

称号及び氏名	博士（理学） 笠松 真吾
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 31 日
論文名	Analysis of regulatory mechanism of NO/ROS signaling by nNOS in neuronal cells (神経細胞における nNOS による NO/ROS シグナル制御機構の解析)
論文審査委員	主査 居原 秀 副査 児玉 靖司 副査 佐藤 孝哉 副査 八木 孝司

論文要旨

研究背景

神経系において一酸化窒素(nitric oxide; NO)は、主に神経型 NO 合成酵素(neuronal NO synthase; nNOS)によって産生され、様々な生理作用に参与する。一方で、過剰に産生された NO は神経変性疾患などの病理作用にも参与している。nNOS は NO だけでなく、アンカップリング反応によりスーパーオキシド(O₂⁻)などの活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)も産生する。ROS もまた、単独、あるいは NO と共同し活性酸化窒素種の形でシグナル分子として機能していることが、近年報告されてきている。しかし、nNOS が産生する ROS の生理的機能については不明な点が多い。

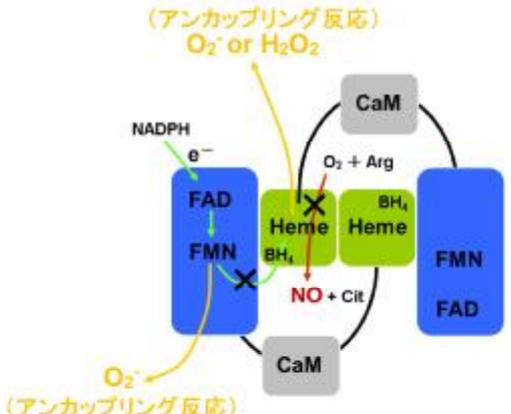


図.1 nNOS の NO/ROS 産生機構

近年、NO/ROS シグナルの関連分子として神経系でニトロ化環状グアノシンーリン酸(8-nitro-cGMP)という新規のニトロ化核酸が発見された。この 8-nitro-cGMP はタンパク質のシステイン残基に cGMP 構造を付加する S-グアニル化と呼ばれる独自の翻訳後タンパク質修飾作用を有し、シグナル伝達関連タンパク質を修飾することで様々な生理作用、病理作用に参与していることが分かってきている。これらのことから、nNOS 由来の NO/ROS シグナルによる作用は 8-nitro-cGMP を介して機能している可能性が予想される。

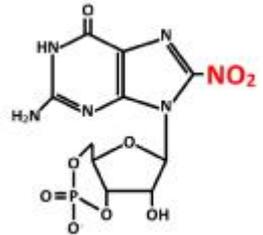


図.2 8-Nitro-cGMP の構造

さらに **8-nitro-cGMP** の代謝制御に、システインイオウ付加体であるシステインパースルフィド(過イオウ化システイン)などの新規イオウ代謝物が深く関わることを見出した。すなわち、その代謝機構の本体は硫化水素ではなく、システインパースルフィドに代表される活性イオウ分子種であることが明らかとなった。さらに、活性イオウ分子は、親分子であるシステインよりレドックス活性(求核性)が高く、強力な抗酸化能を有することが分かってきた。

そこで、本研究では **8-nitro-cGMP** を含む活性酸素シグナル・抗酸化応答における活性イオウ分子種に注目し、神経系における **nNOS** 由来の **NO/ROS** シグナルの生理作用(第1章)と病理作用(第2章)について研究を行った。

第一章 nNOS リン酸化を介した神経保護機構の解析

[緒言]nNOS 酵素活性の調節因子の一つとしてリン酸化は、**NO** 産生活性の減少効果が報告されており、脳虚血モデル動物の脳内での **nNOS** のリン酸化が亢進することから神経保護的な機能への関与が示唆されていた。しかし、その詳細な機構は分かっていたなかった。また、**nNOS** リン酸化による **ROS** 産生活性への影響については未だ不明である。

[目的]本章では、生理的条件下における **nNOS** の **NO/ROS** シグナル制御機構を調べるために、**nNOS** 酵素活性調節因子であるリン酸化の中でも *in vivo* において生理的条件下でのリン酸化が確認されている **847** 番目のセリン残基(**Ser⁸⁴⁷**)に注目して研究を行った。まず **nNOS** 遺伝子の **Ser⁸⁴⁷** を **Asp** に点変異した偽リン酸化 **nNOS (847D)** 遺伝子を作製し、組み換え **nNOS** タンパク質を調製した後、*in vitro* での酵素活性測定実験を行い、**nNOS** リン酸化による **nNOS** 酵素活性への影響を調べた(1-1)。次に、ラット小脳顆粒神経細胞(**CGNs**)初代培養系を用いて細胞内 **NO/ROS** シグナルへの影響を検討するとともに、**8-nitro-cGMP** を介した細胞保護効果について詳細な解析を行った(1-2)。本章では、**nNOS** 活性化刺激にニコチンを用い、細胞膜上の受容体を介した **Ca²⁺**流入にて細胞内 **nNOS** 活性化を行い、シグナル機構を調べた。

1-1 組換え偽リン酸化 nNOS の酵素活性の解析

[方法]nNOS 遺伝子の **Ser⁸⁴⁷** を **Asp** に点変異し、大腸菌発現系を用いて組換え偽リン酸化 **nNOS** タンパク質(**847D**)を調製した。**nNOS** 酵素活性測定は、**NO** 産生活性、**NADPH** 酸化活性、アンカップリング効率、**O₂** 産生活性の計 **4** 項目について行った。

[結果・考察]**847D** の酵素活性は野生型(**WT**)と比べて、**NO** 産生活性は約 **24%**減少し、**NADPH** 酸化活性は約 **21%**増加した。次に、化学量論的に算出したアンカップリング効率は、**WT** で **49%**、**847D** で **62%**だった。電子スピン共鳴法を用いて **O₂** 産生活性を測定した結果、**847D** の活性は **WT** の **210%**に増加した。これらの結果から、**nNOS** リン酸化により、**NO** 産生活性が減少するとともに、アンカップリング反応が増加し、**O₂** 産生が増加し、**NO/ROS** 産生比が変化する可能性が示唆された。

1-2 nNOS リン酸化による NO/ROS シグナル制御を介した細胞保護機構の解析

[方法]Wister rat より小脳顆粒神経細胞(**CGNs**)を調製し、ニコチン刺激による **nNOS** リン酸化をウエスタンブロッティングにて検出した後、**ROS** 産生、**8-nitro-cGMP** 産生

について nNOS リン酸化による影響を検討した。さらに、低カリウム刺激(LK 刺激)によるアポトーシスに対する保護機構について、NOS 阻害剤 L-NAME、膜透過性 SOD(PEG-SOD)、Ca²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ(CaMKs)阻害剤 KN93 および膜透過性ヘムオキシゲナーゼ 1(HO-1)阻害剤(PEG-ZnPP)を使用し、LK 刺激後の細胞生存率を MTS assay にて検出し、解析を行った。またニコチン刺激、8-nitro-cGMP 処理後の細胞内 HO-1 タンパク質発現誘導をウエスタンブロッティングにて検出した。

[結果・考察]ウエスタンブロッティングの結果、nNOS リン酸化はニコチン刺激により亢進し、この亢進は KN93 前処理により完全に打ち消された。また ROS 産生および 8-nitro-cGMP 産生活性も、ニコチン刺激により増加した。これらの増加は、L-NAME、PEG-SOD 前処理により完全に阻害されたが、KN93 前処理群では部分的な阻害しか起こらなかった。これらのことから、CGNs において ROS 産生および 8-nitro-cGMP 産生が nNOS リン酸化により調節されていることが初めて明らかになった。

またニコチンは、処理時間依存的に LK 刺激によるアポトーシスを阻害し、抗酸化ストレス応答関連タンパク質である HO-1 の細胞内発現量を増加させることが分かった。この細胞保護効果は、L-NAME および PEG-ZnPP 前処理群で完全に打ち消された一方で、KN93 前処理群では半分程度の低下に留まり、LK 刺激群に比べ若干の細胞保護効果が見られた。また、8-nitro-cGMP も同様にアポトーシスに対して保護的に働き、HO-1 タンパク質発現誘導を示した。これらの結果から、ニコチンによる細胞保護効果は、HO-1 を介した経路によるものであり、HO-1 タンパク質が nNOS リン酸化による 8-nitro-cGMP 産生を含む NO/ROS シグナルの下流分子として制御されていることが示唆された。

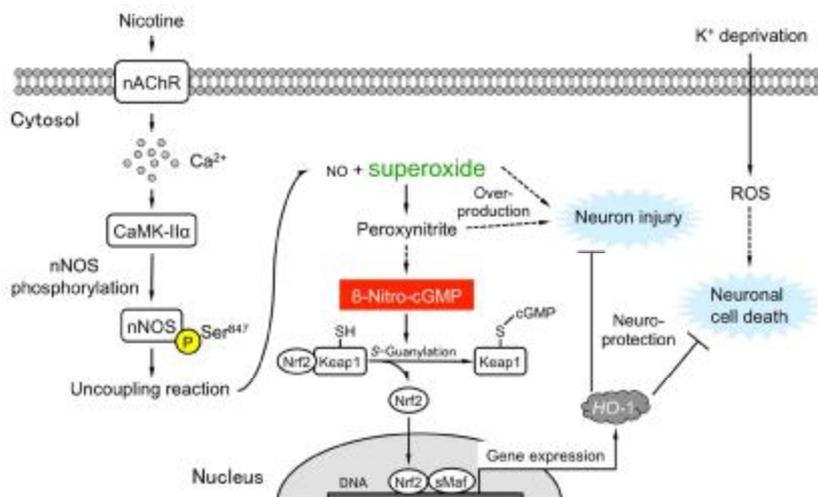


図.3 ニコチンの nNOS リン酸化を介した細胞保護機構

第 2 章 有機水銀による神経細胞死メカニズムの解析

[緒言]メチル水銀 (MeHg) などの有機水銀化合物による中毒症は、世界的な環境汚染問題として未解決の重要な課題である。これまで、MeHg が、その強力な親電子性により神経毒性を発揮することが明らかにされており、さらに、その毒性に酸化ストレスが関与していることも示唆されている。しかしながら、有機水銀の毒性発現機構は不明な点も多い。我々は最近、8-nitro-cGMP が、心筋において細胞老化シグナルとして機能すること、また、その活性が活性イオウ分子によって負に制御されていることを明らか

にした。

[目的]本研究では、MeHg 神経毒性への **8-nitro-cGMP** の関与およびその下流シグナル伝達機構について検討した。あわせて、活性イオウ分子と **8-nitro-cGMP** の代謝物である **8-メルカプトグアノシン-3',5'-環状 1 リン酸 (8-SH-cGMP)** 産生への MeHg の影響についても解析した。

[方法]細胞に **CGNs** を用いて MeHg 処理による ROS と **8-nitro-cGMP**、**8-SH-cGMP** 産生への影響を蛍光免疫染色法および質量分析法にて検討した。またその下流のシグナルをウェスタンブロット、 β -ガラクトシダーゼ染色にて解析した。さらに、MeHg 中毒モデルラットを作製し、その脳切片について免疫染色を行い、*in vivo* での知見を得た。

[結果・考察]ROS 特異的、活性イオウ分子特異的プローブを用いた蛍光顕微鏡法により、**CGNs** で MeHg 処理による細胞内 ROS 産生の増加、活性イオウ分子産生の減少を確認した。また、免疫染色および質量分析の結果、MeHg 処理により **8-nitro-cGMP** 産生は増加し、**8-SH-cGMP** 産生は減少していることが分かった。ウェスタンブロット解析の結果、MeHg 処理時間依存的に **H-Ras** タンパク質の活性化および **S**-グアニル化、**ERK1/2** のリン酸化が亢進していることが明らかになった。また、 β -ガラクトシダーゼ染色の結果、MeHg 処理による細胞老化が観察された。さらに MeHg 中毒モデルラットを用いた実験から、小脳プルキンエ細胞において MeHg 投与後 5 日目まで

8-nitro-cGMP、**S**-グアニル化タンパク質の増加が見られたが、投与後 8~11 日で完全にこれらのシグナルが消失していた。今回得られた結果から、MeHg は活性イオウ分子による親電子性シグナル制御を破綻させることで **8-nitro-cGMP** の細胞内蓄積を誘導し、神経細胞毒性を示している可能性が示唆された。

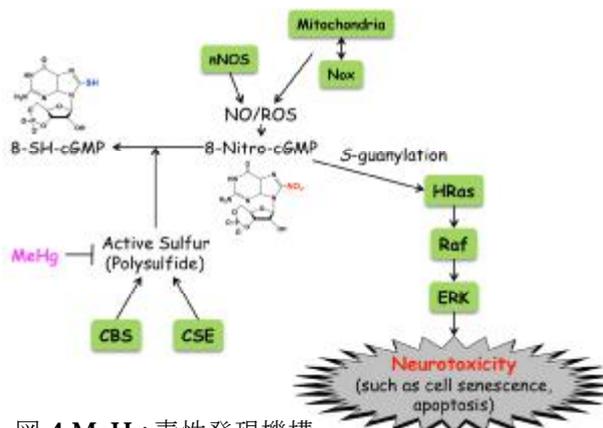


図.4 MeHg 毒性発現機構

総括

本研究で、神経細胞内において **nNOS** による **NO/ROS** シグナルの下流で産生された **8-nitro-cGMP** が生理的作用、病理的作用に関与していることが示された。このように同一分子から全く異なる作用が示される原因は、初期シグナルや同時に活性化するその他の因子に依存するものであると考えられる。今後より詳細にこれらの **8-nitro-cGMP** の生体内機能のシグナル機構について研究を行うことによって、新たな治療戦略ターゲットが発見できると期待できる。

○業績論文

- I Redox signal regulation via nNOS phosphorylation at Ser⁸⁴⁷ in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. Kasamatsu, S., Watanabe, Y., Sawa, T., Akaike, T., Ihara, H. *Biochem. J.* 2014 Feb 6. [Epub ahead of print]

○参考論文

- I Methodological proof of immunochemistry for specific identification of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formed in glia cells. Ihara, H., Ahtesham, A. K., Ida, T., Kasamatsu, S., Kunieda, K., Okamoto, T., Sawa, T., and Akaike, T. *Nitric Oxide* 25, 169–175 (2011)
- I Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling. Ahmed, K. A., Sawa, T., Ihara, H., Kasamatsu, S., Yoshitake, J., Rahaman, M. M., Okamoto, T., Fujii, S., and Akaike, T. *Biochem. J.* 441, 719–730 (2012)

審査結果要旨

本学位論文は、二つの章から構成され、第一章では、生理的条件下における神経型一酸化窒素合成酵素（**nNOS**）のリン酸化による一酸化窒素（**NO**）/活性酸素種（**ROS**）シグナルの制御機構を、組換え体タンパク質、**nNOS** 恒常発現細胞、ラット小脳顆粒神経細胞(**CGNs**)初代培養系を用いて検討し、**nNOS** リン酸化の生理作用を明らかにしている。第二章では、有機水銀による **NO/ROS** シグナルを介した神経毒性を、株化細胞、**CGNs**、ラット個体を用いて解析し、毒性発現の分子機構を明らかにしている。

これまで **nNOS** のリン酸化は、**NO** 産生活性を低下させることにより様々な生理機能を調節していると考えられていたが、本研究により、**nNOS** のリン酸化は、**NO** 産生を減少するだけでなく、**ROS** 産生を増加させることにより、**NO/ROS** 産生比を変えて、**NO/ROS** シグナルを調節していることが明らかとなった。また、**CGNs** で、アセチルコリン受容体刺激による **nNOS** リン酸化を介した **NO/ROS** シグナル、さらに下流のアポトーシス制御機構を明らかにした。

一方で、**NO/ROS** シグナルは、硫化水素関連物質（活性硫黄）により調節され、細胞毒性にも関与していることが示されている。本研究では、有機水銀による神経毒性の分子機構について解析し、有機水銀が活性硫黄と反応し、**NO/ROS** シグナルを攪乱することにより神経細胞毒性を示すことを明らかにした。

これまで **ROS** は毒性物質とみなされていたが、近年、**ROS** (**NO** と反応して生じる活性窒素酸化物も含めて) が毒性物質としてではなく、シグナル分子として生理・病理作用を制御しているという **NO/ROS** シグナル説が新たな概念として確立されてきている。上記の研究成果は、**NO/ROS** シグナルの神経系における制御機構について、新しい知見を加えるものであり、詳細な実験に基づいて論理的に結論が導かれているものと認められ、学位論文として合格と判断した。