

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450451

研究課題名(和文) 子宮内膜でのアポトーシスに及ぼす一酸化窒素とS-ニトロシル化タンパク質の関与

研究課題名(英文) Involvement of s-nitrosylation and nitric oxide on apoptosis in rat uterus

研究代表者

滝沢 達也 (Takizawa, Tatsuya)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：00247305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中期のラット子宮内膜のアポトーシスに及ぼす一酸化窒素(NO)の関与を検討した。NO産生を阻害すると活性型カスパーゼ-3とアポトーシス細胞はともに増加したが、同時にX連鎖アポトーシス阻害因子(XIAP)も増加した。また、脱ニトロシル化の主要因子であるチオレドキシンは減少した。さらに、NO産生の阻害により活性型カスパーゼ-3とXIAPのS-ニトロシル化が著しく増加し、これはチオレドキシンの著しい減少と関連していた。これらの結果は、妊娠中期の子宮内膜のアポトーシスは、カスパーゼ-3とXIAP、その両者のS-ニトロシル化により正負両面から調節されている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of nitric oxide (NO) on apoptosis and S-nitrosylation that might affect apoptosis. To inhibit NO production, pregnant rats were administered an NO synthase inhibitor, L-NAME, apoptotic cells were observed in the endometrium of L-NAME-treated and -untreated rats. L-NAME-treatment significantly increased apoptosis and the expressions of cleaved-caspase-3 and X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), but significantly decreased thioredoxin (Trx) -1. Furthermore, L-NAME-treatment significantly induced S-nitrosylation (SNO) of cleaved caspase-3 and XIAP that were associated with a marked decline in Trx-1. These results suggest that apoptosis in the endometrium is positively and negatively regulated by NO through caspase and its inhibitor and S-nitrosylation of those factors during mid-gestation.

研究分野：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：一酸化窒素(NO) S-ニトロシル化タンパク質 アポトーシス 子宮 ラット

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) は、多様な作用を有している。妊娠中は NO 産生が増加することから、正常な妊娠維持に NO が関与し、その異常は子癩前症などの疾病と関連すると報告されている。また、NO は細胞増殖とアポトーシスにも関与することが知られている。NO は可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMP 産生を促進することにより作用を発揮する。しかしながら、子宮における妊娠中期の NO 産生の意義にはまだ不明な点が残されている。その要因の一つとして、NO により種々のタンパク質のシステイン残基のチオール (-SH) 基が S-ニトロシル化され、タンパク質の性質が修飾されることがあげられる。この S-ニトロシル化はレドックス調節経路としても重要である。当初、S-ニトロシル化は、誘導型 NO 合成酵素 (NOS) 由来の大量の NO 産生時に生じると考えられ、敗血症などにおいて研究が進められていた。しかし、内皮型 NOS や神経型 NOS 由来の少量の NO によっても S-ニトロシル化が生じ、NO すべてに共通する修飾機構であることが明らかになった。また、NO-ピオチンスイッチ法の開発により、S-ニトロシル化についての研究はめざましい発展を遂げているものの、生理的な条件下では存在しないような高濃度の NO を用いて実験している事例もあり、課題が残っている。

2. 研究の目的

研究代表者らは、これまで、ラット子宮における NO 産生は、妊娠 17.5 日に著しく増加することを、スピントラップ・電子常時性共鳴吸収法により明らかにし報告した。さらにこの NO 産生を L-NAME などの NOS 阻害剤により抑制すると、子宮内膜におけるアポトーシスが有意に増加することを報告した。しかしながら、この子宮内膜におけるアポトーシスは活性型カスパーゼ-3 の発現部位とよく一致するものの、活性型カスパーゼ-3 発現の程度と比較するとアポトーシス細胞は極めて限定的である。この差異が生じる要因は明らかではない。また、妊娠中期に NO 産生のピークが認められるが、その時、同時に多数の S-ニトロシル化タンパク質が認められることを報告してきた。しかし、活性型カスパーゼ-3 と X 連鎖アポトーシス阻害因子 (XIAP) の発現とその S-ニトロシル化、脱ニトロシル化の主要因子であるチオレドキシニン-1 との関連も十分には解析されていない。これらことから、子宮内膜におけるアポトーシスと NO 産生および S-ニトロシル化の関与について検討した。

3. 研究の方法

子宮内膜におけるアポトーシスと NO 産生

および S-ニトロシル化の関与を検討するために、NOS 阻害剤である L-NAME を用いて、妊娠 13.5、17.5、21.5 日のラットの子宮内膜におけるアポトーシス細胞の頻度、S 期の細胞頻度を求めた。アポトーシス細胞の検出にはタネル法を用い、S 期の細胞はチミジン類似体 BrDU の核への取り込みで評価した。活性型カスパーゼ-3 と XIAP の陽性細胞は免疫組織化学法で観察した。活性型カスパーゼ-3、XIAP、チオレドキシニン-1 はピオチンスイッチ法を用いて S-ニトロシル化を検出し、ウエスタンブロット法により解析した。

4. 研究成果

妊娠中期のラット子宮において NO が産生されており、NO 産生が抑制されると子宮内膜においてアポトーシスが増加する。しかしながら、このアポトーシスの増加程度は、活性型カスパーゼ-3 の発現程度と比較すると極めて限定的である。そこで、妊娠中期のラット子宮におけるアポトーシスに及ぼす NO の関与を検討した。NOS 阻害剤 L-NAME を用いて NO 産生を抑制すると、妊娠 13.5 日と 17.5 日では L-NAME 処置の有無に関わらず、タネル法で検出されるアポトーシス細胞は認められたが、妊娠 21.5 日では観察されなかった。また、妊娠 13.5 日と 17.5 日ではチミジン類似体 BrDU の核への取り込みで評価した細胞増殖は NO 産生の抑制により有意に抑制された。NO 産生の抑制により活性型カスパーゼ-3、XIAP は有意に増加した一方で、チオレドキシニン-1 は有意に減少した。活性型カスパーゼ-3 と XIAP の減少は、免疫組織化学法での観察結果と一致していた。さらに、ピオチンスイッチ法により、NO 産生を抑制すると活性型カスパーゼ-3 と XIAP の著しい S-ニトロシル化を引き起こした。この変動は、脱ニトロシル化因子であるチオレドキシニン-1 の著しい減少と関連していた。これらの結果は、NO 産生を抑制すると、活性型カスパーゼ-3 と XIAP が増加し、同時にチオレドキシニン-1 の減少に伴い活性型カスパーゼ-3 の S-ニトロシル化の増加が生じたものと考えられ、NO 産生の抑制により生じる妊娠中期における子宮内膜におけるアポトーシスは、活性型カスパーゼ-3 と XIAP、両者の S-ニトロシル化により正負両面から調節されている可能性を示した。

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 4 件)

Suzuki T, Fukuoka H, Ushikoshi S, Satho R., Morita H, and Takizawa T. Protective effect of aqueous extracts from *Rhizopus oryzae* against liver injury induced by Carbon tetrachloride in rats by

aqueous extracts of *Rhizopus oryzae*. Anim. Sci. J., 86(5):532-40, 2015.

Tanaka K., Takizawa T., Oki O., Fukawa K., Ito T., Miyabe M., Mannen H., Kurosawa Y and Hirose K. Allele frequency for c.335 A>C polymorphisms in porcine ghrelin/obestatin prepropeptide gene and association analysis with performance traits in various pig breeds. *Czech Journal of Animal Science*. 60(9). 411-416, 2015.

Usami M., Mitsunaga K., Miyajima A., Takamatsu M., Kazama S., Irie T., Doi O., Takizawa T., Effects of 13 developmentally toxic chemicals on the migration of rat cephalic neural crest cells in vitro. *Congenital Anomalies*, 56(2): 52-9, 2016.

Okubo T., Yaguchi T., Fujita Y., Sakaue M., Suzuki T., Tsukamoto A., Murayama O., Lynch J., Miyazaki Y., Tanaka K., and Takizawa T. Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Experimental Animal*, 65(1): 45-51, 2016.

〔学会発表〕(計 7 件)

風間崇吾、石川亘、鈴木武人、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也。ラット子宮におけるS-ニトロシル化タンパク質の検出とアポトーシスに及ぼす影響。日本先天異常学会学術集会、2014年7月

大久保巧、宮崎陽子、鈴木武人、田中和明、滝沢達也。ラット脂肪組織幹細胞の神経細胞分化に及ぼすバルプロ酸の影響と一酸化窒素の関与。日本先天異常学会学術集会、2014年7月

香川 静、宮腰 隆、荒木 貴広、犬飼 直人、曾川一幸、宮崎 陽子、田中 和明、滝沢達也。ラット肝部分切除後の肝再生に及ぼす一酸化窒素(NO)とNO-シトルリン回路の関与。日本生化学会総会、2014年10月

風間崇吾、高松美奈、宮崎陽子、鈴木武人、田中和明、滝沢達也。ラット子宮におけるS-ニトロシル化の検出とチオレドキシンの変動。日本獣医学会学術集会、2015年9月

林大希、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也。バルプロ酸によるラット脂肪組織幹細胞の

神経分化の促進とNO-シトルリン回路の関与。日本獣医学会学術集会、2015年9月

林大希、大久保巧、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也。バルプロ酸によるラット脂肪組織幹細胞の神経分化の促進とNO-シトルリン回路の関与。日本生化学会総会、2016年9月

高松美奈、風間崇吾、宮崎陽子、田中和明、宇佐見誠、滝沢達也。ラット子宮におけるS-ニトロシル化タンパク質の同定とS-ニトロシル化デスミンの変動。日本生化学会総会、2016年9月

〔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

滝沢達也 (TAKIZAWA, Tatsuya)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号：00247305

(2) 研究分担者

宇佐見 誠 (USAMI, Makoto)
国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・
第4室長
研究者番号：20223521

森田英利 (MORITA, Hidetoshi)
岡山大学・環境生命科学研究科・教授
研究者番号：70257294

田中和明 (TANAKA, Kazuaki)
麻布大学・獣医学部・准教授
研究者番号 : 50345873

(3) 連携研究者

鈴木武人 (SUZUKI, Takehito)
麻布大学・獣医学部・准教授
研究者番号 : 90532052