

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08962

研究課題名(和文)小胞輸送を標的とするうつ病治療戦略

研究課題名(英文) Depression treatment strategy targeting vesicle trafficking

研究代表者

渡部 正彦 (Watabe, Masahiko)

帝京大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：90301788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本におけるうつ病の生涯有病率は約6.7%といわれ、15人に1人がうつ病を経験している計算になり、決して珍しい病気ではなく誰でも罹患する可能性がある。既存する抗うつ薬は服用のため治療しやすいが、効果が出るまで時間がかかるため医師の指示があるまで服用を続ける必要があり、患者に適切な薬に辿りつくまでに非常に時間を要するなどの問題点が多く存在する。研究代表者は、これまでの抗うつ薬とは全く異なる小胞輸送経路を標的とするアプローチからの研究により、小胞輸送経路を調節するカギとなるRabタンパク質とうつ症状を改善しうる生体内抗酸化因子グルタチオン量調節因子GTRAP3-18が相互作用することを見い出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の抗うつ薬の作用点である神経伝達物質の再取り込みを担うタンパク質を標的とするのではなく小胞輸送経路を標的とすることで、既存薬では改善されない患者に対しての使用や既存薬との併用による改善・副作用の軽減などが期待できる。すなわち、本研究での活性調節経路の存在および病態における役割を解明することは、単に学術的新規性が高いばかりでなく、これらを標的として開発される化合物がうつ病の治療に寄与し得ることを提示でき、工業的にも非常に高いポテンシャルを有する。

研究成果の概要(英文)：The lifetime prevalence of depression in Japan is said to be about 6.7%, which means that 1 in 15 people experience depression. The existing antidepressants are easy to treat because they are taken orally, but they take time to become effective, so it is necessary to continue taking them until a doctor instructs them, and it takes a very long time to find the right drug for the patient. Through research from an approach that targets the vesicular transport pathway, which is completely different from that of conventional antidepressants, I found that Rab protein, which is the key to regulating the vesicle transport pathway, interacts with the antioxidant glutathione content regulator GTRAP3-18, which in vivo that can improve depressive symptoms.

研究分野：分子細胞薬理学

キーワード：タンパク質相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

セロトニン作動性神経に大量に存在するタンパク質 histone deacetylase 6 (HDAC6)の活性を阻害するとうつ様症状が緩和されるとの報告がある(PLoS One. 2012;7: e30924)。HDAC6 遺伝子を破壊したマウス、あるいは阻害薬を投与したマウスでは抗うつ薬を投与したマウスと同様の行動を示すという。現在までに 11 種類見出されている histone deacetylase ファミリーの中で、HDAC6 は細胞質内に局在する唯一の isozyme であるため、HDAC6 の脱アセチル化標的タンパク質が核ではなく細胞質内に多く存在していると考えられる。申請者は、タンパク質リン酸化酵素 CK2 が HDAC6 活性増強因子であることを見出しており(Watabe and Nakaki, J Cell Sci. 2011; 124:1519-32., Watabe and Nakaki, Commun Integr Biol. 2012; 5(3):278-80.)、その結果、CK2 は細胞質内における HDAC6 の活性化を介してうつ症状の出現もしくは増悪に関与する可能性が示唆され、CK2 の活性制御はうつ症状の改善に大いに期待できる。

一方、酸化ストレスを軽減することはうつ病もしくはうつ症状の改善効果を生むと予想されている(J Psychiatr Res. 2012; 46:1326-32)。抗酸化物質は全身に分布しているが、中枢神経系は末梢臓器とは異なり super oxide dismutase の量が圧倒的に少ないことから、その役割におけるグルタチオンの寄与が相対的に大きいと考えられている。

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドである。その合成過程におけるグルタミン酸とシステインの縮合反応が律速段階であること、細胞内システイン濃度がグルタミン酸およびグリシンに比べ著しく低いことから、細胞内グルタチオン濃度制御の律速段階はシステインであると考えられる。さらに、神経細胞は他の細胞とは異なりシステインを細胞外から取り込む機構はなく、細胞外のシステインを EAAC1 と呼ばれる輸送タンパク質が直接取り込むことによりグルタチオンを合成している。EAAC1 と結合するタンパク質として GTRAP3-18 があり、申請者は GTRAP3-18 が EAAC1 のシステイン輸送機能を阻害することにより神経細胞内グルタチオン量を負に制御することを見出している(Watabe et al. J Neurosci. 2008; 28:9404-9413., Watabe et al. Mol Pharmacol. 2007; 72:1103-1110)。したがって、GTRAP3-18 の抑制によるグルタチオン増加を介してうつ症状が改善する可能性がある。

## 2. 研究の目的

申請者が見出したこれら二つの活性調節因子 CK2 と GTRAP3-18 に関するこれまでの報告を整理して互いの関連性を調べてみると、GTRAP3-18 は小胞輸送に関わる G タンパク質 Rab と結合し(J Cell Mol Med. 2009; 13:114-24)、Rab 活性は分子シャペロンである Hsp90 が調節し(Mol Biol Cell 2006;17:3494-507)、Hsp90 のシャペロン活性は HDAC6 の脱アセチル化(Mol Cell 2005;18:601-7)および CK2 のリン酸化(Cell Mol Life Sci 2009; 66:11-12)により制御され、HDAC6 の活性は CK2 が調節(Watabe and Nakaki, J Cell Sci. 2011; 124:1519-32.)している。以上を整理した相関図から推察すると、CK2 と GTRAP3-18 は Hsp90、HDAC6、Rab というタンパク質を介して集束する可能性が濃厚である。うつ病の主な一病因として考えられるシナプス伝達障害を考慮すると、神経伝達物質貯蔵小胞の細胞内輸送に於いて重要な働きを担う Rab タンパク質の制御機構は、既存の抗うつ薬とは異なる新たな薬物標的として大いに期待できる。本研究は五つの CK2/Hsp90/HDAC6/Rab/GTRAP3-18 タンパク質とうつ病との関連性を明確にし、最終的には新規抗うつ薬の開発のための理論的基盤を構築することを目的とする。

抗酸化因子グルタチオンがうつ症状を改善することは知られているが、近年、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC6) 活性阻害がうつ症状を緩和できると報告された。申請者は、世界に先駆けて HDAC6 タンパク質の活性調節機構を解明し、神経細胞内グルタチオン量調節因子 GTRAP3-18 を見出すことに成功している。そこで本研究は、HDAC6 活性調節機構および GTRAP3-18 による神経細胞内グルタチオン量調節機構とうつ病との接点の明確化を目的とし、接点を標的としたこれまでにない全く新しい抗うつ薬開発への薬理的基盤を提示するものである。

## 3. 研究の方法

- (1) 各種発現ベクターの構築は酵母のシステムを用いて行った。
- (2) タンパク質発現による細胞増殖への影響を調べるために、酵母におけるタンパク質発現システムを用いて細胞増殖テストを行った。
- (3) また、最終到達目標であるヒト細胞に及ぼす影響を調べるために、申請者が見出した 2 つの活性調節因子 CK2 および GTRAP3-18 に関するこれまでの実績データ豊富な培養細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて検討することとし、SH-SY5Y 細胞への発現ベクター導入条件を行った。

後、SH-SY5Y 細胞の増殖試験を行なった。

(4) 細胞内への発現ベクター導入後に目的のタンパク質が発現していることを確かめるために、目的とするタンパク質に対するそれぞれの特異抗体を用いて、ウェスタンブロット解析により調べた。

(5) 細胞内への発現ベクター導入後に目的のタンパク質が酵母細胞および SH-SY5Y 細胞内の何処に発現しているか、その局在を調べるために、目的とするタンパク質に対するそれぞれの特異抗体を用いた免疫染色を行うことで可視化し、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。

(6) 細胞内への発現ベクター導入後に目的タンパク質の発現による酵母細胞および SH-SY5Y 細胞の細胞死の判定を行うために、Hoechst による核染色を行い、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。

#### 4. 研究成果

うつ病の主な一病因として考えられるシナプス伝達障害を考慮すると、神経伝達物質貯蔵小胞の細胞内輸送に於いて重要な働きを担う Rab タンパク質の制御機構は、既存の抗うつ薬とは異なる新たな薬物標的として大いに期待できる。これまでの自身の研究とこれまでの報告内容を整理して互いの関連性を調べてみると、五つのタンパク質 CK2、Hsp90、HDAC6、Rab、GTRAP3-18 とうつ病との関連性を明確にすることは、新規抗うつ薬の開発のための理論的基盤構築を可能にし得ることから、五つのタンパク質の活性調節経路の重要性を明らかにすることを目的として本研究を行った。

これらタンパク質の機能を詳細に調べるために、それぞれの発現ベクターの構築を試みた。五つのタンパク質のうち、一番初めに発現ベクターの構築に成功した GTRAP3-18 の発現ベクターを細胞内に導入し強制発現させたところ、驚くべきことに細胞死を誘導したのである。そこで、GTRAP3-18 と結合報告のある Rab タンパク質に着目し、GTRAP3-18 のこの毒性に対する影響を調べた。Rab タンパク質には多くのファミリータンパク質の存在が知られているが、その中で Rab1a を GTRAP3-18 と共に細胞内に強制発現させたところ、Rab1a と GTRAP3-18 とが共発現している生細胞の観察に成功したのである。つまり、GTRAP3-18 の毒性を Rab1a が抑えたというこの結果は、Rab1a が GTRAP3-18 を制御しているというとても重要な事実であることから、論文としてまとめ報告した (Biochem Biophys Rep 2018;14:16-9)。

次に GTRAP3-18 と他の残りのタンパク質との細胞内での関係性を明らかにしようと試みたが、GTRAP3-18 を細胞内に強制発現させると GTRAP3-18 の毒性があまりにも強いため、細胞内で GTRAP3-18 と他の残りのタンパク質との関連性を調べることに難航した。そこで、GTRAP3-18 の毒性を軽減することはできないかと試行錯誤したところ、蛍光タンパク質 GFP を結合させたキメラタンパク質 GFP-GTRAP3-18 としてなら、GTRAP3-18 を細胞内に強制発現させても細胞死を誘導しないことを見出したので、論文としてまとめ報告した (Protein Expr Purif. 2018 Aug; 148:40-45)。この手法は毒性の強いタンパク質を細胞内に強制発現させる実験系において困っている多くの研究者に新たな光を与えることができたのではないかと推察される。

さらに GTRAP3-18 と他の残りのタンパク質との細胞内での関係性を明らかにしようと、他の残りのタンパク質の発現ベクターの構築に取り組んでいたが、当初の想定通りとはいかず試行錯誤している最中に最近まで影響していたコロナ問題に突入してしまった。何とか現在までに CK2 と HDAC6 の発現ベクターの構築に成功し、これら発現ベクターの細胞内導入条件の詳細な検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oshikane Hiroyuki, Watabe Masahiko, Nakaki Toshio	4. 巻 148
2. 論文標題 Facilitation of yeast-lethal membrane protein production by detoxifying with GFP tagging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein Expr Purif	6. 最初と最後の頁 40-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pep.2018.03.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Oshikane Hiroyuki, Watabe Masahiko, Kikuchi-Utsumi Kazue, Nakaki Toshio	4. 巻 14
2. 論文標題 Rab1a rescues the toxicity of PRAF3	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 16～19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2018.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部正彦、押鐘浩之
2. 発表標題 Rabタンパク質によるPRAF3シグナルの機能調節
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部正彦
2. 発表標題 細胞毒性に対するRab1aタンパク質の保護効果
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部正彦
2. 発表標題 Rabタンパク質とPRAFタンパク質による細胞保護効果
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部正彦
2. 発表標題 PRAFタンパク質誘発細胞毒性に対するRabタンパク質の細胞保護効果
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関