

# 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 祐 [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が產生される。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Matchmaker3 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、その後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ーティングで検討したが、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。