

酸化ストレスによるタンパク質の修飾

プロテオーム解析と酸化ストレスマーカーへの応用

酸化ストレスは、過剰な活性酸素種が引き起こす状態で、多くの疾患に関わっていると言われる。酸化ストレス状態になると、ペルオキシレドキシンのようなタンパク質のシステイン残基が酸化されることがわかった。アルツハイマー病では、このタンパク質の酸化が進行していることが判明しており、この酸化を疾病診断の指標として応用することが期待できる。

“Oxidative stress” is defined as a disturbance in the oxidant-antioxidant balance in favor of the former, and is involved in a numerous number of diseases. We identified the structure of oxidatively modified peroxiredoxin (Prx) and DJ-1 under the oxidative stress condition using mass spectrometry. The ratios of the oxidatively modified Prx 2 and Prx 6 to the reduced form in erythrocytes of Alzheimer’s disease (AD) patients were elevated compared to those of the healthy control, respectively. These modified proteins are promising candidate markers for diagnosis of AD.

酸化ストレス

「ストレス」は広い意味をもつために漠然とした印象を持たれがちであるが、個々の現象については明確に定義することができる。酸化ストレスとは、生体内の酸化還元状態を維持する機構が破綻し、内因性や外因性の活性酸素種を処理(還元)しきれなくなった状態を指す。生体内では、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の過程や、薬剤、紫外線などによって活性酸素種が発生する。ガン、糖尿病、動脈硬化、アルツハイマー病などの疾患では、生体は酸化ストレス状態にあり、活性酸素種がこれらの疾患に関わっているといわれる。

活性酸素種(一重項酸素、スーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、過酸化水素、脂質ペルオキシドなど)は、その名の通り非常に反応性に富み、タンパ

ク質、核酸、脂質といった生体を構成する分子と容易に反応して、その構造や機能を変化させる。われわれは、こうした疾患と酸化ストレスの関係を分子レベルで明らかにするため、酸化ストレスと生体分子、特にタンパク質の構造変換について研究を行ってきた。

プロテオーム解析と翻訳後修飾

酸化ストレスによるタンパク質の構造変換、すなわちタンパク質の翻訳後修飾は、多くの例が知られている。細胞内の情報伝達で重要な働きをするリン酸化と脱リン酸化、タンパク質のアミノ酸側鎖の酸化やカルボニル化、糖の非酵素的な修飾(グリケーション)などが、酸化ストレスに特徴的な翻訳後修飾である。培養細胞に酸化ストレスを負荷させるモデル実験からヒトの疾患の組織試料まで、その翻訳後修飾の

絹見 朋也 きぬみ ともや

t.kinumi@aist.go.jp

計測標準研究部門 有機分析科
バイオメディカル標準研究室 研究員
(つくばセンター)

本研究成果は、ヒューマンストレスシグナル研究センター ストレス応答研究チームに所属時の研究成果です。タンパク質の構造とその分析手法に興味を持ち、プロテオーム解析によるタンパク質解析、その基礎となる質量分析による構造解析、定量法の開発を行ってきた。質量分析は生体分子の解析に必要な不可欠な分析手法で、精力的な技術開発が続いており今後も大きなブレークスルーが期待される。2006年4月より計測標準部門において、質量分析を用いた生体分子の標準の確立に取り組んでいる。

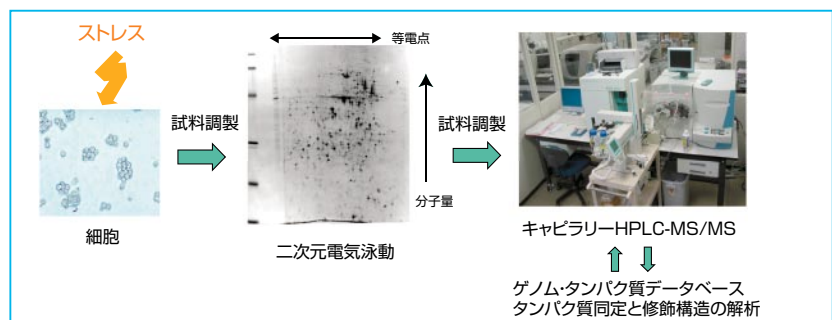
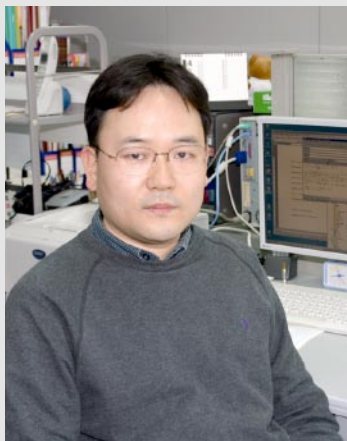


図1 二次元電気泳動とキャピラリー HPLC-MS/MS によるプロテオーム解析システム

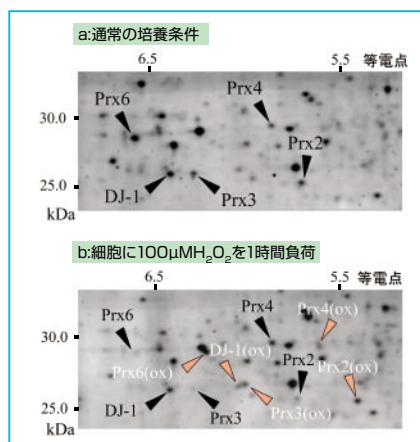


図2 a) 通常の培養条件、b) 100 μM 過酸化水素を負荷させた時の血管内皮細胞の二次元電気泳動像

キャピラリーHPLC-質量分析によりスポットを同定し、ペルオキシレドキシ (Prx)、DJ-1、およびそれらの酸化型、Prx(ox)、DJ-1(ox)を示した。

構造を決定し定量するためには、プロテオーム解析によるタンパク質の網羅的な解析が最適である。なぜなら、翻訳後修飾はゲノム情報によっては同定できず、タンパク質の分析が唯一の解析手法となるからである。

われわれは図1に示すシステムにより、システインの酸化に注目したプロテオーム解析を行って、酸化ストレスのマーカーとなるタンパク質を見いだした。また、このタンパク質が酸化ストレスが関係すると考えられる疾患のマーカーとして使用できる可能性を検討した。

酸化ストレスによるタンパク質の酸化

われわれは、生体内で発生する活性酸素種の1つである過酸化水素をヒトの血管内皮細胞に加えて、タンパク質の変化をプロテオーム解析により調べた。図2のように、細胞に過酸化水素を加える前(図2a)と後(図2b)の二次元電気泳動像を比較すると、4つのスポットの等電点が酸性側に移動している。キャピラリーHPLC-質量分析装置(HPLC-MS)を用いて4つのスポットを同定したところ、ペルオキシレドキシ

ン(Prx)の3つのアイソフォーム(機能がほぼ同じでアミノ酸配列が異なるタンパク質)、Prx2、Prx3、Prx6とDJ-1タンパク質であることがわかった。さらに、図2bに黄色で示した酸性型のスポットについて、質量分析で詳細な構造解析を行ったところ、Prxは活性システインが酸化されてシステイン酸になっていた。

DJ-1では、3つあるシステイン残基のうち106位にあるシステインだけが選択的に酸化されてシステインスルホン酸になっていることがわかった。このシステインは、過酸化物による酸化に対してきわめて鋭敏で、他の2つのシステイン残基とは異なった酸化還元環境にあると考えられた¹⁾。DJ-1は、家族性パーキンソン病の原因遺伝子として同定されてから²⁾機能解析が進み、106位のシステインが活性中心となって、システインプロテアーゼ様活性とシャペロン様活性をもつことが知られている。つまり、酸化ストレスによって106位のシステインが選択的に酸化されて、DJ-1の活性が低下していると考えられた。パーキンソン病に酸化ス

トレスが関わっていることは以前から指摘されていたが、酸化ストレスによるDJ-1の機能不全とパーキンソン病の関連は興味深い。

酸化ストレスマーカーの疾病診断への応用

アルツハイマー病患者の赤血球について、Prx、DJ-1の還元型・酸化型の比率と疾病の状況(疾病の有無や病状の進行度合い)の関係を調べた。図3のように、健常人に比べて、アルツハイマー病患者では赤血球中の酸化型(Prx2(ox)、Prx6(ox))の比率が有意に上昇していた。われわれは、これらの酸化ストレスのマーカーとなるタンパク質と脂質の酸化マーカーを指標として、客観的な診断が困難なアルツハイマー病の診断や定量的なリスク評価に応用できないかを検討している。タンパク質マーカーは、その発現変動を指標とするものが一般的で、翻訳後修飾を指標とするマーカーはほとんど例がない。今後、タンパク質の翻訳後修飾に注目することで、より有用なマーカー分子の探索が可能になるものと思われる。

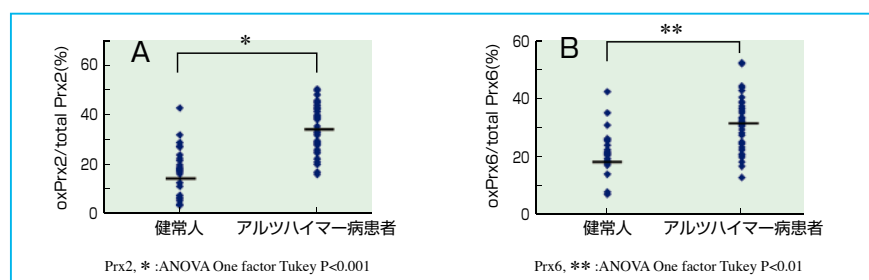


図3 赤血球中のペルオキシレドキシ 2 (A, Prx2)、およびペルオキシレドキシ 6 (B, Prx6) に関して、各ペルオキシレドキシ量に対する酸化体の割合 (oxPrx/ total Prx) を健常人 (22 例)、アルツハイマー病患者 (41 例) について測定した。

関連情報：

- 共同研究者：吉田康一、小川陽子、二木鋭雄 (ヒューマンストレスシグナル研究センター)、吉川敦 (寿栄会病院)、木全順子 (サーモエレクトロン株式会社)
- 1) T. Kinumi, J. Kimata, T. Taira, H. Ariga, E. Niki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 315, No2, p306-312 (2004)
- 2) V. Bonifati et al.: *Science* Vol. 299, p.256-259 (2003)
- 特願 2005-174961 「痴呆症の診断方法及び診断キット」(絹見朋也、吉田康一、小川陽子、二木鋭雄、吉川敦)