

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：21590312

研究課題名（和文） 核酸ニトロ化修飾による酸化ストレスシグナル制御の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of oxidative stress regulation by nucleic acid nitration

研究代表者

澤 智裕 (SAWA TOMOHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：30284756

研究成果の概要（和文）：炎症刺激（リポ多糖とサイトカイン処理）した細胞では、NADPH オキシダーゼ活性に依存して、ミトコンドリアからの活性酸素生成が顕著に亢進することを見出した。ミトコンドリア由来活性酸素は、同じく生成が亢進した一酸化窒素（NO）とともに、グアニンヌクレオチドを効率良くニトロ化した。これらの知見は、核酸ニトロ化反応が細胞内のレドックス状態を反映するユニークなセンシング機構である可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory stimulation with lipopolysaccharide and cytokines remarkably augmented reactive oxygen species (ROS) production from mitochondria via activation of NADPH oxidase. Mitochondria-derived ROS together with nitric oxide (NO) induced nitration of guanine nucleotides in cells. These data suggest that guanine nitration might function as a unique sensing mechanism representing cellular status of redox homeostasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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・医化学一般

キーワード：活性酸素、シグナル伝達、核酸ニトロ化、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

炎症などで過剰に生成する一酸化窒素（NO）は、さらに活性酸素（Reactive oxygen species, ROS）と反応して化学反応性に富む活性窒素酸化物（Reactive nitrogen oxide species, RNOS）となり、生体分子をニトロ化することが知られている。

ニトロ化された生体分子は、これまでバイオマーカーとしての研究は進んでいたものの、その生物学的な意義については、不明な点が多く残されていた。我々は、新規なニトロ化核酸として、8-ニトログアノシン 3',5'-環

状 1 リン酸（8-ニトロ cGMP）を同定した（Nature Chem Biol 2007, 3, 727-735）。さらに 8-ニトロ cGMP による特筆すべき新しいシグナル伝達機序として、8-ニトロ cGMP が ROS センサータンパク質のチオール基と反応して、これまで知られていなかった翻訳後修飾である cGMP 付加体形成を介して酸化ストレス応答シグナルの制御に密接に関わることを明らかにした。このような cGMP 付加修飾をタンパク質 S-グアニル化とよび、生体の酸化ストレス応答の重要な制御機能を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、核酸ニトロ化に関わる生体内 ROS 産生メカニズムを明らかにする。この知見に基づき、酸化ストレスシグナル伝達における核酸ニトロ化の役割とその機能制御メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 化学特性の異なる様々な活性酸素酸化物とグアニン関連核酸化合物を反応させ、生成するニトロ化合物をクロマトグラフィー、質量分析法にて解析した。

(2) C6 ラットグリオーマ細胞を、リポ多糖とサイトカインで刺激した炎症細胞モデルを作成した。この細胞内に生成する NO、ROS を蛍光プローブを用いて解析した。さらに NO、ROS の生成と細胞内に生成する 8-ニトロ cGMP の関係を解析した。

4. 研究成果

(1) 今回調べた活性酸素酸化物のうち、パーオキシナイトライトと、亜硝酸イオン/過酸化水素/ミエロパーオキシダーゼに強力な核酸ニトロ化を認めた。

(2) パーオキシナイトライトによるニトロ化は、グアノシンヌクレオチドのリン酸構造に大きく依存し、その効率、GTP > GDP > GMP > cGMP の順となった。GTP は細胞内に豊富に存在するヌクレオチドであり、活性酸素酸化物の良い標的となりうることを示された。

(3) 炎症刺激した C6 細胞では、NADPH オキシダーゼ活性の亢進と、ミトコンドリアからのスーパーオキシド生成が亢進していた。この細胞では、8-ニトロ cGMP の生成が顕著に亢進していた。

(4) 8-ニトロ cGMP の細胞内生成は、NADPH オキシダーゼの siRNA ノックダウン、および活性酸素消去酵素 (スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ) 処理により抑制された。一方、ミトコンドリアの電子伝達複合体 3 をロテノンにより阻害すると、8-ニトロ cGMP 生成は亢進した。

(5) 以上の結果から、炎症刺激した細胞内におけるニトロ化核酸の精製は、NO の産生とともに、(i) ROS の産生が必須であること、(ii) ROS の産生源として、NADPH オキシダーゼとミトコンドリアが重要であること、が明らかとなった。8-ニトロ cGMP は、このような ROS の過剰産生に対して酸化ストレス応答を誘導し、細胞内のレドックス状態の恒常性を維持させる重要なシグナル分子として機能している可能性が示唆された。

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 24 件)

1. Nishida M, Sawa T, Kitajima N, Ono K, Inoue H, Ihara H, Motohashi H, Yamamoto M, Suematsu M, Kurose H, van der Vliet A, Freeman BA, Shibata T, Uchida K, Kumagai Y, and Akaike T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. **Nature Chem Biol.** in press (2012). 査読有
2. Ishima Y, Hoshino H, Shinagawa T, Watanabe K, Akaike T, Sawa T, Kragh-Hansen U, Kai T, Watanabe H, Maruyama T, and Otagiri M. S-Guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. **J Pharm Sci.** in press (2012). 査読有
3. 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
4. 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
5. 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
6. Ihara H, Sawa T, Nakabeppu Y, and Akaike T. Nucleotides function as endogenous chemical sensors for oxidative stress signaling. **J Clin Biochem Nutr.** 48: 1-7 (2011). 査読有。

7. Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Sawa T, Akaike T, Shudo K, and Katsuki H. Midbrain dopaminergic neurons utilize nitric oxide/cyclic GMP signaling to recruit ERK that links retinoic acid receptor stimulation to up-regulation of BDNF. **J Neurochem.** 116: 323-333 (2011). 査読有
8. Tokutomi Y, Kataoka K, Yamamoto E, Nakamura T, Hisato F, Nako H, Toyama K, Dong YF, Ahmed KA, Sawa T, Akaike T, and Kim-Mitsuyama S. Vascular responses to 8-nitro-cyclic GMP in nondiabetic and diabetic mice. **Br J Pharmacol.** 162: 1884-1893 (2011). 査読有.
9. Ahmed KA, Sawa T, and Akaike T. Protein cysteine S-guanylation and electrophilic signal transduction by endogenous nitro-nucleotides. **Amino Acids.** 41: 123-130 (2011). 査読有
10. Sawa T, Ihara H, and Akaike T. Antioxidant effect of a nitrated cyclic nucleotide functioning as an endogenous electrophile. **Curr Top Med Chem.** 11: 1854-1860 (2011). 査読有
11. Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y, Sawa T, Akaike T, Kumagai Y. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in mammalian cells. **Chem. Res. Toxicol.** 24: 1633-1635 (2011). 査読有
12. 澤 智裕, 小野勝彦, 赤池孝章. 活性酸素・一酸化窒素によるニトロ化シグナルと抗炎症作用. **感染・炎症・免疫.** 41: 12-19 (2011). 査読無
13. 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
14. 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
15. Sawa T, Arimoto H, and Akaike T. Regulation of redox signaling involving chemical conjugation of protein thiols by nitric oxide and electrophiles. **Bioconjugate Chem.** 21: 1121-1129 (2010). 査読有
16. 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
17. Ishima Y, Hiroyama S, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Sawa T, Akaike T, Kai T and Otagiri M. One-step preparation of S-nitrosated human serum albumin with high biological activities. **Nitric Oxide.** 23: 121-127 (2010). 査読有
18. 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.
19. 澤 智裕, 赤池孝章. 毒性説から脱した活性酸素研究 -シグナル分子としての活躍-. **現代化学.** 469: 34-38 (2010). 査読無
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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

24. 澤 智裕, 有本博一, 赤池孝章.
チオール基の修飾による活性酸素のセンサー機能制御.
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, 赤池孝章, 鈴木敬一郎, 内田浩二編集) pp. 2341-2347 (2009). 査読無

[学会発表] (計 10 件)

1. Tomohiro Sawa. Redox activation of H-Ras oncogenic signal by electrophilic nucleotide via posttranslational cysteine modification.
The 23rd Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (October 6-7, 2011, Seoul, Korea)
2. 澤 智裕. Redox activation of H-Ras oncogenic signal by electrophilic nucleotide via posttranslational cysteine modification.
第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月 3-5 日, 名古屋, 名古屋国際会議場)
3. 澤 智裕, 赤池孝章. 酸化ストレス応答のケミカルバイオロジー.
第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月 21-24 日, 京都, 国立京都国際会館)
4. 澤 智裕, 赤池孝章. 活性酸素のシグナル伝達機能と硫化水素による制御.
第 32 回日本炎症・再生医学会 (2011 年 6 月 2-3 日, 京都, 国立京都国際会館)
5. 澤 智裕
ニトロ化環状ヌクレオチドとガス状メディエーターの交叉シグナリング.
第 11 回日本 NO 学会学術集会 (2011 年 5 月 13-14 日, 東京 町田, 昭和薬科大学)
6. 澤 智裕, 赤池孝章
NO による抗酸化応答の新展開.
第 27 回臨床フリーラジカル会議 (2010 年 12 月 3-4 日, 京都市, 里山の休日 京都・烟河)
7. 澤 智裕, 赤池孝章
核酸分子の化学修飾による活性酸素シグナルのケミカルセンシング.
第 83 回日本生化学会大会 (2010 年 12 月 7-10 日, 神戸, 神戸ポートアイランド)
8. 澤 智裕, Ahmed Khandaker Ahtesham,

Joseph R. Burgoyne, 岡本竜哉, 藤井重元, Philip Eaton, 赤池孝章

ニトロ化環状ヌクレオチドによる蛋白質 S-グアニル化を介した cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化機構.

第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月 21-24 日, 神戸, 神戸ポートアイランド)

9. 澤 智裕, Ahmed Khandaker Ahtesham, J. Burgoyne, 岡本 竜哉, 藤井 重元, P. Eaton, 赤池 孝章
S-グアニル化を介した protein kinase G の新規な活性化機構.
第 62 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2009 年 6 月 11-12 日, 福岡, 九州大学百年講堂)
10. 澤 智裕, 藤井重元, 入江 厚, 岡本竜哉, 居原 秀, 本橋ほづみ, 山本雅之, 赤池孝章
S-Guanylation proteomics: unique post-translational modification of thiols dependent on nitric oxide and reactive oxygen species.
第 9 回日本 NO 学会学術集会 (2009 年 5 月 8, 9 日, 静岡, グランシップ)

[図書] (計 3 件)

1. Sawa T., Akaike T. Antioxidant adaptive response of malignant glioma related to antitumor treatment. *In* Novel Therapeutic Concepts in Targeting Glioma (eds., Faris Farassati), InTech (Open Access Company) 2011, p. 247-262
2. 澤 智裕, 赤池孝章. 一酸化窒素 nitric oxide/NO. 免疫の事典 (桂 義元, 河本宏, 小安重夫, 山本和彦 編) 朝倉書店. 2011. p. 39
3. 澤 智裕, 赤池孝章. 活性酸素 reactive oxygen species (ROS). 免疫の事典 (桂 義元, 河本 宏, 小安重夫, 山本和彦 編) 朝倉書店. 2011. p. 109

[その他]

ホームページ等

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

<http://ros-signal.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤 智裕 (SAWA TOMOHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 30284756

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

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