

平成30年 6月22日現在

機関番号：23102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861586

研究課題名(和文) 口腔組織の炎症によって発生する気体分子と細胞機能の破綻

研究課題名(英文) Oral tissue inflammation cellular generate gases that cause cellular function failure.

研究代表者

萩原 真 (Hagiwara, Makoto)

新潟県立大学・人間生活学部・助教

研究者番号：30546099

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)：一酸化窒素は一酸化窒素合成酵素の作用によってL-アルギニンから産生される気体分子である。近年、一酸化窒素は翻訳後修飾の一種であるS-ニトロシル化に関与し、タンパク質の機能を調節している。まず、NOドナーであるGSNOを添加したRAW264細胞ではファゴサイトーシスが促進した。NOドナーで処理した細胞では、Rab5の活性が上昇していることがGST-R5BDプルダウンアッセイで明らかになった。ビオチンアッセイでは活性型Rab5が強くS-ニトロシル化していた。これらのことより、Rab5がS-ニトロシル化されることによってファゴサイトーシスが調節されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Nitric oxide (NO), produced from L-arginine by nitric oxide synthases (NOSs) in cells, modulates post-translational proteins. Recent studies have been reported covalent adduction of a NO moiety to cysteines called S-nitrosylation is a key NO signaling pathway and regulates protein functions. Here, we report that NO regulates phagocytosis through S-nitrosylation of Rab5. To investigate the effect of NO on phagocytosis, we treated RAW264 cells with a NO donor GSNO. Phagocytosis was facilitated in RAW264 cells by treatment with GSNO. We next examined the effect of NO on Rab5 activity. As a result of GST-R5BD pull down assay, Rab5 activity was augmented by treatment with NO in cultured cells. We evaluated S-nitrosylation of Rab5 by using biotin switch methods. S-nitrosylation was observed in active Rab5 more strongly than inactive Rab5. Collectively, our data suggests a mechanism by which NO activates Rab5 and phagocytosis through S-nitrosylation.

研究分野：歯学

キーワード：一酸化窒素 エンドサイトーシス Rab5

1. 研究開始当初の背景

ファゴサイトーシスは、単球、マクロファージ、好中球など主に免疫細胞によって、細胞外からの細菌などの病原物質や死んだ細胞、動脈の脂肪の除去などに重要である。ファゴサイトーシスは 0.5 μm 以上の物質の取り込みと定義され、細胞表面のレセプターに物質が結合するとシグナル伝達によってアクチンが再構築され膜輸送によって細胞内に物質が取り込まれる。例えば細菌が細胞表面のレセプターに結合するとアクチンが再構築され、細菌の周りにファゴサイティックカップが形成される。そして、ファゴサイティックカップは細胞膜より切り離され、小胞（ファゴソーム）となる。細胞に取り込まれた細菌は Rab5 陽性のファゴソームから Rab7 陽性のエンドソームへと運ばれファゴソーム内の pH が低下していく。最終的には細菌はファゴリソームへと運ばれ分解される。しかしながら、ファゴサイトーシスにおける Rab5 の役割は不明な点が多い。

Rab ファミリータンパク質はエンドサイトーシスとエキソサイトーシスを制御しているタンパク質である。現在、Rab ファミリータンパク質は 60 個以上存在することが知られており、それぞれが特異的にオルガネラに局在し、小胞輸送を司っている。Rab5 は細胞膜と初期エンドソームに局在し、ファゴサイトーシスを含めたエンドサイトーシスに関わるタンパク質であり、これまでに 30 個以上の特異的な相互作用因子が同定されている。Rab5 には GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型があり、その構造変化は GDP/GTP 交換因子 (GEF)、GTPase 促進因子 (GAP)、GDP 解離抑制因子 (GDI) によって調節されている。

口腔組織に炎症が起こると一酸化窒素 (NO) などの気体分子が産生される。口腔組織の直下には無数の毛細血管が張りめぐらされており、そこには免疫細胞が存在している。NO は生理学的に免疫系において重要な因子であり、また、細胞機能の破綻に関与する可能性が示唆されている。NO は、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS または NOS1)、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS または NOS2)、上皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS または NOS3) によって L-アルギニンから合成される。近年、NO がタンパク質のシステインのチオール基に付加する翻訳後修飾である S-ニトロシル化が注目されている。S-ニトロシル化は NOS の発現量に依存し、NOS が局在している場所でもたらされる修飾である。

2. 研究の目的

本研究では、口腔組織の炎症によって発生する一酸化窒素が細胞に及ぼす影響を解析する。

3. 研究の方法

トランスフェクションは invitrogen 社の Lipofectamine3000 を用いて行った。ファゴサイトーシスアッセイは invitrogen 社の pHrodo red-labeled *S. aureus* BioParticles を用いて行った。タンパク質同士の相互作用解析は GST プルダウンアッセイや免疫沈降法で解析した。細胞内局在性は免疫染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss 社) で観察した。タンパク質の S-ニトロシル化は cayman 社の S-Nitrosylated Protein Detection Kit を用いたビオチンスイッチ法で検出した。Rab5 の活性は GST-R5BD プルダウンアッセイで解析した。

4. 研究成果

まず始めに NO がファゴサイトーシスに及ぼす影響について NO ドナーである GSNO を用いて解析した。その結果、予想に反して GSNO を添加した RAW264 細胞ではファゴサイトーシスが促進した。次に NO 阻害剤である L-NAME を用いてファゴサイトーシスアッセイを行った。その結果、L-NAME を添加した RAW264 細胞ではファゴサイトーシスが低下していた。そして、Rab5 と iNOS の結合状態を明らかにするために、LPS 刺激し iNOS を発現させた RAW264 細胞を用いて免疫沈降法で解析した。その結果、Rab5 と iNOS が共免疫沈降した。さらに、iNOS が活性型 Rab5 と結合するのかそれとも不活性型 Rab5 と結合するのか GST プルダウンで解析した。その結果、不活性型 Rab5 と比較して活性型 Rab5 に強く結合した。

iNOS と HA-Rab5 の局在を解析するために LPS 刺激した RAW264 細胞を用いて免疫染色を行い共焦点蛍光顕微鏡で観察した。その結果、iNOS と HA-Rab5 が共局在した。次に、Rab5 が S-ニトロシル化されるか否か HA-Rab5 をトランスフェクションした HEK293T 細胞を用いてビオチンスイッチ法で解析した。その結果、HA-Rab5 が細胞内で S-ニトロシル化されていた。そして、活性型変異体 GST-Rab5Q79L と不活性型変異体 GST-Rab5S34N を用いてビオチンアッセイ法で解析した。その結果、GST-Rab5S34N と GST-Rab5Q79L の方が強く S-ニトロシル化された。

NO が Rab5 の活性に及ぼす影響を明らかにするために、HA-Rab5 をトランスフェクションした HEK293T 細胞を GSNO で処理し、GST-R5BD プルダウンで解析した。その結果、GSNO 処理した細胞では Rab5 の活性が上昇していた。そして、NO が直接的に Rab5 の活性を上昇させるのか否か明らかにするために His-Rab5 を用いて解析した。その結果、NO ドナーである DEA-NONOate で処理した His-Rab5 は Rab5 の活性が上昇していた。

Rab5 の S-ニトロシル化部位を明らかにするために Rab5 のシステイン残基をアラニンに置換した変異体を用いて解析した。その結果、Rab5 の 212 番目と 213 番目のシステインが S-ニトロシル化されることが明らかとな

った。次にこれらシステイン変異 Rab5 を用いてファゴサイトーシスアッセイを行った。その結果、212 番目と 213 番目のシステインが変異した Rab5 はファゴサイトーシスが低下していた。

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 8 件)

Naoyuki Ishida, Yuichi Ishihara, Kazuto Ishida, Hiroyuki Tada, Yoshiko Funaki-Kato, Makoto Hagiwara, Taslima Ferdous, Mohammad Abdullah, Akio Mitani, Makoto Michikawa, Kenji Matsushita Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. NPJ Aging Mech Dis. 3:15 印刷中 査読あり

神山伸、萩原真、曾根英行「植物におけるピオチンの合成と光と温度による調節」ビタミン、印刷中 査読あり

神山伸、榎原詩野、本間千裕、萩原真、曾根英行「雪室貯蔵が小麦粉の品質と製パン性に与える影響」日本食品工学会誌、第 18 巻、1 号、p19-24 2017 査読あり

萩原真、神山伸、曾根英行「高濃度アスコルピン酸は酸化を促進し大腸ガン細胞のアポトーシスを誘導する」ビタミン、第 90 巻、第 12 号、p600-602、2016 査読あり

神山伸、土沼侑佳、塩沢浩太、萩原真、曾根英行「SLC35F2 の発現状態及び B 群ビタミンが肺腺がん細胞のゲフィチニブ感受性に及ぼす影響」微量栄養学会誌、第 33 集、p80-86、2016 査読あり

萩原真、神山伸、曾根英行「葉酸と葉酸レセプター を利用したドラッグデリバリーシステム」ビタミン、第 90 巻、第 9 号、p441-444、2016 査読あり

Tada Hiroyuki, Matsuyama Takashi, Nishioka Takashi, Hagiwara Makoto, Kiyoura Yusuke, Shimauchi Hidetoshi, Matsushita Kenji, Porphyromonas gingivalis Gingipain-Dependently Enhances IL-33 Production in Human Gingival Epithelial Cells. PLoS One, 11(4):e0152794, 2016 査読あり

Kato Yoshiko, Hagiwara Makoto, Ishihara Yuichi, Isoda Ryutaro, Sugiura Shinsuke, Komatsu Toshinori, Ishida Naoyuki, Noguchi Toshinori, Matsushita

Kenji, TNF- α augmented Porphyromonas gingivalis invasion in human gingival epithelial cells through Rab5 and ICAM-1. BMC Microbiol, 14:229, 2014 査読あり

〔学会発表〕(計 17 件)

萩原真、多田浩之、石田直之、王静舒、高田 鮎子、松下健二: マクロファージ活性化因子としての一酸化窒素、トランスポーター研究会、2016/7/1

高田鮎子、松下健二、萩原真、堀岡悟、古市保志、角屋保徳: 310nm 紫外線 LED の口腔内細菌に対する殺菌作用の検討 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会、2015/9/12

佐藤晋太郎、萩原真、土屋郁恵、室田友紀子、土屋和之、鈴木司、小林謙一、山本祐司: TSC1/2 複合体がカベオラ依存性エンドサイトーシスにおける Rab5 の活性に与える影響の解析 第 96 回日本栄養・食糧学会関東支部大会、2015/9/5

萩原真、多田浩之、石田直之、王静舒、高田鮎子、松下健二: ファゴサイトーシスは NO 修飾によって調節される 第 67 回日本細胞生物学会大会、2015/7/2

萩原真、多田浩之、石田直之、王静舒、高田鮎子、松下健二: 貪食細胞における NO 産生による食作用促進機構 第 10 回トランスポーター研究会年会、2015/6/21

Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Hagiwara M, Michikawa M, Matsushita K: Porphyromonas gingivalis infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. Europerio 8, London, UK, June 4, 2015

Hagiwara M, Ishida N, Wang J, Matsushita K: Nitric oxide regulates phagocytosis in macrophage-like RAW264 cells 第 7 回 NAGOYA グローバルリトリート 2015/2/13

Wang J, Kobayashi K, Hagiwara M, Ishida N, Matsushita K: Analysis of the Regulatory Mechanism by which Shear Stress and Stretch Force Induce Nitric Oxide Production in Endothelial Cells. ASCB/IFCB meeting. Dec 9, 2014

Hagiwara M, Ishida N, Wang J, Matsushita K: Nitric oxide regulates phagocytosis by S-nitrosylation of Rab5. ASCB/IFCB meeting. Dec 8, 2014

萩原真、石田直之、王静舒、松下健二:

NO 修飾のファゴサイトーシスへの関与 第 37 回日本分子生物学会年会 2014/11/27

王静舒、小林かおる、萩原真、石田直之、松下健二：ずり応力と引張応力による血管内皮細胞のシグナル伝達機構の解析 第37回日本分子生物学会年会 2014/11/26

Wang J, Kobayashi K, Hagiwara M, Ishida N, Matsushita K : Analysis of Intracellular Signal Transduction Induced by Shear Stress and Stretch Force in Endothelial Cell Cultures. 15th IUBMB -24th FAOBMB-TSBMB. Oct 23-24, 2014

Hagiwara M, Ishida N, Wang J, Matsushita K : Nitric oxide regulates phagocytosis. 15th IUBMB -24th FAOBMB-TSBMB. Oct 21-22, 2014

Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Kato Y, Hagiwara M, Michikawa M, Noguchi T, Matsushita K: Periodontitis Induced by Porphyromonas Gingivalis Infection Exacerbates Features of Alzheimer's Disease in Transgenic Mice. 100th Annual Meeting of American Academy of Periodontology. Sep 20, 2014

萩原真、石田直之、王静舒、松下健二：NO は化学修飾を介してファゴサイトーシスを調節する 光イメージングに興味のある若手研究者の会 2014/9/6-7

萩原真、石田直之、王静舒、松下健二：細菌感染防御機構における一酸化窒素の新規な作用機構 第9回トランスポーター研究会 2014/6/14-15

Makoto Hagiwara, Ryutaro Isoda, Yoshiko Kato, Naoyuki Ishida, Jingshu Wang and Kenji Matsushita : How is phagocytosis regulated by NO ? The 66th Annual Meeting of Japan Society for Cell biology. June 11, 2014

〔図書〕(計1件)

Ishida Naoyuki, Ishihara Yuichi, Ishida Kazuto, Tada Hiroyuki, Kato Yoshiko, Isoda Ryutaro, Hagiwara Makoto, Michikawa Makoto, Noguchi Toshihide, and Matsushita Kenji, Chapter 26. Periodontal disease as a possible risk factor for Alzheimer's disease, Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface 2014 (Sasaki K, Suzuki O, and Takahashi N eds), p237-243, 2015 査読なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

萩原 真 (HAGIWARA Makoto)
新潟県立大学・人間生活学部・助教
研究者番号：30546099