

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01808

研究課題名(和文)ネオエキヌリンAの標的分子の同定と作用機構解明

研究課題名(英文)Target identification and mechanism of action of neoechinulin A

研究代表者

紙透 伸治 (KAMISUKI, Shinji)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：30553846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ネオエキヌリンAは、活性窒素であるパーオキシナイトライト(ONOO-)による神経細胞死を抑制する。活性窒素による神経細胞傷害は、パーキンソン病などの神経変性疾患との関連性が知られている。そこで本研究では、ファージディスプレイ法によりネオエキヌリンA結合タンパク質を探索した。その結果、chromogranin Bとglutaredoxin 3二つの結合タンパク質を見出した。細胞のchromogranin Bをノックダウンしたところ、ONOO-に対する感受性が下がった。ネオエキヌリンAはchromogranin Bに結合することで機能を阻害し、ONOO-による細胞死を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neoechinulin A is an indole alkaloid that protects neuronal PC12 cells from cytotoxicity induced by the peroxy nitrite generator SIN-1, but the target proteins and precise mechanism of action of neoechinulin A were unclear. In this study, we employed a phage display screen to identify proteins that bind directly with neoechinulin A. Our findings identified two proteins, chromogranin B and glutaredoxin 3, as candidate target binding partners for the compound. QCM analyses revealed that neoechinulin A displays high affinity for both chromogranin B and glutaredoxin 3. RNA interference-mediated depletion of chromogranin B decreased the sensitivity of PC12 cells against SIN-1. Our results suggested chromogranin B is a plausible target of neoechinulin A.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：天然物 生理活性物質 神経保護効果 活性窒素 神経細胞死 ファージディスプレイ 標的タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ネオエキヌリン A (図 1) は真菌から単離されたインドールアルカロイドであり、抗酸化活性、抗炎症活性など様々な生理活性を示すことが報告されている。本研究では、ネオエキヌリン A がもつ神経保護作用に着目した。ネオエキヌリン A は神経細胞の 3-morpholinolinosydnonimine (SIN-1) による細胞死を抑制する。SIN-1 は活性窒素であるパーオキシナイトライト (ONOO-) を発生させ、細胞死を誘導する。活性窒素による神経細胞傷害は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患との関連性が知られている。興味深いことに、ラット副腎褐色細胞腫 PC12 を用いた実験では、ネオエキヌリン A の保護効果は分化前の PC12 細胞では見られず、神経成長因子によって神経細胞へと分化した PC12 細胞のみで見られる¹⁾。また、マウスを用いた実験では、ネオエキヌリン A は抗うつ作用をもち、学習記憶障害を改善することが明らかにされている。

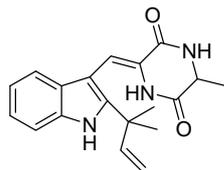


図 1 ネオエキヌリン A の構造

2. 研究の目的

我々はこれまでに、ファージディスプレイ法を基盤とする手法により、様々な生理活性物質の結合タンパク質を同定している。そこで本研究では、ファージディスプレイ法を用いてネオエキヌリン A の標的タンパク質を同定することを目的に研究を行った。さらに神経保護作用のメカニズム解明を目的とし、得られたタンパク質と神経保護作用の関連性を調べた。

3. 研究の方法

神経細胞へ分化した PC12 細胞より作成し

た cDNA をファージベクターに組み込み、ファージの外殻タンパク質にペプチドとして提示させたファージライブラリーを作成した。このファージライブラリーを、ビオチン化ネオエキヌリン A (図 2)²⁾ を固定化したウェルに加えた。洗浄後、ネオエキヌリン A に結合するペプチドを提示しているファージを溶出し、得られたファージの DNA 配列を解析することで結合ペプチド (タンパク質) を同定した。

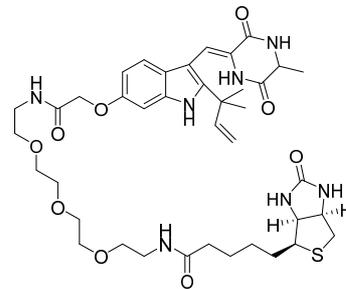


図 2 ビオチン化ネオエキヌリン A の構造

4. 研究成果

ファージディスプレイ法によってネオエキヌリン A 結合ファージをスクリーニングし、結合ファージを SDS を含む緩衝液によって溶出した。その結果、表 1 のファージクローン No.1 と 2 を得た。また、結合ファージの溶出液を過剰なネオエキヌリン A を含む緩衝液に変え、競合的に溶出した結果、ファージクローン No.3 と 4 を得た。ファージクローンが提示するペプチド配列を解析した結果、クローン No.1 は glutaredoxin-3、クローン No.2, 3, 4 は chromogranin B (secretogranin-1) と相同性を持つことが明らかになった (表 1)。glutaredoxin (Grx) ファミリーは細胞内で還元型グルタチオン (GSH) から酸化型グルタチオン (GSSG) を生成する反応などを触媒する酸化還元酵素であり、Grx ファミリーは酸化ストレスとの関連性が示唆されている。chromogranin B は神経内分泌顆粒のタンパク質であり、生物

活性ペプチドの前駆体と考えられている。

表 1 スクリーニングにより得られたファージクローンが提示するペプチド配列

No.	Amino acid sequence	Protein name (region)	Identity (%)
1	NSQKVDRLDGAHAPELTK KVQRHVSSGFPSTNEHV KEDLNLRLLKLTAAAP	Glutaredoxin 3 (95-147 a.a.)	100
2	NSSEKHNAFNSKRSEASAK KKEESVARAEAHFVELEKT HSRESLRPHSSN	Chromogranin B (190-230 a.a.)	97
3	NSSEKHNAFNSKRSEASAK KKEESVARAEAHFVELEKT HSREQSSQESGEEKACGRT RVTS	Chromogranin B (190-239 a.a.)	98
4	NSSEEVSPDRQKKGKTTT QRQGAGARSLSCS	Chromogranin B (490-515 a.a.)	61

スクリーニングにより得られた glutaredoxin-3 と chromogranin B の断片を提示するファージクローン No.1 と No. 2 を用いて、ネオエキヌリン A と結合するかどうかを解析した。クローン No.1 と No. 2 をビオチン化ネオエキヌリン A を固定したウェルあるいは未固定のウェルに加え、回収率を算出し、これらの回収率の比を L/N とした (図 3)。その結果、ファージクローン No.1 と No. 2 はビオチン化ネオエキヌリン A と結合することが確認された。

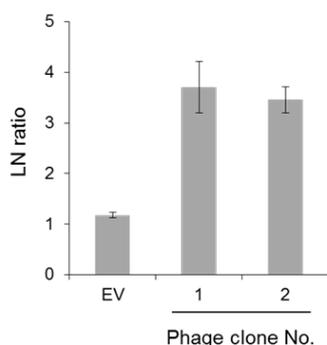


図 3 シングルクローンファージを用いた結合実験

次に水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法を用いて、glutaredoxin-3 と chromogranin B タンパク質とネオエキヌリン A の相互作用を解析した。ビオチン化ネオエキヌリン A をセンサーチップに固定し、glutaredoxin-3 タンパク質を添加したところ振動数の減少が見られた。このことからネオエキヌリン A は glutaredoxin-3 と結合することが示唆された。Chromogranin B も QCM 法により相互作用解析を行ったところ、このタンパク質もネオエキヌリン A と結合することが示唆された (図 4)。ネオエキヌリン A の glutaredoxin-3 と chromogranin B に対する解離定数はそれぞれ 11 nM、18 nM と見積もられ、二つのタンパク質と高い親和性をもつことが明らかになった。さらにプルダウン法によりネオエキヌリン A とタンパク質の相互作用を解析した。ビオチン化ネオエキヌリン A をストレプトアビジンビーズに固定化し、chromogranin B との結合を解析した。その結果、ネオエキヌリン A と chromogranin B の結合が確認された。

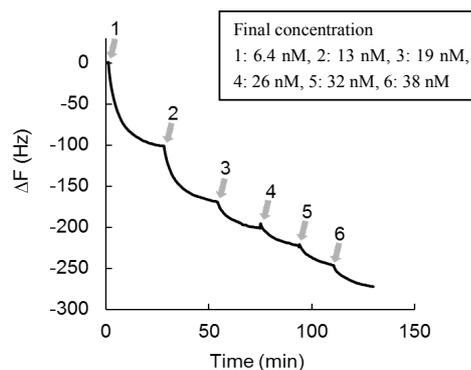


図 4 QCM によるネオエキヌリン A と Chromogranin B の相互作用解析

次に siRNA を用いて、PC12 細胞の chromogranin B と glutaredoxin-3 をノックダウンし、ONOO⁻に対する感受性を調べた。PC12 細胞を siRNA で処理し、神経成長因子によって神経細胞へと分化させた。分化後、ONOO⁻

を発生させる SIN-1 を処理することで細胞死を誘導し、感受性の変化を調べた。その結果、chromogranin B のノックダウンにより SIN-1 に対する感受性が下がり、glutaredoxin-3 のノックダウンでは SIN-1 に対して感受性が上がることが示唆された。さらに SIN-1 に対するネオエキヌリン A の保護効果の変化を調べた。chromogranin B と glutaredoxin-3 のノックダウンは、ネオエキヌリン A の保護作用に顕著な影響を与えなかった。以上の結果から、ネオエキヌリン A は chromogranin B に結合し、その機能を阻害することで ONOO⁻に対する感受性を下げていることが示唆された。

Chromogranin B と同じタンパク質ファミリーである chromogranin A はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患との関連性が示唆されている³⁾。Chromogranin A は誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現を誘導し、一酸化窒素 NO を産生させることでミクログリアを活性化する。ミクログリアの活性化は様々な神経変性に関わることが知られている。一方、ネオエキヌリン A はアミロイドによって誘導される iNOS を介したミクログリアの活性化を抑制することが報告されている⁴⁾。Chromogranin B も chromogranin A と同様に NO 産生やミクログリアの活性化に関わっている可能性も考えられ、ネオエキヌリン A によってこの機能が抑制されているのかもしれない。本研究により、chromogranin B が神経変性疾患の治療薬の標的となりうる可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) Maruyama, K., Ohuchi, T., Yoshida, K., Shibata, Y., Sugawara, F., Arai, T. *J. Biochem.*, **136**, 81-87 (2004)
- 2) Kuramochi, K., Aoki, T., Nakazaki, A., Kamisuki, S., Takeno, M., Ohnishi, K., Kimoto, K., Watanabe, N., Kamakura, T., Arai, T., Sugawara, F., Kobayashi, S. *Synthesis*, **23**, 3810-3818 (2008)
- 3) Hooper, C., Fry, V. A., Sevastou, I.G., Pocock,

J. M. *FEBS Lett.*, **583**, 3461-3466 (2009)

- 4) Dewapriya, P., Li, Y. X., Himaya, S. W., Pangestuti, R., Kim, S. *NeuroToxicology*, **35**, 30-40 (2013)

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2件)

Sasaki-Hamada, S., Hoshi, M., Niwa, Y., Ueda, Y., Kokaji, A., Kamisuki, S., Kuramochi, K., Sugawara, F., Oka, J. Neoechinulin A induced memory improvements and antidepressant-like effects in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **71**, 155-161 (2016) (査読有)
DOI: 10.1016/j.pnpbp.2016.08.002
Kamisuki, S., Himeno, N., Tsurukawa, Y., Kusayanagi, T., Takeno, M., Kamakura, T., Kuramochi, K., Sugawara, F. Identification of proteins that bind to the neuroprotective agent neoechinulin A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**(3), 442-448. (2018) (査読有)
DOI: 10.1080/09168451.2018.1433018

[学会発表](計2件)

紙透伸治
真菌由来の新規生理活性物質の探索
第28回新薬創製談話会
2017年
紙透伸治、姫野なつみ、鶴川幸音、草柳友恵、竹野正洋、鎌倉高志、倉持幸司、菅原二三男
神経保護物質ネオエキヌリン A の結合タンパク質の同定
日本農芸化学会 2018 年度大会
2018 年

[その他]

ホームページ等
<https://lab-navi.azabu-u.ac.jp/v-01-chemi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

紙透 伸治 (KAMISUKI, Shinji)
麻布大学・獣医学部・講師
研究者番号：30553846

(3)連携研究者

菅原二三男 (SUGAWARA, Fumio)
東京理科大学・理工学部・教授
研究者番号：30192123