一分子からの定量的解析によるシナプス活性化機構の解明

芦高　恵美子

研究のねらい

痛みは、生体警告反応としての生理的機能を担う一方、がん末期の激痛や脊髄損傷に伴う神経因性疼痛などは、痛み自身が有害な病態をもたらす。我々は、同一前駆体タンパク質に隣り合わせに存在し、痛覚伝達において相反する作用を示す神経ペプチド、ノシセプチンとノシスタチンを見いだした。ノシセプチンは、オピオイド受容体類縁体の内因性リガンドで、オピオイドペプチドと相同性を有しているが、従来のオピオイドペプチドが鎮痛作用を示すのとは対照的に、触覚刺激などの非侵害性刺激による痛覚反応（アロディニア）や熱刺激による痛覚過敏反応を誘導することを明らかにしてきた。一方ノシスタチンは、同じ前駆体より切り出され、ノシセプチンによる痛覚反応を抑制するペプチドであることを発見した。同一前駆体に存在するペプチドが相反する作用を示すのは初めての報告である。また、疼痛制御のみならず記憶、学習や食欲の制御においてもこれらのペプチドの相反する作用が認められている。この制御機構としては、シナプスにおけるペプチドの産生、遊離および受容体との結合が重要な鍵を担っていると考えられる。本研究においては、ノシセプチンとノシスタチンの生物活性をモデルとしたシナプスの活性化機構の解明を目的とする。

研究成果

(1) ノシセプチンとノシスタチンの産生・遊離機構

(i) プロセッシングモニター系の確立

神経ペプチドは、前駆体タンパク質として合成され、その後プロセッシングや糖鎖付加等の翻訳後修飾を受け成熟ペプチドとなる。ペプチド産生機構である前駆体タンパク質からのプロセッシングは、これまで生化学的な解析や無細胞系における解析であった。本研究においては、プロセッシングを細胞外で定量的にモニターできる分泌型プローブによる一分子内 Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)システムを開発した。分泌型発光酵素（*Vargulla* luciferase）は、460 nmに発光スペクトルのピークを示し、蛍光タンパク質(EYFP)との融合タンパク質では、460 nm に加え 525 nm のピークを示し、この 525 nm のピークは YFP の蛍光スペクトルと一致していたことより、BRET が生じていることが確認できた。また、525 nm / 460 nm の比は、1.00 であり、従来型の BRET パートナーである *Renilla* luciferase とGFP が DeepBlueC を基質とした場合が、0.14 であるのに対し、BRET 効率において優れていた。さらに、(分泌型発光酵素)-(ノシスタチン-Lys(K)Arg(R)-ノシセプチン)-(EYFP)の融合タンパク質の遺伝子ベクターをデザインし、細胞に導入した。この融合タンパク質は、ノシスタチンとノシセプチンがプロセッシングされない場合は、発光酵

素の光はBRETにより、EYFPが励起され525nm の黄色光を発したが、プロセッシングされた場合、発光酵素自体の 460 nm の青色光を発した（図1）。

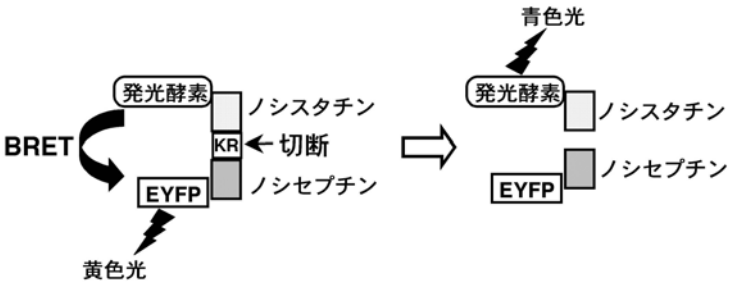

図1　ノシスタチンとノシセプチンのプロセッシングと BRET

しかも、分泌型発光酵素を用いたことで、分泌経路を介するタンパク質のプロセッシングの細胞外でのモニターが可能になり、かつ細胞を破壊することなく培地を連続的に分取し、発色光を指標にペプチドのプロセッシング過程のリアルタイムな追跡が可能となった。また、BRET の効率とプロセッシング量の変化は非常に相関していたことより、タンパク質プロセッシングの定量的モニターに適用できるものである[1)]（国内特許出願[特許出願番号 2002−360744]）。今後、BRET 測定による神経刺激に応答する神経ペプチド産生、遊離の定量化と細胞の膜電位や細胞内 Ca^{2}+動態との同時イメージングにより、二次元的なシナプスの活性化機構の解明が可能になると考えられる。

(ii) プロセッシング酵素の同定および分泌機構

確立したシステムを用い、ノシセプチンとノシスタチンの産生に関与するプロセッシングに、少なくともプロセッシング酵素の proprotein convertase (PC)1、PC2 および furin が関与していることを明らかにした。内因性に furin を発現している細胞に、PC1 および PC2 を発現させると、ノシセプチンはデンスコア小胞に認められた。一方、ノシスタチンは、PC2 発現細胞では、デンスコア小胞に存在するのに対し、PC1 発現細胞においては、未熟なデンスコア小胞かさらに微小な小胞に存在していることが認められた。ノシスタチンは、PC1 発現により恒常的分泌経路を、PC2 発現により調節的分泌経路を介して分泌された。また、炎症性の痛覚モデルマウスにおいて、脊髄後角において furin と PC2 が顕著に上昇する興味深い結果が得られた。このことは、プロセッシング酵素の誘導により、ノシスタチンの産生や分泌経路が異なり、ノシセプチンの痛覚発症が制御されている可能性が示唆された（論文発表準備中）。

(iii) ペプチドの遊離に関するシナプス活性化および痛覚発症機構

ノシセプチンは、用量、動物種、投与方法により疼痛と鎮痛の両方の作用が報告されてきた。そこで、新規ノシセプチン受容体拮抗薬 JTC-801 を用い、痛覚反応における受容体の関与を明らかにした。マウス脊髄腔内投与による低用量のノシセプチンによる痛覚過敏反応、アロディニア、炎症性疼痛モデルのホルマリン試験による痛覚反応は、JTC-801 によって抑制効果を示し受容体を介していたが、ノシセプチンの高濃度による鎮痛作用に対しては効果を示さなかった[2)]。また、L5 脊髄神経

損傷に伴う神経因性疼痛においても、JTC-801 は、神経型一酸化窒素合成酵素を介した一酸化窒素の産生抑制により鎮痛効果を示すことを明らかにした[3)]。JTC-801 は、ノシセプチンによる痛覚反応のみならずプロスタグランジン(PG)E_2 に対するアロディニアに対しても抑制効果を示した。さらに、ノシセプチン受容体欠損マウスにおいて、ノシセプチンおよび PGE_2 によるアロディニアが認められず、ノシスタチンも、ノシセプチンのみならず PGE_2 による痛覚反応に対して抑制効果を示すことより、ノシセプチンと PGE_2 の痛覚発症において共通の伝達経路や神経回路網の関与が示唆された。PG 産生阻害薬によって、ノシセプチンによるアロディニアは抑制されなかったことより、PGE_2 がノシセプチンの痛覚伝達経路の上流に位置することが考えられたので、PGE_2 のノシセプチンの遊離に対する効果を検討した。脊髄スライスにおいて、PGE_2 は、EP_4 受容体を介してノシセプチンの遊離を引き起こし、ノシセプチン前駆体タンパク質欠損マウスにおいて PGE_2 のアロディニアは消失した。以上の結果より、PGE_2 によるアロディニアは、EP_4 受容体を介したノシセプチンの遊離を介していることが示唆された（論文投稿中）。これまで、ノシセプチンによるアロディニアは、一次求心性線維の C 線維を介し、そのシナプス終末から遊離される興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体である NR2A サブタイプを含む NMDA 受容体の活性化や、抑制性神経伝達物質グリシンの脱抑制によって発症することを報告しているが、今回の結果を総合的に考えると脊髄後角におけるシナプス伝達機構が図2のように推定される。一方、ノシスタチンは、PGE_2 により遊離されないが、PGE_2 による痛覚反応に対して抑制効果を示すことより、グルタミン酸やノシセプチンの遊離調節により、痛覚制御がなされていることが考えられる。

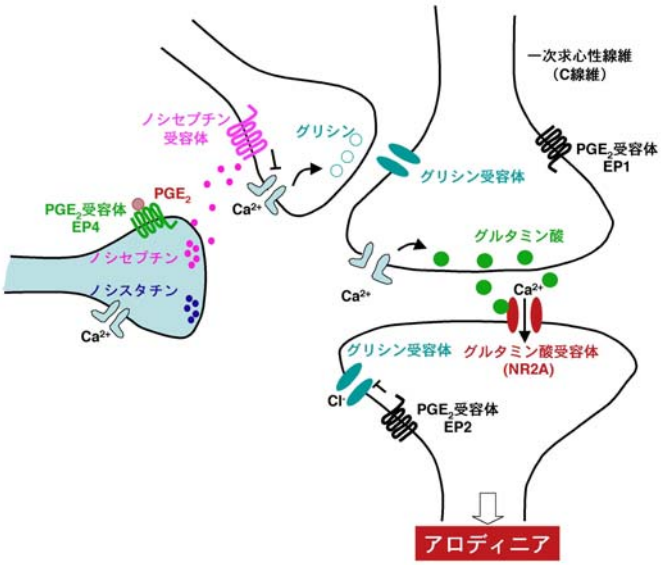

図2　脊髄後角におけるノシセプチンによるシナプス伝達機構

(2) ノシスタチン受容体

ノシセプチン受容体は、オピオイド受容体と相同性を示す7回膜貫通型 GTP 結合受容体であるが、ノシスタチンは、ノシセプチン受容体に結合せず、それ自身の受容体が示唆された。ノシスタチン受容体のクローニングをタンパク質精製からのアプローチを行うため、光アフィニティー修飾ノシスタチン誘導体

およびノシスタチン結合ビーズを用いた精製を行った。マウス脊髄膜画分において、光アフィニティー修飾ノシスタチン誘導体により約 33 kDa の結合タンパク質が認められた。このタンパク質は、細胞膜のラフト画分に存在し、GTPγS の処理により消失したことより、GTPase ファミリーの膜タンパク質の可能性が示唆された。さらに、ノシスタチン結合ビーズによっても分子量の異なるノシスタチン結合タンパク質が認められた。

これらのシナプス活性化機構の解明は、痛みをはじめとする脳神経系の営む高次神経活動を理解するうえで、必要不可欠な分子基盤であり、ノシスタチン受容体の解明とともに新しい鎮痛薬の創薬の開発の手がかりとなると考えられる。

今後の展開

本研究において、新規の BRET パートナーの構築、生きたままの細胞におけるタンパク質のプロセシングのモニター系が確立でき、ノシスタチンとノシセプチンの産生に関与するプロセッシング酵素を同定し、プロセッシング酵素の差異により産生や分泌経路が異なること、また PGE_2 によるアロディニアが、ノシセプチンの遊離を介しており、ノシスタチンによってその痛覚反応が抑制される痛覚伝達経路を明らかにすることができた。しかしながら、当初の目標としていた BRET システムを用いた細胞内および個体レベルでの可視化は検出系の感度の問題点が解決できておらず、未だ詳細な解析に至っていない。ノシスタチン受容体に関しては、ノシスタチンを発見してからの最大の研究課題であり、分子生物学手法、電気生理学的手法等いくつものクローニングを行ってきたが成功に至らなかったもので、本研究においてその手がかりとなる分子を精製できたことから、今後その分子の生理的機能の解明とともに、ノシスタチンとノシセプチンの痛覚制御機構への関与を明らかにしようと考えている。

研究成果リスト

（1）原著論文

1. Muratani, T., Minami, T., Enomoto, U., Sakai, M., Okuda-Ashitaka, E., Kiyokane, K., Mori, H. and Ito, S.: Characterization of nociceptin / orphanin FQ-induced pain responses by the novel receptor antagonist JTC-801. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: 424-430, 2002
2. Mabuchi,T., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Kitano, T., Kojima, H., Nagano, T., Minami, T. and Ito, S.: Attenuation of neuropathic pain by nociceptin/orphanin FQ antagonist is mediated by inhibition of nitric oxide production. *Eur. J. Neurosci.*. 17: 1384-1392, 2003
3. Otsuji, T., Okuda-Ashitaka, E., Kojima, S., Akiyama, H., Ito, S. and Ohmiya, Y.: Monitoring for dynamic biological processing by intra-molecular bioluminescence resonance energy transfer system using secreted luciferase. *Anal. Biochem.* 329: 230-237, 2004

（2）特許出願

研究期間累積件数：1 件

芦高恵美子、近江谷克裕、伊藤誠二：「発明の名称：蛋白質のプロセッシングを測定するためのモニター蛋白質」（特願 2002-360744。出願日：2002/12/12）

（3）その他の成果

著書・総説

4. 芦高恵美子、伊藤誠二： ノシセプチン。 痛み-基礎・診断・治療- (編集：花岡一雄、朝倉書店) 37-40, 2003
5. Zeilhofer, H. U., Reinscheid, R. K. and Okuda-Ashitaka, E.： Nociceptin, Nocistatin and Pain. Progress in Pain Research and Management. International Association for the Study of Pain, IASP press, 24: 469-480, 2003
6. 芦高恵美子、伊藤誠二： 痛みシグナルの制御機構と最新治療エビデンス、ノシセプチンの疼痛制御。 医学のあゆみ 211: 375-379, 2004

招待講演

7. Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., and Ito, S.: Molecular approaches to nocistatin signaling. The 10th World Congress on Pain (2002, San Diego, USA)
8. Okuda-Ashitaka, E., Otuji, T., Ito, S., and Ohmiya, Y.: A novel intra-molecular bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for dynamic biological processing. The 31th Annual meeting of the American Society of Photobiology (2003, Baltimore, USA)
9. 芦高恵美子、尾辻智美、近江谷克裕、伊藤誠二： A novel intra-molecular bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for monitoring the processing of prepronociceptin/orphanin FQ. 第 76 回日本生化学会大会（2003、横浜）
10. 芦高恵美子、尾辻智美、近江谷克裕、伊藤誠二： 新規一分子内 BRET を用いたノシセプチン/オーファニン FQ 前駆体のプロセッシング機構の解析。 第 81 回日本生理学会大会（2004、札幌）
11. 芦高恵美子： Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) とは？ 第 81 回日本生理学会大会（2004、札幌）
12. 芦高恵美子： BRETシステムの特徴と分泌型BRETシステムの可能性。 第77回日本生化学会大会（2003、横浜）

学会発表

13. Okuda-Ashitaka, E., Otuji, T., Ohymiya, Y. and Ito, S：Processing mechanism of prepronociceptin/orphanin FQ. The 33th Annual meeting of Society for Neuroscience (2003, New Orleans, USA)
14. 芦高恵美子、尾辻智美、近江谷克裕、伊藤誠二： ノシセプチン/オーファニン FQ 前駆体のプロセッシング機構。 第 26 回日本神経科学大会 (2003、名古屋)