

細胞の「生と死・分化・増殖」とレドックスの
クロストーク機構の解析

姫路工業大学理学部助手

鎌田 英明

細胞の「生と死・分化・増殖」とレドックスのクロストーク機構の解析

1 研究の背景と目的

生体は環境中からの酸化ストレスにさらされており、細胞はこれに対抗して細胞内レドックス環境を還元状態に保持している。細胞内のレドックスを適正に制御することは細胞の生存に必須であり、酸化ストレスによる細胞要傷害と種々の疾患との関連が注目されている。特に脳神経系において、酸化ストレスによる神経細胞死とアルツハイマー病などの神経変性疾患との関連が示唆されてきた。一方、レドックス制御は細胞の生存のみならず、細胞の増殖や分化などの多様な細胞応答においても重要な役割を果たしている。上皮増殖因子(EGF)や血小板由来増殖因子(PDGF)はそれぞれの標的細胞の増殖を促進するが、この刺激にともない細胞内で活性酸素が産生されることが示されてきた。さらに産生された活性酸素がこれらの増殖因子のセカンドメッセンジャーとしてシグナル伝達に関与していることが明らかにされている。すなわち細胞内レドックス制御機構と細胞シグナル伝達系のクロストークによりさまざまな細胞機能が制御されていると考えられる。しかし細胞内シグナル伝達系がこのようなレドックスの変化を感受する機構については不明であり、その解明が待たれている。

我々はこれまでに神経系モデル細胞株PC12を用いた解析において、神経成長因子(NGF)によるPC12の神経分化応答が還元剤N-アセチルシステイン(NAC)により抑制されるのを見いだした。この抑制機構の解析の結果、NACはRasからMAPキナーゼカスケードへのシグナル伝達、およびNGFレセプターの活性化を抑制することが見いだされた。一方、酸化ストレスは種々の細胞傷害性薬剤と共通の経路を介してPC12細胞にアポトーシスによる細胞死を誘導するが、NGFはこの細胞死を特異的に抑制する。

本研究では細胞の「分化」や「増殖」に関連した増殖因子のシグナル系において、①NACによるNGFレセプター(TrkA)およびEGFレセプターの抑制機構、②TrkAおよびEGFレセプターの活性酸素に対する応答、③RasからRafへのシグナル伝達系に対するNACの効果、④ムスカリン性アセチルコリンレセプターからMAPキナーゼの活性化に至る系路上でのNACの効果 を解析することによりシグナル伝達のレドックス制御機構の解明を目指した。さらに酸化ストレスによる細胞死に関して⑤NGFおよびフォルスコリンによる細胞死抑制機構の解析を行った。

2 研究方法・研究内容

①TrkAおよびEGFレセプターのレドックス制御

PC12細胞またはA431細胞をNGFまたはEGFで刺激するとそれぞれのレセプターチロシンキナーゼの速やかな活性化が誘導される。各レセプターに対する抗体を用いた免疫沈降法と抗ホスホチロシン抗体を用いたウエスタンブロット法により、レセプターの活性化に対するNACの効果を検討した。またH₂O₂で細胞を刺激した時のTrkAおよびEGFレセプターの活性化を同様にウエスタンブロット法により解析した。また¹²⁵I EGFを用いてEGFレセプターのEGF結合活性を測定し、レセプターとリガンドの結合に対するレドックスの効果について解析した。

②RasからRafへのシグナル伝達のレドックス制御

NACで処理したPC12細胞においてはNGFの刺激によりRasの活性化は誘導されるにもかかわらずRafやB-Rafの活性化は顕著に抑制されることからRasからRafへのシグナル伝達がNACにより抑制されると考えられる。今回、RasおよびRafをトランスフェクトしたCOS7細胞についてNACの効果を解析することにより、このシグナル伝達系のレドックス制御についての解明を試みた。

③ムスカリン性アセチルコリンのシグナル伝達のレドックス制御

PC12細胞をアセチルコリンで刺激するとMAPキナーゼの速やかな活性化が誘導されるが、このシグナル伝達機構については完全には解明されていない。アトロピンなどのアセチルコリンレセプターの阻害剤やワートマニンなどのPI3キナーゼ阻害剤を用いることによりアセチルコリンの刺激からMAPキナーゼの活性化に至る経路を解析すると共に、このシグナル伝達系に対するNACの効果について解析した。

④NGFおよびフォルスコリンによる細胞死抑制

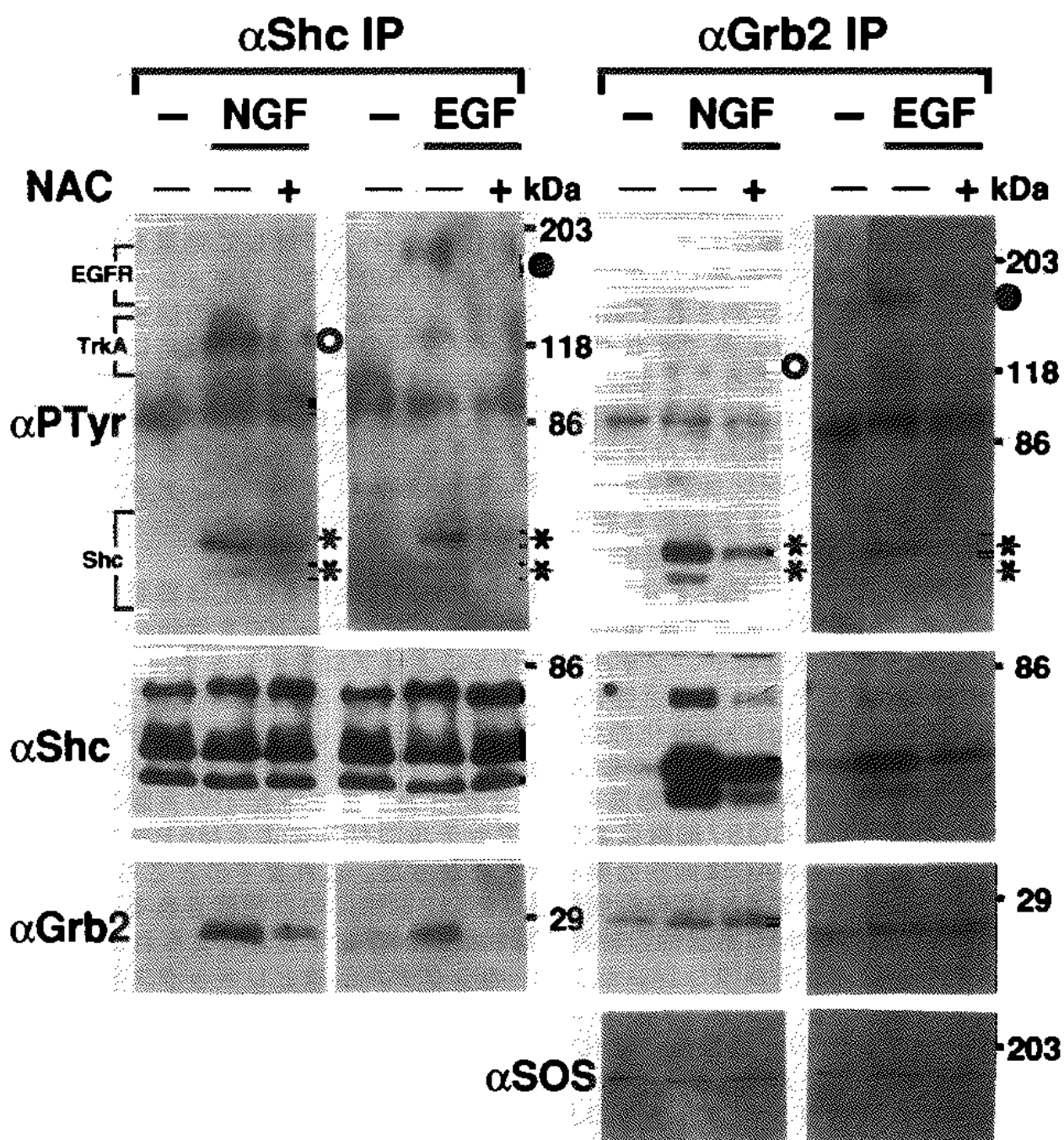
PC12細胞において酸化ストレスによる細胞死はNGFおよびフォルスコリンなどの生存因子により抑制される。この細胞死抑制機構へのMAPキナーゼやJNKキナーゼの関与について、免疫沈降法により細胞から各キナーゼを回収し、その活性を測定することにより検討した。またワートマニンなどのPI3キナーゼ阻害剤を用いることにより、NGFとフォルスコリンの生存促進機構へのPI3キナーゼの関与について解析した。

3 研究結果

①TrkAおよびEGFレセプターのレドックス制御（NACによる抑制機構）

NGFまたはEGFで刺激したPC12細胞ではそれぞれのレセプターのチロシン酸化が顕著に誘導されるが、NACで処理した細胞ではその活性化は顕著に抑制されてる。またNGFやEGFの刺激によりShc、Grb2、SOSなどのシグナル伝達分子がそれぞれTrkAやEGFレセプターに結合しレセプター複合体が形成されるが、この複合体形成をNACは抑制していた（図1）。さらにTrkAおよびEGFレセプターの活性化により誘導されるPI3キナーゼの活性化もNACは抑制しており、これらのレセプターチロシンキナーゼに関連した既知のシグナル伝達系をNACはすべて阻害することが判明した。またNACで前処理した細胞について培地中からNACを除去した状態でNGFまたはEGFの刺激を行ってもそれぞれのレセプターチロシンキナーゼの活性化は抑制されていたことから、NACによる抑制効果は単純なリガンドとレセプターの結合阻害によるものではないと考えられた。

さらにEGFレセプターについてNACによる抑制機構をA431細胞を用いて解析した。NACは活性型EGFレセプターのチロシンキナーゼ活性を阻害することとはなかった。ところがEGFレセプターとEGFとの結合をスクッチャードプロットにより解析したところ、NACは低親和性EGF結合を阻害しないにも関わらず、高親和性EGF結合を阻害することが判明した。さらにEGFで刺激した細胞を架橋剤で処理しEGFレセプターの二量体化に対するNACの効果を調べたところ、NACによる高親和性EGF結合の阻害と一致してレセプターの二量体化は顕著に抑制されていた。すなわちEGFレセプターの活性化機構において、レセプターの二量体化のステップが還元剤に感受性であることが判明した。一方、NACよりも強力な還元力を有する還元剤ジチオスレイトールはEGFとレセプターとの結合を低濃度で強く抑制した。すなわちレセプターの活



NAC, 30mM for 4 hr. NGF/EGF, 50ng/ml for 5min

図 1 : PC12細胞におけるNGFレセプター(TrkA)およびEGFレセプターの活性化のN-アセチルシステインによる抑制 (ウエスタンブロット法による解析)

性化機構において、(1)リガンドとの結合 (2)レセプターの二量体化 が異なる感受性でレドックスによる制御を受けていると考えられた。

②TrkAおよびEGFレセプターのレドックス制御 (H₂O₂による活性化)

H₂O₂で細胞を処理するとさまざまなチロシンキナーゼが活性化されることが知られている。本研究課題ではTrkAおよびEGFレセプターについてH₂O₂による活性化の効果についての比較を行った。H₂O₂で処理したPC12細胞ではEGFレセプターの顕著な活性化が認められるものの、可溶化したEGFレセプターに対してはH₂O₂は活性化を誘導しなかった。またH₂O₂で細胞を処理してもTrkAの活性化は誘導されず、さらに可溶化したTrkAに対して効果を示さなかった。しかしNGFで刺激したPC12細胞ではTrkAのダウンレギュレーションがH₂O₂により顕著に抑制されており、チロシンホスファターゼの阻害の関与が想定された。in vitro 系でそれぞれのレセプターの脱リン酸化反応に対するH₂O₂の効果を見たところ、ともに各レセプターに対するチロシンホスファターゼの活性が阻害されることが確認された。これまでにEGFレセプターの酸化ストレスによる活性化にはチロシンホスファターゼの阻害が関与することが報告されているが、EGFレセプターと同様にTrkAもチロシンホスファターゼを介して酸化ストレスによる制御を受容することが明らかにされた。

③RasからRafへのシグナル伝達のレドックス制御

PC12細胞において、Rasを介したRafやB-Rafの活性化をNACは顕著に抑制する。一方、ホルボールエステルによりプロテインキナーゼCを活性化した際のMAPキナーゼの活性化や、フォルスコリンによりプロテインキナーゼAを活性化した際のMAPキナーゼの活性化をもNACは抑制することから、これらの刺激に伴うRafやB-Rafの活性化の共通のステップに対してNACは抑制効果を有すると考えられた。しかし、COS7細胞においては活性型RasによるRafの活性化に対してはNACは抑制効果を示さなかった。また下記④の実験で明らかにされたように、COS7細胞においてアセチルコリンによるMAPキナーゼの活性化に対してもNACは抑制効果を示さなかった。これまでのところRafへのシグナル伝達に対するNACの抑制効果はPC12細胞にのみ観察されることから、PC12細胞にはNAC感受性の特異的抑制機構が存在すると考えられる。

④ムスカリン性アセチルコリンレセプターのシグナル伝達とレドックス制御

アセチルコリンレセプターのリガンドであるカルバコールの刺激はPC12細胞にMAPキナーゼの一過性の活性化を誘導する。この活性化をアトロピンは抑制するのに対してメカミラミンはほとんど阻害しないことから、カルバコールの刺激はムスカリン性アセチルコリンレセプターを介してMAPキナーゼを活性化すると考えられた。一方、ワートマニンやゲニステインやドミナントネガティブRasもこの活性化を抑制することから、ムスカリン性アセチルコリンレセプターはPI3キナーゼやチロシンキナーゼやRasを介してMAPキナーゼを活性化すると考えられる。とくにカルバコールの刺激によりEGFレセプターやShcのチロシンリン酸化が観察されることから、ムスカリン性アセチルコリンレセプターはEGFレセプターを介してMAPキナーゼの活性化を誘導すると考えられた。

一方、NACはカルバコールの刺激によるMAPキナーゼやEGFレセプター活性化を抑制していた。アセチルコリンレセプターのリガンドとして[³H]QNBを用いた結合実験の結果から、NACによる抑制はアセチルコリンレセプターに対するリガンドの結合阻害によるものではなく、さらに下流のシグナル伝達系

に対して作用することが判明した。しかしムスカリン性アセチルコリンレセプターを発現させたCOS7細胞ではNACはカルバコールによるMAPキナーゼの活性化を全く抑制しなかった。PC12細胞にはNAC感受性の機構が存在すると考えられた。

⑤酸化ストレスによる細胞死のNGFおよびフォルスコリンによる抑制機構

NGFおよびフォルスコリンはH₂O₂や種々の細胞傷害性薬剤によるアポトーシスとこれに伴うカスパーゼの活性化を顕著に抑制した。一方、種々のアポトーシス誘導性の刺激により細胞内でJNKキナーゼが活性化されるが、NGFおよびフォルスコリンはこれらの生存因子は血清除去にともなうJNKの活性化を抑制したのに対して酸化ストレスによるJNKの活性化に対しては抑制効果を示さず、NGFおよびフォルスコリンによる生存促進にはJNK抑制は必須ではないことが示された。また、NGFによる生存促進効果はワートマニンにより阻害されるのに対して、フォルスコリンによる生存促進はワートマニン非感受性であり、フォルスコリンはPI3キナーゼを介さずにアポトーシスを抑制することが示唆された。

4 研究がもたらす効果および波及効果

本研究により細胞内シグナル伝達系のレドックス制御機構に関しての一端が明らかにされてきた。とくにレセプターチロシンキナーゼが酸化ストレスや還元剤によるレドックス制御を受容することが明らかにされた。さまざまな増殖因子のシグナルはこれらのレセプターによりそのシグナルが受容されることから、レセプターにおけるレドックス制御は細胞の分化増殖のシグナル伝達系に於いて第一義的な役割を有すると考えられる。さらにアセチルコリンのシグナル伝達に於いてもレドックス制御が機能することから、神経系の発生・分化のみならず、神経機能に於いてもレドックスが重要であることが明らかとなった。これらの結果は細胞の分化や増殖におけるレドックス制御のはたす役割を明らかにするものであり、とくに神経系に於けるその重要性が示された。また栄養因子による抗酸化ストレス効果についても明らかにしてきた。

酸化ストレスなどのレドックス異常は神経変性疾患などのさまざまな疾患や、発ガンや老化に関与することが想定されている。本研究で解明されたシグナル系におけるレドックス制御機構は、これらの酸化ストレスによる疾患の病因解明に対しても重要な知見を与えるものと考えられる。