

機関番号：32713

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591380

研究課題名 (和文) 新規抗うつ薬結合蛋白質 Dynamin-1 過剰発現マウスの
抗うつ薬投与後の行動解析

研究課題名 (英文) The investigation to Dynamin-1 for new antidepressants binding protein

研究代表者

長田 賢一 (OSADA KENICHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：20233504

研究成果の概要 (和文)：

Dynamin (Dyn)は神経細胞において神経伝達物質のシナプス小胞の再吸収に作用している。dynamine I (Dyn 1) の L-phosphatidylserine (PS) 結合 相同領域に SSRI であるフルボキサミンは結合し、PS と競合的に GTP 活性を抑制するが、一方サートラリンは GTP と PS の両方依存的に GTP 活性を抑制した。我々はサートラリンは Dyn 1 の神経伝達物質のエンドサイトーシスを GTP と PS の両方依存的に抑制することを発見した。この作用は Dyn 1 と同様に Dyn 2 にも認められた。サートラリンの GTP 活性を抑制作用は、トランスフェリンのエンドサイトーシスも抑制し、GTP 活性欠乏 Dyn 1 K44A 変異体では認められないため、サートラリンの作用は GTP 活性を介して起こっていることが判明した。

研究成果の概要 (英文)：

Dynamin (Dyn) 1 plays a role in recycling of synaptic vesicles, and thus in nervous system function. Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), may compete with L-phosphatidylserine (PS) for binding to the pleckstrin homology domain of dynamine I (Dyn 1) GTPase. On the other hand, sertraline was a mixed type inhibitor with respect to both GTP and PS. We showed that sertraline is a mixed-type inhibitor of Dyn 1 with respect to both GTP and L- α -phosphatidyl-L-serine (PS) in vitro, and we suggested that it may regulate the neurotransmitter transport by modulating synaptic vesicle endocytosis via inhibition of Dyn 1 GTPase. GTPase assay showed that sertraline inhibited Dyn 2 as well as Dyn 1. Therefore, the effect of sertraline on endocytosis was mediated by Dyn 2, at least in HeLa cells, as well as by Dyn 1 in cell lines that express it. Moreover, the inhibition mechanism of transferrin (Tf) uptake by sertraline differed from that in cells expressing Dyn 1 K44A, a GTP binding-defective variant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：SNRI, dynamin, GTPase

1. 研究開始当初の背景

抗うつ薬の作用機序は、現在までの仮説では矛盾が多く、臨床と基礎研究が大きく解離している。その矛盾を解決するため、申請者らは、新たな発想で抗うつ薬結合蛋白の概念を提唱し、現在までプロテオミクス手法を用い **dynamin-1** が抗うつ薬結合蛋白であることを突き止めた。

2. 研究の目的

申請者らは、現在までプロテオミクス手法を用い **dynamin-1** が抗うつ薬結合蛋白であることを着き止めた。今回は、さらに発展させ、**dynamin-1** の GTPase 活性を中心とした機能解析と抗うつ作用との関連の検討を行う。また、**dynamin-1** と抗うつ薬の細胞内での結合している証明を行い、**dynamin-1** がセロトニンなどの神経伝達物質に与える影響を検討する。抗うつ薬が **dynamin-1** に及ぼす機能について解析する。

3. 研究の方法

クローニングとプラスミドの発現は PCR 法により行った。**dynamin-1** の GTPase 活性は Malachite Green GTPase assay 法により行った。神経伝達物質のエンドサイトーシスの機能を測定するため、Alexa-CTB、Alexa-Tf を用い共焦点顕微鏡にて測定した。

4. 研究成果

プロテオミクス手法を用いて同定した抗うつ薬結合蛋白の一つが、**dynamin I** であった。**Dynamin** は細胞膜に存在し、トランスポーターを介して、シナプス間隙の神経伝達物質を再吸収し、シナプス小胞の形成に関与する 96kDa GTPase である。**Dynamin I** は脳にのみ存在している。また、プレシナプスでの神経伝達物質分泌に関与している重要な蛋白質であることが、近年の研究で証明された。**Dynamin I** は開口分泌時のカルシウムのセンサーの働きをしていることが知られている。

この **dynamin I** の GTPase 活性と抗うつ薬である SSRI など向精神病薬との関係を検討した。**dynamin I** の GTPase 活性を SSRI であるサートラリン、フルボキサミンが著明に抑制することが判明し報告した。フルボキサミンの **dynamin I** に対する GTPase 活性阻害は、GTP に対しては非競合的阻害であるのに対して、L-phosphatidylserine(PS) に対しては、競合的阻害を示した。一方、サートラリンは GTP、PS に対して混合的阻害を示した。サートラリンは **dynamin I** だけでなく **dynamin2** の GTPase 活性の阻害も認めた。**Dynamin** は開口分泌に関与しているだけでなく、**transferin** のエンドサイトーシスに関

与していることが判明した。**dynamin I K44A** は GTPase 活性サイトの変異であり、この部位には G T P 結合部位がある。**dynamin I K44A** 変異により、エンドサイトーシスが抑制された。また、サートラリンは **dynamin I** のエンドサイトーシスを阻害したが、サートラリンの阻害機序は **dynamin I K44A** による機序とは別であることが判明した。

この **dynamin I** の GTPase 活性と抗うつ薬である SSRI など向精神病薬との関係を検討した。**dynamin I** の GTPase 活性を SSRI であるサートラリン、フルボキサミンが著明に抑制することが判明し報告した。フルボキサミンの **dynamin I** に対する GTPase 活性阻害は、GTP に対しては非競合的阻害であるのに対して、L-phosphatidylserine(PS) に対しては、競合的阻害を示した。一方、サートラリンは GTP、PS に対して混合的阻害を示した。サートラリンは **dynamin I** だけでなく **dynamin2** の GTPase 活性の阻害も認めた。**Dynamin** は開口分泌に関与しているだけでなく、**transferin** のエンドサイトーシスに関与していることが判明した。**dynamin I K44A** は GTPase 活性サイトの変異であり、この部位には G T P 結合部位がある。**dynamin I K44A** 変異により、エンドサイトーシスが抑制された。また、サートラリンは **dynamin I** のエンドサイトーシスを阻害したが、サートラリンの阻害機序は **dynamin I K44A** による機序とは別であることが判明した。

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 13 件)

- ① Osada K, Oka H, Isomura T, Nakamura I, Tominaga K, Takahashi S, Kojima A, Nishioka K. Development of the Japanese version of the Fibromyalgia Impact Questionnaire (JFIQ): The assessments of reliability and validity, Int. J. Rheumatol Dis, 2011; 14(1): 74-80. (査読有)
- ② Osada K, Ogawa Y, Haga T, Nakano M, Tanaka D, Sasuga Y, Asakura M, Yamaguchi N. Chronic trifluoperazine treatment increased P-glycoprotein in the rat brain. J. St. Marianna Univ 2010; 38(1): 7-13. (査読有)
- ③ Takahashi K, Miyoshi H, Otomo M, Osada K, Yamaguchi N, Nakashima H. Suppression of dynamin GTPase activity

by sertraline leads to inhibition of dynamin-dependent endocytosis. Biochem Bio Res Comm 2010; 391: 382-387. (査読有)

- ④ Nakano M, Osada K, Misonoo A, Fujiwara K, Takahashi M, Ogawa Y, Haga T, Kanai S, Tanaka D, Sasuga Y. Yanagida T, Asakura M, Yamaguchi N. Fluvoxamine and sigma-1 receptor agonists dehydroepiandrosterone (DHEA)-sulfate induces the Ser473-phosphorylation of Akt-1 in PC12 cells. Life Sciences 2010; 86: 309-314. (査読有)
- ⑤ Misonoo A., Osada K, Nakano M. Chronic treatment with fluvoxamine stimulates phosphorylation of Ser473 and Thr308 of AKT in the rat cerebral cortex. 聖マリアンナ医科大学大学雑誌、2008; 36(3): 207-214. (査読有)
- ⑥ Otomo M, Takahashi K, Miyoshi H, Osada K, Nakashima H, Yamaguchi N. Some selective serotonin reuptake inhibitors inhibit dynamin I GTPase. Biol Pharm Bull, 2008; 88: 1489-1495. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

- ① Osada K, Haga T, Ogawa Y, Matsui H, Nakano M, Asakura M, Yamaguchi N. Fluvoxamine and Sigma-1 Receptor Agonists Dehydroepiandrosterone (DHEA)-sulfate Induces the Ser473-phosphorylation of Akt-1 in PC12 Cells. 41th Annual Meeting of Neuroscience, 2010. 11.14
- ② Osada K, Ogawa Y, Matsui H, Haga T, Nakano M, Takahashi K, Fujiwara K, Yanagida T, Kanai S. Chronic trifluoperazine treatment increased P-glycoprotein in the rat brain. 40th Annual Meeting of Neuroscience, 2009. 10.19
- ③ Osada K, Nakano M, Misonoo A, Kanai S, Tanaka D, Ootmono M, Sasuga Y, Takahashi K, Ogawa Y, Haga T, Asakura M. Antidepressants induces phosphorylation of Akt in PC12. 38rd Annual Meeting of Neuroscience, 2008. 11.15

[図書] (計 2 件)

- ① 長田賢一. 向精神薬などの精神科的治療、線維筋痛症診療ガイドライン 2009、厚生労働省研究班監修、日本リウマチ財団、東京、2010 ; 65-70.
- ② 長田賢一. 疼痛に対する SNRI の臨床応

用:線維筋痛症、SNRI のすべて第二版、小山 司・樋口輝彦編集、先端医学社、東京、2010; 217-223.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 賢一 (OSADA KENICHI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20233504

(2) 研究分担者

山田 光彦 (YAMADA MITUHIKO)
国立精神・神経センター 精神保健研究所
精神薬理研究部・部長
研究者番号: 6024004

喜田 聡 (KIDA SATOSHI)
東京農業大学 応用生物科学部・教授
研究者番号: 80301547

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
(H20→H21: 連携研究者)

(3) 連携研究者

朝倉 幹雄 (ASAKURA MIKIO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 70103504

松井 宏晃 (MATUI HIROAKI)
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科
(研究院)・教授
研究者番号: 90181685

加藤 智啓 (KATOU TOMOHIRO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80233807

貴家 康男 (SASUGA YASUO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60308450

御園生 篤志 (MISONOO ATUSHI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号: 204101208

小川 百合子 (OGAWA YURIKO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技
術員
研究者番号: 90449398

田中 大輔 (TANAKA DAISUKE)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：80410124