

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 24 年 3 月 30 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580131

研究課題名（和文）ネオエキヌリン A の神経細胞保護メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of neuroprotection by neoechinulin A

研究代表者

渡邊 伸夫（WATANABE NOBUO）

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：80396928

研究成果の概要（和文）：各種の変性神経疾患では活性窒素による細胞傷害が示唆されている。ネオエキヌリン A は、活性窒素に対する耐性を賦与するが、そのメカニズムは不明であった。本研究により、ネオエキヌリン A による細胞保護作用は、細胞の NAD(P)H 産生の産生予備能力を亢進させるという、新規メカニズムに基づいていることが明らかとなった。また、ネオエキヌリン A の更なる薬効評価のため、活性窒素によるアルツハイマー病細胞モデル系等を構築した。

研究成果の概要（英文）：Cytotoxicity by reactive nitrogen species is suggested responsible for various neurodegenerative diseases. Treatment with neoechinulin A renders cells resistant to insults by reactive nitrogen species but the mechanism remained unclear. In this study, we clarified a novel mechanism underlying the cytoprotective action of neoechinulin A treatment; neoechinulin A engenders an increase in cellular reserve capacity for NAD(P)H generation. We also established for the first time a cellular model of Alzheimer's disease, with which the effectiveness of neoechinulin A would be assessed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物生産化学

科研費の分科・細目：生物有機化学

キーワード：薬理学、痴呆、老化、抗生物質、神経科学

1. 研究開始当初の背景

種々の変性神経疾患において、パーオキシナイトライト(ONOO-)による細胞傷害が示唆されている。PC12 細胞において、ONOO-ドナーである 3-morpholinosydnonimine (SIN-1)による細胞死を防ぐ物質として、海洋性微生物代謝産物由来の neoechinulin A が見出された。neoechinulin A はその後、パーキンソン病モデルである 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP)誘導細

胞死においても保護効果を有することが判明した。しかし、その作用メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

(1) PC12 細胞をネオエキヌリン A 存在下で 24 時間培養し、抗酸化系酵素や代謝系酵素等の活性変化を網羅的に調べる。
(2) ネオエキヌリン A の細胞保護効果の有無を、SIN-1 誘導細胞死以外の簡便なモデル系

において調べる。

(3)細胞内タンパク質の S-ニトロソ化を指標としたニトロソ化ストレスモデル、ならびに持続的な一酸化窒素(NO)処理によるアルツハイマー病モデルを新規に構築し、ネオエキヌリン A の薬理作用を評価する。

3. 研究の方法

(1) PC12 細胞をネオエキヌリン A または vehicle にて 24 時間処理し、細胞ライゼートを調製した。これを用い、抗酸化系酵素活性 (superoxide dismutase, catalase, catalase, NAD(P)H quinone oxidoreductase, GSH reductase, GSH peroxidase, GSH-S-transferase, GSNO reductase, thioredoxin reductase)、代謝系酵素活性 (hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, NADPH-isocitrate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, citrate synthase)、プロテアソーム活性ならびにグルタチオン含量を測定した。

(2) ロテノン、H2O2、NO ドナー (NOR-3, DETA NONOate)、ならびにメナジオン (活性酸素産生を誘発するキノン化合物) に対して、ネオエキヌリン A 処理 PC12 細胞が耐性を示すかどうか検討した。

(3) S-nitrosocysteine (CysNO)、S-nitrosoglutathione (GSNO)、SIN-1、NOR-3 などを用いて、ニトロソ化ストレスの指標である細胞内タンパク質の S-ニトロソ化の度合いをビオチンスイッチ法で測定した。また、タウをトランスフェクションにより過剰発現させ、NO によって不溶化するかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) ネオエキヌリン A 処理の有無による抗酸化系、代謝系、プロテアソーム系の変化を調べたところ、GSH の含量は半減するが、他の抗酸化系・代謝系酵素に関してはほとんど変化を与えないことがわかった (Table 1-3)。GSH の含量の低下は、生細胞レベルでの細胞外ジスルフィド還元活性の低下にも反映された。一方、代謝系酵素の活性に変化が見られないにも関わらず、生細胞レベルではフェナジンを介した細胞外テトラゾリウムの還元活性に上昇がみられ、NAD(P)H の還元型の量的な上昇が示唆された。しかし、ライゼート中では、NADH あるいは NADPH のいずれにも、量的な変化は見られなかった。これはテトラゾリウムにより NAD(P)H が強制的に酸化された際のみ、NAD(P)H を還元型に維持する潜在能力 (reserve capacity) が、ネオエキヌリン A 処理細胞において亢進していることを示す。ネオエキヌリン A による活性酸素に対す

る特異的な細胞保護効果 [下記の 2)] が、この reserve capacity 亢進に基づいていることが示唆された。

Table 1 Effect of neoechinulin A treatment for 24 h on the activities of antioxidant enzymes and GSH contents in PC12 cells

antioxidant enzyme or GSH	unit	neoA (-)	neoA (+)	%	P
superoxide dismutase (SOD)	U/mg	21.6 ± 1.4	22.2 ± 1.8	102	ns
catalase	U/mg	2.04 ± 0.05	1.75 ± 0.14	86	*
NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO 1)	mU/mg	9.7 ± 2.1	9.2 ± 1.7	95	ns
glutathione (GSH)	nmol/mg	18.7 ± 0.5	8.4 ± 1.0	45	***
glutathione reductase (GR)	mU/mg	62.7 ± 2.4	60.3 ± 2.8	97	ns
glutathione S-transferase (GST)	mU/mg	11.2 ± 1.2	11.0 ± 0.0	98	ns
glutathione peroxidase (GPx)	mU/mg	20.4 ± 0.8	17.5 ± 1.5	86	ns
GSNO reductase (GSNO R)	mU/mg	19.5 ± 2.0	20.7 ± 2.1	106	ns
thioredoxin reductase-like (TrxR-like)	mU/mg	16.5 ± 1.0	15.5 ± 1.5	94	ns

Table 2 Effect of neoechinulin A treatment for 24 h on the activities of metabolic enzymes in PC12 cells

metabolic enzyme	unit	neoA (-)	neoA (+)	%	P
hexokinase (HK)	mU/mg	23.1 ± 1.8	22.9 ± 2.0	99	ns
glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)	mU/mg	52.6 ± 3.3	52.3 ± 1.4	99	ns
6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH)	mU/mg	12.8 ± 0.4	12.3 ± 0.5	96	ns
NADPH-isocitrate dehydrogenase (ICDH)	mU/mg	55.5 ± 1.9	57.2 ± 2.3	103	ns
lactate dehydrogenase (LDH)	U/mg	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.5	100	ns
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	mU/mg	78.6 ± 6.7	85.7 ± 5.0	109	ns
citrate synthase	mU/mg	127 ± 2	127 ± 1	100	ns

Table 3 Effect of neoechinulin A treatment for 24 h on the activities of proteasome and other enzymes in PC12 cells

others	unit	neoA (-)	neoA (+)	%	P
proteasome	mU/mg	2.36 ± 0.09	2.20 ± 0.04	93	ns
NADH-diahorase	mAbs/mg	50.7 ± 1.4	51.8 ± 5.6	102	ns
NADPH-diahorase	mAbs/mg	94.9 ± 4.3	100.0 ± 8.7	105	ns

(2) ネオエキヌリン A の 24 時間の前処理は、SIN-1 以外に、NOR-3 による NO ストレスに対しても耐性を賦与したが、H2O2 や menadione に対しては賦与しなかった (Fig. 1)。NO による耐性賦与は、SIN-1 の場合と同様に、12 時間以上前培養することが必要であり、同一の機序に基づく可能性が示唆された。これより、ネオエキヌリン A は、活性酸素に対して特異的な細胞保護効果を発揮することが明らかとなった。

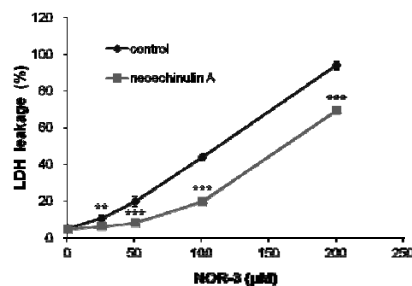


Fig. 1 ネオエキヌリン A は活性酸素による細胞傷害に対する耐性を賦与する

一方、ロテノンによる complex I 傷害に対しては、ロテノン処理時にネオエキヌリン A を共存させた場合、細胞死を遅らせることが判明した。ロテノンにより、グルコース消費と乳酸の産生が亢進されるが、ネオエキヌリン

A はこれらには全く影響を与えなかった。すなわち、解糖系の代謝回転に影響を与えないことが判明した。しかし、ロテノン存在下での ATP 量を半減させることが判明した。以上より、ネオエキヌリン A による細胞保護効果は、ATP 依存的な細胞保護機構の活性化を伴っている可能性が示唆された。

(3) 無機塩とグルコースのみからなるハンクス溶液中では CysNO のみが、アミノ酸トランスポーターでの取り込みを介して、細胞内 S-ニトロソ化を誘導した。一方、通常の細胞培地中では、CysNO を含め、いずれのニトロソ化剤も S-ニトロソ化を誘導できなかった。これは培地含有アミノ酸による競合とアルブミンへのニトロソ基の転移のためであることが判明した。

タウを過剰発現した細胞に、NO ストレスを 96 時間持続に与えることにより、タウが不溶性の凝集体を形成した (Fig. 2)。これは、ジスルフィド結合によって安定化されていた。以上確立した 2 つの系を用い、ネオエキヌリン A の効果の検討を現在行っている。

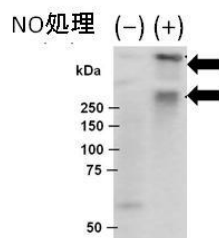


Fig. 2 持続的な NO 処理によるタウタンパク質の凝集 (矢印)

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) Takahashi M, Nonaka T, Hasegawa M, Watanabe N, Arai T
Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells
Neuroscience Letters, 510, 48-52, 2012

(2) Ryuman N, Watanabe N, Arai T.
S-nitrosation of cellular proteins by NO donors in rat embryonic fibroblast 3Y1 cells: factors affecting S-nitrosation
Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2011, article ID: 450317, 2011

(3) Akashi S, Kimura T, Takeuchi T, Kuramochi K, Kobayashi S, Sugawara F, Watanabe N, Arai T

Neoechinulin A impedes the progression of rotenone-induced cytotoxicity in PC12 cells
Biological & Pharmaceutical Bulletin, 34, 243-248, 2011

(4) Aoki T, Ohnishi K, Kimoto M, Fujieda S, Kuramochi K, Takeuchi T, Nakazaki A, Watanabe N, Sugawara F, Arai T, Kobayashi S
Synthesis and Neuroprotective Action of Optically Pure Neoechinulin A and Its Analogs
Pharmaceuticals, 3, 1063-1069, 2010

(5) Konishi K, Watanabe N, Arai T
SIN-1 cytotoxicity to PC12 cells is mediated by thiol-sensitive short-lived substances generated through SIN-1 decomposition in culture medium
Nitric Oxide, 4, 270-278, 2009

[学会発表] (計 8 件)

(1) Neoechinulin A confers resistance against nitrosative stress despite inducing a significant depletion of cellular GSH
Watanabe N, Akashi S, Nakagawa T, Okada T, Takeuchi T, Kuramochi K, Sugawara F, Kobayashi S, Arai T
18th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (November 18th, 2011, Atlanta, GA, USA)

(2) Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells
Takahashi M, Nonaka T, Hasegawa M, Watanabe N, Arai T
18th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (November 18th, 2011, Atlanta, GA, USA)

(3) Neoechinulin A impedes cell death induced by mitochondrial complex I inhibitor rotenone
Akashi S, Kimura T, Takeuchi T, Kuramochi K, Kobayashi S, Sugawara F, Watanabe N, Arai T
18th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (November 18th, 2011, Atlanta, GA, USA)

(4) The mechanistic study of cytotoxicity induced by SIN-1 in PC12 cells
Okada T, Konishi K, Nakashima M, Watanabe N, Arai T
5th Biannual Meeting of the Society for Free Radical Research—Asia (September

1st, 2011, Kagoshima, Japan)

(5) Nitric oxide induces tau protein aggregation in SY5Y cells

Takahashi M, Chin Y, Hasegawa M, Nonaka T, Watanabe N, Arai T

5th Biannual Meeting of the Society for Free Radical Research—Asia (September 1st, 2011, Kagoshima, Japan)

(6) Neoechinulin A confers cytoprotection against nitrosative stresses in PC12 cells while paradoxically decreasing GSH contents

Nakagawa T, Akashi S, Okada T, Konishi K, Ogura Y, Kuramochi K, Kobayashi S, Sugawara F, Takeuchi T, Watanabe N, Arai T

5th Biannual Meeting of the Society for Free Radical Research—Asia (September 1st, 2011, Kagoshima, Japan)

(7) SIN-1 cytotoxicity to PC12 cells is mediated by thiol-sensitive short-lived substances generated through SIN-1 decomposition in culture medium

Watanabe N, Konishi K, Arai T

The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (June 14th, 2010, Kyoto, Japan)

(8) Nitric oxide induces tau protein oligomerization in SY5Y cells

Takahashi M, Chin Y, Hasegawa M, Nonaka T, Watanabe N, Arai T

The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (June 14th, 2010, Kyoto, Japan)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] 該当なし

○出願状況 (計◇件)

名称 :

発明者 :

権利者 : 該当なし

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計◇件)

名称 :

発明者 :

権利者 : 該当なし

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 伸央 (WATANABE NOBUO)

東京理科大学理工学部応用生物科学科
助教

研究者番号 : 80396928

(2) 研究分担者

新井 孝夫 (ARAI TAKAO)

東京理科大学理工学部応用生物科学科
教授

研究者番号 : 60107422

(3) 連携研究者

倉持 幸司 (KURAMOCHI KOUJI)

京都府立大学農学部准教授

研究者番号 : 90408708

小林 進 (KOBAYASHI SUSUMU)

東京理科大学薬学部教授

研究者番号 : 70101102