

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590333

研究課題名(和文) 低血糖・高学習能マウスに関する研究

研究課題名(英文) A study on mice with hypoglycemia and high cognitive ability

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：GTRAP^{-/-}マウスの体重減少と痩せは食餌摂取量の減少が原因であることが示唆された。食欲促進ペプチドの血清MCH, AgRP, NPYは差がなかった。これに対して、食欲抑制ペプチドの α -MSHは有意に増加した。POMCおよび α -MSHの受容体タンパクであるMC4Rは視床下部において差がなかった。野生型マウスの絶食状態ではMC4R受容体活性低下によりAMPK α 活性が増加することを示している。しかしGTRAP^{-/-}マウスでは絶食状態であってもAMPK α 活性は増加しなかった。この事実はGTRAP^{-/-}マウスでは α -MSHが増加しており、AMPK α 活性が抑制されていることと解釈される。

研究成果の概要(英文)：Early experiments suggested the cause of body weight loss and emaciation of GTRAP^{-/-} to be a decrease in food intake. The level of serum MCH, AgRP or NPY, which increases appetite, was not significantly different from that of the wild type, while α -MSH, which inhibits appetite, was significantly increased. POMC and the receptor for α -MSH, MC4R, were not changed in the hypothalamus. Fasted wild type mice showed the increased activity of AMPK- α due to the decrease in MC4R activity in response to appetite increase. However, Fasted GTRAP^{-/-} mice showed suppressed AMPK- α activity, suggesting fasting state did not lead to the decrease in MC4R activity and the increase in MSH- α is the primary change in GTRAP^{-/-} mice.

研究分野：GTRAP3-18

キーワード：GTRAP3-18 EAAC1 低血糖 食欲

1. 研究開始当初の背景

GTRAP3-18 (以下 GTRAP) は EAAC1 の調節因子として同定された膜タンパク質である。EAAC1 は中枢神経系では神経細胞に特異的に発現しており、細胞質から PI3 キナーゼの作用によって形質膜へ移行し、形質膜においてグルタミン酸やシステインの細胞内への輸送を行う。しかし、神経細胞内グルタミン酸の供給源としては、グルタミンからグルタミン酸を合成する機構が主たる役割をしていることが知られており、神経細胞における EAAC1 の役割はむしろシステイン輸送機構として重要であると認識されるようになった。実際に共同研究者の青山が報告したように EAAC1 のノックアウトマウスの神経細胞内グルタミン酸量は全く変化しなかったのに対して、システイン含有量は著明に減少した (Aoyama et al, 2006)。それと同時に神経細胞内グルタチオン量も著明に減少した。一方、グリア細胞内のシステイン及びグルタチオン量は変化しなかった。これらの事実より、EAAC1 は神経細胞内グルタチオン量の維持にとって必須であることが示された。さらに、EAAC1 ノックアウトマウスは酸化ストレスに対して脆弱になっていることも判明した。この事実はグルタチオンが神経細胞において抗酸化ストレス物質として主要な役割をしていることを示している。その後、EAAC1 の機能調節を研究する過程で、文献調査により、米国のグループが Yeast two hybrid method を用いて EAAC1 と物理的に結合するタンパク質として GTRAP を数年前に報告していることを知った (Lin et al., 2001)。そこで、申請者らは GTRAP が EAAC1 のシステイン輸送能力を変化させ、さらに神経細胞内グルタチオン量を変化させるのではないかと推測し、細胞レベル及びマウス個体レベルで GTRAP 発現量を増加させるか、もしくは oligonucleotide や siRNA により GTRAP を減少させることにより EAAC1 の機能を調べたところ、GTRAP は EAAC1 機能の抑制因子であることが強く示唆された (Watabe et al., 2007;2008)。この事実をさらに確定するため、GTRAP^{-/-}マウスでは EAAC1 機能が亢進するという作業仮説の元に GTRAP^{-/-}マウスを作成した。

< GTRAP^{-/-}マウスの表現形 >

このマウスの表現形は予想の範囲内であったものと範囲外のものがあった。予想の範囲内の表現形としては、脳内グルタチオンの増加および酸化ストレスに対する抵抗性がみられた (Aoyama et al., 2011)。予想の範囲外の表現形として、

低血糖、低インスリン血症、低体重、および海馬の肥大および認知能力の亢進があった。低血糖、低インスリン血症、かつ肥満の表現形の組み合わせを持つノックアウトマウスはこれまで多数報告されているが、低血糖、低インスリン血症、かつ低体重の表現形はこれまでに 1 件のみの報告しかなく、それは PPAR^{-c1} (peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha) 遺伝子ノックアウトマウスであった (Lin et al., 2004)。しかし、この PPAR^{-c1} ノックアウトマウスは線条体の変性を伴っていた。これに対して、GTRAP^{-/-}マウスでは線条体の変性は見られず、それとは逆に野生型マウスと比較して海馬の錐体細胞層の厚みが増しており、学習能力も亢進していた。このことから、GTRAP^{-/-}マウスの表現形は全く新しいことが判明した。

< 低血糖・低インスリン血症・低体重をきたす病態生理の解明 >

GTRAP はシステイン輸送タンパク質 EAAC1 の抑制因子であるゆえに、GTRAP^{-/-}マウスでは EAAC1 の機能が亢進することが推定され、神経細胞内へのシステイン取り込み増加、それに起因するグルタチオン量の増加及び酸化ストレスに対する抵抗性の増加が申請者らの実験によって示されているが、GTRAP^{-/-}マウスのすべての表現形を EAAC1 の機能亢進のみに帰着できるか否かが問題となる。少なくともこれまで報告されている EAAC1 の発現組織 (神経細胞、腎、精巣、腸など) のシステインあるいはグルタミン酸の取り込み亢進では説明できない。GTRAP が同定された経緯を振り返るならば、Lin らが Yeast two hybrid method によって同定した GTRAP は EAAC1 の C 末端に結合するタンパク質のスクリーニング法であるゆえ、EAAC1 に結合するタンパク質は GTRAP が最も親和性が高いと推定できるものの、この方法は GTRAP に結合するタンパク質をスクリーニングするものではないため、GTRAP の結合相手としては未知のタンパク質である可能性が十分にある。ヒトの臨床知見から低血糖・低インスリン血症・低体重の原因として食欲低下の可能性が最も考えられ、実際に、食餌摂取量の減少がみられた。したがって、GTRAP は新しい食欲維持タンパク質の可能性がある。それゆえ、GTRAP によって食欲を調節する機序の破綻が考えられる。

< 骨格筋グルコース輸送体 GLUT4 の膜移行に關与する可能性 >

GLUT4(輸送体の系統分類では

SLC12A4)はPI3キナーゼによって膜へ移行することがよく知られている。EAAC1(輸送体の系統分類ではSLC1A1)もPI3キナーゼによって膜へ移行する。GTRAPによって膜移行が抑制される性質はEAAC1だけでなくGLUT4においても見られる可能性がある。GTRAP^{-/-}マウスの極度の低血糖は、GTRAPを欠損することによって生じたGLUT4の膜での過剰発現が原因である可能性もある。このことは、GLUT4の調節機構に新たな知見を加えることになる。

2. 研究の目的

本研究は、GTRAP^{-/-}マウスが低血糖・低インスリン血症・低体重を呈するメカニズムおよび高い学習能力を示すメカニズムを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

摂食行動関連ペプチドおよびその受容体のタンパク発現量

ウェスタンブロットによってスクリーニングした。中枢ペプチドは視床下部、末梢性ペプチドは血液および視床下部の検体につき解析した。解析対象は以下のとおりである。

中枢性摂食行動誘導性ペプチド：Neuropeptide Y、Agouti-related protein、Melanin concentrating hormone、Proopiomelanocortin

中枢性摂食行動抑制性ペプチド：MSH、CRH、Neuropeptide B、Neuropeptide W、Neuromedin U

末梢性摂食行動誘導性ペプチド：Ghrelin

末梢性摂食行動抑制性ペプチド：レプチン Leptin、Insulin、

骨格筋および脂肪組織におけるGLUT4の解析

野生型マウス及びGTRAP^{-/-}マウスにおける、GLUT4組織内総量及び細胞膜発現量、PI3キナーゼ活性、およびインスリン受容体発現量を比較した。骨格筋は大腿四頭筋、脂肪組織は遺伝子発現調節機構が異なる2種類の脂肪組織、すなわち白色脂肪及び褐色脂肪について検討した。

4. 研究成果

体重減少

GTRAP^{-/-}マウスの二ヶ月齢では体重が野生型マウスに比較して有意に少なく、やせていた。その後差は広がった。食餌摂取量にも同様の差が見られた。したがって、GTRAP^{-/-}マウスの体重減少と痩せは食餌摂取

量の減少であることを示唆した。

血清レプチン、インスリン、グルコース濃度

GTRAP^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べてこれらの値が有意に低かった。しかし、骨格筋細胞膜のGLUT4量に差はなかった。また、HOMA指数は野生型に比べて低く、インスリン抵抗性はみられなかった。

食欲を調節するペプチド

血清及び脳内の量を定量した。

ghrelin, melanin-concentrating hormone (MCH), AgRP, NPY, α -MSH, CRHを絶食状態にてELISAにより定量した。食欲促進ペプチドの血清MCH, AgRP, NPYは差がなかった。これに対して、食欲抑制ペプチドの α -MSHは有意に増加した。POMCおよび α -MSHの受容体タンパクであるMC4Rは視床下部において差がなかった。

絶食状態とAMPK

AMPK活性はMC4R受容体により負の制御を受けている。絶食状態の野生型マウスでは食欲が亢進するが、AMPK活性が増加した。このことは絶食状態ではMC4R受容体活性低下によりAMPK活性が増加することを示している。しかしGTRAP^{-/-}マウスでは絶食状態であってもAMPK活性は増加しなかった。この事実はGTRAP^{-/-}マウスでは α -MSHが増加しており、AMPK活性が抑制されていることと解釈される。

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5件)

Kinoshita, C, Aoyama, K and Nakaki, T. microRNA as a new agent for regulating neuronal glutathione synthesis and metabolism. 2, 2015, 124-143. (査読有)

Aoyama, K and Nakaki, T. Glutathione in cellular redox homostasis: Association with the excitatory amino acid carrier 1. 20, 2015, 8742-8758. (査読有)

Aoyama, K and Nakaki, T. Neuroprotective properties of the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). Amino Acid, 45, 2013, 133-142. (査読有)

Aoyama, K and Nakaki T. Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. 14, 2013, 21021-21044. (査読有)

Aoyama, K and Nakaki T. Inhibition of GTRAP3-18 May Increase Neuroprotective Glutathione (GSH) Synthesis. International Journal of Molecular Sciences, 13, 2012, 12017-12035. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

青山晃治、中木敏夫 他神経変性に於けるタンパク質間相互作用(PPI)を基礎として薬剤スクリーニング系の構築の試み。第88回日本薬理学会年会。2015年4月1日～2015年4月3日、名古屋国際会議場(名古屋市)。

青山晃治、中木敏夫 他マウスの摂食行動が海馬グルタチオンに及ぼす影響。第87回日本薬理学会年会。2014年03月21日～2014年03月23日、仙台国際センター(仙台市)。

青山晃治、中木敏夫 他 GTRAP3-18 欠損マウスにおける記憶学習能力の行動学的解析。第86回日本薬理学会年会。2013年03月21日～2013年03月23日、福岡国際会議場(福岡市)。

〔図書〕(計1件)

Aoyama, K and Nakaki, T., Disorders of Glutathione Metabolism in Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disorders. Academic Press, 2015.

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：3 0 1 6 4 1 4 8

(2)研究分担者

青山 晃治 (AOYAMA, Koji)
帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：0 0 4 2 0 9 4 3