

博士学位論文

酸化ストレス時の部位特異的グルタチオン  
化修飾による 90-kDa ribosomal S6 kinase 1  
の活性阻害メカニズムについて

平成 26 年

昭和薬科大学大学院 薬学研究科

薬学専攻 博士課程

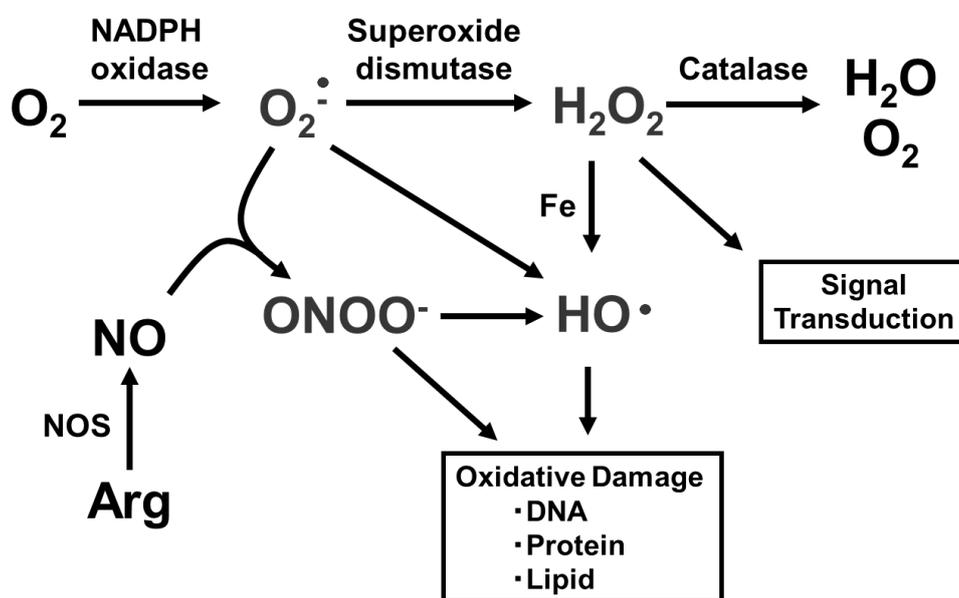
高田 剛

## 目次

1. 序論.....	1
2. 実験材料と方法.....	8
2-1. 試薬.....	8
2-2. cDNA.....	8
2-3. 抗体.....	8
2-4. 細胞培養、遺伝子導入、酸化処置.....	9
2-5. 細胞の可溶化、免疫沈降法.....	9
2-6. 電気泳動およびウェスタンブロッティング.....	9
2-7. 酸化処置による RSK1 不活性化.....	10
2-8. 変異体の構築.....	10
2-9. <i>in vitro</i> における nNOS リン酸化.....	10
3. 結果.....	11
3.1. S-グルタチオン化処置による RSK1 活性への影響.....	11
3.2. RSK1 S-グルタチオン化修飾の検出.....	13
3.3. RSK1 S-グルタチオン化修飾部位の特定.....	15
3.4. 細胞内 nNOS リン酸化に対する RSK1 Cys <sup>223</sup> S-グルタチオン化の影響.....	19
3.5. ROS および RNS による RSK1 活性への影響.....	22
3.6. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> による RSK1 酸化修飾部位の特定.....	24
3.7. 細胞内 nNOS リン酸化に対する H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> による RSK1 酸化修飾の影響.....	26
4. 考察.....	28
5. 結論.....	33
6. 参考文献.....	34
7. 謝辞.....	41
8. 本論文内容の誌上発表.....	42

## 1. 序論

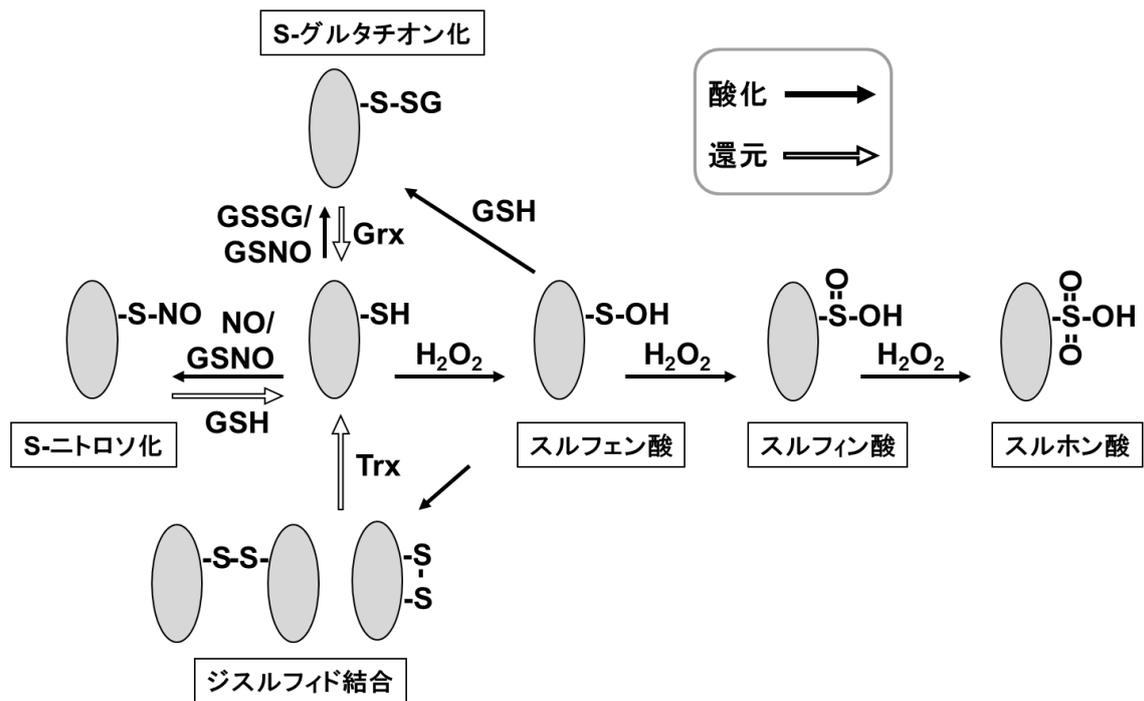
Reactive oxygen species (ROS) は superoxide ( $O_2^-$ )、hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )、hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) など酸素分子に由来する反応性が高い分子群であり、生体内の酸化還元平衡を崩すことで酸化ストレスを引き起こす<sup>1)</sup>。酸素呼吸を行う生物では、ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系から低い頻度で電子が外部に漏れ出し、それを酸素が直接受容することで、superoxide が発生する<sup>2)</sup>。Superoxide は superoxide dismutase や catalase により  $H_2O_2$  を経て代謝されるが、nitric oxide synthase (NOS) により産生される nitric oxide (NO) と反応することでより反応性の高い peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) や hydroxyl radical を生じる。過剰に蓄積した ROS は細胞構成物質の酸化的障害を引き起こし、さまざまな疾患や老化を促進することが知られている<sup>3)</sup>。そのため、これまで ROS は「受動的に生成する毒物」としてその有害作用だけが考えられてきた。ところが、近年では細胞が NADPH oxidase などの酵素により ROS を積極的に作り、細胞の運命や機能を調節する「シグナル分子」として利用していることが注目されている<sup>1,4,5)</sup> (Fig. 1)。つまり、私たちは過剰な ROS から逃れると同時に、それをシグナルとしても利用しており、その正負両面の微妙なバランスの上に生命が成り立っている。



**Fig. 1. ROS の形成、代謝、細胞効果の生化学的経路**

「Wells P. G., McCallum G. P., Chen C. S., Henderson J. T., Lee C. J., Perstin J., Preston T. J., Wiley M. J., and Wong A. W., *Toxicol. Sci.*, **108**, 4-18 (2009).」<sup>1)</sup>より引用改変。

ROS のシグナル分子としての作用において、求核性が非常に高いシステイン (Cys) チオールが生体内の適切なレドックス (Reduction/ Oxidation) 状態の維持に主要な役割を担っている<sup>6)</sup>。なかでも、グルタチオンはチオールを有する生体物質の中では細胞内に最も豊富に存在するため、生理的なレドックスの均衡に大きく貢献している。グルタチオンはヒト体内において還元型グルタチオン (GSH)、酸化型グルタチオン (GSSG)、*S*-ニトロソグルタチオン (GSNO)、そして最も重要であると考えられているタンパク質とグルタチオンがジスルフィド結合した *S*-グルタチオン化タンパク質 (PSSG) などいくつかのレドックス形態を生じる<sup>7)</sup>。近年、多くのタンパク質がその活性を制御するために ROS を利用することが知られており、タンパク質チオールはレドックス反応によりスルフェン酸、スルフィン酸、スルホン酸、並びにジスルフィド結合、*S*-グルタチオン化、および *S*-ニトロソ化といったさまざまな修飾を形成する<sup>6, 8-10)</sup> (Fig. 2)。重度の酸化修飾は細胞のアポトーシスおよび機能喪失を引き起こすが<sup>11)</sup>、チオールはレドックス感受性スイッチとして働き<sup>12)</sup>、チオールの酸化修飾は遺伝子発現<sup>13)</sup>、エネルギー代謝<sup>14, 15)</sup>、リン酸化反応<sup>16-18)</sup>、タンパク質局在化<sup>19)</sup>などの多様な細胞プロセスに関わっている。細胞内において酸化されたチオールは thioredoxin (Trx)、glutaredoxin (Grx)、glutathione reductase (GR) によって還元される<sup>20)</sup>。

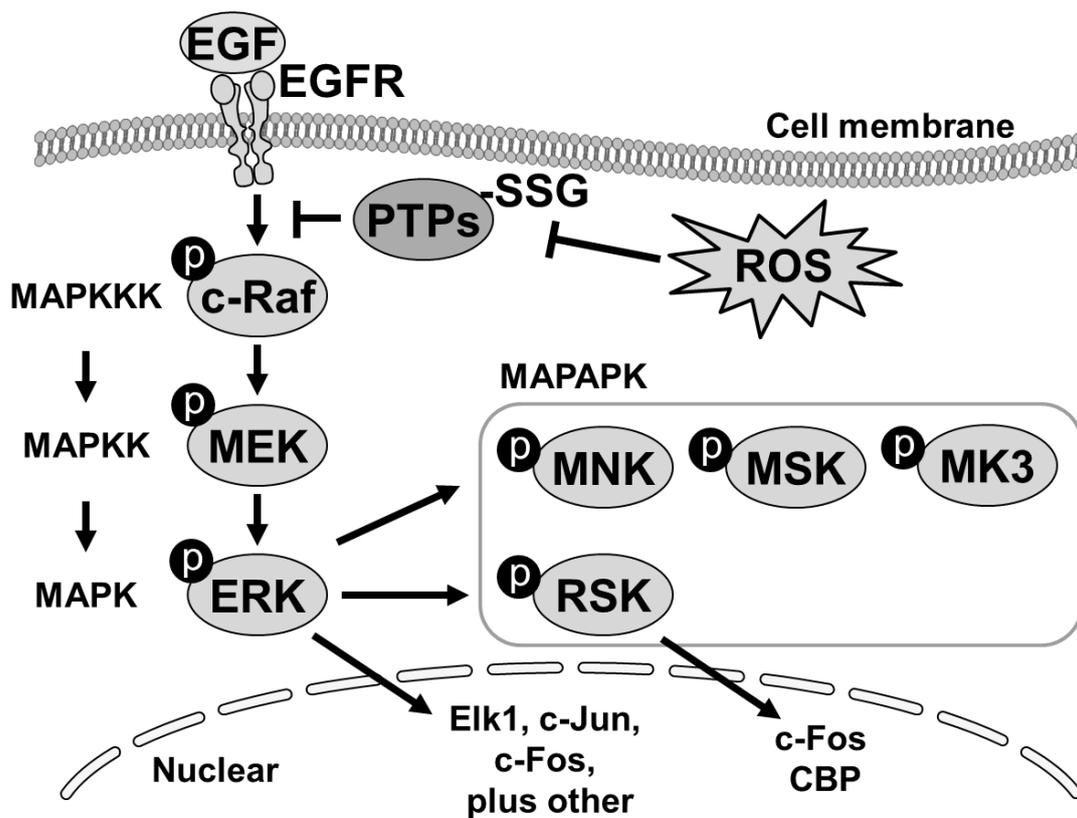


**Fig. 2. タンパク質チオールの酸化修飾**

「Garcia-Garcia A., Zavala-Flores L., Rodriguez-Rocha H., and Franco R., *Antioxid. Redox Signal.*, **17**, 1764-1784 (2012).」<sup>6)</sup>より引用改変。

ROS のシグナル分子としての生理的な作用の 1 つに mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル系の活性化が報告されている<sup>21)</sup>。MAPK シグナル系は多様な細胞の生存、成長、増殖、分化を促進するシグナルを細胞膜から核内に伝える際に中心的役割を果たしている<sup>22)</sup> (Fig. 3)。MAPK シグナル系の 3 つの酵素はすべてタンパク質リン酸化酵素であり、上皮細胞成長因子 (EGF) などの刺激により Raf、MEK1/2、ERK1/2 と順次リン酸化され活性化し、protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) などの脱リン酸化により活性化が抑制される。MAPK シグナル系の広範囲な機能制御は MAPK activated protein kinases (MAPKAPKs) とよばれるファミリーを含めたいくつかの基質をリン酸化することで調節される<sup>23)</sup>。このシグナル系の異常により多種類のがんを含めた種々の障害や疾患が引き起こされる<sup>24)</sup>。これまでに複数の細胞種において ROS 産生を惹起する細胞刺激により MAPK シグナル系が活性化することが確認されている<sup>21, 25)</sup>。さらには、細胞外からの Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の直接的な暴露は酸化ストレスを模倣し、MAPK シグナル系を活性化する<sup>26, 27)</sup>。しかしながら、ROS がどのように MAPK シグナル系を制御しているのかは十分に解明されていない。ROS

はタンパク質チオール基の酸化修飾によってタンパク質の構造や機能を変化させることができるため<sup>6)</sup>、この ROS によるシグナルタンパク質の酸化修飾が MAPK シグナル系活性化の機序である可能性が考えられる。実際、ROS により PTP1B が S-グルタチオン化されることで活性阻害され、間接的に MAPK シグナル系を活性化することが報告されている<sup>28)</sup>。しかし、MAPK シグナル系の ROS による直接的な標的分子については不明である。また、MAPK 信号系の下流基質への ROS の影響については詳細な検討がなされていない。

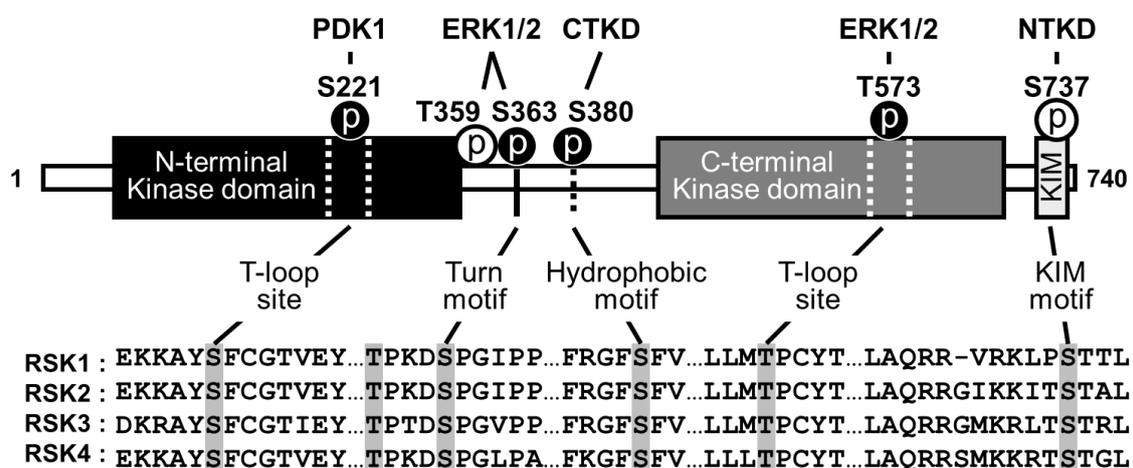


**Fig. 3. MAPK シグナル系活性化の模式図**

「Rubinfeld H., and Seger R., *Mol. Biotechnol.*, **31**, 151–174 (2005).」<sup>22)</sup>より引用改変。

90-kDa ribosomal S6 kinases (RSKs) はセリン/スレオニンリン酸化酵素ファミリーの 1 つであり、MAPKAPKs に位置づけられている<sup>29)</sup>。哺乳類において、RSK は 4 つのアイソフォーム (RSK1-4) が知られている。それらは別々の遺伝子産物であり、75~80% の配列同一性によって特徴付けられる。RSKs は N-terminal kinase domain (NTKD) と C-terminal kinase domain (CTKD) の 2 つの機能タンパク質キナーゼドメイン

ンを持っており、それらは疎水性モチーフ、回転モチーフを含む重要な制御領域である約 100 アミノ酸のリンカー領域によって連結されている<sup>30)</sup> (Fig. 4)。NTKD はさまざまな下流基質をリン酸化するが、CTKD の機能としては NTKD の活性化だけが知られている。RSK の活性化には 6 か所のリン酸化が関わっており、これらのリン酸化サイトは RSK1-4 に高度に保存されている。RSK1 の活性化には Ser<sup>221</sup>、Ser<sup>363</sup>、Ser<sup>380</sup>、Thr<sup>573</sup> のリン酸化が重要であるといわれているが、Ser<sup>363</sup> リン酸化による NTKD 活性化機構はまだ明らかにされていない。RSK1 の kinase interaction motif (KIM) に ERK が結合し、ERK1/2 によってまず CTKD の Thr<sup>573</sup> のリン酸化が起こり、それに続いて CTKD による疎水性モチーフの Ser<sup>380</sup> の自己リン酸化が起こる<sup>31)</sup>。このリン酸化は 3-phosphoinositide- dependent protein kinase 1 (PDK1) の結合を誘導し、PDK1 による NTKD の Ser<sup>221</sup> のリン酸化が起こることによって活性が最大になる<sup>32)</sup>。活性化された RSK は生存や、運動性、細胞増殖を含めた多様な細胞内プロセスを制御する多くの細胞内基質や、核内基質のリン酸化を促進する<sup>33)</sup>。



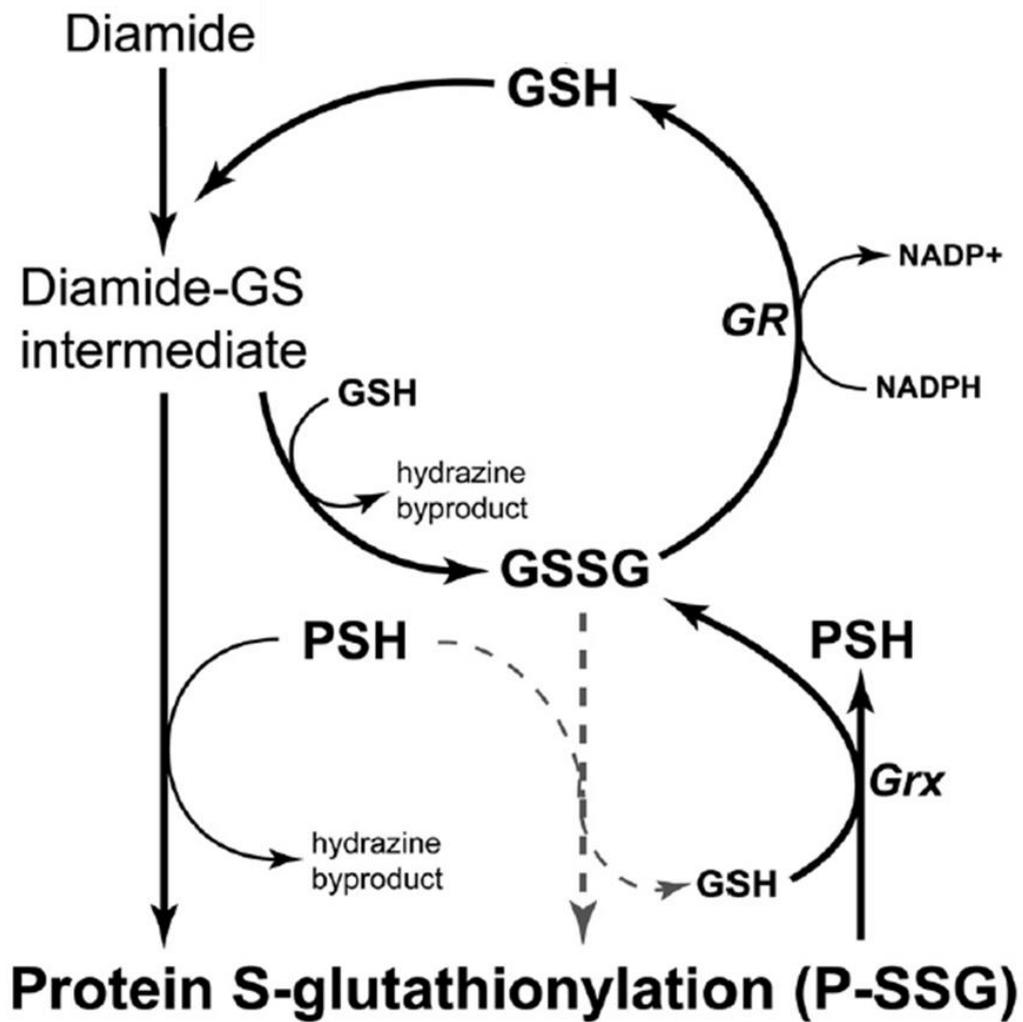
**Fig. 4. RSK1 の主要な機能領域の模式図**

「Romeo Y., Zhang X., Roux P. P., *Biochem. J.*, **441**, 553-569 (2012).」<sup>30)</sup>より引用改変。

当研究室ではこれまでに EGF により活性化した RSK1 が neuronal nitric oxide synthase (nNOS) の Ser<sup>847</sup> をリン酸化することで nNOS の酵素活性を抑制し、nitric oxide (NO) 産生量を制御することを報告している<sup>34)</sup>。ROS により MAPK シグナル系が活性化されることから、nNOS Ser<sup>847</sup> のリン酸化も増加することが予想されるが、ROS

による nNOS Ser<sup>847</sup> のリン酸化への影響については報告がない。さらに RSK1 に対する ROS の直接的な影響についても不明である。MAPK シグナル系の活性化が PTP1B の S-グルタチオン化により制御されていたことから<sup>28)</sup>、ROS による RSK1 の直接的な影響として S-グルタチオン化修飾に着目した。

可逆的に形成されるタンパク質 S-グルタチオン化はチオール修飾のなかで一般的な修飾である。GSH は細胞内に豊富に存在し、スルフェン酸や S-ニトロソ化は S-グルタチオン化に転換されることから、レドックスシグナル伝達において S-グルタチオン化は共通の特徴であることが示唆されている<sup>35)</sup>。チオール基選択的酸化剤である [diazenedicarboxylic acid bis (N, N-dimethylamide)] (diamide) は、タンパク質 S-グルタチオン化形成を促進するため、S-グルタチオン化される標的タンパク質の同定とそのタンパク質の生理機能への効果の検討に利用されている<sup>36)</sup> (Fig. 5)。Diamide は、ROS 産生や ROS 処置に付随する煩雑さを排除して簡易的にタンパク質チオール基への影響を観察できる。そこで、diamide を用いることで RSK1 の S-グルタチオン化を引き起こし、それによる活性制御の可能性について検討することにした。その結果、RSK1 の Cys<sup>223</sup> が S-グルタチオン化を受けることで、直接活性阻害されることを見出した。さらに diamide 処置により MAPK シグナル系はリン酸化され活性化しているにもかかわらず nNOS Ser<sup>847</sup> はリン酸化されないことを明らかにした。本研究では ROS による MAPK シグナル系の活性化が RSK1 の直接的な活性阻害により抑制され、nNOS リン酸化が抑制されるという重要な知見を得たので以下に記述する。



**Fig. 5. Diamide** によるタンパク質 S-グルタチオン化とその代謝の模式図

「Lock J. T., Sinkins W. G., and Schilling W. P., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **300**, H493-H506 (2011).」<sup>36)</sup>より引用改変。

## 2. 実験材料と方法

### 2-1. 試薬

Diamide と GSH は Sigma-Aldrich (社) より購入した。ヒト EGF は Roche (社) より購入した。Diethylamine NONOate (DEA-NONOate) は同仁化学 (社) より購入した。S-Nitrosocysteine (CSNO) は 100 mM L-cysteine (Sigma-Aldrich (社)) と 100 mM NaNO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich (社)) を 1: 1 で混合した後、5  $\mu$ l の 12 N HCl (関東化学 (社)) を加え全量 100  $\mu$ l として調製した。S-Nitrosoglutathione (GSNO) は 100 mM GSH と 100 mM NaNO<sub>2</sub> を 1: 1 で混合した後、5  $\mu$ l の 12 N HCl を加え全量 100  $\mu$ l として調製した。Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、Dithiothreitol (DTT) は和光純薬工業 (社) より購入した。[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (6,000 Ci/mmol) は Perkin-Elmer (社) より購入した。ECL prime ウェスタンブロットング検出試薬は GE Healthcare (社) より購入した。その他実験に使用した試薬は全て特級品を使用した。

### 2-2. cDNA

RSK1 cDNA はマウス脳 cDNA ライブラリーからクローン化し、pME18s-FLAG ベクターに挿入した。nNOS cDNA はラット脳 cDNA ライブラリーからクローン化し、pME18s-ベクターに挿入した。

### 2-3. 抗体

ウサギ anti-Ser<sup>847</sup>phospho-nNOS polyclonal antibody は神奈川歯科大学の野崎直仁博士より分与して頂いた。ウサギ anti-nNOS polyclonal antibody は Santa Cruz Biotechnology (社) より購入した。ウサギ anti-Thr<sup>573</sup>phospho-RSK1 polyclonal antibody は Cell Signaling Technology (社) より購入した。ウサギ anti-RSK1 polyclonal antibody は Sigma-Aldrich (社) より購入した。マウス anti-glutathione monoclonal antibody は Virogen (社) より購入した。ウサギ anti-phospho-ERK1/2 polyclonal antibody およびウサギ anti-ERK1/2 polyclonal antibody は Cell Signaling Technology (社) より購入した。anti-rabbit IgG-HRP および anti-mouse IgG-HRP は GE Healthcare (社) より購入した。

#### 2-4. 細胞培養、遺伝子導入、酸化処置

ヒト胎児由来腎臓 293 細胞 (HEK293) は 10% fetal bovine serum (CCB (社)) を添加した DMEM 培地 (Nacalai Tesque (社)) を用いて 6 cm dish で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。ラット副腎髄質褐色細胞腫 (PC12) は 5% fetal bovine serum、5% horse serum (Gibco (社)) を添加した RPMI1640 培地 (Nacalai Tesque (社)) を用いて 6 cm dish で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。24 時間培養後、HEK293 および PC12 へ pME18s-FLAG-RSK1、pME18s-nNOS を Lipofectamine LTX (Invitrogen (社)) を用いて遺伝子導入し、36-48 時間培養した。その後無血清培地に置換し 18 時間後、各種試薬を滴下した。処置終了時間に、培地を吸引搾取し、細胞を液体窒素にてすばやく凍結した。

#### 2-5. 細胞の可溶化、免疫沈降法

凍結した細胞を TNE buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、1 mM PMSF、100 μM EDTA、100 μM EGTA、10 μg/ml leupeptin、10 μg/ml aprotinin、10 mM sodium pyrophosphate、50 mM sodium fluoride、1 mM sodium orthovanadate、1% Nonidet P-40) で回収し、超音波処理した後、15,000 x g で 15 分間遠心し上清を回収した。可溶化液に 10 μl の anti-FLAG M2 Affinity gel (50% slurry, Sigma-Aldrich (社)) を加え 4°C、1 時間転倒混和した。遠心により gel を沈降させ上清を除去した後、400 μl TNE buffer で 2 回洗浄した。洗浄後 150 ng/μl の 3 x FLAG ペプチド (Sigma-Aldrich (社)) 40 μl により 4°C、20 分間弱くボルテックスすることで目的タンパク質を溶出した。

#### 2-6. 電気泳動およびウェスタンブロッティング

可溶化液中のタンパク質量を Bradford 法により測定した後、1/4 量の 5 x sample buffer (250 mM Tris [pH 6.8]、8% SDS、40% glycerol、0.02% bromophenol blue、10% 2-mercaptoethanol) と混和して 95°C で 5 分間加熱し、一定量のタンパク質を SDS-PAGE によって分離した。これを PVDF 膜に転写した後、各種一次抗体およびそれに対応する二次抗体でラベルし、ウェスタンブロッティング検出試薬 ECL prime を用いて検出した。

## 2-7. 酸化処置による RSK1 不活性化

精製した RSK1 は 250 mM HEPES [pH 7.5]、0.5 mM EDTA 溶液中で、100  $\mu$ M GSH 存在下 0.01-1 mM diamide、0.1-10 mM NO donor、0.1-10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と 25°C で 10 分間反応させた後、活性測定に用いた。Glutaredoxin 処置は、GSH/diamide 処置後にヒト組み換え 0.04 mg/ml glutaredoxin (AbFrontier (社)) を 500  $\mu$ M GSH 存在下反応させた。RSK1 活性は、活性測定溶液 (40 mM HEPES [pH 7.5]、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGTA、10  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP、50  $\mu$ M S6 Kinase/Rsk substrate Peptide 1 [ヒト S6 ribosomal protein の合成リン酸化ペプチド (RRRLSSLRA)][Upstate (社)]) に RSK1 を加え全量 25  $\mu$ l とし、30°C で 10 分間反応させた後測定した。測定はそれぞれの反応溶液 20  $\mu$ l を Whatman P-81 phosphocellulose paper (GE Healthcare) にスポットし、75 mM phosphoric acid で洗浄後、<sup>32</sup>P の取り込み量を液体シンチレーション計測法により測定した<sup>37)</sup>。

## 2-8. 変異体の構築

RSK1 プラスミド DNA を鋳型として、RSK1 配列中の 223 番目の Cys を Ser に置換したプライマーで QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用い、RSK1 C223S 変異体を作製した。作製したのち RSK1 C223S 変異体の塩基配列を確認した。

## 2-9. *in vitro* における nNOS リン酸化

組み換え型ラット nNOS を含んだ *E. Coli* のペレットを 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM EDTA、2 mM EGTA 中で超音波処理し可溶化した後、可溶化液に 10  $\mu$ l の ADP-agarose (50% slurry, Sigma-Aldrich (社)) を加えカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製した nNOS は前処置した RSK1 と共に活性測定溶液 (40 mM HEPES [pH 7.5]、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGTA、1 mM ATP) に加え、30°C で 10 分間リン酸化反応させ、5 x sample buffer を加えることで反応を停止させた。反応液は電気泳動後、表示した抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。

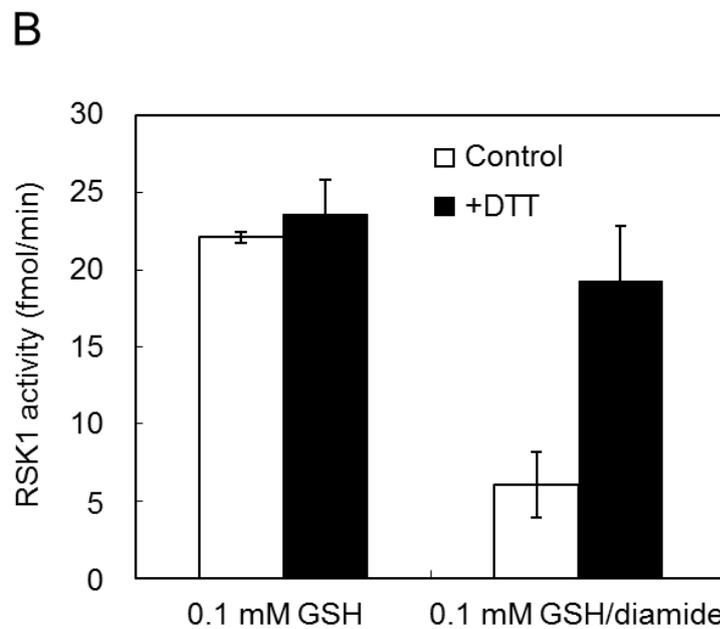
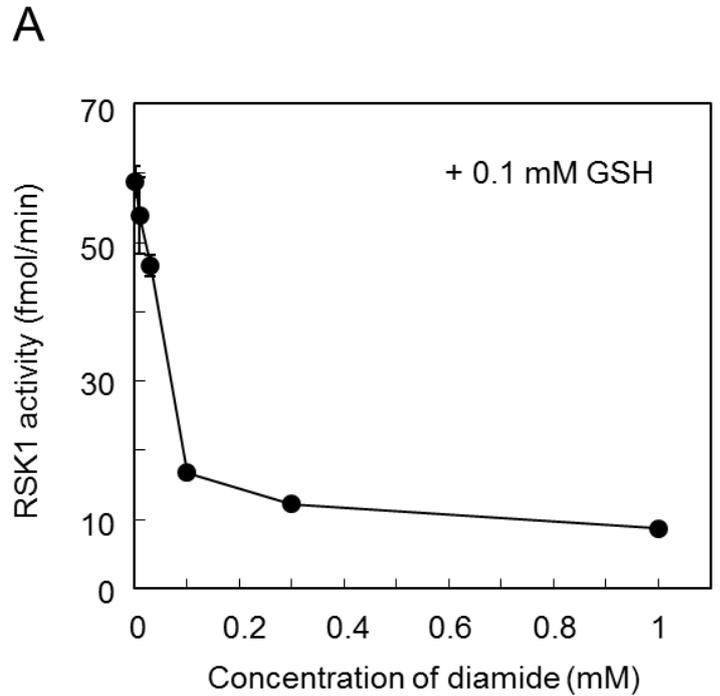
### 3. 結果

#### 3.1. S-グルタチオン化処置による RSK1 活性への影響

チオール基選択的酸化剤 **diamide** のタンパク質 *S*-グルタチオン化形成の促進作用は、*S*-グルタチオン化される標的タンパク質の同定とそのタンパク質の生理機能や活性への効果を検討するために利用される<sup>36)</sup> (Fig. 5)。ROS 産生や ROS 処置に付随する煩雑さを排除して簡易的にタンパク質チオール基への影響を観察できるためこの方法を用いた。

まず最初に還元型グルタチオン (GSH) 存在下 **diamide** を用いた *S*-グルタチオン化処置による RSK1 活性に対する効果を検討した。精製した活性化 RSK1 を 100  $\mu$ M GSH 存在下 **diamide** (0.01-1 mM) で 10 分間反応させることにより **diamide** 濃度 0.1mM のときに 29%、1 mM のときには 15%まで活性の低下がみられた (Fig. 6A)。

次に *S*-グルタチオン化処置による活性阻害の可逆性について検討した。精製した活性化 RSK1 を 100  $\mu$ M GSH 存在下 100  $\mu$ M **diamide** で 10 分間反応させることにより 27%まで活性の低下がみられ、この活性低下は 20 mM DTT の後処置により 82%まで回復した (Fig. 6B)。*S*-グルタチオン化処置により可逆的に RSK1 活性の阻害がみられたことから RSK1 は *S*-グルタチオン化されることが予想された。



**Fig. 6. Diamide/GSH による RSK1 活性への影響**

(A) 精製した RSK1 を 0.1 mM GSH 存在下において図中の diamide 濃度 (0.01-1 mM) で 25°C、10 分間処置した。RSK1 の酵素活性は 50  $\mu$ M S6 Kinase/RSK Substrate Peptide 1 と 10  $\mu$ M [ $\gamma$ -32P] ATP を用いて 10 分間反応させ測定した。(B) 精製した RSK1 を 0.1 mM GSH 存在下 0.1 mM diamide で 25°C、10 分間処置したのち、20 mM DTT で 10 分間処置した。RSK1 の酵素活性は (A) で記述した方法で測定した。

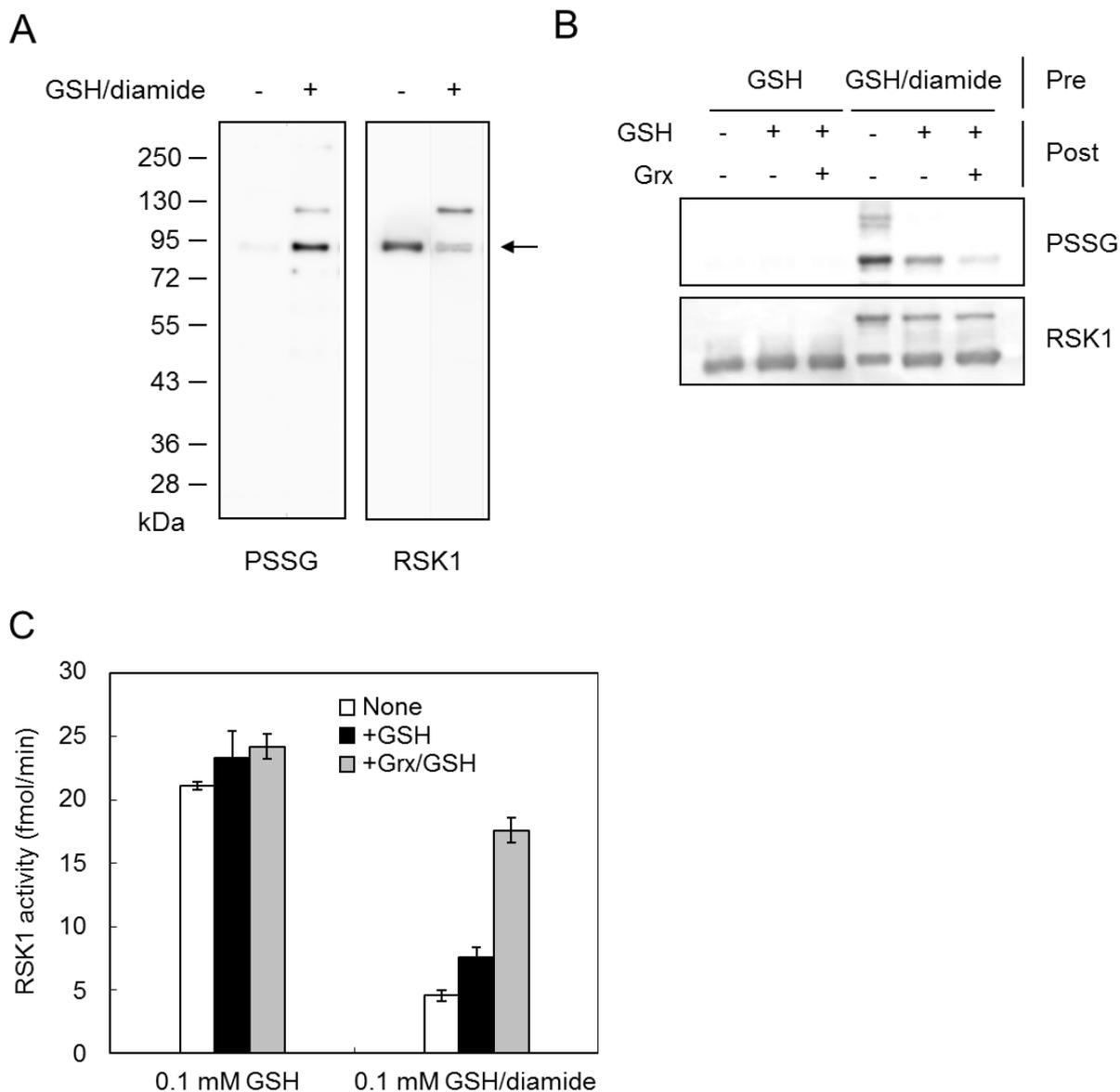
### 3.2. RSK1 S-グルタチオン化修飾の検出

これまでの実験結果より GSH と diamide を用いた S-グルタチオン化処置により可逆的に RSK1 活性が阻害されることが判明した。そこで、実際に RSK1 が S-グルタチオン化されているのか確認するためにグルタチオン-タンパク質複合体を抗原にした抗グルタチオン抗体 (PSSG) を用いることで S-グルタチオン化 RSK1 の検出を試みた。

精製した RSK1 を GSH と diamide の有無において 10 分間反応させ、抗グルタチオン抗体 (PSSG) あるいは抗 RSK1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。S-グルタチオン化は可逆的な酸化修飾であることから非還元条件下で行った。無処置において S-グルタチオン化のバンドがみられなかったのに対し、GSH と diamide の処置により RSK1 の S-グルタチオン化を検出できた (Fig. 7A)。これにより GSH/diamide 処置により RSK1 が S-グルタチオン化されることが明らかとなった。また、この処置により RSK1 の 90 kDa のバンドに加えて 120 kDa のバンドが検出された (Fig. 7A)。このバンドについては考察で言及する。

チオールトランスフェラーゼとして知られているグルタレドキシシン (Grx) は GSH 依存的な機構により S-グルタチオン化タンパク質を選択的に還元する<sup>20)</sup> (Fig. 5)。精製した RSK1 を GSH (100  $\mu$ M) と diamide (100  $\mu$ M) で 10 分間処置した後、Grx (3.3  $\mu$ M) と GSH (500  $\mu$ M) の有無により反応させ、抗グルタチオン抗体 (PSSG)を用いた免疫ブロットにより解析した。分子量 90 kDa と 120 kDa 付近に存在した S-グルタチオン化 RSK1 は Grx と GSH の処置により減少した (Fig. 7B)。一方、120 kDa 付近の RSK1 の総量は Grx と GSH の処置により変化しなかった。

次に、Grx の触媒作用が GSH/diamide が惹起する RSK1 不活性化を回復するかどうか検討した。GSH と diamide により 22%まで低下した RSK1 の活性は Grx と GSH により 73%まで回復した (Fig. 7C)。これにより S-グルタチオン化 RSK1 の消失と阻害されていた活性の回復が観察されたため、RSK1 が S-グルタチオン化により活性阻害されていることが明らかになった。



**Fig. 7. RSK1 S-グルタチオン化修飾の影響**

(A) 精製した RSK1 は 100  $\mu$ M GSH と 100  $\mu$ M diamide で処置し、抗グルタチオン抗体 (PSSG) あるいは抗 RSK1 抗体を用いて非還元条件下でウエスタンブロットを行った。(B) 精製した RSK1 を 100  $\mu$ M GSH と 100  $\mu$ M diamide で処置した後、緩衝液のみ、500  $\mu$ M GSH、500  $\mu$ M GSH /3.3  $\mu$ M Grx で 25°C、15 分間反応させ、抗 GSH 抗体 (PSSG) あるいは抗 RSK1 抗体を用いて非還元条件下でウエスタンブロットを行った。(C) (B) の反応後、各々の条件における RSK1 活性を Fig. 6 で記述した方法で測定した。

### 3.3. RSK1 S-グルタチオン化修飾部位の特定

これまでの実験結果より RSK1 が S-グルタチオン化により可逆的に活性阻害されることが判明した。次に RSK1 不活性化に関与する S-グルタチオン化修飾部位の特定を試みた。

まず、RSK1 基質結合部位が S-グルタチオン化部位である可能性を疑い、RSK1 の基質である ATP と S6 peptide との親和性への影響について検討した。Diamide/GSH による RSK1 の不活性化は ATP と S6 peptide の濃度を増加しても観察された。表に diamide/GSH 処置の有無による RSK1 の性質をまとめた (Table 1)。このことから S-グルタチオン化修飾部位が基質結合部位である可能性は否定された。

これまでに当研究室では  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモデュリン依存性キナーゼ I が Cys<sup>179</sup> の酸化的 S-グルタチオン化により可逆的に不活性化されることを示している<sup>38)</sup>。この Cys<sup>179</sup> はタンパク質キナーゼ触媒領域のサブドメイン VIII 上に存在し<sup>39)</sup>、RSK1 (Cys<sup>223</sup>: マウス RSK1 配列に基づく) を含めたいくつかのキナーゼの中で高度に保存されている (Fig. 4)。そこで、RSK1 の Cys<sup>223</sup> を Ser に置換した FLAG-RSK1 C223S 変異体 (C223S) を作製し、FLAG-RSK1 WT および FLAG-RSK1 C223S を細胞に過剰発現させ、細胞可溶化液から FLAG-agarose gel により精製し、抗 RSK1 抗体を用いたウエスタンブロットにより 90 kDa 付近に主要なバンドを得た (Fig. 8A)。

次に、*in vitro* において精製した RSK1 WT および RSK1 C223S の酵素活性を測定した。GSH (100  $\mu\text{M}$ ) 存在下 diamide (0.01-1 mM) の処置により RSK1 WT は 15%まで活性が低下したが、RSK1 C223S の活性は 75%までしか低下しなかった (Fig. 8B)。

当研究室ではこれまでに RSK1 が神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の Ser<sup>847</sup> をリン酸化することで nNOS の酵素活性を抑制することを報告している<sup>34)</sup>。そこで nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化を指標にして GSH/diamide による RSK1 活性阻害の効果を検討した。GSH (100  $\mu\text{M}$ ) と diamide (0.01-1 mM) で 10 分間処置した RSK1 を用いて nNOS Ser<sup>847</sup> をリン酸化させ、抗 nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化抗体を用いて検出した。Diamide 無処置では RSK1 WT および RSK1 C223S の両方において nNOS の Ser<sup>847</sup> リン酸化が確認できた。GSH (100  $\mu\text{M}$ ) / diamide (>100  $\mu\text{M}$ ) による処置は RSK1 WT の nNOS リン酸化を低下した (Fig. 8C)。対照的に RSK1 C223S は GSH/diamide 処置による低下はみられなかった。さらに、RSK1 S-グルタチオン化を検出してみると nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化の低下がみられた GSH (100  $\mu\text{M}$ ) / diamide (>100  $\mu\text{M}$ ) による処置において RSK1 WT の S-グルタチ

オン化が観察された。一方、RSK1 C223S の S-グルタチオン化も観察されたが、その量は RSK1 WT に比べ少なかった。RSK1 の 120 kDa 付近の上方のバンドは diamide/GSH の処置により RSK1 WT において検出されたが、RSK1 C223S では検出されなかった。

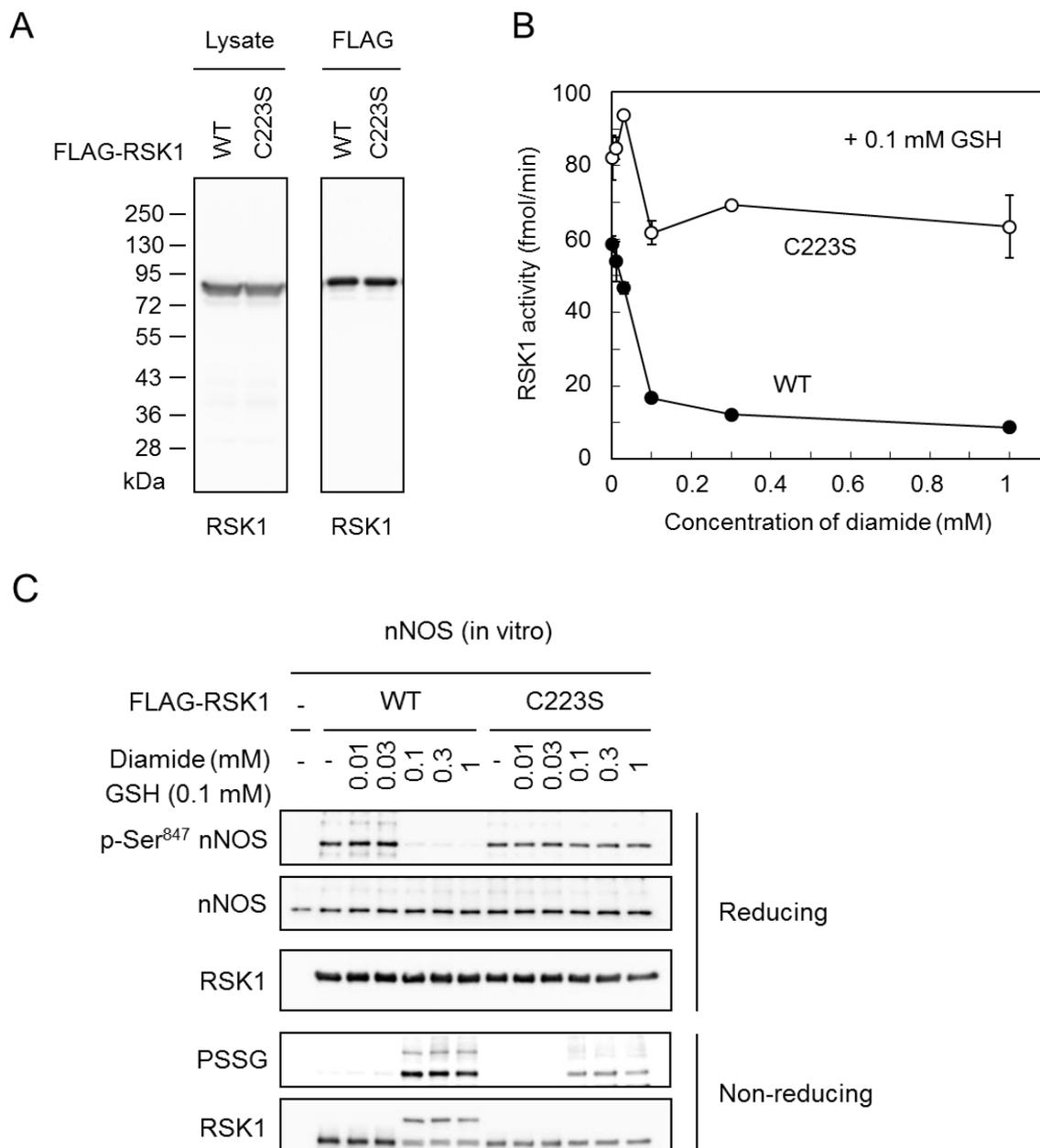
RSK1 の Cys<sup>223</sup> 以外の酸化修飾部位の可能性として CTKD 上にある Cys<sup>575</sup> もまた活性触媒領域に保存されていたため、RSK1 の Cys<sup>575</sup> を Ser<sup>575</sup> に置換した変異体 (C575S) を作製し、精製した。精製した RSK1 C575S を GSH (100  $\mu$ M) /diamide (100  $\mu$ M) で 10 分間処置した後、nNOS をリン酸化させ nNOS の Ser<sup>847</sup> リン酸化を観察した。RSK1 C575S による nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化は GSH (100  $\mu$ M) /diamide (100  $\mu$ M) の処置により低下した (Fig. 9)。今回の実験系では、活性は基質リン酸化をみることで評価したため Cys<sup>575</sup> の酸化修飾は関与していないものと考えられる。したがって RSK1 の活性阻害は Cys<sup>223</sup> S-グルタチオン化を介していることが明らかになった。

**Table 1. RSK1 活性阻害における酵素学的動態の検討**

	Control	Diamide/GSH
Standard	27.21 $\pm$ 1.93	11.19 $\pm$ 0.15
Excess S6 peptide (500 $\mu$ M)	52.71 $\pm$ 2.78	22.15 $\pm$ 0.84
Excess ATP (100 $\mu$ M)	217.02 $\pm$ 3.23	75.70 $\pm$ 4.35

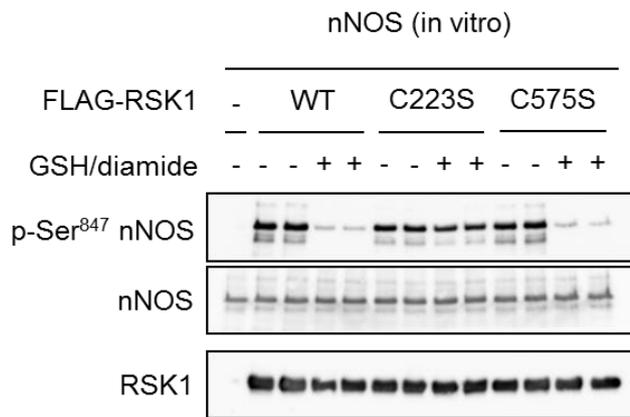
Activity (fmol/min)

GSH/diamide 処置の有無による RSK1 のリン酸化反応の酵素学的動態は 50  $\mu$ M S6 peptide、10  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 含有溶液中で 30°C、10 分間の反応を基準の条件 (Standard) とし測定した。データは平均値 $\pm$ S.E. (N=3) で示した。



**Fig. 8. RSK1 Cys<sup>223</sup> S-グルタチオン化による影響**

(A) HEK293 細胞から精製した FLAG-RSK1 WT および FLAG-RSK1 C223S のタンパク質量を揃えて、SDS-PAGE を行い、抗 RSK1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。(B) 精製した RSK1 WT および RSK1 C223S を 100  $\mu$ M GSH 存在下において図中に示した量の diamide (0.01-1 mM) で 25°C、10 分間処置し、Fig. 6 で記述した方法を用いて活性を測定した。(C) 精製した RSK1 WT および RSK1 C223S を 100  $\mu$ M GSH 存在下において図中に示した量の diamide (0.01-1 mM) で 25°C、10 分間処置した。処置した RSK1 各々をリン酸化酵素反応バッファ中でリコンビナントの nNOS (0.6  $\mu$ g) と 30°C で 10 分間反応させた。反応終了後、抗 p-Ser<sup>847</sup> nNOS 抗体、抗 nNOS 抗体、抗 GSH 抗体 (PSSG)、抗 RSK1 抗体を用いて還元条件下および非還元条件下でウエスタンブロットを行った。



**Fig. 9. nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化阻害に対する RSK1 Cys<sup>575</sup> の関与**

精製した RSK1 WT、RSK1 C223S および RSK1 C575S を 0.1 mM GSH 存在下 0.1 mM diamide で 25°C、10 分間処置した。処置した RSK1 各々をリン酸化酵素反応バッファ中でリコンビナントの nNOS (0.6 μg) と 30°C で 10 分間反応させた。反応終了後、抗 p-Ser<sup>847</sup> nNOS 抗体、抗 nNOS 抗体、抗 RSK1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

### 3.4. 細胞内 nNOS リン酸化に対する RSK1 Cys<sup>223</sup> S-グルタチオン化の影響

MAPK シグナル系は ROS により活性化することが報告されている<sup>21)</sup>。また、当研究室において EGF により活性化した RSK1 が nNOS の Ser<sup>847</sup> をリン酸化することで nNOS の酵素活性を抑制し、NO 産生量を制御することを報告している<sup>34)</sup>。これまでの実験結果より *in vitro* において RSK1 は Cys<sup>223</sup> S-グルタチオン化により可逆的に活性阻害されることが判明した。同様の現象が細胞レベルで観察された場合、ROS により MAPK シグナル系は活性化し RSK1 は阻害されるため、nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化への影響をみることは興味深いことである。そこで、細胞内において diamide による RSK1 Cys<sup>223</sup> への影響について検討した。

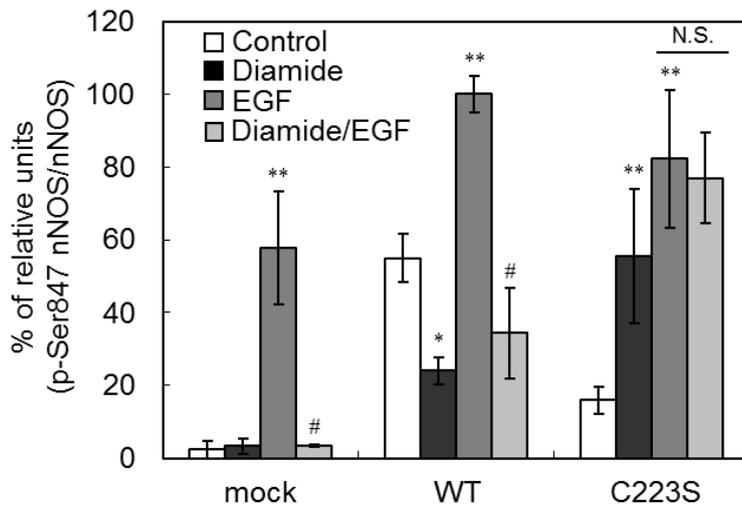
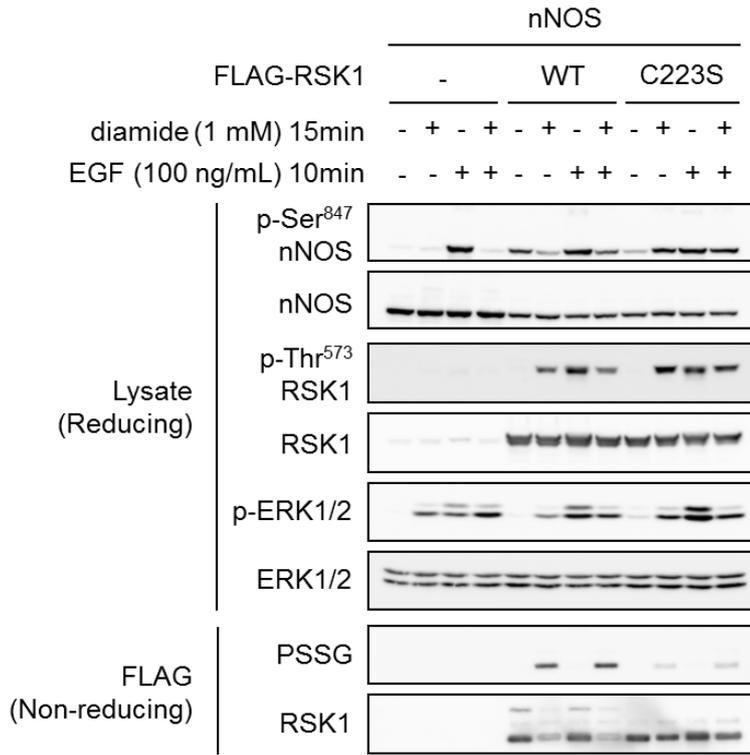
nNOS と FLAG-RSK1 WT または FLAG-RSK1 C223S を遺伝子導入した HEK293 細胞を 1 mM diamide で 5 分間処置した後、100 ng/μL EGF で 10 分間処置した。処置後、細胞を回収し、細胞可溶化液を ERK1/2、RSK1、nNOS の抗体およびリン酸化抗体を用いてウエスタンブロットを行った。MAPK シグナル系の MEK の活性を示す ERK1/2 のリン酸化および ERK1/2 の活性を示す RSK1 Thr<sup>573</sup> のリン酸化をみたところ、EGF、diamide、EGF/diamide のいずれの処置においても増加がみられた。このことから EGF や diamide 処置により MAPK シグナル系が活性化されていることが明らかになった。

nNOS 過剰発現細胞を EGF で処置することにより、前述したように nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化を検出できた (Fig. 10)。これに対し、Diamide の処置は EGF が惹起する nNOS の Ser<sup>847</sup> リン酸化を 91% 阻害した。次に、nNOS と RSK1 WT および RSK1 C223S を発現させた細胞を EGF で処置すると、両方の細胞で、nNOS Ser<sup>847</sup> のリン酸化の増加を確認できた。nNOS Ser<sup>847</sup> のリン酸化は RSK1 WT 発現細胞では 178% 増加し、RSK1 C223S 発現細胞では 465% 増加した。nNOS と RSK1 WT の過剰発現細胞を diamide 処置すると EGF が惹起する nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化は 45% まで低下した (Fig. 10)。対照的に、nNOS と RSK1 C223S の過剰発現細胞では diamide 処置による nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化は 75% まで低下したが有意差はみられなかった。このことから細胞内において RSK1 は Cys<sup>223</sup> の酸化修飾を介して活性阻害され、EGF による nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化を阻害していることが明らかになった。

また、diamide 単独処置により nNOS と RSK1 WT の過剰発現細胞の nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化は 59% まで低下したが、nNOS と RSK1 C223S の過剰発現細胞の nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化は 334% の増加がみられた (Fig. 10)。このことから、ROS は確かに MAPK シ

グナル系を活性化しているが、RSK1 の Cys<sup>223</sup> を介して活性阻害することで下流へのリン酸化を抑制していることが明らかになった。

細胞内は GSH が豊富に存在することから細胞の diamide 処置は S-グルタチオン化タンパク質を増加させる。Diamide 処置により RSK1 の S-グルタチオン化を観察することができ、この S-グルタチオン化量は RSK1 C223S に比べて RSK1 WT で顕著に増加していた (Fig. 10)。



**Fig. 10. 細胞内における nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化に対する diamide の影響**

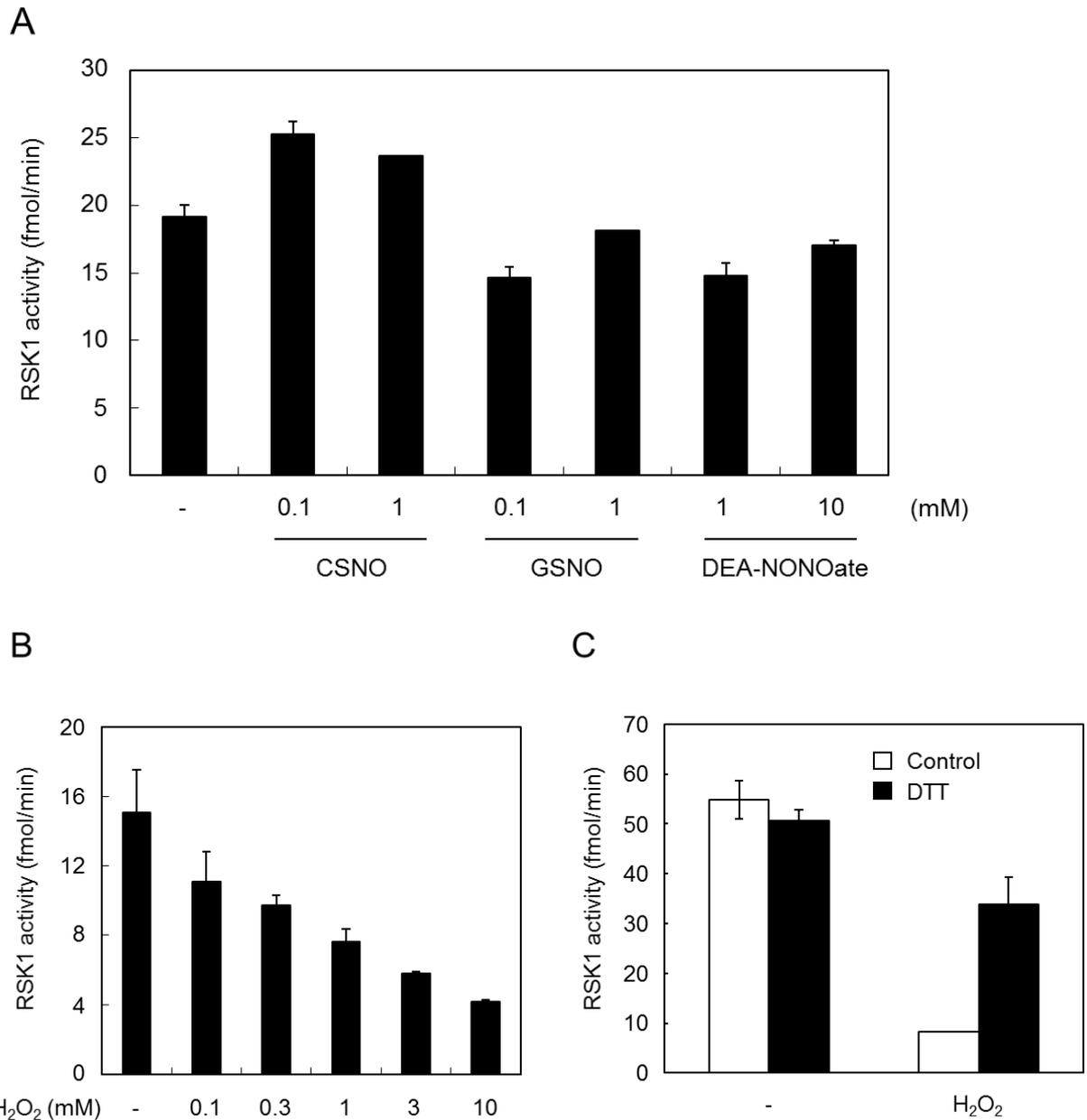
HEK293 細胞に nNOS と FLAG-RSK1 WT および FLAG-RSK1 C223S を発現させ、1 mM diamide を 5 分処置した後に 100 ng/mL EGF を 10 分間処置した。細胞を可溶化後、抗 p-Ser<sup>847</sup> nNOS 抗体、抗 nNOS 抗体、抗 p-Thr<sup>573</sup> RSK1 抗体、抗 RSK1 抗体、抗 p-ERK1/2 抗体、抗 ERK1/2 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。FLAG-RSK1 過剰発現細胞から抗 FLAG アガロースゲルを用いて RSK1 を精製した。精製した RSK1 を抗 GSH 抗体 (PSSG)、抗 RSK1 抗体を用いて非還元条件下でウエスタンブロットを行った。グラフは nNOS 量に対する nNOS リン酸化量を示した。データは平均値±S.E. (N=3) で示した。統計処理は分散分析 (ANOVA) テストにより行った。\* $p < 0.05$  と\*\* $p < 0.001$  はそれぞれ過剰発現させた細胞の control と比較した。# $p < 0.001$  はそれぞれ過剰発現させた細胞の EGF 処置したものと比較した。N.S.は有意差なし。

### 3.5. ROS および RNS による RSK1 活性への影響

これまでの実験結果より *in vitro* および細胞内において RSK1 は Cys<sup>223</sup> S-グルタチオン化により可逆的に活性阻害されることが判明した。ここまで S-グルタチオン化処置として diamide を用いてきたが、非生理的な酸化剤であるため実際にどのような刺激により生体内で酸化修飾が起こるのか明らかにする必要がある。そこで NO donor と活性酸素シグナル分子である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による RSK1 活性に対する影響について検討した。

精製した RSK1 を NO donor である CSNO (0.1, 1 mM)、GSNO (0.1, 1 mM)、DEA-NONOate (1, 10 mM) により 60 分間遮光下で処置し、活性を測定した。NO donor のいずれの処置においても RSK1 活性は変化しなかった (Fig. 11A)。したがって、RSK1 活性は NO による影響を受けなかった。

次に、精製した RSK1 を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1-10 mM) により 10 分間処置すると、RSK1 の活性は濃度依存的に 28%まで低下した (Fig. 11B)。さらに、RSK1 を 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処置することにより 15%まで低下した活性は 20 mM DTT の後処置により 67%まで回復した (Fig. 11C)。したがって、RSK1 は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により可逆的に活性阻害されることが明らかになった。



**Fig. 11. NO donor、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による RSK1 活性への影響**

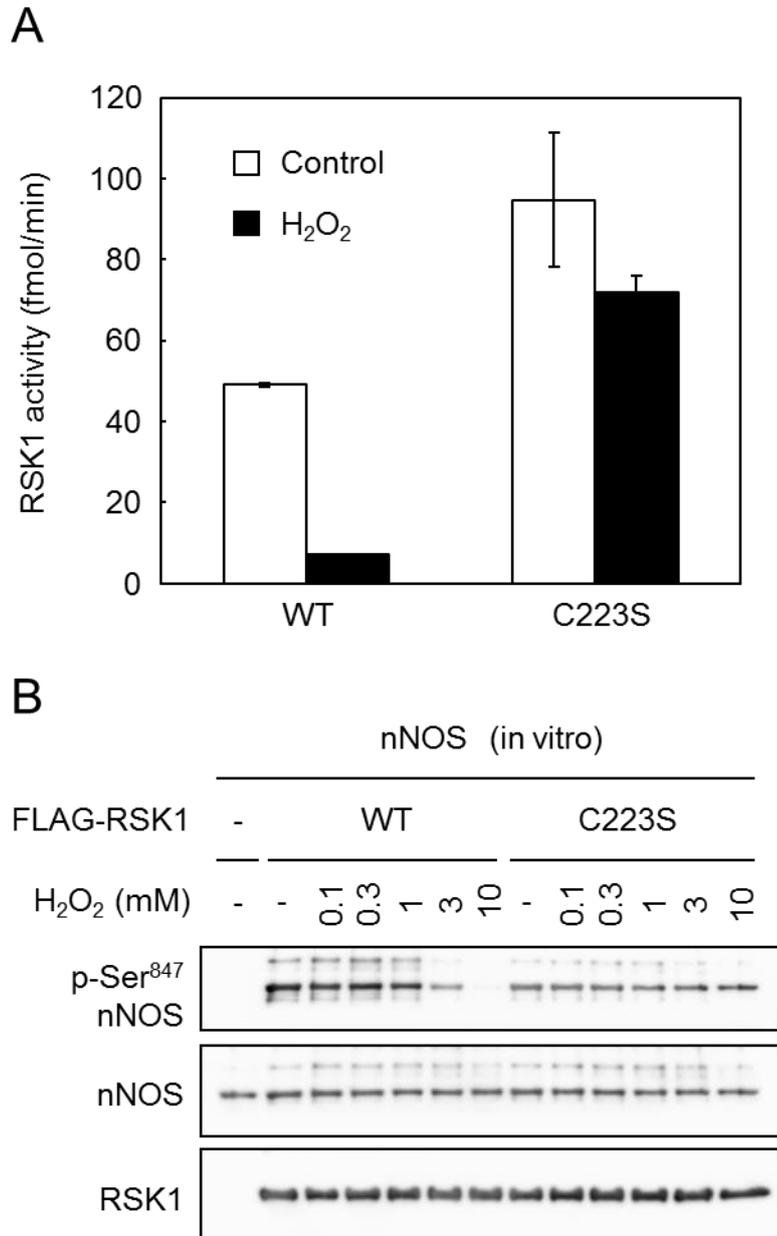
(A) 精製した RSK1 を CSNO (0.1, 1 mM)、GSNO (0.1, 1 mM)、DEA-NONOate (1, 10 mM) により 60 分間遮光下で処置した。(B) 精製した RSK1 は図中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 (0.1-10 mM) で 25°C、10 分間処置した。(C) 精製した RSK1 を 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 25°C、10 分間処置したのち、20 mM DTT で 10 分間処置した。RSK1 の酵素活性は Fig. 6 で記述した方法を用いて測定した。

### 3.6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による RSK1 酸化修飾部位の特定

これまでの実験結果より RSK1 は diamide だけではなく H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によっても可逆的に活性阻害されることが判明した。Diamide のときと同様に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>も Cys<sup>223</sup>を介して活性阻害するのではないかと考え、RSK1 C223S を用いて検討した。

RSK1 を 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 10 分間処置することにより RSK1 WT の活性は 14%まで低下したが、RSK1 C223S の活性は 76%までしか低下しなかった (Fig. 12A)。

次に nNOS リン酸化において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置による RSK1 活性阻害の効果を検討した。RSK1 を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1-10 mM) で 10 分間処置した後、nNOS をリン酸化させ nNOS の Ser<sup>847</sup> リン酸化を観察した。RSK1 WT による nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (>3 mM) の処置により低下した (Fig. 12B)。対照的に RSK1 C223S による nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置による低下はみられなかった。したがって、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による RSK1 の活性阻害は Cys<sup>223</sup> を介していることが明らかになった。



**Fig. 12. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるRSK1 活性阻害へのCys<sup>223</sup>の関与**

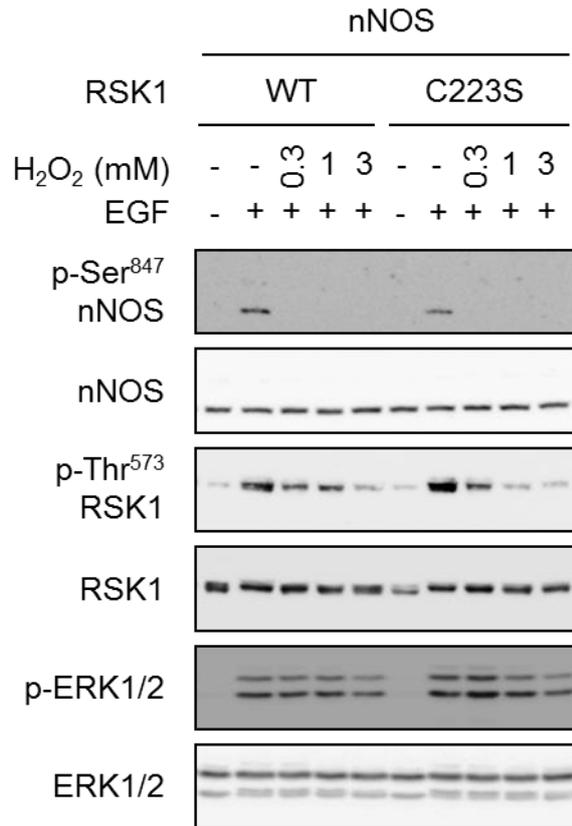
(A) RSK1 WT および RSK1 C223S を 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 25°C、10 分間処置し、Fig. 6 で記述した方法を用いて RSK1 の酵素活性を測定した。データは平均値±S.E. (N=3) で示した。(B) RSK1 WT および RSK1 C223S を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1-10 mM) で 25°C、10 分間処置した。処置した RSK1 をリン酸化酵素反応バッファ中でリコンビナントの nNOS (0.6 μg) と 30°C で 10 分間反応させた。反応終了後、抗 p-Ser<sup>847</sup> nNOS 抗体、抗 nNOS 抗体、抗 RSK1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

### 3.7. 細胞内 nNOS リン酸化に対する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による RSK1 酸化修飾の影響

これまでの実験結果より *in vitro* において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により RSK1 は Cys<sup>223</sup> 酸化修飾を介して可逆的に活性阻害されるということが判明し、diamide 処置による S-グルタチオン化のときと同様の結果を示している。同様の現象が細胞レベルで観察されるのかを確認するために、細胞内において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による RSK1 Cys<sup>223</sup> への影響について検討した。

nNOS と RSK1 WT または RSK1 C223S を遺伝子導入した PC12 細胞を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3-3 mM) で 5 分間処置した後、100 ng/μL EGF で 10 分間処置した。処置後、細胞を回収し、細胞可溶化液を ERK1/2、RSK1、nNOS の抗体およびリン酸化抗体を用いてウェスタンブロットを行った。nNOS と RSK1 WT および RSK1 C223S を発現させた細胞を EGF で処置すると、両方の細胞で、nNOS Ser<sup>847</sup> のリン酸化を検出できた (Fig. 13)。nNOS と RSK1 WT および RSK1 C223S を発現させた細胞を EGF 処置前に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置すると、両方の細胞で、nNOS Ser<sup>847</sup> のリン酸化が阻害された。

さらに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置により EGF が惹起する RSK1 Thr<sup>573</sup> リン酸化が RSK1 WT および RSK1 C223S とともに阻害された (Fig. 13)。一方、ERK1/2 のリン酸化は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置による変化はみられなかった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置により RSK1 Thr<sup>573</sup> リン酸化が阻害されたため、RSK1 活性を評価することが出来なかった。ERK1/2 のリン酸化は阻害されていないことから、細胞内における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置では ERK1/2 の活性が阻害される可能性が示された。



**Fig. 13.** 細胞における RSK1 による nNOS Ser<sup>847</sup> リン酸化に対する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の効果

PC12 細胞に nNOS と RSK1 WT および RSK1 C223S を発現させ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3-3 mM) を 5 分処置した後に 100 ng/mL EGF を 10 分間処置した。細胞を可溶化後、抗 p-Ser<sup>847</sup> nNOS 抗体、抗 nNOS 抗体、抗 p-Thr<sup>573</sup> RSK1 抗体、抗 RSK1 抗体、抗 p-ERK1/2 抗体、抗 ERK1/2 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

#### 4. 考察

RSK1 は単量体で存在し、その活性化は上流のリン酸化酵素 ERK1/2 と PDK1 による連続的なリン酸化により制御されている。ERK1/2 によってまず CTKD の Thr<sup>573</sup> のリン酸化が起こり、それに引き続いて Ser<sup>380</sup> の自己リン酸化が起こる。このリン酸化は PDK1 の結合を誘導し、NTKD の Ser<sup>221</sup> のリン酸化が起こることで活性が最大になる<sup>31,32</sup> (Fig. 4)。本論文では RSK1 の自己リン酸化ではなく S6 peptide や nNOS のリン酸化を測定することにより基質をリン酸化する活性、つまり NTKD の活性を評価した。

Diamide のタンパク質 S-グルタチオン化形成の促進作用は、S-グルタチオン化される標的タンパク質の同定とそのタンパク質の生理機能や活性への効果を検討するために利用される<sup>36</sup> (Fig. 5)。ROS 産生や ROS 処置に付随する煩雑さを排除して簡易的にタンパク質チオール基への影響を観察できるためこの方法を本論文で用いた。最初の検討により RSK1 が GSH/diamide の処置により活性阻害され、還元剤を後処置することで回復がみられた (Fig. 6)。これにより RSK1 が S-グルタチオン化により活性制御されていることが予想された。

S-グルタチオン化の検出は、グルタチオン-タンパク質複合体を抗原にした抗グルタチオン抗体を用いた非還元条件下でのウエスタンブロット法により行った。この方法を用いることで RSK1 の S-グルタチオン化を検出できた (Fig. 7)。チオールトランスフェラーゼとして知られている Grx は GSH 依存的な機構により S-グルタチオン化タンパク質を選択的に還元する<sup>20</sup>。GSH/diamide 処置により RSK1 が S-グルタチオン化されることは明らかとなったが、S-グルタチオン化修飾が RSK1 活性低下に十分であるかを明らかにするため、Grx を用いて GSH/diamide が惹起する RSK1 不活性化の可逆性を検討した。これにより S-グルタチオン化 RSK1 の消失と阻害されていた活性の回復が観察されたため、S-グルタチオン化による活性阻害であることが示唆された。

RSK1 の不活性化に重要な S-グルタチオン化修飾部位を特定するために、まず RSK1 基質 (ATP, S6 peptide) との親和性について検討したが、ATP と S6 peptide のどちらを増加させても S-グルタチオン化による RSK1 活性低下に対する抑制効果はみられなかった (Table 1)。このことから S-グルタチオン化修飾部位は基質結合部位ではなく、活性触媒領域にある可能性が考えられた。リン酸化酵素の活性触媒領域は分子間で配列類似性を示しており<sup>39</sup>、これまで当研究室をはじめ他研究室からもリン酸化酵素の活性触媒領域の Cys が酸化修飾されることで活性制御されることが報告されている<sup>38,40</sup>

41)。RSK1にも同様の配列類似性と保存された Cys<sup>223</sup>を有していたため (Fig. 4)、そこに着目し Cys<sup>223</sup>を Ser<sup>223</sup>に組み替えた変異体 RSK1 C223S を作製して酸化修飾による活性低下に対する抵抗性を検討した。S6 peptide と nNOS のどちらを基質に用いた場合においても、RSK1 C223S は S-グルタチオン化処置による活性低下に抵抗性を示した (Fig. 8)。さらに RSK1 WT に比べて低いものの RSK1 C223S のグルタチオン化が検出された。このことから、Cys<sup>223</sup>以外の Cys が S-グルタチオン化されていることが考えられた。RSK1 WT と RSK1 C223S で酵素活性に大きな差がみられたことから Cys<sup>223</sup>の S-グルタチオン化が RSK1 の酵素活性に大きな影響を与えている可能性が示唆された。

RSK1には7つの Cys が存在する。RSK1 の Cys<sup>223</sup>以外の酸化修飾部位の可能性として CTKD 上にある Cys<sup>575</sup>もまた活性触媒領域に保存されていたため (Fig. 4)、RSK1 の Cys<sup>575</sup>を Ser<sup>575</sup>に置換した変異体 (C575S) を作製し、酵素活性と GSH/diamide による酵素活性阻害の感受性を検討した。*in vitro*での検討において RSK1 WT および RSK1 C575S の酵素活性は同程度であることを確認し、GSH (100 μM) /diamide (100 μM) で10分間処置した結果、nNOS を基質として用いた RSK1 C575S の活性はほぼ完全に阻害された (Fig. 9)。今回の実験系では、リン酸化活性は基質リン酸化をみることで評価したため Cys<sup>575</sup>の酸化修飾は関与していないものと考えられる。

*in vitro*における検討では手技中の酸化により RSK1 が酸化されて活性が低下してしまうことが考えられる。実際、非還元条件で RSK1 を精製すると RSK1 WT に比べ RSK1 C223S の活性は高く、還元剤の処置によって RSK1 WT の活性は回復した (data not shown)。したがって、細胞内での RSK1 の酸化による活性低下を確認するために、細胞内での基質リン酸化を検出した。nNOS と RSK1 WT 発現細胞において EGF により増加した nNOS のリン酸化は diamide の前処置により減弱した (Fig. 10)。一方、nNOS と RSK1 C223S 発現細胞では EGF により増加した nNOS のリン酸化は diamide の前処置による減弱がみられなかった。さらに、diamide 単独処置により RSK1 WT を発現させただけで確認された nNOS のリン酸化が減弱した。一方、RSK1 C223S 発現細胞は diamide 単独処置により nNOS のリン酸化が増加した。これは、ROS 処置により MAPK 活性化を介して RSK1 も活性化されているが、それに加えて直接 Cys<sup>223</sup>が S-グルタチオン化されることにより活性阻害されていることを示している。Diamide 処置により細胞内の RSK1 S-グルタチオン化を検出できたが、無処置の細胞では検出できなかった。

たため、通常の生体内では RSK1 は S-グルタチオン化されておらず、酸化ストレス条件下において S-グルタチオン化されるものと考えられる。

細胞内において EGF 処置前の酸化ストレス処置により RSK1 活性は阻害され (Fig. 10)、あらかじめ細胞において EGF により活性化された RSK1 の活性も *in vitro* における酸化ストレスの処置により阻害された (Fig. 6)。リン酸化による RSK1 活性化の有無に関わらず RSK1 は S-グルタチオン化されたことから、Cys<sup>223</sup> の S-グルタチオン化による RSK1 の活性阻害は Ser<sup>221</sup> のリン酸化による RSK1 の活性化よりも優位であることが示唆された。また、*in vitro* および細胞内において RSK1 活性は S-グルタチオン化により検出限界程度まで阻害されたことから (Fig. 6-10)、ROS により RSK1 のほとんどが S-グルタチオン化されていると考えられる。

さらに、非還元条件での SDS-PAGE において GSH/diamide の処置により RSK1 WT の 120 kDa 付近のバンドが検出されたが、RSK1 C223S ではみられなかった (Fig. 7, 8, 10)。非還元条件での SDS-PAGE ではジスルフィド結合を残したまま分離されるため、RSK1 Cys<sup>223</sup> が S-グルタチオン化に加えて他の酸化修飾を受けることで 120 kDa 付近のバンドが検出されたことが考えられる。上方にバンドがみられたことから、RSK1 は分子間ジスルフィド結合により二量体を形成しているのかもしれない。しかし、S-グルタチオン化させた RSK1 を Grx と GSH で処置した際には、120 kDa の RSK1 のバンドは消失しなかったが、S-グルタチオン化の消失と共に RSK1 活性の回復がみられたことから (Fig. 7)、酸化ストレスによる RSK1 の活性阻害は Cys<sup>223</sup> の S-グルタチオン化を介していると考えている。

Diamide はタンパク質システインチオール特異的にジスルフィド結合の形成や置換反応を誘起する酸化剤として広く用いられている<sup>36)</sup> (Fig. 5)。しかし、これは非生理的な酸化剤であることから、実際にどのような刺激により生体内で酸化修飾が起こるのかを検討する必要がある。そのため酸化ストレスとして NO あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を使用した際の RSK1 Cys<sup>223</sup> への影響を検討した。*in vitro* における検討では NO による RSK1 活性に対する影響は観察されなかったが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置により RSK1 活性の可逆的な阻害が観察された (Fig. 11)。この H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による阻害に対し RSK1 C223S は抵抗性を示した (Fig. 12)。しかし、細胞内では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置により RSK1 Thr<sup>573</sup> リン酸化が阻害されたため、RSK1 活性を評価することは出来なかった (Fig. 13)。ERK1/2 のリン酸化は阻害されていないことから、細胞内における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置では ERK1/2 の活性が阻害される

可能性が示された。生理的な  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度は数 10  $\mu\text{M}$  であり、患部組織では数 100  $\mu\text{M}$  と報告されている<sup>42)</sup>。 $\text{H}_2\text{O}_2$  産生は好中球で最も大規模に研究されており、好中球の特定のオルガネラでは微生物を死滅させるために ROS 産生酵素である NADPH oxidase から数 mM の  $\text{H}_2\text{O}_2$  が産生される<sup>43)</sup>。今回の検討では高濃度の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用いているため、より生理的な条件として受容体刺激を介した ROS 産生による影響を検討する必要がある。

酸化ストレスは MAPK ホスファターゼの不活性化を含む MAPK シグナル系タンパク質の酸化修飾を介して ERK1/2 のリン酸化を増加することが報告されている<sup>44)</sup>。活性化した ERK1/2 は核内、細胞質、細胞表面に存在する多くの細胞内標的分子をもつ。これらの ERK1/2 基質は分裂促進的な刺激により起こる細胞プロセスの制御において重要な役割を担っていると考えられている。ERK1/2 基質の一つである RSK1 は細胞生存に関わる ERK1/2 の中心的なメディエーターである<sup>45)</sup>。RSK1/RSK2/RSK3 のトリプルノックアウトマウスは生存可能であり、表現型の異常は観察されなかった<sup>46)</sup>。異常な MAPK シグナル系の活性化はがん細胞の増殖を亢進するが、RSK1 N 末の ATP 結合阻害を起こす阻害剤により乳癌や前立腺癌細胞の増殖が阻害される<sup>47)</sup>。本研究で見出した S-グルタチオン化による RSK1 の活性阻害は ROS による MAPK シグナル系の異常な活性化を抑制することで、癌細胞の増殖を阻害している可能性がある。

今回の検討では、RSK1 C223S による比較検討を行うために過剰発現に適した HEK293 細胞を用いたが、下垂体由来の GH3 細胞においても EGF による nNOS リン酸化が ROS により減弱することを確認している (data not shown)。NOS には  $\text{Ca}^{2+}$  と calmodulin (CaM) に依存した構成型の血管内皮型 NOS (eNOS)、神経型 NOS (nNOS) と、 $\text{Ca}^{2+}$  非依存の誘導型 NOS (iNOS) の 3 種類のアイソフォームが存在する<sup>48)</sup>。iNOS には nNOS Ser<sup>847</sup> に相当する近辺のドメインは存在しないが<sup>49)</sup>、eNOS については nNOS Ser<sup>847</sup> に相当する Ser<sup>617</sup> が PKA によってリン酸化され、活性化されることが報告されている<sup>50)</sup>。しかし、RSK1 によるリン酸化の報告はないため、血管内皮細胞における ROS-RSK1-NO シグナル系を理解するためには、まず RSK1 による eNOS リン酸化の有無から検討する必要がある。

多くのタンパク質が可逆的な S-グルタチオン化によって制御されることが確認されており、特定タンパク質の S-グルタチオン化は糖尿病、心血管疾患、肺疾患、がん、神経変性疾患に関わることがいわれている<sup>35)</sup>。RSKs は脳内に広く発現しており、細

胞生存を含め重要な細胞内機能を制御している<sup>51)</sup>。NOS は NO と Superoxide を産生することから、peroxynitrite の産生に関与する。peroxynitrite は、より強力な酸化力や毒性を持つラジカルであるため、NOS の阻害は神経保護を示す<sup>52)</sup>。脳は大量のエネルギーを必要とするためミトコンドリアから発生する ROS の影響を受けやすく、細胞の再分化ができない。実際に選択的に神経変性を起こす脳領域特異的な ROS のさまざまな障害が報告されている<sup>53)</sup>。脳損傷・脳卒中・脳感染症などの外的要因によって神経炎症が引き起こされ、中枢神経系の神経炎症では特徴的にミクログリア細胞が活性化し ROS や NO 産生を促進してその多くは細胞死のシグナルを活性化する<sup>54)</sup>。ハンチントン病などの神経変性疾患の際に S-グルタチオン化タンパク質が増加することが報告されている<sup>35)</sup>。ハンチントン病は棘状の GABA 作動性神経変性を引き起こす常染色体優性遺伝疾患であり、線条体の GABA 作動性神経には nNOS が発現している。RSK1/RSK2 の発現量や活性はハンチントン病動物モデルの線条体で増大している<sup>55)</sup>。細胞において酸化ストレスにより RSK1 Cys<sup>223</sup> のグルタチオン化を介して EGF による nNOS Ser<sup>847</sup> のリン酸化は阻害された (Fig. 10)。このことから、本来過剰に NO が産生されるのを防いでいる RSK1 が ROS により活性阻害されることで NO 産生を増長し酸化ストレス環境をより悪化させていることが予想される。酸化ストレスが RSK1 不活性化を介して NO 産生を増長することを明らかにするために、実際に NO 量を測定することが必要である。

## 5. 結論

酸化ストレスは MAPK ホスファターゼの不活性化を含む MAPK シグナル系タンパク質の酸化修飾を介して ERK1/2 のリン酸化を増加することが報告されている<sup>47)</sup>。一方、当研究室ではこれまでに RSK1 が nNOS の Ser<sup>847</sup> をリン酸化することで nNOS の酵素活性を抑制し、NO 産生を制御することを報告している<sup>37)</sup>。本研究では ROS 処置により ERK1/2 の活性化を観察することが出来たが、nNOS リン酸化の減弱が観察された。これは ROS による RSK1 の Cys<sup>223</sup> S-グルタチオン化を介した直接的な酸化修飾により RSK1 活性が阻害されたためである。このことから nNOS の抑制であった RSK1 によるリン酸化が抑制されることで NO 産生の増強が予想される。本論文では ROS-RSK1-NO を結ぶ新たなシグナル系の一部を解明し、以下のスキームを提案する (Fig. 10)。本研究により酸化ストレスによる ROS の標的分子の一つとして、RSK1 を見出し、その酸化修飾の種類と酸化修飾部位を特定することが出来た。ROS シグナル系はさまざまな疾患の結果であり要因であるが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。本研究成果は ROS による標的分子を特定する際に有効であるため、ROS シグナル系の詳細な解析において役立つことが期待できる。

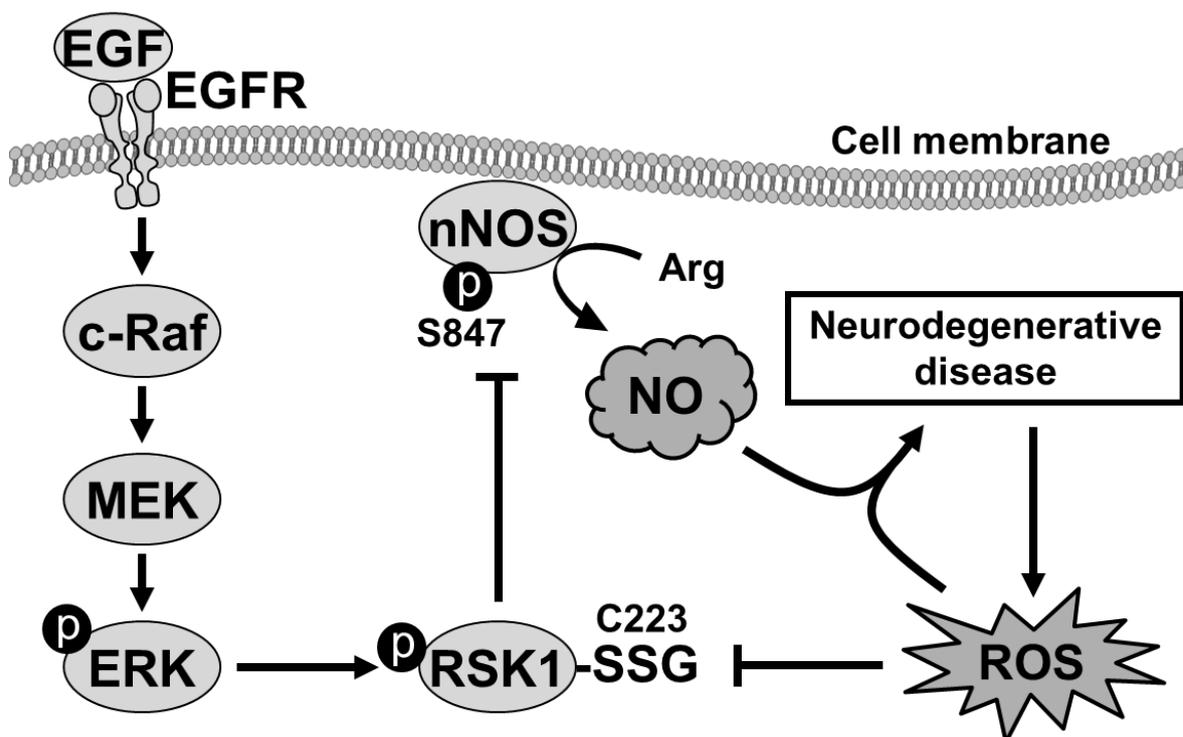


Fig. 10. ROS-RSK1-NO シグナル系のスキーム

## 6. 参考文献

1. Wells P. G., McCallum G. P., Chen C. S., Henderson J. T., Lee C. J., Perstin J., Preston T. J., Wiley M. J., and Wong A. W., Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol. Sci.*, **108**, 4-18 (2009).
2. Adam-Vizi V., Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid. Redox Signal.*, **7**, 1140–1149 (2005).
3. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 44-84 (2007).
4. Camello-Almaraz C., Gomez-Pinilla P. J., Pozo M. J., and Camello P. J., Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, **291**, C1082–C1088 (2006).
5. Guichard C., Pedruzzi E., Fay M., Ben Mkaddem S., Coant N., Daniel F., and Ogier-Denis E., [The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases]. *Med. Sci. (Paris)*, **22**, 953-959 (2006).
6. Garcia-Garcia A., Zavala-Flores L., Rodriguez-Rocha H., and Franco R.. Thiol-redox signaling, dopaminergic cell death, and Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.*, **17**, 1764-1784 (2012).
7. Bilaska A., Kryczyk A., and Wlodek L., [The different aspects of the biological role of glutathione]. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **61**, 438-453 (2007).
8. Stamler J. S., Lamas S., and Fang F. C., Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, **106**, 675-683 (2001).

9. Lim J. C., Choi H. I., Park Y. S., Nam H. W., Woo H. A., Kwon K. S., Kim Y. S., Rhee S. G., Kim K., and Chae HZ., Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. *J. Biol. Chem.*, **283**, 28873-28880 (2008).
10. Gallogly M. M., and Mieyal J. J., Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **7**, 381-391 (2007).
11. Simbula G., Columbano A., Ledda-Columbano G. M., Sanna L., Deidda M., Diana A., and Pibiri M., Increased ROS generation and p53 activation in  $\alpha$ -lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. *Apoptosis*, **12**, 113-123 (2007).
12. Moran L. K., Gutteridge J. M., and Quinlan G. J., Thiols in cellular redox signaling and control. *Curr. Med. Chem.*, **8**, 763-772 (2001).
13. Chen F. E., Huang D. B., Chen Y. Q., and Ghosh G., Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- $\kappa$ B bound to DNA. *Nature*, **391**, 410-413 (1998).
14. Clementi E., Brown G. C., Feelisch M., and Moncada S., Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 7631-7636 (1998).
15. Borutaite V., Budriunaite A., and Brown G. C., Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 405-412 (2000).
16. Franklin R. A., Rodriguez-Mora O. G., Lahair M. M., and McCubrey J. A., Activation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases as a consequence of oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1807-1817 (2006).
17. Zhu W., Woo A. Y., Yang D., Cheng H., Crow M. T., and Xiao R. P., Activation of CaMKII $_{\delta C}$  is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **282**, 10833-10839 (2007).

18. Howe C. J., Lahair M. M., McCubrey J. A., and Franklin R. A., Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **279**, 44573-44581 (2004).
19. Paulsen C. E., and Carroll K. S., Chemical dissection of an essential redox switch in yeast. *Chem. Biol.*, **16**, 217-225 (2009).
20. Berndt C., Lillig C. H., and Holmgren A., Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, *292*, H1227-H1236 (2007).
21. McCubrey J. A., Lahair M. M., and Franklin R. A., Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1775-1789 (2006).
22. Rubinfeld H., and Seger R., The ERK cascade : apro to type of MAPK signaling. *Mol. Biotechnol.*, **31**, 151–174 (2005).
23. Cargnello M., and Roux P. P., Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **75**, 50–83 (2011).
24. Roberts P. J., and Der C. J., Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, **26**, 3291-3310 (2007).
25. Torres, M., and Forman H. J., Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors*, **17**, 287-296 (2003).
26. Ruffels J., Griffin M., and Dickenson J. M., Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *Eur. J. Pharmacol.*, **483**, 163-173 (2004).

27. Dabrowski A., Boguslowicz C., Dabrowska M., Tribillo I., and Gabryelewicz A., Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells. *Pancreas*, **21**, 376-384 (2000).
28. Barrett W. C., DeGnore J. P., Konig S., Fales H. M., Keng Y. F., Zhang Z. Y., Yim M. B. and Chock P. B., Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry*, **38**, 6699-6705 (1999).
29. Frodin M., and Gammeltoft S., Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **151**, 65-77 (1999).
30. Romeo Y., Zhang X., and Roux P. P., Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem. J.*, **441**, 553-569 (2012).
31. Chen R. H., Sarnecki C., and Blenis J., Nuclear localization and regulation of *erk*- and *rsk*-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 915-927 (1992).
32. Jensen C. J., Buch M. B., Krag T. O., Hemmings B. A., Gammeltoft S., and Frodin M., 90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J. Biol. Chem.*, **274**, 27168-27176 (1999).
33. Carriere A., Ray H., Blenis J., and Roux P. P., The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Front. Biosci.*, **13**, 4258-4275 (2008).
34. Song T., Sugimoto K., Ihara H., Mizutani A., Hatano N., Kume K., Kambe T., Yamaguchi F., Tokuda M., and Watanabe Y., p90 RSK-1 associates with and inhibits neuronal nitric oxide synthase. *Biochem. J.*, **401**, 391-398 (2007).
35. Mieyal J. J., Gallogly M. M., Qanungo S., Sabens E. A., and Shelton M. D., Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.*, **10**, 1941-1988 (2008).

36. Lock J. T., Sinkins W. G., and Schilling W. P., Effect of protein S-glutathionylation on Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cultured aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **300**, H493-H506 (2011).
37. Roskoski R. J., Assays of protein kinase. *Meth. Enzymol.*, **99**, 3-6 (1983).
38. Kambe T., Song T., Takata T., Hatano N., Miyamoto Y., Nozaki N., Naito Y., Tokumitsu H., and Watanabe Y., Inactivation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. *FEBS Lett.*, **584**, 2478-2484 (2010).
39. Hanks S. K., Quinn A. M., and Hunter T., The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52 (1988).
40. Humphries K. M., Juliano C., and Taylor S. S., Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 43505-43511 (2002).
41. Yasukawa T., Tokunaga E., Ota H., Sugita H., Martyn J. A., and Kaneki M., S-Nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, **280**, 7511-7518 (2005).
42. Schröder E., and Eaton P., Hydrogen peroxide as an endogenous mediator and exogenous tool in cardiovascular research: issues and considerations. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **8**, 153-159 (2008).
43. Rhee S. G., Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science*, **312**, 1882-1883 (2006).
44. Son Y., Cheong Y. K., Kim N. H., Chung H. T., Kang D. G. and Pae H. O., Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: How can ROS activate MAPK pathways? *J. Signal Transduct.*, **2011**, 792639 (2011).

45. Ballif B. A. and Blenis J., Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.*, **12**, 397-408 (2001).
46. Dumont J., Umbhauer M., Rassinier P., Hanauer A., and Verlhac M. H., p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. *J. Cell Biol.*, **169**, 227-231 (2005).
47. Neise D., Sohn D., Stefanski A., Goto H., Inagaki M., Wesselborg S., Budach W., Stühler K., and Jänicke R. U., The p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor BI-D1870 prevents  $\gamma$  irradiation-induced apoptosis and mediates senescence via RSK- and p53-independent accumulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. *Cell Death Dis.*, **4**, e859 (2013).
48. Abbott L. C., and Nahm S. S., Neuronal nitric oxide synthase expression in cerebellar mutant mice. *Cerebellum*, **3**, 141-151 (2004).
49. Xie Q. W., Cho H. J., Calaycay J., Mumford R. A., Swiderek K. M., Lee T. D., Ding A., Troso T., and Nathan C., Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, **256**, 225-228 (1992)
50. Michell B. J., Harris M. B., Chen Z. P., Ju H., Venema V. J., Blackstone M. A., Huang W., Venema R. C., and Kemp B. E., Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J. Biol. Chem.*, **44**, 42344-42351 (2002).
51. Anjum R., and Blenis J., The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 747-758 (2008).
52. Ischiropoulos H., and Beckman J. S., Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J. Clin. Invest.*, **111**, 163-169 (2003).
53. Andersen J. K., Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.*, **10**, Suppl: S18-S25 (2004).

54. Herrera A. J., Tomás-Camardiel M., Venero J. L., Cano J., Machado A., Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons. *J. Neural Transm.*, **112**, 111-119 (2005).
55. Xifró X., Anglada-Huguet M., Rué L., Saavedra A., Pérez-Navarro E., and Alberch J., Increased 90-kDa ribosomal S6 kinase (Rsk) activity is protective against mutant huntingtin toxicity. *Mol. Neurodegener.*, **6**, 74 (2011).

## 7. 謝辞

本研究の遂行に際しまして、御指導、御鞭撻、御校閲を賜りました昭和薬科大学薬理学研究室・渡邊泰男教授に深甚なる謝意を表すとともに、深く御礼申し上げます。

また、本論文の作成に際しまして、御指導頂きました昭和薬科大学生化学研究室・伊東進教授、統合感染免疫学研究室・石戸聡教授、薬物治療学研究室・水谷顕洋教授に深謝申し上げます。

本研究に際し、建設的な御指導、御助言、御校閲を頂きました昭和薬科大学薬理学研究室・土屋幸弘助教に深く感謝致します。

最後に、多大な御協力を頂きました昭和薬科大学薬理学研究室の皆様、さまざまな面で支援して頂いた全ての皆様に感謝致します。

8. 本論文内容の誌上発表

Takata T., Tsuchiya Y., Watanabe Y., 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 is inhibited by S-glutathionylation of its active-site cysteine residue during oxidative stress., *FEBS Lett.*, **587**, 1681-1686, (2013).