

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06774

研究課題名(和文)カルシウム放出チャネルのS-ニトロシル化及び酸化修飾を介した小脳機能制御機構

研究課題名(英文)Regulation of Cerebellar Function by Redox Modification of Calcium-Release Channel

研究代表者

柿澤 昌(Kakizawa, Sho)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40291059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、カルシウム放出チャネルの一種、1型リアノジン受容体(RyR1)の一酸化窒素(NO)や活性酸素(ROS)による制御と、その脳における機能的意義の解明を目的に計画された。NOによるS-ニトロシル化を受けるシステインをアラニンに置換した変異型RyR1を発現するノックインマウスの解析により、S-ニトロシル化依存的なRyR1活性化の小脳依存的運動学習への関与が示された。また、同じシステインのチオールを標的とするROSの作用により、RyR1のS-ニトロシル化と活性化が阻害されることが示された。本研究により、NO・ROS等のレドックスシグナルによる神経機能制御機構と学習記憶への関与が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一酸化窒素(NO)や活性酸素(ROS)などのレドックスシグナルは、従来、生活習慣病や老化の主要因の一つとされ、悪玉的役割が注目されてきた。本研究ではNOによるCa<sup>2+</sup>放出チャネルの化学修飾(S-ニトロシル化)の小脳依存的運動学習への関与が解明され、レドックスシグナルの脳における善玉的作用が示された。これは悪玉因子とされていたレドックスシグナルが善玉的役割をも有することを示す、新規概念の提唱へと繋がる。また、従来よりROSによる生体機能阻害が知られていたが、その分子機構は多くの点で不明であった。今回、ROSによるS-ニトロシル化阻害を介した生体機能阻害が示され、老化の分子機構の一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：Although possible involvement of redox signals, such as nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), in brain functions are suggested in recent studies, the molecular mechanism and functional role of redox modification has yet to be determined. In the present study, we conducted knock-in (KI) mice expressing type 1 ryanodine receptor, a Ca<sup>2+</sup> release channel, with Cys-to-Ala mutation. In this mice, NO-dependent S-nitrosylation of RyR1 was inhibited. In addition, cerebellar synaptic plasticity as well as cerebellar-dependent motor learning were also impaired. These results demonstrated that essential role of S-nitrosylation of RyR1 in learning and memory. Furthermore, pretreatment of the cerebellar slices with ROS abolished S-nitrosylation of RyR1 and the resultant activation of the receptor. Taken together, the study proceeds our understanding of biological significance and mode of action of redox signals in brain.

研究分野：神経薬理学・神経生理学、基礎老化学

キーワード：一酸化窒素 活性酸素 レドックスシグナル 翻訳後修飾 カルシウム放出 リアノジン受容体 小脳 運動学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素(NO)や活性酸素(ROS)によるタンパク質中の翻訳後修飾の様々な生体機能への関与が近年示唆されているが、脳における機能的役割や分子機構は多くの点が不明である。研究代表者らは近年、マウス小脳の平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおいてNO依存的な長期増強(long-term potentiation; NO-LTP)を発見した(Namiki & Kakizawa et al, J Physiol 2005)。そして、このNO-LTPのNOによるS-ニトロシル化およびプルキンエ細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルへの依存性に気付いたのを契機に、Ca<sup>2+</sup>放出チャネルの一種、1型リアノジン受容体(RyR1)がS-ニトロシル化依存的に活性化され起こる新規細胞内Ca<sup>2+</sup>放出機構、NO依存性Ca<sup>2+</sup>放出(NO-induced Ca<sup>2+</sup> release; NICR)を発見した。さらに培養細胞系を用いた実験により、NICRには1型リアノジン受容体の3636位システインのS-ニトロシル化が必要であることを示した(Kakizawa et al, EMBO J 2012)。さらに代表者らの先行研究において、薬理学的実験によりNICRのNO-LTPへの関与の可能性を示された。小脳のシナプス可塑性は、小脳依存的な運動学習の基盤とされていることから、RyR1のS-ニトロシル化、ひいてはNICRの、小脳機能への関与が推測される。また代表者らは、S-ニトロシル化の標的であるシステインは酸化シグナルによる修飾(ジスルフィド化)の標的でもあること、生体内では加齢に伴う酸化修飾の蓄積が見られることに着目し、NO-LTPが酸化シグナルにより阻害されることを示した(Kakizawa et al, Neurobiol Aging 2012)。NO-LTPへのNICRの関与が予想されていることから、さらに酸化シグナルによるRyR1のS-ニトロシル化およびNICRの阻害が推測される。

## 2. 研究の目的

NICRに必要なRyR1、NO合成酵素とともに生体内で広く発現が見られるため、NICRの様々な生命現象への関与が推測されるが、薬理的にNO-LTPや神経細胞死への関与が示されているのみである。そこでNICRに必要な3636位システインをアラニンに置換した変異型リアノジン受容体を発現するノックインマウス(RyR1<sup>C3636A</sup>マウス)を作製し、その表現型解析によりNICRの機能的役割解明を目指した。さらに、ROSはS-ニトロシル化の阻害を介して分子機能ひいては生体機能を阻害するとの仮説に基づき、RyR1のS-ニトロシル化・NICRを解析対象として、ROSによる生体阻害機構の分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究課題は、「1. ノックインマウスの表現型解析によるNICRの機能的役割解明」と「2. 酸化シグナルによるNICRの阻害機構解明」の二項目からなる。前者は脳におけるS-ニトロシル化修飾の機能的意義と作用機序の解明を、後者は活性酸素による生体機能阻害・老化の分子機構の解明を目指すものである。

### (1) ノックインマウスの表現型解析によるNICRの機能的役割解明

RyR1<sup>C3636A</sup>マウスにおける変異型リアノジン受容体のS-ニトロシル化およびNICRの阻害を確認した上で、NICRの神経回路網レベルでの機能的役割解明のために、小脳シナプス可塑性への影響を調べる。尚、予備実験によりRyR1<sup>C3636A</sup>マウスのヘテロ個体でもNICRが半分程度阻害されることが示されているため、対照群には野生型個体を用いる。

変異型リアノジン受容体におけるS-ニトロシル化阻害： S-ニトロシル化を特異的に検出する生化学的手法(SNO ビオチンスイッチアッセイ；還元剤としてアスコルビン酸を使用)により、RyR1<sup>C3636A</sup>マウス小脳タンパク質中における変異型リアノジン受容体のS-ニトロシル化の特異的阻害を確認する。

NICRの阻害： RyR1<sup>C3636A</sup>マウス小脳スライス標本において、パッチクランプ法によりプルキンエ細胞にCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬を導入し、イメージング法によりNICRの阻害を確認する。比較として、同じリアノジン受容体でカフェイン依存的に誘導されるCa<sup>2+</sup>放出も測定し、NO依存性Ca<sup>2+</sup>放出が特異的に阻害されることを確認する。

シナプス可塑性の阻害： RyR1<sup>C3636A</sup>マウス小脳スライス標本におけるNO-LTP等の平行線維シナプス可塑性を電気生理学的手法(パッチクランプ法)により解析し、NICRの関与を明らかにする。

運動協調の阻害： 回転棒テストによりRyR1<sup>C3636A</sup>マウスにおける運動協調阻害を示す。並

行して、握力テスト・懸垂テスト等により RyR1<sup>C3636A</sup> マウスの筋力に異常が無いことを確認する。

小脳依存的運動学習の阻害： 瞬膜反射条件付け(徳島文理大学・岸本泰司博士の協力を得て行う)により、小脳依存的運動学習の RyR1<sup>C3636A</sup> マウスにおける阻害を示す。

## (2) 酸化シグナルによる NICR の阻害機構

酸化シグナルが、ジスルフィド化修飾の形成を介し S-ニトロシル化を阻害することで生体機能を阻害すること、及び加齢個体では内因性酸化シグナルによるジスルフィド化修飾形成が S-ニトロシル化の阻害を介して老化の原因になることを、以下の実験により明らかにする。

酸化試薬(過酸化水素等)前処理済みの若齢個体由来の小脳における RyR1 (野生型)の NO による S-ニトロシル化阻害を、SNO ビオチンスイッチアッセイで確認する。

酸化試薬前処理済みの若齢個体由来小脳スライス標本における NICR 阻害をイメージング法により確認する。

酸化試薬前処理済みの若齢個体由来小脳内の 1 型リアノジン受容体におけるジスルフィド化修飾増加を、ジスルフィド化修飾を特異的に検出する生化学的手法(SS ビオチンスイッチアッセイ; 還元剤としてジチオスレイトール(DTT)を用いる)により確認する。

上記 ~ の解析を酸化試薬前処理を行わない老齢個体(約 20 ヶ月齢)由来の小脳サンプルでも行い、内因性酸化シグナルによる NICR の阻害機構と老化への関与を明らかにする。

## 4 . 研究成果

### (1) ノックインマウスの表現型解析による NICR の機能的役割解明

RyR1<sup>C3636A</sup> マウスのヘテロ個体同士の交配によりホモ個体を得るとともに、同腹の野生型個体を対照群の実験に用いた。尚、ヘテロ個体、ホモ個体ともに、野生型と同条件の飼育環境下で育成した。以下、RyR1<sup>C3636A</sup> マウスの変異型個体は、全てホモ個体である。

野生型および変異型マウス的小脳 lysate を用いて、タンパク質 S-ニトロシル化を SNO ビオチンスイッチアッセイ法により調べたところ、変異型 RyR1 における S-ニトロシル化阻害が見られた。一方、他のタンパク質の S-ニトロシル化レベルには有意な差が見られなかったことから、変異型個体においては、RyR1 の S-ニトロシル化が選択的に阻害されたと考えられる。

引き続き、RyR1<sup>C3636A</sup> マウス由来の小脳急性スライス標本を用いた Ca<sup>2+</sup>イメージング法により、変異型小脳プルキンエ細胞における NICR の阻害を示した。一方、同じ RyR を介するカフェインに対する応答(カフェイン依存的 Ca<sup>2+</sup>放出)は正常であったことから、変異型で見られる NICR の阻害は、RyR1 の発現や差細胞内 Ca<sup>2+</sup>貯蔵庫の以上に起因するものではないと考えられる。

また、同じく小脳急性スライス標本を用いた電気生理学的手法(ホールセルパッチクランプ法)により、変異型における平行線維 - プルキンエ細胞シナプスにおける長期増強(N0-LTP)の阻害を明らかにした。一方、同じシナプスで見られる長期抑圧(小脳 LTD)は正常であった。

さらに、小脳依存的学習の解析の一環として、ローターロードテストを行ったところ、変異型個体で有意な阻害が見られた。また、瞬膜反射条件付け学習(徳島文理大学香川薬学部・岸本泰司教授との共同研究)においては、条件付けの成立過程は正常であったが、消去過程(消去学習)で有意な阻害が見られた。以上一連の結果から、RyR1 の S-ニトロシル化および NICR の小脳依存的運動学習への関与が明らかになった。これらの研究成果は論文として査読付き国際誌に投稿され、現在、revise 中である(Kakizawa S et al. revise 中)。

また、同じ RyR1<sup>C3636A</sup> マウスを用いた東京大学・東邦大学等との共同研究により、変異型個体における癲癇誘発性前脳細胞死の抑制が認められた。このことから RyR1 の S-ニトロシル化および NICR は、脳の生理機能に加え、その異常亢進により興奮性細胞死にも関与することが示された(Mikami Y...Kakizawa S, Iino M, EBioMed, 2016)。

### (2) 酸化シグナルによる NICR の阻害機構

まず、外因性 ROS の NICR への効果を、過酸化水素で前処理した若齢マウス由来小脳急性スライス標本を用いた Ca<sup>2+</sup>イメージングにより調べたところ、ほぼ完全な阻害が見られた。

引き続き、内因性の ROS の効果と老化への影響を調べるため、約 20 ヶ月齢の老齢マウス個体由来の小脳スライスにおける NICR を解析したところ、有意な阻害が見られた。

これら阻害のメカニズムの解明のため、SNO ビオチンスウィッチアッセイにより SNO 化の阻害を、S-S ビオチンスウィッチアッセイによりジスルフィド化の形成の解析を行い、外因性 ROS 及び加齢による影響を示唆するデータを得た。これらの成果は、査読付き国際誌で発表するために現在、投稿準備中である(Kakizawa S et al. 投稿準備中)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Van B., Nishi M., Komazaki S., Ichimura A., Kakizawa S., Nakanaga K., Aoki J., Park K. H., Ma J., Ueyama T., Ogata T., Maruyama N., Takeshima H. Mitsugumin 56 (hedgehog acyltransferase-like) is a sarcoplasmic reticulum-resident protein essential for postnatal muscle maturation. *FEBS Letters* 589, 1095-1104, 2015. doi: 10.1016/j.febslet.2015.03.028. 査読有

Zhao C., Ichimura A., Qian N., Iida T., Yamazaki D., Noma N., Asagiri M., Yamamoto K., Komazaki S., Sato C., Aoyama F., Sawaguchi A., Kakizawa S., Nishi M., Takeshima H. Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization. *Sci Signal* 9, ra49, 2016. doi: 10.1126/scisignal.aad9055. 査読有

Baba S., Onga K., Kakizawa S., Ohya K., Yasuda K., Otsubo H., Scott B. W., Burnham W. M., Matsuo T., Nagata I., Mori N. Involvement of the neuronal phosphotyrosine signal adaptor N-Shc in kainic acid-induced epileptiform activity. *Sci Rep* 6, 27511, 2016. doi: 10.1038/srep27511. 査読有

Mikami Y., Kanemaru K., Okubo Y., Nakaune T., Suzuki J., Shibata K., Sugiyama H., Koyama R., Murayama T., Ito A., Yamazawa T., Ikegaya Y., Sakurai T., Saito N., Kakizawa S.\*, Iino M. Nitric Oxide-induced Activation of the Type 1 Ryanodine Receptor Is Critical for Epileptic Seizure-induced Neuronal Cell Death. *EBioMedicine* 11, 253-261, 2016. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.08.020. 査読有 (\*corresponding author)

Mikami Y., Kakizawa S., Yamazawa T. Essential Roles of Natural Products and Gaseous Mediators on Neuronal Cell Death or Survival. *Int J Mol Sci* 17, 1652, 2016. DOI: 10.3390/ijms17101652. 査読有

柿澤 昌, 森口 茂樹. 脳における細胞内  $Ca^{2+}$  ストアの制御機構と脳疾患の新たな治療戦略序文. *日本薬理学雑誌* 147, 183, 2016. 査読無

柿澤 昌, 山澤 徳志子. 脳における新規細胞内カルシウム放出機構 一酸化窒素依存的カルシウム放出: 制御機構と神経機能への関与. *日本薬理学雑誌* 147, 194-199, 2016. doi: 10.1254/fpj.147.194. 査読有

山澤 徳志子, 柿澤 昌. 脳における新規細胞内カルシウム放出機構 一酸化窒素依存的カルシウム放出: 神経細胞死への関与. *日本薬理学雑誌* 147, 200-205, 2016. doi: 10.1254/fpj.147.200. 査読有

柿澤 昌, 森口 茂樹. 脳機能とその破綻に対する時間・階層縦断的アプローチと治療戦略序文. *日本薬理学雑誌* 150, 217, 2017. 査読無

柿澤 昌. 活性酸素の中枢シナプス可塑性に及ぼす影響と老化への関与. *日本薬理学雑誌* 150, 234-239, 2017. doi: 10.1254/fpj.150.234. 査読有

柿澤 昌. ホスホチロシンアダプター Shc の脳における機能的役割. *日本薬理学雑誌* 152, 84-89, 2018. doi: 10.1254/fpj.152.84. 査読有

柿澤 昌, 三上 義礼. 脳における善玉・悪玉としてのレドックスシグナルと脳疾患・老化への新たなアプローチ. *日本薬理学雑誌* 152, 215, 2018. 査読無

柿澤 昌. 脳におけるレドックスシグナルの生理的役割: シナプス可塑性・脳機能への関与. *日本薬理学雑誌* 152, 227-232, 2018. doi: 10.1254/fpj.152.227. 査読有

Qian N., Ichimura A., Takei D., Sakaguchi R., Kitani A., Nagaoka R., Tomizawa M., Miyazaki Y., Miyachi H., Numata T., Kakizawa S., Nishi M., Mori Y., Takeshima H. TRPM7 channels mediate spontaneous  $Ca^{2+}$  fluctuations in growth plate chondrocytes that promote

bone development. *Sci Signal* 12, eaaw4847, 2019. doi: 10.1126/scisignal.aaw4847. 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

柿澤 昌, 岸本 泰司, 宮崎 太輔, 田中 碧, 村山 尚, 渡辺 雅彦, 飯野 正光, 竹島 浩. 新規カルシウム放出機構「一酸化窒素依存的カルシウム放出」と小脳依存性運動学習への関与. 第 15 回日本 NO 学会学術集会. 豊中市. 2015 年 6 月.

三上 義礼, 金丸 和典, 小田 康弘, 伊藤 明博, 柿澤 昌, 山澤 徳志子, 齊藤 延人, 飯野 正光. 1 型リアノジン受容体の S-ニトロシル化を介した神経細胞死の誘導. 第 38 回日本神経科学大会. 神戸市. 2015 年 7 月.

柿澤 昌. 小脳依存的運動学習の書き換えと加齢の影響. 第 89 回日本薬理学会年会シンポジウム, 横浜市, 2016 年 3 月. 招待講演

三上 義礼, 金丸 和典, 小田 康弘, 柿澤 昌, 柴田 和輝, 杉山 弘樹, 小山 隆太, 伊藤 明博, 村山 尚, 山澤 徳志子, 渡辺 雅彦, 池谷 裕二, 齊藤 延人, 櫻井 隆, 飯野 正光. S-nitrosylation of the type 1 ryanodine receptor mediates neuronal cell death. 第 89 回日本薬理学会年会. 横浜市. 2016 年 3 月.

三上 義礼, 金丸 和典, 小田 康弘, 柿澤 昌, 柴田 和輝, 杉山 弘樹, 小山 隆太, 伊藤 明博, 村山 尚, 山澤 徳志子, 渡辺 雅彦, 池谷 裕二, 齊藤 延人, 櫻井 隆, 飯野 正光. Nitric oxide-induced calcium release: S-nitrosylation of the type 1 ryanodine receptor and neuronal cell death. 第 93 回日本生理学会大会. 札幌市. 2016 年 3 月.

Kakizawa S., Kishimoto Y., Miyazaki T., Murayama T., Tanaka M., Yamamoto S., Yamazaki D., Nishi M., Yamazawa T., Watanabe M., Takeshima H., Iino M. Involvement of Cerebellar LTP induced by Nitric Oxide-Induced Ca<sup>2+</sup> Release in Extinction of Eyeblink Conditioning. The 10th Forum of European Neuroscience. Copenhagen, Denmark. July, 2016.

三上 義礼, 金丸 和典, 大久保 洋平, 中畝 拓哉, 鈴木 純二, 柿澤 昌, 村山 尚, 柴田 和輝, 小山 隆太, 伊藤 明博, 山澤 徳志子, 伊藤 雅方, 富田 太一郎, 村上 慎吾, 赤羽 悟美, 櫻井 隆, 池谷 裕二, 齊藤 延人, 飯野 正光. 一酸化窒素は 1 型リアノジン受容体の S-ニトロシル化修飾を介して神経細胞死を誘導する. 第 39 回日本分子生物学会年会. 横浜市. 2016 年 11-12 月.

柿澤 昌. 小脳プルキンエ細胞におけるカルシウムストアの維持・制御機構. 第 90 回日本薬理学会年会シンポジウム, 長崎市, 2017 年 3 月. 招待講演

柿澤 昌. 脳におけるレドックスシグナルの生理的役割とクロストーク. 第 90 回日本薬理学会年会シンポジウム, 長崎市, 2017 年 3 月. 招待講演

三上 義礼, 金丸 和典, 大久保 洋平, 中畝 拓哉, 鈴木 純二, 柿澤 昌, 柴田 和輝, 小山 隆太, 村山 尚, 伊藤 明博, 山澤 徳志子, 伊藤 雅方, 富田 太一郎, 村上 慎吾, 赤羽 悟美, 池谷 裕二, 櫻井 隆, 齊藤 延人, 飯野 正光. S-nitrosylation of the type 1 ryanodine receptor is critical for epileptic seizure-induced neuronal cell death. 第 94 回日本生理学会年会. 浜松市. 2017 年 3 月.

Kakizawa S., Kishimoto Y., Miyazaki T., Mikami Y., Murayama T., Nagai M., Yamazawa T., Adachi-Akahane S., Watanabe M., Iino M. Involvement of Nitric Oxide-Induced Calcium Release (NICR) through Type 1 Ryanodine Receptor in Extinction of Cerebellum-Dependent Motor Learning. The 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease Awaji, Japan. October, 2017.

柿澤 昌. レドックスシグナルによる小脳依存的運動学習の制御. 第 71 回日本酸化ストレス学会・第 18 回日本 NO 学会合同学術集会シンポジウム, 京都市, 2018 年 5 月. 招待講演

柿澤 昌, 遠藤 昌吾. Involvement of ROS/8-nitro-cGMP signals in cerebellar synaptic plasticity in mice. 第 91 回日本薬理学会年会・第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議. 京都市. 2018 年 7 月.

柿澤 昌, 遠藤 昌吾. 活性酸素シグナルによる小脳シナプス機能制御. 生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」, 岡崎市, 2018 年 9 月. 招

待講演

柿澤 昌. 小脳シナプスの加齢に伴う機能低下のシグナリング機構と抗老化へのアプローチ.  
第 92 回日本薬理学会年会シンポジウム, 大阪市, 2019 年 3 月. 招待講演

〔図書〕(計 5 件)

Kakizawa S. "Somatolactin". In Handbook of Hormones (ed. Takei Y, Ando H, Tsutsui K), pp.114-115. Elsevier (Tokyo). 2015.

Kakizawa S. "Apelin". In Handbook of Hormones (ed. Takei Y, Ando H, Tsutsui K), pp.277-278. Elsevier (Tokyo). 2015.

Kakizawa S, Mori N. "Critical Roles of Oxidative Signals in Age-Related Decline of Cerebellar Synaptic Plasticity". In Aging Mechanisms: Cells, Metabolism, Longevity, and Brain Aging (ed. Mori N, Mook-Jung I), pp.275-289. Springer (Tokyo). 2015.

Kakizawa S. "Nitric Oxide". In Essentials of the Cerebellum (ed. Gruol D, Koibuchu N, Manto M, Molinari M, Schmahmann J, Shen Y), pp.249-254. Springer (New York). 2016.

柿澤 昌. "レドックスシグナル". In 脳内環境辞典 (ed. 高橋 良輔, 山中 宏二, 樋口 真人, 漆谷 真), pp.98-99. メディカルドゥ (大阪). 2017.

〔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)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。