

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350985

研究課題名(和文)熱ショック蛋白質を誘導して網膜を保護する分子のケミカルバイオロジー

研究課題名(英文)Chemical biology of retina-protective electrophilic compounds

研究代表者

佐藤 拓己 (SATO, Takumi)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：10300831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：NRF2だけを活性化するD3とNRF2とHSF-1を活性化する低分子プローブD1を創製した。D1はD3よりもチオールへの結合性が高かったため、NRF2やHSF-1の活性化が決まることを証明した。すなわちD1はNRF2とHSF-1の両方を活性化し、D3はNRF2のみを活性化した。網膜細胞においてD1は酸化ストレスと小胞体ストレスによる細胞死を抑制したが、D3は酸化ストレスによる細胞死だけを抑制した。D1は光刺激による盲目の細胞死を有意に抑制したが、D3は全く抑制しなかった。光刺激は酸化ストレスと小胞体ストレスが複合的に発生するため、D1だけが保護作用を有することができると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Keap1/Nrf2 and HSP90/HSF-1 pathways play a central role in combatting cellular oxidative damage and related endoplasmic reticulum stress. Electrophilic compounds have been shown to be activators of these transcription-mediated responses. We hypothesized that the para-hydroquinone moiety was critical for this activation because it enhanced transcription of these neuroprotective pathways to a greater degree than that of the corresponding ortho-hydroquinone isomer. This notion was based on the differential oxidation potentials of the isomers for the transformation of the hydroquinone to the active, electrophilic quinone species. Here, to further test this hypothesis, we synthesized a pair of para- and ortho-hydroquinone-based proelectrophilic compounds and measured their redox potentials using analytical cyclic voltammetry. The redox potential was then compared with functional biological activity, and the para-hydroquinones demonstrated a superior neuroprotective profile.

研究分野：神経科学

キーワード：Nrf2 HSF-1 Keap1 HSP90 Electrophile Neuronal death Oxidative stress Retina

1. 研究開始当初の背景

網膜細胞は常に強い酸化ストレスに暴露されているが、転写因子の活性化を介したストレス応答によって耐性が誘導されることによって生存が維持される。特に酸化ストレスと小胞体ストレスは統一的に転写を調節する“マスター転写因子”が存在し、それぞれ NRF2 及び HSF-1 と呼ばれる。これらのマスター転写因子は抗酸化酵素群及び熱ショック蛋白質を誘導して網膜細胞に耐性を与える。注目すべきは、細胞にストレスを与えずにマスター転写因子を活性化する一群の化合物(親電子性物質)が存在することである。研究代表者はローズマリー由来のカルノシン酸をはじめとした、親電子性物質の脳保護作用を研究してきた。熱ショック蛋白質は熱ショックで誘導される蛋白質として古くから知られていたが、ここ 20 年程の研究で蛋白質の高次構造を維持することが主な役割であることが明らかになった。一方ハンチントン舞蹈病やアルツハイマー病などの中枢神経系の疾患において、蛋白質の高次構造が壊れた変性蛋白質の蓄積が最も基本的な病因であることがわかった。従って熱ショック蛋白質の誘導によって脳や網膜を保護するという仮説は多くの研究者から提出された。しかし直接的な証明はまだない。この仮説を証明するため代表者と Stuart A Lipton(Sanford-Burnham Medical Research Institute)のグループは、網膜細胞に熱ショック蛋白質を誘導して、網膜細胞を酸化ストレスと小胞体ストレスから保護する分子 D1 を創製した(Satoh et al., J Neurochem 2011)。この分子が親電子性物質であり、NRF2 及び HSF-1 を活性化して、抗酸化酵素群と熱ショック蛋白質を誘導することは 2011 年度 Journal of Neurochemistry に Full paper で報告した。この論文は親電子性物質である D1 が NRF2 及び HSF-1 をともに活性化して、網膜細胞を保護するという点で画期的である。本研究は” NRF2 及び HSF-1 をともに活性化”することの分子機構を、化合物のシステイン残基への結合性という観点から明らかにすることを主な目標におく。

2. 研究の目的

網膜細胞は、光刺激を直接受けるため、酸化ストレスに常に暴露されている。その機能を保護するため、転写を介した「ストレス応答」を備えている。NRF2 を介した抗酸化酵素群の誘導(酸化ストレス)と HSF-1 を介した熱ショック蛋白質の誘導(小胞体ストレス)である。NRF2 は明らかになりつつあるのに対して、HSF-1 は不明のままである。この状況にブレイクスルーを創るためには、網膜細胞に HSF-1 を活性化する分子プローブが必要である。研究代表者らは最近、二つの経路を活性化して網膜を保護する親電子性物質を発見した。その過程で、NRF2 だけを活性化する分子群と NRF2 と HSF-1 をともに活性化する分

子群があることを発見した。この二つの分子群を分ける、最も基本的な性質は、特異的なシステイン残基への結合性にあると考える。この仮説を化学的な観点と生物学的な観点の両面から検証し、加齢黄斑変性の治療薬の開発への道を開くことを目的とした。

- (1) 化学的な観点とは、Cyclic Voltanography を用いて測定した化合物の酸化還元電位が、cell-free の系で測定した Keap1 や HSP90 の特異的なシステイン残基への結合性と関連することを証明することである。
- (2) 生物学的な観点とは、NRF2 や HSF-1 が調節する転写調節領域(ARE や HSE)の活性化と、抗酸化酵素や熱ショック蛋白質の誘導がこれらの分子群の化学的な性質と完全に相関していることを証明することである。さらに、網膜変性の病態モデルにおいて D1 が有効な保護分子であることを証明することである。

3. 研究の方法

NRF2 だけを活性化する分子群(D3:オルソ異性体)と NRF2 と HSF-1 をともに活性化する分子群(D1:パラ異性体)を分ける、最も基本的な性質が、特異的なシステイン残基への結合性にあることを、化学的な観点と生物学的な観点の両面から検証した。

(1) 創製分子が NRF2 と HSF-1 を活性化するメカニズムを明らかにすること: D1 と D3 のストレス応答の活性化の差異は転写因子 NRF2 と HSF-1 の調節蛋白質 KEAP1 と HSP90 への結合性(すなわち特異的なシステイン残基への S-アルキル化)の相違が大きな理由のひとつである。D1 と D3 は KEAP1 の 151 番目のシステインに結合するが、D1 のみが HSP90 の 420 番目のシステインに結合する。これを LC-MS/MS を用いて証明する。すなわち KEAP1 及び HSP90 の当該システインを含むペプチドを合成し、その結合性を LC-MS/MS を用いて定量的に測定する。さらに KEAP1 及び HSP90 蛋白質を用いて結合性の差異を証明した。この結合性の差異は親電子性(すなわち電子の奪われやすさ)ことに由来する。Cyclic Voltanography を用いて化合物の酸化還元電位が ARE や HSE の活性化と相関していることを証明した。

(2) 細胞レベルの実験: ヒト網膜由来の ARPE-19 細胞を用いて、網膜細胞において D1 及び D3 が NRF2 及び HSF-1 を活性化して酸化ストレスから保護することを証明した。

1 ARPE-19 細胞を用いて、細胞死の抑制作用及び細胞毒性を測定した。

2 RT-PCR 解析によって発現される遺伝子セットを同定する。これにより化合物が KEAP1/NRF2 経路及び HSP90/HSF-1 経路を主に活性化することを証明した。

3 細胞死の抑制作用の細胞内カスケードを同定する。転写エレメント ARE および HSE の活性化、抗酸化酵素群および熱ショック蛋白質の発現、グルタチオンの増加に注目して解析を行った。

4 薬理的にグルタチオンの増加を介して細胞死抑制を誘導すること証明した。

(3) LC-MS を用いたカルノシン酸の眼球内移行の測定(この実験は進行中であり、いまだ完了していない)

化合物が高濃度であれば、HPLC で検出可能であるが、生理的な濃度の化合物を検出するため、LC-MS を用いて行った。既に研究代表者らは、カルノシン酸の脳内移行を HPLC で測定し、2%程度の化合物が脳内に移行することを証明しているが、この解析では一度に数 mg 程度の化合物をマウスに負荷する必要があり、最近では化合物の検出方法を LC-MS に変えた。化合物の負荷を数十分の一程度に減らしても、HPLC と同様な脳内移行の検出に成功した。従って今回は、最適化合物の LC-MS を用いた脳内移行の証明を目指す。さらに眼球の網膜で薬理作用を発揮するために必要な体内での動態を明らかにする。

(4) 光誘導性網膜変性(LIRD)の抑制の証明(この実験は進行中であり、いまだ完了していない)

化合物が AMD の動物モデルである光誘導性網膜変性(LIRD)を顕著に抑制することを証明する。さらに眼球内特に網膜の色素細胞及びニューロンで抗酸化酵素群が誘導されることを示すことによって、化合物が確実に眼球内で作用していることを生物学的に証明する。さらに抗酸化酵素群や熱ショック蛋白質が有意に誘導されていることを証明し、眼球内で化合物が HSF-1 及び NRF2 を活性化することを介して網膜を保護していることを実験的に証明する。

4. 研究成果

網膜細胞は光刺激を直接的に恒常的に受けるため、酸化ストレスに常に暴露されている。網膜細胞はその機能を保持するため、転写因子 NRF2 や HSF-1 を介した「ストレス応答」を備えている。すなわち、NRF2 を介した抗酸化酵素群の誘導と HSF-1 を介した熱ショックタンパク質の誘導である。NRF2 を介したストレス応答は最近かなり明らかにされているが、HSF-1 を介した機構は不明のままである。この状況にブレイクスルーを創るためには、網膜細胞において HSF-1 を活性化する低分子プローブが必要である。研究代表者らはこの二つの経路を共に活性化する新規プローブ D1 の作用メカニズムの解析を行った。NRF2 だけを活性化する D3(オルソ異性体)と NRF2 と HSF-1 を活性化する低分子プローブを創製した。平成 25-26 年度においてその分子機構を明らかにして ASN Neuro(IF=4.436)に Full

Paper を発表した。研究代表者らは D1 が D3 よりも酸化還元電位がはるかに高いことを見いだしたが、この性質によってチオールへの結合性が制御されていることを証明した。すなわち D1 は D3 よりもチオールへの結合性が高かった。このチオールへの結合性の違いによって、NRF2 や HSF-1 の活性化が決まることを証明した。すなわち D1 は NRF2 と HSF-1 の両方を活性化し、D3 は NRF2 のみを活性化した。またヒトの網膜細胞において D1 は酸化ストレスと小胞体ストレスによる細胞死を抑制したが、D3 は酸化ストレスによる細胞死だけを抑制した。D1 と D3 の構造は、火度ロキノン部分がパラ型であるか、オルソ型であるかの相違だけであるから、この構造の差が生み出すチオールへの結合性の差が生理活性の差を生み出していると考えられた。27 年度において個体レベルでの網膜の保護作用を検証するため、ラットの光刺激による網膜保護作用を検討した。D1 は光刺激による盲目の細胞死を有意に抑制したが、D3 は全く抑制しなかった。しかし眼球内への移行性は有意に差がなかった。このことはラットにおける光刺激は酸化ストレスと小胞体ストレスが複合的に発生するため、この両方のストレスに対して耐性を与える D1 だけが保護作用を有することができると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1 . Satoh T, Stalder R, McKercher SR, Williamson RE, Roth GP, Lipton SA, 2015, Nrf2 and HSF-1 Pathway Activation via Hydroquinone-Based Proelectrophilic Small Molecules is Regulated by Electrochemical Oxidation Potential. ASN Neuro. 7(4), pii:1759091415593294, (査読有)

2 . Shimizu H, Koyama T, Yamada S, Lipton SA, Satoh T, 2015, Zonarol, a sesquiterpene from the brown algae *Dictyopteris undulata*, provides neuroprotection by activating the Nrf2/ARE pathway. Biochem Biophys Res Commun 457(4), 718-722, (査読有)

3 . Yamada S, Koyama T, Noguchi H, Ueda Y, Kitsuyama R, Shimizu H, Tanimoto A, Wang KY, Nawata A, Nakayama T, Sasaguri Y, Satoh T, 2014, Marine Hydroquinone Zonarol Prevents Inflammation and Apoptosis in Dextran Sulfate Sodium-Induced Mice Ulcerative Colitis. PloSone, 9(11), e113509, (査読有)

4 . Sasaki S, Tozawa T, Sugamoto K, Matsushita Y, Satoh T, 2013, A novel diterpene para-hydroquinone compound derived from cryptochinone protects neuronal cells against oxidative stress and activates the Nrf2/ARE pathway. Neurosci Lett 548(1), 132-136, (査読有)

5 . Sasaki S, Tozawa T, Sugamoto K, Matsushita Y, Satoh T, 2013, Diterpene para-hydroquinone compounds derived from cryptochinone inhibit adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells and activate the Nrf2/ARE pathway. Biosci Biotech Biochem 77(10), 2131-2133, (査読有)

6 .Satoh T, Mckercher SR, Tayebbeh R, Lipton SA, 2013, The Nrf2-targeted Antioxidant Actions of Pro-Electrophilic Drugs. Free Rad Biol Med Review 65(1), 645-657, (査読有)

4 .

〔学会発表〕(計 3 件)

1 . 佐藤拓己、東京工科大学先端食品セミナー(東京工科大学、2015年9月1日) 褐藻類由来のテルペノイドによるアンチエイジング

2 . 佐藤拓己、小山智之、山田壮亮 日本酸化ストレス学会(同志社大学、2014年9月14日) 褐藻類由来のゾナロールは潰瘍性大腸炎を抑制する

3 . Satoh T, Mckercher SR, Lipton SA, 2013, Nrf2 and hsf-1 pathway activation by hydroquinone-based pro-electrophilic small molecules associated with electrochemical oxidation potential. Nov8-13, San Diego, Soc Neurosci Abstr 43: 63.02.

〔図書〕(計 1 件)

1 . 佐藤拓己、ケトン体革命、エール出版、2016年4月16日、169p

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

1 . 名称：リパーゼ活性阻害剤、及び、その抽出製造方法

発明者：佐藤拓己、小山智之

権利者：東京海洋大学

種類：特許

番号：特願 2013-250309

出願年月日：2013年12月1日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.teu.ac.jp/info/lab/teacher/b/index.html?id=185>

<http://www.teu.ac.jp/info/lab/project/bio/dep.html?id=34>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤拓己 (SATO, Takumi)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：10300831