

研究報告書

「慢性炎症における活性酸素シグナル伝達制御の分子基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 澤 智裕

1. 研究のねらい

慢性炎症において過剰に生成する活性酸素や一酸化窒素は、遷延性、不可逆性の生体分子の修飾を介した酸化ストレスをもたらす、様々な病態形成に関わると考えられている。このため、活性酸素の消去剤を用いた抗酸化治療が試みられてきたが、慢性炎症疾患に対しては、未だ有効な成績が得られていないのが現状である。一方、活性酸素は、非特異的な酸化ストレスをもたらすだけでなく、厳密に制御されたシグナル伝達機能を有することが分かってきた。本研究では、活性酸素による遷延性、不可逆性の分子修飾そのものがシグナル伝達の制御に関わる可能性について検討し、その分子メカニズムの解明を目指した。またこのような活性酸素のシグナル経路が治療の標的として有効であるのかどうかの検証を行った。これにより、従来の活性酸素毒性説に基づく抗酸化治療とは全く異なる切り口から、新しい炎症・酸化ストレスの制御分子の発見と、それらを標的とした治療法、診断法の開発を目指した研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

活性酸素のシグナル伝達機構では、センサータンパク質と呼ばれる、分子内に酸化還元(レドックス)反応に感受性のシステイン残基をもち、このシステイン残基の化学修飾をスイッチとして、多彩なシグナル制御が行われる。本さきがけ研究では、活性酸素の2次シグナル分子として、グアノシン環状ヌクレオチドであるcGMPがニトロ化された8-ニトロcGMPに着目した。8-ニトロcGMPは、センサータンパク質のシステイン残基と反応し、cGMP構造を共有結合を介して付加するタンパク質S-グアニル化をもたらす。本研究では、この8-ニトロcGMP/S-グアニル化シグナルに関わる新規標的タンパク質の探索、機能解析を行い、また、そのシグナルを負に制御する代謝経路の解明を目指した。さらに、この8-ニトロcGMP/S-グアニル化シグナルが慢性炎症の分子標的として有効であるかどうかを検証した。

2次元電気泳動と質量分析を組み合わせたS-グアニル化タンパク質の網羅的解析法(プロテオミクス法)を確立した。これにより、ミトコンドリアにおけるS-グアニル化の標的タンパク質の同定に成功した。具会的には、炎症反応にともなって、ミトコンドリア熱ショックタンパク質がS-グアニル化されることを見出した。さらにこの熱ショックタンパク質のS-グアニル化が、ミトコンドリアからの活性酸素放出を増強し、その結果、8-ニトロcGMPの生成が亢進するという、自己増幅的なメカニズムがあることを明らかにした。

もう一つの標的タンパク質として、低分子量Gタンパク質であるH-Rasを同定した。心筋梗塞後の心不全発症における8-ニトロcGMP/S-グアニル化シグナルを解析した結果、心筋梗塞後に生成した8-ニトロcGMPが、H-Rasの持続的な活性化を介して心筋細胞の老化をもた

らしていることがわかった。さらに、siRNA スクリーニングにより、システイン代謝酵素であるシスタチオニンβ-シンターゼおよびシスタチオニンγ-リアーゼがイオウ代謝物の生成を介して、8-ニトロ cGMP を分解・代謝していることを明らかにした。そこで、心筋梗塞マウスモデルに、イオウ代謝物のモデル化合物として硫化水素ナトリウムを投与したところ、心機能の著しい改善が認められた。以上のことから、イオウ代謝物の制御に基づく新しい炎症性疾患の予防・治療法の可能性が示唆された。

(2) 詳細

「S-グアニル化タンパク質の網羅的解析法の確立とミトコンドリアタンパク質への応用」
S-グアニル化の標的タンパク質の探索を目的として、S-グアニル化タンパク質の網羅的解析法(プロテオミクス法)を確立した。具体的には、タンパク質試料を 2 次元電気泳動にて展開後、ひとつを S-グアニル化タンパク質に対する Western blotting、もう一つを銀染色した。Western blotting で発色したスポットに該当する部分を銀染色から切り出し、トリプシン処理した。得られたペプチド断片からタンパク質を同定した。本法を炎症反応によって亢進するミトコンドリアタンパク質の S-グアニル化の解析に応用した。その結果、内因性に S-グアニル化されるタンパク質として、ミトコンドリア熱ショックタンパク質である HSP60, stress-70 protein を同定した。近年、HSP60 がミトコンドリア内で膜タンパク質と複合体を形成し、ミトコンドリア膜の透過性を制御していることが明らかになってきた。そこで、8-ニトロ cGMP による HSP60 の S-グアニル化と膜透過性の関連について検討した。その結果、8-ニトロ cGMP は HSP60 の S-グアニル化と極めて良い相関を持ってミトコンドリアの膜透過性を亢進させることがわかった。また、これによりミトコンドリア内で生成した活性酸素の細胞質内への放出が促進されることがわかった。これまでの検討から、8-ニトロ cGMP の細胞内生成は、リポ多糖や炎症性サイトカインの刺激後、24-36 時間経過ののち、顕著になることがわかっていたが、そのような誘導期において、ミトコンドリア HSP60 の S-グアニル化を介して自己増幅的に活性酸素の放出が促進され、8-ニトロ cGMP が生成している可能性が示唆された。また、今回の結果は、これまでその分子実態が不明であった酸化ストレス依存性のミトコンドリア膜透過性亢進が HSP60 によって制御を受けている可能性を示す点で興味深い。過剰なミトコンドリア膜透過性亢進は、インフラマゾームの活性化など炎症反応の増悪に關与する可能性が示唆されている。HSP60 によるミトコンドリア膜透過性制御が炎症反応制御の標的となりうるかどうかについて今後の解析が課題である。

「8-ニトロ cGMP/S-グアニル化による H-Ras の活性化と心筋細胞老化」

心筋梗塞後の慢性心不全は世界的にも主要な死因である。これまでに心不全の進展において慢性炎症に基づく酸化ストレスの関与が示唆されているが、その分子基盤は不明な点が残されている。本研究において、西田基宏博士(岡崎統合バイオ)との共同研究により、心筋梗塞および圧負荷による心不全モデルマウスを作成して、心不全発症における 8-ニトロ cGMP/S-グアニル化シグナルについて解析した。心筋梗塞後 4 週間および圧負荷 6 週間の心臓組織を調べたところ、8-ニトロ cGMP の著明な蓄積が見られた。また、その心臓組織において、低分子量 G タンパク質である H-Ras が顕著に活性化されており、さらに H-Ras が 8-ニトロ cGMP によって S-グアニル化修飾されていることを見出した。組換えタンパク質や質

量分析、さらに細胞分画による解析の結果、H-Ras の 184 番目のシステイン残基が特異的に S-グアニル化され、それが H-Ras のラフト領域から非ラフト領域への局在を促進することで活性化に寄与していることが示唆された。心不全発症においてこれまで H-Ras の活性化を介した心筋細胞の老化が密接に関わることが示唆されている。そこで、8-ニトロ cGMP による心筋細胞および心線維芽細胞に対する老化誘導を解析した。その結果、8-ニトロ cGMP は H-Ras、特に 184 番目システイン残基の S-グアニル化に依存して、これら細胞の老化を誘導することが明らかとなった。以上の結果は、活性酸素による心筋老化促進機構として、8-ニトロ cGMP による H-Ras の活性化の関与を示唆したはじめての例である。そこでこの 8-ニトロ cGMP/S-グアニル化シグナルによる H-Ras の活性化を抑制が心不全発症を改善するかどうか、以下に検討を行った。

「8-ニトロ cGMP 代謝に関わるイオウ代謝酵素の同定:イオウ代謝に基づく心不全発症の予防」

8-ニトロ cGMP によるタンパク質 S-グアニル化を制御する機構は、活性酸素シグナルの制御に関わることが期待されるものの、その分子機構については不明であった。我々は、タンパク質 S-グアニル化に対する効果を指標とし、RNAi を用いたスクリーニングを行った結果、システイン代謝に関わるシスタチオニン β -シターゼ (CBS) と、シスタチオニン γ -リアーゼ (CSE) という酵素をノックダウンするとタンパク質 S-グアニル化が著しく増強することを見出した。CBS、CSE による 8-ニトロ cGMP の制御機構を詳細に解析した結果、それら酵素から生成したイオウ代謝物である活性イオウ種が 8-ニトロ cGMP を 8-SH-cGMP へと変換し、さらに生成した 8-SH-cGMP が活性酸素によって cGMP へと変換されることで、8-ニトロ cGMP シグナルが収束していることが分かった。また、我々はごく最近、このような活性イオウ種として、システインチオール基にイオウ原子が付加したパースルフィド・ポリスルフィド分子を同定した (未発表データ)。心筋梗塞を起こした心臓では、このようなイオウ代謝物・活性イオウ分子による 8-ニトロ cGMP の代謝が十分に行われず、その結果、過剰な 8-ニトロ cGMP の蓄積が起こっていることが考えられた。そこで、心筋梗塞を起こしたマウスに、イオウ代謝物のモデル化合物として硫化水素ナトリウムを投与し、心機能がどのようになるかを調べた結果、硫化水素ナトリウムを投与したマウスでは、著しい心機能の改善が見られた。以上の結果は、活性酸素と活性イオウ種のクロストークを介したこれまでに知られていない新しい炎症反応の制御機構を示唆しており、活性イオウ種の生体内生成を標的とした炎症性疾患の治療法開発への展開が期待される。

3. 今後の展開

今回のさきがけ研究において、炎症反応による酸化ストレスの新しい抑制機構として、システイン代謝と関連したイオウ代謝物の重要性を発見した。今回実験に用いた硫化水素ナトリウムは、高濃度において毒性があることや、不安定で取り扱いにくいことなどから、ヒトへの治療へ応用するためには、今後、同様のはたらきがある安全で取り扱いの容易な治療剤の開発が期待される。このような治療剤として、現在我々は、パースルフィドという活性イオウ分子種に注目して研究を進めている。一方、生体内におけるイオウ代謝、特に活性イオウ分子種の生成について

は、これまでほとんど解析が進んでいない。ヒトではメチオニン、シスチンなどをイオウ源として食餌性に摂取し、体内で活性イオウ分子種へと変換される機構が考えられる。このようなイオウ代謝を切り口とした新しい炎症制御の可能性についても今後さらなる検討を進める必要がある。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究の目的であった活性酸素に依存して制御されるシグナル伝達経路として、網羅的解析(プロテオミクス)と機能からの解析という2つの異なるアプローチから、S-グアニル化の標的タンパク質としてミトコンドリア熱ショックタンパク質とH-Rasを同定できたことは、評価に値すると考えられる。ただ、細胞内のタンパク質の中から、なぜ特定のタンパク質にS-グアニル化が誘導されるのか、その選択性の発現機構については、明確な答えを得ることができていない。この点は、活性酸素のシグナル伝達がどのような選択性を持って厳密に制御されているかを明らかにする上で本質的な問題であると考えられる。今回のさきがけ研究を進める中で、8-ニトロ cGMP および S-グアニル化タンパク質の代謝機構が明らかになりつつあることから、今後はこれら代謝機構を阻害剤や siRNA などを駆使して変動させながら、S-グアニル化の選択性発現の解明に取り組むことが課題である。一方、イオウ代謝物による活性酸素シグナルの制御についてはこれまでほとんど報告がなく、酸化ストレスの新しい制御系として、今後、さらに炎症制御との観点から研究を展開できるようにしたい。

(2) 研究総括評価(公開項目)

活性酸素の2次シグナル分子である8-ニトロ cGMP によりS-グアニル化されるタンパク質としてミトコンドリア熱ショックタンパク質と細胞老化の制御に関わるH-Rasを同定し、それらのS-グアニル化タンパク質の機能解析を行うと共に、心筋梗塞モデルにおける炎症・細胞老化促進機構へのS-グアニル化H-Rasの関与を明らかにした。同時に同定した心臓内でほとんど発現しないニトロ cGMP の細胞内代謝・分解を行う2つの酵素が生成するイオウ代謝物(硫化水素)により8-ニトロ cGMP シグナルが収束することなどを明らかにする報告を行った。独創性・新規性の高い活性酸素シグナルの制御に関する成果と評価される。未発表データの論文化も予定されており、今後さらに新しい炎症制御機構が明らかになることが期待できる。どのように慢性炎症の病因病態論へとつながっていくのか、今後の展開が大変楽しみである。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nishida, M., * Sawa, T., * Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H. van der Vliet, A., Freeman, B.A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y. and Akaike, T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophilic sulfhydration. *Nat. Chem. Biol.*, 8: 714-724 (2012). (* equal contribution)
2. Ahmed, K. A., Sawa, T., Ihara, H., Kasamatsu, S., Yoshitake, J., Rahaman, Md. M.,

Okamoto, T., Fujii, S. and Akaike, T. Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling. *Biochem. J.*, 441: 719-730 (2012).

3. Rahaman, Md.M., * Sawa, T.,* Ahmed, K.A., Khan, S., Inoue, H., Irie, A., Fujii, S. and Akaike, T. S-Guanylation proteomics for redox-based mitochondrial signaling. *Antioxid. Redox Signal.*, (2102) in press. (* equal contribution)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【総説及びその他の共著論文】

1. Sawa, T., Ihara, H., Ida, T., Fujii, S., Nishida, M. and Akaike, T. Formation, signaling functions, and metabolisms of nitrated cyclic nucleotide. *Nitric Oxide*, 34: 10-18 (2013).
2. Ito, C., Saito, Y., Nozawa, T., Fujii, S., Sawa, T., Inoue, H., Matsunaga, T., Khan, S., Akashi, S., Hashimoto, R., Aikawa, C., Takahashi, E., Sagara, H., Komatsu, M., Tanaka, K., Akaike, T., Nakagawa, I. and Arimoto, H. Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. *Mol. Cell* (2013) in press.
3. Karim, Md.F., Yoshizawa, T., Sato, Y., Sawa, T., Tomizawa, K., Akaike, T. and Yamagata, K. Inhibition of H3K18 deacetylation of Sirt7 by Myb-binding protein 1a (Mybbp1a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 441: 157-163 (2013).
4. Watanabe, K., Ishima, T., Akaike, T., Sawa, T., Kuroda, T., Ogawa, W., Watanabe, H., Suenaga, A., Kai, T., Otagiri, J. and Maruyama, T. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *FASEB J.*, 27: 391-398 (2013)
5. Sato, Y., Hatta, M., Karim, Md.F., Sawa, T., Wei, F.Y., Sato, S., Magnuson, M.A., Gonzalez, F.J., Tomizawa, K., Akaike, T., Yoshizawa, T. and Yamagata, K. Anks4b, a novel target of HNF4 α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.*, 287: 23236-23245 (2012).

【和文著書・総説】

1. 西田基宏、澤 智裕. 心不全におけるGタンパク質の酸化修飾と活性酸素・親電子シグナル制御. *細胞工学*, 31: 150-154, 2012.
2. 澤 智裕、赤池孝章. 活性酸素のシグナル伝達系と分子標的. *日本臨床*(増刊号),70: 273-276, 2012.
3. 澤 智裕、赤池孝章. ROS・親電子リガンドとガス状分子のシグナルネットワーク. *実験医学*(増刊), 30: 64-69, 2012.
4. 澤 智裕、赤池孝章. NO シグナリング研究の最前線. *Heart View*, 17: 88-92, 2013.
5. 西田基宏、澤 智裕. 硫化水素アニオンによるレドックス恒常性制御とその臨床応用. *生化学*,印刷中.

6. 澤 智裕、赤池孝章. 活性酸素とガス状分子のシグナルネットワーク. *医学のあゆみ*, 印刷中.
7. 澤 智裕、居原 秀、赤池孝章. 細胞の酸化ストレスを量る—親電子化合物 8-nitro-cGMP の定量を例に—. 見つける、量る、可視化する！質量分析実験ガイド: **実験医学別冊**(杉浦悠毅、末松 誠 編)、羊土社、151-158, 2013.

【学会発表】

1. 澤 智裕、赤池孝章. 酸化ストレス応答のケミカルバイオロジー. 第 84 回日本生化学会大会 (シンポジウム), 2011 年 9 月 23 日, 京都.
2. 澤 智裕、赤池孝章. 酸化ストレス応答のケミカルバイオロジー. 千里ライフサイエンスセミナー「ストレス応答の分子メカニズム」, 2011 年 11 月 14 日, 大阪.
3. 澤 智裕、赤池孝章. NO の多様性にケミカルバイオロジーで迫る！新薬理学セミナー(招待講演), 2012 年 6 月 30 日, 徳島.
4. Sawa, T., Rahaman, Md.M. and Akaike, T. Redox-based mitochondrial signaling regulated by a nitrated nucleotide via post-translational modification of mitochondrial heat shock proteins. JST-CREST International Symposium, *Frontiers in Immunology and Inflammation: From Molecules to Disease*, Tokyo, February 12, 2013.
5. 澤 智裕. 新規活性イオウ分子システインパースルフィドの生成と酸化ストレス制御. 第 12 回生物化学若手研究者セミナー(招待講演), 2013 年 9 月 7 日, 仙台.

【プレスリリース、新聞報道など】

1. 「硫化水素が心不全を改善する仕組みを解明～心不全の治療薬開発に期待～」(2012 年 7 月) http://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/kouhou/pressrelease/2012_file/release120704-4.pdf
2. 新聞報道「硫化水素で心機能改善: 治療薬に期待」(熊本日日新聞、平成 24 年 7 月 5 日)