

【総 説】

一酸化窒素 (NO) による生理機能調節とその破綻

松本 明郎

千葉大学大学院・医学研究院・薬理学

要約

一酸化窒素 (NO) が血管内皮由来弛緩因子 (EDRF) として作用していることが報告されて以来、NO の中枢や末梢組織における生理作用や、発生から老化に至る時間軸に沿った役割が明らかにされ、NO は生理的に必須のガス状分子である事が確認された。NO は cGMP やタンパク質のニトロシル化反応を介して生理活性を示すが、NO 産生の低下や無秩序な NO の作用は病態形成へつながることも知られている。各種病態や老化への NO の関与が明らかにされるにつれ、NO を臨床現場で治療や検査に用いる試みが進められる様になっている。本稿では、NO の様々な作用機序を生物化学的にも紹介し、生理的恒常性の維持に関わる NO と病態・治療への関わりについて紹介する。

キーワード：Nitric oxide (NO), Reactive oxygen species (ROS), cGMP, S-nitrosylation, NO synthase (NOS)

1. はじめに

地上に上がった生命体は、酸素呼吸を行なうことにより効率的な生体エネルギーの産生が可能となり、活発な生命活動を営む様になった。ATP 産生を担うミトコンドリアは、必要量を充足するのに十分な酸素供給が常に受けられることを前提として機能しているため、ごく短時間でも酸素供給が遮断されることは、生命機能を直接脅かすことになる。一方、ミトコンドリア電子伝達系における ATP 産生のための電子利用率は 100% ではなく、一部が電子伝達系路外へ漏出し酸素と反応し、活性酸素種 (ROS) の代表格であるスーパーオキシド (O_2^-) を生成してしまう [1]。こうして酸素毒という概念が生まれ、種々の疾患や老化における活性酸素種の障害性に関する研究が進められるとともに、ROS 消去系の解明が進められていった。このような中、ROS と同様に高い反応性を有する一酸化窒素 (NO) が生体内において恒常的に産生され、サイクリック GMP (cGMP) 濃度を変化させる事により様々な機能変化 (たとえば血管弛緩反応) を引き起こす事が発見された [2-4]。後にノーベル医学・生理学賞 (1998 年) が授与された NO の生理作用に関する研究は、生体におけるガス状分子の役割についての研究に大きな道筋を開いたといえる。すなわち、

生体内で産生される二酸化炭素・アンモニアなどをはじめとしたガス状分子 (注：定常状態において気体として存在する) は、生体内から排除されなければならない物質として認識されてきたが、NO は生理的恒常性の維持に必須な分子であることが明らかにされたことは画期的であった。その後の研究から、NO のみならず一酸化炭素 (CO) [5] や硫化水素 (H_2S) [6] も生体内で産生され生理的な機能を発揮するために用いられている事が明らかにされ [7]、ガス生物学 (Gas Biology) 分野の幕が上げられた。さらにその後、分子状水素 (H_2) の治療的効果・機序 [8,9] について次第に明らかにされるなど、現在も新たな分子の参画が続いている分野である。NO 研究から得られた知見は、他のガス状分子の機能解析に演繹され、NO との相違を検討する事から新たな反応性・作用機序などが明らかされるなど、NO はガス状分子の生理機能を検討する上でプロトタイプ (模範分子) としての役割を有している [10]。

2. 生体における NO の産生

NO は周期律表の隣り合った元素である窒素と酸素が共有結合した分子であるため、必然的に最外殻の電子軌道に不対電子が生じる。この不対電子が NO の高い反応性の原因となっているが、同時に NO は不安定であり扱い難い原因でもある。大気中においても高温環境 (1600 °C 以上、たとえば雷放電) においては、大気中の窒素と酸素の反応によって NO が生成されるが、主な発生源は化石燃料の燃焼に伴うものである。しかし、大気中では酸素と反応し亜硝酸 (NO_2) や硝酸 (NO_3) などのい

連絡先：松本明郎 〒260-8670

千葉市中央区亥鼻 1-8-1

Tel: 043-226-2051

E-mail: akio@faculty.chiba-u.jp

わゆる NO_x に変換され、生理的な有用性を失う。そのため生体における NO の作用は、体内で産生された NO により生じるものと考えられている (図 1)。

一酸化窒素	NO	
ニトロシル化	X-NO	Cysteine-S:NO
ニトロ化	X-NO ₂	Tyrosine-C:NO ₂
ニトロソアミン	アミノ酸-N:NO ₂	
窒素酸化物	NO _x (NO ₂ , NO ₃ , N ₂ O, etc.)	

図 1 一酸化窒素 (NO) に関する用語

一酸化窒素はアミノ酸と反応し様々な修飾を生じる。ニトロシル化は恒常的な NO 産生により形成され生理的な機能発現に関わるが、高濃度の NO により形成されるニトロ化修飾やニトロソアミンの形成は病的な意義が強い。ニトロシル化はシステインチオール基 (SH) に NO が配位する S-ニトロシル化反応の他に遷移金属に対して NO が配位するものもある。

生体内での NO 産生は NO 合成酵素 (NOS) による L-アルギニンから L-シトルリンへの変換反応の副産物として生じる。NOS には 3 種類あり、主な発現部位やカルシウム依存性により神経型 (nNOS)、誘導型 (iNOS)、内皮型 (eNOS) の 3 種類に分類される (図 2)。nNOS と eNOS は恒常的に発現しており、生理的な作用を生じる NO の発生源となっていると考えられている一方、iNOS はマクロファージなどの貪食細胞が殺菌能を示す際に必要となる大量の NO を産生するために必要とされる。このように生体内においては、NOS から産生された NO が隣接した部位において作用を示すことが基本的な作用機序として考えられている。

NO 産生量は、NOS のアイソフォームごとに異なった因子により制御されている。例えば恒常的に発現が認められる eNOS や nNOS は細胞内カルシウム濃度に反

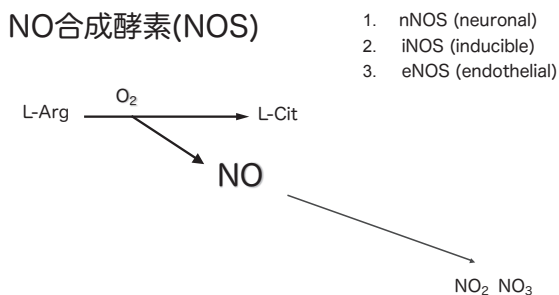


図 2 生体内での NO 合成

生体には NO 合成酵素 (NOS) が 3 種類存在し、いずれもアルギニンをシトルリンへ変換する過程で NO を産生する。産生された NO は酸化を受け、亜硝酸・硝酸へと変化するものが多い。

応して活性化される。そのため、eNOS は血管壁に対するずり応力の変化に反応して NO 産生量を増大させることが知られている。そのため軽度の運動などを行ない血流量が増加するとずり応力が増大し、血管内皮細胞からの NO 産生が増大する。また、内皮細胞表面に存在する HDL 受容体やエストロゲン受容体に対する刺激は、PI3K-Akt 経路を活性化し eNOS タンパク質のリン酸化を介した活性化を生じさせる [10]。また nNOS は神経系に存在している事から、NMDA 受容体刺激などにより連鎖的な活性化をうけ、比較的大量の NO を産生することも知られている。誘導型の遺伝子発現を示す iNOS は通常状態における発現量は低く抑えられているが、リポ多糖や IFN- γ などのサイトカイン刺激により発現が誘導され、極めて大量の NO 産生を生じさせることになる。そのため、恒常的な eNOS や nNOS に由来する NO 濃度と iNOS に由来する NO では局所における濃度が大きく異なっていることが知られており、その作用対象が必然的に異なってくる原因ともなっている。

一方、腸管内においては多くの細菌が常在しているが、それらの細菌も NO 合成能力を有するものがあり、腸内細菌も生体内における NO 産生源の一つとして考えることも出来る [11]。生理的な意義・作用については不明であるが、今後の研究が期待される分野であろう。

3. 生理的な NO の作用機序

血管をいったん収縮させた後にアセチルコリンなどを作用させると、血管弛緩反応が濃度依存性に認められる。この反応は血管内皮細胞が存在しないと生じないことから、内皮細胞由来の血管弛緩因子 (EDRF) が放出されると考えられてきた [2]。その後の研究から NO が EDRF であり、内皮細胞に隣接した血管平滑筋細胞内へ拡散し可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) を活性化することにより血管弛緩反応を引き起こしていることが明らかにされた。この様に、NO の作用機序は cGMP を介した経路と考えられてきた。

一方、ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one) などの sGC 阻害薬を用いて cGMP 産生量を抑制しても残存する NO 依存性の反応が存在することなどから、cGMP を介さない NO の作用機序の存在が示唆された。ヘムタンパク質である sGC の活性化は、活性中心のヘム鉄に対して NO が配位することにより生じるが、この NO の配位反応をニトロシル化 (コラム参照) という。NO が遷移金属に対して配位結合することは NO の消去系とも考えられているヘモグロビンと NO の反応からも明らかであるが、システインのチオール基 (SH) に対して NO が配位し、S-ニトロシル化 (SNO 化) 修飾反応を起こす [12]。この SNO 化反応は、可逆的なタンパク質の翻訳後修飾としてシグナル伝達系、ならびに制御系として作用している事が知られている。遺伝子発現のエピジェネティック制御に重要な役割を果たしているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC-2) は nNOS により SNO 化修飾を受け酵素活性が抑制される。この SNO 化による抑制は、発生段階における脳神経細胞の遊走・

接合を維持するために必須であることが知られている [13,14]。

SNO 化は酵素活性の制御に加え、受容体シグナル・タンパク質相互の複合体形成・細胞内局在・転写因子活性・ユビキチン化など細胞内におけるシグナル伝達のほぼ全てに関与することが明らかにされてきた。その結果、細胞内シグナル調節の代表であるリン酸化と同等の範囲にわたり SNO を介したシグナル伝達制御系が作用している事が明らかにされた [10]。

3.1 SNO 化の特異性と脱 SNO 化

SNO 化は、対象となるタンパク質の特定のシステインだけが修飾を受け、不特定のシステインや他のアミノ酸が標的になるわけではない。タンパク質に存在する多数のシステインの中で、周囲のアミノ酸配列により決定されるチオール基の反応性 (pKa) や NO 供与体となる物質に対するアクセスの容易さ、さらには SNO 化が生じた後での構造変化の影響など様々な因子が複合して SNO 化修飾が生じるシステインが決められている。これまで多くの SNO 化修飾を受けるタンパク質が同定されてきたが、SNO 化が生じるシステインは一カ所であるものが多い (図 3)。

NO が産生されると周囲のタンパク質に SNO 化修飾が生じるわけではない。NO 産生に伴いグルタチオン (GSH) やシステイン (Cys) が SNO 化を受け GSNO や CysNO と呼ばれるニトロシル化システインが形成され、SNO ドナーとなる。これらの SNO ドナーが次いでタ

ンパク質と会合し NO を受け渡す (Transnitrosylation) ことによりタンパク質の SNO 化が生じると考えられている [10]。

一方、SNO 化による作用を停止させるための SNO 修飾の除去 (脱 SNO 化: denitrosylation) 機構も可逆的なシグナル伝達系を形成するために重要である。生体内におけるレドックス状態の維持にはグルタチオンやチオレドキシンの重要であることがよく知られているが、チオレドキシンは脱 SNO 化反応を起こす。SNO 化修飾の生成・分解に関する制御系は確立されており、他の酸化修飾をはじめとした ROS による修飾反応とは異なった可逆性をもつ [15]。

3.2 ニトロ化

NO の生理活性は cGMP または SNO 化反応によるものに大別される。しかし、NO による化学修飾としては亜硝酸 (NO_2) を付加するニトロ化反応が一般的に知られた反応である (高校化学でも履修する)。生体内においてもニトロ化反応は生じ、おもにチロシンなどの芳香族アミノ酸に生じることが知られているが、大量の NO が産生された場合に限られる。すなわち炎症反応などに伴う iNOS の発現誘導により大量の NO が産生された組織に認められる反応であるため、一般的には炎症などの病態形成の指標として用いられてきた。それでは、cGMP の増加やタンパク質の SNO 化修飾に対して、ニトロ化反応だけが病態形成に結びついているのであろうか。答えはそれほど単純なものではないことが次第に明

特異的な SNO 化修飾の例

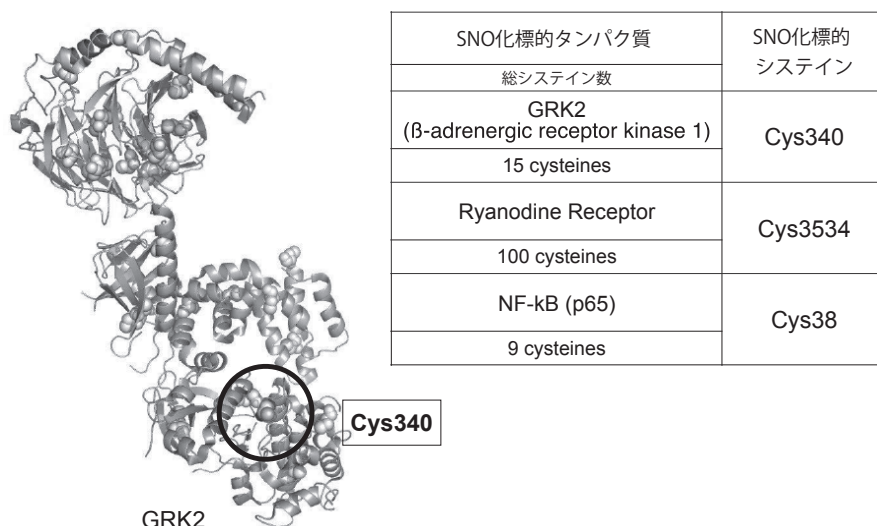


図3 SNO 化修飾の特異性

SNO 化修飾はシステインに対して普遍的に生じる反応ではなく、タンパク質分子中の特定のシステインにのみ生じる反応である。たとえば GRK2 には 15 個、リアノジン受容体には 100 以上、転写因子の NF-kB (p65 サブユニット) には 9 個など多数のシステインが存在する。しかし、SNO 化修飾を受ける対象となるシステインはそのうちの 1 つに過ぎない (右表)。さらに SNO 化反応は可逆的な反応であるため、細胞内のシグナル伝達系・制御系として作用する。左図は GRK2 の SNO 化修飾の標的となるシステインを立体構造モデル上で示した。

らかになってきている。これまでアミノ酸などに対するニトロ化修飾はNOによる障害性の指標とされてきたが、ニトロ化修飾されたcGMP (8-nitro-cGMP) が生体内に広く存在し、タンパク質のS-グアニル化修飾を引き起こしていることが報告されて以来 [16,17]、ニトロ化には障害性の指標以外の側面があると考えられるべき状況になっている。今後の研究成果が待たれる分野であろう。

4. 病態形成とNO

NOの産生または作用の異常が関連する疾患としては、循環器疾患を始めとして多くのものが知られているが、NOのみが発症原因になっている疾患はほとんど知られてはいない。存在感を感じないNOであるが、無くなって初めてその存在価値を認識する正に「空気の様」な存在である。

血管内皮細胞由来のNOが血圧調節に重要である事は、eNOS欠損マウスの体血圧が野生型マウスに比較して高いことから理解されるが、ヒトの高血圧が血管内皮細胞からのNO産生不足により発症しているわけではない。しかし、血管内皮細胞から産生されるNOが様々な血管病態に関連している事は事実である。例えば、加齢や動脈硬化、糖尿病に関係する血管弛緩反応の減弱は、血管内皮細胞機能の減弱から理解することも可能であろう。加齢に伴うeNOSタンパク質発現量の減少や女性ホルモン分泌低下にともない生じるeNOS活性化刺激の減弱、動脈硬化にともなうeNOSタンパク質発現の減少や周囲組織へ浸潤したマクロファージなどによるROS産生の増加がNOの生物活性を減弱させ、高血糖はeNOSタンパク質のアンカッピング（通常は二量体で活性を示すeNOSタンパク質が単量体化し、NO産生に用いられるべき電子が行き場を失いROS産生にまわってしまう）を引き起こしNO産生が減少するのに加え、ROS産生によりNOの生理活性をさらに低下させるなどの機構が想定される [18,19]。また、血管内皮細胞からのNO産生は血管平滑筋細胞の増殖を抑制する作用を有することも知られており、血管内皮細胞の欠損は平滑筋細胞の増殖を引き起こし、血管内腔の狭窄を引き起こす原因ともなる [20]。さらに、加齢に伴う血管の可塑性が低下する機構として、組織トランスグルタミナーゼ (TG2) 活性の増大が検討されている。TG2は血管内皮細胞由来のNOによりSNO化修飾をうけ活性が抑制されているが、加齢に伴いNO産生が減少するとTG2は活性化され、細胞外マトリクスのクロスリンクが進む事から血管の可塑性が減弱すると考えられている [21]。血管内皮細胞由来のNO産生は血流（ずり応力）やeNOS発現量、Aktなどによるリン酸化により様々な制御されているが、血流と血管拡張能から求められるFMD（血流依存性血管拡張反応）などの測定から血管機能を推測する事が臨床でも行なわれている [22]。さらに各種病態に伴うFMDの低下や治療による改善が認められる事から、冠疾患の予後予測などへの応用も試みられている。しかし、血管内皮細胞は血管の収縮・弛緩に関わるエンドセリン・プロスタサイクリンを産生し、NADPH オキ

シダーゼ (NOX) によるスーパーオキシド産生も盛んであるため、NOを含めたこれらの因子の相互作用により血管の収縮・弛緩反応が決定される。そのため、これらの因子による作用を総合的に加味した血管弛緩能を測定する手法の臨床応用が待たれるところである。

心不全に対して交感神経刺激薬を用いる治療は広く行なわれているが、耐性が生じ次第に薬効が減弱することは臨床において経験することである。リガンドが受容体に結合した後、Gタンパク質を介して細胞内へシグナルを流すが、同時にGRK2 (Gタンパク質共役型受容体キナーゼ2) などのキナーゼによりリン酸化され膜成分とともに細胞内へ引き込まれる内在化 (internalization) が起き、受容体の脱感作 (desensitization) を生じる [23]。このようにして過剰な交感神経刺激は脱感作を進めカテコラミンに対する耐性を生じさせると考えられている。しかし、NOはGRK2をSNO化修飾し活性を抑制する事により脱感作を予防している事が明らかにされた [24]。すなわち、GRK2によるリン酸化が十分に起こらなければβ受容体の内在化が減弱し細胞膜表面に存在する受容体数が維持されるため、細胞内へ交感神経刺激が伝達され心収縮力の維持につながると考えられた。実際GRK2のSNO化を促進させる事により膜表面の受容体数が維持される事が示され [25]、今後の臨床応用が期待される状況にある。

脳神経系におけるNOの重要性は、発生段階におけるHDAC-2 (ヒストン脱アセチル化酵素) のSNO化による神経網形成の促進に代表されるが、nNOSの過剰刺激によるNO産生量の増大は神経細胞死 (アポトーシス) を惹起し障害性に働くことも知られている [26]。一方、神経細胞の樹状突起はSNO化修飾により活性化したcdk5 (cyclin-dependent kinase) により減少するが、cdk5のSNO化割合はアルツハイマー病患者脳において亢進している [27]。さらに、パーキンソン病の原因関連タンパク質であるパーキンの活性低下を防ぐことにより抗パーキンソン病効果を発揮する可能性も示唆されている [28]。NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) 受容体刺激はnNOSからのNO産生を亢進させ神経細胞死を惹起することが知られていたが、その機序としてはGAPDH (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ) がSNO化を受けると細胞質から核へ局在を変え、その結果細胞死が惹起される [29]。一方、神経細胞の細胞質にはGOSPEL (GAPDH's competitor Of Siah Protein Enhances Life) と呼ばれるタンパク質が存在し、NO依存性にGAPDHと結合しGAPDHの核移行 (細胞死) を防いでいることも報告された [30]。この様に、SNO化は疾患によっても異なる作用を示すが、同じ細胞においても構成タンパク質の違いによって作用が異なるため、NOの産生量によって作用が決定されているわけではない事に注意を払う必要がある。この点がNOの生理・病態との関わりを理解する事を難しくしている一因でもあろう。

生体にもっとも大量に存在するチオールであるグルタチオンは、SNOドナー (GSNO: SNO化グルタチオン)

としての働きを有する。GSNO 還元酵素 (GSNOR) により酸化型グルタチオン (GSSG) とアンモニアに分解され消去されるが、GSNOR 欠損マウスでは肝がんを自然発症する。これは、GSNO の過剰産生により DNA 修復系が機能障害を受けることが原因である事が示され、ヒトの肝がん患者の約 50% でも GSNOR 活性の低下が認められると報告された [31]。

このように、生理的なシグナルとしての重要性をもつ NO・SNO 化であるが、常に障害性を秘めた分子である事も明らかである。では、なぜこの様な二面性が生じてくるのであろうか。タンパク質に対する NO の反応性が複数存在している事が、その一因と考えられる。すなわち、システインチオール基に対しては SNO 化反応を生じシグナル伝達・制御に関わるのに対して、芳香族アミノ酸に対してはニトロ化反応をおこし障害性をもたらす。さらに、cGMP にも同じニトロ化をおこすものの引き続き生じる S-グアニル化修飾により生理活性を引き出すこともある [16,17]。これらの反応性の違いは、作用点における NO 濃度の違いによりもたらされるが、NO 産生部位 (NOS) から作用点までの経路も重要になる。ガス状分子は自由拡散により膜をも越えて移動すると考えられているが、その経路において消去される可能性もある。たとえば、NO との反応速度が非常に早いスーパーオキシドが経路上に存在していれば、NO は即座に反応し ONOO⁻ (ペルオキシ亜硝酸) を経て生理活性を失う。また遷移金属を含むタンパク質が存在している場合も同様である。GSNOR の発現量によっても SNO 化量は変化する。この様に、小さな細胞や狭い範囲の組織を考えても、NO の作用を規定する様々な因子が存在しており、それらの関与を考慮する事無しには NO の作用を明らかにすることは出来ないわけである。

5. 診断治療へ対する NO の応用 (治療と診断)

治療薬としての NO 分子の活用は、近年になってから始められた比較的新しい治療方法ではあるが、NO に類似した作用を示す薬物は古くから知られてきた。ニトログリセリンはその代表的な薬物であるが、グリセリン骨格に 3 つのニトロ基が結合した構造を有する。細胞内においてニトロ基の一つが遊離し NO へ変換されることによりその薬理作用を示すことが知られている [32]。主に狭心症や心不全などに対して 100 年以上にわたって使用されてきた歴史を持つ薬物である。しかし、全身投与されると紅潮・頭痛などの症状を引き起こすのに加え、耐性が発現しやすいなどの問題点を有していることがよく知られている。これに対して NO 吸入療法は投与経路において作用した NO 以外は、血管内においては赤血球のヘモグロビンによりトラップされ不活化される。そのため、遠隔臓器や肺血管以外に対する作用はほとんどなく、組織特異性の高い治療法である。NO 吸入療法は主に集中治療室における肺高血圧治療などに用いられ成果を上げているが、NO 分子・すなわちガス状の NO を呼気中に一定濃度で加えるためには、比較的大掛かりな装置を必要とするため、院外での使用には向かないなどの

問題点を有する。

そのため、NO の下流で作用する cGMP 量の増大を目指した PDE-V 阻害薬 (シルデナフィル・タダラフィルなど) が投与され高い効果をあげている。さらに、NO の sGC に対する反応性を増強する事を目的とした薬剤 (Riociguat) も開発され、新たな治療戦略として期待されている。このように、NO の血管拡張作用が分子レベルで解明されたことにより、新たな治療戦略が展開されたといえよう。

気管支喘息患者では呼気中の NO 濃度が上昇しているが、治療により喘息症状が安定すると呼気中の NO 濃度も低下する。そのため、呼気中の NO 濃度を治療効果の判定に活用することができる。昨年からの呼気中の NO 濃度測定が保険収載され、一般病院においても気管支喘息患者の管理に用いられる様になっている。一方、呼気中の NO 濃度が気管支喘息患者では上昇しているため、血管と同様に気管支平滑筋も弛緩すると考えられるが、実際には気管支平滑筋の過収縮が生じていることが知られてきた。これは平滑筋における GSNO レベルの低下が誘因になっている事が明らかにされた [33,34]。すなわち、GSNO 還元酵素 (GSNOR) 活性が気管支喘息患者では過剰に上昇し GSNO の分解が亢進しているためである。そのため、GSNOR 阻害薬が開発され、気管支喘息患者を対象とした臨床試験が実施された。GSNO 阻害薬はのう胞性線維症 (Cystic Fibrosis) に対しても臨床応用が試みられている。

食細胞を介した細胞性免疫では、食後の殺菌のため NO をはじめとした ROS が大量に産生され、菌体の生命維持機構の破壊=殺菌をはかる。一方、感染細菌は菌体内部の抗酸化酵素などによる活性酸素防御系を増強することにより対抗している。実際、食中毒の原因ともなる腸管出血性大腸菌 (O-157 など) では、NorV と呼ばれる NO 還元酵素活性と毒素産生などの病原性が相関する事が報告された [35]。下部腸管内腔の酸素濃度は極めて低いため、貪食細胞内部に取り込まれた細菌は、ほぼ無酸素状態におかれることになる [36]。低酸素のため貪食細胞が殺菌のために使うことができる ROS は限られ、NO の重要性が増す。さらに細菌等が NO 代謝に通常用いているフラボヘモグロビン (Hmp) は酸素依存性であるため、酸素非依存的に作用する NorV が NO 耐性を規定することになるのであろう。今後、菌体の ROS 感受性を増大させる薬物も感染症の治療手段として用いられていく可能性がある。

NO による機能付加を目指した新規薬剤開発も注目される。アスピリンはシクロオキシゲナーゼ (COX) や血小板凝集抑制などを目的として頻繁に投与される薬物であるが、消化性潰瘍等の副作用発現が問題となっている。そこでアスピリンと NO を同時に放出する薬物の開発により副作用を低減させることを目的として徐放性 NO-アスピリン製剤が開発され、副作用の低減に貢献した [37,38]。近年では、NO の抗腫瘍効果を目指して通常のアルブミンよりもより SNO 化度の高い SNO-アルブミン製剤の開発も進められている [39,40] が、より高い

効果を達成するためには作用部位への特異的な送達技術の確立が求められるであろう。

6. NO と上手につき合う

酸素呼吸により生命を維持している我々は、効率的なエネルギー産生の代償に活性酸素種 (ROS) による障害を被ることになった。一酸化窒素 (NO) は、大気汚染物質の代表格ともされる NO_x の原因物質である反面、健康に生まれ育ち健康な生活をおくるために必要な生理物質でもある。この様に、酸素・一酸化窒素に代表されるガス状分子の生体内作用は常に二面性を有すると考える事が妥当であろう。それ故に、なぜ二面性が生じるのか、また何が二面性を決めるのかを理解していく事が、生老病死のすべてに関係する NO と上手につき合い、活用していく秘訣になるであろう。

今後は、生体内での NO 産生・消費・生物活性の発現などをモニターするための分子イメージング法や、リアルタイムまたはそれに近い分解能を有した活性測定系などに関する技術開発が進められ、NO やガス状分子の作用を手取るように理解する事ができる様になる事が望まれる。

本稿が空気の様に存在を感じないガス状分子の、生体内での作用を感じていただくきっかけになれば幸いである。

コラム： ニトロシル化とニトロ化 (Nitrosylation vs. Nitration)

生体内で NO は、主にニトロシル化 (ニトロソ化、-NO) とニトロ化 (-NO₂) の2種類の反応を引き起こす。これらの言葉が (日本語として) 極めて紛らわしいのに加え、同じ NO の配位を表す「ニトロシル」と「ニトロソ」という二つの化学用語が併用されている事も、馴染みにくさを演出しているかもしれない。ニトロ化は高校の化学で習うが、ニトロシル化は聞いた事が無い方も多であろう。また、「ニトロソ」化合物という言葉からニトロソアミンを連想され、抵抗感を覚える方も多い。本稿では、用語として「ニトロシル化」を用いているが、「ニトロソ化」と読み替えることも可能である。著者らは NO が生理的な機能を発現するのは、主にシステインや遷移金属に配位した場合と考えているため、生理的条件下では希なアミノ基に対する NO 修飾をも連想させる「ニトロソ化」よりも「ニトロシル化・SNO 化」を用いるようにしている。

参考文献

1. Fridovich, I. Reflections of a fortunate biochemist. *J. Biol. Chem.* **276**: 28629–28636, 2001.
2. Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373–376, 1980.
3. Arnold, W. P.; Mittal, C. K.; Katsuki, S.; Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and

increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 3203–3207, 1977.

4. Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 9265–9269, 1987.
5. Ryter, S. W.; Alam, J.; Choi, A. M. K. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* **86**: 583–650, 2006.
6. Kimura, H. Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxid. Redox Signal.* **12**: 1111–1123, 2010.
7. Mustafa, A. K.; Gadalla, M. M.; Snyder, S. H. Signaling by gasotransmitters. *Sci. Signal.* **2**: re2, 2009.
8. Ohsawa, I.; Ishikawa, M.; Takahashi, K.; Watanabe, M.; Nishimaki, K.; Yamagata, K.; Katsura, K.-I.; Katayama, Y.; Asoh, S.; Ohta, S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* **13**: 688–694, 2007.
9. Matsumoto, A.; Yamafuji, M.; Tachibana, T.; Nakabeppu, Y.; Noda, M.; Nakaya, H. Oral “hydrogen water” induces neuroprotective ghrelin secretion in mice. *Sci. Rep.* **3**: 3273, 2013.
10. Hess, D. T.; Matsumoto, A.; Kim, S.-O.; Marshall, H. E.; Stamler, J. S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 150–166, 2005.
11. Nishimura, A.; Kawahara, N.; Takagi, H. The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier Inc.; **430**: 137–143, 2013.
12. Stamler, J. S.; Toone, E. J.; Lipton, S. a; Sucher, N. J. (S) NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* **18**: 691–696, 1997.
13. Nott, A.; Watson, P. M.; Robinson, J. D.; Crepaldi, L.; Riccio, A. S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature* **455**: 411–415, 2008.
14. Nott, A.; Nitarska, J.; Veenvliet, J. V.; Schacke, S.; Derijck, A. a H. a; Sirko, P.; Muchardt, C.; Pasterkamp, R. J.; Smidt, M. P.; Riccio, A. S-nitrosylation of HDAC2 regulates the expression of the chromatin-remodeling factor Brm during radial neuron migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 3113–3118, 2013.
15. Benhar, M.; Forrester, M. T.; Stamler, J. S. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature

- Publishing Group; **10**: 721–732, 2009.
16. Sawa, T.; Zaki, M. H.; Okamoto, T.; Akuta, T.; Tokutomi, Y.; Kim-Mitsuyama, S.; Ihara, H.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Fujii, S.; Arimoto, H.; Akaike, T. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nat. Chem. Biol.* **3**: 727–735, 2007.
 17. Rahaman, M. M.; Sawa, T.; Ahtesham, A. K.; Khan, S.; Inoue, H.; Irie, A.; Fujii, S.; Akaike, T. S-guanylation proteomics for redox-based mitochondrial signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **20**: 295–307, 2014.
 18. Hink, U.; Li, H.; Mollnau, H.; Oelze, M.; Matheis, E.; Hartmann, M.; Skatchkov, M.; Thaïss, F.; Stahl, R. a. K.; Warnholtz, a.; Meinertz, T.; Griendling, K.; Harrison, D. G.; Forstermann, U.; Munzel, T. Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ. Res.* **88**: e14–e22, 2001.
 19. Guzik, T. J. Mechanisms of Increased Vascular Superoxide Production in Human Diabetes Mellitus: Role of NAD (P) H Oxidase and Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* **105**: 1656–1662, 2002.
 20. Sarkar, R.; Meinberg, E. G.; Stanley, J. C.; Gordon, D.; Webb, R. C. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **78**: 225–230, 1996.
 21. Santhanam, L.; Tuday, E. C.; Webb, A. K.; Dowzicky, P.; Kim, J. H.; Oh, Y. J.; Sikka, G.; Kuo, M.; Halushka, M. K.; Macgregor, A. M.; Dunn, J.; Gutbrod, S.; Yin, D.; Shoukas, A.; Nyhan, D.; Flavahan, N. a; Belkin, A. M.; Berkowitz, D. E. Decreased S-nitrosylation of tissue transglutaminase contributes to age-related increases in vascular stiffness. *Circ. Res.* **107**: 117–125, 2010.
 22. Corretti, M. C.; Anderson, T. J.; Benjamin, E. J.; Celermajer, D.; Charbonneau, F.; Creager, M. a; Deanfield, J.; Drexler, H.; Gerhard-Herman, M.; Herrington, D.; Vallance, P.; Vita, J.; Vogel, R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**: 257–265, 2002.
 23. Pierce, K. L.; Lefkowitz, R. J. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**: 727–733, 2001.
 24. Whalen, E. J.; Foster, M. W.; Matsumoto, A.; Ozawa, K.; Violin, J. D.; Que, L. G.; Nelson, C. D.; Benhar, M.; Keys, J. R.; Rockman, H. a; Koch, W. J.; Daaka, Y.; Lefkowitz, R. J.; Stamler, J. S. Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Cell* **129**: 511–522, 2007.
 25. Makita, N.; Kabasawa, Y.; Otani, Y.; Firman; Sato, J.; Hashimoto, M.; Nakaya, M.; Nishihara, H.; Nangaku, M.; Kurose, H.; Ohwada, T.; Iiri, T. Attenuated desensitization of β -adrenergic receptor by water-soluble N-nitrosamines that induce S-nitrosylation without NO release. *Circ. Res.* **112**: 327–334, 2013.
 26. Samdani, A. F.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L. Nitric Oxide Synthase in Models of Focal Ischemia. *Stroke* 1997. p. 1283–1288.
 27. Qu, J.; Nakamura, T.; Cao, G.; Holland, E. A.; McKercher, S. R.; Lipton, S. A. S-Nitrosylation activates Cdk5 and contributes to synaptic spine loss induced by beta-amyloid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 14330–14335, 2011.
 28. Ozawa, K.; Komatsubara, A. T.; Nishimura, Y.; Sawada, T.; Kawafune, H.; Tsumoto, H.; Tsuji, Y.; Zhao, J.; Kyotani, Y.; Tanaka, T.; Takahashi, R.; Yoshizumi, M. S-nitrosylation regulates mitochondrial quality control via activation of parkin. *Sci. Rep.* **3**: 2202, 2013.
 29. Hara, M. R.; Agrawal, N.; Kim, S. F.; Cascio, M. B.; Fujimuro, M.; Ozeki, Y.; Takahashi, M.; Cheah, J. H.; Tankou, S. K.; Hester, L. D.; Ferris, C. D.; Hayward, S. D.; Snyder, S. H.; Sawa, A. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* **7**: 665–674, 2005.
 30. Sen, N.; Hara, M. R.; Ahmad, A. S.; Cascio, M. B.; Kamiya, A.; Ehmsen, J. T.; Agrawal, N.; Agrawal, N.; Hester, L.; Doré, S.; Snyder, S. H.; Sawa, A. GOSPEL: a neuroprotective protein that binds to GAPDH upon S-nitrosylation. *Neuron* Elsevier Ltd; **63**: 81–91, 2009.
 31. Wei, W.; Li, B.; Hanes, M. a; Kakar, S.; Chen, X.; Liu, L. S-nitrosylation from GSNOR deficiency impairs DNA repair and promotes hepatocarcinogenesis. *Sci. Transl. Med.* **2**: 19ra13, 2010.
 32. Chen, Z.; Zhang, J.; Stamler, J. S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 8306–8311, 2002.
 33. Gaston, B.; Sears, S.; Woods, J.; Hunt, J.; Ponaman, M.; McMahon, T.; Stamler, J. S. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *Lancet* **351**: 1317–1319, 1998.
 34. Que, L. G.; Liu, L.; Yan, Y.; Whitehead, G. S.; Gavett, S. H.; Schwartz, D. a; Stamler, J. S. Protection from experimental asthma by an endogenous bronchodilator. *Science* **308**: 1618–1621, 2005.
 35. Shimizu, T.; Tsutsuki, H.; Matsumoto, A.; Nakaya, H.; Noda, M. The nitric oxide reductase

- of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophages. *Mol. Microbiol.* **85**: 492–512, 2012.
36. Espey, M. G. Role of oxygen gradients in shaping redox relationships between the human intestine and its microbiota. *Free Radic. Biol. Med.* Elsevier; **55**: 130–140, 2013.
 37. Wallace, J. L.; Ignarro, L. J.; Fiorucci, S. Potential cardioprotective actions of no-releasing aspirin. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**: 375–382, 2002.
 38. Fiorucci, S.; Santucci, L.; Gresele, P.; Faccino, R. M.; Del Soldato, P.; Morelli, A. Gastrointestinal safety of NO-aspirin (NCX-4016) in healthy human volunteers: a proof of concept endoscopic study. *Gastroenterology* **124**: 600–607, 2003.
 39. Katsumi, H.; Nishikawa, M.; Yamashita, F.; Hashida, M. Development of polyethylene glycol-conjugated poly-S-nitrosated serum albumin, a novel S-Nitrosothiol for prolonged delivery of nitric oxide in the blood circulation in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**: 1117–1124, 2005.
 40. Katayama, N.; Nakajou, K.; Komori, H.; Uchida, K.; Yokoe, J.; Yasui, N.; Yamamoto, H.; Kai, T.; Sato, M.; Nakagawa, T.; Takeya, M.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Design and evaluation of S-nitrosylated human serum albumin as a novel anticancer drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**: 69–76, 2008.

Role of nitric oxide (NO) in health and disease

Akio Matsumoto, M.D. Ph.D.

Department of Pharmacology Chiba University Graduate School of Medicine

Nitric oxide (NO) is physiologically relevant gaseous molecule whose role in body functions has been clarified since the discovery of NO as endothelium-derived relaxing factor (EDRF) , further investigation revealed the associated changes with NO in development and senescence. NO exerts physiological functions through the activation of cGMP-pathways and the formation of protein S-nitrosylation; however, insufficient production of NO or dysregulated action of NO leads to the formation of pathological changes disturbing physiological functions. Accumulated information about the role of NO in health and disease enabled us to apply NO in therapeutics. This review article is going to focus on the biochemical mechanism of NO actions in physiology, and the therapeutic applications of NO.