

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670029

研究課題名(和文)新規スクリーニング系によるNO調節性エピゲノム制御酵素の単離同定

研究課題名(英文)Identification of novel target proteins of NO with new screening system

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗体アレイとNO結合タンパク質を特異的に検出するビオチンスイッチ法をハイブリッドさせた新規スクリーニング方法によって、新規NO調節性酵素の単離を試みた。加えて、特異的抗体を用いて、NO標的タンパク質の絞り込みスクリーニングを行うことで、エピゲノム制御酵素に対するNOの効果を検討した。その結果、種々の酵素がNOの標的となり、S-ニトロシル化修飾を受けることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to isolate the novel target proteins of NO using new screening system. In addition, we tried to identify the substrates of NO with several specific antibodies. We could isolate several enzymes involved in epigenetics as the targets of NO. We found that those candidates are S-nitrosylated in vitro and in vivo. These results indicated that those proteins are certainly the targets of NO. We are now investigated the role of S-nitrosylation on its enzymatic activity.

研究分野：薬学系薬理

キーワード：一酸化窒素 翻訳後修飾 スクリーニング系 エピゲノム

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は、タンパク質の翻訳後修飾やゲノム修飾などの後天的な生体内調節機構に注目したものが増えつつある。事実、ガンなどの疾病には遺伝子のオン・オフ制御を担うゲノム DNA のエピジェネティクス修飾が関与している可能性が示唆されている。現在では、その修飾に関わる酵素の阻害薬や活性化薬が新規のガン治療薬候補として開発が進められている。

申請者はこれまでに NO による神経細胞死とそれに続く神経変性疾患発症機構について解析し、世界で初めてニトロソ化ストレスの細胞内標的タンパク質 (Parkin, PDI) を同定した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, *Science* 2005, *Nature* 2006)。さらに昨年、新規な NO 結合性タンパク質の網羅的同定法を開発し、多くの NO 基質の単離にも成功している (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011)。この中に、エピゲノム制御酵素が数種含まれていることを発見している。したがって、酸化修飾されたエピゲノム制御酵素を特定し、その活性が変化することを見出した際には、ニトロソ化ストレスによるガンをはじめとした種々の疾患発症機序の提示に繋がる可能性が推定された。

2. 研究の目的

一酸化窒素 (NO) などをはじめとする活性酸素種がタンパク質システイン残基チオール部に直接結合することで、その酵素活性を大きく変化させることが知られている。申請者は細胞内 NO 結合性 (S-ニトロシル化) タンパク質の網羅的同定法の開発に成功し、その中にこれまでに報告のないエピゲノム制御酵素が数種含まれていることを見出した。そこで、この新知見を基に

(1) 解析可能なエピジェネティクス関連酵素に対する NO 感受性をさらに網羅的に

調べること、

(2) その酸化修飾の酵素活性に対する影響や病態との関連性を明らかにすること、を計画した。

本研究を介して、エピゲノム制御酵素群がニトロソ化ストレスによって調節されている事実を証明し、ガンなどの創薬に役立つ初期的な知見を挙げることが目標である。さらには、NOS 阻害薬のエピゲノム制御酵素に対する効果など薬理的アプローチも行う。

3. 研究の方法

エピゲノム制御酵素を多く含む核内タンパク質に対する抗体がスポットされているアレイを使用して、網羅的な NO 基質タンパク質の単離同定を行った。さらに、ヒットした候補タンパク質に関して細胞レベルで本当に NO 結合性を有しているか否か検討した。

(1) 特異的スクリーニングによるニトロシル化されるタンパク質の単離

脳細胞 (神経/グリア) を NO ドナーあるいはグルタミン酸で処理することにより、タンパク質 S-ニトロソ化反応を亢進させた。つぎに、S-ニトロシル化タンパク質を特異的試薬によりビオチン化し、それを核内タンパク質抗体アレイに供した。最終的に蛍光ラベルすることで候補タンパク質の同定を目指した。

(2) 候補タンパク質の取捨選択 (ヒト細胞における再現性と NO 要求性の検討)

(1) でのスクリーニング、ならびにこれまでに予備的に行なった結果から、エピゲノム制御酵素の絞り込みを行った。種々のヒト神経細胞/グリア細胞/血管内皮細胞/胃上皮細胞などに対して外来性の NO ドナーを処理し、S-ニトロシル化反応の濃度依存性から判断した。

(3) NO 結合部位の同定と酵素活性への影響の検討

(2) での結果を踏まえて、NO に対する感受性が高いものを今後の研究の対象

とした。当該タンパク質の NO 修飾部位ならびに活性への影響を検討するために、全長遺伝子をクローニングし、各システイン残基をセリン残基に変換した変異体をそれぞれの分子で作成した。

(4) 候補タンパク質のニトロシル化修飾部位の決定

(3) で作成した各種変異体を動物細胞に強制発現させた後、NO で刺激し、ビオチンスイッチ法で NO 修飾の有無を調べることで、どのシステイン残基が標的となっているかを明らかにした。

(5) 酵素活性に対するニトロシル化の影響

対象となる酵素の中には大きく分けてゲノム DNA やタンパク質の修飾(メチル化やアセチル化)を惹起するものとそれを脱離させるものが知られている。それらの酵素活性に対する NO の影響を種々の活性モニターキットを利用して調べた。

(6) NOS 阻害薬やエピゲノム制御酵素阻害薬の影響

(5) で明らかにした情報を基にして、NOS を活性化させるアゴニスト(グルタミン酸、アセチルコリン、ブラジキニンなど)によっても同じような修飾が観察されるか、さらには、NOS 阻害薬が有効か否かを検討した。

4. 研究成果

スクリーニングを行ったところ、候補タンパク質の中に、これまで報告されていないエピゲノムに関係する酵素が数種含まれていた。このうち、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)に着目して詳細な検討を行った。

HDAC は多くのサブタイプがあり、これまでに HDAC2 の SNO 化に関しては報告がされている。本研究では HDAC6 に関して詳細な解析を行った。HDAC6 は細胞外から発生する NO によって S-ニトロシル化されることを確認した。さらに、A549 細胞をサイトカインで刺激し、iNOS を誘導させ、細胞内で NO を発生させた。この条件でも HDAC6 の SNO 化が観察された。

つぎに、リコンビナント HDAC6 を使用して、in vitro でその酵素活性に対する NO の効果を調べたところ、有意に抑制されることがわかった。さらに、HDAC6 の基質として知られている α -チューブリンのアセチル化に対する効果を細胞レベルで調べた。その結果、A549 細胞をサイトカインで刺激し iNOS を誘導させると、 α -チューブリンのアセチル化は著しく増加することが見いだされた。さらに、この増加は NOS 阻害薬を添加することで basal まで減少することがわかった。したがって、これらの結果から、HDAC6 は NO によって酸化修飾されることで酵素活性が負に調節されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

- Okuda K, Ito A, and Uehara T. Regulation of histone deacetylase 6 activity via S-nitrosylation. *Biol. Pharm. Bull.* In press (2015) 査読有
- Makino K., Okuda K, Sugino E, Nishiya T, Toyama T, Iwawaki T, Fujimura M, Kumagai Y, and Uehara T. Correlation between attenuation of protein disulfide isomerase activity through S-mercuration and neurotoxicity induced by methylmercury. *Neurotox. Res.* 27, 99-105 (2015) 査読有
- Ohno K, Okuda K, and Uehara T. Endogenous S-sulphydration of PTEN helps protect against modification by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 245-249 (2015) 査読有

[学会発表](計11件)

上原 孝：「一酸化窒素による小胞体ス

トレスセンサーの活性化」第13回日本
NO学会学術集会 沖縄県医師会館
(2013.6.28)

奥田洸作,牧野堅人,外山喬士,西屋 禎,
岩脇隆夫,熊谷嘉人,上原 孝:「メチル
水銀誘発性神経細胞死における小胞体ス
トレスの関与」第123回日本薬理学会近
畿部会 ウィンク愛知(2013.7.12)

奥田洸作,牧野堅人,外山喬士,西屋 禎,
岩脇隆夫,熊谷嘉人,上原 孝:「メチル
水銀による小胞体ストレスを介した神経
細胞死誘導」生体機能と創薬シンポジウム
2013 九州大学病院キャンパス医学部百
年講堂(2013.8.29)

上原 孝:「小胞体ストレスシグナリング
の新局面」第86回日本生化学会大会 パ
シフィコ横浜(2013.9.11)

奥田洸作,牧野堅人,西屋 禎,熊谷
嘉人,上原 孝:「PDIのS-水銀化を介
した小胞体ストレス惹起 機構」第
87回日本薬理学会年会 仙台
(2014.3.19)

中戸 亮介,西屋 禎,上原 孝:「一
酸化窒素による小胞体ストレス惹起機
構」日本薬学会第134年会 熊本
(2014.3.30)

賀須井 裕基,西屋 禎,上原 孝:「小
胞体膜E3ユビキチンリガーゼHRD1に
よるインスリン分解 酵素の局
在変化」日本薬学会第134年会 熊本
(2014.3.30)

上原 孝:「NOによるタンパク質成熟
機構破綻メカニズム」第14回日本NO
学会学術集会 佐賀(2014.5.16)

大久保 優,中戸 亮介,上原 孝:「小
胞体ストレスセンサーIRE1aのS-ニト
ロシル化修飾とその役割」第125回日本
薬理学会近畿部会 岡山コンベンショ
ンセンター(2014.6.20)

Takashi Uehara:「Mechanism of nitric
oxide-induced endoplasmic reticulum
stress」WCP2014 Cape Town

International Convention Centre ケー
プタウン(2014.7.15)

上原 孝,大野 一紀:「硫化水素と一
酸化窒素による新規PTEN調節機構」第
126回日本薬理学会近畿部会 和歌山
県JAビル(2014.10.24)

〔図書〕(計6件)

上原 孝:小胞体内ニトロシル化による
神経変性疾患の発症,脳21,16,52-57
(2013) 金芳堂

上原 孝:一酸化窒素(NO)結合性(S-
ニトロシル化)タンパク質の網羅的同定,
生化学85(1),25-30(2013)日本生化学
学会

上原 孝:酸化ストレスと神経変性疾患,
ファルマシア49(9),854-858(2013)日
本薬学会

上原 孝:酸化ストレスのセンシングと
生体機能制御,CLINICAL CALCIUM,
23(11),1613-1619(2013)医薬ジャーナ
ル社

西屋 禎,上原 孝:一酸化窒素(NO)
による細胞死制御,医学のあゆみ
247(9),764-769(2013)医歯薬出版社

上原 孝:小胞体ストレスが細胞の運命
を決める(企画/上原 孝)小胞体スト
レスによる生と死 細胞応答の新たな
役割,実験医学32(14),2194-2200
(2014)羊土社

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/yakuri/Uehara_Lab/Welcome.html

6．研究組織

(1)研究代表者

上原 孝 (TAKASHI UEHARA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：261321

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし