

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19048

研究課題名(和文) 新たなタンパク質修飾機構S-ニトロソ化による糖脂質代謝異常・慢性炎症連関の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms for metabolic disorder and chronic inflammation by S-nitrosylation, a novel protein modification after translation.

研究代表者

篠崎 昇平 (SHINOZAKI, Shohei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40622626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、老年症候群のうち特に内臓脂肪型肥満(メタボリックシンドローム)の発症に注目し、S-ニトロソ化を介する代謝(メタボリック)・リプログラミング機構、およびシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。

研究期間内に、1) DNAおよびヒストンメチル化/脱メチル化酵素のうちS-ニトロソ化される酵素を同定することに成功した。2) GSNOR-KOマウスを用いて、S-ニトロソ化が糖尿病に対して影響を与えることを明らかとした。3) S-ニトロソ化を抑制する天然由来の化合物を同定し、その効果を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the development of age-related diseases, including metabolic syndrome, diabetes and arteriosclerosis. To clarify relationships between metabolic reprogramming and protein S-nitrosylation, we studied about 1) DNA and histone methylation / demethylation enzymes; 2) GSNOR-KO mice; 3) natural compounds which inhibit protein S-nitrosylation and/or iNOS.

Within this study period, 1) we identified novel S-nitrosylated DNA and histone methylation / demethylation enzymes. 2) In GSNOR-KO mice, it was revealed that S-nitrosylation affects diabetes and obesity. 3) Natural compounds, derived from food, inhibit S-nitrosylation are identified and confirmed beneficial effects of diabetes.

研究分野：糖尿病、動脈硬化

キーワード：糖尿病 インスリン抵抗性 メタボリックシンドローム S-ニトロソ化 iNOS 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴って現れる老年症候群に共通する基盤病態として「慢性炎症」が注目されている (Minamino T, et al. Nat Med. 2009)。炎症反応等により生成した一酸化窒素 (NO) が、システイン残基のチオール基を直接 S-ニトロソ化する翻訳後タンパク質修飾機構があることが明らかとなり、現在では、S-ニトロソ化が様々なタンパク質でその機能を制御していると考えられている (Benhar M, et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009)。近年、老化過程にもエピジェネティクスが関与していることが明らかにされつつあり、その重要性が注目されている (Rando TA, et al. Cell 2012)。また、代謝の変化がエピジェネティクスの変化を惹起あるいは促進し、細胞応答の変化を持続的なものにするという考え方から、基本的なプログラムの変更というニュアンスを含めた「メタボリック・リプログラミング」という概念が生まれ、老化についてもこの新たな概念から語られるようになった (Anderson RM, et al. Trends Endocrinol Metab. 2010)。

これまでに我々は、加齢に伴って増加する炎症反応が S-ニトロソ化を介したエピジェネティックな変化によって、メタボリック・リプログラミングを引き起こす可能性を示唆する結果を得ている。長寿遺伝子サーチュイン (SIRT1) の S-ニトロソ化が転写因子のアセチル化を制御して遺伝子発現を変化させ、炎症反応やアポトーシスを調節していることを示した (Shinozaki S, et al. Sci. Sig. 2014) ほか、SIRT3 の S-ニトロソ化が SIRT3 の不活化を介してオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) のアセチル化を増加させ、OTC の活性低下と細胞内シトルリン濃度の低下をもたらすことを明らかとした (未発表)。OTC はオルニチンをシトルリンへ代謝する酵素であり、アセチル化で不活化され、SIRT3 による脱アセチル化で活性化されることが知られている (Hallows WC, et al. Mol Cell. 2011)。また、タンパク質の脱ニトロソ化を促す酵素として S-ニトロソグルタチオン還元酵素 (GSNOR) が知られており、グルタチオン依存的に NO を分解する (Liu L, et al. Nature 2001)。我々は、GSNOR 欠損 (GSNOR-KO) マウスがインスリン抵抗性を示すこと、そのメカニズムに S-ニトロソ化が関与している可能性があることを見いだしている (未発表)。

申請者は、新たに S-ニトロソ化タンパク質を網羅的に検出する方法を世界に先駆けて確立した。この方法を用いることで、脂肪組織における新規 S-ニトロソ化タンパク質を複数同定することに成功した。前年度までの予備的研究において、核内受容体の 1 つである C/EBP β を新規 S-ニトロソ化タンパク質として同定した (未発表)。脂肪組織における炎症反応が C/EBP β の S-ニトロソ化を介し、アディポネクチンの発現量を抑制すること

がメタボリックシンドローム発症メカニズムの 1 つとして示唆された。以上のように、我々は S-ニトロソ化がエピジェネティックな変化あるいは転写活性に影響を与えている知見を複数得ていた。

2. 研究の目的

本申請研究では、老年症候群のうち特に内臓脂肪型肥満 (メタボリックシンドローム) の発症に注目し、S-ニトロソ化を介する代謝 (メタボリック)・リプログラミング機構、およびシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。先行研究において白色脂肪組織特異的に GSNOR を発現するトランスジェニック (Ad-GSNOR-Tg) マウスの作成に成功しており、このトランスジェニックマウスに加え、GSNOR-KO マウス、培養細胞や臨床サンプルを用いて、S-ニトロソ化がメタボリックシンドロームの発症を惹起するメカニズムを解析することとした。研究期間内には以下の項目について取り組むこととした。

① 培養細胞を用いて、DNA およびヒストンメチル化/脱メチル化酵素のうち S-ニトロソ化される酵素を同定する。

② Ad-GSNOR-Tg マウスおよび GSNOR-KO マウスを用いて、S-ニトロソ化がエピジェネティクスに与える影響を解析する。

③ S-ニトロソ化を抑制する可能性のある天然由来の化合物の検索とその検証。

3. 研究の方法

DNA およびヒストンメチル化酵素および脱メチル化酵素の S-ニトロソ化の網羅的な検索

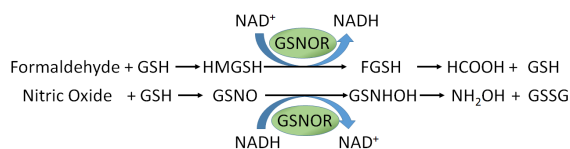
DNA やヒストンのメチル化や脱メチル化を担う酵素には S-ニトロソ化の標的となる Zn フィンガー配列を含むものが多く存在し、エピジェネティックな変化を介したメタボリック・リプログラミングに S-ニトロソ化が関与している可能性が高い。申請者の開発した S-ニトロソ化タンパク質を検索する方法 (プロテオーム解析) に改良を加え、新たに DNA メチル化および脱メチル化酵素の S-ニトロソ化を探索した。この検索により、いくつかの候補が選ばれた。加えて、検索されたタンパク質が細胞内において実際に S-ニトロソ化が起こるかについて確認を行った。具体的には、候補タンパク質に FLAG タグをつけた発現ベクターを構築し、サル腎臓細胞である COS-7 に強制発現させたのち、NO ドナーを用いて S-ニトロソ化蛋白質をビオチンスイッチアッセイによって検出・評価した。

メタボリックシンドロームにおける GSNOR 役割の解明

a. 脂肪組織特異的 GSNOR トランスジェニックマウスの解析

タンパク質の S-ニトロソ化は可逆的な反応であり、その反応に酵素を必要としない。一方、タンパク質の脱ニトロソ化を促す酵素

として S-ニトロソグルタチオン還元酵素 (GSNOR) が知られている (Liu L, et al. Cell 2004)。GSNOR はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) を補酵素とし、グルタチオン依存的にホルムアルデヒドと NO を分解する (下図)。



申請者らは心臓特異的 GSNOR 強制発現マウスを用いて、GSNOR が炎症から心臓を保護する働きがあることを明らかにした (Sips PY, et. al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013)。心臓と同様に脂肪組織特異的に GSNOR を強制発現させることで、S-ニトロソ化タンパク質の蓄積を抑制できることが予想された。脱ニトロソ化の促進が、脂肪組織のインスリン抵抗性を防ぐ働きがあるか解析を行う。GSNOR 強制発現による血糖、血中インスリン、耐糖能、インスリン分泌能の変化を評価した。また、これまでに同定した転写因子に注目し、転写因子の S-ニトロソ化とインスリン抵抗性発症の関連について解析を行う。普通餌にて野生型との違いが観察されない場合は、高脂肪食や高スクロース食などの特殊飼料を与え、肥満および炎症を誘導した状態で検討した。

b. GSNOR ノックアウトマウスの解析

GSNOR 欠損マウスでは S-ニトロソ化タンパク質が蓄積することが報告されている (Lima, B. et. al. Proc Natl Acad Sci USA. 2009)。本研究に先駆けて行われた予備的研究により、GSNOR 欠損マウスでは早期にインスリン抵抗性を発症する結果を得ている (未発表)。また、GSNOR 欠損マウスではリポポリサッカライド (LPS) で炎症を惹起した場合、コントロールよりも SIRT1 がより多く S-ニトロソ化されることを明らかにしている (未発表)。LPS 処理サンプルの作成に関しては、海外協力研究先であるハーバード大学シグナル伝達研究室の金木正夫博士が担当する。主にインスリン抵抗性発症における GSNOR の役割および S-ニトロソ化の関わりについて解析を行った。

S-ニトロソ化を抑制する化合物の検索

メタボリックシンドロームにおける S-ニトロソ化が病態の進展を促進することがこれまでの研究で明らかとなっている。何らかの薬剤、化合物を用いることによって S-ニトロソ化を抑制することができれば、病態の止めることができる。これまでに我々は、iNOS 阻害剤を用いた実験ですれに、インスリン抵抗性を改善できることを示している (Fujimoto M, et. al. Diabetes. 2005)。本申請研究では天然由来の成分に着目し、薬

剤による改善ではなく、機能的な食品によってメタボリックシンドロームが改善できる可能性について検証した。

4. 研究成果

DNA およびヒストンメチル化酵素および脱メチル化酵素の S-ニトロソ化の網羅的な検索

申請者の開発した網羅的検出方法を用いて脂肪組織においていくつかの DNA メチル化酵素が検索された。このうち、特にメタボリックシンドロームと関係があると考えられているものをピックアップし、FLAG タグを付けた発現ベクターを構築した。COS-7 (サル腎臓由来) 細胞に過剰発現させたのち、NO ドナーを作用させて S-ニトロソ化の評価を行ったところ、いくつかの DNA メチル化酵素が S-ニトロソ化することを確認した (図 1)。

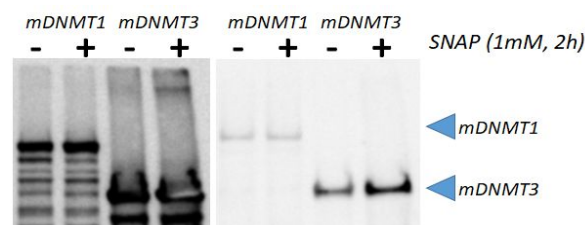


図 1) マウスの DNA メチル化酵素 1 および 3 (mDNMT1 and 3) のピオチンスイッチの結果。SNAP によって mDNMT1 および mDNMT3 の S-ニトロソ化が観察された。検出には抗 FLAG 抗体を用いた。左側は総蛋白、右側はピオチンスイッチ後の溶出文をウエスタンブロットによって検出した。

メタボリックシンドロームにおける GSNOR 役割の解明

a. 脂肪組織特異的 GSNOR トランスジェニックマウスの解析

新たに作出した脂肪組織特異的 GSNOR トランスジェニックマウスの血糖値、インスリン値を測定したが、野生型マウスと比較して有意な差は認められなかった。普通餌による飼育では、過剰発現による差が見られないと考え、高脂肪食での飼育を開始した。研究期間終了時までには結果を得ることができなかったため、現在、継続して観察している。

b. GSNOR ノックアウトマウスの解析

先行研究において GSNOR 欠損マウスはインスリン抵抗性を発症することを確認しており、S-ニトロソ化タンパクが増加することを確認した。しかしながら、肥満糖尿病モデルである ob/ob マウス (レプチン欠損マウス) と GSNOR 欠損マウスを掛け合わせたレプチン・GSNOR 両欠損マウスでは、ob/ob マウスと比較して、血糖値が有意に低下していることを見出した。

S-ニトロソ化を抑制する化合物の検索

S-ニトロソ化を抑制する化合物としてすでに iNOS 阻害剤があげられているが、我々

はいわゆる薬剤に頼らず、食品に含まれる成分で抑制が可能か検討した。いくつかの食品由来の成分が、S-ニトロソ化を抑制する可能性があることが、ライブラリー検索によって分かった。そのうち、ブロッコリーに含まれるスルフォラファン、ビールの製造に欠かせないホップに含まれるキサントフモールに着目した。スルフォラファンに関しては、実験開始直前に他のグループから内臓脂肪増加抑制効果の報告があったため (Zhang HQ, et. al. Mol Nutr Food Res. 2016)、キサントフモールに絞って予備的研究を行った。その結果、キサントフモールの iNOS 発現抑制効果が高いことが明らかとなったため (図 2) キサントフモールを肥満糖尿病モデルである ob/ob マウスに投与して、メタボリックシンドローム改善効果が期待できるか検討した。

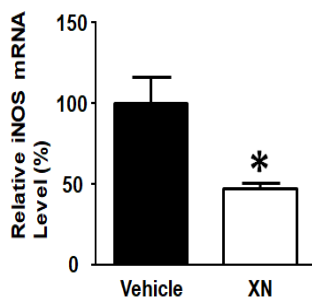


図 2) ob/ob マウスの肝臓における iNOS 遺伝子発現量。キサントフモール (XN) の投与によって有意に発現が抑制された。

キサントフモールによるメタボリックシンドローム改善メカニズムの解明

キサントフモールによって ob/ob マウス肝臓の S-ニトロソ化が減少しており、インスリン抵抗の評価を行ったところ、キサントフモール投与群で改善していることが分かった (図 3)。

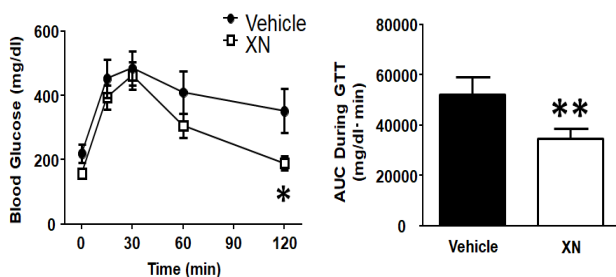


図 3) ob/ob マウスにおける耐糖能試験の結果。キサントフモール (XN) の投与によって、ob/ob マウスの耐糖能が有意に改善する。

これまでに、ob/ob; iNOS-KO マウスを用いた実験で、iNOS の欠損によってインスリン抵抗性が改善すると、体重の増加が観察されていたが (未発表) しかしながら、キサントフモール投与によるインスリン抵抗性の改善は、体重減少を伴っていた (図 4)。

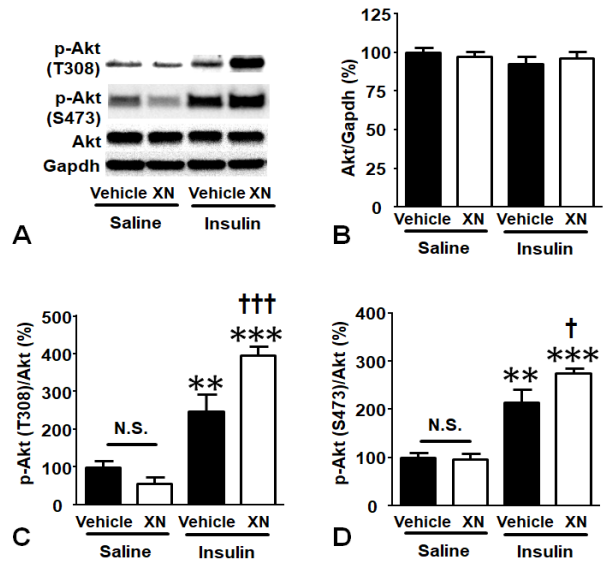


図 4) ob/ob マウスの肝臓における Akt のリン酸化。キサントフモール (XN) の投与によって、インスリンによるシグナルが有意に増強された。XN は Akt そのものの発現量には影響を与えない。

このことから、キサントフモールによるメタボリックシンドローム改善効果は、肝臓における S-ニトロソ化の抑制のみならず、他のメカニズムが存在することが示唆された。

キサントフモールにはファルネソイド X 受容体 (FXR) 活性化作用があることが報告されており (Yang L, et. al. Biochim Biophys Acta. 2016)、メタボリックシンドローム改善効果は S-ニトロソ化の抑制のみではないことが予想された。そのため、脂肪組織における影響を調べ、FXR アゴニストとしての作用を検討した。

FXR の活性化によって、熱産生に關与する脱共役タンパク質 (UCP1) が誘導されることから (Broeders EP, et. al. Cell Metab. 2015)、キサントフモールが白色脂肪組織において UCP1 の発現を増やすかについて調べた (図 5)。

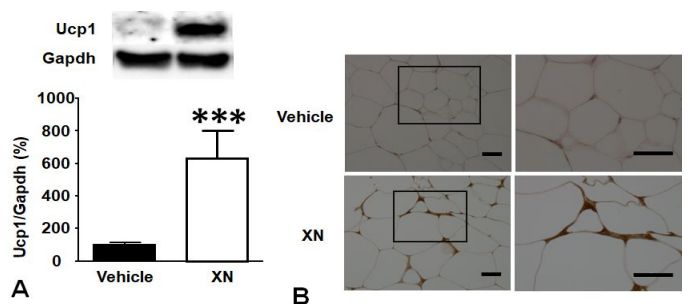


図 5) ob/ob マウスの白色脂肪組織における UCP1 タンパク質の発現量。キサントフモール (XN) の投与によって有意に発現が上昇した (A)。免疫組織染色によっても、XN による UCP1 の発現上昇を確認した (B)。スケールバーは 50 μm を示す。

その結果、キサントフモールには白色脂肪組織において UCP1 を誘導することが明らかとなった。この結果より、エネルギー消費が増えることによって、体重増加の抑制効果が

あることが示唆された。さらに、キサントフモールが代謝を亢進するかについて検討したところ、キサントフモール投与群では、体重当たりのエネルギー消費量が、わずかに増える傾向が見られた。呼吸商を計算した結果、キサントフモール投与群では糖質に比べて脂質消費が有意に増えていることが明らかとなった。(図6)

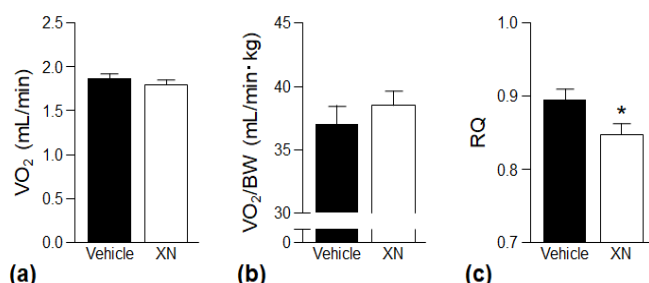


図6)代謝ケージを用いたエネルギー消費量の測定結果。キサントフモール投与群では、体重当たりのエネルギー消費がわずかに上昇していた。呼吸商より、キサントフモール投与群では脂質消費の割合が増えていることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1) Mabuchi S, Shinozaki S*, Soejima Y, Tsuzuki T, Naito H, Sawabe M, Kaneki M, Shimokado K. Beneficial Effects of Xanthohumol on Obesity and Insulin Resistance in Obese, Diabetic (ob/ob) Mice. *:corresponding author. *Isamed Journals Open Access Journal of Food and Nutrition*, Volume 1, Issue 1. (2017) **(査読有り)**

(2) Nakazawa H, Ikeda K, Shinozaki S, Kobayashi M, Ikegami Y, Fu M, Nakamura T, Yasuhara S, Yu YM, Martyn JAJ, Tompkins RG, Shimokado K, Yorozu T, Ito H, Inoue S, Kaneki M. Burn-induced muscle metabolic derangements and mitochondrial dysfunction are associated with activation of HIF-1 and mTORC1: Role of protein farnesylation. *Sci Rep.* 26;7(1): 6618. (2017) **(査読有り)**

(3) Nakazawa H, Chang K, Shinozaki S, Yasukawa T, Ishimaru K, Yasuhara S, Yu YM, Martyn JA, Tompkins RG, Shimokado K, Kaneki M. iNOS as a Driver of Inflammation and Apoptosis in Mouse Skeletal Muscle after Burn Injury: Possible Involvement of Sirt1 S-Nitrosylation-Mediated Acetylation of p65 NF- κ B and p53. *PLoS One.* 12(1): e0170391. (2017) **(査読有り)**

(4) Chiba T, Noji K, Shinozaki S, Suzuki S, Umegaki K, Shimokado K. Diet induced non-alcoholic fatty liver disease affects expression of major cytochrome P450 genes

in a mouse model. *J Pharm Pharmacol.* 68(12):1567-1576. (2016) **(査読有り)**

(5) Sasaki M, Shinozaki S*, Shimokado K. Sulforaphane promotes murine hair growth by accelerating the degradation of dihydrotestosterone. *:corresponding author. *Biochem Biophys Res Commun.* 472(1), Pages 250-254. (2016) **(査読有り)**

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 篠崎昇平 「糖尿病と慢性炎症」 第58回日本老年医学会学術集会 2016年6月9日 石川県立音楽堂(石川県金沢市)(招待講演)

(2) Shohei Shinozaki. S-nitrosylation of SIRT1 as a hub of the inflammatory spiral. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. May. 20, 2016. 仙台国際センター(宮城県仙台市)(招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学老年病内科 研究

<http://www.tmd.ac.jp/grad/vasc/vasc-J.htm/policy.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠崎 昇平 (SHINOZAKI, Shohei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号: 40622626