

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05873

研究課題名(和文) 認知症予防の実現に向けた食品成分のPDI脱SNO化作用に関する学術基盤の構築

研究課題名(英文) The development of dementia prevention by the S-nitrosylated PDI de-modification effect using food componets.

研究代表者

小倉 次郎 (Ogura, Jiro)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：20580640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Protein disulfide isomerase (PDI) はタンパク質のS-S結合形成を触媒し、タンパク質の立体構造を作る役割を担う。神経変性疾患患者の脳では、PDIがS-ニトロシル(SNO)化され、これが異常タンパク質の蓄積の原因とされる。そこで、本研究ではPDIの脱修飾により認知機能の低下抑制作用を発揮する食品成分の同定を試みた。糖負荷およびグルタチオン枯渇による神経変性モデル細胞をフラボノイド配糖体であるネオヘスペリジンで処理したところ、SNO化PDIが脱修飾され、神経変性が抑制された。このことから、ネオヘスペリジンは認知機能の低下抑制作用を有する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、寿命の延伸に伴う高齢化の進展が問題となっているが、その問題の一つに寿命と健康寿命の差、すなわち日常生活に制限のある期間が一向に改善されないことが挙げられる。2019年に行われた国民生活基礎調査(大規模調査)において要介護となった原因のトップは認知症であり、その予防法の確立は喫緊の課題といえる。本研究により見出されたネオヘスペリジンを含めたフラボノイドルインの有用性について、in vivoでの検証など更なる解析を加えることで、社会的課題を解決するbreak thoroughとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein disulfide isomerase (PDI) catalyzes the S-S bond formation of proteins and plays a role in folding the three-dimensional structure of proteins. In the brains of patients with neurodegenerative diseases, PDI is S-nitrosylated (SNO), resulting in the accumulation of abnormal proteins. In this study, I attempted to identify food components that inhibit the decline in cognitive function by demodifying SNO-PDI. In glucose-loaded neurodegeneration model cells and glutathione-depleted neurodegeneration model cells, neohesperidin, a flavonoid glycoside, demodified SNO-PDI and inhibited neurodegeneration. This suggests that neohesperidin may have an inhibitory effect on cognitive function decline.

研究分野：食品科学

キーワード：認知症 フラボノイド PDI タンパク質修飾 酸化ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化の進展とともに認知症患者数は増加の一途を辿り、現在では本邦で 500 万人、全世界で 5000 万人とも言われ、認知症の克服は 21 世紀の最も重大な課題とされる。一方で、認知症の大部分を占めるアルツハイマー型認知症治療薬の開発は中止が相次ぎ、薬物治療は未だ対症療法に限られる。この原因として、認知機能の低下を自覚した段階で、既に回復が見込めないほど神経変性が進行していることが挙げられる。このため、認知症の克服における、予防医療の重要性は極めて高い。PDI はタンパク質の S-S bond 形成を担うタンパク質である。S-S bond はタンパク質の分子内結合の中で最も強力な結合であり、高次構造の形成に不可欠である (1)。アルツハイマー型認知症など、神経変性疾患の主な臨床所見は異常タンパク質の凝集・蓄積であり、認知機能の低下とタンパク質の folding 異常は密接に関連する。PDI は酸化ストレスにより SNO 化されることが知られ、神経変性疾患患者の脳には SNO 化 PDI が蓄積し、異常タンパク質の蓄積、ひいては神経変性の原因とされる (2)。

一般的に、タンパク質の SNO 化は可逆的修飾のため、抗酸化物質により脱修飾可能である。しかしながら、PDI の SNO 化部位は U 字型の立体構造の底部に位置し、抗酸化物質による脱修飾は容易ではない (3)。一方、ソバに含有するフラボノイド配糖体ルチンは PDI の SNO 化部位近傍に結合することが知られ、SNO 化 PDI の脱修飾作用を示す可能性が考えられる (4)。食生活と認知機能は密接に関連しており、特にフラボノイドを豊富に含む野菜、果物の摂取が認知症発症リスクを低下させることが示されている (5)。以上の知見から、フラボノイドをはじめとする食品由来抗酸化物質のうち、SNO 化 PDI 脱修飾作用を有する化合物を用いることで、認知症の発症予防が可能となるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では認知症予防の実現を最終目標に、比較的安全性の高い食品成分を利用して、PDI の脱修飾により異常タンパク質の蓄積を抑制し、認知機能低下の予防を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 使用細胞：ヒト神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞を用いた。糖負荷は high glucose DMEM (4.5 g/L glucose) で培養することで行った。また、グルタチオン (GSH) 枯渇はグルタミン酸を培養液 (low glucose DMEM (1.0 g/L glucose)) に 5 mM で加えて、48 時間培養することで行った。

(2) 細胞増殖能の評価：評価 30 分前に MTT 試薬を 0.025% で培養液に加え、30 分後に培養液を除去し、DMSO で細胞を溶解して 570 nm の吸光度を測定することで評価した。

(3) 細胞内 GSH 量の評価：既報に従い、Ellman's method により行った (6)。

(4) 細胞内活性酸素種 (ROS) 量の評価：評価 60 分前に DCFH-DA を 10  $\mu$ M で培養液に加え、60 分後に培養液を除去し、蒸留水で細胞を溶解して ex485 nm/em525 nm の蛍光強度を測定することで評価した。

(5) SNO 化 PDI 量の評価：既報に従い、Biotin-switch assay により行った (7)。

(6) 小胞体ストレスの評価：IRE1 $\alpha$  のリン酸化を指標として、Western blot により行った。

### 4. 研究成果

(1) 糖質負荷神経変性モデル細胞に対するネオヘスペリジンの効果：SH-SY5Y 細胞をグルコース負荷培地 (4.5 g/L glucose) で培養することで神経変性モデル細胞を作成した。グルコース負荷開始 28 日目において、細胞増殖能の低下、PDI の SNO 化、IRE1 $\alpha$  のリン酸化が確認された。これに対し、グルコース負荷開始 21 日目よりネオヘ

スペリジン (10  $\mu$ M) を共存させたところ、SNO 化 PDI 量は減少し (図 1A)、細胞増殖は回復した (図 1A)。糖質負荷神経変性モデル細胞では糖質負荷開始 7 日目から SNO 化 PDI 量の増大が確認されたことから (データは示さない)、ネオヘスペリジンは生じた SNO 化 PDI を脱修飾し、神経変性を抑制することが示唆された。

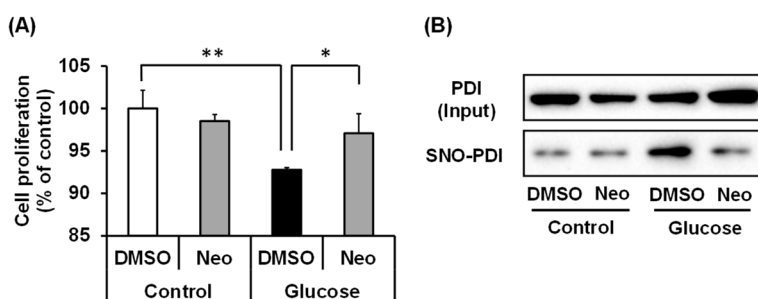


図 1. 糖質負荷神経変性モデル細胞に対するネオヘスペリジン共存の効果

(2) GSH 枯渇神経変性モデル細胞に対するネオヘスペリジンの効果：続いて、糖質負荷とは異なる神経変性モデル細胞として、GSH 枯渇神経変性モデル細胞を作成し、ネオヘスペリジンの効果を検証した。グルタミン酸 (5 mM) を培養液に加えて 48 時間後に細胞内 GSH 量が低下し、細胞内 ROS 量が増加した。この時、PDI の SNO 化が亢進し、IRE1 $\alpha$  のリン酸化が生じた。これに対し、ネオヘスペリジンを共存させると、細胞内 GSH 量、細胞内 ROS 量は変化しなかったが (図 2A, B)、SNO 化 PDI 量は低下し、IRE1 $\alpha$  のリン酸化も抑制された (図 2C, D)。このことから、糖質負荷神経変性モデル細胞で得られた示唆と同様に、ネオヘスペリジンは発生した酸化ストレスを抑制し、PDI の SNO 化を抑制するのではなく、生じた SNO 化 PDI を脱修飾することで、神経変性を抑制することが示された。

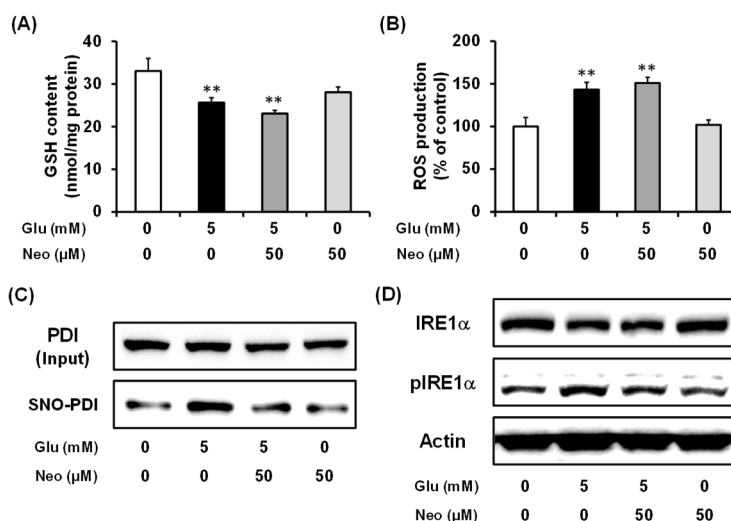


図 2 . GSH 枯渇神経変性モデル細胞に対するネオヘスペリジン共存の効果

(3) GSH 枯渇神経変性モデル細胞に対する N-アセチルシステイン (NAC) の効果：さらに、抗酸化物質として汎用される NAC の効果を、GSH 枯渇神経変性モデル細胞を用いて検証した。その結果、NAC (10 mM) の共存により、細胞内 GSH 量の回復、細胞内 ROS 産生の抑制が確認された (図 3A, B)。しかしながら、SNO 化 PDI 量は変化せず、IRE1 $\alpha$  のリン酸化も抑制されなかった (図 3C, D)。このことから、特定の抗酸化物質のみが SNO 化 PDI を脱修飾し、神経変性を抑制することが示唆された。また、NAC の共存により細胞内 GSH 量の回復、細胞内 ROS 産生の抑制が見られたにも関わらず、SNO 化 PDI 量の増加した原因は、NO ラジカルを補足した NAC が SNO 化されて SNO 化 NAC となり、この SNO 化 NAC により PDI が SNO 化されたためと考えられた。そこで、SH-SY5Y 細胞を SNO 化 NAC で処理したところ、SNO 化 PDI 量の増加が確認された (データは示さない)。

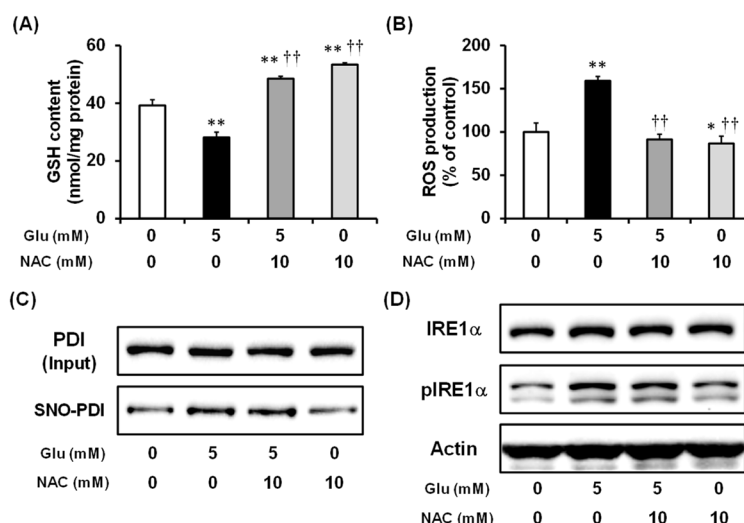


図 3 . GSH 枯渇神経変性モデル細胞に対する NAC 共存の効果

#### <引用文献>

- (1) F. Hatahet, et al., Protein disulfide isomerase: A critical evaluation of its function in disulfide bond formation, *Antioxidants Redox Signal.* 11 (2009) 2807-2850.
- (2) T. Uehara, et al., S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration, *Nature.* 441 (2006) 513-517.
- (3) J. Ogura, et al., Cysteine 343 in the substrate binding domain is the primary S-Nitrosylated site in protein disulfide isomerase, *Free Radic. Biol. Med.* 160 (2020) 103-110.
- (4) L. Lin, et al., Quercetin-3-rutinoside Inhibits Protein Disulfide Isomerase by Binding to Its b x Domain, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 23543-23552.
- (5) T.S.Yeh, et al., Long-term Dietary Flavonoid Intake and Subjective Cognitive Decline in US Men and Women, *Neurology.* 97 (2021) e1041-e1056.
- (6) M.T. Forrester, et al., Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 119-126.
- (7) G.L. Ellman, Tissue Sulfhydryl Groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70-77.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogura Jiro, Sugiura Hiroki, Tanaka Atsushi, Ono Shinji, Sato Toshiyuki, Sato Toshihiro, Maekawa Masamitsu, Yamaguchi Hiroaki, Mano Nariyasu	4. 巻 1865
2. 論文標題 Glucose-induced oxidative stress leads to in S-nitrosylation of protein disulfide isomerase in neuroblastoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129998 ~ 129998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2021.129998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Jiro, Ruddock Lloyd W., Mano Nariyasu	4. 巻 160
2. 論文標題 Cysteine 343 in the substrate binding domain is the primary S-Nitrosylated site in protein disulfide isomerase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 103 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ono Shinji, Ogura Jiro, Sugiura Hiroki, Yamauchi Minami, Tanaka Atsushi, Sato Toshihiro, Maekawa Masamitsu, Yamaguchi Hiroaki, Mano Nariyasu	4. 巻 316
2. 論文標題 Glutathione depletion results in S-nitrosylation of protein disulfide isomerase in neuroblastoma cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 121442 ~ 121442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2023.121442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Jiro, Yamaguchi Hiroaki	4. 巻 23
2. 論文標題 The Effectiveness of Antidiabetic Drugs in Treating Dementia: A Peek into Pharmacological and Pharmacokinetic Properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6542 ~ 6542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23126542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Jiro	4. 巻 142
2. 論文標題 Association of Abnormal Disulfide Bond Formation with Disease Development and Progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1055 ~ 1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.22-00119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小倉次郎, Lloyd Ruddock, 杉浦弘樹, 小野慎司, 眞野成康, 山口浩明.
2. 発表標題 タンパク質ジスルフィド形成酵素protein disulfide isomeraseのS-ニトロシル化位置の同定
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小倉次郎.
2. 発表標題 タンパク質ジスルフィド結合形成異常と疾患発症・進展との関連
3. 学会等名 第43回東北薬学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉次郎, 小野慎司, 杉浦弘樹, 山内碧, 佐藤紀宏, 前川正充, 眞野成康, 山口浩明.
2. 発表標題 グルタチオン合成阻害によるグルタチオン枯渇はProtein disulfide isomeraseのS-ニトロシル化を誘導する
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉次郎, 小野慎司, 杉浦弘樹, 山内碧, 佐藤紀宏, 前川正充, 山口浩明, 眞野成康.
2. 発表標題 神経細胞外のグルタミン酸によるグルタチオン枯渇はProtein disulfide isomeraseのニトロシル化を誘導する
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉次郎, Lloyd Ruddock, 山口浩明, 眞野成康.
2. 発表標題 Protein disulfide isomeraseのニトロシル化位置の同定
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉 次郎, Lloyd Ruddock, 眞野 成康
2. 発表標題 神経細胞におけるProtein disulfide isomerase基質結合ドメインのニトロシル化の影響
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小倉 次郎, 山口 浩明.
2. 発表標題 タンパク質ジスルフィド結合形成酵素PDIのS-ニトロシル化による神経変性の発生・進展メカニズムの検証
3. 学会等名 第54回日本臨床検査医学会東北支部総会・第33回日本臨床化学会東北支部総会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小倉 次郎, 山口 浩明.
2. 発表標題 神経変性疾患におけるPDIのSNO化に対する抗酸化物質の脱修飾効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ラドック ロイド  (Ruddock Lloyd)		
研究協力者	山口 浩明  (Yamaguchi Hiroaki)		
研究協力者	眞野 成康  (Mano Nariyasu)		
研究協力者	前川 正充  (Maekawa Masamitsu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フィンランド	University of Oulu			