

細胞膜脂質ラフトを介する活性酸素種産生機序の解析： 生活習慣病予防をめざして

Analysis of membrane lipid rafts-mediated reactive oxygen species production for preventing lifestyle-related disease

川 本 善 之

Yoshiyuki KAWAMOTO

要 旨

近年、がんや糖尿病、動脈硬化症、神経変性疾患等の生活習慣病は増加の一途を辿っている。これには食生活の欧米化や運動不足の他、有害環境物質の増加などが指摘されている。医療技術の目覚ましい進歩によりこれら疾病に対する治療成績も着実に向上しつつあるが、その発症を未然に防ぐことは何より望ましい。生活習慣病の原因は遺伝子変異のような内因的要因、環境ストレスによる外因的要因と様々であるが、近年の多くの研究より、活性酸素種（Reactive Oxygen Species, ROS）と呼ばれる有害な活性分子がタンパク質やDNAを酸化修飾し、正常な細胞内シグナル伝達のかく乱や遺伝子変異を慢性的にもたらし、様々な生活習慣病の一因として関与していると注目されてきている。本稿では、ROSの新しい産生機序を解析した結果を紹介し、生活習慣病の予防をめざしたその人為的抑制のための方策について考察した。

キーワード：生活習慣病、活性酸素種（ROS）、Srcファミリーチロシンキナーゼ、ラフト

1. はじめに

細胞の増殖、分化、代謝応答は通常、細胞膜上の受容体タンパク質とホルモンや成長因子といった様々なリガンドとの結合により開始される。近年、細胞の脂質二重膜上に存在するタンパク質、リン脂質が絶えず動き回る流動モザイク説に加え、細胞外からの刺激時にシグナル分子同士が集まってあるサイズのクラスターを構成し、より効率的にシグナルを増幅する装置として、細胞膜脂質ラフトの存在が注目されている。ラフトにはもともと、多くの受容体タンパク質が局在しているが、リガンド分子の結合後に新たに局在する分子も多数知られ、LckなどのSrcファミリーチロシンキナーゼ (Parolini et al., 1996) やLATアダプタータンパク質 (Kane LP et al., 2000)、TNF- α

受容体 (Cottin V et al., 2002) などのようなサイトカインレセプターなどが挙げられる。筆者はヒ素を用いたROS産生機序について検討し、ラフトがROS産生応答に極めて重要な働きを担うことに着目し検討を重ねてきた。その結果、ラフトにおけるSrcファミリーチロシンキナーゼも一連のROS産生応答に関与する重要な分子であるほか、新たにGEF (guanosine nucleotide exchange factor) 分子がヒ素刺激に応じてダイナミックにラフトへ局在する現象を見出し、機能的にもROS産生に寄与していることを見出した。本稿ではまず、ラフトのシグナル伝達について概説し、ラフトにおけるチロシンキナーゼの役割、そしてGEFの機能を最新の知見を紹介する。そしてこれらのシグナル分子がROSの産生機序に如何に関わるのか、その先として疾病予防にどの

ような応用につなげることができるのか可能性を含めて考察する。

2. ROS産生におけるラフトの関与とその機序

ラフトは「筏」を意味し、スフィンゴ脂質やコレステロールに富んだ細胞膜マイクロドメインである。GPI-アンカータンパク質やキナーゼが集積し、シグナル伝達のプラットフォームとして機能していると考えられている (Simons K et al., 2000a)。2000年、Hossainらはヒ素刺激によるT細胞のROS産生に、ラフトが関与していることを示した (Hossain et al., 2000)。また、紫外線照射によるケラチノサイトからのROS産生にラフトが関与すると報告がある (Gniadecki R et al., 2002)。しかしこれまで、ラフトを介するROS産生の詳細な機序を示した報告はなされていない。筆者は、ヒトT細胞性白血病細胞株であるJurkat T細胞を用い、ROS産生におけるラフトのより直接的な寄与を調べるため、ラフト常局在性分子であるガングリオシドGM1と親和性の高いコレラトキシンBで細胞をラベルした後、抗コレラトキシンB抗体を用いて間接的にラフトを凝集させると細胞内ROSが亢進する知見を得ている (図1)。これはラフトの物理的凝集がROS産生の引き金になることを示唆するものである。

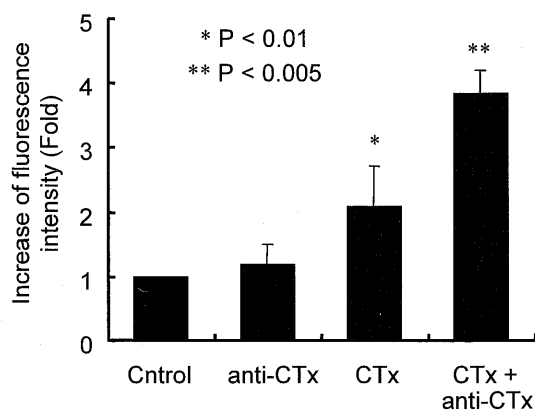


図1 ラフトを介するROS産生

Jurkat T細胞をコレラトキシンBサブユニット (CTx) で処理し、ラフトをラベルした後 (10min, 37℃)、抗CTx抗体でラフトのクロスリンク処理を行った (15min, 37℃)。細胞内ROS産生はROS感受性蛍光色素であるDihydroethidium (DHE) を用い、FACSにて検出した。

ヒ素は発癌性を有する環境汚染物質であり、チオール基と架橋反応を起こす生化学的特性によりタンパク質の凝集を引き起こすことが知られる。また、ヒ素は様々な細胞種において投与濃度依存性に細胞内ROSを惹起することが知られている。筆者はヒ素刺激によるラフトを介するROS産生に関し、細胞骨格の寄与を調べるため、アクチンのモノマー重合阻害剤であるサイトカラシンBをヒ素とともにJurkat細胞へ共刺激したところ、細胞内ROSの産生が大幅に亢進することを見出した (data not shown)。ラフトはコレステロールが密に集合した細胞膜上の構成体で、飽和脂肪酸との疎水結合による相互作用によりタンパク質群が密にパックされた構造をとっている。そこで、コレステロール吸着剤であるメチルβシクロデキストリン (MβCD) を処理してラフト構造を破壊すると、ヒ素単独およびサイトカラシンBとの共投与によるROS産生はいずれも強く抑制された。これらの結果から、サイトカラシンBによりアクチンによるラフトの流動性制御が外れると、ヒ素によるチオール基を介したタンパク質間の架橋が強く亢進され、ROS産生の起動に必要なタンパク質の会合がラフトを介して促進される機序が考えられる。すなわち、ヒ素によるROSの産生は、ラフト局在性タンパク質の凝集が引き金となって惹起されることが考えられ、アクチン細胞骨格はROS産生を負に制御していることが示唆された。

3. ラフトに局在・移行するタンパク質のROS産生への関与

我々はヒ素刺激によるラフトを介したROS産生の機序を解明するためには、ヒ素刺激後にラフトへ局在するタンパク質を同定することが糸口になると考え、まずサイトカラシンBとヒ素刺激を施した細胞のラフト局在タンパク質を抽出し、質量分析機器を用い刺激に応じてラフトへ局在するタンパク質の同定を試みた。ラフト局在タンパク質は、ショ糖密度勾配遠心法により、界面活性剤不溶性の低比重画分として抽出する方法が確立されている。検討の結果、GEF関連タンパク質、Srcファミリーチロシンキナーゼ、アクチン関連タンパク質の大きく分けて3種類のタンパク質が同定された (表1)。これらのタンパク質は確かにヒ素刺激により界面活性剤不溶性低密度画分に

表1 質量分析機器を用いたラフト局在タンパク質の同定

ヒ素+サイトカラシンBで薬剤処理したJurkat T細胞より、界面活性剤不溶性ラフト画分をショ糖密度勾配超遠心法により抽出した。一次元SDS-PAGEにより展開し、薬剤無処理サンプルとバンドのパターンを銀染色にて比較後、薬剤処理サンプルで新たに出現した、あるいは増加が認められたタンパク質バンドを切り出し、質量分析機器にてタンパク質を同定した。

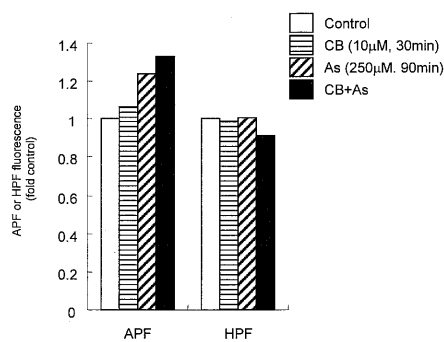
同定タンパク質	分子量 (kDa)	Peptides matched No.
Alpha-actinin 4	104.8	36
Alpha-actinin 1	103.0	25
GEF	98.3	5
Heat shock cognate 71 kDa protein	70.8	25
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 42 (fragment?)	130.5	5
Yes	60.8	10
Fyn	60.6	9
Tyrosyl-tRNA synthetase	59.1	7
Lck	57.8	24
Actin-like protein 3	47.3	10
Actin-like protein 2	44.7	11
Guanine nucleotide-binding protein G(q), alpha subunit	41.4	5
Guanine nucleotide-binding protein G(k), alpha subunit	40.4	12
Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	40.3	22

より多く検出できるようになるが、ROS産生に機能的に関与しているかどうか重要となる。近年、細胞レベルで特定の遺伝子発現を抑制技術であるRNA interference (RNAi) 法が開発され、ノックアウトマウスを作成するより簡便に特定の遺伝子の機能を調べることができるようになった。そこで、ヒ素刺激によりラフトへ局在するタンパク質のうち、最も劇的な局在変化を示したGEFタンパク質の一つをRNAiにより発現抑制させたところ、ROS産生応答が有意に減少した。また、GEFタンパク質欠損マウスの胸腺T細胞ではヒ素によるROS産生応答は野生型マウスに比べ有意に低下していることが分かった (data not shown)。従って、ヒ素刺激によるROSの産生はラフトへ移行したGEFタンパク質が機能的に寄与していることが示唆された。一方、SrcファミリーチロシンキナーゼのROS産生に対する寄与を調べるため、その阻害剤であるハービマイシン

Aを前処理して検討したところ、ヒ素単独によるROS産生に有意な影響は検出されなかったがサイトカラシンBとヒ素によるROS産生の亢進は有意に抑制された。興味深いことに、ハービマイシンAはGEFのラフト移行を阻害せず、ヒ素単独およびサイトカラシンとヒ素共投与によるGEFのリン酸化のみをほぼ完全に阻害していた。これらの結果から、ヒ素によるROS産生とサイトカラシンBによるROS産生の増強には異なる仕組み、すなわちGEFのリン酸化を必要としない一段階目のROS産生のステップと、SrcファミリーチロシンキナーゼとGEFの活性化を必要とする二段階目のステップが存在する可能性が示唆された。

4. ヒ素刺激により産生される活性酸素種の種類

ROSにはヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、スーパーオキシド (O_2^-)、次亜塩素酸 (HOCl)、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ペルオキシラジカル ($\text{ROO}\cdot$) などが知られる。また反応性の高い窒素酸化物として、ペルオキシナイトライト (ONOO^-) や一酸化窒素 (NO) といった活性窒素種、RNSが知られる。従来、細胞内ROS産生はDHEと呼ばれるROS検出色素を用いていたが、これは O_2^- に強い感受性があるが、 H_2O_2 や他のROSにも広範に反応する。ヒ素刺激によりどのような特定のROSが産生されているのであろうか？最近、APFとHPFと呼ばれる新しい活性酸素検出用の蛍光色素が開発された。これらはそれぞれ検出可能なROSがあり、両者を同時に利用することで、次亜塩素酸の特異的検出が可能となる (図2の下表参照)。筆者はこれら新規ROS検出蛍光色素を用い、ヒ素によるROSの検出を試みたところ、蛍光はAPFを使用した場合にのみ見られた。すなわち、次亜塩素酸の産生が検出された (図2)。ROSは酸素分子の一電子還元が基点となり、 O_2^- が生成し、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の働きによって H_2O_2 が生成する。通常はここにカタラーゼが働いて、有害なROSを消去しているが、ヒ素刺激の場合には消去が間に合わず、ミエロペルオキシダーゼの働きにより次亜塩素酸まで産生されることが考えられた。 O_2^- の産生源として、ミトコンドリア酸素呼吸鎖からの O_2^- の漏出が考えられ、ヒ素による



ROS	APF	HPF	
•OH	VS	S	VS=Very Strong
ONOO ⁻	S	S	S=Strong
OCI ⁻	VS	W	W=Weak
O ₂ ⁻	W	W	
¹ O ₂	VW	W	VW=Very Weak
H ₂ O ₂	W	W	
ROO•	W	W	
NO	VW	W	

図2 ユニークなROS感受性蛍光色素を用いた細胞内ROS産生の解析

Jurkat T細胞をヒ素 (As) 単独またはサイトカラシン B (CB) と共処理した後、二種類のROS検出蛍光色素、APF (Aminophenyl Fluorescein) とHPF (Hydroxyphenyl Fluorescein) を用いて細胞内ROSをFACSにより検出した。下の表に示すように、いずれの蛍光色素も•OHとONOO⁻に感受性であるが、APFのみOCI⁻にも感受性である。

ROS産生にミトコンドリアが関与している報告もなされている (Corsini E et al., 1999) (Pelicano H et al., 2003)。しかし、ヒ素刺激のような場合、第一受容部位が通常は細胞膜であること、MβCDによるラフトの破壊によってROS産生が強く阻害されること、ミトコンドリアの膜電位の有意な変化は認められないことから (data not shown)、ミトコンドリアの関与は否定できないまでも、細胞膜、すなわちラフトがO₂⁻産生の主要な起点と考える。マクロファージや好中球では、細菌などの異生物を貪食し、細胞膜にあるNADPHオキシダーゼ複合体を形成後、O₂⁻を放出して殺菌を行う。好中球においてNADPHオキシダーゼの構成成分はラフトへ局在することが報告されており (Shao D et al., 2003)、細胞膜ラフトを起点とするROS産生機構を支持する。Jurkat細胞にはNADPHオキシダーゼが見つからないが、NADPHオキシダーゼ阻害剤であるDPIを処理するとROS産生が抑制される

ことから、NADPHオキシダーゼ様のタンパク質が働いている可能性が十分考えられる。NADPHオキシダーゼの構成成分の一つであるRacはsmall Gタンパク質であり、GEFによって活性化される。つまり、筆者の研究は、NADPHオキシダーゼ (様) タンパク質の活性化に至る前段階のプロセスに着目しているものと考えている。

5. 疾病予防のためのラフトを介するシグナル伝達修飾

ラフトと生活習慣病との関連は、詳細は明らかではないが、がん (Freeman MR, et al., 2005)、糖尿病 (Ikonen E et al., 2005)、動脈硬化症 (Simons K et al., 2000b)、の発症にラフトの機能障害が関係することが示唆されている。生活習慣病は先天性疾患と異なり、一般的には長い時間をかけて病態が進行する性質を持ち、近年、慢性的な炎症が重要な病因の一つであることが考えられている。ROSは細胞内タンパク質のASK1を標的とし、炎症シグナルを強く促進することが最近明らかとなった (Matsuzawa A et al., 2005)。従って、炎症性サイトカインのシグナル伝達の直接抑制か、ROSの抑制、あるいは両者の抑制は、生活習慣病を予防する戦略の一つとなるかもしれない。例えば、EPAやDHAなどのn-3系多価不飽和脂肪酸は青魚油に多く含まれるが、これらはT細胞のラフトを介するサイトカイン産生を負に制御することが分かってきた。T細胞が抗原刺激を受けると、ラフトにおいてCD3複合体の下流でZAP70やSrcファミリーチロシンキナーゼのLckが動員され、アダプタータンパク質のLATがリン酸化を受けた後、PLCγが結合、ジアシルグリセロールの放出やカルシウムイオン濃度の増強を経て、サイトカイン産生に必要な転写因子が活性化される。このカスケードの中で、n-3系列の多価不飽和脂肪酸が存在するとラフトに濃縮され、ラフトに局在するLATをラフトから排除する働きを持つことが分かり、サイトカイン産生を抑制する機序の一つであることが報告されている (Stulnig TM et al., 2001) (Zeyda M et al., 2002) (図3)。T細胞受容体の刺激後にROSが産生されることが知られていることから (Devadas S et al., 2002)、このプロセスにおいてもROSが関与している可能性は高い。こうした例から分

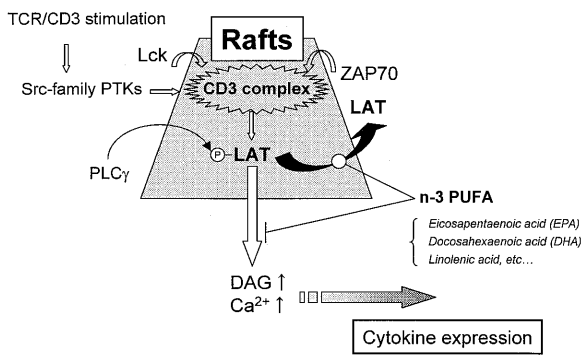


図3 TCR活性化における下流のシグナル伝達カスケードとn-3系多価不飽和脂肪酸の作用部位（予想モデル）

TCR: T cell receptor, PTKs: protein tyrosine kinases, DAG: diacylglycerol, PUFA: polyunsaturated fatty acid

かのように、ラフトは生活習慣病予防の重要な標的の一つと考えられる。ラフトを介するROS産生の仕組みを解明し、その機序に基づいた食品、または薬剤による慢性炎症の抑制が実現できれば、生活習慣病を予防できる可能性がある。癌や糖尿病といった疾患において、ラフト局在性タンパク質に差異があり、それらがシグナル伝達の破綻に関与していることがあれば、薬物治療の標的となり得るであろう。

6. おわりに

ROSと病態との関連は国内外で長く研究され、その制御は疾病予防に寄与すると指摘されてきた。酸素分子が源泉となり産生されることから、ROSはミトコンドリアからの漏出を起源とする説が長らく支配的であったが、細胞膜を起点として産生される証拠が次第に明らかとなり、我々はラフト機能に着目してその解明を進めてきた。ラフトの構造や機能は未だ不明な部分も多く、ラフト構成タンパク質や脂質は細胞種により違うのか、リガンドで活性化された個々のラフトを如何に抽出するか、など解決すべき課題は多い。しかしながら、ラフトと疾病の関連を指摘する多くの報告が挙げられてきていることから、ラフトは新しい疾病予防、治療の標的となる可能性は高いと考える。近年、細胞のリアルタイムイメージング技術の進歩もあり、ラフトの実体は徐々に明らかとな

りつつある。加えて、近年のプロテオーム解析技術やバイオインフォマティクス技術を有効に利用すれば、より詳細なラフト機能が明らかとなり、ラフトにおけるROS産生機序の解明や、疾病に直接関わるラフト局在性タンパク質の発見が現実的となると思われる。

引用文献

- Corsini E, Asti L, Viviani B, Marinovich M, Galli CL. 1999. Sodium arsenate induces overproduction of interleukin-1alpha in murine keratinocytes: role of mitochondria. *J Invest Dermatol* 113: 760-765.
- Cottin V, Doan JE, Riches DW. 2002. Restricted localization of the TNF receptor CD120a to lipid rafts: a novel role for the death domain. *J Immunol* 168: 4095-4102.
- Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS. 2002. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J Exp Med* 195: 59-70.
- Freeman MR, Cinar B, Lu ML. 2005. Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16: 273-279.
- Gniadecki R, Christoffersen N, Wulf HC. 2002. Cholesterol-rich plasma membrane domains (lipid rafts) in keratinocytes: importance in the baseline and UVA-induced generation of reactive oxygen species. *J Invest Dermatol* 118: 582-588.
- Hossain K, Akhand AA, Kato M et al. 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.
- Ikonen E, Vainio S. 2005. Lipid microdomains and insulin resistance: is there a connection? *Sci STKE* 2005: pe3.
- Kane LP, Lin J, Weiss A. 2000. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol* 12: 242-249.
- Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T et al. 2005. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 6: 587-592.

- Parolini I, Sargiacomo M, Lisanti MP, Peschle C. 1996. Signal transduction and glycoposphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood* 87: 3783-3794.
- Pelicano H, Feng L, Zhou Y et al. 2003. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* 278: 37832-37839.
- Shao D, Segal AW, Dekker LV. 2003. Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett* 550: 101-106.
- Simons K, Toomre D. 2000a. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39.
- Simons K, Ikonen E. 2000b. How cells handle cholesterol. *Science* 290: 1721-1726.
- Stulnig TM, Huber J, Leitinger N et al. 2001. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *J Biol Chem* 276: 37335-37340.
- Zeyda M, Staffler G, Horejsi V, Waldhausl W, Stulnig TM. 2002. LAT displacement from lipid rafts as a molecular mechanism for the inhibition of T cell signaling by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 277: 28418-28423.

著 者

川本善之 (Yoshiyuki KAWAMOTO)

中部大学生命健康科学研究所、講師。名古屋大学医学系研究科および東京理科大学薬学部客員研究員。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月より現職。専門分野は生化学、免疫学。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」。プロテオーム解析技術や創薬インフォマティクス技術を利用し、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。