

生体内ガスによる酵素活性調節と神経細胞死との連関

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬効解析学
上原 孝

1. はじめに

グルタミン酸は中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質として知られている。虚血状態においては、細胞外グルタミン酸の濃度上昇に伴い、ニューロンのグルタミン酸受容体が過剰に興奮する。その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、一酸化窒素 (NO) をはじめとするフリーラジカルが過剰に産生され、DNA, RNA の損傷を引き起す。また、ミトコンドリアが損傷により機能不全となり、細胞死に至る。近年、NO の新たな役割が報告されている。蛋白質のチロシン残基やシステイン残基を修飾するというものである。とくに、システイン残基のチオール部位への NO の結合は S-ニトロシル化 (SNO 化) と呼ばれ¹⁾、多くの蛋白質の酵素活性および蛋白質機能に影響を及ぼすことが明らかとなった。たとえば、IKK や NF- κ B の SNO 化は細胞生存シグナルの抑制を引き起こし、細胞死を惹起する²⁾。反対に、JNK やカスパーゼ群の SNO 化はアポトーシス経路の阻害を引き起こし、細胞死を抑制する²⁾。これらのことから、脳虚血あるいは神経変性疾患時に惹起される酸化 (ニトロソ化) ストレスによる蛋白質機能の変化は細胞死に関連することが推定される。

一方、小胞体 (endoplasmic reticulum ; ER) ストレスとは、小胞体に成熟の不完全な蛋白質が蓄積する状態のことを示す。小胞体は、リボソームで合成された分泌蛋白質や膜蛋白質を取り込み、その折りたたみ (folding) や糖鎖修飾を行い、蛋白質を成熟させる器官である。また、細胞内カルシウム濃度の調節や脂質・コレステロールの合成にも関与している。前述の虚血時における低酸素、低グルコース状態のように、小胞体の機能を阻害するストレスが負荷されたり、遺伝子変異による異常蛋白質が生成されたりすると、成熟の不完全な蛋白質 (unfolded protein) が小胞体に蓄積し、小胞体ストレス状態となる。これに対し、小胞体内の異常蛋白質の蓄積を防ぐ機構として、(1) 小胞体シャペロンによる変性蛋白質の修復、(2) 蛋白質の翻訳抑制、(3) 変性蛋白質を小胞体から排出・分解除去する小胞体関連分解 (ER-associated degradation ; ERAD) が知られている^{3, 4)}。しかしながら、この状態が長く持続すると、細胞はアポトーシスを誘導して死に至る。

新規蛋白質のフォールディング/異常蛋白質のリフォールディングばかりでなく、ERAD においても蛋白質の折りたたみ状態の目印になるのが糖鎖である。小胞体に輸送された分泌蛋白質や膜蛋白質の多くは、翻訳と共役しながらポリペプチドのアスパラギン残基に N 結合型糖鎖付加を受ける。糖鎖は、GlcNAc の形まで細胞質で形成され、小胞体内腔に輸送された後にさらにマンノース、グルコースが付加され、Glc₃Msn₉GlcNAc₂ の形でポリペプチドに結合する⁵⁾。新生蛋白質では、この糖鎖が N 末端から 50 残基以内にある場合には calnexin (CNX) / calreticulin (CRT) によって、50 残基以降にある場合には Bip / PDI によってフォールディングされると推定されている。CNX は、小胞体膜に局在する一回膜貫通型の蛋白質、CRT は小胞体内腔に局在する可溶性蛋白質であり、主にモノグルコース型糖鎖を認識して蛋白質と結合し、フォールディングを行う。蛋白質の解離は、glucosidase II によって糖鎖最後のグルコースがトリミングされることによっておこる。解離した蛋白質が正しいフォールディングを受けていれば、mannosidase I, II によってマンノースがトリミングされ、ゴルジ体へ輸送されるが、正しいフォールディングを受けていなければ、UGGT (UDP-glucose glycoprotein glucose transferase) によって再度グルコースが付加され、CNX / CRT に戻される (CNX / CRT サイクル)。一方、ERAD において、変性蛋白質を認識するのは EDEM という小胞体膜蛋白質である。EDEM は Man₈レクチンとして Man₈GlcNAc₂型の糖鎖を認識し、細胞質側への逆行輸送を行っている。

当研究室では、ニューロンにおける PDI の SNO 化による機能消失が、虚血時やヒト孤発性神経変性疾患患者脳において認められることを明らかにしている⁶⁾。したがって、他の多くの小胞体シャペロン群が SNO 化により機能変化をおこす可能性が示唆される。そこで本研究では、シャペロン機能、 Ca^{2+} 貯蔵能ともに重要性が高いと思われる CRT に主に着目し、SNO 化による機能変化ならびに細胞死への関連について研究を行った。

2. 方法

SNO 化蛋白質の検出 (ビオチンスイッチ法)⁷⁾

HEK 293T 細胞を SNO 処理した後、各サンプルに blocking buffer を 2 ml 加え、数分おきに転倒混和しながら 50°C で 20 分間反応させた。-20°C acetone を 5 ml 加えて -80°C で 15 分間、-20°C で 5 分間静置した後、4°C、20,600 x g、15 分間遠心した。上清を除去してペレットを風乾し、100 ml HENS buffer で溶解し 1.5 ml チューブに移した。これに 33 μ l biotin-HPDP/DMF 溶液および 4 μ l の 50 mM アスコルビン酸水溶液を加えて室温で 1 時間反応させた。その後、-20°C acetone を 280 μ l 加えて -80°C で 15 分間、-20°C で 5 分間、4°C、20,600 x g、10 分間遠心した。ペレットを acetone で洗浄し、風乾させた後、450 μ l HENS buffer を加えてサスペンドし、完全にペレットを溶かした。このうち 20 μ l を input サンプルとし、残り 430 μ l に 900 μ l の neutralization buffer を加え、続いて 50 % slurry streptavidin-agarose gel を 25 μ l 加えたものを 4°C で一晩反応させた。

N2a および SH-SY5Y 細胞に対しては、細胞質画分を総蛋白濃度 0.67 mg/ml となるよう HEN buffer で調整し、750 μ l に対して blocking buffer 3 ml を適用した。ブロッキング後、ペレットを 300 μ l の HENS buffer に溶解し、そのうち 100 μ を biotin 化した。また、biotin 化後、まず 100 μ l の HENS buffer に溶解し、そのうち 20 μ l を input サンプルとした。残り 80 μ l を HENS buffer で 1 ml に希釈し、そのうち 400 μ l に 1 ml の neutralization buffer を加え、続いて 50 % slurry streptavidin-agarose gel を 25 μ l 加えたものを 4°C で一晩反応させた。これらを neutralization buffer + NaCl で 3 回洗浄後、25 μ l の 2 X SDS sample buffer を加え、5 分間煮沸して遠心後、上清をサンプルとした。

3. 結果

1) CRT の S-ニトロシル (SNO) 化 : マウス神経芽細胞腫 N2a をカルシウムイオノフォア (A23187) で刺激し、細胞内に Ca²⁺ を流入させ、内在性 CaM / NOS を活性化させたところ、SNO-CRT の形成が認められた。また、A23187 による SNO-CRT の形成は、NOS inhibitor である L-NAME の前処理によって完全に消失した (Fig. 1)。

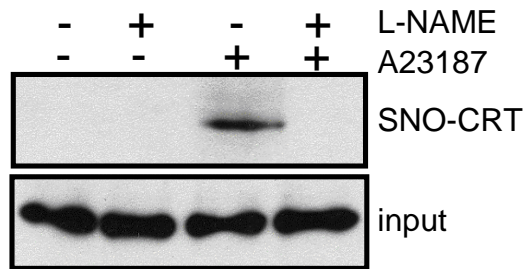


Fig. 1 カルシウムイオノフォアによる SNO-CRT の形成および NOS inhibitor による抑制
N2a 細胞に L-NAME (1 mM) を 1 時間前処理した後、A23187 (5 μ M) で 4 時間刺激した。Biotin-Switch assay の後に Western Blotting を行い、SNO-CRT を検出した。

2) 小胞体ストレスによる CRT の SNO 化 : Tunicamycin (Tm) は新生蛋白質の N 型糖鎖結合を阻害することで、また、thapsigargin (Tg) は小胞体カルシウムホメオスタシスを攪乱することで、小胞体ストレスを惹起する。そこで、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を Tm および Tg で刺激し、Biotin-Switch assay により SNO-CRT 形成の有無を検討した。Tg 刺激で SNO-CRT の形成が認められたものの、Tm 刺激では全く認められなかった。また、L-NAME の前処理によって Tg による SNO-CRT の形成は完全に消失した。

3) 小胞体ストレスによる NOS を介した NO 産生 : 小胞体ストレス誘導試薬のうち Tg は、NOS 依存的な SNO-CRT を形成した。そこで、Tg 刺激によって NO の産生が誘導されるか否かについて検討した。N2a 細胞を Tg 刺激したところ、細胞内 NO 濃度の上昇が時間依存的に観察され、これは L-NAME の前処理によって顕著に抑制された。一方、Tm 刺激によっては細胞内 NO 濃度の上昇はほとんど認められなかった。

4) 脳虚血モデルにおける CRT の SNO 化 : マウス MCA モデルによる虚血に対して、NMDA-R アンタゴニストや NOS inhibitor は梗塞巣や浮腫形成を抑制する。したがって、MCA モデルによる虚血には NOS の活性化に伴う NO の産生が寄与していると考えられる。そこで、MCA モデルを用いたマウス虚血脳から大脳皮質および線条体を分画し、細胞質画分を調整し Biotin-Switch assay により SNO-CRT の形成の有無を検討した。梗塞巣脳では、対側脳比べて、約 20 倍の SNO-CRT の形成が認められた。

5) CRT の SNO 化部位の特定 : CRT には 3 つのシステイン残基 (C88, 120, 146) が存在するが, そのうち C88 と C120 は S-S 結合を形成しているため, CRT の C146 が SNO 化されることが予想された. そこで, C146 が SNO 化の標的になるか否かについて検討した. まず, リコンビナント CRT を用いて解析した. CRT の C146 を Ser に置換したリコンビナント CRT C146S 変異体蛋白質を作製し, DAN assay を行ったところ, 野生型 CRT と比較して S-ニトロシル化が有意に抑制された. つぎに, FLAG タグを付加した野生型 CRT, CRT C146S および CRT C88/120/146S を N2a 細胞に発現させ, Biotin-Switch assay の後に Western blotting で FLAG を検出することによって行った. CRT C146S 変異体では, Cys 残基の存在しない CRT C88/120/146S 変異体と同様に, SNO-CRT の形成は認められなかった (Fig. 2).

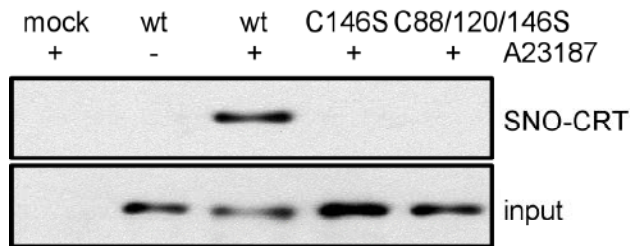


Fig. 2 CRT における SNO 化部位の同定
各 DNA をトランスフェクションし, A23187 (5 μ M) で 4 時間刺激した. Biotin-Switch assay の後に Western Blotting を行い, SNO-CRT を検出した.

4. 考察

本研究により以下の知見が得られた.

1. CRT が *in vitro* および *in vivo* において SNO 化され, これには Ca^{2+} 濃度上昇に伴う NOS の活性化が関与していた.
2. 小胞体ストレス誘導試薬 thapsigargin によって CRT が SNO 化され, これは NOS の活性化を介する NO の産生が関与していた. また, NOS 阻害薬によって thapsigargin による細胞死が抑制された.
3. CRT の SNO 化は, C146 において起こり, C146 の欠失および修飾は CRT のシャペロン活性を抑制し, 小胞体ストレスに対する抗細胞死効果を減弱させた.

これらの結果により, 虚血時および小胞体 Ca^{2+} 貯蔵能の低下による細胞内 Ca^{2+} の上昇は, NOS の活性化を介して NO を過剰産生し, 小胞体シャペロンである CRT を SNO 化することが示唆された. また, CRT の SNO 化によるシャペロン活性の低下は, 小胞体ストレスに対する細胞死に関連することが示唆された.

これまでに, 虚血による小胞体ストレスの惹起には, 低酸素および NO によるニトロソ化ストレスが関与していることが明らかにされてきた⁸⁾. また, NO によるさまざまな蛋白質の SNO 化が細胞死に関与することが明らかになってきた. 本研究において, CRT が虚血に伴うニトロソ化ストレスによって SNO 化され, シャペロン活性が著しく減弱することを見出したことにより, NO と小胞体ストレスの関連性に新たな見解を提示することができた.

5. 発表論文、参考文献

- 1) Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. *Trends Mol Med.* 2003;9(4):160-8.
- 2) Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(2):150-66.
- 3) Kaufman RJ. *Genes Dev.* 1999;13(10):1211-33.
- 4) Kaufman RJ, Scheuner D, Schröder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(6):411-21.
- 5) Molinari M, Helenius A. *Science.* 2000;288(5464):331-3.
- 6) Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi Z, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. *Nature.* 2006; 441(7092):513-7.
- 7) Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. *Nat Cell Biol.* 2001;3:193-7.
- 8) Numajiri N, Takasawa K, Nishiya T, Tanaka H, Ohno K, Hayakawa W, Asada M, Matsuda H, Azumi K, Kamata H, Nakamura T, Hara H, Minami M, Lipton SA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:10349-54.