

# 一酸化窒素と一酸化窒素合成酵素の生理学的役割： 主に神経型一酸化窒素合成酵素について

*The physiological roles of nitric oxide and nitric oxide synthases:  
mainly focus on neuronal nitric oxide synthase*

三井 由香

長野保健医療大学 共通教養センター

**要旨：**一酸化窒素（Nitric Oxide：NO）はガス状の伝達物質であり、既知のシグナル分子の中では最小のものである。細胞膜リン脂質二重層を自由に通り抜け、細胞間、細胞内情報伝達因子として作用する。生体内でNOは一酸化窒素合成酵素（NOS）によって産生されるが、NOSには神経型、誘導型、血管内皮型の3つのアイソフォームが存在する。当初血管弛緩因子として発見されたNOの生理作用は、血管拡張のみならず、神経伝達物質、また免疫細胞が細菌を攻撃するラジカルとして、さらには遺伝子の転写と翻訳の調節、タンパク質の翻訳後修飾など、多岐に及ぶことが明らかになってきた。神経型NOSは主に神経細胞に存在するが、骨格筋や心筋、唾液腺など、様々な細胞で発現する。神経型NOS由来のNOは、脳では長期増強などのシナプス可塑性に関与する一方、過剰な産生は疾患につながる。唾液腺では唾液分泌への関与が示唆されている。この総説では、3種類のNOSアイソフォームの特徴と構造を包括的に述べ、NOの生理作用については主に神経型NOS由来のNOについて述べる。

**キーワード：**一酸化窒素、一酸化窒素合成酵素、神経型一酸化窒素合成酵素

**ABSTRACT:** Nitric oxide (NO) functions as a gaseous transmitter and represents the smallest among known signaling molecules. It readily traverses the phospholipid bilayer of the cell membrane, serving as both an intercellular and intracellular signaling factor. In vivo, nitric oxide (NO) is synthesized by nitric oxide synthase (NOS), which exists in three isoforms: neural, induced, and vascular endothelial. Originally identified as a vasorelaxant factor, the physiological effects of NO encompass not only vasodilation but also extend to neurotransmission, serving as a radical for immune cell-mediated bacterial attack, and involvement in the regulation of gene transcription, translation, and post-translational modification of proteins. Neuronal-type NOS is primarily located in nerve cells but is also expressed in various cell types, including skeletal and cardiac muscle, as well as salivary glands. NO derived from neuronal-type NOS contributes to synaptic plasticity, such as long-term potentiation in the brain; however, excessive production is associated with diseases. In salivary glands, NO has been implicated in salivary secretion.

This review comprehensively delineates the characteristics and structures of the three NOS isoforms. Furthermore, it explores the physiological effects of NO, with a primary focus on neuronal NOS-derived NO.

**Key words:** Nitric oxide, Nitric oxide synthase, Neuronal nitric oxide synthase

## 1. NOの発見と作用発現

一酸化窒素（Nitric Oxide: NO）は、1980年 Furchgottにより内皮由来血管弛緩因子として発

e-mail: mitsui.yuka@shitoku.ac.jp

（受付日：2023年10月31日／受理日：2024年1月31日）

見された<sup>(1)</sup>。NOのような低分子で不安定なガスが、生体内の情報伝達に関わっているとは当時誰も予想しておらず、この発見は瞬く間に多くの分野の研究者の最大の関心を集めることとなった。現在NOは血管拡張だけではなく神経伝達や殺菌など、多彩な生理作用を持つことが明らかとなっている。NOは不対電子を持つラ

ジカル NO<sup>•</sup> であり、極めて反応性が高いため、スーパーオキシド (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) やヒドロキシラジカル (OH<sup>•</sup>) と反応し、さらに殺菌効果の高いラジカルであるパーオキシナイトライト (ONOO<sup>•</sup>) を産生することができる<sup>(2,3)</sup>。NO による血管拡張作用は、血管内皮細胞で作られた NO が拡散し、血管平滑筋にて可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) を活性化して、環状グアノシン一リン酸 (cGMP) を産生させることによる<sup>(4)</sup>。また別の分子機構として、タンパク質のシステイン残基の -SH 基に NO が付加されて -SNO を生成する酸化修飾である、S-ニトロシル化が見だされている<sup>(5,6)</sup>。また NO は、DNA の脱メチル化を引き起こし、その結果疾患関連遺伝子の誘導、さらにヒストンや DNA を修飾する多数の非ヘム鉄酵素を直接阻害することにより、クロマチン構造に影響を与える<sup>(7,8)</sup>。

## 2. 生体内で NO を合成する酵素

NO は生体内で NO 合成酵素 (Nitric Oxide Synthase: NOS: EC 1.14.13.39) によって産生される。NOS は L-アルギニンと分子状酸素を基質として、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)、フラビンモノヌクレオチド (FMN)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)、テトラヒドロビオプテリン (BH<sub>4</sub>) を補酵素として、N<sup>G</sup>-ヒドロキシ-L-アルギニンを経て、L-シトルリンと NO を生成する (図 1)<sup>(9-15)</sup>。NOS の酵素学的特性や、酵素タンパク質の 1 次構造の解析により、NOS には 3 種類のアイソフォームが存在することが明らかとなった。NOS

の 3 つのアイソフォームは、神経型 NOS (neuronal NOS: nNOS: NOS I)、誘導型 NOS (inducible NOS: iNOS: NOS II)、内皮型 NOS (endothelial NOS: eNOS: NOS III) である。これらは細胞や組織特異的に発現し、また選択的スプライシングされた NOS の発現も知られる<sup>(16)</sup>。3 つの NOS アイソフォームは異なる染色体上に位置する<sup>(17)</sup>。nNOS は、最初にラット神経細胞から精製されたため神経型と呼ばれるが、中枢神経系および末梢神経系の神経細胞のほか、様々な臓器の上皮細胞、骨格筋、膵島細胞、血管平滑筋<sup>(18,19)</sup>、唾液腺<sup>(20-22)</sup> でも発現する。iNOS は構成的には存在せず刺激によって発現する。当初マクロファージなど免疫細胞にて、炎症性サイトカインやリポ多糖などの刺激により誘導されることが報告された。しかし後に適切な刺激が加われば、免疫細胞以外でも iNOS の発現は誘導できることが確認された<sup>(23-25)</sup>。eNOS は牛の血管内皮細胞から精製された。eNOS は主に血管内皮細胞で発現するが、心筋細胞、血小板、ヒト胎盤、腎上皮細胞でも確認されている<sup>(5,9,11)</sup>。3 種類の NOS は、すべてホモ二量体である<sup>(14,26)</sup>。nNOS と eNOS の活性化には、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇を必要とするが、iNOS はその分子内に Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質であるカルモジュリンを強固に結合しており、Ca<sup>2+</sup> 非依存性に活性を示す<sup>(14,15,27)</sup>。

## 3. NOS の基本構造と NOS 活性調節 (図 2)

NOS タンパク質の C 末端領域には、FMN、FAD、および NADPH 結合部位を持つレダクターゼ領域が存在し、N 末端領域はプロトポルフィ

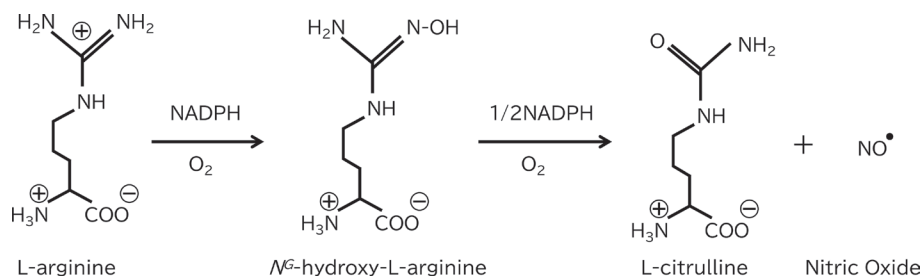


図 1 NOS による NO 生成の反応機構 (文献 14,15 より改変引用)

L-arginine からの NOS による NO 合成。中間体として N<sup>G</sup>-hydroxy-L-arginine を経て、L-citrulline と NO を生成する。

リン区に鉄が配位したヘム、BH<sub>4</sub>、L-アルギニン結合部位が存在するオキシゲナーゼ領域からなる。酵素タンパク質の中間部にはカルモジュリン結合部位が存在する<sup>(14,15,27)</sup>。

### 3-1. レダクターゼ領域

3種類のNOSのアイソザイム間でのレダクターゼ領域のアミノ酸配列には、約50%の相同性が存在する。酸素分子はレダクターゼ領域で還元され、NADPHからFADとFMNを介する酸化還元反応により電子をN末端のオキシゲナーゼ領域のヘムへと受け渡す役割を担っている<sup>(14,15,27)</sup>。

### 3-2. カルモジュリン結合部位

nNOSやeNOSにカルモジュリンが結合することによりCa<sup>2+</sup>が結合できるようになり、酵素活性が発現する<sup>(15,28,29)</sup>。nNOSおよびeNOSでは、フラビンからヘムへの電子移動はカルモジュリン結合によって引き起こされる。一方iNOSは酵素にすでにカルモジュリンが結合している。iNOSのカルモジュリン結合は不可逆的であり、iNOSは一度組み立てられると継続的に活性を示す<sup>(30)</sup>。これはeNOSおよびnNOSはカルモジュリンなしでポリペプチド鎖が折りたたまれる

が<sup>(31-33)</sup>、iNOSは折り畳みにカルモジュリン結合が必要であるためである<sup>(34,35)</sup>。このためiNOSはCa<sup>2+</sup>低濃度の下でも容易に活性を示し、Ca<sup>2+</sup>非依存性である。nNOSとeNOSのFMN結合ドメイン中には、カルモジュリン結合を阻害する配列があり、これはiNOSには存在しない。nNOSとeNOSの活性調節には、カルモジュリンの結合が重要であることを示すものと言える<sup>(36)</sup>。

### 3-3. オキシゲナーゼ領域

オキシゲナーゼ領域のBH<sub>4</sub>結合部位へのBH<sub>4</sub>の結合は、NOS活性発現に必須である。BH<sub>4</sub>はNOSの2量体を安定化させ、酵素活性発現に導く<sup>(36,37)</sup>。1分子のNOSにつき、ヘム1分子が結合する。BH<sub>4</sub>とともにヘムが結合すると、基質であるL-アルギニンのNOSへの結合を容易にし、電子の付加された酸素分子をL-アルギニンへ転移させる。一方でヘムはNOS活性により生成されるNOにより、NOS活性の自己抑制にも働く。これはNOがヘムのシステイン残基のSH基をS-ニトロシル化することで、NOSの二量体形成を阻害することによる<sup>(36,38)</sup>。オキシゲナーゼ領域には、NOSの基質であるL-アルギニン結合部位が存在する。iNOSの場合、N末端から371アミ

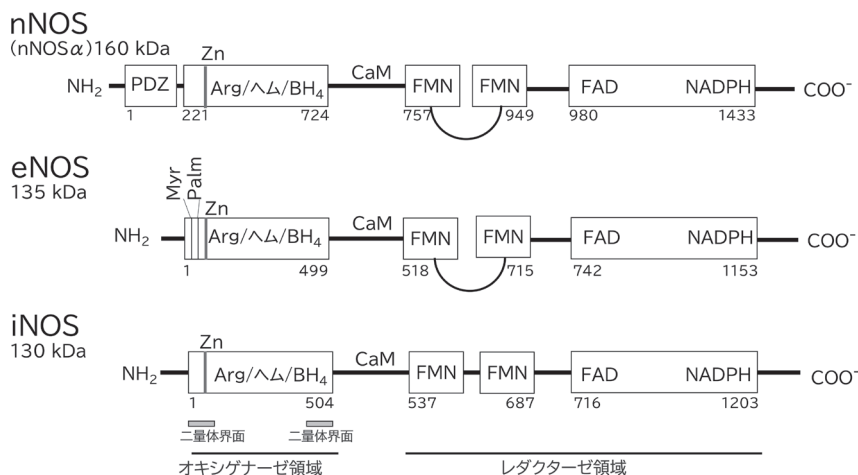


図2 ヒトnNOS, eNOS, iNOSの構造(文献25, 36, 87より改変引用)

オキシゲナーゼ領域、レダクターゼ領域、PDZドメインをボックスで示す。CaM結合領域、各領域の開始/終了のアミノ酸残基番号を示す。eNOS上のミリスチル化(Myristylation)およびパルミトイル化(Palmitoylation)部位、亜鉛(Zn)結合の位置を線にて示す。NOSはホモ二量体で活性を示すが、オキシゲナーゼ領域内の二量体界面を図中に示す。Arg, L-アルギニン; BH<sub>4</sub>, テトラヒドロピオブテリン; CaM, カルモジュリン; FMN, フラビンモノヌクレオチド; FAD, フラビナデニンジヌクレオチド; NADPH, 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸

ノ酸残基のグルタミン酸残基が、L-アルギニンと結合する。このグルタミン酸残基は nNOS と eNOS でも保存され、アルギニン結合部位として機能している<sup>(14,36)</sup>。

### 3-4. リン酸化部位とリン酸化による活性調節

NOS にはリン酸化部位が存在し、リン酸化は NOS 活性に影響を与える。

#### (1) nNOS

nNOS は cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA)、cGMP 依存性プロテインキナーゼ (PKG)<sup>(39)</sup>、カルモジュリン依存性キナーゼ (CaM-K)<sup>(40)</sup> など複数のリン酸化酵素によるリン酸化を受ける。PKA は nNOS の Ser1412 をリン酸化し、酵素を活性化する<sup>(41)</sup>。セリン/スレオニンキナーゼであるプロテインキナーゼ B (Akt) または CaM-K II は、Ser1412 のリン酸化を促進し活性化するが、このリン酸化は nNOS 活性化により生じた NO によりフィードバック抑制される。このリン酸化の抑制は Akt または CaM-K II のいずれかを阻害することにより生じ、nNOS 活性化を防ぐ<sup>(42)</sup>。なお CaM-K I $\alpha$ 、CaM-K II $\alpha$ 、CaM-K IV は、nNOS の Ser847 をリン酸化すると酵素活性を低下させる<sup>(40)</sup>。ホスファターゼ 1 は、Ser847 を脱リン酸化して nNOS 活性を増加させる<sup>(43)</sup>。

#### (2) eNOS

eNOS には多くのリン酸化部位が見い出されており、どの部位がリン酸化されるかにより eNOS は活性化または不活性化を受ける<sup>(44,45)</sup>。ヒトでは、Tyr81、Ser615、Ser633、および Ser1177 のリン酸化によって eNOS は活性化し、Ser114、Thr495、および Tyr657 のリン酸化は eNOS を不活性化する。活性化をもたらすリン酸化酵素としては Akt<sup>(49,50)</sup> と、虚血など低酸素ストレスによって活性化されるアデノシナーリン酸化活性化プロテインキナーゼ (AMPK)<sup>(48)</sup>、PKA があげられる。これらのリン酸化酵素は eNOS の Ser1177<sup>(46)</sup>、Ser615 および Ser633<sup>(49)</sup> のリン酸化をもたらす eNOS を活性化に導く。一方アンジオテンシン II や活性酸素種によって活性化された、プロリンに富むチロシンキナーゼ 2 は、Tyr657 をリン酸化し、eNOS 酵素活性を阻害する<sup>(50)</sup>。

#### (3) iNOS

iNOS のリン酸化については、Src キナーゼが、iNOS の Tyr1055 をリン酸化して、iNOS の半減期を安定化することが報告されている。これにより NO 産生の増大がもたらされるため、炎症や癌との関連が示唆されている<sup>(51)</sup>。

### 3-5. 細胞内タンパク質・膜脂質との結合を示す部位

#### (1) PDZ ドメインと nNOS 活性調節

nNOS のみ、N 末端に PDZ ドメインを持つ。これはほかのアイソザイムには認められない。PDZ ドメインとはシナプスやタイトジャンクションなどの細胞間接触部位に局在する多くのタンパク質に共通に認められるアミノ酸領域であり、細胞外と細胞内のシグナル伝達系を連結する役割を担っている。nNOS は PDZ ドメインを介して、脳内の PSD-95 や、骨格筋のジストロフィンと相互作用する  $\alpha 1$ -syntrophin と結合していることが明らかとなった<sup>(52,53)</sup>。nNOS の PDZ ドメインを欠く変異型マウスでは、nNOS は膜タンパク質と結合しなくなる<sup>(53)</sup>。これらの結果は、PDZ ドメインが nNOS を膜画分の特定のタンパク質複合体に局在させるために必要であることを示している。中枢神経系で nNOS は、この配列を介してグルタミン酸受容体の N-methyl-D aspartate (NMDA) 受容体と強固に結合している。nNOS は PDZ ドメインにより PSD-95 タンパク質と結合し、PSD-95 タンパク質は PDZ ドメインを介して NMDA 受容体とも結合している<sup>(54)</sup>。この場合、NMDA 受容体を介する  $Ca^{2+}$  の流入による nNOS の活性化において、nNOS が NMDA 受容体の近傍に局在することが重要と考えられる。NMDA 受容体と共局在することで、 $Ca^{2+}$  の流入により活性化した nNOS による NO 産生が、順行性または逆行性に作用していると考えられている (図 3)。

#### (2) カベオリン結合部位と NOS 活性調節

細胞膜カベオラは膜タンパク質を集積して、膜を介したシグナル伝達や細胞接着など、細胞機能に重要な役割を持つ<sup>(55)</sup>。すべての NOS アイソフォームのオキシゲナーゼ領域には、カベオラに存在する内在性膜タンパク質であるカベオリンと結合する配列が保存されている<sup>(36)</sup>。nNOS



は神経系のみならず、骨格筋でも高度に発現しているが、骨格筋において nNOS はカベオリン-3 と結合し、筋細胞膜である筋鞘に局在している。カベオリン-3 は骨格筋、心筋特異的に発現し、nNOS と結合すると NOS 活性を阻害する<sup>(56-58)</sup>。これは活性化をもたらす nNOS の Ser1412 のリン酸化を、カベオリン-3 が阻害することによる<sup>(59)</sup>。nNOS の活性化は、Ca<sup>2+</sup> の細胞内濃度上昇により、Ca<sup>2+</sup> と複合体を形成したカルモジュリンが、nNOS に結合することで生じる。遺伝性ミオパチーや、後天性ミオパチー、筋緊張低下の患者では nNOS 局在に異常が見られ、nNOS が細胞膜ではなく細胞質に局在している<sup>(60)</sup>。またカベオリン-3 の遺伝子変異は、常染色体優性肢帯型筋ジストロフィーを引き起こす<sup>(61)</sup>。筋において NO は、筋収縮性<sup>(62)</sup>、および局所血流を制御する<sup>(63)</sup>。

nNOS がカベオリン-3 と結合して筋鞘に存在することが、正常な筋の働きの上で重要であり、nNOS の局在異常は神経筋障害を引き起こす。また eNOS は、カベオリン-1 と結合して不活性化されて細胞膜に存在する。カベオリン-1 結合による eNOS の不活性化は、活性化部位のリン酸化、または細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇により Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリンが eNOS に結合すると解除される。

(3) アシル化部位

eNOS には、N 末端にアシル化部位が存在する(図2)。eNOS は、N 末端グリシン残基のミristol化やシステイン残基のパルミトイル化を介して、カベオリン-1 による膜結合とは異なるメカニズムによっても膜結合タンパク質として細胞膜に局在する<sup>(64,65)</sup>。このような翻訳後修飾のアシル化反応を介して eNOS は、小胞体、ゴル

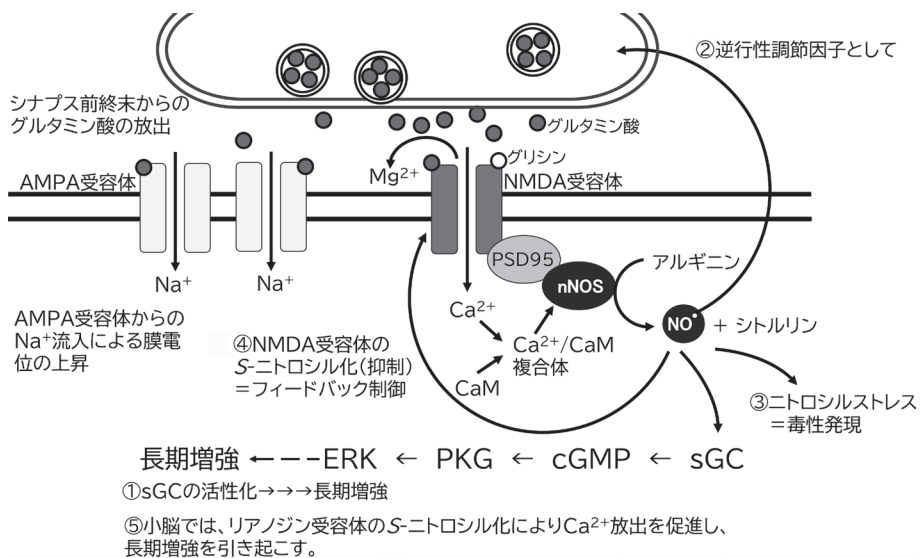


図3 脳のNMDA受容体活性化に伴うNO産生と、NOによる複数の作用発現(文献110-113より改変引用)。nNOSは、PSD95を介してNMDA受容体に結合している。NMDA受容体の活性化により、Ca<sup>2+</sup>が流入することにより、Ca<sup>2+</sup>/CaM依存性のnNOSが活性化し、NOを産生する。NOは、sGC活性化とS-ニトロシル化という異なる分子メカニズムを介して、以下のような様々な機能を発揮する。

- ①sGCを活性化し、cGMPを産生させる。その結果、ERKの活性化を介して長期増強に関与する。
- ②逆行性の調節因子として、シナプス前細胞に拡散し、生理作用を発揮する可能性がある。
- ③細胞内タンパク質をS-ニトロシル化するとタンパク質の変性、毒性の発現となる。
- ④NOはNMDA受容体をS-ニトロシル化して抑制する。これにより③の毒性に対する負のフィードバック制御となる。
- ⑤小脳では、リアノジン受容体のS-ニトロシル化によりCa<sup>2+</sup>放出を促進し、長期増強を引き起こす。

AMPA受容体, グルタミン酸α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionateα受容体; NMDA受容体, グルタミン酸N-methyl-D aspartate受容体; CaM, カルモジュリン; sGC, 可溶性グアニル酸シクラーゼ; cGMP, サイクリックGMP; PKG, cGMP依存性プロテインキナーゼ; ERK, 細胞外シグナル制御キナーゼ

ジ体を経て細胞膜に輸送されると考えられる<sup>(36)</sup>。

#### (4) HSP-90 の結合

eNOS は分子シャペロンである熱ショックタンパク質 90 (HSP-90) と結合すると、酵素の比活性が数倍上昇する<sup>(66)</sup>。カベオリン-1 と結合し、不活性化している eNOS に、カルモジュリンと HSP-90 が動員されると、カベオリン-1 と置換して活性化が生じる<sup>(67)</sup>。C 末端 HSP 相互作用タンパク質 (CHIP) は、HSP-70、HSP-90 と相互作用し、ゴルジ体への eNOS 輸送を負に調節する。対照的に、NOS 相互作用タンパク質 (NOSIP) および NOS トラフィックインデューサー (NOSTRIN) は、細胞膜における eNOS 局在を負に調節することができる<sup>(68)</sup>。

## 4. nNOS と nNOS 由来の NO の生理作用

### 4-1. nNOS

最初にラット小脳神経細胞から精製されたため、神経型と呼ばれる。nNOS は発見された当初、可溶性画分に存在すると考えられたが、現在では PDZ ドメインやカベオリン結合領域により特定のタンパク質と会合して膜画分に存在することが明らかになっている。特に PDZ ドメインは nNOS にのみ存在するため、これらによる膜タンパク質との相互作用が、nNOS 特有の機能発現に重要な役割を担うと考えられる。nNOS の細胞膜局在のためのアダプタータンパク質としては NOSIP、PSD-95、カルボキシ基末端結合タンパク質 (CtBP) などが重要である<sup>(69)</sup>。酵素活性は  $\text{Ca}^{2+}$  とカルモジュリンによって調節され、生理的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇により活性化される。神経細胞では活動電位の到達により電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが開くと、細胞内ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  の放出が促される。これにより細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が、nNOS にカルモジュリンが結合するのに必要な 400 nM 以上に上昇すると、酵素が活性化される。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低下すると、カルモジュリンは nNOS から解離するため、酵素のオン・オフを切り替えるスイッチとして働く<sup>(69-71)</sup>。nNOS は神経系に多く、中枢神経系<sup>(72-75)</sup>、また末梢神経系では、非アドレナリン性・非コリン性 (NANC) 神経系<sup>(76,77)</sup> の多くが NO 作動性神経である。ただしサブスタンス P などのペプチドを

伝達物質としているものもあり、NANC 神経のすべてが NO 作動性であるわけではない。nNOS は神経系以外でも広く存在が認められており、心筋、骨格筋<sup>(78,79)</sup>、腎臓の緻密斑<sup>(80)</sup>、肺の上皮細胞<sup>(81)</sup>、膵臓の  $\beta$  細胞<sup>(82,83)</sup>、唾液腺<sup>(20,21,84-86)</sup> にも分布している。nNOS は、選択的スプライシングの差異により生じる、複数の nNOS タンパク質であるスプライスバリエーションの存在が知られている。nNOS の全長は nNOS $\alpha$  (160 kDa) であり、そのほかに nNOS $\mu$  (164 kDa)、nNOS $\beta$  (136 kDa)、nNOS $\gamma$  (125 kDa)、nNOS2 (144 kDa) の 4 つのスプライスバリエーションが組織特異的に存在する<sup>(87,88)</sup>。脳内では nNOS $\alpha$  と nNOS $\beta$  だけが、優位に NO を産生する<sup>(87,89)</sup>。nNOS $\beta$  と nNOS $\gamma$  は PDZ ドメインを欠いており、PSD-95 と結合せず、細胞膜ではなく可溶性画分に存在していると考えられる<sup>(90,91)</sup>。nNOS $\beta$  は皮質や線条体などの一部の脳領域で NO を生成し、nNOS $\alpha$  の活性の 80% を示す<sup>(92)</sup>。筋萎縮側索硬化症など一部の疾患では、脊髄内の nNOS $\beta$  の増加が報告されている<sup>(93)</sup>。nNOS $\mu$  はカルモジュリン結合ドメインと、フラビン結合ドメインの間に 34 アミノ酸が挿入されて、nNOS の全長である nNOS $\alpha$  よりも分子量が若干大きくなる。nNOS $\mu$  の  $V_{\max}$  と  $K_m$ 、また  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性は、ほぼ nNOS $\alpha$  と同一である<sup>(79,94)</sup>。心筋、骨格筋に多く、骨格筋において nNOS $\mu$  は、運動終板のシナプス接合部に集中している<sup>(88)</sup>。また nNOS $\mu$  は陰茎および尿道にも主要なアイソフォームとして存在する<sup>(95)</sup>。我々はラット耳下腺にも高い比活性で、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性の nNOS が存在することを、酵素学的、免疫学的解析から明らかにした<sup>(20)</sup>。その分子量は nNOS $\alpha$  よりもわずかに大きく、推定 165 kDa 程度であった。また酵素学的解析から、 $V_{\max}$  と  $K_m$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性は、ほぼ nNOS $\alpha$  と同一であったことから、おそらく耳下腺 NOS は nNOS $\mu$  であると考えられる<sup>(20)</sup>。nNOS2 はアルギニン結合に必要な領域が欠失しており、正常な nNOS 作用を阻害する働きのある、ドミナントネガティブ制御因子として作用する可能性が推測されていた<sup>(86)</sup>。しかし最近では、必須の補因子結合領域には影響を及ぼさず、機能を維持すると推定されている<sup>(96)</sup>。nNOS2 は、ヒト神経芽腫細胞株でも検出されている<sup>(97)</sup>。

## 4-2. nNOS 由来の NO の生理作用

### (1) 中枢神経系における NO の生理作用

中枢神経系では、nNOS が主な NO 産生酵素である<sup>(98)</sup>。中枢神経系において、NO は二面性が知られる。少量の NO は生体保護作用を有し、神経伝達物質としての役割を果たし、長期増強や長期抑制といったシナプス可塑性、すなわち学習と記憶に関与している<sup>(99)</sup>。一方で過剰な NO は、虚血性脳卒中などの状況で、毒性を示す<sup>(100)</sup>。NO の毒性は、 $O_2^{\cdot}$  などの他のラジカルの存在下で特に強くなる<sup>(101)</sup>。

血管内皮細胞の eNOS は血管を拡張し血圧を低下させるが、中枢神経系、特に延髄と視床下部における nNOS 活性の遮断は、全身性高血圧症を引き起こす<sup>(102)</sup>。この部位の nNOS は、全身の血圧調節に働くと考えられる。

Rachel らは、nNOS 阻害剤を投与したマウスでは、著しい長期増強の欠損、特に後期長期増強の大幅な損失を引き起こしたことから、海馬の長期増強には nNOS からの持続的および突発的な NO シグナルの両方が必要であると結論付けている<sup>(103)</sup>。中枢神経系において、グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質であるが、グルタミン酸受容体である NMDA 受容体の活性化が、長期増強には必須である (図 3)。NMDA 受容体の活性化には、グルタミン酸だけでなく、グリシンまたはセリンが受容体に結合する必要がある。さらに、同じくグルタミン酸受容体である  $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) 受容体からの  $Na^+$  流入により十分に膜電位が上昇すると、NMDA 受容体の  $Mg^{2+}$  の栓が外れ、 $Na^+$  だけでなく  $Ca^{2+}$  が流入する<sup>(104)</sup>。長期増強にはこの  $Ca^{2+}$  の流入が必須であり、 $Ca^{2+}$  の流入を遮断すると長期増強は生じない<sup>(105)</sup>。NMDA 受容体からの  $Ca^{2+}$  流入は、海馬での長期増強や小脳における長期抑制など、記憶や学習のもととなるシナプス伝達の可塑性に関与する<sup>(106)</sup>。その一方で、NMDA 受容体の過剰な活性化は、神経細胞の壊死、変性に関与すると考えられている<sup>(107,108)</sup>。NMDA 受容体刺激は NO の産生をもたらす<sup>(109)</sup>。脳の nNOS は 160 kDa の nNOS $\alpha$  が主要なスプライズバリエントであり、これは PDZ ドメインによりシナプス後膜の NMDA 受容体に固定されて存在する。nNOS

の PDZ ドメインは、シナプス後密度タンパク質 PSD-95 の PDZ ドメインに結合し、PSD-95 は NMDA 受容体のサイトゾル尾部に結合する<sup>(110)</sup>。nNOS の、これらのタンパク質との会合が、脳での NO 産生と NO の生理作用発現のために重要である。長期増強は、NMDA 受容体からの  $Ca^{2+}$  流入に始まる。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇により  $Ca^{2+}$  依存性の nNOS 活性化を経て NO が産生される。NO は sGC を活性化して cGMP の産生を促進させる。cGMP により活性化した PKG によりリン酸化された細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) を介する機序で、長期増強が生じると考えられる (図 3)。Ota らは NO-cGMP-PKG シグナル伝達経路は、ERK/マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) シグナル伝達カスケードを介して扁桃体のシナプス可塑性に作用することを示した<sup>(111)</sup>。さらに Ping らは、扁桃体と内側膝状核/後層内核の内側分裂の両方における ERK/MAPK を介したシグナル伝達が、長期増強にとって重要であることを、薬理的遮断実験により示した<sup>(112)</sup>。これらにより NO-cGMP-PKG シグナル伝達経路が ERK/MAPK カスケードを介して長期増強をもたらすことが示された。一方で、過剰な NMDA 受容体の興奮は、 $Ca^{2+}$  過負荷による「興奮毒性」と呼ばれる一連の過程を経て、ニューロンの壊死、変性に至る<sup>(107,108,113)</sup>。NMDA 受容体の過剰な活性化によって大量の NO が産生されると、NO は細胞内タンパク質を S-ニトロシル化して、多くの場合それは障害性に働き、ニューロンの死を招く。その一方で NMDA 受容体自身も NO による S-ニトロシル化を受ける。この場合は NMDA 受容体を抑制して、生存方向へ導く<sup>(38,113,114)</sup>。NMDA 受容体の NR2A サブユニットの Cys399 が S-ニトロシル化されると、チャネルの立体構造が変化し、カルシウムイオンに対する透過性が低下する<sup>(114)</sup>。NO は興奮毒性に関与すると同時に NMDA 受容体に作用して、負のフィードバックにより細胞保護に働くといえる。また NO は拡散により逆行性にシナプス前ニューロンに作用して、シナプス小胞のエキソサイトーシスを誘導し、グルタミン酸の放出を促進することが報告されている<sup>(115)</sup>。これはシナプス前ニューロンにて、NO が cGMP の産生を促し、PKG の活性化を介する機序によるものと考え



えられる<sup>(116,117)</sup>。

NMDA 受容体の過剰興奮によってもたらされるニューロンの死には、NO により生じるきわめて酸化力の強い ONOO<sup>-</sup> が、興奮毒性に寄与する可能性がある<sup>(118)</sup>。iNOS は通常マクロファージで発現されるが、細菌のリポ多糖やサイトカインなどの適切な誘導刺激があれば、神経細胞<sup>(119,120)</sup> や、また他のあらゆる細胞や組織<sup>(25)</sup> でも、iNOS 発現は誘導できる。iNOS は一度発現すると常に活性型であり、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度による活性制御を受けない。中枢神経系において、異常に多量の NO は、脳卒中後の興奮毒性、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病などの様々な神経変性病態に寄与する可能性がある<sup>(25)</sup>。

(2) 末梢神経系、膵臓、消化管での NO の生理作用

末梢神経系では、NANC 神経由来<sup>(76)</sup> の NO が神経伝達物質として働き、腸の蠕動運動<sup>(121-123)</sup>、血管拡張、陰茎勃起<sup>(124)</sup> をもたらし、消化管では nNOS 由来の NO が、下部食道、幽門、オッディ括約筋、および肛門の括約筋の筋緊張を調節する<sup>(121-123)</sup>。末梢神経系の伝達物質である NO は平滑筋を弛緩させ、内容物の排出を促進する。膵臓ではインスリンの分泌に関与し、β 細胞をアポトーシスから保護していることが示唆されている<sup>(81,82)</sup>。

(3) 骨格筋における NO の生理作用

骨格筋は nNOS $\mu$  を発現するが、nNOS $\alpha$  など他のスプライスバリエーションが共発現する可能性も示唆される<sup>(94,125,126)</sup>。nNOS $\mu$  はジストロフィンと複合体を形成し、筋紡錘内線維の筋鞘と運動終板のシナプス後細胞膜に存在し、興奮収縮連関による Ca<sup>2+</sup> 上昇に伴い活性化される<sup>(127)</sup>。この NO は  $\alpha$  アドレナリン受容体を媒介する機構により血管収縮を弱め、筋組織への血液と酸素供給を維持する<sup>(94,128)</sup>。またインスリン刺激によるグルコースの取り込みと利用、シグナル伝達にも重要である<sup>(129)</sup>。

(4) 唾液腺における NO の生理作用

哺乳類の唾液腺には高い比活性の Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性の NOS 活性が存在する<sup>(130)</sup>。我々はウサギ、ウシ、マウス、ラット、モルモットの耳下腺および顎下腺の細胞質画分における NOS 活性を比較し、ウサギ、ウシの耳下腺

と顎下腺、マウスの耳下腺において顕著な Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性の NOS 活性を検出した<sup>(130)</sup>。さらにラット耳下腺 NOS は、イムノプロット解析から nNOS であり、その分子量と酵素学的特性から骨格筋や心筋に特異的なスプライスバリエーションの nNOS $\mu$  である可能性を示唆した<sup>(20)</sup>。Xu ら<sup>(131)</sup> は、ラット顎下腺腺房細胞において、Ca<sup>2+</sup> 依存性に活性化され、cGMP 産生をもたらす NOS のアイソフォームは nNOS であることを、選択的阻害剤を用いた研究により示している。ウサギ顎下腺には高い NOS 活性が存在するが<sup>(130)</sup>、Yamamoto らは細胞質画分および膜画分の両方に nNOS が存在することを、免疫学的解析により示した<sup>(21)</sup>。膜画分の NOS 活性は界面活性剤処理により増加し、リン脂質の添加で阻害され、その阻害は Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇により緩和されたことから、リン脂質は nNOS の Ca<sup>2+</sup> による影響を調節することにより、膜画分の NOS 活性を制御することを示唆した<sup>(21)</sup>。ウサギ耳下腺腺房細胞においては、ムスカリン性受容体刺激による cGMP 産生は、Ca<sup>2+</sup> 依存性の NOS 活性化に伴う NO 産生と共役している<sup>(132)</sup>。唾液腺において nNOS によって生成される NO は、ムスカリン受容体を介した水とイオンの放出を促進し<sup>(133,134)</sup>、アミラーゼ分泌を誘導し<sup>(135)</sup>、腺房細胞のタンパク質合成と細胞分裂に関与していることが示唆されている<sup>(135)</sup>。これらの研究はウサギやラットなど実験動物が用いられているが、唾液腺組織は動物種によって異なることが知られており、ヒト唾液腺においてはラットに比較すると nNOS 陽性神経細胞が少ない一方で、すべてのヒト唾液腺のほとんどの管上皮細胞は、nNOS 陽性である<sup>(136)</sup>。ヒト唾液腺において NO は、おそらく唾液腺の神経調節因子としての重要性は低く、管上皮の NO が唾液分泌を直接調節する可能性がある。唾液には硝酸塩が分泌されるが、管上皮の NO はその供給源と考えられる<sup>(22,136)</sup>。動物種により NOS を発現する唾液腺の領域の違いによる機能への影響については、今後の検討が必要である。一方で唾液腺における NO の過剰産生は様々な疾患の発症に関与していると考えられており、特にシェーグレン症候群との関連が詳しく研究されている<sup>(137-139)</sup>。シェーグレン症候群は自己免疫疾患であり、腺房萎縮や唾液腺の機能低下



を引き起こす。この場合は免疫細胞からではなく、腺房細胞自身が iNOS を発現して大量の NO を産生することにより、様々なシグナル伝達経路の S- ニトロシル化を経て細胞毒性をもたらし、腺房細胞の機能低下からシェーンゲレン症候群に至ることが示唆されている<sup>(139)</sup>。

## 5. 結 論

NOS は哺乳類のみならずあらゆる生物、生きた化石と言われるカプトガニ<sup>(140)</sup>にも、植物<sup>(141)</sup>、細菌<sup>(142)</sup>、そして古細菌<sup>(143)</sup>にも存在する。生命の起源の初期のころから、NO は生命の維持に必須のガスであったことがうかがえる。

NO が発見されてから 40 年余り、その間 NO と NOS に関する多くの新しい知見が追加されてきた。nNOS は神経系や骨格筋、唾液腺など多くの組織に存在し、神経系では神経伝達物質のみならずシナプス可塑性や疾病との関わり、唾液腺においては唾液分泌との関わりなど、様々な生理作用や、また病理作用への関与が明らかにされた。今後さらに NOS と NO の生理作用の解明が進むことを期待したい。

**謝辞** 日本大学松戸歯学部にて、唾液腺における一酸化窒素合成酵素の研究を行うにあたり、ご助言とご協力を賜りました、日本大学名誉教授古山俊介先生、日本大学名誉教授杉谷博士先生、東京医科歯科大学大学院准教授横山三紀先生、日本大学松戸歯学部教授吉垣純子先生、東邦大学薬学部講師関広美先生に感謝いたします。

## 文 献

- (1) Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288. 5789 (1980): 373-376.
- (2) Radi R, Beckman JS, Bush KM, et al.: Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 1991; 266: 4244-4250.
- (3) Koppenol WH: 100 years of peroxynitrite chemistry and 11 years of peroxynitrite biochemistry. *Redox Rep*. 2001; 6: 339-341.
- (4) Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, et al.: Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(8): 3203-3207.
- (5) Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, et al.: Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6(2): 150-166.
- (6) Lipton SA, Choi YB, Takahashi H, et al.: Cysteine regulation of protein function—as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends in neurosciences*. 2002 1; 25(9): 474-480.
- (7) Gregory DJ, Zhang Y, Kobzik L, et al.: Specific transcriptional enhancement of inducible nitric oxide synthase by targeted promoter demethylation. *Epi-genetics*. 2013 1;8(11): 1205-1212.
- (8) Vasudevan D, Bovee RC, Thomas DD. Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes. *Nitric Oxide*. 2016 30; 59: 54-62.
- (9) Ludwig ML, Marletta MA. A new decoration for nitric oxide synthase—a Zn (Cys) 4 site. *Structure*. 1999 15; 7(4): R73-79.
- (10) Griffith OW, Stuehr DJ: Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*. 1995, 57.1: 707-734.
- (11) Ignarro LJ (ed): Nitric oxide: biology and pathobiology. Academic press; 2000 13.
- (12) Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, et al.: Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*. 1998 27; 279(5359): 2121-2126.
- (13) Raman CS, Li H, Martásek P, et al. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*. 1998 23; 95(7): 939-950.
- (14) Stuehr DJ: Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1999 5; 1411(2-3): 217-230.
- (15) Stuehr DJ: Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annual review of Pharmacol and toxicology*. 1997; 37(1): 339-359.
- (16) Brenman JE, Xia H, Chao DS, et al.: Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Developmental Neuroscience*. 1997 3; 19(3): 224-231.
- (17) Nathan C, Xie QW: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994 13; 269(19): 13725-13728.
- (18) Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al.: Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.

- Hypertension. 1994; 23(6\_pt\_2): 1121-1131.
- (19) Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, et al.: Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS letters*. 1993 25; 316(2): 175-180.
- (20) Mitsui Y, Furuyama S: Characterization of nitric oxide synthase in the rat parotid gland. *Arch Oral Biol*. 2000 1; 45(7): 531-536.
- (21) Yamamoto Y, Katsumata O, Furuyama S, et al.:  $\text{Ca}^{2+}$ , calmodulin and phospholipids regulate nitric oxide synthase activity in the rabbit submandibular gland. *J Comparative Physiology B*. 2004; 174: 593-599.
- (22) Ambe K, Watanabe H, Takahashi S, et al.: Production and physiological role of NO in the oral cavity. *Japanese dental science review*. 2016 1; 52(1): 14-21.
- (23) Förstermann U: Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. In *Nitric Oxide 2000* (pp. 71-91). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- (24) Du Q, Geller DA: Cross-Regulation Between iNOS/NO and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathways. In *Nitric Oxide 2017 1* (pp. 97-105). Academic Press.
- (25) Förstermann U, Sessa WC: Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart J*. 2012 1; 33(7): 829-837.
- (26) Chen PF, Tsai AL, Berka V, et al.: Endothelial nitric-oxide synthase: evidence for bidomain structure and successful reconstitution of catalytic activity from two separate domains generated by a baculovirus expression system. *J Biol Chem*. 1996 14; 271(24): 14631-14635.
- (27) Marletta MA, Hurshman AR, Rusche KM: Catalysis by nitric oxide synthase. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1998 1; 2(5): 656-663.
- (28) Masters BS, McMillan K, Sheta EA, et al.: Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate - liganded heme protein that hydroxylates L - arginine to produce NO as a cellular signal. *The FASEB*. 1996; 10(5): 552-558.
- (29) Griffith OW, Stuehr DJ: Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*. 1995; 57(1): 707-734.
- (30) Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, et al.: Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *Experimental Med*. 1992 1; 176(2): 599-604.
- (31) Rodriguez-Crespo I, Gerber NC, Ortiz de Montellano PR: Endothelial nitric-oxide synthase. Expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *J Biol Chem*. 1996 10; 271(19): 11462-11467.
- (32) Roman LJ, Sheta EA, Martasek P, et al.: High-level expression of functional rat neuronal nitric oxide synthase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 29; 92(18): 8428-8432.
- (33) Rodriguez-Crespo I, de Montellano PR: Human Endothelial Nitric Oxide Synthase: Expression in *Escherichia coli*, Coexpression with Calmodulin, and Characterization. *Arch Biochem Biophys*. 1996 1; 336(1): 151-156.
- (34) Fossetta JD, Niu XD, Lunn CA, et al.: Expression of human inducible nitric oxide synthase in *Escherichia coli*. *FEBS letters*. 1996 29; 379(2): 135-138.
- (35) Wu C, Zhang J, Abu-Soud H, et al.: High-level expression of mouse inducible nitric oxide synthase in *Escherichia coli* requires coexpression with calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 15; 222(2): 439-444.
- (36) 矢口直之, 鈴木敬一郎 (編): NOの生理作用と疾患, 1999, 羊土社.
- (37) Tejero J, Stuehr D: Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthase. *IUBMB life*. 2013; 65(4): 358-365.
- (38) Ravi K, Brennan LA, Levic S, et al.: S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 24; 101(8): 2619-2624.
- (39) Dinerman JL, Steiner JP, Dawson TM, et al.: Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology*. 1994 1; 33(11): 1245-1251.
- (40) Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, et al.: Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J Biol Chem*. 1999 16; 274(29): 20597-20602.
- (41) Hurt KJ, Sezen SF, Lagoda GF, et al.: Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 9; 109(41): 16624-16629.
- (42) Song T, Hatano N, Sugimoto K, et al.: Nitric oxide prevents phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at serine1412 by inhibiting the Akt/PKB and CaM-K II signaling pathways. *Int J Mol Med*. 2012 1; 30(1): 15-20.
- (43) Rameau GA, Tukey DS, Garcin-Hosfield ED, et al.: Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J Neurosci*. 2007 28; 27(13): 3445-3455.
- (44) Bauer PM, Fulton D, Boo YC, et al.: Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in

- endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2003 25; 278(17): 14841-14849.
- (45) Garcia V, Sessa WC. Endothelial NOS: perspective and recent developments. *British J Pharmacol.* 2019; 176(2): 189-196.
- (46) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999 10; 399(6736): 601-605.
- (47) Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al.: Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999 10; 399(6736): 597-601.
- (48) Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, et al.: AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS letters.* 1999 29; 443(3): 285-289.
- (49) Fulton DJ: Transcriptional and posttranslational regulation of eNOS in the endothelium. In *Advances in Pharmacol* 2016 1 (Vol. 77, pp. 29-64). Academic Press.
- (50) Loot AE, Fisslthaler B, Busse R, et al.: The Proline-Rich Tyrosine Kinase PYK2 Regulates NO Production by eNOS under Physiologic and Pathophysiologic Conditions. 2007: II\_294-II\_294.
- (51) Tyryshkin A, Gorgun FM, Fattah EA, et al.: Src kinase-mediated phosphorylation stabilizes inducible nitric-oxide synthase in normal cells and cancer cells. *J Biol Chem.* 2010 1; 285(1): 784-792.
- (52) Brenman JE, Chao DS, Gee SH, et al.: Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and  $\alpha$ 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell.* 1996 8; 84(5): 757-767.
- (53) Grozdanovic Z, Gossrau R: Co-localization of nitric oxide synthase I (NOS I) and NMDA receptor subunit 1 (NMDAR-1) at the neuromuscular junction in rat and mouse skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* 1997; 291: 57-63.
- (54) Aoki C, Brecht DS, Fenstermaker S, et al.: The subcellular distribution of nitric oxide synthase relative to the NR1 subunit of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Progress in Brain Res.* 1998 1; 118: 83-97.
- (55) Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, et al. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends in Cell Biology.* 1994 1; 4(7): 231-235.
- (56) GATH I, EBERT J, GÖDTEL-ARMBRUST U, et al.: NO synthase II in mouse skeletal muscle is associated with caveolin 3. *Biochemical J.* 1999 15; 340(3): 723-728.
- (57) Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, et al.: Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin: Functional significance of the NOS caveolin binding domain *in vivo*. *J Biol Chem.* 1997 10; 272(41): 25437-25440
- (58) Venema VJ, Ju H, Zou R, et al.: Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle: Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem.* 1997 7; 272(45): 28187-28190.
- (59) Ohsawa Y, Ohtsubo H, Saito Y, et al.: Caveolin 3 suppresses phosphorylation-dependent activation of sarcolemmal nNOS. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 5; 628: 84-90.
- (60) Hedderick EF, Simmers JL, Soleimani A, et al.: Loss of sarcolemmal nNOS is common in acquired and inherited neuromuscular disorders. *Neurology.* 2011 15; 76(11): 960-967.
- (61) Minetti C, Sotgia F, Bruno C, et al.: Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nature genetics.* 1998 1; 18(4): 365-368.
- (62) Slivka A, Chuttani R, Carr-Locke DL, et al.: Inhibition of sphincter of Oddi function by the nitric oxide carrier S-nitroso-N-acetylcysteine in rabbits and humans. *J Clin Invest.* 1994 1; 94(5): 1792-1798.
- (63) Thomas GD, Sander M, Lau KS, et al.: Impaired metabolic modulation of  $\alpha$ -adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 8; 95(25): 15090-15095.
- (64) Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC: Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or-26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry.* 1995 1; 34(38): 12333-12340.
- (65) Busse R, Fleming I. Regulation of NO synthesis in endothelial cells. *Kidney Blood Press Res.* 1998; 21(2-4): 264-266.
- (66) Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, et al.: Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 1998 23; 392(6678): 821-824.
- (67) Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, et al.: Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex *in vitro*: evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem.* 2000 21; 275(29): 22268-22272.

- (68) Jiang J, Cyr D, Babbitt RW, et al.: Chaperone-dependent regulation of endothelial nitric-oxide synthase intracellular trafficking by the co-chaperone/ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem.* 2003 5; 278(49): 49332-49341.
- (69) Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(5): 1079-1095.
- (70) Knowles, RG, Palacios M, Palmer RM, et al.: 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(13): 5159-5162.
- (71) Sheng H, Schmidt HH, Nakane M, et al.: Characterization and localization of nitric oxide synthase in non-adrenergic non-cholinergic nerves from bovine retractor penis muscles. *Br J Pharmacol.* 1992; 106(4): 768-773.
- (72) Garthwaite J, Boulton CL: Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57(1): 683-706.
- (73) Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, et al.: Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature reviews neuroscience.* 2007; 8(10): 766-775.
- (74) Paakkari I, Lindsberg P: Nitric oxide in the central nervous system. *Annals of Med.* 1995 1; 27(3): 369-377.
- (75) Dawson VL, Dawson TM: Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. *Advances in Pharmacol.* 1995 1; 34: 323-342.
- (76) Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, et al.: Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature.* 1990 24; 345(6273): 346-347.
- (77) Boeckxstaens GE, Peickmans PA, Bull H, et al.: Non-adrenergic non-cholinergic relaxation mediated by nitric oxide in the canine ileocolonic junction. *European J Pharmacol.* 1990 6; 190(1-2): 239-246.
- (78) Kusner LL, Kaminski HJ: Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res.* 1996 19; 730(1-2): 238-242.
- (79) Silvagno F, Xia H, Bredt DS: Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1996 10; 271(19): 11204-11208.
- (80) Mundel P, Bachmann S, Bader M, et al.: Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney international.* 1992 1; 42(4): 1017-1019.
- (81) Asano K, Chee CB, Gaston B, et al.: Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 11; 91(21): 10089-10093.
- (82) Lajoix AD, Reggio H, Chardes T, et al.: A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic  $\beta$ -cells controls insulin secretion. *Diabetes.* 2001 1; 50(6): 1311-1323.
- (83) Kaneko YK, Ishikawa T: Dual role of nitric oxide in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Pharmacol Sci.* 2013 20; 123(4): 295-300.
- (84) Lohinai Z, Burghardt B, Zelles T, et al.: The effect of L-arginine/nitric oxide pathway on salivary amylase secretion in conscious rats. *J Physiology-Paris.* 1997 1; 91(3-5): 217-221.
- (85) Lomniczi A, Suburo AM, Elverdin JC, et al.: Role of nitric oxide in salivary secretion. *Neuroimmunomodulation.* 1998 1; 5(5): 226-233.
- (86) Looms D, Tritsaris K, Pedersen AM, et al.: Nitric oxide signalling in salivary glands. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31(10): 569-584.
- (87) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical J.* 2001 1; 357(3): 593-615.
- (88) Hosseini N, Kourosh-Arabi M, Nadjafi S, et al.: Structure, Distribution, Regulation, and Function of Splice Variant Isoforms of Nitric Oxide Synthase Family in the Nervous System. *Current Protein and Peptide Science.* 2022 1; 23(8): 510-534.
- (89) Brenman JE, Chao DS, Gee SH, et al.: Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell.* 1996 8; 84(5): 757-767.
- (90) Andrabi SM, Sharma NS, Karan A, et al.: Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. *Advanced Sci.* 2023 26: 2303259.
- (91) Zhang YH, Jin CZ, Jang JH, et al. Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology. *J Physiology.* 2014 1; 592(15): 3189-3200.
- (92) Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, et al.: Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 1; 94(7): 3396-3401.
- (93) Catania MV, Aronica E, Yankaya B, et al.: Increased expression of neuronal nitric oxide synthase spliced variants in reactive astrocytes of amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord. *J Neurosci.* 2001 1; 21(11): RC148.



- (94) Lainé, Romuald, and Paul R: Ortiz de Montellano. Neuronal nitric oxide synthase isoforms  $\alpha$  and  $\mu$  are closely related calpain-sensitive proteins. *Mol Pharmacol* 54.2 (1998): 305-312.
- (95) Magee T, Fuentes AM, Garban H, et al.: Cloning of a novel neuronal nitric oxide synthase expressed in penis and lower urinary tract. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 4; 226(1): 145-151.
- (96) Kolesnikov YA, Chereshnev I, Criesta M, et al.: Opposing actions of neuronal nitric oxide synthase isoforms in formalin-induced pain in mice. *Brain Res*. 2009 15; 1289: 14-21.
- (97) Fujisawa H, Ogura T, Kurashima Y, et al.: Expression of two types of nitric oxide synthase mRNA in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem*. 1994; 63(1): 140-145.
- (98) Saur D, Paehge H, Schusdziarra V, et al.: Distinct expression of splice variants of neuronal nitric oxide synthase in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2000 1; 118(5): 849-858.
- (99) Hölscher C: Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends in Neurosci*. 1997 1; 20(7): 298-303.
- (100) Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol*. 1995; 57(1): 737-769.
- (101) Pou S, Pou WS, Bredt DS, et al. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1992 5; 267(34): 24173-241736.
- (102) Toda N, Ayajiki K, Okamura T: Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase. *J Hypertens*. 2009 1; 27(10): 1929-1940.
- (103) Garthwaite J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*. 2006 8; 26(45): 11513-11521.
- (104) Collingridge GL, Bliss TV. NMDA receptors-their role in long-term potentiation. *Trends in Neurosci*. 1987 1; 10(7): 288-293.
- (105) Morris RG, Anderson E, Lynch GA, et al.: Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986 27; 319(6056): 774-776.
- (106) Chiueh CC. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999; 890(1): 301-311.
- (107) Honda S, Namekata K, Kimura A, et al.: Survival of alpha and intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in NMDA-induced neurotoxicity and a mouse model of normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019 3; 60(12): 3696-3707.
- (108) Malgaroli A, Tsien RW: Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Nature*. 1992 14; 357(6374): 134-139.
- (109) Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, et al.: Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science*. 1994 18; 263(5149): 973-977.
- (110) Courtney MJ, Li LL, Lai YY: Mechanisms of NOS1AP action on NMDA receptor-nNOS signaling. *Front Cell Neurosci*. 2014 27; 8: 252.
- (111) Ota KT, Pierre VJ, Ploski JE, et al.: The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase. *Learning Memory*. 2008; 15(10): 792.
- (112) Ping J, Schafe GE: The NO-cGMP-PKG signaling pathway coordinately regulates ERK and ERK-driven gene expression at pre-and postsynaptic sites following LTP-inducing stimulation of thalamo-amygdala synapses. *Neural Plast*. 2010; 2010.
- (113) Yang X, Sun X, Wu J, et al.: Regulation of the SIRT1 signaling pathway in NMDA-induced Excitotoxicity. *Toxicology Letters*. 2020 1; 322: 66-76.
- (114) 佐藤拓己：システインを介した情報伝達 --NOから NEPP11 へ。生化学 / 日本生化学会 編。2007; 79(1): 28-34.
- (115) Meffert MK, Premack BA, Schulman H: Nitric oxide stimulates Ca<sup>2+</sup>-independent synaptic vesicle release. *Neuron*. 1994 1; 12(6): 1235-1244.
- (116) Eguchi K, Nakanishi S, Takagi H, et al.: Maturation of a PKG-dependent retrograde mechanism for exocytotic coupling of synaptic vesicles. *Neuron*. 2012 10; 74(3): 517-529.
- (117) Garthwaite J: NO as a multimodal transmitter in the brain: discovery and current status. *British J Pharmacol*. 2019; 176(2): 197-211.
- (118) Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, et al.: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993 12; 364(6438): 626-632.
- (119) Tottrup A, Svane D, Forman A: Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. *Am J Physiol*. 1991 1; 260(3): G385-389.
- (120) Lefebvre RA. Pharmacological characterization of the nitrergic innervation of the stomach. *Verhan-*

- delingen-Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België". 2002 1; 64(3): 151-166.
- (121) Takahashi T: Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol.* 2003; 38: 421-430.
- (122) Xue S, Valdez D, Collman PI, et al.: Effects of nitric oxide synthase blockade on esophageal peristalsis and the lower esophageal sphincter in the cat. *Canadian J Physiol Pharmacol.* 1996 1; 74(11): 1249-1257.
- (123) Park H, Conklin JL. Neuromuscular control of esophageal peristalsis. *Current Gastroenterology Reports.* 1999; 1(3): 186-197.
- (124) Burnett AL: Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biology Reproduction.* 1995 1; 52(3): 485-489.
- (125) Percival, Justin M: nNOS regulation of skeletal muscle fatigue and exercise performance. *Biophysical Reviews* 3 2011: 209-217.
- (126) Bradley SJ, Kingwell BA, Canny BJ, et al.: Skeletal muscle neuronal nitric oxide synthase  $\mu$  protein is reduced in people with impaired glucose homeostasis and is not normalized by exercise training. *Metabolism.* 2007 1; 56(10): 1405-1411.
- (127) Kerrick WG, Xu Y, Percival JM: nNOS splice variants differentially regulate myofilament function but are dispensable for intracellular calcium and force transients in cardiac papillary muscles. *PLoS One.* 2018 20; 13(7): e0200834.
- (128) Percival JM, Anderson KN, Gregorevic P, et al.: Functional deficits in nNOS  $\mu$ -deficient skeletal muscle: myopathy in nNOS knockout mice. *PLoS One.* 2008 13; 3(10): e3387.
- (129) Mezghenna K, Leroy J, Azay-Milhau J, et al.: Counteracting neuronal nitric oxide synthase proteasomal degradation improves glucose transport in insulin-resistant skeletal muscle from Zucker fa/fa rats. *Diabetologia.* 2014; 57: 177-186.
- (130) Mitsui Y, Yasuda N, Furuyama S, et al.: Nitric oxide synthase activities in mammalian parotid and submandibular salivary glands. *Arch Oral Biol.* 1997 1; 42(9): 621-624.
- (131) Xu X, Zeng W, Diaz J, et al.: nNOS and Ca<sup>2+</sup> influx in rat pancreatic acinar and submandibular salivary gland cells. *Cell Calcium.* 1997 1; 22(3): 217-228.
- (132) Michikawa H, Mitsui Y, Fujita-Yoshigaki J, et al.: cGMP production is coupled to Ca<sup>2+</sup>-dependent nitric oxide generation in rabbit parotid acinar cells. *Cell Calcium.* 1998 1; 23(6): 405-412.
- (133) looms DK, Tritsarlis K, Nauntofte B, et al.: Nitric oxide and cGMP activate Ca<sup>2+</sup>-release processes in rat parotid acinar cells. *Biochemical J.* 2001 1; 355(1): 87-95.
- (134) Rosignoli F, Leirós CP: Activation of nitric oxide synthase through muscarinic receptors in rat parotid gland. *European J Pharmacol.* 2002 29; 439(1-3): 27-33.
- (135) Sayardoust S, Ekström J: Parasympathetic nerve-evoked protein synthesis, mitotic activity and salivary secretion in the rat parotid gland and the dependence on NO-generation. *Arch Oral Biol.* 2006 1; 51(3): 189-197.
- (136) Soinila J, Nuorva K, Soinila S. Nitric oxide synthase in human salivary glands. *Histochem Cell Biol.* 2006; 125: 717-723.
- (137) Kontinen YT, Platts LA, Tuominen S, et al.: Role of nitric oxide in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(5): 875-883.
- (138) Correia PN, Carpenter GH, Paterson KL, et al.: Inducible nitric oxide synthase increases secretion from inflamed salivary glands. *Rheumatology (Oxford).* 2010; 49(1): 48-56.
- (139) Caulfield VL, Balmer C, Dawson LJ, et al.: A role for nitric oxide-mediated glandular hypofunction in a non-apoptotic model for Sjögren's syndrome. *Rheumatology.* 2009 1; 48(7): 727-733.
- (140) Kawabata S, Koshihara T, Shibata T: The lipopolysaccharide-activated innate immune response network of the horseshoe crab. *Invertebrate Survival J.* 2009 20; 6(1): 59-77.
- (141) Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM: Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science.* 2003 3; 302(5642): 100-103.
- (142) Sudhamsu J, Crane BR. Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? *Trends in Microbiology.* 2009 1; 17(5): 212-218.
- (143) Martens - Habbenha W, Qin W, Horak RE, et al.: The production of nitric oxide by marine ammonia-oxidizing archaea and inhibition of archaeal ammonia oxidation by a nitric oxide scavenger. *Environmental Microbiology.* 2015; 17(7): 2261-2274.