

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590052

研究課題名（和文）細菌感染時にS-ニトロシル化される蛋白質の同定とその敗血症の病態形成への関与

研究課題名（英文）The identification and characterization of proteins that are S-nitrosylated during bacterial infection and sepsis

研究代表者

西屋 禎 (NISHIYA TADASHI)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80399831

研究成果の概要（和文）：

iNOS 結合蛋白質として SPSB ファミリー蛋白質を同定した。SPSB ファミリー蛋白質は、iNOS を Elongin B/C-Cul5 型 E3 ユビキチンリガーゼへ繋ぐアダプター分子として機能し、iNOS のユビキチン-プロテアソーム依存的分解を誘導することがわかった。SPSB ファミリー蛋白質は、iNOS の積極的分解を誘導することにより、iNOS の過剰な NO 産生を抑制し、その結果、細胞を NO 依存的細胞死から保護する役割を担っていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We have identified SPSB family of proteins as an iNOS-binding protein. SPSB family of proteins function as an adaptor protein that bridges between iNOS and the Elongin B/C-Cul5-type E3 ubiquitin ligase, and induce the ubiquitin/proteasome-dependent degradation of iNOS. SPSB family of proteins play an essential role in protection against the cytotoxic effect of iNOS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,008,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：iNOS、SPSB、ユビキチン化、蛋白質分解、敗血症

## 1. 研究開始当初の背景

細菌感染による全身性の炎症反応症候群である敗血症には有効な治療法がなく、抗生剤が効かなくなったら打つ手がほとんど無い。従って、敗血症の病態形成に関わる分子機構を標的とした新規治療法の確立が急務になっている。敗血症の分子機構は極めて複雑であり、その全体像は未だはっきりしない。

敗血症の発症過程において iNOS が発現し、iNOS の産生する NO が 1) 過剰な殺菌作用に基づく自己組織の破壊、2) グアニル酸シクラーゼのヘム基のニトロシル化に由来する全身の血管平滑筋弛緩による重度の血圧低下作用、を引き起こすことが敗血症の発症の一因となっていることが示唆されている。しかしながら、NO は非常に反応性に富むラ

ジカルガスで、多様な作用点を有することから、敗血症の病態形成に対する NO の役割はまだ不明な点が多いと言わざるを得ない。特に、最近見出された NO による蛋白質のシステイン残基の S-ニトロシル化が如何に敗血症の病態形成に関与するのかは全く明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

申請者は、(1)細菌感染時に特異的に発現する誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が様々な蛋白質を S-ニトロシル化すること、(2)S-ニトロシル化は、リン酸化やユビキチン化と同様に、特定のアミノ酸を標的とした普遍的な蛋白質修飾反応であり、多くの蛋白質及び生理活性ペプチドの活性をダイナミックに制御すること、(3)神経変性疾患などの発症に特定の蛋白質の S-ニトロシル化に関与すること、に着目し、iNOS による S-ニトロシル化が敗血症の病態形成並びに感染病態時の生体反応調節に深く関与するのではないかと考えた。S-ニトロシル化反応は免疫研究者にとって馴染みが薄く、これまでに細菌感染を含む多様な免疫反応の解析において積極的に検討されていない。そこで、本研究では、iNOS により S-ニトロシル化される蛋白質を網羅的に単離・同定し、その敗血症の病態形成における役割を分子レベルで解明する。

## 3. 研究の方法

神経型 NOS (nNOS) 及び内皮型 NOS (eNOS) と同一性が著しく低い iNOS の N 末端側 1-124 アミノ酸部分を bait に用いて、ヒト肝臓、脾臓、心臓、胎児脳、及び成人脳 cDNA ライブラリーを酵母ツーハイブリッド法によりスクリーニングした。これにより iNOS 結合蛋白質として単離した SPRY domain- and SOCS box-containing protein 2 (SPSB2) 及びそのファミリー蛋白質 (SPSB1, SPSB3, 及び SPSB4) と iNOS の結合は、GST pull-down assay と共免疫沈降法を用いて解析した。iNOS と SPSB ファミリー蛋白質の共局在は、YFP および CFP 融合蛋白質として iNOS 及び SPSB ファミリー蛋白質を細胞に発現させて、その細胞を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。iNOS 蛋白質の分解速度は cycloheximide chase assay を用いて解析した。iNOS による NO 産生量は Griess 反応により定量した。iNOS 由来 NO による細胞毒性は、細胞を 7-aminoactinomycin D で染色した後、フローサイトメーターを用いて解析した。マウス iNOS の 1-118 を可逆的に発現する RAW264.7 マクロファージは、Tet-OFF system を用いて作製した。ユビキチン化体 iNOS は、抗 iNOS 抗体を用いた免疫沈

降法により精製した iNOS を、抗ユビキチン抗体を用いたイムノブロットに用いて検出した。

## 4. 研究成果

本研究において、iNOS 結合蛋白質として同定した SBSB ファミリー蛋白質は、iNOS を Elongin B/C-Cullin-5-SOCS Box protein (ECS)型 E3 ユビキチンリガーゼへと繋ぐアダプター分子として機能し、iNOS のユビキチン・プロテアソーム依存的分解を誘導することを明らかにした。さらに、SPSB を介する iNOS 分解系が iNOS の過剰な NO 産生を抑制し、NO 依存的細胞死から細胞を保護する役割を担っていることを明らかにした。以下に、SPSB 蛋白質が iNOS 蛋白質寿命の制御分子であることを実証する具体的な研究成果を示す。

- (1) 酵母ツーハイブリッド法を用いて、ヒト成人の cDNA ライブラリーから iNOS 結合蛋白質として SPSB2 を単離した。
- (2) iNOS と SPSB2 との結合を GST pull-down assay、共免疫沈降法、及び蛍光顕微鏡観察により確認した。
- (3) A549 ヒト II 型肺胞上皮様細胞を用いて、内在性の SPSB2 とサイトカイン誘導性の iNOS との結合を共免疫沈降法により確認した。
- (4) SPSB1 と SPSB4 も iNOS に結合することを共免疫沈降法と蛍光顕微鏡観察により確認した。
- (5) SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 と iNOS の結合には、iNOS の N 末端側 23-27 番目に存在する DINNN という配列が重要であり、iNOS の Asn-27 を Ala に置換した iNOS 変異体はこれらの SPSB 蛋白質に結合しないことを明らかにした。
- (6) SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 と iNOS の結合には、SPSB の N 末端から SPRY ドメインまでの領域が必要であり、SOCS box は関与しないことを明らかにした。
- (7) SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 は、神経型 NOS (nNOS) や内皮型 NOS (eNOS) には結合しないことを明らかにした。
- (8) SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 は、iNOS の細胞局在を、細胞質に点状に凝集した局在から、細胞質全体に一樣に拡散した局在へと大きく変化させることを明らかにし

た。

- (9) SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 の存在下で、iNOS 蛋白質の著しい分解が起こることを明らかにした。
- (10) SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 の存在下で、nNOS 及び eNOS 蛋白質レベルは変化しないことを明らかにした。
- (11) iNOS のユビキチン化は、SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 の存在下で大きく亢進することを明らかにした。
- (12) SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 存在下で、iNOS は Elongin C 及び Cullin-5 と相互作用することを共免疫沈降法により明らかにした。
- (13) iNOS のアミノ酸 1-118 の過剰発現は、SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 と iNOS の結合を阻害し、iNOS 分解を抑制することを明らかにした。
- (14) マクロファージに iNOS のアミノ酸 1-118 を過剰発現させた場合、LPS により誘導された iNOS の寿命が大きく延長し、それにより過剰な NO 産生がおき、NO 依存的なマクロファージの細胞死が起こることを明らかにした。
- (15) マクロファージにおいて、SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 に結合しない iNOS (N27A) 変異体の寿命は、野生型 iNOS と比較して、著しく長いことを明らかにした。
- (16) SPSB2 の Cys-53、Cys-210、及び Cys-234 が S-ニトロシル化されることを明らかにした。

これらの結果より、SPSB ファミリー蛋白質は iNOS 寿命の制御分子であることが明らかになった。さらに、SPSB 蛋白質が S-ニトロシル化されることもわかった。今後、SPSB 蛋白質の生理機能における S-ニトロシル化の役割について検討する予定である。

#### 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 3 件)

1. Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S, The ECS (SPSB) E3 ubiquitin ligase is the master

regulator of the lifetime of inducible nitric-oxide synthase、Biochem Biophys Res Commun、印刷中、査読有

2. Uehara T, Nishiya T、Screening systems for the identification of S-nitrosylated proteins、Nitric Oxide、印刷中、査読有
3. Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S, Regulation of inducible nitric oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins、J Biol Chem、286、pp. 9009-9019、2011 年、査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 西屋 禎、iNOS regulation by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins (SPSBs) in macrophages、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 23 日、横浜
2. 西屋 禎、Elongin B/C、Cul5、Rbx2、及び SPRY domain-containing SOCS box protein (SSB) により構成される E3 ユビキチンリガーゼ複合体 (ECS-SSB) は誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の分解制御システムである、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 9 日、神戸
3. 西屋 禎、The SPRY domain-containing SOCS box protein family regulates the lifetime of iNOS by linking iNOS with Elongin BC-Cul5-Rbx2 E3 ubiquitin ligase complex、The 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (ICI2010)、2010 年 8 月 23 日、神戸
4. 西屋 禎、The lifetime of iNOS is regulated by the SPRY domain-containing SOCS box protein family linking iNOS to the Elongin BC-Cul5-Rbx2 E3 ubiquitin ligase complex、The 6<sup>th</sup> International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (NO2010)、2010 年 6 月 17 日、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://saibo-yakuri.med.hokudai.ac.jp/seika/seika20110103.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西屋 禎 (NISHIYA TADASHI)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80399831

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし