

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500454

研究課題名(和文) グルタミン酸輸送体結合タンパク質欠損マウスにおける記憶力・運動能力向上の機序

研究課題名(英文) Loss of the gene for a neuronal glutamate transporter-binding protein induces glutathione synthesis and better cognitive performances in mice.

研究代表者

青山 晃治 (AOYAMA, KOJI)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：00420943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経保護物質であるグルタチオン(GSH)を脳内で増やすために、神経細胞においてGSH産生を抑制する蛋白質を欠損させた遺伝子改変マウスを作製した。欠損マウスの脳内においては神経細胞内GSH量の増加と酸化ストレスに対する抵抗性を認めた。さらに、行動解析実験にて記憶学習能力の向上を認めた。これらの結果は、本研究で標的とした蛋白質の発現制御が神経変性疾患の治療薬開発につながる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Glutathione (GSH) plays some important neuroprotective roles in the brain. The strategy to increase neuronal GSH level in the brain is a promising approach to the treatment of neurodegenerative diseases. To investigate the potential regulatory mechanism to increase neuronal GSH level in vivo, we generated GTRAP3-18-deficient (GTRAP3-18 KO) mice using a gene-targeting approach. Loss of the GTRAP3-18 gene resulted in increased neuronal GSH content and neuroprotection against oxidative stress. Moreover, GTRAP3-18 KO mice performed better in motor/spatial learning and memory tests than wild-type mice. These results indicate that the suppression of GTRAP3-18 increases neuronal resistance to oxidative stress and also facilitates cognitive function by increasing GSH content. The present study may provide a molecular basis for the development of treatments for neurodegenerative diseases.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：グルタチオン EAAC1 GTRAP3-18 神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

Alzheimer病 (AD) やParkinson病 (PD) などの神経変性疾患では、中枢神経における酸化ストレスの亢進、および抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) の減少が報告されている。さらに、正常な加齢に伴って脳内GSH量が低下することも知られているが、生体内において脳内GSH量の増加が神経変性を阻止するかどうかについては明らかではない。

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り、そ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大部分は神経細胞に存在するNa<sup>+</sup>依存性グルタミン酸トランスポーターであるEAAC1が担っている。申請者は、EAAC1欠損 (KO) マウスにおいて脳内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学習機能の低下をきたすことを報告した (Nature Neuroscience, 2006)。

GTRAP3-18は、EAAC1結合蛋白質であり、神経細胞においてEAAC1の細胞膜上への発現を抑制している。我々は、GTRAP3-18が神経細胞内GSH産生も制御していると考え、これまでの研究で、GTRAP3-18の増加が細胞内GSHを減少させ、逆にGTRAP3-18の減少が細胞内GSHを増加させることを明らかにしてきた (Molecular Pharmacology, 2007) (Journal of Neuroscience, 2008)。

## 2. 研究の目的

本研究では、GTRAP3-18 KOマウスを作製し、EAAC1/GTRAP3-18のGSH産生調節機構を明らかにすることが第一の目的である。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、神経細胞内のGSH産生はGTRAP3-18に制御されていると考えられる。

第二に、GTRAP3-18 KOの表現型解析を行い

形態的異常の有無、神経行動学的異常の有無、運動能力、認知機能について検討した。

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。GTRAP3-18 KOマウスを用いて神経細胞選択的な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創薬研究へとつながることが期待される。

## 3. 研究の方法

GTRAP3-18遺伝子のexon 1をNeo遺伝子で置換することによってGTRAP3-18 KOマウスを作製した。実験では、C57BL/6マウスで交配繁殖させたGTRAP3-18 KOマウス、ヘテロ接合変異マウス、および野生型 (WT) マウスを用いた。生後、中枢神経における形態学的異常の有無、GSH量、EAAC1発現量、酸化ストレスの程度を生化学的、免疫組織学的手法により比較検討した。同時に水迷路試験、ロタロッド試験、オープンフィールド試験などによる認知行動学的検査も行った。

## 4. 研究成果

GTRAP3-18遺伝子のexon 1をNeo遺伝子で置換することによってGTRAP3-18 KOマウスを作製した。Neo遺伝子導入にあたっては、理化学研究所発生・再生科学総合研究センターで行った。GTRAP3-18 KOマウスは、本学中央動物実験施設にて維持・管理し、各実験は当講座内の専用実験室にて行った。実験では、C57BL/6マウスで交配繁殖させたGTRAP3-18 KOマウス、ヘテロ接合変異マウス、および野生型 (WT) マウスを用いた。

固定後脳組織切片を用いたヘマトキシリン・エオジン組織染色では、GTRAP3-18 KOマウスにおいて神経変性所見は認められなかった。また、脳組織において形態学的な異常やグリオシスも認められなかった。

脳抽出液を用いたHPLC法による実験では、WTマウスと比較し、GTRAP3-18 KOマウスにお

いて脳内システイン及びGSH量の有意な増加を認めた。一方、脳内グルタミン酸、グリシン、およびGABA量については両群間に差は認められなかった。

海馬神経細胞におけるGSH量の測定は、GSHマーカーであるCMFDAを用いた組織染色を行い確認した。各種細胞マーカーとCMFDAを用いた二重組織染色像では、WTと比較しGTRAP3-18 KOマウスにおいて、神経細胞マーカーであるNeuN陽性細胞でのCMFDA染色の増強が認められた。一方、グリア細胞マーカーであるGFAPやIba-1陽性細胞では、WTとGTRAP3-18 KOマウスにおいてCMFDA染色に違いは認められなかった。以上の結果から、GTRAP3-18 KOマウスにおける脳内GSH量の増加は神経細胞に由来することが示された。

脳サンプルを用いたWestern Blot法による検討では、GTRAP3-18 KOマウスにおいて細胞膜上でのEAAC1発現量の増加を認めた。この結果は、脳組織切片を用いた免疫組織染色においても確認された。一方、WTマウスと比較しGTRAP3-18 KOマウス脳においてはEAAC1以外のシステイントランスポーターの発現に変化は認められなかった。GTRAP3-18 KOマウスの神経細胞におけるGSH量の増加は、EAAC1の細胞膜上への発現が増加したことによる細胞内へのシステインの取り込み増加によるものと考えられる。GTRAP3-18は、EAAC1を小胞体に留めるアンカー蛋白質として機能していることから、GTRAP3-18の機能抑制がEAAC1の細胞膜上への発現を促し、システインの神経細胞内への取り込み、ひいてはGSH産生を促進したと考えられる。

GTRAP3-18 KOマウスの脳内における酸化ストレスに対する抵抗性を評価するために、生後4週齢マウスの脳切片をvibratomeにて作成し、直後に95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>ガスで飽和した30の人工髄液artificial cerebrospinal fluid (aCSF) 中で実験を行った。

3-morpholininosydnonimine (SIN-1)は、NOドナ

ーとして作用することで強力な酸化ストレスを惹起するペルオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) を発生させる。1 mMのSIN-1を含んだaCSF中に脳組織スライスを30分間静置した後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、ONOO<sup>-</sup>による酸化ストレスマーカーであるニトロタイロシンに対する抗体を用いた免疫組織染色を行い、共焦点顕微鏡下にて組織傷害性をSIN-1未処理の同一脳組織スライスと比較検討した。WTマウスの大脳皮質および海馬スライスにおいては、SIN-1処理後にニトロタイロシン陽性神経細胞が増加したが、GTRAP3-18 KOマウスにおいては、WTと比較し、陽性細胞の増加は抑制されていた。この結果から、GTRAP3-18 KOマウスの脳内ではGSH産生が促進された結果、酸化ストレスに対して抵抗性を示したと考えられた。

また、GTRAP3-18 KOマウスにおける記憶力・運動学習能力について行動学的な解析を行った。空間認知・学習機能評価のための水迷路試験や運動学習機能評価のためのロタロッド試験を用いた検討では、WTマウスと比較しGTRAP3-18 KOマウスは有意に優れた空間認知・学習能力および運動学習機能を持つことが示唆された。

以上の研究結果から、GTRAP3-18の機能を抑制的に制御することは、EAAC1を介した神経細胞に選択的なGSH産生の増加と神経変性に対する抵抗性をもたらすと考えられる。

GTRAP3-18阻害物質の開発により、将来的にADおよびPDなどの神経変性疾患の治療薬となることが期待される。

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 5件)

Aoyama K and Nakaki T. Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 査読有 14: 2013, 21021-21044. doi: 10.3390/ijms141021021

Aoyama K and Nakaki T. Neuroprotective

properties of the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Amino Acids*. 査読有 45: 2013, 133-142. doi: 10.1007/s00726-013-1481-5

**Aoyama K** and Nakaki T. Inhibition of GTRAP3-18 may increase neuroprotective glutathione (GSH) synthesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 査読有 13: 2012, 12017-12035. doi: 10.3390/ijms130912017

**Aoyama K**, Wang F, Matsumura N, Kiyonari H, Shioi G, Tanaka K, Kinoshita C, Kikuchi-Utsumi K, Watabe M, Nakaki T. Increased neuronal glutathione and neuroprotection in *GTRAP3-18*-deficient mice. *Neurobiology of Disease*. 査読有 45: 2012, 973-982. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.016

**Aoyama K**, Watabe M, Nakaki T. Modulation of neuronal glutathione synthesis by EAAC1 and its interacting protein GTRAP3-18. *Amino Acids*. 査読有 42: 2012, 163-169. doi: 10.1007/s00726-011-0861-y

〔学会発表〕(計 4 件)

**青山晃治**, 角田ワッタナポン、押鐘浩之、中木敏夫. マウスの摂食行動が海馬グルタチオン産生に及ぼす影響. 第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 21 日、仙台.

**青山晃治**, 王凡、松村暢子、清成寛、塩井剛、田中かる、木下千里、内海計、渡部正彦、中木敏夫. GTRAP3-18 欠損マウスにおける記憶学習能力の行動学的解析. 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡.

**青山晃治**, 王凡、松村暢子、清成寛、塩井剛、田中かる、木下千里、内海計、渡部正彦、中木敏夫. GTRAP3-18 欠損マウスにおける神経グルタチオン増加と神経保護作用. 第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都.

**Aoyama K**. EAAC1-mediated neuronal glutathione synthesis. 12<sup>th</sup> International congress on amino acids, peptides and proteins. 2012 年 8 月 3 日、北京.

〔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  
<http://www.med.teikyo-u.ac.jp/~pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山晃治 (AOYAMA, Koji)  
帝京大学・医学部・准教授  
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：