

平成 30 年 8 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04649

研究課題名(和文)一酸化窒素によるエピジェネティクス調節機構と薬物制御

研究課題名(英文) Regulation of epigenetic enzymes via nitrosative stress and development of its specific modulator

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) 12,900,000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。その中でも、DNAメチル化酵素に関して解析を進めたところ、NOによって活性中心の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DNAアレイ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。

研究成果の概要(英文)：We could demonstrate that nitric oxide (NO) regulates epigenetic enzymes. A cysteine residue was a target of NO and its covalent modification contributed to the inhibition of enzymatic activity in cells. From these findings, we speculated that NO may be involved in the up-regulation of several genes via this mechanism. Next, we conducted DNA micro array for isolating genes that is sensitive to NO. We could isolate several genes regulated by NO. Thus, we could propose a novel system of gene expression via nitrosative stress in this study.

研究分野：薬理学

キーワード：一酸化窒素 S-ニトロシル化 炎症反応 遺伝子発現 エピゲノム 病態形成

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蛋白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結合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、胃癌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、癌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。また、修飾部位を特異的に認識する抗体の作出を試みることで、ウェスタン解析ばかりでなく ELISA への応用を進める。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両酵素共に 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。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プ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。各実験では、脱メチル化薬である 5-Azacytidine, EZH2 阻害薬である 3-Deazaneplanocin A (DZNep) や GSK126 の作用と NO の効果を比較し、その効力について明らかにする。また、新規抗癌薬として注目されている EZH2 阻害薬 (McCabe *et al.*, *Nature* 492: 108-112, 2012) はメチル基供与体である S-アデノシルメチオニン (SAM) との結合を阻害することが知られている。このような阻害薬は S-ニトロシル化にどのような影響を及ぼすのか、酵素活性とともに調べる。

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、DNAメチル化酵素に関して解析を進めたところ、NOによって活性中心の 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DNAアレイ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，一つの化合物を同定することに成功した（特許出願中）。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。加えて，細胞レベルでは100 nMでも十分に作用することを証明した。

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，本化合物はNOによる脱メチル化を効果的に抑制し，遺伝子発現を減弱させることがわかった。また，細胞毒性もほとんど無いことを明らかにした。次に，がん細胞のNOによる形質転換への影響について解析したところ，本化合物は，NOによる細胞増殖・スフェロイド形成を完全に阻止し，炎症性がんモデル動物における腫瘍形成を抑制することがわかった。その有用性について，現在も解析を進めている。

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6件)

1. Imamura M., Ogawa, D., Takatori, T.,

Yamaguchi, M., Takata, T., Hada, T., and Uehara, T. A retrospective study of the effects of oncology pharmacist participation in treatment on therapeutic outcomes and medical costs.. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1434-1437 (2017). 査読有

2. Abiko, Y., Shinkai, Y., Unoki, T., Hirose, R., Uehara, T., and Kumagai, Y. Polysulfide Na₂S₄ regulates the activation of PTEN/Akt/CREB signaling and cytotoxicity mediated by 1,4-naphthoquinone through formation of sulfur adducts. *Sci. Rep.* 7, 4814 (2017). 査読有

3. Hiraoka, H., Nakahara, K., Kaneko, Y., Akiyama, S., Okuda, K., Iwawaki, T., Fujimura, M., Kumagai, Y., Takasugi, N., and Uehara, T. Modulation of unfolded protein response by methylmercury. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 1595-1598 (2017). 査読有

4. Unoki, T., Abiko, Y., Toyama, T., Uehara, T., Tsuboi, K., Nishida, M., Kaji, T., and Kumagai, Y. Methylmercury, an environmental electrophile capable of activation and disruption of the Akt/CREB/Bcl-2 signal transduction pathway in SH-SY5Y cells. *Sci Rep.* 6, 28944 (2016). 査読有

5. Nakato, R., Ohkubo, Y., Konishi, A., Shibata, M., Kaneko, Y., Iwawaki, T., Nakamura, T., Lipton, S.A. and Uehara, T. Regulation of the unfolded protein response via S-nitrosylation of sensors of endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* 5, 14812 (2015). 査読有

6. Okuda, K., Ito, A., and Uehara, T. Regulation of histone deacetylase 6 activity via S-nitrosylation. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1434-1437 (2015). 査読有

〔学会発表〕(計24件)

上原 孝：「一酸化窒素によるDNAメチル化システム制御を調節する化合物の薬理学的研究」日本薬学会 第138年会 ANA クラウンホテルプラザ金沢(石川県・金沢市)

(2018.3.25-28)

奥田 将, 山地賢一, 島田裕伎, 高杉展正, 上原 孝: 「酸化ストレス依存性細胞死に対するポリサルファドナーの影響」 第132回日本薬理学会近畿部会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)(2017.11.24)

奥田洸作, 高杉展正, 上原 孝: 「エピゲノム制御酵素のS-ニトロシル化を介した活性調節」 第132回日本薬理学会近畿部会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)(2017.11.24)

平岡秀樹, 中原健吾, 藤村成剛, 熊谷嘉人, 高杉展正, 上原 孝: 「メチル水銀による小胞体ストレスを介した細胞死惹起機構」 第132回日本薬理学会近畿部会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)(2017.11.24)

中原健吾, 平岡秀樹, 浜田恭平, 高杉展正, 熊谷嘉人, 上原 孝: 「1,2-ナフトキンによるEGFシグナリング活性化機構」 第132回日本薬理学会近畿部会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)(2017.11.24)

奥田洸作, 足立和哉, 高杉展正, 上原 孝: 「一酸化窒素を介したエピゲノム制御酵素の活性抑制」 第53回日本薬学会 中国四国支部学術大会 徳島大学(徳島県・徳島市)(2017.10/21-22)

足立和哉, 奥田洸作, 高杉展正, 上原 孝: 「一酸化窒素によるエピゲノム制御酵素のS-ニトロシル化修飾」 第53回日本薬学会・中国四国支部学術大会 徳島大学(徳島県・徳島市)(2017.10.21-22)

細川美紅, 坂口加奈, 上原 孝: 「骨芽細胞分化におけるNOの役割」 第53回日本薬学会 中国四国支部学術大会 徳島大学(徳島県・徳島市)(2017.10.21-22)

上原 孝: 「一酸化窒素によるエピゲノム変化を制御する化合物の単離と薬理作用」 生体機能と創薬シンポジウム 京都大学(京都府・京都市)(2017.8.24-25)

上原 孝: 「小胞体ストレス誘発性神経細胞死におけるレドックス調節の関与」 第44回日本毒性学会学術年会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)(2017.7.10-12)

Kosaku Okuda, Akihiro Ito, Takashi Uehara: 「Regulation of Histone Deacetylase 6(HDAC6) Activity via S-nitrosylation」

SfRBM/SFRR1 2016-23rd Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine San Francisco, CA (アメリカ合衆国)(2016.11.16-19)

Hideki Hiraoka, Kyouhei Hamada, Kengo Nakahara, Yoshito Kumagai, Takashi Uehara: 「Molecular Mechanism of PI 3-Kinase-Akt Signaling Stimulated by 1,2-naphthoquinone(NQ)」 SfRBM/SFRR1 2016-23rd Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine San Francisco, CA (アメリカ合衆国)(2016.11.16-19)

上原 孝: 「小胞体タンパク質成熟機能におけるレドックスシグナルの役割」 第89回日本生化学会大会 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)(2016.9.25-27)

山地賢一, 奥田 将, 高杉展正, 上原 孝: 「新生タンパク質成熟機能におけるポリサルファールの役割」 第131回日本薬理学会近畿部会 ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)(2017.6.30)

中原健吾, 平岡秀樹, 浜田恭平, 高杉展正, 上原 孝: 「1,2-ナフトキンによる参加修飾を介したEGFシグナリングへの影響」 第131回日本薬理学会近畿部会 ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)(2017.6.30)

上原 孝: 「非古典的な小胞体ストレス応答が制御する生命現象」 第68回日本細胞生物学会・第11回ケミカルバイオロジー学会 合同大会 京都テルサ(京都府・京都市)(2016.6.15-17)

Yuki Kaneko, Ryosuke Nakato, Yu Ohkubo, Akari Konishi, Mari Shibata, Nobumasa Takasugi, Takashi Uehara: 「Suppression of unfolded protein response via S-nitrosylation of ER stress sensors」 第16回日本NO学会学術集会・第9回国際NO学会 仙台国際センター(宮城県・仙台市)(2016.5.20-22)

Kosaku Okuda, Akihiro Ito, Takashi Uehara: 「Regulation of histone deacetylase 6(HDAC6) activity via S-nitrosylation」 第16回日本NO学会学術集会・第9回国際NO学会 仙台国際センター(宮城県・仙台市)(2016.5.20-22)

Takashi Uehara: 「Control of cell

survival and death in brains through protein S-nitrosylation」第16回日本NO学会学術集会・第9回国際NO学会 仙台国際センター(宮城県・仙台市)(2016.5.20-22)

奥田洸作, 高杉展正, 上原 孝:「一酸化窒素によるエピゲノム制御酵素の活性調節機構」第89回日本薬理学会年会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)(2016.3.9-11)

⑲上原 孝:「一酸化窒素による小胞体恒常性破綻の分子メカニズム」第89回日本薬理学会年会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)(2016.3.9-11)

⑳奥田洸作, 高杉展正, 上原 孝:「エピゲノム制御酵素のS-ニトロシル化を介した活性調節機構」第128回日本薬理学会近畿部会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)(2015.11.20)

㉑奥田洸作, 上原 孝:「一酸化窒素によるエピゲノム制御酵素の活性調節機構」第15回NO学会学術集会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)(2015.6.26-27)

㉒上原 孝:「NOによる小胞体ストレスを介した神経細胞死惹起機構」第15回NO学会学術集会 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)(2015.6.26-27)

〔図書〕(計4件)

1. 奥田洸作, 高杉展正, 上原 孝: ガストランスマッターと神経機能のredox制御・神経細胞死, 脳神経化学 脳はいま化学の言葉でどこまで語れるか, 194-203 (2018) 化学同人

2. 高杉展正, 上原 孝: 軽い重い? 神経変性疾患の発症における一酸化窒素の働きについて, 実験医学 36(5), 149-154 (2018) 羊土社

3. 上原 孝: 親電子性環境因子による小胞体機能への影響, 最新医学 72(5), 727-732 (2017) 最新医学社

4. 大久保 優, 中戸亮介, 上原 孝: タンパク質酸化修飾による小胞体ストレス応答制御, 薬学雑誌 136(6), 801-804 (2016) 日本薬学会

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

1. 名称: DNMTのS-ニトロシル化阻害剤,

がん治療薬及びそのスクリーニング方法
発明者: 上原 孝, 伊藤昭博, Kam Y.J. Zhang, Ashutosh Kumar, 岡田 太

権利者: 同上

種類: 特許

番号: OP01239

出願年月日: 平成29年3月22日

国内外の別: 国内

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〕

ホームページ等

http://owl.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

伊藤 昭博 (AKIHIRO ITO)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号: 40391859

(3) 連携研究者

永坂 岳司 (30452569)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 30452569

(4) 研究協力者

()