

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500337

研究課題名（和文） 神経型一酸化窒素合成酵素による一酸化窒素 - 活性酸素シグナル伝達機構

研究課題名（英文） Regulation of nitric oxide / reactive oxygen species signal by neuronal nitric oxide synthase

研究代表者

居原 秀（IHARA HIDESHI）

大阪府立大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：60254447

研究成果の概要（和文）：神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）は、一酸化窒素（NO）だけでなく活性酸素種（ROS）も産生する。本申請研究では、細胞情報伝達における新たな概念であるNO/ROSシグナルについて研究を行った。ROS産生能の異なるNOSスプライシング変異体発現細胞を神経毒（MPP⁺）で処理すると、NOSがNO/ROSシグナルを活性化しセカンドメッセンジャーである8-ニトロcGMPの産生を促進し、細胞死へと導く新たな情報伝達経路を見出した。

研究成果の概要（英文）：nNOS produces not only NO, but also ROS through uncoupling reaction. In this study, we investigated NO/ROS signaling, a novel concept for cellular signal transduction. In PC12 cells expressing nNOS splice variants, treatment with MPP⁺ activated the NO/ROS signaling to form a second messenger, 8-nitro-cGMP. We found a novel signal pathway leading to cell death through 8-nitro-cGMP formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学 神経薬理学

キーワード：細胞内情報伝達、一酸化窒素-活性酸素

1. 研究開始当初の背景

神経系においてNOは、神経保護、分化、シグナル伝達など様々な生理作用に関与し

ている。研究開始当初、ROSが単なる毒性因子ではなく生理的なシグナル伝達物質であり、NOとも協調して機能している（NO-ROS

シグナル伝達系、図1) ことが明らかになりつつあった。

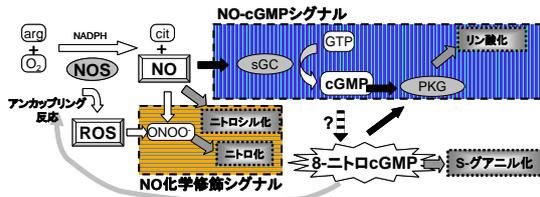


図1 NO-ROSシグナル伝達系

NO-ROS シグナル伝達機構の解明は、基礎生物学的に重要であるだけでなく、脳梗塞、パーキンソン病、アルツハイマー病などの様々な病態の解明と抗酸化的な予防対策・治療戦略を確立する上でも重要であり、その統合的理解は、基礎生物学、医学生物学を含めた生命科学の幅広い分野における学術展開に資するものと考えられていた。

NOは、NO合成酵素 (NOS) によりアルギニン (Arg)、酸素を基質として、NADPH から電子を受け取りシトルリン (Cit) と共に産生される。産生された NO は、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) を活性化し、GTP から cGMP を合成することが知られていた。cGMP は cGMP 依存性プロテインキナーゼ (PKG) を活性化し、さまざまなタンパク質をリン酸化することにより生理機能を調節している (NO-cGMP シグナル経路 縦縞背景)。NOS は NADPH から供給された電子を用い NO を合成するが、一部の電子は NO 合成に用いられずに放出され、周辺の酸素分子と反応し活性酸素種 (ROS) となる (アンカップリング反応)。nNOS 由来 ROS は NO の機能発現に関与していると考えられているが詳細は不明であった。また NO がシステインの SH 基をニトロシル化したり、NO が O_2^- と反応しパーオキシナイトライト (ONOO⁻) となりチロシン、トリプトファン、核酸塩基、脂質をニトロ化するなどして作用する例も多数報告されていた (NO 化学修飾シグナル系、横縞背景)。

2007年に申請者らは、生体内新規情報物質として cGMP のグアニン 8 位がニトロ化された 8-ニトロ cGMP を世界に先駆けて発見していた。8-ニトロ cGMP は cGMP 同様 PKG を活性化するだけでなく、蛋白質チオール基に付加する全く新規な修飾反応 (タンパク質 S-グアニル化)、NOS のアンカップラーとして機能し ROS 産生促進など cGMP にない特有の機能を有する。8-ニトロ cGMP の産生は、NO と ROS に依存しているが、詳細な産生メカニズム、神経系における生理・病理的作用についてはほとんどわかっていなかった。

nNOS にはいくつかのスプライシング変異体が存在する。脳で主に発現している nNOS α のカルモジュリン結合部位近傍に 34 アミノ酸の挿入がある nNOS μ は、最初骨格筋、心筋で見出されたが、脳での発現に関しては不明であった。研究開始当初までに申請者らは、nNOS μ 特異的モノクローナル抗体を作製しラット脳での nNOS μ の発現解析を詳細に行い、脳においても nNOS μ が nNOS 全体の約 10% 発現し、部位特異的な発現パターンを示すことを見出していた。これらの結果は、脳において nNOS μ が特異的に機能することを示唆していたが、nNOS α と nNOS μ の機能差については不明であった。

2. 研究の目的

細胞情報伝達における新たな概念である NO/ROS シグナルについて下流分子である 8-ニトロ cGMP の産生、機能も含めて、nNOS スプライシング変異体を用いて制御機構を解明することを目的にして研究を行った。

3. 研究の方法

nNOS スプライシング変異体 (nNOS α 、nNOS μ) を大腸菌内で発現、精製し、オキシヘモグロビン法による NO 産生、分光光度法によ

る NADPH 酸化、電子スピン共鳴法による活性酸素産生など酵素化学的解析を行った。またレンチウイルスベクターを用い、nNOS α 、nNOS μ を恒常発現する PC12 細胞を作製した。コントロール細胞として LacZ 発現細胞を作製した。ミトコンドリアに作用する神経毒素 (1-methyl-4-phenylpyridinium; MPP⁺) を用いて、ROS 産生、細胞毒性に関する解析を行った。NO/ROS シグナルのセカンドメッセンジャーである 8-ニトロ cGMP の産生を免疫染色法、質量分析法で解析した。さらに下流のシグナルとして H-Ras の活性化、MAP キナーゼの活性化を、プルダウンアッセイ、ウェスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

精製組換え体 nNOS α 、nNOS μ を用いた酵素化学的解析では、両酵素とも同等の NO 産生活性を示したにも関わらず、電子供与体である NADPH の消費量は、nNOS α が nNOS μ の約 2 倍であるという矛盾が生じた。NO 産生に共役しなかった電子は、周辺の酸素分子に渡され活性酸素となることが予想されたので、実際に電子スピン共鳴法で活性酸素の測定を行った。その結果、nNOS α が nNOS μ の 2.3 倍活性酸素を産生することが明らかとなり、両酵素の NO/ROS 産生比が異なっていることが明らかとなった。

さらにこの異なった NO/ROS 産生の生物学的意義を解析するために、nNOS α 、nNOS μ を恒常的に発現する PC12 細胞を作製し、nNOS 発現量が同程度であるクローンを選抜した。両細胞の NO 産生活性は同等であり、精製酵素の結果と一致していた。刺激剤として神経毒である MPP⁺を用いた。MPP⁺は、ミトコンドリアに脱共役を誘発し細胞内 ROS レベルを上昇させ、最終的に nNOS の補酵素であるテトラヒドロビオプテリンを欠乏させること

によって nNOS の脱共役を誘発する。MPP⁺で細胞を処理し ROS 産生を解析した結果、nNOS 発現細胞で、ROS 産生が認められ、その程度は nNOS α 発現細胞の方が、nNOS μ 発現細胞より多く、精製酵素の結果と一致していた。次に NO/ROS シグナルのセカンドメッセンジャーである 8-ニトロ-cGMP 産生について、免疫染色、質量分析法で解析したところ nNOS 発現細胞で 8-ニトロ-cGMP の産生が認められ、その程度は nNOS α 発現細胞の方が、nNOS μ 発現細胞より多く、コントロール細胞では認められなかった。これらの結果より、両酵素が NO/ROS シグナルを異なった制御していることが示唆された。

さらに、両酵素が産生する NO、ROS の生物学的意義を解析するため、MPP⁺誘発性細胞毒性を調べた。MPP⁺濃度依存的に細胞毒性を示し、nNOS α 発現細胞、nNOS μ 発現細胞、コントロール細胞の順で毒性が強かった。この毒性は活性酸素消去剤である Tiron で打ち消されることから、両酵素由来の ROS が毒性に関与していると考えられた。

次に nNOS に依存した細胞毒性を評価するために、申請者が心筋細胞で明らかにした「H-Ras の S-グアニル化による活性化→MAP キナーゼの活性化→細胞死」の経路を解析した。nNOS α 発現細胞を MPP⁺処理することにより、H-Ras の S-グアニル化、活性化が認められた。しかしコントロール細胞ではいずれも認められなかった。さらに下流の MAP キナーゼの一つである Erk のリン酸化も、NOS α 発現細胞を MPP⁺処理することにより確認された。H-Ras→Erk シグナルの阻害剤は、MPP⁺誘発性細胞毒性を減弱した。

また、第 3 のガス状メディエータとして注目されている硫化水素が、上述の「H-Ras の S-グアニル化による活性化→MAP キナーゼの活性化→細胞死」シグナルを阻害した。

以上、nNOS スプライシング変異体の NO と ROS 産生比が異なることを見出した。これらの nNOS スプライシング変異体を用いることにより、NO/ROS シグナルの解析が可能となり、セカンドメッセンジャーである 8-ニトロ cGMP の産生を介して、下流の H-Ras の S-グアニル化による活性化、MAP キナーゼの活性化、さらに細胞死を導いていることを示した。

以上の主要研究内容とは別に、NO、ROS が関与するシグナル伝達に関する研究も行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① 活性酸素シグナルの調節機構-ROS 毒性説から脱却した新たな概念、居原ら 3 人中 1 番目、査読無し、フレグランスジャーナル、vol. 41, 75-80, 2013
- ② 硫化水素と硫化水素シグナル関連物質の検出・定量。居原ら 2 人中 1 番目、査読無し、実験医学増刊、vol. 30, 208-213, 2012
- ③ Inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression by a polymethoxyflavone from young fruits of *Citrus unshiu* in rat primary astrocytes. Ihara ら 8 人中 1 番目(責任著者)、査読有り、Biosci. Biotechnol. Biochem., vol. 76, 1843-1848, 2012
- ④ Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. Nishida ら 16 人中 6 番目、査読有り、Nat. Chem. Biol., vol. 8, 714-724, 2012
- ⑤ Induction of apoptosis in mcf-7 cells by β -1,3-xylooligosaccharides prepared from *Caulerpa lentillifera*. Maeda ら 4 人中 3 番目、査読有り、Biosci. Biotechnol. Biochem., vol. 76, 1032-1034, 2012
- ⑥ Specificity of botulinum protease for human VAMP family proteins. Yamamoto ら 10 人中 10 番目(責任著者)、査読有り、Microbiol. Immunol., vol. 56, 245-53, 2012
- ⑦ Immunostimulatory activity of polysaccharides isolated from *Caulerpa lentillifera* on macrophage cells. Maeda ら 4 人中 3 番目(責任著者)、査読有り、Biosci. Biotechnol. Biochem., vol. 76, 501-505, 2012
- ⑧ Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signaling. Ahmed ら 9 人中 3 番目、査読有り、Biochem. J., vol. 442, 719-730, 2012
- ⑨ Nitric oxide promotes nicotine-triggered ERK signaling via redox reactions in PC12 cells. Miyamoto ら 7 人中 5 番目、査読有り、Nitric Oxide, vol. 25, 344-349, 2011
- ⑩ Methodological proof of immunochemistry for specific identification of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formed in glia cells. Ihara ら 8 人中 1 番目(責任著者)、査読有り、Nitric Oxide, vol. 25, 169-175, 2011

- ⑪ Nucleotides function as endogenous chemical sensors for oxidative stress signaling. Ihara ら 4 人中 1 番目 (責任著者), 査読有り, **J. Clin. Biochem. Nutr.**, vol. 48, 33-39, 2011
- ⑫ Antioxidant effect of a nitrated cyclic nucleotide functioning as an endogenous electrophile. Sawa ら 3 人中 2 番目, 査読有り, **Curr. Top. Med. Chem.**, vol. 11, 1854-1860, 2011
- ⑬ PKC-Dependent Inhibition of Ca²⁺-Dependent Exocytosis from Astrocytes. Yasuda ら 7 人中 6 番目, 査読有り, **Glia**, vol. 59, 143-151, 2011
- ⑭ 喫煙と酸化ストレス: Oxidative stress induced by cigarette smoking. 岡本ら 3 人中 2 番目. 査読無し, **最新精神医学** vol. 16, 431-439, 2011
- ⑮ Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. Akaike ら 4 人中 4 番目, 査読有り, **Nitric Oxide**, vol. 23, 166-174, 2010
- ⑯ Effects of low protein intake on the development of the remaining kidney in subtotaly nephrectomized immature rats: expression of inducible and endothelial NO synthase. Mino ら 7 人中 2 番目, 査読有り, **Med. Mol. Morphol.**, vol 43, 116-122, 2010
- ⑰ The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response. Fujii ら 10 人中 3 番目 (筆頭著者), 査読有り, **J. Biol. Chem.**, vol 285, 23970-23984, 2010
- [学会発表] (計 件)
- ① (Minkyung Jung) ら 10 人中 6 番目、8-ニトロ-cGMPの介する細菌GAPDHを標的とした感染防御、第86回日本細菌学会総会、2013年3月19日、千葉
- ② (笠松 真吾) ら 7 人中 7 番目、神経系における新規cGMP誘導体8-SH-cGMPの検出、第85回日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡
- ③ (國枝 恒兵) ら 8 人中 8 番目、動物細胞、組織における新規のスルフヒドリル化 cGMP (8-SH-cGMP)の産生、第85回日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡
- ④ (Kasamatsu S) ら 7 人中 7 番目、ら 7 人中 7 番目、第11回アジア太平洋神経化学会大会・第55回日本神経化学会大会、2012年10月2日、神戸
- ⑤ (Ihara H) ら 7 人中 1 番目、Quantification of a novel sulfhydrylated cGMP in mammalian cells and tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry、第7回国際NO学会学術集会、2012年7月25日、エジンバラ 英国
- ⑥ (Kasamatsu S) ら 5 人中 5 番目、nNOS modulates NO-ROS signaling in neurons via phosphorylation at Ser847、第7回国際NO学会学術集会、2012年7月25日、エジンバラ 英国

- ⑦ (Akaike T) ら3人中2番目、8-SH-cGMP endogenously formed from 8-nitro-cGMP as a second messenger of hydrogen sulfide、第7回国際NO学会学術集会、2012年7月25日、エジンバラ 英国
- ⑧ (Takeuchi T) 6人中6番目、Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling in MPP+-induced neurotoxicity、6th International Congress of Asian Society of Toxicology、2012年7月20日、仙台
- ⑨ (居原 秀)、環状ヌクレオチドと一酸化窒素、活性酸素、そして硫化水素、第12回日本NO学会学術集会、2012年6月30日、神戸
- ⑩ (居原 秀)、神経型一酸化窒素合成酵素による一酸化窒素/活性酸素シグナルの調節機構、第17回MPO研究会、2011年10月29日、熊本
- ⑪ (國枝 恒兵) ら7人中7番目、神経細胞における8-nitro-cGMPの産生とSNAREタンパク質のS-guanylation、第54回日本神経化学会、2011年9月27日、石川
- ⑫ (笠松 真吾) ら5人中5番目、神経型一酸化窒素合成酵素のリン酸化によるNO/ROS産生への影響Ser847リン酸化は神経細胞における一酸化窒素-活性酸素種シグナルを調節する、第54回日本神経化学会、2011年9月27日、石川
- ⑬ (居原 秀) ら3人中1番目、ニトロ化環状ヌクレオチドを介した一酸化窒素・活性酸素シグナル応答、分子状水素医学シ

ンポジウム 2011年2月18日、名古屋

- ⑭ (居原 秀)、天然生理活性物質による神経保護効果 - 一酸化窒素シグナルをバイオマーカーとした天然物由来の神経保護物質の探索-、農芸化学会関西支部第465回講演会・ミニシンポジウム、2010年7月3日、堺
- ⑮ (居原 秀) ら3人中1番目、ニトロ化環状ヌクレオチドの活性酸素シグナル活性とその生理的意義の証明、第63回日本酸化ストレス学会学術集会、2010年6月24日、横浜
- ⑯ (Ihara H) 5人中1番目、Superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase splice variants and its potential involvement in NO-ROS signaling、第6回国際NO学会学術集会、2010年6月18日、京都

〔図書〕(計1 件)

澤智裕、居原秀、赤池孝章、実験医学別冊 細胞の酸化ストレスを量る、2013年、239 ページ (151-158 ページ担当)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0 件)

○取得状況 (計0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

居原 秀 (IHARA HIDESHI)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：60254447