

# 論文内容要旨

## 論文題目

Detection of glutathionylated proteins by glutathione  
S-transferase overlay  
(グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)を用いたグルタチオン  
化タンパク検出法の開発)

責任講座: 生体分子機能学

氏名: 程 光

## 【内容要旨】

目的: グルタチオン(GSH)は細胞内に高濃度存在し、抗酸化の中心的な役割を担っている。活性酸素種に曝されたグルタチオンは酸化され、その一部はタンパク質中のシステイン残基と反応してジスルフィド結合を形成し、S-グルタチオン化タンパクを生じる。その結果タンパク質機能が傷害されるため、S-グルタチオン化されるタンパク質を調べることが、酸化ストレスによる機能傷害の原因究明に役立つと考えられる。しかし、従来の方法では放射性同位元素の<sup>35</sup>Sで標識を行うなど、煩雑で特殊な操作を必要とした。本研究では、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)がグルタチオンを高親和性で結合することを利用し、グルタチオン化タンパクを簡便に検出する方法の開発を行った。

方法: 日本住血吸虫由来 GST 遺伝子を組込んだ発現ベクターを大腸菌に導入し、組換え GST を大量に得た。GST カラムで GST を精製した後、GSH 樹脂に結合させて酵素活性を維持した状態でビオチン化した。牛血清アルブミン(BSA)もしくは Hela 細胞抽出液を各種酸化剤で処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ビオチン化 GST とインキュベートした後、horseradish peroxidase (HRP)標識した streptavidin と反応させ、HRP の基質である過酸化水素と 4-chloro-1-naphthol を加えて発色させた。また、本法を用いた組織切片での検出も試みた。

結果と考察: モデルタンパクとして BSA を用いて本法による検出を行ったところ、GSH 存在下に diamide で酸化した場合ならびに S-グルタチオン化剤であるニトロソグルタチオン(GSNO)と反応させた場合に陽性バンドが検出された。次に酸化剤で処理した細胞抽出液に本法を施行したところ、バンドのシグナル強度が増加した。ビオチン化 GST とインキュベートする前にブロット膜を還元剤である dithiothreitol 処理することでこのバンドが消失したので、S-グルタチオン化タンパクを特異的に検出していると考えられる。Hela 細胞を培養下に diamide、過酸化水素、GSNO 処理した場合、タンパクの S-グルタチオン化が増加した。また、グルタチオン合成酵素阻害剤(buthionine sulfoximine; BSO)、グルタチオン還元酵素阻害剤(1,3-bis[2-chloroethyl]-nitrosourea; BCNU)、ならびに N-acetylcysteine(NAC)で処理した細胞でも同様に S-グルタチオン化の増加が認められた。BSO と BCNU の作用については、GSH の減少に伴う酸化ストレスの増強が関係していると考えられる。NAC は抗酸化作用を有するが、条件によっては酸化剤の前駆体ともなることが知られており、今回の条件では後者の性質が反映された可能性がある。更に、ラット組織切片を用いた検討から、本法はグルタチオン化タンパクの組織化学的検出にも応用できることが分った。

以上のように、本研究ではビオチン化 GST を用いることによって、グルタチオン化タンパクを簡便にしかも高感度に検出できる方法を開発した。本法は組織切片における S-グルタチオン化タンパクの検出にも利用する事ができ、S-グルタチオン化タンパクの解析を行う有効な方法と考えられる。

平成 18 年 1 月 31 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名：程 光

論文題目：Detection of glutathionylated proteins by glutathione S-transferase overlay

(グルタチオン S-トランスフェラーゼを用いたグルタチオン化タンパク質検出法の開発)

審査委員：主審査委員  
副審査委員  
副審査委員

吉田 匡  
近藤 英夫  
若林 一博



審査終了日：平成 18 年 1 月 19 日

### 論文審査結果要旨

活性酸素種による細胞障害は老化や各種疾病特に慢性疾患の病因となるなど多岐に涉っている。細胞内にはこれら酸素毒に対する様々な防御機構が具備されている。就中、グルタチオン(GSH)はグルタチオンペルオキシダーゼ反応などを通じてその中心的な役割を果たしている。一方、蛋白質のシステイン残基と、活性酸素種によって GSH が直接酸化された結果生じた GSH の分子種がジスルフィド結合しグルタチオン化蛋白質(Protein-S-SG)と成る事が近年注目されている。また、このようなグルタチオン化は当該蛋白質の機能変化をもたらすことも報告されている。従って、どのような蛋白質がグルタチオン化され易いかを検出、特定する事は酸化ストレスによる細胞障害の解明に役立つと考えられる。

今迄のグルタチオン化蛋白質の検出法は何れも煩雑なため、簡便で信頼性が高い方法の開発が望まれていた。そこで程君は、本来は GSH を結合するグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)が Protein-S-SG をも高親和性で認識、結合する事に着目し、その特質を利用した新たな方法の開発を試みた。つまり、Protein-S-SG とビオチン化 GST との複合体を作らせ、次にペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを上記複合体のビオチンに結合させ、最後にペルオキシダーゼ反応を利用して可視化する方法である。

程君は、先ず、日本住血吸虫の GST を大腸菌で大量に発現させ精製した。次に、精製酵素の Protein-S-SG 結合能を保持させるため GSH 樹脂に結合させた状態で GST をビオチン化し、以下の実験に用いた。先ず、本方法の妥当性についてシステイン残基を露出させた変成牛血清アルブミン(BSA)を用いて検証した。変成 BSA を GSH、その酸化型の GSSG、S-グルタチオン化剤として確立しているニトロソグルタチオン(GSNO)、或は強力な酸化剤であるジアミド、の単独処理、或は適宜な組み合わせ処理でグルタチオン化し、非還元状態での SDS-PAGE を行った。泳動蛋白質をゲルからプロットした膜を本方法で可視化した結果、GSH や GSNO 処理によってバンドの濃度が増強され、その泳動位置はゲルのタンパク染色による BSA バンドと一致した。更に、培養細胞抽出液について同様の実験を行ったところ多数のバンドが検出されたが、バンドは膜をジチオスレイトールで前処理する事によって消失した。また、培養細胞抽出液を処理する GSNO の濃度変化に依存してバンドの濃度が増強した。

以上の結果は本方法がグルタチオン化蛋白質を特異的に検出する簡便な方法である事を示している。このような新手法により現時点で未解明の部分が多い蛋白質のグルタチオン化の生理機能の解明が急速に進展する事が期待される。審査会は新手法の開発を高く評価し、本研究は博士(医学)の学位を授与するに値するものと判定した。