

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860231

研究課題名(和文)メタボリックシンドローム病態形成におけるS-ニトロソ化の役割

研究課題名(英文)The role of S-nitrosylation for pathological mechanisms of metabolic syndrome.

## 研究代表者

篠崎 昇平 (SHINOZAKI, SHOHEI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：40622626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、SIRT1のS-ニトロソ化が老化に伴って起こる様々な生体の変化や病気の鍵となる共通のしくみであることを初めて明らかにしました。全身性炎症反応、パーキンソン病、サルコペニアのモデル動物と培養細胞を用い、炎症時における長寿遺伝子産物SIRT1のS-ニトロソ化と炎症の関連について調べました。その結果、急性炎症および慢性炎症によってSIRT1の働きが弱くなり、炎症や細胞死を起こしやすくなることを見出しました。さらに、炎症によって増加したSIRT1のS-ニトロソ化を、薬剤あるいは遺伝子操作によって減らすと、SIRT1の働きが戻り、炎症反応が部分的に抑えられることを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：In aging-related diseases, chronic inflammation is associated with the increased production of nitric oxide. Nitric oxide causes a posttranslational modification of proteins known as S-nitrosylation. SIRT1 is a protein deacetylase that inhibits the transcription factors p53 and NF- $\kappa$ B, which are involved in mediating cell death by apoptosis and promoting inflammatory responses. S-nitrosylation inhibits SIRT1 activity. We found that in cultured mammalian cells, S-nitrosylation of SIRT1 prevented it from deacetylating and inhibiting p53 and NF- $\kappa$ B. In mouse models of systemic inflammation, neurodegeneration or muscle aging, S-nitrosylation of SIRT1 and the associated activation of p53 and NF- $\kappa$ B required the activity of nitric oxide synthases. Thus, S-nitrosylation of SIRT1 may be a critical factor in promoting apoptotic and inflammatory responses in aging-related diseases.

研究分野：糖尿病 動脈硬化

キーワード：S-ニトロソ化 慢性炎症 加齢関連疾患 SIRT1 メタボリックシンドローム 一酸化窒素

## 1. 研究開始当初の背景

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 (S-nitrosylation) 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った。S-ニトロソ化が NO の生理的活性のメカニズムであることが提唱され、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 (Hess, D.T. et. al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005)。タンパク質の S-ニトロソ化を検出する方法として、Jaffrey らによってビオチンスイッチ法が有効であることが報告された (Jaffrey SR, et. al. Nat Cell Biol. 2001) が、この方法は完全に確立されていなかったために十分な感度が得られず、in vivo の S-ニトロソ化を検出することが困難であった。また、ニトロソ化タンパク質の二次元電気泳動法による網羅的検出法の報告 (Chouchani E. T, et. al. Biochem J. 2010) もあるが、その検出感度は低く、in vivo の S-ニトロソ化を高感度で検出するまでには至っていない。

申請者は、S-NO (ニトロソ基) の保護方法、ビオチン化の方法を改善することにより、in vivo の S-ニトロソ化を高感度で検出することを可能とした (Shinozaki S, et. al JBC. 2011)。この手法を用いることにより、タンパク質の S-ニトロソ化が肝臓におけるインスリン抵抗性を引き起こす原因の 1 つである事を明らかにした。本研究は、このような検出方法をさらに発展させ、標識した S-ニトロソ化タンパク質を高感度で網羅的に検出することを可能とするものである。これまでに肥満糖尿病マウスを用いて脂肪組織における S-ニトロソ化タンパク質の網羅的検出に成功しており、今後は脂肪組織の老化、糖尿病および腎障害の発生における S-ニトロソ化タンパク質の同定および、メタボリックシンドローム病態形成における S-ニトロソ化の役割を明らかにし、新たな治療法および治療薬の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

(1) 肥満糖尿病モデルである ob/ob マウスにおける S-ニトロソ化タンパク質の網羅的検索を行い、新規 S-ニトロソ化タンパク質を同定する。

(2) iNOS 欠損による S-ニトロソ化の産生抑制が、ob/ob マウスの各種病態の発生の抑制に関与するか検討するために、iNOS 欠損マウスと肥満糖尿病モデルであるレプチン欠損 (ob/ob) マウスを掛け合わせ、iNOS 欠損 ob/ob マウスを作出する。

(3) S-ニトロソグルタチオンレダクターゼ (GSNOR) を強制発現するマウスを作出し、GSNOR による S-ニトロソ化タンパク質の蓄積抑制と炎症による病態の発生との関連を検討する。

(4) iNOS 阻害薬や NO ドナーを培養細胞もしくは各種疾患モデル動物に作用させ、新たに同定した S-ニトロソ化タンパク質の病態における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) ob/ob マウスにおける S-ニトロソ化タンパク質の同定

肥満糖尿病モデルであるレプチン欠損 (ob/ob) マウスの内臓脂肪および肝臓を用い、申請者の開発した網羅的検出法にて新規 S-ニトロソ化タンパク質の検索を行った。この方法より得られた複数のスポットを回収し、S-ニトロソ化タンパク質の候補を抽出した。飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) 解析を用いて、新規 S-ニトロソ化タンパク質の同定を行い、in vitro において確認実験を行った。

(2) iNOS 欠損;ob/ob マウスの作出

炎症等で発現が誘導される iNOS が産生する NO によって S-ニトロソ化タンパク質が増えることが知られている (Gow, AJ. et. al. J Biol Chem. 2002)。S-ニトロソ化タンパク質が脂肪組織のインスリン抵抗性や糖尿病性腎症の発症に関与しているかを調べるために、iNOS 欠損マウスと肥満糖尿病モデルであるレプチン欠損 (ob/ob) マウスを交配し、iNOS 欠損;ob/ob マウスを作出した。交配に用いる iNOS 欠損マウスおよび ob/ob マウスは Jackson 研究所より購入した。

(3) 脂肪組織特異的 GSNOR トランスジェニックマウスの作出

S-ニトロソ化タンパク質を還元する酵素として考えられている S-ニトロソグルタチオンレダクターゼ (GSNOR) を脂肪組織特異的に過剰発現させるマウスを作出するために、マウスアディポネクチンプロモーター配列を含むプラスミドベクターを作成した。完成したベクターを元にトランスジェニックマウスを作出する過程は、本学実験動物センターが行った。

(4) SIRT1 の S-ニトロソ化と慢性炎症のメカニズムの解析

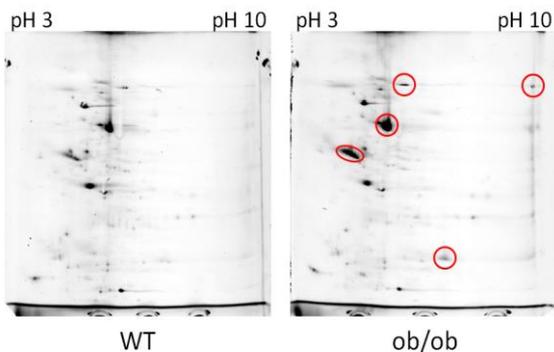
S-ニトロソ化タンパク質の病態における役割を明らかにするために、長寿関連遺伝子産物である SIRT1 に注目して実験を行った。全身性炎症反応、パーキンソン病、サルコペニアのモデル動物と培養細胞を用い、炎症時における長寿遺伝子産物 SIRT1 の S-ニトロソ化と炎症、細胞死の関連について調べた。全身性炎症のモデルとして LPS を腹腔内に投与したマウス、パーキンソン病のモデルとして MPTP 投与マウス、サルコペニアのモデルとして若齢および高齢のラットを用いて実験を行った。それぞれのモデルに対して、iNOS の発現量、S-ニトロソ化 SIRT1 の定量、Ac-p53 および Ac-p65 の定量と DNA 結合能、p53 および p65 によって発現量が制御されている遺伝

子について解析をおこなった。それぞれのモデルに対応する培養細胞を用いて、同様の解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ob/ob マウスにおける S-ニトロソ化タンパク質の同定

今回の解析により、新規 S-ニトロソ化タンパク質を複数個同定することができた。同定されたタンパク質の中には、脂肪組織の老化、糖尿病の発症に関係しうるタンパク質が含まれていた(図1)。現在、これらタンパク質の S-ニトロソ化部位の同定と、疾患における役割について解析している。



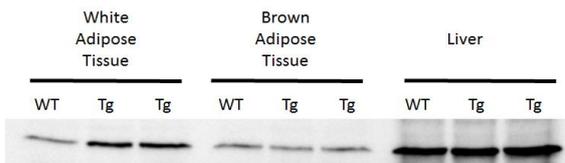
(図1 S-ニトロソ化タンパク質の2次元電気泳動。赤丸で囲まれた部分が肥満で増えた S-ニトロソ化タンパク質。)

(2) iNOS 欠損;ob/ob マウスの作出

iNOS 欠損マウスとレプチン欠損 (ob/ob) マウスを交配し、iNOS 欠損;ob/ob マウスを作出した。iNOS 欠損;ob/ob マウスは平均出産数が少ないため、ジェノタイプングによる確認のみ終了している。本格的な解析は、交配のための個体数を増やして、必要な個体数を得てから行う予定である。

(3) 脂肪組織特異的 GSNOR トランスジェニックマウスの作出

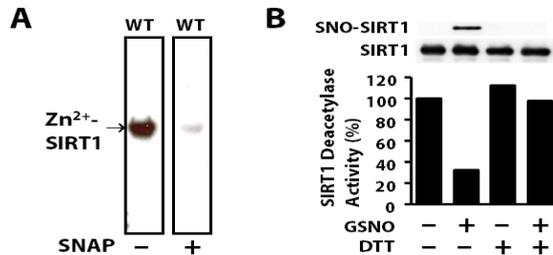
精製した DNA を 200 卵にインジェクションし、最終的に 9 個体を得ることができた。ウエスタンブロットによる発現量解析の結果、特に発現の多い 2 系統を得ることができた(図2)。



(図2 白色脂肪組織特異的な GSNOR 強制発現マウスのウエスタンブロット解析。白色脂肪においてのみ GSNOR の発現誘導が確認できる。褐色脂肪組織や肝臓での発現量の増加は見られない。WT は野生型、Tg はトランスジェニック。)

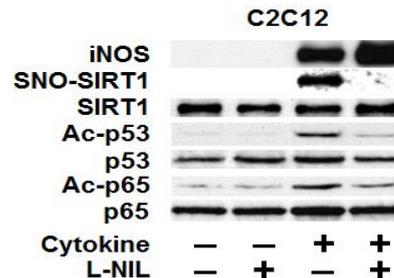
(4) SIRT1 の S-ニトロソ化と慢性炎症のメカニズムの解析

NO ドナーあるいは炎症による iNOS の誘導の結果、SIRT1 の Zn フィンガー内に存在する CXXC モチーフでの S-ニトロソ化を誘導し、それによって亜鉛結合能が妨げられて SIRT1 の活性が阻害されることを明らかとした(図3)。



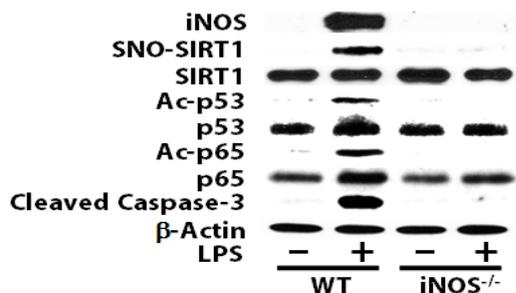
(図3 SIRT1 の S-ニトロソ化と脱アセチル化活性。A: SIRT1 の亜鉛結合能は NO ドナーによって失われる。B: SIRT1 の脱アセチル化活性は NO ドナーによって阻害され、還元剤によってもとのレベルまで回復した。)

S-ニトロソ化により SIRT1 の活性が阻害されると、p53 と p65 のアセチル化が増えて活性化が促進する(図4)。



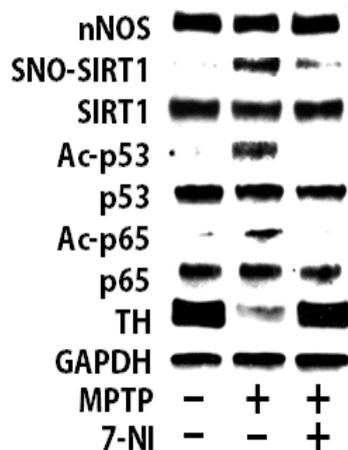
(図4 マウス筋芽細胞 C2C12 における SIRT1 の S-ニトロソ化と p53 および p65 のアセチル化。サイトカイン刺激によって誘導された iNOS によって産生された NO が SIRT1 の S-ニトロソ化を増やす結果、p53 および p65 のアセチル化が増える。iNOS 阻害剤の L-NIL によって S-ニトロソ化が阻害されると、p53 と p65 のアセチル化はもとのレベルまで回復した。)

培養細胞と同様に、各種疾患モデル動物でも同様の検討を行った結果、in vivo においても同じ現象が観察された。LPS 刺激により急性炎症を惹起させたマウス肝臓では、iNOS の誘導が起こり、NO が産生される。その結果、SIRT1 のニトロソ化が起こり、p53 と p65 のアセチル化が増える。しかしながら、この反応は iNOS 欠損マウスでは観察されなかった(図5)。



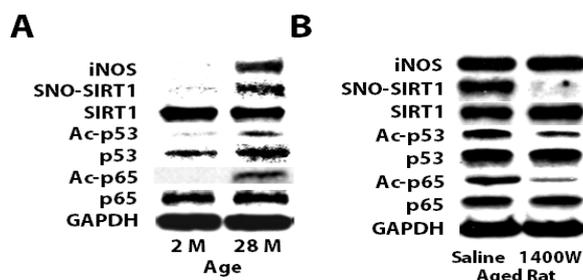
(図5 LPS 刺激によるマウス肝臓における SIRT1 の S-ニトロソ化と p53 および p65 のアセチル化。野生型(WT)では LPS 刺激によって iNOS が誘導され SIRT1 の S-ニトロソ化が起こるが、iNOS 欠損(iNOS<sup>-/-</sup>)マウスでは iNOS が誘導されないため SIRT1 の S-ニトロソ化は起こらない。同様に p53 および p65 のアセチル化は WT の LPS 刺激で増えたが、iNOS<sup>-/-</sup>では増えなかった。)

次にパーキンソン病モデルとして、ドパミン神経を特異的に脱落させる薬剤である MPTP を投与して検討を行った。脳における S-ニトロソ化は iNOS ではなく nNOS が重要な働きを担っており、特異的 nNOS 阻害剤である 7-NI によって、MPTP による SIRT1 の S-ニトロソ化は阻害された (図6)。



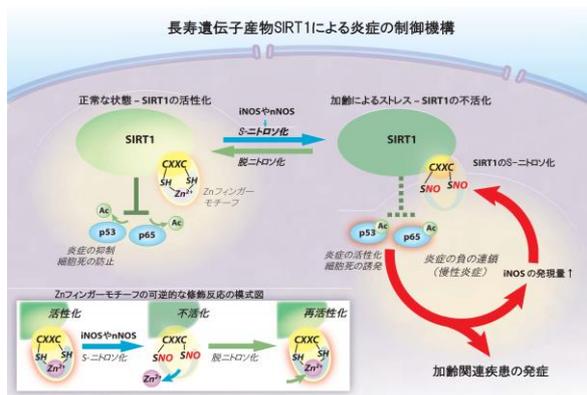
(図6 パーキンソン病モデル動物における SIRT1 の S-ニトロソ化。MPTP によって増加した SIRT1 の S-ニトロソ化は nNOS 阻害剤の 7-NI によって阻害され、元のレベルまで回復した。同様に p53 および p65 のアセチル化は MPTP 刺激で増えたが、7-NI で元のレベルまで回復した。)

さらに、加齢によっても iNOS が誘導され、SIRT1 の S-ニトロソ化が増えるが、薬剤によって S-ニトロソ化を減らすと、SIRT1 のはたらきが戻り、炎症反応が部分的に抑えられることを、若齢および老齢ラットの骨格筋において明らかにした (図7)。



(図7 若齢および老齢ラット骨格筋における SIRT1 の S-ニトロソ化。A: 加齢によって iNOS が誘導されると SIRT1 の S-ニトロソ化が増え、p53 および p65 のアセチル化が増える。B: iNOS 阻害剤の 1400W を投与すると、NO の産生が抑えられる結果、SIRT1 の S-ニトロソ化が減った。SIRT1 の S-ニトロソ化が減ることによって、p53 および p65 のアセチル化が減少した。)

SIRT1 の S-ニトロソ化が加齢関連疾患の共通のしくみであることを初めて明らかにした。(図7)。



(図7 SIRT1 の S-ニトロソ化を介した炎症の制御機構)

### 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) Shinozaki S, Chang K, Sakai M, Shimizu N, Yamada M, Tanaka T, Nakazawa H, Ichinose F, Yamada Y, Ishigami A, Ito H, Ouchi Y, Starr ME, Saito H, Shimokado K, Stamler JS, Kaneki M. Inflammatory stimuli induce S-nitrosylation of the deacetylase SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65. *Sci Signal*. 2014 Nov. 11;7(351):ra106. doi: 10.1126/scisignal.2005375. (査読有り)

(2) Shinozaki S, Chiba T, Kokame K, Miyata T, Kaneko E, Shimokado K. A deficiency of Herp, an endoplasmic reticulum stress protein,

suppresses atherosclerosis in ApoE knockout mice by attenuating inflammatory responses. *PLoS One*. 2013 Oct 28;8(10):e75249. (査読有り)

(3) Sips PY, Irie T, Zou L, Shinozaki S, Sakai M, Shimizu N, Nguyen R, Stamler JS, Chao W, Kaneki M, Ichinose F. Reduction of cardiomyocyte S-nitrosylation by S-nitrosoglutathione reductase protects against sepsis-induced myocardial depression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Apr;304(8):H1134-46. (査読有り)

(4) Kaneki M, Fukushima Y, Shinozaki S, Fukaya M, Habiro M, Shimizu N, Chang K, Yasuhara S, Martyn JA. iNOS inhibitor, L-NIL, reverses burn-induced glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activation in skeletal muscle of rats. *Metabolism*. 2013 Mar;62(3):341-6. (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

(1) Shohei Shinozaki. Single molecular switch may contribute to major aging-related diseases. The 3<sup>rd</sup> Ochanomizu Atherosclerosis Forum. (招待講演) Feb. 28, 2015. 庭のホテル (東京都千代田区)

(2) Shohei Shinozaki, Akihito Ishigami, Konrad Ben, Marlene E. Starr, Hiroshi Saito, Hideki Ito, Kentaro Shimokado, Masao Kaneki. iNOS-dependent inhibitory S-nitrosylation of the CXXC motifs in SIRT1 function as a pro-inflammatory switch leading to sustained activation of p53 and p65 NF- $\kappa$ B in age-related muscle wasting. International Conference on Frailty & Sarcopenia Research. Apr. 24, 2015. Revere Hotel Boston Common (Boston, USA)

(3) Shohei Shinozaki. Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65. The 38<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society for Biomedical Gerontology. Jun. 13, 2015. Pacifico Yokohama (Yokohama, Japan)

(4) 篠崎昇平、青柳奏美、下門顕太郎「S-ニトロソ化を介したメタボリックシンドローム発症メカニズムの解明」第 47 回日本動脈硬化学会総会 2015 年 7 月 9 日 仙台国際センター (仙台市青葉区)

(5) 篠崎昇平「SIRT1 の S-ニトロソ化と慢性炎症・老化」(招待講演) 第 11 回日本食品免疫学会学術大会 2015 年 10 月 15 日 伊藤謝恩ホール (東京都文京区)

[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

東京医科歯科大学 老年病内科/血流制御内科学分野 (<http://www.tmd.ac.jp/grad/vasc/vasc-J.htm/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠崎 昇平 (SHOHEI SHINOZAKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：40622626