

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月18日現在

機関番号：15301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659041
 研究課題名（和文）
 特殊抗体による生体試料中の酸化蛋白質測定系ならびに還元活性作用薬評価系の構築
 研究課題名（英文）Detection of oxidized ER protein by nitrosative/oxidative stress with a specific antibody
 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

研究成果の概要（和文）：スルホン酸化 PDI に対するモノクローナル抗体を作出して新規酸化 PDI 評価系を構築し、各種酸化ストレス刺激による PDI のスルホン酸化を細胞レベルで特異的に検出可能であることを明らかにした。PDI のスルホン酸化は PDI 酵素活性に重要な 2 か所のチオレドキシシン様ドメインにあるシステイン残基で起きることを明らかにした。本実験系を利用して PDI の酸化を抑制する抗酸化薬のスクリーニングが可能であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to establish the assay system to detect oxidized PDI (PDI-SO₃H) with a specific antibody. We succeeded to isolate several specific antibodies against PDI-SO₃H. An antibody could detect the oxidized form of PDI treated with H₂O₂, NO, or rotenone. This antibody might be useful for diagnosis of sporadic neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：一酸化窒素，酸化ストレス，神経細胞，アポトーシス，神経変性疾患，シグナル伝達，特殊抗体

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた現代ではパーキンソン病やアルツハイマー病をはじめとする老人性疾患罹患者が増え続け、深刻な社会問題となりつつある。が、どのような機構で発症するのかについては未だ解明されていない。こ

のような神経変性疾患は診断が下された時点で、すでに神経細胞がかなりの割合で死亡／脱落していることから、いかに早期に診断し、発見するかがカギとなる。したがって、一刻も早い有効で簡便な診断法の確立・治療薬開発が望まれている。

申請者はこれまでに酸化ストレスによる神経細胞死とそれに続く神経変性疾患発症機構について解析し、一酸化窒素 (NO) によるニトロ化ストレスによる蛋白質の酸化が小胞体機能の破綻を惹起し、これが神経変性疾患発症にリンクする可能性を世界で初めて証明した。

これらの成果から、蛋白質の酸化修飾を効率よく検出することが可能ならば、これまでまったく開発されていない科学的な根拠による孤発型神経変性疾患の早期診断に繋がる可能性が推定された。

2. 研究の目的

パーキンソン病などの神経変性疾患は今なおその詳細な発症機構は不明であり、簡便な早期診断法や根本的治療法は確立されていない。申請者は、これまでに発表してきた知見に基いた「病態発症に関わる可能性の高い修飾型蛋白質」に対する抗体の作出に成功している。今回このオリジナリティの高い抗体を利用して、

- 1) 生体試料中の酸化型蛋白質を簡便にモニターする系、
- 2) 酸化型蛋白質を特異的に還元する薬物のスクリーニング系、の開発を目指す。

本研究を介して、従来報告されていない新規早期診断法や神経変性疾患治療薬シーズのスクリーニング系開発に繋がるようなインパクトある初期的知見を挙げる事が目標である。

3. 研究の方法

(1) スルホン酸化特異的 PDI 抗体の作出と検出法の確立

① タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ

(PDI) の2つのチオレドキシシン様ドメイン活性部位とされる CGHC (Cys-Gly-His-Cys)

配列のうち N 末端側の Cys を含む 9 アミノ酸からなるペプチドの酸化 ($-SO_3H$ 化) 型を抗原ペプチドとし、非酸化型をコントロールペプチドとした。これらのペプチドを Morpho Sys 社の フェージライブラリー (HuCAL GOLD®) と反応させて候補抗体を選別した。フェージディスプレイ法¹⁾は、150 億種類以上のヒト Fab 抗体をコードする DNA をフェージに導入し、Fab 抗体ペプチドとフェージコート蛋白質とを融合した形で発現 (ディ氏プレイ) させたフェージライブラリーに抗原ペプチドを反応させ、結合したフェージを選別 (パニング) するものである。その後、選別した抗体 DNA を細胞に発現させ、抗原ペプチドに対する結合性の高いものを ELISA で選別 (スクリーニング) したところ、10 種のクローンを得ることに成功した。これらのうち、ELISA のシグナルの高い2つの抗体を本研究の対象とした。

② 本抗体は遺伝子組み換えにより人工的に作製したものであり、Fc 領域を欠く F(ab')₂ (Fab 二量体) である。したがって、抗原に特異的である Fab 部分以外の領域を介した非特異的な結合反応を防ぐことができると考えられる。しかし、免疫沈降法において通常用いられる Protein A 等の担体には抗体の Fc 部位の結合が必要であるため、本抗体には適用できない。そこで本研究では、担体として Dynabeads M-450 Epoxy を用いた。Dynabeads M-450 Epoxy は磁性を帯びた beads であり、強力磁石を使って遠心分離よりも穏やかな条件下での分離精製が可能である。また、本担体の表面のエポキシ基は第1級アミノ基と共有結合を形成し、本抗体の固定化が可能である。

SDS-PAGE あるいは 2-メルカプトエタノール非存在下での SDS-PAGE に続くウエスタンブロット法に本抗体を適用したが、スルホ

ン酸化 PDI を検出することができなかった。一方、免疫沈降法に適用したところ、スルホン酸化 PDI を効率よく pull-down することが可能であった。SDS-PAGE には SDS により蛋白質の非共有結合を解離させて立体構造を変化させる過程が含まれることから、本抗体は抗原のアミノ酸配列のみでなく、立体構造も認識していることが示唆された。したがって、これ以降の実験は免疫沈降法に本抗体を適用し、種々の検討を行った。

4. 研究成果

これまでに新生蛋白質成熟に深く関与する PDI が NO により S-ニトロシル(SNO)化されること、この修飾がアルツハイマー病やパーキンソン病を含むヒト孤発性神経変性疾患患者死後脳にも認められることを明らかにしてきた。過剰量の NO あるいは過酸化水素によって SNO化PDI (SNO-PDI) は最終的にスルホン酸化 PDI まで酸化される。したがって、細胞内スルホン酸化 PDI の特異的な検出法の確立は、孤発性パーキンソン病などに対する早期診断に応用可能であると推定される。そこで、酸化 PDI 特異的なモノクローナル抗体を作出し、その評価を生化学的手法により検討した。その結果、還元型(-SH)PDIにはまったく反応せず、酸化型(-SO₃H)PDIのみ特異的に認識するヒト型抗体を既に10クローン単離に成功し、このうちの2クローンに関して解析を進めた。

単離した酸化型PDI抗体の特性について予備的な検討を行った。HEK293T 細胞を生理的 NO ドナーである S-ニトロソシステインや過酸化水素で各時間処理した後、細胞質画分に対して酸化 PDI 抗体を用いて免疫沈降反応を行った。沈降物を SDS-PAGE で分離し、抗 PDI 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、時間依存的なバンドが検出さ

れた。このことから、本抗体が酸化ストレス刺激による酸化 PDI を特異的に認識することが確認された。

PDI のSNO 化は、分子中の 2 カ所のチオレドキシシン様ドメインに存在するシステイン残基で起こる。そこで、PDI のスルホン酸化部位を特定するために、野生型および変異型 (C36/39S, C383/386S, C36/39, 383/386S) PDI を強制発現させ、過酸化水素で刺激して同様に解析した。その結果、C36/39S および C383/386S 変異体では野生型の約 1/2 に、C36/39, 383/386S変異体ではほぼ basal レベルまでバンドが減弱することがわかった。

以上の結果より、PDI のSNO 化およびスルホン酸化修飾は酵素活性に重要なチオレドキシシン様ドメインのシステイン残基で起こっていることが明らかとなった。本抗体を用いて内在性 PDI の酸化を検出することが可能となり、今後、病態モデル動物などを用いて疾病発症との因果関係を調べ、新規抗酸化薬のスクリーニング系にも応用する予定である。

以上の特殊抗体を用いた研究を実行することにより、孤発性神経変性疾患に対する簡便な早期診断法や根本的治療薬の開発に向けた有益な情報がもたらされると期待される。また、酸化と疾患発症との因果関係に新たな理解を提示するばかりでなく、一分子に特化した生体内挙動も明らかになることから、学術的にも非常に高いインパクトを与えると予想される。したがって、ここに示した酸化蛋白質特異的抗体を利用して応用展開を図ることは、将来的な診断法/治療薬の開発において重要なステップとして位置づけられると予想される。

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 5 件)

- ① Watanabe, Y., Kaida, Y., Fukuhara, S., Takechi, K., Uehara, T., and Kamei, C. Participation of metabotropic glutamate receptors in pentetrazol-induced kindled seizure. *Epilepsia* 52, 140-150. (2011) 10.1111/j.1528-1167.2010.02764.x.
- ② Numajiri, N., Takasawa, K., Nishiya, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., Asada, M., Matsuda, H., Azumi, K., Kamata, H., Nakamura, T., Hara, H., Minami, M., Lipton, S.A. and Uehara, T. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of PTEN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 10349-10354 (2011) doi: 10.1073/pnas.1103503108.
- ③ Uehara, T. and Nishiya, T. Screening systems for identification of S-nitrosylated proteins. *Nitric Oxide* 25, 108-111 (2011) doi: 10.1016/j.niox.2010.11.002.
- ④ Matsumoto, K., Nishiya, T., Maekawa, S., Horinouchi, T., Ogasawara, K., Uehara, T., and Miwa, S. The ECS (SPSB) E3 ubiquitin ligase is the master regulator of the lifetime of inducible nitric-oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 46-51 (2011) doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.103.
- ⑤ Nishiya, T., Matsumoto, K., Maekawa, S., Horinouchi, T., Fujimuro, M., Ogasawara, K., Uehara, T., and Miwa, S. SPRY domain-containing SOCS box protein-1 (SPSB1), SPSB2, and SPSB4 are master regulators of proteasome-dependent degradation of iNOS. *J. Biol. Chem.* 286, 9009-9019 (2011) doi: 10.1074/jbc.M110.190678.
- ① 上原 孝 : 「ガス状分子の神経細胞死に対する作用機構」 第39回日本毒性学会学術年会 仙台国際センター (2012. 07. 19) 招待講演
- ② 上原 孝 : 「NOによる蛋白質修飾と神経細胞死制御」 第53回日本生化学会 中国・四国支部例会 岡山大学 (2012. 05. 18) 招待講演
- ③ 上原 孝 : 「A novel modulatory ‘on-off’ system for PI 3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation」 第11回日本NO学会学術集会, 昭和薬科大学 (2011. 5. 14) 招待講演
- ④ 上原 孝 : 「抗体アレイを使用した新規S-ニトロシル化蛋白質の探索」 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 神戸国際会議場 (2010. 12. 9)
- ⑤ Takashi Uehara : 「Detection of oxidized protein-disulfide isomerase with a specific antibody」 40th Annual Meeting Neuroscience 2010 San Diego Convention Centre (2010. 11. 15)
- ⑥ 上原 孝 : 「ニトロソ化ストレスを切り口とした神経変性疾患の早期診断/治療薬開発へのアプローチ」 生体機能と創薬シンポジウム 2010京都 グランヴィア京都 (2010. 9. 9) 招待講演
- ⑦ Tadashi Nishiya, Satoshi Maekawa, Masahiro Fujimuro, Kouetsu Ogasawara, Takashi Uehara, and Soichi Miwa : 「The life time of iNOS is regulated by the SPRY domain-containing SOCS box protein family linking iNOS to the elongin BC-Cul5-Rbx2 E3 ubiquitin ligase complex」 The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric

oxide, 京都国際会議場 (2010. 6. 17)

- ⑧ Takashi Uehara : 「Detection of oxidized ER protein by nitrosative/oxidative stress with a specific antibody」 The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric oxide, 京都 (2010. 6. 16)

〔図書〕 (計 6 件)

- ① 上原 孝 : 一酸化窒素 (NO) 結合性 (S-ニトロシル化) タンパク質の網羅的同定, 生化学85(1), p6 (2013)
- ② 上原 孝 : 小胞体内ニトロシル化による神経変性疾患の発症, 脳 2 1, p6 (2013) 金芳堂
- ③ 上原 孝 : タンパク質ニトロシル化による細胞生死調節, 実験医学30(17), p7 (2012) 羊土社
- ④ 鎌田英明, 上原 孝 : 発癌/神経細胞の生死に関わる細胞内ROSシグナル制御, 細胞工学31(2), p6 (2012) 秀潤社
- ⑤ 上原 孝 : NOはPI3-キナーゼ-Aktシグナルのスイッチ分子として機能している, 実験医学29(18), p4 (2011) 羊土社
- ⑥ 上原 孝 : NO・ニトロソシグナルと細胞死, 実験医学27(15), p5 (2009) 羊土社

。

〔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〕
報道関連情報

- ① 平成 23 年 6 月 7 日掲載, 山陽新聞 (27 面)
「NO 濃度細胞生死の鍵/脳梗塞新薬に期待」
- ② 平成 23 年 6 月 7 日放送, RSK 山陽放送 RSK ニュース 「脳梗塞に新たな治療の可能性」
- ③ 平成 23 年 6 月 7 日放送, KSB 瀬戸内海放送 KSB ニュース 「脳こうそくの治療に期待 世界初の発見」
- ④ 平成 23 年 6 月 7 日 WEB 掲載, 東京新聞「細胞生死の鍵は NO, 治療応用も」
- ⑤ 平成 23 年 6 月 7 日 WEB 掲載, 福井新聞「細胞生死の鍵は NO, 治療応用も」
- ⑥ 平成 23 年 6 月 16 日掲載, 朝日新聞 (29 面) 「一酸化窒素濃度 脳細胞生死の鍵」
- ⑦ 平成 23 年 6 月 17 日掲載, 科学新聞 (4 面) 「細胞生死の鍵握る一酸化窒素 2 面性の作用機構解明 ガンなどの新たな治療薬も」
- ⑧ 平成 23 年 6 月 19 日掲載, 読売新聞 (31 面) 「細胞の保護・破壊 濃度次第 一酸化窒素の作用解明」

ホームページ等

http://www.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

なし

(3) 連携研究者
なし