



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Inactivation of Glutathione Peroxidase by Nitric Oxide : Implication for Cytotoxicity   |
| Author(s)    | 朝日, 通雄  |
| Citation     | 大阪大学, 1996, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39881">https://hdl.handle.net/11094/39881</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | 朝日通雄  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 第12357号   |
| 学位授与年月日    | 平成8年3月25日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学研究科生理系専攻  |
| 学位論文名      | Inactivation of Glutathione Peroxidase by Nitric Oxide: Implication for Cytotoxicity<br>(一酸化窒素によるグルタチオンペルオキシダーゼの阻害: 細胞障害における意義) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 谷口直之   |
|            | (副査)<br>教授 多田道彦 教授 高井義美   |

### 論文内容の要旨

#### 〔背景、目的〕

一酸化窒素(NO)は、周知のように、平滑筋の弛緩、神経伝達、炎症等様々な生理機能に関係する情報伝達物質である。NOは、生体内ではO<sub>2</sub>、O<sub>2</sub><sup>·-</sup>、ヘムや非ヘム鉄とすみやかに結合する。また、蛋白質やグルタチオンのSH基と反応し、ニトロソチオールを形成する。この時、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)やプロテインキナーゼC(PKC)のようなSH酵素に結合し、その酵素活性を阻害する。

Glutathione Peroxidase(GPx)は、細胞内のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>や過酸化脂質を消去する主要な抗酸化酵素の一つである。最近、過酸化物が細胞のアポトーシスの直接の原因になり、そのアポトーシスをGPxが阻害することが示された。また、NOが、マクロファージ系細胞や臍臍のβ細胞にアポトーシスを起こすこともわかつてき。そこで、NOとGPxの関係について検討し、NOがGPxを特異的に阻害することを見い出した。

#### 〔方法、成績〕

##### 1. NO donor (s-nitroso acetyl penicillamine (SNAP))によるGPxの阻害

精製したウシ cytosolic GPxに対しSNAPを作用させ、濃度および反応時間の違いによる阻害率を検討した。その結果、GPxは、SNAPにより濃度および時間依存性に阻害され、NOによって阻害されることが知られているGAPDHよりも低濃度で起こることがわかった。しかし、他の抗酸化酵素であるスーパーオキシドディスクターゼ(SOD)やカタラーゼには影響を与えたなかった。このSNAPによるGPxの阻害は、NOスカベンジャーであるCarboxy PTIOで減少することよりNOによるものであることが証明された。

##### 2. ジチオスレイトール(DTT)による、GPxの阻害の回復

SNAPにより不活性化されたGPxを5mM DTTと37°Cで1時間反応させ、活性の回復が見られるかを検討した。その結果、SNAPと1時間反応した時点では約50%の活性が回復した。このことは、NOが酵素に可逆的に結合していることを示しており、ニトロソ化反応の結果と考えられる。すなわち、GPxの活性発現に必須なシステインかこれに類似したセレノシステインにニトロソ化が起こった可能性が高い。

##### 3. SNAP添加による培養細胞内GPx活性の阻害

U937細胞(ヒトリンパ球系細胞)の培地へ100μMのSNAPを添加し、各反応時間で細胞を回収し、そのホモジネートの活性を測定した。その結果、活性は1時間後に最大24.1%低下し(p<0.05)、その後、徐々に回復がみられ

た。この時 GPx の蛋白量は変動しなかったので、精製酵素の場合同様、S N A P 添加により培養細胞内の GPx 活性が可逆的に阻害されたことを示している。

#### 4. 内因性 N O の誘導による培養細胞内 GPx 活性の阻害

RAW264.7細胞（マウスのマクロファージ系細胞）の培地にリポポリサッカライド（L P S）を10ng/ml添加し、18時間後細胞を回収し、ホモジネート中の活性を測定した。その結果、L P S 处理した細胞の培養液中の亜硝酸（NO<sub>2</sub>）の量が上昇し、それに対応して有意に GPx 活性が低下した（p<0.05）。この結果は、誘導された内因性 N O によっても培養細胞の GPx 活性の阻害が起こることを示している。

#### 5. N O による細胞内過酸化物の増加

過酸化物と反応し蛍光を発する色素 5, 6-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescin-diacetate (D C F H - D A) を用いて Flow Cytometry により細胞内過酸化物の量を測定した。U937細胞に100 μM S N A P を添加し、1時間後に D C F H - D A を加えて、各時間での蛍光強度を測定した。その結果、少なくとも 3 時間後までは蛍光が増強されたので、N O により細胞内過酸化物が増加することが示された。

#### 〔総括〕

N O の細胞障害性の原因としてはいくつか考えられているが、まだ不明な部分も多い。その原因の一つに、N O による酵素活性の阻害があり、その阻害様式から次の二つに分類される。一つは、アコニターゼのような非ヘム鉄をもつ酵素であり、もう一つは G A P D H のように活性中心に SH 基をもつ酵素である。今回の結果は活性中心にセレノシスティンをもつ GPx が N O により不活化することを示している。その阻害は G A P D H に比べより低濃度で起こることから、システィンか、それよりも反応性の高い残基の関与が考えられる。セレノシスティンが活性に必須であり、容易に酸化型になることから、この残基が N O による修飾をうけた可能性が高い。また、この現象は細胞レベルでも生じ、外因性および内因性 N O により活性低下が認められた。従って、グルタチオンなど遊離 S H 基が大量に存在する条件下でも本酵素の活性修飾が実際に起こることが示された。N O による細胞内過酸化物の増加は、他の抗酸化酵素が N O の影響を受けなかったことより、GPx 活性の低下を反映している可能性が高い。GPx は活性酸素によつてもたらされるアポトーシスを抑えるので、その阻害が N O による細胞障害やアポトーシスの原因となっている可能性がある。

### 論文審査の結果の要旨

一酸化窒素（N O）は、マクロファージや血管平滑筋細胞にアポトーシスを引き起こすことが知られている。一方、細胞内過酸化物の消去系酵素であるグルタチオンペルオキシターゼ（GPx）は、アポトーシスを抑制するとされている。しかし N O がアポトーシスをおこす機序は不明である。本論文では、N O が直接 GPx を in vitro でも細胞内でも阻害することを明らかにした。N O による GPx の阻害は従来 N O による阻害が報告されている Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase に比べてもはるかに強く阻害され、他の活性酸素消去系酵素である superoxide dismutase や catalase は阻害せず、特異的であった。その機構を検討したところ、N O は、GPx の活性基を形成するセレノシスティン残基または近傍のシスティン残基をニトロソ化するためであることが明らかになった。N O による GPx の阻害は、細胞内の過酸化物の蓄積を招き、それがアポトーシスの原因である可能性が示唆された。

本論文はサイトカインなどにより誘導型 N O 合成酵素が活性化され、大量の N O が産生されるような病態、例えば炎症性疾患や動脈硬化などにおける、マクロファージや、血管平滑筋細胞のアポトーシスの意義を解明する手掛かりとなるものであり学位に値すると考えられる。