

レドックス制御による細胞膜関連チロシンキナーゼの活性化

Mechanisms of redox-linked regulation of membrane-associated protein tyrosine kinases activation.

川本 善之¹ 武田湖州恵¹ 中島 泉²

Yoshiyuki KAWAMOTO¹ Kozue TAKEDA¹ Izumi NAKASHIMA²

要 旨

プロテインチロシンキナーゼ (Protein Tyrosine Kinase, PTK) は細胞の増殖や分化、サイトカイン類の遺伝子発現等に必要となる初期の細胞内シグナリングにおいて鍵となる働きを担う。PTKには受容体型および非受容体型が存在するが、これらの多くが細胞膜脂質マイクロドメインのラフトと呼ばれる微小領域において効率的に活性化される仕組みが解明されつつある。これまでの研究で、細胞膜と相互作用するPTKの活性化に少なくとも二段階の酸化還元制御 (レドックス制御) が関わっていることが明らかとなっている。すなわち、ジスルフィドを介したタンパク質のラフトでの凝集、そしてそれに伴う活性酸素の産生と細胞内キナーゼ領域に高度に保存されたモチーフ配列 (Met-X-X-Cys-Trp) に含まれるシステインを介した活性化である。本稿ではラフトを介した活性酸素の産生の機序とPTKの活性化機序について、それぞれの相互作用を含めて考察した。

キーワード: プロテインチロシンキナーゼ (PTK)、レドックス、ラフト

はじめに

PTKは受容体型と非受容体型PTKが知られており、一般的に細胞膜から細胞核への情報伝達において、初期のシグナル発生時に重要な役割を担っている。受容体型は通常、リガンドの結合後二量体を形成し、しばしばGPI (glycosyl phosphatidyl inositol)-アンカータンパク質と呼ばれる膜結合型タンパク質と複合体を形成し、自己リン酸化を伴って活性化する。非受容体型はSrcファミリーPTKが知られており、N末端アミノ酸が翻訳後脂質修飾されている。活性化時にはGPIアンカータンパク質と共に細胞膜マイクロドメインの膜脂質ラフトと呼ばれる微小領域に局在し、そこで効率よくシグナルを発生・増幅しているこ

とが知られている。PTKの初期活性化機序については不明な点が多いが、少なくともキナーゼドメインの特徴的なチロシン残基のリン酸化が酵素活性の制御に深く関わる事が明らかとなりつつある。例えばSrcキナーゼの場合、C末端の抑制性チロシン残基が、この部位のチロシンを特異的にリン酸化する酵素Cskによりリン酸化を受けるとSrcの酵素活性は負に制御され、逆にホスファターゼにより脱リン酸化を受けると立体構造変化と活性ループ領域のチロシン残基の自己リン酸化を伴って活性化される。こうしてPTKの酵素活性化はホスファターゼによってネガティブ、ポジティブいずれにも制御されている。

T細胞受容体の刺激やリガンドの膜受容体タンパク質への結合に際し、細胞内で活性酸素種

1 名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞免疫学講座 - Department of Immunology, Nagoya University Graduate School of Medicine (2005年中部大学赴任予定)

2 名古屋大学副総長、中部大学客員教授 - Vice-President, Nagoya University; Visiting Professor, Chubu University (2005年中部大学赴任予定)

(Reactive Oxygen Species, ROS) が産生さる。ROSは反応性が極めて高く、産生される量や種類により、細胞の分化や癌化、細胞死を引き起こすことが知られ、その産生機構の解明と詳細な細胞内動態の解析は重要な課題と位置づけられている。近年、ROSは細胞内シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして機能していると注目されている。細胞内においてROSはタンパク質内のシステイン残基を酸化修飾し、ジスルフィド結合の形成を誘導する。この性質により、ROSはPTKの活性化を制御するタンパク質のひとつであるチロシンホスファターゼのシステイン残基を酸化修飾してその不活化を引き起こしてPTKを活性化に導くほか、PTKを直接酸化修飾してタンパク質同士を架橋し、活性化を誘導する可能性が示唆されている。本稿ではレドックス制御機序に基づく新しいPTKの活性化制御の仕組みを論ずる。

1. 細胞膜脂質ラフトのレドックス制御機能

マウス胸腺由来T細胞を用い、SH基反応性の高い水銀(Hg)による細胞膜表面タンパク質の挙動を調べると、GPI-アンカータンパク質であるThy-1やCD3、CD4といった膜貫通タンパク質が

速やかに凝集する現象が見られた (Nakashima et al., 1994)。これらのイベントに引き続き、SrcファミリーPTKであるLckの高度な活性化が惹起され、さらにMAPキナーゼのERKの活性化が導かれた (Nakashima et al., 1994, Rahman et al., 1993)。Hgによるこれらの応答は細胞への処理後わずか5秒からと極めて早く、30秒以内にピークを迎えた。HgによるLckの凝集およびリン酸化はDTTやNACといった還元剤により阻害されたことから、レセプターを介するシグナル伝達は、リガンドとレセプターの結合によるシグナルの発生様式とは別に、チオール反応性化合物が惹起する酸化還元 (レドックス) 制御に基づく新しい活性化機序が存在することが強く示唆された (Nakashima 1996, Nakashima et al., 1997, Nakashima et al., 1994)。

Hgと同様、SH基反応性であるヒ素 (As) 化合物もThy-1の凝集惹起を引き起こし、後続してアポトーシスを導くPTKおよびCaspase-3の活性化を誘導した (Hossain et al., 2000)。Asはまた、細胞膜脂質ラフト (図1) に特徴的なガングリオシドGM1の凝集を引き起こすことが見出された。興味深いことに、ラフト構造を破壊するメチル-β-シクロデキストリン処理条件においては、As

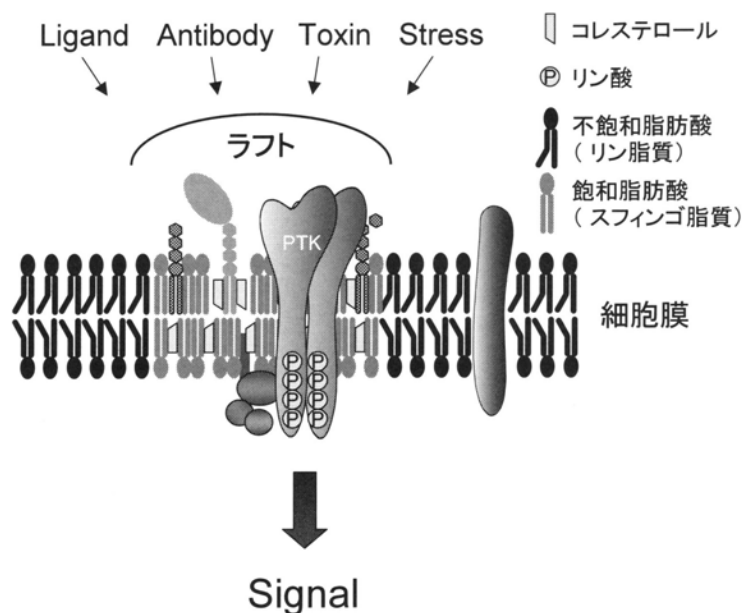


図1 細胞膜脂質ラフトの構造

ラフトとはスフィンゴ脂質やコレステロール、ガングリオシドを主成分とする細胞膜マイクロドメインである。飽和脂肪酸を持つスフィンゴ脂質はコレステロールとの親和性が高く、それぞれの分子間相互作用により脂質が高度に充填されたマイクロドメインを形成している。ラフトには多くの受容体やシグナル伝達に寄与する重要な分子が様々な刺激に応じて集積し、これらのシグナル分子間の効率的な相互作用をもたらす場となっており、いわばシグナルアンプとして機能していると考えられている。

が誘導するThy-1やGM1の凝集、PTKの活性化、Caspase-3の活性化、アポトーシスすべてのイベントが阻害されることが判った (Hossain et al., 2000)。Asは細胞内ROSを発生させるが、メチル- β -シクロデキストリンはROSの発生をも阻害した。最近、我々はAs誘導によるROS産生はラフトが基点となっており、初期に発生するROS産生にはミトコンドリアの寄与は少なく、細胞骨格のアクチン繊維により産生量が調節されていることを見出している (未発表データ)。Asは一方、細胞の生存シグナルに寄与するAktの活性化をもたらすことも明らかにされており、ここでもラフトの機能が必要であることが明らかとなっている。これらの事実から、レドックス反応に関連した細胞膜表面レセプターの活性化には細胞膜ラフトが強く関与していることが示唆された。

2. PTKに高度に保存されたシステインを介したレドックス制御によるPTK活性化機構

1993年、Veilletteら (Veillette et al., 1993)

はLckに含まれる5つのシステイン (Cys217, Cys224, Cys378, Cys464, Cys475) のアラニン置換体を作成し、それぞれの酵素活性化とタンパク質の安定性について評価を行った。その結果、Cys464とCys475のアラニン置換体ではそれぞれ酵素活性が消失し、Cys475のアラニン置換体ではタンパク質の半減期が著しく減少した。これらのことから、これら二つのシステインはLckの酵素活性化において、構造の安定化上重要かつレドックス制御を受ける標的アミノ酸であろうと予想した。しかしながらこれらのシステインがレドックス反応に基づいた酵素活性化の引き金となるかどうかの具体的な検討はなされていなかった。そこで、受容体型PTKであるc-RETおよび細胞外領域欠損体であるRET-PTC-1を用いて、LckのCys464とCys475に相当するCys976とCys987 (c-RET)、Cys365とCys376 (RET-PTC-1) に着目し、それぞれのアラニン置換体を作成してこれらシステイン残基の機能を検討した。NIH3T3細胞に導入したc-RetやRET-PTC-1はそれぞれ紫外線刺激

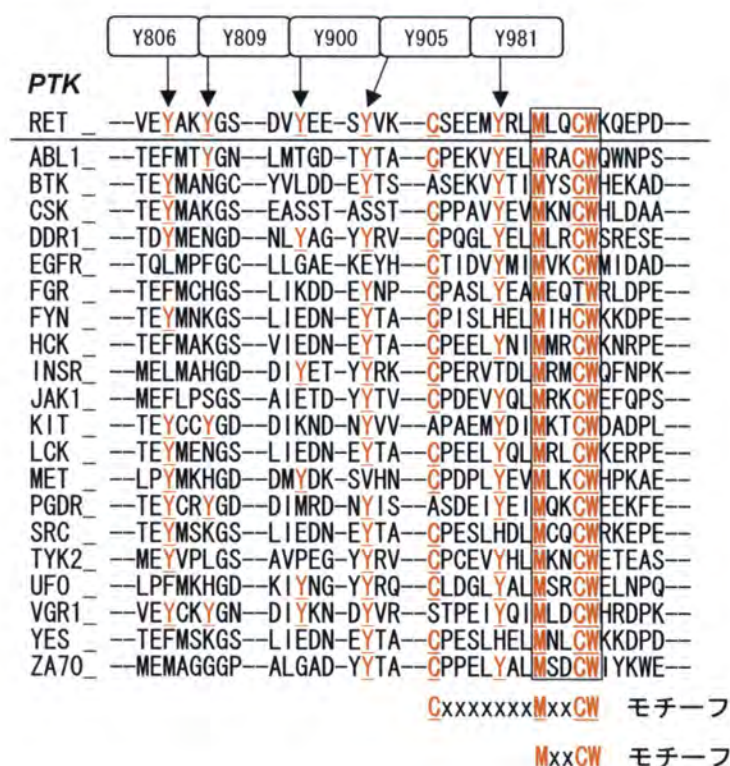


図2 ヒトチロシンキナーゼのマルチプルアライメントとMxxCWモチーフ

Swiss Protデータベースに登録されている80種類のヒトPTKのうち一部を抜粋し、必要なアミノ酸配列部分のみを示した。RETで同定された自己リン酸化部位 (Y806, Y809, Y900, Y905, Y981) は、ヒトPTK間でよく保存されていた。また、ヒトPTKの中でMxxCWモチーフあるいはCxxxxxxxMxxCWモチーフは極めて高度に保存されていることが判った (それぞれ97.5%, 82.5%)。FGRは例外的にMxxTWとなっている (Kawamoto et al. J Biol Chem 2004 Figure 6より一部改変して引用)。

(Kato et al., 2000a, Kato et al., 2000b)、浸透圧ストレス刺激 (Takeda et al., 2001) により二量体化を誘導し酵素活性化を導くことが明らかとなったが、c-RETのCys987のアラニン置換体(C987A) およびRET-PTC-1のC376Aではこれら刺激による酵素の活性化はほぼ完全に消失した。一方、C976AあるいはC365Aでは活性化消失は見られなかった。これらの結果から、c-RETのCys987、RET-PTC-1のCys376は、酵素の触媒活性をもたらす上で重要なアミノ酸残基であり、これらシステインのSH基修飾による二量体化を介したレドックス制御機序が考えられた。

公開データベース (Swiss-Prot) に登録されている80種類のヒトPTKのアミノ酸配列を、多重アライメントを行い比較検討した (Kawamoto et al., 2004) (図2)。興味深いことに、共通基本骨格を有するこれら80種類のPTKのうち、FGRを除くすべてのPTKはMet-x-x-Cys-Trp (MxxCW) モチーフを有することが判明した (FGRはシステインの代りにスレオニンであった)。このモチーフ中のシステインはc-RETのCys987に相当する。また、最近の知見では、FGRのこのモチーフにおけるスレオニンは、プロテインキナーゼCの基質配列と相同となり、MxxCWモチーフを介するレドックス制御に関連したシグナリングを補償する可能性を示唆する結果を得つつある (投稿準備中)。これらの事実から、MxxCWモチーフは普遍的にPTKの機能において重要な意味を持つと考えられた。

3. PTKの自己リン酸化部位の同定

PTKの活性化において、チロシン残基のリン酸化は酵素の触媒活性化と下流へのシグナル伝達に重要である。しかしながら、これまでどのチロシン残基が実際にリン酸化されるのかを網羅的かつ確定的に調べた報告はなかったが、我々は質量分析機器を用いてc-RET自己リン酸化部位の同定に成功した (Kawamoto et al., 2004) (図3)。まずc-RETの細胞質内領域をコードする遺伝子をGST融合タンパク質として発現可能なバキュロウィルスベクターに組み込み、昆虫細胞を用いたタンパク質発現系を構築した。精製タンパク質をATPと反応させ *in vitro* で活性化した後、タンパク質をプロテアーゼにより消化し、得られたペプチドサンプルをMALDI-TOF MSで解析

し、チロシンリン酸化ペプチドを同定した。また、イオントラップ型質量分析装置を用いてリン酸化ペプチドのMS/MS解析を行い、TOF MSで得られたリン酸化ペプチドのアミノ酸配列とリン酸化部位を確認した。その結果、チロシン806 (Y806)、Y809、Y900、Y905、Y981、Y1062、Y1090、Y1096がチロシンリン酸化部位であることが明らかとなった。ホモロジーモデリングによるRETの3次元立体構造をコンピューターシミュレーションソフトウェアで構築して調べたところ (図4)、興味深いことに、Y900は主要自己リン酸化チロシンと考えられているY905の近傍にあり、おなじ活性化ループ上に存在していた。Y900およびY905それぞれのフェニルアラニン(F)置換体、および二重変異体を作成し、*in vitro* キナーゼアッセイを行った結果、Y900Fでは活性は下がらなかったもののY905Fでは自己リン酸化、酵素触媒活性が著しく減少し、二重変異体においては自己リン酸化および酵素触媒活性がほぼ完全に消失した。このことから、Y900はY905の機能を補助し、主要自己リン酸化チロシン残基として働いていることが示唆された。またY806およびY809は推定上のATP結合部位との位置関係からATPの結合性に影響している可能性が考えられ、それぞれのフェニルアラニン置換体による細胞増殖試験および*in vitro* キナーゼアッセイの結果から、これらのリン酸化はキナーゼ活性と細胞増殖に部分的に寄与していることが示唆された。

4. レドックス反応とチロシンリン酸化によるPTK活性化のdual controlメカニズム

PTKの活性化において、チロシン残基のリン酸化とMxxCWモチーフ内にあるシステイン残基のレドックス反応という二つの制御 (dual control) 点を考えた場合、立体構造変化の上でどのようなメカニズムが考えられるのであろうか。Xuら (Xu et al., 1997) はc-SrcのX線結晶解析の結果から、酵素活性化には二つの制御構造、すなわちグローバルスイッチとローカルスイッチが重要であると提唱した。c-SrcではグローバルスイッチにはC末端抑制性チロシン (Tyr527) とSH2ドメインを有する。Tyr527はCskなどの他のPTKによりリン酸化され、同分子内のSH2ドメインと結合することで立体構造の安定化をもたらす、酵素活性化を負に制御する。逆にこのチロシ

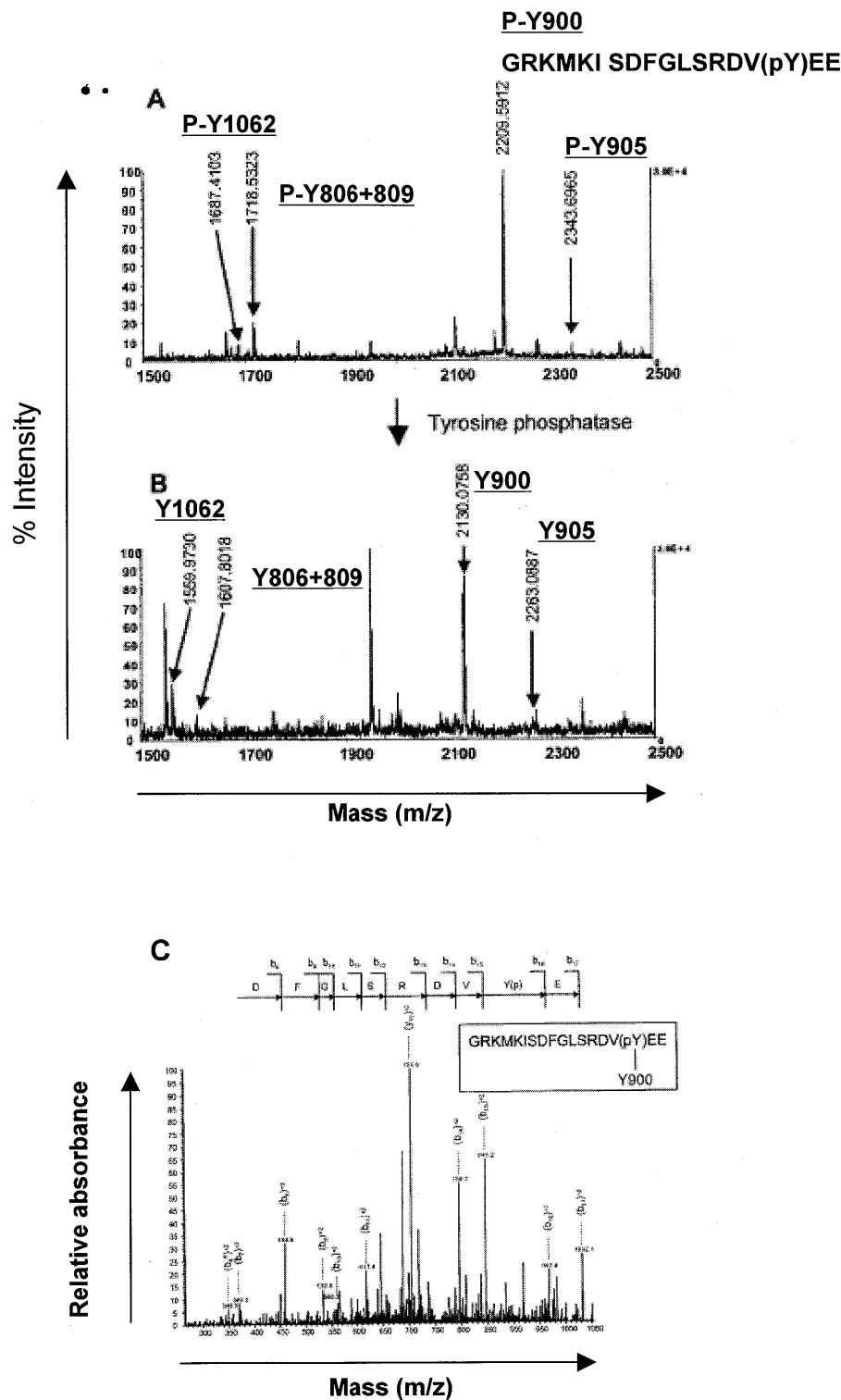


図3 質量分析によるチロシンキナーゼRETの自己リン酸化部位の同定

GST融合タンパク質として精製したRETタンパク質を、ATP存在下で活性化させ、自己リン酸化を誘導した後、V8プロテアーゼでペプチドに断片化した。このリン酸化ペプチドをMALDI-TOF MSまたはイオントラップLC-MS/MSで解析し、自己リン酸化部位を同定した。(A)MALDI-TOF MSによるリン酸化ペプチドの検出。計算上の質量値と一致するチロシン（部位を示す番号付）リン酸化ペプチドのシグナルを示した。(B)リン酸化ペプチドサンプルを脱リン酸化酵素で処理し、MALDI-TOF MSで解析した。これによりリン酸化ペプチドであることを確認した。(C)イオントラップ型LC-MS/MSによるリン酸化ペプチドの同定。MS/MSスペクトルを取得することによりアミノ酸配列が同定できる。図はRETのチロシン900がリン酸化ペプチドであることが確認されたマスペクトルを示す (Kawamoto et al. J Biol Chem 2004 Figure 3, 4より一部改変して引用)。

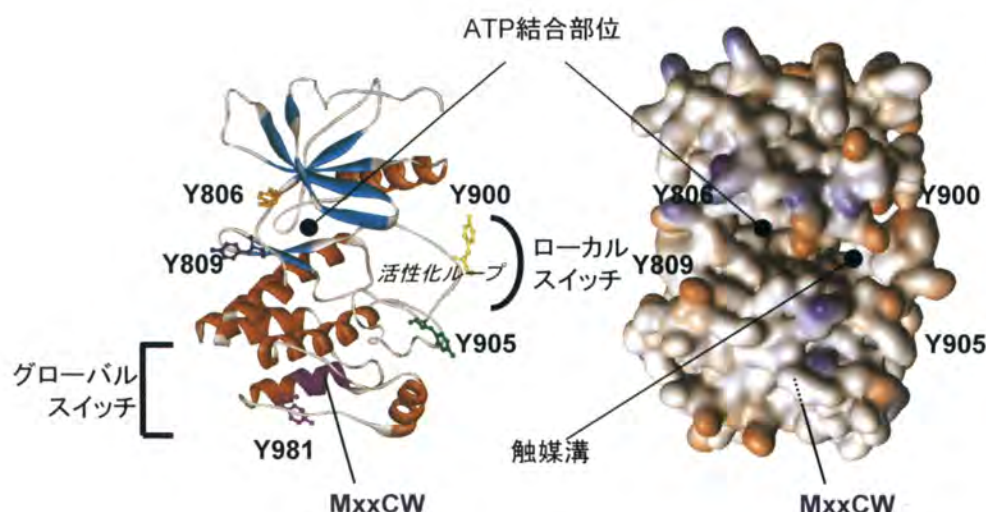


図4 ホモロジーモデリングにより構築したRETの立体構造と各機能部位

RETのアミノ酸配列情報をもとに、タンパク質立体構造予測ソフトウェア(FAMS, 北里大学、岩館・梅山博士)を用いてRETの3次元立体構造を構築した。左図はリボン表示によるタンパク質二次構造、右図は同方向から見たタンパク質表面表示を表す。質量分析により同定されたリン酸化を受けるチロシン残基およびMxxCWモチーフが示されている。また活性化ループでは触媒溝があり、その反対側にATP結合部位(推定上)が存在している。MxxCWモチーフはC末端尾部のやや上流に位置しており、グローバルスイッチとして機能し、活性化ループとATP結合部位はローカルスイッチとして働いていると考えられる(Kawamoto et al. J Biol Chem 2004 Figure 5 より一部改変して引用)。

ンが脱リン酸化されるとSH2ドメインから解離し、分子構造の不安定化をもたらすと伴に活性化ループとに存在する基質結合領域の触媒溝が露出する。さらにローカルスイッチとして、活性化ループ上の主要自己リン酸化チロシンであるTyr416の自己リン酸化の誘導により、リン酸基と近辺のアミノ酸との安定化が触媒溝の更なる開溝をもたらし、高度な触媒活性を誘導する。RETではc-SrcのTyr416に相当するTyr905がリン酸化され、近隣のTyr900のリン酸化はおそらくc-Srcと相同な機序で触媒溝の開溝に寄与していると考えられる。また分子モデリングにより構築したRETの立体構造の解析から、Tyr806とTyr809はATP結合部位の近傍に位置し、この部位のリン酸化はATP結合溝のATPとの結合性に対して正に制御している可能性が示唆される。SrcファミリーのPTK以外ではC末端の抑制性チロシンを有していないため、ローカルスイッチをONにするための他の機序が存在すると思われる。MxxCWモチーフのシステイン残基はC末端尾部の上流に位置しているため、これを介したグローバルスイッチの制御機序が存在する可能性が考えられる。すなわち、ジスルフィド結合を介する二量体化に関連したCys987依存シグナルがグローバルスイッチとし

て働き、MxxCWモチーフが存在する α ヘリックス部位での構造修飾がc-Srcの抑制性チロシンを含むC末端尾部と同等な働きによってタンパク質の構造不安定化をもたらし、活性化ループのチロシン自己リン酸化依存ローカルスイッチをONにするように働くものと推測される(図4)。

まとめ

以上の結果から、細胞膜PTKの活性化にはレドックス制御に基づいた二段階のステップが存在することが示唆される(図5)。すなわち、初めのステップではレドックス関連シグナルは細胞膜ラフトに関連するタンパク質の凝集を引き起こし、後続してセカンドメッセンジャーとしてのROSの惹起を引き起こす。細胞内ROSは生体チオール化合物のグルタチオンやタンパク質の酸化型-還元型バランスに影響を与えた結果、そのバランスはより酸化型となり、PTKを含むタンパク質同士のジスルフィド結合を介した二量体化あるいは多量体化を引き起こし、酵素の活性化を誘導すると思われる。PTKにおいては、高度に保存されたMxxCWモチーフのシステインは、活性化ループにあるチロシンの自己リン酸化依存的ロー

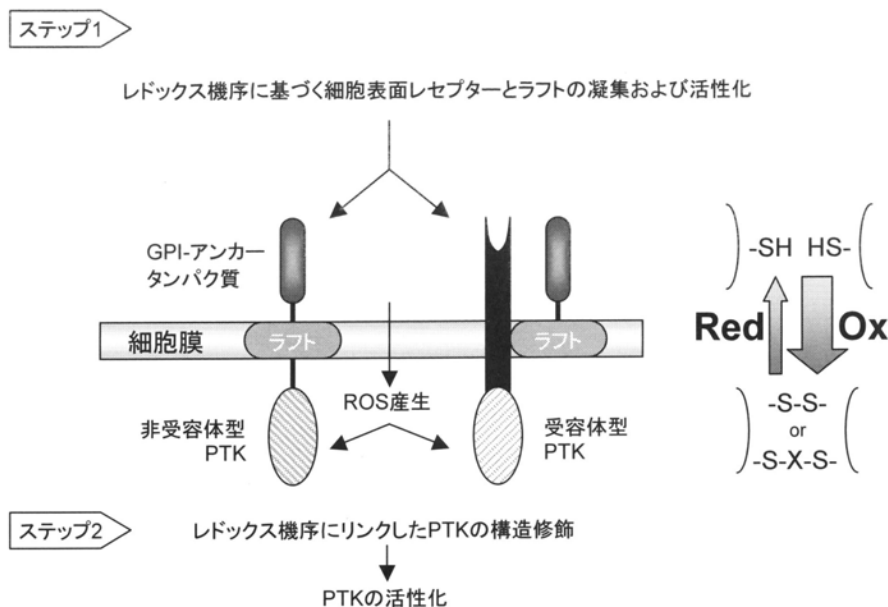


図5 レドックス制御に基づいた二段階ステップによる細胞膜PTKの活性化機序

レドックス機序に立脚した受容体型および非受容体型PTKは、二相性に制御されていると考えられる。最初のステップでは、リガンドのレセプターへの結合により引き起こされる反応の代わりに、チオール反応性化合物によりS-S結合、あるいはS-X(Hg, Asなど)-S結合を介する細胞表面タンパク質とラフトとの会合が起こり、シグナル分子の相互作用および活性化が引き起こされる。次のステップではROS産生によりMxxCWモチーフ配列を標的とした化学修飾反応が起こり、グローバルスイッチの始動と、活性化ループおよびATP結合部位周辺のチロシン自己リン酸化に依存したローカルスイッチの始動により、最終的にPTKの強い触媒活性が付与される機序が考えられる(Nakashima et al. Arch Biochem Biophys 2005 Figure 3より一部改変して引用)。

カルスイッチをONにするためのグローバルスイッチとして働いているだろうと考えられる。

引用文献

- Hossain K, Akhand AA, Kato M, Du J, Takeda K, Wu J, Takeuchi K, Liu W, Suzuki H, Nakashima I. 2000. Arsenite induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane raft-linked signaling for activation of c-Jun amino-terminal kinase. *J Immunol* 165: 4290-4297.
- Kato M, Iwashita T, Akhand AA, Liu W, Takeda K, Takeuchi K, Yoshihara M, Hossain K, Wu J, Du J, Oh C, Kawamoto Y, Suzuki H, Takahashi M, Nakashima I. 2000a. Molecular mechanism of activation and superactivation of Ret tyrosine kinases by ultraviolet light irradiation. *Antioxid Redox Signal* 2: 841-849.
- Kato M, Iwashita T, Takeda K, Akhand AA, Liu W, Yoshihara M, Asai N, Suzuki H, Takahashi M, Nakashima I. 2000b. Ultraviolet light induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. *Mol Biol Cell* 11: 93-101.
- Kawamoto Y, Takeda K, Okuno Y, Yamakawa Y, Ito Y, Taguchi R, Kato M, Suzuki H, Takahashi M, Nakashima I. 2004. Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry. *J Biol Chem* 279: 14213-14224.
- Nakashima I. Can cysteine direct tyrosine in signal transduction for environment-oriented gene control? 1996. *Nagoya J Med Sci* 59: 1-10.
- Nakashima I, Pu M, Akhand AA, Kato M, Suzuki H. 1997. Chemical events in signal transduction. *Immunol Today* 18: 362.
- Nakashima I, Pu MY, Nishizaki A, Rosila I, Ma L, Katano Y, Ohkusu K, Rahman SM, Isobe K, Hamaguchi M, et al. 1994. Redox mechanism as alternative to ligand binding for receptor activation delivering disregulated cellular signals. *J Immunol* 152: 1064-1071.
- Nakashima I, Takeda K, Kawamoto Y, Okuno Y, Kato M, Suzuki H. 2005. Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine

kinases. Arch Biochem Biophys 434: 3-10.

Rahman SM, Pu MY, Hamaguchi M, Iwamoto T, Isobe K, Nakashima I. 1993. Redox-linked ligand-independent cell surface triggering for extensive protein tyrosine phosphorylation. FEBS Lett 317: 35-38.

Takeda K, Kato M, Wu J, Iwashita T, Suzuki H, Takahashi M, Nakashima I. 2001. Osmotic stress-mediated activation of RET kinases involves intracellular disulfide-bonded dimer formation. Antioxid Redox Signal 3: 473-482.

Veillette A, Dumont S, Fournel M. 1993. Conserved cysteine residues are critical for the enzymatic function of the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. J Biol Chem 268: 17547-17553.

Xu W, Harrison SC, Eck MJ. 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. Nature 385: 595-602.

著 者

川本善之 (Yoshiyuki KAWAMOTO)

日本学術振興会特別研究員 (PD)。2004年、名古屋大学大学院医学系研究科博士課程修了、博士 (医学)。2005年4月に中部大学講師に赴任予定。専門分野は生化学、免疫学、レドックス科学。主な研究テーマは、「レドックス機序に基づく細胞内シグナル伝達に関する研究」。最近はプロテオーム解析やin silico解析法を用い、生活習慣病予防に繋がる知見の取得や制癌剤に繋がるタンパク質活性阻害剤の開発に着手。

武田湖州恵 (Kozue TAKEDA)

名古屋大学大学院医学系研究科助手。平成13年、名古屋大学大学院医学研究科博士課程病理系免疫学専攻修了。医学博士。平成6年から社会保険中京病院に3年間勤務。平成13年から名古屋大学医学部免疫学客員研究員。同年8月から名古屋大学医学部非常勤講師、中核的研究機関研究員を経て平成14年1月から長寿科学振興財団21世紀型医療推進研究リサーチレジデント。同年6月から名古屋大学大学院医学系研究科助手となり現在に至る。専門分野は免疫学、分子生物学。主な研究テーマは「チロシンキナーゼの活性化機構」、「酸化ストレスによるシグナル伝達の解析」。

中島 泉 (Izumi NAKASHIMA)

国立大学法人名古屋大学理事・副総長、中部大学客員教授。昭和45年名古屋大学大学院医学研究科単位取得退学。医学博士 (名古屋大学)。同年名古屋大学助手。同大助教授、教授、医学部長を経て現在に至る。平成17年4月に中部大学学監、教授に就任予定。専門分野は免疫学。主な研究テーマは、「免疫系における酸化ストレスシグナル伝達の分子機序の解明」など。国外では、ユネスコの国際細胞科学研究機構 (ICRO/Unesco, Paris) のPanel Convener/Vice-Presidentをつとめる。