

【緒言】

酸化ストレスとは生体の酸化還元（レドックス）の均衡が崩れ酸化状態に傾くことであり、さまざまな疾病との関連が指摘されている。これまで酸化ストレスの要因である活性酸素種（Reactive Oxygen Species：ROS）は生体分子の非特異的損傷をもたらす毒性因子として扱われてきた。しかし、近年になり、特異的にシグナル経路を制御することで細胞機能に利用されていることが分かってきた。その1つに、mitogen-activated protein kinase（MAPキナーゼ）信号系のROSによる活性化が報告されており、その活性化は上流の epidermal growth factor（EGF）受容体の活性化あるいは脱リン酸化酵素の阻害を介しているといわれている。

一方、MAPキナーゼ信号系の下流分子である 90-kDa ribosomal S6 kinase 1（RSキナーゼ1）はMAPキナーゼ（= extracellular signal-regulated kinase：ERキナーゼ）により直接リン酸化され活性化し、基質リン酸化を介して細胞の生存、分化、増殖を制御している。近年、基質として神経型一酸化窒素（NO）合成酵素（nNOS）が同定され、部位特異的リン酸化（Ser⁸⁴⁷）を介してNO産生を阻害していることが報告されている。

このように、これまでの報告によるとMAPキナーゼ信号系は、ROSによってRSキナーゼ1も含めて活性化されていると思われる。そこで、本研究ではERキナーゼ-RSキナーゼ1-nNOS信号系に着目しMAPキナーゼ信号系のROS感受性について検討を行った。

【結果・考察】

1. ROSによる内在性RSキナーゼ1の活性阻害

まず、細胞内でのMAPキナーゼ信号系に対するROSの影響を機能分子の部位特異的リン酸化検出によって検討した（Fig. 1）。ヒト胎児腎細胞由来のHEK293細胞にnNOSを過剰発現させEGFで刺激すると、ERキナーゼより上流分子の活性化を示すERキナーゼのリン酸化（p-ERK1/2）がみられた。さらにERキナーゼの活性を示すRSキナーゼ1のリン酸化（p-Thr⁵⁷³RSK1）およびRSキナーゼ1の活性を示すnNOSのリン酸化（p-Ser⁸⁴⁷nNOS）がみられた。一方、同細胞を細胞内分子のS-グルタチオン化を惹起するチオール基選択的酸化剤のdiamideで処置すると、ERキナーゼおよびRSキナーゼ1のリン酸化はみられたが、nNOSのリン酸化はみられなかった。また、diamideとEGFの共処置においてもnNOSのリン酸化はみられなかった。

2. 部位特異的S-グルタチオン化によるRSキナーゼ1の活性阻害

上記の結果は、ROSによるS-グルタチオン化修飾によってRSキナーゼ1の活性が阻害されていることを示唆する。そこで、ROSによるS-グルタチオン化を介したRSキナーゼ1の活性阻害の可能性について検討した。EGF処置を行ったRSキナーゼ1過剰発現HEK293細胞より活性化RSキナーゼ1を精製した。

精製した RSK キナーゼ 1 の活性は合成ペプチド (S6 peptide) を基質として用いて測定した。還元型グルタチオン (GSH) と diamide の処置により酵素活性は顕著に低下し、この活性低下は低分子酸化還元剤の DTT の添加によりほぼ完全に回復した。次に、タンパク質 S-グルタチオン化認識抗体 (PSSG) を用いることで、同処置による RSK キナーゼ 1 の S-グルタチオン化が観察された。また、脱 S-グルタチオン化酵素であるグルタレドキシシン (Grx) の後処置により脱 S-グルタチオン化され、阻害された活性の回復がみられた (Fig.2)。さらにグルタチオン化修飾による RSK キナーゼ 1 の阻害形式は RSK キナーゼ 1 の基質である ATP や S6 peptide のどちらにとっても競合阻害ではなかった。そこで、ROS により酵素触媒部位が S-グルタチオン化修飾されていると考え、活性中心に存在する Cys²²³ を Ser に置換した RSK キナーゼ 1 変異体 (C223S) を作製し、培養細胞への過剰発現系で ROS 感受性を検討した。野生型 RSK キナーゼ 1 発現細胞でみられた ROS によるグルタチオン化修飾ならびに nNOS リン酸化活性の低下は、C223S 発現細胞ではともにみられなかった。

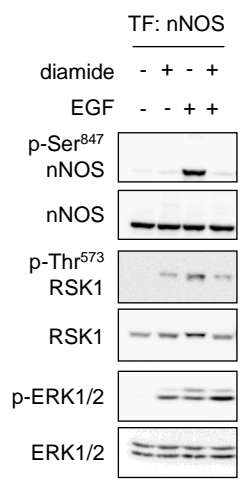


Fig. 1. Effects of diamide on RSK1-induced phosphorylation of nNOS in cells.

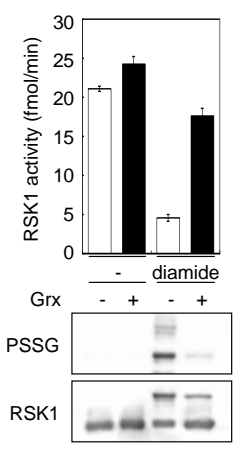


Fig. 2. RSK1 is inhibited upon being S-glutathionylated.

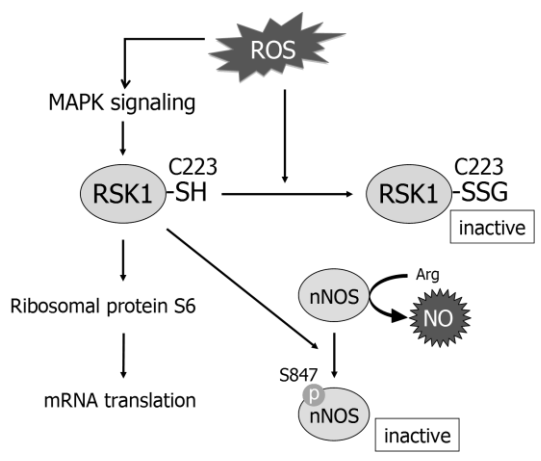


Fig. 3. Inactivation of RSK1 by S-glutathionylation.

【結論】

ROS は細胞内において MAP キナーゼ信号系を活性化するとされるが、本研究によって同信号系の 1 分子である RSK キナーゼ 1 は、その Cys²²³ の S-グルタチオン化を介して活性が抑制されていることが明らかになった。さらに、RSK キナーゼ 1 による nNOS リン酸化が NO 産生を阻害しているという報告と合わせて、ROS 刺激による RSK キナーゼ 1 の活性阻害が、NO 産生を増長させ、NO 信号系の制御にもかかわっている可能性が示唆された (Fig. 3)。

【本研究の誌上発表】

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).