

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790196
 研究課題名 (和文) GTRAP3-18 による神経細胞のグルタチオン濃度決定機構の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of regulatory mechanism underlying neuronal glutathione content by GTRAP3-18
 研究代表者
 渡部 正彦 (WATABE MASAHIKO)
 帝京大学・医学部・講師
 研究者番号：90301788

研究成果の概要：脳内において、酸化ストレスに対する防御機構が低下すると神経変性をはじめとする多くの疾患が惹起される。本研究により、あるタンパク質が酸化ストレスに対する防御機構の調節に強く関わることを示すことができた。これは、単に学術的新規性が高いばかりでなく、そのタンパク質を標的として開発された化合物が、酸化ストレスに対する防御機構を増加させる可能性を示すものであり、神経変性疾患の治療に貢献できるという新しい可能性を提示することができ、工業的にも高い価値を有するものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：中枢・末梢神経

1. 研究開始当初の背景

グルタチオンは生体の主要な抗酸化物質である。中枢神経ではもう一つの抗酸化物質として知られるスーパーオキシドジスムターゼ活性の分布と神経変性疾患の障害部位との相関は低く (Am J Pathol. 1996; 148: 273-9)、酸化ストレスに対する防御機構としてグルタチオンの相対的重要性が推定される。神経細胞内のグルタチオンを減少させると神経変性が起こることやパーキンソン病患者死後脳の中枢黒質で対照群と比較してグルタチオ

ンが減少していることも知られている (Neurosci Lett. 1986; 67: 269-74)。

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンが特異的酵素により順次縮合されたトリペプチドである。その合成過程において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、さらには細胞内におけるグルタミン酸およびグリシンの濃度はシステインに比べ高いことから、細胞内グルタチオン濃度を制御しているのはシステインであると考えられる。神経細胞は他の細胞とは異なる

りシスチンを細胞外から取り込む機構がその成熟過程において消失してしまうため、細胞外のシスチンを直接、取り込むことによりグルタチオンを合成していると考えられている (Neurosci Lett 1996; 219: 211-4)。しかし、細胞外シスチンがどのような仕組みで細胞内に取り込まれるのか、またその調節機構は何かについては長い間不明であった。

神経細胞にはグルタミン酸トランスポーターファミリーである EAAC1 を発現しているが、EAAC1 は他のグルタミン酸トランスポーターと比較してグルタミン酸輸送能力が著しく低いため、グルタミン酸輸送蛋白としてではなく他の機能の存在が予想されていた。最近、EAAC1 がシスチンを細胞内に取り込む機序が発見された。アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて EAAC1 の発現を抑制した研究や遺伝的に EAAC1 を欠損したマウスを用いた研究結果から、EAAC1 が細胞内グルタチオン量を維持するために必須のタンパク質であることが示され、EAAC1 不足は神経のグルタチオン代謝を障害し、酸化ストレスと神経変性を引き起こすと考えられた (Nature Neurosci, 2006; 9: 119-26)。従って、EAAC1 を積極的に活性化する方法もしくは不活性化を抑制する方法があれば、理論的には細胞内グルタチオン量を増加させることが可能である。しかし、EAAC1 活性の調節機構は不明である。

そこでまず EAAC1 に結合する小分子化合物が細胞内グルタチオン量を増加させる候補化合物として考えられるかもしれない。しかしながら、神経伝達物質のトランスポーターなどの多くの例から、そのような化合物はトランスポーターの機能を阻害してしまう可能性が大きい。そこで申請者は他の膜タンパク質による EAAC1 の制御機構に着目した。すなわち、仮に EAAC1 のシスチン輸送機能を阻害するタンパク質が存在した場合には、このタンパク質を標的とした化合物を探索することにより、間接的に EAAC1 機能を促進することが可能となり、細胞内グルタチオン量の増加が期待できる。

これまで EAAC1 と結合することが示されているタンパク質として GTRAP3-18 がある。GTRAP3-18 は脳などに多く発現し EAAC1 のグルタミン酸輸送作用を阻害するという報告がある。EAAC1 のグルタミン酸輸送とシスチン輸送において要求される立体構造が異なっていることは知られているが、GTRAP3-18 との結合によって生じる EAAC1 のコンフォメーションの変化がシスチン輸送能力にどのよう

に影響するかは全く不明である。

2. 研究の目的

本研究は GTRAP3-18 が EAAC1 によるシスチン輸送にどのように影響するかを調べ、神経細胞グルタチオン量の調節機構を明らかにすることにより、パーキンソン病などの神経変性疾患の治療に寄与する基礎的情報を提供することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 平成19年度

グルタミン酸トランスポーターファミリーはこれまでに5種類の存在が示されており、それらが共存する *in vivo* の実験系では GTRAP3-18 との相互作用に影響する可能性もあるため、EAAC1 のみを発現している培養細胞 HEK293 細胞を用いて、GTRAP3-18 が EAAC1 によるシスチンの取り込みを制御する因子であるか否かについて検討を行った。

- ① HEK293細胞のシスチンおよびグルタチオン濃度を測定するため、高速液体クロマトグラフィー検出システムを用いて、シスチンおよびグルタチオンの有するSH基を蛍光物質マレイミドで蛍光標識し、蛍光ピークを検出することにより、シスチンおよびグルタチオンの濃度を定量した。
- ② グルタミン酸トランスポーターの阻害剤を用いて、HEK293細胞内のシスチンおよびグルタチオンの濃度がEAAC1 のみに依存しているか否かについて検討した。
- ③ RNAiの手法を用いてGTRAP3-18の発現を抑制したときのHEK293細胞内シスチンおよびグルタチオン濃度を定量した。
- ④ また、GTRAP3-18を増加させたときの影響を調べるために、HEK293細胞をGTRAP3-18の発現を増加させることのできるMethyl- β cyclodextrin処理し、グルタチオン濃度に及ぼすGTRAP3-18の影響を調べた。
- ⑤ GTRAP3-18が実際に細胞膜上でEAAC1と結合して機能していることを形態学的に確かめるために、EAAC1とGTRAP3-18に対する特異抗体および蛍光標識抗体を用いて免疫細胞化学的解析を行いEAAC1とGTRAP3-18の細胞内局在を調べた。

- ⑥ EAAC1およびGTRAP3-18の細胞膜上の相互作用を生化学的に検討するため、Pinpoint™ Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce)を用いて、細胞膜表面タンパク質のビオチン化を行った後に細胞可溶化液を調製し、アビジンビーズを用いてビオチン化された細胞膜表面タンパク質画分を細胞可溶化液より分離した。その後、この画分にEAAC1とGTRAP3-18の存在が認められるか否かを検討した。

(2) 平成20年度

昨年までに、グルタミン酸トランスポーターファミリーの中で、EAAC1のみを発現している培養細胞 HEK293 細胞を用いて、GTRAP3-18がEAAC1によるシステインの取り込みを制御する因子であることを明確にすることができた。そこで本年は、実際の神経細胞においてもGTRAP3-18がEAAC1によるシステインの取り込みを制御する因子であるか否かについて検討を行った。

- ① ラット小脳初代神経培養細胞内のシステインおよびグルタチオン濃度を、高速液体クロマトグラフィー検出システム、および、システインおよびグルタチオンの有するSH基と特異的に反応する蛍光標識マレイミドを用いて定量的に測定した。
- ② グルタミン酸トランスポーターの阻害剤を用いて、ラット小脳初代神経培養細胞内のシステインおよびグルタチオンの濃度がEAAC1のみに依存しているか否かについて検討した。
- ③ RNAiの手法を用いて、ラット小脳初代神経培養細胞内GTRAP3-18の発現を抑制したときのシステインおよびグルタチオン濃度を定量し、グルタチオン合成におけるGTRAP3-18の役割を調べた。
- ④ また、GTRAP3-18を増加させたときの影響を調べるために、ラット小脳初代神経培養細胞をMethyl- β cyclodextrinで処理し、グルタチオン濃度に及ぼすGTRAP3-18の影響を調べた。
- ⑤ GTRAP3-18が実際にラット小脳初代神経培養細胞膜上でEAAC1と結合して機能していることを形態学的に確かめるために、EAAC1とGTRAP3-18に対する特異抗体および蛍光標識抗体を用いて免疫細胞化学的解析を行いEAAC1と

GTRAP3-18の細胞内局在を調べた。

- ⑥ EAAC1およびGTRAP3-18の細胞膜上の相互作用を生化学的に検討するため、Pinpoint™ Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce)を用いて、細胞膜表面タンパク質のビオチン化を行った後に細胞可溶化液を調製し、アビジンビーズを用いてビオチン化された細胞膜表面タンパク質画分を細胞可溶化液より分離後、この画分にEAAC1とGTRAP3-18の存在が認められるか否かを検討した。
- ⑦ 最終的にマウス脳内でGTRAP3-18がEAAC1によるシステインの取り込みを制御する因子であるか否かについて検討を行うために、GTRAP3-18の発現を増加させることのできるMethyl- β cyclodextrin、およびGTRAP3-18の発現を抑制するためのGTRAP3-18のsiRNAをマウス脳室内に投与したときのグルタチオン濃度を調べることで、マウス脳内神経細胞のグルタチオン濃度に及ぼすGTRAP3-18の影響を調べた。

4. 研究成果

初年度は、グルタミン酸トランスポーターファミリーはこれまでに5種類の存在が示されており、それらが共存する *in vivo* の実験系ではGTRAP3-18との相互作用に影響する可能性もあるため、EAAC1のみを発現している培養細胞 HEK293 細胞を用いて、GTRAP3-18がEAAC1によるシステインの取り込みを制御する因子であるか否かについて検討を行った。グルタミン酸トランスポーターの阻害剤を用いた結果、HEK293細胞内のグルタチオンの濃度はEAAC1のみに依存していることが確認された。次に、GTRAP3-18が実際に細胞膜上でEAAC1と結合して機能していることを、EAAC1とGTRAP3-18に対する特異抗体および蛍光標識抗体を用いた免疫細胞化学的解析を行った結果、形態学的にGTRAP3-18は細胞膜上でEAAC1と結合していることが確認された。さらに、細胞膜表面タンパク質のビオチン化法を用いて細胞膜表面タンパク質画分を調製した結果、生化学的にもGTRAP3-18が細胞膜上でEAAC1と結合していることが確認された。そして、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、GTRAP3-18の発現を抑制したときのグルタチオン濃度を定量した結果、GTRAP3-18は細胞内グルタチオン濃度を負に制御していることを明らかにすることができた。以上のごと

く、GTRAP3-18 が EAAC1 によるシステインの取り込みを制御する因子であることを明確にすることができた。

最終年度は、実際の神経細胞においても GTRAP3-18 が EAAC1 によるシステインの取り込みを制御する因子であるか否かについて、初代神経培養細胞系およびマウス脳への脳室内投与系を用いて検討を行った。グルタミン酸トランスポーターの阻害剤を用いた結果、初代神経培養細胞内のグルタチオンの濃度は EAAC1 のみに依存していることが確認された。次に、GTRAP3-18 が実際に細胞膜上で EAAC1 と結合して機能していることを、EAAC1 と GTRAP3-18 に対する特異抗体および蛍光標識抗体を用いた免疫細胞化学的解析を行った結果、形態学的に GTRAP3-18 は神経細胞膜上で EAAC1 と結合していることが確認された。さらに、細胞膜表面タンパク質のピオチン化学法を用いて細胞膜表面タンパク質画分を調製した結果、生化学的にも GTRAP3-18 が細胞膜上で EAAC1 と結合していることが確認された。そして、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび siRNA を用いて、GTRAP3-18 の発現を抑制したときのグルタチオン濃度を定量した結果、GTRAP3-18 は初代神経培養細胞内およびマウス脳内グルタチオン濃度を負に制御していることを明らかにすることができた。以上のごとく、神経細胞において GTRAP3-18 が EAAC1 によるシステインの取り込みを制御する因子であることを明確にすることができた。

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 3 件)

- ① 渡部正彦、青山晃治、中木敏夫、A dominant role of GTRAP3-18 in neuronal glutathione synthesis.、Journal of Neuroscience、28、9404-9413、2008、査読 有
- ② 青山晃治、渡部正彦、中木敏夫、Regulation of neuronal glutathione synthesis.、Journal of Pharmacology Science、108、227-238、2008、査読 有
- ③ 渡部正彦、青山晃治、中木敏夫、Regulation of glutathione synthesis via interaction between GTRAP3-18 and

EAAC1 at plasma membrane.、Molecular Pharmacology、72、1103-1110、2007、査読 有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 渡部正彦、青山晃治、中木敏夫：初代培養神経細胞内グルタチオン濃度調節機構の解析。第 82 回日本薬理学会年会、横浜、3、2009
- ② 青山晃治、渡部正彦、中木敏夫：マウス脳内グルタチオン濃度調節機構の解析。第 82 回日本薬理学会年会、横浜、3、2009

[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 1 件)

名称：グルタチオン増加物質のスクリーニング方法

発明者：中木敏夫、渡部正彦、青山晃治

権利者：帝京大学

種類：特許権

番号：特願 2006-128369

取得年月日：2006.2.5

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 正彦 (WATABE MASAHIKO)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：90301788 (2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：