

称号及び氏名	博士(理学) 津々木 博康
学位授与の日付	平成20年3月31日
論文名	「Modulation of exocytosis by nitric oxide signaling pathway (一酸化窒素シグナル伝達系による開口放出の調節機構)」
論文審査委員	主査 原 正之 副査 上田 純一 副査 八木 孝司 副査 廣田 順二

論文要旨

神経伝達物質の開口放出は、電位依存性カルシウム (Ca^{2+}) チャンネル (VDCC) からの Ca^{2+} 流入、シナプス性タンパク質の複合体形成を介したシナプス小胞とシナプス前膜との結合、融合によって起こる。シナプス間隙に放出された神経伝達物質は、後シナプスの細胞表面に局在する受容体に結合し、後シナプスにおける電位変化を起こし、セカンドメッセンジャーが細胞内でシグナル伝達系を成立させる。一酸化窒素 (NO) などいくつかの分子は細胞膜を透過できる非開口放出性の化学伝達物質となる。神経系には神経細胞とグリア細胞の二種類が含まれ、互いに伝達物質や成長因子などを放出、受容しており、この相互作用は神経細胞-グリア細胞コミュニケーションと呼ばれている。NOは内在的にNO合成酵素 (NOS) により産生される。神経系でNOは神経型NOS (nNOS) によって産生され、記憶・学習、アポトーシスを含む神経細胞死や神経の発生などに関与していると報告されているが不明な点が多い。NOシグナル伝達系として、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) はNOの代表的なターゲットで、NOにより活性化されてcGMPを産生し、シグナル伝達を成立させる。これまで、NO研究においてNO/cGMPシグナル伝達系が主に研究されてきたが、近年NOによるシグナル伝達系として化学修飾系が注目されている。NOは直接タンパク質のスルフィドリル基をニトロソ化したり、金属や活性酸素種と反応して活性窒素酸化物に変換されたあと核酸、タンパク質、脂質を酸化したりニトロ化する。特に最近新規のニトロ化核酸として 8-nitro-cGMPが生体内で合成され、多様な機能を発揮していることが報告された。8-nitro-cGMPはcGMP様の活性をもち、プロテインキナーゼG (PKG) を活性化する。8-nitro-cGMPは求電性をもち、アンカップラーとしてNOSなどの電子伝達を阻害し、活性

酸素を産生する。さらに 8-nitro-cGMPはタンパク質のスルフィドリル基と反応し全く新規のタンパク質翻訳後修飾を行い、これはS-グアニル化と命名された。これまでNOシグナル伝達系が神経系において様々な神経伝達物質の開口放出を調節しているという報告があるが、その分子メカニズムは不明な点が多い。

本研究は、次の2つのことを目的とした。第一章では初代培養ラット小脳顆粒細胞 (cerebellar granule cell; CGC) からのグルタミン酸 (Glu) の開口放出に及ぼす NO の影響を調べ、NO による開口放出調節の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。第二章では、アストロサイト、大脳神経細胞、CGC を用い、神経系での 8-nitro-cGMP の合成を調べ、ウシ副腎髄質クロマフィン細胞 (bovine chromaffin cell; BCC) を用い、アンペロメトリー法でカテコールアミン (CA) 放出に及ぼす 8-nitro-cGMP の影響を調べ、NO シグナル伝達系による開口放出の速度論的過程の調節機構を詳細に解析することを目的とした。

第一章

<実験方法>

ラット小脳よりCGCを調製し、nNOS特異的抗体を用いて、ウェスタンブロット、蛍光免疫染色によりnNOSの発現を解析した。Glu放出解析は、CGCをNOS阻害剤 (L-NAME、L-NMMA)、NO発生剤 (NOC 7)、sGCの阻害剤 (ODQ)、cGMPアナログ (8-Br-cGMP)、L型VDCC阻害剤 (Nifedipine)、特異的L型VDCC開口薬 (Bay K 8644)、還元剤DTTまたは開口放出を特異的に阻害するボツリヌス神経毒素 (BoNT) で処理した後、脱分極処理またはCa²⁺イオノフォアによりGluを放出させた。培養上清中に放出されたGluは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。細胞内Ca²⁺濃度は、CGCをNOC7、NifedipineまたはN型VDCC阻害剤 (ω -conotoxin) で処理した後、Ca²⁺感受性蛍光プローブFluo 3-AMを添加し蛍光プレートリーダーを用いて経時的に測定した。

<結果>

ウェスタンブロット、蛍光免疫染色共に、CGC内でのnNOSの発現が確認できた。nNOSの発現量をウェスタンブロットで比較したところ、培養日数の経過に伴いnNOSの発現量が増加し、Glu放出量の増加と相関があった。NOS阻害剤は、脱分極誘発性Glu放出を増加させ、NOC 7は減少させた。NOS阻害剤によるGlu放出の増加は、BoNTで完全に阻害された。ODQ、8-Br-cGMPでの処理は影響なかった。これらの結果より、NOがcGMPを介さずにCGCからの脱分極誘発性Glu開口放出を阻害することが示された。また、NOはCa²⁺イオノフォア誘発性開口放出に影響しなかった。

これらの結果から、NOがCa²⁺チャンネルに影響を及ぼすことが示唆された。CGC内Ca²⁺濃度を解析した結果、脱分極誘発性Ca²⁺濃度上昇はNifedipineと ω -conotoxinにより減少された。また、NOC 7によりCa²⁺濃度増加が抑制され、この効果はNifedipineの効果に影響しなかったが、 ω -conotoxinの効果に影響し、Ca²⁺濃度をより減少させた。これらの結果より、NOがL型VDCCに作用し、Ca²⁺流入を阻害していることが示唆された。またNifedipineは脱分極誘発性Glu放出を阻害した。NOC 7は、Nifedipineの効果に影響しなかった。Bay K 8644 は脱分極誘発性Glu放出を促進した。しかしながら、その効果はNOC 7により打ち消された。これらの結果よりCGC

からの脱分極誘発性Glu開口放出においてNOはL型VDCCに作用して開口放出を阻害すると考えられた。NO発生剤は脱分極誘発性Glu放出を阻害した。この効果はDTTにより回復した。このことからNOが酸化還元的な可逆的修飾によりGlu放出を調節していることが示唆された。

<小括>

本研究において、NOがCGCからの脱分極誘発性Glu開口放出を阻害することが明らかとなった。これまで、NOがcGMPを介したシグナル伝達経路を介して開口放出を調節するという報告があるが、CGCからの脱分極誘発性Glu開口放出においてNOはcGMPシグナル伝達系を介さずL型VDCCに酸化還元的な可逆的修飾を行い開口放出を阻害すると考えられた。

第二章

<実験方法>

ラット小脳よりCGC、ラット大脳よりアストロサイトと大脳神経細胞を調製し、8-nitro-cGMPの神経系での合成を、蛍光免疫染色法を用いて調べた。ウシ副腎髄質よりBCCを調製し、8-nitro-cGMPで処理した後、脱分極処理によりCAを放出させた。放出されたCAは、HPLCと微小炭素電極を用いたアンペロメトリー法により測定した。8-nitro-cGMPによりS-グアニル化されたタンパク質は抗8-チオアルコキシcGMP抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。

<結果>

免疫染色により神経系での8-nitro-cGMPの合成が初めて確認された。8-nitro-cGMPはBCCからの脱分極誘発性CA放出を大きく変化させず、バッチ法で解析するには限界があり、より詳細な解析が必要であることが考えられた。アンペロメトリー法により8-nitro-cGMPが8-Br-cGMPと同様に単一小胞からのCA放出におけるピークの高さ、半値幅、減少時の傾きなどの速度論的パラメータを変化させることが分かった。これは8-nitro-cGMPがBCCからのCA開口放出の速度論的過程を調節していることを示唆した。この調節における8-nitro-cGMPのターゲットとしてPKGシグナル伝達系及び活性酸素の関与に注目した。PKG阻害剤は、8-Br-cGMPの効果を回復したが8-nitro-cGMPの効果に対しては8-Br-cGMPとは異なった効果を示し、8-nitro-cGMPは8-Br-cGMPとは異なった経路でPKGシグナル伝達に関与していることが示唆された。活性酸素補足剤であるTironを用いた結果、Tironは8-nitro-cGMP、8-Br-cGMPのどちらの効果にも影響を及ぼさず、活性酸素は関与しないことが示唆された。8-nitro-cGMPは大脳神経細胞、BCC内で多くのタンパク質をS-グアニル化し、これらのタンパク質のS-グアニル化により開口放出が調節されることが示唆された。

<小括>

この研究において、8-nitro-cGMPがBCCからのCA放出の速度論的過程を調節していることが示された。初代培養ニューロンを用いた系では困難であったNOシグナル伝達系による開口放出速度論的解析を、モデル細胞としてBCCを用い、アンペロメトリー法によるリアルタイムな解析により可能にした。今後さらにcGMPシグナル伝達系の詳細な解析が期待される。

<総括>

これまでNOシグナル伝達系による開口放出の調節に関する報告はいくつかあるが、

NO/cGMP シグナル伝達系による研究が多く、NO の化学修飾的な調節の分子メカニズムについての詳細な報告はない。また、NO/cGMP シグナル伝達系による開口放出の調節機構に関して、詳細に速度論的解析を行った報告は少ない。本研究より脳神経系における NO シグナル伝達系による開口放出の多様な調節機構の解析が可能となり、今後 NO シグナル伝達系によるさらに複雑な調節機構の関与が明らかになるかもしれない。

審査結果の要旨

本論文は、神経系におけるシナプス情報伝達メカニズムと一酸化窒素 (NO) の役割についての申請者の研究成果をまとめたものである。第一章に記述の研究においては初代培養ラット小脳顆粒細胞 (cerebellar granule cell; CGC) からのグルタミン酸 (Glu) の開口放出に及ぼす NO の影響を調べ、NO による開口放出調節の分子メカニズムを明らかにする目的で研究を行った。NO が CGC からの脱分極誘発性 Glu 開口放出を阻害することが明らかとなった。NO が cGMP を介したシグナル伝達経路により開口放出を調節するという既存の報告があるが、CGC からの脱分極誘発性 Glu 開口放出において、NO は L 型 VDCC に酸化還元的な可逆的修飾を行い開口放出を阻害すると考えられた。この研究内容は、すでに学術論文として発表済みである。

第二章に記述の研究においては、アストロサイト、大脳神経細胞、CGC を用い、神経系での 8-nitro-cGMP の合成を調べ、ウシ副腎髄質クロマフィン細胞 (bovine chromaffin cell; BCC) を用い、アンペロメトリー法でカテコールアミン (CA) 放出に及ぼす 8-nitro-cGMP の影響を調べ、NO シグナル伝達系による開口放出の速度論的過程の調節機構を詳細に解析した。この研究において、8-nitro-cGMP が BCC からの CA 放出の速度論的過程を調節していることが示された。初代培養ニューロンを用いた系では困難であった NO シグナル伝達系による開口放出速度論的解析を、モデル細胞として BCC を用い、アンペロメトリー法によるリアルタイムな解析により可能にした。今後さらに cGMP シグナル伝達系の詳細な解析が期待される。これらの研究内容は新規で貴重な知見を含み、学術論文として発表可能と認められる。

これまで NO シグナル伝達系による開口放出の調節に関する報告はいくつかあるが、NO/cGMP シグナル伝達系による研究が多く、NO の化学修飾的な調節の分子メカニズムについての詳細な報告はない。また、NO/cGMP シグナル伝達系による開口放出の調節機構に関して、詳細に速度論的解析を行った報告は少ない。本研究はシナプス情報伝達における NO の役割を明らかにしたものであり、これらの新規の知見により脳神経系における NO シグナル伝達系による開口放出の多様な調節機構の解析が可能となり、今後さらに複雑な調節機構の関与が明らかになる可能性がある。

学位論文審査委員会は、当該論文の審査ならびに最終試験の結果に基づき、申請者に対して博士 (理学) の学位を授与することが適当であると結論した。