

機関番号 : 34519

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20590320

研究課題名 (和文) 腎疾患における酸化ストレスの関与と抗酸化代償機構の解明

研究課題名 (英文) The compensatory mechanism against oxidative stress in kidney dysfunction

研究代表者

鈴木 敬一郎 (SUZUKI KEIICHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 70221322

研究成果の概要 (和文) :

Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) は生体にとって有害なスーパーオキシドを毒性の弱い酸素と過酸化水素に変換する酵素で、酸化ストレスから生体を守る重要な役割を果たしている。しかし、SOD1 をノックアウト (KO) したマウスは一見正常に生育し、明らかな表現型を示さない事実から、若齢の SOD1KO マウスでは SOD1 を代償するような防御機構が存在するのではないかという仮説を立てた。そこで、SOD1 KO マウスと野性型マウスの腎臓を用いて発現の異なる遺伝子のスクリーニングを行ったところ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ A4 (GSTA4) をコードする遺伝子が SOD1 KO マウスの腎臓で有意に上昇していることを発見した。つまり、SOD1KO マウス腎臓では、GSTA4 タンパク量が上昇していること、免疫組織染色によって腎臓の近位尿細管に GSTA4 が過剰発現していること、さらに鉄が蓄積していることを見いだした。HEK293 細胞にマウス GSTA4cDNA を導入した GSTA4 過剰発現腎細胞ではスーパーオキシドおよび HNE に対する細胞傷害性が低下しており、細胞内タンパクの過酸化脂質アダクト量も減少していた。若齢の SOD1 KO マウスでは GSTA4 が腎臓で誘導されることで酸化ストレスから身を守っていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) :

Copper/zinc-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD, SOD1) plays a protective role in cells by catalyzing the conversion of the superoxide anions into molecular oxygen and hydrogen peroxide. Although SOD1 knockout (KO) mice exhibit a decreased life span and an elevated incidence of dysfunctions in old age, young SOD1 KO mice grow normally and exhibit no abnormalities. This fact leads to the hypothesis that other antioxidative proteins prevent oxidative stress, compensating for SOD1. Differently expressed genes in 3-week-old SOD1 KO and littermate wild-type mice were explored. The gene remarkably elevated in SOD1 KO mice kidneys was identified as the glutathione S-transferase alpha 4 gene (*Gsta4*), which encodes the GSTA4 subunit. The GSTA4 mRNA, protein level and activity were significantly increased in SOD1 KO mice kidneys. The administration of an iron complex, a free radical generator, induced GSTA4 mRNA and protein expression in wild-type mice kidneys. In addition, overexpression of mouse GSTA4 cDNA in human embryonic kidney cells led to a protective effect against cell death caused by both 4-hydroxynonenal and superoxide. These findings suggest that compensatory induced GSTA4 plays a protective role against oxidative stress in young SOD1 KO mice kidneys.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：スーパーオキシドジスムターゼ、SOD1、SOD1 ノックアウトマウス、腎臓、グルタチオンSトランスフェラーゼ、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

腎臓は、排泄と再吸収の際に活性酸素の発生源となる血液中の有害物質に曝されているため、非常に酸化ストレスに暴露されやすい臓器である。活性酸素は多くの疾患や病態の形成・進行に関与することが知られており、腎細胞を直接障害するだけでなくフリーラジカル連鎖反応による細胞膜の脂質過酸化を促進すると考えられている。酸化ストレスから身を守るために、我々の生体には多くの抗酸化酵素や抗酸化物質が存在する。中でもCu/Znスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)は生体にとって有害なスーパーオキシドを毒性の弱い酸素と過酸化水素に変換する酵素で、酸化ストレスから生体を守る重要な役割を果たしている。しかし、SOD1をノックアウト(KO)したマウスは一見正常に生育し、明らかな表現型を示さない。週令の高いSOD1KOマウスでは難聴や脂肪肝、貧血などが報告されているが、若齢マウスでは目立った異常は見つかっていない。特に腎臓は血流が大きく、酸化ストレスに曝されやすい臓器で、SOD1KOマウスでは虚血再還流により、腎機能障害が出やすいことが報告されている。それでも目立った腎疾患に陥らないのは、若齢のSOD1KOマウスではSOD1を代償するような防御機構が存在することが予想された。しかし、SODのアイソザイムであるSOD2やSOD3の有意な上昇は報告されておらず、代償機構は不明であった。

2. 研究の目的

若齢のSOD1KOマウスではSOD1を代償するような抗酸化酵素または抗酸化タンパク質を見だし、その防御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ディファレンシャルディスプレイ法を

用いて、3週令のSOD1KOマウスと野性型マウスの腎臓を用いて発現の異なる遺伝子のスクリーニングを行った。

(2) グルタチオンS-トランスフェラーゼA4(GSTA4)をコードする遺伝子がSOD1KOマウスの腎臓で有意に上昇していることを発見したため、GSTA4に特異的な抗体を作製し、ウエスタンブロット解析や免疫組織染色を行った。

(3) GSTA4の生体防御機構を調べるために、ヒト腎細胞であるHEK293細胞にマウスGSTA4cDNAを導入し、種々の酸化ストレスをかけて細胞傷害に対する影響を検討した。

4. 研究成果

グルタチオンS-トランスフェラーゼA4(GSTA4)をコードする遺伝子がSOD1KOマウスの腎臓で有意に上昇していることを発見した。

マウスGSTA4を認識するポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色によってSOD1KOマウス腎臓の近位尿細管にGSTA4が過剰発現していることを見いだした(図1)。また腎障害を引き起こすFe-キレート剤またはシスプラチンを野性型マウスに腹腔内投与したところ、GSTA4遺伝子が有意に誘導された。またSOD1KOマウス腎臓の近位尿細管にはFeが蓄積していることを見いだした(図2)。

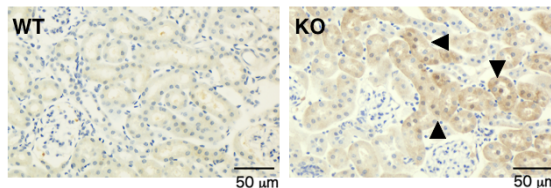


図1. GSTA4抗体による腎臓組織切片の免疫組織染色(メス)

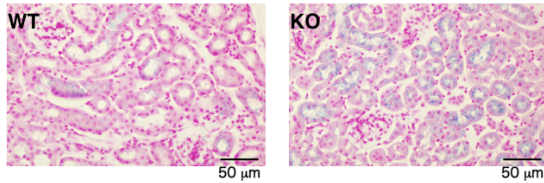
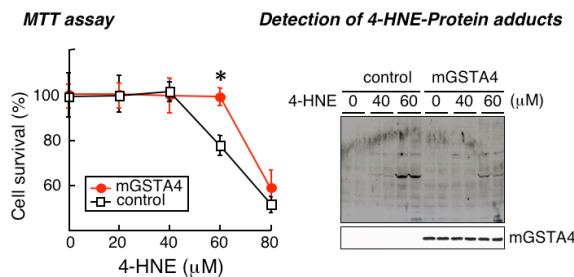


図 2. ベルリンブルーによる腎臓組織切片の鉄染色 (メス)

ヒト腎細胞である HEK293 細胞にマウス GSTA4cDNA を導入した GSTA4 過剰発現腎細胞では過酸化水素およびヒドロキシノネナール (HNE) に対する細胞傷害性が低下しており、細胞内タンパク質の過酸化脂質アダクト量も減少していた (図 3)。

図 3. GSTA4 過剰発現細胞に対する HNE の影響



GSTA4 は HNE などの脂質過酸化物に対する親和性が高く、他の GST アイソザイムとは異なった基質特異性を有する酵素である。以上の結果は、SOD1KO マウスでは SOD1 欠損による酸化ストレスで GSTA4 が誘導され、過酸化物質から腎細胞を守る役割を果たしていることを示唆している。腎臓の疾患には酸化ストレスや鉄イオンの関与が報告されてきている。GSTA4 の防御作用は今後の腎疾患治療の開発に貢献できる可能性がある。

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 10 件)

- ① Sakiyama H., Fujiwara N., Noguchi T., Eguchi H., Yoshihara D., Suzuki K.: The role of O-linked GlcNAc modification on the glucose response of ChREBP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 784-789, 2010 (査読有)
- ② Takeuchi S., Fujiwara N., Ido A., Ono M., Takeuchi Y., Tateno M., Suzuki K., Takahashi R., Tooyama I., Taniguchi N.,

Julien JP., Urushitani M.: Induction of protective immunity by vaccination with wild-type apo SOD1 in the mutant SOD1 transgenic mice, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 69, 1044-1056, 2010 (査読有)

- ③ Yoshihara D., Fujiwara N., Suzuki K.: Benefits and risks of antioxidants for health, *Maturitas*, 67, 375-376, 2010 (査読無)
- ④ Yoshihara D., Fujiwara N., Suzuki K.: Antioxidants: benefits and risks for long-term health, *Maturitas*, 67, 103-107, 2010 (査読有)
- ⑤ Yoshihara D., Fujiwara N., Ookawara T., Kato S., Sakiyama H., Yokoe S., Eguchi H., Suzuki K.: Protective role of glutathione S-transferase A4 induced in copper/zinc-superoxide dismutase knockout mice, *Free Radic. Biol. Med.* 47, 559-567, 2009 (査読有)
- ⑥ Suzuki K. Anti-oxidants for therapeutic use: why are only a few drugs in clinical use? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 287-289, 2009 (査読無)
- ⑦ 藤原範子, 松本紋子, 鈴木敬一郎, 谷口直之: ALS における酸化ストレスおよび酸化型 SOD1 の関与、*実験医学(増刊)『病態解明に迫る活性酸素シグナルと酸化ストレス』*(谷口直之監修)、羊土社、Vol. 27, No. 15, 140-144, 2009 (査読無)
- ⑧ 江口裕伸, 藤原範子, 大河原知水, 鈴木敬一郎, 谷口直之: 酸化ストレスと健康、「*生物資料分析*」Vol. 32, No. 4, 247-256, 2009 (査読無)
- ⑨ 藤原範子: MEDICAL TOPICS 第 28 回、ヒト Cu, Zn-SOD (SOD1) のシステイン残基の酸化的修飾とその特異抗体の開発、*THE LUNG perspectives*, *メディカルレビュー社*、Vol. 16, No. 3, p90-95, 2008 (査読無)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 吉原大作, 藤原範子, 崎山晴彦, 江口裕

- 伸、鈴木敬一郎 (2009) SOD1 ノックアウトマウスの腎臓における鉄代謝異常とその分子機構、第 83 回日本生化学会大会、12. 7-10、神戸
- ② 吉原大作、藤原範子、崎山晴彦、江口裕伸、鈴木敬一郎 (2009) SOD1 ノックアウトマウスの腎臓における鉄代謝異常、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、6. 24、神奈川
- ③ Fujiwara N., Nakano M., Kato S., Yoshihara D., Eguchi H., Sakiyama H., Taniguchi N. and Suzuki K. (2009) Oxidative modification of Cys111 residue in human Copper/zinc superoxide dismutase and its immuno-probe, The 5th Joint Meeting of The Societies For Free Radical Research Australasia and Japan, 12. 1-4, Sydney, Australia
- ④ 藤原範子、伊原健太郎、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一郎 (2009) 抗酸化能を獲得した 2-メルカプトエタノール修飾型 Cu, Zn-SOD の構造解析、第 82 回日本生化学会大会、10. 21-24、神戸
- ⑤ 伊原健太郎、藤原範子、富本裕介、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一郎 (2009) 2ME 化 SOD1 の結晶構造解析 第 26 回 PF シンポジウム 3. 24-25 つくば
- ⑥ 藤原範子、中の三弥子、大河原知水、吉原大作、横江俊一、加藤信介、谷口直之、鈴木敬一郎 (2008) ヒト Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) の Cys111 の酸化と酸化型 SOD1 特異抗体の作製、第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会、6. 19-20, 京都、(抄録、p66)
- ⑦ 吉原大作、藤原範子、大河原知水、横江俊一、崎山晴彦、鈴木敬一郎 (2008) Cu/Zn-SOD ノックアウトマウスにおける GSTA4 の生理的意義、第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会、6. 19-20, 京都
- ⑧ 吉原大作、藤原範子、大河原知水、崎山晴彦、横江俊一、江口裕伸、鈴木敬一郎 (2008) SOD1 ノックアウトマウスにおける GSTA4 の誘導と生理的意義、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 12. 9-12, 神戸 (Late-Breaking Abstracts、p14)
- ⑨ Yoshihara D., Fujiwara N., Ookawara T., Yokoe S., Suzuki K.: GSTA4-4 as a biomarker of oxidative stress in renal tubular cells, BOSH2008 Biomarkers of Oxidative Stress in Health and Diseases, Osaka, 2008
- ⑩ Fujiwara N., Nakano M., Yoshihara D., Ookawara T., Eguchi H., Taniguchi N. and Suzuki K. (2008) Cys111 in human copper-zinc-superoxide dismutase is a primary target for peroxidation to cysteine sulfonic acid, The Gordon Research conference on Thiol-based Redox Regulation and Signaling, 5. 25-30, Lucca, Italy
- [図書] (計 1 件)
- ① 鈴木敬一郎、藤原範子、大河原知水：CHAPTER 3, 生体の抗酸化システム (1) スーパーオキシドジスムターゼ系、酸化ストレスの医学 (吉川敏一監修)、診断と治療社、23-30、2008
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
鈴木 敬一郎 (SUZUKI KEIICHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：70221322
- (2) 研究分担者
藤原 範子 (FUJIWARA NORIKO)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10368532
崎山 晴彦 (SAKIYAMA HARUHIKO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：30508958
江口 裕伸 (EGUCHI HIRONOBU)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：60351798
吉原 大作 (YOSHIHARA DAISAKU)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：00567266
横江 俊一 (YOKOE SYUNICHI)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：40454756
(H20-21:連携研究者)
- (3) 連携研究者
大河原 知水 (OOKAWARA TOMOMI)
兵庫医療大学・薬学部・准教授
研究者番号：50330452