

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月18日現在

機関番号：15301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20117011

研究課題名（和文）

孤発性神経変性疾患発症に関わるニトロソ化シグナルの分子作用メカニズム

研究課題名（英文）Molecular mechanism of nitric oxide/nitrosative stress implicating in onset of neurodegenerative disorders

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：00261321

研究成果の概要（和文）：代表者は一酸化窒素（NO）の新規標的蛋白質を単離／同定する目的で、抗体アレイを用いたスクリーニングシステムを開発した。およそ 2000 種の抗体を使用して探索したところ、今回 50 種の候補が得られた。この中、これまでに発表されていなかった脱リン酸化酵素 PTEN についてさらに解析し、PTEN が介在するシグナル伝達において新たな NO による調節機構を発見した。また、誘導型 NO 合成酵素の寿命を直接制御する蛋白質として SPSB2 を同定した。

研究成果の概要（英文）：We performed antibody-array screening in conjunction with biotin-switch assays to identify the novel S-nitrosylated proteins. Using this assay system, we found that phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN) is selectively S-nitrosylated by low concentrations of NO at a specific cysteine residue. In addition, we demonstrated the mechanism of SPSB-mediated iNOS degradation and the relative contributions of different SPSB proteins to iNOS regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2009年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2010年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2011年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2012年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
総計	55,100,000	16,530,000	71,630,000

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：一酸化窒素，酸化ストレス，神経細胞，アポトーシス，神経変性疾患，シグナル伝達，

1. 研究開始当初の背景

私たちはこれまでに一酸化窒素（NO）誘発

性神経細胞死惹起機構について解析してきた。NO は多岐にわたる生理的・病態生理的機

能を担っているが、それぞれにおいてどのように作用するのかは今現在も不明な点が多く残されている。とくに細胞死においては、ミトコンドリアに作用して呼吸鎖を抑制することでアポトーシスを誘導することが知られているが、一方で、ミトコンドリアを介さない経路の存在も示唆されてきた。また、アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患発症に NO が関与している報告がなされつつあった。興味深いことに、NO は蛋白質システイン残基チオール部を酸化修飾 (S-ニトロシル化) することが見いだされ、これまでに同定されてきた発症原因遺伝子産物を S-ニトロシル化することで活性を調節し、これが神経細胞死を惹起することが提唱されてきた。これまでに、新規内在性ストレス抵抗性蛋白質としてタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) を同定してきた。PDI は新生蛋白質成熟機構に必須な小胞体シャペロンであり、活性中心にシステインを有しているが、NO によって S-ニトロシル化され、酵素活性を抑制することを見出した。さらに、ヒト病態サンプル (死後脳) においても PDI の S-ニトロシル化が検出された。したがって、NO を介する PDI の活性低下が小胞体内に未成熟蛋白質を蓄積させ、小胞体ストレスを介してアポトーシスを惹起することがわかった。

この成果においても使用したが、生体内 NO 結合性蛋白質を簡便に検出することが可能なビオチンスイッチ法の開発以来、これまでに多くの基質が単離同定され、詳細な生理/病態生理機構が提示されつつある。しかしながら、NO の作用メカニズムは依然として不明な点が多く残されている。本方法は最終的には候補蛋白質の抗体を使用したウェスタン解析によって検出することになるために一度に複数の基質を同定出来ないことから、

TOF-MASS を用いた解析が進められてきているが、すべての候補蛋白質をカバー出来ないことが問題であった。

2. 研究の目的

そこで、私たちは本方法と抗体アレイを使用した新規スクリーニングシステムを考案し、網羅的な NO 基質蛋白質の同定を試みることを目的とした。さらに、当該蛋白質の NO に対する感受性を調べ、より生理的な濃度において、どのような調節を受けているのかを明らかにする。このように NO によって活性調節される蛋白質あるいは情報伝達系が生理応答や病態形成にどのように関係しているのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 新規 NO 結合性蛋白質の網羅的スクリーニング法：種々の細胞をカルシウムイオノフォアで刺激し、細胞内で NO 合成酵素由来の NO を産生させた。この全細胞抽出液に対してビオチンスイッチを行い、S-ニトロシル化蛋白質をビオチンラベルした。このサンプルを抗体アレイに供し、その後、蛍光標識したストレプトアビジンでインキュベートし、スキャンニングした。

(2) S-ニトロシル化蛋白質の検出：細胞内 S-ニトロシル化蛋白質はビオチンスイッチ法を用いて、-SNO 基を-SS-ビオチン化し、ストレプトアビジン-アガロースで pull down させ、特異的抗体を使用してウェスタン解析から検出した。大腸菌で発現させたリコンビナント蛋白質に対しては、各濃度の NO ドナーで処理した後に、DAN 法で解析した。

(3) 局所脳梗塞モデルマウスの作出：麻酔下、中大脳動脈を 2 時間閉塞し、その後再開通させた。

(4) リン酸化蛋白質の検出：Akt, eNOS などの

リン酸化は特異的リン酸化抗体を使用して、ウェスタン解析から求めた。

4. 研究成果

(1) ヒト腎細胞、血管内皮細胞、神経細胞内で NO を発生させたサンプルに対して、総計約 2000 種蛋白質に対する抗体がスポットされたアレイを用いて、NO 基質を探索したところ、50 種の候補の単離に成功した。これらには、既知の S-ニトロシル化蛋白質が含まれており、本スクリーニング系が正しく働いていることを示唆した。

(2) 候補蛋白質の中、脱リン酸化酵素の一つであり、癌抑制遺伝子産物でもある PTEN が含まれていた。詳細な解析を行ったところ、①PTEN は数 μM の NO によって S-ニトロシル化される、NO 高感受性蛋白質であることがわかった

②PTEN は S-ニトロシル化によって酵素活性が抑制された

③種々の変異体を用いた解析から、活性中心のシステイン残基 (C124) でなく、83 番目のシステインが標的であることを発見した。

④したがって、PTEN は C83 の S-ニトロシル化によってアロステリックな調節を受けていることが明らかとなった。

(3) PTEN は細胞増殖に関わる Akt 経路を負に調節する酵素であることから、つぎに S-ニトロシル化の Akt 活性化に対する影響を検討した。

①低濃度 NO は時間依存的な Akt のリン酸化を惹起したが、興味深いことに高濃度 NO はまったく Akt のリン酸化を誘導しなかった。この Akt のリン酸化は PI3-キナーゼ阻害薬のワートマニンで阻害されることを確認した。

②Akt の下流に存在し、基質でもある eNOS のリン酸化も低濃度 NO で亢進し、高濃度 NO で抑制された。

③このとき、Akt の S-ニトロシル化を検討したところ、PTEN と比べて 100 μM 以上を要求することがわかり、NO 感受性が大きく異なることを見いだした。

(4) このような NO の効果が細胞生理にどのような影響を及ぼすのかをヒト内皮細胞を用いて検討した。

①低濃度 NO は PTEN 不活性化に起因する Akt の活性化とそれに続く eNOS のリン酸化・活性化を誘導した。

②この活性化は Akt 阻害薬で完全に抑制されることを確認した。

③したがって、内皮細胞において低濃度 NO は PTEN 特異的に作用することで活性を抑制する結果、Akt のリン酸化を誘導し、eNOS を活性化することで生理的な NO 産生を亢進するポジティブフィードバック機構に関与することがわかった。

(5) さらに、脳梗塞時における NO の役割について解析した。

①脳梗塞中心部では NO の濃度は高く、周辺部では比較的低いことが予想された。したがって、蛋白質 S-ニトロシル化も同様であることを検討したところ、中心部は周辺部に比べて約 3 倍亢進していることがわかった。

②このとき、PTEN と Akt のニトロシル化を見たところ、中心部では両者ともに、周辺部では PTEN のみで観察された。

③このとき、リン酸化 Akt は中心部ではまったく観察されず、周辺部でのみ検出された。逆に、アポトーシスした神経細胞は中心部で有意に増加していた。

④このことから、脳梗塞周辺部では NO 濃度が比較的低いために、PTEN の S-ニトロシル化に起因する Akt 活性化・生存シグナルが亢進しているために、細胞保護効果が起こっている結果、遅延性の細胞死が観察されることが推定された。

(6)以上より, NO は PTEN の S-ニトロシル化を介して Akt シグナリングを調節するスイッチ分子として機能していることが示唆された.

(7) iNOS は炎症時に誘導されるが, 本酵素の生体内寿命に関しては不明な点が多い. そこで, 酵母 2-ハイブリッド法を用いて結合性調節蛋白質の単離を目指した. その結果, SPSB2 が同定された.

①SPSB2 は分子内に SPRY domain を有し, これが iNOS との結合に必須であった. また, SOCS box を介して, ECS 型ユビキチンリガーゼと複合体形成することがわかった.

②この複合体形成によって iNOS はポリユビキチン化を受け, プロテアソーム依存的な分解を受けることが明らかとなった.

③したがって, SPSB は iNOS 蛋白質寿命を制御する分子であ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 5 件)

- ① Watanabe, Y., Kaida, Y., Fukuhara, S., Takechi, K., Uehara, T., and Kamei, C. Participation of metabotropic glutamate receptors in pentetrazol-induced kindled seizure. *Epilepsia* 52, 140-150. (2011) 10.1111/j.1528-1167.2010.02764.x.
- ② Numajiri, N., Takasawa, K., Nishiya, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., Asada, M., Matsuda, H., Azumi, K., Kamata, H., Nakamura, T., Hara, H., Minami, M., Lipton, S.A. and Uehara, T. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of PTEN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 10349-10354 (2011) doi: 10.1073/pnas.1103503108.

- ③ Uehara, T. and Nishiya, T. Screening systems for identification of S-nitrosylated proteins. *Nitric Oxide* 25, 108-111 (2011) doi: 10.1016/j.niox.2010.11.002.
- ④ Matsumoto, K., Nishiya, T., Maekawa, S., Horinouchi, T., Ogasawara, K., Uehara, T., and Miwa, S. The ECS (SPSB) E3 ubiquitin ligase is the master regulator of the lifetime of inducible nitric-oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 46-51 (2011) doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.103.
- ⑤ Nishiya, T., Matsumoto, K., Maekawa, S., Horinouchi, T., Fujimuro, M., Ogasawara, K., Uehara, T., and Miwa, S. SPRY domain-containing SOCS box protein-1 (SPSB1), SPSB2, and SPSB4 are master regulators of proteasome-dependent degradation of iNOS. *J. Biol. Chem.* 286, 9009-9019 (2011) doi: 10.1074/jbc.M110.190678.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 上原 孝: 「ガス状分子の神経細胞死に対する作用機構」第 3 9 回日本毒性学会学術年会 仙台国際センター (2012. 07. 19) 招待講演
- ② 上原 孝: 「NOによる蛋白質修飾と神経細胞死制御」第 5 3 回日本生化学会 中国・四国支部例会 岡山大学 (2012. 05. 18) 招待講演
- ③ 上原 孝: 「A novel modulatory ‘on-off’ system for PI 3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation」第11回日本NO学会学術集会, 昭和薬科大学 (2011. 5. 14) 招待講演
- ④ 上原 孝: 「抗体アレイを使用した新規S-ニトロシル化蛋白質の探索」第 3 3 回日本分子生物学会年会・第 8 3 回日本生化学会

大会 合同大会 神戸国際会議場
(2010.12.9)

- ⑤ Takashi Uehara: 「Detection of oxidized protein-disulfide isomerase with a specific antibody」 40th Annual Meeting Neuroscience 2010 San Diego Convention Centre (2010.11.15)
- ⑥ 上原 孝: 「ニトロソ化ストレスを切り口とした神経変性疾患の早期診断／治療薬開発へのアプローチ」 生体機能と創薬シンポジウム 2010京都 グランヴィア京都 (2010.9.9) 招待講演
- ⑦ Tadashi Nishiya, Satoshi Maekawa, Masahiro Fujimuro, Kouetsu Ogasawara, Takashi Uehara, and Soichi Miwa: 「The life time of iNOS is regulated by the SPRY domain-containing SOCS box protein family linking iNOS to the elongin BC-Cul5-Rbx2 E3 ubiquitin ligase complex」 The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric oxide, 京都国際会議場 (2010.6.17)
- ⑧ Takashi Uehara: 「Detection of oxidized ER protein by nitrosative/oxidative stress with a specific antibody」 The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric oxide, 京都 (2010.6.16)

[図書] (計6件)

- ① 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), p6 (2013)
- ② 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, p6(2013) 金芳堂
- ③ 上原 孝: タンパク質ニトロシル化による細胞生死調節, 実験医学30(17), p7 (2012)

羊土社

- ④ 鎌田英明, 上原 孝: 発癌／神経細胞の生死に関わる細胞内ROSシグナル制御, 細胞工学31(2), p6 (2012)秀潤社
- ⑤ 上原 孝: NOはPI3-キナーゼ-Aktシグナルのスイッチ分子として機能している, 実験医学29(18), p4 (2011)羊土社
- ⑥ 上原 孝: NO・ニトロソ化シグナルと細胞死, 実験医学27(15), p5 (2009)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:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
報道関連情報

- ① 平成23年6月7日掲載, 山陽新聞(27面)
「NO濃度細胞生死の鍵／脳梗塞新薬に期待」
- ② 平成23年6月7日放送, RSK山陽放送 RSKニュース「脳梗塞に新たな治療の可能性」
- ③ 平成23年6月7日放送, KSB瀬戸内海放送 KSBニュース「脳こうそくの治療に期待 世界初の発見」
- ④ 平成23年6月7日WEB掲載, 東京新聞「細胞生死の鍵はNO, 治療応用も」

- ⑤ 平成 23 年 6 月 7 日 WEB 掲載, 福井新聞「細胞生死の鍵は NO, 治療応用も」
- ⑥ 平成 23 年 6 月 16 日掲載, 朝日新聞 (29 面)「一酸化窒素濃度 脳細胞生死の鍵」
- ⑦ 平成 23 年 6 月 17 日掲載, 科学新聞 (4 面)「細胞生死の鍵握る一酸化窒素 2 面性の作用機構解明 ガンなどの新たな治療薬も」
- ⑧ 平成 23 年 6 月 19 日掲載, 読売新聞 (31 面)「細胞の保護・破壊 濃度次第 一酸化窒素の作用解明」

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 : 00261321

(2) 研究分担者

西屋 禎 (TADASHI NISHIYA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 80399831

(3) 連携研究者

なし