

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06955

研究課題名(和文) 活性酸素シグナルの脳機能への正負の作用機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of brain functions by reactive oxygen species-mediated signal

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、活性酸素(ROS)が安定した化学修飾を通じて標的分子に長期的作用を及ぼし得ることに着目し、ROSシグナルの小脳依存的運動学習及びその基盤となるシナプス可塑性の一種、長期抑圧(long-term depression; LTD)への関与について解明を進めた。その結果、ROS/8-nitro-cGMPシグナル、及びその下流で活性化されるプロテインキナーゼG/G-substrateシグナルが、小脳運動学習及びLTDの誘導に必要であることが示された。さらにRイメージング法により、LTD誘導刺激によるROSが産生も示され、生理的作用を有する因子としてのROSシグナルの機能的役割が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素(reactive oxygen species; ROS)は、従来、老化や生活習慣病の原因となる、いわゆる悪玉因子として生体に作用すると考えられてきた。本研究では、ROSが、その下流となる8-nitro-cGMPを介して、小脳依存的な運動学習およびその基盤となる小脳シナプス可塑性の一種、長期抑圧(long-term depression; LTD)に関与することが示された。このことはROSは脳の高次機能の発現に必要な生理的因子であることを示唆するものであり、本成果により、これまで悪玉因子とされてきたROSが生理的シグナルでもあるというパラダイムシフトがもたらされることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Involvement of reactive oxygen species (ROS)-mediated signals in cerebellar-dependent motor learning and the underlying cerebellar synaptic plasticity, long-term depression (LTD), was examined, because ROS induces its effects on the target molecules through stable chemical modification(s). Optokinetic response (OKR), a kind of cerebellar-dependent motor learning, was impaired when inhibitor of ROS or ROS synthase was applied to the cerebellum. Cerebellar LTD was also abolished by the inhibitors. As the downstream signals, involvements of 8-nitro-cGMP in OKR and cerebellar LTD were also demonstrated. In addition, imaging study using fluorescent probe for ROS revealed that ROS was produced by neuronal stimulation inducing cerebellar LTD, suggesting involvement of endogenous ROS in the motor learning and cerebellar LTD. Taken together, essential roles of endogenous ROS - 8-nitro-cGMP signaling in long-term memory of motor learning and cerebellar synaptic plasticity were indicated.

研究分野：神経生理学、神経薬理学、基礎老化学

キーワード：reactive oxygen species long-term memory motor learning synaptic plasticity cerebellum nitric oxide long-term depression mouse

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

活性酸素(reactive oxygen species; ROS)は、従来、老化や生活習慣病の原因となる、いわゆる悪玉因子として生体に作用すると考えられてきた。一方で、近年、ROSの産生酵素の同定が進むとともに、ROS産生酵素の脳における発現も報告されており、ROSが脳において酵素依存的に(調節的に)産生される生理的作用を有する因子であることが示唆されている。しかし、神経活動依存的なROSの産生や、脳におけるROSの生理的役割及び作用機序に関しては、殆ど不明であった。また、小脳依存的な運動学習およびその基盤となる小脳シナプス可塑性の一種、長期抑圧(long-term depression; LTD)に関しては、関与するシグナル因子の同定が進んでいるものの、その長期化のメカニズムについては、研究開始当初、不明であった。そこで我々は、ROSが化学修飾を介して標的分子に持続的に影響を及ぼし得ることに着目し、ROSシグナルは小脳運動学習および小脳LTDに必要なであるとの仮説を立て、この仮説を検証するため、本研究課題を立案した。

2. 研究の目的

ROSシグナルの小脳運動学習および小脳LTDへの関与を明らかにするため、以下の4つの研究項目を設定し、研究を推進することを目指した。

- (1) 小脳運動学習へのROSシグナルの関与を明らかにする
- (2) 小脳LTDへのROSシグナルの関与を明らかにする
- (3) 小脳LTDの誘導におけるROSの下流となるシグナルを同定する
- (4) 神経活動依存的なROSの産生とその分子機構を解明する

3. 研究の方法

上記(1)-(4)の研究項目に対して、以下に記すアプローチを用いた。尚、実験動物としてはマウスC57BL/6系統を用いた。

- (1)運動学習については、視機性眼球反応(optokinetic response; OKR)を専用の装置を用いて解析する(共同研究)
- (2)-(3) 小脳LTDについては、マウス小脳スライス標本を作製し、ホールセルパッチクランプ法によりシナプス電流応答を解析する
- (4) ROSの産生とその分子機構に関しては、ROS蛍光プローブを用いたイメージング法を用いて解析する。

尚、上記 1)-4)については、ROS や ROS 合成酵素、あるいは 8-nitro-cGMP シグナル等を阻害して影響を調べるため、選択的阻害薬を用いる。

4 . 研究成果

- (1) ROS の小脳運動学習への関与 まず初めに、ROS 及び 8-nitro-cGMP の小脳依存的運動学習への関与を明らかにするため、ROS 分解酵素である superoxide dismutase(SOD)と catalase を、小脳運動学習(OKR)を担う脳部位である小脳片葉に投与し、ROS シグナル阻害の小脳運動学習(OKR)への影響を解析した。その結果、それぞれの薬物投与 24 時間後に、OKR の有意な阻害が見られた。これらの結果から、小脳運動学習の一種、OKR への ROS シグナルの関与が示された。
- (2) ROS の小脳 LTD への関与 小脳平行線維 - プルキンエ細胞シナプスにおける長期可塑性の一種、長期抑圧(long-term depression; LTD)は OKR を始めとする小脳運動学習の細胞レベルでの基盤である。そこで、次に、ROS - 8-nitro-cGMP による小脳運動学習阻害の細胞レベルでのメカニズム解明、及び小脳 LTD への ROS - 8-nitro-cGMP シグナルの関与について調べた。若齢個体由来の小脳急性スライス標本上で、小脳プルキンエ細胞に、上述の SOD/catalase あるいは 8-nitro-cGMPs を記録電極より投与し、小脳 LTD への影響について調べた。平行線維を電気刺激するとプルキンエ細胞からシナプスの電氣的応答(excitatory postsynaptic current; EPSC)が記録されるが、ここで平行線維刺激とプルキンエ細胞の脱分極の組み合わせ刺激(LTD 誘導刺激)を繰り返し与えると、平行線維シナプス LTD が誘導される。対照群においては、誘導刺激によりシナプス電流応答は 30%近く減弱し、この状態が 30 分以上維持される、いわゆる LTD が誘導された。一方、SOD/catalase 投与群、あるいは 8-nitro-cGMPs 投与群では、LTD の誘導は有意に阻害され、むしろ、LTP 様の変化が認められた。これらの結果から、小脳 LTD への ROS - 8-nitro-cGMP シグナルの関与が示された。
- (3) ROS の下流シグナルの同定 引き続き、ROS の下流で小脳依存的運動学習および小脳 LTD に必要となるシグナルの同定を進めた。小脳 LTD には、カルシウムシグナル、代謝型グルタミン酸受容体シグナルに加え、一酸化窒素(NO) - 可溶性グアニル酸シクラーゼ - cGMP - プロテインキナーゼ G(PKG) - G-substrate シグナルが関与することが明らかにされている。しかし、細胞内カルシウム上昇は一過的であり、一酸化窒素や cGMP は速やかに反応もしくは代謝により消失するため、シナプス可塑性ひいては運動学習が持続化するメカニズムについては、不明であった。そこで代表者らは、NO および ROS 存在下で合成される新規シグナル分子、8-nitro-cGMP に着目した。8-nitro-cGMP は cGMP と同様に PKG を活性化することが出来るが、cGMP と異なりホスホジエステラーゼによって代謝されないため、長時間存在し、PKG を持続的に活性化することが可能である。上述の通り、ROS が小脳運動学習(OKR)および小脳 LTD に関与することが示されたことから、代表者らは、ROS - 8-nitro-cGMP シグナルが、OKR 及び小脳 LTD に関与するとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、まず、8-nitro-cGMP の阻害分子、8-nitro-cGMPs の膜透過型分子を小脳片節に投与し、OKR への影

響を調べたところ、24時間後の学習に阻害が見られた。引き続き、8-nitro-cGMP を記録電極よりプルキンエ細胞に投与し、小脳 LTD への影響を調べたところ、阻害効果が見られた。この時も、LTD 誘導刺激により LTD は誘導されず、むしろ LTP 様の変化が見られた。以上一連の結果より、8-nitro-cGMP の小脳運動学習及び小脳 LTD への関与が示された。

- (4) 神経活動依存的な ROS の産生 上述の研究により、ROS の小脳運動学習及び小脳 LTD への関与が示されたが、ROS は反応性に富む分子であり、産生後、速やかに反応または代謝により消失する。このことから、小脳 LTD の誘導に関与する ROS は、LTD 誘導刺激により産生されることが推測される。この仮説を検証するため、まず、小脳スライス標本で ROS(過酸化水素; H₂O₂)をイメージングする系の確立に取り組んだ。AmplexRed は、ROS 非存在下ではほとんど蛍光を発しないが、ROS 存在下では peroxidase の作用により代謝され、代謝産物 レゾルフインは赤色蛍光を発する。そこで、AmplexRed と peroxidase を記録電極よりプルキンエ細胞に投与し、過酸化水素を投与したところ、明瞭な赤色蛍光の上昇が見られ、ROS イメージング系として機能することが示された。引き続き、この ROS イメージング系を用いて、LTD 誘導刺激による ROS の産生と、ROS 産生酵素の関与について調べた。LTD 誘導刺激を小脳スライスに与えると、プルキンエ細胞内の赤色蛍光は有意に上昇し、ROS の産生が示された。しかし、この時に同時に ROS 産生酵素阻害薬、apocynin を投与すると、赤色蛍光の上昇は完全に阻害された。以上の結果より、神経活動依存的な ROS の産生と、ROS 産生酵素の関与が示された。
- (5) ROS - 8-nitro-cGMP シグナルによる LTP シグナルの阻害 小脳プルキンエ細胞においては、LTD を誘導する神経刺激により LTP を誘導するシグナル系も活性化されるが、LTP の変化率(100%以上)は LTD の変化率(20 - 30%程度)よりもはるかに大きいため、LTP シグナルが阻害されない限り、LTP により LTD が打ち消され、LTD 刺激により LTD は誘導されず、LTP が誘導されることになる。上述の通り、ROS および 8-nitro-cGMP を阻害すると、LTD の阻害に加えて LTD 刺激による LTP の誘導が見られることから、ROS-8-nitro-cGMP は単に LTD 誘導シグナルを活性化するのみならず、LTP を阻害することで、LTP に打ち消されることなく LTD を誘導する役割を担っていることが推測される。実際に、代表者の過去の研究により、活性酸素により小脳 LTP が阻害されることが示されている(Kakizawa et al. Neurobiol Aging, 2012)。そこで、本研究では、8-nitro-cGMP による LTP の阻害について解明を進めた。記録電極より 8-nitro-cGMP をプルキンエ細胞に投与し、LTP 誘導刺激を与えたところ、LTP の誘導は完全に阻害され、LTD 様の変化も見られなかった。以上の結果より、ROS - 8-nitro-cGMP シグナルによる小脳 LTP の阻害が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamazawa Toshiko, Kobayashi T, Kurebayashi N, Konishi M, Noguchi S, Inoue T, Inoue Y, Nishino I, Mori S, Iinuma H, Manaka N, Kagechika H, Uryash A, Adams J, Lopez JR., Liu X, Diggle C, Allen PD., Kakizawa Sho, Ikeda K, Lin B, Ikemi Y, Nunomura K, Nakagawa S, Sakurai T, Murayama Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 A novel RyR1-selective inhibitor prevents and rescues sudden death in mouse models of malignant hyperthermia and heat stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24644-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyazaki Yuu, Ichimura Atsuhiko, Kitayama Ryo, Okamoto Naoki, Yasue Tomoki, Liu Feng, Kawabe Takaaki, Nagatomo Hiroki, Ueda Yohei, Yamauchi Ichiro, Hakata Takuro, Nakao Kazumasa, Kakizawa Sho, Nishi Miyuki, Mori Yasuo, Akiyama Haruhiko, Nakao Kazuwa, Takeshima Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 C-type natriuretic peptide facilitates autonomic Ca ²⁺ entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e71931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.71931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsumagari Ryosuke, Kakizawa Sho, Kikunaga Sakiko, Fujihara Yoshitaka, Ueda Shuji, Yamanoue Minoru, Saito Naoaki, Ikawa Masahito, Shirai Yasuhito	4. 巻 7
2. 論文標題 DGK Knock-Out Mice Show Impairments in Cerebellar Motor Coordination, LTD, and the Dendritic Development of Purkinje Cells through the Activation of PKC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 0319-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0319-19.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kakizawa Sho, Kishimoto Yasushi, Yamamoto Shinichiro, Onga Kazuko, Yasuda Kunihiro, Miyamoto Yoshiaki, Watanabe Masahiko, Sakai Ryuichi, Mori Nozomu	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional maintenance of calcium store by ShcB adaptor protein in cerebellar Purkinje cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71414-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsumagari Ryosuke, Maruo Kenta, Kakizawa Sho, Ueda Shuji, Yamanoue Minoru, Saito Hiromitsu, Suzuki Noboru, Shirai Yasuhito	4. 巻 21
2. 論文標題 Precise Regulation of the Basal PKC Activity by DGK Is Crucial for Motor Coordination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 21217866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Qian Nianchao, Ichimura Atsuhiko, Takei Daisuke, Sakaguchi Reiko, Kitani Akihiro, Nagaoka Ryohei, Tomizawa Masato, Miyazaki Yuu, Miyachi Hitoshi, Numata Tomohiro, Kakizawa Sho, Nishi Miyuki, Mori Yasuo, Takeshima Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 TRPM7 channels mediate spontaneous Ca ²⁺ fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaaw4847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aaw4847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 9件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kakizawa Sho
2. 発表標題 リアノジン受容体のレドックス修飾の運動学習と脳機能老化への関与
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿澤 昌、新崎 智子、佐藤 泰司、遠藤 昌吾
2. 発表標題 Involvement of 8-nitro-cGMP ? ERK signals in induction of long-term depression in the mouse cerebellum
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 侑、市村 敦彦、北山 諒、岡本 直樹、安江 智生、劉 楓、川邊 隆彰、長友 宏樹、西 美幸、柿澤 昌、竹島 浩
2. 発表標題 C-type natriuretic peptide stimulates bone growth by potentiating autonomic Ca ²⁺ entry in growth plate chondrocytes
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿澤 昌
2. 発表標題 活性酸素の小脳シナプスの老化と可塑性への関与
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本 直樹、市村 敦彦、宮崎 侑、北山 諒、安江 智己、劉 楓、川邊 隆彰、長友 宏樹、柿澤 昌、西 美幸、竹島 浩
2. 発表標題 C型ナトリウム利尿ペプチドは軟骨細胞内Ca ²⁺ シグナル経路を活性化し骨伸長を促進する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿澤 昌、遠藤 昌吾
2. 発表標題 Ca ²⁺ とレドックスシグナルによる小脳シナプス可塑性の極性決定.
3. 学会等名 生理学研究所 研究会「細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柿澤 昌
2. 発表標題 活性酸素依存的なカルシウム恒常性システムの調節を介した小脳機能制御
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kakizawa Sho
2. 発表標題 Possible Involvement ROS in Physiological Aging through Inhibition of Protein S-nitrosylation of calcium channel
3. 学会等名 The 19th Korea-Japan Joint Symposium for Basic Gerontology(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kakizawa Sho, Endo Shogo
2. 発表標題 Involvement of ROS - 8-nitro-cGMP signals in cerebellar long-term depression
3. 学会等名 NEURO2019 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oyamada H, Ao Y, Kudo Y, Matsuoka T, Okamoto R, Murayama T, Yamazawa T, Kakizawa S, Oguchi T, Kimura A, Yasumoto T, Mori Y, Tsuji M, Oguchi K, Kiuchi Y
2. 発表標題 Construction and integration of the All-in-One type single double-conditional shRNA expression vectors for spatio-temporal gene and/or cell targeting
3. 学会等名 NEURO2019 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿澤 昌, 遠藤 昌吾
2. 発表標題 レドックスシグナルによる小脳機能制御
3. 学会等名 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」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿澤 昌
2. 発表標題 レドックスシグナルによる細胞内Ca ²⁺ 放出系の制御とシナプス可塑性の極性決定
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kakizawa Sho, Mori Nozomu
2. 発表標題 Disparity of age-dependent decline in calcium release channel responses to nitric oxide and calcium in central neuron
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿澤 昌
2. 発表標題 活性酸素の小脳シナプス可塑性への関与と方向性決定機構
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kakizawa Sho
2. 発表標題 Involvement of ROS signal in regulation and aging of brain function
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会 100周年記念シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柿澤 昌、遠藤 昌吾
2. 発表標題 活性酸素シグナルの小脳シナプス長期可塑性および 可塑性方向性決定機構への関与
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Kakizawa Sho (分担執筆)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ACADEMIC PRESS	5. 総ページ数 1113
3. 書名 Handbook of Hormones (2nd Ed.)	

1. 著者名 Kakizawa Sho (分担執筆)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 742
3. 書名 Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders (Second Edition)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------