

〈特集：酸化ストレス〉

## 酸化ストレスとレドックス制御 ～タンパク質の酸化的修飾と活性調整～

榮長 裕晴<sup>1),2)</sup>、吉原 栄治<sup>1),2)</sup>、松尾 禎之<sup>2)</sup>、淀井 淳司<sup>2)</sup>

### Oxidative stress and redox regulation — protein oxidative modification and activation —

Hiroharu Einaga<sup>1),2)</sup>, Eiji Yoshihara<sup>1),2)</sup>, Yoshiyuki Matsuo<sup>2)</sup> and Junji Yodoi<sup>2)</sup>

**Summary** It is important throughout the life of animals to regulate the oxygen concentration and to scavenge oxygen radicals. Reactive oxygen species (ROS) are generated as by-products in the respiratory system and are increased under inflammatory conditions. Oxidative stress is induced by ROS production which exceeds the cell's ability to detoxify ROS and is involved in many diseases, such as heart failure, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and cancer.

Among the key antioxidant enzymes, thioredoxin and glutaredoxin play important roles in cell defense against oxidative stress and the maintenance of redox homeostasis. Thioredoxin is a small redox active protein distributed ubiquitously in various mammalian tissues and cells and acts not only as an antioxidant but also an anti-inflammatory and an antiapoptotic protein. Here we discuss the roles of thioredoxin on oxygen stress and redox regulation.

**Key words:** Oxidative stress, Redox regulation, Thioredoxin

#### I. はじめに

酸化ストレスとは内因性、あるいは外因性の要因により生じる活性酸素を、生体が十分に処理することが出来なくなるために生じるものである。生体は常に多くの酸化ストレスに曝された状態で生きているが、生体は酸化ストレスに

対して様々な制御機構を働かせることで適応し、恒常性を維持している。この恒常性の維持において重要な役割を担っている機構がレドックス制御であり、分子の酸化還元反応によって細胞の機能を調節している機構である。このレドックス制御において重要な働きを行っている分子の1つとしてチオレドキシシンがある。チオレド

<sup>1)</sup>京都大学大学院生命科学研究科高次生命科学専攻

<sup>2)</sup>京都大学ウイルス研究所生体応答学研究部門感染防御研究分野

〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53

<sup>1)</sup>Division of Systemic Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University,

<sup>2)</sup>Department of Biological Responses, Institute for Virus Research, Kyoto University,

53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

キシンはグルタチオンとともに、細胞内において基質となるタンパク質を還元することによって、遺伝子の転写やタンパク質の合成・分解、および細胞増殖や細胞死の制御を行っている。

今回は、酸化ストレスによって生じるチオレドキシンのレドックス制御を通じて、タンパク質の酸化的修飾とそれによる活性調節について述べる。

## II. レドックス制御

レドックスとは還元 (reduction) と酸化 (oxidation) の合成語である。酸化還元反応は2つの物質間に電子の授与が起こる反応であるが、レドックス制御とは分子の酸化還元反応による細胞機能の調節、すなわち遺伝子の転写や発現、タンパク質の細胞内局在や合成、分解、および細胞の増殖、分化、アポトーシス、ネクローシス、細胞間伝達などが制御される現象の総称である。

生体は外界から常にいろいろなストレスにさらされている。しかし、いつもそのストレスに屈するわけではないのは、生体内にあるいろいろな制御システムによって生体の恒常性 (ホメオスタシス) を維持しているからである。レド

ックス制御とは、生体の酸化還元状態を制御することによってこのような多彩なストレスに適応しホメオスタシスを維持する、地球上の生命の存続に必要な基本システムであると考えて良いだろう。このシステムは多くの外来性の因子、すなわち薬剤、放射線、紫外線、環境物質である農薬、ダイオキシシンなど、また、高熱、低温、低酸素状態に適応するように機能する (図1)。

レドックス制御は酸化ストレスを契機とするストレス応答反応とも捉えることが出来るため、レドックス制御と酸化ストレス応答は表裏一体の関係にある。過度の酸化ストレスは脂質やDNA、タンパク質などの生体分子に変性的修飾や障害を与え、細胞機能障害や細胞死を引き起こすため、がんや老化、動脈硬化などの重要な原因の1つであると考えられている。一方、軽度の酸化ストレスは細胞の増殖やアポトーシスといった生体にとって防御的に働く応答を誘導する。

また、細胞外から細胞内へのシグナル伝達の際さまざまな段階において、シグナル伝達に関わる分子はレドックス制御を受けていることが明らかになっている。生体内で酸化還元を受けやすいのはタンパク質のシステイン残基であり、細胞内においてシステイン残基の還元を行って

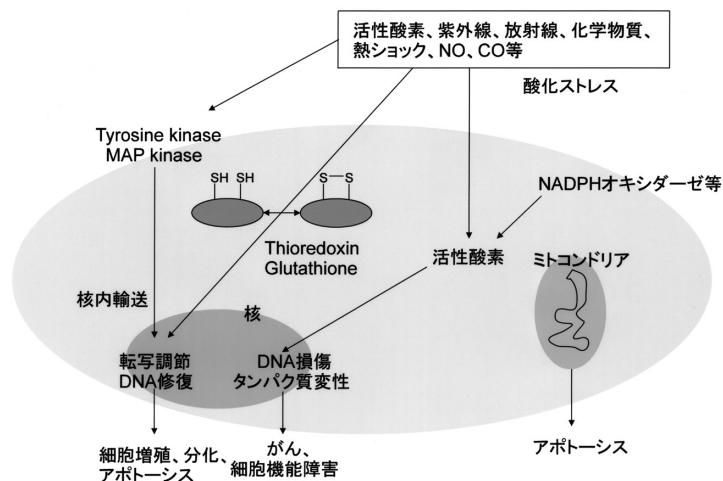


図1 ストレスシグナルとレドックス制御  
タンパク質のSH基の修飾がシグナルのセンサーとなり、またシグナルの調節 (レドックス調節) に重要である。一方、細胞内外からのストレスは細胞に反応 (ストレス応答、ストレスシグナル) を誘導し、アポトーシス、細胞周期制御、DNA修復、タンパク質合成・分解、シグナル伝達などの様々な生命現象を引き起こす。

いるのはチオレドキシン (thioredoxin, TRX) 系とグルタチオン系の分子である。チオレドキシンは活性部位に2つのシステイン残基を持ち、このシステイン残基の酸化還元反応によって活性酸素種の消去の他に、転写因子やシグナル伝達因子との結合・離脱による活性調整を行っていると考えられている。それ以外にも、リンパ球への酸化ストレスによって細胞膜のチロシinkinナーゼの活性化が生じることや、細胞外からの過酸化水素やNADPHオキシダーゼにより生産される活性酸素種によって強くリン酸化酵素が活性化されることなど、レドックス/酸化ストレスは様々なステップで細胞のシグナル伝達の活性化や調節に関与していることが明らかになってきた。

### Ⅲ. チオレドキシンとは

チオレドキシン (thioredoxin: TRX) は、1964年にスウェーデンのPeter Reichard らによって、大腸菌のDNA合成に必要なリボヌクレオチド還元酵素の補酵素として発見された<sup>1)</sup> (図2)。チオレドキシンは活性部位に-Cys-X-X-Cys-配列を有し、この2つのシステイン残基間でジスルフィド結合をつくる酸化型と、遊離チオール基をもつ還元型が存在する。還元型チオレドキシンは基質タンパク質のジスルフィド結合を還元し、自らは酸化型となることが知られている (図3)。ヒトチオレドキシンは1980年代後半に淀井らによって、インターロイキン2レセプターアルファ鎖の誘導因子として、成人T細胞白血病由来因子 (ATL-derived factor: ADF) として報告された<sup>2)</sup>。遺伝子クローニングの結果、ADFはヒトチオレドキシンと同一であることが判明した。同時期に同定されたEpstein-Barrウイルス感染細胞増殖因子3B6-IL-1や、B細胞増殖因子であるMP6-BSF、さらに妊娠早期の血清中に存在する免疫抑制物質early pregnancy factorの成分のひとつも、ヒトチオレドキシンと同一の分子であった<sup>3)</sup>。チオレドキシンは、酸化ストレスを引き起こす原因である紫外線、放射線、酸化剤、ウイルス感染、虚血再灌流障害、抗癌剤投与など、様々な要因によって誘導されることが報告されている<sup>3)</sup>。誘導されたチオレドキシンは、単独で一重項酸素やヒドロキシルラジカルを消去するほか<sup>4)</sup>、チオレドキシン依存性のペルオキシダーゼであるペルオキシレドキシンの協調作用に

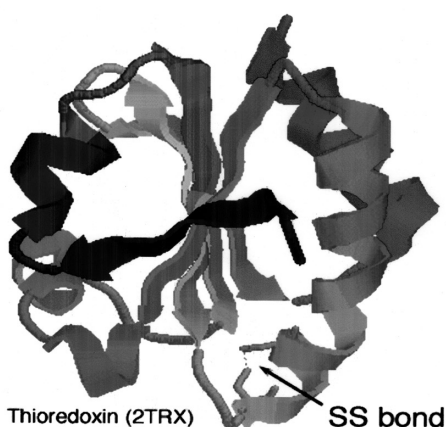


図2 ヒトチオレドキシンの立体構造

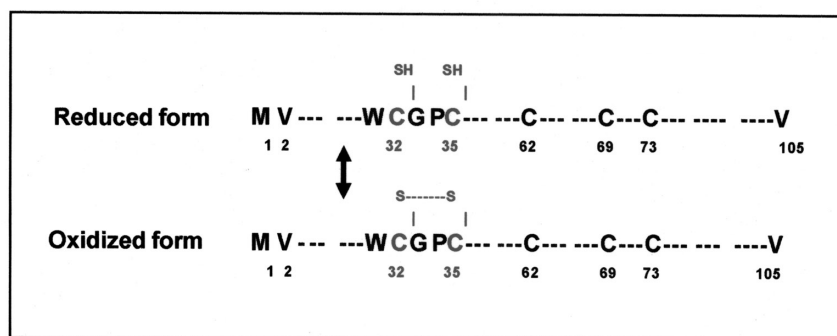


図3 還元型チオレドキシンと酸化型チオレドキシ  
チオレドキシンは活性中心に2つのシステイン残基をもっており、これらのジチオール/ジスルフィド交換反応により基質タンパク質のジスルフィドを還元する。

より、細胞内の活性酸素種 (ROS) を消去する抗酸化物質として働く<sup>5)</sup> (図4)。チオレドキシシ高発現マウスは長寿傾向を示し<sup>6)</sup>、酸化ストレス誘導性の疾患に対して防衛的であること、種々の化学物質や抗癌剤に抵抗性を示すことなどからも、生体内における抗ストレス因子としてのチオレドキシシの重要性は明らかである。また、チオレドキシシのノックアウトマウスは胎性致死となり、胎仔の発生・分化の初期段階にチオレドキシシが必須の遺伝子であることが示唆されている<sup>7)</sup>。さらにチオレドキシシは、種々の遺伝子発現を調節する転写因子や細胞内

のシグナル伝達分子の活性を、直接・間接的に制御していることも報告されている。

#### IV. チオレドキシシによるレドックス制御

1) チオレドキシシとチオレドキシシ結合タンパク質 (TBP-2)

チオレドキシシの結合蛋白質として当研究室で同定したThioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2) は還元型チオレドキシシと選択的に結合し、その活性を抑制する働きを持つことを我々の教室から報告した<sup>8)</sup> (図5)。TBP-2の発現は酸化

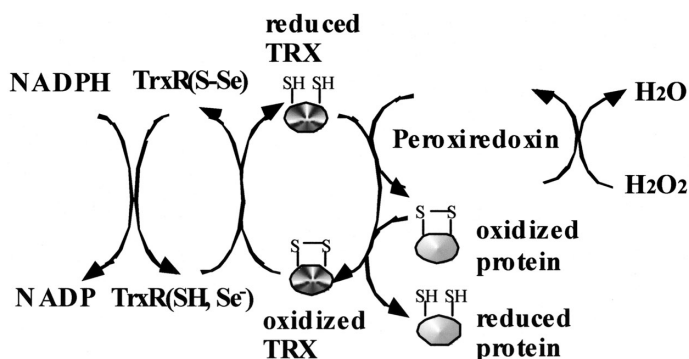


図4 チオレドキシシ系の生化学

酸化型チオレドキシシはNADPHおよびチオレドキシシ還元酵素により還元型チオレドキシシに還元され、基質タンパク質のジスルフィド結合を還元する。またはチオレドキシシ依存性ペルオキシダーゼであるペルオキシレドキシシを還元型にすることにより過酸化水素を水に還元する。

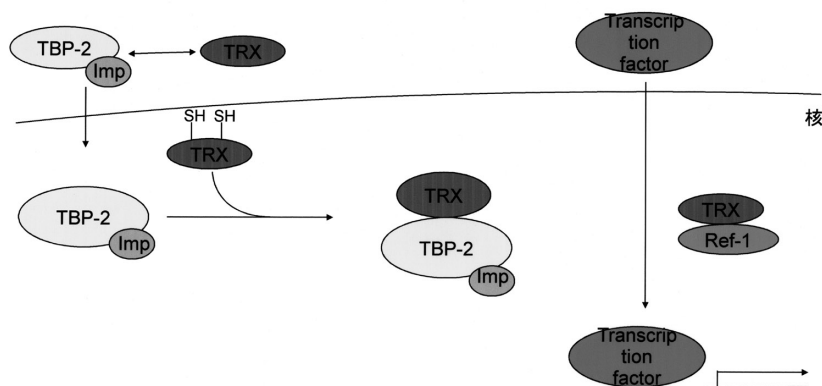


図5 チオレドキシシとTBP-2の結合

TBP-2はチオレドキシシ結合タンパク質である。結合するのは還元型のチオレドキシシのみであり、酸化型のチオレドキシシは結合しない。TBP-2はチオレドキシシ以外にもImportin- $\alpha$  (Imp) との結合が知られており、複合体を形成することによって細胞機能制御を行っている。



もたない変異型チオレドキシソレダクターゼの大量発現やその阻害剤の負荷により、AP-1やNF- $\kappa$ Bの転写活性化能が失われることが報告されている<sup>19)</sup>。このようなことから、チオレドキシソが電子供与体としてそれらの転写因子の活性化に重要な役割を担っていると考えられる。

細胞の生と死を決定するシグナルの調節機構は多様である。このシグナル調節機構にもレドックス制御が深く関わっていることが示されつつある。その中でも、apoptosis signal-regulating kinase (ASK) -1はアポトーシス制御機構に深く関わるMAPキナーゼキナーゼキナーゼとして一條らによって同定された<sup>20)</sup>。一條らによって、チオレドキシソはこのASK-1のN末端領域と直

3) チオレドキシソによるアポトーシス調節機構

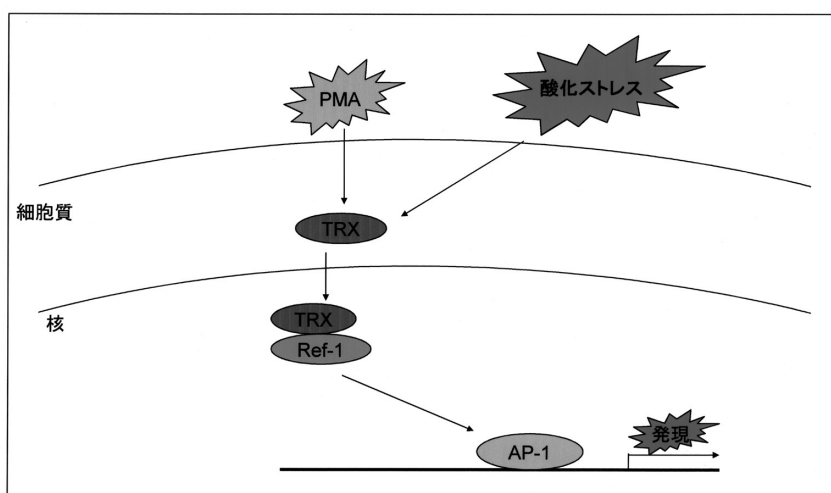


図6 酸化ストレスによるチオレドキシソとRef-1の活性化  
酸化ストレスを受けることによってチオレドキシソは核内に移行し、活性中心のシステイン残基を用いてRef-1と結合することでRef-1を活性型にする。活性型になったRef-1はAP-1のDNA結合能を亢進し、遺伝子の発現を増加させる。

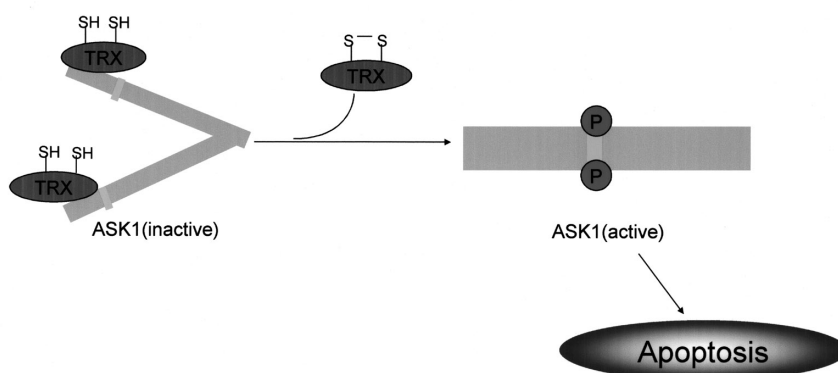


図7 チオレドキシソによるASK1の活性制御  
還元型チオレドキシソはASK1と結合することによって、その活性を抑制している。酸化ストレスを受けて細胞質内が酸化状態になったとき、チオレドキシソの活性中心にあるシステイン残基が参加され、ASK1から解離する。その結果、ASK1は自己リン酸化を起こし、アポトーシスを誘導する。

接結合していることが酵母two-hybrid法による解析の結果で明らかとなった<sup>21)</sup>。チオレドキシンは細胞内においてASK-1に結合して活性を制御しており、チオレドキシンの過剰発現は各種刺激によるASK-1の活性化を抑制していることがわかった<sup>21)</sup> (図7)。また、チオレドキシんとASK-1の結合は還元的条件下でのみ観察され、さらにチオレドキシンの活性中心のシステイン残基に変異を加えた場合にはASK-1との結合は見られなかった。このことから、ROSによってチオレドキシンの活性中心のシステイン残基が酸化されることで生じるチオレドキシんとASK-1の解離がASK-1の活性化において重要なステップの1つであると考えられている。

#### 4) チオレドキシンの生存、増殖促進の調節機構

チオレドキシンはASK-1の制御によってアポトーシスを調整することで生存に関与していることが明らかとなってきた。その一方で、チオレドキシンの細胞の生存や増殖を担う分子の活性への関与に関しても研究が進められており、最近、我々はチオレドキシンのノックダウンによって細胞周期が停止することを報告した<sup>22)</sup>。

チオレドキシンをRNA i法によってノックダウンすると細胞周期G1期で停止した。細胞周期G1期の調節因子の中にサイクリンD1があるが、チオレドキシンのノックダウンによる細胞周期の停止は、このサイクリンD1の転写レベルでの発現抑制によるものであることがわかった。サイクリンD1のプロモーター解析から、チオレドキシンはAP-1結合サイトを介してサイクリンD1の転写制御を行うことが示唆された。AP-1の構成因子であるc-fos等の発現を制御しているMAPキナーゼの1つERK1/2のリン酸化レベルを調べたところ、チオレドキシンのノックダウンによってEGF誘導性のERK 1/2のリン酸化が抑制されていることもわかった。

チオレドキシンは単にアポトーシスを抑制することだけでなく、生存や増殖を促す経路の制御にも関わることが明らかとなった。今後、より詳細な機構が解明されることで、チオレドキシンのレドックス制御は一部の限られた機構ではなく、幅広い機構において重要な役割を担っていることが明らかになるとと思われる。

## V. おわりに

ここまでチオレドキシンの働きを通じて、酸化ストレスによって生じるタンパク質の酸化的修飾とそれによる活性調節について述べてきた。酸化ストレスは様々な疾患の原因または誘因となることが知られており、それらから生体を保護するためにシグナル伝達分子や転写因子が重要な役割を担っている。それらの活性・不活性を調節するために様々な形でのタンパク質の酸化的修飾が行われている。今後の研究により、新たなタンパク質の酸化的修飾によるシグナル調節機構が明らかになる可能性はきわめて高いと考えられる。

酸化ストレスからの生体の保護は生物の生存にとって重要な問題である。今後、さらに酸化ストレスによって生じるタンパク質の酸化的修飾についての報告がなされ、生物がいかにして酸化ストレスから生体を保護しているのか、そのメカニズムが解明されていくと思われる。

### 参考文献

- 1) Holmgren A: Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 237-271, 1985
- 2) Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, Hamuro J, Brown N, Arai K, Yokota T, Wakasugi H, et al.: ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J.*, 8: 757-764, 1989
- 3) Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J: Redox regulation of cellular activation. *Ann. Rev. Immunol.*, 15: 351-369, 1997
- 4) Das KC, Das CK: Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 277: 443-447, 2000
- 5) Tamura T, Stadtman TC: A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: 1006-1011, 1996
- 6) Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, Kondo N, Hirabayashi Y, Ishizaki-Koizumi S, Hirakawa T, Inoue T, Yodoi J: Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid. Redox. Signal.*, 4: 693-696, 2002

- 7) Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, Taketo M: Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.*, 178: 179-185, 1996
- 8) Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, Takagi Y, Sono H, Gon Y, Yodoi J: Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J. Biol. Chem.*, 274: 21645-21650, 1999
- 9) Ahsan MK, Masutani H, Yamaguchi Y, Kim YC, Nosaka K, Matsuoka M, Nishinaka Y, Maeda M, Yodoi J: Loss of interleukin-2-dependency in HTLV-I-infected T cells on gene silencing of thioredoxin-binding protein-2. *Oncogene.*, 25: 2181-2191, 2006
- 10) Oka S, Liu W, Masutani H, Hirata H, Shinkai Y, Yamada S, Yoshida T, Nakamura H, Yodoi J: Impaired fatty acid utilization in thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)-deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome. *FASEB J.*, 20: 121-123, 2005
- 11) Oka S\*, Yoshihara E\*, Bizen-Abe A, Liu W, Watanabe M, Yodoi J, Masutani H: Thioredoxin binding protein-2/thioredoxin-interacting protein is a critical regulator of insulin secretion and peroxisome proliferator-activated receptor function. *Endocrinology.*, 150: 1225-1234, 2009
- 12) Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J, Miyazaki J: Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J. Exp. Med.*, 188: 1445-1451, 1998
- 13) Yamamoto M, Yamato E, Toyoda S, Tashiro F, Ikegami H, Yodoi J, Miyazaki J: Transgenic expression of antioxidant protein thioredoxin in pancreatic beta cells prevents progression of type 2 diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.*, 10: 43-49, 2008
- 14) Nishinaka Y, Masutani H, Oka S, Matsuo Y, Yamaguchi Y, Nishio K, Ishii Y, Yodoi J: Importin alpha1 (Rch1) mediates nuclear translocation of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3)-up-regulated protein 1. *J. Biol. Chem.*, 279: 37559-37565, 2004
- 15) Ago T, Liu T, Zhai P, Chen W, Li H, Molkentin JD, Vatner SF, Sadoshima J: A redox-dependent pathway for regulating class II HDACs and cardiac hypertrophy. *Cell.*, 133: 978-993, 2008
- 16) Okuyama H, Yoshida T, Son A, Oka S, Wang D, Nakayama R, Masutani H, Nakamura H, Nabeshima YI, Yodoi J: Thioredoxin binding protein 2 modulates natural killer T cell-dependent innate immunity in the liver: possible link to lipid metabolism. *Antioxid Redox Signal.*, 2009, (In press)
- 17) Seki S, Akiyama K, Watanabe S, Hatsushika M, Ikeda S, Tsutsui K: cDNA and deduced amino acid sequence of a mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) with significant homology to Escherichia coli exonuclease III. *J. Biol. Chem.*, 266: 20797-20802, 1991
- 18) Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J: AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94: 3633-3638, 1997
- 19) Karimpour S, Lou J, Lin LL, Rene LM, Lagunas L, Ma X, Karra S, Bradbury CM, Markovina S, Goswami PC, Spitz DR, Hirota K, Kalvakolanu DV, Yodoi J, Gius D: Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Oncogene.*, 21: 6313-6327, 2002
- 20) Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y: Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.*, 275: 90-94, 1997
- 21) Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H: Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO j.*, 17: 2596-2606, 1998
- 22) Mochizuki M, Kwon YW, Yodoi J, Masutani H: Thioredoxin regulates cell cycle via the ERK1/2-cyclin D1 pathway. *Antioxid Redox Signal.*, 2009, (In press)