

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2008～2013

課題番号：20117006

研究課題名(和文)化学プローブを駆使した活性酸素シグナルの制御機構解明

研究課題名(英文)Probing ROS signaling with small molecules

研究代表者

有本 博一 (ARIMOTO, HIROKAZU)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60262789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 82,500,000円、(間接経費) 24,750,000円

研究成果の概要(和文)：8-ニトロcGMPは、一酸化窒素と活性酸素に由来する新規メディエーターである。本研究課題では、この分子に着目して研究をおこなった。まず、同位体標識した8-ニトロcGMPを合成し、細胞に投与して代謝過程を調べた。その結果、まず8-アミノcGMPへの還元が起こり、LPS処理による炎症条件下では、一酸化窒素に依存して、さらにcGMPに変換されることが判明した。続いて、蛍光標識プローブを合成した。蛍光の細胞内局在情報に着想を得て、8-ニトロcGMPのオートファジー誘導能を明らかにした。A群連鎖球菌のオートファジーによる排除では、細菌表面に8-ニトロcGMPとの反応によるS-グアニル化修飾が見られた。

研究成果の概要(英文)：8-Nitro-cGMP is a novel mediator of active oxygen and nitric oxide. In this program, isotopically labeled 8-nitro-cGMP was synthesized to examine its metabolic fate in cells. It was reduced to 8-amino-cGMP first, and then converted to intact cGMP in cells. The latter transformation from 8-amino-cGMP required LPS-treatment of cells. We also prepared fluorescent nitroguanosine probes to obtain insight into the intracellular localization of 8-nitro-cGMP. The lysosomal localization of the fluorescent probes prompted us to examine the roles of 8-nitro-cGMP in autophagy induction. 8-Nitro-cGMP accelerated the autophagic clearance of intracellular group A Streptococcus (GAS). Interestingly, the surface of intracellular GAS was modified by S-guanylation, and the level of the modification showed a robust relationship with GAS ubiquitination suggesting that S-guanylation. These results may suggest that 8-nitro-cGMP works as a tag for selective transport of bacteria to autophagosomes.

研究分野：活性酸素のシグナル伝達機能

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：活性酸素 化学プローブ 一酸化窒素 8-ニトロcGMP オートファジー

1. 研究開始当初の背景

「活性酸素シグナル」の過程には、二次シグナル分子が種々関与していると考えられる。しかし、その物性や安定性が不明であれば、直接的検出、同定は容易でない。このような状況では、有機化学の貢献が大いに期待される。

例えば、化学合成により、存在が疑われる二次シグナル候補分子を調製し、その特異的抗体を作製して、免疫化学的染色により生体内存在を探る。このような研究の流れが可能となる。領域代表(赤池)が見出した8-ニトロ cGMP も、同様な経緯で発見された。申請者は、合成化学の立場でこの研究に参画した。

8-ニトロ cGMP は、酸化ストレスに対して細胞を保護するなど、ユニークな生物活性を示す。生物活性の発現は、タンパク質のS-グアニル化修飾を介している。非修飾のセカンドメッセンジャー cGMP と異なる機能を示すのは、この化学反応のためである。ニトロ cGMP は、感染、炎症など酸化ストレス状態における新しい情報伝達分子として幅広く働くと考えられ、研究開始前には、ごく一部の機能しか明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者の特徴である有機化学のポテンシャルを活かして、種々のプローブ分子を合成し、多角的に8-ニトロ cGMP の働きを明らかにすることを目指した。特に、炎症や感染条件下で8-ニトロ cGMP が果たす機能の発見に注力した。

3. 研究の方法

(1) 同位体標識プローブを用いる8-ニトロ cGMP 代謝過程の解明, (2) 蛍光標識プローブを用いる8-ニトログアニン誘導体の細胞内局在解明, (3) 8-ニトロ cGMP のオートファジーにおける役割, の3点にわけて検討した。

4. 研究成果

(1) 同位体標識プローブを用いる8-ニトロ cGMP 代謝過程の解明 (Molecular BioSystems 2012)

8-ニトロ cGMP は、一酸化窒素の下流分子として細胞内で産生され、細胞保護など重要な生理機能を果たすと考えられている。一般に生理機能分子には、その効果を解除するための消去過程が必要である。タンパク質のシステイン残基とのS-グアニル化反応に用いられない、過剰の8-ニトロ cGMP の代謝過程については全く調べられていなかった。そこで、同位体標識を活用して微量の代謝物の分析を行なった。まず、8-ニトロ cGMP の6位カルボニル酸素を¹⁸O 標識した。続いて、通常の培養条件下でHepG2細胞に投与して、同位体プローブの代謝物を質量分析機で追跡した。¹⁸Oのみからなる通常の8-ニトロ cGMP と¹⁸O 標識を混合して投与することによって、

スペクトル上で特徴的なパターンが得られるので、特異的な検出が可能であった。代謝産物は還元が起きた8-アミノ cGMP であった。

上記実験では細胞外から人為的に8-ニトロ cGMP を添加したので、次に細胞内で生成する内因性8-ニトロ cGMP の代謝過程を調べた。この場合は選択的な同位体標識が不可能であるため、まず8-アミノ cGMP 特異的抗体を作成した。得られた抗体を用い、LPS 刺激したRAW264.7細胞を調べたところ、8-ニトロ cGMP の生成に遅れて8-アミノ cGMP が生成することが確認された。8-ニトロ cGMP に次ぐ2例目の内因性 cGMP 誘導体の発見となった。

興味深いことに、HepG2細胞を用いた最初の実験では8-アミノ cGMP は細胞内において安定であり、別の代謝産物への変化は見られなかった。しかし、RAW264.7細胞で生じた内因性8-アミノ cGMP は速やかに消失した。このことは、使用した細胞株の違いに加え、細胞をLPSで刺激していることに起因すると考えられた。つまり、8-ニトロ cGMP を生じるようなLPS刺激条件では細胞内で一酸化窒素や活性酸素が生成しているため、これらが8-アミノ cGMP の代謝に関与する。実際、¹⁸O 同位体標識した8-アミノ cGMP を用いて再検討したところ、LPS刺激によって8-アミノ cGMP は更に還元されてcGMPに変換された。L-NMMA を使用して細胞内の一酸化窒素生成を抑制するとcGMP への変換が阻害されたことから、一酸化窒素の関与がわかった。8-アミノ cGMP からcGMP への細胞内変換機構は完全には明らかになっていないが、*in vitro* での検討は8-アミノ cGMP がジアゾ化を経てcGMP に変換される可能性を示唆した。

(2) 蛍光標識プローブを用いる8-ニトログアニン誘導体の細胞内局在解明 (ChemBioChem 2013)

8-ニトロ cGMP の未知の生理機能について知見を得るため、この分子の細胞内局在を調べた。環状リン酸構造は8-ニトロ cGMP 特有の反応性(S-グアニル化)には関係ないと考え、リン酸構造の代わりに蛍光団を導入した8-ニトログアノシン誘導体を合成した。投与して生細胞観察すると、細胞質に粒子状の局在が見られた。そこで、種々の細胞内小器官特異的な蛍光試薬と共染色したところ、リソソームと、よく共局在することがわかった。このことは、8-ニトログアニン誘導体が、細胞内分解プロセスに関与する可能性を示唆している。

一方、蛍光性8-ニトログアノシン誘導体の性質を調べたところ、蛍光強度が非常に低いことがわかった。蛍光団から電子不足のニトログアニン環への電子移動が原因と考えられる。実際、S-グアニル化によって電子求引性のニトロ基が消失すると蛍光強度が回復した。この性質は、細胞内のS-グアニル化を選択性高く検出するうえで有用である。

つづいて、ニトロ基を持たない蛍光性グアノシン誘導体を合成した。予想通り強い蛍光を示したが、細胞に投与しても特段の局在を示さず、細胞質に広がって存在した。この状態で細胞をLPSで刺激したところ、細胞内で一酸化窒素と活性酸素が生じ、グアニン環のニトロ化が起こると予想された。実際、LPSによって、蛍光の局在が変化し、8-ニトログアノシン誘導体と似た粒子状の局在が観察された。すなわち、蛍光性グアノシン誘導体を用いることで、細胞内の炎症を蛍光像から間接的に検出できることがわかった。

(3) 8-ニトロ cGMP のオートファジーにおける役割 (Molecular Cell, 2013)

上記(2)の検討から8-ニトログアニン誘導体は細胞内でリソソームに移行することが明らかとなった。これに着想を得て、8-ニトロ cGMP のオートファジーへの影響を調べた。RAW264.7細胞を8-ニトロ cGMP で処理したところオートファゴソームのマーカーとして知られるLC3陽性の斑点が細胞質に増加し、オートファジーを誘導することが分かった。ここで文献を精査したところ、2009年にYuanらがLPS刺激した心筋細胞においてオートファジーが亢進すると報告していた。このオートファジーが一酸化窒素と活性酸素の両方に依存することも示されている。すでに述べたように、LPS処理は細胞に炎症を起こさせ、細胞内では8-ニトロ cGMP が生成する。すなわち、Yuanらの報告は内因性8-ニトロ cGMP の働きとして説明できる可能性がある。

続いて、抗菌オートファジーにおける8-ニトロ cGMP の役割を検討した。2004年に中川、吉森らは細胞内に侵入したA群連鎖球菌(GAS)が細胞質においてオートファジーに補足され選択的に排除されることを報告している。細菌感染は、細胞内で8-ニトロ cGMP の生成を促進するため、抗菌オートファジーへの関与が予想された。実際、GAS感染したマウス由来マクロファージ細胞に8-ニトロ cGMP 処理すると、細菌の排除が促進された。このとき、細胞内のオートファゴソーム様小胞(GcAV)の数も増加し、オートファジーが亢進していることを示した。電子顕微鏡による観察でもGASを含むオートファゴソーム特有の二重膜構造が確認できた。

外部から8-ニトロ cGMP を添加していない条件下、細胞内のGASを細胞免疫化学で詳細に調べたところ、細菌の周囲にS-グアニル化修飾が見られた。このことは細菌感染によって速やかに内因性8-ニトロ cGMP が生成したことを示している。さらに興味深いことに、細胞質のGASの約半数がS-グアニル化修飾されているのに対して、オートファゴソーム内に捕捉されたGASは、ほぼ全てがS-グアニル化を受けていた。このことはS-グアニル化が細菌を捕捉するうえで必須の目印として働く可能性を示唆する。従来の研究において、細胞内侵入細菌が選択的オートファジーに

捕捉されることが知られており、そのプロセスには細菌表面のユビキチン化の関与が重要とされている。そこで、S-グアニル化とユビキチン化レベルの関係を調べたところ、両者には強い相関が見られた。さらなる実験からS-グアニル化された細菌が優先してリジン63型ユビキチン化を受けると推定された。つまり、8-ニトロ cGMP はオートファジー排除の非常に初期の段階で起こり、選択性発現に関与していると考えられる。

既に述べたように8-ニトロ cGMP は、細菌感染がない状態でもオートファジーを促進する。そこで、非感染条件下でもユビキチン化との関係を調べた。種々の変異ユビキチンコンストラクトをトランスフェクションしたA549細胞に8-ニトロ cGMP 処理を行ったところ、ユビキチンの63番目のリジン残基を持たないケースにおいて、オートファジー誘導が観察されなかった。このことは、非感染条件下でもリジン63型ポリユビキチン鎖がオートファジー誘導に必要であることを示している。

一酸化窒素は、これまで直接細菌に作用して殺菌することが知られていたが、今回の研究により、オートファジー誘導の制御を介する間接的経路によっても細菌排除に貢献することが分かった。

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 4件)

Ito, C.; Saito, Y.; Nozawa, T.; Fujii, S.; Sawa, T.; Inoue, H.; Matsunaga, T.; Khan S.; Akashi, S.; Hashimoto, R.; Aikawa, C.; Takahashi, E.; Sagara, H.; Komatsu, M.; Tanaka, K.; Akaike, T.; Nakagawa, I.; Arimoto, H.: "Endogenous Nitrated Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and Innate Defense against Bacteria" *Molecular Cell* 52. 794-804. (2013), DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.024>, 査読有

Saito, Y.; Ito, C.; Fujii, S.; Sawa, T.; Akaike, T.; Arimoto, H.: "Fluorescent probes for live cell imaging of endogenous guanine nitration" *ChemBioChem* 14. 1068-1071 (2013), DOI: 10.1002/cbic.201300129, 査読有

Saito, Y.; Sawa, T.; Yoshitake, J.; Ito, C.; Fujii, S.; Akaike, T.; Arimoto, H.: "Nitric oxide promotes recycling of 8-nitro-cGMP, a cytoprotective mediator, into intact cGMP in cells" *Molecular BioSystems* 8. 2009-2015 (2012), DOI: 10.1039/C2MB25189B, 査読有

Sawa T.; Arimoto, H.; Akaike T.:

"Regulation of Redox Signaling Involving Chemical Conjugation of Protein Thiols by Nitric Oxide and Electrophiles" Bioconjugate Chemistry 21, 1121-1129 (2010), DOI: 10.1021/bc900396u, 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

Arimoto, H. "Endogenous Nitrated Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and Innate Defense against Bacteria" Gordon Research Conference: Autophagy in Stress Development & Disease (20140319), Lucca, Italy

有本博一: "感染症の制御に向けた化学からのアプローチ" 中西シンポジウム 2012. (20120325). 慶応義塾大学 (横浜市)

有本博一: "感染症の理解と制御のための化学的アプローチ" 第13回生命化学研究会. (20110108). 仙台市ホテル佐勘

有本博一: "感染症の理解と制御のための化学的アプローチ" 第22回万有札幌シンポジウム. (20100703). 札幌市さっぽろ芸術文化の館

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1件)

名称: 抗8-ニトロサイクリックグアノシン3',5'-リン酸抗体

発明者: 赤池孝章、有本博一、芥 照夫、佐々本一美

権利者: 国立大学法人 熊本大学、国立大学法人名古屋大学

種類: 特許

番号: 4857431

取得年月日: 平成23年11月11日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bunseki/ArimotoGroup.html>

報道等 (計 5件)

Molecular Cell (論文掲載誌) 2013年12月26日号 「8-Nitro-cGMP-A New Player in Antibacterial Autophagy」

科学新聞 2013年12月6日 「細菌を細胞から排除: 東北大など「鍵分子」発見」

朝日新聞 2013年12月5日朝刊 「細胞内で異物につく分子 東北大・東京医科歯科大が発見」

毎日新聞 2013年11月28日朝刊 「細胞の細菌排除メカニズムを解明」
河北新報 2013年11月22日朝刊 「細胞侵入細菌に結合 目印役の分子発見」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有本 博一 (ARIMOTO HIROKAZU)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号: 60262789