

機関番号：32713

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791152

研究課題名（和文）

sertraline の endocytosis 阻害作用に求めるうつ病の原因因子

研究課題名（英文）

Inhibition of endocytosis by sertraline leads to causal factors of depression

研究代表者

高橋 清文 (TAKAHASHI KIYOFUMI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：70398965

研究成果の概要（和文）：抗うつ薬のセルトラリン（sertraline）にはエンドサイトーシスの小胞分離に機能する dynamin の GTPase を阻害する作用があり、dynamin 依存的なエンドサイトーシスを強力に遮断する。その作用機序は、コイル状オリゴマー形成時の dynamin 間の相互作用を阻害せず、GTPase の基質である GTP と脂質膜に対して混合型非拮抗の様式で阻害していることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Sertraline, an antidepressant belonging to selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), inhibits GTPase activity of dynamin which plays an important role in membrane fission on endocytosis. It was revealed that sertraline is a mixed-type inhibitor of the GTPase activity with respect to both guanosine 5'-triphosphate (GTP) and 3-*sn*-phosphatidyl-L-serine (PS)-liposome, and does not inhibit dynamin self-assembly for oligomerization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：脳・神経、向精神薬、エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

選択的セロトニン再取り込み阻害薬（selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI）はうつ病の第一選択薬として重用される薬剤群である。その作用機序はうつ病の原因因子とされるセロトニンの輸送体に特異的なアンタゴニストとして機能するといわれているが、SSRI ひとつ、セルトラリンにはエンドサイトーシスの小胞分離に機能する dynamin の GTPase 活性を阻害する働きが認められた [Otomo, M. *et al.*, Biol. Pharm.

Bull. 2008]。

2. 研究の目的

セルトラリンによる dynamin 阻害の作用機序を分子生物学的に解明し、その抗うつメカニズムを捉える。

3. 研究の方法

エンドサイトーシスは細胞外の物質を細胞内に取り込む生命現象の総称で、神経伝達物質の一部も同じメカニズムに制御される。

我々の着目した dynamin は、自身の GTPase を用いてエンドサイトーシスにおける小胞分離に機能するタンパク質である (図 1 A)。dynamin は GTPase による GTP の加水分解、膜結合、相互作用といった機能領域が運動することでエンドサイトーシスを表している (図 1 A、B)。

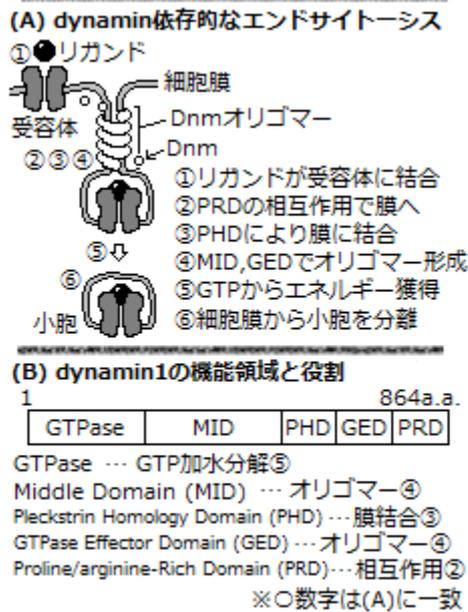


図1 dynaminとエンドサイトーシス

よって、以下の方法により、機能ごとにセルトラリンとの関連を調査する。

(1) エンドサイトーシスについて：dynamin 依存的なエンドサイトーシスマーカーであるトランスフェリンの蛍光誘導体を用いて、その取り込みを培養細胞により観察する。

(2) GTP 加水分解について：関与する領域は GTPase domain である。リコンビナントの精製 dynamin を用いて、その加水分解により遊離したリン酸を検出する GTPase assay を行う。必要があればラインウェーバー・バークの式を用いた酵素反応速度論により検討する。

(3) 脂質膜結合について：関与する領域は pleckstrin homology domain (PHD) である。物質間の結合・解離を求める表面プラズモン共鳴測定により脂質膜 (PS-liposome) と dynamin の結合を調べる。脂質膜は GTPase の基質のひとつであるため、(1)と同様、酵素反応速度論に準じた GTPase assay を行い、阻害様式を検討する。

(4) dynamin 相互作用について：関与する領域は、middle domain (MID) および GTPase effector domain (GED) である。トランスフェクションにより形質転換した培養細胞をセルトラリンで処理、その抽出液を用いる免

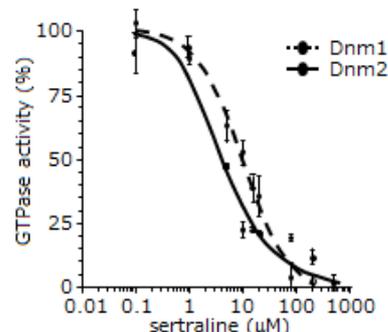
疫沈降法により、相互作用の影響を検討する。また、タンパク質の複合体を崩さずに泳動する Blue Native PAGE を経て、切り出したゲル片を SDS-PAGE により二次元展開し、本来の大きさのタンパク質として分離、dynamin の形成するオリゴマーを検出しその影響を検討する。

なお、図 1 B 中の proline/arginine-rich domain (PRD) についてはプロリンリッチドメインと相互作用する Src homology 3 domain (SH3) を持つ他のタンパク質の存在が必要であること、大友らの解析系には dynamin 以外のタンパク質を用いていないことから、本研究における検討範囲外と考えた。

4. 研究成果

本研究の礎である大友らの報告に際しては、向精神薬を調査対象としたこともあり、神経特異的に発現する dynamin1 を対象に GTPase assay を施行した。本研究では、体組織全体で発現する dynamin2 の GTPase に対して、セルトラリンが同様の効果を示すことも新たに分かった (図 2 A)。セルトラリンの阻害効果は dynamin のアイソフォームに及ぶと考えられる。

(A) セルトラリンによる dynamin GTPase の阻害曲線



(B) 培養細胞中の dynamin アイソフォーム

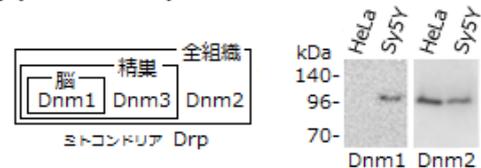


図2 dynamin アイソフォームとセルトラリン

(1) エンドサイトーシスについて：ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞とヒト神経芽腫由来の SH-Sy5Y 細胞における dynamin1、dynamin2 の発現は、体組織での発現分布と同じであった (図 2 B)。そこで、これらの培養細胞を用いて、セルトラリンのエンドサイトーシスへの影響を観察したところ、両細胞で dynamin 依存的なエンドサイトーシスの対象であるトランスフェリンの抑制が観察できた (図 3)。



赤色光：トランスフェリン、青色光：核

図3 培養細胞のセルトラリン処理

GTPase assay で得られたセルトラリンによる dynamin GTPase の阻害は、培養細胞でもエンドサイトーシスの抑制として観察することができる。では、セルトラリンはどのような機序で dynamin を阻害しているのだろうか。dynamin の主な機能、(2)GTPase、(3)脂質膜結合、(4) dynamin 間の相互作用についてそれぞれ検討した。

(2)GTPase について：酵素反応速度論より、セルトラリンは dynamin GTPase の基質、GTP に対して混合型非拮抗阻害の様式を示した (図4)。

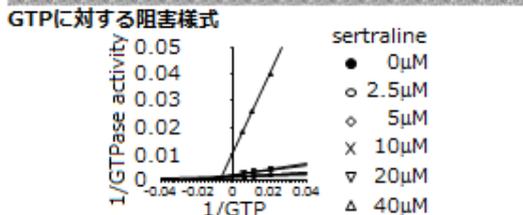
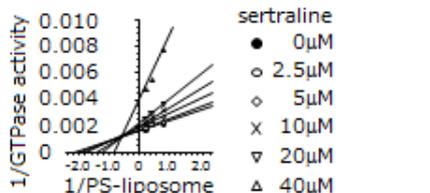


図4 セルトラリンとGTP

(3)脂質膜結合について：酵素反応速度論より、セルトラリンは dynamin GTPase の基質、脂質膜に対して混合型非拮抗阻害の様式を示した (図5 A)。また表面プラズモン共鳴測定では、セルトラリンの存在が dynamin と脂質膜の結合には殆ど影響を与えなかった (図5 B)。

(A) 脂質膜に対する阻害様式



(B) 表面プラズモン共鳴測定

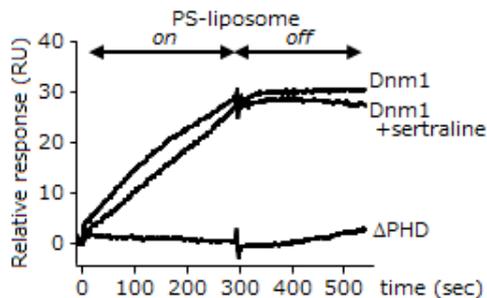


図5 セルトラリンと脂質膜

(4) dynamin 相互作用について：Flag および Myc タグ付きの dynamin を発現させた HeLa 細胞をセルトラリン濃度別に処理し、タンパク質を回収、免疫沈降により dynamin 相互作用を確認した。100mM のセルトラリン処理でも、dynamin の相互作用に異常は見られなかった。

また、二次元電気泳動による結果から、セルトラリンがオリゴマー形成にも影響を与えないことも分かった。(以上、(4)の結果図表については未発表)

以上(1)～(4)の結果より、セルトラリンは dynamin 相互作用に影響せず、GTP および脂質膜に対して混合型の非拮抗阻害剤として dynamin の GTPase を阻害しているものと推測される。

加えて、MID 中の 1 残基が置換された変異体による研究も進めている。この変異体では野生型に比べ単量体になりやすく、脂質膜の無い条件下での GTPase 活性が保たれる野生型と異なり大きく減少した。以上のことから脂質膜により依存したタイプの点変異であると考えている。セルトラリンによる GTPase 阻害は、この変異体に対してより強力に働くことが示されているが、我々はむしろ“野生型で残る脂質膜無しでの GTPase 活性”を阻害出来ないものと考えている。すなわち、セルトラリンの阻害は脂質膜が基質となる小胞分離の工程にこそ関与している可能性がある。

同様に dynamin 阻害作用を有していた SSRI のフルボキサミンが、脂質膜に対する競合阻害を示したこと [Otomo, M. et al., Biol. Pharm. Bull. 2008] は非常に興味深い。セロトニンおよびその輸送体が dynamin 依存的なエンドサイトーシスの対象となる場合、セルトラリンやフルボキサミンは輸送体のアンタゴニストとしてだけではなく、エンドサイトーシスによる再取り込みのメカニズムそのものを抑制している可能性も考えられ、副作用の軽減や創薬に向けての新たな研究課題となるだろう。

セルトラリンと dynamin の関係が明らかになれば、基礎系学問からのアプローチに乏しいうつ病に新たな視野を与えられる。本研究課題の遂行により、dynamin の各機能領域に対するセルトラリンの作用が解明できた。しかし、詳細な干渉部位については未解明である。今後、結晶構造解析などを交え、より具体的な作用機序の解明が求められる。

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 1 件)

① Kiyofumi Takahashi, Hiroshi Miyoshi, Masahiro Otomo, Kenichi Osada, Noboru Yamaguchi, Hideki Nakashima. Suppression of dynamin GTPase activity by sertraline leads to inhibition of dynamin-dependent endocytosis. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* **391**(1) 382-387 (2010) 査読有り

〔学会発表〕 (計 3 件)

① Kiyofumi Takahashi. Suppression of dynamin GTPase activity by sertraline inhibits dynamin-dependent endocytosis. Francis Crick Symposium on Neuroscience held at Cold Spring Harbor Conferences Asia (12-17 April 2010) Suzhou, China

② 高橋清文、sertraline は dynamin の GTPase 活性を抑制し dynamin 依存的な endocytosis を阻害する、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 9～12 日、横浜市

③ 高橋清文、Sertraline inhibits endocytosis *via* suppression for dynamin GTPase.、第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会合同年会、第 1 回アジア神経精神薬理学会、平成 21 年 11 月 13～15 日、京都市

〔その他〕

ホームページ等

<http://mariannapsycho.web.fc2.com/kenkyuu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 清文 (TAKAHASHI KIYOFUMI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：70398965

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

三好 洋 (MIYOSHI HIROSHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：80322519