

8-Nitro-cGMP の発見と生理機能の解明

藤井重元, 澤 智裕, 赤池孝章

これまで毒性物質ととらえられていた活性酸素が、細胞機能を変化させるシグナルとして機能していることがわかってきた。近年、巧妙に制御された細胞内活性酸素シグナルの受容と伝達の仕組みが次第に明らかになりつつある。生体内において活性酸素と一酸化窒素により生成する 8-nitro-cGMP は、親電子性を有するユニークな特性をもった新規な二次メッセンジャーであり、活性酸素シグナル伝達において重要な役割を果たしている。

内因・外因を問わず、体内で産生される活性酸素はこれまで、酸化ストレスをもたらす有害物質として見なされてきた。しかし近年、活性酸素は生体分子に非特異的な化学損傷をもたらす毒性因子ではなく、巧妙に制御されたシグナル伝達機構の担い手であるというコンセプトが広く受け入れられつつある^{1), 2)}。すなわち、活性酸素が防御的な酸化ストレス応答を誘導する重要なシグナル分子であることが明らかになってきた。

活性酸素や一酸化窒素 (NO) は、シグナル伝達の最も上流に位置する分子群として、細胞内のセンサータンパク質を活性化し、さらに下流のエフェクター分子へとシ

グナルを伝える。このような活性分子種によるシグナル伝達機構の詳細は、これまでほとんどわかっていなかった。筆者らは最近、活性酸素シグナル伝達に関する新しい二次メッセンジャーを発見した。すなわち、NO の二次メッセンジャーである cGMP が、活性酸素と NO の作用によりニトロ化を受け、新規二次メッセンジャーである 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP) が生成することが明らかとなった。ここでは、生体内における 8-nitro-cGMP の生成と、そのシグナル伝達機構について紹介する。

新規環状ヌクレオチド 8-nitro-cGMP の生成

ガス状の無機ラジカルである一酸化窒素 (NO) は、生体内では NO 合成酵素 (NOS) の働きにより、基質である L-アルギニンを酸化的に分解してつくられる。NOS には、恒常的に発現している内皮型 NOS (endothelial NOS, eNOS)、神経型 NOS (neuronal NOS, nNOS) と、細菌のリポ多糖 (LPS) や炎症性サイトカインで発現が誘導される誘導型 NOS (inducible NOS, iNOS) の 3 つのアイソフォームがある。NO は、血圧調節、神経伝達、免疫調節、感染防御など多彩な生理機能の調節に関わるが、そのシグナル伝達経路としてこれまで、可溶性グア

Discovery of a New Signaling Molecule 8-Nitro-cGMP and Its Physiological Functions
Shigemoto FUJII, Tomohiro SAWA, Takaaki AKAIKE, 熊本大学大学院医学薬学研究部

ニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase, sGC) の活性化を介したグアノシン 3', 5' 環状ヌクレオチド (guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate, cGMP) を二次メッセンジャーとする経路が知られている。一方, NO は共存する活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) と反応して, 化学反応性に富む活性酸化窒素種 (reactive nitrogen oxide species, RNS) へと変換され, それらが核酸・タンパク質・脂質といった生体分子を化学修飾 (酸化, ニトロ化, ニトロソ化) する。このような生体分子の化学修飾は, もっぱら酸化ストレスにおける生体分子の損傷反応という観点から捉えられてきた。ところが近年, NO 依存的に生成するニトロ化産物が酸化ストレスに対する適応応答 (adaptive response) や細胞保護シグナルにおける重要な細胞内メッセンジャーとして機能していることが明らかとなってきた^(3,4)。

筆者らは, これまで核酸塩基グアニンの生体内ニトロ化反応について調べてきた。たとえば, マクロファージ系の細胞を LPS とインターフェロン γ (IFN γ) で刺激すると, iNOS が誘導され, 過剰な NO 産生が見られる。刺激細胞における 3-nitro-tyrosine (3-NT) 生成 (RNS 産生のバイオマーカー) を定量すると, 非刺激細胞と比べて有意に 3-NT 量が増加していることから, LPS/IFN γ 刺激によって, iNOS 由来の NO 産生とともに, ROS と RNS の生成も増加していることがわかる⁽⁵⁾。この刺激細胞を, 核酸塩基グアニンのニトロ化体である 8-nitroguanine 誘導体に対する特異抗体で免疫染色すると陽染像が見られ, LPS/IFN γ 刺激細胞で顕著に 8-nitroguanine 誘導体の生成が亢進していることが示唆された⁽⁵⁾。

8-Nitroguanine 誘導体の構造, すなわちリボースやリン酸基の有無について, それらを認識する特異抗体を作製し, 生体内でどのような 8-nitroguanine 誘導体が生成しているのかを免疫染色により検討したところ, 非常に興味深いことに, 主要な 8-nitroguanine 誘導体として cGMP のニトロ化体である 8-nitro-cGMP の細胞内生成の可能性が示唆された⁽⁶⁾ (図 1)。この RAW264.7 細胞内に生成した 8-nitroguanine 誘導体について液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) および高速液体クロマトグラフィー-電気化学検出法 (HPLC-ECD) によって詳細に解析した結果, 8-nitro-cGMP が最も主要なニトロ化産物であることが明らかとなった (図 2)。上述のように, cGMP は NO の二次メッセンジャーであるが, このものの誘導体の生成は哺乳細胞においてはこれまで知られておらず, 8-nitro-cGMP が最初の報告となった。

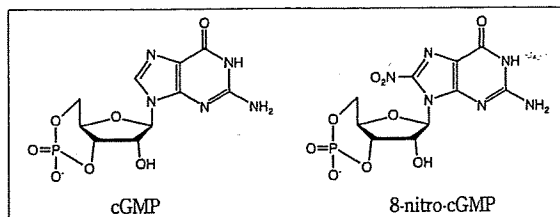


図 1 ■ cGMP と 8-nitro-cGMP の構造

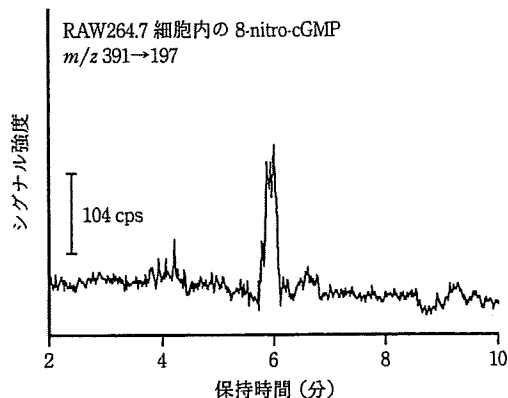
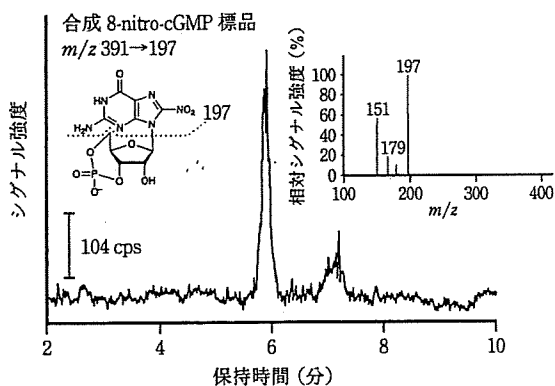


図 2 ■ 8-nitro-cGMP の細胞内生成の同定

LPS と IFN γ で刺激した RAW264.7 細胞から, 8-nitroguanine 誘導体をアフィニティー精製し, LC-MS/MS で解析した。上段は合成 8-nitro-cGMP 標品, 下段は RAW264.7 細胞抽出物の解析結果を示す。細胞内において 8-nitro-cGMP が生成していることがわかった。(文献 5 より改変)

8-Nitro-cGMP による cGMP 依存性シグナル伝達

8-Nitro-cGMP は cGMP と同様, cGMP 依存性タンパク質キナーゼ (protein kinase G, PKG) を活性化する⁽⁶⁾。たとえば, 血管内皮を除去したラット頸動脈を作製し, フェニレフリンで前処理した後に 8-nitro-cGMP を添加し, 血管弛緩反応を観察すると, 8-nitro-cGMP は濃度依存的に血管を弛緩させた。また, 培養平滑筋細胞を用いた解析系により, 8-nitro-cGMP 処理が, 平滑筋細胞内で vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) のリ

ン酸化を誘導すること、およびその VASP リン酸化が、PKG アンタゴニストである 8-(4-chlorophenylthio)-guanosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate, Rp isomer によって完全に抑制されることがわかった。以上のことより、8-nitro-cGMP は、もとの cGMP と同様に生体内で cGMP 依存性のシグナル伝達活性を有するものと考えられる。

細胞内に生成した cGMP はホスホジエステラーゼ (PDE) によって速やかに分解され、そのシグナル活性が消失する。一方、8-nitro-cGMP は PDE に完全に耐性である⁶⁾。実際、NO 放出試薬である S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) で処理をした C6 ラットグリオーマ細胞の cGMP と 8-nitro-cGMP の生成量を LC-MS/MS により測定すると、cGMP は SNAP 添加後 1 時間以内に一過性に増加した後、速やかに減少するのに対し、8-nitro-cGMP は、SNAP 添加後 18 時間まで経時的に増加を続けることがわかった(論文投稿中)。すなわち、8-nitro-cGMP は PDE による分解に対し耐性であるため、cGMP に比べて持続的なシグナル活性を発揮するものと思われる。

8-Nitro-cGMP の親電子性とタンパク質 S-グアニル化

8-Nitro-cGMP によるシグナル伝達機構には、上記の PKG に依存した経路以外に、これまでにない新しいメカニズムが関わっている⁶⁾。すなわち、cGMP はそのグアニン部分がニトロ化されることにより親電子性を獲得する。具体的には、8-nitro-cGMP がその親電子性により、細胞内のタンパク質のシステイン (Cys) のチオール (SH) 基と反応して、これまで知られていなかったタンパク質翻訳後修飾である cGMP 付加体形成を介して酸化ストレスセンサータンパク質を活性化することがわかつ

てきた。このような新規なタンパク質翻訳後修飾を“タンパク質 S-グアニル化 (protein S-guanylation)”と呼ぶことにした(図 3)。8-nitro-cGMP による S-グアニル化には、Cys SH 基の酸解離度 (pK_a) が大きく影響し、 pK_a の低いもの、すなわち酸性度の高い SH 基に対してより高い反応性を示していた。たとえば、グルタチオンや L-Cys などの一般的な低分子のチオール化合物の pK_a はおよそ 8.5 程度である。また、グルタチオンに対する 8-nitro-cGMP と ROS・RNS の反応速度定数を比較すると、8-nitro-cGMP のグルタチオンに対する反応性は ROS・RNS に対してかなり小さく、このため細胞内に過剰のグルタチオン (mM レベル) が存在しているような環境中でも 8-nitro-cGMP は安定して親電子シグナル活性を発揮できることが予想される。

一方、細胞内のタンパク質の中には著しく低い pK_a の SH 基、すなわちレドックス活性および親電子性の高い SH 基をもつものがある。興味深いことに、それら低 pK_a (高レドックス活性) チオール含有タンパク質の多くは酸化ストレスに対して感受性で、ROS や RNS、および 8-nitro-cGMP などの親電子物質により SH 基の化学修飾をうける。さらに、それが引き金となってコンフォメーション変化を介したシグナル伝達を行なうことで、いわゆる酸化ストレスセンサータンパク質として機能しているものと考えられる⁶⁻⁸⁾。

8-Nitro-cGMP によるタンパク質 S-グアニル化と適応応答シグナル

Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) は、上述の酸化ストレスセンサータンパク質の代表的なものであり、細胞内では転写因子 Nrf2 と結合して、その転写活性を制御している⁹⁾。すなわち、通常は Keap1 は Nrf2 と結合しており、Nrf2 のユビキチン化を介するプロテ

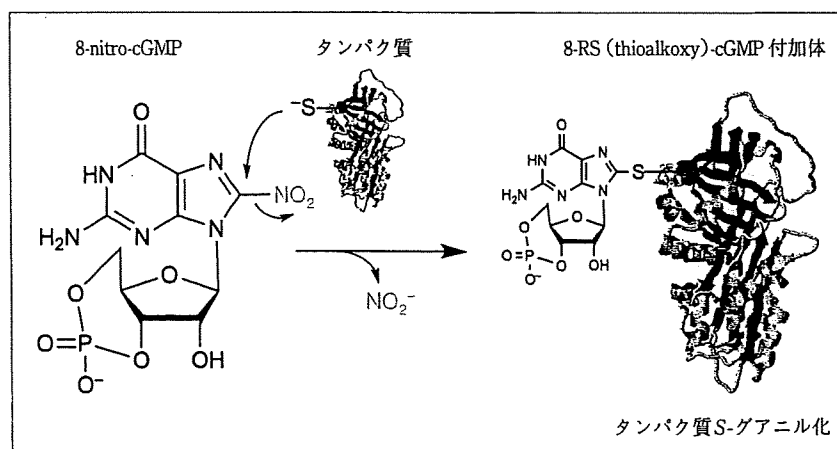
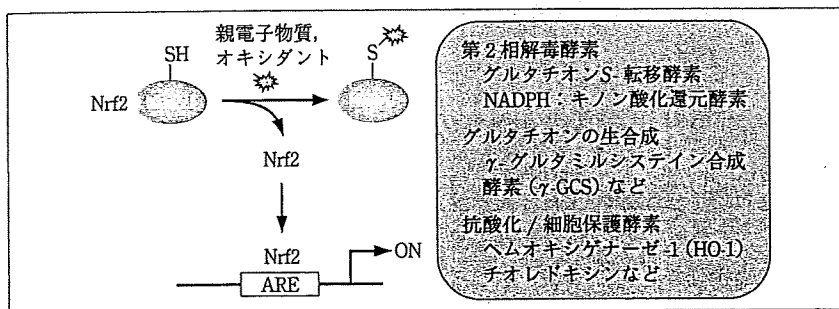


図 3 ■ タンパク質 S-グアニル化反応

8-Nitro-cGMP がタンパク質 SH 基と反応し、cGMP を付加する。このとき、8-nitro-cGMP のニトロ基に由来する亜硝酸イオンが放出される。



平常時には Keap1 は Nrf2 と結合しており、Nrf2 の転写活性を抑制しているが、Keap1 の SH 基が親電子物質や ROS・RNS により修飾を受けると、Nrf2 が活性化し、酸化ストレス適応応答に関連した様々な遺伝子の発現が誘導される。ARE: antioxidant responsive element

図4 ■酸化ストレスセンサータンパク質 Keap1 の SH 基修飾とそれによる遺伝子発現

アソームでの分解を促進することにより Nrf2 を不安定化している。親電子物質などにより Keap1 の Cys SH 基が化学修飾を受けると、Nrf2 との解離あるいは Nrf2 の安定化がもたらされ、その結果、Nrf2 誘導性に種々の遺伝子発現が起こる。この Nrf2 によって発現誘導される遺伝子は、①グルタチオン合成に関わる酵素（グルタミルシステイン合成酵素、シスチン輸送体）、②活性酸素を消去する酵素（チオレドキシ還元酵素1など）、③抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、④第2相解毒酵素（グルタチオン S-転移酵素など）、などがあり、これら遺伝子産物の作用により酸化ストレスに対して耐性を獲得するようになる（図4）。すなわち、Keap1/Nrf2 シグナルは酸化ストレスに対する適応応答シグナルであるといえる。

具体的なシグナルモデル系として、LPS/IFN- γ 刺激したマクロファージや、さらにはサルモネラ感染マクロファージの細胞内で生成する S-グアニル化タンパク質を解析した結果、この Keap1 が S-グアニル化の標的タンパク質の一つであることが確認された⁽⁶⁾。一方、組換え Keap1 を用いた *in vitro* の解析より、Keap1 に対して大過剰のグルタチオン（10 mM、SH 基濃度で 3,000 倍以上）が存在しても、8-nitro-cGMP による Keap1 の S-グアニル化はまったく阻害されなかった⁽⁶⁾。したがって、細胞内のグルタチオンなどに依存した還元条件においても、Keap1 の反応性の高い SH 基に対して 8-nitro-cGMP が優先的に S-グアニル化をもたらすものと考えられる。

さらに、8-nitro-cGMP による Keap1/Nrf2 系のシグナル伝達経路について、C6 ラットグリオーマ細胞を用いて詳細な解析を行なった（論文投稿中）。C6 細胞を SNAP で処理したり、iNOS の発現誘導刺激である LPS/ サイトカインで刺激すると、LC-MS/MS による解析により細胞内において著明な 8-nitro-cGMP の生成が観察された。また、このような 8-nitro-cGMP の生成

に伴い、細胞内の Keap1 が S-グアニル化を受けることが、ウエスタンブロットおよびマトリックス支援レーザー脱離 (MALDI)-飛行時間型 (TOF)-MS/MS を用いた解析により明らかになった。また、その下流のシグナル経路として、細胞内の Keap1 の S-グアニル化の増加に伴い、Nrf2 の活性化が観察され、Nrf2 により発現制御を受ける抗酸化タンパク質である HO-1 などの発現上昇が見られた。上記のように Keap1/Nrf2 系により発現制御を受ける遺伝子群は酸化ストレスに対する適応応答に働くことが知られている。実際、過酸化水素による細胞死に対する 8-nitro-cGMP の細胞保護効果について調べたところ、8-nitro-cGMP で処理した細胞では、非処理の細胞に比べ過酸化水素による細胞死が有意に抑制され、8-nitro-cGMP が Keap1 の S-グアニル化を介して細胞保護効果を発揮することが明らかとなった（論文投稿中）。

筆者らの研究室では、このような Keap1 の S-グアニル化を介した 8-nitro-cGMP のシグナル伝達について、特に感染症モデルを用いたストレス応答シグナルの解析も進めている^(6,10)。これまで、サルモネラ感染病態においては、ROS や NO あるいは RNS がその抗菌作用とともに細胞保護作用があることがマウスモデルを用いた解析から示唆されていたが^(11,12)、それがどのようなシグナル伝達によるのかはわかっていなかった。筆者らはごく最近、サルモネラ感染に伴ってマクロファージ細胞内に 8-nitro-cGMP が生成すること^(6,10)、またこの 8-nitro-cGMP が細胞保護作用を示すことを見いだした⁽¹⁰⁾。さらに解析を進めたところ、この感染系においても Keap1 が 8-nitro-cGMP による S-グアニル化修飾の標的タンパク質の一つであることが明らかとなった。すなわち、この Keap1 S-グアニル化が引き金となって Nrf2 シグナルの活性化がもたらされ、HO-1をはじめとする抗酸化酵素群などの発現誘導を介して、細胞保護作用が発揮されていることが明らかになった⁽¹⁰⁾。

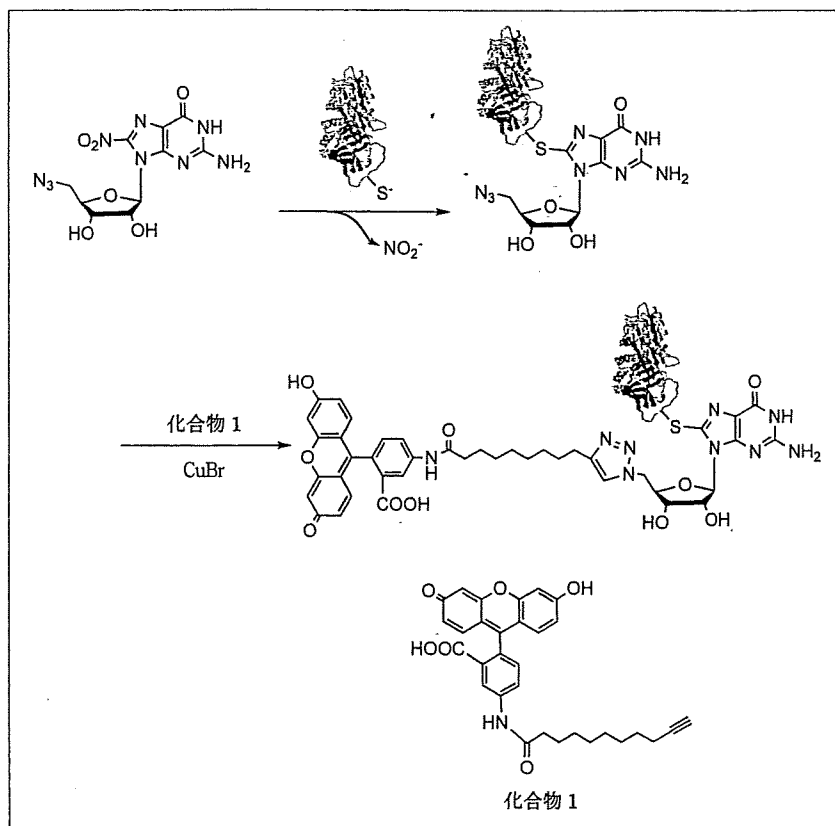


図5 ■ クリックケミストリーに基づいたタンパク質 S-グアニル化の検出法

8-Nitroguanosine のアジド誘導体がタンパク質 SH 基に対して S-グアニル化を起こす。その後、銅触媒存在下でアジド基と化合物 1 を反応させ、S-グアニル化部位に蛍光団を導入する。この蛍光を検出することで S-グアニル化を確認する。

このように、ニトロ化された cGMP は、SH 基に対する反応性を獲得し、酸化ストレスセンサータンパク質の S-グアニル化というユニークな反応によって適応応答シグナルを伝えることが示された。すなわち、タンパク質 S-グアニル化は、NO と活性酸素によるユニークなシグナル伝達経路として、生体の酸化ストレス応答の主要な制御機構を担っているといえる⁽¹³⁾。

タンパク質 S-グアニル化の解析と活性酸素シグナル研究の展開

8-Nitro-cGMP は、活性酸素シグナルに関与するとともに、親電子反応であるタンパク質 S-グアニル化を介して細胞内シグナル伝達に関わっている。活性酸素・親電子シグナルを解析する上で重要となるのは、実際の細胞内でどのタンパク質が標的となり、どのシステイン残基 (SH 基) が修飾を受けているのかを明らかにすることである。タンパク質 S-グアニル化に関しては、すでに特異抗体 (ポリクローナル、モノクローナル) が得られており、それらを用いることで誘導体化などの操作をすることなく解析 (S-グアニル化プロテオミクス) を行なうことが可能である。実際、Keap1 の S-グアニル化部

位について質量分析により解析したところ、細胞内においては特定のシステイン残基が優先的に S-グアニル化されていた (論文投稿中)。このシステイン残基は、Keap1 と Nrf2 のインターフェイスに存在することから、S-グアニル化によって Keap1/Nrf2 タンパク質相互作用が変化していることが考えられ、現在、その機能解析を進めている。一方、筆者らは、クリックケミストリーに基づいた S-グアニル化の標的タンパク質の高感度な検出法の開発も進めている⁽¹⁴⁾ (図 5)。この方法では、8-nitroguanosine を母骨格としても誘導体と細胞を反応させ、続いて S-グアニル化されたタンパク質に対してのみクリックケミストリーを介して蛍光団を導入することで、選択的かつ高感度な S-グアニル化タンパク質の検出が可能となった。

これまで、生体分子のニトロ化修飾は、ROS・RNS の過剰な産生に伴う非特異的な損傷反応と考えられてきたが、8-nitro-cGMP はタンパク質 S-グアニル化というユニークで選択的なメカニズムにより活性酸素シグナルの制御に関わることが明らかとなった。今後、細胞内ヌクレオチド (あるいはヌクレオチドプール) のニトロ化反応を介した、ROS・RNS センシングと活性酸素シグ

ナル研究の展開が期待される¹³⁾。

*

本稿で紹介したように、8-nitro-cGMPを活性酸素の二次メッセンジャーとするタンパク質S-グアニル化は、ユニークなタンパク質翻訳後修飾であり、酸化ストレスに対する適応応答における重要なシグナル伝達経路の一つであることがわかった。タンパク質S-グアニル化の機能解析を今後さらに展開することにより、活性酸素シグナルの全貌解明に貢献できるものと考えている。

文献

- 1) C. Nathan : *J. Clin. Invest.*, 111, 769 (2003).
- 2) B. D'Autreaux & M. B. Toledano : *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 813 (2007).
- 3) 赤池孝章 : 実験医学, 27, 2320 (2009).
- 4) 澤 智裕, 有本博一, 赤池孝章 : 実験医学, 27, 2341 (2009).

- 5) T. Sawa *et al.* : *Nature Chem. Biol.*, 3, 727 (2007).
- 6) T. Sawa, H. Arimoto & T. Akaike : *Bioconjug. Chem.*, in press.
- 7) H. J. Forman, M. Torres & J. Fukuto : *Mol. Cell Biochem.*, 234/235, 49 (2002).
- 8) H. K. Na & Y. J. Surh : *Mol. Carcinogenesis*, 45, 368 (2006).
- 9) M. Kobayashi & M. Yamamoto : *Adv. Enzyme Regul.*, 46, 113 (2006).
- 10) M. H. Zaki, S. Fujii, T. Okamoto, S. Islam, S. Khan, K. A. Ahmed, T. Sawa & T. Akaike : *J. Immunol.*, 182, 3746 (2009).
- 11) K. Umezawa, T. Akaike, S. Fujii, M. Suga, K. Setoguchi, A. Ozawa & H. Maeda : *Infect. Immun.*, 65, 2932 (1997).
- 12) M. S. Alam, T. Akaike, S. Okamoto, T. Kubota, J. Yoshitake, T. Sawa, Y. Miyamoto, F. Tamura & H. Maeda : *Infect. Immun.*, 70, 3130 (2002).
- 13) M. Feelish : *Nature Chem. Biol.*, 3, 687 (2007).
- 14) Y. Saito, H. Taguchi, S. Fujii, T. Sawa, E. Kida, C. Kabuto, T. Akaike & H. Arimoto : *Chem. Commun.*, 5984 (2008).

プロフィール

赤池 孝章 (Takaaki Akaike) <略歴> 1984年熊本大学医学部卒業/1991年同大学大学院医学研究科博士課程修了/同年同大学医学部助手/1992年同講師/1994年同助教授/2005年同大学大学院医学薬学研究部微生物学分野教授, 現在にいたる。この間, 1993年米国トーマスジェファーソン医科大学客員教授, 2001年米国アラバマ大学バーミングハム校客員教授, 2003~2006年文部科学省研究振興局学術調査官(兼任)<研究テーマと抱負>活性酸素と酸化ストレスのケミカルバイオロジー。最近ではNO研究の中で出会った内因性親電子物質(8-nitro-cGMP)によるシグナル伝達メカニズムの解明を目指している。また, 昨年より新学術領域研究(研究領域提案型)「活性酸素シグナル」の領域代表を務める<趣味>旅行(特に史跡の散策), 絵画鑑賞, 読書

井上 嘉則 (Yoshinori Inoue) <略歴> 1976年早稲田大学理工学部応用化学科卒業/同年昭光通商(株)/1985年横河電機(株)・横河アナリティカルシステムズ/1998年技術コンサルタント/2008年

日本フィルコン(株), 現在にいたる。1996年工博(山梨大学)<研究テーマと抱負>吸着・分離剤の開発。「分けること」と「分けないこと」との融合<趣味>古代史, 古美術, 寺社めぐり, 料理など

丑田 公規 (Kiminori Ushida) <略歴> 1987年京都大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程修了/同年京都工芸繊維大学工学部教務員/1989年同助手/1990年理化学研究所研究員, 現在にいたる<研究テーマと抱負>ムチン化学, 細胞外物質の物理化学<趣味>産業遺構を探る旅行, 仏像

梅垣 敬三 (Keizo Umegaki) <略歴> 1985年静岡薬科大学大学院博士課程修了後, 国立栄養研究所(現(独)国立健康・栄養研究所)入所, 同研究員, 主任研究官を経て, 同室長, 2006年同研究所健康食品情報プロジェクトリーダー/2008年同研究所情報センター長, 現在にいたる<研究テーマと抱負>抗酸化性を有する食品成分の有効性と安全性の評価法, 食品と医薬品の相互作用

太田 敏郎 (Toshiro Ohta) <略歴> 1988年東京大学理学部生物学科卒業/1993年同大学大学院理学系研究科植物学専攻博士課程修了/同年日本学術振興会特別研究員(PD)/1996年静岡県立大学大学院生活健康科学研究科助手/2007年同助教, 現在にいたる。この間, 1994年米国ミネソタ大学ポスドク<研究テーマと抱負>食品成分による血管新生の抑制とその分子機構, 心筋梗塞における血管内皮細胞虚血障害<趣味>水泳, サイクリング

大竹 久夫 (Hisao Ohtake) <略歴> 1968年東京大学工学部卒業/1973年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了(工博)/1978年東京大学応用微生物研究所助教授/1990年広島大学工学部醸造工学講座教授/2003年大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻教授/2005年同研究科生命先端工学専攻教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>リン資源枯渇の問題に正面から取り組んでいきたい

【活性酸素・NOによる感染防御シグナルの新展開】

Antimicrobial signaling mediated by reactive oxygen species and NO

岡本 竜哉・澤 智裕・藤井 重元・赤池 孝章

Okamoto Tatsuya, Sawa Tomohiro, Fujii Shigemoto, Akaike Takaaki

Key words

一酸化窒素 (NO), 活性酸素,
感染防御シグナル,
8-ニトロ-cGMP,
ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)

要約

感染症において普遍的に産生される活性酸素種やNOは、病原体に抗菌作用を発揮する一方、宿主に酸化ストレスをもたらすことから、これまで生体にとって有害な分子種と考えられてきた。我々は、感染に伴って、NOのシグナル分子であるcGMPがニトロ化された新しい環状ヌクレオチドである8-ニトロ-cGMPが、活性酸素種とNOの産生に依存して生体内で生成することを見出した。さらに8-ニトロ-cGMPは、タンパク質のシステイン残基のチオール基と反応し、cGMPを付加するユニークなタンパク質翻訳後修飾(S-グアニル化)を介して、HO-1誘導といった酸化ストレス応答をもたらすシグナル分子として、感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。8-ニトロ-cGMPのシグナル機能の解明は、感染病態研究の新たな展開をもたらすばかりでなく、感染症の治療法の開発に大きく寄与することが期待される。

はじめに

一酸化窒素(NO)は、NO合成酵素(NOS)によりL-アルギニンと酸素より生成される低分子無機ラジカルである。これまで、神経型NOS(nNOS)、内皮型NOS(eNOS)、誘導型NOS(iNOS)の3種類のアイソフォームが同定されている。NOは、可溶性グアニルシクラーゼ(sGC)を活性化し、その産物であるグアノシン3',5'-環状1リン酸(cGMP)は、2次メッセンジャーとして、血管系や神経系の情報伝達

に関与する。一方、感染・炎症病態においてはiNOSの誘導を介して過剰なNO生成がもたらされる。NOは、共存する活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)との反応を経て、パーオキシナイトライト(ONOO⁻)や二酸化窒素(NO₂)といった、より化学反応性に富む活性酸化窒素種(reactive nitrogen oxide species, RNOS)に変換され、病原体と宿主の双方に酸化ストレスをもたらすことが示唆されてきた(図1)。ROSやNOは、感染・炎症のみならず、がんや神経疾患、生活習慣病といった様々な病態に関与することから、生体にとって有害な分子種と考えられている。しかし最近になって、感染防御や酸化ストレス応答におけるシグナル分子として機能することで、より幅広い生命現象に関わっていることが明らかとなり、大きく注目されている。本稿では、感染病態における、活性酸素・NOによる生体防御シグナルの分子機構について、我々の知見を中心に概説する。

1. 感染病態におけるNOの生物活性の二面性

iNOSによるNO産生は、細菌、ウイルス、真菌といった様々な病原体による感染症に共通して認められる非特異的防御反応の一つと考えられる。病原体の持つ様々な菌体由来成分(リポ多糖体、ペプチドグリカン、真菌多糖体など)や核酸由来成分

熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野

: Department of Microbiology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

〒860-8556 熊本市本荘1-1-1 Tel: 096-373-5320 Fax: 096-362-8362

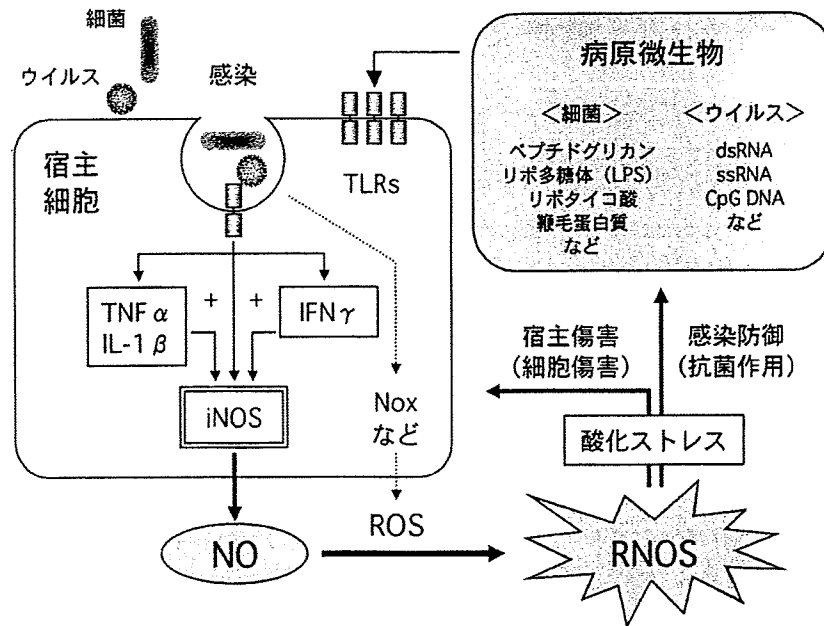


図1 感染病態におけるiNOSの誘導と、活性酸素・NOの二面的作用
病原微生物の様々な菌体成分や核酸成分は、TLRsにより認識され、iNOSが誘導される。炎症性サイトカインやインターフェロンは、iNOSの誘導を相乗的に促進する。NOは、NADPH oxidase (Nox) などにより生成されるROSとの反応により、より化学反応性に富むRNOSに変換される。RNOSは病原微生物と宿主細胞の双方に酸化ストレスをおよぼすため、そのバランスによって感染病態に対し、宿主傷害的、あるいは感染防御的、いずれの方向にも作用し得る。

(dsRNA, ssRNA, CpG DNA など) が、Toll-like receptors (TLRs) によって認識されることでiNOSは誘導され¹⁾、さらに感染に伴い産生される炎症性サイトカインやインターフェロンによってその誘導は相乗的に増強される(図1)²⁾。NOの感染防御能について、サルモネラのマウス感染モデルを用いて解析したところ、NOを十分に産生できないiNOS欠損マウスでは、野生型に比べ、肝内生菌数が有意に多く、また死亡率も高かった。また野生型感染系へのiNOS阻害薬の投与は病態を悪化させた³⁾。このことは、iNOS由来のNOが感染防御(抗菌)作用を発揮していることを示唆している。一方、ウイルス感染症、例えば、マウスインフルエンザウイルス肺炎モデルにおいては、この逆の現象が認められる。すなわち、iNOS阻害薬の投与は生存率を改善し、またiNOS欠損マウスでは、野生型に比較して、肺の病理所見は軽度で、死亡率も有意に低かった⁴⁾。すなわち、NOは抗ウイルス作用を示すことなく、むしろ宿主の細

胞・組織を傷害し、病態の進展に関わっていると考えられる。感染病態において普遍的に産生されるNOは、宿主と病原微生物の双方を傷害し、そのバランスによって感染病態に二面的に作用する可能性が示唆される(図1)。

2. 感染病態におけるROS・NOのシグナル機能

低分子の無機化合物であるNOが、多彩な生物活性を発揮するのは、NOが多様な化学反応性とシグナル伝達機能を有していることに起因する。NOによるシグナル伝達には2つの異なる経路、すなわちcGMP依存性経路と、cGMP非依存性経路が知られている。cGMP依存性経路によるシグナル伝達は、前述したように、NOによるsGCの活性化を介して生成したcGMPによりもたらされ、神経・血管系に生理的な調節作用を発揮する。一方、cGMP非依存性経路は、タ

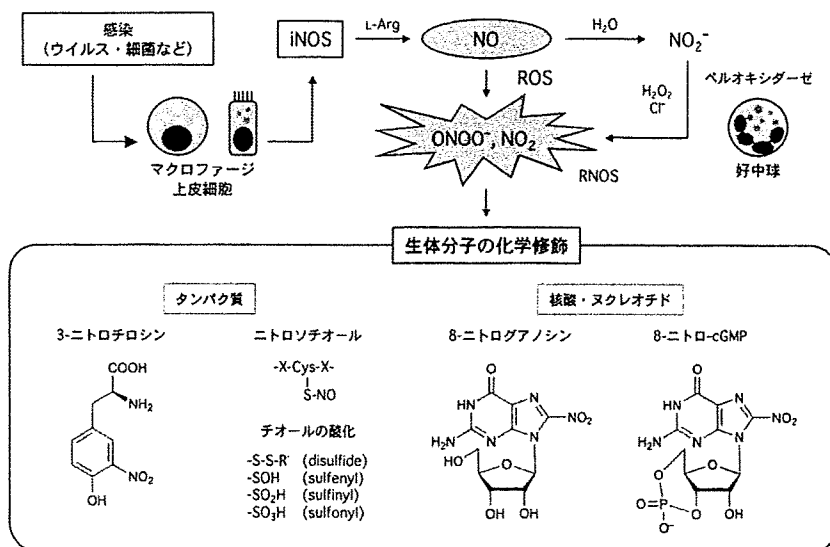


図2 ROS・NOによる生体分子の化学修飾
 感染病態において、NOは共存するROSとの反応を経てRNOSに変換され、タンパク質・核酸といった生体分子を化学修飾し、3-ニトロチロシンや8-ニトログアノシン誘導体といった芳香族化合物のニトロ化体、さらにチオール基のニトロ化体や酸化体を生成する。

ンパク質、脂質、核酸といったさまざまな生体分子の化学修飾によってもたらされる⁶⁾。NOはROSとの反応を介してRNOSに変換され、タンパク質中のチロシンやトリプトファン残基、核酸塩基であるグアニンといった芳香族化合物をニトロ化(NO₂付加反応)する。またNOは、酸素や金属イオンの存在下でシステイン残基のチオール基をニトロ化(NO付加反応)する。さらに、チオール基は、ROS・RNOSにより可逆的もしくは不可逆的な酸化修飾をうける(図2)。このような生体分子の化学修飾は、しばしば生体機能を障害するため、酸化ストレスをもたらす有害な反応として理解されてきた。しかしながら、最近になって、生体防御シグナルなどの生理的な情報伝達をも担っていることがわかってきた^{6) 7)}。そこで以下に、RNOSが関与するユニークな生体分子の化学修飾と感染病態における意義について解説する。

3. 8-ニトログアノシンの生成と感染病態

DNAやRNAをONOOと反応させると、グアニン塩基の8位の炭素がニトロ化されて、8-ニトログアノシンが生成する(図2)⁸⁾。インフルエンザウイルス感染マウスの肺組織を免疫染色すると、iNOSの局在

に一致して、特に気道上皮に強い陽性像が得られた⁹⁾。また、ヒトの疾患肺組織、特に気道上皮においても陽性像を認めた⁹⁾。8-ニトログアノシンの生物活性については、第一に、ウイルスや真核細胞に対し遺伝子変異を誘発すること^{10) 11)}、第二に、チトクロムP450レダクターゼやNOSによって還元的に活性化され、スーパーオキシド(O₂⁻)を産生するレドックス活性分子として機能することがわかった¹²⁾。このことは、8-ニトログアノシンが、単なる酸化ストレスのバイオマーカーではなく、固有の生物活性を発揮することを示唆している。

4. 8-ニトロ-cGMPの生成と感染防御シグナル

グアニン塩基は核内の遺伝子のみでなく、細胞質のヌクレオチドプールにも存在し、エネルギー代謝や細胞内シグナル伝達を担っているため、そのニトロ化は幅広い生命現象に影響を及ぼす可能性がある。そこで、我々は、DNAやRNAといった高分子核酸以外のグアニンヌクレオチドのニトロ化反応に着目し解析を進めた。その結果、NOの二次シグナル分子であるcGMPそのものがRNOS依存的にニトロ化され、全く新規の環状ヌクレオチドである8-ニトログ

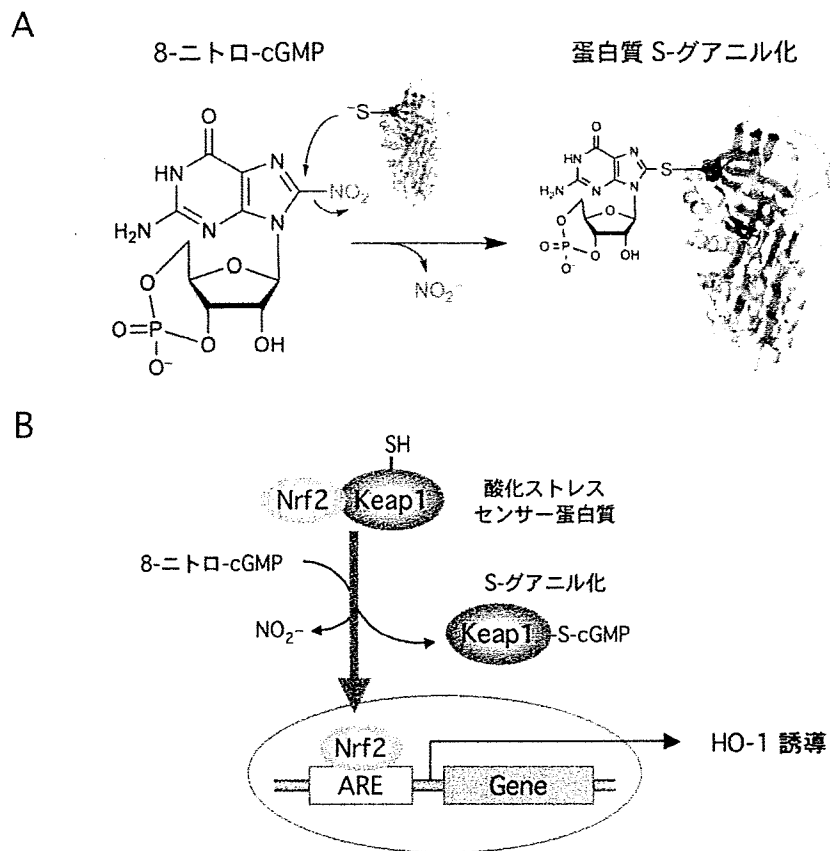


図3 8-ニトロ-cGMPによる新しいタンパク質翻訳後修飾と感染防御シグナル応答
 (A) 活性酸素・NO 依存的に細胞内に生成する新規環状スクレオチド 8-ニトロ-cGMP は高い親電子性を有し、タンパク質中のチオール基と反応し cGMP を付加するタンパク質翻訳後修飾 (S-グアニル化) を惹起する。
 (B) 8-ニトロ-cGMP は、酸化ストレスセンサータンパク質 Keap1 の S-グアニル化を介して、感染防御応答をもたらすシグナル分子として機能している可能性が示唆される (ARE, antioxidant response element)。

アノシン 3',5'-環状リリン酸 (8-ニトロ-cGMP) が細胞内に生成することを世界で初めて証明した⁷⁾。興味あることに、8-ニトロ-cGMP は高い親電子性を有しており、タンパク質中のチオール基との求核置換反応により cGMP を付加する全く新しいタンパク質翻訳後修飾 (S-グアニル化) をもたらすことを見出した (図3A)⁷⁾。

現在、S-グアニル化の標的タンパク質を探索しているが、その有力な候補分子として Keap1 に注目している¹³⁾。Keap1 は、酸化ストレス応答を制御する転写因子 Nrf2 の活性化を抑制する調節因子である。Keap1 は多くの Cys 残基を有しており、酸化ストレスセンサーとして機能している。すなわち、ROS や親電子性物質によりチオール基が化学修飾を受ける

と、Nrf2 に対する結合性が失われ、その結果 Nrf2 が核へと移行し、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) などの酸化ストレス応答因子や毒物代謝酵素が誘導される (図3B)¹³⁾。実際にインフルエンザウイルス感染モデルを用いて解析したところ、ウイルス増殖の場である気道上皮の細胞質において、iNOS 誘導の時間経過に一致した強い 8-ニトロ-cGMP の免疫染色像を認め、これに並行して HO-1 の誘導が認められた。また、種々の培養細胞に 8-ニトロ-cGMP を添加すると、HO-1 が誘導されることを証明した (論文投稿中)。したがって、8-ニトロ-cGMP は、Keap1 の S-グアニル化を介して HO-1 を誘導するシグナル分子として機能している可能性が示唆された。(図3B)。

5. 感染病態における HO-1 誘導の意義

HO-1 はヘムを分解し、反応産物であるビリベルジンは、ビリルビンへと還元されて、抗酸化作用を発揮する。また、その反応過程で生じる一酸化炭素 (CO) は、炎症性サイトカインの産生やアポトーシスを抑制することが知られている。

一般に、感染に伴う宿主細胞のアポトーシスは、病態の進展に重要と考えられている。実際、動物モデルに HO-1 遺伝子を導入すると、アポトーシスが抑制され、その結果として生存率が改善することが報告されている¹³⁾。我々も、サルモネラ感染モデルにおける HO-1 発現の意義を検討した。その結果、感染に伴い、肝における 8-ニトロ-cGMP の生成と、主にマクロファージにおける HO-1 の誘導を認めた。また HO-1 阻害剤の投与により、肝組織中のアポトーシス細胞の増加と肝内生菌数の増加を認めた。したがって、HO-1 は、マクロファージのアポトーシスを抑制することで、サルモネラのクリアランスを促進し、感染防御能を発揮している可能性が示唆された (論文投稿中)。

しかしその反面、感染防御におけるアポトーシスの必要性を示唆する報告もある。例えば、インフルエンザウイルス感染においては、感染上皮がアポトーシスに陥ることによって、マクロファージによる貪食が促進され、その結果ウイルスのクリアランスが促進されるとの報告がある¹⁴⁾。また、ある種の細胞内寄生細菌は、マクロファージに貪食されたのち、様々な機構でその殺菌システムを逃れ、マクロファージ内で生存・増殖する。このような細菌の中には、マクロファージのアポトーシスを抑制することで自らの増殖の場を確保するという巧妙なメカニズムを有するものも報告されている¹⁵⁾。したがって、HO-1 の過剰な発現、あるいはアポトーシスの抑制は、病原体の排除を遅らせ、あるいは病原体に有利な生体内環境を形成する危険性も想定される。

すなわち、8-ニトロ-cGMP の生成を介した HO-1 の誘導は、感染防御的あるいは病原体の生体内侵入の促進のどちらにも作用するといえる。病原体や侵襲を受ける細胞の種類、さらに感染と HO-1 の発現誘導の時空間的特性など、様々な要因によって異なった生物効果をもたらされるであろう。

まとめ

RNOS による生体分子の化学修飾と、感染防御における役割について解説した。RNOS は、生体機能を傷害するばかりでなく、酸化ストレス応答を司る生理的なシグナル分子として、感染防御に重要な役割を演じることがわかってきた。すなわち、感染に伴って生成する 8-ニトロ-cGMP は、タンパク質 S-グアニル化を介して HO-1 誘導といった酸化ストレス応答をもたらすシグナル分子として、自然免疫に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。8-ニトロ-cGMP による感染防御シグナルの解明は、感染症の新たな診断・治療法の開発に向けた分子基盤を確立できるものと期待される。

文 献

- 1) Akira S, Takeda K: *Nature Rev Immunol* 4 : 499-511, 2004.
- 2) Saura M, *et al.*: *J Mol Biol* 289 : 459-471, 1999.
- 3) Alam MS, *et al.*: *Infect Immun* 70 : 3130-3142, 2002.
- 4) Akaike T, *et al.*: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 685-690, 2003.
- 5) Bove PF, van der Vliet A: *Free Radic Biol Med* 41 : 515-527, 2006.
- 6) D'Autreaux B, Toledano MB: *Nature Rev Mol Cell Biol* 8 : 813-824, 2007.
- 7) Sawa T, *et al.*: *Nature Chem Biol* 3 : 727-735, 2007.
- 8) Yermilov V, *et al.*: *FEBS Lett* 376 : 207-210, 1995.
- 9) Terasaki Y, *et al.*: *Am J Respir Crit Care Med* 174 : 665-673, 2006.
- 10) Yoshitake J, *et al.*: *J Virol* 78 : 8709-8719, 2004.
- 11) Kaneko K, *et al.*: *Cancer Lett* 262 : 239-247, 2008.
- 12) Sawa T, *et al.*: *Biochem Biophys Res Commun* 311 : 300-306, 2003.
- 13) Wakabayashi N, *et al.*: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 : 2040-2045, 2004.
- 14) Hashiba T, *et al.*: *Gene Ther* 8 : 1499-1507, 2001.
- 15) Fujimoto I, *et al.*: *J Virol* 74 : 3399-3403, 2000.
- 16) Takaya A, *et al.*: *Cell Microbiol* 7 : 79-90, 2005.

<細胞ニュース>

第27回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
下記の日程で学術大会を開催いたします。

大会長：草間 幹夫 (自治医科大学歯科口腔外科)
会 期：2009年 1月28日(水)～1月30日(金)
会 場：栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター
〒320-8530 (専用郵便番号) 栃木県宇都宮市本町18
TEL : 028-643-1000 (代表)
連絡先：自治医科大学歯科口腔外科学講座
第27回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会準備委員会
事務局 (準備委員長：神部 芳則 事務担当：関根 玲子)
〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1
TEL : 0285-58-7390 Fax : 0285-44-8669

NOによる細胞内感染防御の新しい展開

赤池孝章*、岡本竜哉、Md Hasan Zaki、藤井重元、澤 智裕

熊本大学大学院 医学薬学研究部 微生物学分野

〔受付・掲載決定：2008年8月11日〕

キーワード：一酸化窒素 (NO)、細菌感染防御機構、8- ニトロ -cGMP、
ヘムオキシゲナーゼ -1、酸化ストレス

はじめに

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は、非特異的感染防御機構において重要な役割を演じている。細菌、ウイルス、真菌といった病原体の種類の如何に関わらず、感染病態においては、誘導型 NO 合成酵素 (inducible NO synthase, iNOS) が誘導される。iNOS は、病原体の持つ様々な菌由来成分 (リポ多糖体、リポタイコ酸、ペプチドグリカン、真菌多糖体など) や核酸由来成分 (dsRNA, ssRNA, CpG DNA など) が、対応する病原体分子パターン認識受容体群 (pattern recognition receptors, PRRs) である Toll-like receptors (TLRs) によって認識されることによって誘導され¹⁾、さらに感染に伴って産生される炎症性サイトカインやインターフェロンなどによって相乗的に誘導が増強される²⁾。iNOS 誘導に伴って過剰に産生された NO は、同時に生成する活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) と反応し、パーオキシナイトライトといったより化学反応性に富んだ活性酸化窒素種 (reactive nitrogen oxide species, RNOS) に変換され、強力な抗菌活性を発揮し、マクロファージ等

の貪食細胞による自然免疫機能に重要な役割を演じていることが報告されている³⁻⁵⁾。しかしながらその反面、NO/ROS は、宿主の細胞・組織を傷害し、酸化ストレスとよばれる生体損傷反応をもたらすことも明らかとなっており、感染病態における NO の役割は、いわば「両刃の剣」ともいえる (図1)^{6,7)}。

一方、最近の新しい展開として、NO は宿主を傷害するばかりでなく、感染に伴う宿主細胞のアポトーシスを抑制するシグナル分子として機能することで、酸化ストレス応答に関与していることが分かってきた (図1)。そこで本稿においては、細胞内感染防御における NO の果たす役割について、シグナル伝達機構と抗酸化システムの誘導を介する細胞保護作用を含め、我々の知見を中心に概説する。

サルモネラ感染における NO の防御作用

我々はこれまで、通性細胞内寄生菌であるサルモネラ (*Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*) のマウス感染モデルを用いて、NO の感染防御能について解析を行ってきた^{4,5,8,9)}。野生型マウスにサルモネラを感染させると、肝臓に感染巣が形成されるのに伴って、iNOS 誘導を介した過剰な NO の生成がみられる。iNOS 欠損マウスを用いて感染実験を行ない、野生型と比較すると、NO を産生できない iNOS 欠損マウスにおいては、肝内生菌数は野生型に比べて有意に多く、また死亡率も野生型に比

* Corresponding author:
熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野
〒860-8556 熊本市本荘 1-1-1
TEL : 096-373-5100 FAX : 096-362-8362
E-mail : takakaik@gpo.kumamoto-u.ac.jp

べ著明に高かった。このことは、iNOS由来のNOが、抗菌作用を介して感染防御能を発揮していることを示している⁵⁾。NOとROSとの反応により生じるRNOSが、病原体のタンパク質・脂質・核酸に対して化学修飾(酸化、ニトロ化)をもたらすことで、直接的な抗菌作用が発揮されるものと考えられる^{5,8)}。

酸化ストレスとHO-1の誘導

前述したように、NOやRNOSは、抗菌作用を発揮する反面、宿主の細胞・組織に対して酸化ストレスをもたらす¹⁰⁻¹²⁾。酸化ストレスに曝されると、生体においては、様々な抗酸化システムや細胞保護物質の誘導よりなる酸化ストレス応答が惹起される。このような、酸化ストレスに対して速やかに応答し、生体防御機構に重要な貢献をする因子としてヘムオキシゲナーゼ(HO)-1が知られてい

る¹³⁾。HO-1は、フリーのヘムを基質として分解し、ビリベルジン、鉄イオン、一酸化炭素(CO)に分解する。ビリベルジンはビリルビンへと還元され、鉄イオンはフェリチンの誘導を介して共に抗酸化作用を発揮する。またCOは、炎症性サイトカインの産生やアポトーシスを抑制し、細胞保護作用を発揮することが知られている¹⁴⁾。

そこで、サルモネラ感染に伴う肝組織中のHO-1の発現レベルを解析したところ、タンパク質の量、活性(血中CO量)いずれも、感染後の経過にしたがって、主にマクロファージにおいて増加することが分かった。また、HO-1の活性を薬理的に阻害すると、肝内生菌数は約10倍に増加し、肝組織中のアポトーシス細胞数も増加した(論文投稿中)。したがって、HO-1は、マクロファージのアポトーシスを抑制し、サルモネラのクリアランスを促進することで感染防御的に働いている可能性が示唆された(図1)。大変興味あることに、感染

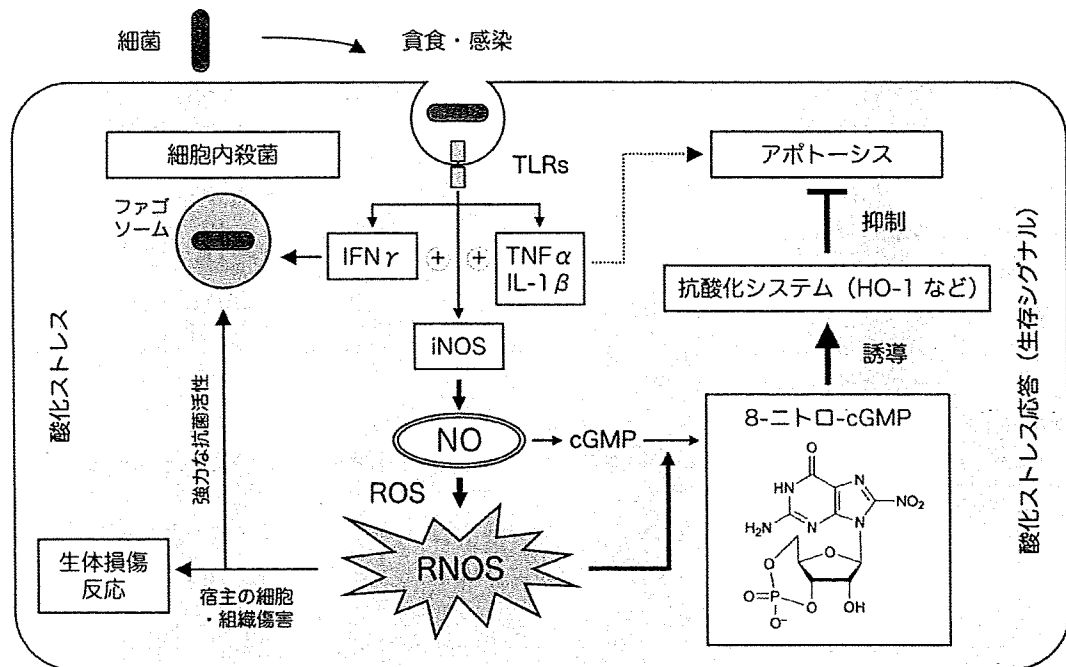


図1 細菌感染病態におけるiNOSの誘導とNOによる感染防御機構
細菌感染に伴って誘導されるiNOSにより過剰に産生されたNOは、ROSとの反応を介してRNOSに変換される。RNOSは、強力な抗菌活性を発揮し、細胞内殺菌に寄与する一方、宿主の細胞や組織を傷害するといった二面的な生物活性を有している。最近我々は、NOや活性酸素が、NOの2次シグナル分子であるcGMPをニトロ化し、新しい環状ヌクレオチドである8-ニトロ-cGMPを生成することを見出した。8-ニトロ-cGMPは、HO-1の誘導といった酸化ストレス応答におけるシグナル分子として働き、自然免疫において重要な役割を演じている可能性が示唆されている。

に伴う HO-1 の発現レベルを野生型と iNOS 欠損マウスにて比較すると、タンパク質・mRNA・活性レベルいずれにおいても iNOS 欠損マウスにおいて低いことが分かった (論文投稿中)。このことは、HO-1 の誘導に NO の産生が関与している可能性を示唆している。

サルモネラ感染モデルにおける 8- ニトロ -cGMP の生成

これまでの研究で、NO の生物活性、特にシグナル伝達機能は、2 次メッセンジャーであるグアノシン 3',5'- 環状 1 リン酸 (cGMP) を介する経路と¹⁵⁾、タンパク質・脂質・核酸といった生体分子の化学修飾 (酸化・ニトロ化) を介する経路^{11, 16)} によって発揮されることがわかっている。我々は、タンパク質チロシン残基のニトロ化や、核酸塩基グアニンのニトロ化が感染に伴って惹起され、病態の形成に関わっていることを報告してきた⁷⁾。

最近我々は、NO に依存して、cGMP がニトロ化された全く新規な環状ヌクレオチドである 8- ニトログアノシン 3', 5'- 環状 1 リン酸 (8- ニトロ-cGMP) が細胞内に生成することを世界に先駆けて発見した (図 1)¹⁷⁾。まず、化学合成した 8- ニトロ-cGMP を抗原として、抗 8- ニトロ-cGMP モノクローナル抗体を開発し、サイトカインで刺激した培養細胞 (RAW264 細胞) を免疫染色にて解析したところ、iNOS の誘導に依存した 8- ニトロ-cGMP の生成が認められた¹⁷⁾。そこで、培養したマウス腹腔マクロファージにサルモネラを感染させると、野生型のマクロファージでは 8- ニトロ-cGMP が生成するのに対し、iNOS 欠損マウスのマクロファージにおいては、生成が認められなかった。さらに、サルモネラ感染マウスの肝組織を免疫染色にて解析したところ、野生型マウスにおいては、感染に伴って、8- ニトロ-cGMP が肝組織において強く生成するのに対し、iNOS 欠損マウスにおいては生成を認めず、in vivo の感染モデルにおいても NO の産生に依存して 8- ニトロ-cGMP が生成することが分かった (論文投稿中)。

8- ニトロ -cGMP の HO-1 誘導活性 および細胞保護作用

これまでに述べた NO 産生に依存した 2 つの現象、すなわち 8- ニトロ-cGMP の生成と HO-1 の誘導の間に、どのような関連があるのでしょうか？我々はこれを検討するため、iNOS 欠損マウス由来の培養腹腔マクロファージに 8- ニトロ-cGMP を添加し、HO-1 の発現量を解析した。その結果、添加した 8- ニトロ-cGMP の濃度と時間に依存して HO-1 が誘導された。また、腹腔マクロファージにサルモネラを感染させた際に誘導される HO-1 の発現量は、iNOS 欠損マクロファージにおいては野生型マクロファージに比較して低いが、8- ニトロ-cGMP を添加することによって野生型マクロファージと同程度のレベルまで回復すること、また、感染に伴うアポトーシスも、8- ニトロ-cGMP 処理によって著明に抑制されることが分かった (論文投稿中)。以上の知見から、サルモネラ感染に伴って生成する 8- ニトロ-cGMP がシグナル分子として作用し、HO-1 を誘導する可能性が示唆された (図 1)。

8- ニトロ -cGMP のユニークな シグナル伝達機能

では、8- ニトロ-cGMP は、どのような分子メカニズムを介してシグナル活性を発揮するのでしょうか？我々は、8- ニトロ-cGMP の生物活性を解析する過程で、本物質が非常に高い親電子性を有しており、タンパク質中のチオール基に対して求核置換反応によって cGMP を付加し、全く新規なシステイン残基の修飾反応である 8-thioalkoxy-cGMP アダクト生成反応をもたらすことを見出した。この 8- ニトロ-cGMP によるタンパク質システイン残基の cGMP 付加体形成は、新しいタイプの翻訳後修飾であり、我々はこのタンパク質翻訳後修飾を Protein S-guanylation (タンパク質 S- グアニル化) と名付けた (図 2A)¹⁷⁾。

HO-1 は生体に加わる様々なストレスに応じて誘導され、細胞保護作用を発揮するため、その遺伝子発現には、heat-shock factor 1 (HSF1)、nuclear

factor- κ B (NF- κ B)、activator protein-1 (AP-1)、および nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) といった、多数の転写因子が関与していることが知られている (図 2 B)¹³⁾。HSF1 は、高温や異常タンパク質の細胞内蓄積により、NF- κ B は、感染・炎症反応により、AP-1 は、細胞の増殖異常により、そして Nrf2 は、親電子性物質や酸化ストレスにより活性化される。そこで我々は、Nrf2 の活性

化経路に注目し解析を進めた。Nrf2 は、Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) とよばれる調節因子と結合することによって、その活性化が抑制されている。Keap1 は多くの Cys 残基を有するが、ROS や親電子性物質によりそのチオール基が化学修飾を受けると、Nrf2 に対する結合性が失われ、その結果 Nrf2 が核へと移行し、HO-1 を始めとする酸化ストレス応答因子や毒物代謝酵素が誘導さ

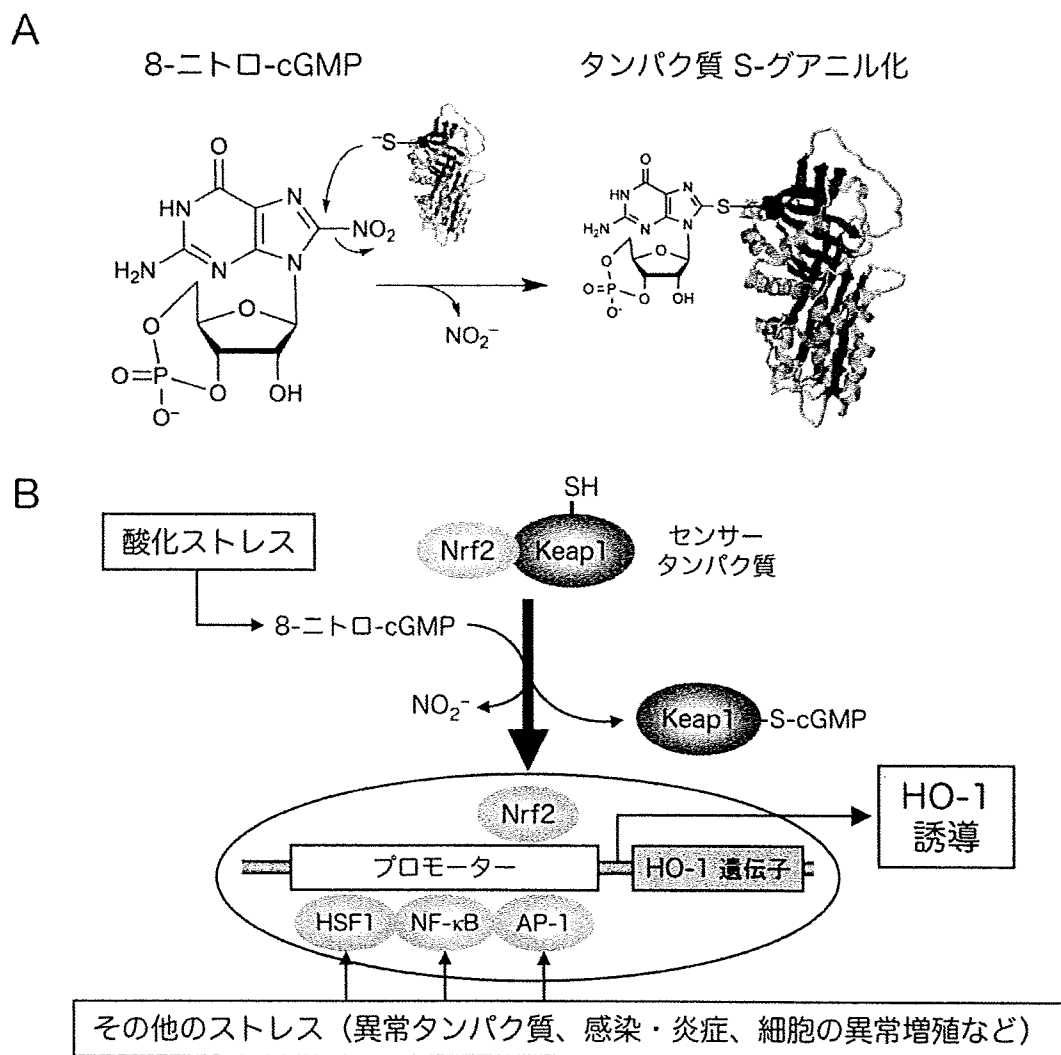


図 2 8-ニトロ-cGMP による新しい蛋白質翻訳後修飾と HO-1 の誘導
 (A) NO 依存的に細胞内にて生成する新規環状ヌクレオチド 8-ニトロ-cGMP は高い親電子性を有し、タンパク質中のチオール基と反応し cGMP を付加するタンパク質翻訳後修飾 (S-グアニル化) を惹起する。(B) HO-1 は生体に加わる様々なストレスに応じて誘導されるため、その遺伝子発現には、多数の転写因子が関与する。酸化ストレスにより生成する 8-ニトロ-cGMP は、センサータンパク質 Keap1 の S-グアニル化を介して Nrf2 経路を活性化し、HO-1 の誘導をもたらすものと考えられる。

れる。したがって Keap1 は、いわば酸化ストレスセンサーとして機能しているといえる¹⁸⁾。我々は、マウス腹腔マクロファージを始めとする種々の細胞培養系を用いて解析を行い、8-ニトロ-cGMPが、Keap1のS-グアニル化を介してNrf2の活性化、ひいてはHO-1を誘導していることを明らかにした¹⁷⁾(図2B)(一部未発表)。

HO-1の誘導と感染病態

サルモネラ感染モデルを用いた解析により、NOは、8-ニトロ-cGMPを2次メッセンジャーとしてHO-1を誘導し、マクロファージのアポトーシスを抑制することで菌のクリアランスを促進し、感染防御能を発揮することが明らかとなった。しかし、ある種の細胞内寄生細菌は、マクロファージに貪食されたのち、様々な機構でその殺菌システムを逃れ、マクロファージ内で生存・増殖することが知られている。このような細菌の中には、マクロファージのアポトーシスを抑制することで自らの増殖の場を確保するという巧妙なメカニズムを有するものも報告されている¹⁹⁾。従って、HO-1の過剰な発現とこれに伴うアポトーシスの抑制は、病原体のクリアランスを抑制し、あるいは病原体に有利な生体内環境を形成する可能性も想定される。

すなわち、8-ニトロ-cGMPを介したHO-1の誘導は、感染防御的あるいは病原体の生体内生存の促進のどちらにも作用するといえる。病原体や侵襲を受ける細胞の種類、さらに感染とHO-1の発現誘導の時空間的特性など、様々な要因によって異なった生物効果をもたらされるであろう。

おわりに

細胞内感染防御におけるNOのシグナル伝達機構と抗酸化システムの誘導を介する細胞保護作用について概説した。感染病態において誘導されるNOは、8-ニトロ-cGMPの生成を介して細胞内センサー・レセプタータンパク質を活性化してHO-1の誘導といった生存シグナルを発信し、そのことが、マクロファージによる殺菌能を維持し、自然免疫において重要な役割を演じていることが明らかとなった。今後、感染防御因子NOやRNOSの

さらに詳細な機能解明、特に8-ニトロ-cGMPによるS-グアニル化の標的タンパク質の解析を進めることで、様々な細胞内感染病態における診断・治療への応用に向けた展開が期待される。

文 献

- 1) Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signaling. *Nature Rev Immunol* 4: 499-511, 2004.
- 2) Saura M, Zaragoza C, Bao C, McMillan A, Lowenstein CJ: Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor kappa B during activation of inducible nitric oxide synthase transcription. *J Mol Biol* 289: 459-471, 1999.
- 3) Doi T, Ando M, Akaike T, Suga M, Sato K, Maeda H: Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect Immun* 61: 1980-1989, 1993.
- 4) Umezawa K, Akaike T, Fujii S, Suga M, Setoguchi K, Ozawa A, Maeda H: Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infect Immun* 65: 2932-2940, 1997.
- 5) Alam MS, Akaike T, Okamoto S, Kubota T, Yoshitake J, Sawa T, Miyamoto Y, Tamura F, Maeda H: Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. *Infect Immun* 70: 3130-3142, 2002.
- 6) Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, Setoguchi K, Suga M, Zheng YM, Dietzschold B, Maeda H: Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2448-2453, 1996.
- 7) Akaike T, Okamoto S, Sawa T, Yoshitake J, Tamura F, Ichimori K, Miyazaki K, Sasamoto K, Maeda H: 8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis.

- Proc Natl Acad Sci USA 100: 685-690, 2003.
- 8) Alam MS, Zaki MH, Yoshitake J, Akuta T, Ezaki T, Akaike T: Involvement of *Salmonella enterica* serovar Typhi RpoS in resistance to NO-mediated host defense against serovar Typhi infection. *Microb Pathog* 40: 116-125, 2006.
 - 9) Alam MS, Zaki MH, Sawa T, Islam S, Ahmed KA, Fujii S, Okamoto T, Akaike T: Nitric oxide produced in Peyer's patches exhibits anti-apoptotic activity contributing to an antimicrobial effect in murine salmonellosis. *Microbiol Immunol* 52: 197-208, 2008.
 - 10) D'Autreaux B, Toledano MB: ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 8: 813-824, 2007.
 - 11) Bove PF, van der Vliet A: Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. *Free Radic Biol Med* 41: 515-527, 2006.
 - 12) Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G: Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol* 533: 240-252, 2006.
 - 13) Alam J, Cook JL: How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 166-174, 2007.
 - 14) Ryter SW, Alam J, Choi AM: Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86: 583-650, 2006.
 - 15) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
 - 16) Feelisch M: Nitrated cyclic GMP as a new cellular signal. *Nature Chem Biol* 3: 687-688, 2007.
 - 17) Sawa T, Zaki MH, Okamoto T, Akuta T, Tokutomi Y, Kim-Mitsuyama S, Ihara H, Kobayashi A, Yamamoto M, Fujii S, Arimoto H, Akaike T: Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nature Chem Biol* 3: 727-735, 2007.
 - 18) Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW, Talalay P: Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2040-2045, 2004.
 - 19) Takaya A, Suzuki A, Kikuchi Y, Eguchi M, Isogai E, Tomoyasu T, Yamamoto T: Derepression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes within macrophages leads to rapid apoptosis via caspase-1- and caspase-3-dependent pathways. *Cell Microbiol* 7: 79-90, 2005.

New paradigm of host defense against intracellular pathogens by nitric oxide

Takaaki AKAIKE * , Tatsuya OKAMOTO, Md Hasan ZAKI, Shigemoto FUJII,
and Tomohiro SAWA

Department of Microbiology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

[Received / Accepted: 11 Aug, 2008]

Key words : nitric oxide, host defense, 8-nitro-cGMP, heme oxygenase-1, oxidative stress

Nitric oxide (NO) produced by inducible NO synthase (iNOS) during infection plays a crucial role in host defense mechanisms, via its antimicrobial and cytoprotective activities. Infection of *Salmonella typhimurium* in mice induces excessive production of NO, as a host defense response. We found much greater bacterial growth and apoptotic changes in iNOS-deficient (iNOS^{-/-}) mice than in wild-type mice. However, the mechanism of NO-mediated cytoprotection during *Salmonella* infection remained unclear. An important signaling mechanism induced by NO is heme oxygenase (HO)-1, a significant cytoprotective molecule produced by oxidative stress. Thus, we sought to clarify NO-dependent cytoprotective and antimicrobial host defense, with a particular focus on the signaling mechanism of HO-1 induction. We recently discovered a nitrated cyclic nucleotide, 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP), which is formed via NO possibly with reactive oxygen species. We observed strong immunoreactivity for 8-nitro-cGMP in *Salmonella*-infected wild-type mouse liver and peritoneal macrophages in culture but not in iNOS^{-/-} mouse liver and macrophages. Moreover, a higher apoptosis was observed in iNOS^{-/-} macrophages compared with wild-type macrophages after *Salmonella* infection, but the difference was nullified when iNOS^{-/-} cells were treated with 8-nitro-cGMP. Finally, authentic 8-nitro-cGMP induced HO-1 in cultured macrophages infected with *Salmonella*. The signaling function of 8-nitro-cGMP appears to be mediated by its unique reaction with the sulfhydryl group of cysteine, thus forming a protein-S-cGMP adduct, which is an important mechanism of post-translational modification of proteins called protein S-guanylation. More importantly, we found 8-nitro-cGMP-dependent S-guanylation of Keap1, a regulatory protein of transcription factor Nrf2, which regulates the transcription of HO-1. In this review, we focus on a unique mechanism of NO-mediated host defense via formation of a novel signaling molecule, 8-nitro-cGMP in microbial infections.

*Corresponding author :
Department of Microbiology, Graduate School of Medical Sciences,
Kumamoto University
1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan.
TEL : 096-373-5100 FAX : 096-362-8362
E-mail : takakaik@gpo.kumamoto-u.ac.jp



Topics

精神科病院における禁煙の取り組み*

橋本和典** 岸本年史**

Key Words : cigarette smoking, smoking cessation, psychiatric hospital

はじめに

タバコは、肺がんをはじめとして、口腔・咽頭がん、喉頭がん、食道がん、胃がん、膀胱がん、膵がんなどの多くの悪性腫瘍や、虚血性心疾患、脳血管障害、慢性閉塞性肺疾患などの疾患や、低出生体重児や流産・早産など妊婦に関連した以上の危険因子である。本人の喫煙のみならず、周囲の喫煙者のタバコの副流煙による受動喫煙も肺がんや虚血性心疾患、呼吸器疾患などの危険因子である。さらに精神科病院の喫煙患者にはタバコによる健康被害だけでなく、喫煙行動に潜在する火災などの危険性から住居確保に困難があるなどの生活権被害も生じている。わが国での禁煙の動きとして、喫煙防止、禁煙支援、非喫煙者の保護などを目標に健康日本21が平成12年に公表され、平成15年には健康増進法の制定により受動喫煙の防止が義務づけられた。

このように、健康施策の整備のもと、わが国でも急速に喫煙対策が進められている。たばこ産業の「平成20年全国たばこ喫煙者率調査」によると、成人女性の喫煙率は横ばいといった状況であるが、成人男性の喫煙率は昭和41年のピークの83.7%から39.5%に減少しており、日本では

国民の禁煙に対する意識が高まるとともに、実際に喫煙率は減少傾向を示している。

かかる状況において精神障害者の喫煙対策が健常人と同様に行われる必要があるが、たばこ産業の「平成20年全国たばこ喫煙者率調査」による成人の平均喫煙率(男性39.5%, 女性12.9%)に対して、精神科病院の入院患者の半数以上を占める統合失調症患者の喫煙率は高く(68~88%)¹⁾²⁾、禁煙の成功率も低いこと³⁾が知られており、また、うつ病患者の喫煙率⁴⁾も高く、精神障害者の禁煙支援、禁煙治療、精神科病院の敷地内全面禁煙は簡単ではない。精神科において喫煙は比較的望ましい嗜好品として職員にも患者にも愛されてきた歴史があり、「喫煙をよし」とする精神科病院の独特の文化があり、精神科における禁煙対策については、日本においてだけではなく、世界的にも「neglected problem」⁵⁾であった。財団法人日本医療機能評価機構による病院機能評価では、他の医療機関では「全館禁煙」が基準である中、「精神科医療、長期療養、緩和ケアの禁煙・分煙については別途判断する」とされ、精神科での禁煙化に対しては若干緩和された基準となっており、精神科病院での禁煙化への慎重な姿勢がみられる。しかし、少しずつではあるが喫煙対策がすすんできており、大学医学部附属病院を対象に行われた喫煙対策の実態調査では⁶⁾、77の精神科病棟のうち52の病棟で全面禁煙が実施されている。精神科病院においては、

* Approach to smoking cessation in psychiatric hospital.

** Kazumichi HASHIMOTO, M.D. & Toshifumi KISHIMOTO, M.D., Ph.D.: 奈良県立医科大学精神医学教室(〒634-8522 奈良県橿原市四条町840); Department of Psychiatry, Nara Medical University, Kashihara, Nara 634-8522, Japan.

施設内全面禁煙を行っている病院は少ないものの禁煙化の動きが高まってきている。このように、社会的な流れからも精神科病院においても喫煙対策を行っていくことが必要になってきており、実際に成功している例も増えてきているのが事実である。

本稿では、喫煙の精神障害者への影響から、精神科病院で喫煙が困難と考えられている理由、禁煙化への取り組みについて述べたい。

喫煙の利害

一般的には、喫煙により慢性気管支炎、肺気腫などの慢性閉塞性肺疾患の危険が増大し、肺機能検査により閉塞性障害の頻度が高いことが観察され喫煙は単独で、がんの原因の約30%を占めている。喫煙により引き起こされるさまざまな健康影響により、喫煙者は余命が短くなるといわれている。どれくらい寿命が短くなるのかについて、イギリスのR.ドール博士が、1950年代から50年間、医師の集団を追跡する研究を行った結果、喫煙者は非喫煙者と比べると、概ね10歳程度、余命が短いことが示された。

精神科入院患者の大多数を占める統合失調症患者に対してのニコチンの作用について検討してみると、まず、陽性症状、陰性症状についてであるが、ニコチンそれ自体の効果については否定的な報告が多く⁷⁾、ニコチン自身はこれらの症状に直接的な効果はないと考えられている。しかし、選択的に α_7 ニコチン性アセチルコリン受容体を刺激するDMXB-Aは陰性症状を有意に改善する⁸⁾ことが示されている。また、ニコチンの中枢刺激作用により症状を改善させようとする自己治療の可能性がいわれている。その理由として、統合失調症患者へのニコチンの作用としては、認知機能の改善、抗精神病薬による副作用の軽減、あるいは感覚情報処理機能の改善⁹⁾などが報告されており、ニコチンの効果を必ずしも否定することができない。

以上のようなニコチンの統合失調症への保護的な役割の一方で、統合失調症患者の寿命が一般人口よりも20%ほど短く、死因の主たる原因は自殺ではなく、心血管障害であることが報告されており、危険因子の一つである喫煙の治療

の必要性がいわれている¹⁰⁾。また、喫煙をひき起こす主要な疾患である肺がんについては、その発症率が一般人口よりもやや高く、喫煙という要因を除いて統計処理を行うと逆に発症率が低くなること¹⁰⁾から、禁煙による肺がんの高い予防効果も期待でき、統合失調症患者における禁煙は必要であると考えられる。

ニコチン依存

喫煙の本態は、ニコチンという依存性薬物による依存症である。1988年の米国公衆衛生総監報告書によると、止めることの難しさは、コカイン、ヘロイン、アルコールと同様、耐性の強さはアルコール、ヘロインと同様、コカインより強い、離脱症状はアルコール、ヘロインよりは弱い、コカインより強いと位置づけられている¹¹⁾。ニコチンは脳内の報酬回路に働き、快感を起こす物質である。喫煙によりニコチンは肺から直接血流にのり、脳内に到達するため、ニコチンによる効果を期待してから数秒で脳は期待した効果を感じてしまう。この間隔が短いほど、精神依存を来しやすくなる。

また、禁煙することによりさまざまな症状が現れる。身体面での症状としては、心拍数の減少、手指振戦、胃部不快感、頭痛、体重増加、食欲亢進などがある。行動面では、注意力の散漫、活動能力の低下、攻撃衝動の強まりなどが現れる。精神面の症状としては、不安や抑うつ、イライラ感や落ち着きのなさ、緊張感、集中力の低下、睡眠障害、タバコに対する渴望、我慢力の低下などがある。このような症状がニコチンの離脱による症状であり、離脱症状をやわらげるために、ニコチン依存が継続する。これがニコチンの身体依存である。

喫煙者の心理では、タバコを吸うことを正当化しようとする仕組みが働く。タバコによる健康被害や不利益を否定し、タバコはストレスを解消するとか、会話を円滑にするなど喫煙を合理化する理由づけをするという心理が働く。

これらのように、ニコチンには精神依存、身体依存があり、また、依存症特有の心理的な働きを認め、禁煙を難しくしている要因となっている。