

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670063

研究課題名(和文) ロテノンによる細胞外グルタミン酸濃度上昇に対する細胞応答とその破綻による細胞死

研究課題名(英文) Cell response of glutamate transporter against rotenone

研究代表者

古武 弥一郎 (Kotake, Yaichiro)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・准教授

研究者番号：20335649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外グルタミン酸濃度を調節するグルタミン酸トランスポーターが、曝露した毒性物質(ここでは、ミトコンドリア呼吸鎖阻害物質ロテノン)に対してどのように応答するかを調べるため、EAAT3のみを発現するC6細胞を用いて調べた。50 nMロテノンによりEAAT3タンパク質は時間依存的な発現上昇が認められたが、mRNAの上昇は認められなかった。他の結果と併せて考えると、ロテノンはEAAT3タンパク質を分解抑制することにより、細胞外グルタミン酸濃度を低下させることに寄与しており、このメカニズムが破綻するとグルタミン酸神経毒性が惹起されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glutamate causes neurotoxicity by releasing into the extracellular space in excess and activating glutamate receptors. Glutamate transporter EAAT3, an excitatory amino acid transporter, plays an important role in regulating extracellular glutamate concentration. In this study, we investigated the expression of EAAT3 protein induced by rotenone in rat C6 cells. We found that EAAT3 protein was increased by 50 nM rotenone. However, EAAT3 mRNA was not increased by rotenone. These results suggest the possibility that increased expression of EAAT3 protein is caused by the suppression of protein degradation. Combination of rotenone and an EAAT inhibitor dramatically increased extracellular glutamate concentration, before cell death occurs. These findings suggest that increased expression of EAAT3 protein by rotenone is one of the biological defense responses against glutamate neurotoxicity and that the rupture of this system leads to neuronal cell death.

研究分野：神経毒性学

キーワード：ロテノン グルタミン酸 グルタミン酸トランスポーター 細胞応答

## 1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は興奮性神経伝達物質として記憶や学習などの高次機能に重要な役割を持つ。神経終末に放出されたグルタミン酸は、神経細胞やグリア細胞の細胞膜上に存在するグルタミン酸トランスポーター (excitatory amino acid transporter : EAAT) により取り込まれ、神経伝達が終了する。神経終末から放出されたグルタミン酸はEAATにより低濃度に維持されているが、過剰に放出されるとグルタミン酸興奮毒性を引き起こすことが知られている。神経終末から放出されたグルタミン酸はグリア細胞や神経細胞膜上に存在するグルタミン酸トランスポーター (excitatory amino acid transporter : EAAT) により取り込まれる。EAATは5つのサブタイプを有し、そのうち神経細胞に分布しているのは主にEAAT3である。脳内のグルタミン酸濃度調節にはグリア細胞に発現しているEAAT1 (GLAST) やEAAT2 (GLT-1) が重要であることが知られているが、EAAT3はグリア型のEAAT発現が少ない周生期に多く発現しているという報告があり、グルタミン酸濃度調節に神経型のEAAT3も大きく関与していることが考えられる。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は、グルタミン酸興奮毒性と関連することや、EAATの発現量が変化することが知られており、細胞間隙のグルタミン酸調節を担うEAATの機能・発現制御は様々な神経変性疾患に密接に関与すると考えられている。また、これらの疾患において、細胞のエネルギー産生を担っているミトコンドリアの機能が低下することも報告されている<sup>3)</sup>。しかしながら、ミトコンドリア機能低下とグルタミン酸興奮毒性の関連に関する研究はほとんどなされていない。

また、EAATsの生理的役割については多数の報告が存在するが、化学物質が曝露された際のEAATsによる細胞応答とその破綻について

詳細なメカニズムを調べた報告は殆ど存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤であり、パーキンソン病モデル作製に汎用されるロテノンを用い、ロテノンが惹起する細胞外グルタミン酸濃度上昇に対する細胞応答とその適応破綻の分子メカニズムを調べ、ロテノンの新規神経毒性メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

EAAT3のみを発現する株化細胞としてラット C6 細胞を用いた。

### 1) 細胞外グルタミン酸濃度測定

細胞外グルタミン酸濃度を Amplex<sup>®</sup> red glutamic acid/glutamate oxidase assay kit を用いて測定した。培養細胞の培地を HEPES-buffered salt solution と交換後、EAAT 阻害剤である 500  $\mu$ M DL-*threo*-beta-benzyloxyaspartic acid (TBOA) で 30 分前処置し、ロテノン各時間曝露後、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した (Ex : 544 nm, Em : 590 nm)。

### 2) Western blotting

C6 細胞にロテノンを各時間曝露後、可溶化し、等量のタンパク質を SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に転写して各種抗体と反応させ目的タンパク質の検出を行った。

### 3) Real-time RT-PCR

C6 細胞にロテノンを各時間曝露後、細胞から RNA を抽出し逆転写酵素により cDNA を作製し、SYBR<sup>®</sup> Green 試薬を用いて real-time RT-PCR を行い、mRNA を定量した。

#### 4) プロテアソーム活性測定

C6 細胞にロテノンを経時的に曝露後、可溶化させたサンプルと各種基質 (caspase/PGPH 様活性 : Z-LLE-AMC, chymotrypsin 様活性 : Z-LLVY-AMC, trypsin 様活性 : Z-ARR-AMC) を 30 分反応させ、切断された基質が発する蛍光強度を測定した (Ex : 355 nm, Em : 460 nm)。

#### 4. 研究成果

##### 1) ロテノンによる細胞外グルタミン酸濃度に対する影響

C6 細胞にロテノンを曝露し、細胞外グルタミン酸濃度へ与える影響を検討した。その結果、50 nM ロテノン曝露により時間依存的に細胞外グルタミン酸濃度が上昇した。また、EAAT 阻害剤である 500  $\mu$ M TBOA 前処置後、各時間ロテノン曝露を行ったところ、3 時間、6 時間でロテノン単独曝露に比べて有意な細胞外グルタミン酸濃度上昇がみられた。これらの結果から、ロテノン曝露による細胞外グルタミン酸濃度上昇が明らかとなり、EAAT3 が細胞外から細胞内にグルタミン酸を取り込んでいることが示唆された。ロテノン毒性として知られる ATP 産生減少についても検討を行ったところ、50 nM ロテノンの 6 時間曝露では ATP の減少は認められなかった。

##### 2) ロテノンによる EAAT3 タンパク質発現変動

ロテノン曝露により細胞外グルタミン酸濃度が上昇したことから、グルタミン酸トランスポーターである EAAT3 タンパク質発現に変動がみられるか否か検討を行った。ウェスタンブロッティングの結果、50 nM ロテノン曝露により時間依存的に EAAT3 タンパク質発現上昇が認めら

れた。また、EAAT3 の多くは細胞膜に局在しているため、膜画分での EAAT3 発現検討も行った。その結果、膜画分でも時間依存的に EAAT3 タンパク質発現が上昇していた。これらの結果から、ロテノン曝露によるグルタミン酸濃度上昇に対する生体応答として EAAT3 タンパク質発現が上昇し、細胞外グルタミン酸を取り込んでいることが考えられる。

##### 3) ロテノンによる EAAT3 発現上昇メカニズムの検討

EAAT3 タンパク質発現上昇が EAAT3 タンパク質の新規合成促進によるものか、または EAAT3 の分解抑制によるものか検討を行った。まず 50 nM ロテノンを各時間曝露し、RNA 抽出を行い、real-time RT-PCR により EAAT3 mRNA を定量した。しかし、EAAT3 mRNA 発現上昇は認められなかった。この結果から、EAAT3 タンパク質発現上昇は、EAAT3 の分解抑制によるものであると考えられる。そこで、タンパク質合成阻害剤である 100  $\mu$ g/mL シクロヘキシミドで 30 分前処置することでタンパク質分解抑制を調べたところ、ロテノン曝露により 1 時間、3 時間で有意に EAAT3 の分解抑制が起こっていることが示された (Fig. 3b)。これらの結果から、EAAT3 タンパク質発現上昇は EAAT3 mRNA 発現上昇によるものではなく、EAAT3 タンパク質分解抑制によるものであることが示唆された。

##### 4) ロテノンによるプロテアソーム活性への影響

EAAT3 タンパク質分解経路の検討を行った。タンパク質の分解には大きくわけてユビキチンプロテアソーム系とオートファジーリソソーム系がある。そこでプロテアソーム阻害剤である 1  $\mu$ M MG132 と

リソソーム阻害剤である 100 nM bafilomycin を曝露し EAAT3 タンパク質発現を検討したところ、MG132 曝露で EAAT3 タンパク質発現が有意に上昇した。これより、EAAT3 の分解にはユビキチンプロテアソーム系が関与していることが示唆された。

そこで、1  $\mu$ M MG132 をポジティブコントロールとし、ロテノンがプロテアソーム活性に与える影響を検討した。その結果、50 nM ロテノンの 6 時間曝露まではプロテアソーム活性に影響を与えなかった。これらの結果から、ロテノンが EAAT3 のユビキチン化や脱ユビキチン化に影響を与えることで EAAT3 の分解抑制が生じている可能性が考えられる。

#### 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 11 件)

1. Miyara M\*, Umeda K\*, Ishida K, Sanoh S, Kotake Y, Ohta S. Protein extracts from cultured cells contain nonspecific serum albumin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 1164-1167 (2016). (\*equal contribution)(査読有) doi: 10.1080/09168451.2016.1151338.
2. Umeda K, Kotake Y, Miyara M, Ishida K, Sanoh S, Ohta S. Methoxychlor and fenvalerate induce neuronal death by reducing GluR2 expression. *J. Toxicol. Sci.* **41**, 255-264 (2016). (査読有) doi: 10.2131/jts.41.255.
3. Asanagi M, Yamada S, Hirata N, Itagaki H, Kotake Y, Sekino Y, Kanda Y. Tributyltin induces G2/M cell cycle arrest via NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase in human embryonic carcinoma cells. *J. Toxicol. Sci.* **41**, 207-215 (2016). (査読有) doi: 10.2131/jts.41.207.
4. Santoh M, Sanoh S, Takagi M, Ejiri Y, Kotake Y, Ohta S. Acetaminophen induces accumulation of functional rat CYP3A via polyubiquitination dysfunction. *Sci. Rep.* **6**, 21373 (2016). (査読有) doi: 10.1038/srep21373.
5. Takagi M, Sanoh S, Santoh M, Ejiri Y, Kotake Y, Ohta S. Detection of metabolic activation leading to drug-induced phospholipidosis in rat hepatocyte spheroids. *J. Toxicol. Sci.* **41**, 155-164 (2016). (査読有) doi: 10.2131/jts.41.155.
6. Yamada S, Kotake Y, Nakano M, Sekino Y, Kanda Y. Tributyltin induces mitochondrial fission through NAD-IDH dependent mitofusin degradation in human embryonic carcinoma cells. *Metallomics* **7**, 1240-1246 (2015). (査読有) doi: 10.1039/c5mt00033e.
7. Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica* **45**, 605-614 (2015). (査読有) doi: 10.3109/00498254.2015.1007112.
8. Kotake Y, Sekiya Y, Okuda K, Ohta S. Detection of a novel neurotoxic metabolite of Parkinson's disease-related neurotoxin, 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. *J. Toxicol. Sci.* **39**, 749-754 (2014). (査読有)

9. Yamada S, Kotake Y, Demizu Y, Kurihara M, Sekino Y, Kanda Y. NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Sci. Rep.* **4**, 5952 (2014). ( 査読有 ) doi: 10.1038/srep05952.

10. Sanoh S, Santoh M, Takagi M, Kanayama T, Sugihara K, Kotake Y, Ejiri Y, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Fluorometric assessment of acetaminophen-induced toxicity in rat hepatocyte spheroids seeded on micro-space cell culture plates. *Toxicol. In Vitro* **28**, 1176-1182 (2014). ( 査読有 ) doi: 10.1016/j.tiv.2014.05.007.

11. Contu VR, Kotake Y, Toyama T, Okuda K, Miyara M, Sakamoto S, Samizo S, Sanoh S, Kumagai Y, Ohta S. Endogenous neurotoxic dopamine derivative covalently binds to Parkinson's disease-associated ubiquitin C-terminal hydrolase L1 and alters its structure and function. *J. Neurochem.* **130**, 826-838 (2014). ( 査読有 ) doi: 10.1111/jnc.12762.

〔学会発表〕(計4件)

1. 菅田和子, 古武弥一郎, 足立 暁, 太田 茂「ロテノン曝露により放出された因子が大脳皮質神経細胞に与える影響」

日本薬学会第136年会、2016年3月27-29日  
横浜

2. 石田慶士, 古武弥一郎, 青木香織、瀧下 智子、木村朋紀、諫田泰成、太田 茂「低濃度トリブチルスズによるニューロン脆弱化機構の解明」

メタルバイオサイエンス研究会 2015、2015年8月27-28日 名古屋

3. 石田慶士, 古武弥一郎, 青木香織、瀧下

智子、木村朋紀、諫田泰成、太田 茂「有機スズ神経毒性に關与する核呼吸因子-1 (NRF-1) 阻害機構の解明」

第42回日本毒性学会学術年会 2015年6月29-7月1日 金沢

4. 足立 暁、古武弥一郎、山本智美、菅田和子、太田 茂「ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤による細胞外グルタミン酸上昇とその細胞応答」

第53回日本薬学会・日本薬剤師会中国四国支部学術大会 2014年11月 広島

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

古武 弥一郎 (KOTAKE YAICHIRO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：20335649