活性酸素の中樞シナプス可塑性に及ぼす影響と老化への関与

柿澤 昌

要約：加齢に伴う記憶力の低下は、個人差があるものの、誰でも経験し得る生理的な老化現象である。このような脳機能の生理的な老化のメカニズム解明へのアプローチとして、記憶学習の細胞レベルでの基盤とされるシナプス可塑性への加齢の影響、さらには、老化の原因因子として着目されている活性酸素の影響に関する様々な研究が行われているが、未だに不明な点が少なくない。本稿では、システインのチオールは、活性酸素による酸化修飾に加え、一酸化窒素によるS-ニトロシル化修飾の標的であることに着目し、活性酸素によるS-ニトロシル化修飾の阻害を介したシナプス可塑性阻害に関する研究を紹介する。小脳皮質の平行線維-プルキンエ細胞シナプスに於けるシナプス可塑性の一種、長期増強 (LTP) はS-ニトロシル化依存的であるが、若齢マウス個体由来の小脳スライスの活性酸素処理により、平行線維シナプス LTP 及び小脳タンパク質のS-ニトロシル化が阻害される。さらに、老齢個体由来のスライスでも、同様に平行線維シナプス LTP 及び小脳タンパク質S-ニトロシル化の阻害が見られる。これらの結果は、老齢個体に於いては、内因性の活性酸素による機能分子のS-ニトロシル化阻害を介してシナプス可塑性が阻害されることを示唆するものであり、このS-ニトロシル化阻害を特異的に解除する薬物の開発により、抗老化創薬に向けた一つの道が拓かれる可能性が期待される。

1. はじめに

生体では加齢に伴い、心身ともに様々な変化が現れる。生後発達期に起こる変化の多くが「成長」「発達」であるのに対し、成熟期以降に起こる変化は「老化」と呼ばれる。そして、この老化は「生理的な老化」と「病的老化」とに大きく分けられる(1)。生理的な老化は、身

体や精神のいかなる疾患の影響も受けずに加齢のみの影響で生体に起こる変化であり、多かれ少なかれ、誰にでも起こり得るが、早い人では20~30歳頃から現れ出す。代表的な例として、白髪(しらが)や脱毛、脳・筋肉・骨などの重量低下などの形態・構造的な変化、及び老眼・難聴・免疫力低下などの機能的変化が挙げられる。一方、病的老化は、この生理的な老化に様々な疾患や環境などの外部因子がストレスとして加わることで起こる変化であり、必ずしも誰にでも起こるとは限らない。高血圧や動脈硬化、認知症などは、病的老化の代表的な例である。生理的な老化の進行による免疫力の低下が原因で病的老化の原因となる疾患が発症することもあるなど、二つの老化は密接に関係し、その境界線は非常に曖昧なものであるが、臨床的には、顕著な臨床症状のある疾患を有するものを病的老化、特に疾患がないものが生理的な老化とされる。

脳に於いても加齢に伴う機能低下が見られる。加齢に伴う緩やかな脳機能の低下、例えば記憶力の低下は、個人差があるものの、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経疾患に代表される病的老化が見られなくても、誰にでも起こり得る。しかしながら、そのQOLへの影響の大きさから、アルツハイマー病やパーキンソン病等のメカニズム解明や治療法開発に関する研究が盛んに進められている一方で、加齢に伴う記憶力の低下に関しては、未だに不明な点が少なくない。本稿では、老化の原因因子として注目されている活性酸素(reactive oxygen species: ROS)に着目し、記憶学習の細胞レベルでの基盤とされるシナプス可塑性への影響、老化との関連性について、筆者自身による研究成果を含めて紹介する。

2. 加齢に伴う脳機能低下と活性酸素

パーキンソン病患者において中脳黒質のドーパミンニューロンの脱落が見られるように、神経変性疾患を伴う病的老化においては、特定部位における神経細胞の変性・脱落が見られるが、病的老化の状態にない高齢者の脳においては、その様な神経細胞の顕著な変性・脱落は殆ど見られない。一方、生理的老化が見られる脳を生化学的に解析すると、タンパク質、脂質、核酸などの機能分子における酸化修飾（e.g. ジスルフィド結合など）の蓄積が見られる(2)。さらに、病的老化が見られる脳では、機能分子における酸化修飾の蓄積はより顕著である。この様な観察結果から、老化の原因因子として、酸化修飾を施す活性分子種である活性酸素が着目されている(3)。すなわち、老齢個体においては、活性酸素による機能分子の酸化修飾の蓄積が原因となって、脳機能の低下が起こると推測されている。

この仮説を検証するため、記憶学習の細胞レベルでの基盤とされるシナプス可塑性への活性酸素の影響に関する研究が、海馬を中心に、数多く行われている。しかしながら、それらの実験結果は、活性酸素のシナプス可塑性への阻害効果を示唆するもの、増強効果を示すもの、さらには、何の影響もみられないものと、極めて多様性に富むものである(4,5)。この原因として、実験に用いた個体の種、性別、週齢等の違いや、可塑性を誘導するプロトコルの違い、解析を行う部位の違い（同じ海馬内でも）などが考えられる。さらに、研究の進展を妨げていることとして、活性酸素が海馬シナプス可塑性を阻害する分子機構に関する有力なモデルが十分に確立されていないことが挙げられる。

筆者らは、小脳皮質の興奮性シナプスにおける長期増強（long-term potentiation：LTP）への活性酸素の阻害効果を示すことで、活性酸素によるシナプス可塑性阻害の分子機構の一つのモデルと提唱できるのではないかと考え、実験を行った(6)。その詳細について触れる前に、まず、解析対象となったマウス小脳皮質の回路網とシナプス可塑性について、その概略を説明したい。

3. 小脳皮質の神経回路網とシナプス可塑性

小脳は、主に運動学習を司ることで知られるが、その表層側に位置する小脳皮質は、外側より分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の三層からなる（図1）。このうち、プルキンエ細胞は、小脳皮質から皮質外へ投射する唯一のニューロンであり、小脳皮質の主要

図1 小脳神経回路網と瞬膜反射条件付け学習
小脳皮質は外側より分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層から成る三層構造をとる。プルキンエ細胞は小脳皮質の主要ニューロンであり、皮質外の小脳核／前庭核にGABA作動性の抑制性投射を行う。成熟個体では個々のプルキンエ細胞には、それぞれグルタミン酸（Glu）を伝達物質とする、1本の登上線維と約10万本もの平行線維が入力する。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。条件付け学習に関しては本文を参照。

ニューロンとされる。プルキンエ細胞には、顆粒細胞の軸索である平行線維と、延髄の下オリーブ核由来の登上線維という、二種類のグルタミン酸作動性の興奮性線維が入力し、それぞれ、遠位樹状突起、近位樹状突起にシナプスを形成する。このうち、平行線維－プルキンエ細胞シナプスにおける伝達効率の長期的な低下、いわゆる長期抑圧現象（long-term depression：LTD）は、小脳依存的な運動学習の細胞レベルの基盤であるとされる(7,8)。以下、小脳運動学習の一種、瞬膜反射条件付けを例に説明する。瞬膜反射条件付けにおける条件刺激（conditioned stimulus：CS）である音刺激は、条件付けの成立前は、単独でマウスに与えても、条件反射（conditioned response：CR）である瞬き反射を引き起こさない。しかし、非条件刺激（unconditioned stimulus：US）である瞼への電気ショックに対して条件刺激を数百ミリ秒ほど先行させた状態で組み合わせると、条件付け学習の進行とともに、先行する条件刺激、つまり音刺激のみが与えられている位相で、条件反射が現れるようになる。そして、この条件反射の出現率は、数日間以上の学習期間に於いて徐々に上昇する。この条件付けの神経回路の基盤として、音刺激を伝達する苔状線維は、条件反射応答の

出力源である小脳核／前庭核に興奮性の入力をするとともに、顆粒細胞にも興奮性のシナプスを形成し、その軸策である平行線維を介して、プルキンエ細胞を興奮性支配する。プルキンエ細胞は小脳核／前庭核に抑制性の入力をするため、通常は、苔状線維の活動によりプルキンエ細胞からの抑制性入力も活性化され、苔状線維の活動単独では小脳核／前庭核のニューロンは興奮せず、瞬き反射は起こらない。しかし、非条件刺激（電気ショック）の情報を伝達する登上線維と、音刺激を伝達する平行線維の組み合わせ刺激（電気ショックと音刺激の組み合わせ投与に相当）を繰り返すと、平行線維－プルキンエ細胞シナプス（以下、平行線維シナプス）で長期抑圧（平行線維シナプス LTD）が誘導される。したがって、音刺激によるプルキンエ細胞を介した小脳核／前庭核ニューロンの抑制が減弱し、音刺激単独で小脳核／前庭核ニューロンが興奮し瞬き反射が現れる。Albus－Marr－伊藤らによるモデルの提唱後、平行線維シナプスの長期抑圧が瞬膜反射条件付け学習の神経回路レベルでのメカニズムであることを示唆する実験結果が、遺伝子改変動物における長期抑圧と瞬膜反射条件付け学習の阻害を示した報告を含め、数多く報告されている(7)。一方、瞬膜反射条件付けには、成立した条件付けを消去する「消去学習」の存在も知られている。モデル研究により、平行線維シナプスにおける「長期増強」が、消去学習の基盤になると考えられている(9)。しかし、同じシナプスにおける長期抑圧と比較して、長期増強は長い間、実験的に示されなかった。

4. 小脳平行線維シナプスの長期増強と S-ニトロシル化修飾の関与

小脳平行線維－プルキンエ細胞シナプスの長期増強については、モデル研究により、平行線維単独の頻回刺激による誘導が示唆されていた(9)。そして、2000年代になって、複数のグループより平行線維シナプス長期増強が報告された(10)。いずれのグループによる報告も、平行線維単独刺激により誘導されるものであるが、誘導に関与するシグナル系は、報告間で必ずしも一致しない。その中で、複数のグループにより一酸化窒素（nitric oxide：NO）の関与が示された(11-13)。一酸化窒素合成酵素の薬理的阻害、もしくは遺伝子欠損により、平行線維シナプス長期増強は阻害される。また、NO スカベンジャーの細胞外液への投与によっても、この長期増強は阻害される。

NO は、二系統のシグナル伝達系を解して情報を伝達する。一つは可溶性グアニル酸シクラーゼ－サイク

図2 一酸化窒素によるタンパク質のS-ニトロシル化と活性酸素による阻害

(上) 一酸化窒素（NO）は2種類のシグナル系により情報を伝達する。sGC：可溶性グアニル酸シクラーゼ、cGMP：サイクリック GMP、PKG：プロテインキナーゼ G。(下) 活性酸素による S-ニトロシル化阻害仮説。チオールが還元状態（-SH）にある時は、NO による S-ニトロシル化を受け（-SNO）、分子機能が発現する。一方、チオールが活性酸素の作用で酸化状態（例：ジスルフィド化（-S-S-））にある時は、NO による S-ニトロシル化が阻害される。

リック GMP－プロテインキナーゼ G を介したタンパク質のリン酸化、もう一方は、NO によるタンパク質中のシステインのチオール基の化学修飾 S-ニトロシル化である（図2）可溶性グアニル酸シクラーゼ－プロテインキナーゼ G を介する系については、NO による可溶性グアニル酸シクラーゼ活性化の阻害薬、ODQ による平行線維シナプス長期抑圧の阻害に関する複数の報告があり、平行線維シナプス長期抑圧への関与が示されている(13-15)。一方、長期増強に関しては、ODQ による阻害は示されておらず、還元作用を持つ薬物の一種、アスコルビン酸のプルキンエ細胞内への投与により阻害されることから、NO による S-ニトロシル化修飾の関与が示唆されている(13)。

5. 加齢及び活性酸素による平行線維シナプス長期増強の阻害

平行線維シナプス長期増強への加齢もしくは活性酸素の影響は、この長期増強が報告された2000年代前半から2010年頃までの間、全く不明であった。しかし筆者らは、加齢に伴い機能分子における酸化修飾の蓄積が増加すること、及びシステイン残基のチオールは、NO による S-ニトロシル化の標的であることに加え、過酸化水素などの活性酸素によるジスルフィド化の標的となることに着目した。一般的に、ジスルフィド化は、S-ニトロシル化よりも化学的に安定とされることから、筆者らは、活性酸素によりジスルフィド結合が形成されると、このジスルフィド結合は比較的安定であるため、同じチオール基に対する NO の作用、

即ち、新たな S-ニトロシル化修飾の形成を阻害するのではないかと考えた。つまり、チオールが還元状態であれば、S-ニトロシル化修飾され分子機能を発揮することが可能であるが、チオールがジスルフィド化を受けていると、その後の S-ニトロシル化ひいては分子機能の発現が阻害され、これが活性酸素による生体機能の阻害あるいは老化の原因になるのではないかと考えた (図 2)。

この仮説を検証するため、筆者らはまず、実際に老齢個体由来の小脳急性スライス標本で、平行線維シナプス長期増強が阻害されるかどうか確かめた (6)。スライス標本中でプルキンエ細胞からホールセルパッチクランプ法により、平行線維を刺激してシナプス電流を記録すると、生後 1 ヶ月齢の若齢マウス由来の小脳標本では、LTP 誘導刺激によりシナプスの電流応答の 30 分以上に渡る増強、即ち、LTP の誘導が見られる。一方、生後 20 ヶ月齢以上の老齢個体由来の標本では、LTP のほぼ完全な阻害が見られた (図 3)。

それでは、この加齢に伴う LTP 阻害に、活性酸素は関与するのであろうか？ そこで、生後 1 ヶ月齢の若齢マウス個体由来の小脳スライスを、1~100 μM の過酸化水素水で前処理したのち、LTP への影響を解析した。その結果、100 μM の過酸化水素水処理により、ほ

ぼ完全に LTP は阻害された (図 3)。また過酸化水素による LTP 阻害効果には、1~100 μM にかけて濃度依存性が見られた。尚、LTP 刺激の代わりに、細胞外から 100 μM の過酸化水素水を投与しても平行線維シナプスの電流応答に影響はなく、LTP は誘導されない。したがって、過酸化水素水即ち活性酸素による LTP 阻害効果は、活性酸素により LTP が誘導され飽和したことによるものではないことが示された。

6. 活性酸素及び加齢による小脳タンパク質の S-ニトロシル化阻害

我々の作業仮説では、システインのチオールの S-ニトロシル化が平行線維シナプス LTP に必要であることから、活性酸素による S-ニトロシル化の阻害により、平行線維シナプス LTP も阻害されると考えられる (図 2)。この仮説を検証するため、小脳ライセート中のタンパク質の S-ニトロシル化のレベルを、ビオチンスイッチアッセイ法と言う生化学的手法により解析した (16)。この方法においては、まず、還元状態のチオールを *N*-エチルマレイミド (NEM) による修飾で安定化し、引き続き、S-ニトロシル化されたチオールを、アスコルビン酸による還元後、ビオチンでラベルする (図 4)。このビオチン化されたチオールを発色試薬等を用いて

図 3 小脳平行線維シナプス長期増強の加齢及び活性酸素による阻害

生後 1 ヶ月齢の若齢マウス由来の小脳急性スライス標本 (Control) では、平行線維へのバースト刺激 (BS) によりシナプス電流応答の振幅が 30 分以上に渡って増強される、長期増強 (LTP) が誘導される。一方、生後 20 ヶ月齢の老齢個体由来のスライス標本 (Aged)、及び若齢個体由来のスライス標本を 100 μM 過酸化水素水で前処理したもの (ROS) では、平行線維シナプス LTP は著しく阻害される。(左) 電流応答振幅の相対値の時間変化。(右) BS 後 21 分~30 分間の電流応答振幅 (相対値) の平均値。電流応答振幅の値は、BS 前 10 分間の平均値で標準化した。*** $P < 0.001$, Control との比較 (*t*-test)。 (文献 6 より改変)

図 4 ビオチンスイッチアッセイ法によるタンパク質の S-ニトロシル化の検出

処理前のサンプル (一番左) には、還元状態のチオール (-SH) に加え、S-ニトロシル化 (-SNO) 及びジスルフィド化 (-S-S-) されたチオールが存在する。この内、還元状態のチオールは *N*-エチルマレイミド (NEM) による修飾を受け安定化するため、また、ジスルフィド結合は弱い還元剤であるアスコルビン酸 (Ascorbate) では還元されないため、S-ニトロシル化されていたチオールのみが、アスコルビン酸により還元された後にビオチン化され、発色試薬などによりシグナルが検出される。

検出することで、S-ニトロシル化されたチオールレベルを定量的に解析できる。

この方法を用いて、NO 処理による S-ニトロシル化の程度を解析した。生後 1 ヶ月齢の若齢マウス由来の小脳サンプルでは、NO ドナーである NOC7 処理 (1 mM) により S-ニトロシル化レベルが 2 倍以上に上昇する。しかし、同じ小脳サンプルを 100 μ M の過酸化水素水で前処理すると、NOC7 処理による S-ニトロシル化の上昇は著しく阻害される (図 5)。このことから、活性酸素による S-ニトロシル化の阻害が示唆される。内因性の活性酸素による S-ニトロシル化の阻害が、上に示した加齢による平行線維シナプス LTP の阻害 (図 3) に関与しているのであれば、老齢個体由来の小脳サンプルにおいても、S-ニトロシル化の阻害が見られるはずである。実際に、生後 20 ヶ月齢の老齢個体由来の小脳サンプルでは、NOC7 処理による S-ニトロシル化の上昇は 1.5 倍程度であり、若齢個体における約 2.5 倍の上昇と比べ、著しい阻害が見られる (図 5)。このことから、老齢個体においては、内因性

の活性酸素の作用により S-ニトロシル化が阻害され、これが S-ニトロシル化依存的な平行線維シナプスの長期増強の阻害の原因になることが示唆された (6)。

7. おわりに

上述のとおり、小脳平行線維シナプスで起こる LTP をモデル系にして、活性酸素によりタンパク質の S-ニトロシル化が阻害され、これが S-ニトロシル化依存的なシナプス可塑性阻害の原因となることが示唆された。さらに、老齢個体の小脳においては、内因性の活性酸素の作用によりタンパク質の S-ニトロシル化が阻害され、これが加齢に伴う平行線維シナプス LTP 阻害の原因となることが示唆された。その後、小脳プルキンエ細胞では、細胞内カルシウムストアである滑面小胞体膜に発現するカルシウム放出チャネルの一種、1 型リアノジン受容体 (type 1 ryanodine receptor : RyR1) が NO により S-ニトロシル化されることで活性化し、カルシウム放出が起こることが、筆者らの研究により示された (17)。この NO 依存的なカルシウム放出 (NO-

図 5 小脳タンパク質における S-ニトロシル化の活性酸素及び加齢による阻害

(上) S-ニトロシル化されたチオールを含むタンパク質を、図 4 の方法によりビオチンラベルし、電気泳動による分離後、メンブレン上でシグナルを検出した像。タンパク質量は β チューブリンで補正。下に記した値は、S-ニトロシル化レベルを、過酸化水素 (H_2O_2)・NO ドナー (NOC7) 非処理群 (若齢個体由来サンプル) の値で標準化したもの。(下) S-ニトロシル化レベルを、過酸化水素・NO ドナー (NOC7) 非処理群 (若齢個体由来サンプル) の値で標準化した値の、群ごとの平均値。若齢個体由来の小脳スライス (Y) では H_2O_2 非処理群で、NOC7 投与によるシグナル上昇が見られるが、 H_2O_2 処理群および老齢個体由来のスライス (A) では、NOC7 投与によるシグナル上昇が著しく阻害される。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(文献 6 より改変)

induced calcium release : NICR) は平行線維シナプス LTP の誘導に必要であり, アスコルビン酸処理などにより 1 型リアノジン受容体の S-ニトロシル化を阻害すると, 平行線維シナプス LTP も阻害される。したがって, 上述の活性酸素により S-ニトロシル化の阻害を受けるタンパク質の候補の一つとして 1 型リアノジン受容体が想定される。活性酸素および加齢による小脳平行線維シナプス LTP の阻害に対応して, 瞬膜反射条件付けにおける消去学習の阻害は, 筆者の知る限り, まだ実験的には示されていない。しかし, 筆者らの 1 型リアノジン受容体の遺伝子改変動物を用いた研究では, 平行線維シナプス LTP の阻害とともに, 瞬膜反射条件付けの消去学習の阻害が見られる (柿澤ら, 第 90 回日本薬理学会年会シンポジウムにて発表)。この結果から, 活性酸素処理を施した固体, 或いは老齢個体においては, 活性酸素の作用により 1 型リアノジン受容体の S-ニトロシル化, ひいては平行線維シナプス LTP が阻害され, このことにより瞬膜反射条件付けの消去学習が阻害される可能性が考えられる。

S-ニトロシル化を介した機能分子の活性制御と機能的役割は, 現在, 様々な分子について解明が進みつつあり, 今後, 様々な分子の S-ニトロシル化阻害を介した機能阻害と老化への関与が明らかとなるであろう。そして将来的には, これらタンパク質の機能制御にかかわる S-ニトロシル化の阻害を特異的に抑制する薬

物が開発され, 活性酸素による S-ニトロシル化の阻害に起因する加齢に伴う生体機能の低下や病的老化の予防や治療へとつながることが期待される。

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, 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科神経形態学教室の森望先生, 柴崎晶彦先生, 大神和子技官, 及び京都大学薬学研究所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) 後藤佐多良. 新老年学(第 3 版). 東京大学出版. 2010. p. 3-21.
- 2) Bindoli A, et al. Antioxid Redox Signal. 2013;18:1557-1593.
- 3) Finkel T. J Cell Biol. 2011;194:7-15.
- 4) Kishida KT, et al. Antioxid Redox Signal. 2007;9:233-244.
- 5) Massaad CA, et al. Antioxid Redox Signal. 2011;14:2013-2054.
- 6) Kakizawa S, et al. Neurobiol Aging. 2012;33:535-545.
- 7) Ito M. Physiol Rev. 2001;81:1143-1195.
- 8) Thompson RF, et al. Annu Rev Neurosci. 1994;17:519-549.
- 9) Mauk MD. Neuron. 1997;18:343-346.
- 10) Jorntell H, et al. Neuron. 2006;52:227-238.
- 11) Kakegawa W, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:17846-17851.
- 12) Lev-Ram V, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:8389-8393.
- 13) Namiki S, et al. J Physiol. 2005;566:849-863.
- 14) Lev-Ram V, et al. Neuron. 1997;18:1025-1038.
- 15) Lev-Ram V, et al. Learn Mem. 1997;4:169-177.
- 16) Forrester MT, et al. J Biol Chem. 2007;282:13977-13983.
- 17) Kakizawa S, et al. EMBO J. 2012;31:417-428.