

5-オキソプロリンの輸送担体を利用したグリア細胞の酸化ストレス抵抗性に関する研究

北海道大学大学院薬学研究院・准教授 小林 正紀

■ 目 的

超高齢化社会へ突入する我が国において認知症患者数は増加の一途を辿っている。我々は認知症の症状の中でも特に記憶の低下を軽減することが患者の QOL 改善に大きく寄与すると考えた。近年、脳アストロサイトからのモノカルボン酸輸送担体(MCT)を介したニューロンへの乳酸供給が記憶形成に重要であることが報告され(*Cell*. 2011)、本輸送担体の機能を解析することは記憶の維持・改善につながるとして注目を浴びている。我々は食品中に含まれ、かつ記憶の改善に寄与することが示唆されているアミノ酸誘導体 5-oxoproline (5-OP) が MCT の基質であることを新たに見出した(*JBC*. 2015)。そこでこれらの知見を踏まえ、本研究では脳アストロサイトにおける MCT を介した 5-OP 輸送を解析し、本輸送が認知症に深く関与する酸化ストレスに及ぼす影響を検証することで記憶の維持・改善へ向けた分子基盤を確立する。

■ 方 法

実験にはグリア由来細胞株である T98G、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた。輸送活性の評価は取り込み実験により行い、5-OP の定量は液体シンチレーションカウンタにて測定した。また MCT 発現は RT-PCR およびウエスタンブロットにより解析した。

■ 結果および考察

グリア由来細胞株 T98G における 5-OP 輸送はプロトン勾配依存的であり、かつ MCT1 阻害剤により取り込みは顕著に低下した。さらに濃度飽和性の検討より 5-OP の濃度の増加に伴い Michaelis-Menten 型の飽和性を示した。フィッティングから $K_m=3.2\pm0.2\text{mM}$ と算出された。次に MCT1 発現卵母細胞を用いて 5-OP 取り込みの濃度飽和性を検証したところ、 $K_m=3.8\pm0.2\text{mM}$ と算出され、 K_m 値が一致した。したがって T98G 細胞における 5-OP 輸送は MCT1 を介していることが示唆された。さらに 5-OP 輸送における MCT1 の寄与を明らかにすべく、siRNA による発現抑制を行った。電気穿孔法により siMCT1 を導入した細胞の MCT1 蛋白質量は siControl を導入した細胞に比べ、 $42.5\pm6.7\%$ まで減少し、その時の 5-OP 取り込みは同程度減少した。またこの条件下で細胞内グルタチオン量を測定したところ MCT1 siRNA 処理により有意に減少した。一方で本条件下においてグルタチオン合成に係わる酵素の変動は認められなかった。したがって MCT1 の発現抑制あるいは阻害は細胞内グルタチオン量を抑制する事が示唆された。最後に MCT1 の阻害剤である PZA および基質として見出した 5-OP を用いて酸化ストレスに及ぼす影響を検討した。過酸化水素の処理により有意に細胞生存率の低下を認めた一方で 5-OP を前処理することで生存率の低下は抑制されることが明らかとなった。また MCT1 の阻害剤である PZA を併用すると生存率低下の軽減効果は消失したことから MCT1 機能は酸化ストレスと関連する事が示唆された。

■ 結 語

5-OP がグリア由来細胞において MCT1 を介して輸送されることを明らかにした。また 5-OP を輸送する MCT1 はグルタチオンの維持に関わり、その機能抑制により酸化ストレス抵抗性を示すことが明らかとなった。