

足立 直子

バイオシグナル総合研究センター・助教

共同研究タイトル

**The mechanisms and functions of Cys-based post-translational protein modifications,
in particular S-palmitoylation and S-nitrosylation,
in physiological function and in pathophysiology**

グローバルメンター

Dr. Douglas Hess, Associate Professor, Case Western Reserve University, OH USA

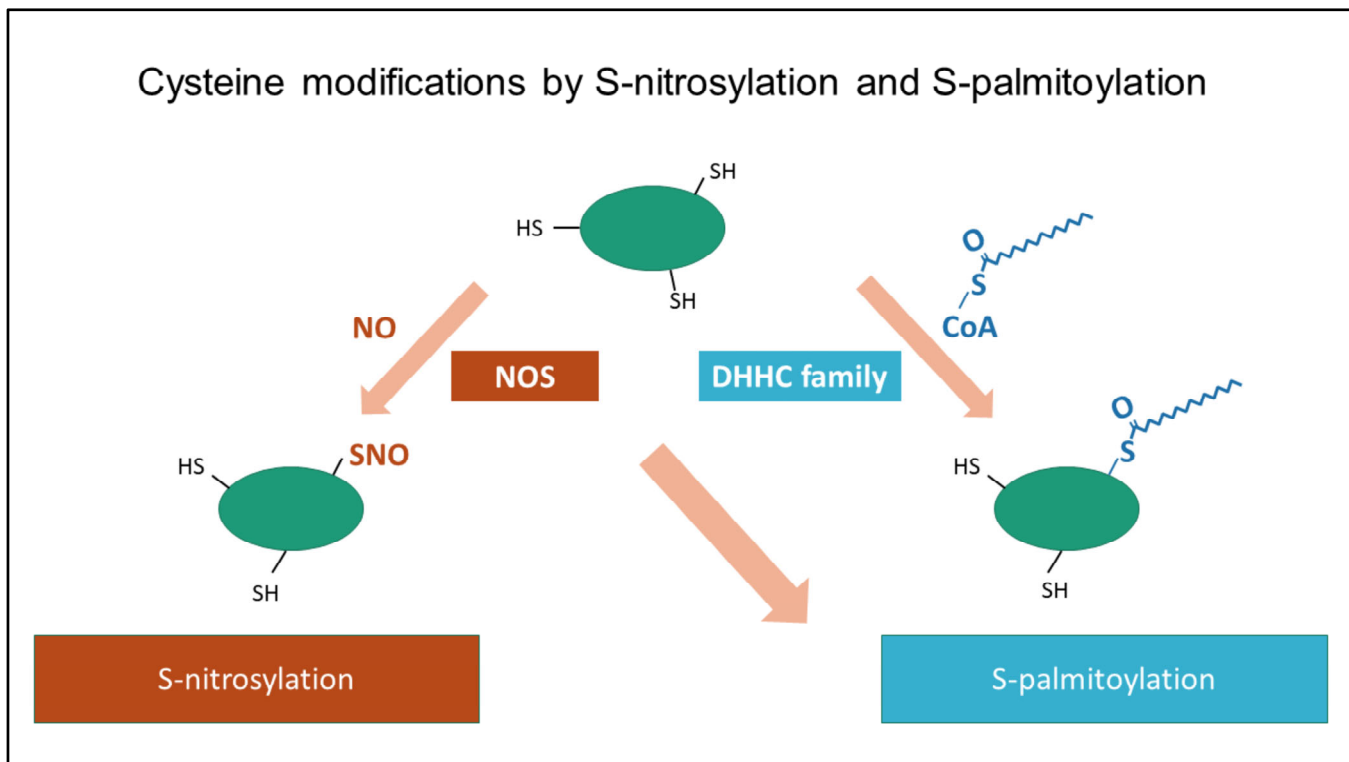
共同研究者

Dr. Matthew Brody, Assistant Professor, University of Michigan, MI USA

研究内容紹介

Global regulation of S-palmitoylation by nitric oxide

Cysteine modifications by S-nitrosylation and S-palmitoylation

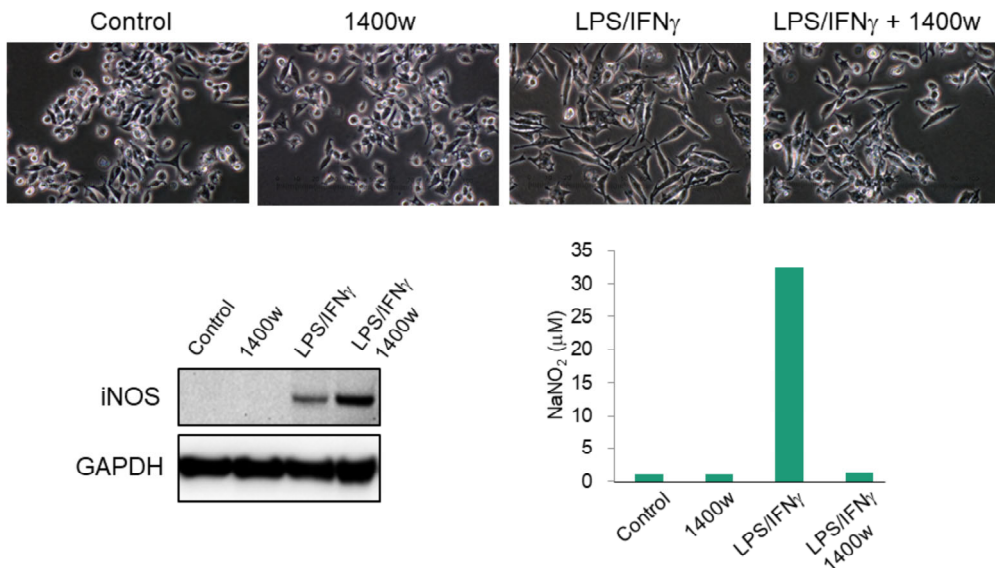


タンパク質のシステイン残基は反応性の高いチオール基を有していることから、様々な翻訳後修飾のターゲットとなり得ます。一酸化窒素合成酵素であるNOSは細胞内でNOを産生し、チオール基をS-ニトロシル化修飾し、基質タンパク質の活性調節や分解などに寄与します。

また、ヒトでは23種あるDHHC酵素はチオール基にパルミチン酸を付加する、S-パルミトイル化修飾を仲介し、基質タンパク質の疎水性を上昇させることで、タンパク質の輸送や安定性、活性化などに寄与します。

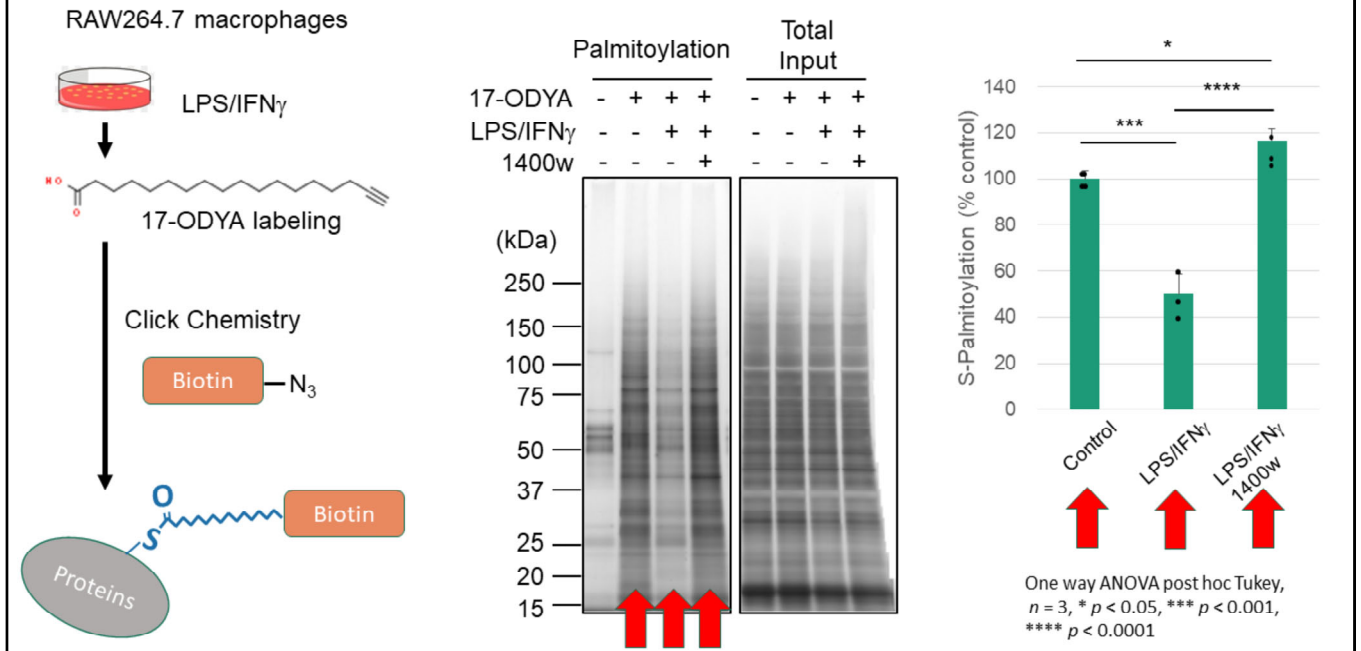
では、これらの翻訳後修飾が互いに影響を及ぼし、機能調節を協調的に行うことは無いのでしょうか？この疑問に答えるために我々は、NO産生条件下でのパルミトイル化修飾の動態を検討しました。

iNOS induction in LPS/IFN γ stimulated macrophage



NO産生細胞のモデルとして、マクロファージ細胞をもちいました。この細胞にグラム陰性菌由来のリポ多糖であるLPSとインターフェロン γ 刺激を行うと、活性化がおり、内在性のiNOS誘導により多量のNOが産生されます。一方で、iNOS特異的阻害薬である1400W処置でNOの産生は完全に抑制されます。

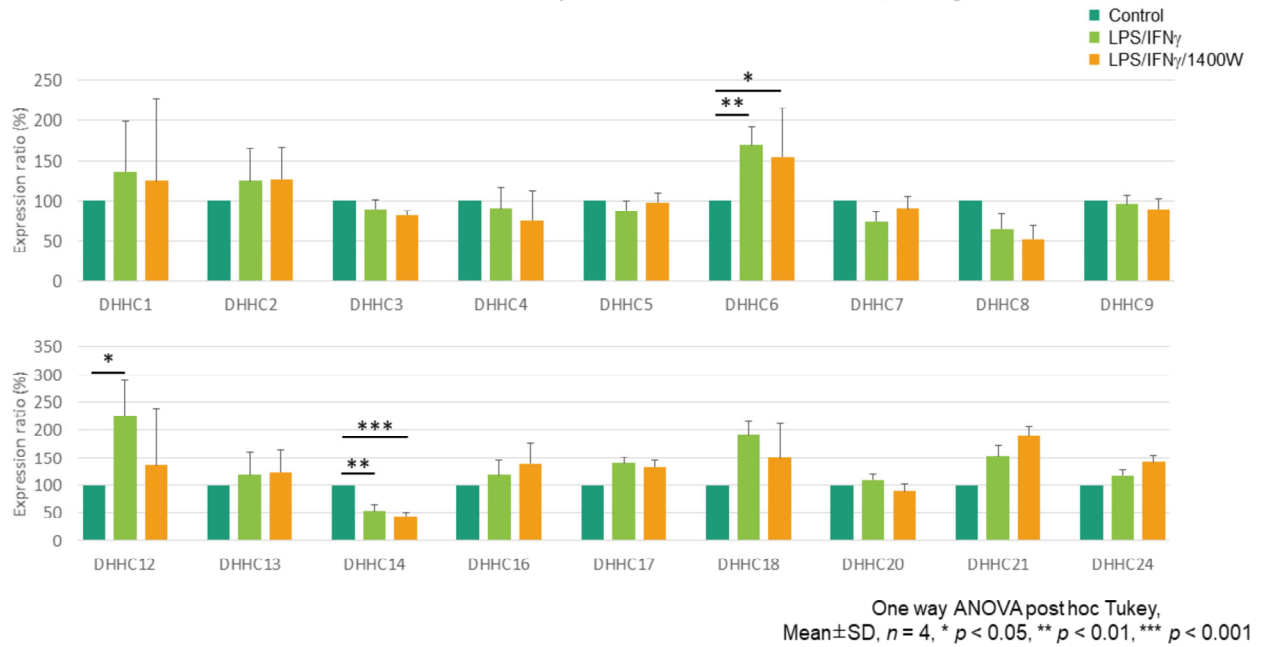
Nitric oxide diminished S-palmitoylation in macrophage



パルミトイル化タンパク質の検出には代謝標識法を用いました。17-ODYAはパルミチン酸のアナログであり、Alkyneを有します。これを細胞に代謝標識し、Azide化されたビオチンをクリックケミストリーにより付加することでパルミトイル化修飾タンパク質を検出しました。

コントロールでは細胞内に恒常的に存在するパルミトイル化タンパク質がこのように検出されますが、LPS刺激によるNO産生条件下では、パルミトイル化タンパク質量は有意に低下し、また、1400wによって、NO産生を阻害すると、再び多くのパルミトイル化タンパク質量が検出されました。

mRNA levels in LPS/IFN γ stimulated macrophages

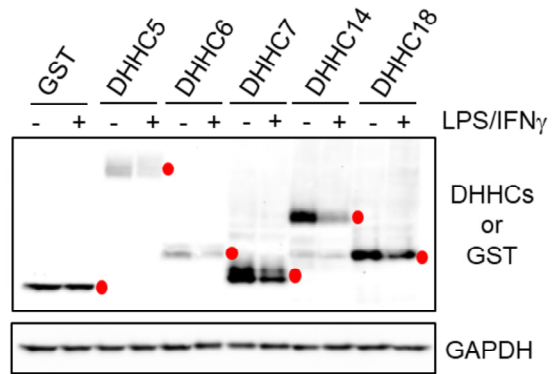


そこで、パルミトイル化修飾酵素であるDHHHC酵素のmRNAレベルを調べました。

マクロファージに発現するすべてのDHHHCの内、D H H C 1 4 ではLPS刺激により低下が見られましたが、多くのD H H C 酵素には有意な変化は見られませんでした。

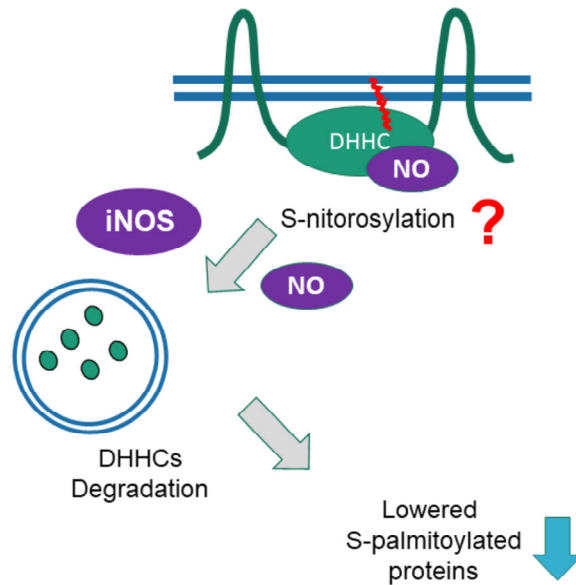
このことから、NOがパルミトイル化修飾に及ぼす作用は転写抑制ではないということが判明しました。

LPS/IFN γ stimulation downregulated DHHCs



次に、DHHC酵素のたんぱく質レベルでの検討を行いました。
LPSでマクロファージを活性化し、NO産生を誘導すると多くのDHHC酵素は、
たんぱく質量が明らかに低下しました。

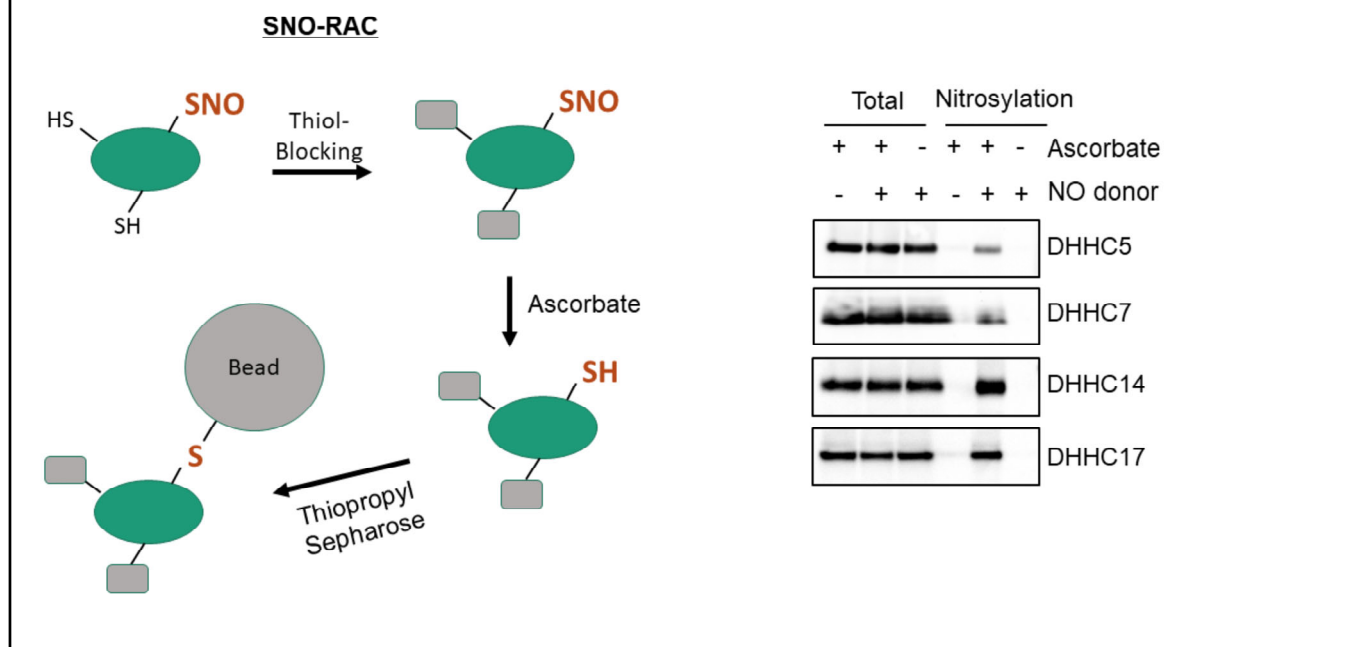
Working hypothesis



この結果より、パルミトイル化修飾酵素であるDHC酵素はNO産生条件下で分解され、結果的に細胞内のパルミトイル化タンパク質レベルの低下を引き起こすことが示唆されました。

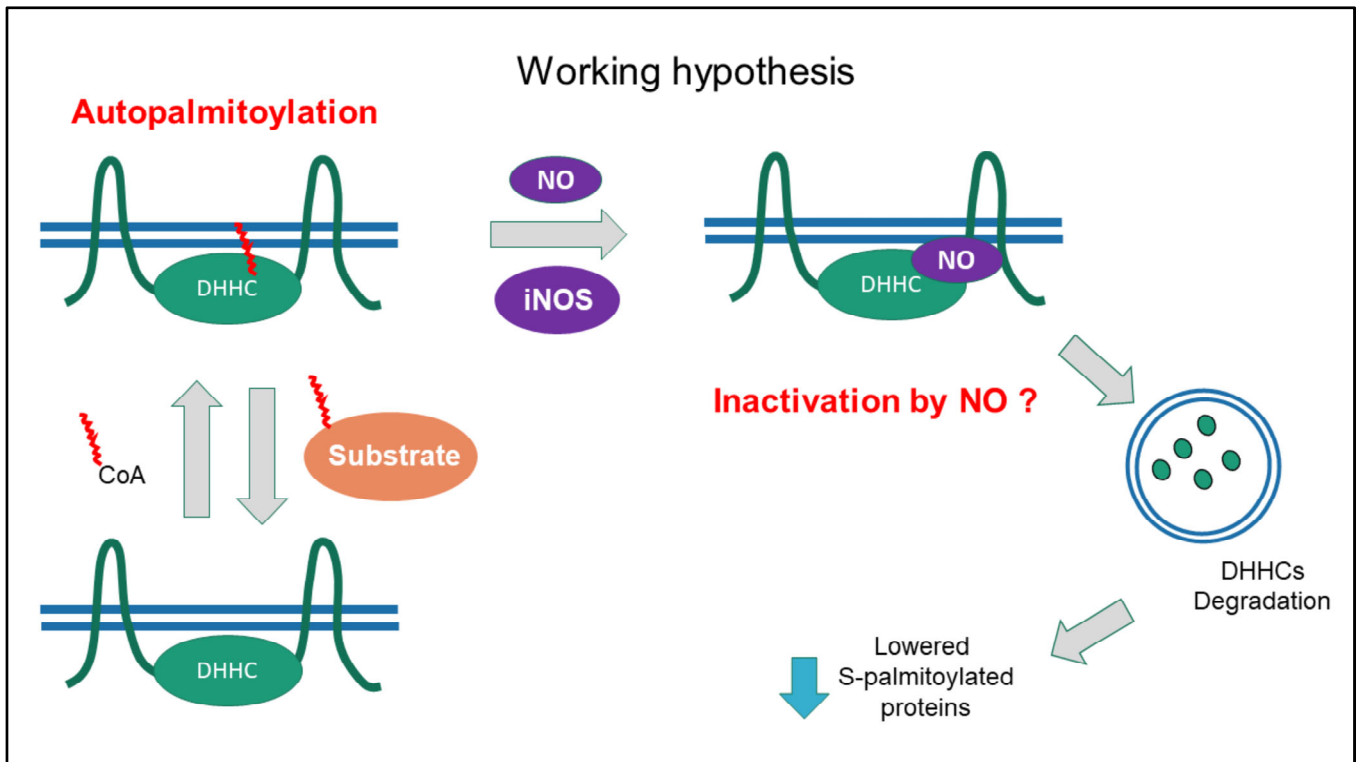
興味深いことに、DHC酵素はシステインリッチドメインを有しているタンパク質です。では、NOはDHCタンパク質をS-ニトロシル化することによって制御しているのでしょうか？

S-nitrosylation on DHHCs



そこで、我々はDHHC酵素のニトロシル化修飾をSNO-RAC法、アスコルビンによりニトロシル化修飾を特異的に還元し検出する手法を用いて検討しました。

結果は、NOドナーにより、検討した全てのDHHC酵素はS-ニトロシル化されることが判明し、そのシグナルはアスコルビン酸特異的でした。



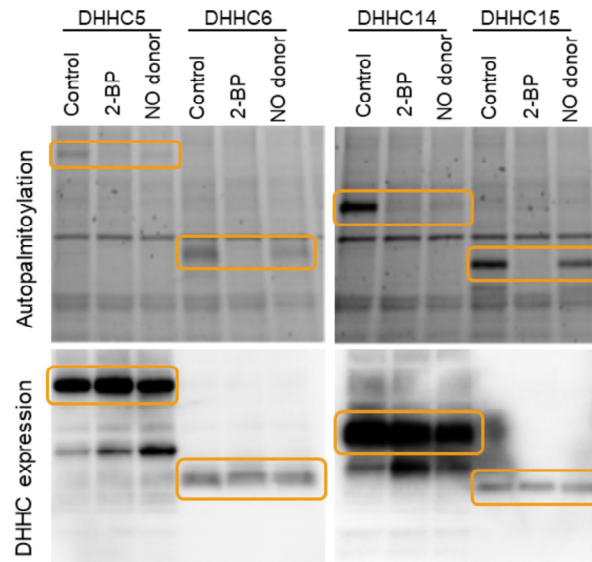
では、S-ニトロシル化されたDHC酵素の活性化状態はどうなっているのでしょうか？

DHC酵素の活性化は自己パルミトイル化を指標に検出することが可能です。

DHC酵素は活性中心領域にDHC、アスパラギン酸-ヒスチジン-ヒスチジン-システイン残基の配列を持ち、
 まずは、自身の活性中心システイン残基をパルミトイルCoAを用いて自己パルミトイル化します。

自己パルミトイル化したDHC酵素は活性化状態であり、近傍の基質タンパク質にパルミトイル基を転移することが可能となります。

Autopalmitoylation of DHHC is diminished by nitric oxide

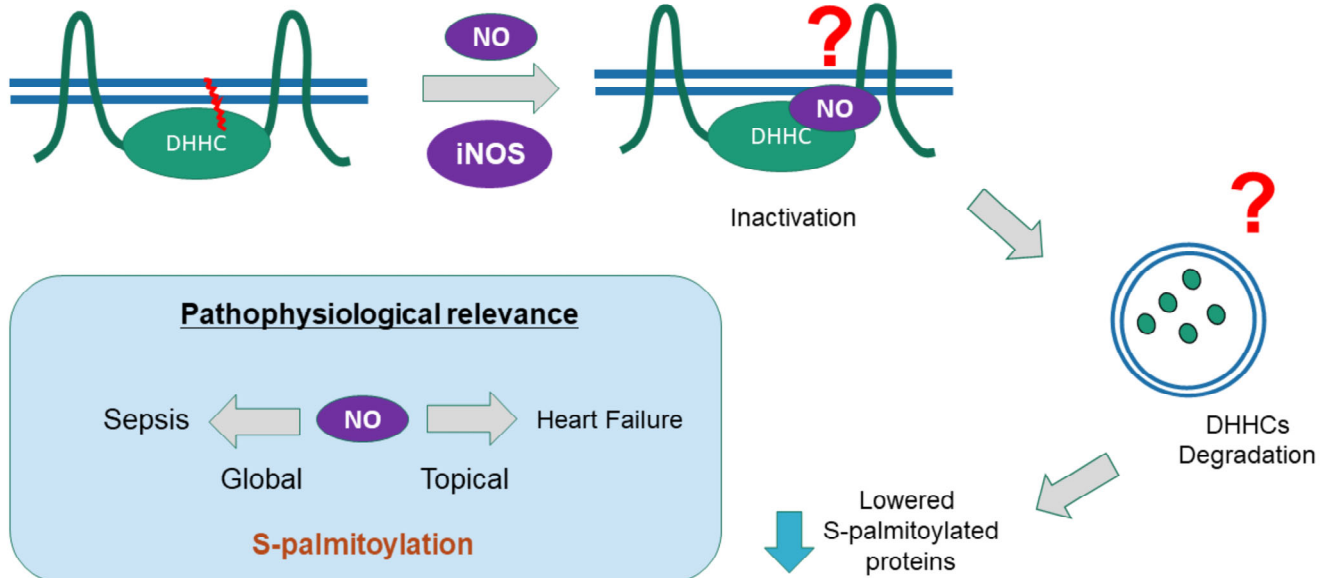


そこで、我々は、新規にin vitroでDHHC酵素の自己パルミトイル化、つまりは活性化状態を検出する手法を開発し、NOによるDHHC酵素の活性化を検討しました。

結果、NOドナー添加により、どのDHHC酵素においても、明らかな自己パルミトイル化の低下、つまりは活性化の低下がみられました。加えて、ここではDHHC酵素の活性中心部位に入り込み自己パルミトイル化を阻害する、2-BP, 2-bromopalmitateを不活性化のコントロールとして用いています。

今後の展望

Summary and Discussion



これらの結果をまとめます。本研究により、DHC酵素はNO存在下では、S-ニトロシル化修飾を受けることで、短期的には不活性化し、長期的には分解誘導され、これにより、タンパク質の総パルミトイル化レベルが低下することが判明しました。しかしながら、DHC酵素のどのシステイン残基がS-ニトロシル化修飾を受けるのか、または、どのような経路で分解されるのかは、わかっておらず、検討が必要です。

また、今後は、病態下でNO産生が全身性でおこる敗血症や局所的におこる心不全におけるNOの下流でのパルミトイル化修飾の寄与を病態モデルマウスを用いて検討していきたいと考えています。