

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590291

研究課題名（和文） 中枢神経系酸化ストレス抵抗性マウスに関する研究

研究課題名（英文） A study on CNS oxidative stress-resistant mouse

研究代表者

中木 敏夫（NAKAKI TOSHIO）

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：30164148

研究成果の概要（和文）：神経細胞内グルタチオン量の調節機構を明らかにする目的で GTRAP3-18 欠損マウス (GTRAP3-18<sup>-/-</sup>) を作成した。GTRAP3-18<sup>-/-</sup> は細胞形質膜の EAAC1 量の増加、神経細胞グルタチオン量の増加、および酸化ストレスに対する神経保護能を有していた。さらに GTRAP3-18<sup>-/-</sup> は空間学習能力および記憶力が野生型よりも優れていた。それゆえ、GTRAP3-18 は神経細胞内グルタチオンを増加することにより酸化ストレスに対する神経細胞の抵抗性が増し、学習が促進したと考えられた。本研究の成果により、神経変性疾患の治療薬の標的分子 GTRAP3-18 がなりうる事を示している。

研究成果の概要（英文）：To investigate the potential regulatory mechanism to increase neuronal GSH level in vivo, we generated GTRAP3-18-deficient (GTRAP3-18<sup>-/-</sup>) mice using a gene-targeting approach. Disruption of the GTRAP3-18 gene resulted in increased EAAC1 expression in the plasma membrane, increased neuronal GSH content and neuroprotection against oxidative stress. In addition, GTRAP3-18<sup>-/-</sup> mice performed better in motor/spatial learning and memory tests than wild-type mice. Therefore, the suppression of GTRAP3-18 increases neuronal resistance to oxidative stress by increasing GSH content and also facilitates cognitive function. The present results may provide a molecular basis for the development of treatments for neurodegenerative diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：GTRAP3-18、EAAC1、神経細胞、グルタチオン、遺伝子破壊マウス、神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

グルタチオンは生体抗酸化物質としてきわめて重要な分子である。中枢神経系以外の組

織ではスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)等が酸化ストレスに対する防御機構として重要であるが、中枢神経では SOD 活性の分

布と神経変性疾患の障害部位との相関性が低いことが知られ(Bergeron et al., 1996)、グルタチオンの酸化ストレスに対する中枢神経系防御機構が重要であると推定されている。パーキンソン病患者の中脳黒質ではグルタチオンが減少していること(Maher, 2005)、アルツハイマー病の患者ではグルタチオンによる過酸化水素の解毒が発病時期に関連があること(Spalletta et al., 2007)が知られている。

グルタチオンはグルタミン酸、システインおよびグリシンから特異的酵素により順次縮合されて生合成される。細胞内グルタミン酸及びグリシン濃度は mM レベル存在する一方、システインはわずかに  $\mu\text{M}$  レベルであるため、システインが神経グルタチオン合成の律速段階となっている。神経細胞はグリア細胞とは異なりシスチン(Cys-Cys)輸送機構が発現していないためシスチンをグルタチオン合成の原料とすることができない。したがって細胞外システインを取り込むことが細胞内グルタチオン量を決める重要な因子となっている(Dringen et al., 1999)。しかし、細胞外システインがどのような仕組みで細胞内に取り込まれるのかについては不明であった。グルタミン酸トランスポーターファミリーに属する膜タンパク質 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、グルタミン酸輸送以外の役割が予想されていたが、実際に EAAC1 はシステイン取り込み能力が大きいことが報告された(Chen and Swanson, 2003)。さらに、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 EAAC1 遺伝子破壊マウスを用いて証明された(Aoyama et al., 2006)。EAAC1 の機能を調節機構は不明の点が多いが、少なくとも細胞質及び細胞形質膜に存在するタンパク質である GTRAP3-18 によって負の調節を受けることが申請者らによって明らかにされてきた。すなわち、HEK293 細胞を用いて膜タンパク質 GTRAP3-18 が EAAC1 と細胞膜上で結合し、EAAC1 のシステイン輸送活性を阻害することおよび細胞内グルタチオン量が増加することを報告した(Watabe et al., 2007)。さらに、神経細胞初代培養系およびマウス個体を用いてそれぞれオリゴヌクレオチドおよび siRNA により GTRAP3-18 の発現を抑制す

ると、神経細胞内グルタチオン量が増加すること、また GTRAP3-18 の発現を増加させる試薬(methyl- $\beta$ -cyclodextrin)を作用させると神経細胞内グルタチオン量が減少することを報告した(Watabe et al., 2008)。すなわち、培養細胞系だけでなく生体位においても GTRAP3-18 は EAAC1 活性の抑制性因子として働くことを示した。このように GTRAP3-18 は神経細胞グルタチオン量の負の調節因子であるが、神経細胞グルタチオン量の調節機構は C キナーゼによる EAAC1 の膜移行も関与しており、あるいはこれら以外にも未知の調節機構が存在することは容易に想像できることであり、さらなる実験的エビデンスが必要である。GTRAP3-18 のグルタチオン合成における役割を検証する方法は2つあり、一つは我々がすでに報告したように短期的に GTRAP3-18 の機能を阻害することであり、もう一つの方法は遺伝子破壊動物で表現形を検証することである。これらの2つのアプローチはそれぞれの欠点を補完し、結論が一致することによってはじめて GTRAP3-18 の神経グルタチオンにおける役割が確立されると考えた。さらに、本研究には実用化に向けての戦略も内包している。すなわち、これまでの *in vitro* および *in vivo* における siRNA を用いた結果を根拠に本研究の結果を推定するならば、GTRAP3-18 ノックアウトマウスは神経細胞内グルタチオン量が増加し、酸化ストレスに対する抵抗性が増すと予想できる。この結果は、システイン輸送タンパク質である EAAC1 と相互作用するタンパク質の機能を阻害することにより、神経細胞グルタチオン合成量を調節できることを示すことになる。EAAC1 を直接刺激したほうがより単純であるような印象を受けるかもしれないが、残念ながらこれまで臨床で使用されている医薬品でトランスポーターを標的とする化合物はいずれも阻害薬である。したがって、あくまでも確率の問題ではあるが EAAC1 に結合する化合物は促進作用ではなく阻害作用を有する可能性が高い。この観点から GTRAP3-18 を阻害することにより神経グルタチオンが増加することを本研究によって示すことは学術的新規性が高いばかりでなく、すでに報告している siRNA の結果と相俟って GTRAP3-18 阻害化合物が神経細胞グルタチオンを増加させる可能性を示すものであり、工業的価値の

可能性をも有すると考える。

## 2. 研究の目的

**GTRAP3-18 遺伝子破壊マウス (GTRAP3-18<sup>-/-</sup>)** を作成・確立し、**EAAC1** 活性の増加およびそれに伴う中枢神経系グルタチオン量の変動、さらには神経変性に対する抵抗性について検証することである。

## 3. 研究の方法

### (1) GTRAP3-18<sup>-/-</sup> の作成

GTRAP3-18 遺伝子は3個のエキソンから成り立っている。このうち第1エキソンを定法に従ってネオマイシンカセットで置換した変異遺伝子を作成する。また、TT2 cell に変異遺伝子を導入し、ネオマイシンにより選択する。胚性幹細胞をC57BL/6マウスのblastocystに挿入した後C57BL/6マウスの子宮に移植し、出生させることによりキメラマウスを作成した。

### (2) GTRAP3-18<sup>-/-</sup> の確立

上記のキメラマウスと野生型C57BL/6マウスを交配させ、F1を得た後heterozygoteと野生型マウスの交配を繰り返し、第5世代以降のheterozygote同士の交配によりhomozygoteを得た。

(3) GTRAP3-18<sup>-/-</sup> の一般状態の確認  
体重増加、新生個体の発育状況を確認した。

### (4) 行動

Rotarod テスト、オープンフィールドテストおよび自発運動量につき、野生型マウスと比較検討する。

### (5) 生化学的性質

(a) パーキンソン病モデルと関連性が深いタンパク質のウェスタンブロッティングを実施した。

(b) 大脳システインおよびグルタチオンを高速液クロにより分離・定量した。

### (6) 形態学的性質

(a) 大脳皮質、線条体、黒質、海馬におけるGTRAP3-18の免疫組織染色を実施した。

(7) スライスカルチャー系における実験  
GTRAP3-18<sup>-/-</sup> および野生型マウスより中脳を含むスライスを作成し、以下の実験を行い、両マウスで比較した。

(a) 神経細胞内グルタチオン量測定  
(b) 過酸化水素ストレスに対する抵抗性が増加しているかどうかの検討。

## 4. 研究成果

### (1) GTRAP3-18 遺伝子の破壊

マウス尾部より組織を採取し、サザンブロッティングにより遺伝子が改変されたことを確認した。ウェスタンブロッティングにより、野生型マウスでは分子量23kDaのGTRAP3-18を確認できたが、遺伝子破壊マウスGTRAP3-18<sup>-/-</sup>では発現が認められなかった。

### (2) GTRAP3-18<sup>-/-</sup> の表現形

異型接合体GTRAP3-18<sup>+/+</sup>とGTRAP3-18<sup>-/-</sup>を交配させたときに得られる接合体の生まれる割合はメンデルの法則にしたがっていた。生後6ヶ月の時点でGTRAP3-18<sup>-/-</sup>は野生型に比較して肉眼的には奇形や腫瘍の発生はなかったが、やせていた。生後5ヶ月での尾懸垂試験では後肢のclaspingsは認められなかった。GFAPによるアストロサイト染色およびIba1によるミクログリア染色の結果では野生型と差は認められなかった。

### (3) 細胞形質膜でのEAAC1発現量

脳全体でのEAAC1発現量は野生型と差がなかったが、細胞形質膜での発現量は増加していた。海馬でのNeuN陽性細胞(神経細胞と考えられる)内のEAAC1の免疫染色像はGTRAP3-18<sup>-/-</sup>において辺縁に集中しており、細胞形質膜に増加したという結果と一致した。これに対して野生型では、EAAC1の分布は細胞体に均一に存在していた。

(4) GTRAP3-18<sup>-/-</sup>におけるグルタチオン量  
生後6ヶ月における全脳グルタチオン量およびシステイン量は野生型に比較して有意に増加した。しかし、肝臓のグルタチオン量には差がなかった。GABA、グルタミン酸およびグリシン量には差がなかった。海馬のグルタチオンをCMFDA染色した結果では、多くのグルタチオンは神経細胞に存在し、CMFDA染色によるグルタチオン量は約2倍に増加した。アストロサイトのCMFDA染色像には増加が見られなかった。ミクログリアにはCMFDA染色像がみられなかった。

(5) 酸化ストレスに対する抵抗性  
タンパク質のニトロ化を起こす SIN-1 を野生型マウス的大脑皮質または海馬スライスに作用させるとタンパク質のニトロ化が大量に増加した。これに対して、GTRAP3-18<sup>-/-</sup>におけるスライスでは SIN-1 を作用させてもニトロ可能増加が全く見られなかった。

(6) 運動能力および空間学習能力  
自発運動量および探索行動量を測定するためオープンフィールド試験を行った。GTRAP3-18<sup>-/-</sup>および GTRAP3-18<sup>+/-</sup>は野生型マウスに比較して自発運動量および探索行動量が有意に減少していた。しかし、いずれの試験においても平均運動速度には差がなかった。これに対して、強制運動および協調運動能力を測定するために行った Rotarod 試験および空間学習能力を測定するモリス水迷路試験では、GTRAP3-18<sup>-/-</sup>は野生型ならびにヘテロ接合型マウスよりも優れた成績を示した。

## 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 3 件)

① Aoyama K, Wang F, Matsumura N, Kiyonari H, Shioi G, Tanaka K, Kinoshita C, Kikuchi-Utsumi K, Watabe M and Nakaki T Increased neuronal glutathione and neuroprotection in GTRAP3-18-deficient mice. Neurobiol Dis 45:973-982, 2012. (査読有)

② Aoyama K and Nakaki T, Modulation of neuronal glutathione synthesis by EAAC1 and its interacting protein GTRAP3-18. Amino Acids 2011. (査読有)

③ Aoyama K, Matsumura N, Watabe M, Wang F, Kikuchi-Utsumi K, and Nakaki T. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. Neuroscience 181:206-215, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

① 青山晃治, 王凡, 松村暢子, 清成寛, 塩井剛, 田中かろ, 木下千智, 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, in 第 85 回日本薬理学会年会, 2012. 3. 14-16, 京都.

② 青山晃治, 松村暢子, 渡部正彦, 王凡, 中木敏夫 プリン誘導体による神経グルタチオン増加第 84 回日本薬理学会年会, 2012. 3. 22, 横浜.

③ Nakaki T. Modulation of neuronal glutathione synthesis. 11th National Sino-Western Joint Conference on Microcirculation. 2011. 6. 18, Yantai, China.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 2 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, 青山晃治, 渡部正彦

権利者: 帝京大学

種類: 特許

番号: 4785919

取得年月日: 2011-07-22

国内外の別: 日本

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, 青山晃治, 渡部正彦

権利者: 帝京大学

種類: 特許

番号: C12Q1/68M6; G01N33/566 (EPC)

取得年月日: 2011-11-17

国内外の別: 国外 EPC (ドイツ、フランス、イタリア、イギリス)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中木敏夫 (NAKAKI TOSHIO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号: 30164148

(2) 研究分担者

青山晃治 (AOYAMA KOJI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号: 00420943