

論文の内容の要旨

Identification of a novel redox sensor that mediates delayed activation of stress-responsive MAPK pathways

(新規レドックス・センサー分子による SAPK シグナル
制御機構の解析)

氏名 松下萌恵

<序論>

生体を構成する細胞は、様々な環境ストレス（活性酸素や紫外線など）に常に曝されている。特に、活性酸素は呼吸や感染に伴って生成され、細胞に酸化ストレスをもたらす。活性酸素は細胞内で還元酵素の作用により除去されるが、この様な酸化ストレスに対する応答機構の破綻は癌や慢性炎症性疾患の原因となることが知られている。活性酸素はタンパク質や脂質、DNA などの変性を誘導して細胞にダメージを与える一方で、外部刺激に応じて細胞内にシグナルを伝えるセカンドメッセンジャーとしても機能することが近年報告されている。しかし、細胞が酸化ストレスを感知するメカニズムには未だ不明な点が多く残されている。

細胞のストレス応答を担う機構の一つにストレス応答 MAPK (SAPK : p38 および JNK) 経路がある。SAPK 経路は MAPKKK、MAPKK、MAPK の段階的かつ連続的なリン酸化によって活性化し、アポトーシスや炎症反応、細胞周期の停止などに代表される細胞のストレス応答の制御に重要な役割を果たしており、また、その破綻が癌などの難治性疾患の病態に深く関与することが知られている。

当研究室では、SAPKKK の一つである MAP three kinase 1 (MTK1)を同定し、その活性化機構を解析してきた。これまでに MTK1 は活性化因子 GADD45 との結合によって活性化す

ることが分かっている。GADD45 はストレス誘導遺伝子であり、DNA 損傷やサイトカイン刺激等に応答して合成され、MTK1 の N 末端側に存在する制御ドメインと結合して MTK1 の構造変化 (N-C 相互作用の解除) を誘導する。この構造変化によって MTK1 は二量体化し、トランス自己リン酸化を起こして活性化する。さらに、活性化した MTK1 は p38、JNK 経路を活性化し、細胞のストレス応答を制御する。

本研究において私は、酸化ストレス刺激の場合には GADD45 の転写誘導がほとんど起こらないにも関わらず、MTK1 が強く活性化することを見出した。活性酸素による MTK1 活性化は、タンパク質合成を阻害した場合にも観察されることから、少なくとも酸化ストレス環境下では GADD45 非依存的な新たな MTK1 活性化機構が存在すると考えられる。そこで本研究では、酸化ストレスによる未知の MTK1 活性化機構およびその生理的意義の解明を目指した。

<結果>

まず、酸化ストレス環境下で MTK1 タンパク質が直接酸化される可能性を検証した。その結果、非還元条件でのウェスタンブロットにおいて、過酸化水素刺激依存的に MTK1 の著しいバンドシフトが観察されたことから、酸化ストレス刺激後、MTK1 が速やかに酸化

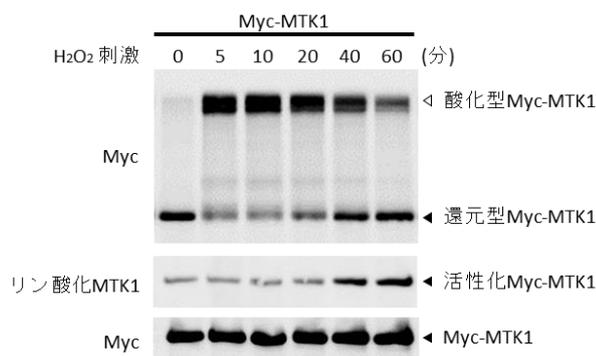


図1 酸化ストレスによるMTK1のバンドシフト(酸化型MTK1)および活性化

されることが分かった (図1上)。一方、MTK1 の活性化は酸化型 MTK1 が還元されるタイミングに一致して起きていることも分かった (図1中、下)。さらに、カタラーゼ阻害剤を用いて細胞内の酸化状態を遷延化させ、MTK1 の還元を抑制したところ、活性化も阻害された。以上の結果から、酸化ストレスによって誘導される MTK1 の活性化には、MTK1 タンパク質の酸化および還元の両方が必要であると考えられる。

一般的に、酸化ストレス環境下ではタンパク質の Cys 残基 (チオール基) が酸化されることが知られている。そこで、MTK1 分子内に存在する Cys 残基の点変異体を系統的に作成して解析したところ、MTK1 の制御ドメイン内に存在する特定の Cys 残基が酸化の標的であることを見出した。さらに興味深いことに、この Cys 残基を Ser に置換することで酸化不能型となった MTK1 点変異体は、GADD45 依存的な活性化能は維持していたものの、酸化ストレスによる活性化能がほぼ完全に消失していることを見出した。従って、この Cys 残基のレドックス制御が、酸化ストレス状況下での MTK1 の活性化に必須であることが明らかとなった。

MTK1 は通常、N 末端側の制御ドメインと C 末端側のキナーゼドメインの抑制的相互作用により不活性状態を保っており、MTK1 の活性化にはこの N-C 相互作用の解消が必要である。そこで、制御ドメインを含む MTK1 N 末端断片とキナーゼドメインを含む C 末端断

片を細胞に共発現させ共免疫沈降実験を行ったところ、酸化ストレス刺激後、酸化型 MTK1 が還元される際に、この N-C 相互作用が解除されることが分かった。

次に、MTK1 の還元を担う細胞内因子の探索を行った。共免疫沈降実験によるスクリーニングの結果、Thioredoxin (Trx)が酸化型 MTK1 と特異的に結合し、MTK1 の還元に伴って解離することが分かった。また、大腸菌から精製したリコンビナント Trx と細胞から精製した MTK1 を試験管内で混合し、*in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、Trx が酸化型 MTK1 を還元して、活性化することが示された。以上の結果から、MTK1 はレドックスセンサー分子として機能しており、酸化ストレス環境下で一旦酸化型となった MTK1 が Trx によって還元されることで活性化する、という新たな酸化ストレス感受・応答機構の存在が明らかとなった (図 2 上)。

さらに、酸化ストレスによる MTK1 活性化の生理的意義を解明するため、MTK1 欠損細胞を作成した。この細胞に酸化ストレスを加えたところ、野生型細胞と比較して、特に刺激後 120 分以降の持続的な p38、JNK の活性が大幅に低下することが確認された。従って、MTK1 は酸化ストレス刺激後に起こる SAPK 活性の遷延化に寄与すると考えられる。

酸化ストレスによって活性化される MTK1 以外の SAPKKK として Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)が報告されている。そこでさらに ASK1 欠損細胞および MTK1 と ASK1 の両方を欠損させた細胞を作成し、同様の解析を行った。その結果、ASK1 欠損細胞では酸化ストレス刺激後 30 分程度で起こる早い段階での p38、JNK 活性の低下が観察され、MTK1/ASK1 欠損細胞では酸化ストレスによる p38、JNK の活性化が早期および遅延期の両方で低下した。すなわち、酸化ストレス環境下においては、まず ASK1 が p38、JNK 経路の早期活性化を誘導し、続いて遅れて活性化する MTK1 が p38、JNK の遅延期の活性化を担うことが示された。

これまでに SAPK 経路の活性持続時間の長短が、細胞死や炎症/免疫応答などを代表とする細胞運命決定の制御に重要であることが示唆されている。そこで、MTK1 欠損細胞を用いて細胞生存アッセイを行ったところ、MTK1 欠損細胞では過酸化水素刺激時における生存細胞の割合が野生型細胞と比べて有意に増加した。即ち、MTK1 による SAPK 活性の遷延化は酸化ストレスによる細胞死誘導に寄与すると考えられる。また、免疫系における MTK1 の役割を解明するため、酵母細胞壁成分であるザイモサンでマクロファージを刺激して酸化バーストを誘導し、これによって誘発される各種炎症性サイトカインの産生量を定量 PCR 法で調べた。その結果、刺激後早期に産生される TNF α の発現量には差が認められなかったが、一方で、刺激 6 時間以降に誘導される IL-6 産生は、野生型に比べて、MTK1 をノックダウンしたマクロファージで有意に抑制されていた。即ち、MTK1 による p38、JNK の持続的な活性化は IL-6 等、特定のサイトカインの産生に寄与することが明らかとなった。

<考察>

活性酸素はタンパク質や脂質、DNA の変性を誘導し、細胞にダメージを与えることが知

られているが、近年、活性酸素がシグナル因子としても機能することが明らかになってきた。本研究では、酸化された MTK1 が Trx によって還元されて活性化し、SAPK 経路を活性化することを見出した。すなわち、SAPKKK である MTK1 自身がレドックスセンサーとして機能することが明らかになった。

また、酸化ストレスによる MTK1 の活性化は p38、JNK の持続的な活性化を誘導することも新たに見出した。これに対して ASK1 は酸化ストレス環境下での早期の p38、JNK の活性化を担うことが示唆された。ASK1 は、Trx との結合によってその活性が抑制されており、酸化ストレス時には Trx が酸化されて ASK1 から解離し、ASK1 の活性化が誘導される。そのため、酸化、還元を経て活性化する MTK1 と比べて ASK1 はより早いタイミングで活性化できるのではないかと考えられる。このように、酸化ストレス環境下では、MTK1 と ASK1 が協調的に活性化することで、p38、JNK の活性化を制御していることが示唆された(図2)。

これまでに報告されているレドックスセンサー分子としては、MAPK phosphatase (MKP) 等のホスファターゼや、Keap1-NRF2 等の転写制御に関わる分子があげられる。特に、MKP は p38、JNK の脱リン酸化を担い、酸化ストレス環境下で直接酸化されて不活性型となり、Trx による還元を経て再び活性化する。酸化ストレス時には MKP の不活性化に伴って p38、JNK が活性化し、細胞死を誘導することも報告されている。そのため、SAPK シグナルの抑制因子である MKP、SAPKKK である MTK1、ASK1 が共に酸化ストレスによる活性制御を受け、細胞レベルでの酸化ストレス応答の一端を担うと考えられる。さらに、IL-6 は、自己免疫疾患や動脈硬化などの病態に密接に関与することから、MTK1 による IL-6 産生がこれらの疾患一因となっている可能性があり、今後のさらなる解析が期待される。

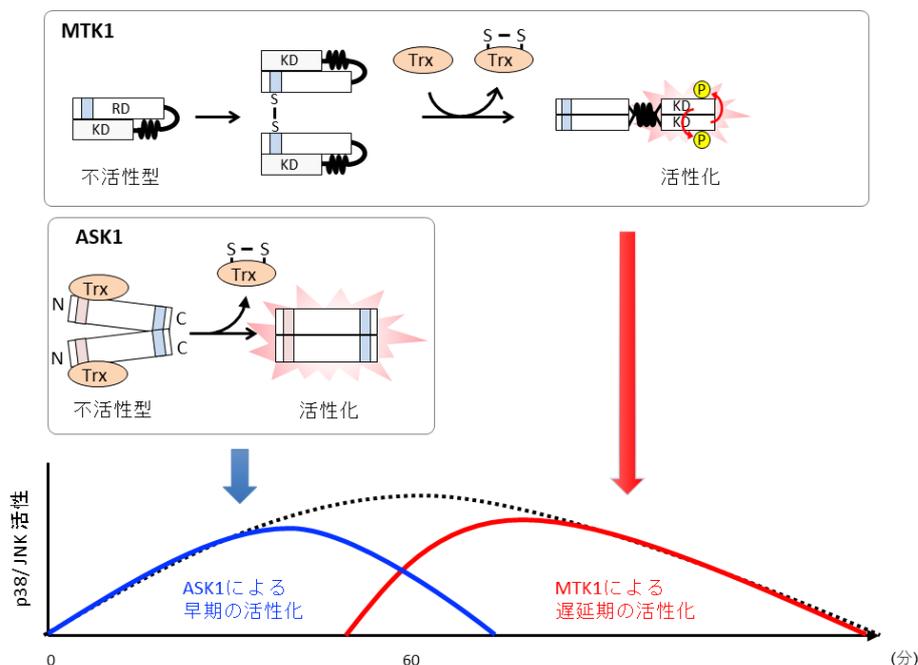


図2 本研究のモデル図。
酸化ストレス刺激時にはp38/JNKの早期の活性化をASK1、遅延期の活性化をMTK1が担う。
RD: 制御ドメイン、KD: キナーゼドメイン