

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：渡邊 泰男  
所属機関名：昭和薬科大学  
所属部署名：薬理学研究室 職名：教授  
所在地：東京都町田市東玉川学園 3-3165  
電 話：042-721-1511 内線：2120



1. 助成金額： 800,000 円

### 2. 研究テーマ

神経因性疼痛における一酸化窒素の分子病態：カルシウム受容キナーゼの調節機構

### 3. 成果の概要

ラット神経因性疼痛モデルにおいて、後根画分の一酸化窒素修飾タンパクの検出を行ったところ、損傷側に有意にニトロソ化タンパクの上昇が検出された。一方、分子・細胞レベルでの解析の結果、カルシウム受容キナーゼのカルモデュリン（CaM）キナーゼ I が、部位特異的なグルタチオン化修飾を受けることによって酵素活性が可逆的に阻害されることを見出した。このことは慢性疼痛における新しい作用機構解明に役立つと思われる。

#### ※発表論文等

平成 21 年 10 月 21 日-24 日 第 82 回日本生化学会大会（神戸）にて口演発表、現在 FEBS Lett で改訂中。平成 22 年 3 月 16 日-18 日第 83 回日本薬理学会年会（大阪）にてシンポジウム発表予定。

### 4. 研究組織

日本側研究者氏名：渡邊 泰男	職名：教授
所属機関名：昭和薬科大学	部署名：薬理学
中国側研究者氏名：宋 涛	職名：准教授
所属機関名：中国医科大学付属第一病院	部署名：麻酔科

神経因性疼痛における一酸化窒素の分子病態：カルシウム受容キナーゼの調節機構

日本側研究者氏名 渡邊 泰男

所 属 機 関 昭和薬科大学薬理学研究室 教授

中国側研究者氏名 宋 涛

所 属 機 関 中国医科大学附属第一病院麻酔科 准教授

要旨

細胞は様々なレドックス反応「レダクション(還元)とオキシデーション(酸化)」を基本として維持されている。近年、このレドックス代謝に異常を起こすことが、脳梗塞、脊髄損傷、脳神経変性疾患等の種々の疾患に密接に関与している可能性が強く指摘されている。また、これらの中枢神経障害に一酸化窒素(NO)が関与することが報告されている。そして、このNOによる中枢神経細胞死はNO由来の反応性窒素酸化物による生体機能分子のレドックス制御機構の乱れによる可逆的修飾であるグルタチオン化やニトロソ化を介して発現することも示唆されている。一方、脳神経系において、神経成長、成熟に関わる細胞内情報伝達はカルシウム/カルモデュリン( $Ca^{2+}/CaM$ )によって活性化されるカルシウム受容リン酸化酵素、CaMキナーゼ群が絡んでいる可能性が示唆されている。近年、このCaMキナーゼ群ならびにNOが、神経因性疼痛等の種々の慢性疼痛に密接に関与している可能性が強く指摘されている。しかし、これまでに、神経因性疼痛のメカニズムをCaMキナーゼ群のNO応答性ならびにレドックス反応性に着目して行われた研究はない。そこで、本研究課題では、神経因性疼痛の分子病態をNOとカルシウム受容キナーゼの相互作用で理解し、予防法・治療法の基盤を築くことを目的とした。その結果、ラット脊髄神経損傷モデルにおいて、後根画分のNO修飾タンパクの検出を行ったところ、損傷側に有意にニトロソ化タンパクの上昇が検出された。一方、分子・細胞レベルでの解析の結果、CaMキナーゼIが、部位特異的なグルタチオン化修飾を受けることによって酵素活性が可逆的に阻害されることを見出した。これらレドックス応答分子としてのキナーゼ群ならびにタンパクの制御機構解明は、脳神経傷害における新たなレドックス制御薬の理論的基礎研究として位置付けられる。

Key Words 神経因性疼痛、CaM キナーゼ、一酸化窒素、ニトロソ化、グルタチオン化

## 緒言

近年、脳梗塞、変性疾患による中枢神経障害に一酸化窒素(NO)を始め様々なタンパク質リン酸化酵素が関与することが

報告されている。中でも、カルシウム/カルモデュ

リン (Ca<sup>2+</sup>/CaM) によって活性化されるリン酸化

酵素 CaM キナーゼは、神経シナプス形成、記憶・

学習に関わる機能分子でもあることが広く研究さ

れてきている。これまでに、私共は神経における

NO 産生の律速酵素である神経型 NO 合成酵素

(NOS) の CaM キナーゼによる部位特異的リン

酸化が NO シグナルを負に制御していることにより脳梗塞や神経伝達物質ドパミン信号系において重要な役割を果たして

いることを示唆してきた (図) [1-4]。

ところで、NO によるシグナル伝達には可溶性グアニレートサイクラーゼの活性化による cGMP を介する経路と、cGMP

に依存しないものがある。前者は、血管内皮依存性 NOS による血管平滑筋弛緩反応に代表される情報伝達メカニズムで

脳循環や血圧調節に関与する。後者の場合、NO そのものというより、NO 由来の反応性窒素酸化物による生体分子のシ

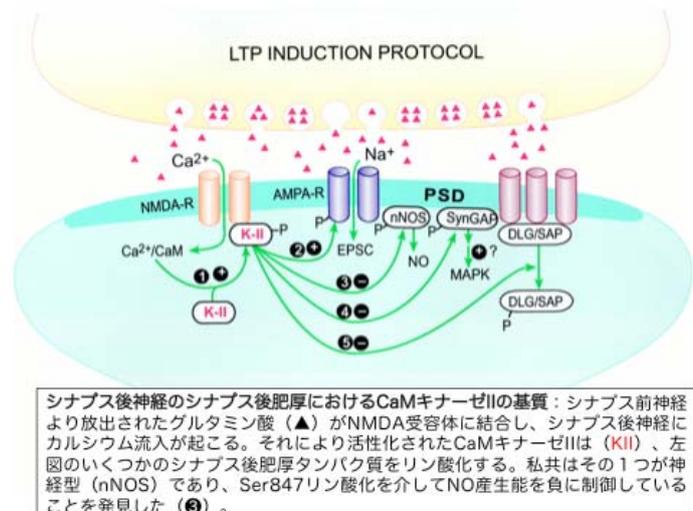
ステインチオールグルタチオン化 (RSSG) やニトロソ化 (RSNO) 反応を介するものである。近年、この後者の反応

性窒素酸化物などによる生体分子修飾が、脳神経変性疾患等の種々の疾患に密接に関与している可能性が強く指摘されて

いる。私共はこれまでに、CaM キナーゼ II の部位特異的システインチオールのニトロソ化によってキナーゼ活性が可逆的

に阻害され、脳虚血時の CaM キナーゼ II 活性の低下がこの部位特異的 NO 修飾によることを示唆した [5]。本研究課題では、

近年、いくつかの神経機能がそれにより調節されているとされる CaM キナーゼ I のレドックス応答性の分子基盤ならびに、



その脳神経細胞機能を明らかにすることを目的とした。そして、ペインクリニックでも重要懸案である神経因性疼痛のメカニズムを機能分子のレドックス応答性解析の為、ラット神経因性疼痛モデルにおける髄後根画分でのレドックス応答タンパク質の検索を行った。

## 方法

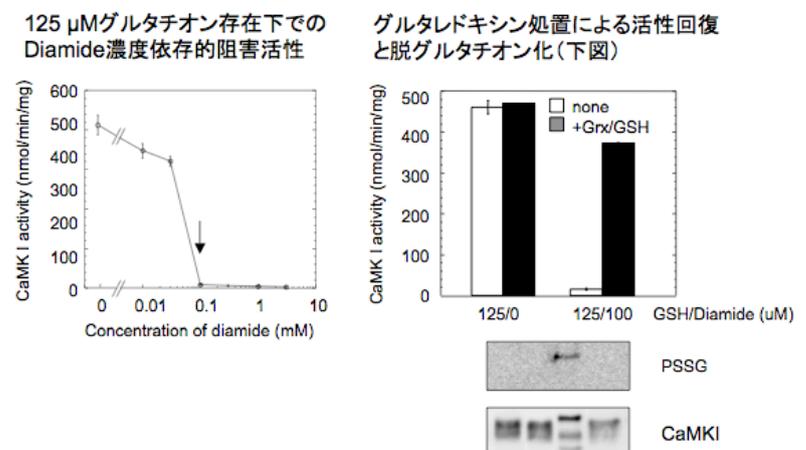
神経因性疼痛モデルラットは、手技的な変動が少ない脊髄神経結紮モデルを用いた。腰髄後根画分での不特定多数の修飾タンパクの検出は、抗ニトロソ化タンパク抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。CaM キナーゼ I のレドックス応答性の解析には、酸化ストレス刺激として SH 基選択性酸化剤(diamide)ならびに還元型グルタチオンを使用した。リコンビナント CaM キナーゼ I は大腸菌発現系にて精製し、キナーゼ活性測定には $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  から合成ペプチド基質 (シグナイド 2) への $^{32}\text{P}$  転位の検出によって行った。酸化修飾部位および種類解析は、CaM キナーゼ I の分子内のシステイン残基の点変異体および ESI-四重極型 MS による質量分析法にて行った。グルタチオン化タンパクの検出には抗グルタチオン化抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。

## 結果

### 1) CaM キナーゼ I のグルタチオン化による活性阻害

リコンビナント CaM キナーゼ I を Diamide (0-3 mM) および還元型グルタチオン(125  $\mu\text{M}$ ) 処置し、酵素活性を測定すると 100  $\mu\text{M}$  Diamide でほぼ完全に阻害された。この処置により CaM キナーゼ I がグルタチオン化されていることが、抗グルタチオン抗体を用い

図 1 Diamide/グルタチオン処置によるCaMキナーゼI活性阻害



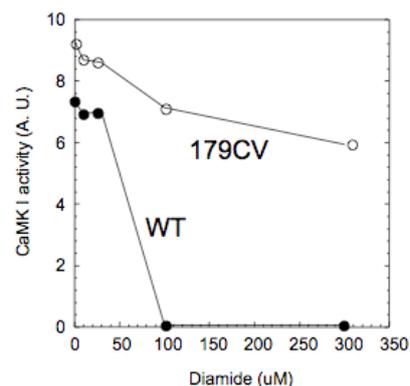
確認できた。さらに、阻害された酵素活性は、脱グルタチオン化酵素であるグルタレドキシシンによって回復され、同時に

脱グルタチオン化も観察された ( 図 1 )。

## 2 ) Cys179 修飾による CaM キナーゼ I 活性阻害

CaM キナーゼ I の活性中心近傍の Cys179 の変異体(179CV)ミュータントのリコンビナント酵素を作成した。そして、Diamide/グルタチオン処置による CaM キナーゼ I 活性阻害を野生型と比較した。179CV は 125  $\mu$ M グルタチオン、0-300  $\mu$ M Diamide 存在下で、酵素活性に大きな変化は見られなかつ

図2 Cys179を介したグルタチオン化によるCaMキナーゼIの活性阻害



た ( 図 2 )。CaM キナーゼ I は Cys179 以外に 9 つの Cys 残基を有するがどの点変異体も Diamide/グルタチオン処置による活性低下には抵抗性を示さなかつた ( データ表示せず )。

## 3 ) CaM キナーゼ I の Cys179 残基のグルタチオン化修飾の検出

Diamide/グルタチオン処置によって

Cys179 にグルタチオン化修飾が見られるのかを、処置酵素のプロテアーゼ分解後、

ESI四重極型 MS による質量分析法によ

って解析を行った。73% のペプチド回

収率で 10 個の Cys 残基のうち 3 つの

Cys 残基を含むペプチド (Cys179, Cys267, Cys349) が回収された。そのどの Cys 残基にもグルタチオン化修飾が検出された

( 表 )。

### プロテアーゼ処置後のCys残基を含むペプチドのグルタチオン化検出

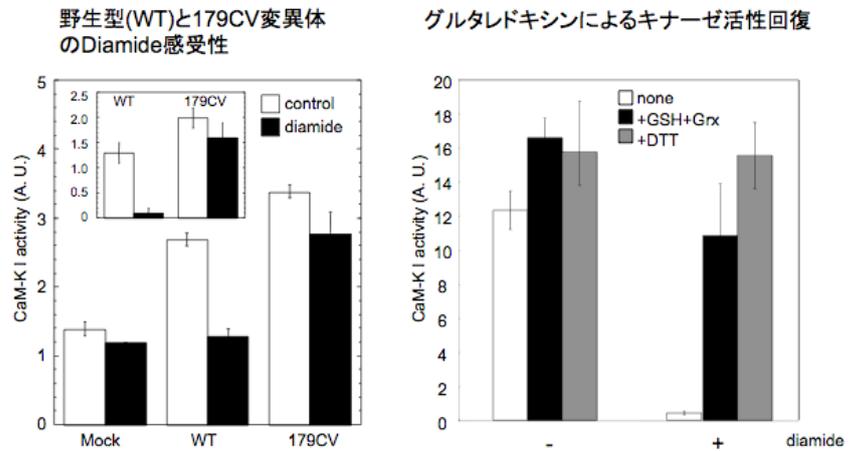
Amino acid sequence	Modification	ESI (m/z)
170-188	DPGSVLSTACGTPGYVAPE	1063.47
176-190	STACGTPGYVAPEVL	885.39
176-195	STACGTPGYVAPEVLAQKPY	786.38
265-275	FTCEQALQHPW	832.87
336-349	ELLTPTAGGPAAGC	781.86

4) 細胞内 CaM キナーゼ I のグルタチオン

化による活性制御

Hela 細胞に野生型と 179CV 変異体の CaM キナーゼ I を遺伝子導入し、Diamide(1 mM) 処置後、CaM キナーゼ活性を測定した。野生型では Diamide 処置により酵素活性は殆ど消失したが、179CV 変異体は抵抗性を示した。

図3 Hela細胞におけるCaMキナーゼIの酸化ストレスによる活性阻害



さらに、野生型の酵素活性消失は、その後のグルタレドキシン処置によって回復が見られた ( 図 3 )。

5) ラット神経因性疼痛モデルにおける髄後根画分でのレドックス応答タンパク質の検索

脊髄神経結紮モデルを用い、腰髄後根画分での不特定多数の修飾タンパクの検出を、抗ニトロソ化タンパク抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。障害側でのニトロソ化タンパクは健側側に比べて有意に増加していることが分かった ( 図 4 )。なお、障害側でのバンドは還元剤処置によって消失することを確認した ( データ表示せず )。

図4 損傷側 健側



Anti-SNO抗体

考察

以上のように、今回の助成では、NO 信号系制御の新しい作用機序の解明を通して、NO 信号系制御薬創製の分子基盤を築くことが出来た。つまり、CaM キナーゼ群が直接 NO の修飾を受けその活性が可逆的に制御されているという概念を確立できた。これまでに、レドックス制御の乱れが、脳神経細胞障害を引き起こすとされている。実際に、いわゆるレド

ックス制御薬が、急性期脳梗塞の治療に使われている。しかしながら、各レドックス疾患において主因となる酸化ストレス系は単一でないことから、フリーラジカル消去薬だけで全てのレドックス疾患を効率的に治療するには限界があり、今後は各疾患の信号系に特化したレドックス疾患治療に貢献する新しいレドックス制御薬の登場が待たれる。私共はこれまで、キナーゼシグナルによる活性窒素シグナルの制御機構を報告してきた。その中で、私共が見出したレドックス応答分子としてのCaMキナーゼ群の制御機構は、神経傷害において防御的分子であるCaMキナーゼ群と攻撃的分子である酸化ストレスのクロストーク理解において新展開であり、新たなレドックス制御薬の理論的基礎研究として位置付けられる。神経因性疼痛モデルでは脊髄でのNO産生が亢進していることが判明しているため、今回得られた障害側の腰髄後根画分でのニトロソ化タンパクの検出は今後その標的分子の同定を通して、慢性疼痛における新しい作用機構を明らかにすることができると思われる。現在、CaMキナーゼ群のニトロソ化ならびにグルタチオン化の検出をしているところである。今後は脳虚血、神経損傷、クモ膜下出血などの中枢神経疾患の分子病態を広く生体機能分子のレドックス制御破綻として捉え、レドックス制御薬開発の基盤研究を展開させたい。

## 参考文献

- [1] T. Song, N. Hatano, K. Kume, K. Sugimoto, F. Yamaguchi, M. Tokuda, and Y. Watanabe, Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by phosphorylation at Threonine1296 in NG108-15 neuronal cells. *FEBS Lett.* 579 (2005) 5658-5662.
- [2] Y. Hayashi, M. Nishio, Y. Naito, H. Yokokura, Y. Nimura, H. Hidaka, and Y. Watanabe, Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 20597-20602.
- [3] K. Komeima, Y. Hayashi, Y. Naito, and Y. Watanabe, Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 28139-28143.
- [4] T. Song, N. Hatano, M. Horii, H. Tokumitsu, F. Yamaguchi, M. Tokuda, and Y. Watanabe, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *FEBS Lett.* 570 (2004) 133-137.
- [5] T. Song, N. Hatano, T. Kambe, Y. Miyamoto, H. Ihara, H. Yamamoto, K. Sugimoto, K. Kume, F. Yamaguchi, M. Tokuda, and Y. Watanabe, Nitric oxide-mediated modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 412 (2008) 223-231.

注：本研究は、平成21年10月21日-24日 第82回日本生化学会大会（神戸）にて口演発表、現在FEBS Lettで改訂中。

平成22年3月16日—18日第83回日本薬理学会年会（大阪）にてシンポジウム発表予定。

作成日：2010年3月10日