

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790587

研究課題名(和文)一酸化窒素を利用した喘息予防機序におけるタンパク質ニトロソ化の役割の解明

研究課題名(英文) Study on role of protein nitrosylation in the nitric oxide-mediated prevention of asthma

研究代表者

高橋 秀和 (TAKAHASHI, Hidekazu)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90450402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目標は、喘息の新しい予防法を開発することである。喘息においては一酸化窒素が重要な役割を果たすことが知られている。一酸化窒素は気管支の拡張作用などを有することが知られているが、その機構には不明な点が多い。本研究では、喘息を人為的に誘導したマウスを用いて、肺における一酸化窒素修飾タンパク質や一酸化窒素化合物の濃度・種類の変化を調べた。喘息においては、一酸化窒素修飾タンパク質や一酸化窒素化合物の濃度がやや増大していた。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to develop a novel method to prevent asthma. It is known that nitric oxide plays key roles in asthma. Nitric oxide is known to function as a bronchodilator. However, the detailed mechanisms of action remain incompletely understood. This study examined, using a murine model of asthma, the changes in the concentrations of nitric oxide-modified proteins and other nitric oxide-derived small molecules. Nitric oxide-modified proteins and other nitric oxide-derived molecules were rather increased in asthma.

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：予防医学 喘息 一酸化窒素 マウス

1. 研究開始当初の背景

喘息において一酸化窒素(NO)は重要な役割を果たす。一酸化窒素には気管支の拡張作用があり、喘息患者では気道の炎症によって一酸化窒素が不足している。ダニ抽出物等をマウスに点鼻投与することによってマウスに喘息を引き起こす実験系がすでに確立されている。この喘息モデルマウスに、一酸化窒素を増加させるような処置を施すと喘息症状を改善することが知られている。しかし、一酸化窒素が喘息症状を改善する分子レベルの機構には不明な点が多い。喘息の予防法の確立には、一酸化窒素の下流で作用する分子標的・経路を明らかにすることが重要である。

一酸化窒素が引き起こす分子レベルの作用としては、金属分子を含むタンパク質などへの結合、酸素ラジカルへの結合、シグナル伝達作用、タンパク質のシステイン残基のニトロソ化修飾などが知られている。これらの経路の喘息予防における重要性は必ずしも明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、一酸化窒素による喘息予防法を確立するために、一酸化窒素の喘息における作用をより明らかにすることである。特に、肺組織中でニトロソ化修飾されるタンパク質の喘息予防における重要性を明らかにすることに焦点を当てて研究をおこなった。

具体的には、肺組織中で、ニトロソ化を受けるタンパク質を網羅的に同定し、その中から喘息の制御に重要と想定される調節因子を同定・検証することを第一の目的とした。また、ニトロソ量と他のNO関連分子濃度の喘息における変動について比較することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

喘息モデルマウスはダニ抽出物をマウスに点鼻投与することによってマウスに喘息を引き起こす方法(Life Sci. 2006. 78:987-994)を用いて作成した。

ニトロソ化タンパク質の同定・精製には、Jaffrey らによって開発されたビオチン交換法(Nat Cell Biol, 3:193-197, 2001)を用いた。具体的には、まずマウスから肺の抽出液を調製して、Methanethiosulfonate によってフリーのシステイン残基をメチル基でブロックする。次に、弱い還元剤であるアスコルビン酸でニトロソ基のみをフリーのシステイン残基へと還元する。このフリーとなったシステイン残基に Biotin を共有結合させる。

このように、ニトロソ化修飾されていたタンパク質はビオチン修飾に置換されるので、抗ビオチン抗体による免疫学的検出やアビジンカラムを介した精製が可能となる。精製したタンパク質を質量分析にかけることによって、ニトロソ化されていた肺のタンパク質およびそのニトロソ化残基を同定した。

NO_x ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)の量の測定には、市販のNOアナライザーならびに比色法によるアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 喘息モデルマウスの肺においてシステイン残基のニトロソ化修飾の量が変化するタンパク質を同定するために、健康なマウスと喘息モデルマウスから肺組織を単離して、その粗抽出液を調製した。ニトロソ化は光による分解を受けるので、可能な限りその影響を最小にするようにして、一度にマウス肺2-3個ずつから抽出を行った。マウスが喘息を発症していることは、肺におけるアルギナーゼタンパク質発現量の増大によって確認

できた。

(2) これまでに報告されたビオチン交換によるニトロソ化修飾タンパク質の同定は、培養細胞や人為的にニトロソ化量を増加させた条件において主に報告されており、生理的な条件下での報告は少ない。そこで、まず正常マウスの肺より調製した抽出液を用いて、ビオチン交換法の条件検討を行った(図1)。

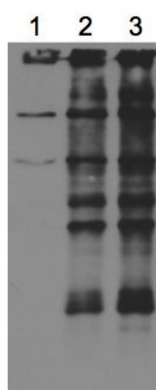


図1. ビオチン交換法の至適化。正常マウス肺抽出液をビオチン交換反応にかけて、抗ビオチン抗体によるウエスタンブロッティングを行った。

- 1: ビオチンHPDPなし
- 2: アスコルビン酸なし
- 3: 両方ともあり

ビオチン反応試薬を加えなかったサンプルではほとんどシグナルは検出されなかった(レーン1)よって内在性のビオチン化されたタンパク質の影響はほとんどないと考えられた。アスコルビン酸なし(レーン2)に比べて、アスコルビン酸あり(レーン3)では、想定された通りシグナルが強かった。これまで報告されている培養細胞などの報告の多くではニトロソ化を増加させるような試薬を用いているため差がより明確だが、本研究では完全に生理的な条件で動物組織を用いたことから、アスコルビン酸の有無による差(レーン2 vs. レーン3)が相対的に少なかったと考えられる。

(3) ビオチン交換法によってニトロソ化修飾を受けるタンパク質をまとめて精製した。精製したタンパク質を変性ゲル電気泳動で分離して銀染色したところ、10-20のバンドが検出できた。これらのタンパク質を個別にゲルから切り出して、質量分析によって同定した。同定されたニトロソ化タンパク質の中には、明らかに喘息を制御するような性質を持つようなタンパク質は見出されなかったものの、今後のさらなる解析が必要である。

(4) 喘息においてニトロソ化レベルが変化するタンパク質として、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を質量分析によって同定した。GAPDHは培養細胞などにおいてニトロソ化されていることが知られているタンパク質であり、ビオチン交換法がうまく機能したことを示している。GAPDHのニトロソ化レベルは喘息においてやや上昇していた。

(5) 喘息などの炎症を制御する重要な転写因子であるNF- κ Bについて、ニトロソ化レベルの変化を調べた。喘息における一酸化窒素の効果はNF- κ Bのニトロソ化が中心となっている可能性があるためである。NF- κ Bの生理的なニトロソ化レベルはマウス1匹分の肺からではこの方法の検出感度限界ぎりぎりでありバラツキが大きいので、複数のマウスに由来する高濃度の肺サンプルで追試を行う必要があるが、NF- κ Bのニトロソ化レベルは喘息においてやや上昇しているようであった。この結果は、NF- κ Bのニトロソ化が喘息における一酸化窒素の効果の中心的経路であることを支持しないが、機能的アッセイによる今後の検証なども必要である。

(6) 比較検討の為に对照として、ニトロソ化以外の翻訳後修飾の変化についても、特定の翻訳後修飾に対する抗体を用いたイムノブ

ロッキングによって解析した。その結果、喘息モデルマウスの肺において、ニトロソ化よりも明確に変化するタンパク質も存在した。この結果などを総合的に考慮すると、喘息において一酸化窒素は重要な役割を果たすものの、下流においてはニトロソ化以外の機能を主に介している可能性がある。あるいは、一酸化窒素の効果はニトロソ化を介しているが、喘息を制御・調節する重要なニトロソ化タンパク質の存在量やニトロソ化レベルが非常に少ないのかもしれない。

(7) 一酸化窒素(NO)に関連した分子の喘息モデルマウスの肺組織における濃度を測定した。NO_x (NO₂⁻とNO₃⁻の合計)濃度はこれまでは統計的に有意な変化は確認されていなかったが、今回測定したNO_x濃度では、喘息モデルマウスでは健康なマウスに比べてむしろ増加していた。NO₂単独の測定に関しては、個体間のバラツキなどがあり、統計的有意になるほどの変化は検出できなかった。

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 1 件)

Ogino K, Kubo M, Takahashi H, Zhang R, Zou Y, Fujikura Y. "Anti-inflammatory effect of arginase inhibitor and corticosteroid on airway allergic reactions in a Dermatophogoides farinae-induced NC/Nga mouse model" Inflammation, 36, 141-151, 2013, 査読有, DOI:10.1007/s10753-012-9529-3

[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

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~kouei/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 秀和 (TAKAHASHI, Hidekazu)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 9 0 4 5 0 4 0 2

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし