

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：19590312
 研究課題名（和文）新規ニトログアノシン環状一リン酸の生体内生成とその NO シグナルへの関与
 研究課題名（英文）Biological formation of 8-nitroguanosine 3'5'-cyclic monophosphate and its implication in NO signaling
 研究代表者
 澤 智裕（SAWA TOMOHIRO）
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授
 研究者番号：30284756

研究成果の概要：新規な環状ヌクレオチドである 8-ニトログアノシン 3',5'-サイクリック一リン酸（8-ニトロ cGMP）は蛋白質チオール基に対してユニークな翻訳後修飾である蛋白質 S-グアニル化（蛋白質チオール基に対する cGMP 付加）をもたらす。本研究では、8-ニトロ cGMP とチオール基の反応機構を解析した。また、蛋白質 S-グアニル化の新しい分析法として、S-グアニル化に対する特異抗体と質量分析を組み合わせた S-グアニル化プロテオミクスを開発した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：活性酸素、酸化ストレス、一酸化窒素、レドックス、シグナル伝達、適応応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 8-ニトログアノシン 3',5'-サイクリック一リン酸（8-ニトロ cGMP）は、一酸化窒素生成に依存して細胞内に生成する新規な環状ヌクレオチドであり、蛋白質のチオール基に対して付加反応を起こし、蛋白質 8-チオール cGMP 付加体を形成する（蛋白質 S-グアニル化）。

(2) 蛋白質 S-グアニル化の細胞内標的蛋白質として、酸化ストレスの適応応答の制御に関わるレドックスセンサーである Keap1 が同定された。これにより、8-ニトロ cGMP の生成と、それによる蛋白質 S-グアニル化が、酸

化ストレスの適応応答シグナルに密接に関わることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、8-ニトロ cGMP とチオール基との反応メカニズムを解析するとともに、その細胞シグナルへの影響を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 8-ニトログアノシン誘導体とチオールとの反応メカニズムの解析
 8-ニトログアノシン誘導体のチオール基に

対する反応速度定数を、分光学的手法を用いて解析した。

(2) 蛋白質 S-グアニル化抗体の作製
蛋白質 S-グアニル化部位をエピトープとして有する抗原を用いて、S-グアニル化に対する特異抗体を作製した。

(3) S-グアニル化プロテオミクスの開発
蛋白質 S-グアニル化について、質量分析に基づく解析手法の検討を行った。タンパク質モデルとして、組換え Keap1 を用いた。組換え Keap1 を 8-nitro-cGMP と反応させ、S-グアニル化 Keap1 を得た。それをトリプシン消化し、S-グアニル化システインを含むペプチド断片を作成した。抗 S-グアニル化抗体を結合した抗体カラムを作成し、それを用いて S-グアニル化ペプチドを選択的に精製・濃縮した後、質量分析に供した。質量分析は、MALDI-TOF-MS および LC-ESI-MS により行った。

4. 研究成果

(1) 8-ニトログアノシン誘導体とチオールとの反応メカニズムの解析

8-ニトロ cGMP とチオール基の反応メカニズムを解析した。まず、8-ニトロ cGMP と種々のアミノ酸の反応を解析したところ、8-ニトロ cGMP はシステインとのみ反応し、その他のアミノ酸とは見かけ上全く反応せず、チオール基に選択的であることが分かった。また、チオール化合物と 8-ニトログアノシン誘導体との反応速度を解析した結果、8-ニトロ cGMP > 8-ニトログアノシン > 8-ニトログアノシンの順であった。8-ニトロ cGMP とチオール化合物の反応速度は pH 依存적であり、チオール化合物の pKa 付近で最大の反応速度を示し、それよりも弱酸性領域では反応性が著しく減少した。したがって、8-ニトロ cGMP との反応には、チオール基が酸解離したチオレートアニオンが主たる反応種であることが示された。

(2) 蛋白質 S-グアニル化抗体の作製

蛋白質 8-チオール付加体を検出するために特異抗体の作製を試みた。8-チオール cGMP 付加体については、ウサギポリクローナルとマウスモノクローナル抗体を得た。また、8-チオールグアノシン付加体については、ウサギポリクローナル抗体を得た。蛋白質特異的な抗体として、S-グアニル化 Keap1 に対するモノクローナル抗体を作製した。

(3) S-グアニル化プロテオミクスの開発

S-グアニル化抗体を結合した抗体カラムを用いることにより、種々のペプチドが混在する試料から S-グアニル化ペプチドを選択的かつ効率よく濃縮することが可能となった。S-グアニル化ペプチドについて、タンデム質量分析を行った結果、S-グアニル化ペ

チドでは、cGMP 構造に特徴的で優先的な解裂・脱離が起こっており、これを指標に S-グアニル化ペプチドを容易に同定できることが分かった。本手法は、新しい翻訳後修飾である蛋白質 S-グアニル化の解析に有用であることが示された。

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 15 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 H. 8-Nitroguanosines as chemical probes of the protein S-guanylation. *Chem. Commun.* 5984-5986, 2008. (査読有)

5. Yoshitake J, Kato K, Yoshioka D, Sueishi Y, Sawa T, Akaike T, 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: 223-8, 2008. (査読有)

6. 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)

7. 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)

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, 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: 827-34, 2008. (査読有)

9. Ishima Y, Akaike T, Kragh-Hansen U, Hiroyama S, Sawa T, Suenaga A, Maruyama T, Kai T, 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)

10. 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)

11. 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)

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

13. Ishima Y, Sawa T, Kragh-Hansen U, Miyamoto Y, Matsushita S, Akaike T, and Otagiri M. S-Nitrosylation of human variant albumin Liprizzi (R410C) confers potent antibacterial and cytoprotective properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320: 969-77, 2007. (査読有)

14. Ishima Y, Akaike T, Kragh-Hansen U, Hiroyama S, Sawa T, Maruyama T, Kai T, Otagiri M. Effects 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. 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. 2007. (査読無)

{ 図書 } (計 1 件)

1. 澤智裕, 赤池孝章. 一酸化窒素 (NO) とシグナル伝達. *酸化ストレスの医学. 診断と治療社* (吉川敏一監修) pp. 138-146 (2008).

{ 学会発表 } (計 10 件)

1. 澤智裕, 藤井重元, 入江厚, 岡本竜哉, 居原秀, 本橋ほづみ, 山本雅之, 赤池孝章. S-Guanylation proteomics: NO と活性酸素に依存したユニークなチオール基翻訳後修飾. 第 81 回日本生化学会大会. 2008/12/09-12. 神戸市.

2. Sawa T, Fujii S, Irie A, Okamoto T, Kobayashi A, Yamamoto M, and Akaike T. NO dependent modification of Keap1 thiol by nitrated nucleotide, 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. 第 67 回日本癌学会総会. 2008/10/28-30. 名古屋市.

3. Sawa T, Fujii S, Irie A, Okamoto T, Motohashi H, Yamamoto M, and Akaike T. Nitric oxide-dependent sulfhydryl modification of Keap1 by 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. 5th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic applications of NO 2008. 2008/08/28-30. Bregenz, Austria.

4. 澤智裕, 赤池孝章. NO による酸化ストレス応答の分子制御機構. 第 61 回日本酸化ストレス学会. 2008/06/19-20. 京都市.

5. 澤智裕, 藤井重元, 入江厚, 岡本竜哉, 居原秀, 小林聡, 山本雅之, 赤池孝章. S-Guanylation proteomics: Keap1 修飾部位の解析. 第 8 回日本 NO 学会総会. 2008/05/09-10. 仙台市.

6. 澤智裕, 大島寛史, 赤池孝章. 感染・炎症におけるグアニンニトロ化と発がんへの関与. 第 8 回日本 NO 学会総会. 2008/05/09-10. 仙台市.

7. 澤智裕, 岡本竜哉, Zaki MH, 藤井重元, 山本雅之, 赤池孝章. NO に依存した 8-ニトログアノシン-3',5'-環状リン酸の生成を介した抗アポトーシスシグナル. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007/10/3-4. 横浜市.

8. 澤智裕, 藤井重元, 岡本竜哉, 有本博一, 赤池孝章. 新規環状ヌクレオチド 8-nitroguanosine-3',5'-cyclic monophosphate によるチオール基への付加体形成反応 (S-guanylation) の解析. 第 29 回日本フリーラジカル学会総会. 2007/06/09-10. 名古屋市.

9. 澤智裕, 藤井重元, 岡本竜哉, 有本博一, 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'-サイクリック環状リン酸の生成とそのチオール基への付加体形成

反応 (S-guanylation) の解析. 第 7 回日本
N0 学会総会. 2007/05/17-18. 大津市.

10. 澤智裕、赤池孝章. 炎症発がん和酸素
ストレス適応応答の分子制御機構. 第 31 回
日本鉄バイオサイエンス学会学術集会.
2007/4/10. 京都市.

〔その他〕

ホームページ : <http://kumadai-bisei.com>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

澤 智裕 (SAWA TOMOHIRO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号 : 30284756

(2)研究分担者

岡本 竜哉 (OKAMOTO TATSUYA)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号 : 30419634

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