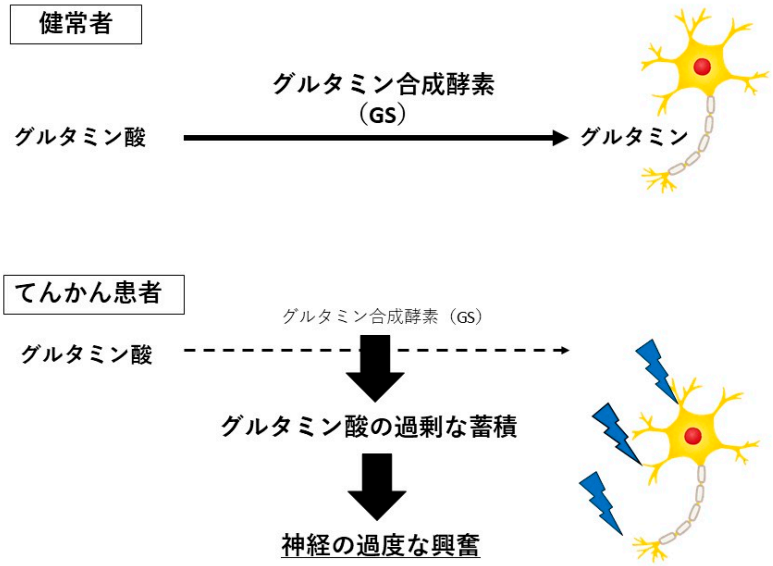
128　グルタミン合成酵素を起点としたてんかんの発症機序	岸川　咲吏

【目的】アストロサイトは脳細胞で唯一グルタミン合成酵素（Glutamine synthetase : GS）を発現し、GS を介して神経伝達物質ではあるが神経毒性をもつグルタミン酸を無害なグルタミンに変換する機能を有している。しかし、何らかの原因で GS の発現が減少すると、細胞間隙にグルタミン酸が過剰に蓄積する。てんかん患者ではグルタミン酸が過剰に蓄積したため神経細胞の過度な興奮が起きていると考えられている。近年、脳細胞以外の細胞で GS の発現が減少する原因として、オートファジーの亢進が報告された。しかし、アストロサイトの GS の発現を制御する分解系の有無については報告がない。我々は準備実験においてプロテアソーム阻害剤であり、オートファジーを誘導する作用をもつ MG132 を培養アストロサイトに添加したところ時間依存的に GS の発現が減少するという結果を得た。そこで、本研究課題ではオートファジーの活性化が GS の発現やアストロサイトの機能に与える影響、そしてアストロサイトの GS の分解経路について明らかにする。

【方法】本研究では、オートファジーの活性化がアストロサイトの GS の発現や機能に与える影響と GS の分解経路を調べるために、胎生ラットの大脳皮質由来の培養アストロサイトを用いて以下の検討を行った。1. MG132 を培養アストロサイトに経時的に添加し、GS とオートファジーマーカーである LC3 の発現変化についてウエスタンブロット法を用いて解析を行った。2. 培養アストロサイトに MG132 とオートファジー阻害剤を添加し、MG132 による GS の発現低下からの回復の程度について調べた。3. 2. の実験におけるアストロサイトの細胞形態の変化について観察した。

【結果】本研究の結果、1. MG132 を添加したことでオートファジー活性化の指標である LC3-2／LC3-1 は有意に増加した。しかし、2. MG132 添加による GS の発現減少を回復するためにオートファジー阻害剤を添加しても、GS の発現低下は回復しなかった。さらに、3. MG132 を添加したアストロサイトでは細胞萎縮や細胞死などが観察された。形態回復を目的に MG132 にオートファジー阻害剤を添加しても、細胞は縮小したままであった。

GS の発現減少によるてんかんの発症



128. グルタミン合成酵素を起点としたてんかんの発症機序

岸川　咲吏

新潟大学 研究推進機構 超域学術院

Key words：アストロサイト，てんかん，グルタミン合成酵素，分解系

緒　言

てんかんは、脳の神経細胞が過度に興奮することによって意識消失や痙攣がくりかえし起きる疾患である。てんかんの発症年齢は乳幼児から高齢者までさまざまである。てんかんの原因として出生時に脳が傷ついたり、低酸素症や脳炎、また脳梗塞などの脳への傷害が原因とされている［1］。

脳細胞は神経細胞とグリア細胞に大別される。グリア細胞の多くを占めるアストロサイトは、周囲の神経細胞から放出される神経伝達物質の授受やシナプス形成の補助を行っている。またアストロサイトは神経毒性を有するが神経伝達物質でもあるグルタミン酸とアンモニアを取り込み、グルタミン合成酵素（glutamine synthetase：GS）を介して無害なグルタミンに変換する、脳細胞で唯一の機能を持っている。

てんかん患者の脳ではGSの発現が低下していることが報告されている［2］。GSの発現が低下すると、細胞間隙にグルタミン酸が過剰に蓄積し、神経細胞が過度に興奮した状態が持続するためてんかん発作が起きると考えられている。しかし、GS の発現低下を引き起こすメカニズムについての報告はない。アストロサイトとは異なる細胞では GS の分解はプロテアソーム・ユビキチン系を介して起きることが報告されている［3］。そこで、アストロサイトの GS の発現低下の原因が分解系の亢進によるものだと考え、プロテアソーム・ユビキチン系の阻害剤である MG132 を培養アストロサイトに添加し GS の発現変化について検討した。結果、驚くべきことに、GS の発現は時間依存的に減少した。この結果からプロテアソーム阻害剤により、リソソーム分解系が亢進し、GSの発現減少が起きたと考えた。近年、MG132 は小胞体ストレスを介してオートファジーを誘導することが報告されている［4］。我々は、ストレス刺激によりオートファジー分解系が誘導され、GS の発現低下が起きた結果グルタミン酸が過剰に蓄積してしまい、神経細胞の過度な興奮状態が持続することでてんかん発作が起きると仮説を立てた。

そこで、本研究では計画 1 として、プロテアソーム阻害剤によるオートファジー誘導の有無を解析することで、アストロサイトのGSの分解経路について明らかにする。また計画2としてオートファジーの亢進によるGSの変化とアストロサイトの機能と形態変化について明らかにする。

方　法

1.　アストロサイトの初代培養

大脳皮質由来のアストロサイトは胎生 18 日の仔ラットから抽出し培養した。動物実験は新潟大学動物実験委員会の許可を得て行い、ガイドラインに沿って処置を行った。

2.　ウエスタンブロット

ユビキチン・プロテアソーム阻害剤として MG132、オートファジー阻害剤として 1 nM バフィロマイシン、10μM クロロキンを用いて時間依存的に培養アストロサイトに添加した。培地を PBS で 2 回洗浄し、lysis buffer を用いて　細胞を溶解、回収した。13,500 rpm、30 min、4℃にて遠心後に上清を回収し適切な濃度に調節した。8% SDS-PAGE を用いて電気泳動を行い、ニトロセルロースメンブレンに転写を行った。一次抗体に anti-mouse GS（millipore）、anti-mouse alpha-tubulin（Sigma）、anti-rabbit LC3（MBL）を用いて、4℃で o/n を行った。HRP 標識二次抗体で室温 1 時間放置後、LAS-4000 mini を用いて検出した。すべてのグラフは 3 回以上の独立した

実験の平均±SD を示す。alpha-tubulin を用いて標準化を行った。検定はすべて One-way ANOVA Dunnet の検定を用いた（*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001）。

結　果

1. MG132 添加はアストロサイトに発現する GS の分解を促進する

まず培養アストロサイトにプロテアソーム阻害剤である MG132 を時間依存的に添加し、オートファジーマーカーである LC3 が誘導されるかどうかについてウエスタンブロット法を用いて解析を行った。LC3 の細胞質型である LC3-1 はホスファチジルエタノールアミンが付加するとオートファゴソーム膜に誘引されて LC3-2 に変換される。そのため、オートファジー活性の指標として LC3-2／LC3-1 の比率を用いた［5］。MG132 添加後 72 時間までに LC3-1 の発現は変化しなかったが、LC3-2 の発現は MG132 添加後 24 時間で減少した。結果 LC3-2／LC3-1 の比率は MG132 を添加したことで減少し、オートファジーが促進していたことが明らかになった（図 1a）。次に、MG132 にオートファジー阻害剤を添加することで GS の発現低下から回復するかどうかについて解析した。オートファジー阻害剤には、クロロキンもしくはバフィロマイシンを用いた。MG132 刺激と同時にクロロキンを添加し、24 時間後に解析を行ったところ、LC3-2／LC3-1 の比率は増加傾向にあったが、GS の発現は回復しなかった（図 1b）。バフィロマイシンについても結果はクロロキンと同じく、MG132 添加による GS の発現減少からの回復には寄与しなかった（図 1c）。以上のことから、MG132 添加による GS の発現減少にはオートファジー分解系が寄与していない可能性が示唆された。また MG132 添加により小胞体ストレスや酸化ストレスが誘導されているかどうかについて、RNA シークエンス解析を用いて mRNA レベルで解析を行った。MG132 無添加に比べて、MG132 を 24 時間添加した細胞では、小胞体ストレスマーカーである ATF4 や ATF6 の発現量が 2 倍以上に増加していた。その一方で、GS の mRNA 発現量は、約 1／10 ほどにまで減少していた（未発表データ）。

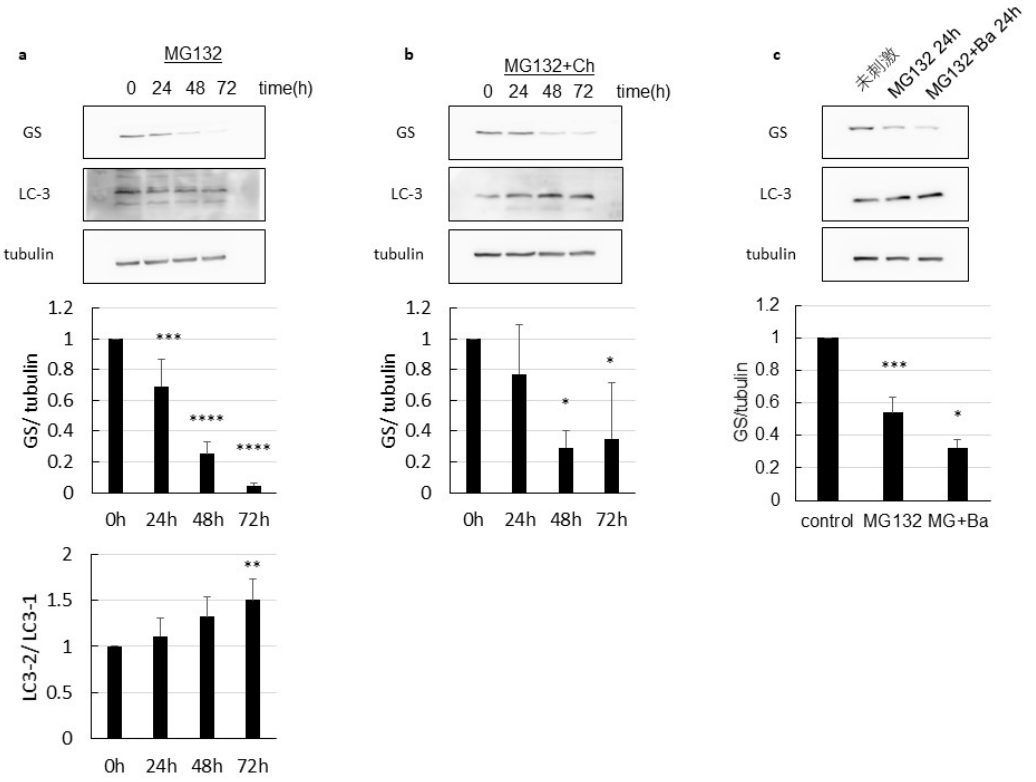


図 1. MG132 による GS の発現減少はオートファジー阻害剤の添加で回復できない

a）0.5μM MG132 を 24 時間ごとに添加。

b）0.5μM MG132 と 10μM クロロキン（Ch）を 24 時間ごとに添加。

c）0.5μM MG132 と 1nM バフィロマイシン（Ba）を 24 時間添加。

2. MG132 はアストロサイトの形態変化を引き起こす

タイムラプス法を用いて、MG132 添加によるアストロサイトの形態変化について解析を行った。MG132 を 0.5μM 添加し、72 時間後まで観察を行ったところ、48 時間後には細胞の萎縮や細胞死が観察されはじめた。72 時間後には、細胞がほとんど観察されなかった。また MG132 とオートファジー阻害剤を組み合わせてアストロサイトの形態変化について経時的に観察を行った。MG132 とクロロキン両添加を行った細胞では、MG132 のみの添加を行った細胞と同じく細胞萎縮、細胞死が観察された。以上の結果から、MG132 添加によるアストロサイトの形態変化に対し、オートファジー阻害剤を添加しても細胞の形態変化は避けられず、その形態を元の状態に回復できないことが明らかになった。

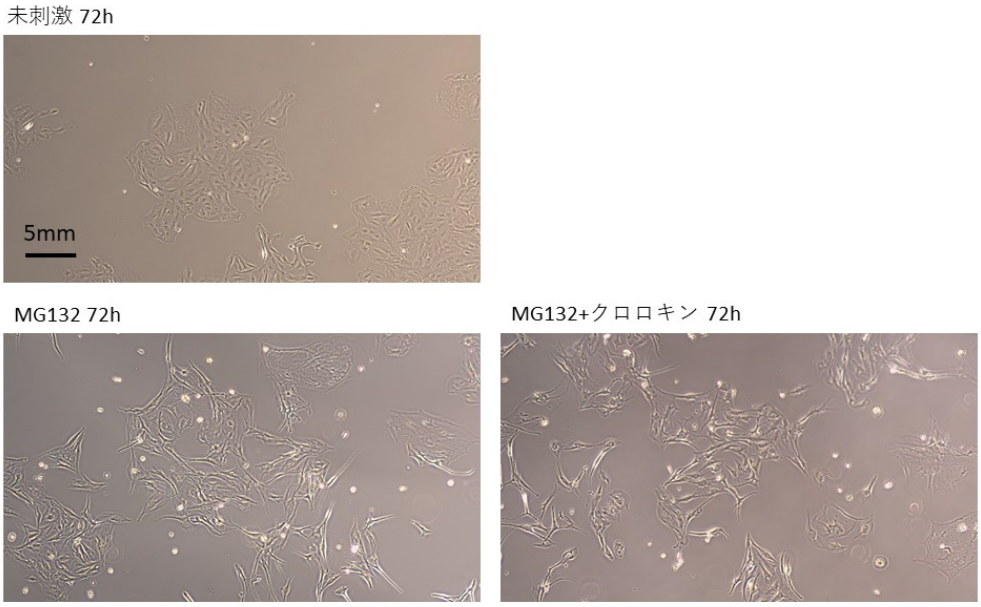


図 2. MG132 添加によりアストロサイトは萎縮する

a）未刺激のアストロサイト。

b）0.5μM MG132 を添加した 72 時間後のアストロサイト。

c）0.5μM MG132 と 10μM クロロキンを添加した 72 時間後のアストロサイト。

考　察

プロテアソーム阻害剤である MG132 を培養アストロサイトに添加することで、オートファジーマーカーである LC3-2／LC3-1 の比率が増加し、その結果に反比例するように GS の発現は減少したことから、MG132 添加による GS の発現減少にはオートファジーの活性化が寄与していることが考えられた。しかし、MG132 を添加したアストロサイトにオートファジー阻害剤であるバフィロマイシンやクロロキンを添加したが、GS の発現低下は回復しなかった。これは、MG132 添加による GS の発現減少にはオートファジーが関与していないことが示唆された。また、GS の mRNA 発現量が未刺激のアストロサイトよりも MG132 刺激アストロサイトで有意に減少していたことから、MG132 は GS の転写を抑制したと推察された。また、アストロサイト以外の細胞にも GS は発現しており、近年その上流因子の存在について報告された［6］。しかしアストロサイトに発現する GS の発現制御メカニズムやそれに関与する分子については報告がない。そのため、MG132 がオートファジー促進剤として働いた結果、GS の発現を制御する未知の上流因子の分解亢進により、タンパク質・遺伝子レベルで GS 発現が抑制されたとも考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔生化学分野の照沼美穂教授である。

文　献

1) Nguyen R, Téllez Zenteno JF. Injuries in epilepsy: a review of its prevalence, risk factors, type of injuries and prevention. Neurol Int. 2009 Nov 16;1(1):e20. PMID: 21577358 DOI: 10.4081/ni.2009.e20

2) Eid T, Tu N, Lee TS, Lai JC. Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy. Neurochem Int. 2013 Dec;63(7):670-81. doi: 10.1016/j.neuint.2013.06.008. Epub 2013 Jun 18. Review. PMID: 23791709 DOI: 10.1016/j.neuint.2013.06.008

3) Saitoh F, Araki T. Proteasomal degradation of glutamine synthetase regulates schwann cell differentiation. J Neurosci. 2010 Jan 27;30(4):1204-12. PMID: 20107048. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3591-09.2010

4) Bao W, Gu Y1, Ta L, Wang K, Xu Z. Induction of autophagy by the MG‑132 proteasome inhibitor is associated with endoplasmic reticulum stress in MCF‑7 cells. Mol Med Rep. 2016 Jan;13(1):796-804. Epub 2015 Nov 23. PMID: 26648402 DOI: 10.3892/mmr.2015.4599

5) Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. Autophagy. 2007 Nov-Dec;3(6):542-5. Epub 2007 Jun 19. PMID: 17611390 DOI: 10.4161/auto.4600

6) Cox AG, Hwang KL, Brown KK, Evason K, Beltz S, Tsomides A, O'Connor K, Galli GG, Yimlamai D, Chhangawala S, Yuan M, Lien EC, Wucherpfennig J, Nissim S, Minami A, Cohen DE, Camargo FD, Asara JM, Houvras Y, Stainier DYR, Goessling W. Yap reprograms glutamine metabolism to increase nucleotide biosynthesis and enable liver growth. Nat Cell Biol. 2016 Aug;18(8):886-896. doi: 10.1038/ncb3389. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27428308 DOI: 10.1038/ncb3389