

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：機関番号：11501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21380074

研究課題名（和文） 食品由来成分によるシスチン・グルタミン酸トランスポーターの発現制御と生理機能.

研究課題名（英文） Regulation of cystine/glutamate transporter by food-derived factors and its physiological functions.

研究代表者 佐藤 英世 (SATO HIDEYO)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：60235380

研究成果の概要（和文）：生体抗酸化系の一つとして機能していると考えられるシスチン・グルタミン酸トランスポーター(xCT)の食品由来成分による発現制御とその生理機能について検討を行った。xCT は、免疫系組織で構成的に発現し、グルタチオン維持等の抗酸化機能を担っていることが個体レベルで示された。また、マクロファージのような免疫系細胞の機能発現に関与することが示された。また、ネギ科植物等の食材には、xCT の発現を誘導し、グルタチオンレベルを上昇させる効果のあることが明らかとなった。これが、酸化ストレスに対するB細胞のインスリン分泌能の機能維持に寄与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we have investigated the regulatory mechanism of cystine/glutamate transporter (xCT) by food-derived factors and the physiological functions. xCT is constitutively expressed in immune tissues including mesenteric lymph node and Payer's patch. Induction of xCT in macrophages has been demonstrated to be important for expressing the function of the cells. The extract derived from some species of *Allium* increased intracellular glutathione. This was due to the induction of xCT. Increased glutathione in islet cells by the extract from *Allium* plants seems to play a protective role against oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品、グルタチオン、シスチン、トランスポーター、ネギ科植物、酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

食品に含まれるポリフェノール等の微量成分には、生体の様々な生理機能の発現や恒常性維持に重要な役割を担うものがあることがわかってきた。しかし、どのよ

うな食品成分がどのような生理機能の制御にかかわるか十分解明されていないものも多い。我々は、これまで哺乳類細胞形質膜上に発現するいくつかのアミノ酸ト

ランスポーターに注目し、その発現調節機構やアミノ酸輸送という第一義的な機能から派生する種々の生理機能について研究を進めてきた。その中で、特に  $x_c$ 系と呼ばれるシスチン・グルタミン酸トランスポーターの生理機能を詳細に調べ、初めてその遺伝子 cDNA をクローニングして構造を解明し、このトランスポーターの本体を構成する xCT と命名したタンパク質の発現制御機構の一端を明らかにした。一方で、食品成分による xCT 遺伝子の発現制御機構を調べ、最近、ある種のフラボノイドによって、培養細胞レベルで xCT 活性が制御されることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、アミノ酸輸送に焦点を絞り、食品中に含まれる種々の生理活性物質がシスチン・グルタミン酸トランスポーターの発現制御に個体レベルでどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的とした。また、このトランスポーターの生理機能について個体レベルでの解析を試みた。さらに、いくつかの病態モデルを用いて、ポリフェノールや新規生理活性成分がシスチン・グルタミン酸トランスポーターの発現制御を介して種々の病態に対し、どのような効果を表わすか個体レベルで解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

種々の培養細胞に食品由来成分を添加した時の細胞内グルタチオンレベルの変化を酵素リサイクル法や HPLC による分析により測定した。また、xCT の発現を RT-PCR やアミノ酸取り込み活性測定により調べた。個体レベルでは、xCT 遺伝子欠損マウスを用いて、野生型と比較することで xCT の個体レベルでの生理機能について解析した。

## 4. 研究成果

(1) xCT の発現部位について消化管を中心に調べたところ、パイエル板と腸間膜リンパ節で xCT mRNA の構成的な発現が認められた。これにより、胸腺、脾臓等のリンパ組織に加

え、消化管関連リンパ組織においても xCT が構成的に発現していることが示された。

(2) パイエル板および腸間膜リンパ節に存在するリンパ球とリンパ球以外の支持細胞とに分けて xCT の発現を調べたところ、リンパ球では、xCT がほとんど発現していないのに対し、支持細胞では、xCT が強く発現していることがわかった。このことから、支持細胞において、xCT を介して取り込まれたシスチンが、細胞内でシステインに還元され、これが、支持細胞から放出されることにより、リンパ球のグルタチオン維持に利用されていると考えられた。

(3) 肺胞マクロファージにおける xCT の発現とグルタチオンとの関連性を検討したところ、肺胞マクロファージでは、腹腔マクロファージとは異なり、xCT が構成的に発現していることがわかった。また、肺胞マクロファージの細胞内グルタチオンは、腹腔マクロファージと比べて数倍程度高かった。このことから、肺胞マクロファージにおいては、xCT が、細胞内グルタチオンの維持に寄与していると考えられた。

(4) アサツキの可食部分から調製した抽出液をマウス膵臓ランゲルハンス島 B 細胞由来の  $\beta$ TC3 細胞やマウス腹腔マクロファージに添加したところ、細胞内グルタチオンレベルが有意に上昇することがわかった。また、アサツキ抽出液は、xCT の発現を誘導することが示された。

(5) マウス膵臓ランゲルハンス島 B 細胞由来の  $\beta$ TC3 細胞やマウス腹腔マクロファージにネギ科植物(ニンニク、長ネギ、アサツキ、タマネギ)の水抽出液を添加したところ、タマネギ以外の植物由来抽出液で細胞内グルタチオンレベルが有意に増加した。アサツキの抽出液は、xCT の発現を誘導することによって細胞内グルタチオンレベルを増加させるのに対し、ニンニク及び長ネギ抽出液は、細胞外のシスチンをシステインに還元し、構成的に発現している中性アミノ酸輸送系を介して直接グルタチオン前駆アミノ酸であ

るシステインが供給されることにより、グルタチオンが上昇することが明らかとなった。(6)不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸やアラキドン酸に弱い xCT 誘導活性が認められた。これらの脂肪酸が酸化されると xCT の誘導は強くなり、細胞内グルタチオンレベルも上昇することがわかった。

(7)肺胞上皮組織では、パラコート投与による酸化ストレス負荷によって xCT が強く誘導されることが明らかとなった。肺胞マクロファージも同様に酸化ストレス負荷により in vivo で xCT が誘導されることが示された。

(8)脳における xCT の生理機能を xCT KO マウスを用いて解析したところ、海馬等のグルタミン酸濃度が野生型マウスに比べて有意に低下することが示された。このことから、xCT は、脳において細胞外グルタミン酸の濃度制御に寄与することが初めて示唆された。

(9)アサツキなど地域の食材としてネギ科植物に注目し、その抽出液について細胞機能への影響を調べた。マウス脾臓 B 細胞由来  $\beta$  TC3 細胞にアサツキやギョウジャニンニクの水抽出液を添加したところ、インスリンの分泌能にほとんど影響は見られなかった。一方、酸化ストレス負荷により、インスリン分泌能は著しく低下したが、アサツキ等の水抽出液を前処理しておくことによって、酸化ストレス負荷によるインスリン分泌能の低下が有意に抑制されることが明らかとなった。

(10)xCT の個体レベルでの機能を調べる一環として、シスチン・システイン欠乏食を xCT 遺伝子欠損マウスに摂取させた時の影響を調べた。その結果、組織学的には、有意な差は認められなかった。しかし、血中のシスタチオン量が野生型マウスに比べて、欠乏食給仕により有意に減少することがわかった。

(11)病態モデルの一つとして、細菌性リポ多糖(LPS)の投与による感染症における xCT の役割を調べるために、マウス腹腔マクロファージを用いて、感染に伴い産生される一酸化窒素(NO)の動態を調べた。その結果、xCT は、細胞内のシステインレベルを高めること

により、NO の細胞外への放出に寄与していることが示唆された。

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 8 件)

1. Conrad, M. and Sato, H. (2012) The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, System xc<sup>-</sup>: cystine supplier and beyond. *Amino Acids* 42: 231-246. 査読有
2. Lewerenz, J., Sato, H., Albrecht, P., Henke, N., Noack, R., Methner, A., and Maher, P. (2012) Mutation of ATF4 mediates resistance of neuronal cell lines against oxidative stress by inducing xCT expression. *Cell Death & Differentiation* 19, 847-858. 査読有
3. Massie, A., Schallier, A., Kim, S-W., Fernando, R., Kobayashi, S., Beck, H., De Bundel, D., Vermoesen, K., Bannai, S., Conrad, M., Plesnila, N., Sato, H., and Michotte, Y. (2011) Dopaminergic neurons of system xc<sup>-</sup> deficient mice are highly protected against 6-OHDA induced toxicity. *FASEB J.* 25: 1359-1369. 査読有
4. De Bundel, D., Schallier, A., Loyens, E., Fernando, R., Miyashita, H., Van Liefferinge, J., Vermoesen, K., Bannai, S., Sato, H., Michotte, Y., Smolders, I., and Massie, A. (2011) Loss of system xc<sup>-</sup> does not induce oxidative stress but decrease

- extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J. Neurosci.* 31: 5792-5803. 査読有
5. Kurakane, S., Yamada, N., Sato, H., and Igarashi, K. (2011) Anti-diabetic effects of *Actinidia arguta* polyphenols on rats and KK-A<sup>y</sup> mice. *Food Sci. Technol. Res.* 17: 93-102. 査読有
  6. Zang, Y., Sato, H., and Igarashi, K. (2011) Anti-diabetic effects of kaempferol glycoside-rich fraction from unripe-soybean (Edamame, *Glycine max.* L. Merrill. 'Jindai') leaves on KK-A<sup>y</sup> mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 1677-1684. 査読有
  7. Sugimoto, M., Ikeda, S., Niigata, K., Tomita, M., Sato, H., and Soga, T. (2011) MMDB: Mouse multiple tissue metabolome database. *Nucleic Acids Res.* 2011: 1-6. 査読有
  8. Mandal, P. K., Seiler, A., Perisic, T., Kölle, P., Canak, A. B., Förster, H., Weiss, N., Kremmer, E., Lieberman, M. W., Bannai, S., Kuhlencordt, P., Sato, H., Bornkamm, G. W., and Conrad, M. (2010) System x<sub>c</sub><sup>-</sup> and thioredoxin reductase 1 cooperatively rescue glutathione deficiency. *J. Biol. Chem.* 285: 22244-22253. 査読有
- [学会発表] (計 10 件)
1. Sato, H. Cystine/glutamate antiporter: Light and shadow under physiological and pathophysiological conditions. UK-Japan Research Symposium (6-7, Apr, 2012) つくば市 (つくばサイエンスインフォメーションセンター)
  2. 小林翔、三瓶陽太、筒井拓己、井川奈保、柳大樹、五十嵐喜治、坂内四郎、佐藤英世 Role of cystine/glutamate transporter, System x<sub>c</sub><sup>-</sup>, on NO release from macrophages. 第 34 回日本分子生物学会大会 2011 年 12 月 15 日、横浜市 (パシフィコ横浜)
  3. 小林翔、土田雄介、笠越隆幸、小倉美雪、佐藤寛、五十嵐喜治、坂内四郎、佐藤英世 肺胞マクロファージにおけるシスチン・グルタミン酸トランスポーターの発現と機能 第 83 回日本生化学会・第 33 回日本分子生物学会合同大会 2010 年 12 月 7 日、神戸市 (神戸国際展示場)
  4. 高野智枝、酒出はるな、佐藤英世、戸津川清、木村直子 培養系マウス卵の初期発生におけるグルタチオンおよびシスチン・グルタミン酸トランスポーターの役割 第 103 回日本繁殖生物学会大会 2010 年 9 月 3 日、十和田市 (北里大学獣医学部)
  5. 高野智枝、木村直子、佐藤英世、戸津川清 シスチン・グルタミン酸トランスポーター(xCT)遺伝子欠損マウス由来受精卵の体外発生能 第 51 回日本哺乳動物卵学会 2010 年 5 月 30 日、新潟市 (朱

鷺メッセ)

6. 岡田卓巳、佐藤英世、渡辺直子 皮膚炎症反応におけるレドックスバランス制御  
第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年  
12 月 11 日、横浜市 (パシフィコ横浜)
7. 柴崎 智弘、井内良仁、岡田太、桑田一  
歩、山辺 拓也、坂内四郎、富田善彦、佐  
藤英世、藤井順逸 *Physiological relevance  
of ischemia/reperfusion-induced  $xCT$   
expression in kidneys: corroborating  
evidence in  $xCT$ -deficient mice.* 第 82 回日  
本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日、神  
戸市 (神戸国際展示場)
8. 小林翔、大林亮介、菅野裕司、土田雄介、  
柳大樹、坂野麻里子、五十嵐喜治、坂内  
四郎、佐藤英世 哺乳類培養細胞のシス  
チン・グルタミン酸トランスポーターの  
発現における多価不飽和脂肪酸の影響  
第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月  
22 日、神戸市 (神戸国際展示場)
9. Watanabe, N., Okada, T., and Sato, H.  
Effect of cystine transporter on  
cutaneous inflammation. The 6<sup>th</sup> Joint  
Seminar on Biomedical Sciences. (16  
Oct, 2009) 東京都大田区 (東邦大学医学  
部)
10. Sato, H. Protective role of System  $x_c^-$  *in  
vivo* against oxidative stress. 11<sup>th</sup>  
International Congress on Amino acids,  
Peptides, and Proteins (3-7, Aug, 2009)  
Vienna, Austria

[その他]  
ホームページ等

<http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~shide/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 英世 (SATO HIDEYO)  
山形大学・農学部・教授  
研究者番号：60235380

##### (2) 研究分担者

五十嵐 喜治 (IGARASHI KIHARU)  
山形大学・農学部・教授  
研究者番号：00111336