

# 脳型ADPリボシールシクラーゼの精製とcDNAクローニング

著者	東田 陽博
著者別表示	Higashida Haruhiro
雑誌名	平成11(1999)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	1997-1999
ページ	36p.
発行年	2000-03
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00049436">http://doi.org/10.24517/00049436</a>



# 脳型 ADP リボシールシクラーゼの精製と cDNA クローニング

(課題番号：09480221)

平成9年度～平成11年度

科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 東田陽博

(金沢大学医学部・教授)

著者寄贈

## 目 次

1. はしがき	1
2. 研究組織	2
3. 研究経費	3
4. 研究発表 (1) 学会誌等	4
(2) 口頭発表	7
(3) 著書	9
5. 研究成果 (日本語版)	11
5-1 研究の背景	
5-2 cADPR	
5-3 cADPR受容体	
5-4 ADP-ribosyl cyclase	
5-5 従来のADP-ribosyl cyclaseの決定法と我々の開発した方法	
5-6 神経腫瘍細胞膜に存在するADP-ribosyl cyclase	
5-7 cADPR産生の調節機構—我々の発見	
5-8 受容体—ADP-ribosyl cyclaseのカップリング	
5-9 細胞内NAD <sup>+</sup> 濃度の減少	
5-10 おわりに	
5-11 文献	
6. 研究成果 (英語版)	26
7. 謝辞と展望	34
8. 添付	
学会誌等での発表	
出版物 (著書)	

## 1. はしがき

私達は10数年来、受容体からイオンチャンネルに到るシグナル伝達について研究している。ことにムスカリン性アセチルコリンやブラジキニン両受容体刺激により、イオンコンダクタンスを減少させ膜を興奮させるMタイプのカリウム ( $K^+$ ) イオンチャンネルに興味を持っている。最近は、Mおよびその仲間の不活性化しない  $K^+$  チャンネルの遺伝子をクローニングする事とサイクリックADPリボース (cADPR) がMチャンネル抑制のセカンドメッセンジャーではないかという仮定のもとに研究を進めてきた。

前者の成果として  $K^+$  チャンネルの新しい発現機能調節因子であるKCR1を見出した。また、後者としてcADPR産生酵素 (ADP-ribosyl cyclase) 活性を持つリンパ球細胞膜表面抗原であるヒトCD38 cDNA の大量発現細胞を作り、cADPRの細胞内作用を研究しているうちに、思いがけなく、内在性のADP-ribosyl cyclaseがムスカリン受容体により、Gタンパク質を介してその活性を上下させることを知った。この情報変換機構は、非骨格筋細胞内でリアノジン受容体の関与する。即ち、 $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$ -release 機構の関与する  $Ca^{2+}$  バイオシグナル分野で長らく疑問とされていた宿題に対する一つの回答であった。

そこで我々は、(非骨格筋細胞に存在するII型の) リアノジン受容体に作用するcADPRの産生機構の分子機構解明を目指し、「脳型ADPリボシルシクラーゼの精製とcDNAクローニング」という課題の研究費補助を受け、研究をスタートさせた。

その結果、①ラット心臓心室筋細胞でのADPリボシルシクラーゼが  $\beta$  受容体により活性化されること、②培養脳アストロ細胞でADPリボシルシクラーゼが  $\beta$  受容体により活性化されること、③神経腫瘍細胞NG108-15細胞に注入したcADPRにより、L型Caチャンネルが活性化されることなど、生化学的生理学的研究に成果があがった。一方、CD38ではないADPリボシルシクラーゼ分子の同定は、まだ見るべき成果をあげていない現実である。

## 2. 研究組織

研究代表者：東田陽博（金沢大学医学部・教授）

研究分担者：横山 茂（金沢大学医学部・助教授）

研究分担者：橋井美奈子（金沢大学医学部・講師）

研究分担者：星 直人（金沢大学医学部・助手）

### 3. 研究経費

平成 9年度：2,800 千円

平成10年度：4,100 千円

平成11年度：3,100 千円

---

計 10,000 千円

#### 購入した設備備品

高速液体クロマトグラフ

検出器

攪拌器

送液ポンプ

データ処理装置

## 4. 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Zhong, Zhen-Guo, Yokoyama, Shigeru, Noda, Mami and Higashida, Haruhiro: Overexpression of adhesion molecule L1 in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells enhances dibutyryl cAMP induced neurite outgrowth and functional synapse formation with myotubes.  
J. Neurochem. 68: 2291-2299, 1997.
2. Takanaga, Hitomi, Maeda, Hiroshi, Yabuchi, Hikaru, Tamai, Ikumi, Higashida, Haruhiro and Tsuji, Akira: Nicotinic acid transport mediated by pH-dependent anion antiporter and protein cotransporter in rabbit intestinal brush-border membrane.  
J. Pharm. Pharmacol. 48: 1073-1077, 1996.
3. Tamai, Ikumi, Hayashi, Kiyomi, Terao, Toshimitsu, Sai, Yoshimichi, Shiraga, Toshiyuki, Miyamoto, Ken-ichi, Takeda, Eiji, Higashida, Haruhiro and Tsuji, Akira : The predominant contribution of oligopeptide transporter PepT1 to intestinal absorption of b-lactam antibiotics in the rat small intestine.  
J. Pharm. Pharmacol. 49: 796-801, 1997.
4. Taketo, Megumi, Yokoyama, Shigeru, Fukuda, Mitsunori, Mikoshiba, Katsuhiko and Higashida, Haruhiro: Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding sites in control and ras-transformed NIH/3T3 fibroblasts.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 239: 349-352, 1997.
5. 橋井美奈子, 東田陽博: 培養細胞の受容体依存的Ca<sup>2+</sup> 流入測定法  
日薬理誌 110: 195-203, 1997.
6. Higashida, Haruhiro, Yokoyama, Shigeru, Hashii, Minako, Taketo, Megumi, Higashida, Masaharu, Takayasu, Tatsunori, Ohshima, Tohru, Takasawa, Shin, Okamoto, Hiroshi and Noda, Mami: Muscarinic receptor-mediated dual regulation of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15 neuronal cell membranes.  
J. Biol. Chem. 272: 31272-31277, 1997.
7. Higashida, Haruhiro: ADP-ribosyl cyclase coupled with receptors via G proteins.  
FEBS Lett. 418: 355-356, 1997.

8. Ishizaka, Nobuto, Noda, Mami, Yokoyama, Shigeru, Kawasaki, Kazuo, Yamamoto, Miyuki and Higashida, Haruhiro: Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the human iris.  
Brain Res. 787: 344-347, 1998.
9. Higashida, Haruhiro, Hoshi, Naoto, Knijnik, Rimma, Zadina, James E., and Kastin, Abba J.: Endomorphins inhibit high-threshold  $Ca^{2+}$  channel currents in rodent NG108-15 cells overexpressing m-opioid receptors.  
J. Physiol. (Lond) 507: 71-75, 1998.
10. Furukawa, Taiji, Miura, Reiko, Mori, Yasuo, Strobeck, Mark, Suzuki, Kazuyuki, Ogihara, Yoshiyasu, Asano, Tomiko, Morishita, Rika, Hashii, Minako, Higashida, Haruhiro, Yoshii, Mitsunori and Nukada, Toshihide: Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal  $Ca^{2+}$  channels with G-protein  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits.  
J. Biol. Chem. 273: 17595-17603, 1998.
11. Hoshi, Naoto, Takahashi, Hiroto, Shahidullah, Mohammad, Yokoyama, Shigeru and Higashida, Haruhiro: KCR1, a membrane protein that facilitates functional expression of non-inactivating  $K^+$  currents associates with rat EAG voltage-dependent  $K^+$  channels.  
J. Biol. Chem. 273: 23080-23085, 1998.
12. 東田陽博, 横山 茂, 橋井美奈子, 星 直人: セカンドメッセンジャーとしてのサイクリックADPリボース — 受容体から ADP-ribosyl cyclase への膜内情報変換機構 —  
生化学 70 (11): 1326-1334, 1998.
13. Zhong, Zhen-Guo, Noda, Mami, Takahashi, Hiroto, Higashida, Haruhiro: Overexpression of rat synapsins in NG108-15 neuronal cells enhances functional synapse formation with myotubes.  
Neurosci. Lett. 260: 93-96, 1999.
14. Takeda, Hisashi, Kimura, Yasuhiro, Higashida, Haruhiro, and Yokoyama, Shigeru: Localization of B2 bradykinin receptor mRNA in the rat retina and sclerocornea  
Immunopharmacol. 45: 51-55, 1999.
15. Higashida, Haruhiro, Taketo, Megumi, Takahashi, Hiroto, Yokoyama, Shigeru, and Hashii, Minako: Potential mechanism for bradykinin-activated and inositol tetrakisphosphate-dependent  $Ca^{2+}$  influx by Ras and GAP1 in fibroblast cells  
Immunopharmacol. 45: 7-11, 1999.



16. Higashida, Haruhiro, Egorova, Alla, Higashida, Chiharu, Zhong, Zhen-Guo, Yokoyama, Shigeru, Noda, Mami and Zhang, Jia-Sheng: Sympathetic potentiation of cyclic ADP-ribose formation in rat cardiac myocytes.  
J. Biol. Chem. 274: 33348-33354, 1999.
17. Takahashi, Yoshitaka, Kawajiri, Hiroo, Yoshimura, Tanihiro, Hoshi, Naoto and Higashida, Haruhiro: 12-lipoxygenase overexpression in rodent NG108-15 cells enhances the excitability by inhibiting M-type K<sup>+</sup> channels.  
J. Physiol. (London) 521: 567-574, 1999.
18. Hottra, Taeko, Asai, Kiyofumi, Fujita, Kaori, Kato, Taiji and Higashida, Haruhiro: Membrane-bound form of ADP-ribosyl cyclase in rat cortical astrocytes in culture.  
J. Neurochem. 74: 669-675, 2000.
19. Hashii, Minako, Minabe, Yoshio and Higashida, Haruhiro: cADP-ribose potentiates cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation and Ca<sup>2+</sup> entry via L-type voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in NG108-15 neuronal cells.  
Biochem. J. 345: 207-215, 2000.
20. Higashida, Haruhiro, Zhang, Jia-Sheng and Takeda Yoshiyu: Angiotensin II cyclase ADP-ribose formation in rat cardiac myocytes.  
Biochem. J. Submitted

## (2) 口頭発表

1. Hashii, M. & Higashida, H.: Cyclic ADP-ribose-induced potentiation of a cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rise resulted from  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in NG108-15 cells.  
The 75th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan Satellite Symposium.  
(1998. 3. 30) (金沢)
2. Noda, M., Akaike, N. & Higashida, H. : Inhibition of M-type  $\text{K}^+$  current by cognition enhancer in NG108-15 cells and rat verebral neurones in culture.  
The 75th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan Satellite Symposium.  
(1998. 3. 30) (金沢)
3. Higashida, H. : Slow synaptic responses in neuronal tumor cells: Dual regulation of ADP-ribocyl cyclase by muscarinic receptor stimulation and inhibition of M-current .  
The 75th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan Satellite Symposium.  
(1998. 3. 30) (金沢)
4. Noda, M., Akaike, N. & Higashida, H. : Inhibition of M-type  $\text{K}^+$  current by cognition enhancer in NG108-15 cells and rat verebral neurones in culture.  
The 75th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan Satellite Symposium.  
(1998. 3. 30) (金沢)
5. Higashida, H. : Slow synaptic responses in neuronal tumor cells: Dual regulation of ADP-ribocyl cyclase by muscarinic receptor stimulation and inhibition of M-current .  
The 75th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan Satellite Symposium.  
(1998. 3. 30) (金沢)
6. Egorova, A., Hoshi, N. & Higashida, H.: Acetylcholine-like effect of sulfhydryl-modifying reagents on M-current in rodent NG108-15 cells.  
The 75th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan Satellite Symposium.  
(1998. 3. 30) (金沢)
7. Higashida, H., Yokoyama, S., Hoshi, N., Hashii, M., Egoraova, A. & Zhong, Z.-G. : Mucarinic acetylcholine m1-m4 receptors overexpressed in neuroblastoma-glioma hybrid NG1080-15 cells as a cholinergic model.  
Xth International Symposium on Cholinergic Mechanisms. (1998. 8.31-9.9) (フランス)

8. Higashida, H., Yokoyama, S., Hashii, M., Noda, M., Egorova, A. & Zhang, J.-S.:  
ADP-ribosyl cyclase coupled with muscarinic acetylcholine receptors via G proteins.  
(ムスカリン受容体からADPリボシルサイクラーゼへの膜内情報伝達機構)  
第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会 (1998.9.21-23) (東京)
  
9. Higashida, H., Yokoyama, S., Hashii, M., Egorova, A. & Zhang, J.-S.: Muscarinic  
receptor-mediated regulation of membrane-bound form of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15  
neuronal cells.  
Kanazawa University International Symposium on Bioinformatics and Molecular Medicine.  
"Function and Dysfunction of Cholinergic Neurotransmission" (1998. 11.13-14) (金沢)
  
10. Higashida, H. & Nomura, Y. : Pharmacology on cyclic ADP-ribose-dependent  $Ca^{2+}$  signaling.  
[サイクリックADPリボースの関与するCaシグナリングの薬理]  
第72回日本薬理学会年会シンポジウム (1999. 3. 23) (札幌)
  
11. 東田陽博, 横山 茂, 橋井美奈子, 星 直人 : 膜分画に存在するADPリボシル環  
状化酵素の諸性質  
第42回日本神経化学会 (1999. 9. 15-17) (広島)

### (3) 出版物

1. Yokoyama, Shigeru, Takeda, Hisashi, and Higashida, Haruhiro: Expression of Kv1.2 potassium channels in rat sensory ganglia: an immunohistochemical study.  
Ann. NY. Acad. Sci. 868: 454-457, 1999.
2. Higashida, Haruhiro, Shigeru, Yokoyama, Minako, Hashii, and Taketo, Megumi: Slow synaptic responses in neuronal tumor cells: dual regulation of ADP-ribosyl cyclase and inhibition of M-current by muscarinic receptor stimulation. In:  
Slow Synaptic Responses and Modulation. Eds. K. Kuba, H. Higashida, D. A. Brown and T. Yoshioka. Springer-Verlag, 35-41, 1999.
3. Egorova, Alla B., Hoshi, Naoto, and Higashida, Haruhiro: Acetylcholine-like effect of sulfhydryl-modifying reagents on M-current in rodent NG108-15 cells. In:  
Slow Synaptic Responses and Modulation. Eds. K. Kuba, H. Higashida, D.A. Brown and T. Yoshioka. Springer-Verlag, pp42-45, 1999.
4. Noda, Mami, Higashida, Haruhiro and Akaike Norio: Inhibition of M-type K<sup>+</sup> currents by cognition enhancers in NG108-15 cells and rat cerebral neurons in culture.  
Slow Synaptic Responses and Modulation. Eds. K. Kuba, H. Higashida, D.A. Brown and T. Yoshioka. Springer-Verlag, pp46-48, 1999.
5. Hoshi, Naoto, Takahashi, Hiroto, Yokoyama, Shigeru, and Higashida, Haruhiro: Three types of cerebellar voltage-gated K<sup>+</sup> currents expressed in *Xenopus* oocytes. In:  
Slow Synaptic Responses and Modulation. Eds. K. Kuba, H. Higashida, D. A. Brown and T. Yoshioka. Springer-Verlag, pp93-96, 1999.
6. Knijnik, Rimma, Hoshi, Naoto, Zadina, James, Kastin, Abba J., and Higashida, Haruhiro: Endomorphins inhibit N-type Ca<sup>2+</sup> channel currents through m-opioid receptors in NG108-15 cells expressing cloned m-receptors. In:  
Slow Synaptic Responses and Modulation. Eds. K. Kuba, H. Higashida, D.A. Brown and T. Yoshioka. Springer-Verlag, pp161-162, 1999.
7. Hashii, Minako, and Higashida, Haruhiro: Upregulation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases by cyclic ADP-ribose in NG108-15 neuronal cells: in comparison with inositol tetrakisphosphate in fibroblast cells. In:  
Slow Synaptic Responses and Modulation. Eds. K. Kuba, H. Higashida, D. A. Brown and T. Yoshioka. Springer-Verlag, pp209-211, 1999.

8. Zhong, Zhen-Guo, Yokoyama, Shigeru, Moda, Mami, and Higashida, Haruhiro: Role of adhesion molecule L1 in neurite outgrowth and functional synapse formation. In: Slow Synaptic Responses and Modulation. Eds. K. Kuba, H. Higashida, D. A. Brown and T. Yoshioka. Springer-Verlag, pp367-369, 1999.
9. Yokoyama, Shigeru, Takeda, Hisashi, and Higashida, Haruhiro: B<sub>2</sub> bradykinin receptors in neuronal cells: a genetic aspect. In: Slow Synaptic Responses and Modulation. Eds. K. Kuba, H. Higashida, D.A. Brown and T. Yoshioka. Springer-Verlag, pp370-374, 1999.

## 5 研究成果（日本語版）

### 5-1 研究の背景

細胞内のカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )上昇がシグナルとなって種々の細胞反応が生じる。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇を生じる機構は、細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入と細胞内貯蔵 $\text{Ca}^{2+}$ の細胞質への遊離の2つによる。後者は、細胞内微小器官、例えば、小胞体や核膜腔に貯えられていた $\text{Ca}^{2+}$ が、イノシトール1,4,5-三リン酸( $\text{IP}_3$ )で $\text{IP}_3$ 受容体 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離チャネルの開口により、細胞質に放出され、細胞内の遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) が高まる<sup>1)</sup>。又、その $\text{Ca}^{2+}$ が更なる $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を生じる。後者の機構を $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) と呼ぶ<sup>2)</sup>。CICRは、小胞体に存在する $\text{IP}_3$ 受容体とは別で（リアノジンで開きっぱなしになることで不活性化する $\text{Ca}^{2+}$ 遊離チャネルを含有する）リアノジン受容体 (RyR) が関与している<sup>3)</sup>。

RyRは分子量約560キロダルトンのサブユニットからなり、四量体を形成する<sup>3, 4)</sup>。N末端が細胞質に飛び出し、C末端側に4回膜貫通構造を持ち、その部分が $\text{Ca}^{2+}$ を通すイオンポアを構成すると考えられている。RyRには現在I~III型の3種類のサブタイプが知られている。タイプIは骨格筋に、タイプIIは心筋に主に存在する。一方、神経細胞はII型が多いが、IやIII型も発現している<sup>4, 5)</sup>。筋肉では細胞表面膜直下の筋小胞体(SR)膜にRyRタイプIが凝集し、足(Foot)構造を形成している。骨格筋では、脱分極で膜電位依存性L型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルが開口し、細胞内に流入した $\text{Ca}^{2+}$ がタイプI RyRの $\text{Ca}^{2+}$ 透過性を高める。この $\text{Ca}^{2+}$ 増幅機構により筋肉の収縮が行われ、興奮収縮関連(Excitation-contraction coupling)と呼ばれている<sup>2, 3, 6)</sup>。膜電位依存性L型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルとタイプI RyR間には、タンパク質同士の相関が存在し、両タンパク質が接触した状態で機能している<sup>7)</sup>。一方、他の細胞のタイプIIやIII RyRでは、このような直接的な関連は証明されていない。これから述べるサイクリックADPリボース(cADPR)等がメッセージーとして、少なくともサブタイプII RyRの $\text{Ca}^{2+}$ による活性化をモジュレートして、 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を調節していることが、だんだんはっきりしてきた<sup>8)</sup>。

これらの研究に関して、CICRは遠藤らにより、筋収縮機構研究の中から発見された<sup>2)</sup>。その機構と $\text{IP}_3$ による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動員について、Berridgeによる総説があり<sup>9)</sup>、神経細胞については久場らが記述している<sup>10)</sup>。細胞内Ca

$Ca^{2+}$  貯蔵コンパートメントについては飯野らが明確にし<sup>11)</sup>、 $IP_3$ 受容体は、御子柴や古市ら<sup>1)</sup>、またRyRは沼研究室にて、竹島らがクローニングした<sup>3)</sup>。膜電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルとRyRタイプIとのカップリングによる筋収縮(ECカップリング)は田辺らによりすでに詳しく述べられている<sup>12)</sup>。

一方、cADPRはミネソタ大学のホンチャンリー (Hon Cheung Lee)が、ウニ卵細胞の受精信号分子として<sup>13)</sup>、またcADPR合成酵素についてもLeeらが見出したものである<sup>8, 14)</sup>。Oxford大学のガリオネ(Galione)らにより、cADPRのセカンドメッセンジャーとしての作用が明確にされた<sup>15)</sup>。東北大学の岡本らは膵インシュリン分泌との関連でcADPRとその合成酵素等の生化学的研究を進めている<sup>16-20)</sup>。モノADPリボシル化との関係から、ADP-リボース(ADPR)合成酵素について、堅田らが研究している<sup>21-24)</sup>。最近、日本語で書かれた堅田による総説がこの分野を理解するのに役立つ<sup>25)</sup>。また、RyRとcADPRについてLeeの総説が出た<sup>26)</sup>。著者らは1987年にcADPRが発見されて以来、集積されてきた膨大なこの分野の中で、著者らの研究の中で最近得た、受容体によるcADPR産生のコントロール機構<sup>27, 28)</sup>について述べる。

## 5-2 cADPR

cADPRについて述べる前に、細胞内のNicotinamide adenine dinucleotide ( $NAD^+$ )とその主要代謝産物であるADPRについての全体像を知っておくことは意味がある。 $NAD^+$ 、中間代謝産物としてのcADPR、ADPRおよびタンパク質モノADP-リボシル化、ポリADP-リボシル化等はJacobsonらによって示された図1のような関係にある<sup>29-31)</sup>。

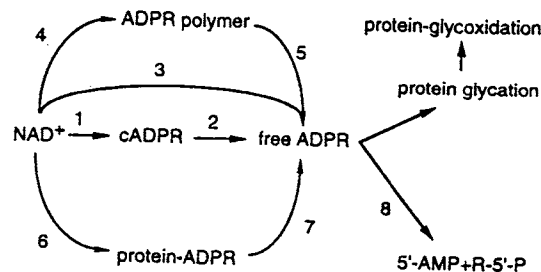


図1  $NAD^+$ 代謝の模式図

1は、ADP-ribosyl cyclase, 2はcADPR hydrolase, 3はNAD glycohydrolase, 4はpoly ADPR polymerase, 5はpoly ADPR glycohydrolase, 6はprotein ADPR transferase, 7はADPR hydrolase, 8はADPR pyrophosphataseの各酵素反応過程を示す。

cADPRは、ウニ卵にピリジンヌクレオチドである $\text{NAD}^+$ や $\text{NADP}^+$ を注入した時、 $\text{IP}_3$ とは独立に、HPLCにより分離される、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の動員を生じる物質として見出された<sup>13, 32, 33</sup>)。cADPRは $\text{NAD}^+$ の代謝産物中の活性物質で、NMRや質量分析によりその構造が決定された<sup>32, 34, 35</sup>)。cADPRの化学構造は図2に示すように、終末リボースの $\beta$ 位のCとアデニン環の1位のNが自身の分子内で結合し環状化している事が解った<sup>35</sup>)。cADPRは $\text{NAD}^+$ からニコチンアミドが切り出され小さくなるが、ADPRより1水分子分大きい物質で、酸性下で容易に水解する。ウニ卵で、cADPRには $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用があり、 $\text{NAD}^+$ やADPRにはないことが証明された<sup>8, 26</sup>)。一方、交感神経節細胞等にcADPRを注入しても、 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が生じない事が報告されている<sup>36</sup>)。我々は初期に、NG108-15神経腫瘍細胞にcADPRの注入による $\text{Ca}^{2+}$ の上昇を観察したが<sup>37, 38</sup>)、その後、膜電位固定法を用いた詳細な研究の結果、(1) cADPRは直接 $\text{Ca}^{2+}$ を遊離しないが、(2) 脱分極等により $\text{Ca}^{2+}$ 流入が先行していると、cADPRは $\text{Ca}^{2+}$ の上昇を増加させることがわかった<sup>39</sup>)。また最近、cADPR以外にも、 $\text{Ca}^{2+}$ の遊離を生じる物質として、cyclic ADP-ribose 2'-phosphate、dimeric ADP-riboseやnicotinic acid adenine dinucleotide phosphate等が見出されている<sup>40-42</sup>)。

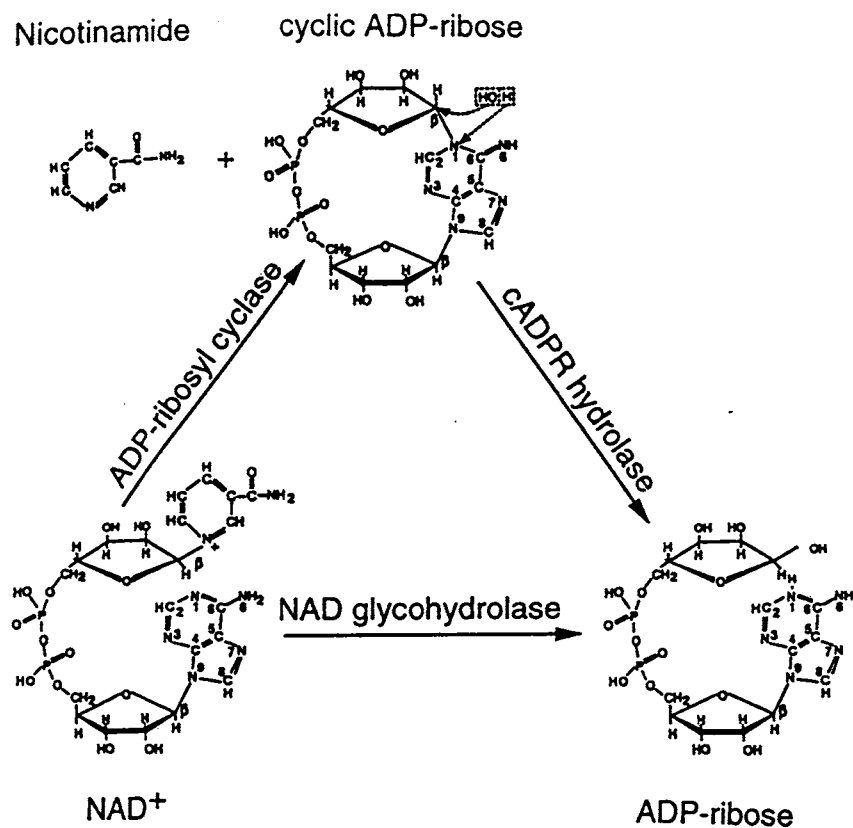


図2 NAD<sup>+</sup>、cADPRとADPRの化学構造とその代謝ステップに働く各酵素名



### 5-3 cADPR 受容体

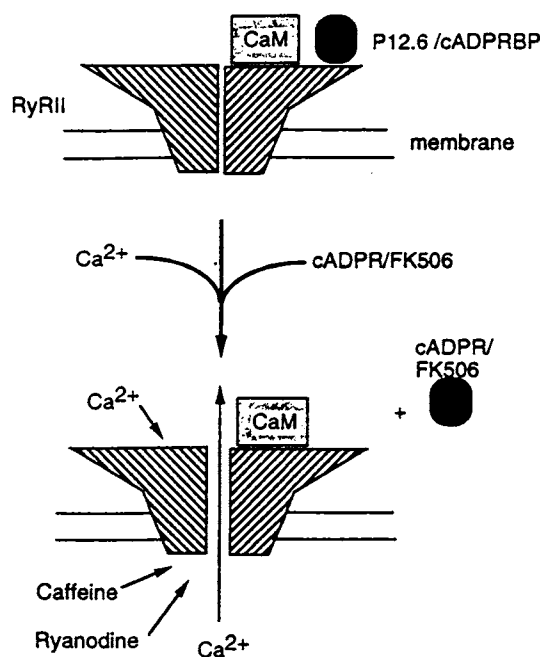
心臓から調整されたRyRを含む人工膜にcADPRを添加して、RyRのCa<sup>2+</sup>遊離チャンネルの開口率増加を観察した実験により、cADPRの作用がタイプII RyRの活性化であることが確立した<sup>43)</sup>。RyRの活性化には、ある濃度のCa<sup>2+</sup>が必要とされ<sup>44)</sup>、カルモジュリン分子もcADPRによるRyRからのCa<sup>2+</sup>遊離を増強する<sup>45)</sup> (図3)。

一方、骨格筋と心筋からRyRを精製中、免疫抑制剤として使われるFK506に対する結合タンパク質FKBP12とFKBP12.6が同時に精製されることがわかった<sup>46)</sup>。タイプIRyRにFKBP12が結合し<sup>47,48)</sup>、FK506の添加によりRyRからFKBP12が遊離し<sup>48)</sup> RyRが活性化する<sup>49-51)</sup>。

同様の様式がタイプII RyRにも考えられる。cADPRはFKBP12.6にKd値35nMで結合し、それはFK506の32nMと同等であることが示され<sup>52,53)</sup>、FK506の添加により、RyRタイプIIからのCa<sup>2+</sup>の遊離が生じる。また、FK506添加後、cADPRによる遊離が減少することにより、同一サイトに作用していることが示唆された。これらの事実からcADPRは、RyRに直接作用するのではなく、cADPR結合タンパク質を介して作用すると考えられる(図3)。FKBP12のカルチニューリンの結合部位が、IP<sub>3</sub>受容体では、N末端側の400-401番目のleucyl prolineであることが示され<sup>48)</sup>、タイプI RyRでは<sup>2458</sup>LRSLVPLDDL<sup>2468</sup>であることがわかった<sup>48,54)</sup>。このleucyl prolineの構造がFK506の構造と似ているため、FKBP12がFK506と結合し、IP<sub>3</sub>受容体(またはRyR)から遊離する事がCa<sup>2+</sup>チャンネルを開くと考えられている(図3)。

図3 cADPR受容体タンパク質とリアノジン受容体(RyR)

タイプII RyR(斜線)は、カルモジュリン(CaM)とcADPR受容タンパク質(P12.6/cADPRBP)と関連している。細胞内Ca<sup>2+</sup>の増加と、cADPRあるいはFK506の存在で、RyR Ca<sup>2+</sup>遊離チャンネルが開く。cADPRあるいはFK506の結合によりP12.6/cADPRBPは離れ、チャンネルの不活性化などが延長する<sup>78,79)</sup>。



#### 5-4 ADP-ribosyl cyclase

cADPRは酵素的に作られる。NAD<sup>+</sup>を基質として、ニコチンアミドの遊離と、アデニン環の1位のNとターミナルリボースの結合を行い環状化する<sup>26)</sup>。さらにこのcADPRは加水分解しADPRとなる。ADP-ribosyl cyclaseはこの2つの酵素活性を含む両機能性の酵素である。酵素は可溶分画と膜分画両方に存在することが知られている<sup>26,55)</sup>。可溶分画の酵素は、2量体で存在し、X線解析から保存されたポケット構造にNAD<sup>+</sup>が入り込む二次構造が推測された<sup>56)</sup>。リンパ球表面抗原であるCD38が、本酵素活性を持つことが両者間のホモロジーから見出された<sup>17, 19~27, 40, 43, 56)</sup>。実際、CD38はcyclaseとhydrolaseの2つの酵素活性を持ち、NAD<sup>+</sup>から直接ADPRを生じるNAD glycohydrolase活性も持ち合わせている<sup>21~23)</sup>。CD38の細胞外に突出していると考えられるN末端側に、よく保存された11個のcysteine残基があり、S-S結合通じて構造を保つのに役立っている<sup>56, 57)</sup>。119番目と201番目のcysteineを他のアミノ酸に置換したヒトCD38変異酵素では、hydrolase活性が消失しcyclase活性が残ることが示された<sup>57)</sup>。

#### 5-5 従来からのADP-ribosyl cyclaseの測定法と我々の開発した方法

産物であるcADPRとADPRを基質であるNAD<sup>+</sup>から分離する方法として、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が一般的に使われている<sup>13, 17, 19)</sup>。陰イオン交換樹脂 (例えばAGMP-1) をつめたカラムがよく使われる<sup>13)</sup>。HPLC法は一つのサンプルを分離するのに平衡化や洗いを含めて40分以上かかるため、多数のサンプルの測定には大変な時間がかかる。そこで我々は簡便な薄層クロマトグラフィー (TLC) による分離法を開発した。レジンとしてまず最初に、ポリエチレンイミンセルロースを用い、種々の展開液を試したが、cADPRとADPRの十分な分離はできなかった。ただし、ニコチンアミドの分離は、水：エタノール：炭酸水素アンモニウム (1：2：0.2M) やブタノール：酢酸：水 (2：1：1) やメタノール：酢酸アンモニウム (5：2) 等で、一番速く移動するのでNAD<sup>+</sup>からADPRへの分解活性を測定できた。

シリカゲルを用いると、スポットも局限し、分離が容易であった。種々の展開液を試み、水：エタノール：炭酸水素アンモニウム(NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>)を1：2：0.2 Mで使う場合、ADPR、cADPR、NAD<sup>+</sup>の順に移動し、基質として大量用いるNAD<sup>+</sup>やその他の最終産物 (例えばADP) の影響を少なくすること等、

最もよい分離が得られることがわかった<sup>27)</sup>。TLCによる分離は以前から試みられていたが<sup>15, 58)</sup>、我々の方法がいずれの方法よりも良かった。最近 Lee 等により、TLCによるcADPR量の測定が、HPLCやCa<sup>2+</sup>の遊離能で測定した値とほぼ同等の結果が出ると報告され、TLCによる測定が保証された格好となった<sup>55)</sup>。また、光学的にcyclic guanosine diphosphate-riboseの生成で測定する方法も考案されている<sup>59)</sup>。

酵素活性測定用の反応液 (20  $\mu$ l) は、50 mM Tris  $\cdot$  HCl (pH 6.5)、100 mM KCl、100  $\mu$  M CaCl<sub>2</sub>、2  $\mu$  M NAD<sup>+</sup>と0.11  $\mu$  M [<sup>3</sup>H]NAD<sup>+</sup>を含む<sup>27)</sup>。この反応液にNG108-15細胞の粗膜標品 (100K ペレット) を酵素源として1~20  $\mu$ g 加えると、最初の2~4分間は[<sup>3</sup>H]cADPRが直線的に増加し、以後ほぼ平衡に達するか、あるいはADPRへの分解により減少した。一方[<sup>3</sup>H]ADPRは測定した16分間直線的に増加した。従って、2  $\mu$  MのNAD<sup>+</sup>は反応液中飽和した量でないにしろ、数分の測定が可能な充分量である。

#### 5-6 神経腫瘍細胞膜に存在するADP-ribosyl cyclase

ADP-ribosyl cyclaseは細胞質および膜分画両方に存在する。アメフラシの場合、細胞質の活性は全活性の約30%である<sup>8,26,55)</sup>。全細胞ホモゲネートや細胞質に存在するcyclaseも測定できるが、内在性のNAD<sup>+</sup>を測定液中に持ち込むため、厳密には測定できない。膜成分は、よく洗浄すれば内在性のNAD<sup>+</sup>あるいは、(存在しているかもしれない本酵素の) モジュレーター等も除け、加えた基質濃度での酵素活性を測定できる。例えば、2  $\mu$  MのNAD<sup>+</sup>を用いて、神経腫瘍由来NG108-15細胞の活性を測定した<sup>27)</sup>。すなわち、NG108-15細胞膜分画のADP-ribosyl cyclase活性は、約230 pmol/分/mg タンパク質であった。同時に[<sup>3</sup>H]ADPRもほぼ同レベル生成した (296 pmol/分/mg タンパク質)。このことは、我々のインキュベーション条件下においてはNAD<sup>+</sup>がcADPRを経てADPRへ、ほぼ1:1のモル比で変換していることを示唆している。このことは、TLCのオートラジオグラフィでも確認した (図4)。

#### 5-7 cADPR産生の調節機構—我々の発見

cADPRの産生調節に関して、今まで2、3の説がある。例えば、膵臓ではグルコースの取り込みが上昇させるというものである (図5)。すなわち、

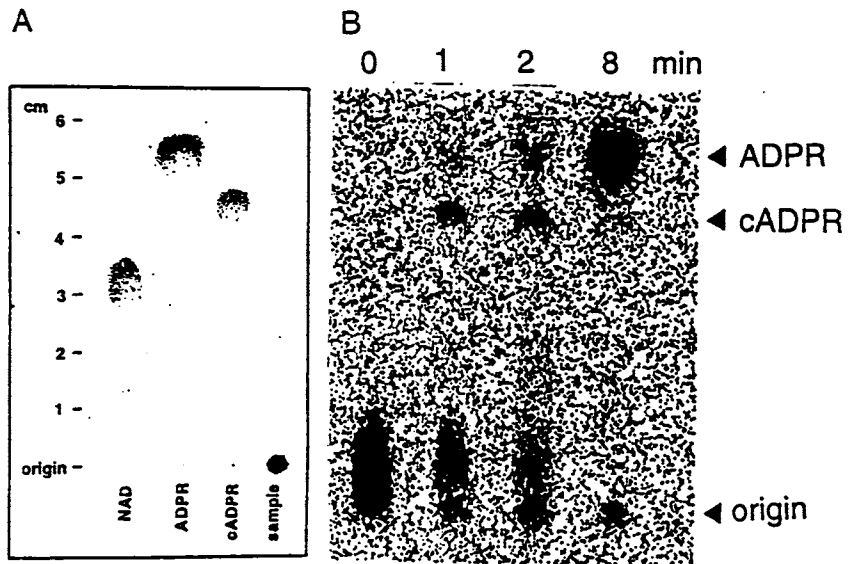


図 4 TLC による  $\text{NAD}^+$  関連分子の分離

A. プラスチックシリカゲル TLC シートによる標準品の分離。室温、40~80 分の展開後、紫外光で検出。

B.  $[^3\text{H}]\text{cADPR}$  と  $[^3\text{H}]\text{ADPR}$  を TLC にて分離後のオートラジオグラム。NG108-15 細胞膜画分を  $[^3\text{H}]\text{NAD}^+$  とインキュベートした時間(分)を上に表示す。

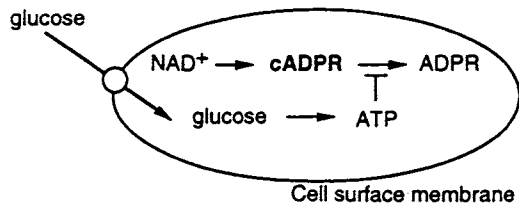


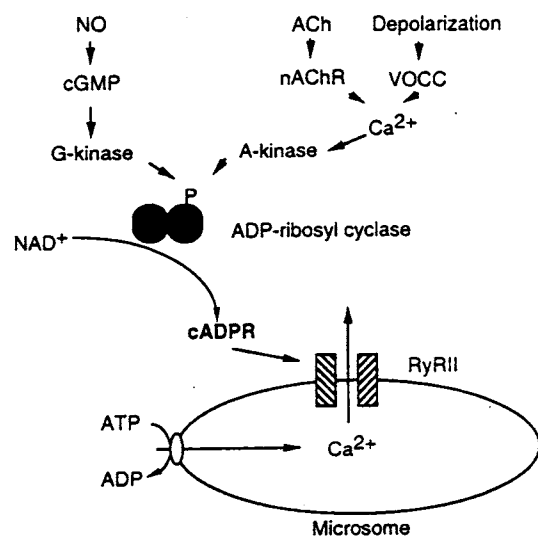
図 5 膵臓  $\beta$  細胞での cADPR 産生の増加を示す模式図

グルコースが丸で示したグルコーストランスポーターにより取り込まれた後 ATP が産生される。この ATP が cADPR hydrolase を抑制する結果、cADPR 濃度が増す。

グルコースからTCAサイクルの回転によりつくられるATPの生成上昇がcADPR水解酵素活性を抑制する結果cADPR産生量が増加する<sup>60)</sup>。ちなみに、東北大学の岡本らは、このcADPRによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がインシュリンの分泌を高めると考えている<sup>16, 20, 61)</sup>。Galioneらは、細胞質のADP-ribosyl cyclase活性がNOやcGMPにより上昇することを見出した<sup>15, 62)</sup>。cGMPやNO産生は、受容体のコントロールを受けているので、受容体によるcyclase制御も行われると推論した(図6)。哺乳動物のPC12褐色細胞腫では、アセチルコリンによる(たぶんニコチン受容体も含めた)受容体刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と膜脱分極刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がトリガーとなり、また、プロテインキナーゼAを介して、cADPR産生を上昇させることが報告された(図6)<sup>63)</sup>。その他の細胞でも、アゴニストによるコントロールを推測させるようなデータが出されたが<sup>64, 65)</sup>、決定的な証拠がなかった。そこで最近では、cADPRの産生量制御が受容体により行われれば、セカンドメッセンジャーとして、また内在物質により変調させられれば、モジュレーターとしての側面を持つと考えられるに至った<sup>26)</sup>。そこでcADPRのセカンドメッセンジャーとしての役割を確立するためには、古典的な受容体、例えば、アドレナリン受容体やムスカリン受容体(mAChR)などにより制御が行なわれていることの証明が待たれていた<sup>66)</sup>。私達はこの点に関して、一つの直接的証拠を見出したので次にそれを解説する<sup>27, 28)</sup>。

図6 ADP-ribosyl cyclaseのリン酸化によるcADPR産生の調節機構

アメフラシで示されたように<sup>15)</sup>、NOガスによるグアニル酸シクラーゼ活性の上昇に伴うcGMP増加が、Gキナーゼを活性化する。また、PC-12細胞では<sup>63)</sup>、アセチルコリン(ACh)や脱分極刺激が、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)や膜電位依存性 $Ca^{2+}$ チャンネル(VOCC)を介して流入した $Ca^{2+}$ が、Aシクラーゼを介しcAMP依存的キナーゼを活性化する。この両キナーゼによりリン酸化されたADP-ribosyl cyclaseがcADPRの産生を高め、小胞体(楕円でかかれた)  $Ca^{2+}$ の遊離を上方に調節する。丸は $Ca^{2+}$ 流入をつかさどる $Ca^{2+}$ -ATPase。



## 5-8 受容体-ADP-ribosyl cyclaseのカップリング

膜分画に存在するcyclaseが、どのような受容体によりどのように制御されているか知ることが一つの課題であった。我々は、幸いNG108-15細胞<sup>6,7)</sup>にmAChR<sup>6,8)</sup>のm1、m2、m3、m4サブタイプ<sup>6,9-7,1)</sup>をそれぞれ別々に発現している細胞株<sup>7,2)</sup>を持っていたので、それぞれのサブタイプによるcyclase活性に対する効果を観察することにした<sup>2,7)</sup>。

まず、NG108-15細胞はm4サブタイプを内在性のmAChRとして持っているが、この細胞膜分画をカルバミルコリン(CCh)とインキュベートすると活性は約半分に抑制された。脳型M1に対応するm1 mAChRを大量発現する(内在性のm4も保持しているが)細胞では、CChの投与により、約2.5~3倍の活性上昇が生じた。さらにm2とm4サブタイプの大量発現により抑制、m3サブタイプの発現により活性化を観察した。これはアデニレートシクラーゼと抑制的にカップルするm2/m4とホスホリパーゼCにカップルするm1/m3 mAChRsという以前この細胞で示されたカップリング様式と類似していた。m1/m3による活性化とm2/m4による抑制は、GTPによりそれぞれ再現されたので、GTP結合タンパク質の関与が考えられた。そこで、コレラ毒素(CTx)および百日咳毒素(PTx)で前処理した細胞で、CChの効果のみたところ、CTxにより活性化は消失したが抑制には無影響であった。逆にPTxは抑制効果を消失させ、PTxに感受性のある活性化の程度は小さくなったが有意に上昇したままで保たれた。以上この結果の一番単純な解釈は、抑制にはGi/GoタイプのGタンパク質、活性化にはCTxに感受性のあるGsタイプのGタンパク質が絡んでいることであるが(図7)、実際どのGタンパク質が関与しているのかは今後の詳細な研究が必要である。

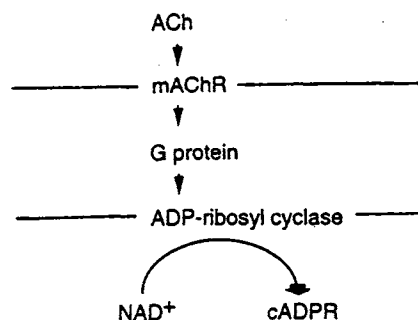


図7 NG108-15細胞表面膜内でのADP-ribosyl cyclaseの調製

アセチルコリンの投与がムスカリン受容体とGタンパク質を介して、ADP-ribosyl cyclaseへカップルしている様子を示す。

## 5-9 細胞内NAD<sup>+</sup>濃度の減少

膜分画に存在するADP-ribosyl cyclase活性をもつ分子として、現在CD38<sup>73, 74)</sup>やBST-1<sup>18)</sup>が同定されている。これらの分子の活性部位は、細胞外に面しており<sup>56, 57)</sup>、この構造では、細胞内物質としてのNAD<sup>+</sup>から細胞内物質としてのcADPRが作られると考えるには、非常な無理が生じる。この矛盾を解く考え方は、アストログリア細胞で示されるように<sup>75)</sup>、(1) 細胞外で作用するcADPRを細胞外でつくと、そのまま単純に考えるか、(2) 外で作られたcADPRが細胞内へ移行するか、(3) CD38ないしそのアイソフォーム酵素で細胞内に触媒サイトを持つものが存在する<sup>61, 76)</sup> と考えるかどちらかである。

従って、膜分画に存在するADP-ribosyl cyclaseのトポロジーから、細胞表面の外側にその活性部位を持つか、それとも内側に持つかはcADPRをセカンドメッセンジャーと考える上に大変重要なポイントであることがわかる。この点に関してmAChRとカップルするcyclaseが細胞内酵素であるか細胞外酵素であるか決める実験を細胞内NAD<sup>+</sup>濃度を測定することにより行った<sup>27)</sup>。m1サブタイプmAChRを発現する生きているNG108-15細胞にCChを細胞外に投与し、15、30、60、120秒後にNAD<sup>+</sup>濃度を測定した。NAD<sup>+</sup>濃度は15~60秒後に、一過性の減少を生じた。NAD<sup>+</sup>が活性化されたADP-ribosyl cyclaseにより、消費されたためと考えられる。この時間経過は、ホスホリパーゼCを活性化するブラジキニンによりホスファチジルイノシトール4,5二リン酸が減少した経過と大変よく似ていた<sup>77)</sup>。このことから、cADPRを産生するための基質としての細胞内NAD<sup>+</sup>が使われたということは、受容体とカップルするcyclaseは、他の可能性よりは、細胞内に酵素触媒部位を持つと判断した<sup>27)</sup>。

## 5-10 おわりに

細胞内のcADPR濃度の調節機構について、最近著者らの発見を述べた。その内容は細胞表面膜内で受容体-Gタンパク質-ADP-ribosyl cyclaseへと情報が伝わり、cADPRの産生をコントロールしていることである。これは、サイクリックAMPやIP<sub>3</sub>で知られている変換機構と同じである(図8)<sup>28)</sup>。この我々の仮説は、cADPRが受容体の下流でセカンドメッセンジャーとして作用するとするCa<sup>2+</sup>バイオシグナリング上はじめての酵素学的証拠であった。その後、ラット心臓心室筋細胞膜<sup>80)</sup>と、神経系のアストログリア細胞膜に存在する

$\beta$ アドレナリン性受容体が、この経路を利用していることを証明した。交感神経興奮に心筋収縮増強作用・cADPR から説明できることを図9に示してある。またcADPRが、Caリアノジン受容体からのCa動員を生じた後、リアノジン受容体そのものや、L型Caチャネルをさらに活性化すること (図10) を見出した<sup>82)</sup>。

図8 NG108-15細胞での膜内情報変換様式

受容体-Gタンパク質への情報は、それぞれADP-ribosyl cyclase, ホスホリパーゼCやアデニル酸シクラーゼなどのエフェクター酵素に伝えられcADPR, IP<sub>3</sub>/ジアシルグリセロール(DG)やcAMPの濃度を変える。

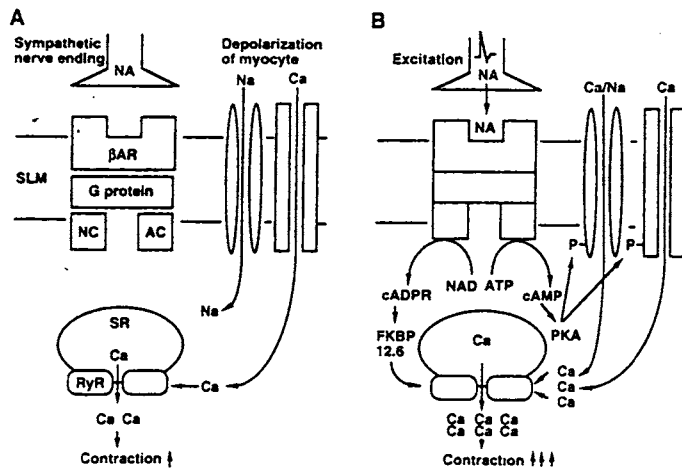
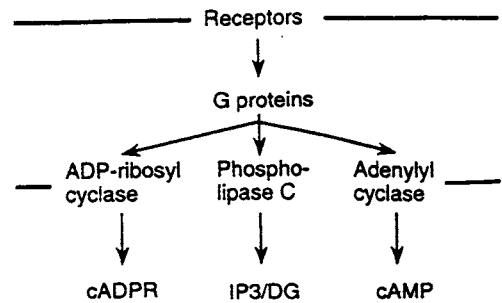


図9. 交感神経興奮によりひき起こされる心室筋収縮増強作用をcADPR産生ルートを加えて説明する概念図

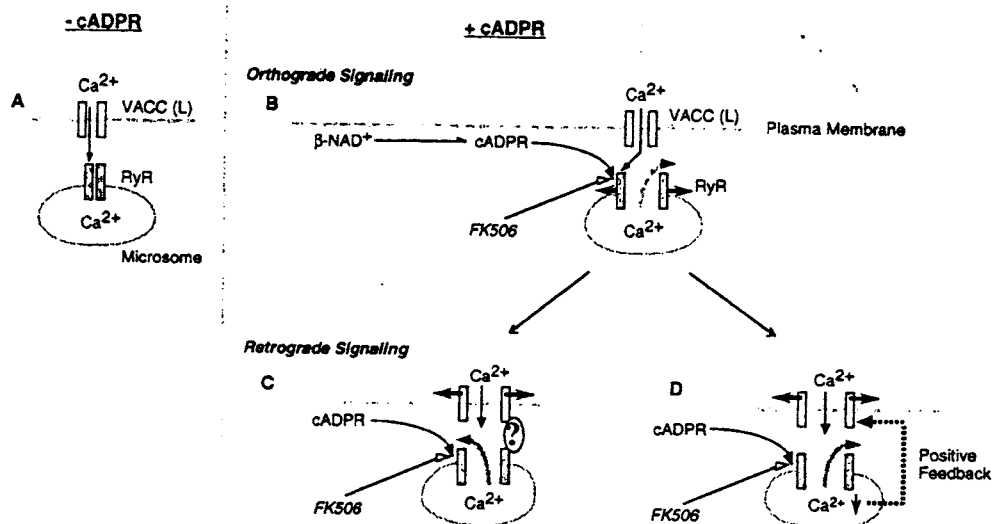


図10. cADPR存在下による、リアノジン受容体の活性化とL型Caチャネルの活性化を示す模式図



5 - 1 1 文献

1. Furuichi, T & Mikoshiba, K. (1995) *J. Neurochem.* **64**, 953-960.
2. Endo, M. (1977) *Physiol. Rev.* **57**, 71-108.
3. Takashima, H. (1993) *Ann. New York Acad. Sci.* **707**, 165-177.
4. Sutko, J. L. & Airey J. A. (1996) *Physiol. Rev.* **76**, 1027-1071.
5. 小川靖男、村山尚. (1995) *Folia Pharmacol. Jpn.* **105**, 423-430.
6. Takeshima, H. Iino, M., Takekura, H., Nishi, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H. & Noda, T. (1994) *Nature* **369**, 556-559.
7. Walker, D. & De Waard, M. (1998) *Trends Neurosci.* **21**, 148-154.
8. Lee, H. C. (1996) In *Ryanodine Receptors* (Sorrentino, V. ed.) pp31-50, CRC Press, Boca Raton.
9. Berridge, M. J. (1997) *J. Physiol.* **499**, 291-306.
10. Nohmi, M., Hua, S.-Y. & Kuba, K. (1992) *J. Physiol.* **450**, 513-528.
11. Hirose, K. & Iino, M. (1994) *Nature* **372**, 791-794.
12. Tanabe, T., Beam, K. G., Powell, J. A. & Numa, S. (1988) *Nature* **336**, 134-139.
13. Clapper, D. L., Walseth, T. F., Dargie, P. J. & Lee, H. C. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 9561-9568.
14. Lee, H. C. & Aarhus, R. (1991) *Cell Regul.* **2**, 203-209.
15. Galione, A., White, A., Willmott, N., Turner, M., Potter, B. V. L. & Watson, S. T. (1993) *Nature* **365**, 456-459.
16. Takasawa, S., Nata, K., Yonekura, H. & Okamoto, H. (1993) *Science* **259**, 370-373.
17. Takasawa, S., Tohgo, A., Noguchi, N., Koguma, T., Nata, K., Sugimoto, T., Yonekura, H. & Okamoto, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26052-26054.
18. Hirata, Y., Kimura, N., Sato, K., Ohsugi, Y., Takasawa, S., Okamoto, H., Ishikawa, J., Kaisho, T., Ishihara, K. & Hirano, T. (1997) *FEBS Lett.* **356**, 244-248.
19. Okamoto, H., Takasawa, S., Tohgo, A., Nata, K., Kato, I. & Noguchi, N. (1997) *Methods Enzymol.* **280**, 306-318.
20. Takasawa, S., Akiyama, T., Nata, K., Kuroki, M., Tohgo, A., Noguchi, N., Kobayashi, S., Kato, I., Katada, T. & Okamoto, H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2497-2500.
21. Nishina, H., Inageda, K., Takahashi, K., Hoshino, S., Ikeda, K. & Katada, T. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1318-1323.
22. Hara-Yokoyama, M., Kukimoto, I., Nishina, H., Kontani, K., Hirabayashi, Y., Irie, F., Sugiyama, H., Furuyama, S. & Katada, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 12951-12955.
23. Kukimoto, I., Hoshino, S., Kontani, K., Inageda, K., Nishina, H., Takahashi, K. & Katada, T. (1996) *Eur. J. Biochem.* **239**, 177-182.
24. Kontani, K., Kukimoto, I., Nishina, H., Hoshino, S., Hazeki, O., Kanaho, Y. & Katada, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 1534-1537.

25. 堅田利明、仁科博史、高橋勝宣、星野真一、紺谷圈二、前濱朝彦、柗元巖. (1950) *蛋白質・核酸・酵素* 40, 1900-1911.
26. Lee, H. C. (1997) *Physiol. Rev.* 77, 1027-1071.
27. Higashida, H., Yokoyama, S., Hashii, M., Taketo, M., Higashida, M., Takayasu, T., Ohshima, T., Takasawa, S., Okamoto, H. & Noda, M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 31272-31277.
28. Higashida, H. (1997) *FEBS Lett.* 418, 355-356.
29. Cervantes-Laurean, D., Minter, D. E., Jacobson, E. L. & Jacobson, M. K. (1993) *Biochem.* 32, 1528-1534.
30. Kim, H., Jacobson, E. L. & Jacobson, M. K. (1993) *Science* 261, 1330-1333.
31. Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E. L. & Jacobson, M. K. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 10461-10469.
32. Lee, H. C., Walseth, T. F., Bratt, G. T., Hayes, R. N. & Clapper, D. L. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 1608-1615.
33. Lee, H. C., Aarhus, R. & Walseth, T. F. (1993) *Science* 261, 352-355.
34. Rusinko, N. & Lee, H. C. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 11725-11731.
35. Lee, H. C., Aarhus, R., Levitt, D. (1994) *Nature Struct. Biol.* 1, 143-144.
36. Hua, S.-Y., Tokimasa, T., Takasawa, S., Furuya, Y., Nohmi, M., Okamoto, H. & Kuba, K. (1994) *Neuron* 12, 1073-1079.
37. Ishizaka, N., Noda, M., Kimura, Y., Hashii, M., Fukuda, K., Katayama, M., Brown, D. A. & Higashida, H. (1995) *Pflügers Archiv* 429, 426-433.
38. Higashida, H., Robbins, J., Egorova, A., Noda, M., Taketo, M., Ishizaka, N., Takasawa, S., Okamoto, H. & Brown, D. A. (1995) *J. Physiol.* 482, 317-323.
39. Hashii, M., Minabe, Y. & Higashida, H. (1998) *FEBS Lett.* in press.
40. Aarhus, R., Graeff, R. M., Dickey, D. M., Walseth, T. F. & Lee, H. C. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 30327-30333.
41. De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Bruzzone, S., Benatti, U., Damonte, G. & Lee, H. C. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12945-12951.
42. Genazzani, A. A., Empson, R. M. & Galione, A. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 11599-11602.
43. Mészáros, L. G., Bak, J. & Chu, A. (1993) *Nature* 364, 76-79.
44. Sitsapesan, R., McGarry, S. J. & Williams, A. J. (1995) *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 386-391.
45. Lee, H. C., Aarhus, R., Graeff, R., Gurnack, M. E. & Walseth, T. F. (1994) *Nature* 370, 307-309.
46. Timerman, A. P., Onoue, H., Xin, H.-B., Barg, S., Copello, J., Wiederrecht, G. & Fleischer, S. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 20385-20391.
47. Wagenknecht, T., Radermacher, M., Grassucci, R., Berkowitz, J., Xin, H.-B. & Fleischer, S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 32463-32471.

48. Cameron, A. M., Nucifora, F. C. Jr., Fung, E. T., Livingston, D. J., Aldape, R. A., Ross, C. A. & Snyder, S. H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27582-27588.
49. Brillantes, A.-M. B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasová, E., Moschella, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E. & Marks, A. R. (1994) *Cell* **77**, 513-523.
50. Ahern, G. P., Junankar, P. R. & Dulhunty, A. F. (1997) *Biophys. J.* **72**, 146-162.
51. Snyder, S. H. & Sabatini, D. M. (1995) *Nature Medicine* **1**, 32-37.
52. Lam, E., Martin, M. M., Timerman, A. P., Sabers, C., Fleischer, S., Lukas, T., Abraham, R. T., O'Keefe, S. J., O'Neill, E. A. & Wiederrecht, G. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26511-26522.
53. Noguchi, N., Takasawa, S., Nata, K., Tohgo, A., Kato, I., Ikehata, F., Yonekura, H. & Okamoto, H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 3133-3136.
54. Jayaraman, T., Brillantes, A.-M., Timerman, A. P., Fleischer, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Marks, A. R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9474-9477.
55. Graeff, R. M., Franco, L., De Flora, A. & Lee, H. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 118-125.
56. Prasado, G. S., McRee, D. E., Stura, E. A., Levitt, D. G., Lee, H. C. & Stout, C. D. (1996) *Nature Structur. Biol.* **3**, 957-964.
57. Tohgo, A., Takasawa, S., Noguchi, N., Koguma, T., Nata, K., Sugimoto, T., Furuya, Y., Yonekura, H. & Okamoto, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 28555-28557.
58. Mészáros, V., Socci, R. & Mészáros, L. G. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 452-456.
59. De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Pestarino, M., Usai, C., Marchetti, C., Fedele, E., Fontana, G. & Raiteri, M. (1996) *Biochem. J.* **320**, 665-672.
60. Tohgo, A., Munakata, H., Takasawa, S., Nata, K., Akiyama, T., Hayashi, N. & Okamoto, H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 3879-3882.
61. Kato, I., Takasawa, S., Akabane, A., Tanaka, O., Abe, H., Takamura, T., Suzuki, Y., Nata, K., Yonekura, H., Yoshimoto, T. & Okamoto, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 30045-30050.
62. Willmott, N., Sethi, J. K., Walseth, T. F., Lee, H. C., White, A. M. & Galione, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 3699-3705.
63. Morita, K., Kitayama, S. & Dohi, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21002-21009.
64. Kuemmerel, J. F. & Makhoulouf, G. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25488-25494.
65. Beers, K. W., Chini, E. N., Lee, H. C. & Dousa, T. P. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, C741-C746.
66. Berridge, M. J. (1993) *Nature* **365**, 388-389.
67. Nirenberg, M., Wilson, S., Higashida, H., Rotter, A., Krueger, K., Busis, N., Ray, R., Kenimer, J. G. & Adler, M. (1983) *Science* **222**, 794-799.
68. Haga, K. & Haga, T. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7927-7935.

69. Kubo, T., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takahashi, H., Mishina, M., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. & Numa, S. (1986) *Nature* **323**, 411-416.
70. Kubo, T., Maeda, A., Sugimoto, K., Akiba, I., Mikami, A., Takahashi, H., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T. & Numa, S. (1986) *FEBS Lett.* **209**, 367-372.
71. Kubo, T. (1993) *Ann. New York Acad. Sci.* **707**, 210-224.
72. Fukuda, K., Higashida, H., Kubo, T., Maeda, A., Akiba, I., Bujo, H., Mishina, M. & Numa, S. (1988) *Nature* **335**, 355-358.
73. Mehta, K., Shahid, U. & Malavasi, F. (1996) *FASEB J.* **10**, 1408-1417.
74. Lund, F. E., Cockayne, D. A., Randall, T. D., Solvason, N., Schuber, F. & Howard, M. C. (1998) *Immunol. Rev.* **161**, 79-93.
75. Pawlikowska, L., Cottrell, S. E., Harms, M. B., Li, Y. & Rosenberg, P. A. (1996) *J. Neurosci.* **16**, 5372-5381.
76. Zocchi, E., Daga, A., Usai, C., Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Costa, A., Marchetti, C. & De Flora, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8017-8024.
77. Yano, K., Higashida, H., Inoue, R. & Nozawa, Y. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10201-10207.
78. Xiao, R.-P., Valdivia, H. H., Bogdanov, K., Valdivia, C., Lakatta, E. G. & Cheng, H. (1997) *J. Physiol.* **500**, 343-354.
79. Lukyanenko, V., Wiesner, T. F. & Györke, S. (1998) *J. Physiol.* **507**, 667-677.
80. Higashida, H., Egorova, A., Higashida, C., Zhong, Z.-G., Yokoyama, S., Noda, M., & Zhang, J.-S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 33348-33354.
81. Hotta, T., Asai, K., Fujita, K., Kato, T. & Higashida, H. (2000) *J. Neurochem.* **74**, 669-675.
82. Hashii, M., Minabe, Y. & Higashida, H. (2000) *Biochem. J.* **345**, 207-215.

## 6 研究成果 (英語版)

# **Cyclic ADP ribose as the second messenger in the nervous system revisited from new aspects in signal transduction from receptors to ADP-ribosyl cyclase**

Haruhiro Higashida, Minako Hashii, Shigeru Yokoyama,  
and Naoto Hoshi

*Department of Biophysical Genetics, Molecular Medicine and Bioinformatics,  
Kanazawa University Graduate School of Medicine, Kanazawa 920-8640, Japan*

Correspondence to H. Higashida: Department of Biophysical Genetics, Molecular Medicine and Bioinformatics, Kanazawa University Graduate School of Medicine, 13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-8640, Japan.

e mail: haruhiro@med.kanazawa-u.ac.jp telephone: +81-76-265-2455 fax: +81-76-234-4236

### **Abstract:**

Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in neuronal tumor cells or  $\beta$ -adrenergic receptors in cortical astrocytes and ventricular myocytes utilize the direct signaling pathway to ADP-ribosyl cyclase within cell membranes to produce cyclic ADP-ribose (cADPR) from  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>. This signal cascade is analogous to the previously established transduction pathways from hormone or neurotransmitter receptors to adenylyl cyclase and phospholipase C $\beta$  via G proteins. Upon receptor stimulation, the newly formed cADPR may coordinately function to upregulate the release of Ca<sup>2+</sup> from the type II ryanodine receptors (orthograde signaling) as well as to facilitate Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels (retrograde signaling). cADPR interacts with an immunosuppressant FK506 at either the FK506 binding protein FKBP12.6, calcineurin, or ryanodine receptors. Thus, the receptor-controlled and cADPR-dependent modulation in neuronal Ca<sup>2+</sup> signaling may induce various responses in soma and dendrites of neurons and glial cells.

**Key Words:** NAD<sup>+</sup>, ryanodine receptors, Ca<sup>2+</sup> signaling, muscarinic receptors, adrenergic receptors, sympathetic stimulation, glial cells

## Introduction

Increase in intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  is a signal for various cellular responses. An elevation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) results either from  $\text{Ca}^{2+}$  entry or  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. In the latter case, inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ) opens  $\text{Ca}^{2+}$  release channels of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  receptors (Berridge & Irvine, 1989; Furuichi & Mikoshiba, 1995). The increased  $\text{Ca}^{2+}$  can induce further release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the second  $\text{Ca}^{2+}$  pool which is ryanodine and caffeine sensitive (Endo, 1977). This mechanism is called  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR), in which  $\text{Ca}^{2+}$  release channels of ryanodine receptors are involved even in neurons (Kuba, 1994).

Ryanodine receptors are consisted of homotetrameric peptides whose molecular mass of one subunit is about 500-560 kDa (Takekshima et al., 1989). Three isoforms of ryanodine receptors are known (see Serentino, 1995). Type I is mainly localized in skeletal muscle, and type II in cardiac muscle, while in the nervous system type II is the main ryanodine receptor, but type I and III are also found (Furuichi et al., 1994). In skeletal muscle cells, type I receptors are concentrated in sarcoplasmic reticulum (SR) membrane and forms the "foot" structure (Iino, 1999). Influx of  $\text{Ca}^{2+}$  through L type voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels upon depolarization increases cellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Catterall, 1993), subsequently this  $\text{Ca}^{2+}$  activates CICR, which results in muscle contraction (Tanabe et al., 1990). This sequence is called "excitation-contraction coupling". To coordinate  $\text{Ca}^{2+}$  amplification more efficiently, the physical contact between L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and the skeletal-muscle isoforms (type I) ryanodine receptors is estimated (Nakai et al., 1996 and 1998).

On the other hand, no direct protein-protein coupling has been reported between other type of ryanodine receptors and  $\text{Ca}^{2+}$  channels. However, in neuronal cells, a link from N- or L-type voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels to ryanodine receptors ("an orthograde signal") (Davies et al., 1996; Empson & Galione, 1997) and functional coupling from ryanodine receptors to L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels ("a retrograde signal") have been reported (Chavis et al., 1996). The molecular mechanism and responsible second messengers for such functional interactions are not yet clear.

Very recently, however, we have demonstrated that cyclic ADP ribose (cADPR) is involved in these bidirectional coupling between ryanodine receptors and voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian neuronal cells (Hashii et al., 2000). In order to stress this cADPR-dependent process as an important signaling in the nervous system, we have attempted to overview the role of cADPR in neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  signaling from a new view point of receptor-controlled cADPR synthesis by ADP-ribosyl cyclase.

## Cyclic ADP ribose

Before starting description of cADPR, for better understanding, I show the intracellular whole feature of  $\text{NAD}^+$  and its metabolites. It is known the starting reactions of  $\text{NAD}^+$  as the substrate, conversion to cADPR and ADPR as intermediate metabolites, mono- and poly-ADP-ribosylation of proteins, and the metabolic fate of ADPR. This figure is modified from the original figure described by Jacobson and his group (1993 and 1996). Enzymes involved in each step are listed in the figure

legend. cADPR is synthesized by ADP-ribosyl cyclase from  $\text{NAD}^+$  and metabolized to ADPR by cADPR hydrolase in the nervous system (Lee and Aarhus, 1993), including cerebellar granule cells (De Flora et al., 1996), cortical astrocytes (Pawlikowska et al., 1996; Hotta et al., 2000), and neuronal tumor cells (Higashida et al., 1997; Morita et al., 1997).

cADPR is first isolated as a substance, which mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  from the microsome fraction prepared from sea urchin eggs that has been injected with  $\text{NAD}^+$  (Clapper et al., 1987; Lee et al., 1989). cADPR is not the same class of inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{InsP}_3$ ) and nicotinic acid adenine dinucleotide, a metabolite of  $\text{NADP}^+$  by the same ADP-ribosyl cyclase (Wilson and Galione, 1998), in that cADPR targets ryanodine receptors to release  $\text{Ca}^{2+}$ , while  $\text{InsP}_3$  mostly targets  $\text{InsP}_3$  receptors (Clapper et al., 1987; Takasawa et al., 1993 and 1998; Lee, 1997). The molecular structure of cADPR was determined by NMR, mass spectroscopy, and X-ray crystallography in 1994 (Lee et al.).

The first carbon in the terminal ribose and the first nitrogen in the adenine are linked in the  $\beta$ -conformation. Nicotinamide is cleaved out from  $\text{NAD}^+$  and molecular mass of the rest part, cADPR, is larger by one  $\text{H}_2\text{O}$  than ADPR. Hydrolysis of the N1-glycosidic linkage by addition of a water molecule occurs spontaneously in acidic condition (pH 2) with  $t_{1/2}$  of 24 h or immediately by cADPR hydrolase.

cADPR, but not  $\text{NAD}^+$  and ADPR, can release  $\text{Ca}^{2+}$  from  $\text{Ca}^{2+}$  pools with whole cell homogenates of sea urchin eggs (Lee et al., 1989; Galione et al., 1991). In intact sympathetic ganglion neurons, however, simple infusion of cADPR does not immediately mimic  $\text{Ca}^{2+}$  rise, but slowly enhances the  $\text{Ca}^{2+}$  increase evoked by depolarization (Hua et al., 1994). The authors have previously reported that cADPR injection into neuroblastoma-derived cells increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (Ishizaka et al., 1995; Higashida et al., 1995). But, later, more careful experiments carried out under the voltage-clamp condition of neuroblastoma cells revealed that, though cADPR does not trigger  $\text{Ca}^{2+}$  release at the resting membrane potential of -60 to -40 mV, it can release  $\text{Ca}^{2+}$  when cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increase is preconditioned by depolarization (Hashii et al., 2000). In this sense, at least in neurons, cADPR is unlike to directly act as the 'primary' agonist for the  $\text{Ca}^{2+}$  release.

Based on the observation that addition of cADPR to membranes prepared from ventricular myocytes increases open probability of  $\text{Ca}^{2+}$  release channels (Meszaros et al., 1993), it is clear that cADPR targets type II ryanodine receptors (Clementi et al., 1996). Activation of ryanodine receptors requires a certain level of  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations, suggesting that the primary ligand is  $\text{Ca}^{2+}$  and cADPR is the 'secondary' ligand, as suggested by Sitsapesan et al. (1995). Calmodulin is another factor which potentiates cADPR-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from ryanodine receptors (Lee et al., 1993; Lee et al., 1994), suggesting that some accessory proteins can be involved in modulation of the ryanodine receptor function.

### **cADPR binding proteins**

Originally it is thought that cADPR binds directly to ryanodine receptors to initiate its function. On the other hand there is an accumulating evidence to indicate that cADPR may function through its

specific binding proteins. FKBP12 or FKBP12.6, the binding proteins for FK506 of an immunosuppressant drug, is copurified during purification of ryanodine receptors from skeletal or cardiac muscle cells (Jayaraman et al., 1992; Brillantes et al., 1994; Lam et al., 1995; Timerman et al., 1996). Association of FKBP12 to the cytoplasmic face of skeletal type (type I) ryanodine receptors blocks channel activity in planar lipid bilayers (Chen et al., 1994). FKBP12 (Ahern et al., 1997a and 1997b) or FKBP12.6 associated with ryanodine receptors (Xin, et al., 1999) is dissociated by FK506- or rapamycin-addition to the reaction mixture, which in turn activates ryanodine receptors (Ahern et al., 1997a and 1997b; Barg et al., 1976; Kaftan et al., 1976).

cADPR binds to FKBP12.6 with the  $K_d$  value of about 35 nM, which is the same value as 32 nM for FK506 nM (Noguchi et al., 1997). Upon FK506 addition,  $Ca^{2+}$  is released from type II ryanodine receptors. Pretreatment with FK506 of ryanodine receptors decreases cADPR-induced  $Ca^{2+}$  release, suggesting that cADPR and FK506 interact at the same site on FKBP12.6 (Fig. 4). Therefore, it is highly possible that cADPR functions on type II ryanodine receptors indirectly through FKBP12.6 rather than direct binding to ryanodine receptors, at least in some tissue such as pancreatic islet and cardiac muscle cells. There is no evidence to show on which site cADPR acts in neuron and glia cells.

It has been shown that FKBP12 and calcineurin bind at the 1400th and 1401st leucyl proline of InsP3 receptors (Cameron et al., 1997) and at 2458LSLVPLDDL2468 in type I ryanodine receptors (Jayaraman et al., 1992). Molecular configuration of leucyl proline resembles that of FK506. In the presence of FK506, thus, FKBP12 dissociates from ryanodine receptors and tends to bind with FK506.

The precise mechanism how cADPR potentiates  $Ca^{2+}$  release is not completely clear. However, recently, one possibility has been shown that removal of FKBP12 from ryanodine receptors tends to delay the inactivation (closure) process (Xiao et al., 1997). This helps ryanodine receptor channels to keep at the open state for long time, which can contribute to an accelerated increase of cytosolic  $Ca^{2+}$ . In sum, two steps of regulation are estimated in  $Ca^{2+}$  release from ryanodine receptors: (1)  $Ca^{2+}$  as the direct key factor for opening channels. (2) Once opened, channels retains at the "open" state by cADPR. Such dual regulation of ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  release channels enables to perform finer control.

### **ADP-ribosyl cyclase and CD38**

cyclic ADP-ribose is synthesized enzymatically (Rushinko and Lee, 1989). ADP-ribosyl cyclase catalyzes both synthesis of cADPR from  $NAD^+$  associated with release of nicotinamide from  $NAD^+$ . In addition to this bifunctional enzyme action, ADP-ribosyl cyclase directly synthesizes ADPR from  $NAD^+$ , known as NAD glycohydrolase. NAD glycohydrolase is known to be present in the nervous system for long time, being its function unclear (Snell et al., 1984). ADP-ribosyl cyclase is localized at both membrane and cytosolic fractions. In *Aplysia*, ADP-ribosyl cyclase activity in the cytosole is only 30% and 70% of the total activity is recovered in the membrane fraction (Lee, 1997). The



specific activity of ADP-ribosyl cyclase in the membrane fractions prepared from NG108-15 neuroblastoma x glioma cells and rat ventricular muscle cells is 230 and 3700 pmol/min/mg of protein, using 2  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]NAD $^+$  as the substrate (Higashida et al., 1997 and 1999). [ $^3\text{H}$ ]ADPR was also formed at the same level, suggesting that one molar of NAD $^+$  is converted to one molar of ADPR via cADPR stoichiometrically in these membranes.

Dimeric ADP-ribosyl cyclase in the soluble fraction has a conserved pocket structure for NAD $^+$  which is the catalytic domain estimated from X-ray analysis of the crystallized enzyme of *Aplysia* (Prasad et al., 1996). This enzyme is highly homologous to CD38, the mammalian T cell surface marker (Howard et al., 1993). CD38 is a type II transmembrane glycoprotein of 46 kDa. CD38 is a bifunctional enzyme catalyzing both synthesis of cADPR and hydrolysis of cADPR (Takasawa et al., 1993; Katada et al., xxxx). Both enzyme activities of CD38 are located at the extracellular region of the amino terminus. It has been shown that 11 cysteine residues conserved between *Aplysia*'s enzyme and CD38 may function to keep the higher structure by their disulfide bonds. Out of 6 additional cysteines, residue 119 and 201 found in human CD38 but not in the *Aplysia*'s protein, are involved in the cADPR hydrolase reaction (Tohgo et al., 1994).

Serious questions to be answered are how intracellular NAD $^+$  supply to the extracellular catalytic site of ADP-ribosyl cyclase of CD38 and how cADPR formed outside the cell functions as the intracellular second messenger. Because NAD $^+$  is the abundant intracellular substance at submolar concentrations, but usually not richly present in the extracellular space. For this contradiction, De Flora and her group (1998 and 1999) have reported that dimeric CD38 or CD38 internalization can function as a transporter of cADPR and NAD $^+$ . Another suggestion is made from the results in transgenic mice of CD38 (Kato et al., 1995). In CD38-overexpressed islet cells of such mice, ADP-ribosyl cyclase activity is found at intracellular membrane compartments as well, suggesting that even the membrane-bound ADP-ribosyl cyclase can form cADPR inside the cells. The last idea is to estimate an isoform whose topology is different from CD38, in that its catalytic domain locates inside.

### **Control of cytosolic ADP-ribosyl cyclase**

It has been shown that the formation of cADPR is enhanced by nitric oxide (NO) and cyclic GMP in homogenates of sea urchin eggs (Galione et al., 1993). Since NO and cyclic GMP are formed in response to hormones and neurotransmitters, it is speculated that the cADPR level could be controlled by receptors through a long cascade until reaching to the activation of cytosolic ADP-ribosyl cyclase by cyclic GMP-dependent protein phosphorylation (Clementi et al., 1996; Willmott et al., 1996), according to the original propose by Berridge (1993).

### **Control of membrane bound form of ADP-ribosyl cyclase**

The typical pathway in mammalian cells consists of signals from receptors involved in forming intracellular second messengers, such as cyclic AMP or Ins(1,4,5)P $_3$  and diacylglycerol, being transduced to effector enzymes of adenylyl cyclase or phospholipase C $\beta$  via G proteins in the cell

surface membrane (Gilman, 1984). Therefore, an analogy to this established signaling pathway leads us to an interesting hypothesis, namely that cADPR formation is regulated by membrane-bound ADP-ribosyl cyclase through the direct action of G proteins in the cell membrane.

Stimulation of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) with acetylcholine or carbamylcholine (CCh) activates cADPR formation in mAChR-expressing NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells (Higashida et al., 1997). Interestingly, activation of ADP-ribosyl cyclase by CCh was observed in membranes obtained from NG108-15 cells overexpressing m1 or m3 mAChRs, while inhibition was mediated by endogenous m4 mAChRs and exogenous m2 mAChRs. These effects were mimicked by GTP in NG108-15 cells. The CCh-induced activation was inhibited by prior treatment of cells with cholera toxin, while the inhibition of ADP-ribosyl cyclase was sensitive to pertussis toxin. Thus, it can be hypothesized from these observations that the signal to ADP-ribosyl cyclase from mAChRs is mediated via different G proteins (Higashida, 1997).

This signaling seems to be comparable to that from other endogenous receptors expressed in NG108-15 cells, namely  $\alpha$ B2 adrenergic,  $\delta$  opioid, B2 bradykinin and P2u ATP receptors, which have been shown to activate or inhibit adenylyl cyclase or to stimulate phospholipase C $\beta$  via G proteins (Noda et al., 1996).

Recently, ADP-ribosyl cyclase activity was measured in membranes of rat heart muscle cells. Isoproterenol at 1  $\mu$ M increased ADP-ribosyl cyclase activity by 1.7-fold in ventricular myocytes (Higashida et al., 1999). This increase was inhibited by a  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist, propranolol. The stimulatory effect on the cyclase was mimicked by 10 nM GTP and 10  $\mu$ M GTP- $\gamma$ -S, while 10  $\mu$ M GTP inhibited the cyclase. Cholera toxin pretreatment of rats prevents the activation of the cyclase by isoproterenol. These results suggest the existence of a signal pathway from  $\beta$ -adrenergic receptors to ADP-ribosyl cyclase via G protein in the ventricular muscle cell membrane which is in the same analogy for mAChRs.

Now we can propose a new cascade for how contraction of heart muscle is enhanced after excitation of sympathetic neurons, integrating the above observation on the previously known pathways. At the resting state, each beat (action potential) evokes Ca<sup>2+</sup> flux through the classical pathways of L-type Ca<sup>2+</sup> channels increases subcellular Ca<sup>2+</sup> and thereby activates SR Ca<sup>2+</sup> release, Ca<sup>2+</sup> sparks, and the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient, and results in contraction. Upon stimulation of  $\beta$ -adrenergic receptors by norepinephrine released from sympathetic nerve terminals, cAMP as well as cADPR formation is increased. In one branch, cAMP-activates cAMP-dependent protein kinase. Subsequently, phosphorylated L-type Ca<sup>2+</sup> channels and Na<sup>+</sup> channels (30% of the total content) can increase huge amount of subcellular Ca<sup>2+</sup>, and thereby activates SR Ca<sup>2+</sup> release more, as a well known events (Hartzell et al, 1991; Xiao et al., 1994; Walsheth et al., 1994; Santana et al., 1998). In another arm, newly formed cADPR binds directly to ryanodine receptors or to FKBP12.6, which is removed from ryanodine receptors and delays inactivation from activated channels, and subsequently results in a larger [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient. These changes may contribute significantly to local and global cardiac Ca<sup>2+</sup> signaling (Lukydrek and Cyke, 1999), which controls the force of contraction. This will be possible

involvement of increased cADP-ribose synthesis in upregulation of cardiac function by sympathetic stimulation. To support the role of ADP-ribosyl cyclase in cardiac cells, increases of cytosolic cADPR either by application of it through patch pipettes (Iino et al., 1997) or by photolysis of caged cADPR can mimic the effect of sympathetic excitation, i.e. potentiation of contractility. These effects can be antagonized by a cell permeable antagonist for cADPR (Rakovic et al., 1996 and 1999)

Another example of  $\beta$ -adrenergic receptors is found in rat cortical glial cells. A relatively high rate of [ $^3$ H]cADP-ribose production converted from [ $^3$ H]NAD $^+$  by ADP-ribosyl cyclase ( $2015 \pm 554$  pmol/min/mg protein) is detected in the crude membrane fraction, which shares about 50% of the total cyclase activity (Hotta et al., 2000). The formation rate of [3H]ADPR from cADP-ribose by cADP-ribose hydrolase and/or from NAD $^+$  by NAD glycohydrolase is low but enriches in the cytosolic fraction. NAD $^+$  in the extracellular medium was metabolized to cADP-ribose by incubating cultures of intact astrocytes. The presence of Triton X-100 in the medium for permeabilizing cells also increases cADP-ribose production three times as much. These results suggest that ADP-ribosyl cyclase is at least partly located in the surface membrane of cortical astrocytes, a half of which has extracellular action. Isoproterenol and GTP increased [ $^3$ H]ADPR formation in crude membranes of cortical astrocytes. the membrane-associated cyclase activity. This isoproterenol-induced stimulation of the membrane-associated ADP-ribosyl cyclase activity was confirmed by cyclic GDP-ribose formation fluorometrically. This action was blocked by the prior treatment of cells with cholera toxin, but not by pertussis toxin. and the remaining half has the intracellular action. These results suggest that signals of  $\beta$ -adrenergic stimulation is transduced to membrane-bound ADP-ribosyl cyclase via G proteins within cell surface membranes of astrocytes.

In chromaffin cells, stimulation with CCh, excess KCl depolarization and 8-bromo-cyclic AMP induces activation of ADP-ribosyl cyclase in membranes (Morita et al., 1997). This activation is dependent on Ca $^{2+}$  influx and subsequent protein kinase A activation. Therefore, protein kinase A-dependent phosphorylation of ADP-ribosyl cyclase may increase its catalytic activity. In this case, both cytosolic and membrane-bound ADP-ribosyl cyclase could be phosphorylated. This idea is also thought in cardiac muscle cells, in which phosphorylation of membrane-bound form of ADP-ribosyl cyclase could be phosphorylated after adrenergic stimulation which is remained to be proved, since it is the best known cAMP/the protein kinase A signal transduction.

### **Cellular localization of ADP-ribosyl cyclase**

ADP-ribosyl cyclase activity level in cultured astrocytes is high. One half of the membrane bound ADP-ribosyl cyclase is localized in the cell surface and the membrane-bound form of cyclase has its action in the extracellular space. The extracellular localization of the catalytic domain of ADP-ribosyl cyclase has already been reported that rat cortical astrocytes have extracellular cyclase (Pawlikowska et al., 1996). However, our results differ from those of Pawlikowska et al. (1996), in that ADP-ribosyl cyclase activity in our results is much higher and is not exclusively extracellular but intracellular as well.

CD38 cell surface antigen possesses ADP-ribosyl cyclase, cADP-ribose hydrolase and NAD glycohydrolase activities (Howard et al., 1993; Harada et al., 1993; Takasawa et al., 1993; Hoshino et al., 1997; Umar et al., 1996; Prasad et al., 1996) and is detected in the cortex by immunostaining (Mizuguchi et al., 1995). It has been shown that the catalytic domain of CD38 is localized in the extracellular side (Tohgo et al., 1994; De Flora et al., 1996; Lee, 1997). Therefore, one possibility is that, intact cortical astrocytes, cADP-ribose is synthesized in the extracellular space by CD38-like ADP-ribosyl cyclases, which have extracellular action. Thus, extracellular ADP-ribosyl cyclase may play a crucial role in neuronal signal transmission at chemical synapses by regulating the concentrations of NAD<sup>+</sup>, cADP-ribose and ADPR in the synaptic cleft packed with surrounding astrocytes (Pawlikowska et al., 1996).

### **Cellular responses involved in cADPR**

It has been shown that catecholamine secretion was sensitive to caffeine and a ryanodine receptor inhibitor in chromaffin cells (Morita et al., 1997). Further validation is necessary for that upregulation of cADPR formation involved in secretion.

Ca<sup>2+</sup> transients evoked by activation of VACCs are prolonged by caffeine at both distal and proximal dendrites and soma of neurons (Kano et al., 1995; Korkotian and Segal, 1999). These results suggest that RyRs may be involved in synaptic Ca<sup>2+</sup> release signaling through VACCs in normal brain neurons. If we assume that the mechanism described above in NG108-15 neuronal cells exists in intact brain neurons, cADPR may be involved in synaptic Ca<sup>2+</sup> signaling by enhancing CICR resulting from activation of L-type VACCs at dendritic synapses. Of course in this case, it is necessary to determine which transmitter or receptor activates production of cADPR in neurons. A direct evidence has been shown that cADPR is involved in long-term synaptic depression in hippocampus (Reyes-Harde et al., 1999). These findings implicate the release of intracellular Ca<sup>2+</sup> through ryanodine receptors in the light-induced phase delay of the circadian clock restricted to the early night (Ding et al., 1998).

Finally, it has been reported that application of cADPR into NG108-15 cells facilitate rundown of so-called M current, a non-inactivating voltage-dependent potassium current (Bowden et al, 1999; Higashida et al., 1995). This effect of cADPR is suggested to be not directly correlated with the Ca mobilization action of cADPR. Thus it is interesting to test whether cADPR modulate potassium channels via a separate route with a number of molecular targets.

## 7 謝辞と展望

本研究の遂行にあたり、貴重なご助言、ご協力を賜った、金沢大学医学部法医学講座・大島 徹教授、高安達典助教授、東北大学大学院教授・岡本宏教授、高沢 伸助教授、九州大学大学院・野田百美助教授、名古屋市立大学医学部・加藤泰治教授に厚く御礼申し上げます。

ADP リボシルシクラーゼアイソフォームのタンパク質の精製とクローニングは現在も進行中であり、基礎配属に来た学生諸君（渋谷良子、新宅美幸、竹内崇博、山本秀文、横田大輔）も参加してくれている。近い将来に解決出来るものと信じて研究を進めている。

また、研究の成果と公開に関しては、ここに述べた学術雑誌や著書の出版、口頭発表を行った。しかし別の報告書として広く頒布することを止めるかわりに、研究成果をReviewした論文を、International Society of Neurochemistryの機関誌である、Journal of Neurochemistry（東田が編者の一人でもある）発表することで、より多くの人に伝えたいと意図し、努力していることを申し添えておきます。