脳における新規細胞内カルシウム放出機構 —一酸化窒素依存的カルシウム放出： 制御機構と神経機能への関与

柿澤 昌¹⁾, 山澤徳志子²⁾

要約：細胞内カルシウムシグナルは、細胞外からの流入と、細胞内ストアからの放出により上昇するが、特に脳の神経系においては、カルシウム放出を担うチャネルの制御機構や、カルシウム放出系の機能的役割に、いまだに不明な点が少なくない。近年、我々は脳の神経細胞において、新しいカルシウム放出機構、一酸化窒素依存的カルシウム放出 (nitric-oxide induced calcium release: NICR) という現象を発見した。このNICRは一酸化窒素的作用により、カルシウム放出チャネルの一種、1型リアノジン受容体がS-ニトロシル化修飾を受けて活性化されることで起こる。NICRの生理的機能の解明については、まだ研究が端緒にいたばかりであるが、これまでに小脳シナプス可塑性への関与が示されている。NICRは、イノシトール三リン酸 (IP₃) によるIP₃受容体の活性化や、細胞内カルシウムの上昇によるリアノジン受容体の活性化などの既知のカルシウム放出機構とは大きく異なる特徴を示しており、独自の機能的役割を有すると推測される。今後、NICRの機能的役割が明らかになり、その破綻や異常亢進に起因する疾患が明らかになることで、NICRの制御を標的とした新たな脳疾患の治療戦略へと道が開けることが期待される。

1. はじめに：脳の神経細胞におけるカルシウム放出系

細胞内カルシウムシグナル系は、筋収縮、ホルモンや神経伝達物質などの分泌、発生、免疫、記憶学習など、生体の様々な機能に関与し、重要な役割を担っている(1, 2)。したがって、カルシウムシグナル制御系の破綻は、これらカルシウムシグナルが関与する生体の機能に重篤な影響を及ぼす。細胞内カルシウムシグ

ナル系は、細胞内カルシウム濃度の上昇により賦活化されるが、細胞内カルシウム濃度の上昇は、大きく分けて二つの経路により起こる。一つは、細胞外からのカルシウム流入であり、電位依存性カルシウムチャネル、あるいはカルシウム透過性を有するイオンチャネル型の神経伝達物質の受容体 (例：NMDA型グルタミン酸受容体) などのカルシウムチャネルを介した、細胞外から細胞内への電気化学的勾配に従ったカルシウム流入である。もう一つは、筋小胞体/滑面小胞体 (以下、小胞体と記す) などの細胞内カルシウムストアからの放出であり、小胞体膜上に発現するカルシウム放出チャネルを介し、小胞体内腔と細胞質との電気化学的勾配に従ったカルシウムイオンの受動的な移動である(3)。カルシウム放出チャネルには、セカンドメッセンジャーであるイノシトール三リン酸 (IP₃) の結合により活性化されるIP₃受容体と、細胞外からのカルシウム流入もしくはIP₃受容体を介したカルシウム放出により上昇した細胞内カルシウム、もしくは電位依存性カルシウムチャネルの活性化を受けて直接活性化される (骨格筋の場合)、リアノジン受容体が、それぞれ3つのサブタイプずつ同定されている(4, 5)。

脳の神経細胞は興奮性細胞の一種であり、電位依存性カルシウムチャネルを発現するとともに、カルシウム透過型のグルタミン酸受容体の発現も豊富にみられる。したがって、脳の神経細胞内のカルシウム濃度は神経活動依存的に、これらのカルシウム流入チャネルを介して頻繁に上昇する。その一方で、脳の神経細胞ではIP₃受容体の発現も、リアノジン受容体の発現も見られる(6, 7)。それでは、これらの神経細胞内に発現するカルシウム放出チャネルは、どのような機能的役割を担っているのでしょうか？ また、その調節機

キーワード：カルシウム、一酸化窒素、リアノジン受容体、シナプス可塑性、小脳

¹⁾ 京都大学大学院 薬学研究科 生体分子認識学分野 (〒606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

²⁾ 東京慈恵会医科大学 分子生理学講座 (〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8)

E-mail: kakizawa.sho.4u@kyoto-u.ac.jp 原稿受領日：2015年12月24日、依頼原稿

Title: Nitric-oxide induced calcium release: regulatory mechanism and physiological function

Author: Sho Kakizawa, Toshiko Yamazawa

構はどのようなものなのだろうか？ IP_3 受容体やリアノジン受容体の機能的役割に関しては、それぞれのサブタイプ特異的なノックアウトマウス、複数のサブタイプのダブルノックアウトマウスの解析、あるいは阻害薬を用いた薬理学的アプローチにより断片的に情報が得られている。しかし、例えば1型リアノジン受容体のノックアウトマウスは出生致死(8)、2型リアノジン受容体のノックアウトマウスは胎生致死を示し(9)、これらのノックアウトマウスを用いた成熟個体における機能的役割の解析は不可能である。また薬理学的アプローチに関しても、薬物の特異性／副作用の問題などがあり、カルシウム放出チャネルの機能的役割や制御機構に関しては、いまだに不明な点が少なくない。

近年、我々はリアノジン受容体を介する新しいカルシウム放出機構、一酸化窒素依存的カルシウム放出(nitric oxide-induced calcium release；以下、NICRと記す)を小脳で見出した(10)。この新規カルシウム放出機構の機能的役割と制御機構の解明は、カルシウム放出チャネルの機能的役割や制御機構に関する問いに新たな回答を与えるのみならず、NICRの破綻もしくは異常亢進に起因する疾患を明らかにすることで、リアノジン受容体やその活性化調節にかかわる分子を標的とした創薬へとつながる道が開けることも期待される。本稿では、NICRの発見に至る経緯、分子機構、および小脳シナプス可塑性への関与について述べたい。さらに、NICRの虚血後再灌流時に起こる神経細胞死への関与も示唆されているが、これに関しては、本特集、山澤らの稿を参考にされたい。

2. 一酸化窒素(NO)イメージングとNO依存的シナプス可塑性

一酸化窒素(nitric oxide：NO)は、内皮細胞から産生放出される血管弛緩因子として同定されたガス状のシグナル伝達分子であり、生体内ではNO合成酵素の働きによりアミノ酸の一種、L-アルギニンと酸素分子からシトルリンを副産物として合成される(11-14)。NO合成酵素には、主に脳や末梢神経等の神経系や骨格筋で発現が見られる神経型NOS(neuronal NOS：nNOS, NOS1)、主に免疫系で発現する誘導型NOS(inducible NOS：iNOS, NOS2)、および血管内皮細胞などで発現が高い内皮型NOS(endothelial NOS：eNOS, NOS3)という、三種類のサブタイプが存在する(15, 16)。このうちnNOSとeNOSは構成型NOS(constitutive NOS：cNOS)とも呼ばれ、発現部位においては定常的に細胞内に存在し、カルシウム／カルモ

ジュリン複合体との結合により活性化される(17, 18)。したがって、脳の神経細胞におけるnNOSの活性化には細胞内カルシウム濃度の上昇が必要である。一方、iNOSはサイトカインや細胞内毒素により発現が誘導されるが、常に活性化型であるため、その活性化には細胞内カルシウム濃度上昇を必要としない。脳においては神経型を中心に全てのタイプのNO合成酵素の発現がみられることから、様々な脳機能へのNOの関与が推定されており、これまでに、海馬や小脳のシナプス可塑性を始めとする脳機能へのNOの関与が示されてきた(14, 19, 20)。しかし、神経活動により産生されるNOがどのような時間的・空間的な変化挙動を取ることで、その作用を及ぼすのかについては多くの点が不明であった。その原因の一つとして、筆者らが脳におけるNOイメージングに着手した頃(2000年代初頭)に入手可能であったNOに対する蛍光プローブはNOの代謝産物に反応するものであり、NOそのものの時空間的挙動を必ずしも正確に反映するものではなかったことが挙げられる。

そこで、当時、筆者が所属していた東京大学医学系研究科の飯野正光教授らの研究グループでは、NOそのものに特異的に結合する可溶性グアニル酸シクラーゼ(soluble guanylyl cyclase：sGC)のヘム結合領域(heme-binding region：HBR)と蛍光タンパクであるgreen fluorescent protein(GFP)を繋げたNO蛍光プローブ(HBR-GFP)を作製した(21)。そして、このタンパク質から成るHBR-GFPの遺伝子を有するウイルスを神経細胞に感染させることで、脳の神経細胞におけるNOイメージングに取り組んでいた。筆者らは、マウスの小脳皮質を対象としていたが、小脳皮質は、脳の中では比較的少数の細胞種から成る、規則的で明瞭な神経回路網を有する(図1)。小脳皮質は外側から分子層、プルキンエ細胞層、顆粒層(顆粒細胞層)の3層から成り、小脳皮質の主要ニューロンであり、唯一、皮質外のニューロンに軸索を伸ばすプルキンエ細胞は、プルキンエ細胞層に一層に配列する。そして、このプルキンエ細胞には、グルタミン酸を神経伝達物質とする2種類の興奮性線維が入力する。一つは延髄の下オリブ核に出力源を持つ登上線維であり、成熟個体では1つのプルキンエ細胞に1本の登上線維が入力する。もう一つは、顆粒細胞の軸索である平行線維であり、1つのプルキンエ細胞には、10万本もの平行線維がシナプスを形成すると見積もられている(22, 23)。この平行線維とプルキンエ細胞とのシナプス、平行線維シナプスにおいては、平行線維の出力源である顆粒細胞ではNO合成酵素(nNOS)の発現が

図1 小脳皮質の三層構造と興奮性入力

小脳皮質は、表層から分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層から成る三層構造をとる。プルキンエ細胞は皮質外に GABA 作動性の抑制性投射を行う、小脳皮質の主要ニューロンで、成熟個体では、1本の登上線維と、約10万本もの平行線維という、グルタミン酸 (Glu) を伝達物質とする2種類の興奮性線維が入力する。平行線維の出力源である顆粒細胞には、皮質外より苔状線維が入力する。

見られるが、プルキンエ細胞では NO 合成酵素の発現は見られない。そこで、平行線維の活動依存的に NO の産生放出が誘導されると考え、マウスの *in vivo* での顆粒細胞の活動パターンを模倣したバースト刺激 (50 Hz で5発) を、1 Hz で60バースト、平行線維に与えたところ、刺激を受けたシナプス特異的に、明瞭な NO シグナルの上昇が見られた。さらに、この活動依存的に産生される NO の機能的役割を調べるため、この NO 産生刺激が平行線維シナプスの電流応答 (興奮性シナプス後電流, excitatory postsynaptic current: EPSC) を解析したところ、NO 産生刺激、すなわちバースト刺激後、30分以上に渡る EPSC 振幅の長期増強 (long-term potentiation: LTP) が見られた。この LTP は NO 合成酵素の阻害薬により阻害され、nNOS のノックアウトマウスでも消失することから、NO 依存的であることが示されている (21)。時期を前後して、NO 依存性を持つ平行線維シナプス LTP が他にも2つのグループから報告されており (24, 25)、誘導刺激のパターンに若干の違いはあるものの、同様のシグナル系が活性化されているものと推測される。

3. NO シグナルによるカルシウムシグナル系の活性化: NO 依存的なシナプス可塑性の細胞内カルシウム依存性と再構築系を用いたチャネルの研究

引き続き筆者らは、この NO 依存的な小脳 LTP の誘導に関わるシグナリング機構について解析を進めた。NO はその下流に二種類のシグナル系を有する。一つは NO の結合による sGC の活性化を介した細胞内サイクリック GMP 濃度の上昇とそれに引き続くプロテインキナーゼ G (protein kinase G: PKG) の活性化であり、上述の NO による血管弛緩作用は、この sGC-cGMP シグナル系を介する。もう一つは、タンパク質に含まれるシステイン残基のチオール基 (-SH) に対する化学修飾、S-ニトロシル化修飾 (S-nitrosylation: SNO 化, S-ニトロソ化 (S-nitrosation) とも呼ばれる (26)) である (27, 28)。小脳 LTP は、NO と sGC の結合を阻害することで NO による sGC の活性化を阻害する薬物、1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) により阻害されず、NO の下流のシグナル系として sGC-cGMP 系ではなく、タンパク質の S-ニトロシル化の関与が間接的に示唆された (21)。この S-ニトロシル化はチオール基の硫黄原子を基準に見ると酸化反応になるが、比較的弱い還元試薬であるアスコルビン酸 (ascorbic acid) のプルキンエ細胞内投与により小脳 LTP が阻害されることが、後日、確認されている (10)。

シナプス可塑性に関しては、その多くがシナプス後膜側の細胞内カルシウムに依存することが知られている。実際に、平行線維シナプスでも、小脳依存的な運動学習の素過程とされる長期抑圧 (long-term depression: LTD) の誘導へのプルキンエ細胞内カルシウムシグナルの関与が示されている (29, 30)。そこで小脳 LTP へのカルシウムシグナルの関与を調べたところ、プルキンエ細胞内へのカルシウムキレート試薬、O,O'-Bis (2-aminophenyl) ethyleneglycol-N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) の投与 (30 mM) による阻害が見られた (図2)。つまり、小脳 LTP の誘導は、NO (および S-ニトロシル化) シグナルに加え、プルキンエ細胞内のカルシウムシグナルも必要とすることが示された。

これらの結果から、① NO シグナルとカルシウムシグナルが、その下流でそれぞれ異なるシグナル伝達因子を活性化し LTP が誘導する可能性が考えられる。並行して、② NO シグナルがカルシウムシグナルを活性化する可能性、或いは③カルシウムシグナルが NO

図2 小脳プルキンエ細胞における NO 依存的なカルシウム濃度上昇

(左上) NO 供与体 (NOC7, 0.3 mM) 投与前 (NO 投与前), NO 投与後のプルキンエ細胞におけるカルシウム蛍光指示薬のシグナル強度の変化を擬似カラー表示したもの。(右上, 左下) NO 依存的なカルシウム濃度上昇はタブシガルジン (右上), およびダントロレン (左下) により阻害されることから, リアノジン受容体を介するカルシウム放出であることが示される。(右下) NO 依存的なカルシウム上昇への薬物の効果。OCa: 細胞外カルシウム除去, TG: タブシガルジン, Hep: ヘパリン, Dan: ダントロレン (36 度で作用)。** $P < 0.01$ 。

シグナルを活性化する可能性も否定できない。ただし, NO-LTP に必要なカルシウムシグナルはプルキンエ細胞内で誘起されるが, NO の産生放出は nNOS を発現する顆粒細胞の軸索である平行線維で起こるとされることから, ③のカルシウムシグナルの下流で NO シグナルが活性化される可能性は否定される。

したがって, ①の NO シグナルとカルシウムシグナルが, その下流でそれぞれ異なるシグナル伝達因子を活性化し LTP が誘導する可能性と, ②の NO シグナルがカルシウムシグナルを活性化する可能性が残るわけだが, ここで, 1990 年代の後半より脂質二重膜を用いて行われた研究の報告が参考になった。NO が骨格筋の収縮に影響を及ぼすことは以前より知られており, 前述の sGC-cGMP シグナル系以外に NO の下流で骨格筋の収縮に影響を与える因子があることを示す結果が得られていた。筋小胞体からの 1 型リアノジン受容体を介するカルシウム放出は, 骨格筋の収縮に必要な不可欠である。そこで Stoyanovsky らは, 骨格筋由来の単離筋小胞体からのカルシウム放出への NO の影響について調べ, NO のカルシウム放出誘導効果を明らかにした(31)。Stamler らのグループは, 人工の脂質二重膜 (リポソーム) に発現させたウサギ骨格筋由来の 1 型リアノジン受容体の開口確率が NO の作用により上昇することを明らかにし(32), さらに 3635 位のシ

ステインをアラニンに置換した変異型 RyR1 は NO により開口確率が上昇しないことを示した(33)。これらの結果は, RyR1 は NO による 3635 位システインの S-ニトロシル化に依存して活性化される可能性を示す。さらに病態時の骨格筋において, RyR1 の S-ニトロシル化亢進を伴う筋小胞体からのカルシウム漏出の増大が観察された(34-36)。しかし, 「生理的な状態にある細胞」における「内因性の NO の作用による Ca^{2+} 放出」の誘導については長い間, 報告がなかった。

4. 一酸化窒素依存的カルシウム放出：誘導機構とシナプス可塑性への関与

小脳 LTP の誘導時に NO がカルシウムシグナルを活性化するという仮説は, NO 合成酵素を発現する顆粒細胞の軸索である平行線維の活動により産生放出された NO が, プルキンエ細胞膜を透過し小胞体膜上のリアノジン受容体を活性化すると考えるとつじつまが合う。加えて, 上述の単離筋小胞体や脂質二重膜において NO により 1 型リアノジン受容体が活性化されると言う先行研究の結果は, この考え方を支持する。

そこで筆者らは, 先ず, 小脳スライス標本上で NO を細胞外から投与し, プルキンエ細胞内のカルシウム濃度への影響を調べたところ, NO 投与による明瞭なカルシウム上昇が見られた (図2)。この NO 依存的な

図3 小脳プルキンエ細胞におけるNO依存的カルシウム放出を誘導するシグナル系

平行線維終末からnNOSの作用により産生放出されるNOは、プルキンエ細胞内において、3636位システイン(マウスRyR1の場合、ウサギRyR1では3635位)に存在する還元型チオール基(-SH)のS-ニトロシル化(-SNO)を介してRyR1を活性化することでカルシウム放出を誘導する。このカルシウム放出は、NO合成酵素の阻害薬(L-NAME)や、SERCAの阻害薬タブシガルジン、リアノジン受容体の阻害薬ダントロレンにより阻害されるが、NOによる可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)の活性化の阻害薬(ODQ)では阻害されない。L-Arg: L-アルギニン、ER: smooth endoplasmic reticulum。

カルシウム上昇は、細胞外のカルシウムを除去しても阻害されず、一方、筋小胞体/小胞体カルシウムATPアーゼ(sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase: SERCA)の阻害薬タブシガルジン(thapsigargin)の投与により阻害されたことから、小胞体からのカルシウム放出であることが示された(図2, 図3)。また、IP₃受容体の阻害薬、ヘパリンでは阻害されず、リアノジンやダントロレン(dantrolene)などのリアノジン受容体阻害薬で阻害されたことから、リアノジン受容体を介することが示唆された。さらに、1型リアノジン受容体欠損マウスのプルキンエ細胞ではNO依存的なカルシウム上昇が阻害され、HEK293細胞に1型リアノジン受容体を強制発現させた時は、リアノジン受容体のアゴニスト、カフェインによるカルシウム放出が見られ1型リアノジン受容体の発現が確認された細胞でのみ、NO依存的なカルシウム上昇が見られる。したがって、NO依存的カルシウム上昇は1型リアノジン受容体を介するカルシウム放出であり、我々は、この現象をNO依存的カルシウム放出、NO-induced calcium release (NICR)と命名した(10)。

引き続き、NO産生刺激であるバースト刺激を平行線維に与えると、プルキンエ細胞内でNICRが見られることから、内因性のNOによりNICRが誘導される

ことが示された。また、NO産生刺激はNICRを誘導し、NO依存的な小脳LTPはプルキンエ細胞内のカルシウムに依存することから、NICRの小脳LTPへの関与が強く示唆される。実際に、小脳LTPは、上述の通り、NO合成酵素阻害薬やnNOS遺伝子のノックアウトに加え、SERCA阻害薬であるタブシガルジン、あるいはリアノジンやダントロレンにより阻害される。これら一連の薬理的な実験結果は、いずれもNICRの小脳LTPへの関与を示唆するものである(10)。

しかしながら、NO合成酵素阻害薬やnNOS遺伝子のノックアウトは、NOの産生そのものを阻害するため、NICR以外のNO依存的な現象も阻害する。また、リアノジンやダントロレンはリアノジン受容体そのものの活性化を阻害するため、NICRに加えてカルシウム依存的カルシウム放出(calcium-induced calcium release: CICR)を阻害する。したがって、これらの薬理学的実験は、NICRの小脳LTPへの関与の可能性を提唱するものの、必ずしも、その特異的関与を示すものではない。そこで筆者らは、NICRに必要な3636位のシステインをアラニンに置換した変異型1型リアノジン受容体を発現するノックインマウスを作成した(投稿準備中)。このマウスの解析により、個体レベルでの機能も含めた、様々な生体機能へのNICRの特異的関与が、今後、明らかになることが期待される。

5. 一酸化窒素依存的カルシウム放出の特徴と機能的役割

NICRが最初に観察された小脳プルキンエ細胞では、IP₃によるIP₃受容体の活性化(IP₃-induced calcium release: IICR)、および細胞内カルシウム上昇によるリアノジン受容体の活性化によるカルシウム放出(CICR)も見られ、それぞれ神経機能への関与も示されている。したがってNICRも合わせると、プルキンエ細胞には3タイプのカルシウム放出機構が備わっていることになる。しかし、従来より知られているIICRとCICRが、それぞれIP₃、カルシウムという、細胞膜を透過しないシグナル因子により誘導されるのに対し、NICRはNOという、膜透過性のガス性シグナルにより誘導される。さらに、IICRとCICRは、アゴニストの受容体への結合、すなわち非共有結合により誘起されるのに対し、NICRはNOによるリアノジン受容体のS-ニトロシル化、つまり共有結合により誘起される。このように、NICRはIICRやCICRとは大きく異なる特徴を有しており、NICRが独自の機能的役割を有することが推測される。

1型リアノジン受容体は、小脳以外にも海馬、大脳

皮質，大脳基底核，嗅球などの脳領域で高レベルの発現が見られる(37)．さらに脳以外でも，骨格筋，食道などの消化器系，生殖器系，顎下腺や副腎などの分泌器官などを始め，体内各所で発現が見られる(7)．また，NO 合成酵素も体内で広く発現分布が見られる(38, 39)．このように，NICR の誘導に必要な NO 合成酵素と 1 型リアノジン受容体が体内で広く共局在していることは，NICR の様々な脳機能，さらには脳以外の器官における生体機能への関与を強く示唆する．今後，上述のノックインマウスの解析等が進むことで，NICR の様々な生体機能への関与が明らかとされることが期待される．

6. おわりに

NICR の様々な生体機能への関与が示されることは，さらに，NICR の破綻もしくは異常亢進に起因する疾患の解明へとつながる．実際に，既に薬理学的な実験により虚血後再灌流時に大脳皮質で起こる神経細胞死への NICR の関与が示唆されている(文献 10, 本特集山澤らの稿，参考)．この結果は，NICR の欠損だけではなく異常亢進も生体機能を破綻させる可能性があること，NICR が生理的な機能だけでなく病態生理的な機能にも関与する可能性があることを示す．このように NICR の生理機能だけでなく，病態生理的な役割も明らかになってゆくことで，本特集のテーマでもある「脳疾患の新たな治療戦略」に向けた道が明確になってゆくことが期待される．

謝辞：本稿は，筆者らが論文として報告した研究成果を中心にまとめたものであり，各論文の共著者の方々に，この場を借りて感謝の意を表させていただきます．特に，東京大学医学系研究科細胞分子薬理学教室の飯野正光先生，廣瀬謙造先生，並木繁行先生，同研究科脳外科学教室の陳毅力先

生，伊藤明彦先生，順天堂大学医学部薬理学教室の村山尚先生，呉林なごみ先生，昭和大学医学部薬理学教室の小山田英人先生，京都大学薬学研究科生体分子認識学分野の竹島浩先生には大変お世話になりました．心よりお礼申し上げます．

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない．

文 献

- 1) Berridge MJ, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:11-21.
- 2) Clapham DE. *Cell.* 2007;131:1047-1058.
- 3) Pozzan T, et al. *Physiol Rev.* 1994;74:595-636.
- 4) 竹島 浩. *日薬理誌.* 2003;121:203-210.
- 5) 御子柴克彦. *日薬理誌.* 2003;121:242-253.
- 6) Furuichi T, et al. *Receptors Channels.* 1993;1:11-24.
- 7) Giannini G, et al. *J Cell Biol.* 1995;128:893-904.
- 8) Takeshima H, et al. *Nature.* 1994;369:556-559.
- 9) Takeshima H, et al. *EMBO J.* 1998;17:3309-3316.
- 10) Kakizawa S, et al. *EMBO J.* 2012;31:417-428.
- 11) Ignarro LJ. *FASEB J.* 1989;3:31-36.
- 12) Moncada S, et al. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-142.
- 13) Nathan C. *FASEB J.* 1992;6:3051-3064.
- 14) Snyder SH. *Science.* 1992;257:494-496.
- 15) Lowenstein CJ, et al. *Cell.* 1992;70:705-707.
- 16) Marletta MA. *J Biol Chem.* 1993;268:12231-12234.
- 17) Alderton WK, et al. *Biochem J.* 2001;357:593-615.
- 18) Stuehr DJ, et al. *J Biol Chem.* 2004;279:36167-36170.
- 19) Brett DS, et al. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:175-195.
- 20) Garthwaite J, et al. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:683-706.
- 21) Namiki S, et al. *J Physiol.* 2005;566:849-863.
- 22) Ito M. *The Cerebellum and neural control.* Raven Press; 1984.
- 23) Play SL et al. *Cerebellar cortex.* Springer-Verlag; 1977.
- 24) Kakegawa W, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:17846-17851.
- 25) Lev-Ram V, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:8389-8393.
- 26) Iyer AK, et al. *Nitric Oxide.* 2014;42:9-18.
- 27) Foster MW, et al. *Trends Mol Med.* 2003;9:160-168.
- 28) Hess DT, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:150-166.
- 29) Ito M. *Physiol Rev.* 2001;81:1143-1195.
- 30) Ito M. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:896-902.
- 31) Stoyanovsky D, et al. *Cell Calcium.* 1997;21:19-29.
- 32) Eu JP, et al. *Cell.* 2000;102:499-509.
- 33) Sun J, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:11158-11162.
- 34) Bellinger AM, et al. *Nat Med.* 2009;15:325-330.
- 35) Durham WJ, et al. *Cell.* 2008;133:53-65.
- 36) Eu JP, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:15229-15234.
- 37) Mori F, et al. *Neurosci Lett.* 2000;285:57-60.
- 38) Forstermann U, et al. *FASEB J.* 1998;12:773-790.
- 39) Kleinert H, et al. *Eur J Pharmacol.* 2004;500:255-266.