

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791715

研究課題名(和文) グルタレドキシンの酸化還元制御と心筋細胞における抗アポトーシス効果の解析

研究課題名(英文) Antiapoptotic effect of glutaredoxin in cardiomyocytes by inducing changes in the cellular redox system.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：glutaredoxin (GRX)は生体においてタンパク質のシステイン基を酸化ストレスから保護することが知られている。ラット心筋細胞H9c2のglutaredoxin 1(GRX1)過剰発現細胞(H9c2-GRX)ではコントロール細胞(H9c2-control)と比較してNO刺激によるアポトーシスとGAPDHの酵素活性低下が抑制され、さらにGAPDHの核移行とGAPDHのS-ニトロシル化が抑制されていた。以上よりGRX1がNOによるGAPDHのシステイン残基のS-ニトロシル化を抑制し酸化還元状態を制御することやGAPDHの核移行を抑制することでアポトーシスを抑制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 glutaredoxin (GRX) protects cells from oxidative stress by regulating the redox state of certain proteins. In GRX1-overexpressed rat myocardial H9c2 cells (H9c2-GRX), nitric oxide (NO)-induced apoptosis and decreasing of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) activity was suppressed compare to H9c2-control cells (H9c2-control). Furthermore, under NO stimulation, nuclear translocation of GAPDH and S-nitrosylation of protein was suppressed in H9c2-GRX compare to H9c2-control. These data suggest that the overexpression of GRX1 could protect cardiomyocytes against NO-induced apoptosis, likely through the inhibition of the oxidative modification and the nuclear translocation of GAPDH.

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

GRX はチオレドキシンスーパーファミリーの一つであり、種々の細胞機能発現に重要なタンパク質の遊離チオール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している。そのなかの一つである GRX1 は哺乳類の細胞の細胞質に存在し、抗アポトーシス効果を持つことが知られている。

解糖系酵素である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) はその活性部位のシステイン残基の SH 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、アポトーシスへの過程に関与していることが報告されている。同じチオレドキシンスーパーファミリーの thioredoxin (TRX) は脱ニトロシル化の作用があることが報告されているが、GRX1 に関してはまだ明らかになっていない。

我々は GAPDH が GRX1 の標的分子であることを示すデータを得ており、GRX1 による GAPDH の脱ニトロシル化を含む酸化還元状態の制御を解明することは、アポトーシスの機序とそれに関連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られる。

2. 研究の目的

NO 刺激下での GAPDH の S-ニトロシル化によるアポトーシスの誘導と GRX1 の酸化還元状態の制御による抗アポトーシス効果との関連について明らかにする。

(1) ラット心筋細胞 H9c2 コントロール細胞 (H9c2-control) と GRX1 過剰発現細胞 (H9c2-GRX) において、NO 刺激下での GAPDH の核移行を比較し、またすでに知られている核移行の際の GAPDH と Siah1 (E3 ユビキチンリガーゼ) との結合についても検討する。

(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) GRX1 による抗アポトーシス効果

NO 刺激による細胞のアポトーシスを GRX1 が抑制するかどうか、H9c2-control と H9c2-GRX において NO ドナーである S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) 投与下にて deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) アッセイを用いて評価する。

(2) NO 刺激下での GAPDH 活性の比較

SNAP 投与下に H9c2-control と H9c2-GRX において GAPDH 活性を比較する。

(3) 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 NO 刺激によって核に移行するかどうか、H9c2-control と H9c2-GRX において SNAP 投与下での GAPDH の細胞内局在を、免疫蛍光抗体染色法で比較検討する。また、NO 刺激下で GAPDH が Siah1 と結合し GAPDH が核移行すると報告されており、GAPDH と Siah1 の結合についても同様の方法で比較検討する。

(4) 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

in vivo および in vitro において、SNAP 投与下での GAPDH のシステイン残基の SH 基の修飾を 4-acetamide-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid (AMS) を用いた遊離 SH 基に修飾法で検出し、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か検討する。

4. 研究成果

(1) GRX1 による抗アポトーシス効果

TUNEL アッセイにおいて、200 μ M の SNAP 投与 72 時間後の細胞のアポトーシスは、H9c2-control と比較して H9c2-GRX で抑制されていた。

(2) NO 刺激下での GAPDH 活性の比較

過酸化水素による酸化ストレス下では H9c2-control では GAPDH が著明に不活性化されているのに対し、H9c2-GRX では活性低下が抑制された。また、SNAP 投与下での GAPDH 活性は H9c2-control では低下するが、H9c2-GRX では活性低下が抑制される傾向にあった。GRX の過剰発現が酸化ストレスや NO ストレスによる GAPDH の活性低下を抑制していると考えられる。

(3) GAPDH の核移行の検出

H9c2-control と H9c2-GRX において、200 μ M の SNAP を投与し 24 時間後の GAPDH の細胞内局在を免疫蛍光抗体染色法で比較検討した。H9c2-control では SNAP 投与により GAPDH が核移行した細胞の割合が増加したが、H9c2-GRX では刺激前後での GAPDH の細胞内局在の著明な変化は認められなかった。何らかの機構で NO 刺激による GAPDH の核移行を GRX1 が抑制している可能性が示唆された。今回の実験では、今までに報告されている NO 刺激下での GAPDH の核移行と Siah1 の関連を明らかにできなかった。これは実験に使われた細胞による違いなどの可能性が考えられる。今後は H9c2 細胞で GRX1 の過剰発現がなぜ GAPDH の核移行を抑制するのか、さらなる実験が必要である。

(4) 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

H9c2-control と H9c2-GRX において 200 μM の SNAP 投与の 30 分と 60 分後に抽出したタンパク質を、システインの S-ニトロシル化抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。H9c2-control ではシステインの S-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している可能性が示唆された。

それぞれの細胞群で 200 μM の SNAP 刺激後の時間経過による GAPDH の Cys 残基の酸化修飾の変化を、4-acetamide-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfide acid (AMS)を用いた遊離 SH 基の修飾法によりウエスタンブロット法で検出し、GAPDH の SH 基の酸化還元状態の解析を行った。H9c2-control は SNAP 投与後の時間経過に従って GAPDH の SH 基の酸化修飾が増える傾向が認められたが、H9c2-GRX では H9c2-control と比較して抑制された。

in vitro でウサギ GAPDH に GRX system (還元型グルタチオン、酸化型グルタチオン、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、グルタチオンレダクターゼ、GRX1) の存在下で SNAP を投与し、時間経過による GAPDH の SH 基の酸化修飾の変化を同様の方法を用いて解析した。ウサギ GAPDH に 400 μM の SNAP を投与すると酸化型 GAPDH が認められたが、GRX system の存在下では時間経過に伴い GAPDH の SH 基の酸化修飾が還元された。

以上より、細胞の酸化還元状態を定常的に調節する酵素である GRX1 の過剰発現は、心筋細胞を NO によるアポトーシスから保護することが証明された。この効果は、GRX1 が GAPDH の酸化修飾を抑制することと NO による GAPDH の核移行を抑制する結果である可能性が示唆された。

これまでの実験結果をまとめ論文を作成し、Biochemical and Biophysical Research Communications に投稿し掲載された。

GRX1 が GAPDH の核移行を抑制する機構を明らかにすることを含め、今後さらなる解析が必要ではあるが、今回の結果より GRX1 の過剰発現が GAPDH の酸化還元状態を調節することで心筋細胞を NO によるアポトーシスから保護していることが示唆された。以上のことから、GRX1 による GAPDH の酸化還元状態調節の機構の解明は、酸化ストレス関連疾患の予防と治療へ新たなアプローチをもたらすと考えられる。

今後は S-ニトロシル化により不活性を引き起こし様々な病因に関与することが示唆されている Akt/protein kinase B (PKB) に関して、NO 刺激下での GRX による酸化還元状態の制御を介した Akt/PKB の機能調節につい

て詳細を明らかにしていく。

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 1 件)
Inadomi C, Murata H, Ihara Y, Goto S, Urata Y, Yodoi J, Kondo T, Sumikawa K. Overexpression of glutaredoxin protects cardiomyocytes against nitric oxide-induced apoptosis with suppressing the S-nitrosylation of proteins and nuclear translocation of GAPDH. Biochemical and Biophysical Research Communications 425 巻、2012、656 - 661、査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.118.

[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：