

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02579

研究課題名(和文)一酸化窒素誘発性エピゲノム変化の病態生理的意義の解明と特異的阻害薬の薬効評価

研究課題名(英文) Mechanism of epigenetic regulation by nitric oxide with a novel compound regulating the modification of cysteine residue

研究代表者

上原 孝 (Uehara, Takashi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00261321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティクスに深く関わる酵素が一酸化窒素(NO)の標的であることを明らかにした。ある酵素はNOによってCys残基が修飾されることで活性が著しく低下することがわかった。また、NO刺激に伴って発現量が増加する遺伝子をRNA-seq解析から網羅的に探索した。本スクリーニングから、有力な遺伝子を複数単離することに成功した。この事実を薬理的に明らかにするために、in silicoスクリーニングから酸化修飾阻害薬の単離を試みた。その結果、一つのシーズ化合物を同定することに成功した。次に、この薬物の最適化を計り、より強力な効果を有するシーズ化合物誘導体の作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は生体内で産生されるガス状分子である一酸化窒素(NO)の遺伝子発現に対する影響を調べたものである。一酸化窒素は、血圧調節や記憶形成など様々な役割を担っている。この研究で、NOがある酵素に結合・修飾することで活性を低下させ、ゲノム修飾を抑制して遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。さらに、この修飾を特異的に阻害する化合物の単離に成功した。この化合物はNOによる遺伝子発現を顕著に抑制することが確認された。また、NOによって形成されるがんに関連する遺伝子発現を抑制することが確認された。従って、がんや神経変性疾患の中、ある種のものはNOが原因であり、本研究で開発された化合物は強力なツールであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We clarified that several enzymes involved in epigenetics are targets of nitric oxide (NO). We found that the enzymatic activity was significantly inhibited by modification of Cys residue. In addition, we screened the genes whose expression levels were changed by NO exposure with RNA-seq analysis. From this screening, we succeeded in isolating many candidate genes. Then, we attempted to isolate the compound that attenuates the modification from in silico screening. A compound could inhibit S-nitrosylation of target protein in a concentration-dependent manner. Furthermore, this chemical significantly attenuated the gene expression in response to NO. Our findings strongly suggested that NO is a key factor that regulates gene expression via dysfunction of epigenetic system.

研究分野：薬理学

キーワード：一酸化窒素 エピジェネティクス 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

ヒト全ゲノムが解読されたことにより、疾患発症機構を目指す研究の主流はタンパク質の翻訳後修飾やゲノム修飾など後天的な生体内調節に注目したものが多く、事実、遺伝子のオン・オフ制御には DNA やヒストンのエピジェネティクスが関与しており、これにより疾病がもたらされることも証明されつつある。現在では、エピゲノム関連酵素に対する作用薬の開発が盛んである。しかしながら、エピジェネティクス制御酵素自身が生体内でどのような機構で調節されているのかはまったく不明である。したがって、ヒト疾患と関連させた統合的な理解に至っていない。これらの疑問点を追求することは、疾患発症の根本を明らかにするばかりでなく、環境変化やストレスが細胞にもたらす作用の本質に迫り、新規治療薬開発に大きく貢献すると推定される。

私たちは、これまでに複数の S-ニトロシル化されるエピゲノム関連酵素を単離同定していることである。本研究課題ではこれらの酵素に絞り込み、NO の作用ならびに遺伝子発現調節機構への影響を明らかにし、病態発症との関連性や選択的阻害化合物の単離を目指すことを計画した。

2. 研究の目的

ピロリ菌感染などによる慢性炎症反応がエピジェネティクス異常を惹起し、胃がんなどを招くことが示唆されている。この局所では NO 産生が顕著であり、がん化との因果関係が推定されているものの、エピゲノム変化惹起機構に関してはほとんど不明である。本研究はエピゲノム関連酵素の NO 修飾に起因する酵素活性変化と癌化促進機構との関係を証明することを目的としている。具体的には、今年度までの挑戦的萌芽研究で明らかにした酵素の NO による修飾 (S-ニトロシル化) が及ぼす活性への影響、それに基づくプロモーター解析ならびにその経時変化、その影響によって支配される遺伝子の特定と発現への影響、さらには、病態モデルやヒトにおける当該酵素修飾の有無を明らかにする。さらに、エピゲノム関連酵素は立体構造が解かれていることから、NO 修飾保護あるいは修飾防御可能なシーズを化合物アレイや *in silico* スクリーニングから単離することを計画している。これにより、これまでに提案の無かった新しいタイプの診断方法の確立に繋げる。

3. 研究の方法

エピゲノム関連酵素の NO による S-ニトロシル化修飾とその活性への影響を解析する。申請者は予備研究から数種の酵素が NO の標的となることを明らかにしている。そこで、この詳細な作用様式を明らかにすることを目的とし、エピゲノム関連酵素における S-ニトロシル化修飾の NO 濃度依存性、時間依存性を詳細に検討し、さらに、その安定性を明らかにする。また、標的 Cys 残基を特定するために各種変異体 (Cys → Ser) を用いた解析から特異的修飾部位を決定する。この成果を元にして、*in silico* スクリーニングから、酸化修飾のみを特異的に阻害するシーズ化合物の単離と誘導体の作出を実施する (図 1)。つぎに、NO 処理による S-ニトロシル化修飾の酵素活性への影響を活性測定キットや特異的抗体によるウェスタンブロット解析から検討する。併せて、NO 標的部位変異体の効果について細胞レベルで確認する。また、酸化ストレス依存的な遺伝子発現機構を解析することで、どのような遺伝子が、あるいは何種類の遺伝子が影響を受けるのかを明らかにする。また、私たちが開発した標的タンパク質特異的 S-ニトロシル化阻害薬の薬理学的特性を併せて検討する。

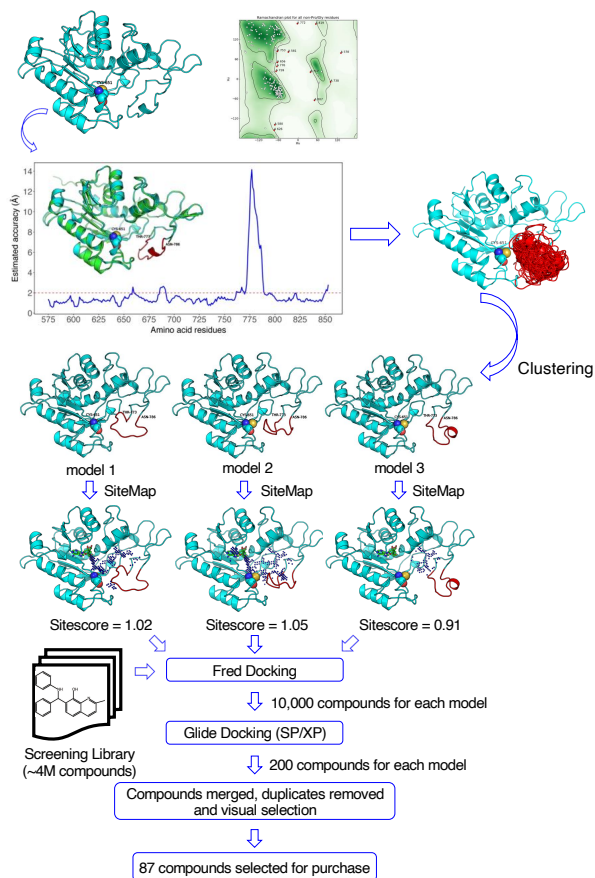


図 1. 特異的酸化修飾阻止薬の *in silico* スクリーニング方法の概略

#### 4. 研究成果

エピジェネティクスに深く関わる酵素が一酸化窒素 (NO) の標的であることを明らかにした。その中でも、ある酵素に関して解析を進めたところ、NOによってCys残基が修飾されることで酵素活性が著しく低下することを明らかにした。この結果より、NO刺激に伴って遺伝子制御機構が破綻することが予想されたため、発現量が変化する遺伝子をRNA-seq解析から網羅的に探索した。本スクリーニングから、有力な遺伝子を複数単離することに成功した。次に、それらの遺伝子上流のメチル化の有無をバイサルファイト法から解析したところ、NOによって劇的に脱メチル化される部位が存在することがわかった。この事実を薬理的に明らかにするために、当該酵素の3次元構造とNO結合部位を基にして、酸化のみを効果的に抑制する化合物をin silicoスクリーニングから単離することを試みた。約400万化合物ライブラリーから、候補となる薬物をスクリーニングしたところ、一つの化合物 (DBICと命名) を同定することに成功した (図1)。詳細な解析を進めたところ、この化合物は、酵素活性を抑制せず、NOによる修飾のみを阻害する性質を有していた。また、NOスカベンジ効力も無く、分子特異的であることも明らかとなった。そこで、本化合物をプローブとし、NOによる遺伝子発現への影響について解析した。その結果、以下の成果を得ることに成功した。

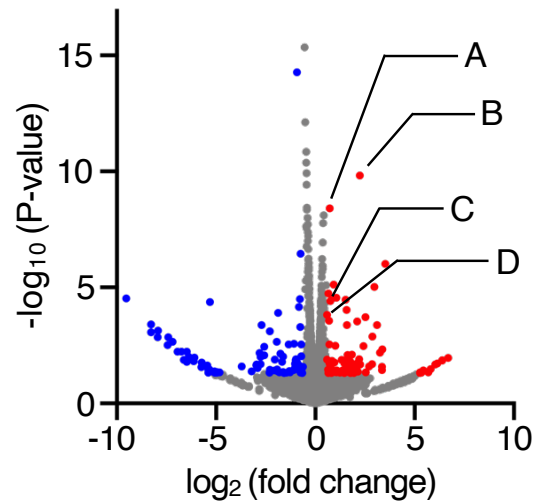


図2. NOによる発現量変化する遺伝子の網羅的検出 (RNA-seq法)

1) NO 依存的誘導遺伝子の特定とその制御機構に関して検討した。まず、マウス初代培養神経細胞ならびに株化ヒト胃がん細胞を用いて、NO 刺激に伴って発現が誘導される遺伝子を RNA-seq 法で単離した。その結果、これまでに報告のない NO 依存的に発現が変化する遺伝子を特定することに成功した (図2)。さらに、これまでに使用していた胃がんモデル細胞に加えて、HeLa 細胞を用いて研究を進めた。その結果、細胞毎によって、変化する遺伝子が異なっていることがわかった。HeLa 細胞で観察された候補遺伝子に関しては、RT-qPCR を用いて再現性が認められた (図3)。がん発症との因果関係に関しては現在解析しているところである。また、ヒト大腸がんサンプルを使用し、実際にエピゲノム制御酵素が S-ニトロシル化されていることも発見した。

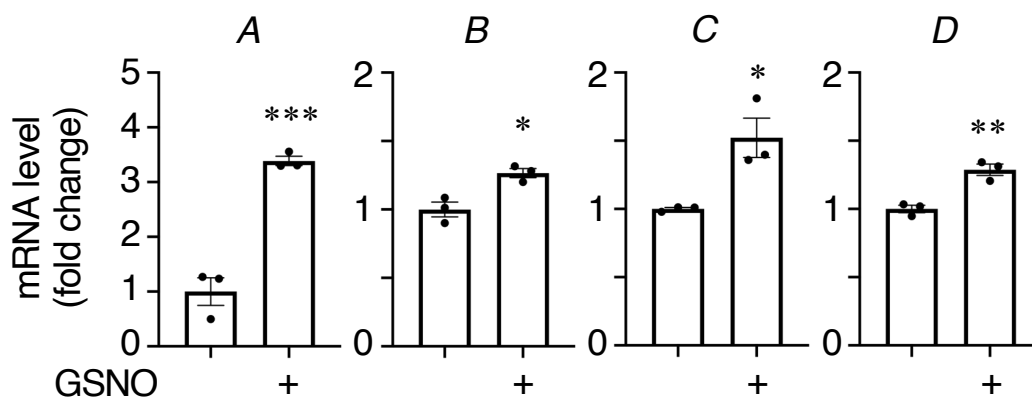


図3. RNA-seqで検出された各遺伝子の発現量確認 (RT-qPCR法にて検出)

2) DBIC の効果ならびにその誘導体の薬理学的特性を明らかにすることを目指した。まず、DBIC の誘導体を9種合成することに成功した。これらのS-ニトロシル化抑制能を細胞レベルで検討したところ、DBICよりも数倍効力の高いものが含まれていた。これらの結果はin silicoシミュレーションのそれと一致していた。次に、in vivoでの作用を検討するために最適化を計った。DBICは水にほとんど不溶であることから、動物への長期間投与が出来ない。そこで、DBIC塩酸

塩の作出を試みたところ、0.8 mg/ml 程度まで溶解することが判明した。なお、DBIC と同様に大量合成も可能であることを確認した。一方、DBIC はその一部が血漿中で代謝されることも明らかにしている。将来的には、脳内での効果も期待していることから、プロドラッグ化を進めることにした。DBIC の水酸基をサクシニル化した誘導体の合成に着手し、期待通りの化合物の作出に成功した。本化合物も水や buffer に約 0.8 mg/ml (2 mM) まで溶解することを確認した。さらに有用な誘導体を作成するべく、再び *in silico* シミュレーションを行なった。その結果、誘導体を新たに 12 種特定することに成功した。それらの S-ニトロシル化抑制能を細胞レベルで検討し、有力な 2 種を選定した。これらは、NO 依存的な遺伝子発現に対しても有効であることを確認した。今後は、他の誘導体についても、有機化学の手法を駆使して合成し、薬理効果について解析していく予定となっている。

3) ゲノムレベルでの NO 依存的なメチル化修飾変化部位の同定: ゲノムワイドに NO 依存的脱メチル化部位を探索することを試みた。まずは全 CpG の 95%程度をカバーするターゲットバイサルファイトシーケンス解析を実施した。しかしながら、NO によって影響を受ける部位が極端に少ないことから、標的を絞ってデータを解析した。その結果、RNA-seq 解析で検出された個々の候補遺伝子上流では、NO 処理によって変化する部分が多く存在することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakahara, K., Fujikawa, K., Hiraoka, H., Miyazaki, I., Asanuma, M., Ito, A., Takasugi, N., and Uehara, T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Attenuation of macrophage migration inhibitory factor-stimulated signaling via S-nitrosylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1044-1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00025	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 Takasugi, N., Hiraoka, H., Nakahara, K., Akiyama, S., Fujikawa, K., Nomura, R., Furuichi, M., and Uehara, T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Emerging role of electrophiles as a key regulator for endoplasmic reticulum (ER) stress.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 pii:E1783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20071783	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 Takeda, K., Nagashima, S., Shiiba, I., Uda, A., Tokuyama, T., Ito, N., Fukuda, T., Matsushita, N., Ishido, S., Iwawaki, T., Uehara, T., Inatome, R., and Yanagi, S.	4. 巻 38
2. 論文標題 MITOL prevents ER stress-induced apoptosis by IRE1 ubiquitylation at mitochondrial-ER contact sites.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 e100999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2018100999	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 Fujikawa K, Nakahara K, Takasugi N, Nishiya T, Ito A, Uchida K, Uehara T.	4. 巻 524
2. 論文標題 S-Nitrosylation at the active site decreases the ubiquitin-conjugating activity of ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1 (UBE2D1), an ERAD-associated protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 910-915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.011	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 Nakahara, K., Fujikawa, K., Hiraoka, H., Miyazaki, I., Asanuma, M., Ito, A., Takasugi, N., and Uehara, T.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Attenuation of macrophage migration inhibitory factor-stimulated signaling via S-nitrosylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1044-1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00025	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 Hiraoka H, Nomura R, Takasugi N, Akai R, Iwawaki T, Kumagai Y, Fujimura M, Uehara T.	4. 巻 95
2. 論文標題 Spatiotemporal analysis of the UPR transition induced by methylmercury in the mouse brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Toxicol.	6. 最初と最後の頁 1241-1250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-021-02982-9.	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 Nakahara K, Hamada K, Tsuchida T, Takasugi N, Abiko Y, Shien K, Toyooka S, Kumagai Y, Uehara T.	4. 巻 296
2. 論文標題 Covalent N-arylation by the pollutant 1,2-naphthoquinone activates the EGF recepto	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 100524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100524.	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Hideki Hiraoka, Kengo Nakahara, Nobumasa Takasugi, Masatake Fujimura, Takao Iwawaki, Yoshito Kumagai, Takashi Uehara
2. 発表標題 Molecular Mechanism of Methylmercury-Induced Neurotoxicity via Endoplasmic Reticulum Stress
3. 学会等名 IUTOX ICTXV 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kana Fujikawa, Kengo Nakahara, Nobumasa Takasugi, Akihiro Ito, Takashi Uehara
2. 発表標題 Regulation of Ubiquitin-Proteasome System in ERAD via S-nitrosylation of UBE2D1.
3. 学会等名 IUTOX ICTXV 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 リバースケミカルジェネティクスから解く酸化ストレスによりエピゲノム調節機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Uehara
2. 発表標題 Detection of novel S-nitrosylated proteins in neuronal cells.
3. 学会等名 SfRBM2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Uehara
2. 発表標題 A novel mechanism of nitric oxide-induced gene expression
3. 学会等名 WCP2018 KYOTO Satellite Symposia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤河香奈、伊藤昭博、上原 孝
2. 発表標題 ユビキチン結合酵素UBE2D1のS-ニトロシル化修飾による機能変化
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K.NAKAHARA, H.HIRAKA, A.ITO, T.UEHARA
2. 発表標題 Function of novel S-nitrosylated proteins identified by biotin switch method with LC-MS/MS analysis
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 NOによる新規遺伝子発現調節機構とその制御薬物の開発
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤河香奈, 中原健吾, 高杉展正, 伊藤昭博, 上原 孝
2. 発表標題 一酸化窒素によるユビキチン結合酵素UBE2D1活性調節機構
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 千葉
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 藤河香奈, 中原健吾, 高杉展正, 伊藤昭博, 上原 孝
2. 発表標題 ユビキチン結合酵素UBE2D1のS-ニトロシル化を介した小胞体関連分解調節機構
3. 学会等名 第19回日本NO学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中原健吾, 高杉展正, 上原孝
2. 発表標題 一酸化窒素応答性遺伝子発現による神経細胞死惹起機構の解析
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 環境化合物修飾によるエピゲノム調節機構
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 環境化学物質の生体内標的探索とその作用機構
3. 学会等名 フォーラム2020衛生薬学・環境トキシコロジー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 一酸化窒素による新たな遺伝子発現調節機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 NOによる新規遺伝子発現調節機構：分子特異的酸化修飾抑制薬の開発を目指して
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会/第20回日本NO学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 酸化修飾による新規エピゲノム調節機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 高杉展正, 上原 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学	

1. 著者名 奥田洸作, 高杉展正, 上原 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 10
3. 書名 脳神経化学	

1. 著者名 平岡秀樹, 上原 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2
3. 書名 生体の科学	

〔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
研究分担者	竹内 靖雄 (Takeuchi Yasuo)  (00163387)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  (15301)	
研究分担者	伊藤 昭博 (Ito Akihiro)  (40391859)	東京薬科大学・生命科学部・教授  (32659)	

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
---------	---------