

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791069  
 研究課題名（和文） Aktのレドックス制御を介した心筋保護メカニズムの  
 分子生物学的解析  
 研究課題名（英文） Molecular biological analysis of myocardial preservation  
 via redox regulation of Akt  
 研究代表者  
 村田 寛明（HIROAKI MURATA）  
 長崎大学・大学病院・助教  
 研究者番号：90437856

## 研究成果の概要：

Akt は酸化ストレスにより一過性にリン酸化されると同時に、活性部位近傍に存在する還元型の cysteine297 と cysteine311 は酸化され S-S 結合を形成する。変異解析の結果より Akt 分子は cysteine297 および cysteine311 のいずれもが還元型として存在している状態でのみ、酸化ストレスに反応してリン酸化され、活性化されることを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 0       | 1,700,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 450,000 | 3,650,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：Akt, レドックス, 酸化ストレス

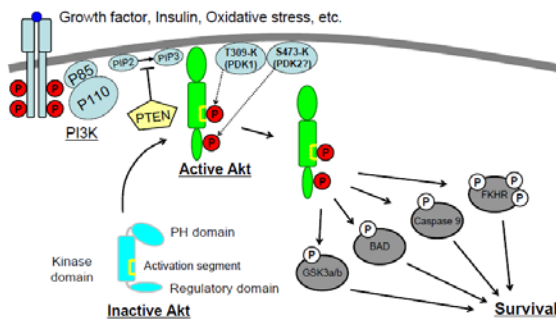
## 1. 研究開始当初の背景

Akt の活性化は虚血再還流障害などの心筋障害に対し保護効果をもたらすとされる。一般に、Akt は serine および threonine のリン酸化を介して活性化され、脱リン酸化されることで不活性化されることが知られている。近年、生体においてタンパク質の cysteine-SH 基は種々の細胞機能発現に重要であるとさ

れている。Akt に関してもその立体構造解析から、不活性化された状態では活性部位付近の cysteine-SH 基が酸化されていることが明らかにされた (cysteine297 と cysteine311 の分子内 S-S 結合)。以上のことより、Akt のリン酸化・脱リン酸化の制御には cysteine-SH 基の酸化還元 (レドックス) 状態が関与している可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

Akt は一般的にリン酸化されることにより活性化されることが知られている (図1)。本研究の目的はAkt の cysteine-SH 基のレドックス状態の制御とリン酸化調節の関連を明らかにすることで、Akt signaling pathway を介した心筋保護機構の新たな制御方法に関する分子生物学的な知見を得ることである。

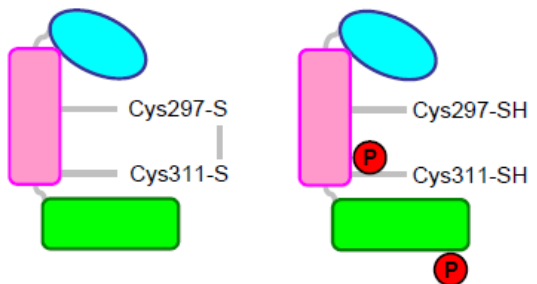


(図1) Akt signaling pathway

## 3. 研究の方法

(1) 変異解析の手法を用いた、Akt 活性化との関連をもつ cysteine-SH 基の同定。

Akt 分子内には複数個の cysteine が存在するため、これらについて変異解析を行えるように mutant Akt cDNA を準備した。しかし、過去の構造解析による報告から、不活性型の Akt 分子は cysteine297 と cysteine311 に S-S 結合を形成していることが明らかにされた

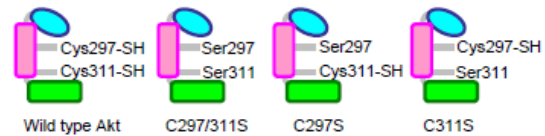


Inactive Akt

Active Akt ?

(図2) 不活性型 Akt 分子内の S-S 結合形成

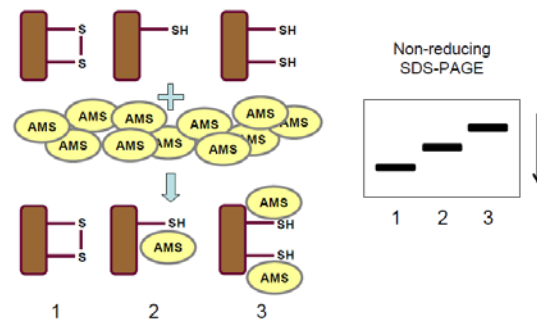
(図2) ため、まずは cysteine297 および cysteine311 を両者ともあるいはそれぞれ単独で serine に置換した3種類の変異タンパク (図3) 発現用の Myc-tagged mutant Akt cDNA (C297/311S, C297S, C311S) を中心に解析を開始した。



(図3) Myc-tagged mutant Akt cDNA

(2) Western blot 法を用いた cysteine-SH 基のレドックス状態について解析。

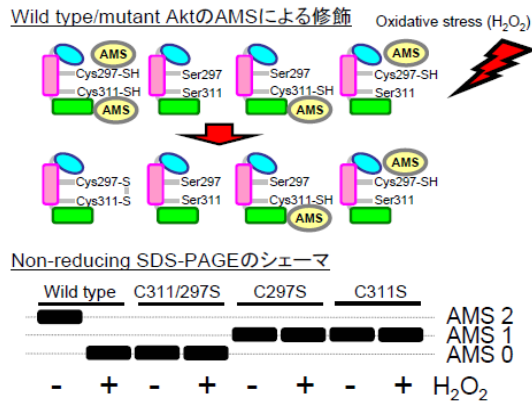
4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid (AMS) は、還元型 cysteine-SH 基に結合することはできるが、SH 基が酸化修飾を受け S-S 結合などを形成すると結合できない。この特性を用いて、タンパク分子のレドックス状態を Non-reducing Western blot 法にて解析することができる。つまり、AMS の結合したタンパクは分子量が大きくなり、電気泳動 (SDS-PAGE) の際に移動度が小さくなる (図4)。



(図4) AMS によるタンパク質 SH 基の修飾と Non-reducing Western blot 法による検出

この手法を用いて、上述の Myc-tagged wild type/mutant Akt cDNA を発現させた心筋芽細

胞由来の H9c2 細胞に酸化ストレスを加え、①cysteine297 および cysteine311 は細胞内では還元型として存在すること、②酸化ストレスにより Akt の cysteine297 と cysteine311 が分子内 S-S 結合を形成することを確認した (図 5)。



(図 5) Akt 分子の酸化ストレスによる修飾

(3) 免疫沈降法を用いた、cysteine-SH 基のレドックス状態と Akt リン酸化の関連についての解析

H9c2 には内在性の Akt 分子が存在する。そこで、遺伝子導入により発現させた wild type/mutant Akt のみを抽出してリン酸化状態や酵素活性を選択的に評価するために、免疫沈降法を用いた。発現ベクターには Myc-tag という標識を付加しており、抗 Myc-tag 抗体を用いると、標的とするタンパクを選択的に抽出できる。すなわち、本研究では内在性の Akt 分子を除外し、発現ベクターによって細胞内に発現させた Myc-tagged Akt 分子のみを抽出することで、解析を進めた。

(4) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた Akt 分子の細胞内局在についての観察

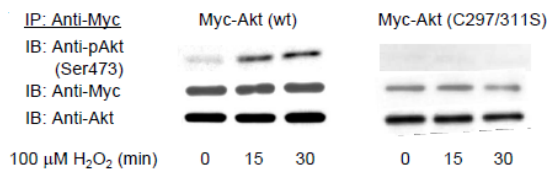
Akt は細胞質タンパクであるが、図 1 に示すように、活性化刺激が加わると細胞膜近傍に recruit されてリン酸化を受けるといわれている。そこで、遺伝子導入により発現させた Myc-tagged wild type/mutant Akt の酸化ストレスによる細胞内局在の変化について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析することとした。

(5) 過酸化酸素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) による酸化ストレス

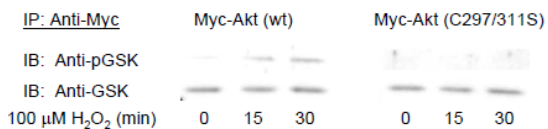
Akt のリン酸化を誘導する酸化ストレスとして H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度および投与時間については、予備実験の結果より、確実にリン酸化を誘導しつつ、短時間での細胞死をもたらさない条件として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度を 100 μM に設定した。この条件では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与後 10 分程度で Akt のリン酸化をもたらすが、60 分までは明らかな細胞死は生じない。

#### 4. 研究成果

心筋芽細胞由来の H9c2 細胞に Myc-tagged wild type/mutant Akt を導入し、100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化ストレスを加えた。投与後、15 分および 30 分でサンプリングを行い、抗 Myc 抗体による免疫沈降法を用いて、導入した Myc-tagged wild type/mutant Akt のみを抽出した。その結果、Akt は cysteine297 および cysteine311 のいずれもが還元型として存在している状態でのみ酸化ストレスに反応してリン酸化され (図 6)、kinase 活性も上昇する (図 7) ことが明らかとなった。Akt のリン酸化は抗リン酸化 Akt 抗体を用いた Western blot 法で、kinase 活性は Akt の基質である GSK3 のリン酸化で評価した (図はいずれも mutant Akt の代表として C297/311S のみ表示)。



(図6) Akt リン酸化と *cysteine297* および *cysteine311* の酸化還元状態との関連



(図7) Akt の kinase 活性と *cysteine297* および *cysteine311* の酸化還元状態との関連

さらにMyc-tagged wild type/mutant Aktの酸化ストレスによる細胞内局在の変化について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。その結果、wild type Aktは30分の100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>投与により細胞膜に集積する傾向にあり、mutant Aktでは細胞膜への集積が少ない傾向にあったが、両者の間に有意な差は確認できなかった。

以上のように、Akt 分子のレドックス制御がその活性調節に関与していることが示唆されるデータが得られた。

## 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0件)

[学会発表] (計3件)

1 Hiroaki Murata, Chiaki Inadomi, Koji Sumikawa: Redox regulation of Akt is crucial for its cardioprotective effect.

International Anesthesia research Society  
2010 Annual Meeting, March 21, 2010  
(Honolulu).

2 Chiaki Inadomi, Yoshito Ihara, Hiroaki Murata, Koji Sumikawa, Takahito Kondo: Cardioprotective effects of glutaredoxin 1 induced by suppressing S-nitrosylation of GAPDH. American Society of Anesthesiologists 2008 Annual meeting, October 19, 2008 (Orlando).

3 稲富 千亜紀, 井原 義人, 村田 寛明, 澄川 耕二, 近藤 宇史: Glutaredoxin protects nitric oxide-induced apoptosis and suppresses the oxidative modification of GAPDH. 第80回日本生化学会大会, 2007年12月14日(横浜)。

[図書] 計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 寛明 (HIROAKI MURATA)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 90437856

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者