

自己評価報告書

平成23年 4月30日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（計画研究）

研究期間：2008～2012

課題番号：20117013

研究課題名（和文） システイン修飾による活性酸素受容体機能制御機構の解明

研究課題名（英文） ROS sensor-effector regulation via Cys modifications

研究代表者

西田 基宏 (NISHIDA MOTOHIRO)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：90342641

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：活性酸素・受容体・G蛋白質・システイン酸化・心臓

1. 研究計画の概要

様々なリガンド刺激で誘発される生理応答（例えば受容体の発現調節）におけるシグナル蛋白質の酸化的機能修飾の役割を明らかにする。具体的には、細胞外ヌクレオチドや細菌毒素が細胞膜上の受容体を刺激することで生成される活性酸素種（ROS）や一酸化窒素（NO）によって局所的に機能修飾を受ける細胞質タンパク（活性酸素受容体）を特定し、ROS/NO 生成酵素との相互作用を示す。また、特定した活性酸素受容体の心血管病における役割を明らかにする。これにより、ROS/NO シグナルソーム形成の意義を明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1)心臓の線維化誘導に関わる ROS の標的分子の探索

我々はこれまで、心筋細胞膜上の受容体と共役する三量体 G₁₂ ファミリー蛋白質 (G₁₂ と G₁₃; G_{12/13}) がホルモン刺激による ROS 生成を仲介することを細胞レベルで明らかにしてきた。本研究では、G_{12/13} 蛋白質シグナリングを特異的に阻害するペプチドを心筋細胞に過剰発現させたマウスを作成し、心臓における ROS シグナリングの役割を解析した。その結果、大動脈狭窄による圧負荷によって誘発される心臓の線維化（コラーゲンやフィブロネクチンの過剰産生）と心機能障害が G_{12/13} 蛋白質シグナリングを抑制することで顕著に抑制されることを見出した (*EMBO J.*, 2008)。G_{12/13} 蛋白質シグナリングの抑制は、圧負荷によるスーパーオキシド生成や、心筋間質における過酸化脂質 (4-hydroxy-2-nonenal) の蓄積も顕著に抑制していた。現在、ROS と心臓の炎症応答（線

維化）を直接結びつける標的センサー分子を特定すべく解析を進めている。

(2)ROS/NO によるアンジオテンシン受容体の発現調節機構の解析

アンジオテンシン type1 受容体 (AT1R) は、心臓の形態構造的改変（リモデリング）を仲介する受容体として注目されている。AT1R の発現量は、NO や親電子化合物などにより負に調節されることが知られているものの、その詳細な機構はわかっていない。我々は、プリン作動性 P2Y₂ 受容体アゴニストである ATP 刺激が NO 依存的に AT1R 発現量を低下させることを見出した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2011)。この過程には、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現誘導による、iNOS と NF-κB の p65 サブユニットとの複合体形成および NO による p65 の局所的 S-ニトロシル化修飾が必要であることがわかった。さらに、マウスの圧負荷によって iNOS の発現量が増加し、これに伴い p65 サブユニットの S-ニトロシル化と AT1R 発現量の低下が観察された。圧負荷による AT1R 発現低下が P2Y 受容体阻害剤処置によって完全に抑制されたことから、個体レベルでも上記シグナル経路が働いている可能性が示された。一方、G_i 蛋白質の薬理的阻害剤として使用されている百日咳毒素が、Toll 様受容体 (TLR4) を介して AT1R 発現量を増加することも明らかにした (*J. Biol. Chem.*, 2010)。この過程には、低分子量 G 蛋白質 Rac の活性化による NADPH oxidase 依存的な ROS 生成とそれに続く NF-κB の活性化が関与していた。さらに、ROS による NF-κB の活性化は IκB のリン酸化による分解に依存しており、p65 サブユニットのシステイン修飾の関与は認

められなかった。これらの結果は、ROS/NOの生成系とセンサー分子との複合体（シグナルソーム）形成が、NF-κB 活性機能調節における活性酸素の種特異性を制御していることを示唆している。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

（理由）

5年間の達成目標のうち、2.(2)のアンジオテンシン受容体の発現調節におけるROS/NOの役割を明らかにし、ROS、NOそれぞれの役割について *J. Biol. Chem.* 誌と *PNAS* 誌に報告することが出来た。残り2年間でやるべき、心不全の原因解明につながる活性酸素の標的分子についても既に明らかにしており、投稿準備段階に至っている。現在、本研究領域内での共同研究も活発に展開しており、活性酸素シグナル制御の基本動作原理の理解につながる新しい知見も得られつつある。

4. 今後の研究の推進方策

これまで、生理的条件下での受容体刺激によって局所的に産生される活性酸素がシグナル伝達に寄与することを示してきた。今後は、ROS/NOシグナリング制御が病態にどう影響するか明らかにしなければならない。特に、高血圧や虚血などのストレスで誘発される心臓の形態構造変化（リモデリング）は、心機能低下（心不全）を引き起こす原因として注目されており、この過程にはROS/NOの産生を介して2次的に生成される親電子性の化合物の蓄積が関与すると考えられている。そこで今後は、ROS/NOだけでなく、親電子化合物も含めた上でのシグナル蛋白分子の翻訳後修飾と病態形成との関係を明らかにしていく予定である。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕（計6件）

1. **Nishida M**, Ogushi M, Suda R, Toyotaka M, Saiki S, Kitajima N, Nakaya M, Kim K-M, Ide T, Sato Y, Inoue K and Kurose H. Heterologous down-regulation of angiotensin type1 receptors by purinergic P2Y₂ receptor stimulation through S-nitrosylation of NF-κB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108: 6662-6627 (2011).
2. **Nishida M**, Suda R, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Sumimoto H, Sato Y & Kurose H. Pertussis toxin upregulates angiotensin type1 receptors through TLR4-mediated Rac activation. *J. Biol. Chem.* 285: 15268-15277 (2010).
3. **Nishida M**, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima K, Ide T, Inoue R & Kurose H.

Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr⁶⁹ is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J. Biol. Chem.* 285: 13244-13253 (2010).

4. Kiyonaka S, Kato K, **Nishida M**, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I & Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 5400-5405 (2009).
5. **Nishida M**, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T & Kurose H. P2Y₆ Receptor-Gα_{12/13} Signaling in Cardiomyocytes Triggers Pressure Overload-induced Cardiac Fibrosis. *EMBO J*. 27: 3104-3115 (2008).
6. **Nishida M***, Kitajima N, Saiki S, Nakaya M & Kurose H. Regulation of angiotensin II receptor signaling by cysteine modification of NF-κB. *Nitric Oxide*. 2011 (in press).

〔学会発表〕（計1件）

1. **Nishida M**. Down-regulation of angiotensin receptors by S-nitrosylation of NF-κB. Society for Free Radical Research (SFRR) International. Free Radical School in Japan 2009 (Joetsu Kokusai Ski Resort, Sep 3rd, Nagano).

〔図書〕（計1件）

1. **Nishida M**, Ohba M, Nakaya M & Kurose H. Heterotrimeric G proteins in heart failure. *Heart Failure: Symptoms, Causes and Treatment Options*, NOVA Publishers (New York), Edited by Wright MS. 51-72 (2010).

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ

<http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp/>

研究成果の報道

<http://www.kyushu-u.ac.jp/pressrelease/index.php>