

したCrSAS-6複合体のモデリング, *in vitro* で再構成したCrSAS-6複合体の電子顕微鏡による観察, 両方の結果はCrSAS-6複合体がカートホイール構造の中央部を形成するモデルと合致する (図1B)⁹⁾.

おわりに

ここで示したモデルはSAS-6高次複合体形成が進化上保存された中心小体の9回対称構造を規定していることを強く示唆している。しかし, CrSAS-6リコンビナントタンパク質を用いた*in vitro*再構成系では, 9回対称リング構造の形成効率は*in vivo*のそれと比較して低いことが推定された。SAS-6は線虫初期胚において中心小体複製開始時にリン酸化されることが示されており, また他のカートホイール構成因子の関与なども考慮すると, *in vivo*ではリン酸化などにより修飾されたSAS-6複合体がさらに他の構成因子と結合することで効率的にカートホイール構造を形成すると考えられる。今後, この具体的な分子基盤の解明が期待される。また, 形成されたカートホイール構造が何層かに積み重なるメカニズム, 微小管がその周囲に結合するメカニズム, 中心小体が伸長し, 一定の長さで止まるメカニズムなど中心小体の段階的な構築過程には解明が待たれる問題が山積しており, 中心小体構築の分子機構の研究はまだ端緒についたばかりであるといえる。

- 1) Nigg, E.A. & Raff, J.W. (2009) *Cell*, 139, 663–678.
- 2) Strnad, P. & Gönczy, P. (2008) *Trends Cell Biol.*, 18, 389–396.
- 3) Gönczy, P., Echeverri, G., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S. J., Copley, R.R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E., Hannak, E., Kirkham, M., Pichler, S., Flohrs, K., Goessen, A., Leidel, S., Alleaume, A.M., Martin, C., Ozlu, N., Bork, P., & Hyman, A.A. (2000) *Nature*, 408, 331–336.
- 4) Sonnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., Heinkel, R., Roder, M., Finell, J., Hantsch, H., Jones, S.J., Jones, M., Piano, F., Gunsalus, K.C., Oegema, K., Gönczy, P., Coulson, A., Hyman, A.A., & Echeverri, C.J. (2005) *Nature*, 434, 462–469.
- 5) Leidel, S., Delattre, M., Cerutti, L., Baumer, K., & Gönczy, P. (2005) *Nat. Cell Biol.*, 7, 115–125.
- 6) Dammermann, A., Muller-Reichert, T., Pelletier, L., Habermann, B., Desai, A., & Oegema, K. (2004) *Dev. Cell*, 7, 815–829.
- 7) Kitagawa, D., Busso, C., Flückiger, I., & Gönczy, P. (2009) *Dev. Cell*, 17, 900–907.
- 8) Kitagawa, D., Flückiger, I., Polanowska, J., Keller, D., Reboul, J., & Gönczy, P. (2011) *Dev. Cell*, 20, 550–562.

- 9) Kitagawa, D., Vakonakis, I., Olieric, N., Hilbert, M., Keller, D., Olieric, V., Bortfeld, M., Erat, M.C., Flückiger, I., Gönczy, P., & Steinmetz, M.O. (2011) *Cell*, 144, 364–375.
- 10) Delattre, M., Canard, C., & Gönczy, P. (2006) *Curr. Biol.*, 16, 1844–1849.
- 11) Pelletier, L., O’Toole, E., Schwager, A., Hyman, A.A., & Muller-Reichert, T. (2006) *Nature*, 444, 619–623.
- 12) Strnad, P., Leidel, S., Vinogradova, T., Euteneuer, U., Khodjakov, A., & Gönczy, P. (2007) *Dev. Cell*, 13, 203–213.
- 13) Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y.D., & Nigg, E.A. (2007) *Dev. Cell*, 13, 190–202.
- 14) Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R., & Hirono, M. (2007) *Curr. Biol.*, 17, 2169–2174.
- 15) van Breugel, M., Hirono, M., Andreeva, A., Yanagisawa, H.A., Yamaguchi, S., Nakazawa, Y., Morgner, N., Petrovich, M., Ebong, I.O., Robinson, C.V., Johnson, C.M., Vepriyev, D., & Zuber, B. (2011) *Science*, 331, 1196–1199.

北川 大樹

(国立遺伝学研究所新分野創造センター
中心体生物学研究室)

Molecular mechanisms of centriole duplication
Daiju Kitagawa (Centrosome Biology Laboratory, Center for Frontier Research, National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka, 411–8540 Japan)

ニトロ化環状ヌクレオチドによるタンパク質S-グアニル化を介する酸化ストレス適応応答の分子機序

1. はじめに

生体内で産生される活性酸素 (ROS) や一酸化窒素 (NO) に由来する活性酸化窒素種 (RNS) は酸化ストレスをもたらす, 感染, 炎症, 発がんなどの病態の進展に関わっている^{1,2)}。これらの物質はこれまで, 生体分子に非特異的な化学損傷をもたらす毒性因子と考えられてきた。しかしながら近年, ROS・RNSがシグナルとして働き, 巧妙に制御された細胞内シグナル伝達経路を経て, 細胞の分化・増殖, 酸化ストレスに対する適応応答などの細胞機能変化が起こることが明らかになってきた^{3,4)}。このようなROS・RNSによるシグナル伝達では, これらの活性分子種が細胞内のセンサータンパク質 (レドックスセンサータンパク質あるいは酸化ストレスセンサータンパク質と呼ばれる) に受容された後, 下流のエフェクター分子へシグナルが伝

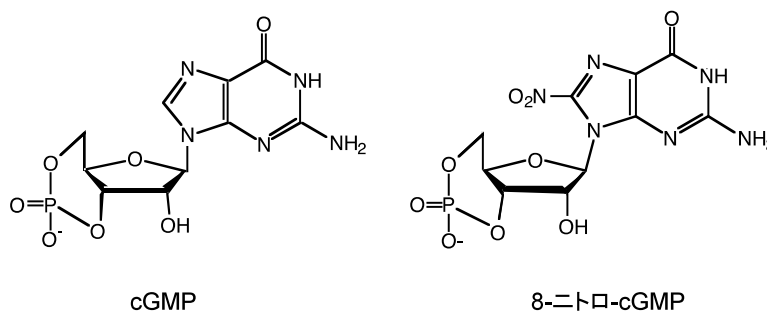


図1 cGMPと8-ニトロ-cGMPの構造

達され、細胞機能変化が起こると考えられるが、シグナル伝達機構の詳細なメカニズムについては明らかではなかった。最近筆者らは、活性酸素によるシグナル伝達を担う新しい二次メッセンジャーとして8-ニトログアノシン3',5'-環状1リン酸(8-ニトロ-cGMP, 図1)を発見した⁵⁾。8-ニトロ-cGMPは、NOの二次メッセンジャーであるグアノシン3',5'-環状1リン酸(cGMP)にニトロ基が付加した構造を有するニトロ化環状ヌクレオチドである。本稿では、8-ニトロ-cGMPの細胞内での生成と、本分子の親電子性に基づくユニークなシグナル伝達機序について概説する。

2. 新規環状ヌクレオチド8-ニトロ-cGMPの生成

NOは、哺乳類細胞では三つのアイソフォームのNO合成酵素(NOS), すなわち神経型NOS(nNOS), 誘導型NOS(iNOS), 内皮型NOS(eNOS)の働きにより、基質であるL-アルギニンを酸化的に分解して作られる。nNOSとeNOSは恒常的に発現しているが、iNOSは細菌のリポ多糖(LPS)や炎症性サイトカインで発現が誘導される。NOは、血圧調節、神経伝達、免疫調節、感染防御など多彩な生理機能の調節に関わり、そのシグナル伝達経路として可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化を介したcGMPを二次メッセンジャーとする経路が知られている。一方、NOは、共存するROSや金属と反応すると、化学反応性に富むRNSへ変換され、核酸・タンパク質・脂質といった生体分子を化学修飾(酸化, ニトロ化, ニトロソ化)する。このような生体分子の化学修飾は、もっぱら酸化ストレスにおける生体分子の損傷反応という観点で捉えられてきたが、近年、NO依存的に生成するニトロ化産物が酸化ストレスに対する適応応答や細胞保護シグナルにおける重要な細胞内メッセンジャーとして機能していることが明らかになってきた⁵⁻⁷⁾。

筆者らは、NOの産生に伴う核酸塩基グアニンのニトロ

化反応について解析を行ってきた。たとえば、iNOSの発現を誘導するLPSとインターフェロン- γ (IFN- γ)で刺激したRAW264.7細胞では、8-ニトログアニン誘導体に対する特異抗体を用いた免疫染色により陽染像が観察された。さらに液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)および高速液体クロマトグラフィー-電気化学検出を用いて、細胞内で生成した8-ニトログアニン誘導体を詳細に解析した結果、8-ニトロ-cGMPが最も主要なニトロ化産物であることが明らかになった⁵⁾。筆者らは、より正確に細胞内の8-ニトロ-cGMPを定量するために、安定同位体希釈法とLC-MS/MSを組み合わせた定量法を開発した(図2)。LPSとサイトカインで刺激したC6ラットグリオーマ細胞が生成する8-ニトロ-cGMPとcGMPをこの方法により定量すると、8-ニトロ-cGMPの細胞内濃度は最大で50 μ M程度に達した⁶⁾。これは、従来よりNOシグナルの二次メッセンジャーとして知られているcGMPの濃度を大きく上回るものであり、8-ニトロ-cGMPが細胞内の主要な環状ヌクレオチドの一つとして生成していることが示された。

3. 8-ニトロ-cGMPのシグナル伝達：親電子性とタンパク質S-グアニル化

8-ニトロ-cGMPは、cGMPと同様にcGMP依存性プロテインキナーゼを活性化し、血管平滑筋の弛緩活性などの生理活性を有している⁵⁾。その一方で、8-ニトロ-cGMPはニトロ基に由来する親電子性により、cGMPとは全く異なる機序でシグナル活性を発揮する。すなわち、8-ニトロ-cGMPは、タンパク質中のシステイン残基のチオール基と反応しcGMP構造を付加する、タンパク質S-グアニル化という全く新しい翻訳後修飾を行うことが明らかになった(図3)⁵⁾。8-ニトロ-cGMPによるS-グアニル化は、標的となるシステインチオール基の酸解離度(pKa)が大きく影

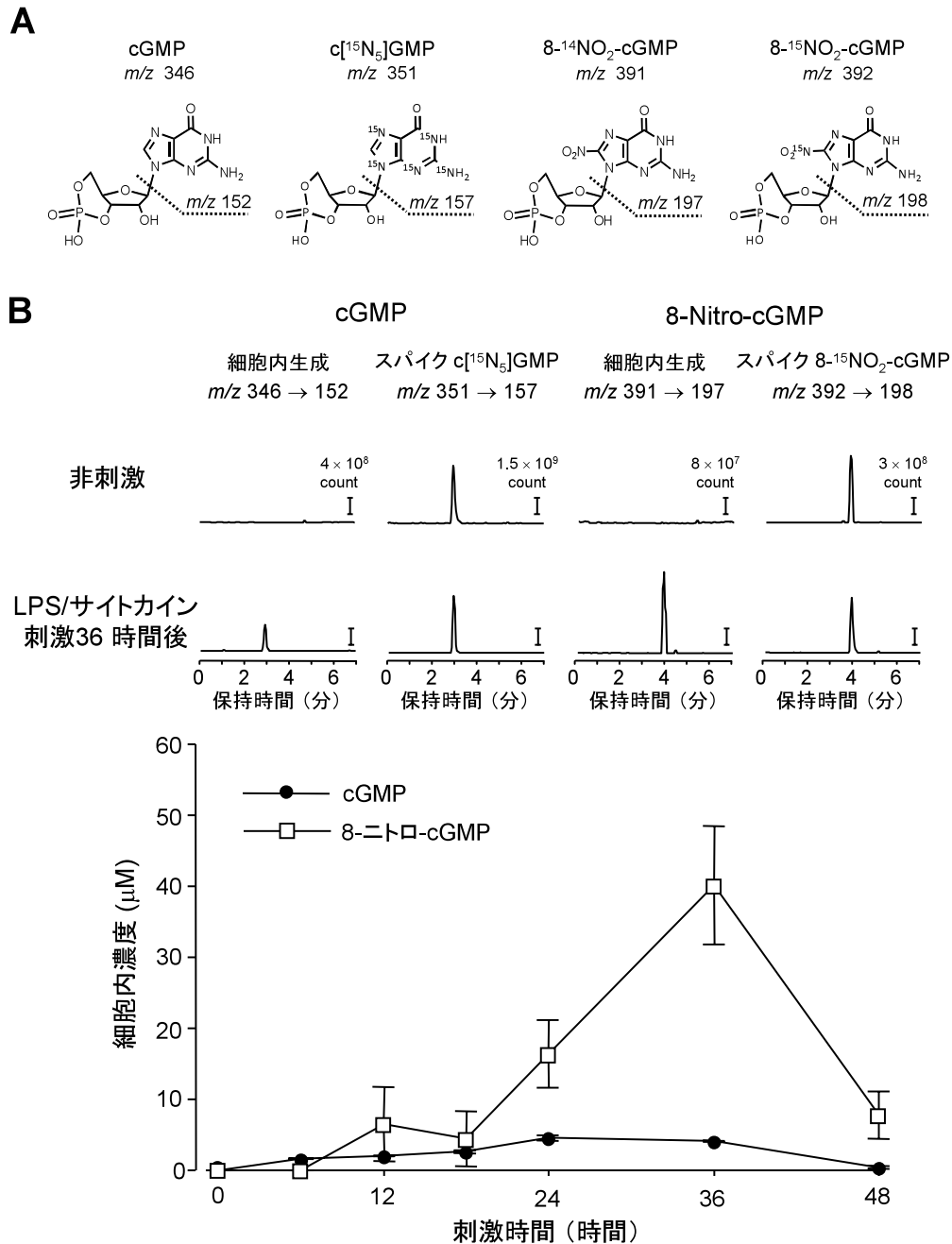


図2 安定同位体希釈法とLC-MS/MSを用いたLPS/サイトカイン刺激細胞における8-ニトロ-cGMP細胞内生成の定量的解析

(A) に示すような安定同位体¹⁵Nで標識したcGMPおよび8-ニトロ-cGMPを作製し、細胞抽出物の調製過程で、既知量の安定同位体標識cGMPおよび8-ニトロ-cGMPを添加した。LC-MS/MSをもちいて、LCにおける保持時間をもとにcGMPおよび8-ニトロ-cGMPを分離・同定するとともに、それぞれの添加した安定同位体標識体(内部標準)の質量分析におけるフラグメント強度をもとに、細胞内で生成したcGMPおよび8-ニトロ-cGMP(非標識体)を正確に算定・定量した。(B)は、この方法を用いて定量したC6細胞におけるLPS/サイトカイン刺激後のcGMPおよび8-ニトロ-cGMPの細胞内濃度の変化を示す。文献7より改変。

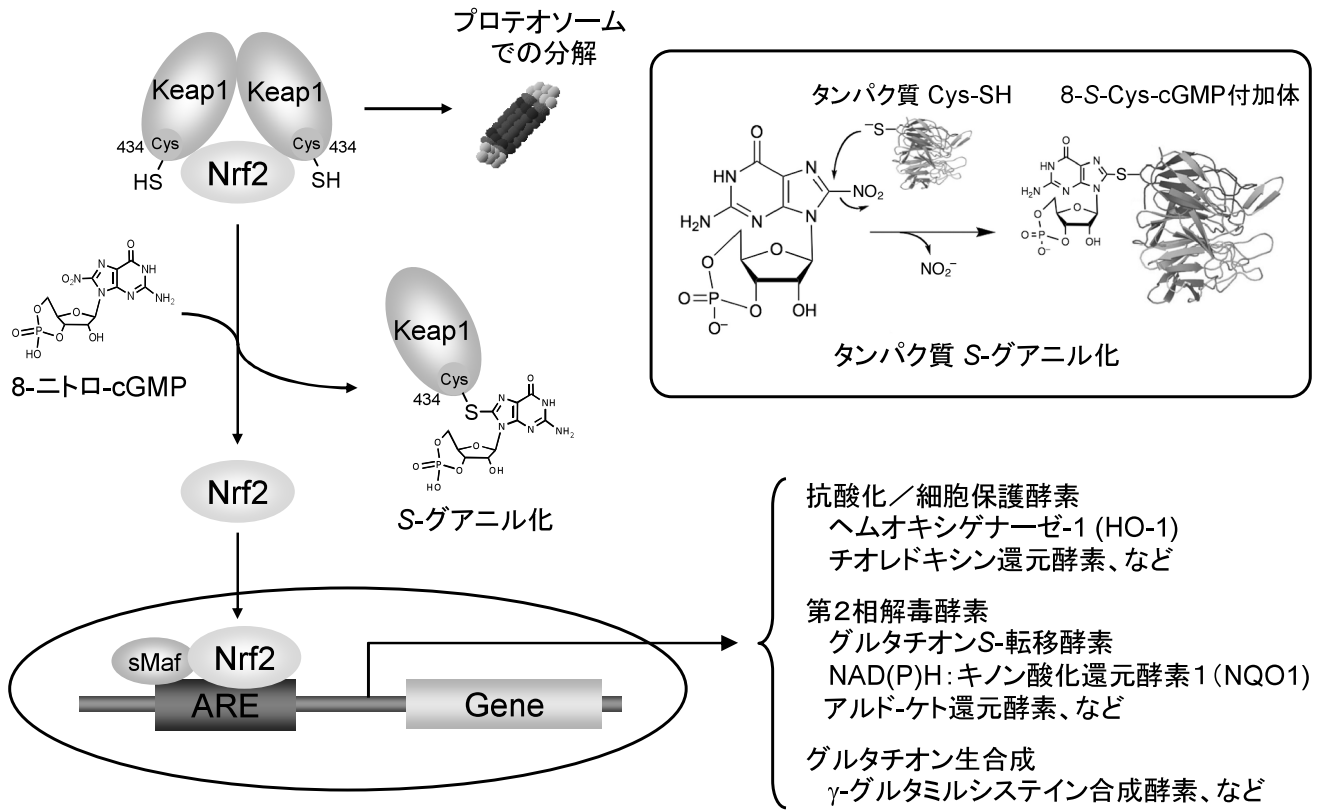


図3 酸化ストレスセンサータンパク質 Keap1 の S-グアニル化と酸化ストレス適応応答関連遺伝子の発現誘導
 平常時には Keap1 は Nrf2 と結合しており、Nrf2 の転写活性を抑制しているが、Keap1 のシステインチオール基が S-グアニル化を受けると Nrf2 が活性化し、酸化ストレスに対する適応応答に関連した各種遺伝子の発現が誘導される。文献7より改変。
 ARE: antioxidant responsive element

響し、pKa の低い（酸性度の高い）チオール基に対してより高い反応性を示していた。一般的な低分子チオール化合物（グルタチオンやL-システイン等）のpKaは8.5程度であるが、細胞内タンパク質の中には、近傍に存在する塩基性アミノ酸のイオン効果等により、著しく低いpKa（6.0以下）のシステインチオール基を持つものがある⁹⁾。興味深いことに、それら低pKa（高レドックス活性）チオール含有タンパク質の多くは酸化ストレスに対して感受性で、8-ニトロ-cGMPなどの親電子物質によりチオール基の化学修飾を受ける。さらに、チオール基の化学修飾によるコンフォメーション変化を介したシグナル伝達を行うことで、このようなタンパク質は、いわゆる酸化ストレスセンサータンパク質として機能している^{9,10)}。8-ニトロ-cGMPは、酸化ストレスセンサータンパク質のリガンドとして働き、4-ヒドロキシ-2-ノネナールや15-デオキシ-Δ12,14-プロスタグランジンJ₂などの生体内で内因性に生成する親電子物質とともに細胞内親電子シグナルを担っていると考えら

れる。

4. 8-ニトロ-cGMPによるタンパク質 S-グアニル化と適応応答シグナル

Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) は、酸化ストレスセンサータンパク質の代表的なものであり、反応性の高いシステイン残基を有している。平常時の細胞内では、Keap1は転写因子Nrf2と結合しており、Nrf2のユビキチン化とプロテオソームでの分解を促進し不安定化することにより、Nrf2の転写活性を抑制している¹¹⁾。Keap1のシステイン残基のチオール基がROSや親電子物質により化学修飾を受けると、Keap1がNrf2から解離し、その結果Nrf2の安定化と核への移行が起こり酸化ストレスの適応応答に関与する様々な遺伝子の発現がもたらされる(図3)。Nrf2により発現制御を受ける遺伝子には、①抗酸化に関わる酵素(ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1),チオレドキシシンドラクダーゼ等)、②第二相解毒酵素(グルタチオン

S-トランスフェラーゼ等), ③グルタチオン合成に関わる酵素(グルタミルシステイン合成酵素)等が知られている¹¹⁾.

筆者らはS-グアニル化タンパク質を特異的に認識する抗体を作製し, LPS/IFN- γ で刺激したRAW264.7細胞やサルモネラを感染させたマウス腹腔マクロファージの細胞内で生成するS-グアニル化タンパク質を解析した結果, Keap1が8-ニトロ-cGMPによるS-グアニル化の標的タンパク質の一つであることが分かった⁵⁾. さらにC6細胞を用いて, 8-ニトロ-cGMPによるKeap1/Nrf2系のシグナル伝達について詳細に解析した. LPSとサイトカインで刺激したC6細胞では, 8-ニトロ-cGMPの生成とともにKeap1が著明にS-グアニル化を受け, それに伴いNrf2の活性化とその下流のHO-1等の遺伝子群の発現増加が観察された⁶⁾. 8-ニトロ-cGMPで処理をしたC6細胞では, Keap1のS-グアニル化とNrf2の活性化, HO-1の発現増加が観察されるとともに, 過酸化水素処理による細胞死が有意に低下した. これらのことより, 細胞内で生成する8-ニトロ-cGMPは, Keap1のS-グアニル化を介してNrf2の活性化をもたらし, 酸化ストレスへの適応応答に働いていることが示唆された⁶⁾.

筆者らは, Keap1のS-グアニル化を介した8-ニトロ-cGMPのシグナル伝達について, 細菌感染症モデルでも解析を行っている. サルモネラ感染マクロファージにおいて, ROSとNOの産生が増加するとともに8-ニトロ-cGMPが生成しKeap1のS-グアニル化が起こること, および, 生成した8-ニトロ-cGMPがサルモネラ感染細胞内で細胞保護作用を発揮していることが明らかとなった^{5,12)}. これらのことから, タンパク質S-グアニル化は活性酸素・NOのユニークなシグナル伝達経路として, 生体の酸化ストレス応答の主要な制御機構を担っていると考えられる.

5. おわりに

8-ニトロ-cGMPは, その親電子性に基づくタンパク質S-グアニル化というユニークな反応により, 活性酸素・NOシグナルの二次メッセンジャーとして機能していることが明らかとなった. 今後, 現在開発を進めているS-グアニル化標的タンパク質の高感度な検出法などを用いてさらなるS-グアニル化標的タンパク質を探索することにより, 8-ニトロ-cGMPシグナルの詳細な機能解明が期待される¹³⁾. また, 細胞内におけるタンパク質S-グアニル化の制御因子や, 8-ニトロ-cGMPおよびS-グアニル化タンパク質の生成・代謝機構等¹⁴⁾も今後の重要な研究課題であり,

これらを明らかにすることにより, 活性酸素・NOシグナルおよび細胞内親電子シグナルの理解をさらに深めることができると考えられる.

謝辞

本稿で紹介した研究成果は, 東北大学の山本雅之先生, 本橋ほづみ先生, 大阪府立大学の居原秀先生を始め多くの方々との共同研究によるものであり, 深く感謝いたします. これらの研究は, 文部科学省新学術領域研究「活性酸素のシグナル伝達機能」の支援を受け行われました.

- Halliwell, N. (2007) *Biochem. Soc. Trans.*, 35, 1147-1150.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., & Freeman, B.A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1620-1624.
- Nathan, C. (2003) *J. Clin. Invest.*, 111, 769-778.
- D'Autreaux, B. & Toledano, M.B. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell*, 8, 813-824.
- Sawa, T., Zaki, M.H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, T., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H., & Akaike, T. (2007) *Nature Chem. Biol.*, 3, 727-735.
- Fujii, S., Sawa, T., Ihara, H., Tong, K.I., Ida, T., Okamoto, T., Ahmed, A.K., Ishima, Y., Motohashi, H., Yamamoto, M., & Akaike, T. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 23970-23984.
- Akaike, T., Fujii, S., Sawa, T., & Ihara, H. (2010) *Nitric Oxide*, 23, 166-174.
- Winterbourn, C.C. & Hampton, M.B. (2008) *Free Radic. Biol. Med.*, 45, 549-561.
- Forman, H.J., Torres, M., & Fukuto, J. (2002) *Mol. Cell. Biochem.*, 234/235, 49-62.
- Na, H.-K. & Surh, Y.-J. (2006) *Mol. Carcinog.*, 45, 368-380.
- Kobayashi, M. & Yamamoto, M. (2006) *Advan. Enzyme Regul.*, 46, 113-140.
- Zaki, M.H., Fujii, S., Okamoto, T., Islam, S., Khan, S., Ahmed, K.A., Sawa, T., & Akaike, T. (2009) *J. Immunol.*, 182, 3746-3756.
- Saito, Y., Taguchi, H., Fujii, S., Sawa, T., Kida, E., Kabuto, C., Akaike, T., & Arimoto, H. (2008) *Chem. Commun.*, 5984-5986.
- Ahmed, K.A., Sawa, T., Ihara, H., Kasamatsu, S., Yoshitake, J., Rahaman, M.M., Okamoto, T., Fujii, S., & Akaike, T. (2012) *Biochem. J.*, 441, 719-730.

藤井 重元, 赤池 孝章

(熊本大学大学院生命科学研究部微生物学分野)

The critical role of nitrated cyclic guanine nucleotide signaling via protein S-guanylation in the antioxidant adaptive response

Shigemoto Fujii and Takaaki Akaike (Department of Microbiology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan)