

ダイバーシティ事業 国際共同研究PI養成プログラム (2020年度分)

報告日：2021年4月14日

期間中に行ったオンライン国際共同研究に関して、研究成果、今後の研究の見通し、研究成果の発表予定について具体的に記入してください。

適宜、行を追加してください。

派遣者所属名	バイオシグナル総合研究センター
派遣者氏名	足立 直子
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
研究目的	<p>パルミトイル化修飾とニトロシル化修飾は共にタンパク質システイン残基の翻訳後修飾であり、細胞外刺激に対しダイナミックに基質タンパク質の局在や構造、活性化状態を変化させることで、細胞応答を変化させる。我々は、ニトロシル化修飾を引き起こす一酸化窒素産生条件下では、細胞内でグローバルなパルミトイル化修飾抑制がかかることを発見し、これらの翻訳後修飾が協調的にタンパク質挙動を制御することを見出した。そこで、本国際共同研究では、これらの現象が、生体内でどのような役割を有しているのかについて、マウスの疾患モデルを用いて検討する。特に、病態下にて一酸化窒素産生が引き起こされる心筋梗塞と敗血症モデルマウスにおいて、パルミトイル化修飾の変化が病態の進行にどのように関与するのかを明らかにし、新規治療方法・薬剤の探索を行う。</p>
研究報告 (内容および成果) 2000字以内	<p>パルミトイル化修飾はタンパク質の可逆的な脂質修飾であり、生体内では約10%のタンパク質がこの修飾を受ける。修飾されたタンパク質は疎水性が上昇し、細胞膜や細胞内小器官膜への親和性が増し、タンパク質の局在や機能をダイナミックに変化させる。ヒトでは23種あるDHHC酵素はパルミトイル化修飾の責任酵素であり、DHHC酵素は共通して活性中心領域に高度に保存されたCysteine (Cys) 残基を複数有する。Cys 残基は反応性の高いチオール基 (-SH) を持ち、様々な翻訳後修飾の標的となる。生体などで重要な働きをするにも関わらず、DHHC酵素の活性調節メカニズムには不明な点が多く、その活性抑制機構は全く分かっていない。そこで、我々は、DHHC酵素において高度に保存されているCys残基の翻訳後修飾がDHHC酵素の活性調節に重要な役割を有する可能性に着目し検討した結果、Cys 残基を S-ニトロシル化修飾 (-SNO) する一酸化窒素 (NO) 存在下で、細胞内パルミトイル化修飾レベルが大幅に低下することを発見した。</p> <p>NOによる細胞内パルミトイル化修飾の低下のメカニズムを解明するために、本研究では、体内に侵入した細菌などの異物を捕食し免疫応答を引き起こすマクロファージ細胞を用いた。マクロファージ細胞は、グラム陰性細菌の外膜の構成成分であるLPSを添加すると、一酸化窒素合成酵素の一種であるiNOSを発現誘導し多量のNOを細胞内にて産生する。また、iNOS阻害薬である1400wの同時添加により、</p>

	<p>NOの産生を抑制できる。このモデルを用いて以下の現象を明らかにした。</p> <p>① 検証した全て DHHC 酵素は NO により S-ニトロシル化修飾を受けた</p> <p>② 短期的 NO 暴露により、DHHC 酵素の酵素活性は消失した</p> <p>③ 一部のDHHC酵素では、NOによりタンパク質発現量が大きく低下したが、mRNA 発現量の変化は限定的であった</p> <p>これらの結果はDHHC酵素にて高度に保存されているCys残基がNO暴露によりS-ニトロシル化修飾を受けると短期的にはDHHC酵素活性は消失し、長期的にはタンパク質分解誘導が引き起こされることを示唆している。</p>
今後の研究の見通し	<p>本研究はグローバルメンターである Hess博士との共同研究にて行っており、Hess博士には定期的に研究の進捗を報告しフィードバックを頂いた。今後は、本現象が個体レベルでどのように病態の進行に関与しているのかを明らかにするため、心不全モデルマウスを用いた研究をBrody博士と、敗血症モデルマウスを用いた研究をHess博士と共同研究を進めており、個体での成果を加えて論文報告する予定である。</p>
研究成果の発表予定	<p>Global nitric oxide regulation on S-palmitoylation, Naoko Adachi, Douglas T. Hess, Izumi Koganemaru, Takehiko Ueyama, Naoaki Saito, 第94回日本薬理学会年会、2021年3月10日、札幌（口頭発表済み）</p> <p>Global regulation of S-palmitoylation by nitric oxide, Naoko Adachi, Douglas T. Hess, Izumi Koganemaru, Takehiko Ueyama, Naoaki Saito(論文発表予定)</p>

オンライン共同研究終了後の進捗状況(2021年3月現在)

2020年度オンライン共同研究では、グローバルメンターと研究の方向性についてディスカッションを行い、定期的に進捗状況の確認を行った。結果、細胞レベルでのメカニズムの解明がほぼ終了し、個体レベルでの解析に入った。現在は共同研究先で作製したモデルマウスの臓器を冷凍で輸送し本学で解析することを予定しており、その結果次第で、共同研究先のコアファシリティを通して、質量分析を用いた修飾タンパク質の同定と修飾部位の決定を行うことを計画している。

海外派遣終了後の進捗状況(2022年3月現在)

2019年3月7日より2019年3月31日まで、米国オハイオ州クリーブランドの Cleveland Clinic, Lerner Research Institute と Case Western Reserve University を訪問し共同研究の打ち合わせを行った。訪問先の研究室で研究発表を行い、出席者より有意義なアドバイスや意見を得られた。また、Case Western Reserve University のヘス博士はその後、国際共同研究PI養成プログラムのメンターになってもらい、研究方針についてのアドバイスを継続して頂いている。ヘス博士と相談の結果、Cleveland Clinic の研究者との共同研究については継続せず、2020年度の国際共同研究PI養成プログラムにはミシガン大学のプロディ博士との共同研究を行う予定として応募したが、コロナ禍における海外への渡航制限と、受け入れ大学であるミシガン大学自体も、海外からの研究者の受け

入れ停止を行い、実際に渡米して研究を行うことが出来なかった。一方で、プロディ博士とは、翻訳後修飾の一種であるパルミトイル化修飾の制御機構について、心疾患モデルマウスを用いたオンラインでの共同研究を開始した。加えて、現在は、ヘス博士と共同で行っている研究「Global nitric oxide regulation on S-palmitoylation」を論文としてまとめている状況である。