

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 20 日現在

機関番号：17401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20117005

研究課題名（和文）活性酸素シグナル受容体蛋白質の分子制御：蛋白質 S-グアニル化プロテオミクス

研究課題名（英文）ROS signaling sensing via unique post-translational modification

研究代表者

赤池 孝章 (AKAIKE TAKAAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20231798

研究分野：複合新領域

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、シグナル伝達、プロテオーム、酸化ストレス、生理活性

1. 研究計画の概要

活性酸素シグナル伝達の分子機構は充分理解されていない。活性酸素・NO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、センサーと直接反応するのか？あるいは、二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かった。本研究では、活性酸素・NOの新しい2次メッセンジャーとして発見された8-nitro-cGMPに焦点を当て、その細胞内生成の制御メカニズム、ならびに8-nitro-cGMPによるシグナル伝達機構を明らかにし、活性酸素のシグナルセンシング機構を解明する。8-Nitro-cGMPによるシグナル伝達機能では、特に8-nitro-cGMPによる新しい蛋白質翻訳後修飾である蛋白質S-グアニル化の標的蛋白質の同定と、機能制御メカニズムを明らかにする。

2. 研究の進捗状況

本研究課題では、活性酸素・NOの新しい2次メッセンジャーである8-nitro-cGMPに焦点をあて、その細胞内生成ならびにシグナル伝達機構について解析を行ない、これまでに下記の点を明らかにした。

(1)8-nitro-cGMPの細胞内生成:8-Nitro-cGMPに対する高感度検出法として、質量分析に基づく安定同位体希釈法を確立した。それにより細胞内に従来予想されていたよりも遥かに高く、かつNOのシグナル分子として発見されたcGMP(1998年度ノーベル生理学・医学賞受賞の対象)をも凌駕する濃度の8-nitro-cGMPが生成していることが明らかとなった。この成果は、cGMPとは独立した機構により8-nitro-cGMPのシグナル機構が制御されてい

ることを示唆しており、新しいシグナル分子の発見として、国内外の関連分野にて高い評価を受けた。

(2)8-nitro-cGMPによるシグナル伝達機構:8-nitro-cGMPによる蛋白質S-グアニル化の標的蛋白質として、Keap1に着目し、S-グアニル化によってNrf2制御性の抗酸化シグナルが誘導されること、その結果、酸化ストレスに対する適応応答が亢進することを明らかにした。また、Keap1のS-グアニル化修飾部位として、これまでほとんど報告がなかったシステイン434番残基を同定し、Keap1/Nrf2シグナルの新しい制御機構の存在を示唆する結果を得た。

3. 現在までの達成度

「①当初の計画以上に進展している。」

当初の研究計画に対して順調に成果が得られている。特に、安定同位体希釈法によるcGMP関連化合物の高感度定量法の開発によって、8-nitro-cGMPの細胞内制御機構の一端が明らかになりつつあり、その成果は活性酸素、NO関連分野の科学者より高い評価を得ている。これら成果を、当該分野で最も大きな国際学会の一つである国際NO学会(2010年6月、京都)にて発表したところ、Murad博士(NOのシグナル機能の発見で1998年ノーベル生理学・医学賞受賞)より、高い評価を受けた。あわせて、この成果について論文発表(J Biol Chem誌)したが、その成果により、国際会議への招待講演の依頼が相次いでいる(Gordon Research Conferenceなど)。

4. 今後の研究の推進方策

本研究課題の後半2年間では、動物細胞のみならず植物細胞における8-nitro-cGMPの

生成制御とS-グアニル化蛋白質の同定を推進し、生物種を超えたシグナル伝達の共通原理の解明を目指す。具体的には、下記の4つの項目について重点的に研究を推進する。

- (1) S-グアニル化プロテオミクスの確立：S-グアニル化蛋白質の新しい網羅的解析法を開発する。
- (2) ミトコンドリアS-グアニル化蛋白質の解析：上記プロテオミクス法を駆使して、ミトコンドリアにおけるレドックス感受性標的蛋白質を同定し、ミトコンドリアにおけるシグナル伝達機能を明らかにする。
- (3) 神経シナプトソーム蛋白質のS-グアニル化とシナプス機能調節機構の解析：神経細胞における8-nitro-cGMP生成メカニズムと、それによる開口放出制御機構を明らかにする。
- (4) 植物気孔閉鎖シグナルにおける8-nitro-cGMPの生成制御とS-グアニル化蛋白質の同定：植物の気孔閉鎖シグナルにおける8-nitro-cGMPの機能を、上記分析手法を駆使して解析する。

5. 代表的な研究成果

(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30件)

- ① Ihara, H., Ahmed, K.A., Ida, T., Kasamatsu, S., Kunieda, K., Okamoto, T., Sawa, T., Akaike, T. Methodological proof of immunochemistry for specific identification of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formed in glia cells. *Nitric Oxide*, in press. [査読有り]
- ② Fujii, S., Sawa, T., Ihara, H., Tong, K., Ida, T., Okamoto, T., Ahtesham, A. K., Ishima, Y., Motohashi, H., Yamamoto, M., 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. [査読有り]
- ③ Akaike, T., Fujii, S., Sawa, T., Ihara, H. Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. *Nitric Oxide*, 23: 166-174, 2010. [査読有り]
- ④ Sawa, T., Arimoto, H., Akaike, T. Regulation of redox signaling involving chemical conjugation of protein thiols by nitric oxide and electrophiles. *Bioconjugate Chem.* 21: 1121-1129, 2010. [査読有り]

- ⑤ Zaki, Md. H., Fujii, S., Okamoto, T., Islam, S., Khan, S., Ahtecham, K., Sawa, T., Akaike, T. Cytoprotective function of heme oxygenase-1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis. *J. Immunol.* 182: 3746-3756, 2009. [査読有り]

[学会発表] (計62件)
(招待講演のみ記載)

- ① Akaike, T. Cellular signaling by nitrated cyclic nucleotides and regulation of its biological effects. *Gordon Research Conference on Nitric Oxide*, February 17, 2011 (Ventura, CA, USA).
- ② Akaike, T. Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. *International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine*, January 21, 2011 (Kyoto, Japan).
- ③ Akaike, T. Protein S-guanylation: a new post-translational regulation for redox signaling. *The 20th World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto*, May 14, 2010 (Kyoto, Japan).
- ④ Akaike, T. Nitric oxide and electrophilic signaling mediated via 8-nitro-cGMP. *SFRR International Free Radical School in Japan 2009*, September 3, 2009 (Niigata, Japan).
- ⑤ Akaike, T. New NO signaling via 8-nitro-cGMP formation and protein S-guanylation. *5th Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research Australia and Japan*, December 4, 2009 (Sydney, Australia).

[図書] (計3件)

- ① Okamoto, T., Zaki, M.H., Fujii, S., Sawa, T., Akaike, T. Transworld Research Network, T.C., Nitric Oxide Synthase Inhibitors: From Animal Studies to Clinical Implications (Tunctan, B., Editor), 2011, in press.
- ② 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)、羊土社、2009、241 ページ。
- ③ 澤 智裕、赤池孝章、診断と治療社、酸化ストレスの医学、2008、384 (138-146)。

[その他] ホームページ (<http://www.ros-signal.jp/>) を開設し、積極的に情報発信を行った。