

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590082

研究課題名（和文）O-GlcNAc 修飾を介した酸化ストレス応答因子の解析

研究課題名（英文）Analysis of responsive factors for oxidative stress mediated by O-GlcNAc modification

研究代表者 三浦 ゆり (MIURA YURI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・  
東京都健康長寿医療センター研究所・主任研究員

研究者番号：00216574

研究成果の概要（和文）：

活性酸素による情報伝達システムにおける N-アセチルグルコサミン修飾 (O-GlcNAc 化) タンパク質の機能的な重要性と O-GlcNAc 化による制御機構について明らかにするため、酸化ストレスによる O-GlcNAc 化タンパク質の変動、及び O-GlcNAc 化によるストレス応答タンパク質の誘導制御について検討した。酸化ストレス応答において O-GlcNAc 化が重要な役割を果たしていること、特にストレス応答タンパク質の発現・誘導において O-GlcNAc 化を介した制御機構が存在する可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify the regulation mechanisms by O-GlcNAcylation in the signaling pathways caused by reactive oxygen species, the alteration of O-GlcNAcylated proteins due to oxidative stress and the effects of O-GlcNAcylation on the induction of stress responsive proteins were examined. The results suggest that O-GlcNAcylated proteins play a critical role of oxidative stress-responses, and that the induction of stress responsive protein is possible to be regulated by O-GlcNAcylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 生化学

科研費の分科・細目： 薬学・生物系薬学

キーワード： シグナル伝達、酸化ストレス、アポトーシス、ストレス応答タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素やフリーラジカルは生命維持に不可欠な生体成分や代謝系に障害を与えることにより、広範な疾患に関与していることが知られている。その一方で、生体のレドックス状態を変化させることで酵素活性や遺伝子発現を制御する生理活性因子として重要であることも判明してきた。このような活性酸素シグナルの情報を細胞内に伝えるしくみは、リン酸化のような動的なタンパク質翻訳後修飾や、酸化還元反応に基づいたレドックス制御を介して行われる。しかし近年、リン酸化と同様に動的な翻訳後修飾である *O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン修飾 (*O*-GlcNAc 化) タンパク質が細胞質や核内で数多く発見され、*O*-GlcNAc 化がリン酸化修飾を制御している可能性が示唆されてきた (*Nature*, 446, 1017-22, (2007))。そこで申請者は、活性酸素やフリーラジカルによる情報伝達システムにおいても *O*-GlcNAc 化による活性制御が関与しているのではないかと考えた。

*O*-GlcNAc 化修飾はタンパク質のセリン・スレオニン残基の水酸基に  $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミンが *O*-グリコシド結合により付加したものである。*O*-GlcNAc の半減期はコアタンパク質に比べて極端に短いことが明らかになっており、リン酸化と同様、タンパク質の動的な翻訳後修飾として、細胞のダイナミクスに関わる様々な機能制御に関与していることが知られている。

*O*-GlcNAc 化はリン酸化部位やその近傍に起こるため、リン酸化との競合的な反応ばかりが目立ってきたが、本研究でレドックスによる *O*-GlcNAc 化の制御についての知見を得ることにより、リン酸化、*O*-GlcNAc 化、レドックス制御の三者のクロストークを提示することになり、タンパク質の機能制御に関

する新たなパラダイムシフトを起こすものと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、活性酸素による情報伝達システムにおける *O*-GlcNAc 化修飾タンパク質の機能的な重要性と *O*-GlcNAc 化による制御機構について明らかにすることを目的とする。このため、酸化ストレスによる *O*-GlcNAc 化タンパク質の変動とその機能変化、さらに *O*-GlcNAc 化による酸化ストレス応答の制御機構について検討する。これらの研究を通して、リン酸化、*O*-GlcNAc 化、レドックス制御のクロストークを介した活性酸素による新たな細胞内情報伝達の精緻な制御システムの解明を目指す。

具体的には、酸化ストレス負荷により *O*-GlcNAc 化タンパク質の変動を調べ、活性酸素シグナルによって引き起こされる細胞応答における *O*-GlcNAc 化修飾の関与について明らかにする。また、*O*-GlcNAc 化修飾の変化が酸化ストレス応答に与える影響について検討し、シグナル伝達における *O*-GlcNAc 化修飾の機能的な重要性について明らかにする。

申請者はこれまで、酸化ストレスによる生体応答について研究を行い、酸化ストレスが適応応答やレドックス制御などの生物活性制御に関与することを明らかにしてきている。これらの知見を踏まえ、本研究では酸化ストレス応答に関与するタンパク質の *O*-GlcNAc 化とその制御機構について検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 種々の酸化ストレスによる細胞内 *O*-GlcNAc 化タンパク質の変化

種々の活性酸素種を発生させる「活性酸

素発生剤」などを用いて培養細胞に酸化ストレスを負荷し、トリパンブルー排除能、あるいは種々のアポトーシス指標を用いて細胞毒性を調べる。また、酸化ストレスを負荷したときの、細胞内 *O*-GlcNAc 化タンパク質の変動について、*O*-GlcNAc 化特異抗体を用いたウェスタンブロットにより検討する。

## (2) 酸化ストレス誘導アポトーシスにおける *O*-GlcNAc 化タンパク質の役割

*N*-アセチルグルコサミニダーゼ阻害剤 (PUGNAc: *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino *N*-phenyl carbamate) を添加して細胞内の *O*-GlcNAc レベルを増加させ、酸化ストレスによって引き起こされるアポトーシスにどのような影響を及ぼすか検討する。また、その分子機構を明らかにするため、熱ショックタンパク質 (HSP: heat shock protein) などのストレス応答タンパク質に着目し、これらの *O*-GlcNAc 化修飾の有無、及び *O*-GlcNAc 化を介した機能制御が存在するかどうかについて明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 種々の酸化ストレスによる細胞内 *O*-GlcNAc 化タンパク質の変化

①培養細胞に種々の酸化ストレスを負荷し、細胞毒性を比較した。酸化ストレスは、活性酸素発生剤として AAPH (2, 2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride)、MEN (2-methyl-1, 4-naphthoquinone)、MV (methyl viologen)、*t*-BuOOH (*tert*-butyl hydroperoxide) を添加することによ

り負荷し、24 時間後の細胞生存率を calcein/EthD1 及びトリパンブルーを用いて調べた。その結果、脂溶性の高い MEN が最も毒性が高く、*t*BuOOH、MV、AAPH の順に毒性が低くなっていたことから、活性酸素発生剤の細胞毒性は、生成する活性種よりも脂溶性の高さ、即ち細胞内への分布に依存していることが示唆された。そこで毒性の高かった MEN と *t*BuOOH を用い、酸化ストレスを負荷したときの *O*-GlcNAc 化タンパク質の変動を、特異的抗体を用いたウェスタンブロットティングにより調べた。その結果、酸化ストレス負荷により細胞内の *O*-GlcNAc 化タンパク質が変動することが明らかになった。

②次に、酸化ストレスとして亜ヒ酸ナトリウムを用いた。亜ヒ酸ナトリウムは、細胞内でグルタチオンなどの抗酸化物質を低下させることが知られている。

培養細胞に亜ヒ酸ナトリウムを添加することによりクロマチン凝縮や Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) の切断が生じ、アポトーシスが誘導されることが明らかになった。またこのときの細胞内の *O*-GlcNAc 化タンパク質を調べたところ、亜ヒ酸ナトリウムの添加により *O*-GlcNAc 化タンパク質は増加することが明らかになった。

これらの結果から、酸化ストレス負荷により引き起こされる様々な細胞内の変化において、*O*-GlcNAc 化タンパク質が関与している可能性が示唆された。

### (2) 酸化ストレス誘導アポトーシスにおける

## O-GlcNAc 化タンパク質の役割

①細胞内の O-GlcNAc 化レベルを変化させて、酸化ストレス誘導アポトーシスに及ぼす影響を検討した。N-アセチルグルコサミニダーゼ阻害剤 (PUGNAc) を添加して細胞内の O-GlcNAc レベルを増加させたところ、亜ヒ酸ナトリウム投与によるアポトーシスが促進することが明らかになった。すなわち、酸化ストレスによって引き起こされるアポトーシスにおいて、O-GlcNAc 化タンパク質の増加が何らかの促進効果を示すことが示唆された。

②そこで、アポトーシスにおける O-GlcNAc 化の役割について検討するため、ストレス応答タンパク質である heat shock protein 60 (HSP60) に着目し、その発現変動を調べた。その結果、亜ヒ酸ナトリウム投与により HSP60 の発現が増加することが明らかになった。また、抗 HSP60 抗体を用いた免疫沈降と O-GlcNAc 特異的抗体によるイムノブロットにより、HSP60 は O-GlcNAc 化修飾を受けていることが明らかになった。

③O-GlcNAc 化タンパク質の増加によるアポトーシス促進作用に、O-GlcNAc 化 HSP60 が関与しているかどうかを調べるため、アポトーシス促進因子である Bax と HSP60 との相互作用について検討した。O-GlcNAc 化 HSP60 の増加により Bax と HSP60 との相互作用が低下し、Bax がミトコンドリアへ移行することによってアポトーシスが促進される (*FEBS Lett.* 580, 2311-2316,

(2006)) ののではないかと予想した。しかし、本実験条件においては、亜ヒ酸ナトリウム添加によって O-GlcNAc 化 HSP60 は増加するものの、このとき HSP60 と Bax との相互作用の低下は認められず、本経路以外の分子機構により制御される可能性が高いことが示唆された。

④そこで、さらに酸化ストレス応答における O-GlcNAc 化の役割について検討するため、ストレス応答タンパク質である heat shock protein 70 (HSP70) に着目し、その発現変動を調べた。その結果、亜ヒ酸ナトリウム投与により HSP70 の発現が増加したが、PUGNAc の添加により細胞内の O-GlcNAc レベルを増加させると、その誘導が抑制されることが明らかになった。HSP70 は分子シャペロンとして細胞保護効果を持つだけでなく、アポトーシス阻害効果もあることが報告されている。このため、この結果は O-GlcNAc 化レベルの増加がストレス応答タンパク質である HSP70 の発現抑制を介して、酸化ストレス誘導アポトーシスの促進に関与する可能性を強く示唆している。今後、さらに詳細な検討を行うことで、O-GlcNAc 化を介した酸化ストレス応答及びアポトーシスの制御システム解明につながるものと期待される。

以上の結果より、酸化ストレス応答において O-GlcNAc 化タンパク質が重要な役割を果たしていることが示唆され、特にストレス応答タンパク質の発現・誘導において O-GlcNAc 化を介した発現制御機構が存在する可能性を示唆した意義は大きいと考えられる。

## 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4件)

- (1) Miura, Y., Sato, Y., Arai, Y., Abe, Y., Takayama, M., Toda, T., Hirose, N., and Endo, T.: Proteomic Analysis of Plasma Proteins in Japanese Semisuper Centenarians. *Exp. Gerontol.* 46, 81-85, (2011)
- (2) Miura, Y., Sakurai, Y., Hayakawa, M., Shimada, Y., Zempel, H., Sato, Y., Hisanaga, S., and Endo, T.: Translocation of lysosomal cathepsin D caused by oxidative stress or proteasome inhibition in primary cultured neurons and astrocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 22-28, (2010)
- (3) Miura, Y., Endo, T.: Survival responses to oxidative stress and aging. *Geriatr. Gerontol. Int.*, 10, S1-S10, (2010)
- (4) Miura, Y.: Proteomic approach for biomarker discovery in radioadaptive responses - Age-dependent variations of cell response to low-dose radiation- *Biological Sciences in Space*, 23, 17-22, (2009)

[学会発表] (計6件)

- (1) Takatoshi Satoh, Yuri Miura, Yoko Sakurai, Tamao Endo, Wakako Hiraoka: Effects of O-linked N-acetyl glucosamine (O-GlcNAc) modification on oxidative stress-response, 第49回生物物理学会, 姫路, 2011.9.16-18
- (2) Satoh, T., Miura, Y., Sakurai, Y., Endo, T., Hiraoka, W.: Effects of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modifi-

-cation on oxidative stress-induced apoptosis, 第48回生物物理学会, 仙台, 2010.9.20-23

- (3) 佐藤貴俊, 三浦ゆり, 櫻井洋子, 平岡和佳子, 遠藤玉夫: 酸化ストレス応答に及ぼすO結合型N-アセチルグルコサミン修飾の影響. 第63回日本酸化ストレス学会, 横浜, 2010.6.24-25
- (4) 三浦ゆり, 眞後俊幸, 櫻井洋子, 久永眞市, 遠藤玉夫: O結合型N-アセチルグルコサミン修飾 (O-GlcNAc化) によるアポトーシスの制御, 第62回日本酸化ストレス学会, 福岡, 2009.6.11-12
- (5) 三浦ゆり, 櫻井洋子, 遠藤玉夫: O結合型N-アセチルグルコサミン修飾 (O-GlcNAc化) によるDNA損傷応答シグナルの制御, 日本薬学会第129年会, 京都, 2009.3.26-28
- (6) 三浦ゆり, 櫻井洋子, 遠藤玉夫: ATMタンパク質のO-GlcNAc化修飾, 日本放射線影響学会第51回大会, 北九州, 2008.11.19-21

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三浦 ゆり (MIURA YURI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・主任研究員

研究者番号: 00216574