

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19790080
 研究課題名（和文）高活性型 nNOS による PTZ 誘発キンドリング獲得の分子メカニズム解明

研究課題名（英文）Stabilization / dimerization of nNOS in PTZ-kindling animals.

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：ペンチレンテトラゾール (PTZ) によって誘発されるキンドリング獲得は、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の持続的高発現と、それによる過剰な一酸化窒素 (NO) 発生が原因となる。本研究では、キンドリングにおける nNOS は、Hsp90 との結合を伴うホモ二量体を形成することで安定性を亢進させ、高活性を持続的に維持していることが示唆された。さらに、新たな nNOS 安定化メカニズムとしてユビキチン様タンパク質修飾の関与が示唆された。また本研究にて、定常状態の NO が痙攣誘発を抑制していることが明らかとなり、てんかん発症における nNOS-NO には、抑制性と興奮性の相反する神経活動を制御する役割があることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

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、神経科学、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS)、一酸化窒素 (NO)、てんかん、ペンチレンテトラゾール (PTZ)、キンドリング

1. 研究開始当初の背景

てんかんは有病率約 1% の頻度の高い脳神経疾患である (WHO)。中でもその 30% 以上を占める全般てんかん (Epilepsia, 49, 1230-1238, 2008.) の発症機構はほとんど解明されていない。

てんかんの病態発症の原因のひとつに、一酸化窒素 (NO) の関与が報告されている。しかし、NO がてんかん病態を悪化させる、あるいは軽減させると言った相反する報告

が複数あり (J. Mol. Neurosci. 14, 183-190, 2000., Neurosci. Lett. 217, 145-148, 1996., など)、てんかんにおける NO の機能の真意は混沌としていた。我々は、全般てんかんモデルとしてペンテトラゾール (PTZ) によって誘発されるキンドリング (燃え上がり) 獲得には、神経型 NO 合成酵素 (nNOS) の高発現に伴う、過剰な NO 発生が原因であることを明らかにした (Neuroscience 129, 757-766, 2004)。しか

しながら、PTZ 誘発キンドリング獲得過程において、なぜ過剰な NO が発生してしまうのか？過剰に発生した NO がキンドリング獲得にどのように関わっているのか？は未だ不明である。

これまでてんかんは、各種抗てんかん薬により、脳神経疾患の中では極めて症状をコントロールしやすい疾患であるとされていた。しかし、最近の調査によりその約 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った (Expert Rev Neurother, 6, 397-406, 2006.)。このような社会的背景からもてんかん発症・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。

2. 研究の目的

本研究では、NO による PTZ 誘発キンドリング獲得の分子メカニズムを明らかにするために、①過剰な NO を合成する酵素 (nNOS) 活性調節機構の解明、②NO によって影響を受ける機能異常分子の解明を目的とした。



① nNOS ホモ二量体形成によるタンパク質安定性や、nNOS のユビキチン (Ub) 化修飾によるタンパク質分解系に着目し、PTZ 誘発キンドリング獲得時の nNOS 活性/発現調節機構を明らかにする。

② nNOS 依存的な過剰な NO によって誘導されるニトロ化タンパク質のプロテオーム解析からキンドリング獲得に関与する機能異常分子を明らかにする。

3. 研究の方法

① PTZ キンドリングラットの作成

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 40 mg/kg を 1 日 1 回腹腔より投与し、投与後 30 分間の行動変化を観察した。痙攣行動は、我々の以前の報告 (Itoh K ら, Neurosci, 129, 757-766, 2004) に順じ、0~5 のステージに分類しスコア化した。ステージ 5 の断続的な全般性痙攣が 3 回 (3 日) 連続した時点でキンドリング獲得とした。

② nNOS 遺伝子欠損 (nNOS^{-/-}) マウスにおける PTZ 誘発痙攣に対する薬理的試験

nNOS^{-/-} マウス (理化学研究所・戸島拓郎博士より供与) は、徳島文理大学香川薬学部・動物実験施設にて、自家交配・繁殖・飼育した。野生 (+/+), ヘテロ (+/-), 欠損 (-/-) の各遺伝子型は、ジェノタイプングにて確定し、これを実験に供した。10-13 週齢の雄マ

ウスに 30-60 mg/kg の PTZ を投与し、投与後 30 分間の行動変化を観察した。NOS 阻害剤 (TRIM, 3Br7NI, PBN, L-NNA) およびイオンチャンネル型グルタミン酸受容体アンタゴニスト (CGP39551, NBQX, MK-801) は、PTZ 投与 30 分前に投与した。

③ 脳組織の可溶化

行動観察後に摘出した脳組織は、大脳・海馬・小脳に分割してホモジナイズし、14,000xg で 20 分間遠心した後、上清を免疫沈降 (IP) やイムノブロット (IB) に供した。

④ nNOS ホモ二量体の検出

SDS 抵抗性の nNOS ホモ二量体は、冷却 SDS-PAGE (4°C) にて分離後、PVDF 膜に転写し、抗 nNOS 抗体にて検出した。

⑤ HEK293T 細胞の強制発現系を用いたユビキチン様タンパク質 (UBL) 化 nNOS の検出

発現プラスミド pCDNA-Flag-rat nNOS および pCAGGS-HA-human UBL を HEK293T にリン酸カルシウム法にて導入し、48 時間後、IP および IB に供した。

⑥ ニトロ化タンパク質の同定

ニトロ化タンパク質は、2 次元電気泳動にて分離後、PVDF に転写し、抗 3-nitro tyrosine (3NT) 抗体にて検出した。標的タンパク質は、トリプシンにて消化後、AXIMA-QIT/TOF を用いた MS/MS 解析にて同定した。

4. 研究成果

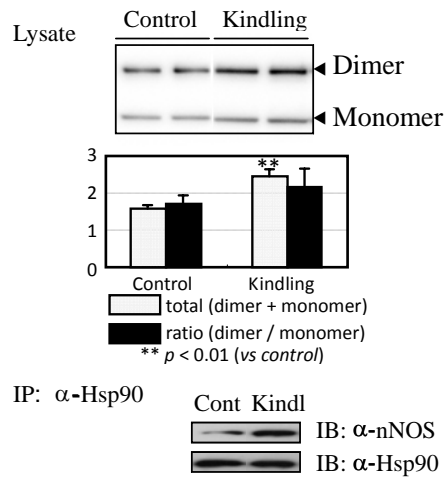
① nNOS タンパク質の安定性と分解系に着目し、キンドリング獲得時の nNOS 活性調節機構解明を試みた。

A) ホモ二量体形成による nNOS 安定化/活性化調節機構 (業績; 論文②)

nNOS の活性発現には、ホモ二量体形成が必須である。そこで、キンドリング獲得時における nNOS ホモ二量体量を定量したところ、優位な増加が認められた (Fig. 1)。また、nNOS はシャペロン分子の Hsp90 と結合すると、nNOS タンパク質の安定性が促進され、さらに NO 産生活性が亢進することが報告されている。本研究では、キンドリング獲得時、Hsp90 と結合した nNOS の増加が認められた (Fig. 1)。

これらの結果から、キンドリング動物における nNOS は、Hsp90 と結合することで安定したホモ二量体を形成し、さらに高活性を持続的に維持していることが推測された。nNOS 二量体形成には、補因子である BH4 やヘムの存在が必須である。それら補因子を含めた nNOS ホモ二量体形成機構とその安定化/活性化調節機構のより詳細な解析が今後の課題となる。

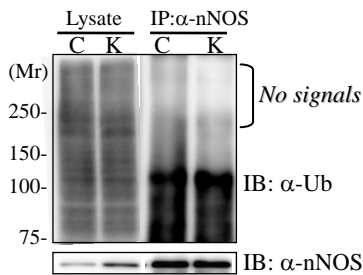
Fig.1 Stabilization/Dimerization of nNOS



B) ユビキチン (Ub) 化修飾による nNOS タンパク質分解機構 (業績; 論文②)

nNOS は Ub 化されプロテアソームにて分解されると考えられている。そこで、キンドリング獲得時における nNOS の高発現/高活性は、分解系 (Ub 化) の抑制に起因するか検証した。キンドリング動物における総 Ub 化タンパク量の顕著な変動は認められなかった。また、抗 nNOS 抗体で免疫沈降後、抗 Ub 抗体を用いたイムノブロットにて Ub 化-nNOS の検出を試みたが、シグナルは得られなかった (Fig. 2)。残念ながら現時点では、キンドリング獲得時における nNOS 高発現/高活性と nNOS 分解系との関連性については明確な結果が得られていない。

Fig.2 Immunoprecipitation of Ub-nNOS

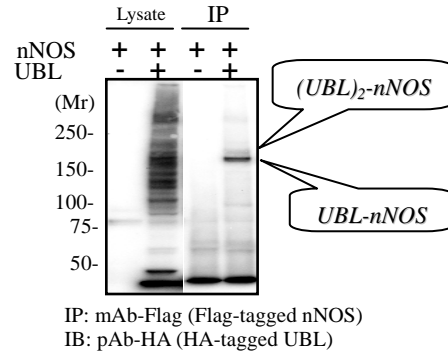


近年、Ub 化を調節する因子としてユビキチン様タンパク質 (UBL) が注目されている。そこで、nNOS の UBL 化修飾に関して検討した。HEK293T を用いた強制発現系にて検討したところ、nNOS は少なくとも 2 箇所 UBL 化修飾を受けることが新たに明らかとなった (Fig. 3)。

これまでのところ nNOS-UBL 化修飾による nNOS-Ub 化の制御機構の存在は確認されていないが、最近我々は、UBL 化が nNOS 二量体形成を制御することを示唆するデータを得た。新たなメカニズム「キンドリングにおける nNOS-UBL 化と nNOS ホモ二量体安

定化機構の関連性」解明には、今後の更なる研究が必要である。

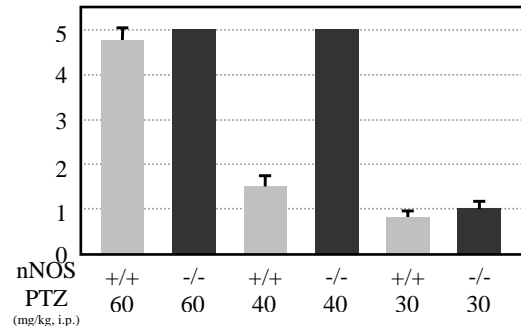
Fig.3 UBL-nNOS in HEK293T cells



② キンドリング獲得時に発生する過剰な NO によって誘導されるタンパク質機能異常解析には、nNOS 遺伝子を欠損したマウスの利用が有効であると考え、比較検討を試みた。A) nNOS 遺伝子欠損 (nNOS^{-/-}) マウスにおける PTZ 誘発痙攣 (業績; 論文①)

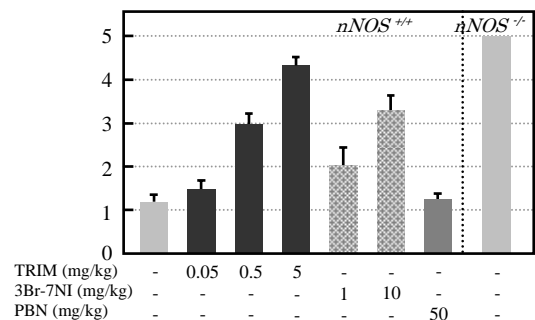
nNOS^{-/-} マウスは、PTZ 誘発痙攣発作を発症しないと考えたが、驚いたことに、nNOS^{-/-} マウスでは野生型 (nNOS^{+/+}) マウスよりも PTZ 感受性が亢進しており、通常痙攣が発症しない低用量 PTZ 40 mg/kg でも間代-強直性痙攣を発症した (Fig. 4)。

Fig.4 Proconvulsive effects of PTZ in nNOS^{-/-} Mice.



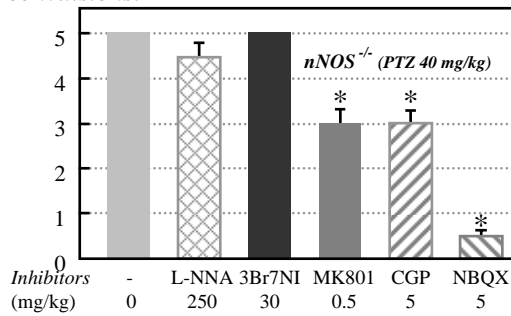
そこで、nNOS^{+/+} マウスの nNOS 活性をあらかじめ阻害した上で、低用量 PTZ 40mg/kg を投与したところ、nNOS^{-/-} マウス同様の痙攣行動の誘発が認められた (Fig. 5)。

Fig.5 Facilitation of PTZ-induced convulsions by treatment with NOS inhibitors in nNOS^{+/+} mice.



また、nNOS^{-/-} はより低用量 PTZ 30 mg/kg にてキンドリングを獲得した。これらの結果は、nNOS 依存的に発生する NO が、PTZ 誘発痙攣を抑制することを示唆する。さらに、nNOS^{+/+} における PTZ 誘発痙攣を抑制するグルタミン酸受容体アンタゴニストを用いたところ、nNOS^{-/-} マウスで認められた PTZ 誘発痙攣は抑制された (Fig. 6)。

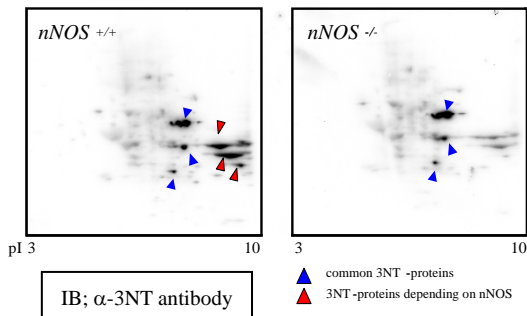
Fig.6 Effects of NOS inhibitors and ionotropic glutamate receptor antagonists on PTZ-induced convulsions.



これらの事実から、平常状態において nNOS により産生される NO は、グルタミン酸神経の過剰興奮を後シナプスで抑制していると考えられる。その一方では、過剰に産生された NO は異常神経活動を誘発することから、てんかんにおける nNOS-NO の役割には、抑制性と興奮性の相反する機能があることが示された。

B) ニトロ化タンパク質のプロテオーム解析
 キンドリング獲得時、nNOS 依存的な過剰な NO が発生する。NO はタンパク質のチロシン残基のニトロ化を誘発し神経細胞障害を引き起こす。これらの事実からキンドリング獲得は、NO によって翻訳後修飾を受けたタンパク質の機能異常が原因であると考えた。そこで、nNOS^{-/-} マウスを用い、nNOS-NO 依存的なニトロ化タンパク質のプロテオーム解析を行った (Fig. 7)。

Fig. 7 Two-dimensional immunoblot analysis.



2次元イムノブロットおよびMS/MS 解析から、複数の解糖系分子が同定された。それらの分子群がキンドリング形成にどのような影響を与えているか今後の検証が必要である。

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 3 件)

- ① Itoh K and Watanabe M. Paradoxical Facilitation of Pentylene-tetrazole-induced Seizure Susceptibility in Mice Lacking Neuronal Nitric Oxide Synthase. *Neuroscience*, 159, 735-743, 2009 (査読有).
- ② Itoh K and Watanabe M. Stabilization /dimerization of nNOS is mediated by the post-translational protein modifications in PTZ-kindling animals. *Ann Rep Jpn Epi Res Found*, 19, 51-58, 2008 (査読無).
- ③ Itoh K, Sakata M, Watanabe M., Aikawa Y, Fujii H. The entry of manganese ions into the brain is accelerated by the activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*, 154, 732-740, 2008 (査読有).

[学会発表] (計 3 件)

- ① K. Itoh, S. Hama, K. Fujisaki, Y. Aikawa, and M. Watanabe. PTZ-induced Seizure Susceptibility in Mice Lacking α nNOS. 第 31 回日本神経学会大会 (Neuro2008), 2008 年 7 月, 東京国際フォーラム (東京).
- ② M. Watanabe, Y. Aikawa and K. Itoh. Nitric oxide generating by neuronal nitric-oxide synthase has anti- and pro-convulsive reciprocal effects. 第 81 回日本薬理学会年会, 2008 年 3 月, パシフィコ横浜 (横浜).
- ③ M. Watanabe, Y. Aikawa and K. Itoh. A higher sensitive pentylene-tetrazole-induced seizures in nNOS deficient mice. 第 30 回日本神経学会大会 (Neuro2007), 2007 年 9 月, パシフィコ横浜 (横浜).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

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；無し

(3)連携研究者；無し