

## 【総説】

## 第六回 高安賞優秀賞受賞論文

## 論文 「Hypoxia Enhances S-Nitrosylation-mediated NMDA Receptor Inhibition via a Thiol Oxygen Sensor Motif」

Neuron

Vol.53, Page 53-64

2007年1月掲載

## 低酸素はS-ニトロシル化介在性のNMDA受容体阻害をチオール酸素検出モチーフを介して促進する

申 然淑 (しん よんしゆく)

## 背 景

NMDA型のグルタミン酸受容体は神経発達や学習を始め多くの生理活性に関与しているが、一方過剰なグルタミン酸の放出は神経細胞死を促す結果となる<sup>1)2)</sup>。脳内酸素の生理的濃度は10-20 mmHgの範囲で恒常環境の酸素よりも低い。低酸素状態においてはシステイン残基はジスルフィド結合を形成するというより、未反応のチオール基を持って存在している。また脳梗塞のような病理的な低酸素状態では多くの蛋白が還元状態で存在している。このような病的状況ではジスルフィド結合の形成はさらに減少する。

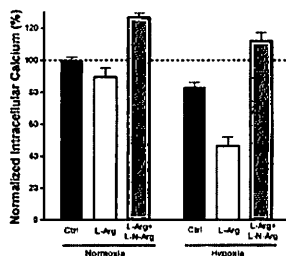


図1. 大脳皮質培養細胞において、低酸素状態はNOによるNMDA受容体の抑制効果を増加させる。

## 結 果

以前に、私たちは一酸化窒素(NO)の前駆体であるニトロシステイン(SNOC)がS-ニトロシレーション反応を介してNMDA由来の電流を抑制することを報告し、この抑制にNR1とNR2A上の2組のシステイン残基が関与していることを示した<sup>3)</sup>。本研究では、低酸素状態においてNMDA受容体がS-ニトロシレーションに極めて敏感に反応することを見いだした。この知見は、リアノジン受容体で観察されたNOによる影響と極めて類似している<sup>4)</sup>。また、NMDA受容体はNR1のシステイン残基、744位と798位を介してジスルフィド結合を形成しているが<sup>5)</sup>、このシステイン残基対が脳内で酸素検出器としての役割をもっていることを本研究で明らかにした。

我々は、大脳皮質培養神経細胞を用いて、定常状態( $pO_2$ :150-160 mmHg)と低酸素条件下( $pO_2$ :5 mmHg)で、50  $\mu$ M NMDAで刺激したカルシウム応答を観察した。定常状態下においては、L-arginineをNOSの基質として培地に添加するとNMDAの添加によって誘起されるカルシウム応答が減少した(図1)。このカルシウム応答の減少は低酸素条件下で大きく増強された(図1)。次に、低酸素がNMDA受容体のS-ニトロシレーションに及ぼす影響をバイオチン置換法を用いて解析した(図2)。低酸素条件下で内因性のnNOSを活性化後にNR1のS-ニトロシレーションを全蛋白量に対する相対値で評価した。低酸素によってNR1のS-ニトロシレーションは2倍程度増加することが確認された(図2)。次に、低酸素条件下でのNOによるNMDAへの影響を、卵母細胞発現系を用いて電気生理学的に解析した。定常状態で内因的に発生するNO前駆体SNOC(500  $\mu$ M)はNR1/NR2Aを発現する卵母細胞でNMDA由来の電流を抑制した(図3A)。低酸素状態はNOによるNMDA電流にさらに抑制した(図3B, C)。次いで我々は、異なるNO濃度におけるNMDA受容体の反応を観察した。定常条件下では10倍低い濃度のSNOC(50  $\mu$ M)はNMDAによる電流をわずかに抑制した(図4A)。しかしながら、低酸素条件下では50  $\mu$ M SNOCは定常大気条件下での同濃度のSNOCより大きくNMDAによる電流を抑制した(図4B)。さらに低い濃度の5  $\mu$ M SNOCは定常大気条件下ではNMDAによる電流を有意に抑制しなかったが(図4A)、低酸素

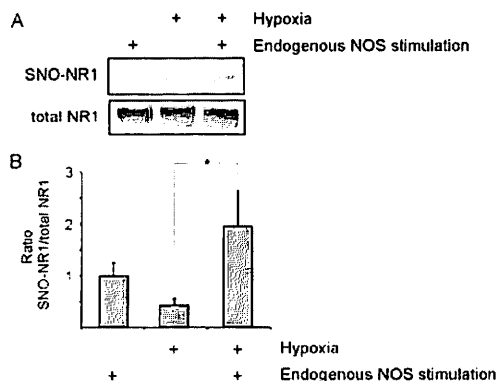


図2. 低酸素状態におけるNMDA受容体NR1サブユニットのS-ニトロシレーション。

条件下では、有意な抑制を示した(図4B, C). NR1のシステイン残基, 744位と798位の変異体とNR2(NR1(C744, C798A)/NR2A)を発現するとNOは定常大気条件下で有意にNMDA反応を抑制した。しかしながらこの変異体では、低酸素のNOの

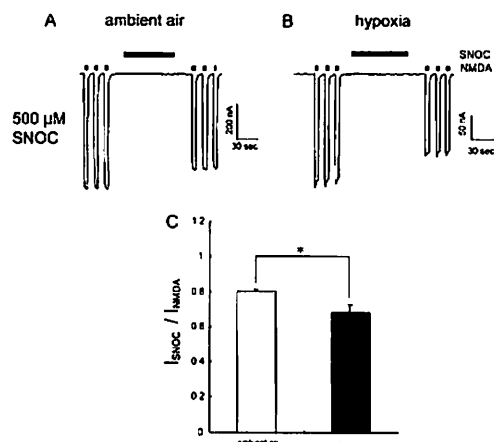


図3. 低酸素状態はNOにおけるNMDA電位の抑制を増強させる。

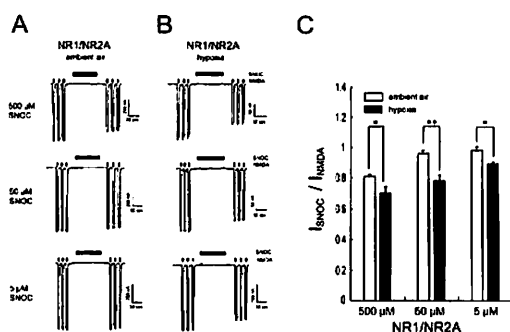


図4. 低酸素はNMDA受容体のNOにおける感受性を高める。

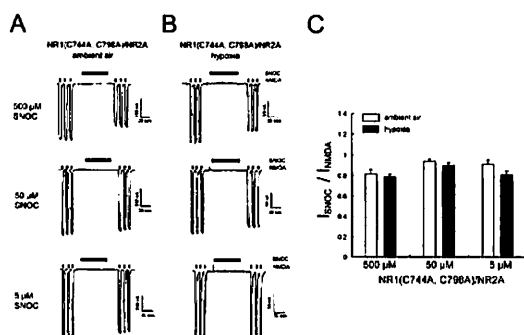


図5. NR1上にある744位と798位のシステイン残基の変異は、低酸素によるNOのNMDA電位抑制増強を排除する。

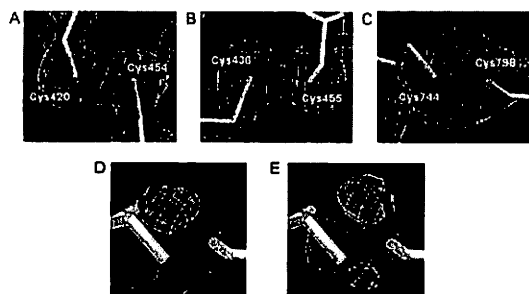


図6. NR1サブユニット上のNOと反応するシステイン残基の結晶構造解析。

抑制増強効果は完全に除外された(図5).

次に, NR1上にあるこのシステイン残基を結晶構造解析を用いて, NOの作用前後の構造変化を比較した. C420-C454およびC436-C455は明確な電子密度が観察された(図6). 一方, C744-C798の主鎖は濃密な電子密度を示していたが, ジスルフィド結合を構成しているS<sub>γ</sub>は拡散した電子密度を示した. SNOCを作用させると, 電子密度の最高値は同じ位置であったが, その値はSNOCを作用させない群と比べて大きかった( $F_o - F_c$ : +SNOC; +7 $\sigma$ , -7 $\sigma$ , -SNOC; +5 $\sigma$ , -4 $\sigma$ , 図6).

## まとめ

低酸素状態がNOによるNMDA受容体の修飾を増加してNMDAによる電流を減少させた. システイン残基がNOの主要なターゲットである以上, NMDA受容体の還元状態がNO修飾の効率に最も重要であると考えられる. 脳内ではpO<sub>2</sub>濃度が定常大気より低いことを考慮すると, 脳卒中や脳溢血などの病理的な低酸素条件下でのNOによるNMDA受容体のより強い修飾を予想させる. このことは, 低酸素状態におけるNOのNMDA電流抑制効果の増加がNOと反応できる未反応のチオール基が増加した結果であると考えられる. NR1中のシステイン残基(C744, C798)の変異体が, 低酸素条件下におけるNOの効果増加を完全に除去したことは, システイン残基自身のニトロシレーションというよりもむしろ, これらが低酸素状態では酸素検知モチーフとして機能していると考えられる.

## 文献

- 1) Lipton, S.A., Choi, Y.-B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.-S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., and Stamler, J.S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632, 1993
- 2) Lipton, S.A., and Chen, H.-S.V. Paradigm shift in neuroprotective drug development: clinically tolerated NMDA receptor inhibition by memantine. *Cell Death Differ.* 11: 18-20, 2004
- 3) Choi, Y.-B., Tenneti, L., Le, D.A., Ortiz, J., Bai, G., Chen, H.-S.V., and Lipton, S.A. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat. Neurosci.* 3: 15-21, 2000
- 4) Eu, J. P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J.S., and Meissner, G. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O<sub>2</sub> sensor and NO signaling functions. *Cell* 102: 499-509, 2000
- 5) Sullivan, J.M., Traynelis, S.F., Chen, H.-S.V., Escobar, W., Heinemann, S.F., and Lipton, S.A. Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron* 13: 929-936, 1994



## Profile

所属：金沢大学大学院医学研究科薬理学研究室  
 2000年 The Burnham Institute にて Research Associate  
 2003年 Louisiana State University にて Research Associate  
 2008年 Columbia University, Howard Hughes Medical Institute にてポスドク  
 現在のテーマは大脳皮質神経細胞の形態と連結の解明  
 E-mail: ys2431@columbia.edu