

	コバヤシ ショウ
<b>氏 名</b>	<b>小林 翔</b>
本籍（国籍）	山形県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 609 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
<b>学位論文題目</b>	シスチン・グルタミン酸トランスポーターの生理機能に関する研究 (Studies of physiological functions of the cystine/glutamate transporter)
学位審査委員	主査 教授 佐藤 英世 副査 教授 永井 毅 副査 教授 木村 賢一 副査 教授 福島 道広

## 論文の内容の要旨

シスチン・グルタミン酸交換輸送系 (xc-系) は、輸送本体である xCT と細胞膜移行に関わる 4F2 heavy chain とのヘテロダイマーとして、哺乳類細胞原形質膜上に発現するアミノ酸トランスポーターの一つである。これまでの培養細胞を用いた研究により、細胞内の主要な抗酸化物質であるグルタチオン量の維持やシスチン・システイン比を指標とする細胞外レドックスバランスの維持に寄与するなど、生体抗酸化系として機能することが明らかとなっている。一方、xCT は、個体レベルで主に脳や胸腺、脾臓といった免疫系組織に構成的に発現していることが明らかとなっているが、その生理機能については十分に解明されていない。そこで、本研究では、xCT の生理機能を解明するための研究の一環として、以下の 2 つのテーマについて解析を行った。

第一章では、xCT が、個体レベルにおいても、抗酸化系としての機能を有するか明らかにするために、xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスと野生型 (WT) マウスに *in vivo* での酸化ストレス負荷モデルとしてパラコート投与を行い、その感受性について検討した。その結果、KO マウスでは、WT マウスに比べ、パラコートに対する感受性が高く、生存率が有意に低下することが明らかとなった。45 mg/kg のパラコートを投与し、経時的に肺のグルタチオンレベルを調べたところ、KO マウスおよび WT マウス共に経時的にグルタチオンの減少が見られたが、投与後 72 時間までは、どの時点においても KO マウスの方が WT マウスよりもグルタチオンが少なくなることが明らかとなった。RT-PCR 法によって、WT マウスの肺でも xCT mRNA の発現が認められたが、パラコート投与により、著しく増強された。また、グルタチオン合成の律速酵素であるグルタミン酸・システインリガーゼ触媒サブユニット (GCLC) mRNA もパラコート投与により、WT および KO マウスで共に誘導された。次に、肺胞マクロファージを単離し、xCT と GCLC の発現を調べた

ところ、肺胞マクロファージにおいては、**xCT mRNA** が構成的に発現しており、パラコート投与によって、*in vivo* で強く誘導されることが示された。**WT** および **KO** マウスの気管支肺胞洗浄液中のグルタチオンを測定したところ、総グルタチオン量と還元型グルタチオン量は、**WT** および **KO** マウスにおいて有意差はなかった。一方、パラコート投与によって、気管支肺胞洗浄液中の総グルタチオン量は **WT** および **KO** マウスにおいて同じように減少したが、還元型グルタチオンは、**WT** マウスより **KO** マウスの方が有意に低下することがわかった。以上により、**xCT** は、酸化ストレス下における肺組織のグルタチオン維持に寄与することが示された。また、**xCT** が、肺胞マクロファージにおいて構成的に発現していることを初めて明らかにした。

第二章では、各組織の代謝における **xCT** の関与を検討するために、メタボローム解析により主要組織の代謝物を網羅的に調べた。**WT** および **KO** マウスの心臓、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、肺、胸腺、大脳、小脳、精巣、血漿を単離し、メタボローム解析を行ったところ、ほとんどの組織において **WT** と **KO** マウスで代謝物に有意差は認められなかった。しかし、**xCT** が構成的に発現する組織である胸腺および脾臓において、トランススルフレーション経路の代謝中間体であるシスタチオニンが、**WT** マウスでは有意に検出されるのに対し、**KO** マウスでは全く検出されないことが明らかとなった。**Real-time PCR** 法で調べたところ、これらの組織では、シスタチオニンの合成と分解を触媒するシスタチオン-β-シターゼおよびシスタチオン-γ-リアーゼ (**CGL**) がほとんど発現していないことが分かった。これら結果は、シスタチオニンが、*in vivo* における **xCT** の生理的な輸送基質の一つとして機能している可能性を示唆した。**WT** の胚性線芽細胞 (**MEF**) において、シスタチオニンは、シスチン取り込みを濃度依存的に阻害した。また、シスタチオンを含んだ緩衝液で **WT-MEF** をインキュベートすると、シスタチオニンがない場合と比較して細胞からのグルタミン酸放出を有意に促進し、同時に細胞内へのシスタチオニンの蓄積が認められた。同様の実験を **KO-MEF** で行ったところ、グルタミン酸放出の促進やシスタチオニンの蓄積は見られなかった。これらのことから、シスタチオニンは、**xCT** を介してグルタミン酸と交換輸送される **xCT** の生理的基質であると考えられた。シスチン欠乏培地で **WT-MEF** を培養すると、細胞内グルタチオンが急速に減少して細胞は死滅するが、シスタチオンを共存させることにより、**WT-MEF** は、死滅せず細胞増殖が認められた。この時、細胞内グルタチオン量は、回復傾向を示した。一方、**KO-MEF** をシスタチオンを含むシスチン欠乏培地で培養しても、細胞死を回避することはできず、グルタチオンレベルも回復しなかった。以上のことから、シスタチオニンは、**xCT** によって取り込まれ、**CGL** の作用によりシステインとして供給されることで、細胞内グルタチオン量が維持され、結果として細胞保護的な効果を示すと考えられた。また、胸腺や脾臓で検出されるシスタチオニンは、もっぱら **xCT** を介する細胞外からの輸送に依存していると考えられた。

本研究により、**xCT** は、個体レベルでも、抗酸化系のひとつとして機能していることが初めて示された。また、シスタチオニンが、シスチン、グルタミン酸と同様に **xCT** の生理的基質であることが示され、免疫系組織に蓄積するシスタチオニンは、**xCT** に依存することが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

哺乳類細胞膜に発現するアミノ酸トランスポーターの一つであるシスチン・グルタミン酸交換輸送系 (x<sub>c</sub>-系) の輸送本体である xCT の生理機能については十分に解明されていない。本研究では、xCT 遺伝子欠損マウスを用いて xCT の個体レベルでの生理機能を解明するための研究の一環として、以下の点について解析を行った。

まず、xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスと野生型 (WT) マウスに *in vivo* での酸化ストレス負荷モデルとしてパラコート投与を行い、その感受性について検討した。その結果、KO マウスでは、WT マウスに比べ、パラコートに対する感受性が高く、生存率が有意に低下することが明らかとなった。パラコート傷害の主要標的臓器である肺について調べたところ、肺のグルタチオンレベルは、KO マウスおよび WT マウス共に経時的に減少したが、どの時点においても KO マウスの方が、WT マウスよりもグルタチオンが少なくなることが明らかとなった。次に、肺胞マクロファージを単離し、xCT の発現を調べたところ、肺胞マクロファージにおいては、xCT mRNA が構成的に発現しており、パラコート投与によって、*in vivo* で強く誘導されることが示された。WT および KO マウスの気管支肺胞洗浄液中のグルタチオンを測定したところ、総グルタチオン量と還元型グルタチオン量は、WT および KO マウスにおいて有意差はなかった。一方、パラコート投与によって、気管支肺胞洗浄液中の総グルタチオン量は、WT および KO マウスにおいて同じように減少したが、還元型グルタチオンは、WT マウスより KO マウスの方が有意に低下することがわかった。以上により、xCT は、酸化ストレス下における肺組織のグルタチオン維持に寄与することが示された。

次に、メタボローム解析により、xCT を構成的に発現する胸腺や脾臓で、トランススルフレーション経路の代謝中間体であるシスタチオニンが、KO マウスでは、まったく検出されないことから、シスタチオニンが *in vivo* における xCT の生理的な輸送基質の一つとして機能している可能性が示唆された。胚性線芽細胞 (MEF) を用いてこの可能性を検討したところ、シスタチオニンは、シスチン取り込みを濃度依存的に阻害した。また、シスタチオニンを含んだ液で WT-MEF をインキュベートすると、シスタチオニンがない場合と比較して細胞からのグルタミン酸放出を有意に促進し、同時に細胞内へのシスタチオニンの蓄積が認められた。同様の実験を KO-MEF で行ったところ、グルタミン酸放出の促進やシスタチオニンの蓄積は見られなかった。これらのことから、シスタチオニンは、xCT を介してグルタミン酸と交換輸送される xCT の生理的基質であると考えられた。

以上、本研究により、xCT は、酸化ストレス下においては、組織グルタチオンレベルの維持に寄与することによって、生体抗酸化系として機能していることが個体レベルで初めて示された。また、シスタチオニンは、xCT の生理的基質であり、グルタミン酸との交換輸送により、細胞内に取り込まれることを明らかにするとともに、胸腺や脾臓のような免疫系組織で検出されるシスタチオニンは、xCT による輸送に依存することを示した。これらの結果は、xCT の生理機能として加えられるべき新しい知見である。

よって、本審査委員会は、本論文を博士 (農学) の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文  
(主論文)

Kobayashi, S., Kuwata, K., Sugimoto, T., Igarashi, K., Osaki, M., Okada, F., Fujii, J., Bannai, S., and Sato, H. (2012) Enhanced expression of cystine/glutamate transporter in the lung caused by the oxidative stress-inducing agent paraquat. *Free Radic. Biol. Med.* 53: 2197-2203.

(参考論文)

Massie, A., Schallier, A., Kim, S-W., Fernando, R., Kobayashi, S., Beck, H., De Bundel, D., Vermoesen, K., Bannai, S., Conrad, M., Plesnila, N., Sato, H., and Michotte, Y. (2011) Dopaminergic neurons of system xc<sup>-</sup> deficient mice are highly protected against 6-OHDA induced toxicity. *FASEB J.* 25: 1359-1369.