

47

助成番号 0147

## Na<sup>+</sup>ポンプ阻害剤、ウアバインは強力な概日リズム制御薬である： その分子機構の解析

助成研究者 森山 芳則(岡山大学 薬学部総合薬学科)

協同研究者 坪井 誠二、大塚 正人(同上)

竹居 孝二、山田 浩司(岡山大学 医学部)

Yoshinori Moriyama, Ph. D.<sup>1)</sup>, Seiji Tsuboi, Ph. D.<sup>1)</sup>, Masato Otsuka, Ph. D.<sup>1)</sup>,  
Koji Takei, Ph. D.<sup>2)</sup>, and Hiroshi Yamada, Ph. D.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Dept. Biochem. Fac. Pharm. Sci., and <sup>2)</sup> Dept. Neurosci. Graduate School of  
Medicine and Dentistry, Okayama University

概日リズムとは約24時間の生体リズムであり、松果体ホルモンであるメラトニンによって制御されている。すなわち、夜間にメラトニンが合成され体内を循環する一方、日中はメラトニン合成が停止する。体内のメラトニン量の増減により、細胞は時間情報を知ると考えられる。概日リズムは、睡眠やホルモン分泌など我々の体の恒常性の維持を司っている。リズムの変調は時差ボケのみならず、様々な精神疾患の原因ともなることが指摘されており、概日リズムの形成の維持機構に関する研究が重要になっている。

メラトニンの合成制御に最も重要な酵素はserotonin N-acetyltransferase (NAT)である。我々はNAT活性の制御系を探索するなかで、2つの興味深い現象を見出した。すなわち、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの特異的阻害剤であるウアバインが極低濃度(50 nM)で強くメラトニン合成を低下させること、ならびにNAT活性が細胞のredox状態により影響を受けるということである。本報告において、その阻害の分子機構について述べる。新規のNATの制御機構の存在が浮かび上がってきた。



助成番号 0147

Na<sup>+</sup>ポンプ阻害剤、ウアバインは強力な概日リズム制御薬である：

その分子機構の解析

助成研究者 森山 芳則 (岡山大学薬学部総合薬学科)

協同研究者 坪井 誠二、大塚 正人 (同上)

竹居 孝二、山田 浩司 (岡山大学医学部)

## はじめに

約24時間の周期を持つ生物リズムはサーカディアンリズム(概日リズム)とも呼ばれ、動物はもとより植物や単細胞生物に至るまで広く見られる現象である。哺乳類の場合、概日リズムの中樞は「視交叉上核」と呼ばれる神経細胞集団にあり、この活動シグナルが交感神経を通じて松果体に伝えられる。松果体はこのシグナルをメラトニンという液性情報に変えて血中に放出する内分泌器官である<sup>1,2)</sup>。放出されたメラトニンは受容体を介して時間情報を細胞に伝達する。従って、松果体は時間情報の変換器とも考えられ、メラトニンの合成・分泌機構を明らかにすることは概日リズムを理解するために極めて重要な課題である。

松果体においてメラトニンは、トリプトファンを前駆物質として合成され、律速酵素は serotonin N-acetyltransferase (NAT) である。概日リズムを維持するために NAT は極めて厳密に制御されている<sup>3,4)</sup>。これまでに少なくとも3種類の調節機構が知られている。第1はβ受容体を介した転写制御による活性促進である。すなわち、夜間に神経末端より放出されたノルアドレナリンが松果体細胞上のβ受容体に結合し、Gsタンパク質を介して細胞内のcAMP濃度を上昇させる。その結果、Aキナーゼが活性化され、転写因子 CREB を活性化する。そして、NAT mRNAが増加し、酵素活性が上昇する<sup>5,6)</sup>。明け方には交感神経からのノルアドレナリン入力なくなり、NAT活性もなくなる。第2は、これに対し、松果体はグルタミン酸を用いて、NAT mRNAを低下させる抑制機構が内在する<sup>7)</sup>。第3はタンパク質レベルでの制御である。NATは通常プロテアソームにおいて分解されるが、cAMP上昇時にはこの分解から保護されている。これは、シャペロンタンパク質である14-3-3タンパク質が、cAMPを介して活性化されたAキナーゼによりリン酸化されたNATと複合体を形成し、NATタンパク質を安定化するためである<sup>8,9)</sup>。しかしながら、ノルアドレナリン入力とNAT mRNAの変動リズムは必ずしも一致しておらず、ノルアドレナリン入力のON/OFFだけでメラトニンの合成リズムを説明するのはむづかしい。

我々は NAT の複雑な制御系を研究する上で現在2つのアプローチをとっている。すな

わち、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の阻害剤であるウアバインがメラトニン合成の強力な阻害剤であることをみいだした。その阻害の作用機構の解明を通じて新しい NAT 制御系を見出すこと、もう一つは、以前より NAT は N-ethylmaleimide (NEM) のような SH 基修飾試薬によって活性が阻害される事が知られている<sup>10)</sup>。この阻害作用機構を分子レベルで解明する方向である。我々は (1) ウアバインが NAT 活性を阻害すること、(2) NAT のシステイン残基の  $-\text{SH}/\text{S}-\text{S}-$  結合の変換により活性が調節されていること、(3) この変換にはグルタチオンが関与していることを見出した。本文で、この新しい活性調節機構について簡単に述べたい。

## 1. ウアバインによるメラトニン合成阻害

ラット器官培養松果体において、ノルアドレナリンにより亢進したメラトニン分泌は  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の阻害剤であるウアバイン (500 nM) の添加により強く阻害された。この時 NAT 活性も同様に強く阻害された。NAT mRNA 及び NAT タンパク質の発現量へのウアバインの影響を検討したところ、両者とも変動は見られなかった。またウアバインによる NAT 活性阻害はプロテアソームの阻害剤では影響を受けなかった。NAT と複合体を形成していることが知られている 14-3-3 タンパク質の mRNA の発現量へのウアバインの影響を調べたところ、 $\epsilon$  サブユニットが上昇、 $\delta$  サブユニットが減少することが明らかとなった。これらの結果より、14-3-3 タンパク質の発現量の変化がウアバインによる NAT 活性の阻害に関与することが示唆された。これは cAMP を介さない未知のタンパク質レベルでの NAT 活性の制御機構である。この結果については、現在、論文を作成中であるので詳細は省かせていただいた。

## 2. NAT のレドックス制御機構

### 2-1 $-\text{SH}/\text{S}-\text{S}-$ 結合の変換による NAT 活性調節

本実験では大腸菌に発現させた GST-NAT を使用した。酸化型グルタチオン (GSSG) の添加、また溶存酸素により NAT を酸化 (5 時間透析をおこなった) した場合、活性は消失したが、ジチオスレイトール (DTT) または還元型グルタチオン (GSH) で処理することにより活性はもとのレベルまで回復した。還元型 NAT (酸化処理をしていないもの) を NEM で処理すると失活し、DTT 及び GSH で処理しても失活したままであった。しかし、酸化及び GSSG で処理した NAT は、NEM の添加後 DTT 及び GSH の処理により活性はもとのレベルまで回復した。更に、Acetyl CoA で NAT を前処理した場合 NEM による活性阻害は見られなかった。

これらの結果より、NAT には活性発現に必要なシステイン残基が Acetyl CoA 結合部位近傍に存在すること、また、このシステイン残基の  $-\text{SH}/\text{S}-\text{S}-$  結合の変換により活性が調節されていることが明らかとなった。

### 2-2 活性に必要なシステイン残基の同定

NAT には種間に保存されている 5 つのシステイン残基 (37, 61, 75, 158,

177番目)が存在する。それではどのシステイン残基が活性発現に重要なのであろうか。Acetyl CoAの前処理によりNEMによる活性阻害が抑制されることから、 $^{14}\text{C}$ -NEMを用いてAcetyl CoA存在下、及び非存在下における $^{14}\text{C}$ -NEMの取り込みを比較した結果、61及び177番目のシステインが活性に重要であることを見出した。このことはC61A(61番目のシステインをアラニンに変えたもの)及びC177A(177番目のシステインをアラニンに変えたもの)、またC61A/C177A(61番目及び177番目のシステインをアラニンに変えたもの)のdouble mutantがNEMの処理により失活しなかったことから示唆された。

### 2-3 分子内ジスルフィド結合の同定

さて、61番目と177番目のシステイン残基の間で実際に-SH/-S-S-結合の変換は行われているのだろうか。そこで分子内-S-S-結合の同定を行った。まず、NATをAcetyl CoAで処理することによりCys 61及びCys 177を保護し、活性に関係のないシステインをNEMで修飾した。その後DTT存在下または非存在下5時間透析を行い、各々還元型または酸化型を調製した。V<sub>8</sub> protease消化後、それぞれ酸化型または還元型だけに見られるフラグメントをHPLCにより単離・精製した。酸化型から得られたフラグメントをDTTにより還元処理すると2本のフラグメントが得られ、各々還元型から得られたフラグメントと一致した。この2本のフラグメントのアミノ酸配列を調べた結果、Cys 61及びCys 177が含まれていた。

これらの結果より、NATには還元型(-SH, 活性型)と酸化型(-S-S-, 不活性型)が存在し、これはCys 61とCys 177の間で-SH/-S-S-結合の変換によって引き起こされていることが明らかとなった。

### 2-4 グルタチオンによるNATのレドックス制御

三次元構造からNATは7つの $\beta$ -sheet及び5つの $\alpha$ -helixを持つ球状タンパク質であり、3つのポリペプチド鎖(Loop 1, 2, 3)がAcetyl CoA結合部位の上であり漏斗状の形をとっている。Cys 61及びCys 177はそれぞれLoop 1及びLoop 3に存在する<sup>11,12</sup>。今回の結果より、この2つのシステイン間の-S-S-結合の形成がAcetyl CoAの結合を阻害することにより、NATを失活させている事が明らかとなった。更にこの分子内-SH/-S-S-結合の変換は、細胞内に最も高濃度に存在する低分子チオールであるグルタチオンによって引き起こされることが示唆された。

以上の結果から、NATの分子内-SH/-S-S-結合の相互変換を介する新しい活性調節機構、すなわちグルタチオンによるNATのレドックス制御機構が明らかとなってきた。細胞中のGSH/GSSG比は、種々の酸化的ストレス、糖尿病をはじめとする様々な病態に於いて変動することが知られており<sup>13,14</sup>、このことが-SH/-S-S-結合の変換、更にはNAT活性の調節に影響を及ぼしていることは十分に可能性がある。今回我々が見出した制御機構は、全く新しい蛋白質レベルでのNATの制御機構であり、概日リズムを理解する上で

新しい展開が期待できるものと確信するものである。

#### おわりに

ソルトサイエンス研究助成金により、当該研究を進めることができた。現在はこの成果を基にして、NATの新規の活性制御の全貌が続々と明らかになりつつある。また、メラトニン量を調節する新しい薬剤も得ることができた。現在、種々の理由でデータを公開できないのが残念である。貴財団に感謝いたします。2.に関する研究成果は最近公表した<sup>15)</sup>。

#### 文献

- 1) Foulkes, N.S., Borjigin, J., Snyder, S.H. & Sassone-Corsi, P. (1997) *Trends Neurosci.*, **20**, 487-492.
- 2) Klein, D.C., Coon, S.L., Roseboom, P.H., Weller, J.L., Bernard, M., Gastel, J.A., Zatz, M., Iuvone, P.M., Rodriguez, I.R., Begay, V., Falcon, J., Cahill, G.M., Cassone, V.M. & Baler, R. (1997) *Recent. Prog. Horm. Res.*, **52**, 307-358.
- 3) Coon, S.L., Roseboom, P.H., Baler, R., Weller, J.L., Namboodiri, M.A.A., Koonin E.V. & Klein, D.C. (1995) *Science*, **270**, 1681-1683.
- 4) Roseboom, P.H. & Klein, D.C. (1995) *Mol. Pharmacol.*, **47**, 439-449.
- 5) Yamada, H., Yatsushiro, S., Ishio, S., Hayashi, M., Nishi, T., Yamamoto, A., Yamaguchi, A. & Moriyama, Y. (1998) *J. Neurosci.*, **18**, 2056-2062.
- 6) Yamada, H., Ogawa, A., Koizumi, S., Yamaguchi, A. & Moriyama, Y. (1998) *J. Neurosci.*, **18**, 4946-4952.
- 7) Moriyama, Y., Hayashi, M., Yamada, H., Yatsushiro, S., Ishio, S. & Yamamoto, A. (2000) *J. Exp. Biol.*, **203**, 117-125.
- 8) Gastel, J.A., Roseboom, P.H., Rinaldi, P.A., Weller, J.L. & Klein, D.C. (1998) *Science*, **279**, 1358-1360.
- 9) Ganguly, S., Gastel, J.A., Weller, J.L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M.A.A., Coon, S.L., Hickman, A.B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Bontin, J.A. & Klein, D.C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 8083-8088.
- 10) Namboodiri, M.A.A., Weller, J.L. & Klein, D.C. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 6032-6035.
- 11) Hickman, A.B., Klein, D.C. & Dyda, F. (1999) *Mol. Cell.*, **3**, 23-32.
- 12) Hickman, A.B., Namboodiri, M.A., Klein, D.C. & Dyda, F. (1999) *Cell*, **97**, 361-369.
- 13) Kurokawa, T., Kobayashi, H., Nonami, T., Harada, A., Nakao, A. & Takagi, H. (1996) *J. Surg. Res.*, **66**, 1-5.
- 14) Sushil, K.J. & Robert, McV. (1999) *Diabetes*, **48**, 1850-1855.
- 15) Tsuboi, S., Kotani, Y., Ogawa, K., Hatanaka, T., Yatsushiro, S., Otsuka, M., Moriyama, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, in press.

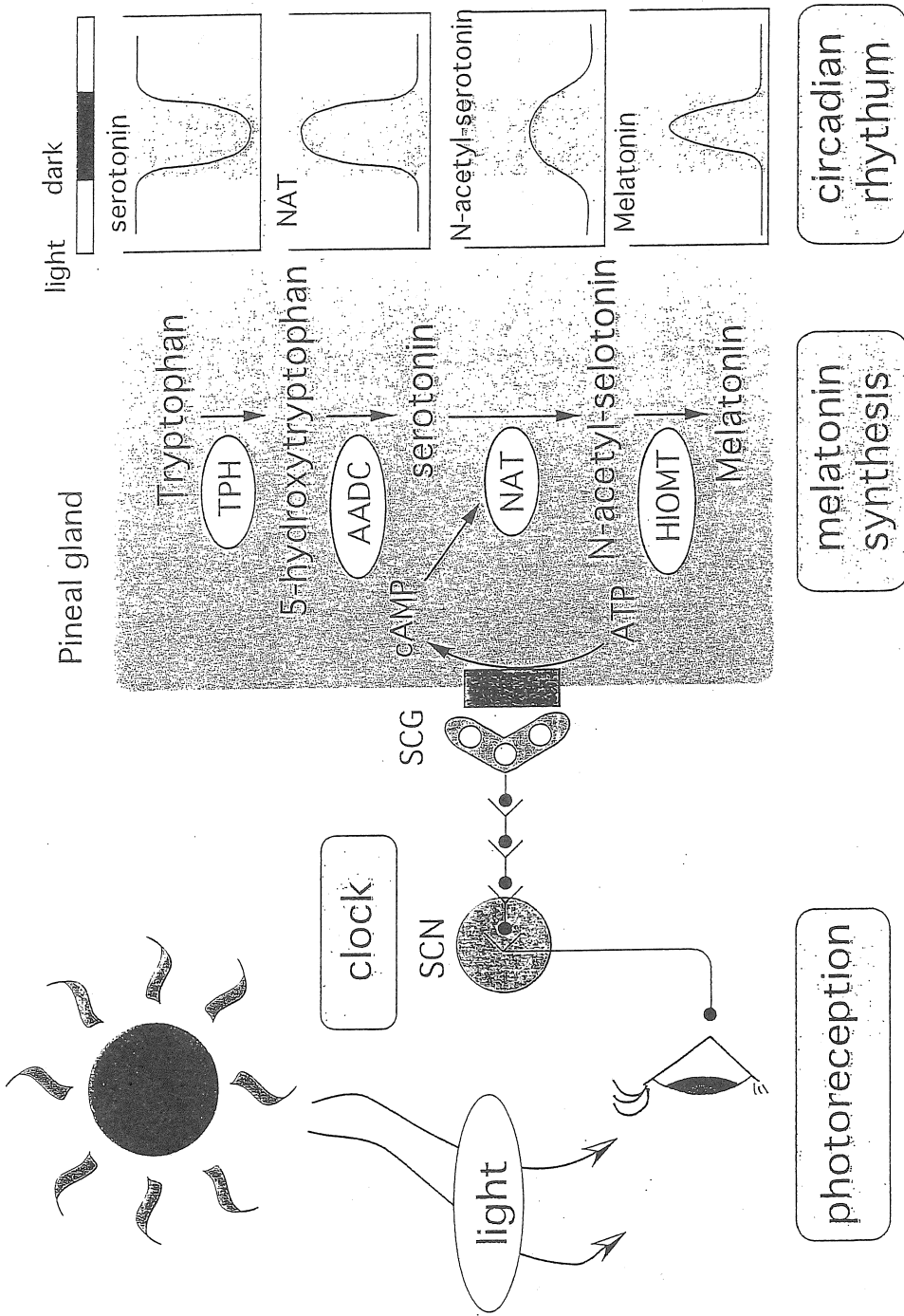
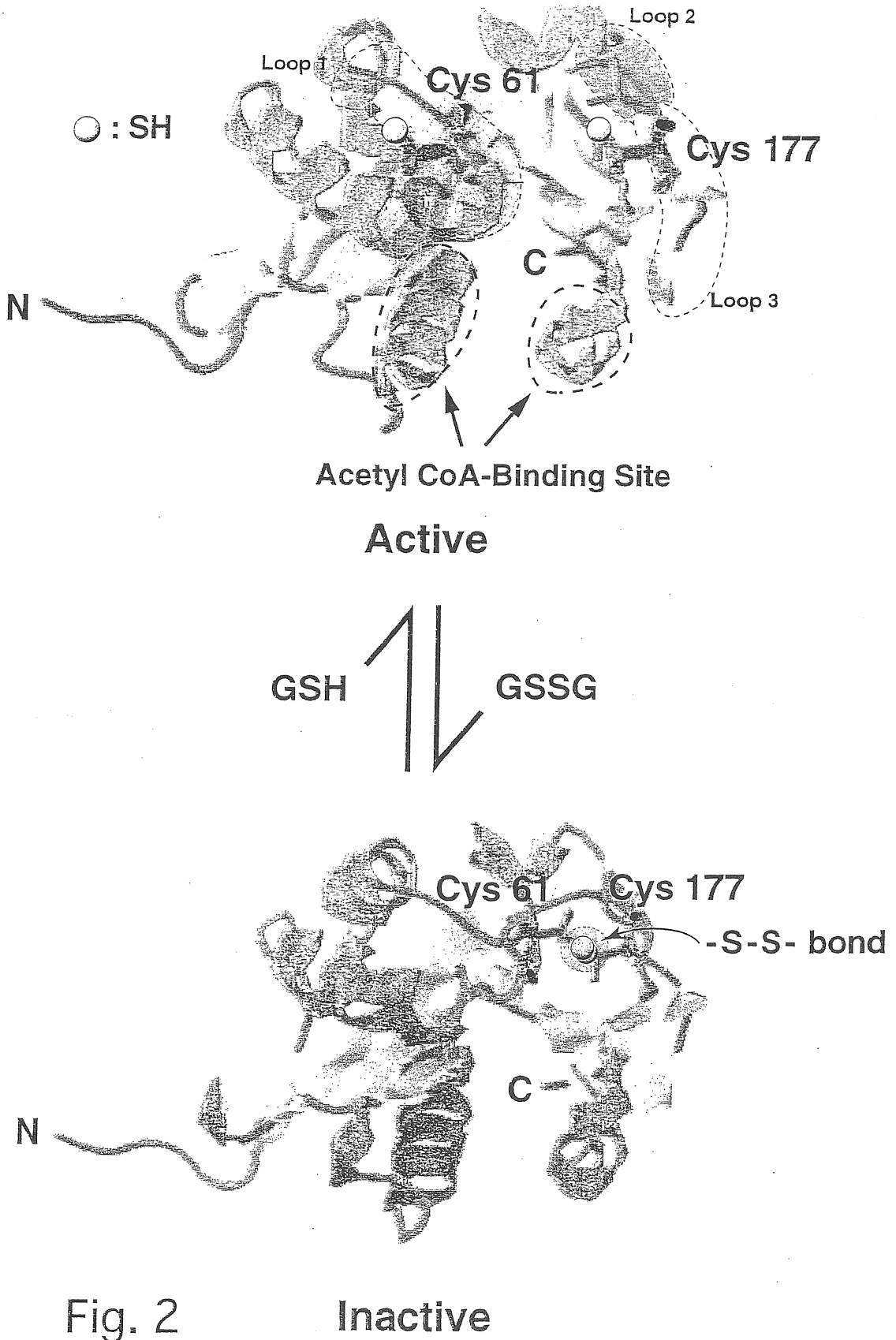


Fig.1 Melatonin synthesis

AADC;aromatic-L-aminoacid decarboxylase HIOMT;hydroxyindole-O-methyltransferase  
 NAT;serotonin N-acetyltransferase SCG;suprachiasmatic nucleus TPH;tryptophan hydroxylase





The molecular mechanism of ouabain-evoked inhibition of synthesis of melatonin, a biological rhythm-producing hormone, in mammalian pineal glands.

Yoshinori Moriyama, Ph. D.<sup>1)</sup>, Seiji Tsuboi, Ph. D.<sup>1)</sup>, Masato Otsuka, Ph. D.<sup>1)</sup>, Koji Takei, Ph. D.<sup>2)</sup>, and Hiroshi Yamada, Ph. D.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Dept. Biochem. Fac. Pharm. Sci., and <sup>2)</sup> Dept. Neurosci. Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama University

### Summary

The mammalian pineal gland is a photoneuroendocrine transducer that rhythmically synthesizes and secrete melatonin at night in response to photoperiodic stimuli from endogenous circadian oscillators. In the rat, this process is positively regulated through sympathetic neurons projecting into the gland: norepinephrine secreted from nerve ending stimulates serotonin-N-acetyltransferase (NAT), a key enzyme for melatonin synthesis, resulting in the increased melatonin output. We have found that very low concentration of ouabain (50 nM), a specific inhibitor for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, strongly inhibits the NE-evoked melatonin synthesis. In the present study, we investigated the molecular mechanism of ouabain-evoked inhibition. At first, we have observed that degrees of ouabain-evoked inhibition of NAT and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase are correlated to each other. Upon treatment of 50 nM ouabain, the NAT activity is strongly inhibited without affecting the level of mRNA of NAT gene, and of NAT protein. Thus, ouabain may inhibit NAT through posttranslational modification of the enzyme. It is possible that perturbation of membrane potential inhibits the expression of one tupe of 14-3-3 protein, resulting in inhibition of NAT through decreased its binding. Durinf the study, we have also noticed that NAT is controlled under redox switch. Amino acid residues involving in the redox switch and changes of 3D structures of NAT during conversion from active and inactive state will be presented.