

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	荊尾 一草
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
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)			
論文審査担当者			
主 査	橋本 浩一	印	
審査委員	今泉 和則		
審査委員	丸山 博文		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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(SERTΔCT)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、SERTΔCT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、SERTΔCTの取り込み活性を上昇させること、④シャペロン活性を誘導するシグマ1受容体作用薬のSKF-10047 (SKF)も4-PBAと同様の効果を持つこと、⑤シャペロン活性を持つあるいは誘導する薬物に対しSERTΔCTは、野生型SERTより高い感受性を持つ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ストレス軽減作用を有する可能性を示唆しており、そのような薬物の探索は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。</p> <p>従来のRI標識されたトリチウム・セロトニン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SERTΔCTを発現させ、4-PBA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ト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</p>			

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ることにより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 は増強傾向を示したが有意ではなかった。この結果は、トリチウム・セロトニン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が示された。

次に SERTACT 発現細胞に対して検討した。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。蛍光基質の SERT に対する親和性( $K_m$ )は、セロトニンの  $K_m$  と同等であることから、SERTACT 発現細胞で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。

一方、SERTACT 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 ストレス軽減薬物を検索することが可能であり、さらにハイコンテンツ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。

SERT を用いた ER ストレスを軽減する薬剤同定のためのスクリーニング法として、蛍光基質を用いた野生型 SERT の取り込み活性と SERTACT の凝集体形成を指標にした解析方法を開発した。これらの解析にハイコンテンツ顕微鏡を用いたハイスループット・スクリーニングを加えることにより、ER ストレス軽減薬物の高処理検索が可能になると予想される。本研究の成果は、ER ストレス関連疾患の治療薬開発に資するところ大である。よって審査委員会委員全員は、本論文が荊尾一草に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。