

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14952

研究課題名(和文)小胞体ストレスシグナリングにおける酸化ストレスの標的探索とその制御機構解析

研究課題名(英文)Regulation of unfolded protein response by oxidative stress

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレスシグナル系におけるNO調節性タンパク質の同定を試みた。その結果、UPRセンサーの中、IRE1 およびPERKがNOによって修飾されることがわかった。一方、ATF6にはまったく影響を及ぼさなかった。IRE1のS-ニトロシル化は変性タンパク質を認識する初期段階には影響しないことが明らかとなった。しかしながら、RNase活性に必要な部位(KEN domain)におけるCys931/Cys951がNOの標的であり、このとき、酵素活性は消失することが認められた。したがって、NOはIRE1 のCys931をニトロシル化することで、酵素活性を抑制していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：S-nitrosylation modulates important cellular processes in many cell types. We attempted to elucidate the effects of S-nitrosylation on unfolded protein response (UPR) pathway. We found that nitric oxide (NO) can S-nitrosylate the ER stress sensors IRE1 and PERK. However S-nitrosylation of IRE1 inhibited its ribonuclease activity, S-nitrosylation of PERK activated its kinase activity and downstream phosphorylation/inactivation of eIF2. Overexpression of IRE1 (Cys931) prevented S-nitrosylation and inhibition of its enzymatic activity, indicating Cys931 is the predominant site of S-nitrosylation. These results indicated that nitrosative stress leads to dysfunctional ER stress signaling, thus contributing to neuronal cell death.

研究分野：薬理学

キーワード：一酸化窒素 小胞体ストレス 親電子性物質 酸化 ニトロシル化 細胞死

1. 研究開始当初の背景

生体内でストレスあるいは受容体刺激に伴って産生される NO や過酸化水素などの活性酸素種 (ROS) はタンパク質システインチオール基を酸化修飾する。とくに、システイン残基が活性に重要な機能を担っている場合、酸化により著しく機能変化を起こすことが知られている。申請者はこれまでに NO による神経細胞死とそれに起因する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タンパク質品質管理系における標的 (Parkin, PDI) を同定した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, *Science* 2005, *Nature* 2006)。さらに、新規 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)。一方、NO や ROS 以外にもシステインチオール基を酸化修飾する物質は多く存在する。とくにメチル水銀などがこれに該当することから、この作用メカニズムに注目してきた。メチル水銀誘発性神経細胞死におけるタンパク質品質管理機構破綻 / 小胞体ストレス惹起機構を解析したところ、NO と似た性質を示すものの、標的や修飾部位が異なっていることを見出している (*Neurotox. Res.* 2015)。このことは、小胞体ストレスを誘起するセンサーやシグナルがレドックス制御され、さらに、感受性が酸化ストレス毎に異なる可能性があることを示唆している。このような知見や報告はこれまでに全くされていない。したがって、酸化ストレスの基質同定と作用様式を解析することは、病態発症に連関している小胞体ストレス経路 (unfolded protein response, UPR) の新規な調節機構を提示することに繋がることが予想され、本研究を計画した。

2. 研究の目的

これまでに 1) 酸化ストレスがどのように小胞体ストレスセンサー活性を調節しているか? 2) センサー毎の役割は理解されてきているが、酸化ストレス感受性の違いはあるか? 3) 環境変化やストレスによる UPR の活性化 / 不活性化は起こるか? などの課題はほとんど解析されていない。申請者はこれらの問題に対して、センサータンパク質や UPR の酸化修飾による機能制御を切り口として明らかにしていくことを計画した。2年間の計画において、センサーおよび下流シグナル分子が酸化ストレスによってどのような影響を受けるのかを明らかにするため、基質タンパク質の網羅的な単離同定を進め、最終的に病態モデルでの検証を行う。

3. 研究の方法

まず小胞体ストレスシグナル系における NO 結合性タンパク質の探索を行った。つぎに、各種酸化ストレス剤 (親電子性化合物) の効果、修飾の特異性、酵素活性への影響を検討する。単離されたタンパク質に対して、分子

サイズの異なる親電子性化合物である硫化水素や 1,2-NQ などによっても酸化するか否か、改変バイオチンスイッチ法や酸化修飾部位を認識する抗体を使用して調べた。また、重要なタンパク質 (センサー蛋白質など) は個々の特異的抗体を用いて個別に調べた。

各種センサー分子や標的タンパク質の修飾部位改変型遺伝子発現細胞 / ノックアウト MEF などを使用して、酸化修飾の小胞体ストレスシグナルへの影響について詳細に調べた。最終的に、酸化ストレス誘発性の神経細胞死惹起経路をタンパク質修飾から証明することを試みた。

各種親電子性化合物 (酸化ストレス) による酸化修飾に伴う酵素活性変化ならびに UPR シグナルへの影響を調べた。とくに、センサーの 2 量体 / 多量体化 / 自己リン酸化、RNase 活性 (xbp-1 mRNA スプライシング) や JNK 経路、eIF2 リン酸化 / ATF4 経路に対して、親電子性化合物はどのステップに影響を及ぼすのかを RT-PCR やウェスタンブロット解析から明らかにした。ATF6 に関してはゴルジ体で限定分解を受けるので、その切断の有無に関して特異的抗体を使用して検討した。さらに、高感度 UPR 検出レポーターアッセイシステム (ERAI (ER stress activated indicator), UMAI (UPR mediated ATF4 indicator) やウェスタン解析を利用して、どの UPR 経路を活性化 / 不活性化するのかを細胞レベルで明らかにした。

4. 研究成果

まず初めに、小胞体ストレスシグナル系における NO 結合性タンパク質をバイオチンスイッチ法を用いて解析した。同時に、特異的抗体を用いて分子特異的な修飾の有無を観察した。その結果、UPR センサーの中で、IRE1 および PERK が NO によって修飾されることがわかった。一方、ATF6 にはまったく影響を及ぼさなかった。そこで、NO による IRE1 経路への影響について解析を進めた。IRE1 は小胞体内腔に変性タンパク質センサー機能を有し、この蓄積に応じて、2 量体 / 多量体化 / 自己リン酸化を引き起こす。そこで、NO 処理をしたところ、これらの応答にはまったく変化が認められなかった。このことから、IRE1 の S-ニトロシル化は変性タンパク質を認識する初期段階には影響しないことが示唆された。つぎに、RNase 活性 (xbp-1 mRNA スプライシング) について調べたところ、NO はこのスプライシングを抑制した。そこで、RNase 活性に必要な部位 (KEN domain) における Cys 残基を Ser 残基に変換した変異体を作成し、NO の影響を調べた。興味深いことに、Cys931/Cys951 が NO の標的であることがわかったが、とくに、Cys931 変異体を発現した細胞では NO の抑制効果が消失することが認められた。以上より、NO は IRE1 の Cys931 をニトロシル化することで、酵素活性を抑制していることが示唆された。

メチル水銀は濃度、処理時間依存的に神経細胞死を惹起することを確認した。この刺激によって、速やかな ATF6 の限定分解や eIF2 のリン酸化が認められた。一方、IRE1 はそれ自体の自己リン酸化は検出されたものの、下流の XBP1 mRNA のスプライシングは全く認められなかった。そこで、IRE1 KO MEF を使用し、これに Cys931 ならびに 951 を Ser に置換した変異体をトランスフェクションすることでその効果を観察した。その結果、C931S 変異体発現細胞でのみ、メチル水銀による XBP1 mRNA のスプライシングが認められた。このことから、メチル水銀は IRE1 の Cys931 を標的として、この経路を阻害することがわかった。IRE1-XBP1 経路は抗細胞死効果に重要なシャペロンなどの発現に関わっている。一方、PERK および ATF6 経路は CHOP の発現を介してアポトーシスを惹起することが知られている。そこで、PERK 特異的阻害薬 GSK2606414 を処理し、メチル水銀による UPR と細胞死に対する影響を調べた。GSK2606414 はメチル水銀による CHOP 発現を阻害し、アポトーシス細胞数を有意に抑制することがわかった。以上より、環境性親電子性化合物であるメチル水銀は小胞体ストレスを介してアポトーシス様の細胞死を惹起すること、これは主に PERK と ATF6 経路の活性化によることが明らかとなった。

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5件)

Hiraoka H, Nakahara K, Kaneko Y, Akiyama Y, Okuda K, Iwawaki T, Fujimura M, Kumagai Y, Takasugi N, Uehara T. Modulation of unfolded protein response by methylmercury. *Biol. Pharm. Bull.* 2017 in press. (査読有)

Abiko Y, Shinkai Y, Unoki T, Hirose R, Uehara T, 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.* 2017 in press. (査読有)

Unoki T, Abiko Y, Toyama T, Uehara T, Tsuboi K, Nishida M, Kaji T, 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.* 2016 6:28944. doi:

10.1038/srep28944. (査読有)

Nakato R, Ohkubo Y, Konishi A, Shibata M, Kaneko Y, Iwawaki T, Nakamura T, Lipton SA, Uehara T. Regulation of the unfolded protein response via S-nitrosylation of sensors of endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep.* 2015 5:14812. doi: 10.1038/srep14812. (査読有)

Okuda K, Ito A, Uehara T. Regulation of Histone Deacetylase 6 Activity via S-Nitrosylation. *Biol. Pharm. Bull.* 2015;38(9):1434-7. doi: 10.1248/bpb.b15-00364. (査読有)

[学会発表](計13件)

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 HYATT REGENCY San Francisco, CA (アメリカ合衆国) 2016.11.17

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 HYATT REGENCY San Francisco, CA(アメリカ合衆国)2016.11.17
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) 2016.9.26

上原 孝, 奥田 将, 杉野 英介: 「小胞体タンパク質成熟機構における活性イオウ/窒素種の役割」第43回日本毒理学学会学術年会 ウィンクあいち(愛知県・名古屋市) 2016.7.1

平岡 秀樹, 浜田 恭平, 高杉 展正, 上原 孝: 「1,2-ナフトキノンによる酸化修飾を介したAkt活性化機構」第129回日本薬理学会近畿部会 広島県医師会館(広島県・広島市) 2016.6.24

奥田 将, 杉野 英介, 森井 啓太, 高杉 展正, 上原 孝: 「活性硫黄種による新規レ

ドックス制御に基づくタンパク質機構調節」第129回日本薬理学会近畿部会 広島県医師会館（広島県・広島市）2016.6.24

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）2016.6.17

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）2016.5.21

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）2016.5.21

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.

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）2016.3.10

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）2015.6.27

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）2015.6.27

〔図書〕(計2件)

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
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〕
ホームページ等

http://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 (UEHARA, Takashi)
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 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()