

平成21年5月11日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590051
 研究課題名（和文）小胞体における蛋白質品質管理システムに対する一酸化窒素の病態生理学的作用
 研究課題名（英文）Pathophysiological function of nitric oxide on protein quality control system in endoplasmic reticulum.
 研究代表者
 上原 孝 (UEHARA TAKASHI)
 北海道大学・大学院薬学研究院・准教授
 研究者番号：00261321

研究成果の概要：脳虚血時による細胞内 Ca^{2+} の上昇は、一酸化窒素 (NO) 合成酵素の活性化を介して NO を過剰産生し、小胞体シャペロンであるカルレチキュリン (CRT) を S-ニトロシル (SNO) 化することが示唆された。また、CRT の SNO 化によるシャペロン活性の低下は、小胞体ストレスに対する細胞死に関連することが示唆された。以上より、NO と小胞体ストレスの関連性に新たな見解を提示することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質として知られている。虚血状態においては、グルタミン酸が細胞外に過剰に放出されて、その濃度上昇に伴いニューロンのグルタミン酸受容体が過剰に興奮する。その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、 Ca^{2+} 依存性蛋白質であるカルモジュリンを介

して一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) が活性化する。ガス状ラジカルである NO は、神経伝達物質として中枢神経系、血管緊張の調節、抗血栓作用など多彩な機能を持つ生理活性分子であるが、過剰に産生される細胞毒性を示すことも知られている。

最近、NO の新たな分子メカニズムが提唱され、多くの報告がなされている。これはシス

テイン残基のチオール部位へのNOの結合(S-ニトロシル化(SNO化))であり,多くの蛋白質の酵素活性および蛋白質機能に影響を及ぼすことが証明されつつある.たとえば,IKK β やNF- κ BのSNO化は細胞生存シグナルの抑制を引き起こし,細胞死を惹起する.反対に,JNKやcaspase群のSNO化はアポトーシス経路の阻害を引き起こし,細胞死を抑制する.これらのことから,脳虚血あるいは老化やストレスによって惹起される過剰量のNO産生を伴う酸化あるいはニトロソ化(nitrosative)による蛋白質機能の変化は細胞死を伴う神経変性に関連することが推定されている.

一方,小胞体(endoplasmic reticulum; ER)ストレスとは,小胞体に成熟不完全な蛋白質が蓄積する状態のことを示す.ERはリボソームで合成された分泌蛋白質や膜蛋白質を取り込み,その折りたたみ(folding)や糖鎖修飾を行うことで蛋白質を成熟させる器官である.虚血時において観察される低酸素/低グルコース状態がERの機能を阻害する,あるいは,遺伝子変異による異常蛋白質が生成される際に成熟の不完全な蛋白質(unfolded protein)がERに蓄積する結果,ERストレス状態となる.これに対し,ER内の異常蛋白質の蓄積を防ぐ機構も存在し,(1)ERシャペロンによる変性蛋白質の修復,(2)蛋白質の翻訳抑制,(3)変性蛋白質をERから排出・分解除去するER関連分解(ER-associated degradation; ERAD)らが知られている.しかしながら,この状態が長く持続すると,細胞はアポトーシスを誘導して死に至る.

新規蛋白質のフォールディングや異常蛋白質のリフォールディングばかりでなく,ERADにおいても蛋白質の目印になるのが糖鎖である.小胞体に輸送された分泌蛋白質や

膜蛋白質の多くは,翻訳と共役しながらポリペプチドのアスパラギン残基にN結合型糖鎖付加を受ける.糖鎖は,GlcNAcの形まで細胞質で形成され,ER内腔に輸送された後にさらにマンノース,グルコースが付加され,Glc₃Msn₉GlcNAc₂の形でポリペプチドに結合する.新生蛋白質では,この糖鎖がN末端から50残基以内にある場合にはcalnexin(CNX)/calreticulin(CRT)によって,50残基以降にある場合にはBip/PDIによってフォールディングされると推定されている.CNXは,小胞体膜に局在する一回膜貫通型の蛋白質,CRTはER内腔に局在する可溶性蛋白質であり,主にモノグルコース型糖鎖を認識して蛋白質と結合し,フォールディングを行う.CNX/CRTは,前述の通りモノグルコース型糖鎖を認識するレクチン様ER分子シャペロンであり,両者は機能面・構造面において相同性が高い.CNXの可溶性ER内腔部分およびCRTのC末端側以外の三次元構造は,伸長アームを持つヘアピン構造をしたprolin-rich domain(P-domain), β -シートグロブリン構造のN-domainから構成されている.N-domainの表面にはグルコース結合部位が存在し,レクチン様作用を示す.この部分はP-domainと向き合う形をとっており,このポケットに糖蛋白質が入り込む形となってシャペロン活性を発揮すると考えられている.CRTのN-domainにも同様に3つのCys残基が存在し,CNXをモデルにした構造解析により,C88-C120がジスルフィド結合を形成することが推測されているが,CNXとは異なり,フリーのC146はグルコース結合部位の近傍に存在する.P-domainの先端部分は,PDIファミリーに属するERp57と結合しており,CNX/CRTが蛋白質の折りたたみを,ERp57がジスルフィド結合を形成することによって協調的にシャペロン機能を果たしてい

る。両者の大きな違いは、CNX が膜蛋白質であるのに対し、CRT が C 末端側に KDEL 配列 (ER retention signal 配列) を持つ管腔蛋白質であるという点である。よって、糖蛋白質のフォールディングに関して CNX が一時的なのに対し、CRT はより流動性をもって関与していると考えられている。また、CNX がモノグルコース型糖鎖部分のみを認識するのにに対し、CRT は蛋白質部分をも認識し、非糖鎖型の蛋白質のフォールディングにも関わっていると言われている。

2. 研究の目的

ニューロンにおける PDI の SNO 化による機能消失が、虚血時やヒト弧発性神経変性疾患患者脳において認められることをこれまでに明らかにしている。したがって、他の多くの ER シャペロン群が SNO 化により機能変化をおこす可能性が示唆される。そこで本研究では、シャペロン機能、Ca²⁺貯蔵能ともに重要性が高いと思われる CRT に主に着目し、SNO 化による機能変化ならびに細胞死への関連について研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞：HEK293 細胞、神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた。

(2) NO 結合性蛋白質の同定：DAN 法ならびにビオチンスイッチ法を駆使して検討した。

(3) 細胞死の評価：クロマチン蛍光色素による核の状態を蛍光顕微鏡下で観察し、アポトーシス細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) CRT の S-ニトロシル化

CRT が SNO 化されるか否かについて、*in vitro* および *in vivo* 系において検討した。また、内在性 CRT がどのような刺激およびストレスによって SNO 化されるのかを検討した。

①リコンビナント CRT のニトロシル化 (DAN

assay)

NO は水中で加水分解され、NO₂⁻と NO₃⁻になる。本実験で用いた DAN assay は、SNOC 処理した蛋白質から Hg²⁺処理により強制的に NO を遊離させ、水溶液中の NO₂⁻を測定することにより、蛋白質に結合した NO の量を簡易的に定量する方法である。NO₂⁻は DAN (2,3-diaminonaphthalene) と結合することにより蛍光色素 NAT (naphthalenetriazole) を形成する。したがって、蛍光強度を測定することによって NO₂⁻の濃度を間接的に測定できる。

大腸菌で発現・精製したリコンビナント CRT wt を生理的 NO ドナーである SNOC で 30 分間インキュベートし、DAN assay を行った。CRT wt の濃度に依存して蛍光強度 (NAT 形成) の増加が起こった。

②カルシウムイオノフォアによる内在性 CRT の SNO 化

マウス神経芽細胞腫 N2a をカルシウムイオノフォア (A23187) で刺激し、細胞内に Ca²⁺を流入させ、内在性 CaM / NOS を活性化させたところ、SNO-CRT の形成が認められた。また、A23187 による SNO-CRT の形成は、NOS inhibitor である L-NAME の前処理によって完全に消失した。

③小胞体ストレスによる CRT の SNO 化

Tunicamycin (Tm) は新生蛋白質の N 型糖鎖結合を阻害することで、また、thapsigargin (Tg) は小胞体カルシウムホメオスタシスを攪乱することで、小胞体ストレスを惹起する。そこで、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を Tm および Tg で刺激し、Biotin-Switch assay により SNO-CRT 形成の有無を検討した。Tg 刺激で SNO-CRT の形成が認められたものの、Tm 刺激では全く認められなかった。また、L-NAME の前処理によって Tg による SNO-CRT の形成は完全に消失した。

(2) 脳虚血による CRT の SNO 化

マウス MCA モデルによる虚血に対して、NMDA-R アンタゴニストや NOS inhibitor は梗塞巣や浮腫形成を抑制する。したがって、MCA モデルによる虚血には NOS の活性化に伴う NO の産生が寄与していると考えられる。そこで、MCA モデルを用いたマウス虚血脳から大脳皮質および線条体を分画し、細胞質画分を調整し Biotin-Switch assay により SNO-CRT の形成の有無を検討した。梗塞巣 (ipsilateral) 脳では、対側脳 (contralateral) 脳と比べて、約 20 倍の SNO-CRT の形成が認められた。

(3) CRT の SNO 化部位の特定

CRT には 3 つのシステイン残基 (C88, 120, 146) が存在するが、そのうち C88 と C120 は S-S 結合を形成しているため、CRT の C146 が SNO 化されることが予想された。そこで、C146 が SNO 化の標的になるか否かについて検討した。

①リコンビナント CRT の C146 変異によるニトロシル化への影響

CRT の C146 を Ser に置換したリコンビナント CRT C146S 変異体蛋白質を作製し、2-2 (1) と同様に DAN assay を行ったところ、CRT wt と比較して S-ニトロシル化が有意に抑制された。

②C146 変異による細胞内での SNO-CRT 形成への影響

C146 変異における A23187 刺激による SNO-CRT 形成への影響は、FLAG タグを付加した CRT wt, CRT C146S および CRT C88/120/146S を N2a 細胞に発現させ、Biotin-Switch assay の後に Western blotting で FLAG を検出することによって行った。CRT C146S 変異体では、Cys 残基の存在しない CRT C88/120/146S 変異体と同様に、SNO-CRT の形成は認められなかった。

(4) CRT のシャペロン活性に対する C146 の修飾が及ぼす影響

CRT の C146 への修飾が、CRT の持つ生理機能に及ぼす影響について検討した。CRT はモノグルコース型糖蛋白質に結合し、folding を促進する。このシャペロン活性が、C146 の修飾によりどのような影響を受けるのか、モノグルコース型糖鎖が多く存在する IgY を用いて検討した。化学変性に続く熱変性による IgY の凝集に対し、CRT wt は抑制効果を示したものの、CRT C146S では抑制効果は認められなかった。この実験系では IgY を化学変性させるために DTT を用いる。そのため、C146 の SNO 化によって、CRT のシャペロン活性が影響を受けるか否かを検討するために SNO-CRT を添加しても、ニトロシル化は還元してチオール基になってしまう。そこで、C146 の修飾について検討するため、SNO 化蛋白質の代謝産物であるといわれているスルホニル化 CRT (H_2O_2 処理) を用いて検討を行った。その結果、スルホニル化 CRT の添加による IgY の凝集抑制効果は認められなかった。

(5) 小胞体ストレスによる細胞死に対する CRT の抑制効果と C146 修飾の影響

小胞体シャペロンである CRT は、小胞体ストレスによる細胞死に対して抑制効果を示す可能性がある。また、C146 への修飾はこの効果に影響を与えることが考えられる。このことを検討するために、SH-SY5Y 細胞に CRT wt および CRT C146S を過剰発現させ、小胞体ストレスによる細胞死への影響を検討した。

Hoechst 33258 染色により、アポトーシス細胞を定量したところ、Tg による細胞死に対して、CRT wt は有意に抑制効果を示したが、Tm による細胞死に対して抑制効果は認められなかった。また、CRT C146S にも抑制効果が

認められなかった。

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)

① Katayama T, Ito M, Kaneko S, Satoh M, Uehara T, & Minami M. Reciprocal regulation of ATPgammaS-induced monocyte chemoattractant protein-1 production by ERK and p38 MAP kinases in rat corticostriatal slice cultures. J Neurosci Res. 87, 1573-1581. 2009 査読有

② Katayama T, Tanaka H, Yoshida T, Uehara T, & Minami M. Neuronal injury induces cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production in astrocytes. J Pharmacol Sci. 109, 88-93. 2009 査読有

③ Nakagawa T, Tsuruma K, Uehara T, & Nomura Y. GMEB1, a novel endogenous caspase inhibitor, prevents hypoxia- and oxidative stress-induced neuronal apoptosis. Neurosci Lett. 438, 34-37. 2008 査読有

[学会発表] (計4件)

① 上原 孝: 生理的条件下におけるS-ニトロシル化蛋白質の網羅的同定と機能解析
第81回日本生化学会大会/第31回日本分子生物学会年会合同大会 2008.12.10. 神戸ポートアイランド

② 上原 孝: 一酸化窒素による小胞体機能消失 第51回日本神経化学会(富山)大会 2008.9.13. 富山国際会議場

③ 上原 孝: 神経変性疾患発症に関わる一酸化窒素による小胞体ストレス発生機構 第31回日本神経科学学会大会 2008.7.9 東京国際フォーラム

④ 上原 孝: ニトロソ化ストレスによる蛋白質品質管理系への影響-孤発性神経変性疾患との関係- 第81回日本薬理学会年会 2008.3.17 パシフィコ横浜

[図書] (計2件)

① 上原 孝: 金芳堂 脳21, 6ページ 2008

② 上原 孝: 総合医学社, 救急・集中治療 5

ページ 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 孝 (UEHARA TAKASHI)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号: 00261321

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし