

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：平成17年度～平成20年度
課題番号：17590089
研究課題名（和文） 神経変性疾患関連凝集体生成機構と活性窒素酸化物誘発ニトロ化ストレスの基礎的研究
研究課題名（英文） Oxidative degeneration of neurodegenerative disease-related protein and reactive nitrogen oxide stress
研究代表者 中川 秀彦（NAKAGAWA HIDEHIKO）
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：80281674

研究成果の概要：

α シヌクレインの凝集体生成に対する酸化ストレスの影響を試験管内反応で検討することでニトロ化修飾の影響を示唆し、またこの知見から、酸化ストレス検討に有用な化合物開発を行い、機能性光誘起型 NO 発生剤の開発、二光子励起光誘起型 NO 発生剤、ニトロ化選択的活性酸素消去剤の開発、および細胞内部位特異的酸化ストレス計測プローブの開発を行い、それぞれの目的の性能を発揮することを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	1,500,000	0	1,500,000
平成18年度	700,000	0	700,000
平成19年度	700,000	210,000	910,000
平成20年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,600,000	420,000	4,020,000

研究分野：創薬化学・ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：酸化ストレス、有機化学、一酸化窒素、パーオキシナイトライト、ドナー化合物、化学プローブ

1. 研究開始当初の背景

代表的な神経変性疾患であるパーキンソン病の予防・治療法を開発するためには発症機構を解明することが重要だが、パーキンソン病には遺伝性と孤発性が知られており、孤発性の発症機構はほとんど解明されていなかった。本研究では特徴的な組織学的病変である Lewy 小体中の α シヌクレインの修飾体・凝集体生成に焦点を絞り、孤発性パーキ

ンソン病と、比較的知見が貯えられている遺伝性パーキンソン病を結ぶ機構を、生化学的な観点から、活性窒素酸化物（ニトロ化ストレス）に着目して検討することを目指した。

パーキンソン病の病態解明に関しては、家族性パーキンソン病における α シヌクレインの変異に基づいて遺伝性要因が研究され、一方、孤発性パーキンソン病変では酸化ストレス（特にニトロ化ストレス）が関与する報告が数多くなされ、それぞれの病態におい

て、病態解明が進められて来た。しかし、

孤発性疾患と遺伝性疾患が同様な病変を引き起こすことについて、研究開始当初、具体的な検討は全く行なわれていなかった。このような背景に基づいて、本研究では、孤発性病変におけるニトロ化ストレスが、遺伝性（家族性）病変とどのように関連するかに着目し、生化学的な観点、特に α シヌクレインの凝集体（重合体）形成において変異とニトロ化ストレスがどのように作用するかを検討することとした。研究開始時点で既に、Lewy小体には α シヌクレイン蛋白質凝集体が多く存在すること、Lewy小体中で、 α シヌクレインとシトクロムcが共存していること、さらに、パーキンソン病等の病変組織中にチロシン残基ニトロ化修飾蛋白質が検出されることが報告されており、ニトロ化ストレスに関して、生化学的検討を進めることは、妥当性があった。

一方、このような検討を行う際には、ニトロ化ストレスを負荷する実験的手法や、選択的にニトロ化ストレスを抑制する手法が重要となる。しかし、研究開始時点では、ニトロ化ストレス負荷については限られた種類の化合物しか利用可能でなく、またその性質も本研究に必ずしも適したものとはいえなかった。さらにニトロ化ストレスに選択的な抑制剤については研究代表者の開発した化合物以外には報告がなかった。ニトロ化ストレスの研究においては、 α シヌクレインへの酸化修飾反応に限らず、ストレス負荷の調節機能などをもつ、ニトロ化ストレス関連機能性分子が、有効であると考えられた。本研究では、ニトロ化ストレスの調節を行う際に有用な独自化合物開発も目指すこととした。

本研究の段階で、研究代表者が得ていた知見として次のものがある。1つ目には、HPLC分離およびMALDI-TOFMSを利用した解析によるシトクロムc蛋白質の化学的修飾とその位置（残基）についての情報、2つ目に、化学修飾を受けたシトクロムcの活性が変化すること、3つ目に、先行しておこなった予備的実験により、 α シヌクレイン・シトクロムc・酸化ストレス（微量過酸化水素）共存下で凝集体が生成し、A53T変異型（家族性パーキンソン病で見られる変異の1つ） α シヌクレインでは、野生型の場合に比べ、凝集体生成が高度に促進されること、活性窒素酸化物により非可逆的にニトロ化修飾されたシトクロムcを用いた場合、野生型 α シヌクレインとの組み合わせでも凝集体生成が高度に促進されること、である。

2. 研究の目的

具体的に研究期間内で行なうこととして、

(1) 野生型および変異型 α シヌクレインのシ

トクロムc共存下での微量過酸化水素による凝集体形成について、検討を進める。

(2) 培養細胞系にニトロ化関連ストレスを負荷できる化合物の開発を行う。ニトロ化ストレスには、一酸化窒素(NO)が重要な役割を果たすと考えられ、NOからパーオキシナイトライトや亜硝酸等のニトロ化反応に関与する化合物が生体内で生成すると考えられる。そこで、細胞内分布を考慮した一酸化窒素(NO)発生剤および発生成能制御可能なNO発生剤の開発を進める。

(3) ニトロ化ストレスに対して、独自開発してきたニトロ化反応選択的阻害剤を改良し、組織・細胞内分布を考慮した新規なニトロ化選択的阻害剤を開発する。

(4) ニトロ化ストレスを含む細胞内の酸化ストレス状態を評価するために酸化ストレス計測プローブを開発する。このとき酸化ストレスによって、細胞死誘導における脂質膜やミトコンドリアの機能変化、あるいは核酸の酸化による遺伝子変異への影響がありうることを考慮して、オルガネラへの酸化ストレス影響を区別して計測可能な酸化ストレスプローブを開発する。

3. 研究の方法

(1) 野生型および変異型 α シヌクレインのシトクロムc共存下での微量過酸化水素による凝集体形成については、予備的検討で得られた知見をもとに、 α シヌクレイン、シトクロムc、微量過酸化水素を共存させた反応系において、 α シヌクレインの凝集反応に時間変化、濃度変化等について、ウェスタンブロットティング法を用いて解析した。

(2) 培養細胞系へ適用可能な一酸化窒素(NO)発生剤の開発については、独自に開発したニトロベンゼンタイプのNO発生剤を基に分子設計を行った。まず、NOとスーパーオキシドを同時生成するタイプの化合物について開発を試みた。ニトロベンゼンタイプのNO発生剤に、細胞内の共役系に水酸基を導入し、NOが遊離したあとの生成物がセミキノンタイプの化合物となるよう分子設計し合成した。また、細胞内分布を制御できるよう、ミトコンドリア局在性化合物と同様の構造を官能基として導入した分子設計を行った。さらに、化合物の組織への適用を目指して、二光子励起を利用できる官能基を導入した化合物を分子設計し合成した。

(3) 細胞内分布を考慮したニトロ化選択的阻害剤の開発については、これまで独自に開発してきたニトロ化反応選択的阻害剤をもとに構造修飾を行い、ニトロ化修飾が報告されている脂質膜に局在する阻害剤の開発を行った。具体的には、既に独自に見いだしたニトロ化選択的阻害剤である

5-methoxytryptamine を基本構造として分子設計を行ない、選択的阻害活性に影響がないことが判明しているアミノ基を利用して、脂肪酸鎖をアミド結合で導入した。

(4) ニトロ化ストレスを含む細胞内の酸化ストレス状態を評価するために酸化ストレス計測プローブの開発については、ニトロキシドラジカル化合物を酸化ストレスセンサーとして利用し、これに標的オルガネラに分布するよう適切な官能基を導入した。脂質膜への分布には長鎖アルキル基を導入した。ミトコンドリアへの分布には、トリフェニルホスホニウム構造を導入した。さらに、核への分布のためには、ビスベンゾイミダゾール構造を導入した。さらに、これらのオルガネラ分布型酸化ストレスプローブを用いて、酸化ストレスを付加した細胞におけるオルガネラ単位の酸化ストレスを評価し、化合物の性能を検証した。

4. 研究成果

パーキンソン病に特徴的な組織学的病変である Lewy 小体中の α シヌクレインの修飾体・凝集体生成に着目し、これに対する活性窒素酸化物（ニトロ化ストレス）の影響を調べた。特に Lewy 小体中の共存蛋白質シトクロム c へのニトロ化ストレス負荷と α シヌクレイン凝集反応活性・ニトロ化反応活性の関連について検討を行った結果、以下に示す結果を得た。

α シヌクレイン凝集反応については、酸化ストレス負荷の状況を試験管内で再現し、微量の過酸化水素を添加した反応系を用いた。微量の過酸化水素、 α シヌクレイン、シトクロム c 共存下で反応を行うと、 α シヌクレインのダイマー、トリマー等の生成がわずかに観察された。シトクロム c はヘム酵素であり、過酸化水素の共存、あるいは生体内還元剤と酸素の共存で反応性の高いヒドロキシラジカル等の活性酸素種を生成し、蛋白質の非特異的な酸化を引き起こすことが知られている。本系でもシトクロム c と過酸化水素から生成した反応性の高い活性酸素種により酸化的重合が引き起こされたと考えられた。

一方、パーキンソン病変ではニトロ化ストレスが負荷されていることが知られている。また我々は、パーオキシナイトライトによりニトロ化ストレスを付加した場合、シトクロム c に特定のチロシン残基がニトロ化されることを既に報告している。そこで、ニトロ化ストレスによりチロシンがニトロ化されたシトクロム c を用いて、上記の α シヌクレインの重合化反応を検討すると、未修飾のシトクロム c を用いた場合に比べ、ダイマー、トリマーの生成が早まることが判明した。

家族性パーキンソン病の一部では α シヌ

クレインに変異が見られる。この変異のうちの 1 つである、 α シヌクレイン A53T を用いて、前述と同様の実験を行ったところ、ダイマー、トリマーの生成が早くなることが示された。

ここまでの検討により、天然型 α シヌクレインとニトロ化ストレス負荷シトクロム c との組合せによる α シヌクレインの重合反応と、変異型 α シヌクレインと未修飾シトクロム c との組合せによる α シヌクレインの重合反応では、ともに重合化の加速が観察された。上記の試験管内での反応は、前者が孤発性パーキンソン病における組合せ、後者が家族性パーキンソン病における組合せに対応すると考えられ、ニトロ化ストレスによる蛋白質修飾の蓄積により、家族性病変と対応する現象が見られた。

また、変異型 α シヌクレインとニトロ化シトクロム c の組み合わせでは極めて早く凝集体生成がおこることが判明した。

上記の検討から、パーキンソン病変における蛋白質凝集には、ニトロ化ストレスの負荷と、酸化ストレス状態の観測が非常に重要であるとの認識に達した。しかし、この時点までに、ニトロ化ストレスを有効に培養細胞系等の実験系に負荷する手法は極めて限られており、特に NO 等の活性窒素酸化物を自由に制御しながら投与する手法については未開拓であった。また、蛋白質凝集において、細胞のどの部位で凝集するか、また細胞死シグナルと蛋白質凝集の関連がどのようなものであるかの知見が非常に乏しいため、脂質膜、ミトコンドリア、細胞核、といった細胞内での部位による酸化ストレスの負荷状況の計測が凝集体形成の解析に重要であると考えられたが、細胞内の部位を区別して酸化ストレス計測する手法も未開拓であった。

そこで、詳細な解明を行うためのニトロ化選択的阻害剤、活性窒素酸化物供与剤、酸化ストレス計測プローブの開発の 3 点に力点を移し化合物開発を行った。

まず、ニトロ化選択的阻害剤として、5-methoxytryptamine 構造を有する脂質膜分布型阻害剤を設計合成した。5-methoxytryptamine 構造は、我々が独自に見いだしたニトロ化反応選択的な防御化学構造である。合成した化合物について、細胞内局在を検討したところ、予想に反し、脂質膜以外に細胞内膜系および細胞核にも分布することが示された。これは 5-methoxytryptamine 部分の水溶性が予想より大きく、細胞内での再拡散が早いことが原因と考えられた。

また、活性窒素酸化物による酸化ストレスを自由に制御しながら負荷できる光誘起型 NO 発生剤の開発を行った。既に独自に開発したニトロベンゼンタイプの光誘起型 NO 発

生剤を基に、ニトロ基と共役する位置にヒドロキシ基を有する化合物を設計・合成し、光照射による反応について解析した。L-チロシン共存下に、この化合物に 330~380 nm の光を照射し、反応液を逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。反応生成物を分析した結果、ニトロ化チロシンは実質的に生成が認められなかったが、L-チロシンから生成したと考えられる高極性生成物が観察された。このような生成物として、チロシン水酸体である L-DOPA が考えられた。

次に、既に独自に開発したニトロベンゼンタイプの光誘起型 NO 発生剤を基に、NO 発生能に影響を与えない置換位置にミトコンドリア局在性を付与するための置換基を導入した化合物を設計合成した。具体的には置換基として、脂溶性カチオン構造であるトリフェニルホスホニウム構造を導入した化合物を合成した。この部分構造を有する化合物は、ミトコンドリアに集積しやすいことが知られている。ミトコンドリアはパーキンソン病を始め、種々の神経変性疾患で重要な役割を果たしていると考えられている。

さらに、光誘起型 NO ドナーの応用性を高めるため、生体透過性の良い長波長光による制御が行える化合物の開発を行った。二光子励起を起こすようフルオレセインを部分構造として導入した Flu-DNB を設計・合成して、パルスレーザーによる NO 放出能を検討したところ、長波長光による NO 放出が観測された。

一方、ニトロ化ストレスの負荷状況を細胞系で定量的に評価するため、酸化ストレス計測用のプローブ分子を設計合成した。そのようなプローブの 1 つ目として、脂質膜上のストレス負荷状態を計測するプローブ FAT1 を合成した。その性能を検証するため炎症性マクロファージモデル細胞で検証したところ、定量的測定が可能であることが判明した。

次に、ミトコンドリアでのストレス負荷状態が重要と考えられたため、ミトコンドリア用プローブの分子設計を行って、F-TriPPT を合成した。その性能を検証するため炎症性マクロファージモデル細胞で検証したところ、定量的測定が可能であることが判明した。脂質膜とミトコンドリアの酸化ストレスを比較したところ、用いたモデル系では脂質膜の酸化ストレス負荷が大きいことがわかった。

さらに、核測定用のプローブ分子設計を行って、HoT を合成した。その性能を検証するため炎症性マクロファージモデル細胞で検証したところ、定量的測定が可能であることが判明した。脂質膜およびミトコンドリアの酸化ストレスと核の酸化ストレスを比較したところ、用いたモデル系では、細胞核の還元力が小さい可能性が示唆され、脂質膜やミ

トコンドリアとは酸化ストレスの影響が異なることが予想された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Yusuke Adachi, Hidehiko Nakagawa, Kazuya Matsuo, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Photoactivatable HNO-releasing compounds using the retro-Diels-Alder reaction, *Chem. Commun.*, (巻数無) 5149-5151 (2008) 査読有
- ② Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl probes for evaluating oxidative stress on the cell membrane and mitochondria, *Methods in Molecular Biology*, 477: *Advanced Protocols in Oxidative Stress I*, (Edited by: D. Armstrong, Humana Press, New York, NY), pp99-112 査読無 (依頼)
- ③ Ayako Kimata, Hidehiko Nakagawa, Ryo Ohshima, Tomoko Fukuuchi, Shigeru Ohta, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, New Series of Antiprion Compounds: Pyrazolone Derivatives Have the Potent Activity of Inhibiting Protease-Resistant Prion Protein Accumulation, *J. Med. Chem.*, 50, 5053-5056 (2007) 査読有
- ④ Shizuka Ban, Hidehiko Nakagawa, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Novel mitochondria-localizing TEMPO derivative for measurement of cellular oxidative stress in mitochondria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 2055-2058 (2007) 査読有
- ⑤ Shizuka Ban, Hidehiko Nakagawa, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Novel membrane-localizing TEMPO derivatives for measurement of cellular oxidative stress at the cell membrane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 1451-1454 (2007) 査読有
- ⑥ Takayoshi Suzuki, Osamu Nagae, Yuka Kato, Hidehiko Nakagawa, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, Photoinduced Nitric Oxide Release from Nitrobenzene Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 11720-11726 (2005) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中川秀彦【招待講演】
光で制御する NO および HNO ドナー化合物

日本薬学会第129年会, 2009年3月28日
(京都)

立大学・大学院薬学研究科・講師(90372838)

② Hidehiko Nakagawa, Shizuka Ban,
Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata
EPR Probes for Measuring Sub-cellular
Oxidative Stress
the 4th Joint Meeting of the Society for
Free Radical Research Australasia and
Japan, 2007年12月3日(Kyoto)

③ 中川秀彦【招待講演】
細胞内部位特異的酸化ストレス計測を
目指したTEMPO誘導体の開発
第45回電子スピンサイエンス学会年
会, 2006年11月14日(京都)

④ 中川秀彦, 鈴木孝禎, 加藤友香, 長江修, 福
原潔, 宮田直樹
ニトロベンゼン構造に基づく新規光誘起
型NOドナーの開発
日本ケミカルバイオロジー研究会第1回
年会, 2006年5月8日(東京)

[図書] (計 1件)

中川秀彦, 宮田直樹
フリーラジカルの測定法
酸化ストレスの医学(吉川敏一監修, 内藤裕
二, 豊国伸哉編, 診断と治療社, 東京) pp88-96
(2008)

[産業財産権]

○出願状況(計 1件)

アシルニトロソ誘導体環化付加アントラセ
ン誘導体及び光作動性HNO供与体、発明者:
宮田直樹、中川秀彦、松尾和哉、鈴木孝禎、
権利者:名古屋市立大学、特願2008-284899、
出願日:2008.11.5(国内)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 秀彦 (NAKAGAWA HIDEHIKO)、名古屋市
立大学・大学院薬学研究科・准教授
(80281674)

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

宮田 直樹 (MIYATA NAOKI)、名古屋市立大
学・大学院薬学研究科・教授(50114647)

鈴木 孝禎 (SUZUKI TAKAYOSHI)、名古屋市