

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19510228

研究課題名（和文） 神経伝達系におけるグルタミン輸送を制御する化合物の創製

研究課題名（英文） Synthesis of glutamine transporter inhibitors regulating amino acids concentrations in neurotransmission system

研究代表者

島本 啓子（SHIMAMOTO KEIKO）

財団法人サントリー生物有機科学研究所 研究員

研究者番号：70235638

研究成果の概要（和文）： アミノ酸や糖といった生体内の小分子の濃度調節に関わるトランスポーターについては、多種類が存在する上に基質選択性の幅が広く、選択的な阻害剤が不足していることから、その機能解析が容易ではなかった。本研究では神経伝達における重要な小分子の移動とその制御機構の面から生命現象の理解に迫ることを目標とし、中性アミノ酸トランスポーター（ASCT2）とグルタミン酸-シスチン交換体（xCT）について阻害剤を合成した。

研究成果の概要（英文）： Extracellular concentrations of amino acids and sugars are regulated by transporters. In order to elucidate physiological roles in neurotransmission system and substrate recognition mechanisms of these transporters, we synthesized selective inhibitors for neutral amino acid transporter (ASCT2) and glutamate-cystine exchanger (xCT).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：(1) グルタミン (2) トランスポーター (3) 阻害剤 (4) グリア細胞  
(5) 立体配座固定 (6) グルタミン酸

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は生存に必須な物質を取り込み、不要な物質を排出することで恒常性を保っている。細胞膜で隔てられた外界と細胞内との間の物質移動は、多くの場合トランスポーターが担い、分子の認識と濃度調節を行っている。

薬剤排出に関するトランスポーターは薬剤耐性克服という実用的な観点から研究が進められてきたが、アミノ酸や糖といった生体内の小分子の濃度調節に関わるトランスポーターについては、多種類のものが存在する上に基質選択性の幅が広く解析が容易ではなかった。しかも選択的な阻害剤が不足して

いることから研究が遅れている。しかし、エネルギー源や窒素/炭素源の取込・生理活性物質の産生調整・神経伝達物質の濃度調整など生命現象の本質に関わる機構であることから、トランスポーターの機能や輸送機構の解明は今後の生命科学の重要な課題になると考えられる。

## 2. 研究の目的

記憶や学習といった脳の高次機能を司る興奮性神経伝達においても、トランスポーターは重要な役割を占めている。代表的な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は、伝達の役割を終えた後は速やかに周囲の細胞に取り込まれてシナプス間隙から除かれ、グルタミンに変換されて神経細胞に逆移送される。この一連のグルタミン酸ならびにグルタミンの輸送には両分子に対する数種のトランスポーターが重要な役割を担っている。神経系にはトランスポーターのみならず受容体や酵素も数多く存在するので、トランスポーターの生理的役割を解明するためには、各トランスポーターに選択的に作用する分子や特異的に阻害する分子が不可欠である。

本研究ではグルタミントランスポーターに注目し、選択的阻害剤を創製することで、トランスポーターの生理的役割を明らかにすることを目的とする。グルタミントランスポーターはグリア細胞から神経細胞へグルタミンを受け渡すことにより、神経伝達物質であるグルタミン酸リサイクルの一環を担っている。グルタミン輸送の詳細と制御の機構にはまだ不明な部分が多いが、グルタミンの輸送効率が神経伝達物質（グルタミン酸・GABA）量の決定に大きな影響を与えることは十分に考えられる。またアラニンやセリンが細胞内外の濃度に応じてグルタミンと交換されていることが示唆されており、グルタミントランスポーターはグルタミンだけでなく、多種類のアミノ酸濃度の恒常性維持を担っている可能性がある。

また、グルタミントランスポーターは細胞外の基質だけでなく、細胞内に存在する基質も認識する。阻害剤を基にした分子プローブを用いて、細胞内外の各々の結合部位にリガンドが結合した構造を固定することで、トランスポーターの3次元構造を明らかにすると共に輸送機構についての知見を得ることを目指す。

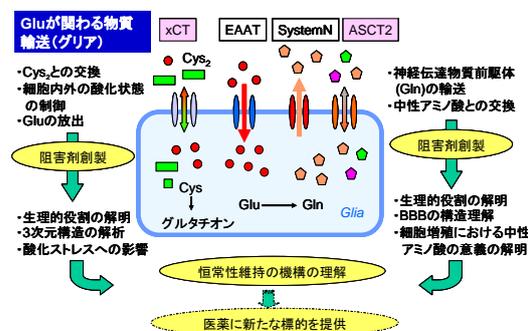
## 3. 研究の方法

各種アミノ酸誘導体を設計・合成し、その $[^3\text{H}]\text{Gln}$ ,  $[^{14}\text{C}]\text{Glu}$ の脳腫瘍由来C6細胞株への取込阻害能を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ASCT 阻害剤の合成

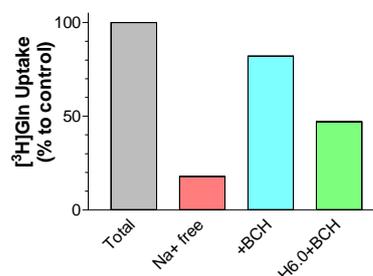
グルタミンは、核酸やアミノ酸の窒素源となるばかりではなく、エネルギー代謝(TCA回路)への基質にもなっており、生体内でもっとも豊富に存在するアミノ酸の一つである。複数のトランスポーターシステム(system N, A, ASC(ATBo), L, bo, +, y+L)が広範囲に発現し、また各々のトランスポーターは幅広い基質選択性を持ち、Glnだけでなく他の中性アミノ酸も取り込む。我々はグルタミントランスポーターの中で、ASCT2 (Alanine-Serine-Cysteine transporter 2)にまず焦点をあてて進めた。ASCT2はグルタミンだけでなく、アラニン、セリン、システインといった小型の中性アミノ酸を輸送する。胎児脳や脳腫瘍、脳損傷後に出現する反応性グリアに多く発現していることから、活動が活発なこれらの細胞のアミノ酸供給を担っていると思われる。



### ①評価系の構築

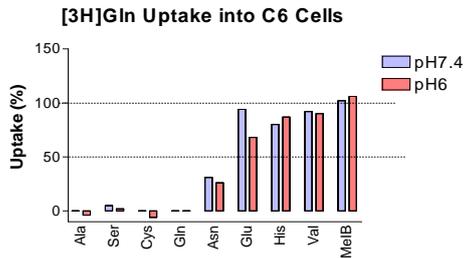
初めに、ASCT2の評価系構築のために、ASCT2が発現しているとされる脳腫瘍由来C6細胞株について $[^3\text{H}]\text{Gln}$ の取込能と種々のアミノ酸による阻害の選択性を調べた。

$[^3\text{H}]\text{Gln}$  Uptake into C6 Cell

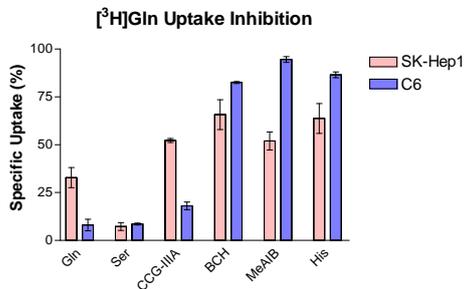


$[^3\text{H}]\text{Gln}$ 取込の約80%がナトリウムイオン依存性であった。また約25%が大型アミノ酸を輸送するSystem Lの阻害剤であるBCHで阻害された。グルタミントランスポーターのうち、System N, AはpH6では輸送が阻害されることが知られているが、C6細胞における輸送ではBCH非感受性取り込みが残っており、

この成分は ASCT2 基質とされる各種のアミノ酸で阻害されるため、C6 細胞のグルタミン取込の主要経路が ASCT2 由来であることを確認した。



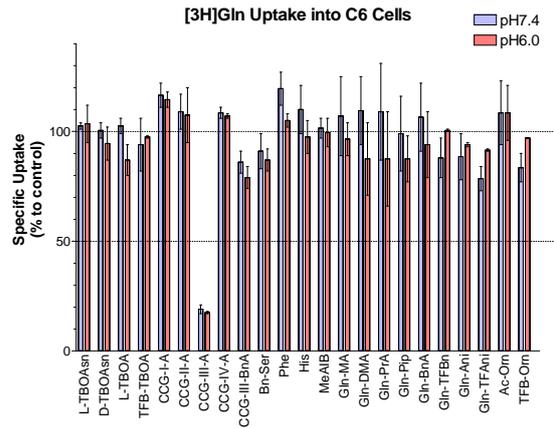
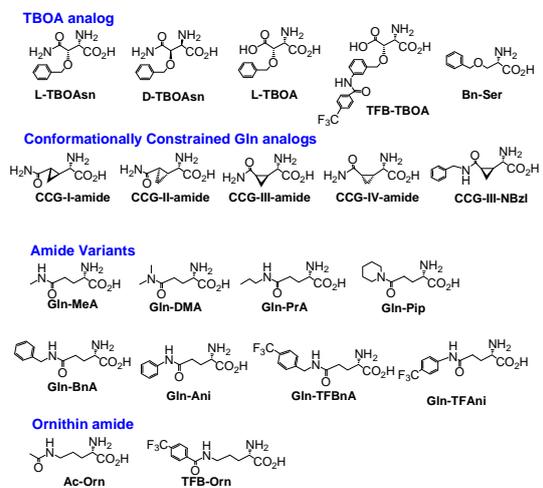
同様に肝腫瘍由来 SK-Hep1 細胞についても調べたが、他の取込システムの関与が示唆され、C6 細胞の方が評価系として適していることが明らかになった。



また、強制発現系についても検討したが、細胞自身が持つ内因性の取込が高いので、発現させる宿主細胞のさらなる検討が必要である。今後、他のシステムとの比較のためには、リポソームに再構成させるなどの手法も有用であると思われる。

## ②グルタミン誘導体の合成とスクリーニング

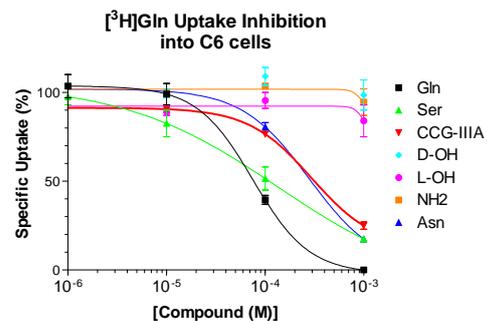
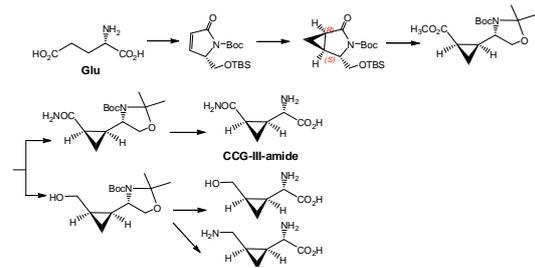
グルタミン誘導体を合成し、C6 細胞への  $[^3\text{H}]\text{Gln}$  取込阻害を測定した。



ASCT2 タンパクと高い相同性をもつグルタミン酸トランスポーター(EAAT)の阻害剤である TBOA (threo-beta-benzyloxy aspartate)のアミド体は、残念ながら期待された阻害を示さなかった。一方、グルタミンの立体配座を固定した類縁体である CCG-amide のうち、folded form をもつ CCG-III に強い阻害が見られた。トランスポーターが特定の配座を認識していることがわかる。アミド部の置換体やアミドの位置をずらしたオルニチン誘導体はいずれも活性を示さなかった。そこで次に CCG-III-amide について詳しく調べた。

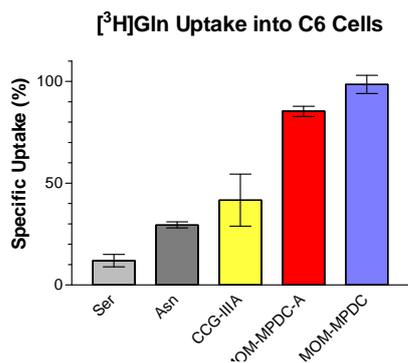
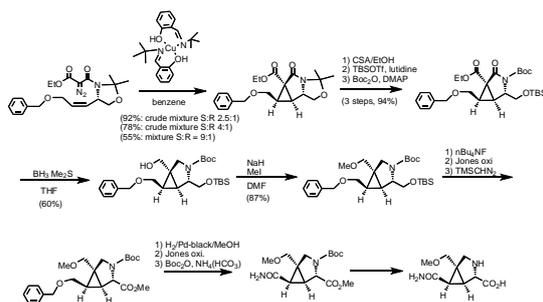
## ③CCG-III-amide の活性

ASCT2 はグルタミンだけでなく、アラニンやセリンも輸送する。CCG-III-amide のアミド部の関与を調べるため、末端の官能基の影響を調べた。



CCG-III-amide の [ $^3\text{H}$ ]Gln はアスパラギンとほぼ同等 ( $\text{IC}_{50}=295 \mu\text{M}$ ) の強い活性をもつことがわかった。アミドを  $\text{CH}_2\text{OH}$  や  $\text{CH}_2\text{NH}_2$  に変えると活性は無くなり、アミド部が重要であることがわかった。

CCG-III-amide はグルタミンの炭素鎖だけではなく、アミノ酸部位の回転も抑制されていると考えられる。そこで CCG-III-amide のアミノ酸部位もさらに固定した二環性の誘導体を合成することを計画した。また、我々は、トランスポーター阻害剤に嵩高い置換基を導入することで、その阻害作用が増強されることを経験しているため、三員環上に置換基を導入することにした。



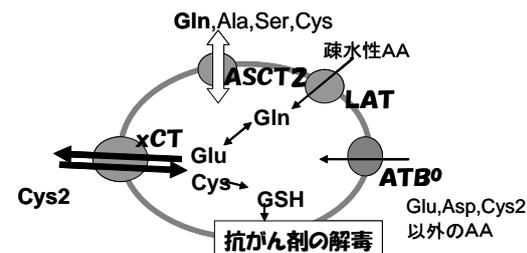
二環性誘導体(MOM-MPDC-amide)は、対応するカルボン酸と比べると、若干阻害が見られ、構造を認識していることは示唆されたが、阻害活性は弱いもので、今後の研究には不相当と判断した。今後は相同性の高いバクテリアのグルタミン酸トランスポーター ( $\text{Glu}_{\text{ph}}$ )-TBOA の結晶構造から構築した ASCT2 モデルを用いて、以前に阻害活性をもつ CCG-III amide の置換基の位置や種類の最適化を行う。

## (2) グルタミン酸-シスチン交換体 (xCT) 阻害剤の合成と活性評価

ASCT2 は細胞外の基質を取り込み、代わりに細胞内の基質を排出するヘテロエキステンジという機構で機能する。一方、EAAT は細胞外の基質を取り込んだ後、カリウムイオンを排出することで細胞内基質を輸送することなく元の状態へ戻るサイクルが優勢である (一部はヘテロエキステ

ンジも起こす)。ヘテロエキステンジの機構を調べるために、同様にヘテロエキステンジでグルタミン酸とシスチンを交換する xCT に注目し、その阻害剤合成を行い、分子プローブ化を進めている。

シスチン-グルタミン酸交換体 (xCT) はグリア内にシスチンを取込むトランスポーターで、このシスチンを原料にして合成したグルタチオンを神経に供給することで、グリアは酸化ストレスから神経を保護するとともに、グルタミン酸を放出して、周囲の神経の働きに影響を与えられている。しかしこのトランスポーターには特異的な阻害剤がない。4-Carboxyphenylglycine (4-CPG) が阻害剤であることが知られており、4-CPG を投与したときに脳腫瘍が縮小することが報告されているが、この化合物は代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluRs) のアンタゴニストとしてはたらくため、作用が xCT 阻害に依るものか mGluR 阻害に依るものかは不明である。トランスポーターにおける基質認識機構を明らかにするとともに、グルタミン酸受容体や他のトランスポーターに作用しない xCT 特異的阻害剤の合成を目指した。



まずアッセイ系を検討した。xCT は生理的条件下では細胞内のグルタミン酸濃度が高いため、グルタミン酸を放出してシスチンを取り込むエキステンジャー (交換体) としてはたらくが、細胞外グルタミン酸濃度が高い場合には、グルタミン酸も取り込むことができる。放射性標識シスチン取り込みで調べる従来の方法では、シスチンが分解したシステインによるバックグラウンドが高くなる可能性があったため、 [ $^{14}\text{C}$ ]グルタミン酸の取込阻害により、阻害剤を評価することにした。脳腫瘍由来 C6 細胞のグルタミン酸取込の基質選択性や阻害剤への応答を調べたところ、 $\text{Na}^+$ 非依存性取込はほぼ xCT に由来すると考えられた ( $\text{Na}^+$ 依存性取込は EAAT に依る)。さらに diethyl maleate (DEM) のような親電子剤で誘導でき、細胞内の酸化還元に関連していることがわかった。

阻害剤のデザインはシスチンを基にした。シスチンの S-S 結合は不安定であるため、これを C-C に置換した diaminosuberlic acid (DAS) を合成した。DAS 自身は DEM 処理 C6 細胞への  $\text{Na}^+$ 非依存性グルタミン酸取込を阻害しなかったが、片方のアミノ基を保護した

DAS 誘導体に強い取込阻害活性を見出した。阻害活性はアミノ基上の置換基のかさ高さや疎水性により影響を受けた。また、DAS よりも炭素鎖が一つ短い diaminopimelic acid (DAP) 誘導体も合成したところ、DAP 誘導体にも同等の xCT 阻害活性が見られた。今後は、これら化合物のグルタミン酸受容体や他のトランスポーターへの作用を調べていく予定である。

#### 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 7 件)

M. Oikawa, M. Ikoma, M. Sasaki, M.B. Gill, G.T. Swanson, K. Shimamoto, R. Sakai, Improved synthesis and in vitro/in vivo activities of natural product-inspired, artificial glutamate analogs, (2010) *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 3795-3804. 査読有

M. Oikawa, M. Ikoma, M. Sasaki, M.B. Gill, G.T. Swanson, K. Shimamoto, R. Sakai, Regioselective Domino Metathesis of Unsymmetrical 7-Oxanorbornenes with Electron-rich Vinyl Acetate toward Biologically Active Glutamate Analogues, (2009) *Eur. J. Org. Chem.*, **32**, 5531-5548. 査読有

K. Shimamoto, Glutamate transporter blockers for elucidation of the function of excitatory neurotransmission systems. (2008) *Chem. Rec.*, **8**, 182-199. 査読有

M. Ikoma, M. Oikawa, M.B. Gill, G.T. Swanson, R. Sakai, K. Shimamoto, M. Sasaki, Regioselective Domino Metathesis of 7-Oxanorbornenes and Its Application to the Synthesis of Biologically Active Glutamate Analogues, (2008) *Eur. J. Org. Chem.*, **31**, 5215-5220. 査読有

A.T. Holten, N.C. Danbolt, K. Shimamoto, V. Gundersen, Low-affinity excitatory amino acid uptake in hippocampal astrocytes: a possible role of Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporters, (2008) *Glia*, **58**, 990-997. 査読有

M. Sasaki, K. Tsubone, K. Aoki, N. Akiyama, M. Shoji, M. Oikawa, R. Sakai, K. Shimamoto, Rapid and efficient synthesis of dysiherbaine and analogues to explore structure-activity relationships, (2008) *J. Org. Chem.*, **73**, 264-273. 査読有

M. Gegelashvili, A. Rodriguez-Kern, L. Sung, K.

Shimamoto, G. Gegelashvili, Glutamate transporter GLAST/EAAT1 directs cell surface expression of FXYP2/gamma subunit of Na, K-ATPase in human fetal astrocytes, (2007) *Neurochem. Int.*, **50**, 916-920. 査読有

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

島本 啓子 (SHIMAMOTO KEIKO)

財団法人サントリー生物有機科学研究所  
研究員

研究者番号 : 7 0 2 3 5 6 3 8