

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750368

研究課題名(和文)還元反応を基軸とする生体分子修復機構の解明研究

研究課題名(英文)Study of biomolecular repair mechanism based on reduction reaction

研究代表者

齋藤 洋平 (Saito, Yohei)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・助教

研究者番号：90723825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で活性酸素種を生じるようなストレスを酸化ストレスと総称する。活性酸素種は一般に生体分子を傷つけるため、ヒトはそのストレスから生体を防御する機構を備えていると考えられる。活性酸素種の一つである活性窒素酸化物とグアニンヌクレオチドから産生される8-ニトロ-cGMPは生体活動における重要なメディエーターであることが分かってきたが、本化合物の消去機構は不明であった。本研究ではその消去機構に生体内のどのような分子が関わっているのかに焦点を当てて研究を行い、金属含有因子の関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is thought that human has a mechanism protecting biomolecules from oxidative stress because reactive oxygen species (ROS) generally injure biomolecules. 8-Nitro-cGMP formed from reactive nitrogen species (RNS) and guanine nucleotide is an important mediator of autophagy and plays an important role in protein regulation. However, its removal mechanism from cells remains to be elucidated. In this study, we focused on what molecules are related to this mechanism and revealed the involvement of metal species.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：酸化ストレス 生体防御

1. 研究開始当初の背景

活性窒素酸化物とグアニンヌクレオチドから産生される 8-ニトロ-cGMP はタンパク質システインと反応することで、その機能制御を担う新しい翻訳後修飾分子として大きな注目を集めた。さらに、本化合物が細胞内のタンパク質および細胞小器官の分解回収機構であるオートファジーを誘導し、細菌排除における重要なメディエーターであることを明らかにしてきた (Mol. Cell 2013)。

元の分子である cGMP はホスホジエステラーゼ (PDE) により加水分解されることでその細胞内シグナルが解除されるが、8-ニトロ-cGMP は PDE による加水分解を受けず、細胞内における分解消去機構は不明なままであった。

そこで、本化合物の細胞内における代謝機構を解明する目的で安定同位体標識した 8-ニトロ-cGMP を合成し、細胞への投与と実験を行ったところ、細胞内に 8-アミノ-cGMP が存在することが判明した。さらに、この 8-アミノ-cGMP は酸化ストレス刺激した細胞内で NO 産生依存的に cGMP へ変換されることが分かった。特異的抗体を用いた実験においても、内因性 8-ニトロ-cGMP が産生した後に 8-アミノ-cGMP が産生してくることが判明した。過剰量産生した 8-ニトロ-cGMP の消去機構として 8-アミノ-cGMP を経由して無修飾の cGMP が再生する巧妙な経路が存在する可能性が示唆された (Mol. Biosyst. 2012)。

8-アミノ-cGMP から cGMP が生成する分子機構は亜硝酸ナトリウムを用いた *in vitro* の実験からジアゾ化を経由することが示唆されているが、8-ニトロ-cGMP から 8-アミノ-cGMP への還元反応に関する詳細は不明なままであった。

2. 研究の目的

生体分子のニトロ化は元の分子の構造変化であることから、これまでは生体損傷のバイオマーカーとして利用されてきた。特に、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患、動脈硬化や心筋梗塞などの心疾患との関与が近年報告されている。

研究代表者が発見した 8-ニトロ-cGMP から cGMP が再生する機構は人間に本来備わっている酸化ストレスから生体分子を修復するための生体防御機構の一つと考えられる。この機構を解明することは酸化ストレスに曝された生体分子を治療的側面から検証することを可能とし、創薬の標的となり得ることが期待される。しかしながら、生体分子修復の見地でニトロ化合物を調査している例はこれまでになく、継続的研究により明らかにしていく必要がある。

本研究では 8-ニトロ-cGMP のニトロ基からアミノ基への還元反応に関わる生体内分子の同定することに焦点を当てて研究を行った。

3. 研究の方法

細胞内にはニトロ基からアミノ基への還元反応に必要な因子がすべて備わっていることから、その中でどのような分子が還元反応に関わっているのか探索するのは困難である。そこで *in vitro* の実験を行うことで還元反応に関わる分子を探索することにした。反応の追跡には HPLC を使用し、別途合成した化合物を標品として用いた。

4. 研究成果

文献を調査したところ、1999 年に Murad らが内因性ニトロ化合物であるニトロチロシンの非酵素的修飾に関する報告を行っていた。本論文ではニトロチロシンに対してヘモグロビンとジチオスレイトールを作用させるとアミノチロシンへ還元されることが示されていた。しかしながら、本条件は反応温度が 100 と生理的条件からはかけ離れたものであった。

8-ニトロ-cGMP はタンパク質システインチオールによる求核置換反応 (S-グアニル化) を受けることから遊離チオールが過剰に存在する本条件では 8-ニトロ-cGMP が S-グアニル化により消費され、8-アミノ-cGMP が生成する還元反応は起きないことが予想された。

そこで、ジチオスレイトールの量を 8-ニトロ-cGMP に対してモル比 20 倍程度とし、還元反応が進行するか検証を行った。ヘム源としてはヘモグロビンの代わりにヘミンを用いた。反応は生理的条件に近い条件にするためにリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) 中、37 で行った。その結果、8-アミノ-cGMP の生成が確認された。8-ニトロ-cGMP とジチオスレイトールとの付加体の生成も観察されたが、予想に反してその生成比は 8-アミノ-cGMP よりも少ないことが判明した (図 1 a)。一方、同様の条件でヘミンを添加せずに反応を行ったところ、8-アミノ-cGMP は生成されず、ジチオスレイトール付加体のみが生成された (図 1 b)。この結果は 8-ニトロ-cGMP の 8-アミノ-cGMP への還元反応にヘムが関与し、ジチオスレイトール等の還元剤のみでは反応が進行しないことを示す。

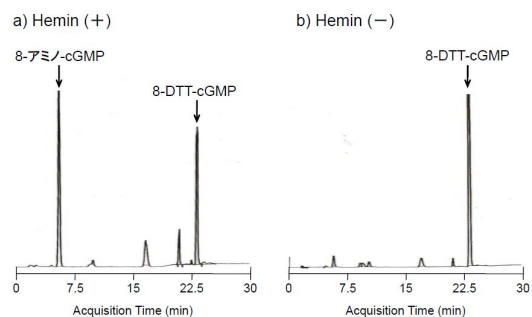


図1 ヘムによる8-ニトロ-cGMPから8-アミノ-cGMPへの変換

さらに、ヘミンの添加量を下げて同様の反

応を行ったところ、8-ニトロ-cGMP に対してモル比で 10 分の 1 程度の添加量においても 8-アミノ-cGMP の生成を確認することができた。この結果は触媒量のヘム存在下でも、還元反応が進行することを示す。

使用したヘミンはプロトポルフィリン内に三価の鉄を含む構造を有していることから、還元剤として機能するためには系内で二価の鉄を含有するヘムへと変換される必要がある。ニトロ基からアミノ基まで還元されるためには 6 電子の授受が必要となるが、触媒量のヘミン添加においても 8-ニトロ-cGMP の還元反応が進行したことは、本条件においてヘミンからヘムへの変換が効率的に行われていること、さらにヘムからニトログアニン塩基へ効率的に電子が受け渡されていることを意味する。推定反応メカニズムを以下に示す(図 2)。

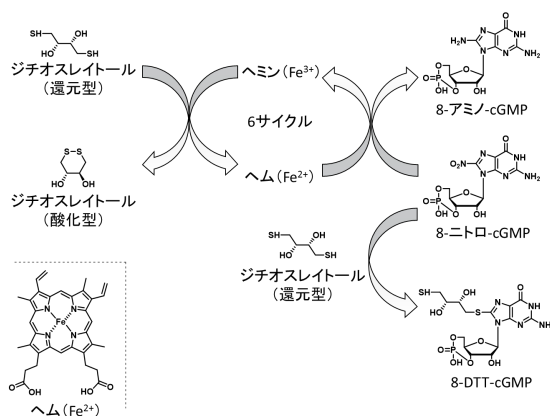


図2 ヘムによる8-ニトロ-cGMPから8-アミノ-cGMPへの推定反応サイクル

ここまでの検証で、8-ニトロ-cGMP はニトロチロシンと性質が異なることが判明した。ニトロチロシンの場合はアミノチロシンへの還元反応に反応温度が 100 と激しい反応条件を要するため、たとえヘムと還元剤が存在したとしても細胞内や生体内でこのような反応が進行することは極めて困難であると考えられる。一方、8-ニトロ-cGMP の場合は生理的条件下で 8-アミノ-cGMP への還元反応が進行することから、ヘムと還元剤が存在する細胞内や生体内で還元反応が起きると解釈できる。

活性窒素酸化物と生体分子との反応で生じる両化合物の反応性においてこのような大きな差が生じる原因として、生体内における化合物の役割の違いが挙げられる。すなわち、シグナル伝達分子としての役割を担う 8-ニトロ-cGMP は必要なときに供給され、不要なときには素早く消去される必要がある。生理的条件下において非酵素的に代謝される最大の利点は細胞内において場所を選ばずに消去が完了することである。一方、酵素的な代謝の場合は恒常的に発現している必要はあるものの、局所的に高濃度で産生されたシグナル伝達分子を消去するに適する。8-ニトロ-cGMP のように細胞内において多量に産生される分子の代謝には細胞内に多く、且つ

安定に存在する分子が関与したほうが効果的と考えられる。ヘムはタンパク質の補欠分子族であり、細胞内には様々なヘムタンパク質が存在する。従って、8-ニトロ-cGMP はヘムタンパク質により酵素的にも、非酵素的にも代謝を受ける可能性があると考えられる。

安定同位体標識した 8-ニトロ-cGMP の代謝研究では還元反応に由来する 8-アミノ-cGMP 以外に S-グアニル化反応に由来するシステイン付加物 (8-Cys-cGMP) グルタチオン付加物 (8-GS-cGMP) が検出されている。細胞内に豊富に存在するこれらの還元剤がヘムを還元する役割を担い、8-ニトロ-cGMP から 8-アミノ-cGMP への還元のサイクルに関わっていることが予想される。

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 2 件)

Nakagawa-Goto, K.; Chen, J. Y.; Cheng, Y. T.; Lee, W. L.; Takeya, M.; Saito, Y.; Lee, K. H.; Shyur, L. F. Novel sesquiterpene lactone analogues an potent anti-breast cancer agents. *Mol. Oncol.*, (2016) in press. 査読有, DOI: 10.1016/j.molonc.2016.03.002

Okazaki, M.; Kurabayashi K.; Asanuma, M.; Saito, Y.; Dodo, K.; Sodeoka, M. VDAC3 gating is activated by suppression of disulfide-bond formation between the N-terminal region and bottom of the pore. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, 1848, 3188–3196 (2015). 査読有、DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.017>

[学会発表](計 9 件)

鈴木愛理、Abdul Rasyid Fadadiba、三宅克典、齋藤洋平、徳田春邦、鈴木信孝、後藤益生、佐々木陽平、後藤(中川)享子、インドネシア産 Agarwood から単離された 2-(2-phenylethyl)chromone 類と発がん抑制効果、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(横浜)

谷口由花子、釣本浩行、齋藤洋平、後藤益生、後藤(中川)享子、ベンゾチオフェンフラボノイド誘導体の抗腫瘍活性と構造活性相関、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜(横浜)

小林佑希子、齋藤洋平、後藤益生、後藤(中川)享子、TEDB-TB 窒素置換誘導体の合成と抗腫瘍活性評価、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜(横浜)

宮島由衣、齋藤洋平、竹谷宗久、後藤益生、後藤(中川)享子、Parvifloron 類を含むアピエタン誘導体の抗腫瘍活性評価と構造活

性相関、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜（横浜）

森田千尋、小林佑希子、齋藤洋平、三宅克典、後藤(中川)享子、Acronychia trifoliolata 含有のアセトフェノンモノマー体の合成、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜（横浜）

谷口由花子、齋藤洋平、後藤益生、後藤(中川)享子、新規抗腫瘍活性ベンゾチオフェンフラボノイドの合成と構造活性相関研究、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸（神戸）

竹谷宗久、齋藤洋平、後藤益生、後藤(中川)享子、Parviflorone 類の全合成と triple negative 乳がんを標的とした抗腫瘍活性評価、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸（神戸）

伊藤千秋、齋藤洋平、野沢孝志、藤井重元、橋本龍太、澤智弘、赤池孝章、中川一路、有本博一、8-ニトロ-cGMP の抗菌オートファジー誘導における役割、第 56 回天然有機化合物討論会、2014 年 10 月 15 日~17 日、高知県立県民文化ホール（高知）

伊藤千秋、齋藤洋平、橋本龍太、赤池孝章、中川一路、有本博一、ニトロ化ヌクレオチドは細菌に対する選択的なオートファジーにおける内因性の誘導因子である、第 25 回万有仙台シンポジウム、2014 年 6 月 14 日、仙台国際センター（仙台）

〔産業財産権〕

出願状況（計 3 件）

名称：アンドロゲン依存性又は非依存性前立腺癌細胞の抑制用の組成物及びそれを含有する前立腺癌の医薬製剤

発明者：溝上 敦、後藤享子、齋藤洋平、泉浩二

権利者：国立大学法人金沢大学

種類：特許

番号：特願 2016-063542

出願年月日：平成 28 年 3 月 28 日

国内外の別： 国内

名称：抗がん剤

発明者：後藤享子、鈴木結貴、齋藤洋平

権利者：国立大学法人金沢大学

種類：特許

番号：特願 2016-061325

出願年月日：平成 28 年 3 月 25 日

国内外の別： 国内

名称：抗がん作用を有するベンゾチオフェン誘導体

発明者：後藤享子、谷口由花子、齋藤洋平

権利者：国立大学法人金沢大学

種類：特許

番号：特願 2015-017635

出願年月日：平成 27 年 1 月 30 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunshishoyaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 洋平 (SAITO, Yohei)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・助教

研究者番号：90723825