

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590066

研究課題名(和文) iNOSが分解されないマウスの作製とそれを用いたiNOS分解系の生理機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the physiological function of iNOS degradation system by generating mice in which the SPSB inhibitor is expressed throughout the body

研究代表者

西屋 禎(Nishiya, Tadashi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80399831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：SPSBと基質との結合を特異的に阻害するSPSB inhibitorを全身の細胞で発現するマウスの作出を試みた。SPSB inhibitor発現遺伝子が導入されたF1マウスが複数匹得られたが、いずれのマウスの腎臓及び肝臓からもSPSB inhibitorの発現を確認することはできなかった。この実験と並行して我々はiNOS以外のSPSBの基質としてCDC14A、CTTNBP2ならびにFOG-2を見出した。これらの基質は、細胞周期、心・肺の発達、ならびに神経細胞機能など広範囲の生理機能に関与する分子であることから、SPSBの基質の分解異常は、マウスの発生に重大な影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We attempted to generate the mice expressing SPSB inhibitor which blocks the association between SPSB and its substrates. Although several F1 mice in which the SPSB inhibitor-expressing gene was introduced were obtained, SPSB inhibitor was not detected in kidneys and livers from these mice. In parallel to this experiment, we identified CDC14A, CTTNBP2 and FOG-2 as novel substrates for SPSB. These substrates are involved in wide variety of physiological functions such as cell cycle control, development of heart and lung, and the dendritic spine formation. Therefore, the inhibition of the degradation of these substrates might cause serious problems for mouse development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：SPSB iNOS CDC14A FOG-2 CTTNBP2 E3 ユビキチン化 蛋白質分解

1. 研究開始当初の背景

酵素の活性は、その「発現」「触媒活性」、そして「分解」により制御される。誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) は、定常的には発現していないが、細菌感染や炎症反応により、その誘導が起こる。iNOS は、他の NOS アイソフォームと異なり、Ca²⁺ による活性制御を受けない。したがって、いったん発現すると、常に活性型であり、分解されない限り NO を合成し続ける。このように、iNOS 発現後は、「分解」が最も重要な iNOS の活性制御機構となる。iNOS による過剰な NO 産生は、生体において良悪両面の顔を持つ。iNOS は細胞内寄生細菌に対して強力な殺菌作用を示す一方、その過剰な NO 産生は自己の細胞にも傷害を与え、さらにその著しい血圧低下作用が相まって、敗血症性ショックを起こす引き金となっている。したがって、生体に対する iNOS の有益性と有害性のバランスは、iNOS が発現する細胞及び組織における NO 産生量、つまりは iNOS 蛋白質の寿命に大きく依存する。

これまでに申請者は、SPRY domain and SOCS Box-containing protein (SPSB) が iNOS をユビキチン-プロテアソーム依存的分解へ導くことを明らかにしている。しかしながら、SPSB が駆動する iNOS 分解が、iNOS の生理作用の有益性と有害性をどのように規定し、両者のバランスをいかに調節しているのかは、未解決のままである。

2. 研究の目的

申請者は iNOS の N 末端側 1-118 アミノ酸部分の過剰発現が、iNOS と SPSB の結合を阻害し、これにより iNOS が分解されなくなることを見出している。本研究では、この発見を応用し、iNOS が分解されないマウス (iNOS の N 末端側 1-118 アミノ酸部分 (以下、SPSB inhibitor) を全身の細胞で発現するマウス) を作出する。そして、このマウスを用いて、iNOS が関与する重要な生理反応における iNOS 分解系の役割を明らかにし、感染症や敗血症の治療を目的とした新しい薬物作用点としての iNOS 分解系の可能性を探るための研究を展開する。

3. 研究の方法

(1) SPSB inhibitor を全身の細胞で過剰発現するマウスの作出

SPSB inhibitor を全身の細胞で発現するトランスジェニックマウス (Tg マウス) は、全身で iNOS の寿命が著しく延びる、いわゆる iNOS 長寿命型マウスとなることが予想される。そこで、この Tg マウスを作出するための発現コンストラクトの作製を以下の手順で行った。まず、ヒト β -actin プロモーターと SV40 polyA から構成される pFRTZ vector の BamHI サイトに、SPSB inhibitor

をコードする cDNA をサブクローニングした。この際に、SPSB inhibitor の C 末端側に FLAG タグ配列を付与した。このプラスミドを HindIII/AatII で消化し、得られた 5.7 kbp 断片、すなわち、ヒト β -actin プロモーター-SPSB inhibitor^{FLAG}-SV40 polyA 断片を精製し、HEK293T 細胞にトランスフェクションして、SPSB inhibitor の発現をイムノブロットにより確認した。その後、断片を Tg マウス作出委託先である日本 SLC へ送った。

(2) ファウンダーマウスのジェノタイピング

日本 SLC から送られてきた 38 匹分のファウンダーマウス (F₀ マウス) の尾から、常法に従ってゲノム DNA を回収し、以下のプライマーを用いて PCR を行い、ヒト β -actin プロモーター-マウス SPSB inhibitor^{FLAG}-SV40 polyA 遺伝子断片が導入されたマウスの同定を行った。Upper primer: 5' -ctg cat gtg aca tcg acc-3', lower primer: 5' -cac cag acc aac tgg taa tgg tag cg-3'。

(3) F₁ マウスにおける SPSB inhibitor の発現確認

F₀ マウスと野生型の C57BL/6 マウスを掛け合わせて得られた F₁ マウスについて、(2) と同様の方法でジェノタイピングを行い、SPSB inhibitor 発現遺伝子が導入された F₁ マウスを同定した。そのマウスから腎臓と肝臓を採取し、細胞抽出液を調製してイムノブロットを行い、SPSB inhibitor の発現を検討した。

(4) SPSB の新規基質候補の網羅的探索

SPSB 認識配列 (D(E)-I(L)-N-N-N) を持つヒト蛋白質を Blast search により検索した。次に、Blast search でヒットしたヒト蛋白質の中から、SPSB 認識配列が他の哺乳動物においても保存されている蛋白質を、Clustalw2 プログラムを用いて検討した。最後に、細胞質に局在する蛋白質、もしくは SPSB 認識配列が細胞質領域にある膜蛋白質を、SOSUI プログラム及び PSORTII プログラムを用いて検討した。以上の条件をすべて満たした蛋白質を SPSB の基質候補蛋白質とした。

(5) 基質候補蛋白質の生化学的解析

HEK293T 細胞に基質候補蛋白質と SPSB を、異なるタグを付けて発現させ、その細胞から調製した細胞抽出液を、各タグの抗体を用いた免疫沈降にかけて、基質候補蛋白質と SPSB との結合を検討した。また、各基質候補蛋白質の寿命はシクロヘキシミドチエイズアッセイにより検討した。

4. 研究成果

本研究の具体的成果・結果を箇条書きで以下に示す。

(1) SPSB inhibitor 発現遺伝子を 282 個の胚にマイクロインジェクションし、10 匹の仮親マウスに移植し、38 匹（雄 15 匹、雌 23 匹）のマウスを得た。

(2) (1) で得たマウスをジェノタイプングした結果、6 匹（雄 3 匹、雌 3 匹）において SPSB inhibitor 発現遺伝子の導入が確認された。

(3) (2) で得た F₀ マウスを野生型の C57BL/6 マウスと掛け合わせ、得られたマウスをジェノタイプングした結果、SPSB inhibitor 発現遺伝子の導入が確認された F₁ マウスを複数匹得た。

(4) (3) で得られたマウスの腎臓及び肝臓を採取し、細胞抽出液を調製して、抗 FLAG 抗体を用いたイムノプロットを行った結果、SPSB inhibitor の発現を確認できるマウスは得られなかった。

(5) D(E)-I(L)-N-N-N 配列を有するヒト蛋白質を Blast search した結果、17 種類の蛋白質がヒットした。この中から、SPSB 認識配列がヒト以外の動物においても保存されているかどうか検討した結果、6 種類の蛋白質に絞り込まれた。この中で、細胞質蛋白質または細胞質領域に SPSB 認識配列を持つ膜蛋白質を調べた結果、iNOS、CDC14A、CTTNBP2 および FOG-2 の 4 種類の蛋白質に絞り込まれた。iNOS を除く 3 つの蛋白質を SPSB 基質候補蛋白質とした。

(6) CDC14A および CTTNBP2 は SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 と結合することを共免疫沈降法により確認した。一方、FOG-2 は SPSB1 ~ SPSB4 全てに結合することを確認した。

(7) CDC14A と SPSB との結合には、CDC14A のアミノ酸 530-534 番目に存在する ELNNN という配列が重要であり、CDC14A の Asn-533 を Ala に置換した CDC14A 変異体は SPSB に結合しないことを明らかにした。

(8) CTTNBP2 と SPSB との結合には、CTTNBP2 のアミノ酸 1640-1644 番目に存在する EINN 配列が重要であり、CTTNBP2 の Asn-1643 を Ala に置換した CTTNBP2 変異体は SPSB に結合しないことを明らかにした。

(9) FOG-2 と SPSB1、SPSB2、及び SPSB4 との結合には、FOG-2 のアミノ酸 134-138 番目に存在する DLNNN という配列が重要であり、FOG-2 の Asn-138 を Ala に置換した

CTTNBP2 変異体はこれらの SPSB に結合しないことを明らかにした。一方、この変異体は、SPSB3 には普通に結合することがわかった。

(10) SPSB1、SPSB2 及び SPSB4 存在下で、CDC14A、CTTNBP2 及び FOG-2 の著しい分解が起こることを明らかにした。

(11) CDC14A、CTTNBP2 及び FOG-2 の SPSB 依存的分解は、プロテアソーム阻害薬の MG-132 により顕著に抑制された。

(12) SPSB に結合しない CDC14A、CTTNBP2 及び FOG-2 の変異体では、SPSB1、SPSB2 及び SPSB4 存在下で分解の更新は見られなかった。

(13) SPSB1、SPSB2 及び SPSB4 存在下で、CDC14A、CTTNBP2 及び FOG-2 のユビキチン化体のレベルが増大することを明らかにした。

本研究において、SPSB inhibitor 発現遺伝子が導入された Tg マウスは得られたが、そのマウスの腎臓及び肝臓の抽出液から SPSB inhibitor の発現を確認することはできなかった。この実験と並行して、SPSB の新規基質を、バイオインフォマティクスを用いて網羅的に探索した。この過程で、数種類の基質候補蛋白質が絞り込まれ、それらについて詳細な生化学的解析を行った結果、CDC14A、CTTNBP2 及び FOG-2 が SPSB の基質であることを明らかにした。これらの基質は、細胞周期や心・肺・雄の性腺の発達、神経細胞樹状突起スパイン形成に関与することが明らかにされている。従って、SPSB inhibitor を発現する Tg マウスが得られなかった原因として、iNOS を含むこれらの蛋白質の寿命が適切に制御されない場合に、マウスの発生に重大な影響を与える可能性が示唆された。今後の展開として、SPSB inhibitor の可逆的発現系を用いた Tg マウスの作出を考えている。

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. Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiva T, Nakamura S, Takeda Y, Dobashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K : NKG2D⁺IFN- γ ⁺CD8⁺T cells are responsible for palladium allergy. **PLoS**

One 9(2):e86810. 査読有

2. Asano H, Horinouchi T, Mai Y, Sawada O, Fujii S, **Nishiva T**, Minami M, Katayama T, Iwanaga T, Terada K, Miwa S : Nicotine- and Tar-Free Cigarette Smoke induces cell damage through reactive oxygen species newly generated by PKC-dependent activation of NADPH oxidase. **J. Pharmacol. Sci.** 118(2), 275-287, 2012. 査読有
3. Horinouchi T, Higa T, Aoyagi H, **Nishiva T**, Terada K, Miwa S : Adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A signaling pathway inhibits endothelin type A receptor-operated Ca^{2+} entry mediated via TRPC6 channels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 340(1), 143-151, 2012. 査読有
4. Horinouchi T, Terada K, Higa T, Aoyagi H, **Nishiva T**, Suzuki H, Miwa S : Function and regulation of endothelin type A receptor-operated transient receptor potential canonical channels. **J. Pharmacol. Sci.** 117(4), 295-306, 2011. 査読有
5. *Numajiri N, *Takasawa K, ***Nishiva T**, Tanaka H, Ohno K, Hayakawa W, Asada M, Matsuda H, Azumi K, Kamata H, Nakamura T, Hara H, Minami M, Lipton S, Uehara T : On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of PTEN. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 108(25), 10349-10354, 2011. ***Equal contribution.** 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1. **西屋禎**, 丸山拳, 高澤孔明, 浜田恭平, 上原孝 : 新規 E3 ユビキチンリガーゼ ECS(SPSB)の基質同定, 第 134 回日本薬学会年会, 熊本大学, 熊本市, 2014 年 3 月 30 日
2. **西屋禎**, 丸山拳, 高澤孔明, 浜田恭平, 上原孝 : E3 ユビキチンリガーゼ ECS(SPSB)の新規基質の網羅的探索, 第 87 回日本薬理学会年会, 仙台国際センター, 仙台市, 2014 年 3 月 19 日
3. **西屋禎**, 丸山拳, 高澤孔明, 浜田恭平, 松本一馬, 小笠原康悦, 三輪聡一, 上原孝 : E3 ユビキチンリガーゼ “ECS(SPSB)” の新規基質の網羅的同定, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 神戸市, 2013 年 12 月 5 日
4. **西屋禎**, 丸山拳, 松本一馬, 小笠原康悦, 三輪聡一, 上原孝 : SPSB ファミリー蛋白質を介した CDC14A phosphatase のユビキチン - プロテアソーム依存的分解機構, 第 86 回日本薬理学会年会, 福岡市, 2013

年 3 月 23 日

5. **西屋禎**, 松本一馬, 小笠原康悦, 三輪聡一, 上原孝 : CDC14A は Elongin B/C-Cul5-SPSB 型 E3 ユビキチンリガーゼの基質である, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡市, 2012 年 12 月 16 日
6. 松本一馬, **西屋禎**, 前川聡, 堀之内孝広, 藤室雅弘, 小笠原康悦, 上原孝, 三輪聡一 : 誘導型 NO 合成酵素のユビキチン・プロテアソーム依存的分解制御機構, 第 25 回北海道薬物作用談話会, 酪農学園大学中央館学生ホール, 江別市, 2011 年 7 月 30 日
7. **西屋禎**, 前川聡, 松本一馬, 堀之内孝広, 藤室雅弘, 小笠原康悦, 上原孝, 三輪聡一 : 誘導型 NO 合成酵素の分解制御機構, 第 11 回日本 NO 学会, 昭和薬科大学, 東京, 2011 年 5 月 13 ~ 14 日

〔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〕
ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
西屋 禎 (NISHIYA TADASHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 80399831

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし