

稲富千亜紀 論文内容の要旨

主 論 文

Overexpression of glutaredoxin protects cardiomyocytes against nitricoxide-induced apoptosis with suppressing the S-nitrosylation of proteins and nuclear translocation of GAPDH

グルタレドキシンの過剰発現はタンパク質の S-ニトロシル化や GAPDH の核移行を抑制することで、心筋細胞を一酸化窒素によるアポトーシスから保護する

稲富千亜紀、村田寛明、井原義人、後藤信治、浦田芳重、淀井淳司、
近藤宇史、澄川耕二

Biochemical and Biophysical Research Communications
425 巻、656 頁～661 頁、2012 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
展開医療科学講座麻酔・蘇生科学分野

(主任指導教員：澄川耕二 教授)

【緒 言】

グルタレドキシシン 1 (GRX1) はタンパク質の脱グルタチオニル化の触媒作用を担っている細胞質基質の酵素であるが、細胞の酸化還元システムを調節することによって炎症やアポトーシスにおいて明確な役割を持つ。S-ニトロシル化は一酸化窒素 (NO) によってタンパク質あるいは低分子量チオール (SH)基が S-ニトロチオール(R-SNO)に変換する酸化還元反応であるが、タンパク質の核移行やアポトーシスに関係していることが報告されている。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) は解糖系酵素としてよく知られているが、最近酸化ストレス・NO ストレスに対する反応や、GAPDH が NO による S-ニトロシル化によって核移行を起こすことでアポトーシスと関係していることが報告されている。我々は GRX1 の過剰発現が NO によるアポトーシスから心筋細胞を保護するのか、その機構を明らかにすることを目的に実験を行った。

【対象と方法】

- 1) 細胞株：ラット培養心筋芽細胞 H9c2 細胞に GRX1 を過剰発現させた細胞 H9c2-GRX30 と、コントロール細胞として H9c2 細胞に空のベクターを発現させた細胞 H9c2-Vector を使用した。
- 2) NO ストレスによる細胞障害の評価：それぞれの細胞を NO ドナーである S-nitroso-N-acetyl-DL

-penicillamine (SNAP) で刺激後に3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイとterminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) アッセイで細胞の生存率を比較した。

- 3) NO ストレス下での GAPDH の細胞内局在の観察：それぞれの細胞を SNAP 刺激後、抗 GAPDH 抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
- 4) GAPDH のシステイン(Cys)残基の S-ニトロシル化の検出：それぞれの細胞を SNAP 刺激後に、GAPDH の Cys 残基の S-ニトロシル化をウエスタンブロット法で評価した。
- 5) GRX1 による GAPDH の酸化還元制御の解析：それぞれの細胞群で SNAP 刺激後の時間経過による GAPDH の Cys 残基の酸化修飾の変化を、4-acetamide-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfide acid (AMS) を用いた遊離 SH 基の修飾法によりウエスタンブロット法で検出し、GAPDH の SH 基の酸化還元状態の解析を行った。また *in vitro* で、ウサギ GAPDH に GRX system (還元型グルタチオン、酸化型グルタチオン、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、グルタチオンレダクターゼ、GRX1) の存在下で SNAP 刺激し、時間経過による GAPDH の SH 基の酸化修飾の変化を同様の方法を用いて解析した。

【結 果】

- 1) H9c2-Vector と比較して H9c2-GRX30 では SNAP 刺激による細胞死やアポトーシスが抑制された。
- 2) H9c2-Vector では SNAP 刺激で GAPDH が細胞質から核に移行するのに対し、H9c2-GRX30 では GAPDH の分布に大きな変動がない傾向が認められた。
- 3) H9c2-Vector では SNAP 刺激で S-ニトロシル化された GAPDH と推測されるタンパク質が検出されたが、H9c2-GRX30 では検出されなかった。
- 4) H9c2-Vector は SNAP 投与後の時間経過に従って GAPDH の SH 基の酸化修飾が増える傾向が認められたが、H9c2-GRX30 では H9c2-Vector と比較して抑制された。 *in vivo* では GRX system の存在下で SNAP 刺激後の時間経過に伴い GAPDH の SH 基の酸化修飾が還元された。

【考 察】

細胞の酸化還元状態を定常的に調節する酵素である GRX1 の過剰発現は、心筋細胞を NO によるアポトーシスから保護することが証明された。この効果は GAPDH の酸化修飾を抑制することと NO による GAPDH の核移行を抑制する結果である可能性が示唆された。

H9c2-Vector では NO により GAPDH が S-ニトロシル化されている可能性が示唆されたが、H9c2-GRX30 ではこれが認められなかったこと、また *in vivo* でも *in vitro* でも NO による GAPDH の修飾を GRX1 が抑制している可能性があることより、GRX システムはシステインの脱ニトロシル化も調節していることが示唆された。

GRX1 が GAPDH の核移行を抑制する機構を明らかにすることを含め、今後さらなる解析が必要ではあるが、今回の結果より GRX1 の過剰発現が GAPDH の酸化還元状態を調節することで心筋細胞を NO によるアポトーシスから保護していることが示唆された。以上のことから、GRX1 による GAPDH の酸化還元状態調節の機構の解明は、酸化ストレス関連疾患の予防と治療へ新たなアプローチをもたらすと考えられる。