

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590605

研究課題名（和文） EC-SOD の抗酸化作用と生活習慣病の動脈硬化予防

研究課題名（英文） Anti-oxidative effect of EC-SOD and prevention of atherosclerosis in lifestyle-related diseases.

研究代表者

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

研究成果の概要：EC-SOD はヘパリンに対し親和性を持ち、血管平滑筋に分布する抗酸化酵素である。EC-SOD は血管を酸化ストレスから保護し、一酸化窒素の寿命を調節することで、血圧の調節に関与しており、EC-SOD の機能、分布の異常と高血圧発症の係わりが注目される。本研究により、EC-SOD 遺伝子の発現において複数の転写開始点が使われ、なおかつ翻訳レベルをネガティブに調節する領域が 5'-UTR 存在することが明らかとなった。また、リコンビナントマウス EC-SOD を用いた実験で、N 末端側のプロセッシングにより EC-SOD がヘパリン親和性の高い 8 量体を形成することが明らかとなった。8 量体 EC-SOD は血管壁に効率よく分布することが期待されることから、組織指向性の高い抗酸化酵素として EC-SOD を高血圧の治療、予防に応用する可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
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：(1) EC-SOD (2) 酸化ストレス (3) 動脈硬化 (4) 生活習慣病 (5) 一酸化窒素 (6) 血管平滑筋

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスによる血管内皮傷害、および酸化 LDL の増加は泡沫細胞の浸潤と活性化による活性酸素の発生の増加をもたらし、動脈硬化の病態に悪循環を形成する。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は、ビタミン E、ビタミン C などの抗酸化物質と並び、抗酸化酵素として生体で最も重要な位置を占める。

EC-SOD (extracellular superoxide dismutase; 細胞外型 SOD) は血管病変との係わりで注目すべき第三の SOD アイソザイムである。EC-SOD は分泌型酵素であることに加え、ヘパリン類似物質に対して親和性を持ち、プロテオグリカンなど細胞外基質に結合することで組織表面に局在する。従来、EC-SOD の役割として、血管内皮表面に結合し酸化スト

レスから内皮を保護することが想定されていた。

研究代表者らは、マウス、およびヒト肺より EC-SOD を精製し、特異抗体を作成した。マウスに対しては免疫組織染色と ELISA により、ヒトに対しては臨床検体として得られた血液サンプルに対する ELISA により、組織分布と細胞内分布、血中濃度を調べ、以下のような EC-SOD の特徴を明らかにした。

(1) 分泌型にもかかわらず大部分は組織中に局在する。

(2) 多くの臓器の血管壁の平滑筋層に多量の蓄積がみられる。

(3) 一部の細胞では核に局在を認め、酸化ストレスにより細胞内局在が変化する。

(4) マウスの一時的な脳虚血に対する耐性は EC-SOD 発現に依存する。

(5) 肥満により血中 EC-SOD は著名な増加を示す。

(6) 有酸素トレーニングを積んだアスリートは、血中 EC-SOD 濃度が有意に低下する一方で、激しい運動で強い酸化ストレスを負荷すると、血中濃度は反応性に増加する。来たる超高齢化社会では高血圧、動脈硬化が生活習慣病の基礎疾患として有病率がさらに高まることが予想され、国民の QOL に決定的な影響を与えることから、動脈硬化の病態を分子レベルで解明し発症と進行を抑制する予防法・治療法の確立は急務である。

## 2. 研究の目的

内皮由来血管弛緩因子としての一酸化窒素

(NO) は、酸化ストレス下でスーパーオキシドと反応し寿命が著しく短縮するのみならず、毒性の強いペルオキシナイトライトを生じ血管傷害をもたらす。また、酸化ストレスは血管平滑筋にへパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子 (HB-EGF) などの増殖因子を誘導し動脈硬化を促進する。血管平滑筋層に局在する EC-SOD は酸化ストレスの抑制に加え、NO による血管弛緩作用の増強、ペルオキシナイトライト発生の抑制、さらに血管の増殖性シグナル抑制の 4 つの経路で血管保護作用を発揮すると考えられる。本研究では、EC-SOD の臨床的な応用に向けて (1) EC-SOD の翻訳調節機構 (2) より高い血管指向性をもつ「super EC-SOD」の分子設計をおこなうことで血管保護と血圧調節に対する EC-SOD の役割について明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

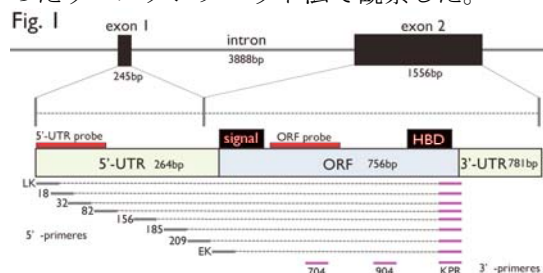
(1) EC-SOD の翻訳調節機構に関する検討

### ① ベクターの構築と細胞培養

RT-PCR 法、およびゲノムを鋳型にした PCR 法により、様々な長さの 5' -UTR を含む EC-SOD の cDNA を作成し、pcDNA3.0 ベク

ターに挿入した。(Fig. 1) リポフェクション法にて CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、48 時間後の培養上清と細胞のライセート中の EC-SOD 発現量を抗 EC-SOD 抗体を用いたウエスタンブロット法で観察した。His タグ付き lacZ 発現ベクターを共導入し、抗 His 抗体を用いたウエスタンブロットを遺伝子導入効率の検定のために行った。

EC-SOD の 5'-UTR 部分の作用を確かめるため、5'-UTR 配列を GFP 発現ベクター (pEGFP) の 5'側につなぎ、GFP の発現に及ぼす影響を蛍光顕微鏡と抗 GFP 抗体を使ったウエスタンブロット法で観察した。



### ② in vivo における 5'-UTR の転写レベルの検討

マウスの腎臓、肺、脂肪組織より RNA を抽出し、RT-PCR、およびノーザンブロット法を行った。RT-PCR は 904 プライマーを GSP として逆転写反応を行い、704 プライマーと 5'-プライマーの組み合わせで PCR を行を行った。Northern blotting は、2μg の RNA をホルマリン変性ゲルで泳動し、ナイロン膜に転写後、5'-UTR プローブ、または ORF プローブでハイブリダイゼーションをおこなった。用いたプローブの位置は Fig.1 に示した。

### (2) 高へパリン親和性 EC-SOD

#### ① 恒常的 EC-SOD 発現細胞の作成

pcDNA3.0 発現ベクターにマウス EC-SOD cDNA を組み込んで CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、恒常的マウス EC-SOD 発現細胞 (CHO-EK) を作成した。DMEM/F12 (2%FSC) で大量培養をおこない、コンフルエントに達した後に 72 時間培養後、培養上清を回収した。

#### ② リコンビナント EC-SOD の精製

培養上清を遠心後、へパリンカラムに添加し、カラムを十分に洗浄後 NaCl でグラジエント溶出をおこなった。得られた SOD 活性画分を濃縮し、ゲル濾過カラムに添加しほぼ純粋な EC-SOD 画分を得た。

#### ③ リコンビナント EC-SOD の解析

精製した EC-SOD のへパリン親和性をへパリンカラムによる親和性アッセイにより、分子量をゲル濾過法により決定する。分子内、分子間のジスルフィド結合について、2-メルカプトエタノールによるジスルフィド還元の影響を SDS-PAGE を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

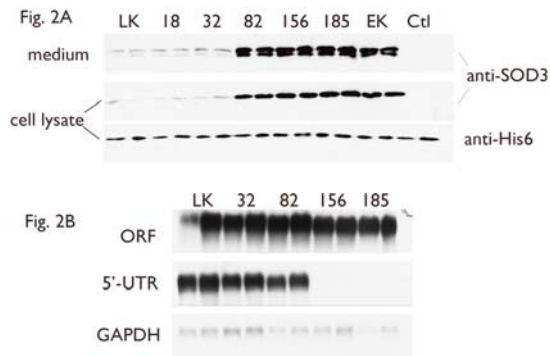
##### (1) EC-SOD 遺伝子の翻訳調節

マウス EC-SOD mRNA は 264bp のかなり長い 5' 非翻訳領域 (5'-UTR) をもつ。EC-SOD 遺伝子において、5'-UTR の長さが翻訳レベルに与える影響について検討した。

##### ① 5'-UTR の長さが EC-SOD 翻訳効率に及ぼす影響

様々な長さの 5'-UTR をもつ EC-SOD 遺伝子を組み込んだ発現ベクター (Fig. 1 参照) を CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、48 時間後の培養上清中、および細胞ライセートの EC-SOD 含量をウエスタンブロットで検討した。(Fig. 2A) 翻訳開始点より 32-82 塩基の間で EC-SOD の発現レベルは大きく変化した。細胞より RNA を抽出し 5'-UTR の長さが EC-SOD の転写レベルに影響しないことを Northern blotting で確認した。

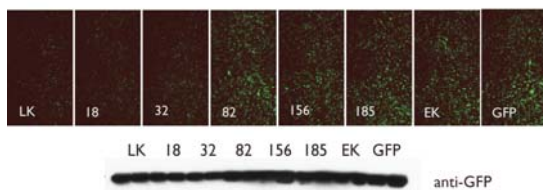
(Fig. 2B) His タグ付き LacZ 発現ベクターは遺伝子導入効率のコントロールに用いた。これらの結果より、EC-SOD の 5'-UTR の長さは翻訳効率に影響しており、翻訳開始点から 82 塩基の間に翻訳効率を低下させる配列が含まれていると考えられる。



##### ② マウス EC-SOD の 5'-UTR は GFP の発現を抑制する

様々な長さの EC-SOD の 5'-UTR を pEGFP-N ベクターに繋ぎ、CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、GFP の発現に対する影響を蛍光顕微鏡とウエスタンブロット法で観察した。(Fig. 3) EC-SOD と同様、GFP の発現も EC-SOD の 5'-UTR の長さの影響を受け、翻訳開始点から 83 塩基までの間の配列により抑制的に調節を受けることが明らかとなった。

Fig. 3



##### ③ マウス組織に発現する EC-SOD mRNA の構造

RT-PCR と Northern blotting により、マウス腎臓、肺、脂肪組織中の EC-SOD 遺伝子発現を検出した。5 種類の 5' プライマーによる増幅結果から、完全長をコードしている mRNA は僅かであり、少なくとも 82 塩基以上 5'-UTR が短縮しているものが多数を占めることが明らかになった。(Fig. 4A)

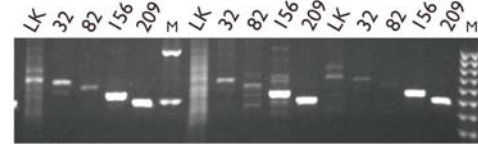


Fig. 4A

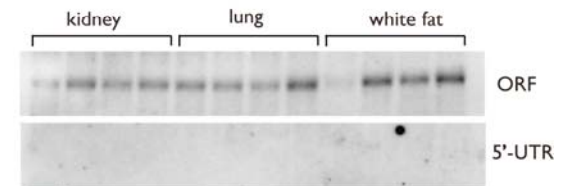


Fig. 4B

ORF 内部と 5'-UTR のそれぞれに設定した 2 種類のプローブ (Fig. 1 参照) を用いた Northern blotting で、それぞれの臓器から抽出した mRNA に含まれる EC-SOD の転写産物のなかに 5'-UTR プローブと結合するのはほとんど検出できなかった。(Fig. 4B) 以上の結果より、長い 5'-UTR は転写のレベルに影響せずに EC-SOD の発現量を明らかに低下させたことから、5' 末端の 30-80 塩基の範囲に翻訳レベルを負に調節する構造の存在が示唆された。組織中の EC-SOD 転写産物は 5'-UTR の翻訳開始点全長を含むものに比べて、より短い 5'-UTR をもつものが多く存在していた。マウス EC-SOD は翻訳翻訳レベルでの抑制が掛かるものと掛からない 2 種類の転写産物を生ずる複数の翻訳開始点が存在する可能性が示唆されたが、その生理的な意味づけについてはさらなる検討が必要である。

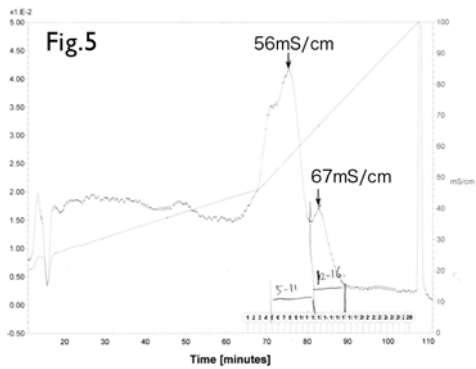
##### (2) 高ヘパリン親和性 EC-SOD

##### ① リコンビナント EC-SOD 精製

二段階のカラム操作により、1 liter 培養上清より約 4 mg の EC-SOD が得られた。

##### ② ヘパリン親和性クロマトグラフィー

ヘパリンに対する親和性が異なる 2 つのピークが出現した。56 mS/cm に溶出される画分は従来の高ヘパリン親和性画分に相当し、64 mS/cm に溶出される画分はよりヘパリンに対する親和性が高い EC-SOD である。(Fig. 5)



③ ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定  
各々の画分を集めて濃縮し、ゲル濾過カラムに添加した。67mS/cm画分(黒)は102分(約250kDa, 8量体)で溶出され、56mS/cm画分(赤)は111分(130kDa, 4量体)で溶出された。

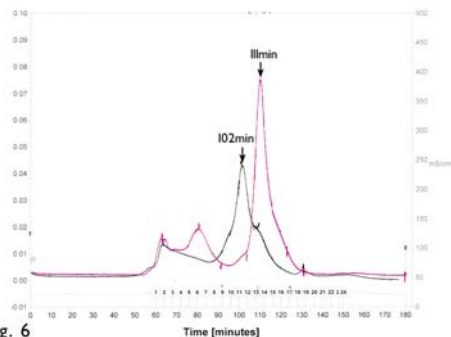


Fig. 6

④ 2-Meによる還元の影響  
精製酵素を用いてSDS-PAGEをおこなった。(Fig. 7A)

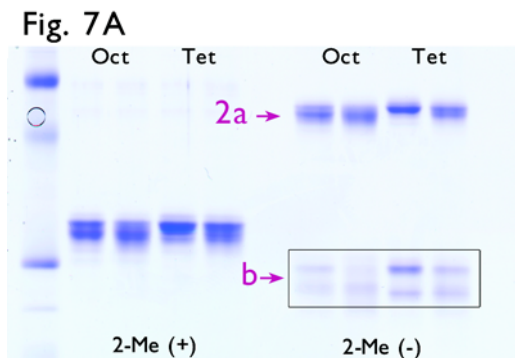
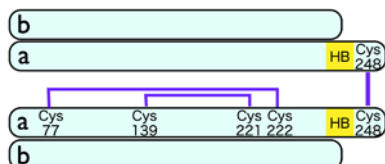


Fig. 7B



還元条件下のSDS-PAGEにより精製EC-SODは様々なプロセッシングを受けた混合物であることが明らかとなった。非還元条件下のSDS-PAGEの結果より、4量体、8量体ともに

ジスルフィドダイマー(2a)と様々な分子内ジスルフィド結合をもったサブユニット

(b)の混合物であることが明らかとなった。両者を比較すると、8量体の方が易動度の大きいものの占める割合が多いことから、N-末端の切断を受けている可能性がある。また、EC-SODはサブユニット当たり1カ所のN結合型の糖鎖修飾を受けることが知られており、分子の4次構造に対する糖鎖修飾の影響は現在検討中である。

## 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4件)

- ① 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.* 査読有り、2009 (印刷中)
- ② Hitomi Y, Watanabe S, Kizaki T, Sakurai T, Takemasa T, Haga S, Ookawara T, Suzuki K, Ohno H. Acute exercise increases expression of extracellular superoxide dismutase in skeletal muscle and the aorta. *Redox Rep.* (査読有り) 13, 2008, 213-6.
- ③ 大野秀樹, 木崎節子, 櫻井拓也, 大河原知水, 鈴木敬一郎, 新時代の糖尿病学(2) 病因・診断・治療研究の進歩 スーパーオキシドジスムターゼ. *日本臨牀*, (査読無し) 66(増刊4), 2008, 351-354.
- ④ Fujiwara N, Nakano M, Kato S, Yoshihara D, Ookawara T, Eguchi H, Taniguchi N, Suzuki K. Oxidative modification to cysteine sulfonic acid of Cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol Chem.* (査読有り) 282, 2007, 35933-44.

[学会発表](計7件)

- ① 是金敦子, Extracellular Superoxide Dismutase (EC-SOD)の糖鎖構造解析. 第81回日本生化学会大会、2008年12月9日-12日、神戸市
- ② 吉原大作, 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81回日本生化学会大会、2008年12月9日-12日、神戸市
- ③ Fujiwara, N 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、2008年5月25日～30日、Lucca, Italy Fujiwara, N 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、2008年5月25日～30日、Lucca, Italy

- ④ 吉原大作 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、2008年6月19-20日、京都市
- ⑤ 藤原範子 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、2008年6月19-20日、京都市
- ⑥ 大河原知水、EC-SOD の細胞内分布に対する酸化ストレス、一酸化窒素の影響. 第8回日本 NO 学会学術集会、2008年5月10日、仙台市
- ⑦ Yoshihara, D. GSTA4-4 as a biomarker of oxidative stress in renal tubular cells. Biomarkers of Oxidative Stress in Health and Diseases (BOSHD2008)、2008年1月16日～19日、Osaka

〔図書〕(計1件)

- ① 鈴木敬一郎, 藤原範子, 大河原知水 (2008) 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, 東京, 23-30.

## 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・准教授  
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 (FIJIWARA 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