

中枢神経修復・再生におけるタンパク質のS-ニトロシル化の役割

郡山 恵樹

Role of Protein S-nitrosylation in Central Nervous System Survival and Regeneration

Yoshiki Koriyama

*Department of Molecular Neurobiology, Graduate School of Medicine, Kanazawa University;
13-1 Takaramachi, Kanazawa 920-8640, Japan.*

(Received May 7, 2013)

The retina has been regarded as 'an approachable part of the brain' for investigating central nervous system (CNS). The optic nerve injury is a well-accepted model to study the mechanisms of neural degeneration and/or axonal regeneration after trauma in the CNS. Nitric oxide (NO) is a gaseous messenger molecule biosynthesized from L-arginine and molecular oxygen by NO synthase. Many reports suggest that excess production of NO plays a crucial role in neuronal cell death including in death of retinal ganglion cells (RGCs). In contrast, several lines of evidence indicate that NO can prevent neuronal death. In general, NO mediates neuroprotection through two main signaling pathways: the NO/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway and the S-nitrosylation pathway. Especially, whether S-nitrosylation of proteins promotes RGCs survival and its axonal regeneration after injury is unclear. Thus, we focused on the S-nitrosylation-dependent mechanism of RGCs survival and axonal regeneration by NO after nerve injury.

Key words—S-nitrosylation; nitric oxide; regeneration; survival; Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1); histone deacetylase 2

1. はじめに

脳神経の1つである視神経は発生の過程において外胚葉性の神経管前部に由来するため中枢神経系に属する。われわれは「網膜-視神経」を中枢神経モデルとして、損傷後の中枢神経修復及び再生の分子メカニズムを解析する研究を行っている。

網膜は組織の層構造がはっきりしているだけでなく、網膜神経節細胞 (retinal ganglion cells; RGCs) の細胞体とそこから伸びる神経線維束 (視神経) の構造もはっきりとしているため解剖学的な観察が容易である。また、視神経束から離れたコンパートメントに細胞体 (RGCs) があるその構造特殊性から外科的手術も薬理学的実験も容易である。これらのことより網膜は「研究しやすい脳」とされ、網膜-視神経中枢神経モデルは中枢神経の損傷・脱落研究や修復・再生研究など広く用いられてきた。つまり、

網膜-視神経中枢神経モデルは単に虚血性視神経症、緑内障など視神経関連疾患のモデルに留まるのではなく、脳虚血やアルツハイマー病を始めとする難治性中枢神経疾患や脊髄損傷への治療・再生の研究にも応用が容易である。

新生期ほ乳類の中枢神経系は損傷後も比較的容易に神経再生が誘導される。しかし、成熟期ほ乳類中枢神経系は再生が困難である。その理由は、①成熟期における再生関連遺伝子発現の制限、②視神経損傷後の RGCs の細胞死誘導、③RGCs 軸索伸長能力の低下といったことが考えられる。つまり、これらの要因を克服することができれば成熟期ほ乳類においても損傷後の視神経再生が起こる可能性がある。特に、神経細胞死からの保護そのものは神経再生を誘導しないが、生存 (修復) 作用は神経再生の程度を著しく高める重要なファクターとなっている。本稿では損傷後の神経細胞における神経修復と再生におけるタンパク質の S-ニトロシル化の役割について述べるとともに再生医療への応用の可能性を示す。

2. タンパク質のS-ニトロシル化

一酸化窒素 (nitric oxide; NO) はシナプス形成

The author declares no conflict of interest.

金沢大学医薬保健研究域医学系脳情報分子学 (〒920-8640 金沢市宝町 13-1)

e-mail: koriyama@med.kanazawa-u.ac.jp

本総説は、平成 24 年度日本薬学会北陸支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

や血圧コントロールなど、実に様々な生理機能を担っていることが知られている。特に中枢神経系では脳梗塞後に過剰に放出された興奮性アミノ酸の作用依存的に産生された NO や過度の炎症によりグリア細胞が誘導型一酸化窒素合成酵素を発現させ、産生された過剰量の NO など、高濃度の NO は神経細胞死を誘導する。一方、低濃度の NO はシナプス伝達や神経細胞死抑制に働くことが知られている。このことより NO はしばしば 2 面性の顔を持つヤヌス神や諸刃の剣にたとえられるガス状分子である。しかし、過剰な NO による神経細胞死機構については多くの報告がなされているものの、低濃度 NO による神経保護機構メカニズムについてはほとんど報告されていない。NO はタンパク質システイン残基のチオール部に対して化学的修飾 (S-ニトロシル化) をすることが分かっているが、近年、S-ニトロシル化修飾されたタンパク質を比較的簡単な手法で特異的に検出できるビオチンスイッチアッセイ法⁹⁾が開発され、タンパク質の S-ニトロシル化修飾の研究に大きく寄与されている。この方法が開発されて以来、どのようなタンパク質が S-ニトロシル化修飾を受けその作用が変化するか、またそれらの機構がどのような疾病の発症機序に係わっているか、そのターゲット探索が世界的競争下にある。しかし、視神経損傷後の RGCs における修復・再

生機構において、タンパク質の S-ニトロシル化との関係を記した報告はほとんどない。そこで、われわれはタンパク質の S-ニトロシル化修飾による損傷後神経の修復・再生の可能性とその作用メカニズムの精査を行った。

3. Keap1 の S-ニトロシル化による神経修復

脳や網膜組織は他の組織に比べて酸素消費量が多いため、活性酸素の産生が高いことが知られている。通常、ヒトの体には酸化ストレスを感知してそれを無毒化の方向へシフトする仕組みが備わっており、酸化ストレスはラジカル捕捉型化合物や内因性抗酸化物によって処理することが可能である。しかし、病態などにより強い酸化ストレスがかかると抗酸化システムが破綻し酸化ストレス障害性の中枢神経疾患のトリガーになり得る。われわれは内因性抗酸化システムを外部刺激によって増強できる機構の精査とその化合物の探索を行った。

酸化ストレスセンサーとして内因性抗酸化機構の中心的役割を担うタンパク質、Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) が知られている (Fig. 1)。非酸化ストレス下では Keap1 は転写因子である NF-E2-related factor 2 (Nrf2) と結合し、Nrf2 を細胞質に留めてその核内移行を抑えている。酸化ストレスを消去する必要がなければ、Keap1 はユビキチン E3 リガーゼのアダプターとして機能し、Nrf2

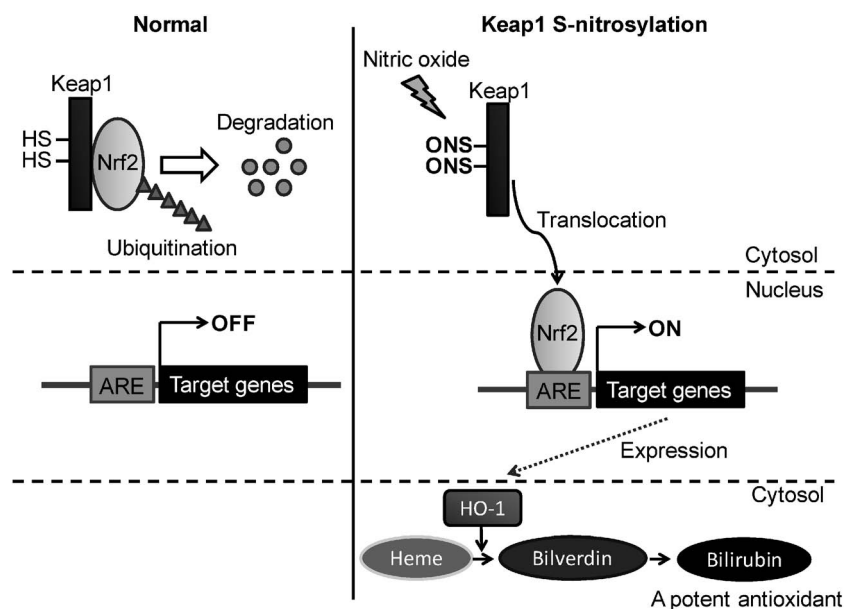


Fig. 1. Schematic Diagram of Keap1-S-Nitrosylation Anti-Oxidative Signaling Pathway
NO donors induced S-nitrosylation of Keap1 and HO-1 expression through Nrf2/ARE signaling.

をユビキチン化することで分解する。しかし、Keap1は、アルキル化や酸化などの化学的修飾を受けると、Nrf2抑制機構が解除され、Keap1から解離して核内移行したNrf2が抗酸化応答エレメント (antioxidant response element; ARE) に結合する。これにより様々な種類の抗酸化タンパク質の発現が促進され、細胞を酸化ストレスから守る。また、Keap1はその構造中に持つSH基が酸化及びアルキル化されるとNrf2を解離し、抗酸化タンパク質の発現促進のスイッチが入ることが神経系を含む多くのモデルにおいて報告されてきた。しかし、Keap1がS-ニトロシル化され、抗酸化システムを制御するという報告はほとんど皆無であったため、Keap1のS-ニトロシル化によるNrf2の活性化と内因性抗酸化機構の活性化による神経保護作用について調べた。

本研究ではNOドナーとして異なる2種類の化合物を使用した。1つは、イリドイド化合物であるゲニピンである。ゲニピンは脂溶性の低分子化合物であり、これまで多くの神経保護作用や神経軸索伸長作用の報告がある神経栄養因子様活性物質である。^{2,3)} ゲニピンは一酸化窒素合成酵素 (NOS) の活性化に必要な補酵素であるテトラヒドロピオプテリン (BH4) と類似の構造を持ち、BH4代替作用でNOを産生することとそれ自体が神経型NOS (nNOS) を発現させることでNOを産生することが報告されている。⁴⁾ しかし、ゲニピン自体はヘミアセタール構造を有し、安定性に問題があるためその安定誘導体、(1*R*)-isopropylxygenipin (IPRG001) を用いた。もう1つは緑内障治療薬として臨床で用いられているニプラジロールである。ニプラジロールはアドレナリン受容体遮断作用を持つとともに、NOの放出作用を持つため血管拡張や眼圧降下の目的で使用されてきた既存薬である。⁵⁾ この2種化合物を用いてKeap1のS-ニトロシル化と内因性抗酸化機構誘導による保護作用メカニズムについて精査した。^{6,7)} 実験には網膜神経節細胞株RGC-5を用いた。IPRG001及びニプラジロールはいずれもRGC-5処理の2時間以内におよそ1.5-2倍のNOを産生することが確認できた。また、いずれのNOドナーも前処理(4-6時間)によってRGC-5の過酸化水素障害を有意に抑制するが、前処理時間を短くすると保護作用が減弱された。その効果はNOスカベンジャーやタンパク質合成阻害剤で消失する

ことから、NO依存的なタンパク質発現による保護作用であることが考えられた。その保護作用に関連する抗酸化タンパク質群をスクリーニングした結果、ヘム・オキシゲナーゼ1 (heme oxygenase 1; HO-1) が最も顕著な発現を示した。HO-1は細胞内のヘムを遊離鉄と一酸化炭素とビリベルジンに分解する酵素である。ビリベルジンはビリルビンに素早く変換されて強力な活性酸素スカベンジャーとして作用し、過酸化脂質の産物である4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) の産生を防ぐことが知られている。IPRG001及びニプラジロールの保護効果におけるHO-1の関連性を調べるために、HO-1阻害剤のSn-メゾポルフィリン (SnMP) やHO-1特異的なsiRNAを用いた。そのいずれでもNOドナーによる酸化ストレス障害に対する抑制作用が回避されたため、HO-1を介した保護作用であることが確認された。また、ニプラジロールはNO放出性作用以外にアドレナリン受容体遮断作用が知られているが、同作用を持つプラゾシン及びチモロールにHO-1依存的な酸化ストレスに対する保護作用は認められなかった。さらに、ニプラジロールのNO放出作用のみを欠いた脱ニトロニプラジロールでも酸化ストレスに対する保護作用やHO-1の発現誘導作用は認められなかったため、NO放出作用由来の抗酸化機構が存在することが示唆された。

次にNOドナーによるNrf2の核内移行作用を免疫染色と核内サンプルのウェスタンブロットにより調べた。NOドナー処理後2時間以内にNrf2は核内に移行するデータが得られた。また、その作用はNOスカベンジャーやS-ニトロシル化阻害剤のジチオスレイトールで消失することから、NO/S-ニトロシル化に起因するNrf2の核内移行作用であることが示された。両NOドナー化合物の処理(1時間)によって、Keap1のS-ニトロシル化が起こることをビオチンスイッチアッセイ法によって確認することができた。また、それにより核内移行されたNrf2はHO-1のAREであるE1エンハンサーに結合することをクロマチン免疫沈降法で確認した。

次にこれらの保護作用機構を視神経損傷後のRGCs (*in vivo*) において調べた。視神経損傷後は、RGCsに酸化ストレスを含む様々な細胞死シグナルスイッチが入り、1週間以内にアポトーシスを引き起こし2週間以内におよそ90%のRGCsが死ぬこ

とが知られている。IPRG001 とニプラジロールはいずれも眼球内投与すると 1 日で RGCs 特異的に HO-1 の発現誘導が認められた。また、NO ドナーの眼球内投与前処理により視神経損傷後の RGCs の細胞死が有意に抑えられることと、その作用が SnMP で減弱することが分かった。さらに、視神経損傷後に増加する 4-HNE の産生量は NO ドナーの前処理により低下し、その効果も SnMP の前処理によって抑制されることが分かった。つまり、*in vitro* における NO ドナーによる HO-1 発現誘導を介した細胞死抑制作用機構が、*in vivo* における視神経損傷後の酸化ストレス障害に対しても効果を示す可能性が示唆された。

本研究により明らかになった作用メカニズムは神経保護を目指す新規治療法開発に大きく寄与できるものと考えている。

4. ヒストン脱アセチル化酵素 2 (HDAC2) の S-ニトロシル化による神経再生

成熟期ほ乳類の視神経は損傷後も再生が難しいのに対し、新生期では容易に再生する。これらの神経再生機構の相違を精査することは、ほ乳類中枢神経再生機構解明の鍵となる。そこでわれわれは成長とともにダイナミックに変化する、ヒストンの化学的修飾について着目した。ヒストンの化学的修飾やそれによるクロマチンリモデリングは再生関連分子の遺伝子発現 ON/OFF 機構とその後の神経再生の可否決定機構の根幹を司る可能性がある。これまでの研究から成長により再生関連分子の遺伝子発現が制限され再生能力が衰退することが分かってきた。そのダイナミックな遺伝子発現 ON/OFF 機構にはヒストンの化学修飾とクロマチンのリモデリングを伴うエピジェネティックな遺伝子発現制御機構との関連が考えられる (Fig. 2)。しかし、成長過程及び視神経損傷後の RGCs におけるクロマチンダイナミクス解析やそれによる遺伝子発現制御と神経再生を関連付けた報告は国内外ともに皆無である。ヒストン H3 や H4 の特定のアセチル化はクロマチン構造を緩め (ユークロマチン)、転写因子結合が容易になると遺伝子発現機構が ON となる。一方、ヒストンメチル化やそれにつぐヘテロクロマチンタンパク (HP1) の結合は強固のクロマチン構造 (ヘテロクロマチン) にシフトされた結果、遺伝子発現が OFF となる機構が知られている。

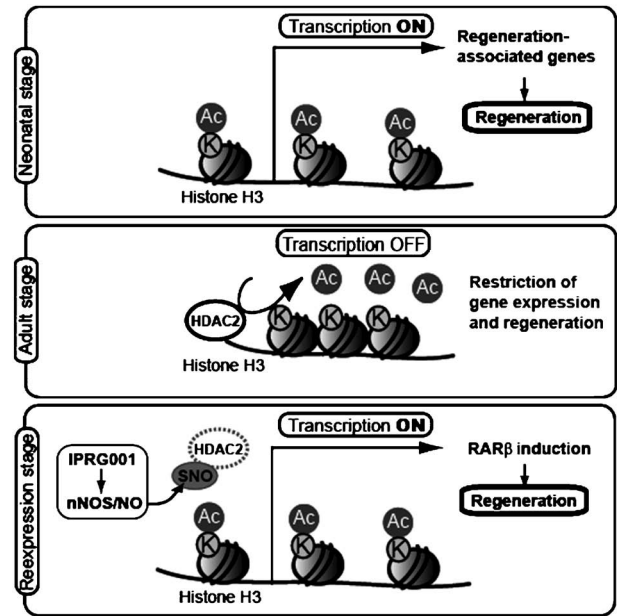


Fig. 2. Schematic Diagram for CNS Regeneration by IPRG001

IPRG001 initially induces nitric oxide (NO) production, followed by S-nitrosylation of HDAC2 and RAR β upregulation. IPRG001 accelerates axonal regeneration through RAR β "re-expression" in adult CNS.

特に本研究では S-ニトロシル化の標的分子の 1 つとして知られるヒストン脱アセチル化酵素 2 (histone deacetylase 2; HDAC2) とその制御に起因する再生関連分子の発現による神経再生メカニズムの解析を目的とした。また、予試験的に Neuro2a における IPRG001 の軸索伸長誘導に関する遺伝子発現をマイクロアレイで網羅的に解析した結果、レチノイン酸受容体 β (retinoic acid receptor β ; RAR β) の発現が特に顕著だったため RAR β を再生関連分子候補として、その発現制御について着目した。

RGC-5 において IPRG001 処理により軸索伸長は促進された。⁸⁾ その効果は NO スカベンジャーで消失することから NO 依存的であることが分かった。また、NO はグアニル酸シクラーゼを活性化して cGMP/cGMP 依存的プロテインキナーゼ (PKG) シグナルを活性化させることが知られている。⁹⁾ しかし、cGMP アナログで RGC-5 の軸索伸長が起こらないことと、IPRG001 の軸索伸長が PKG 阻害剤で抑制されないことから、cGMP/PKG 経路と無関係であることが示唆された。IPRG001 の軸索伸長効果における RAR β の必要性を調べるために RAR β の siRNA を用いたところ、IPRG001 の軸索伸長効果は RAR β のノックダウンで有意に抑制された。

また、IPRG001 処理により *in vitro*, *in vivo* のいずれにおいても RGC-5/RGCs において RAR β の発現が誘導されることが分かった。

一方、レチノイン酸シグナルは生物の発生機構に非常に大切であることが知られている。RAR β は新生期 1 日目 (P1) の RGCs に強く発現が認められるが成長とともに減衰し、成熟期には P1 に対して約 20% の発現まで低下される。興味深いことに、われわれが行った網膜組織片からの神経再生のアッセイにおいて、その再生能力は新生期から減衰し、成熟期には P1 の約 10% 以下まで低下した。そのカーブパターンは生後の RAR β の発現パターンと見事に一致したため、新生期網膜で RAR β を siRNA によりノックダウンしたところ神経再生が抑制された。つまり、新生期における視神経再生は RAR β の発現が豊富であることで起こり、そのレベルは成長とともに減衰するため再生能力が低下していくことが考えられた。また、IPRG001 は RAR β の発現誘導作用を持つため、成熟期で RAR β を再発現させることができれば神経再生能力が得られると仮定した。実際に成熟期網膜組織片を用いた実験により IPRG001 は神経再生を誘導した。また、その効果は NO スカベンジャーや S-ニトロシル化の阻害剤である DTT, また RAR β の阻害により抑制されたことから NO/S-ニトロシル化に起因する RAR β の発現機構の存在が予想された。その結果ピオチンスイッチアッセイにより、IPRG001 は HDAC2 を S-ニトロシル化することが分かった。またそのとき、RGCs においてヒストン H3 のアセチル化が起こっていることを免疫染色で確認した。その形態は IPRG001 未処理と比べ、明らかに細胞核が大きくなっていることが分かった。これは IPRG001 処理により HDAC2 が S-ニトロシル化されて不活性化されることでヒストンのアセチル化が優勢となり、アセチル化されたヒストンがユークロマチンの状態となっていることを示し、遺伝子転写が ON になっていることが考えられた。その標的再生関連分子の 1 つが RAR β であり、成熟期における RAR β の再発現が神経軸索伸長を促して神経再生を起こす可能性を示した。実際に *in vivo* のレベルにおいて損傷後のラット視神経を IPRG001 が著しく再生させ、それは RAR β のノックダウンによって抑制されるデータが得られ、現在

論文投稿中である。これは、新生期の細胞内環境を成熟期の神経再生へ応用した成功例となった。実際にヒストン脱アセチル化阻害剤であるバルプロ酸やトリコスタチン A は RGCs の軸索伸長を促すことも報告されているが、発達期 RGCs におけるエピゲノム解析と視神経再生の関係が記載された報告はほとんどなく、それらの解明は大変興味深いものであると考える。

5. ホスファターゼ・テンシン・ホモログ (PTEN) の S-ニトロシル化による神経再生

これまでの研究において、「視神経再生」とはトップジャーナルにおいても視神経損傷部位からわずか数百ミクロンの軸索再生を示すに過ぎなかった。¹⁰⁾ それは、中枢にある視神経の標的組織どころか眼球から中枢へ向かう経路において左右の視神経が交わる、視交叉にすら再生線維が到達できていないことを意味した。しかし近年、われわれは劇的な RGCs 再生線維が視交叉を超え、中枢の標的である外側膝状体及び中脳上丘まで再到達させることに成功し、世界で初めて純粋な視神経再生による視覚機能の回復を証明した。¹¹⁾ その際、ホスファターゼ・テンシン・ホモログ (PTEN) のコンディショナルノックアウトマウスを用いた。PTEN のノックアウトは生存シグナル Akt を強く活性化させるため生存を高める作用を持つ。それに加え、新規軸索再生シグナルとしても注目されている Akt/mTOR 経路を介するもので、劇的な神経再生作用が確認された。さらに、われわれは PTEN 欠損モデルを用いて、生存・再生分子として見出した、オンコモジュリン (軽度な眼炎症により劇的な再生を誘導する際に発現が高まる再生分子) の発現と cAMP レベルの上昇を RGCs に引き起こす処理を網膜内に施し、劇的な視神経再生の誘導を成功させた。

一方、PTEN は S-ニトロシル化を受けて不活性化されるタンパク質であることが知られている。NO ドナーであるニプラジロールは PTEN を S-ニトロシル化させ、Akt/mTOR 経路により損傷後視神経の再生を誘導することを現在論文投稿中である。¹²⁾

6. おわりに

われわれが見出した NO ドナーの IPRG001 やニプラジロールは低分子で脂溶性が高いので血液脳関門や血液網膜関門を比較的容易に通過でき、非常

に毒性も弱いことが分かっている。S-ニトロシル化される標的タンパク質は今後も同定され、機能解析や疾病との係わり等が解明されると思われる。本研究で解明されたメカニズムの一部や化合物そのものが疾病の新規治療薬開発に貢献できることを望む。

謝辞 研究及び本総説の執筆に当たり終始多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました金沢大学医薬保健研究域医学系脳情報分子学の加藤 聖 教授に謹んで感謝の意を表しますとともに厚く御礼申し上げます。また、多くの御指導、御協力頂きました脳情報分子学研究室の皆様、金沢大学医薬保健研究域薬学系、北陸大学薬学部の共同研究者の皆様に深く感謝致します。また、貴重な試薬を提供頂きました興和創薬株式会社に御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Jaffrey S. R., Erdjument-Bromage H., Ferris C. D., Tempst P., Snyder S. H., *Nat. Cell Biol.*, **3**, 193–197 (2001).
- 2) Yamazaki M., Chiba K., Mohri T., Hatanaka H., *J. Neurochem.*, **79**, 45–54 (2001).
- 3) Yamazaki M., Chiba K., Mohri T., Hatanaka H., *Eur. J. Pharmacol.*, **488**, 35–43 (2004).
- 4) Suzuki H., Yamazaki M., Chiba K., Sawanishi H., *J. Health Sci.*, **53**, 730–733 (2007).
- 5) Adachi T., Hori S., Miyazaki K., Takahashi E., Nakagawa M., Udagawa A., Hayashi N., Aikawa N., Ogawa S., *Eur. J. Pharmacol.*, **286**, 201–204 (1995).
- 6) Koriyama Y., Chiba K., Yamazaki M., Suzuki H., Muramoto K., Kato S., *J. Neurochem.*, **115**, 79–91 (2010).
- 7) Koriyama Y., Kamiya M., Takadera T., Arai K., Sugitani K., Ogai K., Kato S., *Neurochem. Int.*, **61**, 1242–1253 (2012).
- 8) Koriyama Y., Takagi Y., Chiba K., Yamazaki M., Arai K., Matsukawa T., Suzuki H., Sugitani K., Kagechika H., Kato S., *J. Neurochem.*, **119**, 1232–1242 (2011).
- 9) Koriyama Y., Yasuda R., Homma K., Mawatari K., Nagashima M., Sugitani K., Matsukawa T., Kato S., *J. Neurochem.*, **110**, 890–901 (2009).
- 10) Dickendesher T. L., Baldwin K. T., Mironova Y. A., Koriyama Y., Raiker S. J., Askew K. L., Wood A., Geoffroy C. G., Zheng B., Liepmann C. D., Katagiri Y., Benowitz L. I., Geller H. M., Giger R. J., *Nat. Neurosci.*, **15**, 703–712 (2012).
- 11) de Lima S., Koriyama Y., Kurimoto T., Oliveira J. T., Yin Y., Li Y., Gilbert H. Y., Fagiolini M., Martinez A. M., Benowitz L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9149–9154 (2012).
- 12) Koriyama Y., Kamiya M., Arai K., Sugitani K., Ogai K., Kato S., *Adv. Exp. Med. Biol.* (in press)