

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年2月27日現在

機関番号：17301
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2009～2010
課題番号：21890193
研究課題名（和文） 心筋細胞における抗アポトーシス効果：グルタレドキシンによる酸化還元制御の解析
研究課題名（英文） Antiapoptotic effect of glutaredoxin in myocardiac cells induced by regulating the redox state of GAPDH.
研究代表者
稲富 千亜紀 (INADOMI CHIAKI)
長崎大学・大学病院・助教
研究者番号：20508444

研究成果の概要(和文):細胞において glycerinaldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) は活性部位のシステイン基が nitric oxide (NO)により S-ニトロシル化されると核移行し、アポトーシスを起こすことが知られている。ラット心筋芽細胞 H9c2 のコントロール細胞では NO 刺激による細胞死は濃度依存性に増加したが glutaredoxin1 (GRX1)過剰発現細胞(H9c2-GRX)では抑制されていた。H9c2-GRX では GRX1 が GAPDH の S-ニトロシル化を抑制しており、また H9c2-GRX ではコントロール細胞と比較して NO 刺激による GAPDH の核移行が少なかった。以上より GRX1 が GAPDH の S-ニトロシル化を抑制し抗アポトーシス効果を発揮している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): It is known that NO induced S-nitrosylation of GAPDH elicits its nuclear translocation and causes apoptotic cell death. In H9c2-control cells, NO-induced cell death increased dose-dependently compare to GRX1-overexpressed rat myocardiac H9c2 cells (H9c2-GRX). We revealed that GRX1 suppressed S-nitrosylation of GAPDH in H9c2-GRX. In addition, NO-induced nuclear translocation of GAPDH was decreased in H9c2-GRX compared to H9c2 control cells. These data suggest that GRX exerts the antiapoptotic effect by suppressing the S-nitrosylation of GAPDH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：酸化ストレス、心筋保護、循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

glutaredoxin1 (GRX1)は哺乳類の細胞の細胞質に存在することが知られており、タンパク質の遊離システイン基の酸化還元状態を制御することで酸化ストレスから生体を保護する働きを持つ。GRX1が抗アポトーシス効果を持つことが知られているが、その詳細な機構については明らかにされていない。近年、解糖系酵素である glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の活性部位にあるシステイン残基のチオール基が酸化ストレスや nitric oxide (NO)によるストレスでジスルフィド結合や S-ニトロシル化などの修飾を受け、アポトーシスの進行に関与していることが示唆されている。

また、GRXもその一つであるチオレドキシンプファミリーのなかの thioredoxin (TRX) に脱ニトロシル化の作用があることが報告されているが、GRXに関してはまだ明らかにはなっていない。さらに、タンパクの脱ニトロシル化はタンパクのリン酸化やユビキチン化のリバースに匹敵すると考えられており、タンパクの脱ニトロシル化の制御を解明することは非常に重要である。

我々は GAPDH が GRX1 の標的分子である可能性を示すデータを得ており、GAPDHの酸化還元状態制御を介した GRX1 による細胞保護機構を分子生物学的に解明することは、アポトーシスに関連した様々な病態の治療に結びつく基礎的な知見を得るものである。

2. 研究の目的

GAPDH の S-ニトロシル化によるアポトーシスの誘導と GRX1 の抗アポトーシス効果との関連について明らかにする。

(1) ラット心筋芽細胞 H9c2 コントロール細胞(H9c2-control)と H9c2-GRX1 過剰発現細胞(H9c2-GRX)での GAPDH の核移行と酸化還元状態との関連を比較・解析する。

(2) GRX1 による GAPDH の酸化還元制御による抗アポトーシス効果を解析する。

3. 研究の方法

(1) GRX によるアポトーシス効果

NO ストレスによる細胞のアポトーシスを GRX が抑制するかどうか、H9c2-control と H9c2-GRX において NO ドナー投与下に 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)アッセイと

terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)アッセイを用いて評価する。

(2) GAPDH の核移行の検出

通常は細胞内に広く分布している GAPDH が、酸化修飾あるいは NO による S-ニトロシル化によって核に移行するかどうか、H9c2-control と H9c2-GRX で NO ドナーの投与下における GAPDH の局在を、免疫蛍光抗体染色法を用いて比較検討する。

(3) GRX1 による GAPDH の酸化還元制御による抗アポトーシス効果の解析

NO ドナー投与下での GAPDH のシステイン残基の修飾を in vivo において 4-acetamide-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfide acid (AMS)を用いた遊離 SH 基の修飾法で検出を行い、H9c2-GRX では GRX1 の過剰発現が GAPDH のシステイン残基の修飾を抑制し酸化還元状態を制御しているかを検討する。

4. 研究成果

(1) GRX1 によるアポトーシス効果

①MTT アッセイにおいてラット心筋芽細胞 H9c2 のコントロール細胞(H9c2-control)では NO ドナーである S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP)投与による 24 時間後の細胞死は濃度依存性に増加したが、これと比較して glutaredoxin1 (GRX) 過剰発現細胞 (H9c2-GRX)では抑制された。

②TUNEL アッセイにおいて、200 μ M SNAP の投与による 72 時間後の細胞のアポトーシスは H9c2-control と比較して H9c2-GRX では抑制された。

以上の結果より、GRX1 が NO 刺激による H9c2 細胞のアポトーシスを抑制していることが明らかになった。

(2) GAPDH の核移行の検出

H9c2-control と H9c2-GRX で SNAP の投与下における GAPDH の局在を、免疫蛍光抗体染色法を用いて比較検討した。H9c2-control では SNAP 投与により GAPDH が核移行した細胞が増加したが、H9c2-GRX では GAPDH の細胞内分布の著

明な変化は認められなかった。
このことから、GRX1 が何らかの機構で NO 刺激による GAPDH の核移行を抑制している可能性が示唆された。

(3) GRX1 による GAPDH の酸化還元制御による抗アポトーシス効果の解析

①H9c2-control と H9c2-GRX で SNAP の投与後にシステインのニトロシル化抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、H9c2-control ではシステインのニトロシル化が検出されたが H9c2-GRX では検出されなかった。GRX1 がシステインのニトロシル化を抑制することが示された。

②AMS を用いた遊離システイン基の修飾法を用いて *in vitro* での NO 刺激による GAPDH の酸化還元状態における GRX システムの関与を明らかにした。還元型のウサギ GAPDH を SNAP で処理すると GAPDH のシステイン基は修飾を受けるが、GRX システム (GRX1、還元型/酸化型グルタチオン、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/グルタチオン還元酵素) の存在下では GAPDH のシステイン基は時間依存性に還元された。

以上より、GRX1 が GAPDH のシステイン残基の修飾を抑制し酸化還元状態を制御していることが示唆された。

これまでの実験の結果より、H9c2 細胞において GRX1 は GAPDH の S-ニトロシル化を抑制することにより細胞の核移行とそれによるアポトーシスを抑制していることが示唆された。これらの結果をまとめた論文の作成は終了し、近日中に投稿予定である。

近年、GRX を中心とした内在性抗酸化物質による細胞保護機構及び抗アポトーシス効果に関する研究が盛んに行われている。今回の研究対象とした GAPDH はアポトーシス関連分野で注目されている重要なタンパク質である。本研究は GRX1 による酸化還元状態の制御を介した GAPDH の機能調節を解明するという点で非常に独創性が高く、重大な課題であると考えられる。

また、チオレドキシシンファミリーの TRX については脱ニトロシル化の作用を持つことが報告されているが GRX1 の脱ニトロシル化の作用に関してはまだ明らかにはなっていない。今回の実験では同じチオレドキシシンファミリーの GRX1 にも脱ニトロシル化の作用があるという重要な結果が得られた。

今後は、分子間のシステイン基間に生じ

るジスルフィド結合やタンパク分子のシステイン基と酸化型グルタチオンとの間で形成される S-glutathionylation を還元する作用を持つ GRX が、これまでに同定されているこのような酸化修飾を受けるタンパク質のシステイン基の酸化還元状態をどのように制御しているか解析することにより、新たな GRX の標的分子を同定することが必要である。

以上より、本研究は今後アポトーシスに関連した虚血性心疾患をはじめとした様々な病態に対する新しい治療法に関する基礎的な知見を得る上で、非常に重要であると考え

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲富 千亜紀 (INADOMI CHIAKI)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：20508444

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：