

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20500333

研究課題名(和文) 中枢神経系における一酸化窒素シグナル依存性カルシウム放出と生理的意義

研究課題名(英文) Physiological functions of nitric-oxide induced calcium-release in central nervous systems

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

研究成果の概要(和文):本研究では、中枢神経系における新規細胞内カルシウム動因機構、一酸化窒素(NO)依存的カルシウム(Ca²⁺)上昇のメカニズムと生理的役割の解明を目指した。マウス小脳プルキンエ細胞において、NO投与により細胞内Ca²⁺濃度上昇が見られるが、これは細胞内ストアからのCa²⁺放出に依存する。さらに、このCa²⁺上昇はシナプス可塑性を誘導する神経活動によっておこり、Ca²⁺上昇の阻害によりシナプス可塑性も阻害された。したがって、NO依存的Ca²⁺上昇のシナプス可塑性への関与が明らかになった。

研究成果の概要(英文): The aim of this project is to examine the mechanism and functional role of nitric oxide-induced Ca²⁺ elevation in central neurons. In mouse cerebellar Purkinje cells, application of nitric oxide (NO) induced intracellular Ca²⁺ levels, and the elevation was revealed to be dependent on Ca²⁺ release from intracellular store. NO-induced Ca²⁺ increase was induced also by physiological patterns of neuronal activity which induces synaptic plasticity. Furthermore, the condition which blocks NO-induced Ca²⁺ increase also impaired the synaptic plasticity. These results indicate that NO-induced Ca²⁺ release is essential for the induction of synaptic plasticity in the cerebellum.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経科学・神経薬理学

キーワード：一酸化窒素、カルシウム、小脳、プルキンエ細胞、シナプス可塑性、S-ニトロシル化

1. 研究開始当初の背景

Ca²⁺シグナルは極めて幅広い生命現象に関与する細胞内シグナル因子であるが、中枢神経系における生理的役割は多くの点が未だに不明である。申請者が近年行った研究等により、マウス小脳平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおいて、一酸化窒素(NO)シグナル

依存的なシナプス可塑性、長期増強(NO-LTP)が見つかっている。さらにその後の申請者自身の研究により、この平行線維シナプスLTPがプルキンエ細胞内のCa²⁺濃度上昇に依存することが示唆され、NOシグナルとCa²⁺シグナルとのクロストークに着目するに至った。過去に脂質二重膜を用いた実

験系により、NOが或る種のCa²⁺放出チャネルの開口確率を上昇させることが示されており、NOシグナルによるブルキンエ細胞内のCa²⁺放出チャネルの活性化が、ストアからのCa²⁺放出を介してLTPを誘導するという仮説が考えられる。

2. 研究の目的

(1) NO依存的なCa²⁺上昇への細胞内ストアの関与 細胞内Ca²⁺濃度は、細胞外からの流入と細胞内ストアからの放出により上昇する。もしもブルキンエ細胞において、NO依存的なCa²⁺放出チャネルの活性化が起こるなら、細胞内ストアの機能が関与するはずである。

(2) Ca²⁺放出チャネルの同定 細胞内ストアからのCa²⁺放出を介するチャネルは2種類に大別される。上述の脂質二重膜を用いた実験の結果を参考に、この中で興奮性細胞で発現するタイプのチャネル、特に骨格筋型サブタイプに着目し、薬理学的手法及び遺伝子改変動物を用いて、チャネルのタイプを同定する。

(3) 生理的役割の解明 NO依存的な細胞内Ca²⁺濃度上昇によるNO-LTPの誘導は、本研究計画の根幹となる仮説である。そこで、先ず、LTP誘導刺激によりNO依存的なCa²⁺上昇が生じることを示し、さらに、このCa²⁺上昇が阻害される条件では、NO-LTPも阻害されることを示す。

3. 研究の方法

本研究では、マウス小脳急性スライス標本上で、NO供与体投与あるいは電気刺激により、NO依存的なCa²⁺上昇およびNO-LTPを誘導し、目的に応じて阻害薬もしくは遺伝子改変動物を用いて、NO依存的なCa²⁺上昇のメカニズムと機能的役割の解明を目指した。

(1) スライス標本の作製 マウスC57BL/6の生後24-45日齢の雄個体(ただし、Ca²⁺放出チャネル欠損マウスは出生直後の個体)よりエーテル麻酔化で小脳を摘出し、矢状断の急性スライス標本(250 μm)を作製。

(2) Ca²⁺イメージング パッチクランプ用ガラスピペットよりCa²⁺蛍光指示薬としてOregon Green 488 BAPTA-1(100 μM)を小脳ブルキンエ細胞に導入、成立型共焦点レーザー顕微鏡を用いて、XYZ-Tモードで10秒ごとにXYZ画像を取得し、FluoViewもしくはImage-Jによりシグナル強度の刺激前に対する変化率を解析。

(3) 電気生理学的解析 ホールセルパッチ

クランプ法により小脳ブルキンエ細胞より電流を記録。平行線維を細胞外電極により刺激し、興奮性後シナプス電流応答(EPSC)を記録。10分間安定した記録(変化率2%/10 min以下)が得られた後、LTP誘導刺激を与え、NO-LTPを誘導。

4. 研究成果

NOシグナル依存的な細胞内ストアからのCa²⁺放出の分子機構と機能的役割の解明を目標に、以下のような研究を行った。

(1) 小脳ブルキンエ細胞におけるNOシグナル依存的なCa²⁺上昇への細胞内ストアの関与 脳神経系の細胞において実際にNOシグナルによりCa²⁺放出が誘起されることを示すため、マウス小脳急性スライス標本においてブルキンエ細胞内のCa²⁺イメージングを行い、NO供与体投与が及ぼす影響を調べた。その結果、NOシグナル依存的に顕著なCa²⁺上昇が見られた。このCa²⁺上昇は細胞外からのCa²⁺流入に依存せず、その一方で、薬理学的処置により細胞内Ca²⁺ストアを枯渇させると消失することから、Ca²⁺放出によるものであることが示された。また、このCa²⁺上昇は、可溶性グアニル酸シクラーゼには影響を受けず、還元剤の細胞内投与により阻害されたことから、タンパク質のS-ニトロシル化を介するものと考えられる。

(2) NOシグナル依存的なCa²⁺上昇を担うCa²⁺放出チャネルの同定 引き続き、このCa²⁺放出に関与するイオンチャネルの同定を試みた。ブルキンエ細胞での発現が知られているCa²⁺放出チャネルの特異的阻害薬のCa²⁺放出への影響を調べたところ、骨格筋型Ca²⁺放出チャネルの関与を示唆する結果が得られた。さらに、この骨格筋型Ca²⁺放出チャネル遺伝子欠損マウス由来の小脳ブルキンエ細胞では、NO供与体投与によるCa²⁺上昇が完全に阻害された。したがって、小脳ブルキンエ細胞におけるNO依存的なCa²⁺上昇は、骨格筋型Ca²⁺放出チャネルを介した細胞内ストアからの放出によるものであることが明らかになった。そこで私は、このNOシグナルによるCa²⁺放出現象を「一酸化窒素依存的なCa²⁺放出」(NO-induced calcium release; NICR)と名付けた。

(3) NICRの機能的役割の解明 NICRの小脳NO-LTPへの関与を調べるため、NICRを阻害する薬物のNO-LTPへの影響を調べたところ、全ての薬物に対して阻害効果が認められた。また、NICRはNO-LTP誘導刺激により誘導される。さらに、神経型NO合成酵素欠損マウスにおいては、平行線維刺激によるNICRとともにNO-LTPも阻害された。したがって、

NICR は神経活動依存的に内因性の NO 合成酵素の作用を介して誘起される細胞内 Ca²⁺動因機構で、シナプス可塑性(N0-LTP)の誘導に必要であることが明らかとなった。

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5件)

Yamazaki, D., Tabara, Y., Kita, S., Hanada, H., Komazaki, S., Naitou, D., Mishima, A., Nishi, M., Yamamura, H., Yamamoto, S., Kakizawa, S., Miyachi, H., Yamamoto, S., Miyata, T., Kawano, Y., Kamide, K., Ogihara, T., Hata, A., Umemura, S., Soma, M., Takahashi, N., Imaizumi, Y., Miki, T., Iwamoto, T. & Takeshima, H. TRIC-A Channels in Vascular Smooth Muscle Contribute to Blood Pressure Maintenance. *Cell Metabolism* (in press) (2011) 査読有.

Venturi, E., Mio, K., Nishi, M., Ogura, T., Moriya, T., Pitt, S., Okuda, K., Kakizawa, S., Sitsapesan, R., Sato, C. & Takeshima, H. Mitsugumin 23 forms a massive bowl-shaped assembly and cation-conducting channel. *Biochemistry* 50, 2623-2632 (2011) 査読有.

Kakizawa, S., Shibasaki, M. & Mori, N. Protein oxidation inhibits NO-mediated signaling pathway for synaptic plasticity. *Neurobiology of Aging* (in press; accepted on 2010/04/20) (2010) 査読有.

柿澤 昌. 「I 型インシュリン様成長因子受容体」. *生体の科学* 61 巻 5 号、386-387 (2010) 査読有.

Kakizawa, S., Moriguchi, S., Ikeda, A., Iino, M. & Takeshima, H. Functional crosstalk between cell-surface and intracellular channels mediated by junctophilins essential for neuronal functions. *Cerebellum* 7, 385-391 (2008) 査読有.

[学会発表](計14件)

Kakizawa, S. Protein Oxidation

inhibits Nitric Oxide-Dependent Signaling Pathway Essential for Synaptic Plasticity in the CNS. The 6th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects. April 2, 2011, Kyoto.

柿澤 昌. 一酸化窒素シグナル依存的シナプス可塑性と活性酸素種による制御. 第84回日本薬理学会年会シンポジウム(オーガナイザー: 西田 基宏、松本 明). 2011年3月24日、横浜.

山澤 徳志子、柿澤 昌、小山田 英人、村山 尚、櫻井 隆、小口勝司、飯野 正光. リアノジン受容体を介した一酸化窒素によるカルシウム放出機構. 第84回日本薬理学会年会. 2011年3月23日、横浜.

Kakizawa, S., Shibasaki, M., Mori, N. & Takeshima, H. Protein oxidation inhibits nitric oxide-mediated signaling pathway essential for synaptic plasticity. *Biophysical Society 55th Annual Meeting*. March 6, 2011, Baltimore MD, U.S.A.

Kakizawa, S. Protein Oxidation inhibits Nitric Oxide-Induced Signaling Pathway Essential for Synaptic Plasticity in the CNS. The 1st AACL Meeting. February 18, 2011, Fukuoka.

柿澤 昌. 受容体アダプター分子欠損マウスの小脳プルキンエ細胞における細胞内 Ca 放出系の機能阻害. 第4回トランスポーター研究会九州部会. 2010年9月11日、佐世保.

柿澤 昌、柴崎晶彦、大神和子、森 望. 老齢マウス小脳プルキンエ細胞における酸化ストレスによる神経可塑性の低下. 日本基礎老化学会第33回大会. 2010年6月18日、名古屋.

柿澤 昌. 中枢ニューロンにおける受容体アダプター分子によるイオン輸送体機能制御と生理学的意義. トランスポーター研究会第3回九州部会シンポジウム(オーガナイザー: 古川 龍彦). 2009年11月21日、鹿児島

山澤 徳志子、柿澤 昌、小山田 英人、村山 尚、櫻井 隆、小口勝司、飯野 正光. リアノジン受容体を介した一酸化窒素によるカルシウム放出機構. 第82回日本薬理学会年会. 2009年3月、横浜.

山澤 徳志子、柿澤 昌、小山田 英人、村山 尚、櫻井 隆、小口勝司、飯野 正光。リアノジン受容体を介した一酸化窒素によるカルシウム放出機構。平成 20 年筋生理の集い。2008 年 12 月、東京。

柿澤 昌。脳は使わないと衰える？ - 小脳興奮性シナプスの活動依存的維持機構。第 4 回長崎ニューロサイエンス研究会。2008 年 10 月 4 日、長崎。

山澤 徳志子、柿澤 昌、小山田 英人、村山 尚、櫻井 隆、小口勝司、飯野 正光。一酸化窒素 (NO) による細胞内 Ca^{2+} 動員機構。第 119 回日本薬理学会関東部会。2008 年 10 月、東京。

植村 健、柿澤 昌、山崎 美和子、崎村 建司、渡辺 雅彦、飯野 正光、三品 昌美。Regulation of climbing fiber territory by the carboxyl terminal of GluR? 2 at parallel fiber synapses in cerebellar Purkinje cells. 第 31 回日本神経科学大会。2008 年 7 月 8-11 日、東京。

Kakizawa, S., Kishimoto, Y., Hashimoto, K., Miyazaki, T., Furutani, K., Shimizu, H., Fukaya, M., Nishi, M., Sakagami, H., Ikeda, A., Kondo, K., Kano, M., Watanabe, M., Iino, M. & Takeshima, H. Junctophilin-mediated functional crosstalk between ryanodine receptors and SK channels essential for long-term depression in the cerebellum. The 8th Biennial Meeting of Asia-Pacific Society for Neurochemistry. Jun25, 2008, Shanghai, China.

〔図書〕(計 4 件)

柿澤 昌。「8 章 恒常性」(分担執筆)。新医歯薬学系学生のための基礎生命科学 (竹島 浩 編、京都廣川書店) (印刷中) (2011)。

竹島 浩、柿澤 昌。「 Ca^{2+} シグナルとイオンチャネル 総論」。トランスポートソームの世界。(金井 好克、竹島 浩、森 泰生、久保 義弘編、京都廣川書店) (印刷中) (2011)。

竹島 浩、柿澤 昌。「小胞体 Ca^{2+} 放出チャネルファミリー」。トランスポートソームの世界。(金井 好克、竹島 浩、森 泰生、久保 義弘編、京都廣川書店) (印刷中) (2011)。

竹島 浩、柿澤 昌。「結合膜構造とチャネルミクロアセンブリ」。トランスポートソームの世界。(金井 好克、竹島 浩、森 泰生、久保 義弘編、京都廣川書店) (印刷中) (2011)。

〔その他〕
ホームページ等

京都大学 学術情報リポジトリ
<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/>

長崎大学 学術研究成果リポジトリ
<http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし