

論文の内容の要旨

論文題目 酸化ストレスによる MAP kinase (ERK)活性化における標的分子の解明

西田 基宏

1. 背景

酸化ストレスとは、生体における酸化・還元バランスが破綻し酸化側に傾いた状態と定義される。病態時において生体内の活性酸素量が増加することから、酸化ストレスは疾患の発症の重要因子として注目されている。活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は、これまで細胞内の蛋白質、脂質、核酸などを非特異的に酸化し、生理機能の障害を引き起こすと考えられてきた。心筋においては、ROS が虚血再灌流やサイトカイン刺激により生成し、アポトーシスや心肥大形成に関与することが報告されている。その一方で、ROS はいくつかの情報伝達経路において、細胞内のメディエーターとして働いていることも知られている。ROS を介した情報伝達は、最近特に注目を集めており、その生理的役割およびメカニズムの解明に向けた研究が精力的に進められている。

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) は mitogen activated protein (MAP) kinase family の一つであり、細胞の増殖・分化・生存に関与している。酸化ストレスは、Src チロシンキナーゼや低分子量 G タンパク質 ras を介して ERK を活性化する (Fig. 1B)。しかし、ROS による ERK にお

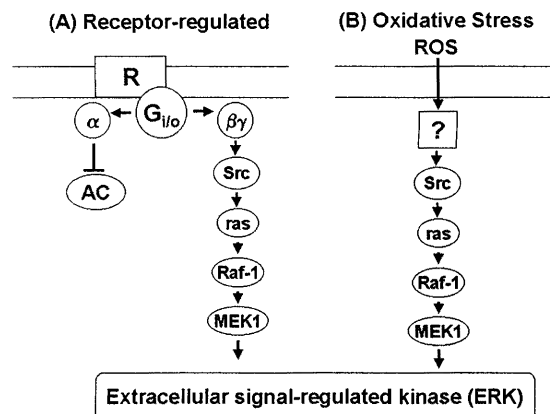


Fig. 1 心筋におけるERK活性化経路

ける最初の標的分子については全くわかっていない。私は、心筋において酸化ストレスによる ERK 活性化経路と G_i タンパク質共役型受容体刺激による ERK 活性化経路が類似していることから (Fig. 1)、ROS の標的分子が G タンパク質ではないかと仮説を立て、検討を進めることにした。

2. 酸化ストレスによる MAP kinase 活性化の特徴

ラット新生仔の心室筋は、酵素的に単離し、高密度 (10^5 cells / cm^2) で培養した。 G タンパク質の $\beta\gamma$ subunit ($G\beta\gamma$) を捕捉し、その機能を阻害する β adrenergic receptor kinase のカルボキシル末端 (β ARK-ct) は、リコンビナントのアデノウィルスを作成し心筋に発現させた。対照群の細胞には LacZ を発現させた。ERK 活性は特異的基質のリン酸化により測定した。酸化ストレスを模倣する試薬として頻用されている過酸化水素 (H_2O_2) 1 mM を 10 分間処置することにより、ERK は最大の活性化を示した。 H_2O_2 を処置する前にあらかじめ β ARK-ct を発現させておくと、 H_2O_2 刺激による ERK 活性化は約 70 % 抑制された (Fig. 2)。受容体非依存的に $G_{i/o}$ 蛋白質を活性化させる mastoparan ($30 \mu M$) 処置による ERK 活性化もまた β ARK-ct の発現により約 50 % 抑制された。しかし、プロテインキナーゼ C を直接活性化するホルボールエステル (PMA) 処置による ERK 活性化に対し、 β ARK-ct の発現は何ら影響を与えなかった。

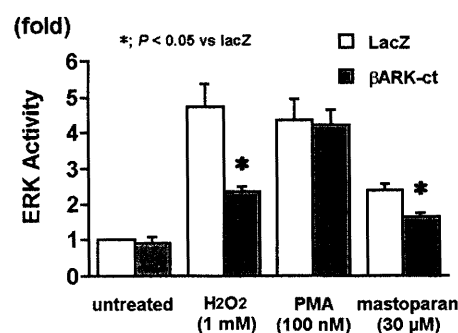


Fig. 2 H_2O_2 刺激による ERK 活性化に対する β ARK-ct の作用

一方、 H_2O_2 刺激は ERK のみならず、ストレス応答性の MAP kinase family である c-Jun N-terminal kinase (JNK) や p38 MAP Kinase も活性化させた。しかし、 β ARK-ct を発現させても H_2O_2 刺激による JNK や p38 MAP kinase の活性化は抑制されなかった。

次に各種阻害剤の効果を調べた。 G_i タンパク質を ADP リボシル化し、受容体との共役を阻害する百日咳毒素 (Pertussis toxin; PTX) やプロテインキナーゼ A 阻害剤 H-89 は、 H_2O_2 刺激による ERK 活性化には何ら影響しなかった。しかし、ホスファチジルイノシトール-3-リン酸キナーゼ (PI3K) の阻害剤である wortmannin と LY294002 は、用量依存的に H_2O_2 処置による ERK 活性化を抑制した (Fig. 3)。チロシンキナーゼ阻害剤である genistein ($10 \mu M$) 処置もまた H_2O_2 刺激による ERK 活性化を抑制した。

さらに Genistein 感受性のチロシンキナーゼ、PI3K および β ARK-ct の関係を調べた。Src の活性は基質のリン酸化により、Akt の活性は抗リン酸化抗体を用いて Western blot により測定した。 H_2O_2 刺激による Akt および Src の活性化は、

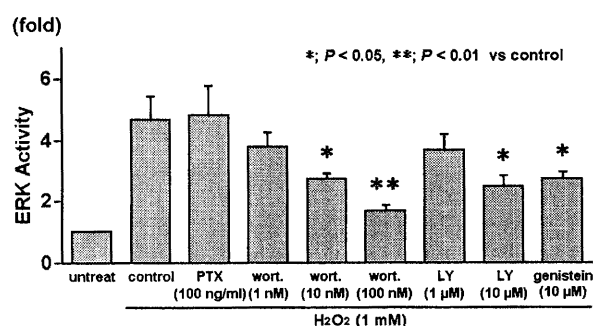


Fig. 3 H_2O_2 刺激による ERK 活性化に対する各種阻害剤の作用

β ARK-ct の発現により部分的に抑制された。しかし、 H_2O_2 刺激による Akt の活性化は wortmannin (100 nM) 処置によりほぼ完全に抑制されたが、genistein 処置では抑制されなかった。以上の結果から、 H_2O_2 刺激は受容体を介さずに G タンパク質を活性化し、解離した $G\beta\gamma$ により PI3K、Src チロシンキナーゼが活性化され、ERK が活性化されることが示唆された。

3. 酸化ストレスによる G タンパク質の活性化

酸化ストレスによって G タンパク質が直接活性化されるか調べるため、ラット新生仔心室筋の細胞膜標品を用いて $[^{35}S]$ GTP γ S の結合活性を測定した。 H_2O_2 刺激により細胞膜への $[^{35}S]$ GTP γ S 結合活性は濃度依存的に増加した。この増加は抗酸化剤である

N-acetyl-L-cysteine の前処置により完全に抑制された (Fig. 4)。この結果は、心室筋細胞膜上の GTP 結合タンパク質が H_2O_2 刺激により活性化されることを示している。しかし、細胞膜標品において GTP γ S の結合活性だけでは結合した G タンパク質が三量体 G タンパク質か低分子量 G タンパク質かわからない。そこで、三量体 G タンパク質は活性型と不活性型でトリプシン消化される部位が異なることを利用して Western blotting により G タンパク質の活性化を調べた。その結果、細胞膜標品において、 G_i と G_o が H_2O_2 処理により活性化されており、 G_q と G_s は活性化されていないことが示された。

さらに直接 G タンパク質が H_2O_2 刺激により活性化されるかを調べるため、精製した三量体 G タンパク質 (G_i 、 G_o 、 G_s) を用いて $[^{35}S]$ GTP γ S 結合活性を測定した。 G_i 、 G_o への $[^{35}S]$ GTP γ S 結合活性は H_2O_2 刺激 10 分後から増大したが、 G_s への $[^{35}S]$ GTP γ S 結合活性は増加しなかった (Fig. 5)。

4. G_o タンパク質の H_2O_2 刺激による活性化のメカニズム

三量体 G タンパク質は α 、 β 、 γ の 3 つの subunit からなっている。PTX は三量体の状態にある G タンパク質のみを ADP リボシル化することから、ADP リボシル化の減少は G タンパク質の活性化を意味する。PTX と $[^{32}P]$ NAD により、G タンパク質が ADP リボシル化されるという方法を用いて、どの subunit が H_2O_2 刺激により修飾を受けて活性化するか検討した。 G_o タンパク質の α subunit ($G_o\alpha$) を H_2O_2 (300 μ M) 刺激し、 $G\beta\gamma$

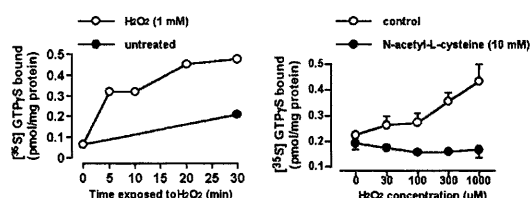


Fig. 4 ラット心室筋細胞膜標品における H_2O_2 刺激による活性化

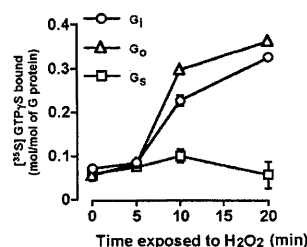


Fig.5 H_2O_2 刺激による三量体 G 蛋白質の活性化

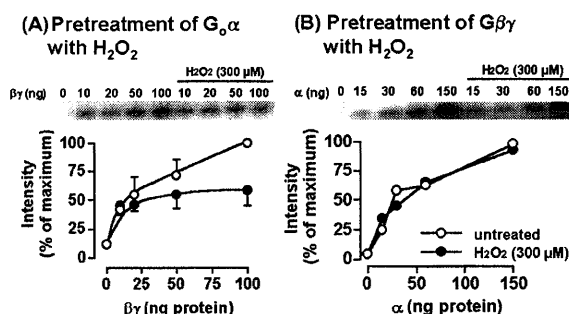


Fig. 6 H_2O_2 前処理した $G_o\alpha$ 、 $G\beta\gamma$ における PTX による ADP リボシル化

の存在下でADP リボシル化を行うと、ADP リボシル化の程度は減少した。これに対し、G $\beta\gamma$ をH₂O₂ (300 μ M) 刺激した後、G α を加えPTXによるADP リボシル化を行った場合、ADP リボシル化の減少は観察されなかった (Fig. 6)。

さらにG α タンパク質の α subunit (G α) がH₂O₂ 刺激により直接活性化されるかどうかを調べた。H₂O₂ 刺激によりG α の [³⁵S] GTP γ S 結合活性は濃度依存的に増加した。以上の結果から、G α がH₂O₂ 刺激により修飾を受け、活性化されることが明らかとなった。

5. 酸化ストレスによる ERK 活性化の生理的役割

心筋では、虚血再灌流時にもROSが産生されることが報告されている。虚血再灌流を模倣する低酸素・再酸素化処理を培養心筋細胞に与えると、ERK 活性が無処置時に比べて約4倍に増加した。この活性化はH₂O₂ 消去剤であるcatalaseにより抑制され、 β ARK-ctの発現によってもさらに抑制された。以上の結果から、心筋細胞において虚血再灌流時に産生されるROSがG $\beta\gamma$ タンパク質を活性化し、遊離したG $\beta\gamma$ がERKを活性化することが示された。

ERKやAktは増殖・分化を引き起こすだけでなく細胞の生存因子として働くことが知られている。ラット新生仔の培養心室筋細胞にH₂O₂ (100 μ M) を48時間処理したところ、40%弱の細胞死が引き起こされた。これに対し、あらかじめ β ARK-ctを発現させておいた細胞では細胞死が60%以上に増加していた。従って、ROSによって活性化されるGタンパク質を介した情報伝達は、酸化ストレスに適応するための保護シグナルとして働くことが示唆された。

6. まとめ

私は、酸化ストレスによるERK活性化の標的分子がGタンパク質 (G $\beta\gamma$, G α) の α subunitであることを初めて明らかにした。またラット新生仔心室筋細胞において、G α の活性化により遊離した $\beta\gamma$ subunitがPI3Kを介してSrc、Akt、ERKを活性化することを明らかにした。本研究結果は、これまで受容体でしか活性化されないと信じられてきたGタンパク質の概念を打ち破る画期的なものであり、またこれまで毒性の面のみが強調されてきたROSが細胞の保護に働く経路をも活性化しうることを示した報告である。

参考文献

Nishida, M., Maruyama, Y., Tanaka, R., Kontani, K., Nagao, T. & Kurose, H. G α_i and G α_o are target proteins of reactive oxygen species. *Nature (London)* 408, 492-495 (2000).

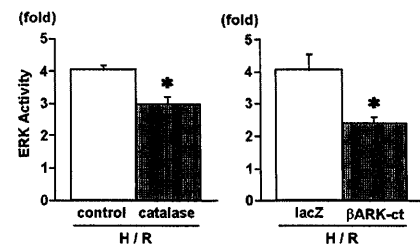


Fig. 7 低酸素・再酸素化刺激によるERK活性化に対する β ARK-ctの作用