

称号及び氏名 博士(理学) 岸本 祐典

学位授与の日付 平成 31 年 3 月 31 日

論 文 名 Effects of 8-nitro-cGMP on SNARE complex formation and brain  
functions  
(8-Nitro-cGMP が SNARE 複合体形成と脳機能に及ぼす影響)

論文審査委員 主査 居原 秀  
副査 児玉 靖司  
副査 佐藤 孝哉

## 8-Nitro-cGMP が SNARE 複合体形成と脳機能に及ぼす影響

岸本 祐典 (分子生物学分野)

### 研究背景

記憶の分子機構は、神経細胞間情報伝達（化学シナプス伝達）の長期的な伝達効率の変化であると考えられている。化学シナプス伝達では、前シナプスから神経伝達物質が放出され、後シナプスでそれらが受容される。神経伝達物質の放出（開口放出）において、シナプス前膜とシナプス小胞は膜融合する。この過程は、soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) と呼ばれる 3 種類のタンパク質が、複合体

(SNARE 複合体) を形成することによって誘導される。Complexin (cplx) は、SNARE 複合体に特異的に結合するタンパク質であり、非刺激下において SNARE 複合体を“クランプ”することで、自発的な開口放出を防ぐ因子として機能する (Fig.1)。

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は記憶障害などの症状を示す神経変性疾患であり、その患者数は世界中で増加している。しかし、AD への効果的な予防・治療方法は、現在のところ確立されていない。AD 患者脳内において、amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) の過剰蓄積、凝集体形成が観察されている。 $A\beta$  は直接、あるいはグリア細胞における炎症反応を介して間接的に、神経細胞に一酸化窒素/活性酸素種 (nitric oxide/reactive oxygen species, NO/ROS) ストレスを負荷する。結果的に神経細胞の機能低下および神経細胞死を惹起するので、 $A\beta$  下流で生じる NO/ROS ストレスが AD 病態メカニズムへ関与していることが示唆されている。しかしながら、その病態生理学的なメカニズムの詳細については不明な点が多く残っている。一方、AD 発症の前、軽度認知障害 (mild cognitive impairment, MCI) の段階において、記憶に重要な役割を担う海馬が、過活動を起こすことが明らかにされている。また、MCI 以降の患者において、神経細胞の異常興奮によるてんかん発作が、健常人より多く起こり、てんかん発作は AD における認知機能を悪化させることが報告されている。てんかん発作では、神経細胞の過剰な興奮により、NO/ROS ストレスが負荷されることが分かっている。

我々の研究グループは、NO/ROS シグナルの下流で産生されるニトロ化環状ヌクレオチド 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP) が、SNARE タンパク質の一つである synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) のチオール基に cGMP を付加 (*S*-guanylation) し、SNARE 複合体形成を促進することを発見した。しかし、この翻訳後修飾が脳神経機能に及ぼす影響については不明である。本研究では、8-nitro-cGMP が開口放出制御機構 (第一章) と脳機能 (第二章) に及ぼす影響、さらには AD およびてんかんにおける、この分子の病態生理学的役割 (第三章) について研究を行った。

### 第一章 8-Nitro-cGMP による SNARE 複合体と cplx 間相互作用への影響

【緒言】 開口放出は SNARE タンパク質以外にも、cplx 等の様々なタンパク質によって制御されている。SNAP-25 の *S*-guanylation は SNARE 複合体を増加させるが、SNARE タンパク質以外の開口放出制御タンパク質との相互作用に及ぼす影響は不明である。本章では、開口放出における 8-nitro-cGMP の役割を明らかにするために、SNAP-25 の *S*-guanylation が SNARE 複合体と cplx の親和性へ与える影響について解析を行った。

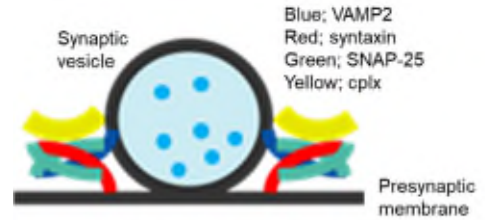


Fig.1 SNARE複合体とcplx

【実験方法】ヒト神経芽細胞腫由来の株化細胞である SH-SY5Y 細胞にプラスミド DNA をトランスフェクションし、SNAP-25-FLAG および cplx-V5 を発現させた。8-Nitro-cGMP 処理後、抗 FLAG タグ抗体により共免疫沈降される cplx-V5 を Western blot 法により解析した。BN-PAGE 法によりタンパク質複合体を保持したままサンプルを電気泳動し、Western blot 法によりタンパク質複合体を解析した。

【結果と考察】8-Nitro-cGMP 処理により、SNAP-25 (wild-type) を発現させた細胞では、共免疫沈降された cplx-V5 が減少した。しかし、S-guanyl 化の標的システイン残基をアラニンに置換した SNAP-25 (C90A) を発現させた細胞では、そのような変化は認められなかった (Fig.2)。一方、BN-PAGE の結果では、8-nitro-cGMP 処理により、SNARE 複合体量は増加したが、高分子

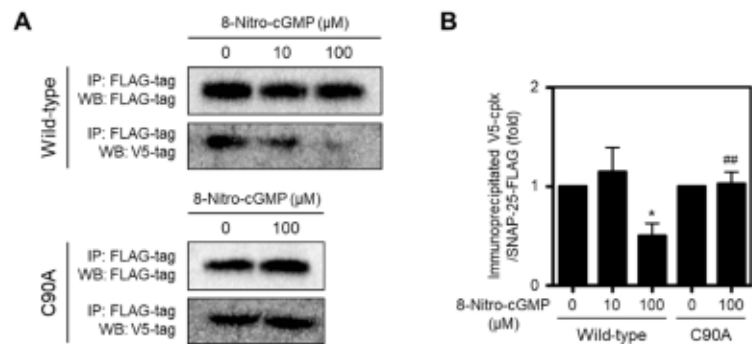


Fig.2 共免疫沈降法によるSNARE複合体とcplxの相互作用解析

量側に検出された cplx は減少した。これらの結果から、8-nitro-cGMP は SNAP-25 の S-guanyl 化を介して SNARE 複合体を増加させる一方で、SNARE 複合体と cplx の親和性を低下させることが示唆された。

## 第二章 8-Nitro-cGMP のマウス側脳室投与による記憶への影響

【緒言】記憶障害を示す疾患である AD と、その進行過程で発生するてんかん発作では、神経細胞に NO/ROS ストレスが負荷されるが、NO/ROS シグナルの下流メッセンジャーである 8-nitro-cGMP が記憶に及ぼす影響については不明である。本章では、8-nitro-cGMP が脳機能に与える影響を解明するために、マウスを用いた行動解析試験を実施した。

【実験方法】側脳室 (icv) に通ずるカニューレをマウスに装着し、8-nitro-cGMP を行動解析試験の前日 (計 2 回) に投与した。オープンフィールド試験 (open-field test, OFT)、恐怖条件付け課題 (fear-conditioning task, FCT) を実施し、マウスの情動性と記憶を評価した。試験後、マウス脳タンパク質の S-guanyl 化レベルを Western blot 法により、SNAP-25 の S-guanyl 化を免疫沈降法により解析した。また、課題に使用したマウス脳組織について、Nissl 染色および、神経活動のマーカータンパク質である c-Fos 特異的抗体を用いた免疫組織染色を行い、8-nitro-cGMP 投与による影響について組織学的観察を行なった。

【結果と考察】OFT において、マウスの総移動距離 (水平方向活動の指標) および、静止時間、中央滞在時間 (不安傾向の指標) に、8-nitro-cGMP 投与による有意な差は認められなかった。一方で、立ち上がり行動 (縦方向活動の指標) については、8-nitro-cGMP 投与により、有意な減少が認められた。FCT のうち、手掛かり恐怖条件付けの評価結果では、各群間で差は認められなかったが、文脈恐怖条件付けを評価したところ、8-nitro-cGMP 投与によるフリージング時間の減少が認められた (Fig.3)。Western blot 解析により、特に海馬において、S-guanyl 化タンパク質の増加が確認された。また、免疫沈降の結果、海馬にお

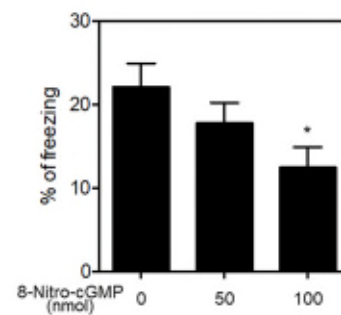


Fig.3 恐怖条件付け課題によるマウスの記憶評価

より、特に海馬において、S-guanyl 化タンパク質の増加が確認された。また、免疫沈降の結果、海馬にお

ける SNAP-25 の S-guanyl 化が観察された。Nissl 染色および c-Fos 特異的抗体を用いた免疫染色によって、8-nitro-cGMP 投与による海馬における神経細胞死は確認されず、一方で、c-Fos 陽性細胞が増加することが明らかになった。立ち上がり行動と条件性文脈恐怖はそれぞれ、海馬の関与が示唆されていることから、8-nitro-cGMP の icv 投与の影響は、海馬における神経細胞死によるものではなく、タンパク質の特異的 S-guanyl 化を介した神経細胞の異常活性化が誘発する機能障害によるものである可能性が考えられる。AD 初期の段階では、海馬は過活動を起こすことが明らかにされており、8-nitro-cGMP の icv 投与による神経活動の変化をより詳細に解析することは、AD 初期の病態メカニズムの解明に有意義である。

### 第三章 8-Nitro-cGMP による神経活動の増強：AD およびてんかんの関与

【緒言】AD の発症、進行には、A $\beta$  の蓄積、凝集体形成が関与している。近年、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) が AD 患者脳内の A $\beta$  と共局在しており、GAPDH/A $\beta$  共凝集体の icv 投与は、マウスの海馬神経細胞死を誘導することが報告された。一方、AD の進行と関連が示唆されているてんかん発作は、異常な神経活動を特徴としており、グルタミン酸（興奮性の神経伝達物質）アナログであるカイニン酸 (kainate, KA) は、その投与によりげっ歯類にてんかん発作を誘導する。以上から、AD モデルマウスとして GAPDH/A $\beta$  共凝集体投与マウス、およびてんかんモデルマウスとして KA 投与マウスを解析することは、AD の病態生理学的メカニズムの解明に寄与すると考えられる。本章では、これらのマウスを用い、AD およびてんかんにおける、8-nitro-cGMP の産生と作用について解析を行った。

【実験方法】GAPDH/A $\beta$  共凝集体をマウス icv へ投与し、10 日後に脳組織サンプルを採取した。マウス icv に KA を投与し、1.5 および 24 時間後に脳組織サンプルを採取した。Nissl 染色および免疫組織染色を行い、神経細胞・グリア細胞の組織学的解析、8-nitro-cGMP 生成動態の解析を行った。マウス脳組織よりシナプトソームを調製し、開口放出の蛍光トレーサー色素 (ViVidFluor Neuro Green) を用いて、8-nitro-cGMP による開口放出機構への影響を解析した。8-Nitro-cGMP のマウス icv 投与から 24 時間後に KA を投与し、海馬における c-Fos 発現レベルを Western blot 法により解析した。

【結果と考察】GAPDH/A $\beta$  共凝集体投与マウスの海馬 CA3 野において神経細胞の萎縮および、グリア細胞の活性化、8-nitro-cGMP 産生の増加が確認された。一方、KA 投与マウスの海馬 CA3 野において、投与 1.5 時間後に 8-nitro-cGMP 産生の増加が、24 時間後に神経細胞死が確認された。蛍光色素を用いて開口放出を解析した結果、8-nitro-cGMP 処理により、カルシウム依存的な開口放出の増加が確認された。また、8-nitro-cGMP の前投与によって、KA の icv 投与による c-Fos タンパク質発現誘導がさらに増強されることが分かった (Fig.4)。これらの結果から、AD およびてんかんの病理メカニズムに、8-nitro-cGMP が関与している可能性が示唆された。

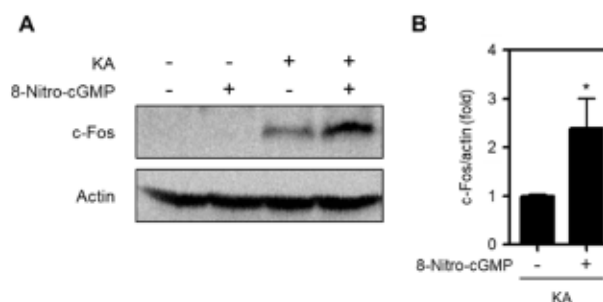


Fig.4 8-Nitro-cGMP前投与による神経活動の増強

## 総括

本研究により、AD およびてんかんの病理メカニズムにおいて、NO/ROS シグナルの下流メッセンジャーである 8-nitro-cGMP が過剰産生されることが示された。8-Nitro-cGMP は、SNAP-25 の S-guanylation を介して SNARE 複合体を増加させ、複合体と cplx の親和性を低下させることで、異常な開口放出に関与している可能性が考えられる。一方で、8-nitro-cGMP のマウス icv 投与は、海馬依存的な記憶障害を惹起したにも関わらず、神経細胞死を誘導しなかった。このマウスにおいて、海馬における神経活動は増加しており、8-nitro-

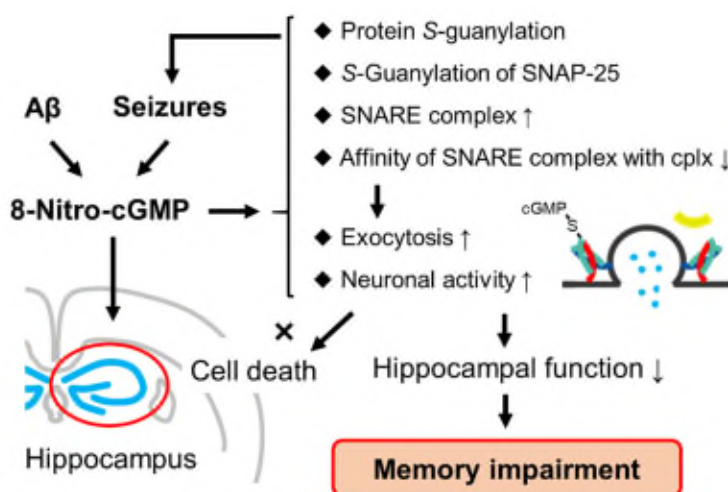


Fig.5 本研究のまとめ

cGMP の前投与は、KA による神経活動をさらに増強したことから、AD およびてんかんの病理メカニズムに、8-nitro-cGMP 産生を介した神経伝達機能制御異常が関与している可能性が示唆された (Fig.5)。今後、8-nitro-cGMP による脳内 NO/ROS レドックスシグナルについてより詳細に解析を行うことで、AD やてんかんの病理メカニズムの解明および、治療・予防戦略の開発に貢献できると期待される。

## 【業績】

- 8-Nitro-cGMP attenuates context-dependent fear memory in mice., **Kishimoto, Y.**, Kasamatsu, S., Yanai, S., Endo, S., Akaike, T., Ihara, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 511 (1), 141-147, 2019
- SNAP-25 S-guanylation and SNARE complex formation., **Kishimoto, Y.**, Akaike, T., Ihara, H., *Methods Mol. Biol.* 1860, 163-173, 2019
- 8-Nitro-cGMP attenuates the interaction between SNARE complex and complexin through S-guanylation of SNAP-25., **Kishimoto, Y.**, Kunieda, K., Kitamura, A., Kakihana, Y., Akaike, T., Ihara, H., *ACS Chem. Neurosci.* 9 (2), 217-223, 2018
- 8-Nitro-cGMP enhances SNARE complex formation through S-guanylation of Cys90 in SNAP25., Kunieda, K., Tsutsuki, H., Ida, T., **Kishimoto, Y.**, Kasamatsu, S., Sawa, T., Goshima, N., Itakura, M., Takahashi, M., Akaike, T., Ihara, H., *ACS Chem. Neurosci.* 6 (10), 1715-1725, 2015

## 2 学位論文審査結果の要旨

本学位論文は、レドックスシグナル二次分子である 8-nitroguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP) による脳機能、特に記憶の調節機構に着目した研究である。記憶の形成は、神経細胞間情報伝達の長期的な伝達効率の変化であり、様々な分子によって調節を受ける。アルツハイマー病やてんかんなどの疾患では、この分子調節機構に異常が生じる。近年の研究では、一酸化窒素/活性酸素種 (NO/ROS) が、これらの疾患に関与していることが示唆されている。しかし詳細に関しては不明な点が残っている。本研究では、NO/ROS シグナルの下流で産生される 8-nitro-cGMP による神経伝達物質の放出制御機構、マウス個体を用いた記憶に及ぼす影響、さらには AD およびてんかんモデルマウスにおける 8-nitro-cGMP の病態生理学的役割について研究を行っている。

本研究では、まず、8-nitro-cGMP による神経伝達物質の放出機構を、生化学、細胞生物学、分子生物学的手法を駆使して、分子レベルで明らかにしている。また、マウス個体を用いて行動解析実験を行い、8-nitro-cGMP が、海馬依存的な記憶障害を惹起することを明らかにしている。さらに、アルツハイマー病モデルマウス、てんかんモデルマウスを作製し、アルツハイマー病、てんかんの発病、病態進行に 8-nitro-cGMP が関与していることを示している。これらの結果は、アルツハイマー病、てんかんなどの記憶障害を伴う神経疾患において、8-nitro-cGMP 産生を介した NO/ROS シグナルが関与していることを示す世界で初めての研究成果である。

上記の研究成果は、アルツハイマー病、てんかんなどの神経疾患の発現メカニズム解明、さらには、新規治療・予防薬の開発に貢献すると期待される。研究内容は、詳細な実験に基づいて論理的に結論が導かれており、学位授与に値する内容であると認められた。

学位論文審査委員会

委員長 教授 居原 秀  
教授 児玉靖司  
教授 佐藤孝哉