

平成21年4月15日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008年

課題番号：18780237

研究課題名（和文）犬遺伝性グルタミン酸輸送体欠損症の分子基盤とその臨床的意義

研究課題名（英文）Molecular basis of hereditary glutamate transporter deficiency in canine red cells

研究代表者

佐藤 耕太（SATO KOTA）

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：50283974

研究成果の概要：

日本犬の一部に見られる遺伝性赤血球GLAST欠損症の分子メカニズムの解明を目的に、不安定GLAST分子をコードするG492S GLASTの分解機序およびGLAST遺伝子転写活性低下機序の両者について検討した。K562赤芽球細胞株発現系を用いた検討からは、野生型およびG492S GLASTの分解過程に大きな差異は見られず、分解はK562では観察できない赤芽球分化後期の成熟過程すなわち正染性赤芽球→網状赤血球に起こると考えられた。また、GLAST遺伝子プロモーターの活性は、上流2-3 kbの領域をMEDEP細胞株において比較した場合に犬形質による差異が見られ、何らかの赤芽球特異的転写因子の関与が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	210,000	3,810,000

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：臨床獣医学

キーワード：グルタミン酸、遺伝性疾患、赤血球

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は哺乳動物の中樞神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。しかしながら、グルタミン酸は、神経細胞外に過剰に存在した場合、過度の興奮による神経毒性を示し、最終的に神経細胞を死に至らしめる。神経細胞外のグルタミン酸は周囲のグリア細胞に発現するグルタミン酸輸送体により活発に細胞内に取り込まれ、非常に低レベルに維持されている。これはグルタミン酸輸送

体が神経伝達の終結のみならず、興奮性神経毒性から神経細胞を保護する役割を果たしていることを示している。さらに、筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病やてんかんなどの難治性神経疾患では、グルタミン酸輸送体の活性の低下が関与していることが報告されている。しかしながら、グルタミン酸輸送体の発現調節機構については未だに不明な点が多く、病態との関連についても未だに議論されている。

一方、哺乳動物の赤血球には、犬などの肉食動物においてのみグルタミン酸輸送体が発現していることが知られている。私たちは犬のグルタミン酸輸送体の機能的解析から脳に発現するグルタミン酸輸送体と類似した分子が犬赤血球に発現していることを明らかにし、さらにタンパク質および遺伝子レベルでの解析から、犬赤血球に発現するグルタミン酸輸送体が GLAST サブタイプであることを明らかにした。さらに、日本犬の一部に、正常な犬の赤血球 (Normal Glutamate Transport; NGLuT) に比較して、GLAST の発現が欠損～低下している犬 (Low Glutamate Transport; LGLuT) の家系が存在することを明らかにした。

この家系犬における GLAST 遺伝子の解析から、これらの犬赤血球 GLAST 欠損には GLAST タンパク質におけるアミノ酸置換 Gly492Ser (G492S) が関与することが示唆された。さらに、GLAST 遺伝子の発現レベルの低下が見られる個体の解析から、GLAST プロモーターの異常もまた一つの原因となることが明らかとなっていた。

しかしながら、G492S による GLAST タンパク質の発現低下機序は未だに明らかになっておらず、プロモーター領域の異常についても明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

グルタミン酸輸送体の機能的あるいは量的異常は神経変性疾患などの発症に関与することが示唆されている。しかし、その調節メカニズムについては十分に明らかになっておらず、人為的に発現量を制御するなどの治療法の開発につながる知見は培養細胞レベルでは存在するものの生体レベルでは知られていない。そこで本研究では犬赤血球における GLAST 発現低下の分子機序を明らかにし、実際に生体で観察されている GLAST 発現の低下に至る分子機構を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、犬赤血球 GLAST 欠損に至る分子機構を解明するために、以下の方法により検討を行った。

(1) G492S GLAST の発現赤芽球細胞株の確立

野生型あるいは G492S GLAST を安定発現する赤芽球細胞株を確立するために、レンチウイルスベクター用プラスミドコンストラクトを作成した。293T 細胞を用い、GLAST ウイルスベクターを産生し、K562, MEL あるいは MEDEP E14 細胞に感染させた。これらの細胞を限界希釈法によりクローニングし、GLAST 発現細胞株を確立した。さらに、その分化過程における GLAST 細胞表面発現の

変動を細胞表面ビオチン化法、蛍光免疫染色法あるいは免疫ブロット法により解析した。

(2) GST-GLAST C 末端融合タンパク質の作製と結合アダプタータンパク質の探索

GST の C 末端に GLAST C 末端 (アミノ酸番号 486-542) を融合し、BL21 大腸菌細胞に遺伝子導入し、発現させた。GSH ビーズを用い融合蛋白を精製した後、可溶性赤血球膜タンパク質あるいは赤芽球細胞ライセートと反応させ、結合タンパク質を分離した。

(3) GLAST 遺伝子プロモーター領域の単離とプロモータ活性の解析

NGLuT あるいは LGLuT の各形質の犬ゲノム DNA を鋳型に PCR 法により増幅した犬 GLAST 遺伝子プロモーター領域をルシフェラーゼレポーターベクターに導入し、K562, MEL あるいは MEDEP E14 各赤芽球細胞株に導入した。細胞ライセートについてルシフェラーゼ活性を測定し、各プロモーター活性を比較した。

4. 研究成果

(1) GLAST 発現赤芽球細胞株における GLAST 分子の分布

レンチウイルス系により GFP-GLAST 遺伝子を導入した K562 細胞株を確立した。GLAST タンパク質は主に細胞膜に分布し、さらにエンドソームへの分布も観察された (図 1)。これは、細胞膜へ発現した GLAST がリサイクリングすることを示唆している。このように、本細胞株は GLAST の赤芽球での発現動態を解析するのに有用なモデル系であるといえる。本細胞株において、酪酸ナトリウムによる分化誘導を試みたところ、野生型および G492S 両者の分布の変化は観察されず、少なくとも K562 細胞株の分化成熟の段階では両者の差異は無いものと考えられた。ビオチン化細胞表面発現解析においても大きな差異は見られず、G492S による分解促進は再現できなかった。今後、網状赤血球にまで分化する MEDEP 細胞を用いた GLAST 発現細胞株の確立が望まれる。

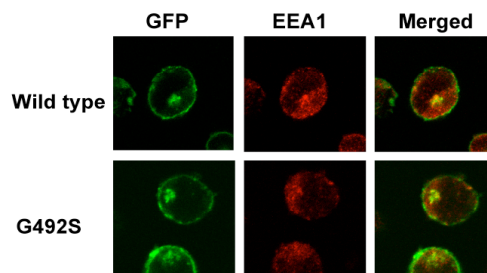


図 1. K562 細胞における GFP-GLAST の細胞内分布. GFP-GLAST 遺伝子をレンチウイ

ルスにより K562 細胞に導入し、安定発現細胞株を確立した。この細胞をエンドゾームマーカーである EEA1 (赤色) を染色し、GFP-GLAST (緑色) との局在を比較した。

(2) GLAST C 末端結合タンパク質の解析

GLAST C 末端 (Ct; C-terminal) 細胞内ドメインについて GST 融合蛋白を作製した (図 2)。融合タンパク質は予想される約 30 kDa のタンパク質として合成された (図 2A)。これを GSH アガロースにより精製した後、犬赤血球膜 Triton X-100 可溶性分画と反応させ、結合タンパク質を GSH ビーズにより沈降した。これらの沈降物を SDS-PAGE により解析したところ、G492S で 55 kDa のバンドがより強く観察された (図 2B)。これは、GLAST-Ct と赤血球膜タンパク質の結合が G492S 変異により変化することを示唆している。分子量から、PDZ ドメインタンパク質の一つである p55 がその候補である。GLAST の C 末端は PDZ 結合配列となっており、この結合が赤血球膜発現の低下に関与している可能性があるものと考えられた。

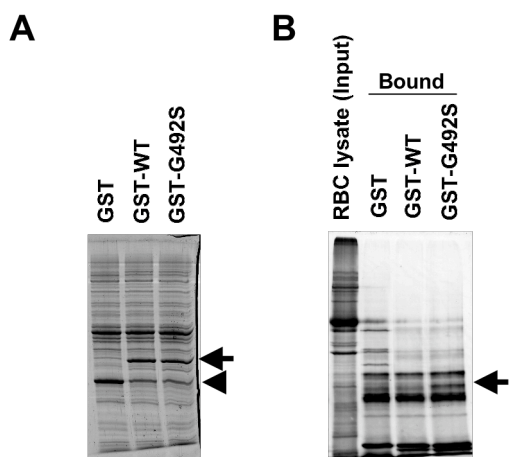


図 2. GST プルダウンアッセイによる GLAST C 末端結合タンパク質の単離

A) BL21 大腸菌を pGEX-GLAST-Ct により形質転換し、IPTG で発現誘導した。BL21 の可溶性分画を 10%SDS-PAGE で分離後、クマシー染色を行った。矢印は GST 融合 GLAST C 末端を示し、矢頭は GST を示す。B) 赤血球膜タンパク質を 1% Triton X-100 で溶解した上清 (RBC lysate; Input) を、GST、GST-野生型 GLAST-Ct (GST-WT) あるいは GST-G492S GLAST-Ct (GST-G492S) 結合 GSH ビーズと反応させ、結合蛋白質を沈降した。沈降物を 8%SDS-PAGE により分離した後、銀染色を行い観察した。矢印は G492S で増加の見られる沈降物を示す。

(3) 各形質犬由来 GLAST プロモーターの単離と活性の比較

NGluT および LGLuT 犬より GLAST プロモーターを単離し、それらの活性を比較検討し

た。単離した領域は GLAST 遺伝子上流約 3.5 kb で、赤芽球細胞株 MEL および MEDEP E14 で比較的強い活性を示した。しかしながら、MEL 細胞では形質間の差異は見られなかった。一方で、MEDEP 細胞では LGLuT 犬由来プロモーターの活性が NGluT に比較して約 50%に低下していた (図 3)。MEL に比較して、MEDEP 細胞はより成熟した赤芽球ステージの細胞であることから、より後期の赤芽球細胞に特異的な転写因子あるいはプロモーター領域結合タンパク質がプロモーター活性の差異に関与している可能性が示された。

以上の結果から、GLAST の発現低下は主に赤芽球成熟後期に見られる G492S GLAST タンパク質と他の膜タンパク質との相互作用の変化によってもたらされることが示唆された。また、GLAST プロモーターの活性の低下も赤芽球成熟後期の現象であり、G492S アレルに関連していることが示唆された。しかしながら、これらに関与する分子本体は特定されておらず、LGLuT 形質の発現メカニズムは完全には明らかにされていない。このことから、赤芽球系の終末分化を再現できるモデル系の確立が望まれ、このような細胞から実際に発現低下に関与する分子を決定できるものと期待される。

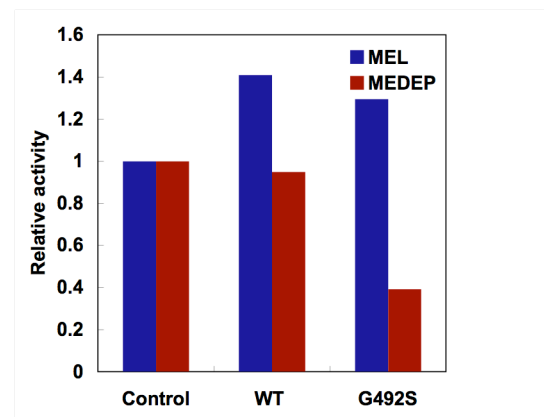


図 3. GLAST 遺伝子プロモーターの赤芽球系細胞株における活性の比較

各形質の犬ゲノム DNA より GLAST 遺伝子上流約 3.5 kb の領域を PCR 法により増幅単離し、ルシフェラーゼレポーターベクターに挿入した。これらを MEL あるいは MEDEP 細胞に遺伝子導入し、各プロモーターの活性をルシフェラーゼアッセイにより解析した。

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)

- 1 Sato K, Otsuka Y, Arashiki N, Komatsu T, Wang CC, Tamahara S, Inaba M. 2008. Identification of genes for two major

sialoglycoproteins, glycophorin A and glycophorin C in canine red cell membranes.

Jpn J Vet Res **55**: 103-114. 査読有

2. Sato K, Inaba M, Ariizumi K. 2007. Molecular basis of innate immune responses by recognition of fungi by dendritic cell C-type lectin dectin-2.

Vet Biochem **44**: 15-25. 査読有

3. Chung JS, Sato K, Dougherty II, Cruz PD Jr, Ariizumi K. 2007. DC-HIL is a negative regulator of T lymphocyte activation.

Blood **109**: 4320-4327. 査読有

4. Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby-Phelps K, Kimberly RP, Underhill D, Cruz PD Jr, Ariizumi K. 2006. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor g chain to induce innate immune responses.

J Biol Chem **281**: 38854-38866. 査読有

5. Sato K, Shikano S, Xia G, Takao J, Chung JS, Cruz PD Jr, Xie XS, Ariizumi K. 2006. Selective expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit d2 by particular subsets of dendritic cells among leukocytes.

Mol Immunol **43**: 1443-1453. 査読有

[学会発表] (計 24 件)

1. 大津航、佐藤耕太、安達啓一、新敷信人、大塚弥生、稲葉睦. 赤血球型 AE1 の膜トラフィックにおける N 末端領域配列の役割 (BMB 2008 2008.12.12. 神戸ポートアイランド、神戸市)
2. 新敷信人、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉睦. 牛 γ -グロビンプロモーターの特異的活性化機構の解明 (BMB2008 2008.12.11. 神戸ポートアイランド (神戸市))
3. 大塚弥生、佐藤耕太、梅村知里、大村俊弥、新敷信人、小松智彦、稲葉睦. 牛赤血球膜のグライコフォリン A. 第 146 回日本獣医学会 2008.9.25. 宮崎シーガイア、宮崎市)

4. 山口聡子、小形芳美、大塚弥生、小松智彦、三浦潔、齋藤幸夫、佐藤耕太、稲葉睦. 黒毛和種牛の虚弱子牛症候群

(weak calf syndrome) とヒトの DiGeorge 症候群との関連に焦点をおいた分子病理学的解析(第 146 回日本獣医学会 2008.9.25. 宮崎シーガイア、宮崎市)

5. 大津航、佐藤耕太、安達啓一、新敷信人、大塚弥生、稲葉睦. 牛赤血球型 AE1 の膜トラフィックにおける N 末端領域配列の役割(第 146 回日本獣医学会 2008.9.24. 宮崎シーガイア、宮崎市)

6. 野呂絵里花、安達啓一、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉睦. アニオン交換輸送体 AE1 の小胞体品質管理におけるカルネキシンの役割(第 146 回日本獣医学会 2008.9.24. 宮崎シーガイア、宮崎市)

7. 大津航、佐藤耕太、黒岡貴生、安達啓一、小松智彦、大塚弥生、稲葉睦. 赤血球型 AE1 の膜トラフィックにおける N 末端領域配列の役割 (日本膜学会第 30 年会 2008.5.16. 東京理科大学森戸記念会館、東京都)

8. 大田寛、出口康平、安達啓一、大塚弥生、佐藤耕太、陰山聡一、尾上貞夫、稲葉睦. 牛腎尿細管異形成症 (クロロデン 16 欠損症) における尿細管崩壊の分子機構 (日本膜学会第 30 年会 2008.5.16. 東京理科大学森戸記念会館、東京都)

9. 新敷信人、大塚弥生、小松智彦、伊東大介、佐藤耕太、稲葉睦. 赤血球膜の酸化傷害とスペクトリンの 4-ヒドロキシノネナル修飾 (日本膜学会第 30 年会 2008.5.16. 東京理科大学森戸記念会館、東京都)

- 戸記念会館、東京都)
10. 大塚弥生、佐藤耕太、梅村知里、新敷信人、小松智彦、玉原智史、稲葉睦. 牛赤血球膜グライコフォリン A : 同定、性状ならびに疾患病態との関連 (日本膜学会第 30 年会 2008.5.16. 東京理科大学森戸記念会館、東京都)
 11. 伊東大介、安達啓一、新敷信人、黒岡貴生、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉睦アニオン交換輸送体 AE1 のプロテアソーム系小胞体関連分解. (BMB2007 2007.12.13. パシフィコ横浜、横浜市)
 12. 黒岡貴生、佐藤耕太、安達啓一、伊東大介、小松智彦、大塚弥生、稲葉睦. A Novel role of the N-terminal region of the cytoplasmic domain in effective trafficking of bovine AE1 to the plasma membrane. (BMB2007 2007.12.13. パシフィコ横浜、横浜市)
 13. 新敷信人、伊東大介、大塚弥生、梁美羅、佐藤耕太、稲葉睦. 赤血球膜に対する酸化ストレス: 赤血球膜骨格タンパク質スペクトリンに見出された 4-ヒドロキシノネナールによる分子修飾 (BMB2007 2007.12.12. パシフィコ横浜、横浜市)
 14. 大塚弥生、伊東大介、勝岡加世子、新敷信人、佐藤耕太、稲葉睦. プリオン病における α -hemoglobin stabilizing protein 転写抑制の分子機構 (BMB2007 2007.12.12. パシフィコ横浜、横浜市)
 15. 安達啓一、伊東大介、新敷信人、黒岡貴生、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉睦. アニオン交換輸送体 AE1 のプロテアソーム系小胞体関連分解 (第 144 回日本獣医学会 2007.9.2. 酪農学園大学、江別市)
 16. 大塚弥生、伊東大介、勝岡加世子、新敷信人、佐藤耕太、稲葉睦. プリオン感染動物における AHSP mRNA 量の低下の分子機構: IL-6 による GATA-1 依存性赤芽球特異的遺伝子発現の抑制. (第 144 回日本獣医学会 2007.9.2. 酪農学園大学、江別市)
 17. 新敷信人、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉睦. 新生子牛のグロビンスイッチングにおける Erythroid Kruppel-like Factor の役割と関連因子の探索. (第 144 回日本獣医学会 2007.9.2. 酪農学園大学、江別市)
 18. 稲葉睦、黒岡貴生、佐藤耕太、安達啓一、伊東大介、大塚弥生. 牛赤血球型 AE1 の膜トラフィックを規定する細胞質内ドメイン配列. (第 144 回日本獣医学会 2007.9.2. 酪農学園大学、江別市)
 19. 小松智彦、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉睦. 小胞放出経路による犬網状赤血球からの stomatin と Na,K-ATPase の消失. (第 144 回日本獣医学会 2007.9.2. 酪農学園大学、江別市)
 20. 佐藤耕太、安達啓一、新敷信人、小松智彦、大塚弥生、稲葉睦. 犬赤血球膜主要グライコフォリン遺伝子の同定. (第 144 回日本獣医学会 2007.9.2. 酪農学園大学、江別市)
 21. 片山宜郎、伊東大介、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉睦. Band 3 bov.Yamagata の分子病態: R664X 変異 AE1 の膜骨格タンパク質発現に対するドミナントネガティブ作用 (日本膜学会第 29 年会 2007.5.11. 東京理科大学森戸記念会館、東京都)
 22. 黒岡貴生、佐藤耕太、安達啓一、伊東大介、大塚弥生、稲葉睦. 牛赤血球型 AE1 の膜トラフィックを規定する細

胞質ドメイン内配列. (日本膜学会第
29 年会 2007.5.11. 東京理科大学森
戸記念会館、東京都)

23. 片山宜郎、伊東大介、佐藤耕太、新敷
信人、安達啓一、大塚弥生、稲葉睦 牛
赤血球 band 3 (AE1)欠損症における変
異 AE1 のドミナントネガティブ効
果 : R664X 変異 AE1-アンキリン複合
体の小胞体滞留と分解. (第 143 回日
本獣医学会 2007.4.5. つくば国際会
議場、つくば市)
24. 新敷信人、伊東大介、大塚弥生、梁美
羅、佐藤耕太、稲葉睦. 赤血球膜に対
する酸化ストレス : 赤血球膜骨格蛋白
質 β -スペクトリンの 4-ヒドロキシ
ノネナールによる分子修飾 (第 143 回
日本獣医学会 2007.4.5. つくば国際
会議場、つくば市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 耕太 (SATO KOTA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号 : 50283974

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし