

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590261

研究課題名（和文） 神経細胞における新たなグルタチオン産生調節機構の解明

研究課題名（英文） A novel mechanism of glutathione synthesis in neuron

研究代表者

青山 晃治 (AOYAMA KOJI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：00420943

研究成果の概要（和文）：神経細胞のグルタチオン（GSH）産生に関わる EAAC1 は、小胞体蛋白である GTRAP3-18 により抑制的に制御されている。今回我々は、マウス側脳室持続注入モデルを用いて、GTRAP3-18 の脳内 GSH 量に及ぼす影響について検討した。GTRAP3-18 siRNA 注入モデルでは、海馬の GSH 量が有意に増加した。一方、メチルβサイクロデキストリン注入モデルでは、海馬での GTRAP3-18 発現量増加と GSH 量減少を認めた。以上の結果から、海馬神経細胞の GSH 量は GTRAP3-18 によって調節されることが証明された。

研究成果の概要（英文）：EAAC1 plays an important role in neuronal GSH synthesis. GTRAP3-18 is an EAAC1-binding protein to inhibit the function in neurons. However, it is still elusive that GTRAP3-18 negatively regulates neuronal GSH synthesis in vivo. In this study, we showed that intraventricular injection of GTRAP3-18 siRNA decreased GSH content in the hippocampus, while intraventricular injection of methyl β- cyclodextrin decreased GSH content with increased GTRAP3-18 expression in the hippocampus. These results suggest that GTRAP3-18 negatively regulates neuronal GSH synthesis in the hippocampus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：グルタチオン、GTRAP3-18、EAAC1、神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

Alzheimer 病(AD)や Parkinson 病(PD)は加齢に伴い発症する神経変性疾患であり、高齢化社会においては今後、患者数の増加が予想される疾患である。AD、PD 患者の脳組織では、酸化ストレスの亢進、抗酸化物質グルタチオン(GSH)の減少が報告されている。これまでの研究から、脳内 GSH 量の低下は神経変性疾患の発症に先立って起こると考えられている。また、正常な加齢に伴って脳内 GSH が低下することも知られているが、その意義および機序について

は明らかではない。

GSH は、中枢神経において細胞内濃度の最も高い抗酸化物質であり、酸化還元反応の中心的役割を担っている。GSH は、Super oxide、nitric oxide、peroxynitrite および hydroxyl radical などの様々なフリーラジカルと直接反応し活性を抑制する抗酸化機能を持ち、GSH peroxidase や GSH-S-transferase の補酵素として働き、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の分解除去や細胞内毒物の細胞外排泄にも関わっている。GSH の機能障害は酸化ストレスを中心とする認知機能ならびに運動

機能の低下および神経変性疾患に深く関与しているものと推測される。また、GSH は中枢神経における重要な抗酸化物質であるだけでなく、酵素反応、酸化還元反応、および解毒機構においても重要な役割を担っており、加えて神経伝達物質として働くことも知られている。海馬においては、記憶に関わるシナプスの可塑性にも関わっている。以上のことから GSH の機能障害は加齢性変化および神経変性疾患に深く関与しているものと推測される。

GSH は、グルタミン酸、システインおよびグリシンからなるトリペプチドである。細胞内に高濃度で存在するグルタミン酸やグリシンに対し細胞内システイン濃度は非常に低いため、GSH の合成はシステインの細胞内取り込み量により決定される。神経細胞におけるシステイン取り込みの75%は、Na<sup>+</sup>依存性グルタミン酸トランスポーター (EAAC1) が担っている。EAAC1 は神経細胞に特異的なグルタミン酸トランスポーターであるものの、中枢神経のシナプス間隙におけるグルタミン酸の再取り込みは主にグリア細胞に発現している他のタイプのグルタミン酸トランスポーターにより行われていることから、これまで中枢神経における EAAC1 の意義は明らかではなかった。近年、EAAC1 がグリア型グルタミン酸トランスポーターとは異なり、GSH の基質の一つであるシステインをグルタミン酸同様に細胞内に取り込むことが明らかとなった。申請者は、EAAC1 欠損マウスにおいては脳内 GSH の低下、海馬での酸化ストレス亢進、加齢に伴う脳萎縮と空間認知機能の低下をきたすことを明らかにし、神経細胞においては EAAC1 が GSH 産生に必要なシステインの取り込みに必須であることを報告した (Nature Neuroscience, 2006)。神経細胞における GSH 低下は加齢に伴う神経変性を促進すると考えられ、EAAC1 のシステイン取り込み機能を促進するメカニズムの解明が神経変性の抑制に関わると考えられる。

GTRAP3-18 は、小胞体に存在する 188 のアミノ酸からなるタンパク質で、EAAC1 の C 末端に直接結合することにより EAAC1 の細胞膜表面への移行を抑制し、グルタミン酸の取り込みを抑制するタンパク質であることが知られている。我々は、GTRAP3-18 がグルタミン酸だけでなくシステインの細胞内取り込み、ひいては神経細胞内 GSH 産生も抑制していると考え、これまでの培養細胞での研究から、GTRAP3-18 が EAAC1 による細胞内 GSH 産生を抑制することを明らかにした。しかしこれまでに、動物モデルにおける GTRAP3-18 の役割については報告がない。

神経細胞内の GSH 量を増加させることが神経変性に対し保護的に働くことは以前より知られていたが、これまでの研究では主に細胞外もしくは末梢からの GSH およびシステインなどの GSH 前駆物質の投与による実験が中心であった。GSH やシステインは本来、血液脳関門を通過しにくく、

中枢神経における GSH 量を増加しない。解毒に使用される N-アセチルシステインなどの GSH 前駆物質についても、動物実験において脳内 GSH 増加の報告はあるもののやはり血液脳関門の透過性が低く大量投与が必要であり、臨床的に期待できるものはいまだ見つかっていない。また、神経細胞選択的に GSH を増加させる物質も見つかっていない。これらのことから申請者は、外来性の GSH 増加作用ではなく、内在的に、かつ神経細胞選択的に GSH 産生を調節するメカニズムについて研究を行ってきた。神経細胞におけるシステインの取り込みは EAAC1 にのみ依存していること、システインが GSH 生成に必要であること、加えて GTRAP3-18 が EAAC1 を選択的に抑制していることから、我々は、神経細胞内の GSH 産生は GTRAP3-18 に制御されていると考え、神経細胞に特異的に発現する GTRAP3-18 の機能を抑制することで EAAC1 による機能を高め、内在的に神経細胞の GSH 量を増やし、それによって神経変性が抑制されると考えている。神経細胞選択的な GSH 産生機構を解明することができれば、将来的に、神経変性疾患の発症予防、および発症後の神経変性抑制のための研究へとつながる。

## 2. 研究の目的

マウス siRNA 側脳室持続注入(ICV)モデルを用いて、神経細胞型グルタミン酸トランスポーター EAAC1、EAAC1 制御蛋白 GTRAP3-18 の役割を明らかにすることが目的である。これまでの報告では、siRNA をマウスの側脳室に持続注入することによりノックダウンモデルを作成することは報告されているものの、GTRAP3-18 をターゲットにした報告はない。本研究においては、まずは初代神経培養細胞を用いた GTRAP3-18 ノックダウンモデルを作成し、神経細胞における細胞内 GSH 量の変化を確認する。次に GTRAP3-18 をターゲットにした siRNA をマウスの側脳室に持続注入することによりノックダウンモデルを作成し、海馬、中脳における GSH 産生に及ぼす影響について考察する。また、GTRAP3-18 発現量を増加させるメチルβサイクロデキストリンを用いた ICV モデル(過剰発現マウス)も作成し、GSH 産生に与える影響を比較検討する。

## 3. 研究の方法

本研究においては、ラット初代神経培養細胞において、GTRAP3-18 をターゲットにした antisense oligonucleotide を用いて GTRAP3-18 の発現を抑制し、細胞内 GSH 量に与える影響を観察する。次に、GTRAP3-18 をターゲットにした siRNA をマウスの側脳室に持続注入することによりノックダウンモデルを作成し、海馬における GSH 産生に及ぼす影響について考察する。

GTRAP3-18 に対する antisense oligonucleotide の効果: GTRAP3-18 に対する

antisense oligonucleotide の GSH に及ぼす効果は、初代神経培養細胞に GSH マーカーである CMFDA を用いて確認する。

siRNA モデル動物作製: 小動物用脳定位固定装置を用いて C57BL6 マウス(オス4週齢)の側脳室内に Alzet pump Brain infusion Kit を用いて GTRAP3-18 に対する siRNA もしくは scrRNA を持続注入する。実験方法の詳細については、Thakker らの方法 (Proceedings of the National Academy of Sciences. 49, 17270-17275, 2004) を参照する。

GTRAP3-18 発現抑制の確認: 1-2 週間の siRNA 持続投与後に脳組織を取り出し、大脳皮質、海馬、中脳、および小脳における GTRAP3-18 の発現量をウエスタンブロットおよび免疫染色にて確認する。

GSH 測定: Tietze 法 (Analytical Biochemistry. 27, 502-522, 1969) を用いた酵素活性法により組織 GSH を測定する。GTRAP3-18 siRNA 投与マウスにおいて GSH 量の変化が見られるかどうか確認する。

また、GTRAP3-18 発現量を増加させるメチルβサイクロデキストリンを用いた ICV モデル(過剰発現マウス)も作成し、GSH 産生に与える影響を比較検討する。

#### 4. 研究成果

ラット初代神経培養細胞を用いた実験では、GTRAP3-18 に対する antisense oligonucleotide を用いて GTRAP3-18 の発現を抑制したところ、細胞内 GSH 量は有意に低下した。一方、メチルβサイクロデキストリン処理により細胞内 GTRAP3-18 の発現は上昇し、メチルβサイクロデキストリンの濃度依存的に細胞内 GSH 量は有意に低下した。

EAAC1 および GTRAP3-18 を標的蛋白とした siRNA を、それぞれマウス側脳室内に 7 日間持続投与した。海馬において siRNA による標的蛋白の発現減少を免疫染色法およびウエスタンブロット法により確認した。海馬 GSH 量は EAAC1 の発現量減少により有意に減少した。一方、GTRAP3-18 の発現量減少は、海馬 GSH 量を有意に増加させた。メチルβサイクロデキストリンの 5 日間側脳室持続投与により、海馬における GTRAP3-18 の発現量、および EAAC1 との結合量は増加し GSH 量は減少した。以上の結果から、海馬神経細胞の GSH 量は EAAC1 を制御している GTRAP3-18 によって調節されていることが、動物実験によっても証明された。

国内外において EAAC1/ GTRAP3-18 は、専らグルタミン酸再取り込みについて研究されており、システイン取り込みおよび GSH 産生機構に関する研究は、申請者らの研究以外にない。GTRAP3-18 を抑制することにより神経細胞における GSH 産生を高め、神経変性を抑制する研

究は、この点において独創的である。GTRAP3-18 発現抑制マウスにおいて、中枢神経における GSH 量の増加と神経変性に対する保護効果が認められたことは、神経細胞選択的な GSH 産生機構を解明するだけでなく、薬理的にも GTRAP3-18 阻害物質を創造することで、将来的に AD および PD などの神経変性疾患の治療薬開発につながる可能性が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. Modulation of neuronal glutathione synthesis by EAAC1 and its interacting protein GTRAP3-18. *Amino Acids*. 査読有 2011 (in press).
2. Aoyama K, Matsumura N, Watabe M, Wang F, Kikuchi-Utsumi K, Nakaki T. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. *Neuroscience*. 査読有 181, 206-215, 2011.
3. Watabe M, Aoyama K, Nakaki T. A dominant role of GTRAP3-18 in neuronal glutathione synthesis. *Journal of Neuroscience* 査読有 28, 2008, 9404-9413.
4. Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *Journal of Pharmacological Sciences* 査読有 108, 2008, 227-238.

[学会発表] (計 3 件)

1. 青山 晃治、マウス脳組織を用いたプリン誘導体によるシステイン取り込みに関する研究、第 83 回日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 16 日、大阪
2. 青山 晃治、Crucial Role of EAAC1, a member of glutamate transporter family, in cysteine uptake and glutathione level in the brain. 11th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins 平成 21 年 8 月 5 日、ウィーン
3. 青山 晃治、マウス脳内グルタチオン濃度調節機構の解明、第 82 回日本薬理学会年会、平成 21 年 3 月 18 日、横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青山 晃治 (AOYAMA KOJI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：00420943

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：