

論文内容要旨

The development of screening methods to identify drugs to limit ER stress using wild-type and mutant serotonin transporter.

(野生型および変異体セロトニントランスポーターを用いたERストレスを軽減する薬剤を同定するためのスクリーニング法の開発)

ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA, 2016, in press.

主指導教員：酒井 規雄教授
(基礎生命科学部門 神経薬理学)

副指導教員：安井 弥教授
(基礎生命科学部門 分子病理学)

副指導教員：山脇 成人准教授
(広島大学病院 精神神経医学)

荊尾 一草

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

[背景と目的]

セロトニントランスポーター (SERT) は、神経終末から放出されたセロトニン (5-HT) を神経終末に再取り込みしセロトニン神経伝達を終了させるタンパク質である。SERT の機能は膜輸送機構により調節される。これまでの研究により、①SERT の C 末端欠損変異体 (SERT Δ CT) は、膜輸送が阻害され小胞体 (ER) に停留すること、②プロテアソーム阻害剤によって引き起こされた ER ストレスは、SERT の膜輸送を障害し SERT を ER に停留させ、SERT Δ CT と同様な状態を作ること、③ER ストレスを軽減させる効果のあるケミカルシャペロンの 4-phenylbutilic acid(4-PBA) は、SERT の膜輸送を亢進させ SERT、SERT Δ CT の取り込み活性を上昇させることを明らかにしている。これらの事実は、SERT の膜輸送を促進させる薬物は、ER ストレス軽減に効果のある薬物である可能性を示唆しており、そのような薬物を探索することは ER ストレス関連疾患の治療法の開発に有益であると考えられる。

そこで、本研究では、SERT を用いて ER ストレスを軽減させる効果のある薬物を探索する簡易で有益なスクリーニング法を開発することを目的とした。

[結果]

①野生型 SERT と SERT Δ CT の セロトニン取り込み活性に対する 4PBA と SKF-10047 の効果

電気穿孔法を用いて COS-7 細胞に野生型 SERT と SERT Δ CT を発現させ、ケミカルシャペロンの 4PBA とシャペロン活性を発揮するシグマ 1 受容体のアゴニストである SKF-10047 (SKF) をそれぞれ 24 時間処置した。その後、単位タンパク質あたりの [3 H]5-HT の取り込み量を SERT の取り込み活性として測定した。その結果、4PBA (3mM) の処置は野生型 SERT の取り込み活性を 43%、SERT Δ CT の取り込み活性を 71% 増大させた。また SKF 処置は、野生型 SERT の取り込み活性は増大させなかったが、SERT Δ CT の取り込み活性を濃度依存的に顕著に増大させた。過去の検討により 4-PBA、SKF は SERT の膜輸送を促進することを明らかにしており、この結果から、SERT Δ CT は、野生型 SERT よりシャペロン活性を持つあるいは誘導する薬物に高い感受性を持つことが示唆された。

②SERT の蛍光基質を用いたセロトニン取り込み活性の検討

従来の [3 H] を用いる方法は手順が複雑であるため薬物を高処理でスクリーニングするには適していない。そこで、Neurotransmitter Transporter Uptake Assay kit (Molecular Device 社) を用いて蛍光標識された SERT の基質を SERT 発現 COS-7 細胞に取り込ませて、時間依存的な細胞内への蛍光の蓄積を指標にして SERT 取り込み活性を計測することを試みた。COS-7 細胞に SERT あるいは SERT Δ CT を発現させ、4PBA と SKF をそれぞれ 24 時間処置した後、蛍光基質を添加し蛍光変化をハイコンテンツ共焦点レーザー顕微鏡 Opera Phenix で測定した。野生型 SERT 発現細胞では時間依存的に蛍光強度が増加した。この蛍光強度の増加は、SERT 阻害剤のフルボキサミンを処置した細胞では観察されず、蛍光基質が SERT を介して細胞内に取り込まれたため観察される現象であると推測された。また、4-PBA は野生型 SERT の取り込み活性

を有意に増強し、SKF は効果を示さなかった。この結果は、 $[^3\text{H}]$ を用いた解析の結果と同様であり、この方法による SERT 取り込み活性の測定法の確からしさを示した。一方で SERTACT 発現細胞に蛍光基質を添加しても時間依存的な蛍光の増加はみられず、フルボキサミン処置した細胞と同様の蛍光強度レベルであった。この結果から、本方法により SERTACT の取り込み活性を評価することは困難であると示唆された。

③SERTACT の凝集体形成を指標にした ER ストレス軽減効果のある薬物のスクリーニング法の検討

SERTACT を発現 COS-7 細胞の SERT の局在を免疫染色により検討すると、SERT の凝集体が核周囲・細胞質の ER に観察された。4-PBA や SKF の処置により SERTACT の凝集体が減少する傾向が見られたので、まず手動による計測による定量化を試みた。4-PBA、SKF の処置により、細胞 1 個当たりの SERTACT の凝集体数は有意に減少することが確認された。次に Opera Phenix を用いて自動計測することを試みた。自動計測でも手動による計測時と同様の結果が得られ、4-PBA、SKF は有意に SERTACT の凝集体数を減少させることが明らかとなった。この結果により、SERTACT の凝集体を指標に ER ストレス改善薬を検索することが可能であり、さらにハイコンテンツスクリーニング顕微鏡を用いることによって高処理スクリーニングが可能であることが示唆された。

[考察]

以上の結果より、SERTACT は、野生型 SERT より 4PBA と SKF-10047 に対する効果が顕著にみられたことから、ER ストレス軽減薬物のセンサータンパク質として有用であると考えられた。また、野生型 SERT に対しては、蛍光基質を用いた確からしいセロトニン取り込み活性測定が可能であり、SERT の取り込み活性を修飾する薬物を高処理で検索することが可能であることが明らかとなった。しかし、SERTACT に対しては蛍光基質の取り込みが観察されなかった。蛍光基質の SERT に対する親和性(K_m)は $[^3\text{H}]$ セロトニンの K_m と同等であることから、SERTACT の蛍光基質の取り込みが観察されなかった理由として、蛍光で取り込みを感知する解析法の感度が低いことが推測された。さらに、SERTACT の凝集体の減少を指標にして、またその際、ハイコンテンツスクリーニング顕微鏡を用いて凝集体数を自動計測することにより、ER ストレス軽減薬物を高処理スクリーニングできることが示唆された。