

<平成 20 年度助成>

老人性認知症・運動障害発症に対する機能性食品 / サプリメントの予防効果

上原 孝

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

1. 緒言

神経細胞は虚血ストレスに対して脆弱であり、すみやかに死に至る。脳虚血時にはグルタミン酸の過剰量放出が起こり、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とそれに伴う一酸化窒素合成酵素 (NOS) の活性化を介した一酸化窒素 (NO) の産生が惹起される (図 1)。NO は蛋白質システイン残基チオール基の修飾 (S-ニトロシル化) を引き起こし、その機能に影響を与えることが明らかにされつつある。とくに、細胞内 S-ニトロシル化蛋白質を特異的に検出する Biotin-switch 法の開発¹⁾以来、Parkin²⁾ や caspase³⁾ など数多くの基質蛋白質が同定され、それらの酵素活性に対する効果や種々の生理的あるいは病態発症機構が提唱されている。当研究室では、脳虚血ストレス抵抗性因子である蛋白質ジスルフィドイソメラーゼ (protein-disulfide isomerase; PDI) が NO により S-ニトロシル化され、酵素活性が消失することを明らかにしている⁴⁾。さらにごく最近、新たな S-ニトロシル化蛋白質の網羅的スクリーニング系を開発し、その一つとして癌抑制因子である PTEN の単離同定にも成功している。この PTEN の S-ニトロシル化は脳神経系における細胞の生存あるいは死を制御する重要な鍵となっている反応であることを突き止めた⁵⁾。

PDI は小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) 内腔に存在し、新生蛋白質のジスルフィド結合形成に関わる酸化還元酵素であり、蛋白質の高次構造形成に必須である。さらに、PDI は折りたたみ不全蛋白質のフォールディングを促すシャペロン活

性も有している。また、PDI は植物から高等生物まで種を超えて保存されており、生物にとって必要不可欠な酵素である。しかしながら、脳梗塞あるいは老化によって酸化ストレス、とくに NO によるニトロソ化ストレスが負荷されると PDI の触媒部位システイン残基が S-ニトロシル化されることを明らかにしてきた。PDI の S-ニトロシル化は酵素活性を著しく消失させるために、結果として、ER 内に未成熟な変性蛋白質が蓄積することになる。その状態が続くといわゆる小胞体ストレスとなり、様々な小胞体を起源とした情報伝達系すなわち UPR: unfolded protein response が活性化される。この持続的な UPR の活性化により、細胞死惹起シグナルが ON となり、アポトーシスが誘導され、最終的に神経変性疾患が惹起されることが示唆されている。さらに特筆すべきことは、この S-ニトロシル化された PDI (SNO-PDI) は遺伝的な背景を有さない孤発性神経変性疾患患者 (アルツハイマー病やパーキンソン病) の死後脳においてのみ著明に認められたことである。したがって、この発見はこれまでに不明であった孤発性神経変性疾患発症にニトロソ化ストレス、とくに PDI の S-ニトロシル化が関与しており、小胞体に機能異常・小胞体ストレスを介して神経細胞死を惹起するという世界で初めてのコンセプトを提唱するに至った (図 1)。

細胞内 SNO-PDI の特異的検出法の開発は、孤発性神経変性疾患に対する早期診断に役立つことが期待される。そこで、SNO-PDI を特異的に認識する抗体の作出を考案したが、S-ニトロシル

基は不安定であり、抗原として不適であった。システインチオール基の酸化修飾には複数の段階があるが、これまでに、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 解析から PDI が NO 刺激によってスルフェン酸 (-SOH)、スルフィン酸 (-SO₂H) を形成することを明らかにしていた(図2)。また、一般に、S-ニトロシル化は可逆的な反応であるが、一方、最終的にスルホン酸まで酸化されると安定して存在することが知られている。そこでこのスルホン酸化 PDI の抗体の作出を試み、それを用いた薬物のスクリーニング系の構築を行うこととした。

2. 実験方法

2.1 スルホン酸化 PDI 特異的モノクローナル抗体の作出

PDI は N 末端側、C 末端側に 2 か所のチオレドキシシン様ドメインをもち、それぞれ活性部位とされる CGHC (Cys-Gly-His-Cys) 配列を有している。PDI はこの CGHC 配列に含まれるシステイン残基のチオール基と基質蛋白質チオール基との間で結合・解離することにより正しいジスルフィド結合形成を行う。当研究室では、これらのシステイン残基が NO や H₂O₂ の標的であることを明

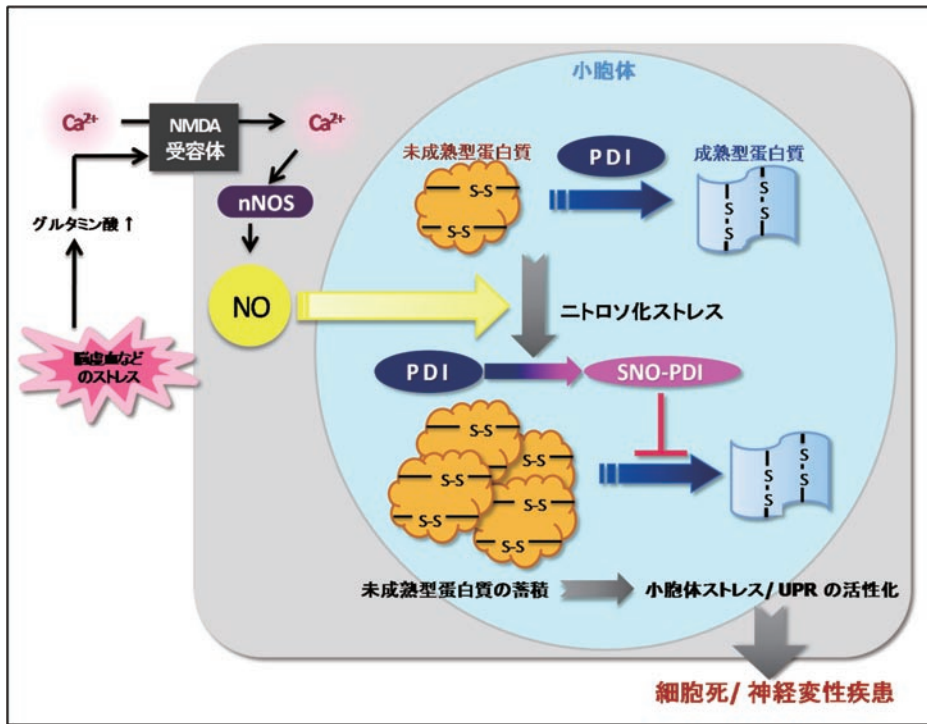


図1 PDIのS-ニトロシル化と小胞体ストレスを介した神経変性疾患惹起機構

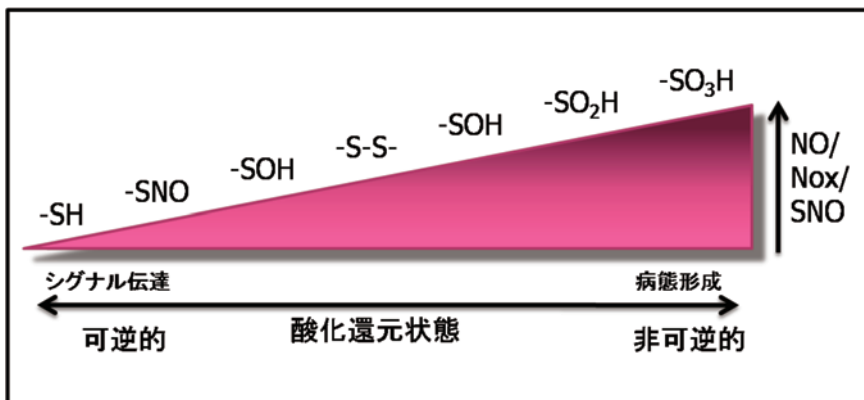


図2 蛋白質システインチオール基の酸化還元による修飾段階

らかにしてきた。そこで、このシステイン残基をスルホン酸化したペプチドを抗原とし、抗体のスクリーニングを試みた。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(-SO₃H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社のファージライブラリー(HuCAL GOLD[®])と反応させて候補抗体を選別した。ファージディスプレイ法は、150億種類以上のヒトFab抗体をコードするDNAをファージに導入し、Fab抗体ペプチドとファージコート蛋白質とを融合した形で発現させたファージライブラリーに抗原ペプチドを反応させ、結合したファージを選別(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、シグナルの高いものを選択し、本研究の対象とした。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。

本研究を始めるにあたって、まず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。その結果、野生型PDIおよびPDIの活性部位にあたるチオレドキシシン様ドメインにあるシステインをセリンに変異させた4種の変異体(C36/39S、C383/386S、C36/39/383/386S)をHEK293T細胞に強制発現させ、H₂O₂で6h処理後、可溶性画分に対して抗スルホン酸化PDI抗体を用いて免疫沈降反応を行った。その後、免疫沈降物に対して抗PDI抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。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レベルまでシグナルが減弱した。このことから、本抗体がスルホン酸化PDIを特異的に認識していること、さらにスルホン酸化修飾はS-ニトロシル化部位と同様に酵素活性に重要なチオレドキシシン様ドメイン中のシステイン残基で起きていることが明らかとなった。

2.2 Biotin-switch assay (図3)

S-ニトロシル化蛋白質の検出はBiotin-switch assayを駆使して行った。下図にその概略を示した。遮光した15mlチューブにBlocking bufferを予め分注し、そこへインキュベート後のサンプル全量を移し、50℃の恒温槽で20minインキュベートした。その間3minおきに転倒混和をした。未反応のMMTSを除去するため、-20℃アセトン10mlずつ加えて-20℃で20min静置した後、3000rpm, 4℃, 15min遠心分離した。上清を除き、-20℃アセトンで3回洗浄した後、アセトン

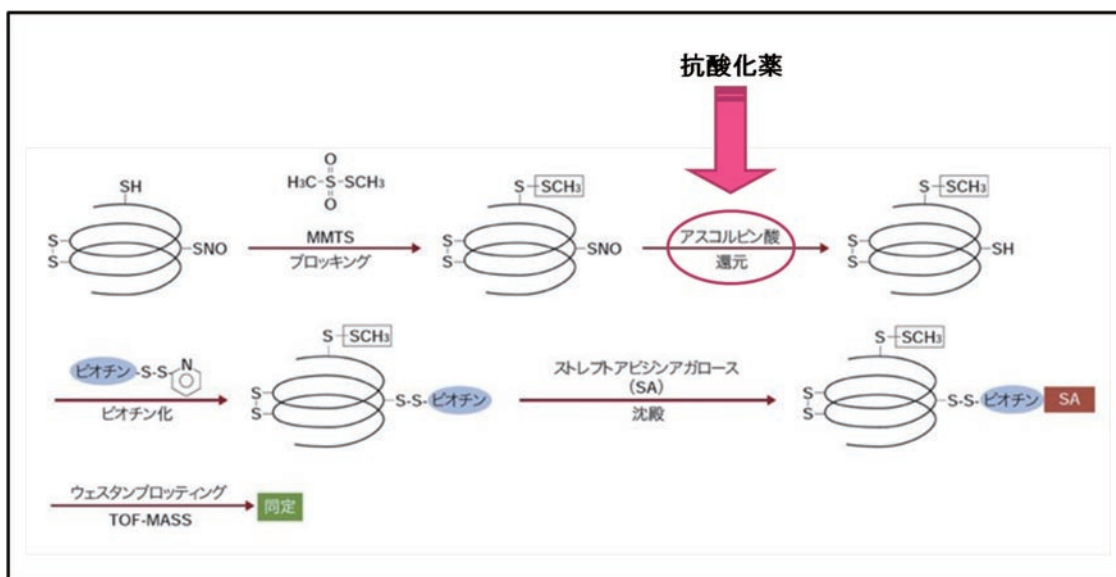


図3 Biotin-switch assayを利用した抗酸化薬のSNO-PDI還元能スクリーニング法の概略

が完全にきれいになるまでチューブを倒置した。その後、HENS buffer 200 ml でペレット状のサンプルを clear solution になるまでピペッティングにより溶解させ、新しい 15 ml チューブに移した。そこへ 4mM Biotin-HPDP 66 ml および Ascorbate solution あるいは 50 mM 抗酸化薬を 5 ml 加え、遮光、室温条件下 1h インキュベートした。

未反応の Biotin-HPDP を除去するため、 -20°C アセトンを $540\ \mu\text{l}$ ずつ加えて -20°C で 20 min 静置した後、3000 rpm, 4°C , 10 min 遠心分離した。上清を除き、アセトンが完全にきれいになるまでチューブを倒置した。その後、HENS buffer $450\ \mu\text{l}$ でペレット状のサンプルを clear solution になるまでピペッティングにより溶解させた、サンプル溶液の $20\ \mu\text{l}$ を input 用に新しい 1.5ml チューブに移した。Input 用サンプルには $4 \times$ Laemmli を 20 ml 加え、5 min 煮沸した。ここで、streptavidine-agarose gel $30\ \mu\text{l}$ / サンプルをそれぞれ新しい 1.5 ml チューブに取り、5000 rpm, 4°C , 1 min で遠心分離後上清を除き、Neutralization buffer を $30\ \mu\text{l}$ ずつ加えて懸濁した。サンプル $430\ \mu\text{l}$ に Neutralization buffer $800\ \mu\text{l}$ を加え、先に用意しておいた streptavidine-agarose gel の懸濁液のチューブにそれぞれ移し、パラフィルムで密閉後、ロ

ーター上にて 4°C で一晩インキュベートした。

翌日サンプルを 1000 rpm, 4°C , 1 min 遠心分離し、上清をピペットで静かに除いた。Neutralization buffer + NaCl 1 ml で streptavidine-agarose gel を 4 回洗浄した後、上清を完全に除いたサンプルに $4 \times$ laemmli buffer $20\ \mu\text{l}$ を加え、5 min 煮沸し、氷冷した。

3. 結 果

PDIの酸化がアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患発症の形成に関与していることが我々の研究から示唆されたことから、PDIの酸化を抑制する/あるいは酸化したPDIを還元するような抗酸化薬が見出されれば、孤発性神経変性疾患の予防や治療に貢献する可能性がある。そこで、抗体を用いたスルホン酸化PDI特異的検出法を利用し、PDIの酸化を特異的に抑制する薬物の探索を行った。

スルホン酸化PDIの形成の抑制する薬物の抗酸化作用には様々な機構が予想される。具体的には、①活性酸素種や活性窒素種などのラジカル種そのものを捕捉することによりPDIの酸化を妨げる、②可逆的な修飾であるS-ニトロシル化を受けたPDIのニトロソチオール基をチオール

基に還元する、③スルホン酸より酸化度の比較的低いスルフェン酸、スルフィン酸などで酸化された PDIを還元する、④(持続的な酸化刺激に対して)細胞内シグナル伝達を介して抗酸化作用を示す、などの機構が考えられる。本研究では特に、 H_2O_2 刺激によるスルホン酸化 PDIを減少させる抗酸化薬が①活性酸素捕捉能を有するか、またあるいは② SNO-PDIを還元するか否かを以下の実験により検討した。

まず、抗スルホン酸化 PDI 抗体を用いて、1 mM

H_2O_2 刺激によるスルホン酸化 PDI形成を抑制する抗酸化薬を探索した。

12種の既知抗酸化薬 A-L について、薬物 A-I 各 $100 \mu M$, J, K 各 $10 nM$, L $400 \mu M$ を 1 h 前処理した HEK293T 細胞に対し $1 mM H_2O_2$ により惹起された PDI のスルホン酸化が抑制されるか否かを検討した。その結果、7種の薬物 A, C, D, F, H, J, K においてスルホン酸化 PDI が著しく減少することがわかった(図 4 および図 5)。

次に、これらの薬物の PDI の酸化を抑制する作

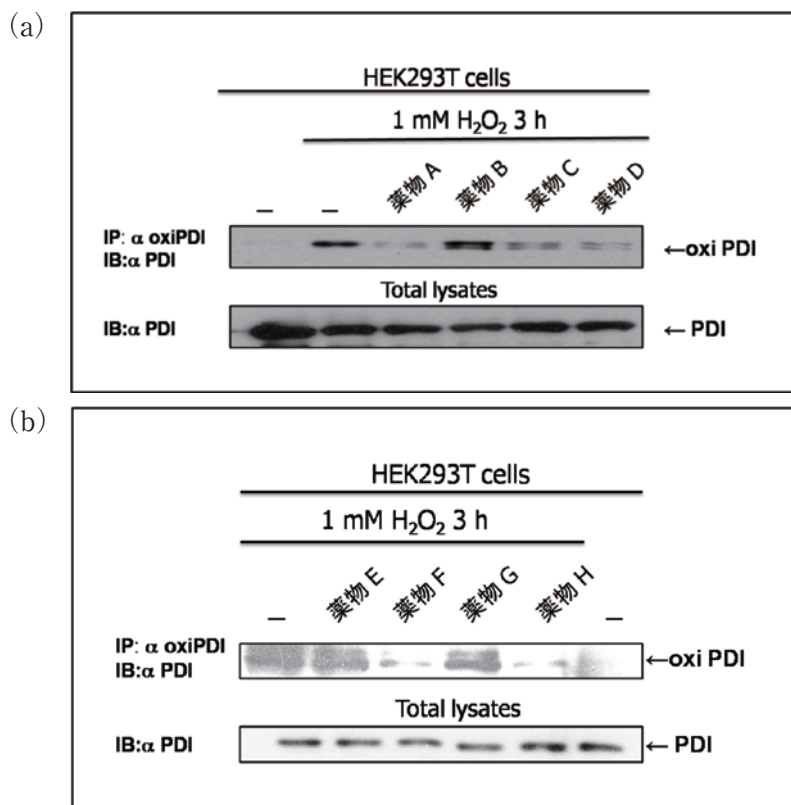


図 4 H_2O_2 刺激によるスルホン酸化 PDI 形成を抑制する抗酸化薬のスクリーニング
(a) 薬物 A, B, C, D 各 $100 \mu M$, (b) 薬物 E, F, G, H 各 $100 \mu M$,

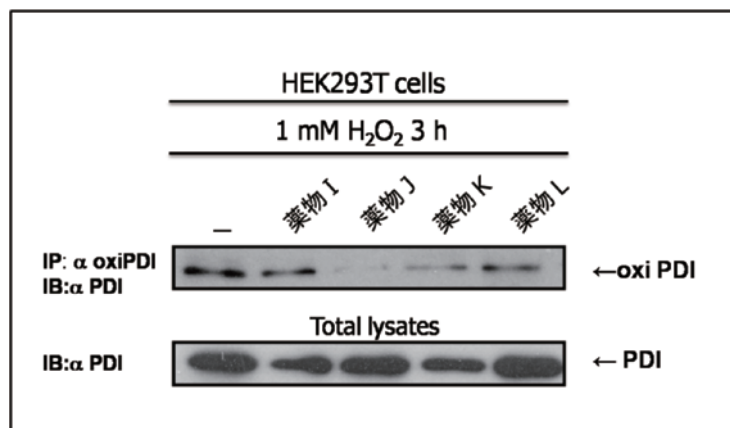


図 5 H_2O_2 刺激によるスルホン酸化 PDI 形成を抑制する抗酸化薬のスクリーニング
(c) 薬物 I $100 \mu M$, J, K 各 $10 nM$, L $400 \mu M$

用が、活性酸素捕捉能の有無によるものであるか否かを検討した。一部の抗酸化薬（薬物 B, E, F, G, H, J, K, L）について、その活性酸素捕捉能の有無を調べた。ルミノールの過酸化水素との反応による化学発光を抗酸化薬が抑制すれば、過酸化水素を直接捕捉している可能性を間接的に示すことができる。その結果、薬物 E, F, G, H, J でルミノール反応における化学発光量が著しく抑制された。一方、薬物 B, K ではコントロールとほとんど差がなく、一方、薬物 L はルミノール反応における化学発光量を増大させた（図 6）。

これらのことから、薬物 E, F, G, H, J はその強力な活性酸素捕捉能により過酸化水素に直接作用して PDI のスルホン酸化を抑制した可能性が示唆された。

さらに、これらの薬物が S-ニトロシル化された PDI を還元するか否かを検討するため、Biotin-switch Assay に応用してその効果の有無を検討した。Biotin-switch Assay では S-ニトロシル化蛋白質を還元するアスコルビン酸 (Asc) の代わりに抗酸化薬で処理した。その結果、薬物 B のみで、アスコルビン酸と同程度の還元作用があることが示唆された（図 7）。

4. 考 察

PDI のスルホン酸化を抑制する薬物は多く存在したが、PDI の S-ニトロシル化を還元する活性を持つ薬物は B のみであった。薬物 C, D, I は未検討であり、ラジカルスカベンジ能、S-ニトロシル化 PDI 還元能について今後検討する必要がある。

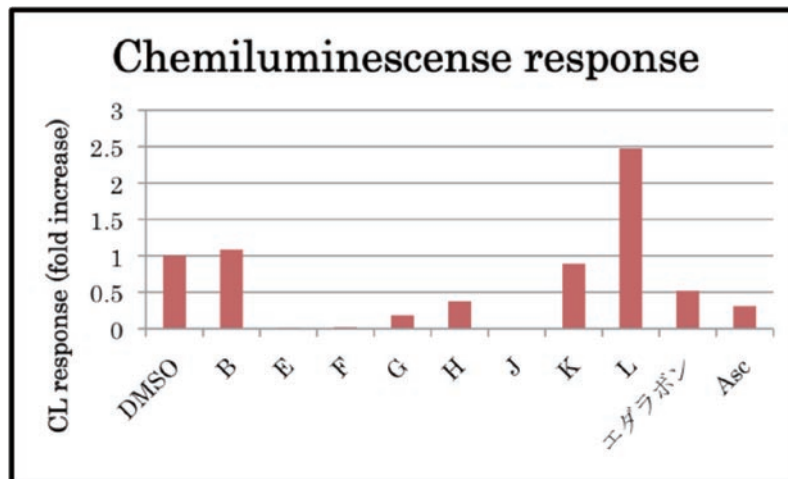


図 6 ルミノールの過酸化水素との反応による化学発光

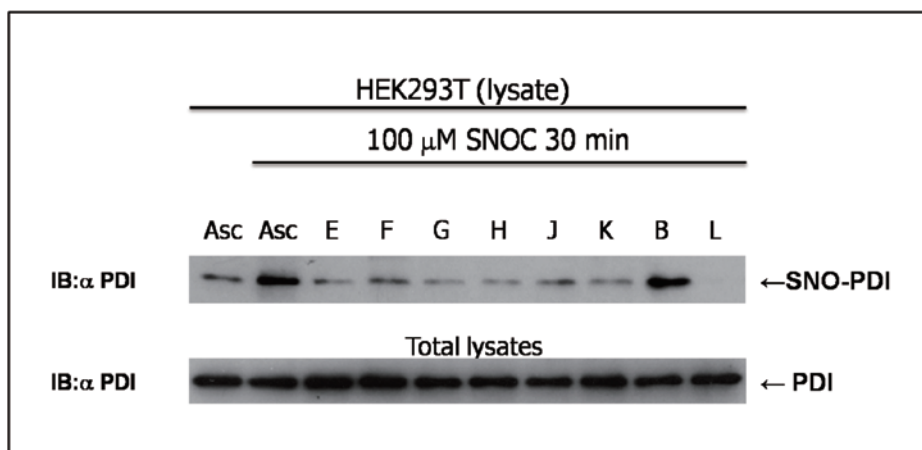


図 7 Biotin-switch Assay による抗酸化薬物の S-ニトロシル化 PDI に対する還元作用

ある。ただし、薬物 D は生体内に高濃度に存在し、中枢神経系においても重要な役割を果たすことが知られる物質であることから、今後臨床応用を視野に入れた際に中枢神経系において「抗酸化薬」としてそのまま投与することには慎重を要する。しかし、生体内における薬物 D 量は老化とともに減少するという報告があり、老化に伴う酸化ストレスの増加に対し抵抗性を示す内在性物質であるかもしれない。

データには示さなかったが、アスコルビン酸は、PDIのスルホン酸化を抑制する傾向がみられた。したがって、PDIのスルホン酸化を抑制し、かつ S-ニトロシル化 PDI還元能をもつと推定される薬物は現段階ではアスコルビン酸が有力な候補であることは間違いない。アスコルビン酸は IUPAC 命名法ではフランの誘導体と見なして、(R)-3, 4-ジヒドロキシ-5-((S)-1, 2-ジヒドロキシエチル)フラン-2(5H)-オンと表される水溶性物質である。一方、血液脳関門の機能により、脳には脂溶性の高い物質のみ移行可能であることが知られている。したがって、中枢神経系にアスコルビン酸を抗酸化薬として応用する場合、脂溶性をもつ構造へ変化させる工夫が必要であると考えられる。

アスコルビン酸が S-ニトロソチオール基を特異的に還元する機構については、最新の報告ではその詳細な機構が提唱されている⁶⁾。それによると、S-ニトロソチオール-アスコルビン酸反応では、アスコルビン酸の 4-位のヒドロキシル基の O 原子が S-ニトロソチオール基の N 原子を攻撃し、トランス S-ニトロシル化が起きる。O-ニトロソアスコルビン酸は自己分解により、NO とアスコルビルラジカルアニオン、あるいは亜硝酸イオンとアスコルビン酸となり、それぞれ再び反応に利用されると考えられている。

アスコルビン酸に類似した構造を持つ、とくにアスコルビン酸の 4-位のヒドロキシル基に類似

した特徴を持つ抗酸化薬が見いだされれば、それらは S-ニトロソチオール基に直接作用して還元する作用を有する可能性が高いと推定される。

薬物 L は、代表的なラジカルスカベンジャーとして知られているが、過酸化水素により産生したヒドロキシラジカルに対するスカベンジ能を示さず、逆にルミノール反応による化学発光量を増加させた。これに関しては、L 単独ではラジカルスカベンジ能を示さないがアスコルビン酸と協働して強力なラジカルスカベンジ機能を発揮するという報告があり、これを支持する結果であるかもしれない。アスコルビン酸と混合した際にラジカルスカベンジ能を発揮するか否かを検討する必要がある。効果が認められる場合には、アスコルビン酸の欠点（中枢神経系への作用を考える場合の欠点、水溶性であることなど）を補い（その場合にはアスコルビン酸自体にも脂溶性を増す工夫が求められるが）、強力な抗酸化薬として臨床応用の可能性があるかもしれない。

今後、PDIの酸化を抑制し、かつ S-ニトロシル化 PDIを還元するような抗酸化薬が見いだされれば、蛋白質の還元を介して神経変性疾患の症状緩和に貢献するかもしれない。

5. 結 論

本研究から以下の知見を得た。

1. 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。
2. 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。
3. 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。また、ビオチンスイッチ法や活性

酸素捕捉能測定により、抗酸化物の作用の違いを明らかにできる可能性を示した。

PDIの酸化を活性酸素種自体の産生抑制、あるいはそれらを捕捉する薬物はPDIの酸化を未然に防ぎ、小胞体ストレスを介して発症する孤発性神経変性疾患の予防薬として応用できる可能性がある。また、PDIの酸化やS-ニトロシル化を還元するような抗酸化薬は、前述の疾患の治療に貢献することが期待される。

今後、PDIの酸化を抑制する抗酸化薬を新たに見出していくとともに、その詳細な機構についてさらに検討していく必要がある。また、これら抗酸化薬がパーキンソン病モデル動物に作用し、酸化を抑制して細胞死/症状を緩和するか否かを検

討していくことが重要と思われる。

文 献

- 1) Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. *Nat Cell Biol.* 2001; 3(2): 193-7.
- 2) Chung KK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson VL, Dawson TM. *Science* 2004;304(5675):1328-31
- 3) Mannick JB, Schonhoff C, Papeta N, Ghafourifar P, Szibor M, Fang K, Gaston B. *J Cell Biol.* 2001;154(6): 1111-6.
- 4) Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. *Nature.* 2006;441(7092): 513-7.
- 5) 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 SA, Uehara T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011;108(25): 10349-54.
- 6) Kirsch M, Buscher AM, Aker S, Schulz R, de Groot H. *Org. Biomol. Chem.*, 2009;7(9):1954-1962.

Novel screening system for new type of anti-oxidant reagents with a specific antibody

Takashi Uehara

*Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences
Okayama University*

We have demonstrated that protein-disulfide isomerase (PDI), a thioredoxin-related ER chaperone, functions as a protective protein against apoptotic neuronal cell death triggered by hypoxia/ischemia. On the other hand, protein quality control is known to be a critical system of intracellular homeostasis. Particularly, misfolded proteins produced in ER lumen are rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. Free radicals including nitric oxide (NO) are known to induce the accumulation of misfolded proteins in cells. Interestingly, we have found that S-nitrosylation/oxidation of PDI results in protein misfolding leading to neuronal cell death/sporadic neurodegenerative diseases. Furthermore, we could detect the S-nitrosylated form of PDI in cells by treatment with not only NO/glutamate but also in brains manifesting sporadic Parkinson's or Alzheimer's disease. Oxidation of PDI attenuates the enzymatic chaperone and isomerase activities, leads to accumulation of poly-ubiquitinated proteins, and activated the unfolded protein response in primary cortical neurons. Hence we speculate that there is a relationship between dysfunction of ER enzyme via oxidation and onset of sporadic neurodegenerative disorders.

The aim of this study is to establish the assay system to detect oxidized PDI (PDI-SO₃H) with a specific antibody and to isolate the new type of anti-oxidant derivatives by means of this antibody. We initially attempted to isolate the specific monoclonal antibody that recognizes oxidized domain of PDI. We screened human antibodies that bind to the synthetic peptide (EFYAPWC(-SO₃H)GH) using an antibody library displayed in M13 phage by an ELISA assay and then obtained several candidates. Consequently, a clone could be employed to detect oxidized form of PDI in response to NO and hydrogen peroxide. Thus, we succeeded to establish the specific monoclonal antibody that recognizes oxidized form of PDI. Then, we examined if several known anti-oxidants prevent the oxidized formation of PDI induced by NO/hydrogen peroxide (H₂O₂). Some compounds actually had an ability to attenuate the oxidized formation of PDI by NO/H₂O₂, however, those were attributed to function as a radical trapper. Interestingly, since a compound revealed both the inhibition of the oxidized formation of PDI and non-radical trapper activity, this chemical might be a new type of anti-oxidant which results in the reduction of a particular protein as seen in ascorbate *in vitro*. Therefore, we are now trying to demonstrate the ability of this compound in cells and *in vivo* system.