

特集：ストレス応答分子：分子メカニズムの解明と病態の理解

nucleoredoxin によるシグナル伝達のレドックス制御

船戸 洋 佑, 三 木 裕 明

近年、能動的に産生された活性酸素がさまざまなシグナル伝達経路の調節に寄与していることが明らかになりつつある。我々は Wnt シグナル伝達に必須のアダプター分子 Dishevelled (Dvl) の新規結合タンパク質としてチオレドキシン (thioredoxin) ファミリーの一員、nucleoredoxin (NRX) を同定した。機能解析の結果、Dvl と NRX との結合が活性酸素刺激に応じて解離することで、Wnt シグナル伝達がレドックス依存的に制御されていることを発見した。さらに個体レベルでの実験を行い、NRX がアフリカツメガエルやマウスの初期発生に重要な役割を果たしていることなども見いだしている。これらの結果は、発生・分化、また発がんなどに活性酸素シグナルが重要な意味を持つ可能性を示唆している。

1. はじめに

近年の目覚ましい研究の進展により、過酸化水素 (hydrogen peroxide, H_2O_2) など活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が単なる代謝の副産物として産生される毒物ではなく、能動的に産生され、そして生理的なシグナル伝達を制御するセカンドメッセンジャーとして機能していることを支持する知見が多く得られている¹⁾。特に ROS の産生については、NADPH オキシダーゼなどの因子を介して刺激応答性に (すなわち積極的に) 作り出される、その分子機序が明らかとなってきた。一方で、能動的に産生された ROS がセカンドメッセンジャーとして機能するためには、ROS に特異的、かつ可逆的に応答する「活性酸素センサータンパク質」の存在が必須と考えられる²⁾。しかし、このような ROS に敏感に応答する因子の解析については、まだ未解明の部分が多く残されている。以下では我々のグループが携わってきた nucleoredoxin (NRX) の

研究について、その活性酸素センサーとしての役割を中心に紹介していきたい。

2. Dvl 結合因子としての NRX の同定

我々のグループでは、初期発生や幹細胞の多分化能制御、発がんなどに重要な Wnt シグナル経路の研究に携わっていた。Wnt リガンド刺激によって活性化を受ける経路は Wnt/ β -catenin 経路と Wnt/PCP 経路とに大別される³⁾ (図 1)。両経路の分岐点に位置し、両シグナル伝達経路の調節に必須の役割を果たしているアダプタータンパク質 Dishevelled (Dvl) にフォーカスを絞り、その結合タンパク質を網羅的に探索した。その結果、我々は細胞内における Dvl の主たる結合因子として NRX を同定した⁴⁾。NRX は当初、システインの酸化修飾を還元する酵素チオレドキシン (thioredoxin: TRX) と相同性の高いドメイン (TRX 様ドメイン) を有する新規分子として 1997 年に報告された。その際、強制発現した NRX の核における局在が観察されたことから “nucleo” redoxin と名付けられている⁵⁾。しかし、NRX が細胞内でどのような役割を担っているのか、その後殆ど研究が進んでいなかった。我々は NRX が主として細胞質に存在する Dvl と結合することから、細胞分画を行い内在性 NRX の細胞内局在を調べたところ、NRX が少なくとも我々が調べた細胞においてはむしろ細胞質に豊富に存在することを発見した⁴⁾。

大阪大学微生物病研究所細胞制御分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1)

Redox-dependent regulation of intracellular signaling via nucleoredoxin

Yosuke Funato and Hiroaki Miki (Department of Cellular Regulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

3. TRX ファミリーメンバーとしての NRX

ここでNRXが属する「TRXファミリー」について紹介したい。TRXは大腸菌における核酸合成に必須の役割を果たす因子として1964年に同定された⁶⁾。高等生物においてはTRX様ドメインを持つ20種類以上のタンパク質が

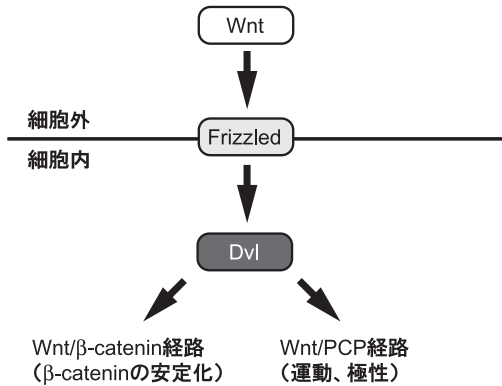


図1 Wntシグナル経路の概略

Wntリガンド刺激によって細胞内のシグナル伝達が活性化される。Wnt経路はDvlの位置でβ-cateninの安定化につながるWnt/β-catenin経路と、極性や運動を制御するWnt/PCP経路などに分岐している。

TRXファミリーを形成しており、多様な生物機能を担っていると考えられている⁷⁾(図2)。TRXファミリータンパク質は活性中心に反応性の高いシステイン残基をペアで持つことが特徴で、この二つのシステイン残基を利用してジスルフィド結合を還元(切断)する酵素群である(図3)。TRXの還元基質としてもっともよく知られるタンパク質がペルオキシレドキシシン(Peroxiredoxin: PRX)である⁸⁾。PRXは代表的なROSの一つであるH₂O₂を分解して除去する酵素であり、この反応時にH₂O₂によって酸化されたPRXを還元してH₂O₂除去能を回復させるのがTRXである。このようにしてTRXは細胞内全体の酸化・還元(レドックス)恒常性の維持に重要な役割を果たしている(図4)。

一方、TRXは標的タンパク質のジスルフィド結合を還元する働きとは異なる様式でシグナル伝達を制御していることも知られている。細胞死を誘導するキナーゼとして同定されたApoptosis-regulated signal kinase1(Ask1)⁹⁾は、定常状態においてはTRXと複合体を形成しており、その活性が抑えられている¹⁰⁾。腫瘍壊死因子α(TNFα)刺激などによってROSが大量に産生されると、TRXの二つの活性システインの間で分子内ジスルフィド結合が形成され、

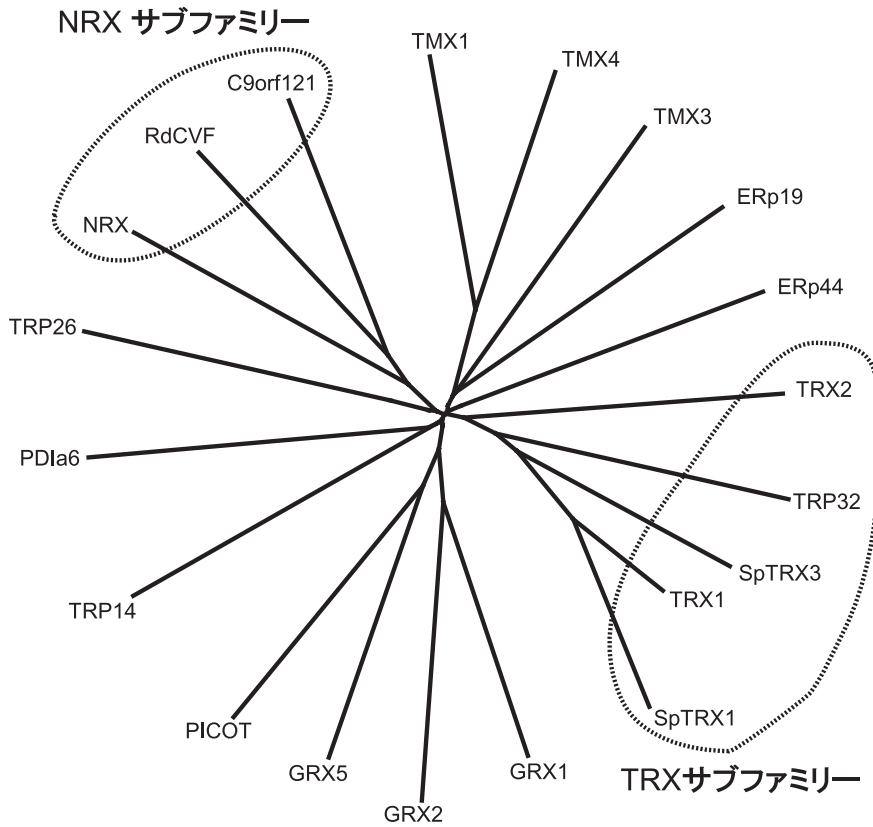


図2 TRXファミリー
TRXファミリータンパク質のうち一部を、配列の相同性で分類して記載してある。その中でもNRXと比較的配列が類似した因子群があり、NRXサブファミリーを形成している。

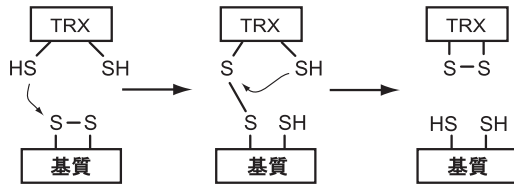


図3 TRXによるジスルフィド結合の切断

TRXは活性中心に二つの保存されたシステインを有している。基質タンパク質のジスルフィド結合を還元する際には、まずそのうちアミノ末端側のシステイン残基（ヒトTRXの場合はCys32）を利用して基質タンパク質のジスルフィド結合を切断し、TRXと基質タンパク質との間でジスルフィド中間体を形成する。その後、カルボキシ末端側のシステイン残基（ヒトTRXではCys35）によってこのジスルフィド中間体が切断され、基質タンパク質と解離することで反応が終了する。

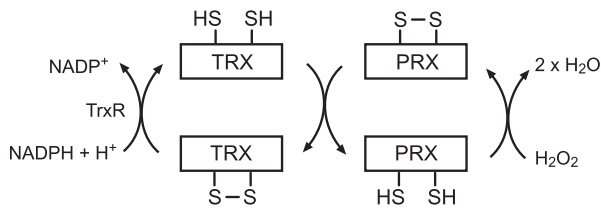


図4 TRXカスケード

PRXは H_2O_2 を還元する。その際、酸化されたPRXはTRXによって還元され、再活性化される。酸化TRXについてはチオレドキシシンレダクターゼ（TrxR）がNADPHを利用して還元反応を行う。つまり、NADPHを還元力の源として、TrxR, TRX, PRXへと電子がリレーされることで H_2O_2 の還元が担われている。

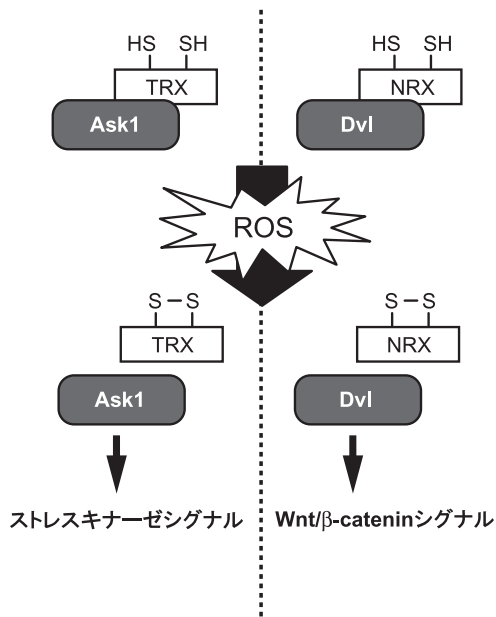


図5 レドックス依存的な Ask1 および Dvl の活性制御

定常状態においてはTRXやNRXは還元状態にあり、それぞれAsk1, Dvlと結合することにより、その活性化を抑えている。ROSによってTRXやNRXが酸化されるとそれぞれ解離し、フリーとなったAsk1およびDvlは活性化状態となって下流へとシグナルを伝える。

酸化されたTRXはAsk1から解離する。その結果、TRXによる機能抑制が解除されたAsk1は活性化し、下流のストレスキナーゼ経路のシグナル伝達を惹起することによりアポトーシスを誘導する（図5）。この発見は、TRXが活性酸素シグナルを伝える重要な仲介因子であることを明確に示した点で非常に重要な意義をもっている。しかし、他のTRXファミリータンパク質について、同様の働きを有しているかどうかは全く不明であった。

4. NRXとDvlのレドックス依存的な相互作用

NRXはTRXファミリーの一員であり、TRXと同様に活性中心の二つのシステインによってジスルフィド結合を還元する活性を有している。我々はNRXとDvlの結合について、TRX/Ask1複合体と同様にレドックス依存的であるかどうか、検討を行った。まず、この両者の結合におけるNRXの活性中心システインペアの重要性について調べるため、両システイン残基（Cys205, Cys208）をセリンに置換した変異型NRXをDvlと共に細胞に強制発現させ、免疫沈降実験を行った。その結果、野生型NRXはDvlと共沈し複合体形成が確認できたのに対して、変異型NRXでは共沈が観察されず、NRXの活性中心にある二つのシステイン残基がDvlとの結合に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、NRXとDvlの組み換えタンパク質を発現、精製し、両者の直接結合について、そのレドックス依存性の検証を行った。 H_2O_2 あるいは還元剤のジチオスレイトール（dithiothreitol: DTT）を用いて酸化・還元状況下での両タンパク質の結合を調べたところ、DTT存在下では両者の結合が強まり、逆に過酸化水素を加えることによって結合が減弱することを見いだした。また、細胞内における内在性のDvl/NRX複合体についても、過酸化水素処理によって解離することが観察された。これらの実験結果から、NRXとDvlがレドックス依存的に結合することが明らかとなった。

5. NRXによるWntシグナル伝達のレドックス依存的な制御

次に我々は、NRXがDvlを介してWntシグナル伝達にどのような影響を及ぼしているか、検討を行った。Dvlの過剰発現やWntリガンド刺激によってWnt/ β -catenin経路を活性化させた細胞にNRXを共発現させると、 β -cateninの蓄積や、 β -cateninの下流にある転写因子TCF/LEFの活性化が顕著に抑制された。また、RNA干渉法によって内在性NRXの発現を抑制した細胞では、Wnt/ β -catenin経路が恒常的に活性化しており、実際にCyclin D1やc-Mycといった著名なWnt/ β -catenin経路の標的遺伝子の発現が上昇していた。これらの実験結果から、NRXがWnt/ β -catenin経路を負に制御する働きをしていることが明らか

となった。また、NRX 発現抑制細胞では細胞増殖能やフォーカス形成能の亢進が見受けられ、NRX が Wnt/ β -catenin 経路の制御を介して細胞増殖やがん化にも関与している可能性を示唆する実験結果も得られている。

これらの実験結果から、(1) NRX が Dvl に結合して Wnt シグナルを抑制すること、そして (2) NRX と Dvl の結合がレドックス応答性であること、が明らかとなった。この二つを合わせて考えると、NRX がレドックス応答性に Wnt シグナル伝達を制御している可能性が想起された。実際、培養細胞を H_2O_2 で刺激すると β -catenin の蓄積、TCF/LEF の活性化、およびターゲット遺伝子の発現増加といった Wnt/ β -catenin 経路の活性化を示す結果が得られた。この H_2O_2 による Wnt/ β -catenin 経路の活性化は、NRX 発現抑制細胞では殆ど観察できなかったことから、 H_2O_2 刺激応答性の Wnt/ β -catenin 経路の活性化に NRX が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

これらの実験結果より、NRX/Dvl 複合体は TRX/Ask1 複合体と似通った仕組みでレドックス依存的にシグナル伝達を制御していると考えられる (図 5)。定常状態では細胞内は還元状態にあり、従って NRX は Dvl と強く結合することで Wnt/ β -catenin 経路の活性化を阻害している。ROS が発生すると NRX の二つの活性システイン残基の間に分子内ジスルフィド結合が形成され、Dvl から解離する。そしてフリーとなった Dvl が下流へとシグナルを伝え、 β -catenin の蓄積を促すのである。

最近、NRX が生理的な環境下で産生された ROS にも応答することが報告された¹¹⁾。Wnt リガンド刺激に応じて Nox1 依存的に ROS が産生され、そして NRX が酸化されることが示されており、NRX が「活性酸素センサータンパク質」として実際に細胞内で機能していることを支持する実験結果と位置づけられる。

6. 個体レベルでの解析よりわかった NRX の新たな機能

1) アフリカツメガエルを用いた解析

筆者らはさらに NRX の生物個体レベルでの機能を明らかにするべく、Wnt シグナルの解析によく用いられるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を用いた実験を行った。形成体(オーガナイザー)は本来背側にのみ形成されるが、Dvl mRNA を初期胚の腹側に注入して異所的に Wnt/ β -catenin 経路を活性化すると腹側にもオーガナイザーが誘導され、二次軸が形成されることが知られている^{12,13)}。この際、NRX mRNA を同時に注入すると、Dvl mRNA による二次軸誘導が抑制され、個体レベルの実験系においても NRX が Wnt/ β -catenin 経路の抑制因子であることが確認された。また、配列特異的に mRNA に結合することで特定のタンパク質の翻訳を阻害する、モルフォリーノアンチセ

ンスオリゴをアフリカツメガエルの NRX に対して設計し、受精卵の動物極側に注入したところ、頭部の形成不全が起こった。Wnt/ β -catenin シグナルはアフリカツメガエルの初期発生における前後軸形成に重要であり、頭部では通常 Wnt/ β -catenin シグナルが抑制されていると言われている^{14,15)}。従って、NRX モルフォリーノの注入による頭部形成不全は、頭部における Wnt/ β -catenin シグナルの異常な活性化を反映しているものと考えられる。実際に、Wnt/ β -catenin シグナルを抑制する GSK3 β や変異型 TCF の mRNA を共注入することによって、上記の頭部形成不全が解除された。

図 1 で示したように、Wnt リガンドによって惹起されるシグナルは β -catenin の安定化を促す Wnt/ β -catenin 経路と、細胞極性を制御する Wnt/PCP 経路の 2 種類に大別される。我々はアフリカツメガエルにおける実験から NRX が Wnt/ β -catenin シグナルのみならず、もう一つの Wnt/PCP 経路にも関わっていることを発見した。Wnt/PCP 経路は当初ショウジョウバエにおける羽の平面内極性に関わる経路として同定されたが、アフリカツメガエルなどにおいては、初期発生時の原腸陥入における細胞の協調的な運動に重要であることがわかっている¹⁶⁾。NRX mRNA あるいは NRX に対するモルフォリーノアンチセンスオリゴの注入による強制発現、あるいは発現抑制実験を行ったところ、原腸陥入運動に異常が観察された。さらに、NRX モルフォリーノアンチセンスオリゴの注入によって生じる細胞運動の異常が、Wnt/PCP 経路を抑制する変異型 Dvl の mRNA を共注入することによって緩和されることもあわせて発見した¹⁷⁾。これらの実験結果から、NRX が Wnt/ β -catenin 経路だけでなく、Wnt/PCP 経路の制御にも関わることが明らかとなった。

2) 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析

我々はさらに NRX の高等動物における個体レベルでの重要性を明らかにするべく、NRX の遺伝子ノックアウトマウスを作製し、その解析も行っている。ホモ欠損型のマウスは生後 1 日までに致死であり、解剖の結果、骨および心臓の形成に異常が見受けられた¹⁸⁾。ノックアウトマウス、およびマウスより採取した初代培養細胞を用いたさらなる解析より、NRX の新たな機能が明らかとなった。Dvl はユビキチン化を介して分解されることがわかっているが¹⁹⁾、NRX がこの Dvl のユビキチン化とそれに伴うタンパク質分解を抑制しており、Dvl のタンパク質安定性の制御に関わっていることを突き止めた。

これまでに培養細胞で明らかにしてきたように、NRX は Dvl の活性化を抑える機能をも有している。この二つの機能を合わせて考えるに、NRX は Dvl を不活性状態で安定化し、Wnt リガンド刺激への高い応答性を担保し、また

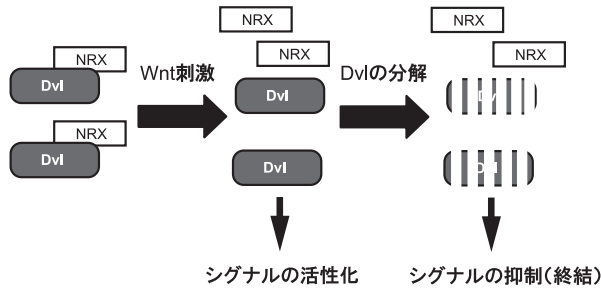


図6 NRXはDvlタンパク質の安定性を制御する

NRXは定常状態においてはDvlと結合しており、Dvlの活性化だけでなく、その分解をも同時に抑制している。Wntリガンド刺激はDvlとNRXの解離を促し、シグナル伝達を活性化させるが、同時にフリーとなったDvlはユビキチン化を介した分解を受けようになり、Wnt/ β -cateninシグナルの恒常的な活性化が阻止されている。

一方で恒常的なWnt/ β -cateninシグナルの活性化を阻止しているという、ユニークな役割を担っていると考えられる(図6)。実際、NRX遺伝子ノックアウトマウスより採取した細胞ではWntリガンド刺激に応じたWnt/ β -cateninシグナルの活性化が顕著に抑制されていた。

7. おわりに

我々はNRXが活性酸素センサータンパク質としてWnt/ β -catenin経路をレドックス依存的に制御することを明らかにしてきた(図5)。NRXについては、今回6節で紹介したように個体レベルでの解析からWnt/PCP経路やDvlのタンパク質安定性制御にも関与していることを突き止めている。また、NRXはDvlの他にもprotein phosphatase 2A²⁰⁾、Flightless-1²¹⁾やSec63²²⁾などと相互作用し、その機能を制御していることが報告されている。これらNRXの新たな役割についてもNRXのレドックスセンサーとしての機能がどのように関わっているのか、明らかにしていくことが今後の課題として挙げられる。また、ROSを長時間に渡って作用させるとWnt/ β -cateninシグナルが抑制されるとの報告もあり²³⁾、一過的なシグナル活性化の持つ意義を明らかにすることも今後の大きな課題である。

TRXファミリーには図2にその一部を記載したように、TRXやNRX以外にも多くのタンパク質が存在している。しかし、その機能が明らかになっているものはごく一部に限られている。ROSに敏感に応答することができるTRXファミリーの機能解析は、細胞がROSに応答する、その仕組みの全貌を理解する上で極めて大きな意義を持つものと考えられ、今後の研究の進展が待ち望まれる。

文 献

- 1) Rhee, S.G. (2006) *Science*, **312**, 1882–1883.
- 2) Miki, H. & Funato, Y. (2012) *J. Biochem.*, **151**, 255–261.
- 3) Reya, T. & Clevers, H. (2005) *Nature*, **434**, 843–850.
- 4) Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M., & Miki, H. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 501–508.
- 5) Kurooka, H., Kato, K., Minoguchi, S., Takahashi, Y., Ikeda, J., Habu, S., Osawa, N., Buchberg, A.M., Moriwaki, K., Shisa, H., & Honjo, T. (1997) *Genomics*, **39**, 331–339.
- 6) Laurent, T.C., Moore, E.C., & Reichard, P. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 3436–3444.
- 7) Funato, Y. & Miki, H. (2007) *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 1035–1057.
- 8) Rhee, S.G., Yang, K.S., Kang, S.W., Woo, H.A., & Chang, T. S. (2005) *Antioxid. Redox Signal.*, **7**, 619–626.
- 9) Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., & Gotoh, Y. (1997) *Science*, **275**, 90–94.
- 10) Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., & Ichijo, H. (1998) *EMBO J.*, **17**, 2596–2606.
- 11) Kajla, S., Mondol, A.S., Nagasawa, A., Zhang, Y., Kato, M., Matsuno, K., Yabe-Nishimura, C., & Kamata, T. (2012) *FASEB J.*, **26**, 2049–2059.
- 12) McMahon, A.P. & Moon, R.T. (1989) *Cell*, **58**, 1075–1084.
- 13) Sokol, S.Y., Klingensmith, J., Perrimon, N., & Itoh, K. (1995) *Development*, **121**, 1637–1647.
- 14) Kim, C.H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K.B., Chandrasekharappa, S.C., Driever, W., & Chitnis, A.B. (2000) *Nature*, **407**, 913–916.
- 15) Kiecker, C. & Niehrs, C. (2001) *Development*, **128**, 4189–4201.
- 16) Wallingford, J.B., Fraser, S.E., & Harland, R.M. (2002) *Dev. Cell*, **2**, 695–706.
- 17) Funato, Y., Michiue, T., Terabayashi, T., Yukita, A., Danno, H., Asashima, M., & Miki, H. (2008) *Genes Cells*, **13**, 965–975.
- 18) Funato, Y., Terabayashi, T., Sakamoto, R., Okuzaki, D., Ichise, H., Nojima, H., Yoshida, N., & Miki, H. (2010) *Curr. Biol.*, **20**, 1945–1952.
- 19) Angers, S., Thorpe, C.J., Biechele, T.L., Goldenberg, S.J., Zheng, N., MacCoss, M.J., & Moon, R.T. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 348–357.
- 20) Lechward, K., Sugajska, E., de Baere, I., Goris, J., Hemmings, B.A., & Zolnierowicz, S. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 3631–3637.
- 21) Hayashi, T., Funato, Y., Terabayashi, T., Morinaka, A., Sakamoto, R., Ichise, H., Fukuda, H., Yoshida, N., & Miki, H. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 18586–18593.
- 22) Müller, L., Funato, Y., Miki, H., & Zimmermann, R. (2011) *FEBS Lett.*, **585**, 596–600.
- 23) Shin, S.Y., Kim, C.G., Jho, E.H., Rho, M.S., Kim, Y.S., Kim, Y.H., & Lee, Y.H. (2004) *Cancer Lett.*, **212**, 225–231.