

学位論文題名

Molecular Pathobiological Studies on Glutamate/Aspartate
Transporter (GLAST) in Canine Red Cells
– Molecular Basis for Hereditary Deficiency
of GLAST in Dogs –

(イヌ赤血球グルタミン酸/アスパラギン酸輸送体 (GLAST) に関する
分子病態生理学的研究 – イヌにおける遺伝性 GLAST 欠損の分子機序 –)

学位論文内容の要旨

高親和性ナトリウム依存性グルタミン酸輸送体は現在までに5種類の異なるグルタミン酸輸送体サブタイプ (GLAST, GLT-1, EAAC1, EAAT4, および EAAT5) の存在が報告されており, 哺乳動物の全身組織で重要な生理的役割を果たしている. 中枢神経系では, これらの輸送体は高度に局在化することが知られており, グルタミン酸を神経細胞およびグリア細胞に取り込み興奮性神経伝達を終結させ, 過剰なグルタミン酸の蓄積による神経毒性を防ぐ役割を果たしている. このことから, グルタミン酸輸送体の機能異常は神経変性疾患の発症に深く関与することが示唆されている. 一方, 末梢組織ではグルタミン酸輸送体は上皮細胞における酸性アミノ酸の吸収や体細胞におけるグルタチオンレベルの調節に重要な役割を果たしているものの, 末梢組織におけるグルタミン酸輸送体サブタイプの病態生理的役割についてはほとんど明らかでない.

ほとんどの哺乳動物の赤血球はグルタミン酸に不透過であるのに対して, イヌ赤血球は高親和性 Na^+/K^+ 依存性グルタミン酸輸送系を有する. 一方, イヌ赤血球は通常細胞内のイオン組成が低カリウム高ナトリウム (LK型) であるのに対して, 柴犬などの日本犬の一部では高カリウム低ナトリウム (HK型) となっている. HK型赤血球は Na^+/K^+ 依存性グルタミン酸輸送活性が亢進し, 著明な細胞内グルタミン酸およびグルタチオンの蓄積を示す. しかし, これらのHK型イヌにはグルタミン酸輸送の減少あるいは欠損によりグルタチオン蓄積を示さない変異体が存在することが明らかになった.

本研究の目的は, イヌ赤血球におけるグルタミン酸輸送体欠損症の分子機序を解明することであり, その成果はグルタミン酸輸送体の発現調節機序, および脳を含む全身組織における本輸送体の病態生理学的意義を解明する上で有用であるものと考えられる.

イヌ赤血球における Na^+ 依存性グルタミン酸輸送体の動力的および薬理学的特質を赤血球および赤血球ゴーストを用いて検討した. イヌ赤血球グルタミン酸輸送は細胞外 Na^+ および細胞内 K^+ に完全に依存しており, 動力的解析から, 1分子のグルタミン酸

の輸送に対して2分子のNa⁺の共輸送及び1分子のK⁺の逆輸送が共役していることが明らかになった。また、本輸送系はthreo-3-hydroxyaspartateおよびL-cysteinesulfinateにより強く阻害され、dihydrokainate, DL- α -aminoadipateおよびL-cysteineによりほとんど阻害を受けないことが明らかになった。さらに、細胞内HCO₃⁻によりグルタミン酸取り込みは促進されたことから、イヌ赤血球におけるグルタミン酸輸送は少なくとも部分的に細胞内HCO₃⁻に依存しているものと考えられた。これらのイヌ赤血球グルタミン酸輸送系の特質はグリア細胞型輸送体であるGLASTサブタイプのものに最も類似していた。

4種類のイヌ脳由来グルタミン酸輸送体サブタイプcDNAのPCR法による単離、アフリカツメガエル卵母細胞発現系における機能的特質、転写産物の組織分布およびイヌ赤血球膜におけるグルタミン酸輸送体の免疫学的検出に基づき赤血球型グルタミン酸輸送体サブタイプを決定した。

イヌGLAST, GLT-1, EAAC1およびEAAT4 cDNAをイヌ脳より5'-および3'-RACE法により単離した。これらの輸送体はEAAT4をのぞきNa⁺依存性高親和性グルタミン酸輸送を示した(K_m=23-56 μ M)。また、GLASTのグルタミン酸構造類似体に対する反応はイヌ赤血球のものと同様であった。RT-PCRにより4種のサブタイプの脳における発現およびGLASTの全身臓器における発現が明らかになった。4種類のサブタイプのうちGLASTのみが骨髄および網状赤血球に発現していた。全長GLAST cDNAは約3.8 kbであり、脳および骨髄でそのサイズは一致していた。これらの結果から、イヌ赤血球系細胞のグルタミン酸輸送体はGLASTであることが示唆された。

イヌ赤血球膜において、66 kDaの糖蛋白質がGLAST-COOH末端特異的抗体を用いたイムノブロッティングにより検出された。赤血球膜GLASTは脳GLAST蛋白質(60-62 kDa)よりもN結合型糖鎖の相違により見かけ上の分子量が大きく、可溶化条件における二量体形成の特徴も有していた。これらの結果から、イヌ赤血球膜グルタミン酸輸送体GLAST型であることが明らかになった。

低グルタミン酸輸送(LGluT)赤血球は著明なグルタミン酸輸送およびグルタチオン濃度の低下を示し、酸化ストレス抵抗性が低下していた。またLGluT赤血球膜のGLAST蛋白質量は著明に低下しており、これらのLGluTイヌはすべてミスセンス変異Gly492Ser (G492S)をホモあるいはヘテロ接合で保有していた。G492S変異GLAST蛋白質はアフリカツメガエル卵母細胞発現系において正常なグルタミン酸輸送を示したが、シクロヘキシミド添加条件下で野生型GLASTは正常な輸送活性を維持したのに対して、G492S変異GLASTは輸送活性の減少を示したことから、G492Sは野生型に比べ不安定な蛋白質であることが示唆された。さらに、正常輸送活性を示すG492Sヘテロ接合体は骨髄中の野生型GLASTアレルおよびG492Sアレル由来mRNAが同程度であったのに対し、LGluT G492Sヘテロ接合は野生型GLAST mRNAの選択的な減少が見られた。これらの結果から、LGluT形質はG492S変異および転写活性の低下の組み合わせにより生じることが示唆された。

本研究により、イヌ赤血球グルタミン酸輸送体の本体がGLAST型であることが示され、日本犬における赤血球GLAST欠損症の分子機序が明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 前 出 吉 光
副 査 教 授 柴 原 幹 典
副 査 教 授 葉 原 芳 昭
副 査 教 授 伊 藤 茂 男

学 位 論 文 題 名

Molecular Pathobiological Studies on Glutamate/Aspartate Transporter (GLAST) in Canine Red Cells – Molecular Basis for Hereditary Deficiency of GLAST in Dogs –

(イヌ赤血球グルタミン酸/アスパラギン酸輸送体 (GLAST) に関する
分子病態生理学的研究 – イヌにおける遺伝性 GLAST 欠損の分子機序 –)

本論文は、イヌ赤血球におけるグルタミン酸輸送体欠損症の分子機序を解明したものである。著者は最初にイヌ赤血球における Na^+ 依存性グルタミン酸輸送体の動力学的および薬理学的特質を赤血球および赤血球ゴーストを用いて検討した。その結果、イヌ赤血球グルタミン酸輸送は細胞外 Na^+ および細胞内 K^+ に完全に依存しており、動力学的解析から、1分子のグルタミン酸の輸送に対して2分子の Na^+ の共輸送及び1分子の K^+ の逆輸送が共役していること、*threo*-3-hydroxyaspartateおよびL-cysteinesulfinateにより強く阻害されるが、dihydrokainate, DL- α -aminoadipateおよびL-cysteineによりほとんど阻害を受けないこと、及び細胞内 HCO_3^- によりグルタミン酸取り込みは促進されることが明らかになった。これらのイヌ赤血球グルタミン酸輸送系の特質はグリア細胞型輸送体であるGLASTサブタイプのものに最も類似していた。そこで次に、4種類のイヌ脳由来グルタミン酸輸送体サブタイプcDNAのPCR法による単離、アフリカツメガエル卵母細胞発現系における機能的特質、転写産物の組織分布およびイヌ赤血球膜におけるグルタミン酸輸送体の免疫学的検出に基づき赤血球型グルタミン酸輸送体サブタイプを検討した。その結果、イヌ赤血球膜において、66 kDaの糖蛋白質がGLAST-COOH末端特異的抗体を用いたイムブロッティングにより検出された。赤血球膜GLASTは脳GLAST蛋白質 (60-62 kDa) よりも、N結合型糖鎖の相違により見かけ上の分子量が大きく、可溶化条件における二量体形成の特徴も有していた。これらの結果から、イヌ赤血球膜グルタミン酸輸送体はGLAST型であることが明らかになった。次に、遺伝的に赤血球グルタミン酸輸送体を欠損しているイヌ (LGluTイヌ) について、同輸送体欠損の分子機序を検討した。その結果、LGluTイヌ赤血球膜のGLAST蛋白質量は著明に低下しており、これらのLGluTイヌはすべてミスセンス変異Gly492Ser(G492S)をホモあるいはヘテロ接合で保有していた。G492S変異GLAST蛋白質はアフリカツメガエル卵母細胞発現系において正常なグルタミ

ン酸輸送を示したが、シクロヘキシミド添加条件下で野生型GLASTは正常な輸送活性を維持したのに対して、G492S変異GLASTは輸送活性の減少を示したことから、G492Sは野生型に比べ不安定な蛋白質であることが示唆された。さらに、正常輸送活性を示すG492Sヘテロ接合体は骨髄中の野生型GLASTアレルおよびG492Sアレル由来mRNA量が同程度であったのに対し、LGluT G492Sヘテロ接合においては野生型GLAST mRNAの選択的な減少が見られた。これらの結果から、LGluT形質はG492S変異および転写活性の低下の組合せにより生じることが示唆された。

本研究は、グルタミン酸輸送体の発現調節機序、および脳を含む全身組織における本輸送体の病態生理学的意義を解明する上で有用である。よって審査委員一同、佐藤耕太氏は、博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。