

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830047

研究課題名(和文) グルタミン酸誘導的な細胞死を調節するタンパク質複合体の解析

研究課題名(英文) Characterization of protein complex regulating glutamate-induced cell death

研究代表者

王 旻(Wang, Min)

東京大学・教養学部・特任助教

研究者番号：10616329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：すぐに虚血後に発生するグルタミン酸の蓄積は、神経毒性につながるグルタミン酸受容体の過剰な刺激をもたらします。然し、今の治療は正常な脳の機能に必要とされるシナプス後グルタミン酸反応を抑制するので、脳卒中治療におけるグルタミン酸受容体拮抗薬の臨床応用が失敗しました。したがって、虚血性脳卒中の治療のために、代替のターゲット/経路を求められている必要があります。

本研究では、GAPDHはGluR2NTとの直接的な相互作用を介してタンパク質複合体を形成し、AMPAの活性化はGluR2とGAPDHの共内化とそれに続く核移行を促進し、核のGAPDH / p53の複合体形成を促進することを発見しました。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of glutamate, which occurs immediately after ischemia, results in excessive stimulation of glutamate receptors leading to neurotoxicity. However, clinical application of glutamate receptor antagonists in stroke treatment has failed since these treatments suppress postsynaptic glutamate response that is needed for normal brain function. Therefore, alternative targets/pathways for therapeutic treatment of ischemic stroke must be sought.

We have been able to demonstrate for the first time that the GluR2 AMPAR-mediated neurotoxicity is mediated by a novel mechanism that involve several steps: (1) GAPDH forms a protein complex with AMPAR through its direct interaction with the GluR2NT, (2) AMPAR activation promotes co-internalization and subsequent nuclear translocation of GluR2 and GAPDH, and (3) the formation of the nuclear GAPDH/p53 complex and the activation of nuclear p53-mediated cell death pathways.

研究分野：総合生物

キーワード：Neurotransmitter Receptors Glutamate Cell Death

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は、脳内の主要な興奮性神経伝達物質であり、多くの生理学的機能に関与しています [1]。また、そのような発作および脳卒中の治療に臨床上有益であってもよいグルタミン酸受容体機能に拮抗する化合物の希望につながった神経毒性に関連しているてんかんなどの神経病理学的疾患に関与しています [2]。しかし、グルタミン酸アンタゴニスト療法は、重篤な副作用に起因する臨床試験で失敗しました。これは、正常な脳機能の維持におけるグルタミン酸受容体媒介神経伝達の必須の要件で指定された驚くべきことではありません。したがって、具体的にはグルタミン酸受容体媒介性神経毒性を標的と代替方法は、脳卒中の治療の可能性であってもよいです。

興奮性シナプスで速いシナプス伝達を伸介する AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) 型グルタミン酸受容体 (AMPA) は、しっかりと両方のグローバルおよび焦点虚血性脳卒中後の神経喪失の選択パターンに関連付けられています [3]。かなりの証拠は、虚血は、特定の脳領域における AMPAR サブユニットの発現パターンの変化を引き起こす可能性があることを示しており [4-5]、AMPA アンタゴニストは、虚血誘発性神経細胞死に対する保護効果を発揮します [6]。しかし、基礎となるメカニズムはよくわかっていないままです。近年、GRIP (glutamate-receptor-interacting-protein) [7]、NSF (Nethylmaleimide-sensitive factor) [8]、PICK (protein interacting with C kinase) [9] などの細胞内タンパク質の様々な、AMPA の GluR2 サブユニットに結合することが報告されています。これらのタンパク質は、受容体の標的化またはクラスタリングではなく、受容体活性およびシグナル伝達経路の活性化の調節だけでなく、重要な

役割を果たしています。また、私たちを、Na⁺-K⁺ ATPアーゼは、AMPA の GluR2 サブユニットに結合し、AMPA の代謝回転を調節発見しました [10]。このように、AMPA とこれらのタンパク質間の相互作用を調節することは、脳の特定の領域で AMPAR を標的とすることができる場合があります。

AMPA は興奮毒性に寄与し、AMPA アンタゴニストは神経損傷に対する保護を示しました。AMPA に拮抗するだけでなく、このような非損傷ニューロンにおけるグルタミン酸の興奮性神経伝達としての生理的機能をブロックするため、しかし、完全に AMPAR を遮断することは、動物およびヒトに致命的である可能性があります。したがって、多分実り選択に影響を受けないグルタミン酸の生理作用を残して、AMPA 相互作用タンパク質を調節することにより、脆弱ニューロンにおける AMPAR の病理学的効果をブロックします。

2. 研究の目的

虚血性脳梗塞は深刻な健康問題で、ヒトの死の主要な要因である。脳内のグルタミン酸レベルは脳こうそくの後で上昇していることが多く、神経細胞死に重要な役割を果たすと考えられている。従って、グルタミン酸受容体依存的な細胞毒性の制御を理解することは、虚血性脳梗塞の治療法の開発にとって重要である。本研究では、グルタミン酸受容体の機能を制御するタンパク複合体とその細胞死における役割を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

以前に我々のグループで説明したように GST 融合タンパク質、ミニ遺伝子、タンパク質アフィニティー精製、インビトロ結合、同時免疫沈降およびウェスタンブロット、細胞に ELISA アッセイを実施しました [11-13]。

(1) AMPAR 媒介性の興奮毒性の定量

GluR1 / 2 サブユニットでトランスフェクトした HEK- 293T 細胞を、24 時間、37 で 300 μ M のグルタミン酸 / 25 μ M のシクロチアジドで処理しました。細胞を 37 で 24 時間回復させました。細胞死を定量するために、培地を、ヨウ化プロピジウム (PI) 50 μ g / ml を含む細胞外液と交換しました。37 で 30 分間のインキュベーション後、各ウェルの蛍光強度をプレートリーダーで測定しました。死細胞の割合は、グルタミン酸処理した細胞で発生した細胞毒性のために標準化しました。

(2) 核の精製

細胞を穏やかに、氷冷 PBS で 2 回すすぎ、溶液 1 (10 mM Hepes, pH 8.0, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, proteinase inhibitor and PMSF) 1ml に掻き取りました。細胞が膨潤する 15 分間氷上で放置しました。次に、1% NP-40 を添加し、細胞を 8,000 \times g で短時間遠心分離しました。ペレットを溶液 2 (20 mM Hepes, pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 25% glycerol (V/V), 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, proteinase inhibitor and PMSF) の 175 μ L に再懸濁し、25 ゲージ針を介して均質化しました。核の懸濁液を 4 で 30 分間攪拌し、次いで、4 で 5 分間、16,000 \times g で遠心分離しました。上清を核抽出物です。

4 . 研究成果

(1) GluR2 サブユニットは、直接 GAPDH と相互作用します

GAPDH と相互作用することができるの GluR2 サブユニット上の領域を同定するために、我々だけでは、可溶化ラット海馬組織から精製する「プルダウン」GAPDH をアフィニティー GST- GluR2NT (V₂₂-E₅₄₅)、GST- GluR2CT (I₈₃₃-I₈₈₃) と GST を用いたアフィニティー精製実験を適用しました。その後のウ

エスタンプロット分析は GluR2NT 及び GAPDH はなく、GST- GluR2CT との関連を確認しました(図 1)。このように、GAPDH のみ GluR2NT と特異的に相互作用しました。

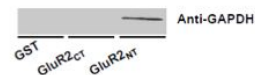


図 1 GAPDH を可溶化ラット海馬溶解物から GST - GluR2CT と GST ではなく、GST- GluR2NT でプルダウンされています。

GAPDH との相互作用に關与 GluR2NT の領域にこれらの結果を確認し、描写するために三 GluR2NT GST 融合タンパク質 (図 2 G) を構築し (GluR2_{NT1}: V₂₂-S₂₇₁, GluR2_{NT2}: K₂₇₂-I₄₂₁, GluR2_{NT3}: L₄₂₂-E₅₄₅)、アフィニティー精製実験に使用しました。図 2 A に示すように、唯一の GST- GluR2NT1 は GluR2 のサブユニットは、その NT 領域を介して GAPDH と相互作用することを示す GAPDH を沈殿させました。GluR2NT1 領域の切断一連の後、GAPDH と相互作用する部位をマッピングするために作成されました。図 2 B - C に示すように、唯一の GST- GluR2NT1-3 (H₁₂₂-K₁₇₂) 及び GST- GluR2NT1-3-2 (Y₁₄₂-K₁₇₂) は、ラット海馬組織由来の GAPDH を沈殿させることができました。

GAPDH との GluR2 サブユニットは互いに直接相互作用するという証拠を提供するために、我々は、in vitro 結合アッセイを行いました。図 2 D に示すように、in vitro で翻訳 [35S] GAPDH と GluR2NT1 との間の直接的なタンパク質 - タンパク質相互作用の特異性を示す、GST- GluR2NT1 ではなく GST- GluR2NT2、GST- GluR2NT3 または GST のみとハイブリダイズ-GAPDH プローブ。私たちのアフィニティー精製実験と一致して、in vitro で翻訳された [35S] -GAPDH プローブのみ GST- GluR2NT1-3 および GST- GluR2NT1-3-2 とハイブリダイズ (図 2 E - F)。一緒に、これらのデータは、GAPDH は GluR2NT の Y142 - K172 領域を介した GluR2 サブユニットと直接

タンパク質間相互作用を形成していることが示唆されました。

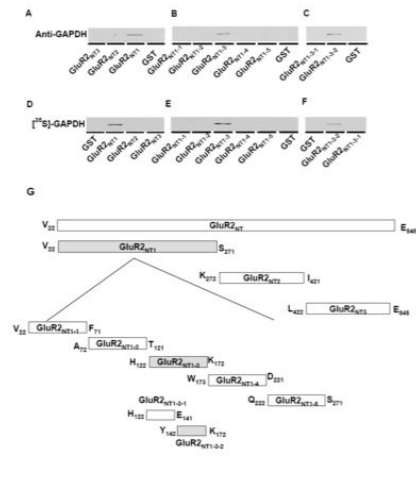


図2 GluR2 - GAPDH 相互作用に関与する GluR2 サブユニット領域の識別

A-C. GAPDH を可溶性ラット海馬溶解物から (A) GST-GluR2NT1; (B) GST-GluR2NT1-3; (C) GST-GluR2NT1-3-2 でプルダウンされています。

D-F. *in vitro* での結合アッセイ。[35S]は-GAPDH プロローブは、GST-GluR2NT1 (D), GST-GluR2NT1-3 (E) and GST-GluR2NT1-3-2 (F) と結合します。

G. GluR2NT セグメントの GST 融合タンパク質の略図。

(2) AMPAR の活性化は、GAPDH と GluR2 の間の複合体形成を促進しました

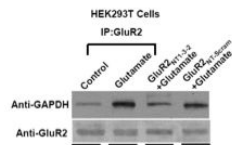


図3. GluR2NT1-3-2 または GluR2NT -スクラムミニ遺伝子で前に処理した GluR1 / 2 サブユニットを発現する HEK - 293T 細胞からの (グルタミン酸処理付き/なし) の GluR2 抗体による GAPDH の免疫共沈降

我々は、AMPA / GAPDH 複合体の形成に AMPAR 活性化の効果を調べました。GluR1 / 2 サブユニットを発現する HEK - 293T 細胞における AMPAR の活性化 (100 μ M グルタミン酸) は $75 \pm 18\%$ (mean \pm SEM, n=3), の GluR2 と GAPDH の共免疫沈降を増加させました (図3)。アゴニスト刺激が大幅に直接免疫沈降の GluR2 サブユニットのレベルを変化させませんでした (図3)。また、スクランブル GluR2NT1-3-2 ミニ遺伝子 (GluR2_{NT1-Scram}) ではなく、GluR2NT1-3-2 ミニ遺伝子の共導入は、かなりトランスフェクトされた HEK- 293T 細胞における AMPAR / GAPDH 複合体形成におけるアゴニスト誘導性の増加を抑制しまし

た (図3、mean \pm SE, n=3)。

(3) GAPDH - GluR2 の相互作用の破壊は AMPAR により引き起こされる細胞死を抑制しました

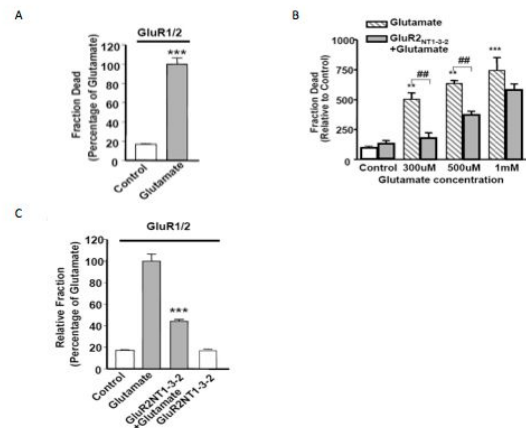


図4 HEK293T 細胞における AMPAR 媒介細胞死の調節。

A. GluR1 / 2 サブユニットを発現する HEK - 293T 細胞 (グルタミン酸処理付き/なし) からの PI 蛍光の定量的測定 (300 μ M glutamate, 25 μ M CTZ, 24 hr). ***Significantly different from control group (n=9 per group, P<0.001); t-test.

B. GluR2NT1-3-2 ミニ遺伝子の存在/非存在下で、種々の用量でのグルタミン酸処理での GluR1 / 2 サブユニットを発現する HEK- 293T 細胞からの PI 蛍光の定量的測定. ** P<0.01, *** P<0.001; significantly different from control group. ANOVA, followed by post-hoc SNK test. ##, significant from the corresponding glutamate group (P<0.01, n=9 per group), t-test.

C. GluR2NT1-3-2 ミニ遺伝子の存在/非存在下で、グルタミン酸処理での GluR1 / 2 サブユニットを発現する HEK- 293T 細胞からの PI 蛍光の定量的測定. ***Significantly different from glutamate group (P<0.001; n=9 per group). ANOVA, followed by post-hoc SNK test.

AMPA と GAPDH の両方が独立して細胞毒性に関与することが示されています [14-18]。AMPA の活性化が AMPAR / GAPDH 複合体の形成を促進した観察は、GAPDH - GluR2 のタンパク質 - タンパク質相互作用が AMPAR 媒介性の興奮毒性を媒介する役割を果たしている可能性が示唆されました。以前の研究と一致して、GluR1 / 2 を発現する HEK- 293T 細胞をグルタミン酸の処置は、著しい細胞死を引き起こしました (図4 A)。

AMPA 媒介細胞死における GAPDH / GluR2 の相互作用の関与を調べるために、GluR1 / 2 を発現する HEK - 293T 細胞であった GluR2NT1-3-2 ミニ遺伝子で同時トランスフェクト。図4 B に示すように、GluR2NT1-3-2 ミニ遺伝子が実証、 $56 \pm 2\%$ AMPAR 媒介性の細胞死を減衰し、その AMPAR 媒介性の細胞死から GAPDH - GluR2 の結合救出細胞の破壊 (図4 C)。一緒に、これらのデータはさらに、GAPDH - GluR2 のタンパク質 - タンパ

ク質相互作用は、GluR2 の AMPAR 媒介性細胞死に寄与し得ることを支持しています。

(4) GAPDH との GluR2 が GAPDH - GluR2 の相互作用を介して核に移行します

以前の研究は、GAPDH は、SIAH1 は結合後に核移行することにより、アポトーシス細胞死を開始したことを明らかにしました [15, 19]。グルタミン酸刺激は GAPDH に核移行を促進しました。したがって、我々は内在化 GAPDH が AMPAR アゴニスト刺激による核に移行したかどうかを検討しました。GluR1 / 2 サブユニットを発現する HEK - 293T 細胞における AMPAR の活性化後、GAPDH だけでなく、GluR2 も核局在化の著しい増加を示しました (図 5 A-C)。また、GAPDH との GluR2 の核移行は GluR2NT1-3-2 ミニ遺伝子との共導入によって遮断されました (図 5 A-C)。LaminB1 核マーカーとして使用し、チューブリンは、細胞質のマーカーとして使用しました。

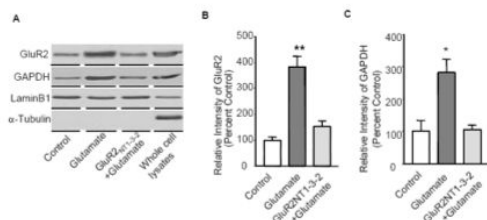


図 5 AMPAR の活性化は、GAPDH - GluR2 の核移行を誘導します。

A. GluR1 / 2 サブユニットを発現する HEK - 293T 細胞における GluR2NT1-3-2 ミニ遺伝子の存在/非存在下での (グルタミン酸処理付き/なし) 核における GluR2 との GAPDH 発現。LaminB1 及び α チューブリンは、それぞれ、核および細胞質のマーカーとして使用しました。全細胞溶解物をコントロールとして使用しました。

B-C. GluR2 (B) と GAPDH の核発現の定量化 (C)。** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; significantly different from control group (n=3 per group). ANOVA, followed by *post-hoc* SNK test.

(5) AMPAR の活性化は、核 GAPDH - p53 の結合を促進します

p53 は、アポトーシスを開始することができ、腫瘍抑制および転写因子は、以前にグルタミン酸が媒介する興奮毒性に関与しました [20-22]。さらに興味深いことに、以前の研究では、GAPDH およびニューロンのアポトーシスに關与する p53 の間の相互作用を示

しました [23]。そこで、GluR2NT および GAPDH は実験を「プルダウン」の親和性を使用して p53 と相互作用するかどうかを試験しました。GST-GAPDH はラット海馬神経細胞の核抽出物 (図 6 A) からの p53 を沈殿させました。図 6 B に示されるようにまた、GAPDH 用の GluR1 / 2 のサブユニットを発現する HEK - 293T 細胞の単離された核からの p53 と共免疫沈降。これは、AMPA の活性化は GAPDH および p53 の複合体の形成を促進するように見えることを示しています。GluR2NT1-3-2 ミニ遺伝子との同時トランスフェクションが GAPDH / p53 の相互作用を阻害しているため、p53 は、GAPDH - GluR2 の結合に対する阻害剤、競争力として作用しました。

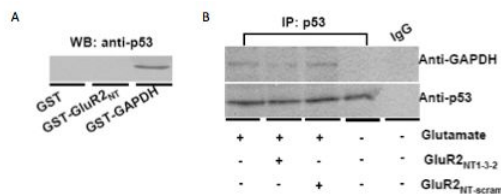


図 6 AMPAR の活性化は、核 GAPDH - p53 相互作用を促進します。
A. 核 p53 は、海馬で GST - GAPDH によってプルダウンされます。
B. GluR1 / 2 サブユニットを発現する HEK - 293T 細胞の核タンパク質から p53 と GAPDH の共免疫沈降

(6) GAPDH - p53 は GluR2 の媒介性細胞死に重要な役割を果たしています

GAPDH および p53 の両方は、独立して細胞毒性に關与することが示されています [14, 21]。我々は GluR2 の、GAPDH および p53 および核移行イベント間のシーケンシャルタンパク質 - タンパク質相互作用が AMPAR 媒介性の興奮毒性を媒介するのに重要な役割を果たしている可能性があることが疑われます。GluR2 の媒介細胞死における p53 の役割を調べるために、我々は前グルタミン酸処理への p53 阻害剤の PFT - (pifithrin-a, 10 mM, 1 hour) での GluR1 / 2 サブユニットを発現する HEK - 293T 細胞を前処理し。PFT - は、予め DNA 損傷剤、アミロイドペプチド、グルタミン酸および虚血によって誘導されるアポトーシスに対してニューロ

ンを保護するために使用された p53 の阻害剤です(16, 17)。図 7 A-B に示すように、HEK-293T 細胞における PFT- α 処理顕著に抑制グルタミン酸誘発細胞死はの GluR1 / 2 サブユニットを発現するが、GluR1 / 3 サブユニットを発現する HEK-293T 細胞におけるグルタミン酸誘導性の細胞死を抑制しませんでした。これは GluR2 の AMPAR 媒介性細胞死は p53 依存性であることを示唆しています。

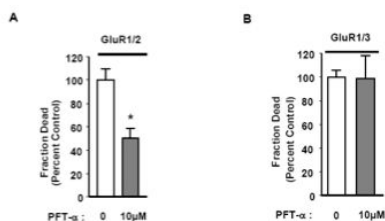


図 7 GAPDH - p53 は GluR2 の AMPAR 媒介性細胞死に重要な役割を果たしています。
A. GluR1 / 2 サブユニットを発現する HEK - 293T 細胞における PFT - α の存在/非存在下 (10 μ M、1hr) でのグルタミン酸誘発細胞死 (PI 蛍光の定量的測定) *Significantly different from control group ($P < 0.05$; n=9 per group); t-test.
B. GluR1 / 3 サブユニットを発現する HEK - 293T 細胞における PFT - α の存在/非存在下 (10 μ M、1hr) でのグルタミン酸誘発細胞死 (PI 蛍光の定量的測定) (n=9 per group).

<引用文献>

- Bliss, T.V. and G.L. Collingridge. *Nature*, 1993. 361(6407): p. 31-9.
- Choi, D.W., *Neuron*, 1988. 1(8): p. 623-34.
- Dos-Anjos, S., et al. *Brain Res*, 2009. 1287: p. 20-7.
- Gorter, J.A., et al., *J Neurosci*, 1997. 17(16): p. 6179-88.
- Ying, H.S., et al., *J Neurosci*, 1997. 17(24): p. 9536-44.
- Sheardown, M.J., et al., *Eur J Pharmacol*, 1993. 236(3): p. 347-53.
- Dong, H., et al., *Nature*, 1997. 386(6622): p. 279-84.
- Nishimune, A., et al., *Neuron*, 1998. 21(1): p. 87-97.
- Xia, J., et al., *Neuron*, 1999. 22(1): p. 179-87.
- Zhang, D., et al., *J Neurosci*, 2009. 29(14): p. 4498-4511.
- Lee, F.J., et al., *Cell*, 2002. 111(2): p. 219-30.
- Liu, F., et al., *Nature*, 2000. 403(6767): p. 274-80.

- Zou, S., et al., *J Neurosci*, 2005. 25(17): p. 4385-95.
- Chuang, D.M., C. Hough, and V.V. Senatorov, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. 45: p. 269-90.
- Hara, M.R., et al., *Nat Cell Biol*, 2005. 7(7): p. 665-74.
- Ishitani, R. and D.M. Chuang, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(18): p. 9937-41.
- Ishitani, R., et al., *Mol Pharmacol*, 1998. 53(4): p. 701-7.
- Sawa, A., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(21): p. 11669-74.
- Hara, M.R., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(10): p. 3887-9.
- Lakkaraju, A., et al., *J Biol Chem*, 2001. 276(34): p. 32000-7.
- Sakhi, S., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(16): p. 7525-9.
- Uberti, D., et al., *Eur J Neurosci*, 1998. 10(1): p. 246-54.
- Chen, R.W., et al., *J Neurosci*, 1999. 19(21): p. 9654-62.

5 . 主な発表論文等

無し

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

王 旻(WANG, Min) 東京大学・教養学部・特任助教

研究者番号: 10616329

(2) 研究協力者

石浦 章一(ISHIURA, Shoichi)

刘 芳(LIU, Fang)