

バイオフィクター (シグナル伝達物質) としての過酸化水素

スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素 (ROS) は、生体に障害を与え、がん、動脈硬化などの原因になる¹⁾という考え方が一般に受け入れられているが、生体に必須の物質、特にホルモンのシグナル伝達物質という一面が注目されている。

H_2O_2 は、タンパク質チロシンホスファターゼ (PTP) を可逆的に阻害することがわかっている。PTP は活性中心に pKa 5 程度の Cys 残基を持つので、中性条件ではチオレート (-S-) に解離している。チオール (-SH) より酸化還元電位が低いために H_2O_2 で簡単に酸化されてスルフェン酸 (-SOH) 等を経て、ジスルフィド等に変換される。これら酸化型には酵素活性はなく、結果としてタンパク質の脱リン酸化が阻害され、特定のリン酸化タンパク質が蓄積する。酸化されたホスファターゼを元に戻す酵素も存在する²⁾⁴⁾。

PTP1B の H_2O_2 による可逆的阻害機構が解明された。PTP1B を等モルの H_2O_2 で処理すると、2 h で Cys215 の S が Ser216 の N と結合してスルフェニルアミドが生成した。X 線回折で見るとスルフェニルアミドになった酵素はかなり大きな構造変化を起こして活性もない。しかしスルフェニルアミドになった PTP1B の結晶を DTT (ジチオスレイトール) や GSH (グルタチオン) で処理すると、活性型に戻る⁵⁾。

細胞内の多くの酵素がリン酸化によって活性が調節されている。リン酸化されたタンパク質は PTP1B のようなホスファターゼによって脱リン酸化を受けることで特定のシグナルが持続しないように調節されている。細胞内の活性はホスファターゼの方がはるかに優勢なのでタンパク質は通常脱リン酸化状態にある。このため、一過性のリン酸化がシグナル伝達において意味があることになる。優勢なホスファターゼが H_2O_2 によって阻害されれば、大きな影響が出ることは容易に想像できる。

ここではホルモンの代表としてインスリンをとりあげる。インスリンのシグナル伝達の一部を図 1 に示した。 H_2O_2 は脂肪細胞に対してグルコースの取込みを促進するなどインスリン類似作用を持ち、それに -SH 基の酸化が関係している⁶⁾⁷⁾とか、 H_2O_2 でインスリン受容体 (IR) のサブユニット (IR β) の Tyr と Ser のリン酸化が迅速に活性化されるとか、 H_2O_2 処理した細胞から部分精製した IR の Tyr キナーゼ活性は亢進しているが、部分精製した受容体に H_2O_2 を作用させてもキナーゼ活性の亢進や自己リン酸化は起こらないのでこれらの作用は H_2O_2 が IR に直接的に引き起こすわけではなく、細胞内の他の因子 (後で解明されたホスファターゼの不活化等) が必要であることなどは昔から知られていた⁸⁾。

L6 筋細胞の培地にグルコースオキシダーゼとグル

コースを添加して H_2O_2 を発生させると Glut 1 (Glucose transporter 1) の mRNA 量、その半減期、転写因子 AP-1 の DNA 結合活性、c-fos, c-jun mRNA などが増加する。これらは rapamycin {当初インスリンによる pp70 ribosomal S6 kinase 活性化の阻害剤とされていたが、mTOR (mammalian target of rapamycin という Ser/Thr kinase family の阻害剤とされている) では阻害されないが、100 nM インスリンによる Glut 1 mRNA や 2-デオキシグルコース輸送の増加は rapamycin で阻害されるので、 H_2O_2 によるこれらの効果はインスリンとは違う機構で起こっているとされる⁹⁾。以上の研究から、 H_2O_2 を細胞外から加えるとインスリン類似作用を持つが、これらは IR を介するシグナルとは異なると考えられている。

一方、インスリンの作用に H_2O_2 が必須であるという論文が多数ある。3T3-L1 脂肪細胞や HepG2 細胞をインスリン (100 nM) 処理すると 1 分後に H_2O_2 が発生し、5 ~ 10 分でその濃度は最大になった。PTP1B 活性は、インスリン処理後 5 ~ 10 分で 32 ~ 52 % 減少する。同時にインスリンによる IR 自己リン酸化も IRS-1 (Insulin receptor substrate-1) の Tyr リン酸化も同時に起こる。カタラーゼ共存下では H_2O_2 発生はなく、上記全ての反応を阻害する。インスリン処理後低下した PTP は DTT によって活性が回復する¹⁰⁾。

以上から、インスリンが IR に結合すると H_2O_2 が発生し、これが IR 自己リン酸化や IRS のリン酸化、PTP1B の

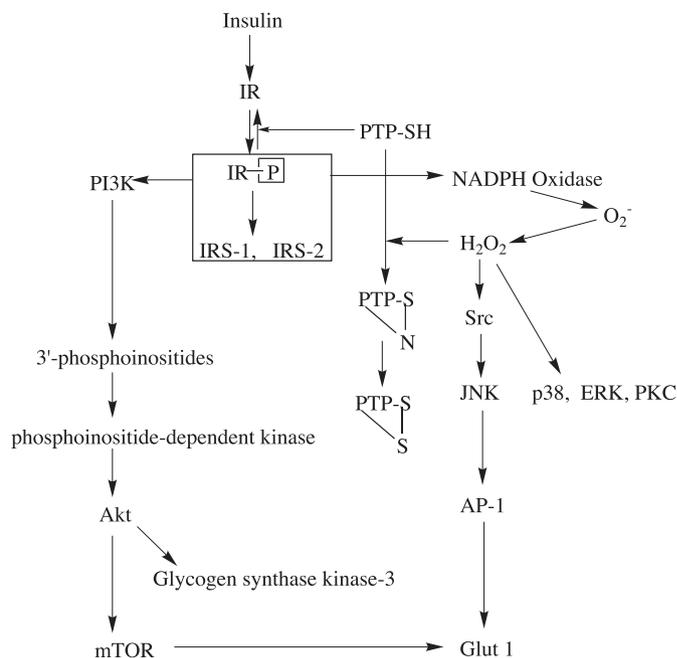


図 1. インスリンのシグナル伝達と過酸化水素の関係。

可逆的不活化を引き起こすと結論できる。

さらに、Rat-1細胞にインスリンを作用させると H_2O_2 が発生し、同時に $IR\beta$ とPKB/AktのTyrにリン酸化が起こる。この細胞にカタラーゼを過剰発現させると、ROS発生もこれらのTyrリン酸化も阻害される。modified in-gel PTP assayを用いてインスリン処理で阻害されるPTPを同定すると既知のPTP1BとTC45(the 45-kDa splice variant of T cell protein-tyrosine phosphatase)であった¹¹⁾。

TC45のsiRNAでTC45の量を減少させるとインスリンによるAktのリン酸化は強くなり、かつ持続時間も長くなる。これらの細胞にPDGFを作用させると、PDGF受容体の自己リン酸化とAktリン酸化が起こるが、これらのリン酸化にはTC45 siRNAは影響を与えない。即ち、TC45はインスリンを介するシグナル伝達に特異的であった¹¹⁾。

同様にHepG2細胞でもTC45のsiRNAでTC45の量を減少させてインスリンを作用させると、Aktのリン酸化のレベルも持続時間も長くなった。しかもTC45は $IR\beta$ と結合することを、substrate-trapping mutantを用いて証明した¹¹⁾。

次に H_2O_2 が発生する機構であるが、3T3-L1脂肪細胞においてdiphenyleneiodonium (DPI: NADPHオキシダーゼ阻害剤)はインスリンによる H_2O_2 産生、PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)の活性化、Aktの活性化すべてを阻害した。これらはDPI処理した細胞に H_2O_2 を添加することで回復した。 H_2O_2 によるAktの活性化はPI3Kの阻害剤であるwortmanninやLY294002処理により完全に阻害されたが、これらは H_2O_2 生成を阻害しない。よってインスリンはAktとは独立の経路で H_2O_2 生成を起こすと考えられる(PDGFなどはAktの活性化が H_2O_2 生成に関係している¹²⁾)。DPIはインスリンによるグルコースの取込みもGlut 4の細胞膜への移行も阻害する¹³⁾。以上より、貪食細胞で活性化されることがよく知られたNADPHオキシダーゼが H_2O_2 の発生に関与している。

3T3-L1脂肪細胞にはNox4 [gp91phox{貪食細胞のNAD(P)Hオキシダーゼ触媒サブユニット}の相同体]が発現している。この細胞にNAD(P)HおよびFAD/NAD(P)H結合領域を欠損したNox4 deletion constructを発現させると、インスリンによる H_2O_2 発生、IRとIRS-1のTyrリン酸化、グルコース取込み、IRS-1へのPI3K p85サブユニットの結合、Erk1とErk2のリン酸化などがすべて阻害された¹⁴⁾。

さらにNox4のsiRNAを導入してNox4を減少させると、インスリンによるIRリン酸化、グルコース取込み、Aktのリン酸化が阻害された。以上から、脂肪細胞ではインスリンにより、Nox4が活性化されて H_2O_2 を発生し、これがIR自己リン酸化、MAPK活性化、グルコースの取込みなどを行う。これと逆の作用をしているのがPTP1B

である¹⁴⁾。

以上のようにインスリンのシグナル伝達に少量の H_2O_2 が必要であるとすると、細胞内の H_2O_2 を迅速に分解すればインスリンのシグナルは伝達しなくなるはずである。培養細胞系でも外部から加えたカタラーゼやカタラーゼの過剰発現がインスリンの作用を阻害する。 H_2O_2 を分解するセレン依存性グルタチオンペルオキシダーゼ1(GPX1)を過剰発現させたマウスは生後24週間で対照群と比較して、体重、体脂肪率が有意に高く、血糖、血液中のインスリンとレプチン濃度が高くインスリン抵抗性も高かった。肝臓でのインスリンによる $IR\beta$ のリン酸化も30~70%減少していた。さらに肝臓とヒラメ筋におけるインスリンによるAktのSer473とThr308のリン酸化も減少していた。これらの事実からGPX1過剰発現による H_2O_2 濃度の低下はIRの機能発現に必要な H_2O_2 を消失させる結果、インスリン抵抗性を惹起する¹⁵⁾。

このような結果を見ると、少量の H_2O_2 はインスリンの機能発現に必須であり、糖尿病で酸化ストレスが亢進し、ROSが増加する¹⁶⁾のは、インスリン抵抗性を緩和するためではないかなどという議論が出るかもしれないが、そう単純ではない。逆に H_2O_2 はインスリン抵抗性を引き起こすという研究がある。

ラット血管平滑筋細胞(VSMS)を50 μ Mの H_2O_2 で処理した後、インスリンを作用させると、 $IR\beta$ の自己リン酸化、AktのSer473やThr308のリン酸化が大きく阻害された¹⁷⁾ことから H_2O_2 はインスリン抵抗性を引き起こすとされる。一方、50 μ M H_2O_2 処理のみでAktのリン酸化は有意に増加したが、これは H_2O_2 のインスリン類似作用である。

NIH-B細胞でも0.1~5 mM H_2O_2 で5分間処理後、インスリン(100 nM, 5分)を作用させると濃度依存的に $IR\beta$ のTyr自己リン酸化が阻害された¹⁸⁾。L6筋細胞においてもインスリンはグルコースの取込みを2倍、グリコーゲン合成を5倍に増加させるが、50 μ M以上の H_2O_2 存在下では、前者は73%阻害され、後者は完全に阻害された。即ち、 H_2O_2 はインスリンの阻害剤である。(インスリン+ H_2O_2)で処理したあと培地を交換して、その後インスリンで刺激すると H_2O_2 の効果は消失するので、 H_2O_2 の効果は可逆的である。その原因は、p38 MAPKの活性化であった。実際にp38阻害剤存在下では、 H_2O_2 はグルコースの取込みをインスリンと同程度に促進する。この現象はwortmanninで阻害されたので、 H_2O_2 はp38とPI3K両方を活性化するが、PI3Kのほうがglucose輸送を活性化することがわかる。一方、p38の活性化はグルコース輸送を阻害する。 H_2O_2 はp38以外にJNK(c-Jun NH₂-terminal kinase)、p42/p44 MAPK、Aktを活性化する¹⁹⁾。

H_2O_2 によるMAPK活性化についてはこれ以外に、ブ

タ大動脈内皮細胞 PAECs を 200 μM の H_2O_2 で処理すると, c-Jun と JNK のリン酸化が起こり, AP-1 の活性化を起こすことが知られている. これらの反応は, まず Src の活性化が起こり, これが EGF 受容体のリン酸化を起こし, JNK 活性化につながると考えられている²⁰⁾. さらにラット心筋細胞を 100 μM H_2O_2 で処理すると, JNK が活性化され c-Fos をリン酸化する. リン酸化された c-Fos はプロテアソームで分解されなくなることが報告されている. 同時に心肥大に関係すると言われている AP-1 も活性化される²¹⁾.

上記以外に H_2O_2 によって影響を受けるホルモン受容体は, NGF, HGF, VEGF, TNF- α , IL-1 β , アンジオテンシン II, 転写因子としては NF- κB , タンパク質としてはマトリックス金属プロテイナーゼ (MMP), 一酸化窒素シターゼ (NOS), PTEN, Cdc25c, タンパク質キナーゼ C, Rac 1 を介する NADPH オキシダーゼ, HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), focal adhesion kinase pp125^{FAK} など多彩である²⁴⁾.

細胞に H_2O_2 を作用させる場合, その濃度が重要である. 例えば 1 mM ぐらいの高い濃度では細胞死を引き起こすので, 細胞死のシグナルが活性化する. 10 ~ 200 μM 程度が生理的濃度であろうが, 細胞外から加えた H_2O_2 とインスリンが受容体に結合して発生する H_2O_2 とは何が違うのかが不明である. 単に局在の問題とは言い切れない.

ヒト PTP1B が O_2^- と反応して不活化される反応速度は $334 \pm 45 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ で, H_2O_2 との反応速度は $42.8 \pm 3.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ なので, O_2^- のほうが反応性は 8 倍ほど高い²²⁾. しかも, H_2O_2 との反応では Met の酸化も起こるため可逆的に回復する酵素の割合が 20 % しかなく, O_2^- の場合の 60 ~ 65 % に比べて非常に低い. PTP1B を O_2^- と反応させると Cys215 はスルフェン酸に変換され, これを 10 mM の GSH と反応させると GSH 化が起こる. 実際, 培地から血清を除去した A431 細胞に EGF を作用させると Cys215 が GSH 化されていた. これは DTT かチオールトランスフェラーゼで再活性化された²²⁾.

1.5 μM の PTP1B を 100 μM H_2O_2 で処理するとその活性低下の半減期が 3 分であると報告されており²³⁾, 上記の反応速度とほぼ対応している. 細胞におけるインスリンによる PTP1B の不活化は 5 分で明確なので, H_2O_2 の局所濃度はその程度はあるはずである. PTP1B を不活化するのは反応速度, 可逆性から見ると O_2^- のように見えるが, 細胞外から添加したカタラーゼがこのプロセスを阻害することが繰り返し報告されているので H_2O_2 であろう. しかも細胞外のカタラーゼが有効であることを考えると, H_2O_2 の発生は特定の領域や方向で起こるのではなくランダムな方向に起こっていることは明らかである.

しかし最初に活性化されるのが NADPH オキシダーゼなら, O_2^- が大量に発生するはずで, それが SOD と反応

しなければ H_2O_2 の発生は遅い. 実際に O_2^- も H_2O_2 も膜や水溶液を自由に拡散できるので, 近くに SOD があるとしても, なぜ O_2^- が直接反応しないのかという疑問がわく. 最も単純と思われることにもまだまだ解明すべきことが多い.

(奈良女子大学食物栄養学科 小城 勝相)

文 献

- 1) Kojo S (2004) Vitamin C, Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress. *Curr Med Chem* **11**, 1041-1064
- 2) Finkel T (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 247-254
- 3) Droege W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95
- 4) Forman HJ, Fukuto JM, Torres M (2004) Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and mitogen species can act as second messengers. *Am J Physiol* **287**, C246-C256
- 5) Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Meng T-C, Hinks JA, Tonks NK, Barford D (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **423**, 769-773
- 6) Czech MP, Lawrence Jr. JC, Lynn WS (1974) Evidence for electron transfer reactions involved in the Cu^{2+} -dependent thiol activation of fat cell glucose utilization. *J Biol Chem* **249**, 1001-1006
- 7) Czech MP, Lawrence JC, Lynn WS (1974) Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 4173-4177
- 8) Hayes GR, Lockwood DH (1987) Role of insulin receptor phosphorylation in the insulinomimetic effects of hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 8115-8119
- 9) Kozlovsky N, Rudich A, Potashnik R, Ebina Y, Murakami T, Bashan N (1997) Transcriptional activation of the Glut1 gene in response to oxidative stress in L6 myotubes. *J Biol Chem* **272**, 33367-33372
- 10) Madadev K, Zilbering A, Zhu L, Golstein BJ (2001) Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1B *in vivo* and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem* **276**, 21938-21942
- 11) Meng T-C, Buckley DA, Galic S, Tiganis T, Tonks NK (2004) Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *J Biol Chem* **279**, 37716-37725
- 12) Bae YS, Sung J-Y, Kim O-S, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, Rhee SG (2000) Platelet-derived growth factor-induced H_2O_2 production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **275**, 10527-10531
- 13) Mahadev K, Wu X, Zilbering A, Zhu L, Lawewnce JTR, Goldstein BJ (2001) Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **276**, 48662-48669
- 14) Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G., Lambeth JD, Goldstein BJ (2004) The NADP(H) oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H_2O_2

- and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* **24**, 1844-1854
- 15) McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG (2004) Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 8852-8857
- 16) Sun F, Iwaguchi K, Shudo R, Nagaki Y, Tanaka K, Ikeda K, Tokumaru S, Kojo S (1999) Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci* **96**, 185-190
- 17) Gardner CD, Eguchi S, Reynolds CM, Eguchi K, Frank GD, Motley ED (2003) Hydrogen peroxide inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. *Exp Biol Med* **228**, 836-842
- 18) Hansen LL, Ikeda Y, Olsen GS, Busch AK, Mosthaf L (1999) Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. Evidence for a role of H₂O₂ in tumor necrosis factor α -mediated insulin resistance. *J Biol Chem* **274**, 25078-25084
- 19) Blair AS, Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS (1999) Regulation of glucose transport and glycogen stnthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem* **274**, 36293-36299
- 20) Chen K, Vita JA, Berk BC, Keaney Jr JF (2001) c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves Src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* **276**, 16045-16050
- 21) Coronella-Wood J, Terrand J, Sun H, Chen QM (2004) c-Fos phosphorylation induced by H₂O₂ prevents proteasomal degradation of c-Fos in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **279**, 33567-33574
- 22) Barrett WC, DeGnove JP, Keng Y-F, Zhang Z-Y, Yim MB, Chock PB (1999) Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phoaphatase 1B. *J Biol Chem* **274**, 34543-34546
- 23) Lee S-R, Kwon K-S, Kim S-R, Rhee SG (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* **273**, 15366-15372