

機関番号：3 2 6 4 3

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：2 1 7 9 0 2 5 1

研究課題名 (和文) 神経細胞内グルタチオン濃度調節因子の探索

研究課題名 (英文) Search of regulatory factors in neural glutathione concentration

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 (和文)：パーキンソン病患者死後脳でもみられるように、抗酸化物質であるグルタチオンが減少すると神経変性が起こる。グルタチオン合成の材料となるシステインを、EAAC1 が細胞外から直接取り込んでグルタチオンを合成している。研究代表者は EAAC1 の阻害因子 GTRAP3-18 を標的タンパク質として神経細胞内のグルタチオン量を変化させる生体内物質もしくは合成化合物の探索を行うにあたり、カギとなる情報として GTRAP3-18 がリン酸化されることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：Glutathione is an essential reductant which protects cells and is reduced in neurodegenerative disorders such as a Parkinson's disease. Neurons rely mainly on extracellular cysteine for glutathione synthesis and a cysteine transporter termed *excitatory amino acid carrier-1* (EAAC1). I previously showed GTRAP3-18 (*glutamate transport associated protein for EAAC1*) to interact with EAAC1 and thereby regulate neuronal glutathione levels. In this time, I indicated the phosphorylation of GTRAP3-18, which is a key of information to search regulatory factors in neural glutathione concentration.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：脳・神経、脳神経疾患、ストレス

## 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の一つである。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。実際に、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脳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ている。神経細胞は他の細胞とは異なりシスチンを細胞外から取り込む機構はなく、細胞外のシステイ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 (Neurosci Lett 1996; 219: 211-4)。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、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。

## 2. 研究の目的

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に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 がシステインを細胞内に取り込む機能が発見された。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子工学的に作成した EAAC1 欠損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生成を障害し、酸化ストレスと神経変性を引き起こすことが示された (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。

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 のシステイ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 (Nature, 2001; 410: 84-88)。EAAC1 のグルタミン酸輸送とシステイ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テイン輸送能力にどのように影響するかは全く不明であった。

申請者は最近、EAAC1 のシステイン輸送における GTRAP3-18 の機能を解明することに成功した。これまでにクローニングされている 5 種類の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、EAAC1 によるシステインの取り込みを GTRAP3-18 が抑制することを見出した。更に最近になり、神経細胞の初代培養系およびマウス脳室内投与系の実験を行い、神経細胞内でも実際に GTRAP3-18 が EAAC1 によるシステインの取り込みを抑制する因子であることを証明した。

すなわち、GTRAP3-18 が先に述べたような EAAC1 のシステイン輸送機能を阻害するタンパク質だったのである。しかしながら、GTRAP3-18 の調節機構はこれまで全くの不明である。そこで本研究は、GTRAP3-18 タンパク質を標的タンパク質として、EAAC1 機能を促進もしくは抑制する生体内もしくは合成化合物を探索することにより、神経細胞内のグルタチオン量を変化させるものを見出し、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) 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確認した。
- (3) リン酸化セリン・リン酸化スレオニン・リン酸化チロシンに対する特異抗体を用いて、HEK293 細胞内の GTRAP3-18 のリン酸化状態を、ウェスタンブロット解析により調べた。
- (4) ラット小脳初代神経培養細胞内の GTRAP3-18 のリン酸化状態を、リン酸化

セリン・リン酸化スレオニン・リン酸化チロシンに対する特異抗体を用いたウェスタンブロット解析により調べた。

- (5) スクリーニングを行うためのアッセイ方法は簡便かつ多検体での測定が可能でなければならない。そこで96穴プレートを使用することとし、細胞を96穴プレートにて培養し、細胞内のグルタチオンと効率よく反応する蛍光物質 ThioGlo-1 を用いて、接着細胞のまま蛍光プレートリーダーにて蛍光強度を測定し、得られた蛍光強度よりグルタチオンの濃度を算出した。
- (6) スクリーニングによりグルタチオンの濃度が変化したものに関して、高速液体クロマトグラフィー検出システムを用いて、システイ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、再度、システインおよびグルタチオンの濃度の正確な定量を行った。
- (7) 既知キナーゼ阻害物質ライブラリー（予め96穴プレートに既知のキナーゼ阻害物質が分注されている）を用いて、HEK293細胞内のグルタチオンの濃度を変化させるキナーゼの予備的な同定を試みた。

#### 4. 研究成果

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、はじめに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確認を行った。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EAAC1に対して抑制的に制御するために必要な因子の探索を行うにあたり、まず、GTRAP3-18が何らかの因子により活性調節を受けている可能性を調べるために、GTRAP3-18自身が翻訳後修飾されているか否かの検討を行った。翻訳後修飾の中でも、リン酸化修飾に着目した。リン酸化セリン・リン酸化スレオニン・リン酸化チロシンに対する特異抗体を用いて、HEK293細胞内GTRAP3-18のリン酸化状態を調べた。その結果、リン酸化スレオニン・リン酸化チロシンに対する抗体の反応性と比較すると、リン酸化セリンに対して

強い反応性を示すことを見出すことに成功した。つまり、GTRAP3-18自身の翻訳後修飾として、リン酸基修飾がみられることを明らかにすることができた。この結果より、EAAC1に対してGTRAP3-18が抑制的に制御する方法の一つがリン酸化反応である可能性が示された。

次に、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際に、リン酸化されているか否かについて、初代神経培養細胞系を用いて検討を行った。まず、グルタミン酸トランスポーターの阻害剤を用いて、初代神経培養細胞内のグルタチオンの濃度がEAAC1のみに依存していることを確認した。そして、初代神経培養細胞内のGTRAP3-18のリン酸化状態をリン酸化セリン・リン酸化スレオニン・リン酸化チロシンに対する特異抗体を用いて調べた。その結果、リン酸化スレオニン・リン酸化チロシンに対する抗原抗体反応と比較すると、HEK293細胞の時と同様、リン酸化セリンに対して強い反応性を示した。つまり、実際の神経細胞においても、GTRAP3-18自身の翻訳後修飾として、リン酸基の修飾がみられることを明らかにすることができた。この結果より、神経細胞において、GTRAP3-18がリン酸化反応を介してEAAC1を抑制的に制御している可能性が示された。

そこでGTRAP3-18によるシステインの取り込み制御機構にセリン・スレオニンキナーゼの関与が予想されたので、どのようなキナーゼが関与しているのかを既知キナーゼ阻害物質ライブラリーを用いて、細胞内グルタチオン濃度に影響を与える物質のスクリーニングを行った。しかしながら、推奨される阻害剤の濃度で処理したときのキナーゼの活性を実際に調べてみると、その阻害効果が弱かったりと阻害剤ごとにHEK293細胞へ影響を与える濃度や処理時間の設定が難しいことがわかった。そのため、現在でもHEK293細胞内グルタチオン濃度に影響を与える阻害剤の適切な濃度や処理時間の検討を行っている。

#### 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1件）  
青山晃治、渡部正彦、中木敏夫、Modulation of neuronal glutathione synthesis by EAAC1 and its interacting protein GTRAP3-18, Amino Acids、査読有、In Press.

〔学会発表〕（計1件）  
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の増加、第84回日本薬理学会年会、2011年3月22日、パシフィコ横浜

## 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：