

称号及び氏名 博士(理学) 國枝 恒兵

学位授与の日付 平成 27 年 9 月 25 日

論 文 名 **Analysis of Formation and Function of 8-Nitroguanosine
3', 5'-Cyclic Monophosphate in Nervous Systems**
(神経系における **8-Nitroguanosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate** の
産生および機能の解析)

論文審査委員 主査 居原 秀
副査 八木 孝司
副査 原 正之
副査 佐藤 孝哉

Analysis of Formation and Function of 8-Nitroguanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate in Nervous Systems

(神経系における 8-Nitroguanosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate の産生および機能の解析)

國枝恒兵

【研究背景】

神経細胞において、一酸化窒素 (NO) は、神経型 NO 合成酵素 (neuronal NO synthase; nNOS) により産生される。nNOS は Ca^{2+} 依存的に活性化され、シナプス可塑性や神経伝達に関与している。NO の作用機構として、2 種の経路が知られている (Fig.1)。一方は NO が可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) を活性化し、セカンドメッセンジャーとして guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cGMP) を産生する経路 (NO/cGMP 経路) であり、もう一方は NO の高い反応性に依存したタンパク質や核酸の化学修飾系である。活性酸素種 (ROS) は、高い酸化活性を有し、生体分子に非特異的損傷をもたらすと考えられていたが、近年では、生体内シグナル分子として機能していると考えられている。我々の研究グループが発見した 8-nitro-cGMP は、新規のニトロ化核酸であり、生体内において NO/ROS 依存的に産生される。8-nitro-cGMP は、cGMP アナログとして機能する他、独自の性質も有しており、システイン残基に cGMP 構造を付加する S-guanylation は、新規のタンパク質翻訳後修飾として注目されている (Fig.1)。これまでに、心筋細胞やグリア細胞などで 8-nitro-cGMP の産生が報告されているが、神経組織における知見は少ない。



Fig. 1 一酸化窒素シグナル経路

神経伝達物質放出過程のシナプス小胞、シナプス前膜の融合には、soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) タンパク質ファミリーであるシナプス小胞上の VAMP2、シナプス前膜上の syntaxin1, SNAP25 が関与している。これら 3 種のタンパク質は、安定な 3 量体 (SNARE complex) を形成し、2 つの細胞膜を近接させる (Fig.2)。さらに、3 量体 SNARE complex に complexin が結合することで SNARE complex 形成に伴う膜融合が抑制され、開口放出は複雑に調節されている。

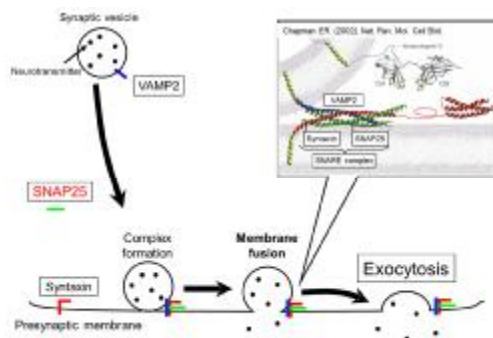


Fig. 2 SNARE と膜融合

本研究では、8-nitro-cGMP の神経系にお

る作用に注目し、神経組織中での **8-nitro-cGMP** 産生、並びに **8-nitro-cGMP** の神経機能への影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

・正常脳組織における内在性 **8-nitro-cGMP** の検出

蛍光免疫染色法、並びに質量分析装置を用いた安定同位体希釈法により、正常ラット、正常マウス脳組織中の内在性 **8-nitro-cGMP** の検出を試みた。ラット脳の凍結切片を抗 **8-nitro-cGMP**、抗 **S-guanylated protein** 抗体で蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いて検出した。また、マウス全脳に ^{13}C 標識 **8-nitro-cGMP**、及びメタノールを加えホモジナイズし、抽出液を質量分析装置により解析した。

・**8-Nitro-cGMP** の標的タンパク質の同定

S-guanylation proteomics 法、並びに免疫沈降により標的タンパク質の同定を行った。正常ラット全脳よりシナプトソームを調製し、**8-nitro-cGMP** を処理した。**S-guanylation proteomics** では、抗 **S-guanylated protein** 抗体を用いた **Western blotting** で標的タンパク質を検出し、銀染色後のゲルより対応するタンパク質を抽出、トリプシン消化し、抽出液を **LC-MS/MS** により解析した。免疫沈降では、抗 **S-guanylated** タンパク質抗体により免疫沈降を行い、各 **SNARE** タンパク質抗体を用いて **Western blotting** を行った。

・**8-Nitro-cGMP** の標的システインの同定

組換えラット **SNAP25B wild type**、4つのシステインをアラニンに置換した変異体を作製し、**8-nitro-cGMP** を処理した。その後、**8-nitro-cGMP** との反応性を **Western blotting** により比較した。

・nNOS 依存的 **SNAP25 S-guanylation** の確認

nNOS 恒常発現 **HEK-293 細胞(HEK-nNOS)**に **A23187** (Ca^{2+} イオノフォア) を処理し、nNOS 依存的な **8-nitro-cGMP** 産生を調べた。**A23187** 刺激後の **HEK-nNOS** を用い、蛍光免疫染色、**Western blotting** を行い、**8-nitro-cGMP** 産生、タンパク質 **S-guanylation** を評価した。また、**HEK-nNOS** に **SNAP25** を過剰発現させ、**A23187** 処理による **SNAP25** の **S-guanylation** への影響を調べた。

・**SNARE complex** の解析

SNARE complex が **SDS** 耐性を持つことを利用し、シナプトソーム、並びに **SNAP25 (wild type or C90A)**発現 **SH-SY5Y 細胞**中の **SNARE complex** を **Western blotting** により検出した。さらに、**complexin** によりプルダウンアッセイを行い、**8-nitro-cGMP** の **SNARE complex** と **complexin** の親和性への影響について調べた。

【結果】

・正常脳組織における内在性 8-nitro-cGMP の検出

蛍光免疫染色の結果、大脳、小脳で染色がみられ、なかでも、海馬のアンモン角、小脳のプルキンエ細胞で強い染色がみられた。さらに、質量分析により、**8-nitro-cGMP**を検出することができ、その産生量は、**2.92 ± 0.10 pmol/mg protein**であった。このことから、**8-nitro-cGMP**が神経組織において定常的に産生されていることが明らかとなった。

・8-Nitro-cGMP の標的タンパク質の同定

S-guanylation proteomicsの結果、様々な標的タンパク質が同定され、神経特異的タンパク質である **SNAP25** も同定された。さらに、抗 **S-guanylated protein** 抗体による免疫沈降後の画分に **SNAP25** が含まれた。このことから、**SNAP25** が **8-nitro-cGMP** の標的となると考える。

・8-Nitro-cGMP の標的システインの同定

組換え **SNAP25** に **8-nitro-cGMP** を処理した結果、*in vitro* においても **SNAP25** の **S-guanylation** を確認できた。さらに、**90** 番目のシステインを変異させた **SNAP25** において **S-guanylation** が顕著に減少していた。このことから、**90** 番目のシステインが標的であることが示唆された。

・nNOS 依存的 SNAP25 S-guanylation の確認

HEK-nNOS において、**Ca²⁺**依存的に **8-nitro-cGMP** が産生され、タンパク質 **S-guanylation** の亢進がみられた。さらに、**SNAP25** 発現細胞において、**Ca²⁺**依存的に **SNAP25** の **S-guanylation** が亢進した。このことから、**SNAP25** は **nNOS** 活性依存的に **S-guanylation** されることが明らかとなった。

・SNARE complex の解析

シナプトソーム、**SNAP25 (wild type)**発現 **SH-SY5Y** では、**8-nitro-cGMP** 処理により **SNARE complex** の割合が増加していた。しかし、**SNAP25 (C90A)**発現細胞では、**8-nitro-cGMP** 処理による変化はみられなかった。このことから、**90** 番目のシステインの **S-guanylation** が **SNARE complex** 形成を促進していることが示された。さらに、**8-nitro-cGMP** 処理により **complexin** と共沈降する **SNAP25** の量は減少した。このことから、**8-nitro-cGMP** は **SNARE complex** 形成を促進するとともに、**complexin** の結合を阻害していることが示唆された。

【総括】

本研究では、世界で初めて正常動物個体脳内の **8-nitro-cGMP** を検出、定量した。また、神経細胞において Ca^{2+} 流入により **nNOS** が活性化され、その下流シグナルとして **8-nitro-cGMP** が産生されることを明らかにした。さらに、**8-nitro-cGMP** が **SNAP25** を **S-guanylation** することを示し、**90** 番目のシステインがターゲットであることを明らかにした。また、**8-nitro-cGMP** は **SNAP25** の **S-guanylation** を介して **SNARE complex** の安定性を上昇させ、一方で **complexin** の結合を抑制することを明らかにした (**Fig.3**)。

これらの結果は、**8-nitro-cGMP** による **SNAP25** の **S-guanylation** を介した、新たな **NO** シグナル経路による開口放出調節機構の存在を示唆する。

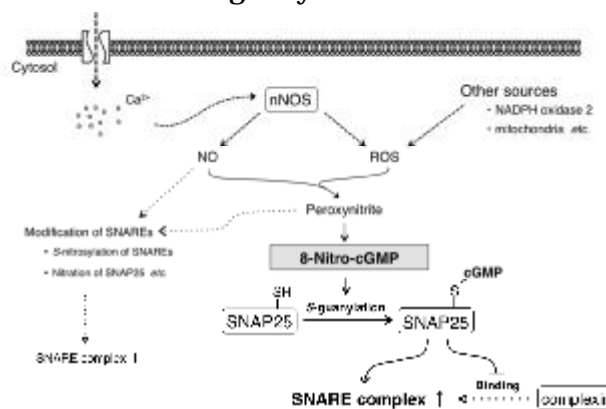


Fig. 3 本研究の summary

【論文・業績】

H. Ihara, A. K. Ahtesham, T. Ida, S. Kasamatsu, K. Kunieda, T. Okamoto, T. Sawa, and T. Akaike, *Nitric Oxide* 25, 169-175 (2011)

K. Kunieda, H. Tsutsuki, T. Ida, Y. Kishimoto, S. Kasamatsu, T. Sawa, N. Goshima, M. Itakura, M. Takahashi, T. Akaike, and H. Ihara, *ACS Chem. Neurosci.* in press (2015)

学位論文審査結果の要旨

これまでに活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) は、生体分子に非特異的損傷をもたらす毒性分子であると考えられてきたが、近年、生体内シグナル伝達に参与する機能分子として注目されている。**8-nitroguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP)**は、ROS/RNS シグナルの二次メッセンジャーとして同定され、タンパク質システイン残基に cGMP を付加する翻訳後修飾 (**S-guanylation**) を行うなどユニークな機能を持つ。本学位論文は、神経系における **8-nitro-cGMP** の産生と機能に関する研究について記述されている。

これまでに神経系における **8-nitro-cGMP** の産生、機能に関しては不明な点が多かったが、本研究では、特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法、安定同位体化合物を用いた質量分析法により、ラット、マウスの脳神経細胞内で **8-nitro-cGMP** が産生されていることを明らかにした。また、**S-guanylation** プロテオミクス法により **8-nitro-cGMP** の標的タンパク質を解析し、いくつかのタンパク質を同定した。それらの中で神経特異的に発現し神経伝達調節において重要な働きをする **synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25)** に注目した。点変異体を用いた解析から **S-guanylation** 部位が **90** 番目のシステインであることを明らかにし、細胞生物学的解析により、この残基が修飾されることにより、神経伝達物質の開口放出を制御している **SNARE complex** が安定化されること、**SNARE complex** の調節タンパク質である **complexin** の機能を調節していることを示した。これらの結果は、神経系における **8-nitro-cGMP** の産生および標的タンパク質の同定、機能解析を行った世界で初めての報告である。

近年 ROS/RNS 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、神経系における ROS/RNS シグナル制御機構について新たな知見を加えるものであり、神経伝達、神経疾患のメカニズム解明に貢献することが期待される。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、学位授与申請に値する内容であると認められた。