

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 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500354

研究課題名（和文）脳神経系におけるカルモデュリンキナーゼ I のレドックス応答性とその意義

研究課題名（英文）Redox regulation of calmodulin kinase I in neurons

研究代表者

渡邊 泰男（WATANABE YASUO）

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10273228

研究成果の概要（和文）：学習や記憶などの神経細胞の活動はカルシウムイオンによって調節されている。一方、これまで単なる「毒物」と思われていた活性酸素も、神経細胞で大切な役割を果たしていることがわかってきた。この研究では、カルシウムイオンによって調節される細胞の機能そのものが、活性酸素によってもコントロールされていることを発見した。つまり、学習や記憶などの神経機能を考えるときには、常に活性酸素のことを気にしなくてはならない。

研究成果の概要（英文）：Many intracellular signaling events are regulated by Ca^{2+} signals in neurons. It has also been reported that these events are accompanied by generation of reactive oxygen species. Here, we show that oxidation and Ca^{2+} signals are mutual regulated in cells. We propose that oxidation stress might regulate neuronal function via cross-talk with Ca^{2+} signals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

(1),レドックス「レダクション（還元）とオキシデーション（酸化）」制御機構が乱れると、活性酸素種が体内で産生されると、活性酸素種の要因となる「毒物」として取り扱われてきた活性酸素が細胞内外での情報伝達に積極的な役割を果たしているとされている。

(2),細胞内カルシウムイオン濃度の上昇がきっかけとなる数多くの細胞機能はカルシウム/カルモデュリン (Ca^{2+}/CaM) 依存性セリ

ン・スレオニンキナーゼ (CaM キナーゼ群) を介して行われている。CaM キナーゼは、キナーゼへの CaM 結合によってその活性が制御されている。ところが、CaM キナーゼ群は、活性酸素による新たな活性制御メカニズム、即ち、分子内のメチオニン残基の酸化修飾を介したレドックス反応によって制御されている事が示された (Cell 2008, 133, 462-474)。

(3),私共はこれまで、脳神経系において、一酸化窒素 (NO) とキナーゼ信号系を、細胞

内情報ネットワークで理解してきた。そして、CaM キナーゼ II の NO シグナルによるレドックス制御を発見した(Biochem. J. 2008, 412, 223-231)。更に、CaM キナーゼ I の特異的レドックス応答性を見出すに至った。このことが、本研究課題発案のきっかけになった。

2. 研究の目的

私共が見出した「CaM キナーゼ I が、そのシステイン残基修飾を介したレドックス応答分子である。」という知見を踏まえ CaM キナーゼ群のレドックス応答性の分子基盤をならびに、その脳神経細胞機能を明らかにする。

- (1), CaM キナーゼ群の部位特異的酸化修飾による活性阻害様式の解析
- (2), CaM キナーゼ群の部位特異的酸化修飾の生理的意義ならびの修飾の種類検討
- (3), その他のカルシウム信号系のレドックスセンサーの可能性の検討
- (4), 中枢神経疾患モデルを用いた、キナーゼと酸化ストレスの作動の検討

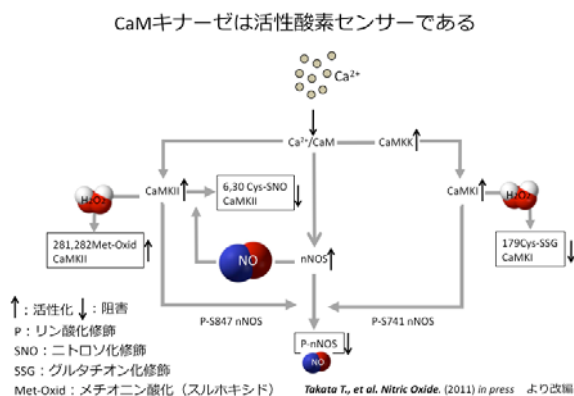
3. 研究の方法

CaM キナーゼ群のレドックス応答性の意義を解析するため以下の項目を設定した。

- (1), 基質ペプチドへのリン酸化能を RI ラベル ATP を用いてアッセイを行い、酸化修飾の酵素学的な効果を検討する。
- (2), 酸化修飾を受けない変異体の作成を行い、細胞内での酸化修飾の観察ならびに意義を検討する。
- (3), NO 産生細胞と非産生細胞をもちいて、カルシウム信号系に対する差異を解析する。
- (4), 脳梗塞、くも膜下出血モデルを作製し、キナーゼ信号系をリン酸化抗体で解析する。

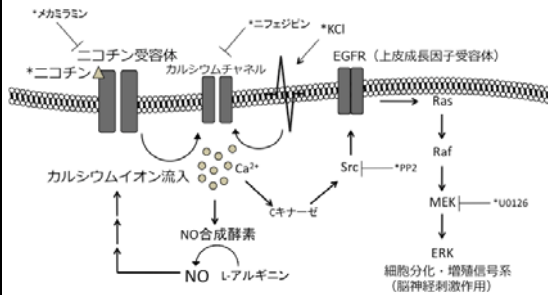
4. 研究成果

(1), 活性酸素種の新しい情報伝達系の解明
 活性酸素の生体分子の応答機構 (活性酸素センサー分子探索) を解明する中 (下図) で、脳卒中などの中枢神経疾患の予防、治療や老化機構解明の糸口が見出したい。



(2), ニコチンの新しい情報伝達系の解明
 ニコチンは喫煙の生理薬理の主要な活性物質で、ニコチン性アセチルコリン受容体の刺激を介して細胞にカルシウムを流入させる。私たちは、このニコチン作用が NO 無くしては作用しない事を見出した (下図)。

ニコチンによる脳神経刺激作用にはNOシグナルが必要不可欠



(3), 血管攣縮による脳梗塞の原因となるくも膜下出血時のレドックス信号系の関与を示唆した。つまり、現在、脳梗塞急性期に適応があるレドックス制御薬であるエダラボンをくも膜下出血モデルに用いる事によって、酸化ストレス信号系が急性期の炎症信号系を介してくも膜下出血病態に関与している事を示唆した。カルシウム信号系以外の炎症シグナル、代謝シグナルのキナーゼ作動を虚血ならびに出血モデルで解析した。

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 10 件)

- ① Osuka K., Watanabe Y., Usuda N., Atsuzawa K., Yoshida J., Takayasu M. Modification of Endothelial Nitric Oxide Synthase through AMPK after Experimental Subarachnoid Hemorrhage J.Neurotrauma (2009) 26, 1157-1165 (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19226196>
- ② Osuka K., Watanabe Y., Usuda N., Atsuzawa K., Wakabayashi T., Takayasu M. Oxidative stress activates STAT1 in basilar arteries after subarachnoid hemorrhage Brain Res. (2010) 1332, 12-19 (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307504>
- ③ Kambe T., Song T., Takata T., Hatano N., Miyamoto Y., Nozaki N., Naito Y., Tokumitsu H., Watanabe Y. Inactivation of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein

- Kinase I by S-Glutathionylation of the Active-site Cysteine Residue FEBS Lett. (2010) 584, 2478-2484 (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20420839>
- ④ Takata T, Kimura J., Tsuchiya Y., Naito Y., Watanabe Y.
 Calcium/calmodulin-dependent protein kinases as potential targets of nitric oxide Nitric Oxide (2011) 25, 145-152 (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21255668>
- ⑤ Funai M., Osuka K., Usuda N., Atsuzawa K., Inukai T., Yasuda M., Watanabe Y., Takayasu M. Activation of PI3 kinase / Akt signaling in chronic subdural hematoma outer membranes. J.Neurotrauma (2011) 28, 1127-1131 (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21309701>
- ⑥ Butturini E., Cavaliere E., Carcereri de Prati, A., Darra E., Rigo A., Shoji K., Murayama N., Yamazaki H., Watanabe Y., Suzuki H., Mariotto S. Two naturally occurring terpenes, dehydrocostuslactone and costunolide, decrease intracellular GSH content and inhibit STAT3 activation PLoS ONE (2011) 6(5), e20174. (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21625597>
- ⑦ Miyamoto Y., Sakai R., Maeda C., Takata T, Ihara H., Tsuchiya Y., Watanabe Y. Nitric oxide promotes nicotine-triggered ERK signaling via redox reactions in PC12 cells Nitric Oxide (2011) 25:344-349 (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742048>
- ⑧ Osuka K., Watanabe Y., Usuda N., Atsuzawa K., Yasuda M., Aoshima C., Wakabayashi T., Takayasu M. Activation of STAT1 in neurons following spinal cord injury in mice Neurochem. Res. (2011) 36, 2236-2243 (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833847>
- ⑨ Hayashi S., Osuka K., Watanabe Y., Yasuda M., Takayasu M., Wakabayashi T. Hypothermia enhances the colocalization of calmodulin kinase II α with neuronal nitric oxide synthase in the hippocampus following cerebral ischemia Neurosci. Lett. (2011) 505, 228-232 (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22015767>
- ⑩ Osuka K., Watanabe Y., Yasuda M., Takayasu M. Adiponectin activates endothelial nitric oxide synthase through AMPK signaling after subarachnoid hemorrhage. Neurosci. Lett. (2012) 514, 2-5 (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230897>
- [学会発表] (計 35 件)
 (平成 23 年度)
- ① カルモデュリンキナーゼIVはレドックスにより活性が制御される 土屋幸弘、高田剛、木村淳、渡邊泰男 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)
- ② カルモデュリンキナーゼの一酸化窒素による活性制御 高田剛、土屋幸弘、渡邊泰男 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)
- ③ 神経型一酸化窒素合成酵素のSer847 リン酸化は神経細胞における一酸化窒素-活性酸素種シグナリングを調節する 笠松真吾、澤智裕、渡邊泰男、赤池孝章、居原秀 第 54 回日本神経化学学会大会 2011 年 9 月 26 日 (月) ~ 28 日 (水) 山代温泉 (石川)
- ④ NO、活性酸素でみるくも膜下出血の分子病態大須賀浩二、高安正和、渡邊泰男 第 11 回日本NO学会学術集会 2011 年 5 月 13, 14 日 昭和薬科大学 (東京)
- ⑤ 神経型一酸化窒素合成酵素のリン酸化による一酸化窒素/活性酸素種シグナル経路の調節機構の解析 笠松真吾、澤智裕、渡邊泰男、赤池孝章、居原秀 第 11 回日本NO学会学術集会 2011 年 5 月 13, 14 日 昭和薬科大学 (東京)
- ⑥ NO信号系によるカルモデュリンキナーゼ活性制御機構 高田剛、池田未希、木村淳、土屋幸弘、渡邊泰男 第 11 回日本NO学会学術集会 2011 年 5 月 13, 14 日 昭和薬科大学 (東京)
- ⑦ スルフェン化によるカルモデュリンキナーゼIVの活性制御機構五味渕優紀、木村淳、土屋幸弘、渡邊泰男 第 11 回日本NO学会学術集会 2011 年 5 月 13, 14 日 昭和薬科大学 (東京)
- ⑧ マウス海馬でのニコチンによるERK活性化におけるNOの関与 土屋幸弘、前田千春、宮本嘉明、居原秀、渡邊泰男 第 11 回日本NO学会学術集会 2011 年 5 月 13, 14 日 昭和薬科大学 (東京)
- ⑨ 一酸化窒素信号系によるニコチン誘発性MAP kinaseファミリーの活性化 彦坂知佐、菊地明日香、梶原綾、土屋幸弘、居原秀、渡邊泰男 第 11 回日本NO学会学術集会 2011 年 5 月 13, 14 日 昭和薬

科大学 (東京)
(平成 2 2 年度)

- ⑩ NOの標的分子としてのカルモデュリンキナーゼ 渡邊 泰男 日本薬学会第131年会 2011年3月28日(月)~31日(木) グランシップ 静岡
- ⑪ 神経型NO合成酵素恒常発現PC12細胞での薬物誘発細胞障害性に対するニコチンの効果 前田 千春, 宮本 嘉明, 土屋 幸弘, 居原 秀, 渡邊 泰男 BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010年12月7日~10日 神戸ポートアイランド
- ⑫ 神経型一酸化窒素合成酵素のリン酸化によるNO/ROS産生への影響 笠松 真吾, 澤 智裕, 渡邊 泰男, 赤池 孝章, 居原 秀 BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010年12月7日~10日 神戸ポートアイランド
- ⑬ カルモデュリンキナーゼIVのレドックスによる活性制御機構 木村 淳, 土屋 幸弘, 渡邊 泰男 BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010年12月7日~10日 神戸ポートアイランド
- ⑭ レドックスセンサーとしてのカルモデュリンキナーゼIの活性制御 高田 剛, 土屋 幸弘, 渡邊 泰男 BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010年12月7日~10日 神戸ポートアイランド
- ⑮ NOによるCa²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIアイソフォームの活性制御 内藤 康仁, 遠山 加奈子, 山路 晶子, 渡邊 泰男, 田辺 光男 BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010年12月7日~10日 神戸ポートアイランド
- ⑯ ニコチン誘発性P38 活性化機構における一酸化窒素の関与 梶原 綾, 彦坂 知佐, 前田 千春, 宮本 嘉明, 土屋 幸弘, 居原 秀, 渡邊 泰男 BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010年12月7日~10日 神戸ポートアイランド
- ⑰ Calcium/calmodulin-dependent protein kinases as potential targets of NO Yasuo Watanabe The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide 2010 June 14-18 (Kyoto, Japan)
- ⑱ Superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase splice variants and its potential involvement in

NO-ROS signaling Hideshi Ihara, Ida Tomoaki, Sawa Tomohiro, Yasuo Watanabe, Takaaki Akaike The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide 2010 June 14-18 (Kyoto, Japan)

- ⑲ Analysis of the uncoupling reaction of neuronal nitric oxide synthase Shingo Kasamatsu, Yasuo Watanabe, Hideshi Ihara The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide 2010 June 14-18 (Kyoto, Japan)

(平成 2 1 年度)

- ⑳ 神経におけるカルモデュリンキナーゼレドックス応答性とその意義 渡邊 泰男 第83回日本薬理学会年会 平成22年3月16日-18日 大阪国際会議場 (大阪)
- 21 ニコチン誘発性ERKシグナリングにおける神経型一酸化窒素合成酵素の関与 酒井亮介, 宮本嘉明, 前田千春, 神戸敏江, 居原秀, 渡邊泰男 第83回日本薬理学会年会 平成22年3月16日-18日 大阪国際会議場 (大阪)
- 22 NOによるCa²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIアイソフォームの活性制御 内藤康仁, 山路晶子, 遠山加奈子, 渡邊泰男, 佐々木泰治 第83回日本薬理学会年会 平成22年3月16日-18日 大阪国際会議場 (大阪)
- 23 S-グルタチオン化によるカルモデュリンキナーゼIの活性制御 高田剛, 神戸敏江, 宮本嘉明, 波多野直哉, 内藤康仁, 宋涛, 野崎直仁, 渡邊泰男 第83回日本薬理学会年会 平成22年3月16日-18日 大阪国際会議場 (大阪)
- 24 神経型一酸化窒素合成酵素アンカップリング反応の解析 笠松真吾, 渡邊泰男, 居原秀 第82回日本生化学会大会 平成21年10月21日-24日 神戸ポートアイランド (神戸)
- 25 海馬でのニコチン誘発性ERK活性化機構におけるNOの関与 宮本嘉明, 酒井亮祐, 前田千春, 神戸敏江, 居原秀, 渡邊泰男 第82回日本生化学会大会 平成21年10月21日-24日 神戸ポートアイランド (神戸)
- 26 カルモデュリンキナーゼIのグルタチオン化応答性の意義 神戸敏江, 高田剛, 宮本嘉明, 波多野直哉, 内藤康仁, 宋涛, 野崎直仁, 渡邊泰男 第82回日本生化学会大会 平成21年10月21日-24日 神戸ポートアイランド (神戸)
- 27 NOによるCa²⁺/Calmodulin-dependent

protein kinase I γ の活性調節機構 山路晶子、佐々木泰治、渡邊泰男、内藤康仁、第82回日本生化学会大会 平成21年10月21日-24日 神戸ポートアイランド (神戸)

- 28 一酸化窒素による脳血管れん縮の分子病態 大須賀浩二、高安正和、渡邊泰男 第120回日本薬理学会関東部会 平成21年7月11日 東京医科歯科大学
- 29 NOによるニコチン・シグナリングの活性制御 酒井亮祐、宮本嘉明、前田千春、神戸敏江、居原秀、渡邊泰男 第120回日本薬理学会関東部会 平成21年7月11日 東京医科歯科大学
- 30 ニコチン・シグナリングにおけるNO依存性レドックス制御 宮本嘉明、酒井亮祐、前田千春、神戸敏江、居原秀、渡邊泰男 第120回日本薬理学会関東部会 平成21年7月11日 東京医科歯科大学
- 31 カルモデュリンキナーゼIのS-グルタチオン化について 神戸敏江、高田剛、宮本嘉明、波多野直哉、渡邊泰男 第120回日本薬理学会関東部会 平成21年7月11日 東京医科歯科大学
- 32 ラットくも膜下出血モデルにおけるeNOS活性化について 渡邊泰男、大須賀浩二、若林俊彦、高安正和 平成21年5月8-9日 第9回日本NO学会 (静岡)
- 33 NO依存性レドックス制御によるニコチン・シグナリングの増強機構 宮本嘉明、酒井亮祐、神戸敏江、居原秀、渡邊泰男 平成21年5月8-9日 第9回日本NO学会 (静岡)
- 34 グルタチオン化によるカルモデュリンキナーゼIの活性制御 渡邊泰男、神戸敏江、宮本嘉明、波多野直哉 平成21年5月8-9日 第9回日本NO学会 (静岡)
- 35 月桂樹由来テルペンのSTAT3活性化と抗腫瘍効果Elena Butturini, Elisabetta Cavalieri, Elena Darra, Alessandra Carcereri de Prati, Sofia Mariotto, Kazuo Shoji, Yasuo Watanabe, Hisanori Suzuki 平成21年5月8-9日 第9回日本NO学会 (静岡)

[その他]

ホームページ等

<http://www.shoyaku.ac.jp/labosite/yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 泰男 (WATANABE YASUO)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10273228

(2) 研究分担者

土屋 幸弘 (TSUCHIYA YUKIHIRO)

昭和薬科大学・薬学部・助教(2010~2011)

研究者番号：30455406

野崎 直仁 (NOZAKI NAOHITO)

神奈川歯科大学・歯学部・講師(2009)

研究者番号：70222198

神戸 敏江 (KAMBE TOSHIE)

昭和薬科大学・薬学部・講師(2009)

研究者番号：80276625

宮本 嘉明 (MIYAMOTO YOSHIAKI)

昭和薬科大学・薬学部・助教(2009)

研究者番号：20449101

(3) 連携研究者

野崎 直仁 (NOZAKI NAOHITO)

神奈川歯科大学・歯学部・講師(2010~2011)

研究者番号：70222198