

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22498

研究課題名(和文)小胞体ストレスセンサー分子特異的な酸化修飾阻止薬の開発

研究課題名(英文)Development of specific oxidative modification inhibitor for endoplasmic reticulum stress sensor

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(NO)はUPRのセンサー分子であるIRE1をS-ニトロシル化して不活性する。NOによる阻害は細胞を脆弱にすることをから、IRE1のエンドヌクレアーゼ活性を阻害することなく、酸化修飾のみを特異的に抑制する化合物はNO修飾に起因するUPR機能消失依存的な疾患に有効である可能性がある。そこで、薬理学的にも新たなカテゴリーに属する分子特異的酸化修飾部位阻止薬を単離することにチャレンジし、候補リード化合物の作出に成功した。特異性を高めるために、2種の誘導体も作出し、その阻害効果を確認した。これらは、NOによるUPR経路の遮断を濃度依存的に回復させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病や糖尿病の発症には小胞体ストレスが介在していることが明らかとなっている。一方で、一酸化窒素はセンサータンパク質であるIRE1に結合することで、本来は抗細胞死に関わる経路を遮断することでより脆弱にさせることを証明してきた。そこで、この経路を回復させるような化合物の作出は病態発症を軽減する可能性があると考えた。スクリーニングから有力な候補化合物を単離することに成功した。これらは酵素活性を阻害することなく、NOによる修飾のみを抑制することがわかった。今後、動物モデルに適用してその効力を検討することで、新規作用メカニズムを有した治療薬開発に有益な情報をもたらすと推定される。

研究成果の概要(英文)：Nitric oxide (NO) regulates the enzymatic activity of IRE1, a sensor molecule of UPR, through protein S-nitrosylation. Since NO resulted in apoptosis via inactivation of UPR, we consider a compound that specifically suppresses this oxidative modification without inhibiting endonuclease activity of IRE1 is effective. Certainly, there are many diseases dependent on UPR dysfunction such as Parkinson's disease or diabetes. Therefore, we attempted to isolate a specific oxidative modification inhibitor for the endoplasmic modification site. From in silico screening, we could isolate a candidate lead compound. In order to increase the pharmacological potency, two derivatives were also produced. We then confirmed their inhibitory effects that restored the blockage of the UPR pathway by NO in a concentration-dependent manner.

研究分野：薬理学

キーワード：一酸化窒素 小胞体ストレス UPR ニトロシル化

1. 研究開始当初の背景

様々なストレスや外的要因によって、小胞体のタンパク質成熟機構や品質管理機構が破綻すると、小胞体内腔に変性タンパク質が蓄積する。この状態が小胞体ストレスであり、細胞の生存に大きな影響を与える。このような危機的状況を回避するために、小胞体を起源とする特異的なシグナルである unfolded protein response (UPR) が活性化され、シャペロンやプロテアソームなどが誘導される。一方、UPR の持続的な活性化は、CHOP 発現などを介して、パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患、糖尿病、関節リウマチなどの発症を惹起することが示唆されている。しかしながら、小胞体ストレスを惹起する要因、とくに生体内物質・環境変化とその標的に関しては、ほとんど理解されていない。したがって、実験レベルではツニカマイシンなどの試薬 (小胞体ストレスサ) を添加して、その影響を検討しているものの、真の病態発症原因を追求するには未だ多くの課題を残している。このことが、小胞体ストレスが介在する病態に対する効果的な化合物・薬物を開発させることを遅らせている原因の一つでもある。

その中で、申請者は一酸化窒素 (NO) が小胞体ストレスを惹起することを世界で初めて証明し、その標的が新生タンパク質成熟機構に必須なタンパク質ジスルフィド異性化酵素 (PDI) であることを特定した (Uehara *et al.*, *Nature* 2006, Yao and Uehara *et al.*, *PNAS* 2002, *Science* 2005)。さらに、パーキンソン病やアルツハイマー病のヒト死後脳において、PDI の NO 酸化修飾 (S-ニトロシル化) を認めた (Uehara *et al.*, *Nature* 2006; *Antioxid. Redox. Signal.* 2007)。PDI の酵素活性は S-ニトロシル化修飾によって著しく抑制され、変性タンパク質の蓄積に引き続き、持続的な小胞体ストレスを惹起した。興味深いことに、NO は UPR のセンサー分子として機能する IRE1 α も同時に S-ニトロシル化して不活性することを証明した (Nakato *et al.*, and Uehara. *Sci. Rep.* 2015)。

2. 研究の目的

IRE1 α -XBP1 経路はシャペロンなどの誘導を介して抗細胞死効果を発揮するが、NO によるこの経路の遮断は細胞をより脆弱にすることが示唆された。したがって、IRE1 α のエンドヌクレアーゼ活性を阻害することなく、酸化修飾のみを特異的に抑制する化合物は NO 修飾に起因する UPR 機能消失依存的な疾患に有効である可能性がある。そこで、薬理的にも新たなカテゴリーに属する分子特異的酸化修飾部位阻止薬を単離することにチャレンジし、その薬理学的特性、特にパーキンソン病治療薬シーズを目指した抗細胞死効果について検証することを目的とする。

3. 研究の方法

申請者は既に IRE1 α 中の NO 結合 Cys 残基 (C931, C951) の特定に成功している (Nakato *et al.*, *Sci. Rep.* 2015)。この修飾は IRE1 α のエンドヌクレアーゼ (mRNA スプライシング) 活性を抑制することを見出している。この情報を基にして、NAMIKI 商事が保有する約 400 万種以上の化合物ライブラリーを用いて *in silico* スクリーニングを展開し、当該 Cys 近傍に結合する化合物の選定を初期的に済ませた。その中で、最終的に候補に上がった 80 種の化合物に関して、1) S-ニトロシル化阻害能を検討する。同時に、IRE1 α 酵素活性阻害作用が無いことを確認した。2) 次に、誘導体を合成し、最適化を進める。これに関しては、本学有機合成講座：竹内靖雄教授にアドバイスを頂き、当研究室の大学院生が担当した。3) 候補化合物に関して、NO だけでなく、パーキンソン病様症状を惹起する薬品 (MPP⁺, ロテノン, 6-OHDA) による神経細胞死に対する抑制効果を調べた。4) 誘導体に関しても、同様に解析した。

4. 研究成果

申請者は、NO は UPR のセンサー分子として機能する IRE1 α も同時に S-ニトロシル化して不活性することを証明した。IRE1 α -XBP1 経路はシャペロンなどの誘導を介して抗細胞死効果を発揮するが、NO によるこの経路の遮断は細胞をより脆弱にすることが示唆された。したがって、

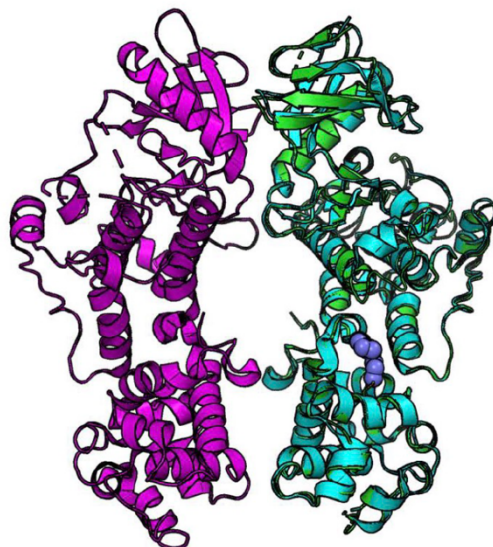


図 1. IRE1 α 分子とリード化合物の結合シミュレーション

IRE1 α のエンドヌクレアーゼ活性を阻害することなく、酸化修飾のみを特異的に抑制する化合物はNO修飾に起因するUPR機能消失依存的な疾患に有効である可能性がある。そこで、薬理的にも新たなカテゴリーに属する分子特異的酸化修飾部位阻止薬を単離することにチャレンジし、その薬理学的特性、特にパーキンソン病治療薬シーズを目指した抗細胞死効果について検証することを目的とした。約400万種の化合物ライブラリーを用いてin silicoスクリーニングを展開し、当該Cysならびに近傍に結合する候補化合物100種をピックアップした。これらに対して、S-ニトロシル化阻害能とIRE1 α 酵素活性阻害作用を調べた。その結果、有力な1つの化合物の特定に成功した(図1)。リード化合物は濃度依存的にIRE1 α のS-ニトロシル化を抑制することがわかった。さらには、ツニカマイシンなどによる小胞体ストレス活性化をNOは効果的に抑制するが、この作用に対して有効であることを明らかにした(図2)。次に、他の分子

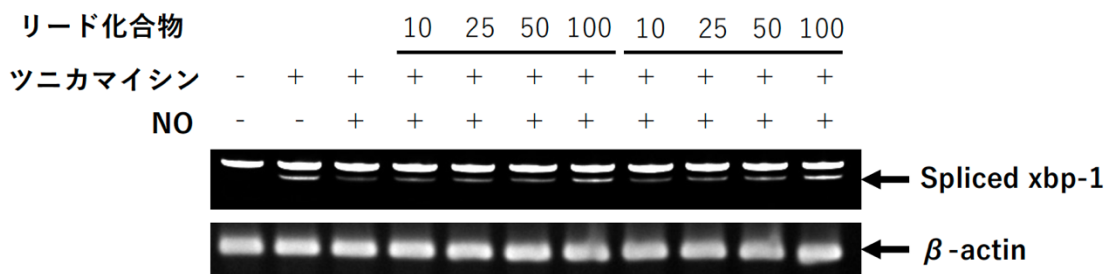


図2. ツニカマイシンによるxbp-1 mRNA切断に対するNOの抑制効果とそれを回復させるリード化合物の作用

への影響(分子特異性)についても検討した。その結果、NOによって修飾されるPTENへの作用を調べたところ、残念ながら、本化合物によって阻害されることがわかった。このことから、本分子はその構造から、多くのタンパク質Cys残基と相互作用することが示唆された。そこで、分子特異性を上げるために、さらに2次スクリーニングを行ったところ、新たに3つの候補化合物の単離に成功した。これらはリード化合物よりも効力(阻害効果)が高く、非特異性も解消されていた(図3および4)。現在、その詳細な薬理効果について検討を行っている。

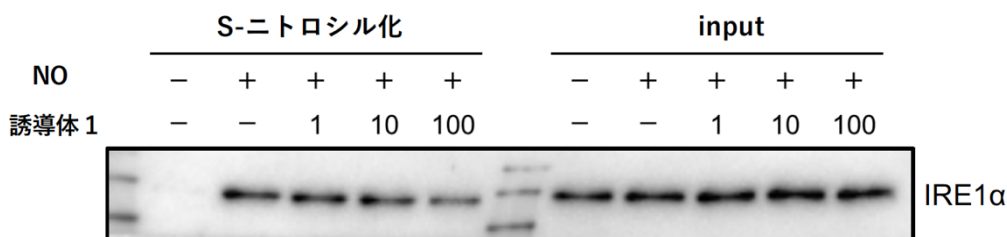


図3. NOによるIRE1 α のS-ニトロシル化修飾に対する誘導体1の阻害効果

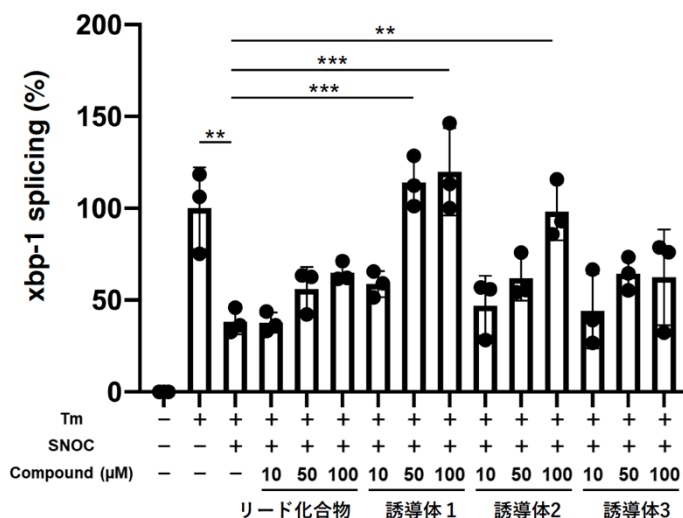


図4. ツニカマイシンによるxbp-1 mRNA切断に対するNOの抑制効果とそれを回復させる誘導体の作用

これまでに、このようなタンパク質特異的酸化（S-ニトロシル化）修飾阻止薬は発表されておらず、ここに示した知見は非常にオリジナリティの高いものであると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takeda, K., Nagashima, S., Shiiba, I., Uda, A., Tokuyama, T., Ito, N., Fukuda, T., Matsushita, N., Ishido, S., Iwawaki, T., Uehara, T., Inatome, R., and Yanagi, S.	4. 巻 38
2. 論文標題 MITOL prevents ER stress-induced apoptosis by IRE1 ubiquitylation at mitochondrial-ER contact sites.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 e100999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2018100999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takasugi, N., Hiraoka, H., Nakahara, K., Akiyama, S., Fujikawa, K., Nomura, R., Furuichi, M., and Uehara, T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Emerging role of electrophiles as a key regulator for endoplasmic reticulum (ER) stress.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 pii:E1783
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20071783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakahara K, Fujikawa K, Hiraoka H, Miyazaki I, Asanuma M, Ito A, Takasugi N, Uehara T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Attenuation of Macrophage Migration Inhibitory Factor-Stimulated Signaling via S-Nitrosylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1044-1047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00025.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujikawa K, Nakahara K, Takasugi N, Nishiya T, Ito A, Uchida K, Uehara T.	4. 巻 524
2. 論文標題 S-Nitrosylation at the active site decreases the ubiquitin-conjugating activity of ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1 (UBE2D1), an ERAD-associated protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 910-915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiraoka H, Nomura R, Takasugi N, Akai R, Iwawaki T, Kumagai Y, Fujimura M, Uehara T.	4. 巻 95
2. 論文標題 Spatiotemporal analysis of the UPR transition induced by methylmercury in the mouse brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Toxicol.	6. 最初と最後の頁 1241-1250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-021-02982-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakahara K, Hamada K, Tsuchida T, Takasugi N, Abiko Y, Shien K, Toyooka S, Kumagai Y, Uehara T.	4. 巻 296
2. 論文標題 Covalent N-arylation by the pollutant 1,2-naphthoquinone activates the EGF receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 100524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100524.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 リバースケミカルジェネティクスから解く酸化ストレスによりエピゲノム調節機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Uehara
2. 発表標題 Detection of novel S-nitrosylated proteins in neuronal cells.
3. 学会等名 SfRBM2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 レドックスを介したDNAメチル化制御機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kana Fujikawa, Kengo Nakahara, Nobumasa Takasugi, Akihiro Ito, Takashi Uehara
2. 発表標題 Regulation of Ubiquitin-Proteasome System in ERAD via S-nitrosylation of UBE2D1.
3. 学会等名 IUTOX ICTXV 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 環境化合物修飾によるエピゲノム調節機構
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 一酸化窒素による新たな遺伝子発現調節機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------