

助成番号 0726

アンギオテンシンによる活性酸素種産生を介したMAPキナーゼホスファターゼ(MKP) 制御機構と食塩感受性高血圧における臓器障害への関与

鎌田 英明

広島大学大学院医歯薬学総合研究科探索医科学講座医化学研究室

概要 アンギオテンシン II に応答した血圧上昇には p38 や JNK などの MAP キナーゼの活性化が関与するが、この活性化には新規 NADPH オキシダーゼ NOX により産生された活性酸素種が重要な役割を担うことが明らかにされてきた。またアンギオテンシン II は NF- κ B の活性化を介して腫瘍壊死因子(TNF α)の発現を誘導するが、TNF α も活性酸素種の産生を誘導して組織障害を引き起こすことが知られている。NOX により産生された O₂⁻ は H₂O₂ に変換された後に、O₂⁻ と鉄と共役したフェントン反応により OH[•] に変換されるが、これら O₂⁻、H₂O₂、および OH[•] の活性酸素種のいずれが MAP キナーゼ系の活性化に連関するのかわかり不明であった。さらにこれらの活性酸素種がどのような機構を介して MAP キナーゼの活性化を誘導して細胞応答を引き起こすのかについては不明であった。そこでアンギオテンシン II と TNF α について、それぞれのシグナル系における活性酸素種の作用を解析し、酸化ストレスに応答した細胞応答や細胞障害の分子機構を解析した。興味深いことに、最も反応性の高いラジカルであり、タンパク質機能を非特異的に阻害する分子種であると考えられてきた OH[•] が MAP キナーゼの駆動に最も重要な役割を担うことが判明した。さらにアンギオテンシン II や TNF α により産生された活性酸素種は MAP キナーゼに対するホスファターゼとして機能する MAP キナーゼホスファターゼ(MKP)の活性中心のシステイン残基の酸化修飾を誘導することにより MKP の活性を抑制し、MAP キナーゼ系の活性化を増強することが判明した。さらに活性酸素種の産生に伴う酸化ストレスは I κ B α の分解を介して NF- κ B の活性化を引き起こすことも見いだされた。これらの応答は細胞の活性化を誘導すると共に、細胞死の誘導を介して組織障害にも関与すると考えられる。

1. はじめに

生体内ではミトコンドリアにおける電子伝達系からもれだした電子が酸素分子に受容されてスーパーオキシド(O₂⁻)が生じる。また、活性化されたマクロファージや好中球などの食細胞でも NADPH オキシダーゼが活性化されて O₂⁻を生じる¹⁾。NADPH オキシダーゼは食細胞に特異的に発現していると従来は考えられていたが、食細胞で発現している NOX2 の他に、繊維芽細胞や血管内皮細胞や平滑筋細胞においても新規の NADPH オキシダーゼファミリーである NOX1 や NOX4 が発現していることが明らかにされてきた²⁾。食細胞では体内に進入してきた細菌の殺菌を引き起こすために O₂⁻の産生が誘導されるが、アンギオテン

シン II に応答して食細胞内で産生された活性酸素種は NF- κ B の活性化に対して促進的に機能することにより腫瘍壊死因子(TNF α)などのサイトカインの産生を増強して炎症応答に関与することも報告されている³⁾。さらにアンギオテンシン II による刺激を受容した血管内皮細胞や平滑筋における NADPH オキシダーゼが細胞の活性化や細胞遊走に関与することも明らかにされてきた。また炎症部位に於いて産生された TNF α は標的細胞内で活性酸素種の産生を誘導し、臓器障害を引き起こすことも知られている⁴⁾。TNF α による細胞死の誘導にはミトコンドリアに起因する活性酸素種の産生が関与すると考えられているが、ある種の細胞株では TNF α により活性化された NADPH オキシダー

由来の活性酸素種が細胞死を誘導するのに主要な役割を担うとの報告もなされている⁵⁾。さらに近年の研究により、活性酸素種には酸化ストレスを発生させて細胞障害や組織障害を引き起こす元凶としての役割だけでなく、細胞内シグナル伝達系のメディエーターとして機能する能動的な役割を有することも明らかにされてきた⁶⁾。しかしながら、NADPH オキシダーゼやミトコンドリアで産生された活性酸素種がどのような分子機構を介して細胞応答を誘導するのかについては未解明の部分が多く、その解明が待たれているのが現状である。

活性酸素種には O_2^- 、 H_2O_2 、および OH^\cdot の三つの分子種が存在することが知られている。とくに NADPH オキシダーゼやミトコンドリアの電子伝達系から供与された電子は酸素分子に供与されて O_2^- を生じ、さらに O_2^- は H_2O_2 に変換された後に、鉄と共役したフェントン反応により OH^\cdot に変換される。 OH^\cdot はこれらの活性酸素種の中でも特に反応性に富んでおり、非特異的に生体分子の酸化修飾を引き起こすことにより、酵素などのタンパク質成分の機能障害のみならず、脂質や DNA の障害を引き起こす元凶であると考えられてきた。しかし、これらの O_2^- 、 H_2O_2 、および OH^\cdot のいずれがアンギオテンシン II や $TNF\alpha$ のシグナル伝達や細胞応答に関与するのかは不明である。

一方、p38 などの MAP キナーゼは平滑筋細胞の遊走と増殖により血管肥厚を惹起し、高血圧に関与すると想定される。これまでにアンギオテンシン II による血管障害の機序に MAP キナーゼや転写因子 AP-1 が重要な役割を担うことが報告されてきた。またアンギオテンシン II に応答した NF- κ B の活性化と、これに伴う $TNF\alpha$ などの炎症性サイトカインの産生が血管障害に関与することも想定されてきた。本研究ではアンギオテンシンおよび $TNF\alpha$ に応答して産生された活性酸素種に起因する細胞応答の分子機構について MAP キナーゼ系の活性化に着目し、活性酸素種による MAP キナーゼホスファターゼ (MKP) の制御の分子機構および、活性酸素種による細胞障害の分子機構についての解析をおこなった。さらに活性酸素による新規の NF- κ B の活性化機構について解析した。

2. 方法および結果

アンギオテンシン II や高塩分食に応答した血圧上昇には ERK や p38 や JNK などの MAP キナーゼの活性化が

関与することが報告されている。まず MAP キナーゼの活性化にアンギオテンシン II により誘導される活性酸素種の産生に関与するかを検討した。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) にアンギオテンシン II を作用させた後に細胞抽出液を回収して抗リン酸化 ERK 抗体、抗リン酸化 p38 抗体、および抗リン酸化 JNK 抗体を用いたウエスタンブロットにより MAP キナーゼ系の活性化を解析した。アンギオテンシン II により ERK、p38、JNK などの MAP キナーゼの活性化が誘導されることが観察されたが、このときに培養液中に 100 μ M の抗酸化剤 butylated hydroxyanisole (BHA) や 10 mM の N-アセチルシステイン (NAC) を培地中に添加しておくことと活性化が顕著に抑制されることが判明した (Fig. 1(A, B))。このことからアンギオテンシン II により産生された活性酸素種が MAP キナーゼの活性化に関与していると考えられた。さらに NADPH オキシダーゼ阻害物質であるジフェニレン・ヨードニウム (DPI) を培地中に添加しておくこととアンギオテンシン II による p38 や JNK などの活性化が減弱することから、アンギオテンシン II による MAP キナーゼ系の活性化には NADPH オキシダーゼが関与すると考えられた (Fig. 1(C))。

NADPH オキシダーゼにより産生される O_2^- 、 H_2O_2 、および OH^\cdot の分子種のうちのいずれが酸化ストレスに応答した MAP キナーゼ系の活性化に主要な役割を担っているのかを検討した。とくに OH^\cdot はこれらの活性酸素種の中でも特に反応性に富む。 OH^\cdot 特異的感受性蛍光色素である hydroxyphenyl fluorescein (HPF)、 O_2^- 感受性色素である hydroethidine (Het)、および O_2^- 、 H_2O_2 、および OH^\cdot のいずれとも反応する ROS 感受性色素 dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFH-DA)、および抗酸化剤を用いて解析した。まず細胞に HPF、HEt、DCFH-DA を負荷した後に細胞内で産生された各種の活性酸素種について FACS を用いて定量的に解析した。細胞に H_2O_2 を作用させると HEt の蛍光強度が増強することなしに HPF と DCFH の蛍光強度が増強し、細胞内で OH^\cdot が生じることが確認された。またウエスタンブロット法により p38 と JNK のリン酸化・活性化を解析したところ、さらに OH^\cdot の産生に伴いこれらの MAP キナーゼの活性化が誘導されるが、このときに OH^\cdot 特異的なスカベンジャーである thiourea を添加しておくこと、 OH^\cdot 産生の抑制に伴う HPF の蛍光強度の減少と共に H_2O_2 に応答した MAP キナーゼの活性化が抑制され

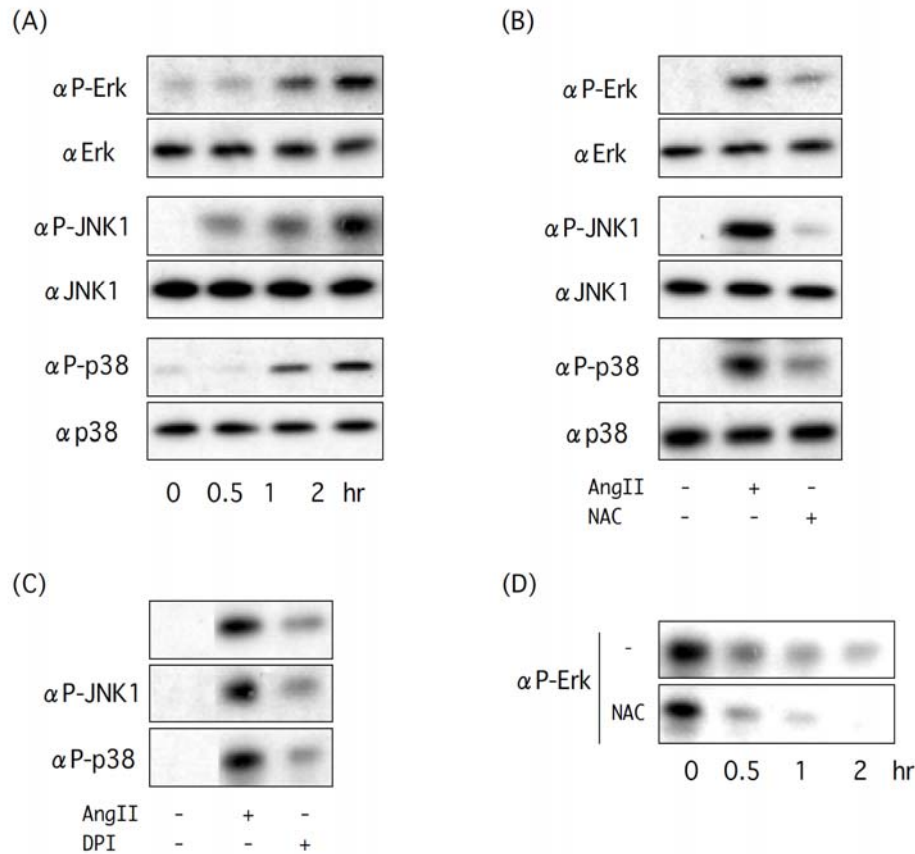


Figure 1. (A) アンジオテンシン II を作用させた後に各抗体を用いたウエスタンブロットにより MAP キナーゼ系の活性化を解析した。(B, C) 培地中に NAC または DPI を添加してアンジオテンシン II で 1 時間の刺激を行った。(D) アンジオテンシン II 刺激後、NAC 存在下および非存在下で PD98059 を作用させた。

ることが観察された。さらに鉄のキレーターによりフェントン反応を抑制して OH^\cdot の産生を減少させた場合でも、HPF の蛍光強度の減少と共に MAP キナーゼの活性化が減弱することが観察された。これらのことより、 O_2^\cdot や H_2O_2 は最終的に最も反応性に富む OH^\cdot に変換されて細胞応答を引き起こすと考えられた。以上の事実より、NADPH オキシダーゼを介して産生された活性酸素種は最終的に OH^\cdot に変換されて MAP キナーゼを活性化すると考えられた。

さらに活性酸素種がどのような機構を介して MAP キナーゼの活性化を亢進するのかについての検討を行った。これまでに酸化ストレスや活性酸素種の産生に伴う JNK の活性化には JNK の上流で機能する Ask1 の活性化が関与しており、活性酸素種のセンサーとして機能するチオレドキシンと Ask1 との会合が制御することが知られている⁷⁾。これに加えて活性酸素種によるチロシンホスファターゼファミリーの活性抑制がチロシンキナーゼや MAP キナーゼ

の活性化に関与することも報告されている。そこで我々は MAP キナーゼに対するホスファターゼとして機能する MAP キナーゼホスファターゼ (MKP) に対する活性酸素種的作用について解析した。まずアンジオテンシン II により MAP キナーゼのリン酸化を誘導した後に、MEK 阻害剤である PD98059 を作用させて ERK の活性化に対する上流からのシグナルをブロックした後に ERK の脱リン酸化反応について抗リン酸化 ERK 抗体を用いて解析した。PD98059 の作用により ERK の脱リン酸化反応が誘導されるが、このときに培地中に NAC を添加して活性酸素種の効果をブロックすると ERK の脱リン酸化反応は亢進することが見いだされた (Fig. 1(D))。アンジオテンシン II により産生された活性酸素種は MKP の活性を抑制することにより MAP キナーゼの脱リン酸化が抑制されて、MAP キナーゼの活性化が亢進すると考えられた。

MKP はチロシンホスファターゼファミリーに属する脱リン

酸化酵素であり、その活性中心はシステイン残基により構成されている。チロシンホスファターゼファミリーの活性中心のシステイン残基は反応性に富むことから、酸化ストレスにより容易に酸化されて失活すると考えられる⁸⁾。この応答は最終的に MAP キナーゼの活性化に至ると考えられる。MKP の活性中心のシステイン残基の酸化ストレスによる酸化修飾を、細胞内における MKP3 の発現系、および大腸菌を用いて作製した精製 MKP3 タンパク質を用いて解析した。MKP3 分子上には 9 個のシステイン残基がコードされているが、それぞれのシステイン残基をセリンに置換した変異体を作製しこれを細胞内に発現させた。細胞を H₂O₂ で処理した後に細胞抽出液を還元剤非存在下で調整し、SDS-PAGE 上の挙動をウェスタンブロット法により解析したところ、酸化ストレスに反応して MKP3 は分子間ジスルフィド結合を形成して高分子量の複合体を形成することが見いだされた (Fig. 2)。

このジスルフィド形成による複合体形成に関与するシステイン残基に関して、システイン残基のセリン置換型 MKP3 変異体の解析を行ったところ、活性中心の 293 番目のシステイン残基のセリン置換変異体では顕著に複合体形成が抑制されることから、このシステイン残基がジスルフィド形成と複合体形成においてもっとも重要な部位であることが確認された。また、精製タンパク質に対して試験管の中で H₂O₂ を反応させた場合でも、細胞内と同様に分子間ジスルフィドの形成により高分子量複合体が形成されたが、活性中心の 293 番目のシステイン変異体ではこの形成が顕著に抑制されていた。MKP3 は反応中心のシステイン残基が最も酸化修飾を受容しやすい部位であり、この酸化により MKP は容易に失活することにより MAP キナーゼの活性化を増強すると考えられた。

MAP キナーゼのうち特に JNK の活性化は細胞の増殖や運動を亢進する活性だけでなく、アポトーシスを強力に誘発するシグナルとして機能する。アンジオテンシン II に応じた NF-κB の活性化により産生された TNFα は、炎症応答や標的細胞に細胞死応答を引き起こすことにより臓器障害に関与することが想定されるが、細胞死に MKP の酸化修飾が関与することを TNFα による細胞死の実験系を用いて検証した (Fig. 3)。繊維芽細胞に TNFα を作用させても細胞死は誘導されないが、この細胞に活性中心のシステイン残基を変異させて酸化修飾を受容した状態を模

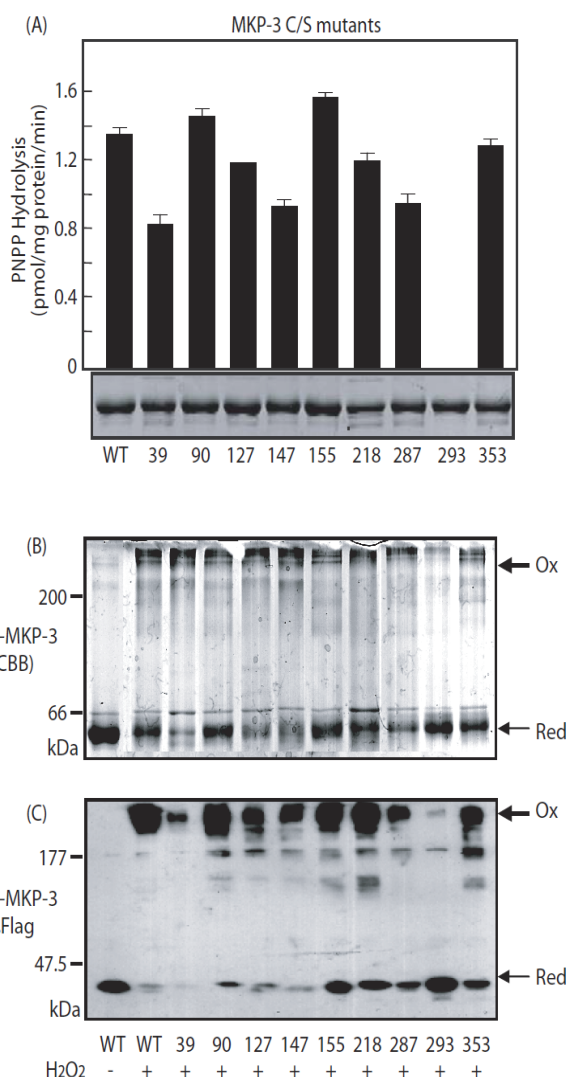


Figure 2. (A) MKP3 の各変異体タンパク質におけるホスファターゼ活性。(B) MKP3 の各変異体タンパク質に H₂O₂ を作用させた後に非還元条件下での SDS-PAGE を行った。(C) MKP3 の各変異体を細胞に発現させた後に H₂O₂ を作用させ、非還元条件下での SDS-PAGE 上での挙動をウェスタンブロットで解析した。

倣した MKP1 や MKP5 変異体を細胞内に発現させて TNFα を作用させたところ、顕著な細胞死が誘導されることが判明した。このことは、TNFα に応答して活性酸素が産生されるような細胞では、活性酸素により MKP が失活して JNK の強力な活性化を誘導し、この応答が細胞死を誘導することを示唆する。

さらに活性酸素種の NF-κB の活性化に対する効果を解析した。細胞に酸化ストレスを付与したところ、NF-κB の阻害タンパク質である IκBα は核内に移行して βTrCP を含む

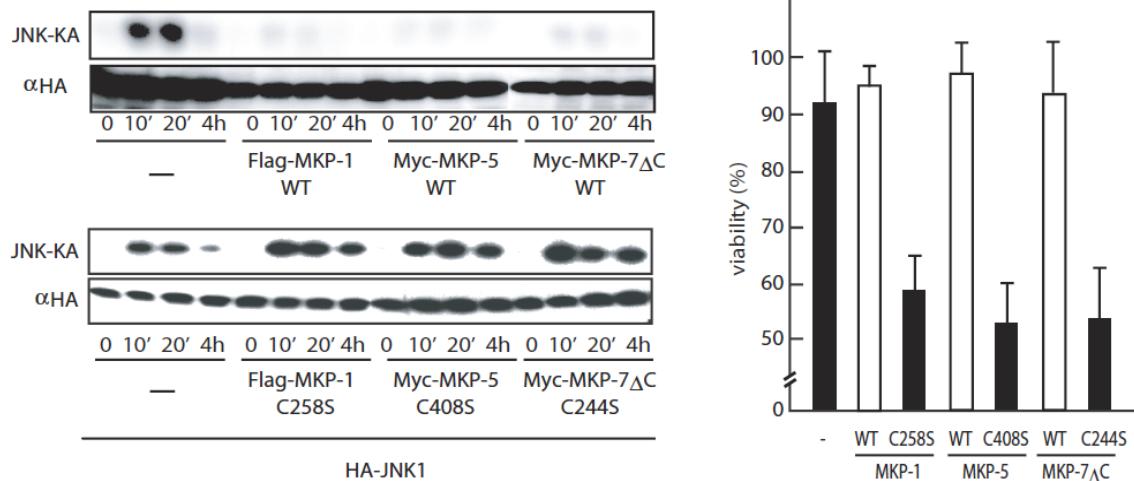


Figure 3. (左)各分子種のMKPの野生型と活性中心システイン残基の変異体を細胞に発現させ、TNF α によるJNKの活性化に対する効果をウェスタンブロットで解析した。(右)各分子種のMKPを発現させた細胞にTNF α を作用させ、細胞死に対する効果をFACSにより解析した。

ユニークな複合体を形成することが判明した。最終的にI κ B α はユビキチン・プロテアソーム系により分解されて、NF- κ Bの活性化が誘導される。

以上のことより、アンジオテンシンIIやTNF α にตอบสนองして細胞内で産生された活性酸素種がMKPの酸化修飾によるMAPキナーゼの活性化やNF- κ Bの活性化を介して、細胞の活性化・遊走や細胞死応答に密接に関連しており、最終的に臓器障害の要因となることが想定された。

3. 考察

細胞内で産生された活性酸素種のうちOH \cdot が最も主要な役割を担う分子種である事を見いだした。このことは活性酸素種が産生されたとしてもOH \cdot の産生を抑制すれば酸化ストレスに伴う細胞障害を軽減することが出来ることを意味する。O $_2$ \cdot^- またはH $_2$ O $_2$ が細胞内に産生されても、フェントン反応による両者の共役を抑制してOH \cdot の産生を抑制することが重要であると考えられた。

本研究では活性酸素にตอบสนองした細胞反応と細胞障害の重要なメディエーターとしてMKPの役割を明らかにした。MKPには複数の分子種が存在しており、それぞれのMKPは重複してERK、p38、JNKのMAPキナーゼの活性を制御している。これらのMKPは臓器や細胞種において固有の発現パターンを有しており、さらに細胞質や細胞核などの細胞内局在もそれぞれの分子種で異なっている

ことから、それぞれに特異的な役割を担っていると考えられる。しかしそれぞれのMKP分子の個別の役割は完全には明らかにされておらず、この解明が待たれるところである。特に酸化ストレスを介した高血圧と臓器障害に対するそれぞれのMKPの関与と、そのメカニズムの解明が必要であると考えられる。

さらにNF- κ Bの活性化にはI κ B α のリン酸化と分解が最も重要であることが知られている。とくに炎症部位ではTNF α がI κ B α のリン酸化を引き起こしてNF- κ Bの活性化を誘導することが重要な役割を担う。さらにアンジオテンシンIIもNF- κ Bの活性化によりサイトカインの産生を誘導する。本研究ではTNF α やアンジオテンシンIIによる活性酸素の産生がI κ B α のリン酸化とは別に新規のメカニズムでNF- κ Bの活性化を誘導する事を見いだした。活性酸素によるNF- κ Bの活性化とMAPキナーゼの活性化は、酸化ストレスによる血管リモデリングに関与することが想定される。今後、本研究で明らかにされたアンジオテンシンIIの細胞応答における分子機構が炎症や血管障害などにどのように関与するのかについて検討を行う必要があると考えている。

引用文献

1. Kamata, H. and H. Hirata, *Redox regulation of cellular signalling*. Cell Signal., 1999. **11**(1): p. 1-14.

2. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-9.
3. El Bekay, R., *et al.*, *Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB*. Blood, 2003. **102**(2): p. 662-71.
4. Kamata, H., *et al.*, *Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases*. Cell, 2005. **120**(5): p. 649-61.
5. Kim, Y.S., *et al.*, *TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death*. Mol Cell, 2007. **26**(5): p. 675-87.
6. Rhee, S.G., *Cell signaling. H2O2, a necessary evil for cell signaling*. Science, 2006. **312**(5782): p. 1882-3.
7. Saitoh, M., *et al.*, *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. Embo J, 1998. **17**(9): p. 2596-606.
8. Tonks, N.K., *Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling*. Cell, 2005. **121**(5): p. 667-70.

No. 0726

Regulation of MAP Kinase Phosphatase Activity by Reactive Oxygen Species in the Angiotensin II Signal and Tumor Necrosis Factor

Hideaki Kamata

Department of Molecular Medical Science, Graduate School of Biomedical Sciences,
University of Hiroshima

Summary

MAP kinases including ERK, p38 and JNK, play important role in angiotensin II signaling. Angiotensin II induces tumor necrosis factor (TNF α) expression through activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B), and both Angiotensin II and TNF α activate several types of NADPH oxidase (NOX) and generate reactive oxygen species (ROS) including O $_2^{\cdot-}$, H $_2$ O $_2$, and the hydroxyl radical (OH \cdot) in endothelial cell, vascular smooth muscle cells, neutrophils, and macrophages. O $_2^{\cdot-}$ and H $_2$ O $_2$ are readily converted into the hydroxyl radical (OH \cdot) by Fenton reaction in the presence of Fe. Recent studies have revealed that ROS mediates angiotensin II and TNF signaling and are involved in vascular disorders. However, it was unclear how ROS activate MAP kinases in angiotensin II and TNF signaling pathways. Here we found that OH \cdot scavenger thiourea effectively suppresses H $_2$ O $_2$ -induced MAP kinase activation indicating an essential role of OH \cdot in oxidative stress-induced MAP kinase activation. Accumulation of ROS inactivates MAP kinase phosphatases (MKPs) by oxidation of their catalytic cysteine, which in turn leads to activation of MAP kinases. TNF α also stimulates MAP kinases by inactivation of MKPs through generated ROS and promotes cell death in NF- κ B-deficient cells. Furthermore, we found that ROS induce I κ B α degradation by association with β TrCP in a specific manner resulting in NF- κ B activation. These results suggest that generation of ROS by angiotensin II and TNF α is involved in a number of vascular disorders, including hypertension and atherosclerosis, through activation of MAP kinases and NF- κ B.