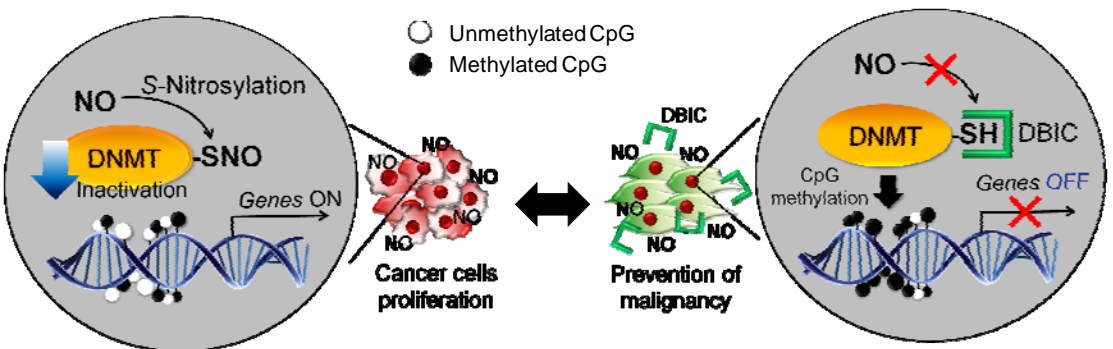


| | |
|---------|---------------------------------------|
| 氏名 | 奥田 洸作 |
| 授与した学位 | 博士 |
| 専攻分野の名称 | 薬科学 |
| 学位記授与番号 | 博甲第 5722 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 30 年 3 月 23 日 |
| 学位授与の要件 | 医歯薬学総合研究科 薬科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当) |
| 学位論文の題目 | エピゲノム制御酵素の S-ニトロシル化を介した活性調節機構 |

学位論文の要約

【グラフィックアブストラクト】



【背景・目的】

生体内で産生される一酸化窒素 (nitric oxide, NO) はガス状シグナル分子として、血圧調節や記憶形成など多様な生理活性を示す。その作用機構の一つとして、タンパク質システインチオール基の S-ニトロシル化 (SNO 化) を介した機能調節が提唱されている。翻訳後修飾の一つである SNO 化は可逆性であり、NO 適量産生下では生体恒常性に関わるシグナルとして機能する。一方、NO 過剰量産生下や長期曝露ではがんや神経変性疾患などの病態形成に深く関与することが知られている。当研究室ではこれまで、SNO 化タンパク質の同定とその機能解析に取り組み、パーキンソン病や脳虚血の病態形成機構を解明してきた。そこで、さらなる新規 SNO 化タンパク質を網羅的に探索するため、独自に開発した抗体アレイを利用したスクリーニングを行った結果、エピゲノム制御酵素を複数同定することに成功した。

エピゲノムは DNA やヒストンに対する修飾を指すが、環境やストレスに応じてそのパターンは変化し、遺伝子発現に影響する。最近、エピゲノムのパターン異常による遺伝子発現変動と、種々の病態形成との関係性が指摘され、精力的に解析が進んでいる。しかし、生体内でどのような分子機構によりエピゲノム異常が惹起されるのか、その活性調節機構についてはほとんど不明である。そこで、上記スクリーニングの結果より、エピゲノム制御酵素の SNO 化を介した活性調節の可能性を推定した。本研究ではスクリーニングで得られた候補タンパク質のうち、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) と DNA メチル基転移酵素 (DNA methyltransferase, DNMT) に着目し、SNO 化による活性調節機構を明らかにすることを目的とした。また、これまでに開発されていない分子特異的 SNO 化制御薬の探索を試み、その特性を薬理的に解析した。

【結果・考察】

1. SNO-HDAC6 形成による酵素活性抑制

スクリーニングにより HDAC2 と HDAC6 が SNO 化候補タンパク質として得られたが、HDAC2 は SNO 化を介した機能抑制を受けることが既に報告されていた。そのため、これまで報告の無い HDAC6 に着目し、SNO 化に対する影響を検討した。A549 細胞において内源性 HDAC6 は外来および内因性 NO により SNO 化された (図 1A)。また *in vitro* HDAC6 酵素活性に対する NO の影響を検討した結果、脱アセチル化活性は NO 依存的に有意に抑制された (図 1B)。HDAC6 は細胞質に局在するためエピジェネティクスには直接関係しないが、 α -tubulin や heat shock protein 90 などを脱アセチル化することでその機能調節を行うことが知られている。そこで、A549 細胞を NO 刺激した際の α -tubulin のアセチル化レベルを検出した。細胞を各種サイトカインで刺激して NO 合成酵素 (NO synthase 2, NOS2) を発現誘導し、NO 産生量を増加させたところ、アセチル化 α -tubulin レベルは有意に増加した。一方、NO 依存的アセチル化レベルの上昇は NOS 阻害薬である L-NAME によって抑制された (図 1C)。

以上より、HDAC6 は SNO 化を介して酵素活性が抑制され、その結果として細胞内 α -tubulin のアセチル化レベルが上昇することが明らかとなった。

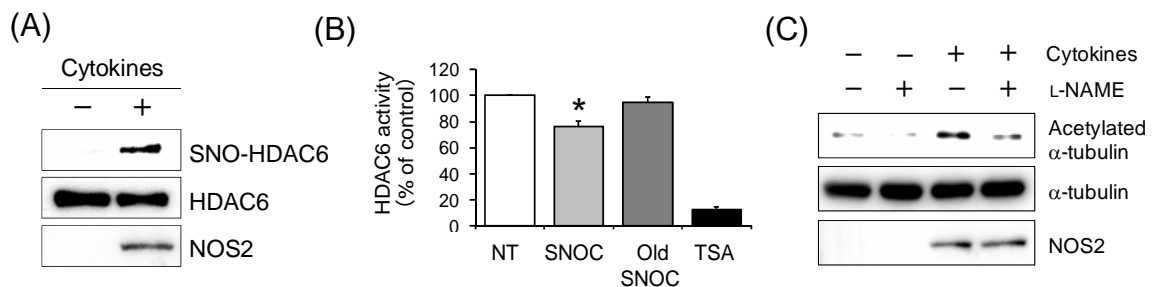


図 1. (A) サイトカイン (TNF- α , IFN- γ) 刺激による NOS2 活性化を介した SNO-HDAC6 形成。
(B) HDAC6 酵素活性に対する NO の影響. TSA = tubastatin A (HDAC6 阻害薬). * $p < 0.05$.
(C) α -Tubulin アセチル化レベルに対する NO の影響.

2. SNO-DNMT 形成による酵素活性抑制と DNA メチル化への影響

DNMT に関しても、SNO 化修飾およびそれによる機能変化に関する報告がなかったことから、詳細に解析した。DNMT には DNMT1, DNMT3A, DNMT3B のアイソフォームが存在し、いずれも DNA メチル化に関与している。まず、各 DNMT の SNO 化の有無を検討したところ、すべてのアイソフォームが NO 濃度依存的に SNO 化されることが分かった (図 2A)。また、変異体を用いた解析より、DNMT3B の SNO 化部位は活性中心と推定される 651 番目のシステイン残基 (Cys651) であることを見出した。

つぎに、*in vitro* DNMT 酵素活性に対する NO の影響を解析したところ、メチル化活性は NO 濃度依存的に抑制された。DNMT はシトシン-グアニン (CpG) 配列中のシトシンに対してメチル基を転移する酵素である。ゲノム上では遺伝子プロモーター近傍に CpG 配列が高頻度に集まる領域 (CpG アイランド) が存在し、この領域の CpG メチル化の頻度が下流における遺伝子の転写活性と逆相関する。そこで、NO が遺伝子上流の CpG アイランドのメチル化パターンおよびそれに伴う転写活性に影響を与えるか否かを検討した。各 DNMT を定常的に発現する AGS 細胞において、NO 依存的に CpG アイランドのメチル化パターンが変化する遺伝子をバイサルファイトシーケンス法により探索した。その結果、がん遺伝子の一つである *Ccnd2* (Cyclin D2) の CpG アイランドの一部が時間依存的に脱メチル化されることを見出した (図 2B)。また、NO による脱メチル化に応じて *Ccnd2* の転写活性が亢進することも分かった (図 2C)。さらに、RNA マイクロアレイ解析から、NO 依存的に転写量が増加する遺伝子を網羅的に探索したところ、複数の遺伝子を単離することに成功した。興味深いことに、これらの遺伝子の多くが CpG アイランドメチル化による発現制御を受けていることが報告されていた。

以上より、SNO-DNMT 形成による酵素活性の抑制は、CpG アイランドの脱メチル化を惹起し、遺伝子の発現増加に寄与する可能性が示唆された。

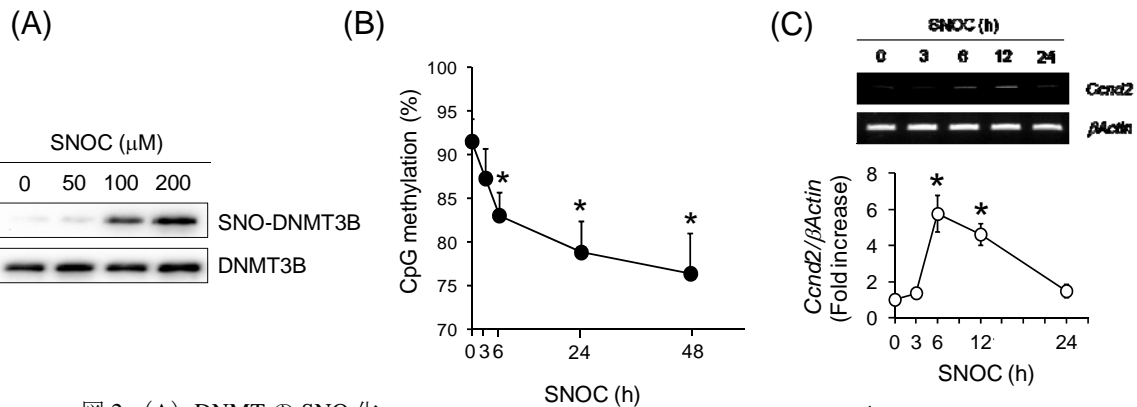


図 2. (A) DNMT の SNO 化.
 (B) *Ccnd2* 遺伝子上流の CpG アイランドにおける NO 依存的な脱メチル化. * $p < 0.05$.
 (C) NO による *Ccnd2* の転写誘導. * $p < 0.05$.

3. DNMT 特異的 SNO 化阻害能を有する化合物 (DBIC) の単離と薬理学的特性

SNO-DNMT 形成の CpG アイランド脱メチル化への寄与を明らかにするために, DNMT3 特異的な SNO 化阻害薬の作出を試みた. *In silico* スクリーニングを用いて, 約 400 万化合物ライブラリーから DNMT3B の Cys651 近傍に作用する化合物を探索した結果, その構造から DBIC と名付けた候補化合物を単離することに成功した (特願 2017-056367) (図 3A). DBIC は濃度依存的に DNMT3B の SNO 化を阻害した (図 3B). 一方, DBIC は DNMT 活性や他のタンパク質 SNO 化に影響を与えなかったことから, 分子特異的モジュレーターである可能性が示唆された. さらに, DBIC の分子特異性を確認するために, ドッキングシミュレーションの結果から DNMT3B との結合に必須と推定された水酸基を欠失した誘導体 (DBIC-neg1) と分子構造を短縮した誘導体 (DBIC-neg2) を作製し, DNMT3B に対する SNO 化阻害能を調べた. 加えて, DBIC との安定な結合に重要と予測されたアミノ酸残基を置換した DNMT3B 変異体を作製し, DBIC の効果を調べた. その結果, 二つの誘導体ならびに DNMT 変異体では SNO 化阻害能が消失したことから, DBIC は DNMT3 特異的に作用することが示された.

つぎに, DBIC の NO 依存的な DNA 脱メチル化への影響について検討したところ, NO による *Ccnd2* の CpG アイランド脱メチル化と転写活性化は DBIC によって有意に抑制された (図 3C). また, NO の長時間曝露により AGS 細胞の増殖能が亢進したが, DBIC はその増殖を有意に抑制した. 一方, DBIC には各種培養細胞に対する細胞毒性が無いことを確認した. 以上より, DBIC は SNO-DNMT 形成に伴う細胞内のエピジェネティックな変化を抑制することが示唆された.

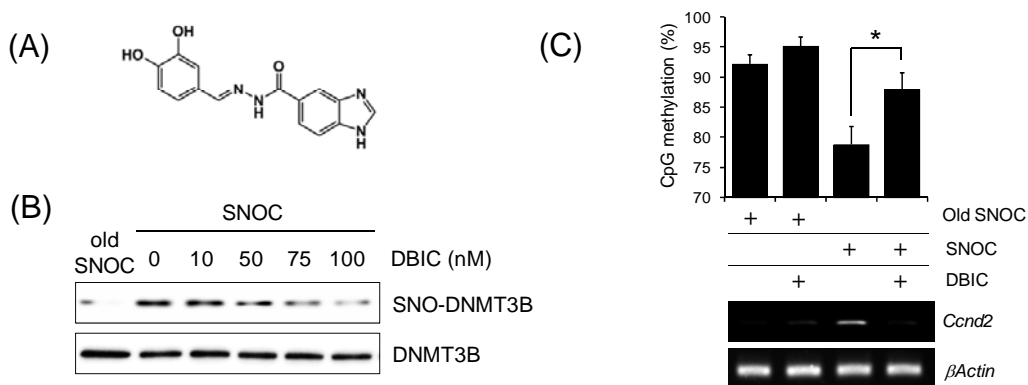


図 3. (A) DBIC の構造式.
 (B) DBIC 処理による DNMT3B の SNO 化形成阻害.
 (C) NO 依存的な *Ccnd2* の CpG 脱メチル化と転写活性化に対する DBIC の阻害効果. * $p < 0.05$.

4. DBIC の炎症発がん抑制効果

これまでがん抑制遺伝子の CpG アイランドが過剰メチル化され、発現抑制されることが発がんに関連していることが推定されてきた。一方、脱メチル化を伴った遺伝子発現に起因した発がん機構についてはほとんど理解されていない。本研究において SNO-DNMT 形成と遺伝子発現の関係が示唆されたことから、つぎに、炎症反応 (NO 産生) が亢進している部位や組織における疾患形成、とくに細胞増殖やがん化との関わりを調べた。

まず、*in vitro* での NO 誘発性スフェロイド形成に対する DBIC の効果を検討した。QR-32 細胞は良性腫瘍由来であるが、NO の長期間曝露により形質変化し、悪性腫瘍に特徴的なスフェロイドを形成する。本系に DBIC を処理したところ、NO 依存的スフェロイド形成はほぼ完全に抑制された。つぎに、炎症発がんモデルマウスにおける DBIC の効果を検討した。マウスに QR-32 細胞とゼラチンスポンジを皮下移植すると、局所的に急性炎症が惹起され、集積した炎症性細胞が産生する活性酸素種や活性窒素種依存的に QR-32 細胞は形質転換し、腫瘍を形成する。本モデルにおいて NOS2 特異的阻害薬である 1400W や DBIC は腫瘍形成を有意に抑制した。このとき、DBIC-neg1 投与群では抑制を認めなかった。また、腫瘍組織における SNO-DNMT3B 形成を検討したところ、溶媒投与群と比較して DBIC 前投与群においては SNO 化レベルが有意に低下していた。

これらの結果より、NO 産生を伴った炎症性のがん形成には DNMT の SNO 化による酵素活性抑制とそれによるエピジェネティックな変化が重要であることが強く示唆された。

【総括】

1. HDAC6 の SNO 化は脱アセチル化活性を抑制し、基質タンパク質の一つである α -tubulin のアセチル化修飾を亢進させた。
2. DNMT は SNO 化により DNA メチル基転移活性が抑制され、特異的な遺伝子上流における CpG アイランドの脱メチル化とそれに伴う転写活性化を惹起した。
3. DNMT 特異的な SNO 化阻害能を有する DBIC の単離に成功した。DBIC は NO を介したエピジェネティックな遺伝子発現変化を制御した。
4. 炎症反応依存的な細胞がん化に SNO-DNMT 形成が関与する可能性を見出した。

今後、全ゲノムレベルにおけるレドックス感受性 DNA メチル化部位を解析するための有用なツールとして DBIC を活用し、様々な病態形成との因果関係を明らかにする予定である。

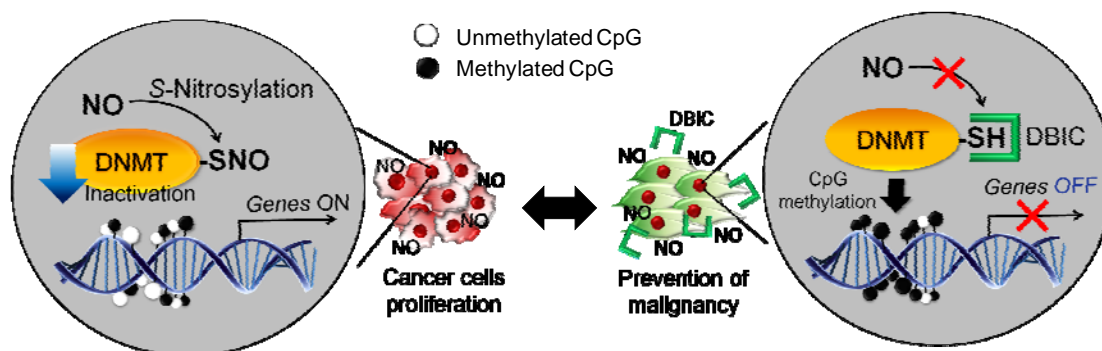


図 4. DBIC による SNO-DNMT 形成阻害を介した炎症発がん抑制効果。

【参考論文】

- 1) Regulation of Histone Deacetylase 6 Activity via S-Nitrosylation
K. Okuda, A. Ito, T. Uehara
Biol. Pharm. Bull., **38**(9), 1434-1437 (2015) (IF: 1.683)

【関連論文】

なし

