

# 論文内容の要旨

## 論文題目

### タンパク質の酸化に依存した細胞内シグナル伝達の解析 (Analysis of intracellular signaling depending on protein oxidation)

氏名 森中 紹文

#### 【序論】

過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)に代表される活性酸素(reactive oxygen species: ROS)は、酸化ストレスを生じて DNA の損傷やタンパク質の凝集を引き起こし、細胞を傷害する毒物としてよく知られる。その一方で ROS は細胞内において能動的に産生される生理的なセカンドメッセンジャーでもある。しかし ROS によるシグナル伝達の分子メカニズムの多くは未解明なのが実情である。そこで私はその一端を解明するため、酸化タンパク質の還元酵素 thioredoxin (TRX)と、酸化によって多量体を形成するタンパク質 peroxiredoxin I (PRX I)に着目し、Semaphorin 3A (Sema3A)による神経軸索の誘導における TRX の役割、および p53 による細胞死における PRX I の役割を解析した。

## I. TRX は CRMP2 の酸化に依存したリン酸化、および神経軸索の誘導を仲介する

#### 【背景】

TRX はジスルフィド結合の還元酵素としてよく知られるが、ROS によるシグナル伝達における役割はよく判っていない。そこで私は TRX の新しい基質タンパク質を探索することで、TRX の役割を解明しようと試み、Semaphorin 3A (Sema3A)シグナルに必要なタンパク質 collapsin response mediator protein 2 (CRMP2)を同定した。

Sema3A は神経軸索を誘導する分泌タンパク質であり、そのシグナル伝達には glycogen synthase kinase 3 (GSK-3)による CRMP2 のリン酸化が必要であるが、そのメカニズムには不明な点が多い。また Sema3A シグナルには ROS によるシグナル伝達の重要性が示唆されるものの、その分子メカニズムは全くの未知であり、CRMP2 のリン酸化と ROS との関係もまた不明である。

#### 【結果および考察】

##### 1. TRX の基質候補 CRMP2 の同定

TRX はまず Cys32 が基質の酸化 Cys 残基とジスルフィド複合体を形成し、さらに Cys32 と Cys35 の間にジスルフィド結合を移動することで基質を還元する(Figure 1A)。Cys35 を Ser 残基に置換した変異体 TRX C35S は基質とジスルフィド複合体を形成するも、その結合は dithiothreitol (DTT)などで還元されないと切断されない。そこで TRX C35S を安定して発現する細胞株を樹立した。さらに TRX C35S の免疫沈降によって共沈した基質を DTT で分離したのち、質量分析法により同定したところ、主要な基質として CRMP2 を同定した(Figure 1B)。そして TRX と CRMP2 が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激に依存してジスルフィド結合による複合体を形成することを確認し、さらにその複合体は TRX と CRMP2 Cys504 の間によることを突き止めた。

##### 2. Sema3A によるシグナル伝達における TRX と CRMP2 の相互作用の重要性

TRX と CRMP2 の相互作用の Sema3A シグナルにおける重要性を検討した。神経細胞の軸索にある成長円錐は Sema3A によって崩壊する(Figure 2A)。そこで CRMP2 と TRX それぞれの野生型および変異体を神経細胞に発現させ、Sema3A による成長円錐の崩壊を解析した。その結果、TRX と相互作用

しない、Cys504 を Ser 残基に置換した変異体 CRMP2 C504S の発現によって Sema3A による成長円錐の崩壊が抑制されることを発見した(Figure 2B)。また、優性阻害の変異体 TRX C32/35S の発現や、RNA 干渉によって TRX の発現を抑制することでも成長円錐の崩壊は抑制された。さらに Sema3A シグナルによる成長円錐の伸長方向の転換や、マウス胎児の大脳皮質における神経細胞の移動においても、これらの変異体の発現によって異常が認められた。

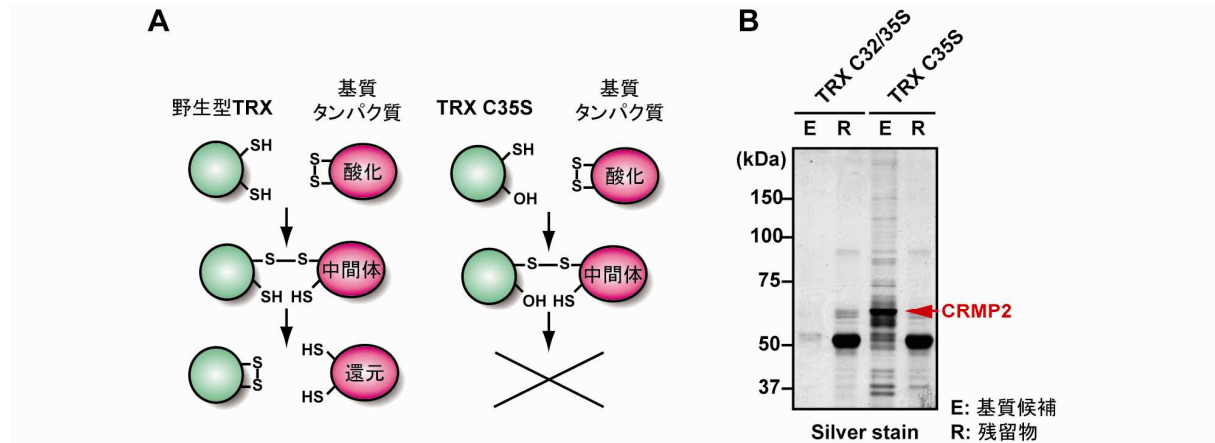


Figure 1. TRX の基質候補 CRMP2 の同定  
 (A) TRX による基質タンパク質の還元と、TRX C35S 変異体を利用した基質タンパク質探索の模式図。  
 (B) TRX 変異体を安定して発現する NIH3T3 繊維芽細胞から TRX 変異体を免疫沈降し、共沈したタンパク質を DTT で分離した。さらに SDS-PAGE とそれに続く銀染色によって基質候補のタンパク質を展開、検出した。

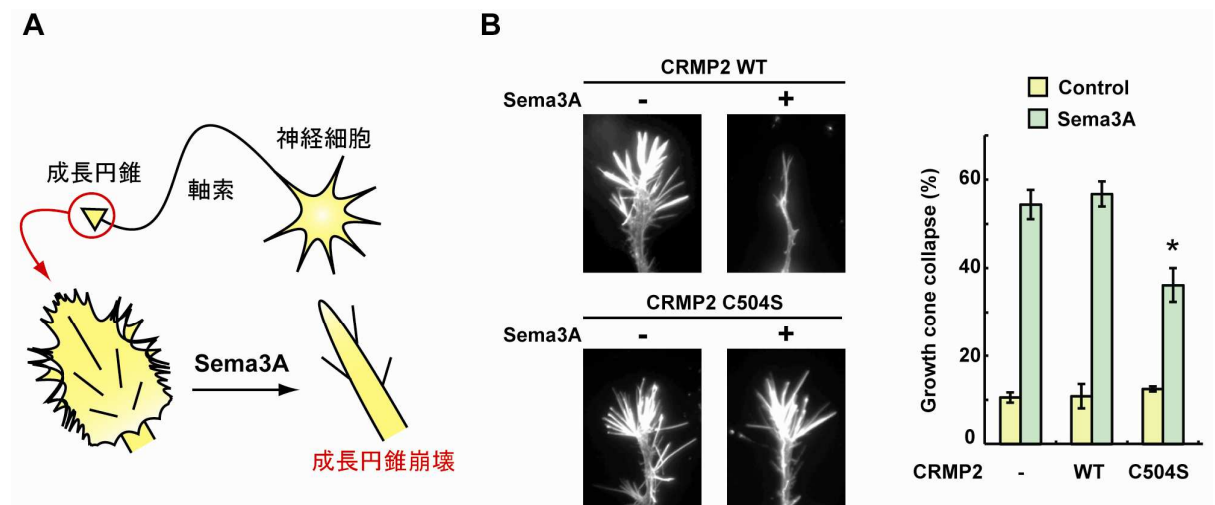


Figure 2. Sema3A によるシグナル伝達における TRX と CRMP2 の相互作用の重要性  
 (A) Sema3A による神経軸索の成長円錐崩壊の模式図。神経軸索の成長円錐は Sema3A によって崩壊する。  
 (B) CRMP2 の野生型もしくは変異体を発現させた DRG 細胞を 0.5 nM Sema3A で 30 分間刺激したのち、固定およびローダミンフロロイジン染色した。糸状仮足が 2 本以下の成長円錐を崩壊したとして計測した。\* は  $p < 0.05$  を示す。

### 3. TRX を介した CRMP2 のリン酸化の分子メカニズム

TRX と CRMP2 の相互作用が Sema3A シグナルを制御する分子メカニズムを解析した。まず  $H_2O_2$  によって GSK-3 による CRMP2 のリン酸化が増加すること、TRX によってそのリン酸化がさらに増幅されることを発見した(Figure 3A)。また CRMP2 C504S や TRX C32/35S の発現ではそれらは起こらないことも見出した。 $H_2O_2$  による CRMP2 の酸化は TRX に還元される。しかし  $H_2O_2$  による CRMP2 のリン酸化は TRX に促進される。これらは一見、矛盾するが TRX は CRMP2 を還元するときに一時的にジスルフィド結合による複合体を形成することを考慮に入れると解決される。つまりジスルフィド結合によって TRX と複合体を形成した CRMP2 がリン酸化されると考えた(Figure 3B)。実際に CRMP2 単量体と比較して

TRX とジスルフィド複合体を形成した CRMP2 はよりリン酸化されることを確認した。

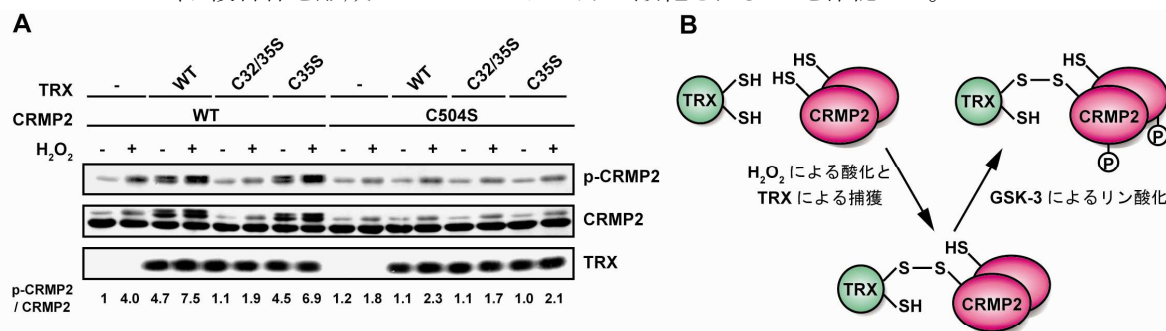


Figure 3. TRX を介した CRMP2 のリン酸化の分子機構

(A) 示されたタンパク質を発現させた COS7 細胞を 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 30 分間刺激したのち細胞を回収し、さらに示された抗体を用いて免疫プロットを行った。

(B) TRX を介した CRMP2 のリン酸化の模式図。酸化された CRMP2 は TRX とジスルフィド結合による複合体を形成し、GSK-3 にリン酸化される。

## 【結論】

以上から Sema3A によって産生された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は CRMP2 を酸化して TRX との間にジスルフィド結合による複合体を形成させることで、CRMP2 のリン酸化を促進してシグナルを伝達すると考えられる。本研究は今まで未解明であったタンパク質の酸化による Sema3A シグナルの一端を解明するものである。またジスルフィド結合による複合体がシグナル伝達に重要であるという報告は本研究が先駆けであり、TRX やその類縁タンパク質が今回の分子メカニズムによって他のシグナル伝達を制御している可能性も考えられ、今後のさらなる研究が期待される。

## II. 多量体 PRX I は p53 による MST1 の活性化に不可欠である

### 【背景】

PRX I は酸化ストレスから細胞を保護する主要な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解酵素であるが、過剰な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に曝されると多量体を形成する性質を持つ。多量体 PRX I は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解活性を失い、代わりにシャペロン様活性を示すことが知られるが、ROS によるシグナル伝達における役割はわかっていない。

一方、mammalian Ste20-like kinase 1 (MST1) は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって活性化されるリン酸化酵素であり、がん抑制タンパク質 p53 によって活性化されて細胞死を引き起こす。しかし H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による MST1 活性化の分子メカニズムや、p53 による MST1 の活性化に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が関係しているのかはわかっていない。私は多量体 PRX I が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による MST1 活性化を仲介し、さらに p53 は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生によって MST1 を活性化しているのではないかと考え、PRX I と MST1 の相互作用の解析を始めた。

### 【結果および考察】

#### 1. 多量体 PRX I は MST1 と特異的に結合することで、MST1 を活性化する

PRX I の多量体形成が PRX I と MST1 の結合にどのような影響を与えるのかを解析した。PRX I が多量体を形成しない定常状態では PRX I と MST1 は弱くしか結合しないが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で細胞を刺激することで PRX I の多量体形成を促進すると、より強く結合した。さらに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> がなくても多量体を形成する変異体 PRX I C173S は定常状態でも MST1 と強く結合し、逆に多量体を形成しない PRX I C52S 変異体は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で細胞を刺激しても弱くしか結合しなかった。

次に PRX I と MST1 の結合が MST1 の活性化と相関するかを解析した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による MST1 の活性化は自己リン酸化の増加によるものであり、その増加は PRX I によって増幅された (Figure 4A)。さらに PRX I C173S 変異体は定常状態でも MST1 の自己リン酸化を強く促進し、逆に PRX I C52S 変異体は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による MST1 の自己リン酸化を増幅しなかった。これらから多量体 PRX I は MST1 に結合することで MST1 の自己リン酸化を促進していると考えられた。また U2OS 骨肉腫細胞において RNA 干渉によって PRX I の発現を抑制すると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による MST1 の自己リン酸化は抑制されることや、MST1 による細胞

死が PRX I の野生型や C173S 変異体によって促進されることを発見した(Figure 4B)。これらから多量体 PRX I が MST1 の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による活性化に重要であると結論した。

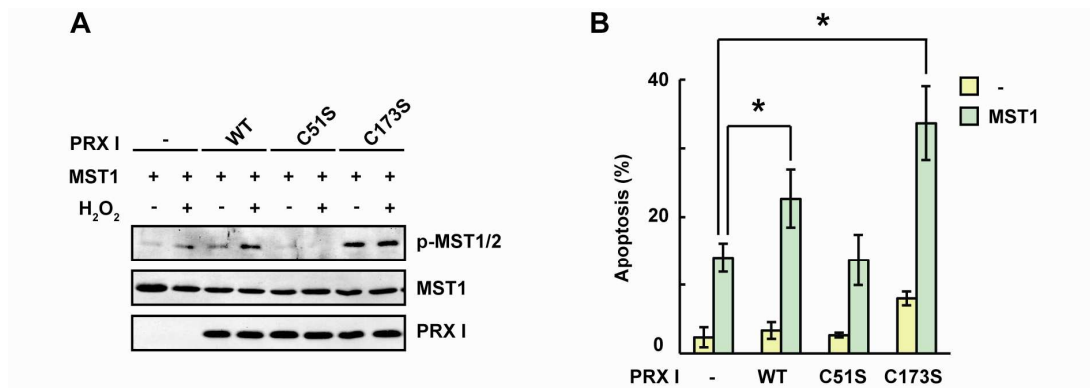


Figure 4. 多量体 PRX I は MST1 を活性化する  
 (A) 示されたタンパク質を発現させた COS7 細胞を 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 30 分間刺激したのちに回収し、さらに示された抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。  
 (B) 示されたタンパク質を発現させた U2OS 細胞を固定、DAPI 染色したのち細胞死の割合を計測した。\*は p<0.05 を示す。

## 2. PRX I は p53 による MST1 の活性化と細胞死を制御する

PRX I による MST1 活性化の、p53 による細胞死における重要性を検討した。p53 は抗がん剤シスプラチンによってその発現が誘導され、ROS を産生することで細胞死を引き起こす。そこで U2OS 細胞をシスプラチンで処理したところ、PRX I が多量体化することや、PRX I と MST1 の結合が強化されることを発見した。さらにシスプラチン処理による MST1 の自己リン酸化の増加、および細胞死は PRX I の RNA 干渉によって抑制された(Figure 5A)。また、p53 欠損マウス胎児線維芽細胞ではシスプラチンで処理しても PRX I は多量体を形成しないことや、MST1 の自己リン酸化が起こらないことから、これらは p53 に依存することが判った(Figure 5, B and C)。

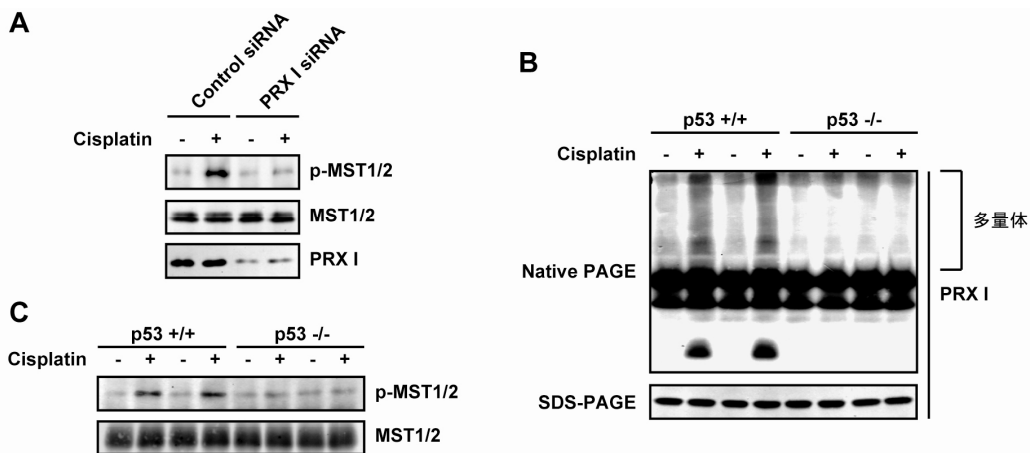


Figure 5. PRX I は p53 による MST1 の活性化と細胞死を制御する  
 (A) 対照もしくは PRX I に対する siRNA を導入した U2OS 細胞をシスプラチンで 24 時間処理したのちに回収し、さらに示された抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。  
 (B) 野生型もしくは p53 欠損 MEF をシスプラチンで 24 時間処理したのちに回収し、Native PAGE もしくは SDS-PAGE で展開したのち抗 PRX I 抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。  
 (C) 野生型もしくは p53 欠損 MEF をシスプラチンで 24 時間処理したのちに回収し、示された抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。

## 【結論】

以上から H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって多量体を形成した PRX I は MST1 と特異的に結合し、MST1 の自己リン酸化を促進することで MST1 を活性化することが判った。さらに多量体 PRX I による MST1 の活性化は p53 による細胞死に重要であることも判明した。本研究は p53 による細胞死の新たな分子メカニズムを解明す

るものであり、抗がん剤シスプラチンによるがん治療の改善に役立つ可能性がある。