

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06099・19K21219

研究課題名(和文) 神経変性疾患に関わるPDIのSNO化位置の同定と神経変性機構との関連

研究課題名(英文) Identification of PDI S-nitrosylated site and the relation S-nitrosylated PDI with neurodegeneration

研究代表者

小倉 次郎 (Ogura, Jiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20580640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：S-ニトロソ化(SNO化) Protein Disulfide Isomerase (PDI) は神経変性疾患患者の脳から検出され、異常タンパク質の蓄積、ひいては神経変性の原因と考えられている。これまで、PDIのSNO化は活性中心であるCGHCモチーフに生じると考えられてきた。しかしながら、近年、この仮説と矛盾した知見がいくつか報告された。本研究では、PDIのSNO化部位として基質結合ドメイン中のC343を同定し、PDI C343のSNO化は神経細胞内で安定に存在することを明らかとした。さらに、PDI C343のSNO化は小胞体ストレスマーカーであるIRE1を誘導することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDIはa、a' domainの両活性中心に酸化力の強いSH基を有し、抗酸化物質を容易に捕捉する。実際、生体内抗酸化物質であるグルタチオンはa domainに存在するSH基に捕捉される。一方、神経変性疾患の予防効果を持つとして注目されるフラボノイド類はSNO化部位であるC343を含むb' domainに結合する。この特性はフラボノイド類の構造的特徴に由来し、構造が類似する化合物は同様の特性を示す可能性が高い。このため、本研究によりPDIのSNO化部位が同定されたことにより、今後様々なフラボノイド類のPDI脱SNO化作用を検証することで、将来的な認知症予防の実現に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：S-nitrosylated PDI was detected in the postmortem brain in various neurodegenerative disease patients. The cysteines at active motif of PDI are speculated to be S-nitrosylation sites but some studies recently reported the results contradicted the hypothesis. In this study, we confirm that PDI C343 at the substrate binding domain of PDI is S-nitrosylation site using SH-SY5Y cells. Although active site S-nitrosylation is reversible by reduced glutathione, S-nitrosylation of C343 is comparative stable. Moreover, S-nitrosylation at C343 of PDI induces the IRE1 phosphorylation. The results of our study provide a new insight into the proceeding neurodegeneration, and may be useful for the drug development for neurodegenerative diseases.

研究分野：医療薬学

キーワード：神経変性疾患 PDI S-ニトロシル化 基質結合ドメイン 小胞体ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の世界的な高齢化の進展に伴い、神経変性疾患の患者数は増加の一途を辿っており、全世界でアルツハイマー病患者だけでも4000万人以上と推定されている。神経変性疾患は運動機能、認知機能などを低下させ、著しいActivities of Daily Living (ADL)、Quality of Life (QOL)の低下をもたらす。さらに、神経変性疾患は難治性であり、未だ根治療法が確立していない。このため、神経変性疾患の根治療法・効果的予防法の確立は健康長寿社会の実現に向けた喫緊の課題である。PDIはa, b, b', a' domainの4つの主要なdomainから成り、活性中心であるa, a' domain中のCGHCモチーフの酸化還元活性により、基質タンパク質のS-S bondの形成、及び、異性化を行い、特定の位置にS-S bondを形成させる。さらに、PDIは凝集タンパク質を乖離させ、再foldingを促すシャペロンとしても機能する。このように、PDIはタンパク質の高次構造形成に重要な役割を担っている。アルツハイマー病、パーキンソン病など、神経変性疾患患者の死後脳からは酸化ストレスにより生じたS-ニトロシル(SNO)化PDIが共通して検出され、異常タンパク質の蓄積、ひいては神経変性や神経細胞死の原因と考えられている[1, 2]。これまで、PDIのSNO化は活性中心であるCGHCモチーフに生じ、SNO化による機能不全が神経変性の要因と考えられてきた。実際、神経変性疾患モデル細胞において、PDIの過剰発現により異常タンパク質の凝集や神経細胞死が抑制されることが示されている[1]。しかしながら、最近になってPDI阻害剤によっても異常タンパク質の凝集、及び、神経細胞死が抑制されることが報告された[3]。申請者はこれらの相反する知見から、神経変性疾患におけるPDIのSNO化は基質結合部位(b' domain)のシステイン残基で生じ、基質タンパク質との結合が変化することでmisfoldingが加速し、神経細胞死が生じるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、PDIの脱SNO化を機序とした新規神経変性疾患の治療・予防法の確立を最終目標とし、PDI b' domainのシステイン残基のSNO化、及び、それに伴う神経変性の進展との関連を解明する。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞：ヒト神経芽腫由来SH-SY5Y細胞、およびPDI wild type (wt), PDI C343S変異体を安定発現させたSH-SY5Y細胞を用いた。

(2) 使用試薬：ニトロシル化剤にはニトロソシステイン(SNOC)を用いた。SNOCは既報に従い[4]、4°C、遮光条件下、0.5 N HCl中で1等量のNaNO₂と5分間反応させることで合成した(収率:>95%)。

(3) ニトロシル化の誘導：Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), pH7.4に100 µMとなるように溶解させたSNOCで細胞を30分処理することで行った。

4. 研究成果

(1) SH-SY5Y細胞におけるPDI SNO化:SH-SY5Y細胞をSNOCで30分処理したところ、著しいPDIのSNO化が検出された(図1, 左列)。さらに、SNOC処理後、SNOCを含まない培養液に置換し、さらに24時間培養した。その結果、SNOCを除去しても24時間後までSNO化PDIは検出された(図1, 右列)。一般にタンパク質のSNO化は可逆的修飾であり、生体内抗酸化物質により脱修飾(還元)されるが、SNO化PDIは神経細胞内で一定の安定性を示すことが明らかとなった。

(2) SH-SY5Y細胞におけるPDI SNO化と小胞体ストレスの発生:続いて、SNO化の誘導による小胞体ストレスマーカーの変化を検討した。その結果、SNOC処理後にはIRE1αのリン酸化、PERKのリン酸化が確認された(図2, 左列)。SNOC除去後24時間後にはPERKのリン酸化は回復したものの、IRE1αのリン酸化は依然として確認された(図2, 右列)。このことから、神経細胞におけるPDIのSNO化はIRE1αのリン酸化を誘導することが示唆された。一方、小胞体ストレスマーカーの下流のUnfolded Protein Response (UPR) 遺伝子である

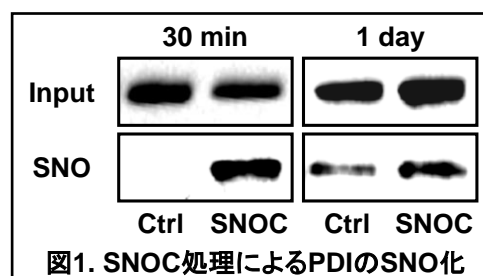


図1. SNOC処理によるPDIのSNO化

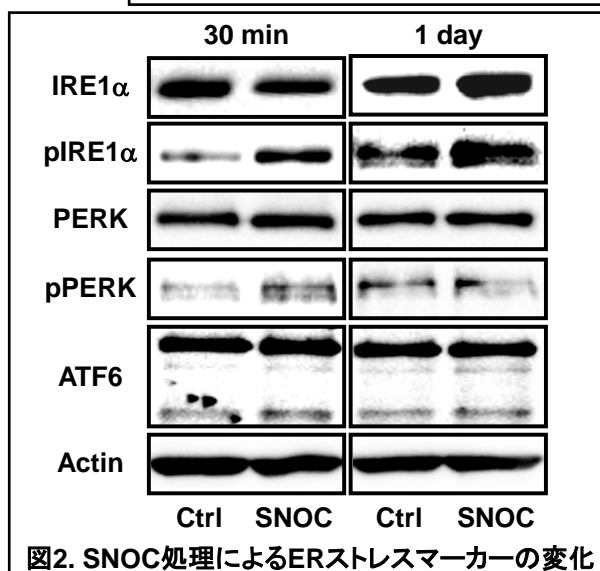


図2. SNOC処理によるERストレスマーカーの変化

ERdj4, ATF4, CHOP, Bip, GRP94 mRNA 量に変化は見られなかった (データは示さない)。

(3) SH-SY5Y 細胞における PDI SNO 化位置の同定: 筆者はこれまでに組換えヒト PDI タンパク質およびそのシステイン変異体を用いて、PDI の SNO 化部位は活性中心である a, a' domain 中の CGHC モチーフと基質結合部位である b' domain 中の C343 であることを明らかにしている。さらに、活性中心の SNO 化は還元型グルタチオン (GSH) により容易に還元されるが、C343 の SNO 化は GSH により還元されないことを見出している。そこで、SH-SY5Y 細胞の SNOC 処理により生じた SNO 化

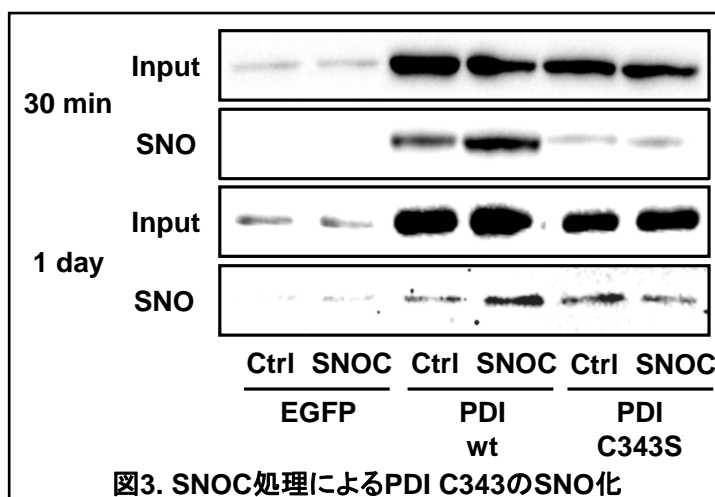


図3. SNOC処理によるPDI C343のSNO化

PDI の修飾位置を確認するべく、PDI wt、PDI C343S を発現させた細胞を作製した。なお、コントロール細胞として EGFP 発現細胞も合わせて作製した。PDI wt 発現細胞と PDI C343S 発現細胞の間に PDI 発現量の差は見られないが、SNO 化 PDI のベースレベルに著しい差が見られた (図 3, 上段)。さらに、これらの細胞を SNOC で処理すると、PDI wt は著しく SNO 化されたが、PDI C343S は SNO 化されるものの、その変化は小さかった (図 3, 上段)。また、SNOC 除去後 24 時間では、PDI wt の SNO 化量は SNOC 処理直後に比べて減少したものの、依然として control と比べて高いレベルであった (図 3, 下段)。一方、PDI C343S の SNO 化量は control と同程度まで回復していた (図 3, 下段)。このことから、神経細胞における PDI の SNO 化部位は C343 であり、細胞内で一定の安定性を示すことが明らかとなった。さらに、PDI wt 発現細胞では SNOC 除去後 24 時間まで IRE1 α のリン酸化が確認されたが、PDI C343S 発現細胞では SNOC 処理直後に見られた IRE1 α リン酸化が、24 時間後にはコントロールと同レベルまで回復していた (図 4)。このことから、PDI C343 の SNO 化が IRE1 α のリン酸化を誘導することが示された。

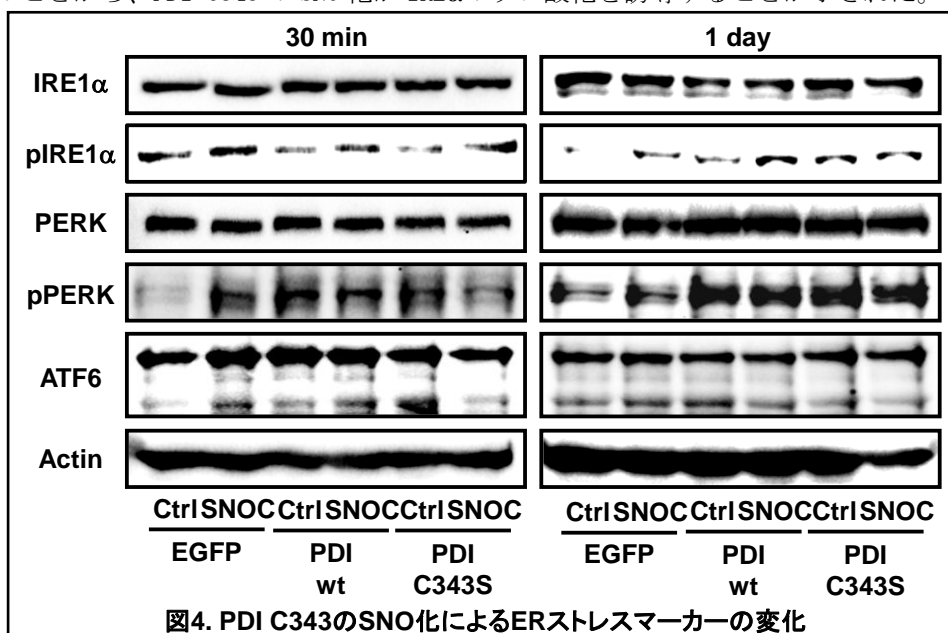


図4. PDI C343のSNO化によるERストレスマーカーの変化

以上、本研究により、神経細胞における PDI の SNO 化部位は C343 であり、PDI C343 の SNO 化は IRE1 α リン酸化を引き起こすことが明らかとなった。

<引用文献>

1. T. Uehara, T. et al., S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration, *Nature*. 441 (2006) 513-517.
2. A.K. Walker, et al., Protein disulphide isomerase protects against protein aggregation and is S-nitrosylated in amyotrophic lateral sclerosis, *Brain*. 133 (2010) 105-116.
3. Š. Lehtonen, et al., Inhibition of Excessive Oxidative Protein Folding Is Protective in MPP(+)-Toxicity-Induced Parkinson's Disease Models. *Antioxid Redox Signal*. 25 (2016) 485-497.
4. T. W. Hart, Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione, *Tetrahedron Lett*. 26 (1985) 2013-2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogura Jiro, Yamaguchi Hiroaki, Mano Nariyasu	4. 巻 15
2. 論文標題 Stimulatory effect on the transport mediated by organic anion transporting polypeptide 2B1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asian Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 181 ~ 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.ajps.2019.10.004	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野慎司、小倉次郎、杉浦弘樹、眞野成康
2. 発表標題 PDI基質結合部位のニトロソ化が誘導する小胞体ストレスマーカーの探索
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦弘樹、小倉次郎、佐藤稔之、小野慎司、眞野成康
2. 発表標題 糖質負荷によるUnfolded Protein Responseマーカーの経時変化の検証
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤稔之、小倉次郎、杉浦弘樹、小野慎司、眞野成康
2. 発表標題 糖質負荷による神経変性とUnfolded Protein Response遺伝子の経時変化の関連
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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)	オウル大学・Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine・Professor	