

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21890086

研究課題名(和文) 一酸化窒素によるタンパク修飾のパーキンソン病における役割の検討

研究課題名(英文) Investigation for roles of post translational modification by nitric oxide (NO) in Parkinson's disease.

研究代表者

小澤 健太郎 (OZAWA KENTARO)

京都大学・薬学研究科・特定助教

研究者番号：80507393

研究成果の概要(和文)：家族性のパーキンソン病の原因遺伝子である Parkin が S-ニトロシル化による修飾が孤発性のパーキンソン病の発症に関与していると考え、修飾されているアミノ酸の同定およびその修飾機構の解明を試みたが、修飾されているアミノ酸を同定することはできなかった。一方で Parkin の基質である Synphilin-1 が S-ニトロシル化されていることを示し、その安定性を制御していることを見いだした。今後も引き続き Parkin の修飾アミノ酸の同定を続けるとともに、Synphilin-1 の S-ニトロシル化がパーキンソン病の発症に関与しているかどうかを検討したいと考えている。

研究成果の概要(英文)： It is reported that S-nitrosylation of Parkin regulates its activity and might play a role in the pathogenesis of Parkinson's disease, however, its function in physiological or pathophysiological situation is incompletely understood. I have tried to identify cysteine residue(s) S-nitrosylated in Parkin by proteomics method using MS and generating truncated forms of Parkin. I found some candidate cysteines but did not confirm that those are S-nitrosylated in physiological conditions. On the other hand, I found Synphilin-1, which is reported to be ubiquitinated by Parkin, was S-nitrosylated by nNOS. These data indicate not only Parkin itself but substrate of Parkin is regulated via S-nitrosylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,261,000
2010年度	970,000	291,000	1,391,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：パーキンソン病、一酸化窒素、タンパク質翻訳後修飾

## 1. 研究開始当初の背景

私は大阪大学での大学院生時代、そして金沢大学での研究員時代においては、低酸素における小胞体シャペロンの発現とその細胞を保護するメカニズムに関して研究してきた。具体的には、低酸素ストレスに暴露さ

れた細胞が、種々の細胞株、神経細胞や平滑筋細胞を問わず、小胞体に存在する分子シャペロンの発現を誘導し、またその発現は細胞が低酸素環境下で生存するのに必要であることを示した。また遺伝子改変マウスを使い、小胞体のシャペロンの発現が、脳虚血におけ

る神経細胞の生存に必要であることを示し、低酸素における小胞体シャペロンの発現誘導が、実際の生体内で必要であることを示した。また脳虚血のような病理的な状況下だけでなく、小脳の発達過程においても分子シャペロンが神経の生存を制御していることも示した。

私が小胞体シャペロンの生理的、病理的役割を研究している間、神経変性疾患の発症メカニズムに関して世界的に多くの報告がなされた。それは主として、分子生物学の手法を用いて、家族性の神経変性疾患の家系より原因遺伝子を同定するという方法で、ポリグタミン病、アルツハイマー病、そしてパーキンソン病などの原因遺伝子が新たに同定されたことが契機となっている。ポリグタミン病は、アルツハイマー病では、家族性のアルツハイマーの家系よりプレセニリン1と2が新たに原因遺伝子として同定され、その後の研究でこの蛋白が APP を切断して、アルツハイマー病患者の脳組織に蓄積する A $\beta$  を産生する酵素であることが分かっている。また家族性パーキンソン病の家系からは、新しく Parkin がパーキンソン病の原因遺伝子として同定され、その後の研究で Parkin はユビキチン化を司る E3 ligase であることが分かっている。

以上のような研究から、神経変性疾患の共通したメカニズムとして、蛋白の凝集、蓄積ということが提唱されております。その凝集する蛋白の種類、場所などは、それぞれの疾患によって違いがあるにもかかわらず、多くの神経変性疾患に、蛋白の凝集物が病的に認められること、また新たに同定された原因遺伝子が凝集する蛋白そのもの、もしくは凝集する異常蛋白の生成、もしくは蛋白分解に関わっていることなどから、この説はかなり有力ではないかと考えられている。小胞体のシャペロンもこのような異常蛋白質の蓄積から細胞を保護する働きがあると考えられ、実際に Parkin の基質の1つであると考えられているパエル受容体の過剰発現による細胞死を、小胞体シャペロンの発現が防いでいることを証明した。

このように神経変性疾患の発症メカニズムはかなり解明されつつあるが、これらはすべて家族性の神経変性疾患をモデルにした系でおこなわれており、弧発性の神経変性疾患で同じことが起こっているという直接的な証明はほとんどなされていない。また異常蛋白質の凝集以外にも、酸化ストレス、ミトコンドリア異常、細胞外もしくは細胞内プールからのカルシウム流入によるプロテアーゼなどの活性化、Bcl 2 ファミリーや caspase などのアポトーシスをおこす蛋白質の関与など、非常に多岐にわたって神経変性疾患のメカニズムは論じられてきており、それぞれ

に説得力のあるデータが存在している。これらをつなぐ物質やメカニズムが何かあるのではないかというのが、私の長年の疑問であり、それがレドックスシグナリングではないかという仮説を漠然と持っていました。

私がレドックスシグナリングに興味を持ったのは、膵臓の $\beta$ 細胞において NO による細胞死と小胞体ストレスを結びつけた論文を読んだことによります。この論文においては小胞体ストレスによる細胞死を促進する転写因子として知られている CHOP の KO マウスにおいて、NO による細胞死が減弱していることを証明されている。また私自身でも、過酸化素刺激によって小胞体ストレスが誘導されることを見だし、これが糖尿病におけるインスリン抵抗性を小胞体シャペロンが改善するメカニズムであることを提唱した。小胞体ストレスによる蛋白の誘導のメカニズム、いわゆる Unfolded Protein Pathway (UPR) は、実験的にはツニカマイシンやサブシガルギンといった小胞体ストレスを特異的に起こす試薬によりおこなわれてきたが、私は実際の生体内での小胞体ストレスを起こすのは、低酸素とともにレドックスシグナリングの活性化があるのではないかと考え、NO の研究で有名な Stamler 博士の研究室で研究を始めることとした。

Stamler 博士の研究室においては、NO による蛋白のシステインの修飾、S-nitrosylation ということを中心にしている。EDRF の正体が NO であると証明され、その作用メカニズムはグアニル酸シクラーゼ (GC) を活性化することであるとされている。しかし GC の阻害剤を使った研究などにより、GC を介する経路以外にも NO の作用メカニズムがあることが示唆されていた。1992 年、Stamler 博士は NO による蛋白のシステインチオール基の修飾が生理的条件下で生じていることを証明した。その後、NO による蛋白質のシステインチオール基への修飾 (S-nitrosylation) は実際に、様々な蛋白質におこっており、その蛋白質の機能を制御していることが示されてきた(表 1 参照)。その中には、神経変性疾患に関係すると思われる蛋白質も多く含まれており、アポトーシスの経路にて中心的役割を担っていると考えられている Caspase ファミリー、中でも Caspase-3 は S-nitrosylation により、抑制されることが報告されている。最近になり、Snyder 博士のグループから、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) が S-nitrosylation により修飾され、アポトーシスを促進することが示された。神経細胞におけるシナプスの制御に大きな役割を果たしている NMDA receptor は、S-nitrosylation により巧妙に制御されていることが、Lipton 博士と Stamler

博士の共同研究により明らかにされている。また低酸素における蛋白の誘導を司っている Hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) や、様々なストレス時における蛋白誘導を司っている(NF- $\kappa$ B)も、S-nitrosylationによる修飾により活性が制御されている。細胞のレドックス代謝の制御にかかわっている Glutathione (GSH)と Thioredoxin (TRX)も S-nitrosylation により修飾されているが、その役割は完全には明らかになっていない。また Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)と いったいわゆる mitogen-activated protein (MAP) kinase を形成する蛋白質の中にも、S-nitrosylation により修飾されるものがあり、S-nitrosylation が細胞内のシグナル伝達に大きくかかわっていることを示している。最近になり、家族性のパーキンソンの家系から原因遺伝子として同定された Parkin や小胞体内で disulfide 結合をおこなっている protein disulfide isomerase (PDI) が、S-nitrosylation により修飾されることが示され、S-nitrosylation が神経変性疾患における異常蛋白の蓄積にかかわっている可能性が示唆されている。

以上に示したように NO による蛋白質の修飾、S-nitrosylation は神経変性疾患に関係していると報告されている様々な蛋白質においておこっており、また S-nitrosylation は酸化ストレス、低酸素ストレスなどの外界ストレスに大きく影響されることより、弧発性の神経変性疾患にかかわっている可能性が高いと考えている。

2004 年に Science と Proceedings of the National Academy of Sciences に Parkin の S-ニトロシル化による制御が報告されたが、修飾部位の同定など詳細なメカニズムは明らかにされず、その後も報告がない状況が続いている。一方で Parkin がパーキンソン病の発症に関与していることは多くの報告があり、Parkin の S-ニトロシル化機構の解明は孤発性のパーキンソン病の解明に重要であると考えられていた。

## 2. 研究の目的

パーキンソン病は神経変性疾患としてはアルツハイマー病に次ぐ症例数であり、家族性のパーキンソン病の解析により新たな原因遺伝子が同定されているものの、症例の大半を占める弧発性パーキンソンに至っては全く手がかりのない状態である。一方で NO の作用メカニズムは主にグアニル酸シクラーゼ (GC) を活性化であるというのが定説であるが、GC の阻害剤を使った研究などにより GC を介する経路以外にも NO の作用メカニズムがあることが示唆されていた。1992 年 Stamler 博士は NO による蛋白のシステイン

の修飾 (S-nitrosylation) が生理的条件下で生じていることを証明し、様々な蛋白質でその蛋白質の機能を制御していることが報告されている。最近になり、家族性のパーキンソンの家系から原因遺伝子として同定された Parkin が、S-nitrosylation により修飾されることが示され、S-nitrosylation が神経変性疾患における異常蛋白の蓄積にかかわっている可能性が示唆されている。今回申請する研究はこの NO による Parkin の修飾を阻害する試薬をスクリーニングするというものである。

## 3. 研究の方法

今回の研究は 大別して 2 つの研究が含まれている。一つは Parkin の S-ニトロシル化されるシステインの同定及びその修飾と病態の関係の検討であり、2 つめが Parkin の S-ニトロシル化を抑制する薬剤のスクリーニングである。

まず Parkin の NO により修飾されるシステインを同定する。Parkin の cDNA を取得済みであり、この cDNA を使って、システインを他のアミノ酸、具体的にはセリンに置換したミュータント (Cys-mutant) を作成する。Cys-mutant をパーキンソン病の研究においてよく使われている neuroblastoma の細胞株、SH-SY5Y 細胞に強制発現させ、Biotin-Switch 法により同定を試みた。

Biotin-Switch Assay は 2001 年に Snyder 博士のグループが開発した方法で、現在では S-nitrosylation により修飾された蛋白質を同定する方法としては、スタンダードになっている。方法の概略は、まず MMTS にて修飾されてないシステインのチオール基を置換した後 (blocking)、アスコルビン酸にて修飾されたチオール基を還元後、ビオチンに置換するという方法である。この一連の反応後、ビオチン化された蛋白質を精製し、その後ある蛋白質特異的な抗体でウェスタンブロットを行う。Wild-type と Cys-mutant の発現レベルが同じになるように SH-SY5Y 細胞に強制発現させ、その後 Biotin-Switch 法により S-nitrosylation のレベルを比較する。内在性の wild-type の Parkin と区別するため、強制発現する Parkin には FLAG タグをつける。以上のように修飾されるシステインが同定されれば、Parkin の S-ニトロシル化の病的意義がより深く検討されるはずである。

今回は時間の関係上行うことができなかったが、Parkin の S-ニトロシル化を抑制する物質の同定を行うことを考えて現在準備を進めている。すなわち Parkin の S-ニトロシル化を減少させる薬剤のスクリーニングを考えている。方法としては Parkin を恒常的に発現させる細胞株を作成し、その細胞にスクリーニングする薬剤を負荷し培養する。その後、細胞を溶解し、修飾されてないシ

ステインのチオール基を置換した後 (blocking)、アスコルビン酸にて NO に修飾されたチオール基を還元する。その後、Parkin のみを FLAG tag を用いて不動化し、5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)によりフリーのチオール基を発色・定量する。これは 96 穴プレートにて行うことが可能であり、薬剤のスクリーニングが可能であると考えている。

Parkin が家族性パーキンソン病の原因遺伝子であることは既に認知されており、これが一酸化窒素による修飾により活性がなくなる現象は、疾患の大部分を占める弧発性の発症機序に深く関与していると考えられる。本研究により、その修飾のメカニズムが解明され、またその修飾を抑制する薬剤を同定できれば、弧発性パーキンソン病の治療に大きく寄与すると考えられる。

#### 4. 研究成果

残念ながら当初予定していた Parkin の修飾アミノ酸を同定することはできなかった。ただ候補はかなり絞れており、今後引き続き検討する。また Parkin の基質が複数、S-ニトロシル化による修飾を受けていることを見いだした。こちらに関してはその役割などを検討中である。

#### 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 2 件)

① 小澤 健太郎 一酸化窒素 (NO) による 7 回膜貫通型受容体の制御とその気管支喘息の病態における関与の可能性 日本薬理学雑誌 136 2010 98-102 査読無し

② Regulation of GPCR by S-nitrosylation  
Ozawa K.  
Seikagaku. 2009 Jan;81(1):42-6. 査読無し

[学会発表] (計 3 件)

① The 6 回国際 NO 学会 京都市 2010 年 6 月 16 日 小澤 健太郎 Identification of S-nitrosylated proteins induced by MPTP.

② 第 20 回北九州心血管機能研究会 北九州市 2009 年 7 月 2 日

「一酸化窒素 (NO) の新しい作用機構: S-ニトロシル化による G タンパク質共役型受容体の制御」

小澤健太郎

③ 第 9 回日本 NO 学会学術集会 静岡市

2009 年 5 月 8 日

「S-ニトロシル化による GPCR の制御」

小澤健太郎

[その他]

ホームページ等

特記すべきものなし。

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 健太郎

(OZAWA KENTARO)

京都大学・薬学研究科・特定助教

研究者番号: 80507393

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし