

博士(薬学) 柏木 仁

学位論文題名

中性アミノ酸トランスポーター SNAT2の
発現変動に関する研究

学位論文内容の要旨

【序論】

システム A は短鎖中性アミノ酸を輸送する Na^+ 依存的なトランスポーターであり、特異的基質として Me-AIB が知られている。これまでの研究により、システム A の輸送活性がインスリンや浸透圧ショック、アミノ酸欠乏により増大することが報告されているが、その詳細な機構は未だ解明されていない。そこで、本研究ではシステム A のサブタイプの一つである SNAT2 が多く発現しているラット骨格筋由来 L6 細胞を用いてシステム A の輸送活性を評価し、さらに、インスリン、浸透圧ショック、アミノ酸欠乏によるシステム A の輸送活性増大機構を解明することを目的とした。

【結果と考察】

まず、各刺激開始後の Me-AIB 取り込み量の経時的变化を観察したところ、L6 細胞において実際にシステム A の輸送活性が増大していることが確認された。また、インスリン、アミノ酸欠乏では刺激後徐々に輸送活性が増大したが、浸透圧ショックでは 2 hr まではほとんど変化せず、4 hr 以降急激な活性増大が認められた。これらの結果より、浸透圧ショックによるシステム A の輸送活性増大にはトランスポーテーションは関与していない可能性が示唆された。

L6 細胞において各刺激によるシステム A の輸送活性増大が確認できたので、次に取り込みの濃度依存性を検討した。各刺激存在下、非存在下での取り込み量をミカエリス-メンテン式に当てはめて K_m 値と V_{max} 値を比較した結果、インスリン、浸透圧ショック、アミノ酸欠乏のいずれにおいても K_m 値はコントロールに比べてほとんど変化せず、 V_{max} 値のみが上昇した。したがって、インスリン、浸透圧ショック、アミノ酸欠乏による刺激では、システム A の基質に対する親和性はほとんど変化せず、細胞膜表面のトランスポーター数、あるいは回転速度が増大することにより輸送活性が増大することが示唆された。

そこで次に、その機構解明を目的に、各刺激による輸送活性増大に及ぼす種々の阻害剤の影響を検討した。今回はトランスポーテーション阻害剤であるクロロキン、タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシド、RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D、PI3K 阻害剤であるウォルトマニン、MAPK の ERK 阻害剤である PD98059、p38 阻害剤である SB202190、JNK 阻害剤である SP600125 を用いた。

インスリン刺激による SNAT2 活性増大に及ぼすクロロキン、シクロヘキシド、アクチノマイシン D の影響を検討した結果、いずれの試薬を用いた場合も Me-AIB の取り込みに阻害が認められ、インスリンによるシステム A の輸送活性増大にはトランスポーテーションおよび mRNA 量の増加を伴った新たなタンパク合成が関与していることが示唆された。さらに、PD98059 と SP600125 では取り込みにはほとんど変化が認められず、ウォルトマニン、SB202190 では有意に阻害されたことから、ERK と JNK は関与せず、PI3K と p38 が関与している可能性が示唆された。

浸透圧ショックに関しても同様に検討したところ、インスリン刺激の場合とは異なり、クロロキンによる取り込みへの阻害効果は非常に小さかった。一方、シクロヘキシド、アクチノマイシン D を用いた場合には取り込み量は有意に減少していたことから、システム A の輸送活性増大にはトランスロケーションではなく mRNA 量の増加を伴った新たなタンパク合成が関与していることが示唆され、先に示した経時的変化の結果とよく一致していた。浸透圧ショックの場合、その他の阻害剤では阻害効果が認められず、システム A の輸送活性増大に PI₃K、ERK、p38、JNK のいずれも関与していないことが示唆された。

アミノ酸欠乏に関しても阻害剤の影響について検討した。インスリン刺激の場合と同様に、クロロキン、シクロヘキシド、アクチノマイシン D、ウォルトマニンのいずれによっても阻害が認められ、アミノ酸欠乏によるシステム A の輸送活性増大にはトランスロケーションおよび mRNA 量の増加を伴った新たなタンパク合成、さらに PI₃K が関与していることが示唆された。MAPK の阻害剤に関しては PD98059 と SP600125 によって阻害が認められ、アミノ酸欠乏によるシステム A の輸送活性増大には ERK と JNK が関与していることが示唆された。

経時的変化およびクロロキンを用いた阻害実験での検討より、インスリンとアミノ酸欠乏によるシステム A の輸送活性増大にはトランスロケーションが関与していることが示唆されたので、次に EGFP-SNAT2 の発現分布を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、刺激非存在下では SNAT2 はその多くが細胞内に蓄積しているが、インスリンとアミノ酸欠乏で刺激することにより、SNAT2 が細胞内プールから細胞膜表面へと移行していることが示唆された。

アクチノマイシン D を用いた検討より、各刺激によるシステム A の輸送活性増大には mRNA 量の増加が関与していることが示唆されたことから、SNAT2 のプロモーター活性が各刺激により増大するか否かをルシフェラーゼアッセイにより検討した。今回特定したプロモーター領域である -96/+40 ではプロモーター活性増大は認められなかったため、-96/+40 を上流および下流に伸ばした配列を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、下流に伸ばした配列においてのみプロモーター活性の増大が認められた。これらの結果より、各刺激によるプロモーター活性の増大に関与している配列は転写開始領域よりも下流の +41 ～ +790 の領域に含まれていることが示唆された。

濃度依存性および阻害剤を用いた検討より、各刺激によるシステム A の輸送活性増大には mRNA 量の増加を伴った新たなタンパク合成が関与し、細胞膜表面のトランスポーター数が増加していることが示唆された。そこで、Western blot と RT-PCR によりさらに詳細に検討した。SNAT2 の発現量を比較した結果、各刺激により細胞膜表面のタンパク量が増加していることが明らかとなり、また、各刺激存在下、非存在下において、システム A のサブタイプである SNAT1 と SNAT4 は mRNA レベルでほとんど発現しておらず、SNAT2 の mRNA 量のみが各刺激により増加していることが示唆された。

【結論】

1. L6 細胞においてインスリン、浸透圧ショック、アミノ酸欠乏によるシステム A の輸送活性増大が認められ、その活性増大は細胞膜表面のトランスポーター数が増加することにより起こることが示唆された。
2. インスリン、浸透圧ショック、アミノ酸欠乏によるシステム A の輸送活性増大は mRNA 量の増加を伴った新たなタンパク合成により起こり、さらにインスリン、アミノ酸欠乏には細胞内プールから細胞膜表面へのトランスロケーションも関与していることが示唆された。
3. インスリンとアミノ酸欠乏によってシステム A の輸送活性が増大するシグナル伝達には PI₃K が関与しており、さらにインスリンの場合は MAPK の p38 が、アミノ酸欠乏の場合は ERK と JNK が関与していることが示唆された。
4. インスリン、浸透圧ショック、アミノ酸欠乏によりシステム A のプロモーター活性が増大し、その活性増大に関与している配列は転写開始領域よりも下流の領域に含まれていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 准教授 菅原 満
副査 教授 井関 健
副査 教授 加茂 直樹
副査 准教授 宮内 正二

学位論文題名

中性アミノ酸トランスポーター SNAT2 の 発現変動に関する研究

システム A は短鎖中性アミノ酸を輸送する Na^+ 依存的なトランスポーターである。過去の研究により、システム A の輸送活性がインスリンや浸透圧ショック、アミノ酸欠乏により増大することが報告されているが、その詳細な機構は未だ解明されていない。そこで、本研究ではシステム A のサブタイプの一つである SNAT2 が多く発現しているラット骨格筋由来 L6 細胞を用いてシステム A の輸送活性を評価し、さらに、インスリン、浸透圧ショック、アミノ酸欠乏によるシステム A の輸送活性増大機構を解明することを目的とした。

第一章では、本検討を進めるにあたり適切な実験系を確立する目的で、システム A が高発現している骨格筋細胞に着目してその機能を評価した。各種刺激開始後の Me-AIB 取り込み量の経時的变化を観察したところ、L6 細胞において実際にシステム A の輸送活性が増大していることが確認された。また、インスリン、アミノ酸欠乏では刺激後徐々に輸送活性が増大したが、浸透圧ショックでは 2 hr まではほとんど変化せず、4 hr 以降急激な活性増大が認められた。これらの結果より、浸透圧ショックによるシステム A の輸送活性増大にはトランスポーテーションは関与していない可能性が示唆された。次に取り込みの濃度依存性を検討した。各刺激存在下、非存在下での取り込み量をミカエリス-メンテン式に当てはめて算出された K_m 値と V_{max} 値を比較した結果、インスリン、浸透圧ショック、アミノ酸欠乏による刺激では、システム A の基質に対する親和性はほとんど変化せず、細胞膜表面のトランスポーター数、あるいは回転速度が増大することにより輸送活性が増大することが示唆された。本結果は、今後、システム A の発現制御機構を検討する上で有用な実験系を確立した点で意義あるものと評価できる。

第二章および第三章では、その機構解明を目的に、各刺激による輸送活性増大に及ぼす種々の阻害剤の影響とルシフェラーゼアッセイ法を用いたプロモーター活性の変動について検討した。その結果、インスリンによるシステム A の輸送活性増大にはトランスロケーションおよび mRNA 量の増加を伴った新たなタンパク合成が関与していることが示唆された。また、ERK と JNK は関与せず、PI₃K と p38 が関与している可能性が示唆された。浸透圧ショックに関しても同様に検討したところ、インスリン刺激の場合とは異なり、システム A の輸送活性増大にはトランスロケーションではなく mRNA 量の増加を伴った新たなタンパク合成が関与していることが示唆された。浸透圧ショックの場合、システム A の輸送活性増大に PI₃K、ERK、p38、JNK のいずれも関与していないことが示唆された。さらに、アミノ酸欠乏によるシステム A の輸送活性増大にはトランスロケーションおよび mRNA 量の増加を伴った新たなタンパク合成、さらに PI₃K および ERK と JNK が関与していることが示唆された。本研究では、一方で、蛍光タンパクを付加したシステム A タンパク質 (EGFP-SNAT2) の強制発現系を用いてその発現分布を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、刺激非存在下では SNAT2 はその多くが細胞内に蓄積しているが、インスリンとアミノ酸欠乏で刺激することにより、SNAT2 が細胞内プールから細胞膜表面へと移行しており、阻害剤を用いた検討結果とよく一致していた。また、SNAT2 のプロモーター活性が各刺激により増大するか否かをルシフェラーゼアッセイにより検討した。今回特定したプロモーター領域である-96/+40 ではプロモーター活性増大は認められなかつたため、-96/+40 を上流および下流に伸ばした配列を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、下流に伸ばした配列においてのみプロモーター活性の増大が認められた。したがって、各刺激によるプロモーター活性の増大に関与している配列は転写開始領域よりも下流の+41～+790 の領域に含まれていることが示唆された。これらの結果は、各種刺激によるシステム A の発現変動には複数の経路が関与していることを示しており、これらを同一の実験系で比較し、その機構を明らかにした本研究は、今後のトランスポーター活性制御に関する研究に有用な情報になるものと評価できる。

公開の発表会および口頭試問においては、多数の出席者を得て討論し、質疑には的確に回答した。また、4人の審査担当者による審査の結果、本論文「中性アミノ酸トランスポーターSNAT2の発現変動に関する研究」は、学位論文の水準に達しており、柏木 仁は博士（薬学）として研究面での十分な知見と能力を有しているものと認めた。