

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590563

研究課題名（和文）

肥満と活性酸素：メタボリック症候群と動脈硬化の病態に対する SOD の関与

研究課題名（英文）

Obesity and oxidative stress: involvement of SOD in the physiology of metabolic syndrome and atherosclerosis

研究代表者

大河原 知水（OOKAWARA TOMOMI）

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：50330452

研究成果の概要（和文）：

組み換え型ヒト EC-SOD の精製系を作製した。恒常的発現細胞 HECY6-7 をクローニングし、473mL の培養上清から 3 段階のクロマトグラフィー操作により 103 μ g の高純度のヒト EC-SOD を精製することができた。精製酵素の N-結合型糖鎖を外し、酵素活性とヘパリン親和性を調べたところ、ともに増加していた。マウス EC-SOD のヘパリン親和性ドメインに二種類の変異を導入した（Glu237Lys および 236KERKKRRRESEC => KERKKRRRESECKEKKRRRESEC）結果、ともにヘパリン親和性が野生型に較べて増加していた。N-結合型糖鎖の結合位置を付け替えた二つの変異体（N121Q/Q207N and N121Q/S234N）では、ともにヘパリンに対する親和性が野生型に較べ変化していた。これらの結果から、EC-SOD の糖鎖修飾は酵素の機能と局在を決める上で重要であり、抗酸化酵素薬として実用化する上で、EC-SOD の N-結合型糖鎖の変換の重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recombinant extracellular superoxide dismutases were purified and the heparin affinity was investigated. 104 micrograms of the wild-type human enzyme was purified from 473mL of cultured medium of recombinant EC-SOD expressing cell line HECY6-7 through three steps of chromatography, heparin-affinity, hydroxyapatite, and gel-filtration. Removing the N-glycan reduced reactivity of ConA, and increased both of specific activity and heparin affinity of the enzyme. Two mutation studies at heparin binding domain (substitution of amino acid, Glu237Lys and doubling basic amino acid cluster, KERKKRRRESEC => KERKKRRRESECKEKKRRRESEC) gave rise to higher heparin binding EC-SOD. Another two mutation that moved the position of N-glycan (N121Q/Q207N and N121Q/S234N) affected the heparin affinity nature of the enzyme. These results suggest that the structure and position of N-glycan play an important role in the function and localization of EC-SOD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
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：社会医学・衛生学

キーワード：予防医学

1. 研究開始当初の背景

インスリン抵抗性と脂肪細胞機能異常を背景とした動脈硬化性血管疾患の危険因子重積状態としてメタボリック症候群が定義され、注目されている。高齢化社会において Quality of Life の向上は個人の幸福を実現するのみならず、医療・介護に掛かるコストを効率的に削減する手段としても有効と考えられ、新たな疾患概念の定義は『メタボ』という言葉とともに国民の健康に対する意識を大いに向上したという点で極めて有意義である。一方、メタボリック症候群の病態的な裏付けとして、各々の危険因子の相互の因果関係について必ずしも十分な知見は得られていない。メタボリック症候群の構成要素となる肥満、耐糖能異常、高血圧、高脂血症は、いずれも生活習慣病としてすでに取りあげられ、それぞれの病態に酸化ストレスが強く関与することが指摘されている。肥満では内臓脂肪の蓄積が重視されるが、増殖した脂肪組織は活発な代謝がおこなうことで活性酸素の発生源となるのみならず、TNF- α を含む様々なアディポサイトカインの分泌が促され、炎症の惹起とそれに伴う酸化ストレスの亢進の原因となる。また、糖尿病による高血糖状態は、タンパク質の糖化反応を促進させ、それ自体が活性酸素の発生源となり糖尿病合併症を増悪させるのに加え、糖化反応生成物が抗酸化酵素の活性低下や断片化をもたらす。高脂血症は、酸化LDLを増加させ、さらに活性酸素による血管内皮傷害は動脈硬化性プラーク生成の引き金をひくことが知られており、酸化ストレスはメタボリック症候群における脳虚血、虚血性心疾患の病態に重要な役割を果たすと考えられる。

スーパーオキシドジスムターゼ (Superoxide dismutase; SOD) はスーパーオキシド(O_2^{\bullet})を代謝する主要な抗酸化酵素であり、生体の酸化ストレス制御に重要な役割を担っている。ほ乳類では局在の異なる三種類のアイソザイム(細胞質型:CuZnSOD、ミトコンドリア型:Mn-SOD、細胞外型:EC-SOD)が知られている。研究代表者らは早くから高血糖状態における酸化ストレスに注目し、細胞質型SODが糖化反応により活性が低下し、さらには断片化を受けることを明らかにし (Ookawara T et al, J Biol Chem. 1992;267(26):18505-10.)、糖尿病の重要な合併症である網膜症、白内障などの因果関係について報告してきた (Kawamura N, Ookawara T, et al, J Clin Endocrinol Metab. 1992; 74(6):1352-4.)。研究代表者らは、引き続き細胞外型SOD(extracellular SOD; EC-SOD)に着目し分子構造、組織内局在を明らかにし、運動、肥満、脳虚血等との係わりを報告してきた。(Ookawara T et al, Am J Physiol, 1998;275(3 Pt 1):C840-7.) EC-SODは分泌型酵素として、細胞外腔で活性酸素を代謝

することに加え、血管平滑筋層に蓄積し、 O_2^{\bullet} の代謝を介して一酸化窒素(NO)の寿命を調節し酸化ストレスと血圧調節の仲介役を演じるとされ、血管病変との係わりがとくに注目される。研究代表者らは、酸化ストレスがマウス脂肪前駆細胞でEC-SODの細胞内局在に影響することを明らかにしているが、そのメカニズムは不明である (Ookawara T et al, Biochem Biophys Res Commun, 2003;303:914-9.)。また、通常は4量体のEC-SODが8量体に変換されるとヘパリン親和性が高まることが明らかとなり、タンパク質の四次構造が EC-SOD の分布に影響する可能性が示唆された。本研究では、酸化ストレスとメタボリック症候群の間に3つの接点を想定した。

(1) EC-SODはメタボリック症候群で亢進する酸化ストレスから血管内皮を保護する役割を担う。

(2) 脂肪組織は最も高いEC-SOD発現を示す臓器であり、肥満モデルのob/obマウスは血中EC-SODの異常高値を示す。(Nakao C, Ookawara T, et al., Free Radic Res, 2000;33, 229-41)

(3) EC-SODは血管壁に局在し一酸化窒素代謝に直接関与するばかりでなく、HB-EGF(ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子)など、血管増殖性の増殖因子シグナルを抑制する。(Nishimura M, Ookawara T et al., Free Radic Res, 2006; 40, 589-95)

以上の点から、EC-SODは、メタボリック症候群と酸化ストレスの関連を理解する上で極めて重要なポジションに位置していると考えられる。

2. 研究の目的

高血圧、動脈硬化、血管スパズムなどの治療に抗酸化酵素を活用するため、より優れた薬物動態を示す分子設計を行う上でEC-SODは優れた素材であると考えられる。そこで、以下の2点を明らかにすることを目標として実験を実施した。

(1) EC-SODの細胞内局在における糖鎖修飾の役割を明らかにする。

(2) ヘパリン親和性部位の改変により血管指向性の高ヘパリン親和性 EC-SOD を作製する。

3. 研究の方法

(1) 組換えヒトEC-SOD発現細胞の作製と組換えタンパク質の精製
類粘膜細胞より ISOHAIR kit (NIPPON GENE) を用いてヒトゲノムDNAを抽出し、PCR法を用いてOpen reading frame全長を含むエキソン3を増幅した。pBluescriptベクターにクローニングし、塩基配列を確認ののち、哺乳細胞発現ベクターのpcDNA3.1に再クローニングした。

リポフェクション法でCHO-K1細胞に遺伝子導入しウエスタンブロット法で発現を確認したのち、ジェネティシンG418で選択し、恒常的発現細胞[HECY6-7、HECY7-3]をクローニングした。コンフルエントに達した組み換え型ヒトEC-SOD発現細胞[HECY6-7]に2%FBSを加えたD-MEM/F12培地で72時間培養し、培養上清を得た。ろ紙でろ過後ヘパリンセルロファイナカラムに添加し、NaClによりグラジエント溶出した。活性画分をヒドロキシアパタイトカラムに添加し、リン酸カリウムのグラジエントにより溶出した。この活性画分を濃縮のちSuperose12カラムに添加し精製組み換え型EC-SODを得た。得られた精製酵素を濃縮し、最終容量200 μ lとした。またBCA法によるタンパク定量、チトクロームC法による活性測定を行った。

(2) 組換えEC-SODの糖鎖除去と糖鎖機能解析 PNGaseF (Peptide-N-glycosidase F Peptide-N4-(acetyl-beta-glucosaminyl)-asparagine amidase)は、糖タンパク質からすべてのタイプのN-グリカン型糖鎖を加水分解する活性を持つ。100pmolのヒトEC-SODを10UのPNGase Fで消化し(37 $^{\circ}$ C、over night)N結合型糖鎖を除去した。反応時間経過ごとにサンプリングを行い、抗EC-SOD抗体を用いたWestern blotting (WB)法、及びConA-HRPを用いたLectin blotting (LB)法で解析し、ECL試薬により検出した。ただしWB法・LB法においてEC-SODは7.5pmol/laneとし、WBに用いた一次抗体はrabbit anti mouse EC-SOD抗体、二次抗体はanti rabbit HRP抗体を使用した。

(3) ヘパリン結合部位変異型EC-SOD発現と解析

既にクローン済みのマウスEC-SOD遺伝子のヘパリン結合部位にinversePCR法を用いて変異を導入した。PCR産物はpBluescriptベクターにクローニングし配列の確認の後にpcDNA3.1ベクターに組み換えて発現ベクターとし、CHO-K1細胞に発現させ、恒常的な発現細胞クローンを選択した。培養上清を遠心分離のち20mM TrisHCl, pH7.4で平衡化したHiTrap-HeparinHPカラムに添加し同緩衝液で洗浄の後1MまでのNaClのグラジエントにより溶出した。分画をチトクロームc法によるSOD活性測定、およびSDS-PAGEと抗EC-SOD抗体を用いたウエスタンブロット法で変異型酵素の溶出部位を決定しヘパリン親和性を評価した。

(4) 糖鎖結合部位移し替え変異型EC-SODの発現と解析

inverse PCR法により、クローン済みのマウスEC-SOD遺伝子のN型糖鎖付加部位の121AsnをGlnに変異させることで糖鎖付加部位を潰し、さらに酵素の活性中心近傍の207GlnをAsnに変異させることで新たなN型糖鎖結合部位 AsnAlaSerを導入した

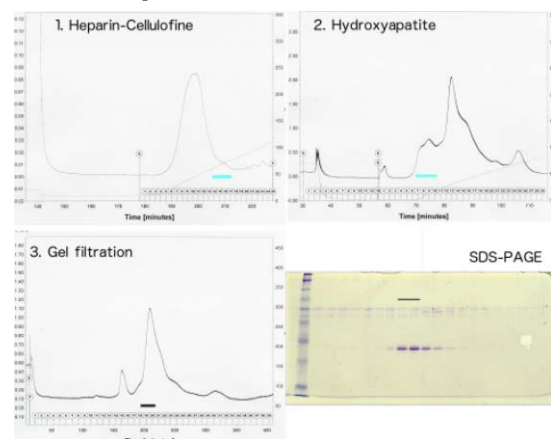
(N121Q/Q207N)。また、同様にAsn121Gln

変異体のヘパリン結合部位直近の234Serを234Asnに変異させることで新たなN結合型糖鎖結合部位を持つ変異体(N121Q/S234N)を作製した。cと同様に恒常的発現細胞のクローニングと変異体の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 組み換え型ヒトEC-SODの精製 (Fig. 1)

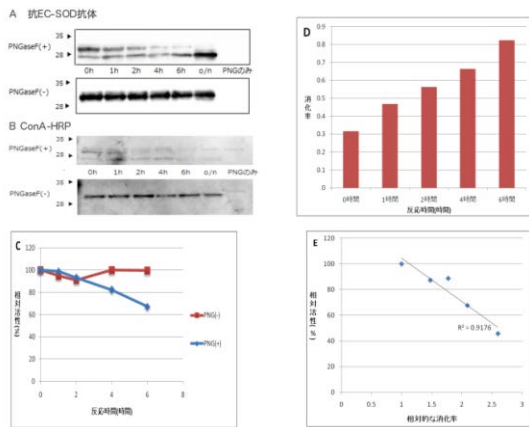
恒常的ヒトEC-SOD発現細胞株HECY6-7の72時間培養上清(2%FCS加MEM/F12)を回収し、ヘパリンセルロファイナ、ヒドロキシアパタイト、ゲルろ過の三段階のカラム操作で組み換え型ヒトEC-SODを精製した。ヘパリンセルロファイナは20mM TrisHCl pH7.4で平衡化したカラムに試料を添加し同緩衝液で洗浄後、1MまでのNaClのリニアグラジエントにより溶出した。ヒドロキシアパタイトは5mMリン酸カリウムpH7.4にて平衡化し0.4Mまでのリン酸カリウムpH7.4によりリニアグラジエントにて溶出した。活性画分を限外濾過法による濃縮のちSuperose12カラムに添加し分画した。



【Fig. 1】組換えヒトEC-SODの精製

473mlの培養上清より0.104mgの純度の高いヒトEC-SODが得られ、比活性は3836.5U/mgで他のEC-SODとほぼ同程度の値を持っていた。組み上げた精製系は室温下で3段階のカラム操作で24時間以内に終了し、簡便で有効な方法である。また、発現させた細胞はチャイニーズハムスター由来であるが、糖鎖形成における翻訳後修飾はさまざまな生物種において共通であることが知られており、分子量や活性測定においても同様の特性を示したことから、本研究の素材として適切である。

(2) ヒトEC-SODの糖鎖改変と機能解析結果の概要をFig. 2に示す。



【Fig. 2】 組み換え形ヒト EC-SOD の PNGaseF による糖鎖除去

A: PNGaseF処理により、約30kDaのEC-SODの経時的な減少がみられ脱糖鎖型の約27kDaに変化し、over nightの反応でほぼすべてのEC-SODが脱糖鎖型となった。B: LBにより約27kDaのバンドはConAとほとんど反応せず、脱糖鎖型に変換されたことが明らかになった。なお、約31kDaにみられるバンドはPNGaseFの糖鎖にConAが結合した結果と考えられる。C: PNGaseFによる糖鎖の除去でEC-SODの活性が反応時間の経過とともに減少した。D: PNGaseFによる脱糖鎖反応の程度をグラフで示した。E: PNGaseF消化にともない、脱糖鎖EC-SODの活性の低下がみられた。

N結合型糖鎖の除去により、EC-SODの活性の低下がみられ、ヒトEC-SODのN結合型糖鎖が酵素活性に関与することが明らかになった。研究代表者らは、マウスEC-SODの糖鎖構造解析で多くはシアル酸を含むことを報告している。

(Glycocon J, (3-4): 2011, 183-96.) 陰電荷を帯びるシアル酸を含んだN結合型糖鎖が除去されたことで、活性酸素に対する反応性が低下したと仮定すると、シアリダーゼを用いてN結合型糖鎖におけるシアル酸のみを除去する、あるいは付加させるような実験を行うことで、N結合型糖鎖の電荷が酵素活性に影響するか可能性を考察できると考えられる。糖鎖除去によるヘパリン親和性変化の解析結果をFig. 3に示す。



【Fig. 3】 N結合性糖鎖の除去とヘパリン親和性の変化

PNGaseF処理により糖鎖が除去されたEC-SOD (PNGaseF(+))とコントロール (PNGaseF(-))

をそれぞれヘパリン親和性カラムに添加し、溶出画分を比較した。糖鎖を持つEC-SODは、NaCl [0.375-0.75 (mol/l)] に溶出された。一方で、N結合型糖鎖を除去したヒトEC-SODではNaCl [0.675-0.875 (mol/l)] で溶出され、脱糖鎖型EC-SODはヘパリンに対する親和性に上昇がみられた。

(3) EC-SODのヘパリン結合部位の改変とヘパリン親和性

マウスEC-SODのヘパリン結合部位に以下の変異を導入した。

① Glu237Lysの置換によりヘパリン結合部位の塩基性アミノ酸数をひとつ増加させる。

(KERKKRRR =>KKRKKRRR)

② 237Lysから248Cysの部分挿入し、ヘパリン結合部位をタンデムに2つ並べる。

(KERKKRRRESEC =>

KERKKRRRESECKEKKKRRRESEC)

これらの変異を導入した発現ベクターを恒常的に発現する細胞を各々クローニングし、①についてはYS8, 2についてはN36細胞を得た。各々の培養上清から、ヘパリン親和性カラムによる粗精製で組み換え型EC-SODのヘパリン親和性を検討した。野生型EC-SODがヘパリンカラムよりNaClのリニアグラジエントで溶出される際の電気伝導度は55.5mS/cm付近であるのに対し、Glu238LysのYS8では70.4mS/cm、ヘパリン結合部位タンデムのN36では92.0mS/cmの位置に溶出され、ともにヘパリン親和性が野生型より高くなることが明らかとなった。

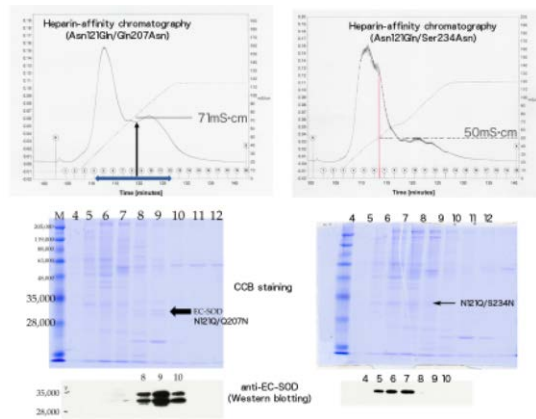
糖鎖の付け替えとヘパリン親和性

Asn121Gln変異により野生型EC-SODに存在するN結合型糖鎖付加部位を破壊したうえで、

① Gln207Asn変異を導入することでN型糖鎖付加部位を活性中心直後に移動させる。

② Ser234Asn変異を導入することでN型糖鎖付加部位をヘパリン結合部位の直前に移動させる。

これらの変異EC-SODを発現させ、ヘパリン親和性カラムの溶出条件からヘパリン親和性の変化について検討した。糖鎖付加部位をAsn121からGln207Asnに移動させた場合はヘパリン親和性カラムの溶出は電気伝導度71mS/cmで、酵素のヘパリンに対する親和性は野生型(55mS/cm)より増加していた。一方、Asn121からSer234Asnに糖鎖を移動させた場合はヘパリン親和性カラムから活性画分は50mS/cm付近に溶出され、ヘパリン親和性は野生型より低下がみられた。結果をFig. 4に示す。



【Fig. 4】N-結合型糖鎖を付け替えた変異体のヘパリン親和性変化

これらの結果から、EC-SOD のもつ N 結合型糖鎖の位置は EC-SOD のヘパリン親和性の強さに影響することが示唆された。EC-SOD はジスルフィドダイマーをプロトマーとした 4 量体を形成しており、ヘパリン親和性には 4 次構造が重要とされる。実際、二量体となるラットの EC-SOD は低ヘパリン親和性であることが知られている。また、ヒト EC-SOD のなかで 8 量体を形成するものが高ヘパリン親和性を示すとする報告もある。本研究における糖鎖結合部位の移動がヘパリン親和性に与える影響は、一つには糖鎖構造による立体障害がヘパリン親和性部位とリガンドの相互作用に影響する可能性、もう一つは糖鎖修飾が EC-SOD の 4 次構造に影響する可能性である。

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 5 件)

- ① Ihara K, Fujiwara N, Yamaguchi Y, Torigoe H, Wakatsuki S, Taniguchi N, Suzuki K., Structural switching of Cu,Zn-superoxide dismutases at loop VI: insights from the crystal structure of 2-mercaptoethanol-modified enzyme. Biosci Rep, 査読有, 32(6): 2012, 539-48. doi: 10.1042/BSR20120029.
- ② Yoshihara D, Fujiwara N, Kato S, Sakiyama H, Eguchi H, Suzuki K., Alterations in renal iron metabolism caused by a copper/zinc-superoxide dismutase deficiency. Free Radic Res, 査読有, 46(6): 2012, 750-7. doi: 10.3109/10715762.2012.673223.
- ③ Korekane H, Korekane A, Yamaguchi Y, Kato M, Miyamoto Y, Matsumoto A, Hasegawa T, Suzuki K, Taniguchi N, Ookawara T., N-Glycosylation profiling of recombinant mouse extracellular superoxide dismutase produced in Chinese hamster ovary cells. Glycoconj J, 査読

有、 (3-4): 2011, 183-96. doi: 10.1007/s10719-011-9333-6.

④ Kizaki T, Maegawa T, Sakurai T, Ogasawara JE, Ookawara T, Oh-ishi S, Izawa T, Haga S, Ohno H., Voluntary exercise attenuates obesity-associated inflammation through ghrelin expressed in macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 413(3): 2011, 454-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.117.

⑤ Eguchi H, Fujiwara N, Sakiyama H, Yoshihara D, Suzuki K., Hydrogen peroxide enhances LPS-induced nitric oxide production via the expression of interferon beta in BV-2 microglial cells. Neurosci Lett, 査読有, 494(1): 2011, 29-33. doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.047.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河原 知水 (OOKAWARA TOMOMI)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号: 50330452

(2) 研究分担者

是金 敦子 (KOREKANE ATSUKO)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号: 80461169

(3) 連携研究者

藤原 範子 (FUJIWARA NORIKO)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10368532

鈴木 敬一郎 (SUZUKI KEIICHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70221322