

# 論文内容要旨

SKF-10047, a prototype Sigma-1 receptor agonist, augmented the membrane trafficking and uptake activity of the serotonin transporter and its C-terminus-deleted mutant via a Sigma-1 receptor-independent mechanism.

(シグマ1受容体のプロトタイプ・アゴニスト SKF-10047 は、シグマ1受容体を介さずセロトニントランスポーターとそのC末端欠損変異体の膜輸送と取り込み能を増強する)

Journal of Pharmacological Science, 2018, in press.

主指導教員：酒井 規雄 教授

(医歯薬保健学研究科 神経薬理学)

副指導教員：安井 弥 教授

(医歯薬保健学研究科 分子病理学)

副指導教員：坂口 剛正 教授

(医歯薬保健学研究科 ウィルス学)

浅野 昌也

(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 $\Delta$ CT)は、折りたたみ不全タンパク質であり、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 $\Delta$ 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 $\Delta$ 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。SERT の膜輸送を亢進させ ER ストレスを緩和させる薬物は、SERT に関わる精神神経疾患の、また、ER ストレス関連疾患の治療法開発の糸口として有用である可能性がある。

一方、小胞体タンパク質のシグマ 1 受容体は、アゴニストによりシャペロン活性が上昇することが知られている。そこで、本研究では、従来からよく知られているシグマ1受容体のアゴニストである SKF-10047 (SKF) が SERT 機能に与える影響を検討することと、その作用メカニズムを調べることを目的とした。

## [結果]

### ①野生型 SERT と SERT $\Delta$ CT の セロトニン取り込み活性とタンパク発現に対する 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 $\Delta$ CT を発現させ、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、あるいは、細胞 1 個当たりの蛍光 SERT 基質の取り込み量の平均を SERT の取り込み活性として測定した。その結果、SKF500  $\mu$  M の処置は野生型 SERT の取り込み活性を有意に上昇させ、SERT $\Delta$ CT では濃度依存的に顕著に取り込み活性を増大させた。

一方、ウエスタンブロッティングによるタンパク発現の検討では、SKF は野生型 SERT に対し SERT 完全糖鎖修飾体を増加させ、未成熟糖鎖修飾体を減少させた。また SERT $\Delta$ CT でも同様に未成熟糖鎖修飾体を減少させた。

この結果から SKF は膜輸送を促進させることにより、SERT 機能を高めていることが示唆された。

②シグマ1受容体ノックダウン時の SERT  $\Delta$  CT の セロトニン取り込み活性に対する SKF-10047 の効果

シグマ1受容体の shRNA と SERT  $\Delta$  CT を電気穿孔法により COS-7 細胞または AD293 細胞に遺伝子導入し、シグマ1受容体の発現をノックダウンさせた細胞を作製し、①と同様の方法で取り込み活性を測定した。その結果、コントロール細胞群とシグマ1受容体ノックダウン細胞群で SKF の取り込み活性に対する上昇効果の違いはみられなかった。

この結果から SKF はシグマ1受容体を介さずに、SERT 機能を調節していることが示唆された。

③SKF 処置により変動する遺伝子の cDNA アレイによる解析とタンパク発現変化の確認

AD293 細胞を用いて、SKF 無処置群と 200  $\mu$  M SKF24 時間処置群間で mRNA 発現量の変化を cDNA アレイにより解析した。SKF 処置群で上昇がみられた複数の遺伝子の中で、SNARE タンパク質であり、膜輸送に関与する Syntaxin3 (STX3)に着目した。ウエスタンブロットティングでは、SKF48 時間処置により STX3 タンパク発現が上昇することを確認した。

④STX3 過剰発現時、ノックダウン時における SERT  $\Delta$  CT の セロトニン取り込み活性に対する SKF-10047 の効果

STX3 発現プラスミドあるいは siRNA と SERT  $\Delta$  CT を電気穿孔法により COS-7 細胞に遺伝子導入し、①と同様の方法で取り込み活性を測定した。

その結果、コントロール細胞群と比較して STX3 過剰発現細胞群で取り込み活性に対する SKF の上昇効果は有意に増強した。一方、STX3 ノックダウン細胞では、取り込み活性に対する SKF の効果は変化なかった。

この結果から SKF の SERT  $\Delta$  CT 機能に対する増強効果の一部に STX3 が関与している可能性が示唆された。

[考察とまとめ]

以上の結果より、シグマ1受容体アゴニスト SKF-10047 はシグマ1受容体を介さず膜輸送を促進することにより SERT 機能、特に折り畳み不全タンパクである SERT  $\Delta$  CT の機能を上昇させることが明らかとなった。SKF は SNARE タンパク質の STX3 の発現を増加させ、さらに STX3 の過剰発現が SKF の SERT  $\Delta$  CT 機能に対する上昇効果をさらに増強することから、SKF-10047 の SERT 機能に対する効果発現の一部に STX3 が関与していることが示唆された。

SERT は抗うつ薬のターゲットであり、うつ病や不安障害をはじめとする精神神経疾患と深く関与している。SKF-10047 は、これらの疾患や膜輸送不全による ER ストレスに起因する病態を改善する治療法の新たな糸口となるかもしれない。