

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659037

研究課題名(和文)酸化ストレス抵抗性を有する変異型チャネルの導入による抗老化への挑戦

研究課題名(英文) Identification of cysteine involved in oxidation-induced inhibition of channel function

研究代表者

柿澤 昌(Kakizawa, Sho)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40291059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：・外因性ROS及び個体の加齢により小脳プルキンエ細胞のNICR及びCa²⁺放出チャネルのNOによる化学修飾であるS-ニトロシル化が阻害されることが示された。・酸化シグナルによる化学修飾であるジスルフィド化を選択的に検出する生化学的手法を確立し、外因性ROS及び個体の加齢による影響を調べたところ、シグナルの有意な上昇が見とめられた。・これらの結果から酸化シグナルはジスルフィド結合を形成することでS-ニトロシル化を阻害し、S-ニトロシル化依存的な現象であるNICRを阻害する可能性が示された。・さらに再構築系を用いた実験により、ジスルフィド結合に関するシステイン候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：Nitric-oxide-induced calcium release (NICR) in cerebellar Purkinje cells was revealed to be inhibited by oxidative signal and aging. Correspondingly, S-nitrosylation of calcium-release channels, essential for NICR, was also impaired by oxidative signal and aging. Biochemical analysis further confirmed that oxidation was induced in the channels by oxidative signal and aging. These observations indicate that oxidative signal inhibit S-nitrosylation as well as NICR through formation of disulfide bond in which cysteine residue of S-nitrosylation site is involved. Because the cysteine residue is incorporated into the disulfide bond, the residue is no longer susceptible to NO and S-nitrosylation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：酸化シグナル 老化 翻訳後修飾 チャネル

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種(ROS)は加齢に伴う生体機能低下の原因因子として注目されているが、その分子機構については多くの点が未だに不明である。研究代表者(以下、代表者)は近年、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)依存的な長期増強現象(平行線維 LTP)を発見したが、平行線維 LTP は老齢個体および ROS で処理された若齢個体由来の小脳スライス標本では阻害される。並行して代表者は、NO により或る種の Ca^{2+} 放出チャネルが活性化され細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出が誘導される現象、NO 依存性 Ca^{2+} 放出(NO-induced Ca^{2+} release; NICR)を発見した。しかも、NICR は平行線維 LTP の誘導に必要不可欠で、 Ca^{2+} 放出チャネル内の特定のシステイン残基(Cys)の S-ニトロシル化に依存する。実際に平行線維 LTP が阻害される老齢個体および ROS 処理された若齢個体由来の小脳スライス標本では NO により誘導されるタンパク質中の S-ニトロシル化レベルが顕著に低下すること、また、Cys 残基は ROS による酸化修飾の標的部位でもあることから、代表者は老齢個体では ROS により Ca^{2+} 放出チャネルが酸化修飾を受け、その結果、NICR の阻害を介して平行線維 LTP や小脳機能が低下するとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究計画ではまず、外因性 ROS および加齢(内因性 ROS)による NICR および Ca^{2+} 放出チャネルの S-ニトロシル化の阻害を確認する。引き続き、 Ca^{2+} 放出チャネル内で NICR に必須な Cys 残基と酸化状態においてジスルフィド結合を形成する Cys 残基を、アミノ酸置換された Ca^{2+} 放出チャネルの NICR 活性に対する ROS の効果を調べることで同定する。そして、その Cys を Ala に置換することで ROS の作用により NICR 機能が阻害されない Ca^{2+} 放出チャネル(変異型 Ca^{2+} チャネル)を発現するノックインマウスを作成する。そして将来的には、ノックインマウスに於いて加齢もしくは外因性 ROS 処理により NICR および NICR 依存的な細胞・組織・器官・個体レベルでの生命現象が阻害されないことを確かめるとともに、寿命への影響についても調べる。以上、一連の研究により、単一機能タンパクの化学修飾状態の制御による抗老化が可能となることを示すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究計画ではまず、一酸化窒素依存性 Ca^{2+} 放出(NO-induced Ca^{2+} release; NICR)の外因性 ROS および加齢(内因性 ROS)による阻害を Ca^{2+} イメージング法および薬理学的手法により確認する。引き続き、 Ca^{2+} 放出チャネル内で NICR に必須な Cys 残基と酸化状態においてジスルフィド結合を形成する Cys 残基を、

アミノ酸置換された Ca^{2+} 放出チャネルの NICR 活性に対する ROS の効果を調べることで同定する。そして、その Cys を Ala に置換することで ROS の作用により NICR 機能が阻害されない Ca^{2+} 放出チャネル(変異型 Ca^{2+} チャネル)を発現するノックインマウスを作製する。将来的には(研究が当初の計画以上に早く進んだ場合は)、加齢もしくは外因性 ROS 処理により NICR および NICR 依存的な細胞・組織・器官・個体レベルでの生命現象が阻害されないことを確かめるとともに、寿命への影響についても調べる。以上、一連の研究により、単一機能タンパクの化学修飾状態の制御による抗老化が可能となることを示す。

4. 研究成果

・外因性 ROS 及び個体の加齢により小脳プルキンエ細胞の NICR 及び Ca^{2+} 放出チャネルの NO による化学修飾である S-ニトロシル化が阻害されることが示された。

・酸化シグナルによる化学修飾であるジスルフィド化を選択的に検出する生化学的手法を確立し、外因性 ROS 及び個体の加齢による影響を調べたところ、シグナルの有意な上昇が見とめられた。

・これらの結果から酸化シグナルはジスルフィド結合を形成することで S-ニトロシル化を阻害し、S-ニトロシル化依存的な現象である NICR を阻害する可能性が示された。

・さらに、培養細胞に NICR に必要なシステインの近傍のシステインを一つずつアラニンに置換した Ca^{2+} 放出チャネルを導入し、酸化試薬処理に対する NICR 阻害が見られないことを指標に、ジスルフィド結合に参与するシステイン候補の同定を行った。その結果、或るシステインをアラニンに置換したチャネルに於いては、NICR が酸化処理により阻害されなかったことから、このシステインをジスルフィド結合に組み込まれるシステインの候補とした。

・現在、このシステインをアラニンに置換した変異型 Ca^{2+} 放出チャネルを発現するノックインマウスを作成中である。

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12件)

1) Kakizawa S, Kaiya H, Takahashi A. Posttranslational Modification of Intercellular Messenger Systems (Editorial article). *Front Endocrinol* 5, 27. doi:10.3389/fendo.2014.00027. (2014). 査読有

2) Kakizawa S. Nitric oxide-induced calcium release: activation of type 1 ryanodine receptor, a calcium release channel, through non-enzymatic posttranslational modification by

- nitric oxide. *Front Endocrinol* 4, 142. doi: 10.3389/fendo.2013.00142 (2013). 査読有
- 3) Kakizawa S, Yamazawa T & Iino M. Nitric oxide-induced calcium release: Activation of type 1 ryanodine receptor by endogenous nitric oxide. *Channels* 7, 1-5 (2013). doi: 10.4161/chan.22555. 査読有
- 4) Tao S, Yamazaki D, Komazaki S, Zhao C, Iida T, Kakizawa S, Imaizumi Y, Takeshima H. Facilitated hyperpolarization signaling in vascular smooth muscle overexpressing TRIC-A channels. *J Biol Chem* 288, 15581-15589 (2013). doi: 10.1074/jbc.M112.435396. 査読有
- 5) Kakizawa S, Takeshima H & Iino M. Nitric Oxide-Induced Calcium Release: A Novel Calcium-Mobilizing Mechanism Mediated by S-nitrosylation-Dependent Modulation of Ryanodine Receptor. *Messenger* 1, 133-140 (2012). 査読有
- 6) Nishi M, Aoyama F, Kisa F, Zhu H, Sun M, Lin P, Ohta H, Van B, Yamamoto S, Kakizawa S, Sakai H, Ma J, Sawaguchi A, Takeshima H. TRIM50 regulates vesicular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells. *J Biol Chem* 287, 33523-33532 (2012). 査読有
- 7) Kakizawa S, Yamazawa T, Chen Y, Ito A, Murayama T, Oyamada H, Kurebayashi N, Sato O, Watanabe M, Mori N, Oguchi K, Sakurai T, Takeshima H, Saito N & Iino M. Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. *EMBO J* 31, 417-428 (2012). doi: 10.1038/emboj.2011.386. 査読有
- 8) Kakizawa S, Shibazaki M & Mori N. Protein oxidation inhibits NO-mediated signaling pathway for synaptic plasticity. *Neurobiol Aging* 33, 535-545 (2012). doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.016. 査読有
- 9) 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, Ogiwara 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 Metab* 14, 231-241 (2011). doi: 10.1016/j.cmet.2011.05.011. 査読有
- 10) 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). doi: 10.1021/bi1019447. 査読有
- 11) Zhao X, Yamazaki D, Kakizawa S, Pan Z, Takeshima H & Ma J. Molecular architecture of Ca²⁺ signaling control in muscle and heart cells. *Channels* 5, 391-396 (2011). doi: 10.4161/chan.5.5.16467. 査読有
- 12) 森 望、柿澤 昌. 「老化脳」. *臨床神経科学* 29 巻 7 号、811-815 (2011). 査読無
- [学会発表](計16件)
- 1) 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—酸化窒素依存的カルシウム放出は小脳運動学習の消去過程に必要である. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月、仙台市.
- 2) 三上 義礼、金丸 和典、小田 康弘、伊藤 明博、柿澤 昌、山澤 徳志子、斉藤 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 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月、仙台市.
- 3) 柿澤 昌. 内因性チャネルを用いた脳内レドックス環境イメージングと老化・病態脳研究への応用. 平成 25 年度「脳内環境」夏の領域班会議シンポジウム (オーガナイザー: 高橋 良輔). 2013 年 8 月、京都市.
- 4) 柿澤 昌、岸本 泰司、山本 伸一郎、大神 和子、安田 邦彦、堺 隆一、竹島 浩、森 望. ホスホチロシンアダプター ShcB によるプルキンエ細胞カルシウムストアの機能維持. 第 36 回日本神経科学学会大会. 2013 年 6 月、京都市.
- 5) 柿澤 昌、岸本 泰司、山本 伸一郎、大神 和子、安田 邦彦、堺 隆一、竹島 浩、森 望. ホスホチロシンアダプター ShcB 欠損マウスにおける小脳機能とプルキンエ細胞内カルシウムシグナル系の阻害. 第 36 回日本基礎老化学会大会. 2013 年 6 月、大阪市.
- 6) 柿澤 昌、岸本 泰司、山本 伸一郎、大神 和子、安田 邦彦、堺 隆一、竹島 浩、森 望. ホスホチロシンアダプター ShcB による小脳プルキンエ細胞カルシウムストアの機能維持. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013 年 3 月、福岡市.
- 7) 柿澤 昌. ホスホチロシンアダプター ShcB 欠損マウスにおける小脳機能とプルキンエ細胞内カルシウムシグナル系の阻害. 日本行動神経内分泌研究会第 3 回開

- 西支部会. 2013年3月、瀬戸内市.
- 8) 柿澤 昌. 一酸化窒素及びカルシウムイメージングにより明らかにされた新規シナプス可塑性とカルシウム動因機構. 日本動物学会第83回大会シンポジウム「可視化により明らかとなる脊椎動物の神経とホルモンのはたらき」(オーガナイザー: 中村和昭、坂本浩隆、坂本竜哉). 2012年9月、豊中市.
 - 9) 柿澤 昌、山澤 徳志子、村山 尚、小山田 英人、呉林 なごみ、渡辺 雅彦、森 望、小口 勝司、櫻井 隆、竹島 浩、飯野 正光. 一酸化窒素依存的カルシウム放出(NICR)はリアノジン受容体1型を介し小脳シナプス可塑性に必須である. 第85回日本薬理学会年会. 2012年3月、京都市.
 - 10) 山澤 徳志子、柿澤 昌、陳 毅力、伊藤 明博、村山 尚、小山田 英人、呉林 なごみ、佐藤 治、櫻井 隆、小口 勝司、竹島 浩、斉藤 延人、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. 第85回日本薬理学会年会. 2012年3月、京都市.
 - 11) 山澤 徳志子、柿澤 昌、陳 毅力、伊藤 明博、村山 尚、小山田 英人、呉林 なごみ、佐藤 治、櫻井 隆、小口 勝司、竹島 浩、斉藤 延人、飯野 正光. リアノジン受容体を介したNOによるCa²⁺放出の機能的意義. 第21回日本循環薬理学会. 2011年12月、岡山市.
 - 12) Kakizawa, S. Regulation of synaptic function by reactive oxygen species in young and aged CNS. The 4th AACL Meeting. November 22, 2011, Nagasaki.
 - 13) 柿澤 昌. 一酸化窒素シグナル依存的な可塑性と活性酸素種による制御. 第84回日本生化学会大会フォーラム(オーガナイザー: 松本 明、西田 基宏). 2011年9月、京都市.
 - 14) 柿澤 昌、山澤 徳志子、村山 尚、小山田 英人、呉林 なごみ、渡辺 雅彦、森 望、小口勝司、櫻井 隆、竹島 浩、飯野 正光. 一酸化窒素依存的 Ca²⁺放出(NICR)はリアノジン受容体を介する新規Ca²⁺放出機構で小脳シナプス可塑性を誘導する. 第34回日本神経科学学会大会. 2011年9月、横浜市.
 - 15) 山澤 徳志子、柿澤 昌、小山田 英人、村山 尚、呉林 なごみ、佐藤 治、櫻井 隆、小口 勝司、竹島 浩、飯野 正光. 一酸化窒素によるリアノジン受容体を介したCa²⁺放出機構. 第124回日本薬理学会関東支部会. 2011年6月、文京区.
 - 16) 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 2011, Kyoto.

〔図書〕(計8件)

- 1) 柿澤 昌. 「27 内因性チャネルを用いた脳内レドックス環境イメージングと老化・病態脳研究への応用」. 遺伝子医学MOOK26号 脳内環境 - 恒常性維持機構の破綻と病気(高橋良輔、漆谷 真、山中宏二、樋口真人編、メディカルドゥ)(2014)印刷中.
- 2) 柿澤 昌. 「非酵素的翻訳後修飾による脳機能制御機構」. プレインサイエンス・レビュー(廣川 信隆編、クバプロ), 57-78 (2014).
- 3) 柿澤 昌. 「ジャンクトフィリン」. 脳科学辞典(Web辞典), <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/ジャンクトフィリン> (2013) 査読有.
- 4) 柿澤 昌. 「リアノジン受容体」. 脳科学辞典(Web辞典), <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/リアノジン受容体> (2012) 査読有.
- 5) 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), 185-216 (2011).
- 6) 竹島 浩、柿澤 昌. 「Ca²⁺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), 104-110 (2011).
- 7) 竹島 浩、柿澤 昌. 「2-5-3 小胞体Ca²⁺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), 121-129 (2011).
- 8) 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), 297-304 (2011).

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp//biochem/>

6．研究組織

(1)研究代表者

柿澤 昌 (KAKIZAWA, Sho)

研究者番号：40291059

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：