

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590253

研究課題名（和文） 細胞内ニトロ化シグナルのグルタチオンによる制御機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of glutathione-mediated regulation of nitrative signal in cells

研究代表者

藤井 重元（FUJII SHIGEMOTO）

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：00325333

研究成果の概要：活性酸素や一酸化窒素によってもたらされる酸化ストレスは、様々な細胞機能変化をもたらす。その機序の一つである細胞内ニトロ化シグナルについて、グルタチオンによる制御機構に焦点をあて解析を行った。その結果、グルタチオンは、ニトロ化シグナルを担う 8-ニトロ cGMP の生成とこの分子による蛋白質の翻訳後修飾を調節し、ヘムオキシゲナーゼ-1 などの抗酸化蛋白質の発現を介した酸化ストレスに対する適応反応の制御に関与していることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：一酸化窒素、活性酸素、酸化ストレス、グルタチオン、ニトロ化、サイクリック GMP、8-ニトロ cGMP、S-グアニル化

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素（NO）は循環制御、感染防御、アポトーシスの制御など様々な生理現象に関わる多機能分子である。NOによるシグナルは、従来から知られていたサイクリック GMP（cGMP）を介した経路に加え、活性窒素酸化物によるアミノ酸や蛋白質の修飾（ニトロソ化、ニトロ化）を介した経路があることが最近の研究により明らかになってきた。したがって、多様なNOの生理作用を理解するにはこ

れらのシグナル経路を詳細に解明する必要がある。

我々は NO および活性窒素酸化物の生理学的、病態生理学的役割に関する研究を行ってきたが、最近 NO 由来の活性窒素酸化種が生体内で核酸のグアニンをニトロ化し、8-ニトログアニン誘導体が生成することを明らかにした。8-ニトログアニン誘導体はスーパーオキシドを産生するなどドックス活性を有しており、更なるシグナルを伝える生理活性物質であることが明らかになった。さらに、

NO により生成する各種ニトログアニン誘導体の中では、NO と cGMP が反応した 8-ニトロ cGMP が主要産物であり、細胞保護効果を発揮するシグナル分子であることが明らかとなってきた。

8-ニトロ cGMP の代謝経路について解析を進めると、8-ニトロ cGMP は、グルタチオンや蛋白質のチオール基と反応して分解し、グルタチオンや蛋白質に cGMP を付加した安定なアダクトを形成すること (S-グアニル化) が明らかとなった。S-グアニル化はこれまで知られていなかった全く新しい蛋白質の翻訳後修飾であり、細胞の機能に変化を与える、ニトロ化シグナルの重要な経路と考えられた。

一方、グルタチオンは細胞内に豊富に存在するチオール化合物であり、細胞内における 8-ニトロ cGMP の S-グアニル化において、蛋白質と競合する制御因子であると推定される。したがって、グルタチオンの S-グアニル化産物 (8-GS-cGMP) の生成、分解の機序を明らかにすることはニトロ化シグナルの制御機構を明らかにする上で重要である。

また、グルタチオンは薬物代謝に重要な役割を果たしており、グルタチオン抱合体を細胞外に排出する機構が存在している。したがって、8-GS-cGMP が、cGMP と同様に血管弛緩作用などの生理活性を持っているとすると、隣接細胞にシグナルを伝えるメディエーターとなると考えられ、8-GS-cGMP は、NO によるニトロ化シグナルを cGMP のシグナルに変換する重要な分岐点になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、8-ニトロ cGMP によるシグナルメカニズムを解明することを目的として、その制御因子と考えられるグルタチオンおよび 8-GS-cGMP の作用に焦点をあて以下のような研究を行う。

- (1) 8-GS-cGMP の測定法の開発と、細胞内・生体内での動態の解析
- (2) 8-GS-cGMP の生理活性、特にプロテインキナーゼ G の活性化を介した血管平滑筋弛緩活性の解析
- (3) 細胞内グルタチオンによる蛋白質 S-グアニル化の制御の解析
- (4) 蛋白質 S-グアニル化を介するニトロ化シグナルの伝達機構の解析

これらにより、NO からの 8-ニトロ cGMP 生成を介した細胞内ニトロ化シグナルの制御メカニズムの全容の解明に向けた重要な知見が得られるものと考えている。

3. 研究の方法

(1) 細胞内での 8-GS-cGMP の生成機構を明らかにするために、HPLC-電気化学検出を用いた 8-GS-cGMP の定量法を開発し、細胞抽出物

中の 8-GS-cGMP の検出を行った。また、細胞をグルタチオンの生合成の阻害剤である L-buthionine sulfoximine (BSO) で処理し、細胞内 8-ニトロ cGMP の生成に対するグルタチオンの影響について検討した。

(2) 8-GS-cGMP が、cGMP と同様に血管平滑筋弛緩活性を有しているかどうかを調べるために、ラットの頸動脈リングに 8-GS-cGMP を作用させたときの血管平滑筋の弛緩反応をマグヌス法により解析した。また、cGMP の分解酵素であるホスホジエステラーゼ 1 (PDE1) および 5 (PDE5) と 8-GS-cGMP を試験管内において反応させ、これらの酵素により 8-GS-cGMP が分解されるかについて、HPLC 法を用いて解析した。

(3) 抗 S-グアニル化蛋白質抗体を用いたウエスタンブロットによる S-グアニル化蛋白質の検出法を確立し、細胞内での 8-ニトロ cGMP 生成に伴った蛋白質の S-グアニル化を解析した。さらに、細胞をグルタチオン生合成の阻害剤で処理し、蛋白質 S-グアニル化のグルタチオンによる制御について検討した。

(4) 細胞内における S-グアニル化の標的蛋白質として、酸化ストレスのセンサー蛋白質として知られている Keap1 に注目し、試験管内および細胞内における 8-ニトロ cGMP と Keap1 の反応性について解析した。さらに、細胞内での Keap1 の S-グアニル化によってもたらされる転写制御因子 Nrf2 の活性化と抗酸化蛋白質の発現誘導をウエスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

(1) 8-ニトロ cGMP で処理をした RAW264 細胞から調製した細胞抽出物では、HPLC-電気化学検出法により 8-GS-cGMP が検出され、細胞内においてグルタチオンと 8-ニトロ cGMP が反応して 8-GS-cGMP が生成することが示された。また、NO 放出試薬処理や LPS/IFN- γ 刺激による細胞内での 8-ニトロ cGMP の生成は、グルタチオン生合成の阻害剤である BSO により著明に増加することから、細胞内グルタチオンが、8-ニトロ cGMP の細胞内濃度を制御する重要な因子であることが示唆された。

(2) 8-GS-cGMP はラット頸動脈リングにおいて血管平滑筋弛緩反応を惹起し、cGMP と同様に血管平滑筋弛緩作用を有していることが示された。一方、cGMP の主要な分解酵素である PDE1 および PDE5 では、8-GS-cGMP は分解されず、8-GS-cGMP は cGMP とは異なる特性を有することが示された。

(3) LPS/IFN- γ 刺激をした RAW264 細胞では、

8-ニトロ cGMP の生成に伴い、蛋白質の S-グアニル化が増加することがウエスタンブロットにより示された。この蛋白質の S-グアニル化は、細胞を BSO で処理することにより著明に増加した。このことから、グルタチオンは、蛋白質の S-グアニル化を調節する制御因子として働いていることが明らかになった。

(4) 各種蛋白質を試験管内で 8-ニトロ cGMP と反応させ、S-グアニル化を解析したところ、ウシ血清アルブミンや α_1 -プロテアーゼインヒビターでは、グルタチオン存在下ではほぼ完全に S-グアニル化が抑制されたのに対し、Keap1 はグルタチオン存在下においても顕著な S-グアニル化が観察され、8-ニトロ cGMP との反応性が非常に高い蛋白質であることが分かった。また、NO 産生刺激 (NO 放出試薬、LPS/サイトカイン) を与えた RAW264 細胞や C6 ラットグリオーマ細胞では、8-ニトロ cGMP の生成に伴い、Keap1 の S-グアニル化が観察された。これらの細胞では、Keap1 の S-グアニル化に伴い、Keap1 により制御を受けている転写因子 Nrf2 の活性化が見られ、さらにヘムオキシゲナーゼ-1 などの Nrf2 により制御を受けている抗酸化蛋白質群の発現が増加した。

(5) 以上より、細胞内グルタチオンは、8-ニトロ cGMP と反応して生理活性を有する 8-GS-cGMP を生成するとともに、蛋白質の S-グアニル化を制御していることが示された。グルタチオンは、Keap1 などの酸化ストレスセンサー蛋白質の S-グアニル化の調節に寄与しており、抗酸化蛋白質の発現制御などの酸化ストレスセンサー蛋白質を介した 8-ニトロ cGMP による細胞内シグナル伝達の制御に関与していることが示唆された。

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 17 件)

1. Zaki MH, Fujii S, Okamoto T, Islam S, Khan S, Ahmed KA, Sawa T, and Akaike T. Cytoprotective function of heme oxygenase 1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis. *J Immunol*. 182: 3746-56. 2009. (査読有)

2. 赤池孝章, 岡本竜哉, Zaki MH, 藤井重元, 澤智裕. NO による細胞内感染防御の新しい展開. *日本ハンセン病学会雑誌*. 78: 41-47. 2009. (査読無)

3. 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 赤池孝章. 活性酸素・NO による感染防御シグナルの新展開. *細胞*. 41: 51-55. 2009. (査読無)

4. Saito Y, Taguchi H, Fujii S, Sawa T, Kida E, Kabuto C, Akaike T, Arimoto T. 8-Nitroguanosines as chemical probes of the protein S-guanylation. *Chem Commun*. 5984-5986 2008. (査読有)

5. Ishima Y, Akaike T, Kragh-Hansen U, Hiroshima S, Sawa T, Suenaga A, Maruyama T, and Otagiri M. S-nitrosylated human serum albumin-mediated cytoprotective activity is enhanced by fatty acid binding. *J Biol Chem*. 283: 34966-34975 (2008). (査読有)

6. McCarthy SM, Bove PF, Matthews DE, Akaike T, and van der Vliet A. Nitric oxide regulation of MMP-9 activation and its relationship to modifications of the cysteine switch. *Biochemistry*. 47: 5832-5840 (2008). (査読有)

7. Yoshitake J, Kato K, Yoshioka D, Sueishi Y, Sawa T, Akaike T, and Yoshimura T. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: Involvement of estrogen receptor-dependent or -independent pathways. *Nitric Oxide*. 18: 223-228 (2008). (査読有)

8. Urano T, Ito Y, Akao M, Sawa T, Miyata K, Tabata M, Morisada T, Hato T, Yano M, Kadomatsu T, Yasunaga K, Shibata R, Murohara T, Akaike T, Tanihara H, Suda T, and Oike Y. Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28: 827-834 (2008). (査読有)

9. Alam MS, Zaki MH, Sawa T, Islam S, Ahmed KA, Fujii S, Okamoto T, and Akaike T. Nitric oxide produced in Peyer's patches exhibits antiapoptotic activity contributing to an antimicrobial effect in murine salmonellosis. *Microbiol Immunol*. 52: 197-208. 2008. (査読有)

10. Kaneko K, Akuta T, Sawa T, Kim HW, Fujii S, Okamoto T, Nakayama H, Ohigashi H, Murakami A, and Akaike T. Mutagenicity of

8-nitroguanosine, a product of nitrative nucleoside modification by reactive nitrogen oxides, in mammalian cells. *Cancer Lett.* 262: 239-47. 2008. (査読有)

11. 岡本竜哉, 赤池孝章. 肺の感染炎症病態におけるニトロ化ストレスとそのバイオマーカー. *医学のあゆみ.* 224: 851-6. 2008. (査読無)

12. 岡本竜哉, 藤井重元, 澤智裕, 赤池孝章. 感染病態におけるNO・活性酸素のシグナル伝達機能: 酸化ストレスとその適応応答の分子メカニズム. *Allergy From the Nose to the Lung.* 6: 12-7. 2008. (査読無)

13. 澤智裕, 赤池孝章. 活性酸素を消去する物質8-ニトロcGMP. *検査と技術.* 36: 678-679 (2008). (査読無)

14. Ishima Y, Akaike T, Kragh-Hansen U, Hiroyama S, Sawa T, Maruyama T, Kai T, and Otagiri M. Effect of Endogenous ligands on the biological role of human serum albumin in S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 364: 790-795 (2007). (査読有)

15. Sawa T, Zaki MH, Okamoto T, Akuta T, Tokutomi Y, Kim-Mitsuyama S, Ihara H, Kobayashi A, Yamamoto M, Fujii S, Arimoto H, and Akaike T. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nature Chem Biol.* 3: 727-35. 2007. (査読有)

16. Fujii S, Zhang L, and Kosaka H. Albuminuria, expression of nitotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and monocyte chemoattractant protein-1 in the renal tubules of hypertensive Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res.* 30: 991-8. 2007. (査読有)

17. Zaki MH, Okamoto T, Sawa T, Fujii S, and Akaike T. Nitrative stress in respiratory inflammation caused by influenza virus infection. *Clin Exp Allergy Rev.* 7: 19-26. 2007. (査読有)

[学会発表](計11件)

1. 藤井重元, 岡本竜哉, 澤智裕, 赤池孝章. サルモネラ感染におけるニトロ化環状ヌクレオチドを介する生体防御機構. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月12-14日. 名古屋市.

2. 藤井重元, 澤智裕, 岡本竜哉, 居原秀、

本橋ほづみ, 山本雅之, 赤池孝章. 新規環状ヌクレオチド8-ニトログアノシン3',5'-環状1リン酸による転写制御因子Keap1のS-グアニル化とその酸化ストレス応答における役割. 第81回日本生化学会大会. 2008年12月9-12日. 神戸市.

3. 藤井重元, Md. H. Zaki, 岡本竜哉, 澤智裕, 赤池孝章. サルモネラ感染病態における8-ニトログアノシン3',5'-環状1リン酸を介したNO誘導性生体防御機構. 第61回日本細菌学会九州支部総会. 2008年10月3-4日. 熊本市.

4. Akaike T, and Sawa T. Signal transduction by 8-nitro-cGMP via its unique redox property and post-translational modification. A Joint Conference of 13th In Vivo EPR Spectroscopy and Imaging and 10th International EPR Spin Trapping/Spin Labeling. 2008年9月28-30日. 福岡市.

5. Akaike T. Protein S-guanylation induced by 8-nitro-cGMP. 5th Internal conference on biology, chemistry and therapeutic applications of NO. 2008年8月24-28日. Bregenz, Austria.

6. Fujii S, Sawa T, Okamoto T, Ihara H, Motohashi H, Yamamoto M, and Akaike T. Physiological role of Keap1 S-guanylation by 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formed in C6 glioma cells. 5th Internal conference on biology, chemistry and therapeutic applications of NO. 2008年8月24-28日. Bregenz, Austria.

7. 藤井重元, 澤智裕, 岡本竜哉, 居原秀, 小林聡, 山本雅之, 赤池孝章. Keap1のS-グアニル化を介する環状ヌクレオチド8-ニトログアノシン3',5'-環状1リン酸のシグナル伝達機序. 第61回日本酸化ストレス学会学術集会. 2008年6月19-20日. 京都市.

8. 藤井重元, 澤智裕, 岡本竜哉, 居原秀, 小林聡, 山本雅之, 赤池孝章. 新規環状ヌクレオチド8-ニトログアノシン3',5'-環状1リン酸による転写制御因子Keap1のS-グアニル化とそのシグナル伝達機構. 第8回日本NO学会学術集会. 2008年5月9-10日. 仙台市.

9. Akaike T, Sawa T, Fujii S, Okamoto T, Ihara H, and Arimoto H. A new second messenger, 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate involved in NO-induced signal transduction via a unique

post-translational modification, protein S-guanylation. 4th Joint Meeting of the Society for Free Radical Research, Australasia and Japan.
2007年12月1-5日・京都市。

10. 藤井重元、澤智裕、Mohammad Hasan Zaki、赤池孝章。新規環状ヌクレオチド8-ニトログアノシン 3',5'-環状1リン酸による転写制御因子 Keap1 のS-グアニル化とその生理作用 第29回日本フリーラジカル学会学術集。2007年6月9-10日・名古屋市。

11. 藤井重元、澤智裕、岡本竜哉、HASAN ZAKI MUHAMMAD、赤池孝章。転写制御因子 Keap1 のS-グアニル化を介した新規環状ヌクレオチド8-ニトログアノシン 3',5'-環状1リン酸による細胞保護作用。第7回日本NO学会学術集会。2007年5月17-18日・大津市。

〔その他〕

ホームページ：<http://kumadai-bisei.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 重元 (FUJII SHIGEMOTO)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号：00325333

(2) 研究分担者

赤池 孝章 (AKAIKE TAKAAKI)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：20231798

(3) 連携研究者

なし