

## 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 6 月 14 日現在

機関番号：36102  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010 年度～2012 年度  
 課題番号：22590095  
 研究課題名（和文）全般てんかんにおける SUMO 化修飾を介したタンパク質安定化機構の役割に関する研究  
 研究課題名（英文）A study on the roles of nNOS-SUMO-1 conjugation and NO-nNOS machinery in PTZ-induced convulsive seizure  
 研究代表者  
 渡邊 正知（WATANABE MASATOMO）  
 徳島文理大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：30306203

研究成果の概要（和文）：全般てんかん獲得には、持続的に高発現する神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）による過剰な一酸化窒素（NO）発生が、一因と考えられている。本研究では、タンパク質の安定性・活性・局在を制御する翻訳後修飾機構に着目し、新たな nNOS の SUMO-1 化修飾機構を明らかにした。さらに、脳全体で発生する NO レベルに依存して、全般痙攣発作が抑制的あるいは促進的に制御されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that excessive nitric oxide (NO) was generated by neuronal NO synthase (nNOS) which is persistently increased in the generalized epilepsy model of pentylentetrazole (PTZ)-induced kindling rodents, which is caused by abnormal neuronal activity. In this study, we characterized a novel posttranslational modification in nNOS by small ubiquitin-related modifier (SUMO) which regulates protein stability, activity and localization. In addition, we found that the threshold of PTZ-induced convulsive seizure was defined by the NO levels in various brain regions of mice.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経薬理学・てんかん・一酸化窒素（NO）・一酸化窒素合成酵素（nNOS）・ペンチレンテトラゾール（PTZ）・small ubiquitin-related modifier（SUMO）

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんに苦しむ患者は、全世界で 500 万人にも上る（World Health Organization, 2009）。これまで、てんかんは抗てんかん薬によりコントロールしやすい疾患とされていた（Shorvon, *Epilepsia*, 2009）。しかし、近年の調査よりその約 30%の患者が抗てんか

ん薬耐性の難治性てんかんであることが明らかとなり（Kwan and Brodie, *Expert Rev Neurother*, 2006）、てんかん発作発症・獲得の分子メカニズム解明に基づく新たな治療薬開発が急務とされている。

てんかん発作は、部分発作と全般発作とに大別されるが、全般発作発症メカニズムに関

しては不明な点が多い。全般発作は、焦点がなく大脳両側での異常な神経発火により誘発される。この「焦点がない」＝「病巣を捉えることができない」が全般発作の最大の特徴であり、それゆえ発症メカニズム解明を困難にしていると考えられる。

我々は、痙攣発作の原因のひとつとして考えられている一酸化窒素 (NO) の関与に着目した。ペンチレンテトラゾール (PTZ) 誘発キンドリング獲得モデル (実験全般てんかん獲得モデル) を用いたところ、持続的に高発現する神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) によって産生される過剰な NO が全般痙攣発作を誘発することを明らかにした (Itoh & Watanabe et al., *Neuroscience*, 2004.)。この事実は、過剰な NO 産生をもたらす nNOS 高発現機構 (タンパク質安定化機構の異常) が全般てんかん発症の一因となりうることを示唆する。一方、我々は、脳内で発生する NO は、PTZ 誘発痙攣発作を抑制的に制御することも見出した (Itoh & Watanabe, *Neuroscience*, 2009.)。NO の痙攣発作における相反作用の制御には、その発生量を規定することに他ならないが、NO 発生量の制御が痙攣発作を制御しうることを示唆する。

## 2. 研究の目的

PTZ 誘発キンドリング獲得には、持続的に高発現する nNOS によって産生される過剰な NO が、その一因と考えられている。本研究では、(1) 過剰な NO 発生部位を全般発作の病巣あるいは薬物治療の標的部位とし、また (2) 過剰な NO を産生する nNOS タンパク質の安定化/分解制御異常をてんかん発症のメカニズムとして位置付け、それらの解明を手掛かりに、全般てんかん発症メカニズムにおけるタンパク質安定化機構の役割を明らかにすることを目的とした。

(1) PTZ 誘発痙攣発作における NO には相反する二面性がある。生理的な NO は NMDA 受容体のニトロソ化を介して神経細胞の過剰興奮を抑制し、過剰な NO は神経の過剰興奮を誘発する (Itoh & Watanabe et al., *Neuroscience*, 2004.; Itoh & Watanabe, *Neuroscience*, 2009.)。NO の神経活動に対する相反作用を適切に制御することで、痙攣発作自体を制御できることが期待されるが、痙攣発作時における NO の発生部位および NO の発生量は不明である。そこで本研究では、痙攣発作を制御する NO 発生部位およびその量を明らかにすることで、全般発作の病巣をとらえ治療標的として確立することを目的とする。

(2) nNOS タンパク質の安定性・分解は、主にユビキチン化修飾によって制御されていると考えられている。しかし、PTZ 誘発キンドリング獲得時における nNOS の持続的

高発現におけるユビキチン化修飾の関与はこれまで認められていない (科研費成果報告: 課題番号 19790080)。そこで我々は、タンパク質の安定性・活性・局在を制御する翻訳後修飾機構の 1 つである small ubiquitin-related modifier (SUMO) 化修飾に着目したところ、nNOS が SUMO-1 化修飾されることを見出した。そこで本研究では、新たな nNOS の SUMO-1 化修飾機構を明らかにするとともに、nNOS タンパク質の安定性/分解制御機構における SUMO 化修飾の役割を明らかにすることを目的とした。また、得られた知見を基盤とし、キンドリング獲得機構における SUMO 化修飾を介したタンパク質安定化機構の役割の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 全般発作モデルの作成と痙攣のスコア化

動物実験は、当該動物実験施設の倫理委員会承認のもと、「徳島文理大学香川薬学部における動物実験の指針」に基づき行った。PTZ を腹腔より投与し、行動変化を観察した。痙攣行動は、我々の以前の報告 (Itoh & Watanabe, *Neurosci*, 2009) に順じ、0~5 のステージに分類しスコア化した。スコア 4 (全般性間代発作: GCS) およびスコア 5 (全般性強直間代発作: GTCS) を全般痙攣発作とした。

### (2) *ex vivo* X-band EPR による脳内 NO 発生量の定量

PTZ 投与 30 分前に、NO 特異的なスピントラップ剤 (500 mg/kg DETC, i.p. + iron-citrate complex, s.c.) を投与した。PTZ 投与後、10 分間行動変化を観察した後、脳を摘出し、大脳皮質 4 部位 (前頭葉・側頭葉・頭頂葉・後頭葉) および海馬・小脳に分割した。脳内で発生した NO は、E500 X-band EPR (Bruker) にて測定し、定量化した。

### (3) HEK293T 細胞の強制発現系を用いた nNOS の SUMO-1 化修飾機構の同定

pCDNA-FLAG-rat nNOS, pCAGGS-HA-human SUMO-1 および関連する発現プラスミドは、リン酸カルシウム法にて HEK293T 細胞に導入し、48 時間後、免疫沈降 (IP) およびイムノブロット (IB) に供した。

### (4) 質量分析計による nNOS の SUMO-1 化修飾の同定

組換え nNOS タンパク質および組換え SUMO-1 化修飾関連タンパク質を用い、*in vitro* SUMO-1 反応を行った。標的分子は、トリプシンにて *in gel* 消化後、AXIMA-QIT (SHIMADZU) を用いた MS<sup>n</sup> 解析にて同定した。

## 4. 研究成果

(1) 全般痙攣発作を制御する NO 発生機構の解明 (Watanabe et al., *Exp Neurol*, *in press*)

①過剰な NO による全般痙攣発作の誘発

PTZ 誘発痙攣発作と脳内における NO 発生量との相関性を明らかにするために、*ex vivo* X-band EPR を用い脳各部位ごとの NO 発生量を定量した。脳内の NO 発生量は PTZ 投与量に依存したが、痙攣の重症度は PTZ 投与量に依存しなかった。興味深いことに、全般痙攣発作が誘発されたときには、脳すべての部位で基底レベルの 1.5 倍以上の NO が発生していた (Fig.1)。このことは、NO 発生量が基底レベルの 1.5 倍以上に達すると全般痙攣発作が誘発されることを示唆する。

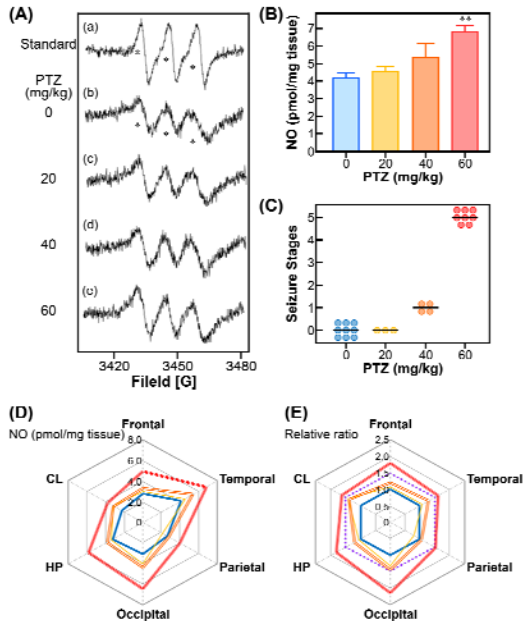


Fig. 1. PTZ-induced convulsive seizures involve excessive NO production in all brain regions.

- (A) Typical *ex vivo* X-band EPR spectra of the (DETC)<sub>2</sub>-Fe(II)-NO complex in the temporal region of the cerebrum from PTZ-injected mice. Characteristic EPR signals of the (DETC)<sub>2</sub>-Fe(II)-NO complex (asterisks) were gradually increased depending on the dose of PTZ (b-e).
- (B) NO content in the temporal region of PTZ-injected mice. An approximately linear correlation was observed between the increase in NO production and the dose of PTZ injection (R<sup>2</sup> = 0.9277). \*\* P < 0.01, vs control.
- (C) Behavioral changes induced by PTZ injection. Behavioral changes were observed for 10 minutes after PTZ injection, and the mice were scored according to a 1–5 rating scale. Each bar shows the mean score.
- (D) NO content measured by X-band EPR in various brain regions from PTZ-injected mice.
- (E) The relative ratio between the NO levels in control and PTZ-injected mice in each brain region.

そこで、NO 発生量を nNOS 阻害剤 (3Br7NI) にて抑制したところ、全般痙攣発作は抑制された。また、nNOS の活性化はグルタミン酸神経活動依存的であることから、

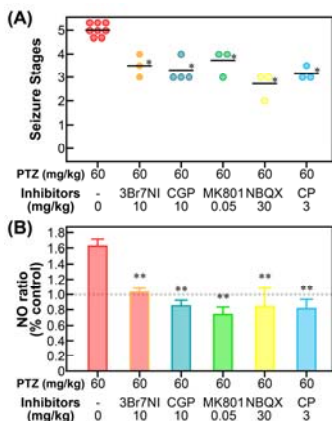


Fig. 2. Enhanced NO content mediated by glutamatergic neuronal excitation is the threshold for induction of GCS & GTCS in PTZ-injected mice.

- (A) Each inhibitor was injected 30 minutes before PTZ injection. The bars indicate the mean score. \* P < 0.05, vs control.
- (B) The NO concentrations in the inhibitor-treated murine brains were normalized to the basal NO content levels of normal mice. \*\* P < 0.01, vs PTZ-injected mice.

NMDAR および AMPAR のアンタゴニストを用いたところ、NO 発生量は基底レベルまで抑制され、全般痙攣発作も抑制された (Fig.2)。これらの結果から、全般痙攣発作は、グルタミン酸神経活動によって活性化された nNOS が産生する過剰な NO 依存的に誘発されることが明らかとなった。

一方、いずれの阻害剤を用いても PTZ 誘発非痙攣性発作 (score1-3) は抑制されなかった (Fig. 2)。この事は、PTZ 誘発非痙攣性発作は NO 非依存的であることを示唆する。そこで、全般痙攣治療薬のバルプロ酸 (VPA) およびエトスクシמיד (ESM) を用い、PTZ 誘発非痙攣性発作における NO の関与を検討した。VPA および ESM は、PTZ 誘発全般痙攣発作および非痙攣性発作のいずれも抑制した。一方、PTZ 誘発過剰 NO 産生は、基底レベルまで抑制されたがそれ以上は抑制されなかった (Fig. 3)。これらの結果から、PTZ 誘発非痙攣性発作は、NO 発生量には非依存的であり、T-type Ca<sup>2+</sup> チャンネルからの Ca<sup>2+</sup> 流入を介して惹起されることが示唆された。

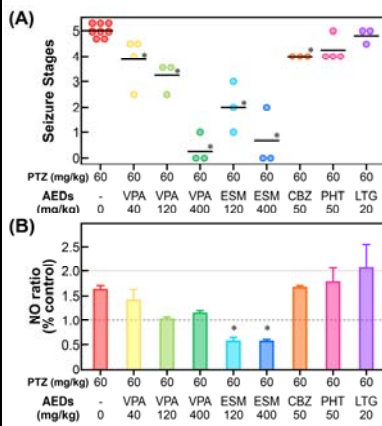


Fig. 3. Effects of AEDs on PTZ-induced convulsive seizures.

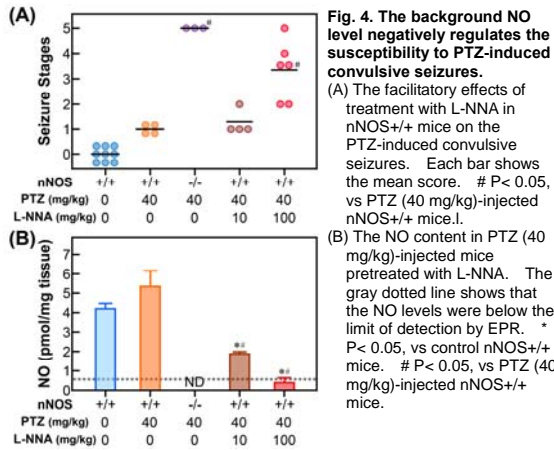
- (A) Anticonvulsant effects of AEDs on PTZ-induced convulsive seizures. \* P < 0.05, vs without AEDs.
- (B) The relative ratio of NO production in PTZ-injected mice treated with AEDs. \* P < 0.05, vs PTZ-injected mice.

以上の結果から、脳全体で発生する NO が基底レベルの 1.5 倍以上に達すると全般痙攣発作が惹起されることが明らかとなった。

②基底レベルの NO による全般発作の抑制

NO は PTZ 誘発痙攣を惹起するだけでなく、抑制的にも作用する (Itoh and Watanabe, *Neurosci*, 2009)。nNOS 遺伝子欠損マウス (nNOS<sup>-/-</sup>) は、野生型 (nNOS<sup>+/+</sup>) では非痙攣性発作しか引き起こさない低用量の PTZ によって激しい全般痙攣発作を引き起す。この現象は、nNOS<sup>+/+</sup> に nNOS 阻害剤を前投与し nNOS 活性を著しく抑制することで再現された。いずれも脳内で発生する NO レベルは、検出限界以下であった。以上より、基底レベルよりも極めて低レベルの NO が PTZ 誘発痙攣感受性を抑制的に制御していることが明らかとなった (Fig. 4)。

本研究より、脳全体で発生する低レベルの NO は全般痙攣発作を抑制的に制御し、脳全体で発生する高レベルの NO は全般痙攣発作を惹起することが明らかとなった。

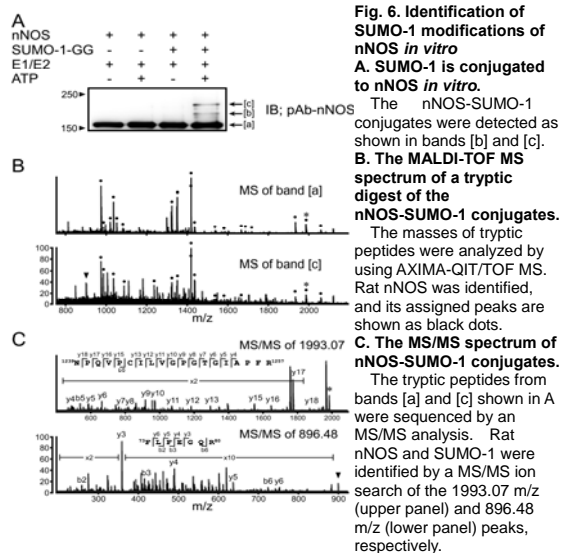
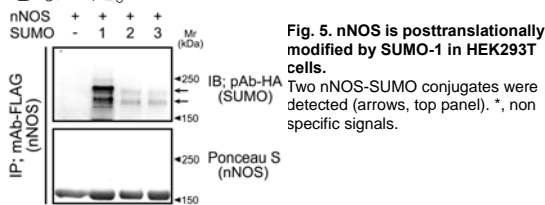


nNOS によって発生する NO レベルの制御が、新たな抗てんかん薬の創薬ターゲットになりうることを期待された。

(2) nNOS タンパク質の安定性/分解制御機構における SUMO 化修飾の役割

① 新たな nNOS のタンパク質翻訳後修飾機構: SUMO-1 修飾機構の同定 (Watanabe & Itoh, *BBA*, 2011)。

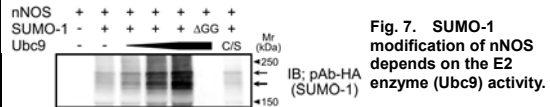
HEK293T を用いた強制発現系による IP/IB (Fig. 5)、および *in vitro* SUMO 化反応産物の質量分析 (Fig. 6) より、nNOS は細胞レベルおよび *in vitro* にて、少なくとも 2 箇所が SUMO-1 化修飾されることが明らかとなった。



SUMO 化修飾反応は、E1(活性化酵素)、E2(結合酵素)および E3 リガーゼにより触媒され、SENPs により脱 SUMO 化される。そこで、nNOS の SUMO-1 化修飾反応に関与す

るそれら酵素群を解析した。

SUMO 化修飾反応は E2 の Ubc9 の酵素活性に依存する。そこで、nNOS の SUMO-1 修飾反応における Ubc9 の影響を検討したところ、2 か所の SUMO-1 修飾は Ubc9 の酵素活性依存的であることが証明された (Fig. 7)。



SUMO 化修飾反応は E3 リガーゼによって促進される。基質特異性の広い PIAS family の影響を検討したところ、nNOS の SUMO-1 化修飾には PIASXβ が E3 として機能することが示された (Fig. 8)。

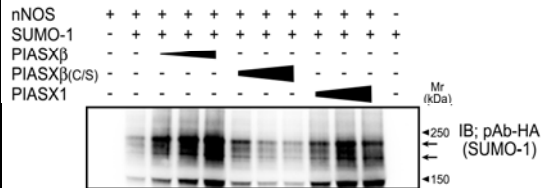


Fig. 8. PIASXβ functions as an E3-ligase for nNOS.

SUMO 化されたタンパク質は、イソペプチダーゼ活性を有する SENP family によって迅速に脱 SUMO 化される。そこで、SENP family の影響を検討したところ、nNOS の SUMO-1 化修飾は、SENP1 および SENP2 によって脱 SUMO 化されることが明らかとなった (Fig. 9)。

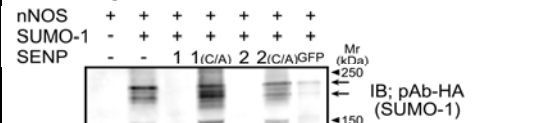


Fig. 9. SENP1 and SENP2 function SUMO-deconjugating enzymes for nNOS-SUMO-1 conjugates.

興味深いことに、nNOS が高発現する小脳顆粒細胞には、SUMO-1, Ubc9, PIASXβ いずれも発現している。それらの発現様式は不明だが、脳内でも nNOS が SUMO 化修飾されることが示唆される。

以上より、nNOS の新たな SUMO-1 翻訳後修飾機構が同定された。

② nNOS の SUMO-1 化修飾による機能制御

nNOS の SUMO-1 化修飾反応は、一部のドメイン構造ではなく全長の立体構造が重要であることが示唆された (Watanabe & Itoh, *BBA*, 2011)。nNOS はホモ 2 量体にて活性化/安定化する。そこで、nNOS の NO 合成酵素活性や nNOS タンパク質安定性に対する SUMO-1 化修飾の影響を検討したが、現在までのところ明確な関与は認められていない。「SUMO-1 修飾による nNOS 機能制御機構」解明には、nNOS の SUMO-1 化修飾部位同定に基づく更なる機能解析が必要である。

③ 全般てんかん獲得モデルにおける SUMO 化修飾タンパク質群の影響

近年、脳虚血モデルにおいて、SUMO 化修飾タンパク質群の発現量変動が報告された



(Cimarosti, et al., *Neuropharmacol*, 2008; Lee, et al., *J Neurochem*, 2009)。脳虚血の病態には NO の関与が報告されており、過剰な NO によって惹起される全般てんかん獲得過程においても、SUMO 化修飾タンパク質群の発現変化が推測された。そこで、PTZ 誘発キンドリング獲得モデルにおける SUMO 化修飾タンパク質群の発現量変動をイムノブロットにて検討したが、現在までにその標的分子の同定には至っていない。全般てんかん獲得過程における SUMO 化修飾機構の関与を明らかにするためには、標的分子の同定に基づく更なる検討が必要である。

④ 痙攣発作を惹起する過剰な NO がもたらす脳機能異常

全般てんかんにおける新たな脳機能異常の指標確立を目的とし、小動物用 MRI を用いた非侵襲的な脳機能評価方法 (Hama et al., *Biol Pharm Bull*, 2012) を改変し、血液脳関門 (BBB) と痙攣発作との関連性を検討した。PTZ 誘発痙攣発作時には、BBB の機能不全が認められた。さらに BBB 不全は、痙攣を惹起する過剰な NO に依存することが明らかとなった (第 86 回日本薬理学会年会、2013)。種々の中枢神経系疾患において、BBB 機能不全と脳内酸化ストレスの関連性が示唆されている。全般てんかんにおける BBB 機能不全は、酸化ストレスの影響を受けやすい SUMO 化修飾機構およびタンパク質安定性の役割を検討する上で、新たな指標となることが期待された。

## 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 4 件)

- ① Watanabe M, Miyai A, Danjo S, Nakamura Y, Itoh K, The threshold of pentylentetrazole-induced convulsive seizures, but not that of nonconvulsive seizures, is controlled by the nitric oxide levels in murine brains, *Experimental Neurology*, 査読有、2013、*in press*.  
DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.02.019
- ② Hama S, Ishihara Y, Watanabe M, Danjo S, Nakamura Y, Itoh K, Effects of sulfaphenazole after collagenase-induced experimental intracerebral hemorrhage in rats, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 査読有、35、2012、1849-1853.  
DOI: 10.1248/bpb.b12-00525
- ③ Itoh K, Fujisaki K, Watanabe M, Human LICAM carrying the missense mutations of the fibronectin-like type III

domains is localized in the endoplasmic reticulum and degraded by polyubiquitylation, *Journal of Neuroscience Research*, 査読有、89、2011、1637-1645.

DOI: 10.1002/jnr.22695

- ④ Watanabe M, Itoh K, Characterization of a novel posttranslational modification in neuronal nitric oxide synthase by small ubiquitin-related modifier-1, *Biochem Biophys Acta*, 査読有、1814、2011、900-907.  
DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.04.006

[学会発表] (計 8 件)

- ① ○南知尋\*, 渡邊正知, 伊藤康一, Mass spectrometric characterization of the glycosylation sites and pattern of neural cell adhesion molecule L1 expressed in murine brain, 日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜 (横浜) \*優秀発表賞受賞
- ② ○伊藤康一, 檀上園子, 石原康宏, 渡邊正知, 中村祐, Blood-brain barrier leakage is transiently induced by activity-dependent excessive nitric oxide production, 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 22 日、福岡国際会議場 (福岡)
- ③ ○伊藤康一, 渡邊正知, The assessment of brain functions in the proconvulsants-provoked convulsive seizure model mice using magnetic resonance imaging, 第 46 回日本てんかん学会、2012 年 10 月 11 日、都市センターホテル (東京)
- ④ ○渡邊正知, 宮井明日香, 伊藤康一, Anticonvulsant effects of AEDs against PTZ-induced generalized seizures are controlled by NO levels in mice brain, 第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14 日、京都国際会館 (京都)
- ⑤ 伊藤康一, 檀上園子, ○渡邊正知, 鴻海俊太郎, 中村祐, ガドリニウム増強磁気共鳴画像法を用いた PTZ 単回投与誘発発作モデルマウスにおける BBB 破綻の解析, 第 45 回日本てんかん学会、2011 年 10 月 6 日、朱鷺メッセ (新潟)
- ⑥ ○檀上園子, 渡邊正知, 鴻海俊太郎, 中村祐, 伊藤康一, ガドリニウム増強磁気共鳴画像法を用いた PTZ 誘発キンドリングマウスにおける BBB 損傷の解析, 第 45 回日本てんかん学会、2011 年 10 月 6 日、朱鷺メッセ (新潟)
- ⑦ 宮井明日香, 渡邊正知, 鴻海俊太郎, 伊藤康一, 神経活動依存的な生体内一酸化窒素 (NO) 発生量と痙攣発作との関連

関係、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2010、2010 年 9 月 11 日、京都大学薬学部（京都）

- ⑧ 渡邊正知，宮井明日香，伊藤康一、Characterization of a novel posttranslational modification in neuronal nitric oxide synthase by small ubiquitin-related modifier-1; SUMO-1、Neuro 2010、2010 年 9 月 2-4 日、神戸コンベンションセンター（神戸）

[その他]

ホームページ：<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph02/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 正知 (WATANABE MASATOMO)  
徳島文理大学・薬学部・准教授  
研究者番号：30306203

### (2) 研究分担者

伊藤 康一 (ITO KOUICHI)  
徳島文理大学・薬学部・教授  
研究者番号：30291149

### (3) 連携研究者

大島 隆幸 (OHSHIMA TAKAYUKI)  
徳島文理大学・薬学部・准教授  
研究者番号：10397557