

学位論文の内容の要旨

(学位論文のタイトル)

Acidic pH increases cGMP accumulation through the OGR1/phospholipase C/ Ca^{2+} /neuronal NOS pathway in N1E-115 neuronal cells

(N1E-115神経細胞において、酸性pHはOGR1/ホスホリパーゼC/カルシウム/nNOS経路を経てcGMPを産生する)

(学位論文の要旨)

1. 研究の背景と目的

細胞外酸性pHは、アルツハイマー病、パーキンソン病といった神経変性疾患や虚血で起こることが知られている。Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1(OGR1)ファミリーは細胞外プロトン (pH 7.6～6.0) を感知し、種々の細胞内情報伝達系を活性化するプロトン感知性のG蛋白共役型受容体 (GPCR) である。OGR1ファミリーには、OGR1、GPR4、G2A、TDAG8が知られている。nNOS (神経型NO合成酵素)/NO(一酸化窒素)を介したcGMP産生経路の役割は、神経細胞において広く調べられている。nNOSを介した中等度のNO産生は、神経細胞生存、神経伸長、神経グルコースの恒常性、記憶などを引き起こすことが報告されている。今回、私達は、神経細胞や関連した細胞株 (N1E-115細胞) において細胞外pHの弱酸性化がcGMP産生を促進することを見出した。本研究では弱酸性によって促進されるcGMP産生のシグナル伝達系とプロトン感知性GPCRの役割について解析した。

2. 実験方法

OGR1ファミリー受容体mRNAはRT-qPCR法で測定した。培養神経細胞としてN1E-115神経細胞(マウス神経芽腫由来の細胞株)を使用した。プロトン感知性GPCR特異的small interfering RNA (siRNA)をN1E-115細胞に導入し、細胞外pHを変化させた時の細胞内カルシウム動員、cGMP産生、イノシトールリン酸産生、AktやnNOSのリン酸化を測定した。これらのシグナル伝達経路について特異的阻害剤(nNOS特異的阻害剤、YM-254890、2-APB, ワルトマニン)を用いて解析した。細胞内カルシウム測定はfura-2ラベルした細胞を用いた。cGMPはcGMP EIA kitを用いて測定した。イノシトールリン酸の産生は ^3H イノシトールで標識した細胞からの ^3H イノシトール 1-リン酸の産生で評価した。AktやnNOSのリン酸化はウェスタンブロッティングを行って評価した。

3. 結果

- (1) N1E-115細胞において細胞外pHを低下するとcGMP産生が増加した。N1E-115細胞ではnNOSが主要なNOSのサブタイプであり、酸性pHによるcGMP産生作用はnNOS特異的阻害薬によって阻害された。
- (2) 細胞外酸性pHはnNOSの活性化に重要な調節メカニズムであることが知られているホスホリパーゼC/カ

ルシウム動員ならびにAktによるnNOS-S1412のリン酸化を亢進した。

(3) N1E-115細胞のみならず他の神経細胞においても発現が観察されたOGR1の関与を調べるためOGR1-siRNAによる受容体のノックダウン法、また、 $G_{q/11}$ タンパク質の関与を知るためにYM254890($G_{q/11}$ 特異的阻害薬)を用いた。これらの薬剤は細胞外酸性pHによるcGMP産生、カルシウム濃度上昇、ホスホリパーゼC活性化のいずれも抑制したが、Akt/nNOSのリン酸化には影響しなかった。

(4) 2-aminoethoxydiphenyl borate(2-APB, イノシトール1, 4, 5-三リン酸チャンネル阻害薬)は酸性pHによるcGMP産生とカルシウム濃度上昇を抑制した。一方、Aktの上流の調節因子であるホスファチジルイノシトール 3-キナーゼの阻害薬であるワルトマニンは酸性pHによるAkt/nNOSリン酸化を阻害したが、酸性pHによるcGMP産生を阻害しなかった。

4. 考察

nNOSの活性化には少なくとも2つの経路が知られている。すなわち、カルシウム濃度上昇がカルモジュリンを経て直接nNOSを活性化する経路とAktによってnNOSをリン酸化する経路である。N1E-115神経細胞においては、カルシウム濃度上昇もAktによるnNOS-S1412のリン酸化も細胞外酸性pHによって引き起こされる。しかし、cGMP産生、ホスホリパーゼC活性化、カルシウム濃度上昇の応答はsi-OGR1, YM254890, 2-APBによって阻害された。したがって、cGMP産生はOGR1/ $G_{q/11}$ /ホスホリパーゼC/イノシトール三リン酸/カルシウム動員という経路を介していると考えられた。すなわち、カルシウム濃度上昇が、カルシウム/カルモジュリンを介してnNOSを直接的活性化し、NO産生を介してcGMP産生を活性化することを示唆している。一方、AktによるnNOS S1412のリン酸化はcGMP産生にはほとんど寄与していないと思われる。まず、ワルトマニンは酸性pHによるAkt S473とnNOS-S1412のリン酸化を阻害したが、cGMP産生を抑制しない。また、酸性pHによるAktのリン酸化はsi-OGR1とYM254890で抑制されない。このことはAktのリン酸化がOGR1/ $G_{q/11}$ 以外のプロトン感知性メカニズムを介していることを示している。N1E-115細胞ではOGR1に加えGPR4の発現している(data not shown)。酸性pHによるAktのリン酸化経路のメカニズムは今後の課題である。

nNOS/cGMP系は細胞生存、ニューロン新生、学習、記憶を含む神経細胞の活動に関わっていることが報告されている。また細胞外弱酸性pHは、神経伝達物質放出や神経保護を含む神経細胞活動を調節することが示されている。従って、酸性pHによるcGMP産生が有益な神経活動を引き起こす可能性が示唆される。

5. 結論

N1E-115神経細胞において、細胞外酸性pHはOGR1/ $G_{q/11}$ /ホスホリパーゼC/カルシウム/nNOSを経てcGMPを産生する。しかし、AktによるnNOSのリン酸化は、細胞外酸性pHによるcGMP産生にはほとんど寄与していない。酸性pHによるnNOS/cGMP系の役割は今後の課題である。