

# 敗血症におけるS-ニトロシル化蛋白質の機能解析と治療への応用

西屋 禎 [北海道大学大学院医学研究科生理系薬理学  
講座細胞薬理学分野／講師]

## 背景・目的

細菌感染による全身性の炎症反応症候群である敗血症には有効な治療法がない。敗血症では、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が発現し、多量の NO が産生される。NO が蛋白質の Cys 残基のチオール基をニトロシル化することにより、多くの蛋白質の生理活性を制御することが示唆されているが、iNOS が特異的に発現誘導される敗血症において、如何なる蛋白質が S-ニトロシル化を受けるのか、また蛋白質の S-ニトロシル化が敗血症の病態形成に如何に関与するのかは不明である。本研究では、敗血症の分子機構の解明として、iNOS により S-ニトロシル化される蛋白質の単離・同定とその機能解析を目的に以下の実験を行った。

## 内容・方法

1) 酵母 two-hybrid 法を用いた iNOS と相互作用する分子の単離・同定

酵母 two-hybrid 法は、Clontech 社の Matchmaker 3 yeast two-hybrid system を用いて行った。Bait には、ヒト iNOS 蛋白質の N 末端から 500 アミノ酸部分を用いた。Prey には、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを用いた。

2) Tet-OFF システムによる iNOS の可逆的発現系の開発

Tet-OFF システムは、Clontech 社の RevTet-OFF システムを用いた。このシステムを HEK293T 細胞および RAW264.7 細胞に導入し、iNOS を可逆的に発現制御可能な細胞株を樹立した。

3) Biotin-switch 法を用いた iNOS 特異的に S-ニトロシル化される蛋白質の単離・同定

Biotin-switch アッセイは、Jaffrey らの方法 (*Nat Cell Biol* 3, 193-197, 2001) に従って行った。

## 結果・成果

1) 酵母 two-hybrid 法による iNOS と相互作用する分子の単離・同定

iNOS により S-ニトロシル化されて活性型となる COX-2 は、iNOS の 1-124 アミノ酸部分と相互作用することが報告されている (*Science* 310, 1966-1970, 2005)。このように、iNOS と相互作用する分子は、最も高レベルに NO に暴露され、S-ニトロシル化される可能性が高いと考えられることから、酵母 two-hybrid 法を用いて iNOS と相互作用する分子の単離・同定を試みた。その結果、一つの positive clone がとれ、DNA シークエンス解析の結果から Ups4 (全長 963 アミノ酸) の N 末端から約 700 アミ

ノ酸をコードする部分であることがわかった。

2) Tet-OFF システムを用いた可逆的 iNOS 発現系の開発

iNOS は、主にマクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞において、Toll 様受容体 (TLR) 刺激により発現誘導される。マイクロアレイの分析から、TLR 刺激によって数千の遺伝子の発現が変化することが示唆されていることから、iNOS による蛋白質の活性制御を解析するためには TLR リガンドやサイトカイン刺激なしに iNOS を発現させる系が必要であると考えられる。そこで、Tet-OFF システムを用いて iNOS の発現を可逆的に on/off 可能な系の開発を試みた。その結果、iNOS 発現を可逆的にコントロールすることが可能な HEK293T 細胞と RAW264.7 マウスマクロファージ細胞を樹立することに成功した。これらの細胞では、ドキシサイクリン (DOX) 添加時にはほぼ iNOS 発現が抑制され、DOX を培地から除去することにより、LPS/IFN- $\gamma$  刺激による iNOS 誘導と相関性の高い iNOS 発現を誘導することができることを確認した。

3) Biotin-switch アッセイと可逆的 iNOS 発現系を用いた iNOS 結合蛋白質の単離・同定

Jaffrey らにより開発された S-ニトロシル化蛋白質の単離・同定法と (2) で作製した可逆的 iNOS 発現系を用いて iNOS により S-ニトロシル化される蛋白質を単離・同定する方法の検討を行った。HEK293T-TetOFF-iNOS 細胞または RAW-TetOFF-iNOS 細胞の培養液から Dox を除去し、その 3、6、12 時間後に細胞抽出液を調製し、biotin-switch アッセイを行って S-ニトロシル化蛋白質を回収した。S-ニトロシル化されることがわかっている protein disulfide isomerase (PDI) が検出されるか否かをイムノプロットングで検討したが、PDI は検出されなかった。現在、PDI が iNOS では S-ニトロシル化されないのか、実験系に不備があるのかを検討中である。

## 今後の展望

酵母 two-hybrid 法で iNOS 結合蛋白質として単離した Ups4 はチオールプロテアーゼに属し、ユビキチン化蛋白質からユビキチンを除去する活性を有し、その活性に Cys<sup>311</sup> が重要であることが報告されている (*JBC* 272, 51-57, 1997)。今後、iNOS がこの Cys<sup>311</sup> を S-ニトロシル化して Ups4 の活性に影響を与えるのかどうかを検討する予定である。また、iNOS はユビキチン-プロテアソーム系により分解されることが報告されていることから (*PANS* 99, 12315-12320, 2002)、Ups4 が iNOS を脱ユビキチン化することで iNOS 蛋白質の half-life に影響を与えるのかどうかを検討する予定である。