

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590287

研究課題名（和文）酸化ストレス適応応答のシグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of signal transduction in antioxidant adaptive response

研究代表者

藤井 重元 (FUJII SHIGEMOTO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：00325333

研究成果の概要（和文）：酸化ストレス適応応答の2次メッセンジャーである 8-nitro-cGMP の特異的で高感度な定量法を確立し、8-nitro-cGMP の生成にミトコンドリアおよび NADPH オキシダーゼが関わることを明らかにした。酸化ストレス適応応答のメカニズムとして、8-nitro-cGMP による Keap1 の翻訳後修飾（S-グアニル化）とそれに伴う Nrf2 の活性化および抗酸化蛋白質群の発現誘導が関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： We established a method for quantification of intracellular 8-nitro-cGMP, a second messenger in antioxidant adaptive response, and revealed the involvement of mitochondria and NADPH oxidase in 8-nitro-cGMP formation in cells. We also found that S-guanylation of Keap1 by 8-nitro-cGMP, and subsequent Nrf2 activation and induction of antioxidant proteins expression, are important mechanisms in adaptive response against oxidative stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：シグナル伝達、酸化ストレス、適応応答、8-nitro-cGMP、S-グアニル化

1. 研究開始当初の背景

従来、生体に酸化ストレスをもたらす有害物質として考えられてきた活性酸素が、細胞・生体が酸化ストレスへの適応応答（adaptive response）を誘導し重要なシグナル分子として機能することが明らかになってきた。活性分子種が生成すると、細胞内のセンサー蛋白質（レセプター）が活性化され、さらに下流のエフェクター分子へとシグ

ナルが伝えられる。このような適応応答シグナルに関わるレセプター・エフェクター分子群は、細胞の主要なストレス応答システムを構築している。活性酸素や一酸化窒素（NO）などのラジカル種は、その最も上流に位置する分子群であるが、シグナル伝達機構の詳細（例えば、レセプターと直接反応するのか？あるいは、2次メッセンジャーの生成をもたらすのか？など）は、これまでほとんど分か

っていないかった。

最近、研究代表者らのグループは、生体の酸化ストレスに対する適応応答のシグナル伝達に関与する NO の全く新しい2次メッセンジャー 8-nitro-cGMP を発見した。8-nitro-cGMP は、活性酸素と NO の作用により生成し、NO のセカンドメッセンジャーである cGMP のニトロ化誘導体構造を有している。8-nitro-cGMP による特筆すべき新しいシグナル伝達機序として、8-nitro-cGMP が細胞内の酸化ストレスセンサーとして機能している蛋白質の Cys チオール基と反応して、これまで知られていなかった蛋白質翻訳後修飾である cGMP 付加体形成（蛋白質 S-グアニル化）を介してセンサー蛋白質を活性化することが分かった。活性酸素やフリーラジカルが生体内でミリ秒～数秒程度の短寿命な活性分子種であるのに対し、8-nitro-cGMP は遙かに安定であり、また、蛋白質チオール基と効率良く反応しその機能を制御する。従って、8-nitro-cGMP は、細胞の酸化ストレス適応応答において極めて重要なシグナル機能を発揮していると推定される。

2. 研究の目的

Keap1 は、転写因子 Nrf2 の活性調節因子であり、酸化ストレス適応応答における様々な遺伝子の発現制御に関わっている。我々は、Keap1 が、生体内において S-グアニル化を受ける主要な蛋白質であることを見出しているが、それがどのような細胞機能変化をもたらすかについては不明である。

そこで本研究では、8-nitro-cGMP のシグナル機能を明らかにするために、細胞内 8-nitro-cGMP の高感度かつ特異的な定量法を開発し、8-nitro-cGMP 細胞内生成のメカニズムを解析した。さらに、酸化ストレスにより生成する 8-nitro-cGMP による Keap1/Nrf2 転写系の制御機構を解析し、酸化ストレス適応応答の分子基盤の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞内での 8-nitro-cGMP の生成メカニズムを明らかにするために、安定同位体希釈法と質量分析を用いた 8-nitro-cGMP の高感度で特異的な定量法を開発を行った。

(2) C6 ラットグリオーマ細胞を用いて、リポ多糖とサイトカイン刺激後の NO の産生に伴う 8-nitro-cGMP の生成を解析した。各種活性酸素産生系の阻害剤を用いて 8-nitro-cGMP の生成メカニズムについて検討した。

(3) 抗 S-グアニル抗体によるウェスタンブロットにより、リポ多糖とサイトカインによる刺激後の C6 細胞における Keap1 の S-グアニル化を解析した。さらに質量分析を用いて Keap1 の S-グアニル化を受けるシステイン残

基の同定を行った。

(4) リポ多糖とサイトカイン刺激 C6 細胞における Nrf2 の活性化と抗酸化遺伝子群の発現をウェスタンブロットにより解析した。さらに、C6 細胞を 8-nitro-cGMP で処理し、過酸化水素による細胞死に対する 8-nitro-cGMP の細胞保護作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 8-nitro-cGMP の特異的かつ高感度な定量法（安定同位体希釈法-質量分析法）を確立し、誘導型 NO 合成酵素の発現誘導刺激（リポ多糖と炎症性サイトカイン）をした C6 細胞において、40 μ M を超える 8-nitro-cGMP が生成することを明らかにした。これは cGMP の細胞内濃度を大きく凌ぐものであり、8-nitro-cGMP が細胞内の主要な環状ヌクレオチドの一つであることが明らかになった。

(2) 上記細胞における 8-nitro-cGMP の生成メカニズムについて検討した結果、ミトコンドリアおよび NADPH オキシダーゼに由来する活性酸素が重要な役割を果たしていることが示された。

(3) 8-Nitro-cGMP の生成に伴い細胞内の Keap1 の S-グアニル化が著明に増加した。Keap1 の S-グアニル化は、Keap1 と Nrf2 の結合領域の近傍に存在する特定のシステイン残基に起こっていることが分かった。

(4) Keap1 の S-グアニル化の増加に伴い、Nrf2 の核移行（活性化）が顕著に増加した。さらに、Nrf2 により支配されるヘムオキシゲナーゼ-1 をはじめとする抗酸化蛋白質群の発現も著明に増加した。また、C6 細胞の 8-nitro-cGMP 処理は、過酸化水素による細胞死を顕著に抑制した。

(5) 以上のことから、8-nitro-cGMP は、活性酸素と NO の2次メッセンジャーとして、Keap1 の S-グアニル化を介した酸化ストレスに対する適応応答において重要な役割を果たしていることが示された。

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 15 件）

1. Khan S, Okamoto T, Enomoto K, Sakashita N, Oyama K, Fujii S, Sawa T, Takeya M, Ogawa H, Yamabe H, and Akaike T. Potential association of *Helicobacter cinaedi* with atrial arrhythmia and atherosclerosis. **Microbiol Immunol.** 56:145-154 (2012). 査読有
2. Ahmed KA, Sawa T, Ihara H, Kasamatsu S, Yoshitake J, Okamoto T, Fujii S, and Akaike T.

- Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cell formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signaling. **Biochem J.** 441:719-730 (2012). 査読有
3. 藤井重元, 赤池孝章.
ニトロ化環状ヌクレオチドによるタンパク質 S-グアニル化を介する酸化ストレス適応応答の分子機序
生化学. 84(2):124-128 (2012). 査読無
 4. Ihara H, Ahmed KA, Ida T, Kasamatsu S, Kunieda K, Okamoto T, Sawa T, and Akaike T.
Methodological proof of immunochemistry for specific identification of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formed in glia cells.
Nitric Oxide. 25: 169-175 (2011). 査読有
 5. 今吉理恵子, 岡本竜哉, 永尾潤一, 長環, 松永勝政, 赤池孝章, 上西秀則.
植物精油 citral のインフルエンザウイルス感染能抑制効果について.
医学と生物学. 155: 489-494 (2011). 査読無
 6. 岡本竜哉, 居原秀, 赤池孝章.
喫煙と酸化ストレス: Oxidative stress induced by cigarette smoking.
最新精神医学. 特集号「精神障害者と喫煙」16: 431-439 (2011). 査読無
 7. Fujii S, Sawa T, Ihara H, Tong KI, Ida T, Okamoto T, Ahmed KA, Ishima Y, Motohashi H, Yamamoto M, and Akaike T.
The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response.
J Biol Chem. 285: 23970-23984 (2010). 査読有
 8. Okamoto T, Khan S, Oyama K, Fujii S, Sawa T, and Akaike T.
A new paradigm for antimicrobial host defense mediated by a nitrated cyclic nucleotide.
J Clin Biochem Nutr. 46: 14-19 (2010). 査読有
 9. Akaike T, Fujii S, Sawa T, and Ihara H.
Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide.
Nitric Oxide. 23: 166-174 (2010). 査読有
 10. 藤井重元, 澤 智裕, 赤池孝章.
8-Nitro-cGMP の発見と生理機能の解明.
化学と生物. 48: 22-27 (2010). 査読無
 11. 岡本竜哉, 澤 智裕, 赤池孝章.
Nitric oxide (NO) および NO 関連物質.
日本臨床. 増刊号「広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査-4」 982: 839-842 (2010). 査読無
 12. 岡本竜哉, 赤池孝章.
呼吸器疾患における酸化ストレスと制御シグナルの分子基盤: Molecular mechanisms of nitric oxide- and reactive oxygen species-mediated signalings in the respiratory diseases.
呼吸. 29: 859-866 (2010). 査読無
 13. Zaki MH, Fujii S, Okamoto T, Islam S, Khan S, Ahmed KA, Sawa T, and Akaike T.
Cytoprotective function of heme oxygenase-1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis.
J Immunol. 182: 3746-3756 (2009). 査読有
 14. 赤池孝章, 岡本竜哉, Zaki MH, 藤井重元, 澤 智裕.
NO による細胞内感染防御の新しい展開 - New paradigm of host defense against intracellular pathogens by nitric oxide.
Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi. 78: 41-47 (2009). 査読無
 15. 岡本竜哉, 澤 智裕, 藤井重元, 赤池孝章.
活性酸素・NO による感染防御シグナルの新展開 - Antimicrobial signaling mediated by reactive oxygen species and NO.
細胞. 41: 51-55 (2009). 査読無
- [学会発表] (計 24 件)
1. 岡本竜哉, 赤池孝章. 硫化水素によりオートファジー制御と感染防御シグナル. 第 85 回日本細菌学会総会 (2012 年 3 月 27-29 日, 長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール, 長崎)
 2. 藤井重元, 赤池孝章. 硫化水素の抗酸化機能と酸化ストレスバイオマーカー. 第 8 回呼吸器バイオマーカー研究会 (2012 年 3 月 10 日, 都市センターホテル, 東京)
 3. 岡本竜哉, 松永哲郎, Shahzada Khan, 小野勝彦, 小山耕太, 吉武 淳, 井上博文, 藤井重元, 澤 智裕, 赤池孝章. サルモネラ感染におけるオートファジーを介した細胞内殺菌と内因性硫化水素イオンによる抑制. 第 17 回 MPO 研究会 (2011 年 10 月 28, 29 日, アークホテル熊本, 熊本)
 4. 岡本竜哉, 澤 智裕, 藤井重元, 河内正治, 布井博幸, Thuy Thi Bich Phung, Liem Thanh, 中島典子, 鈴木和男, 赤池孝章. 小児致死の ARDS 症例および鳥インフルエンザ

- ンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の3-ニトロチロシンの解析. 第84回日本生化学会大会 (2011年9月21-24日、国立京都国際会館、京都)
5. Tatsuya Okamoto, Shahzada Khan, Naomi Sakashita, Kohta Oyama, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Motohiro Takeya, Hisao Ogawa, Kunihiko Matsui, Hiroshige Yamabe, Takaaki Akaike. *Helicobacter cinaedi* infection as a potential etiological factor in atrial arrhythmia and atherosclerosis. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (第84回日本細菌学会総会) (6-10 Sep, 2011, Sapporo Convention Center, Sapporo).
 6. 岡本竜哉、澤 智裕、藤井重元、河内正治、布井博幸、Thuy Thi Bich Phung、Liem Thanh Nguyen、中島典子、鈴木和男、赤池孝章. 小児致死的ARDS症例および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の3-ニトロチロシンの解析. 第64回日本細菌学会九州支部総会 (2011年8月26-27日、門司港ホテル、北九州)
 7. 岡本竜哉. オートファジー誘導物質を用いた感染症治療. 第4回感染病態研究フロンティア (2011年8月6日、ホテル阪急エキスポパーク、大阪府吹田市)
 8. 岡本竜哉. 小児致死的ARDS症例および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の3-ニトロチロシンの解析. 第11回日本NO学会学術集会 (2011年5月13-14日、昭和薬科大学、東京都町田市)
 9. 藤井重元、澤 智裕、居原 秀、Kit I. Tong、井田智章、岡本竜哉、Khandaker Ahtesham Ahmed、本橋ほづみ、山本雅之、赤池孝章. ニトロ化環状ヌクレオチドによる蛋白質S-グアニル化を介する酸化ストレス適応応答の分子機序. 第83回日本生化学会大会 (2010年12月7-10日、神戸ポートアイランド、神戸)
 10. 岡本竜哉、藤井重元、澤 智裕、赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎・ARDSにおける血漿蛋白質中の3-ニトロチロシンの定量的解析. 第47回日本ウイルス学会九州支部総会 (2010年9月3,4日、ホテルメリージュ、宮崎市)
 11. Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, Takaaki Akaike. Critical roles of nitric oxide signaling via 8-nitro-cGMP-induced protein S-guanylation in antioxidant adaptive responses. The 26th Kumamoto Medical Bioscience Symposium (2010年6月19日、Kumamoto University, Kumamoto, Japan)
 12. Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, Tomoaki Ida, Tatsuya Okamoto, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto, Takaaki Akaike. Role of Keap1 S-guanylation in the antioxidant adaptive response in C6 glioma cells. 6th International Conference on Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (2010年6月14-18日、Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan)
 13. Tatsuya Okamoto, Tomohiro Sawa, Shigemoto Fujii, Mie Tateyama, Shoji Kawachi, Thuy Thi Bich Phung, Liem Thanh Nguyen, Kazuo Suzuki, Takaaki Akaike. Detection of protein-bound 3-nitrotyrosine in plasma from pediatric patients with fulminant ARDS and avian influenza infection. 6th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic applications of Nitric Oxide (2010年6月14-18日、Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan)
 14. Tatsuya Okamoto, Shahzada Khan, Kohta Oyama, Naomi Sakashita, Hiroshige Yamabe, Yoshiaki Kawamura, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Motohiro Takeya, Takaaki Akaike. Possible association of *Helicobacter cinaedi* with arrhythmia and atherosclerosis. 第83回日本細菌学会総会 (2010年3月27-29日、パシフィコ横浜、横浜)
 15. 藤井重元、他. ニトロ化環状ヌクレオチドによる蛋白質S-グアニル化を介するcGMP依存性プロテインキナーゼの活性化. 第83回日本細菌学会総会 (2010年3月27-29日、パシフィコ横浜、横浜)
 16. 藤井重元、澤 智裕、岡本竜哉、三浦 高、岩本典子、熊谷嘉人、赤池孝章. 細胞内S-グアニル化蛋白質の同定と蛋白質S-グアニル化の生理機能の解明. 第82回日本生化学会大会 (2009年10月21-24日、神戸ポートアイランド、神戸)
 17. 岡本竜哉、澤 智裕、藤井重元、赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎における8-ニトロ-cGMPの生成を介した酸化ストレス応答の分子メカニズム. 第46回日本ウイルス学会九州支部総会 (2009年9月4, 5日、佐賀大学医学部、佐賀)
 18. 藤井重元、岡本竜哉、澤 智裕、赤池孝章. サルモネラ感染におけるニトロ化環状ヌクレオチドを介するNO誘導性生体防御機構. 第62回日本細菌学会九州支部総会 (2009年9月4, 5日、佐賀大学医学部、佐賀)

19. 藤井重元、澤 智裕、岡本竜哉、居原 秀、井田智章、Kit I. Tong、本橋ほづみ、山本雅之、赤池孝章. 蛋白質 S-グアニル化を介する酸化ストレス適応応答の分子機序. 第6回 Heme Oxygenase 研究フォーラム (2009年8月28日、京都府立医科大学・青蓮会館、京都)
20. 岡本竜哉、澤 智裕、藤井重元、赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎における8-ニトロ-cGMPの生成を介した酸化ストレス応答の分子メカニズム. 第20回日本生体防御学会 (2009年7月25, 26日、東京医科歯科大学(湯島キャンパス)、東京)
21. 岡本竜哉、赤池孝章、河村好章. 新興感染症菌ヘリコバクター・シネディと院内感染. 第2回 感染病態研究フロンティア (2009年7月4日、江陽グランドホテル、仙台)
22. 藤井重元、澤 智裕、岡本竜哉、三浦 高、岩本典子、熊谷嘉人、赤池孝章. 細胞内 S-グアニル化蛋白質の同定と S-グアニル化制御機構の解明. 第62回日本酸化ストレス学会学術集会 (2009年6月11, 12日、九州大学医学部百年講堂、福岡)
23. 岡本竜哉、澤 智裕、藤井重元、赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎における8-ニトロ-cGMPの生成を介した酸化ストレス応答の分子メカニズム. 第9回日本NO学会学術集会 (2009年5月8, 9日、グランシップ、静岡)
24. 藤井重元、赤池孝章. 8-ニトログアノシン 3',5'-環状1リン酸による蛋白質 S-グアニル化を介する酸化ストレス適応応答の分子機構. 第9回日本NO学会学術集会 (2009年5月8, 9日、グランシップ、静岡)

[その他]

ホームページ等

<http://kumadai-bisei.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 重元 (FUJII SHIGEMOTO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：00325333

(2) 研究分担者

岡本 竜哉 (OKAMOTO TATUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：30419634