

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19500341

研究課題名(和文) 中性アミノ酸トランスポーターの制御分子開発と機能解析

研究課題名(英文) Analysis and generation of functional molecules to modulate neutral amino acid transporters

研究代表者

茂里 康 (SHIGERI YASUSHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究センター・主幹研究員

研究者番号：90357187

研究成果の概要(和文): 中性アミノ酸トランスポーターの一種であるアラニン、セリン、システイン輸送機構(alanine-serine-cysteine transporter, ASCT1, 2)の阻害剤スクリーニングのためのハイスループットアッセイ系の開発のために、内因性のASCT1, 2が高発現していないホスト細胞を検索した。そこでCHO細胞、HEK293細胞、3T3細胞等を用いて遺伝子レベル、タンパクレベルでの実験を実施したが、内因性のASCT1, 2の発現量が高く、ASCT1, 2のアッセイ用のホスト細胞としては不向きであることがわかった。しかしヒト型、ラット型ASCT1, 2の遺伝子をクローニングし、哺乳類及びアフリカツメガエル卵母発現系に使用できるベクターに組み込みを完了した。

研究成果の概要(英文): Alanine-serine-cysteine transporters (ASCT1, 2) are neutral amino acids transporters. Their representative substrates are alanine, serine and cysteine. Since there is no specific inhibitors or substrates for ASCT1 and ASCT2, their physiological functions are quite mystery. To develop their specific compounds to modulate their functions, high-throughput screening is essential. Therefore, we made two approaches as follows. First, we looked for host cells with lower level of endogenous ASCT1 or ASCT2. We checked CHO cells, HEK293 cells, 3T3 cells and other cells. But all of the cells that we examined showed higher level of ASCTs expression. Second, we tried the cloning of human and rat type ASCTs. Cloned ASCTs were integrated into the expression vectors for their expressions in mammalian cells and Xenopus oocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学、神経化学・神経薬理学
科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学、神経薬理学
キーワード：トランスポーター、阻害剤、神経伝達物質と受容体

1. 研究開始当初の背景

神経伝達に関わる物質輸送は脳の高次機能に密接に関わっており、その機構の解明は重要課題の一つである。中でもアミノ酸は神経伝達や受容体活性制御の役割を担っているため、その合成・受容・輸送・代謝の全体像の解明は重要である。アミノ酸のトランスポーターは古くから薬理的に分類され、近年ではグルタミン酸や GABA などの神経伝達物質のトランスポーターについての研究が著しく進展したが、それ以外のアミノ酸トランスポーターに関しては特異的な基質や阻害剤の開発が立ち後れているため未解明の部分が多い。そこで、薬理学・分子生物学的に分類されてはいるものの、その生理機能については未解明な部分が多いアラニン、セリン、システイン輸送機構 (alanine-serine-cysteine transporter, ASCT) について注目した。

2. 研究の目的

ASCT は、グルタミン酸トランスポーター (excitatory amino acid transporter, EAAT) のホモロジー蛋白検索によって、比較的早い時期に 2 つのサブタイプ遺伝子 (ASCT1, ASCT2) が単離され EAAT とスーパーファミリーを形成していることが知られていた。ASCT の生理的役割として、例えばセリン生合成酵素と ASCT1 はグリア細胞の局所にほぼ一致して存在する事から、グリア細胞由来のセリンがグリア細胞及び神経細胞上に存在する ASCT1 を介して神経細胞に供給される可能性が考えられている。この事からも ASCT によるアミノ酸輸送の制御は神経細胞の恒常性と機能の維持に大きく寄与していることが推測される。しかし、これらを実験的に解明するにはトランスポーターに選択的に作用する分子や特異的に阻害する分子が不可欠であるが、存在しないため直接的な証明はされていない。トランスポーターや受容体の解析には個体レベルでのアプローチ (トランスジェニック、ノックアウトマウス、病態モデル動物)、分子生物学を用いた分子レベルでのアプローチ (部位特異的変位等) が考えられるが、いずれの場合においても特異的に作用する制御分子 (特異的な基質・阻害剤) は不可欠である。ASCT の機能研究が立ち遅れている原因の一つは、選択的な基質や阻害剤がほとんど開発されていないことである。唯一 ASCT2 に関してセリン、システインのベンジ

ルエーテルが合成され、基質結合に伴うリーク電流を抑制したという報告があるが、基質取り込みそのものに対する影響は報告されておらず、さらに ASCT1 や EAAT など他のトランスポーターへの薬理学的作用は検討されていない。そこで、ASCT に特異的な阻害剤開発のためのスクリーニング系の構築を試みた。

3. 研究の方法

ASCT1, ASCT2 のアッセイ系の確立のために二つの方法でアプローチを行った。第一に、国内外からヒト ASCT1, 2 のクローンを供与して頂き、その配列の確認と発現を行った。また阻害剤アッセイ系に最適な細胞を選ぶために、内因性の ASCT1, 2 を高発現していない宿主細胞を探索した。

4. 研究成果

(1) ASCT1, 2 の特異的発現系を確立するために、横浜市立大学山本敏文先生よりラット型 ASCT1, 2 の遺伝子、米国ピッツバーク大学 Susan Amara 教授、米国オレゴン健康科学大学 David Kabat 教授よりヒト型 ASCT1, 2 の遺伝子を供与していただいた。そこで実際、その遺伝子配列を確認のため読んだところ、ラット型は文献と同一の遺伝子配列を持っていた。しかし、米国オレゴン健康科学大学より供与していただいたヒト ASCT1, 2 のクローンの遺伝子配列を確認したところ、ヒト ASCT2 クローンは C 末端側に欠損が認められたが ASCT1 クローンは報告されていた配列と同じ配列であった。そこで PCR により、ヒト型 ASCT2 の遺伝子を再度クローニングした。次に、ヒト型及びラット型 ASCT1, 2 の遺伝子を動物細胞、アフリカツメガエル卵母細胞発現用のベクターにそれぞれ挿入し、動物細胞及び卵母細胞での ASCT1, 2 の発現を試みたが、基質取り込みが数倍程度しか上昇しなかった。数倍程度ではハイスループットスクリーニングには難しいということが判明した。

(2) ASCT1, 2 の阻害剤スクリーニング等のためのハイスループットアッセイ系の開発のためには、内因性の ASCT1, 2 が高発現していない宿主細胞を選ぶ必要がある。そこで平成 19 年度はガン化されたヒト細胞である HEK293 細胞を用いて ASCT1, 2 の発現を調べたところ、HEK293 細胞には内因性の ASCT1, 2 が比較的高く発現していることが認められ、

ASCT1, 2の阻害剤スクリーニング系の宿主細胞には不向きであることが判明した。そこで最適な宿主細胞系を新たに探索するために、平成20年度はチャニーズハムスターの培養細胞であるCHO細胞等を用いて実験を実施した。しかし同様に、いずれの培養細胞でも内因性のASCT1, 2の発現量が強く、ASCT1, 2のアッセイ用の宿主細胞としては不向きであることがわかった。平成21年度は、3T3細胞等で実験を行ったが、やはり内因性の中性アミノ酸の取り込み量が多かった。そこで実際にASCT1, 2の発現量を調べるために、ASCT1, 2のペプチド断片を化学合成し、抗体を作成しウエスタンブロットを行い内因性のASCT1, 2の発現量を調べた。その結果、CHO細胞、HEK293細胞、3T3細胞もいずれもタンパクレベルで内因性のASCT1, 2の発現が認められ、ハイスループットアッセイ系には残念ながら用いることができないことが判明した。唯一、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いてASCT1, 2のアッセイは用いることができるので、今後電気生理学的アッセイ系を併用してスクリーニングを実施する必要があることが判明した。さらに平成21年度に、東京大学生物機能化合物ライブラリーからランダム化合物ライブラリーの供与を受け、スクリーニング実施に向けてインフラ整備を行った。

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6件)

二村貴樹、杉山康憲、末吉紀行、茂里康、石田敦彦、亀下勇、A minimum size homolog of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV naturally occurring in zebrafish, Journal of Biochemistry、査読有、印刷中、2010

茂里康、GABAトランスポーター(GAT1, BGT1, GAT2, GAT3, VGAT)の構造と機能、生体の科学、査読有、印刷中、2010

末吉紀行、二村貴樹、石田敦彦、谷口隆信、吉村征浩、伊東信、茂里康、亀下勇、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP) is indispensable for normal embryogenesis in zebrafish, Danio rerio, Archives of Biochemistry and Biophysics、査読有、Vol.488、2009、pp48-59

石田敦彦、茂里康、亀下勇、Negative regulation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: physiological and pharmacological significance of protein phosphatases、British Journal of Pharmacology、Vol.154、2008、pp729-740

茂里康、GABAトランスポーターの役割、Clinical neuroscience、査読有、Vol.26、2008、pp1099-1101

末吉紀行、高尾俊彦、二村貴樹、杉山康憲、沼野琢旬、茂里康、谷口隆信、亀下勇、石田敦彦、Inhibitors of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase family (CaMKP and CaMKP-N) Biochem Biophys Research Communications、査読有、Vol.363、2007、pp715-721

[学会発表](計5件)

竹中康浩、山口篤、茂里康、Secreted and Thermostable Luciferases from the Marine Copepod Crustacean, Metridia pacifica、International Symposium Marine Genomics、2009年12月16日、沖縄

地頭所真美子、七里元督、柴田貴広、内田浩二、茂里康、吉田康一、未病を評価するバイオマーカー開発に向けて、フォーラム2009：衛生薬学・環境トキシコロジー、2009年11月6日、沖縄

絹見朋也、木全順子、茂里康、吉田康一、二木鋭雄、Detection of artificially oxidized cysteine residues in peroxiredoxin6 by two-dimensional gel electrophoresis and capillary HPLC-ESI MS Biomarkers of Oxidative Stress in Health and Diseases、HSSRC/AIST-NIEHS/NIH Joint International Symposium、2008年1月17日、大阪

沼野琢旬、末吉紀行、高尾俊彦、石田敦彦、

谷口隆信、二村貴樹、杉山康憲、茂里康、亀下勇、Ca²⁺/CaM 依存性プロテインキナーゼホスファターゼ(CaMKP)阻害剤のスクリーニング、第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 11 日、横浜(パシフィコ横浜)

吉田康一、茂里康、二木鋭雄、Biomarkers of lipid peroxidation; hydroxyoctadecadienoic acid and hydroxycholesterol、BERM 11 (11th International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials、2007 年 10 月 31 日、つくば)

〔その他〕
ホームページ等
<http://unit.aist.go.jp/htrc/soshiki/shigeri.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂里 康 (SHIGERI YASUSHI)
独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究センター・主幹研究員
研究者番号：90357187

(2) 研究分担者

酒井 隆一 (SAKAI RYUICHI)
北海道大学・水産学部・教授
研究者番号：20265721

(3) 連携研究者

()

研究者番号：