

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 cystine/glutamate transporter)

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
ゲノム工学連合講座

小林 翔
主指導教員 佐藤 英世

目次

略号一覧	6
要旨	7
研究の背景と目的	9
1. シスチン・グルタミン酸トランスポーター (x _c 系) について	9
2. グルタチオンについて	12
3. 研究目的	13
付図	14
Table.1 哺乳類におけるアミノ酸トランスポーター	14
Fig.1 哺乳類細胞におけるシスチン・グルタミン酸トランスポーターの模式図	15
第一章 肺における xCT の発現とその機能	16
緒言	16
実験方法	18
1. 試薬および試薬調製	18
2. 実験動物	18
3. 組織固定および各種染色	19
4. 肺組織からの total RNA 抽出	19
5. 肺胞マクロファージからの total RNA 抽出	19
6. cDNA の合成	20
7. 標的 cDNA の増幅 (半定量 PCR)	20
8. 標的 mRNA の発現量の相対定量 (real-time PCR)	20
9. シスチン取り込み活性の測定	21
10. 肺組織からの総グルタチオンサンプリング	22
11. 総グルタチオンの定量	22
12. BALF サンプルからの HPLC サンプリング	22
13. 肺胞マクロファージからの HPLC サンプリング	23
14. HPLC によるシステインおよび GSH の測定	23
15. タンパク質の定量	23
16. 統計解析	24

結果	25
1. パラコート投与による生存率の変化	25
2. パラコート投与による肺組織の組織学的解析	25
3. パラコート投与による総グルタチオン量の経時変化	25
4. パラコート投与における肺組織での xCT と GCLC の発現	26
5. 肺胞マクロファージにおける xCT の発現とパラコート投与による変動	26
6. パラコート投与における肺胞マクロファージ内のシステインと GSH 量	26
7. パラコート投与における BALF 中の total GSH および GSH 量	27
考察	28
付図	32
Table. 2 半定量 RT-PCR におけるプライマーセット	32
Table.3 Real-time RT-PCR におけるプライマーセット	32
Fig. 2 パラコート投与による生存曲線	33
Fig. 3 パラコート投与後の組織化学・免疫化学的解析	34
Fig. 4 パラコート投与による肺組織の total GSH の経時変化	35
Fig. 5 パラコート投与における肺組織での xCT と GCLC の発現	36
Fig. 6 肺胞マクロファージにおける xCT と GCLC の発現	37
Fig. 7 パラコート投与における肺胞マクロファージのシステインと GSH 量	38
Fig. 8 パラコート投与における BALF の total GSH および GSH 量	39
第二章 x_c系によるシスタチオニンの輸送とその機能	40
緒言	40
実験方法	42
1. 試薬および試薬調製	42
2. 実験動物	42
3. 培養細胞	42
4. シスタチオニン血症モデルマウスの作製と血漿および各組織の採取	42
5. 細胞外液中アミノ酸分析のサンプリング	43
6. 組織内アミノ酸分析のサンプリング	43
7. 細胞内アミノ酸のサンプリング	43
8. アミノ酸分析	44
9. 組織からの total RNA 抽出	44

10. 細胞からの total RNA 抽出	44
11. cDNA の合成	44
12. real-time PCR による標的 mRNA の発現量の相対的定量	44
13. シスチン取り込み活性の阻害能の測定	45
14. 細胞内総グルタチオンの定量	45
15. HPLC によるシステイン測定用のサンプリング	46
16. HPLC によるシステインおよび GSH の測定	46
17. タンパク質の定量	46
18. 統計解析	46
結果	47
1. マウスのメタボローム解析	47
2. 胸腺および脾臓における CBS と CGL の発現解析	47
3. PPG 投与による各組織および血漿におけるシスタチオニンの変動	47
4. シスチン取り込みに対するシスタチオニンの阻害効果	48
5. 細胞外シスタチオンと細胞内グルタミン酸との交換輸送	48
6. シスチン欠乏下におけるシスタチオニンの細胞保護効果の検討	49
考察	51
付図	56
Table. 4 Real-time RT-PCR におけるプライマーセット	56
Fig. 9 各組織におけるシスタチオン量	57
Fig. 10 各組織における xCT mRNA および CBS mRNA、CGL mRNA 発現	58
Fig. 11 シスタチオン血症におけるシスタチオニンの変動	59
Fig. 12 WT-MEF のシスチン取り込み活性に対するシスタチオニンの影響	60
Fig. 13 シスタチオン添加による WT および KO-MEF における 細胞内シスタチオン量の比較	61
Fig. 14 シスタチオン添加による WT および KO-MEF からのグルタミン酸の放出	62
Fig. 15 WT および KO-MEF におけるシスタチオニンの細胞生存への影響	63
Fig. 16 WT および KO-MEF におけるシスタチオニンの細胞内システイン と総グルタチオン量への影響	64
Fig. 17 WT および KO-MEF におけるシスタチオニンの xCT mRNA および CGL mRNA、GCLC mRNA 発現への影響	65
Fig. 18 xCT の輸送基質の構造	66

結語	67
謝辞	68
引用文献	69

略語一覽

4F2 hc: 4F2 heavy chain
LPS: lipopolysaccharide
TNF α : tumor necrosis factor
EpRE: electrophile responsive element
ARE: antioxidant responsive element
AARE: amino acid responsive element
ATF4: activating transcription factor 4
GSH: glutathione (reduced form)
MEF: mouse embryonic fibroblast
2-ME: 2-mercaptoethanol
NAC: *N*-acetylcysteine
EAAT: excitatory amino acid transporter
ROS: reactive oxygen species
GCL: glutamate-cysteine lygase
GCLC: glutamate-cysteine lygase catalytic subunit
GCLM: glutamate-cysteine lygase modified subunit
GSSG: glutathione (oxidized form)
GR: glutathione reductase
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ELF: epithelial lining fluid
PBS: phosphate buffered saline
BALF: bronchalveolar lavage fluid
8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
4-NHE: 4-hydroxy-2-nonenal
cDNA: complementary DNA
PCR: polymerase chain reaction
TCA: trichloroacetic acid
mBBr: monobromobimane
CBS: cystathionine β -synthase
CGL: cystathionine γ -lyase
CE-TOFMS: capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry
PPG: DL-propargylglycine
eIF-2 α : eukaryotic initiation factor-2 α

要 旨

シスチン・グルタミン酸交換輸送系 (x_c 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、トランススルフェ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ニン- β -シターゼおよびシスタチオニン- 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。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、シスタチオニ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 をシスタチオニ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。

研究の背景

シスチン・グルタミン酸トランスポーター (x_c 系) について

哺乳類細胞は、必須アミノ酸および生合成だけでは賄いきれない非必須アミノ酸を細胞外液から取り込んでいる。アミノ酸輸送機構は、1950年代から培養細胞や膜標本を用いて、その同定、分類がなされ、アミノ酸分子の多様性を反映して多くの輸送系が記載されてきた(1)。これらのアミノ酸輸送系は、個々のアミノ酸に対してそれぞれ独立した輸送系が存在するのではなく、類似した側鎖を持つ複数のアミノ酸が、同一の輸送系によって輸送される。一般に、原形質膜のアミノ酸トランスポーターは、側鎖の性質や Na^+ 依存性などから分類されており、哺乳類では、酸性アミノ酸トランスポーター (X_{AG} -系、 x_c -系など)、中性アミノ酸トランスポーター (ASC系、L系、A系など)、塩基性アミノ酸トランスポーター (y^+ 系など) などに分類される (Table.1)。シスチン・グルタミン酸トランスポーター (x_c 系) は、主に細胞外液の三極性型のシスチンと細胞内のグルタミン酸とを Na^+ 非依存的に 1対1で交換輸送する輸送系として報告された酸性アミノ酸トランスポーターである (Fig. 1) (2)。シスチンは、システイン 2分子が酸化されてジスルフィド結合したものである。 x_c 系は、シスチンとグルタミン酸の他にも、 α -アミノアジピン酸、 α -アミノピメリン酸、ホモシステイン酸といった三極性型を取り、シスチンと類似の大きさの分子を認識するが(3,4)、アスパラギン酸やシステイン酸といった側鎖の短い分子や、逆に側鎖がより長いホモシスチンのような分子は認識しない。

このトランスポーターは、マウスでは 502 個のアミノ酸残基から成り、12 回膜貫通領域を持つ xCT と 526 個のアミノ酸残基から成り、1 回膜貫通領域を持つ 4F2 heavy chain (4F2hc) とのヘテロダイマーとして発現する(5-9)。構造の特徴などから xCT が輸送を司る本体であり、4F2hc は、 xCT の膜への移行を助ける働きを有すると考えられている。

xCT の発現を誘導する刺激としては、ジエチルマレイン酸のような SH 基などと反応する性質を持つ親電子性試薬(10)、活性酸素や酸化変性したリポタンパク質などの酸化ストレス(11)、免疫系を活性化する細菌性リポ多糖 (LPS) や腫瘍壊死因子 (TNF) α などのサイトカイン(12)、食品由来のポリフェノールなど、きわめて多様である。 xCT 遺伝子上流には親電子性物質応答配列 (electrophile responsive element: EpRE) / 抗酸化物質応答配列 (antioxidant responsive element: ARE) が 4ヶ所存在している。この領域を認識する転写因子として Nrf2 が知られている。通常、Nrf2 は細胞質に存在し、同じく細胞質に存在する Keap1 と呼ばれるタンパク質と結合している(13)。この Keap1 は細胞骨格のアクチンと結合し、さらに、ユビキチン・プロテアソーム系による分解を受けるため、Nrf2 の核移行が抑制されている状態にある。しかし、誘導刺激により、Nrf2 は、Keap1 から解放され、核内に移行し、EpRE/ARE を認識して xCT

などの抗酸化系関連遺伝子の転写を活性化する(14)。また、アミノ酸欠乏やツニカマシ
ンといった小胞体ストレスを誘発する刺激においても xCT の発現が誘導されることが
知られている。この場合は、xCT 遺伝子 5'上流に位置する 2 つのアミノ酸応答配列
(amino acid responsive element: AARE) を認識する転写因子である活性化転写因子 4
(activating transcription factor 4: ATF4) により、xCT 遺伝子の転写が活性化される
ことによって発現が誘導されることが示されている(15)。

個体レベルで xCT mRNA が恒常的に発現しているのは、脳室周囲器官である最後野
と脳弓下器官、脳脊髄膜のクモ膜など脳の特異的部位に加え(16)、胸腺や脾臓(17)に限
られている。最近、当研究室において、パイエル板、腸間膜リンパ節、鼠径リンパ節、
骨髄などの免疫系組織にも xCT mRNA の構成的発現が認められることが明らかとなっ
た(未発表データ)。これらのことから、xCT は、特に神経系と免疫系組織で何らかの
生理機能を担っていることが推定されたが、詳しい機能については、未だ解明されてい
ない。

哺乳類培養細胞を用いた研究から、xc系の生理的役割は、①グルタチオン合成やタン
パク質合成に必要なシステインをシスチンという形で供給すること、②細胞外のシスチ
ンとシステイン比を指標とするレドックスバランスを維持すること、③シスチンの取り
込みに伴って、グルタミン酸を細胞外に放出すること、の 3 点に集約されることが分か
っている。通常、培地中のシステインは、ほとんど空気酸化されてシスチンとして存在
する。細胞内に取り込まれたシスチンは、速やかに還元されて、システインとなり、グ
ルタチオン合成や各種のタンパク質合成に使われる。一方で、細胞内のシステインの一
部は、構成的に発現している中性アミノ酸トランスポーター (ASC 系など) を介して
細胞外に放出される。そして再び、空気酸化を受けてシスチンとなり、xc系により細胞
内に取り込まれる。このように、細胞培養系では、シスチン・システインサイクルと呼
ばれる代謝系が働いており、このサイクルの効率は、xCT によるシスチンの取り込み
活性に依存する。この結果、培養初期では、培養液中にほとんど検出されないシステ
インが、徐々に培養液中に検出されるようになり、培養を続けることにより、一定の割合
で存在するようになる。このような定常状態における細胞外のシスチン・システインの
比は、血漿中のシスチン・システイン比の値に近づくことから、シスチン・システイン
サイクルは、細胞が培養系で生存する際の適応応答の一種と考えられている。

個体レベルにおける xCT の役割をより詳しく解析するために、xCT 遺伝子欠損(KO)
マウスが作製された(18)。この KO マウスは見かけ上正常であり、生殖能力にも問題は
なく、組織学的解析において野生型(WT)マウスとの間に有意な差はないが、血漿中
シスチンレベルが KO マウスの方が WT マウスよりも有意に高く、また、還元型グル
タチオンが低くなっていることから、血漿レドックスバランスが酸化状態にシフトして
いる。KO マウスから樹立されたマウス胚性線維芽細胞(MEF)は、2-メルカプトエタ
ノール(2-ME)やN-アセチルシステイン(NAC)、ビタミンEといった還元物質の添

加を必要とし、これらの還元物質が存在しない条件で培養すると、およそ 24 時間の培養でほとんどの細胞が死滅する。KO-MEF の培養において、2-ME を培地中に添加することにより、2-ME がシスチンに作用してシステインおよび 2-ME とシステインの混合ジスルフィドが生じ、これらを細胞が中性アミノ酸トランスポーターを介して細胞内に取り込むことで、細胞にシステインを供給させることができる(19)。また同様に、NAC を培地中に添加した場合は、NAC 自身が中性アミノ酸トランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、細胞内へのシステイン供給源として機能する。KO マウスは、主に血漿中および組織液中に一定量存在するシステインを中性アミノ酸トランスポーターを介して細胞内に取り込んでいるため、見かけ上、正常に生育できると考えられている。

xCT とがんまたは神経変性疾患との関連が注目を集めるようになった。がん治療の一つに抗がん剤を用いた化学療法があるが、xCT が強く発現するがん細胞では、多くの抗がん剤の効き目が弱まることが報告されている(20-22)。これは、xCT が高発現することによって上昇した細胞内グルタチオンが、グルタチオン-S-トランスフェラーゼを介して抗がん剤を抱合し、細胞外へ排出させることで引き起こされるためであると考えられている。また、脳腫瘍の大部分を占めるグリオーマにおいても xCT が高発現していることが示されており、グルタチオンによる抗がん剤耐性作用に加えて、xCT を介して放出されるグルタミン酸が、グリオーマの増殖や浸潤を促進することが報告されている(23)。したがって、xCT の阻害剤を用いたり、xCT 遺伝子の発現を抑えたりすることによって、抗がん剤の効き目を効率的にする研究も盛んに行われている(24-26)。xCT の阻害剤としては、スルファサラジン (sulfasalazine) や(S)-4-カルボキシフェニルグリシン ((S)-4-carboxyphenylglycine) といった低分子化合物が発見されており、多くの研究において xCT 阻害剤として用いられている(24,27)。xCT が、がん治療の標的となることから、xCT 阻害剤の類似物質を用いて、より xCT への特異性の高い化合物の探索も行われている(28)。Sonam らは多くのがん細胞において変異が認められている Ras の高発現細胞を死滅させる効果を持つ低分子化合物を発見し、これをエラスチン (erastin) と名づけた(29)。ごく最近になってエラスチンは細胞のシスチン取り込み阻害することが明らかとなり、現在ではエラスチンが xCT の特異的な阻害剤であるかどうかの研究が進められている(30)。また、最近、がん細胞において膜抗原である CD44 のスプライスバリエント (CD44v) が、細胞膜上での xCT の安定化に寄与することが報告され、この CD44v の特異的な siRNA によって、抗がん剤の効率を高めることができること示された(31)。パーキンソン病やアルツハイマー病といった神経変性疾患では、神経細胞死とそれらの疾患との関わりが多く論じられており、神経細胞死の一つの要因として、グルタミン酸による興奮毒性が挙げられている。脳においてグルタミン酸は、興奮性の神経伝達物質としてシナプス間隙に放出され、グルタミン酸受容体を介して興奮が伝達される。このとき、余分なグルタミン酸は、速やかに神経細胞または近傍のグリア細胞に発現する興奮性アミノ酸トランスポーター (EAAT) によって回収さ

れ、シナプス間隙中のグルタミン酸濃度が維持されている(32-34)。もし、シナプス間隙中のグルタミン酸の回収が適切に行われなければ、神経細胞は慢性的なグルタミン酸受容による興奮毒性により死滅する。xCT はシスチンを取り込む際にグルタミン酸を放出するので、細胞外グルタミン酸濃度にも寄与する。実際、KO マウスと WT マウスを比較すると、細胞外液中のグルタミン酸濃度は、KO マウスの方が有意に低いことがわかり、xCT が脳において細胞外のグルタミン酸濃度制御に寄与することが示された(35)。また、前述の通り、グリオーマにおいて xCT は高発現しており、xCT を介してグルタミン酸を放出し、その興奮毒性により神経細胞を死滅させることが報告されている(27)。マクロファージにおいて低濃度の LPS が、xCT を強く誘導することが知られており(12)、好中球においてもザイモザンやホルボールエステルといった免疫賦活剤によって xCT の発現が増大することが分かっている(36)。これらの細胞における xCT 発現の増大は、細胞内にシステインを供給し、免疫応答に対する準備をしていると考えられている。マクロファージや好中球といった自然免疫細胞は貪食作用による異物の除去や微生物の殺菌作用が良く知られているが、微生物の殺菌の際には、NADPH オキシダーゼやミエロペルオキシダーゼ、誘導性一酸化窒素合成酵素によって生じるスーパーオキシドアニオンや次亜塩素酸、一酸化窒素、またこれらの活性酸素種 (ROS) が反応した多様な ROS が用いられる。これらの ROS は貪食作用によって取り込んだ微生物だけでなく、マクロファージや好中球自身自身にも酸化ダメージを生じさせるが、これらの細胞は xCT 発現増強によって細胞内グルタチオン量を高め、酸化ダメージに対する防御機構を高めていると考えられている。また、獲得免疫において主要な役割を演じるリンパ球はその活性化のためにシステインが必須であるが、これらの細胞は xCT を発現しないため、細胞内システイン量は中性アミノ酸トランスポーターを介する細胞外からのシステイン取り込みに依存している。このとき、マクロファージなどの xCT を発現する周囲の細胞は、中性アミノ酸トランスポーターからシステインを細胞外液中に放出し、リンパ球へのシステイン供給に寄与すると考えられている(37)。

グルタチオンについて

グルタチオンは、細菌類から高等動植物に至るまで、高濃度に存在する低分子チオール化合物である。グルタミン酸とシステイン、グリシンから成るトリペプチドで、グルタミン酸・システイン結合酵素 (GCL) とグルタチオンシンテターゼの働きにより細胞質で合成される。GCL は触媒サブユニット (GCLC) と調節サブユニット (GCLM) からなるヘテロ二量体として機能する。GCL は、グルタチオンによりネガティブフィードバックを受けており、GCL 活性がグルタチオン合成の律速となっている。哺乳類培養細胞において、グルタチオン合成に必要なアミノ酸のうち、グルタミン酸とグリシンは細胞内に比較的豊富に存在するが、システインは一部の細胞を除いて合成が不十分であるため細胞内の存在量が少ない。このため、細胞内システイン濃度もグルタチオン

合成の律速因子であることが示されている(38,39)。したがって、ほとんどの哺乳類培養細胞において、細胞内へのシステイン供給は、 x_c 系を介したシスチン取り込みに依存している。細胞内のグルタチオンの役割には、活性酸素種 (ROS) の消去やレドックスバランスの制御、グルタチオンの抱合反応による薬物の解毒作用、タンパク質の機能制御、システインのプールなどがある。

細胞内で生じる ROS は、動脈硬化や糖尿病、免疫疾患、がんに関連するという報告が多く、老化や細胞死との結び付きも大きい。細胞内の ROS を消去するため、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) などの抗酸化酵素やグルタチオン、ビタミン C、ビタミン E などの抗酸化物質が細胞内で協調的に働いている。この際、グルタチオンは、GPX を介して過酸化水素や過酸化脂質を解毒消去し、酸化型グルタチオン (GSSG) に変化する。GSSG は、グルタチオンリダクターゼ (GR) とペントースリン酸経路から供給される NADPH とにより再び還元型グルタチオン (GSH) に還元される。通常、GSH と GSSG の比は 100:1 前後になるように維持されるため、細胞内は還元的な状態となっている。しかし、過剰な酸化ストレスの負荷や GR 活性が不十分な場合は、細胞に GSSG が蓄積する。蓄積した GSSG は、細胞外へ ATP 依存的に放出されると同時に、GCL をはじめ酸化ストレスに応答する様々な遺伝子の転写誘導が起こることにより、酸化ストレスが軽減される。

研究の目的

シスチン・グルタミン酸トランスポーターに関する研究は、これまで主に培養細胞を用いて行われており、酸化ストレス下における細胞内グルタチオンの維持、細胞外のレドックスバランスの維持、細胞外へのグルタミン酸の放出が、主要な機能として明らかとなった。 xCT は、個体レベルで主に脳や胸腺、脾臓などの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に、 xCT が個体レベルでも生体抗酸化系として機能するかどうかを明らかにすることを目的として KO マウスを用いた解析を行った。また、 xCT の新しい生理機能の探索を目的にメタボローム解析を行い、得られた結果から、 xCT の新規機能について検討した。

Table.1 哺乳類細胞における主要なアミノ酸トランスポーター

	輸送系	輸送基質	構造
中性アミノ酸 トランスポーター	A	Ala, Gly Pro	ATA1-3
	ASC	Ala, Ser Cys	ASCT1, ASCT2
	L	Leu, Ile Val,	LAT1/4F2hc, LAT2/4F2hc
塩基性アミノ酸 トランスポーター	y ⁺	Arg, Lys	CAT1-4
	b ^{0,+}	Arg, Leu Cyss	BAT1/rBAT
	y ⁺ L	Lys, Leu	y ⁺ LAT1/4F2hc, y ⁺ LAT2/4F2hc
酸性アミノ酸 トランスポーター	X _{AG} ⁻	Asp, Glu	EAAT1, GLT-1, GLAST, EAAT4, EAAT5
	x _c ⁻	Cyss, Glu	xCT/4F2hc

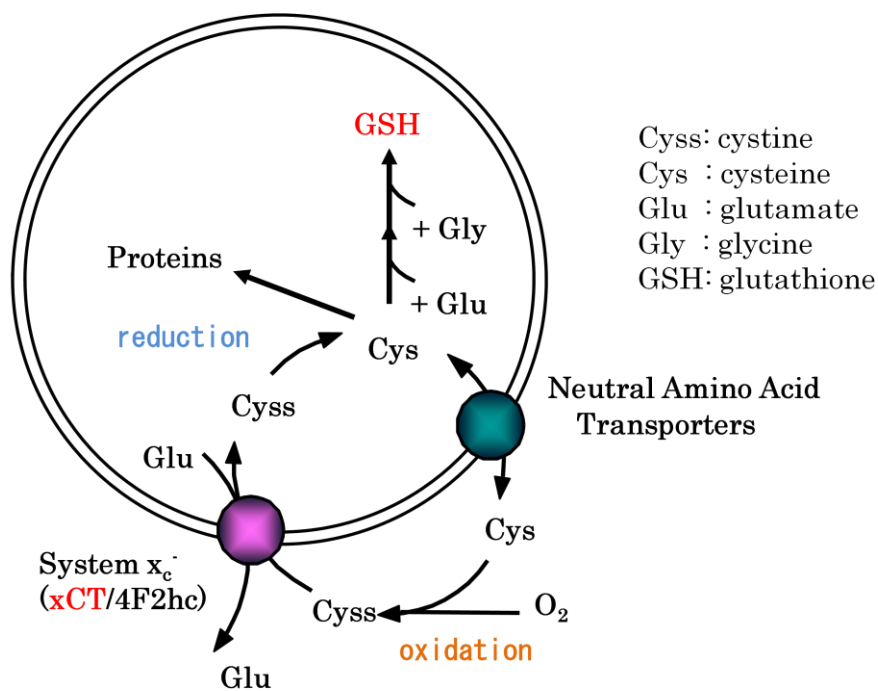


Fig. 1 哺乳類細胞におけるシスチン・グルタミン酸トランスポーターの模式図
 細胞外のシスチンは、 x_c^- 系を介して細胞内のグルタミン酸と1:1の交換輸送により細胞内に取り込まれる。取り込まれたシスチンは、還元されシステインとなり、グルタチオン（GSH）合成やタンパク質合成に利用される。また、還元されたシステインの一部は、中性アミノ酸トランスポーターから細胞外に輸送され、培地のレドックスバランスの維持に寄与する。

第一章 肺における xCT の発現と機能

緒言

肺の主な機能は、肺胞で行われるガス交換である。肺胞周囲には毛細血管網が形成されており、ここを血液が通過するときに赤血球中の二酸化炭素と呼吸によって肺胞までたどり着いた酸素が交換される。肺胞腔に面する肺胞上皮は、I型肺胞上皮細胞とII型上皮細胞から構成される。I型肺胞上皮細胞は、きわめて薄い細胞質を有し、肺胞壁の大部分を覆っている。一方で、II型肺胞上皮細胞は、肺胞表面の10%にすぎないが、脂質とタンパク質の混合物である表面活性物質を分泌し、肺の呼吸機能を高める働きをしている。

肺は、呼吸を介して異物（刺激物や大気汚染物質）や微生物が侵入しやすい器官であり、それに対する防御機構が備わっている。気管支上皮および肺胞上皮は、杯細胞や粘膜下の腺から分泌された上皮被覆液（epithelial lining fluid: ELF）に覆われている。このELFは、ムチンや免疫グロブリン、リゾチーム、抗プロテアーゼを含んでおり、これらは細菌の機能を低下させる。また、粘液に吸着された異物や微生物は、上皮細胞の線毛の運動によって咽頭に運ばれ、咳やくしゃみによって体外に排出される。また、肺胞には、血中から滲出した単球に由来するマクロファージが常在し、肺胞マクロファージとよばれる。肺胞マクロファージは、呼吸によって取り込まれた異物、微生物に対して貪食作用を示し、異物や微生物を除去する働きを担っている。これらの機能により、細菌感染や異物による損傷から肺は保護されている。

喫煙による過剰な酸化ストレスやアスベストや排気ガスの粉塵といった慢性的な外来異物の吸引は、肺損傷と関わりが深い。実験的な肺損傷発症モデルは数多くあるが、中でもパラコート（1,1'-ジメチル-4,4'-ビピリジニウムジクロリド）が多くの研究で使用されている。パラコートは、ビピリニジウム系の非選択型除草剤の一つであり、哺乳動物に強い毒性を示す(40)。パラコートは、NADPHや酸素と反応して活性酸素を発生させるため(41,42)、個体レベルの酸化ストレスの負荷モデルとして頻繁に用いられている。あらゆる臓器の損傷を伴うが、特に肺に対する損傷がパラコート中毒の代表的な症状として知られている(43)。ヒトの場合、服毒すると嘔吐や喉の痛み、その後肝機能障害を経て肺線維症を併発し、死に至ることもある。この肺における毒性は、肺組織に特に高濃度にパラコートの蓄積が認められることに起因している(42,43)。ラットにパラコートを投与すると、血漿や各組織の中で、肺において高濃度の蓄積が見られ、投与後、12.5日後に死亡したラットの肺にもパラコートが残留していた事が報告されている(44)。パラコートは、生体内に存在するNADPHがパラコートを還元する電子供与体として消費されることにより、パラコートラジカルとなる(41,45)。生じたパラコートラジカルが酸素と反応するとスーパーオキシドアニオンを発生する。さらに、パラコートラジカルは、スーパーオキシドアニオンと反応し過酸化水素を生じる。また、スー

パーオキシドアニオン同士の反応によっても過酸化水素ができる。以上のように、生体内ではパラコートラジカルの形成に始まり、種々の ROS が産生され、肺組織を始めとして各臓器に酸化ストレスによる障害を引き起こす。

パラコートは、培養系でも酸化ストレスを生じることが知られており、培養細胞に添加すると酸化ストレス誘導タンパク質として知られるヘムオキシゲナーゼ-1 の合成を誘導するという報告がある(46)。また、腹腔マクロファージでは、パラコート添加により、Nrf2 を介して xCT の発現を誘導することも示されている(47)。

当研究室の以前の研究で、肺組織で xCT が発現するかどうか検討したところ、通常状態の肺組織において、ノーザンブロット法では、xCT mRNA の発現は検出されなかった。しかし、細菌の細胞壁成分である細菌性リポ多糖 (LPS) を大量に投与したマウスの肺組織から抽出した RNA を用いてノーザンブロット解析を行うと、xCT mRNA が強く誘導されることが明らかとなった(17)。また、腹腔マクロファージを用いた実験で、LPS 添加による xCT の発現には酸素の存在が必須であることも示されている(48)。これらのことから、異物や酸化ストレスによって肺組織においては、xCT の発現が誘導される可能性が考えられ、特に、肺胞腔に存在する肺胞マクロファージは、比較的高濃度の酸素の存在下で、異物や微生物に曝されているため、xCT を発現する可能性が考えられた。そこで、本章では、個体レベルでの酸化ストレスモデルとして、特に肺組織に損傷を及ぼすことが知られているパラコート投与による酸化ストレス負荷モデルにおいて、WT および KO マウスにどのような影響が見られるか明らかにすることを目的として以下の解析を行った。

実験方法

1. 試薬および試薬調製

パラコート (1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium dichloride) は、コスモバイオ株式会社 (東京) から購入した。これを生理食塩水に溶かし、4.5 mg/mL に調製した。特に記載がない場合、試薬は和光純薬工業株式会社 (大阪) もしくは SIGMA-ALDRICH (St. Louis, USA) から購入した。

2. 実験動物

14~16 週の C57BL/6 野生型マウス (WT) と C57BL/6J 由来の xCT 遺伝子欠損マウス (KO) (18) を使用した。xCT 遺伝子欠損マウスは C57BL/6J マウスと 10 回以上バッククロスを行ったマウスを使用した。4~6 匹を実験動物用床敷 (オリエンタル酵母株式会社, 東京) を敷いた同一ケージで飼育し、市販の固形飼料 (オリエンタル酵母株式会社, 東京) と水道水を自由摂取させた。室温は 22 ± 2 °C、湿度 40~60%、12 時間の明暗周期で飼育を行った。

WT および KO マウスに対して、45 mg/kg パラコートをマウス腹腔内に単回投与することで酸化ストレス負荷モデルを作製した。マウスをエーテル麻酔し、頸椎脱臼をした後、速やかに肺を摘出した。RNA サンプルは採取された後、直ちに液体窒素を用いて瞬間的に凍結し、使用するまで -80 °C で保存した。総グルタチオン測定用サンプルは、採取した後、湿重量を測定し、5% トリクロロ酢酸の中に沈め、総グルタチオンサンプルリングまで氷上に放置した。また、ブアン固定用サンプルは、採取後直ちにブアン固定を行った。

気管支肺胞洗浄液 (BALF) および肺胞マクロファージを採取する場合は、パラコート投与後 24 時間後に、マウスをエーテルで麻酔し、下大静脈から脱血後、気管を露出した。気管に 22G 翼状針 (株式会社トップ, 東京) を刺し、タコ糸で気管ごと結紮した。肺に 0.1% EDTA 含有リン酸緩衝液 (0.1% EDTA/PBS) 1.5 mL を 2.5 mL シリンジ (TERUMO, 東京) を用いて注入し、胸部を軽くマッサージを行ってから、BALF を回収した。肺に 1.5 mL 注入すると約 1 mL の BALF が回収できた。これ以降は 0.1% EDTA/PBS を 1.0 mL 注入して、同様な操作を 4 回繰り返した。肺に 1.0 mL 注入すると約 0.8 mL の BALF が回収できた。BALF がおよそ 3 mL になったところで、遠心分離 (室温・4,500 rpm・5 分間) を行い、その上清を BALF サンプルとして採取した。沈殿を 0.1% EDTA/PBS を 1 mL で再懸濁し、数匹分まとめて遠心管に回収し、遠心分離 (室温・1,000 rpm・5 分間) した。上清を取り除き、タッピングすることで沈殿を壊した後に、リン酸緩衝液 (PBS) で再懸濁し、再び遠心分離 (室温・1,000 rpm・5 分間) を行った。上清を取り除き、タッピングすることで沈殿を壊した後に、RPMI1640 培地に再懸濁し、2 匹分/24 well または 3 匹分/35 mmdish、4 匹分/60 mmdish で播種した。

培養は 37°C、5%CO₂ の条件下で 1 時間実施し、well または dish に接着した細胞を肺胞マクロファージとして実験に使用した。これらの動物実験は、山形大学農学部動物実験委員会により承認され、それに基づいて実施した。

3. 組織固定および各種染色

採取した肺組織を、約 12 mL のブアン固定液（ピクリン酸飽和水溶液 75 mL、37%ホルムアルデヒド 25 mL、氷酢酸 5 mL を混合した溶液）に約 16 時間、暗所振とう放置した。その後、ブアン固定液を捨て、50%エタノールで 12 時間暗所振とうを 4 回行った。その後、75%エタノールで 12 時間暗所振とうを 2 回行った後、100%エタノールに移し、切片化するまで、室温で保存した。パラフィン包埋後、切片化（4 μm）した。組織病理学的解析のためエオジン&ヘマトキシリン（H&E）染色を行った。また、免疫組織学的解析のため切片を脱パラフィン後、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシンモノクローナル抗体（8-OHdG, 1:50, Nikken SEIL, 静岡）または 4-ヒドロキシ-2'-ノネナールモノクローナル抗体（4-NHE, 1:50, Nikken SEIL, 静岡）で 4 °C で一晩処理を行った。8-OHdG または 4-NHE 陽性細胞は Histofine mouse stain kit (Nichirei, 東京) を用いて検出した。各種染色後、切片を顕微鏡で観察した。

4. 肺組織からの total RNA 抽出

total RNA は ISOGEN（株式会社日本ジーン，東京）を用いて抽出された。2 mL 容量のエッペンチューブで-80 °C で保存された肺組織は ISOGEN を 0.4 mL 加え、ポリトロンでホモジェナイズした。さらに ISOGEN 1.1 mL、クロロホルム 0.3 mL 加え、30 秒間混合後、5 分間室温放置し、遠心分離（4 °C-12,000 rpm-20 分間）した。上清を新しい 2 mL 容量エッペンチューブに移し、等量の中性フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加え、30 秒間混合後、遠心分離（4 °C-12,000 rpm-5 分間）した。上清を新しい 2 mL 容量のエッペンチューブに移し、上清と等量のクロロホルム/イソアミルアルコールを加え、30 秒間混合後、遠心分離（4 °C-12,000 rpm-5 分間）した。上清を新しい 2 mL 容量のエッペンチューブに移し、等量のイソプロパノールを加え、30 秒間混合後、10 分間室温放置して、遠心分離（4 °C-15,000 rpm-20 分間）した。上清を捨て、沈殿に 70%エタノールを 0.5 mL 加え、遠心分離（4 °C-15000 rpm-5 分間）した。遠心後、上清を捨て、2 分間減圧乾燥させた。沈殿に 30 μL の RNase free water を加え、ヒートブロックで 60 °C、15 分間保温し、沈殿を完全に溶解させた。その後、分光光度計を用いて、total RNA 量を測定した。

5. 肺胞マクロファージからの total RNA 抽出

組織からと同様に、total RNA を ISOGEN を用いて抽出した。60 mmdish に 4 匹分まとめて播種された肺胞マクロファージは 37°C、5%CO₂ の条件下で 1 時間培養された

後、RNase free の PBS で 3 回洗浄し、ISOGEN を 1 mL 加え、全体にいきわたらせ、5 分間室温放置した。その後、セルスクレイパーで ISOGEN を 2 mL 容量エッペンチューブに回収した。クロロホルム 0.2 mL 加え、30 秒間混合後、5 分間室温放置し、遠心分離 (4 °C-12,000 rpm-20 分間) した。遠心後、上層を新しい 2 mL 容量エッペンチューブに移し、等量のイソプロパノールを加え、30 秒間混合後、10 分間室温に放置し、遠心分離 (4 °C-15,000 rpm-20 分間) した。遠心後、上清を捨て、沈殿に 70% エタノールを 0.5 mL 加え、遠心分離 (4 °C-15,000 rpm-5 分間) した。遠心後、上清を捨て、2 分間減圧乾燥させた。沈殿に 10 µL の RNase free water を加え、ヒートブロックで 60 °C、15 分間保温し、沈殿を完全に溶解させた。その後、分光吸光度計を用いて、total RNA 量を測定した。

6. cDNA の合成

付属の取扱説明書に従って、PrimeScript® RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて RNA から cDNA を合成した。氷上において、0.2 mL 容量 PCR チューブ (Thermo) に RNA サンプルを 1 µg、5×PrimeScript® Buffer を 4 µL、PrimeScript® RT Enzyme Mix I を 1 µL、Oligo dT Primer (50 µM) を 1 µL (終濃度 2.5 µM)、Random 6 mers を 1 µL (終濃度 5 µM) 加え、RNase free water で全量を 20 µL にした。温度条件を 37 °C-15 分、85 °C-5 秒、4 °C に設定したサーマルサイクラーを使用して、逆転写反応を行った。合成された cDNA は使用されるまで -20 °C で保存した。

7. 標的 cDNA の増幅 (半定量 PCR)

付属の取扱説明書に従って、TaKaRa LA Taq® (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて標的 cDNA の増幅を行った。氷上において、0.2 mL 容量 PCR チューブに cDNA 溶液を 2 µL、10×LA PCR® Buffer II (Mg²⁺ free) を 1.5 µL、TaKaRa LA Taq® を 0.15 µL、25mM MgCl₂ を 0.9 µL (終濃度 1.5 µM)、dNTP Mixture (2.5 mM each) を 1.2 µL (終濃度 0.2 mM each)、Forward と Reverse のプライマー (Table 2) をそれぞれ 0.6 µL (終濃度 0.4 µM) 加え、超純水で全量を 15 µL にした。94 °C-5 分を 1 サイクル、94 °C-30 秒、60 °C-30 秒、72 °C-60 秒を 27 サイクル、72 °C-10 分を 1 サイクル、4 °C に設定したサーマルサイクラーを使用して、PCR 反応を行った。0.5 µg/mL エチジウムブロマイド含有の 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後、トランスイルミネーターを使用して増幅された標的 cDNA のバンドを確認した。

8. 標的 mRNA の発現量の相対定量 (real-time PCR)

付属の取扱説明書に従って、SYBR® Premix EX Taq™ II (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を使用して PCR 反応液を調製し、Thermal Cycler Dice® Real Time System Single (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を使用して、標的 mRNA の発現量を相対定量

した。氷上において、8連 0.2 mL 容量 PCR チューブ（タカラバイオ株式会社, 滋賀）に cDNA 溶液（サンプル）を 2 μ L、SYBR® *Premix EX Taq*™ II (2 \times) を 12.5 μ L、Forward と Reverse のプライマー（それぞれ 10 μ M）をそれぞれ 1 μ l（終濃度 0.4 μ M）に加え（Table. 3）、超純水で全量を 25 μ L にした。GCLC と GAPDH においては、95 $^{\circ}$ C-30 秒を 1 サイクル、95 $^{\circ}$ C-5 秒、64 $^{\circ}$ C-30 秒を 40 サイクル（2 step PCR）、95 $^{\circ}$ C-15 秒、60 $^{\circ}$ C-30 秒、95 $^{\circ}$ C-15 秒を 1 サイクル（Dissociation）に設定した Thermal Cycler Dice® Real Time System Single を使用して、PCR 反応を行った。xCT においては、95 $^{\circ}$ C-30 秒を 1 サイクル、95 $^{\circ}$ C-5 秒、60 $^{\circ}$ C-30 秒、72 $^{\circ}$ C-30 秒を 45 サイクル（3 step PCR）、95 $^{\circ}$ C-15 秒、60 $^{\circ}$ C-30 秒、95 $^{\circ}$ C-15 秒を 1 サイクル（Dissociation）に設定した Thermal Cycler Dice® Real Time System Single を使用して、PCR 反応を行った。PCR 反応と同時に、2 step PCR および 3 step PCR の各サイクルが終わった段階で SYBR® Green I の蛍光強度を検出した。またそれぞれの Dissociation において、60 $^{\circ}$ C から 95 $^{\circ}$ C に上昇するとき、0.5 $^{\circ}$ C 刻みで温度を上昇させ SYBR® Green I の蛍光強度を検出した。各遺伝子のプライマーセットを使用して増幅される増幅産物を TA クローニングにより pGEM®-T easy Vector（Promega, 東京）に組み込んだプラスミドを用いて、任意の割合で連続的に希釈した希釈系列（Standard）を作成した。これらをサンプルと同様に PCR 反応させて、縦軸を Ct 値（Threshold Cycle）、横軸を Standard の初期鋳型量とした検量線を各遺伝子に対して作成した。各遺伝子に対して、検出されたサンプルの Ct 値と検量線からサンプルの初期鋳型量を算出した。GAPDH をハウスキーピング遺伝子として使用して、GAPDH の算出された初期鋳型量に対する標的遺伝子の算出された初期鋳型量を計算した。各遺伝子において、WT のコントロール群（WT-cont）を 1 としたときの倍数（fold）として表した。

9. シスチン取り込み活性の測定

35 mm dish に播種 1 時間後の肺胞マクロファージを、37 $^{\circ}$ C に温められた PBS+G（終濃度で 0.1% グルコースと 0.01% Ca²⁺、Mg²⁺ を含む）約 5 mL で 3 回洗い、37 $^{\circ}$ C に温められた uptake 液（PBS+G に終濃度でシスチンを 0.05 mM と [¹⁴C] で標識されたシスチン 0.2 μ Ci/mL を含む）0.5 mL を加え、37 $^{\circ}$ C で 2 分間放置した。その後、uptake 液を捨て、氷冷の PBS で 3 回洗った。これに 0.5 N NaOH を 0.4 mL 加え、一晩放置した。このうちの 0.2 mL を用いて、シンチレーター 3 mL と 0.2 M Tris conc HCl (10:1) 0.1 mL と混合された後、シンチレーションカウンターで測定した。また、残りのうちの 0.1 mL または 0.2 mL を用いて、Lowry 法によってタンパク質量を定量した。シスチン取り込み活性は、比活性の値から、シスチンの取り込み量を算出し、1 分間あたりタンパク質あたり（nmol/min/mg protein）で表した。

10. 肺組織からの総グルタチオンサンプリング

1 mL の 5%TCA 中に沈められた肺組織は、ポリトロンでホモジェナイズし、30 分間氷上に放置した。その後、遠心分離 (4 °C-3,000 rpm-15 分間) し、上清を採取した。上清中の TCA を除くため、0.01 N HCl 飽和ジエチルエーテル抽出を行い、総グルタチオン定量用サンプルとした。遠心分離した後の沈殿には 0.5 N NaOH を 3 mL 加えて一晩放置し、さらに 0.5 N NaOH を 3 mL 加えて、タンパク質定量用サンプルとした。

11. 総グルタチオンの定量

総グルタチオンの定量は Tietze の方法 (酵素リサイクリング法) により定量した (49)。0.4 mL のサンプル (BALF の場合は 0.05 mL) を H₂O で全量を 1.2 mL にし、測定用 Buffer (0.2 M K phosphate + 10 mM EDTA) を 1.2 mL 加えた。スタンダードとして 5%TCA を 0.01 N HCl 飽和ジエチルエーテル抽出したもの 0.4 mL に H₂O を 0.8 mL と測定用 Buffer を 1.2 mL 加え、0.1 mM GSH 溶液を 0、5 μ l (0.5 nmol)、10 μ l (1 nmol)、20 μ l (2 nmol) 混合したものをサンプル同様に測定した。各サンプルとスタンダードに 4 mg/mL の 5, 5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) を 0.1 mL、20 U/ml の Glutathione Reductase を 0.05 mL、3.62 mg/ml の Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate を 0.05 mL それぞれ混合し、30 秒後と 5 分後での吸光度 (412 nm) を測定した。スタンダードの 5 分後と 30 秒後の吸光度の差を求め、検量線を作成した。この検量線に従い、各サンプルの 5 分後と 30 秒後の吸光度の差から総グルタチオン量を算出し、タンパク質量で標準化し、タンパク質量あたりの総グルタチオン量 (nmol/mg protein) で表した。また、BALF においては、検量線から算出された総グルタチオン量を採取された total BALF 量で標準化、total BALF あたりの総グルタチオン量 (nmol in total BALF) として表した。

12. BALF サンプルからの HPLC サンプリング

BALF サンプル 25 μ L と 50 mM N-ethyl morpholine (NEM) で溶かした 8 mM monobromobimane (mBBBr) 25 μ L を混合し、室温暗所で 10 分間反応させた。この反応物に 100%TCA を 2.5 μ L 加え、混合し、氷上暗所で 30 分間放置した。その後、遠心分離 (0 °C-15,000 rpm-15 分間) し、その上清をフィルター (Millex®-LH, MILLIPORE) に通し、これを HPLC サンプルとした。

13. 肺胞マクロファージからの HPLC サンプリング

24 well に接着した肺胞マクロファージを、20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) + G-saline (終濃度で 137 mM NaCl/3 mM KCl, pH 7.4 に 0.1% グルコースと 0.01% Ca²⁺、Mg²⁺ を含む) で 3 回洗い、50 mM NEM で溶かした 8 mM mBBBr を 50 μ L と 50 mM HEPES + G-saline を 50 μ L 加え、室温暗所で 10 分間

反応させた。この反応物に 100%TCA を 5 μ L 加え、氷上暗所で 30 分間放置した。その後、この溶液を 1 mL 容量のエッペンチューブに移し、遠心分離 (0 $^{\circ}$ C-15,000 rpm-15 分間) し、その上清をフィルターに通し、これを HPLC サンプルとした。さらに、well には 0.5 N NaOH を 0.2 ml 加えて一晩放置し、タンパク質定量用サンプルとした。

14. HPLC によるシステインおよび GSH の測定

肺胞マクロファージと BALF 中のシステイン量および GSH 量は Cotgreave と Moldeus の方法により、mBBr を使用する方法を用いて、HPLC (島津 LC-6A システム) で分析した(50)。HPLC 分離には、逆相系カラム ODS (4.6 mm \times 100 mm、ナカライテクス) を使用し、流速は 1 mL/min に設定した。分離後サンプルは蛍光検出器 (RF-10AXL、島津製作所) に導入し、励起光 394 nm、放出光 480 nm で検出した。移動相は、A 液 (0.25%酢酸/9%アセトニトリル溶液) と B 液 (75%アセトニトリル溶液) とした。分離条件として、8 分間 A 液 100%でサンプルを溶出し、その後ステップワイズグラジエントで B 液 100%にして、5 分間カラムを洗浄し、再度ステップワイズグラジエント A 液 100%に戻し、7 分間カラムを平衡化した。mBBr で修飾されたシステインと GSH はそれぞれ、160-180 秒前後と 360 秒前後で検出され、他の交雑物のピークとは独立していたので、この蛍光のピーク面積を、システインまたは還元型 GSH の濃度計算に用いた。mBBr で修飾された標準サンプルと目的サンプルの面積から、サンプルのシステイン量と GSH 量を算出した。肺胞マクロファージにおいて、算出されたシステイン量および GSH レベルは、タンパク質量で標準化し、タンパク質量あたりの量 (nmol/mg protein) で表した。また、BALF においては、算出された GSH 量を採取された total BALF 量で標準化、total BALF あたりの還元型 GSH 量(nmol in total BALF) として表した。

15. タンパク質の定量

タンパク質の定量は Lowry 法を用いて定量した(51)。サンプル 100 μ L に H₂O を加えて、全量を 500 μ L にした。スタンダードとして、0.4 mg/mL ウシ血清アルブミン 0、50、100、150 μ l に、0.5 N NaOH を 100 μ L 加え、全量が 500 μ L になるように H₂O を加えた。各サンプルとスタンダードに銅試薬 (2%Na₂CO₃/1N NaOH:2%酒石酸カリウムナトリウム:1%CuSO₄=100:1:1) を 2.5 mL 加えて混合し、室温で 15 分間放置した。その後、フェノール試薬 (Follin-Ciocalteu's phenol reagent 2N を H₂O で 2 倍希釈) を 0.25 mL 加えて混合し、室温で 30 分間放置した。これを 660 nm で吸光度を測定した。スタンダードから求められた検量線に従い各サンプルのタンパク質量 (mg) を算出した。

16. 統計処理

値は平均±標準偏差で表した。フィッシャー最小有意差法を用いて有意差検定を行い、 $p<0.05$ で有意であるとみなした。

結 果

1. パラコート投与による生存率の変化

酸化ストレス負荷がマウスの生存率に影響を与えるかどうかを調べた。45 mg/kg パラコート投与による WT および KO マウスの生存率の変化を Fig. 2 に示した。両マウスの生存率はパラコート投与 1.5 日後から減少した。パラコート投与後 3 日後からどちらのマウスでも生存率は一定になったが、KO マウスの方が WT マウスに比べて有意に生存率は低下した。この結果から、パラコート投与による酸化ストレスに対して KO マウスは脆弱であることが示唆された。なお、30 mg/kg パラコート投与では、両マウスとも 90% 生存し、マウス間に有意な差は見られなかった。また、60 mg/kg パラコート投与では、両マウスとも生存率が 20% 以下になり、この条件でもマウス間に有意な差は見られなかった。このため、45 mg/kg 投与の条件をこれ以降の実験では使用した。

2. パラコート投与による肺組織の組織学的解析

パラコートによる障害は、肺組織で大きいことが知られているため、パラコート投与 24 時間目において、肺組織を採取し、組織学的・免疫組織化学的解析を行った (Fig. 3)。肺の損傷では、浮腫や白血球細胞の浸潤、肺胞での出血などを伴う。生理食塩水を投与した場合でも、KO マウスにおいて肺胞壁が肥厚していることを見出した (Fig. 3G)。パラコート投与によって、WT および KO マウス共に炎症性細胞の浸潤と出血を確認したが、特に KO マウスにおいて、肺胞構造が増悪していることが示された (Fig. 3D, J)。酸化ストレスに伴う DNA 障害を調べるために、8-OHdG の抗体を用いて免疫染色したところ、パラコート投与によって両マウスの肺胞上皮細胞において、8-OHdG に対して陽性反応を示したが、WT に比べ KO マウスの方が大きい傾向があった (Fig. 3E, K)。肺における脂質過酸化の程度を調べるために、4-HNE 抗体への反応性を同様に免疫組織化学的に検討した。生理食塩水を投与した場合、両マウス間では有意な差は検出されなかった。パラコート投与によって、WT ではわずかな陽性反応があった一方で、KO では顕著な陽性反応が検出された (Fig. 3 F, L)。これらの結果は、パラコート投与による酸化ストレス障害レベルは、WT マウスよりも KO マウスの肺で大きいことを示唆した。

3. パラコート投与による総グルタチオン量の経時変化

酸化ストレス負荷が肺組織内総グルタチオン量に影響を与えるかどうかを調べるために、45 mg/kg パラコート投与後 0, 24, 48, 72 時間目でマウスの肺を採取し、酵素リサイクリング法により、肺組織内の総グルタチオン量を測定した (Fig. 4)。投与前は、WT および KO マウスの肺組織内グルタチオン量はほぼ同じレベルであり、統計学的に有意な差はなかった。パラコート投与によって、両マウスの肺組織内総グルタチオン量

は経時的に減少したが、各時点において、KO マウスの方が WT マウスよりも総グルタチオン量は有意に低いことが示された。

4. パラコート投与における肺組織での xCT と GCLC の発現

WT での肺組織内グルタチオン量の維持効果が xCT の発現に起因するものかどうかを確かめるために、半定量および real-time RT-PCR によって、xCT およびグルタチオン合成の律速酵素である GCLC の mRNA の発現レベルを解析した。ノーザンブロット解析では、通常状態での肺組織で xCT mRNA は検出されなかったが、半定量および real-time RT-PCR によって通常状態の WT マウスの肺において xCT mRNA の発現していることが明らかとなった。また、この mRNA レベルは、パラコート投与によって著しく増大した (Fig. 5A, B)。GCLC mRNA の発現もパラコート投与によって両マウスにおいて同様に著しく増大することが示された (Fig. 5A, C)。

5. 肺胞マクロファージにおける xCT の発現とパラコート投与による変動

肺胞に存在する肺胞マクロファージは、常に比較的に高い濃度の酸素に曝されているため、構成的な xCT の発現が予想された。そこで、WT マウスの肺胞マクロファージのシスチン取り込み活性を測定した結果、シスチンの取り込み活性が認められた (Fig. 6A)。KO でもシスチン取り込み活性が見られたが、これは、トランスポーターを介さない非特異的な取り込みであると考えられた。半定量および real-time RT-PCR によって、45 mg/kg パラコート投与後における xCT および mRNA の発現を解析したところ、WT マウスの xCT mRNA 発現は、パラコート投与によって著しく増大した (Fig. 6B, C)。KO マウス由来の肺胞マクロファージでは、xCT mRNA の発現は検出できなかったことから、この細胞で見られたシスチンの取り込み活性は、xCT を介さない非特異的な取り込みであることが裏付けられた。同様に GCLC mRNA の発現についても調べたところ、肺組織全体ではパラコート投与によって発現増強が見られた GCLC mRNA は、肺胞マクロファージにおいては、パラコート投与による発現増加は見られなかった (Fig. 6B, D)。

6. パラコート投与における肺胞マクロファージ内のシステイン量と GSH 量

WT マウスにおいて、パラコート投与により xCT mRNA が強く誘導されたことから、xCT の活性が上昇することが考えられた。つまり、肺胞マクロファージにおいてパラコート投与により誘導された xCT は、シスチンを取り込むことで細胞内にシステインを供給し、グルタチオンレベルを上昇させることが予想された。そこで、パラコート投与 24 時間後に回収した肺胞マクロファージ内のシステイン量と GSH 量をモノブロモビマン (mBBr) を用いた HPLC により測定した。細胞内システイン量は、KO マウス由来肺胞マクロファージでは、パラコート投与の有無で有意な差は見られなかったが、

WT マウス由来の肺胞マクロファージにおいては、パラコート投与の有無で有意な差が見られた (Fig. 7A)。これは、パラコートを投与した WT の肺胞マクロファージにおいて、xCT が強く誘導されたことを反映したものと考えられた。しかし、細胞内 GSH レベルは、WT および KO マウス由来の細胞間で有意差が見られないだけでなく、パラコートを投与しても、WT マウス由来のマクロファージでグルタチオンの有意な上昇は認められなかった (Fig. 7B)。

7. パラコート投与における BALF 中の総グルタチオンおよび GSH 量

肺組織や肺胞マクロファージにおける遺伝子の変動が、上皮被覆液中の総グルタチオン量および GSH 量に影響を及ぼすかどうかを検討するため、BALF 中の総グルタチオン量を酵素リサイクリング法によって、GSH 量を mBBr を用いた HPLC によって測定した。その結果、WT と KO マウス共にパラコート投与によって、BALF 中の総グルタチオン量は、パラコートを投与していない場合と比較して減少することが分かったが、減少幅は WT と KO マウスの間で有意差は見られなかった (Fig. 8A)。一方、GSH 量もパラコート投与によって、WT、KO マウスともに減少することが示されたが、その減少幅は WT マウスと比較して KO マウスの BALF で有意に低下することが明らかとなった (Fig. 8B)。

考 察

これまでの研究により、通常の培養条件下で培養できる培養細胞のほとんどは、**xCT** の発現が確認されている。このような培養系においては、**xCT** が発現することによって、細胞外のシスチンが取り込まれ、グルタチオン合成の前駆物質であるシステイン量を高め、結果としてグルタチオン合成が促進されることで、細胞内のグルタチオン量の維持に寄与すると考えられる。また、**xCT** は、活性酸素など種々の刺激によって強く誘導され、その誘導に伴って細胞内グルタチオン量も上昇することが観察されている。逆に、多くの培養細胞では、**xCT** の活性を阻害すると細胞内グルタチオンレベルは急激に減少して細胞死を招く。このようなことから、**xCT** は、少なくとも培養系においては、抗酸化機構の一翼を担うと考えられている。本研究では、この培養系で明らかにされた **xCT** の抗酸化系としての機能が、個体レベルでも見られるか、パラコート投与による *in vivo* の酸化ストレス負荷モデルによって検証した。その結果、**xCT KO** マウスが、**WT** マウスに比べ有意に酸化ストレス負荷に対する感受性が高まることが示された(**Fig. 2**)。このことは、個体レベルでも **xCT** が抗酸化系として機能することを実験的に示した初めての知見である。また、本研究では、肺胞マクロファージにおいて、**xCT mRNA** の構成的な発現が初めて示された (**Fig. 6**)。 **xCT mRNA** は、脳や胸腺、脾臓のような神経系および免疫系組織において構成的な発現が認められているが、*in vivo* の細胞レベルでは、チオグリコレート培地を刺激剤として腹腔投与した際に腹腔中に滲出する好中球に発現していることが報告されている(36)。好中球は、マクロファージと同様、骨髄球系前駆細胞から分化した免疫担当細胞の一種である。肺胞マクロファージは、他の組織・細胞と比べ高酸素および呼気に混入する外来微生物や異物に曝されており、常に酸化ストレスに暴露されていると考えられる。これらの細胞は、自然免疫担当細胞として、細菌などの感染に伴い感染部位に遊走し、貪食作用、細胞傷害性物質の産生、サイトカイン産生などを介して感染拡大を食い止めると考えられている。このような感染部位では、活性酸素などの濃度が局所的に高まる炎症状態が生じるため、免疫担当細胞は、このような酸化ストレスから自身を守る機構が必要となる。好中球やマクロファージのような免疫系細胞は、*in vivo* において、酸化ストレスなどの刺激によって **xCT** を誘導し、細胞内グルタチオン量を高めることによって、自分自身を酸化ストレスから防御する機能を発揮するものと考えられる。

以前、肺組織全体から抽出した **RNA** を用いて、ノーザンブロット解析した結果、肺においては **xCT mRNA** の発現は検出できなかった(17)。しかしながら、**RT-PCR** 法を用いた解析では、**xCT mRNA** の発現が検出された (**Fig. 5**)。このことは、肺の実質細胞は、通常状態では **xCT** を発現していないが、肺組織全体から **RNA** を抽出することによって、構成的に **xCT** を発現している肺胞マクロファージ由来の **RNA** が混入したため、**RT-PCR** 法で検出されたものと考えられる。同じマクロファージ系細胞である腹

腔滲出マクロファージには、**xCT mRNA** の発現がほとんど認められず、シスチンの取り込み活性も極めて低い。培養することにより **xCT** が誘導されることがわかっている (52)。腹腔内は、肺胞内と比べると酸素濃度は低い。培養による酸化ストレスに暴露されることで、**xCT** が誘導されると考えられている。したがって、マクロファージには、潜在的に酸素などの酸化ストレスにより **xCT** を誘導する能力が備わっており、肺では常に酸化ストレスに曝されているため、構成的な **xCT** の発現が見られたものと考えられる。

肺胞マクロファージが **xCT** を発現することが明らかとなったので、肺胞マクロファージ内の **GSH** 量に影響はないかどうか調べたが、**WT** および **KO** マウスで細胞内 **GSH** 量に有意な差はなかった (Fig. 7B)。また、**ELF** 中の総グルタチオン量および **GSH** 量を **BALF** 中のそれらを測定することで推定した。その結果、生理食塩水処理での **BALF** 中の総グルタチオン量および **GSH** 量は、**WT** および **KO** マウスの間で有意な差はなかった (Fig. 9A, B)。**ELF** 中に高濃度でグルタチオンが存在するために、全てのシステインがシスチンに酸化されたわけではなく、システインとしてある程度存在できると考えられる。このために、**KO** マウスの肺胞マクロファージにおいても、構成的に発現する中性アミノ酸トランスポーター (主に **L** 系様トランスポーター(53)) からシステインが供給されるため、細胞内グルタチオン量が、**WT** マウスの肺胞マクロファージと同じ程度維持されていると思われる。**ELF** 中にシステインおよびシスチンが存在するかどうかは、**HPLC** およびアミノ酸分析機を用いて検討する必要がある。これに関して、**Smita** らは、ブレオマイシン投与による食餌摂取量の減退は、**ELF** 中のシスチン・システインを指標とするレドックスバランスの酸化方向へのシフトを引き起こし、肺線維症の発症の要因の一つになり得ることを報告している(54)。肺胞マクロファージで発現する **xCT** は、肺胞の **ELF** 中でシスチン・システインサイクルを形成することによって、**ELF** 中のシスチン・システインレドックスバランスの維持に寄与しているのかもしれない。

WT マウスの肺組織および肺胞マクロファージにおけるパラコート投与 24 時間後の **xCT mRNA** と **GCLC mRNA** の発現を **RT-PCR** 法を用いて解析したところ、肺組織において **xCT mRNA** と **GCLC mRNA** の両方の遺伝子が誘導された (Fig. 5)。しかし、肺胞マクロファージにおいては、**xCT mRNA** が強く誘導されたのに対して、**GCLC mRNA** は、あまり大きな誘導は確認できなかった (Fig. 6)。肺組織における **xCT** と **GCLC** の発現誘導のメカニズムは、**Keap-1-Nrf2** 経路が関与していると考えられる。パラコートによる直接的もしくは間接的な酸化ストレスにより、**Nrf2** が **Keap-1** から解放され、核内に移行し、**xCT** や **GCLC** 遺伝子上流に存在する抗酸化応答配列を認識することによって、これらの遺伝子の発現を誘導したと考えられる。当研究室におけるこれまでの研究から、**xCT** の発現を誘導する刺激は、酸化ストレスのみではなく、腫瘍壊死因子 α (**TNF- α**) のようなサイトカインや食餌刺激などによっても誘導される

ことが示されている(12,36)。これに関連して、間接的に引き起こされた急性肺損傷によって、肺にリンパ球が動員されることが報告されている(55)。本研究では、投与したパラコートの作用によって肺が損傷・炎症を起こしたことで、肺胞中にリンパ球や好中球、単球などの免疫系細胞が遊走し、TNF- α などのサイトカイン類を産生・放出したことにより、肺胞マクロファージに作用した可能性が考えられる。サイトカイン類による xCT の誘導が、Keap1-Nrf2 経路を介するものであるかどうか、今後の検討課題である。

パラコート投与による BALF 中の総グルタチオンレベルを測定した結果、WT、KO マウス共にパラコート投与により総グルタチオンレベルの減少が観察された (Fig. 8A)。総グルタチオンレベルが減少した理由は、2つ考えられる。1つ目は、ELF 量の減少である。パラコートなどの酸化ストレスを発生させる試薬の投与により、肺は損傷・炎症を引き起こし、肺胞内にリンパ球やマクロファージ、好中球、線維芽細胞などが滲出することで、肺胞の空隙が狭くなることが分かっている(54,56,57)。これらの細胞の滲出による肺胞の空隙の縮小により、肺胞内の ELF 量自体が減少したため、BALF 中の総グルタチオンレベルが減少したのかもしれない。肺胞中に浸み出た血中の血漿成分が ELF となるため、血漿中の尿素濃度と ELF 中の尿素濃度は一致するはずである。つまり、BALF 中尿素量と血漿中の尿素濃度を用いて、BALF 中の含まれる ELF の液量が推定できる。この尿素係数を用いて正確に補正した ELF 量を算出する必要がある(58)。2つ目の可能性は、ELF 中でのグルタチオンの分解の亢進である。ELF 中には γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GT) が存在することから、一定の速度でグルタチオンの分解が行われていると考えられる(59)。 γ -GT は、腎臓で最も高い活性を示すが、全身の至る所で発現している。肝臓にも存在し、肝疾患時には、血清中に放出されることが知られている。パラコート投与により肺組織が損傷すると、肺組織中に存在する γ -GT が ELF 中に放出され、ELF 中のグルタチオンの分解が亢進するため、結果的に BALF 中の総グルタチオンレベルが減少したのかもしれない。これを確かめるためには、実際の ELF 中の γ -GT 存在量や活性を検討する必要がある。一方、本研究により、BALF 中 GSH レベルは、パラコート投与において、WT と比較して KO の方が有意に低くなることが明らかとなった (Fig. 8B)。この結果は、肺胞マクロファージにおいて xCT が発現していることによって形成されるシスチン・システインサイクルが関係すると考えられる。パラコート自身やパラコート投与による損傷・炎症により生じる酸化ストレスによって、ELF 中の GSH は酸化型の GSSG になる。また、酸化ストレスで誘導される xCT によって、肺胞マクロファージ内のシステイン量は増大する。このシステインは、新規の GSH 合成に使用されるが、過剰な分は、構成的に発現する中性アミノ酸トランスポーター (主に L 系様トランスポーター) によって ELF 中に放出されると考えられる。このシステインが、ELF 中の GSH より先に酸化され、シスチンとなることで、GSH の酸化を防いでいる可能性がある。また、放出されたシステインが、GSSG

と反応し、システインと GSH の混合ジスルフィドおよび GSH が生成されることによっても ELF 中の GSH レベルが維持されるのかもしれない。このような機構により、xCT は、ELF 中の GSH レベルの維持に寄与しているものと考えられる。

Table. 2 半定量 RT-PCR におけるプライマーセット

Gene	Forward	Reverse
xCT	mouse xCT int 3F (5'-CTC GTG ACA GCT GTG GGC AT-3')	Dr 4 end (5'-GGC ACT AGA CTC AAG AAC TGT-3')
GCLC	mGCL F1 (5'-CTC TGC ACC ATC ACT TCA TTC C-3')	mGCL R1 (5'-CAT CAG CTG GCC ACT ATC TGC-3')
GAPDH	GAPDH F1 (5'-GAC CCC TTC ATT GAC CT-3')	GAPDH R1 (5'-CCA CCA CCC TGT TGC TGT-3')

Table. 3 Real-time RT-PCR におけるプライマーセット

Gene	Forward	Reverse
xCT	Dr 4 3F (5'-CAT TGT ATG GGA CAA GAA ACC-3')	Dr 4 end (5'-GGC ACT AGA CTC AAG AAC TGT-3')
GCLC	MAO64953-F (5'-GAT GTG GAC ACC CGA TGC AG-3')	MAO64953-R (5'-CAG GAT GGT TTG CAA TGA ACT CTC-3')
GAPDH	MAO050371-F (5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3')	MAO050371-R (5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3')

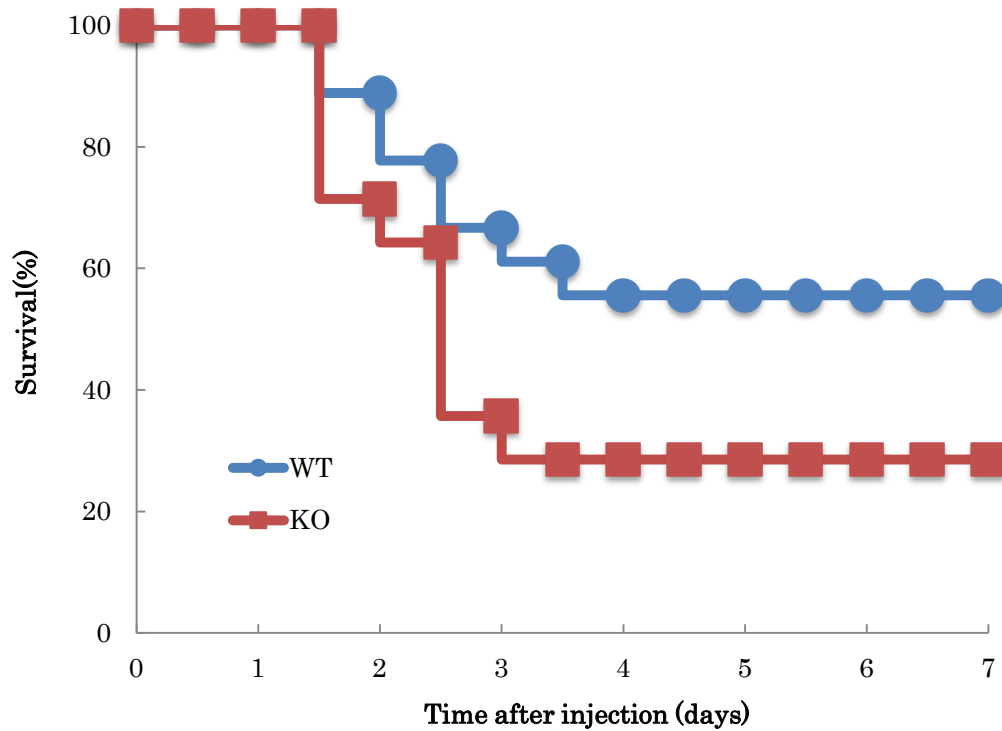


Fig. 2 パラコート投与による生存曲線

雄の野生型 (WT) と α CT 遺伝子欠損 (KO) マウスに、生理食塩水に溶かしたパラコート(45 mg/kg body weight)を腹腔内に単回投与した。その後 12 時間毎に生存率を記録した。測定期間は 7 日間とした。(n=14~18)

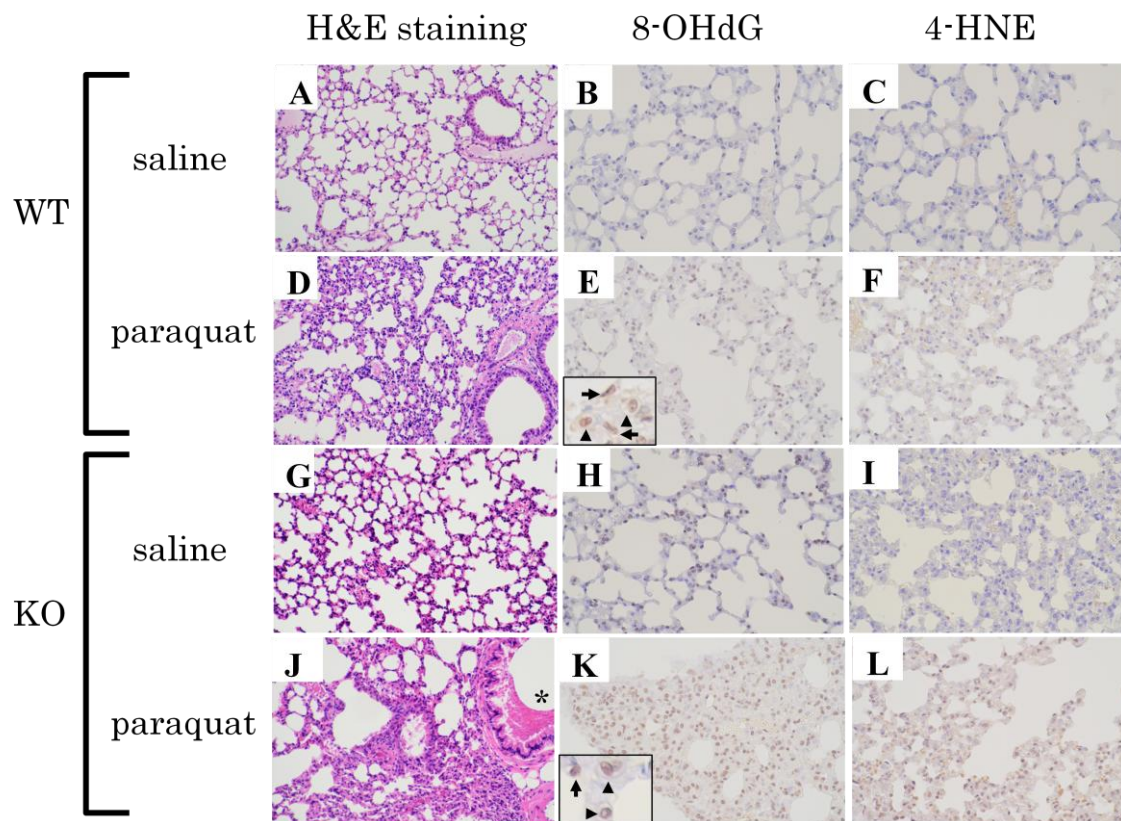


Fig. 3 パラコート投与後の組織化学・免疫化学的解析

雄の野生型 (WT) と xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスに、生理食塩水に溶かしたパラコート(45 mg/kg body weight)を腹腔内に単回投与した。その 24 時間後に肺を摘出・固定し、切片を作製し、H&E 染色 (A, D, G and J, Original magnification ×200)、8-OHdG 免疫染色 (B, E, H and K, original magnification ×200)、4-hydroxynonenal 免疫染色 (C, F, I and L, original magnification ×200) に使用した。

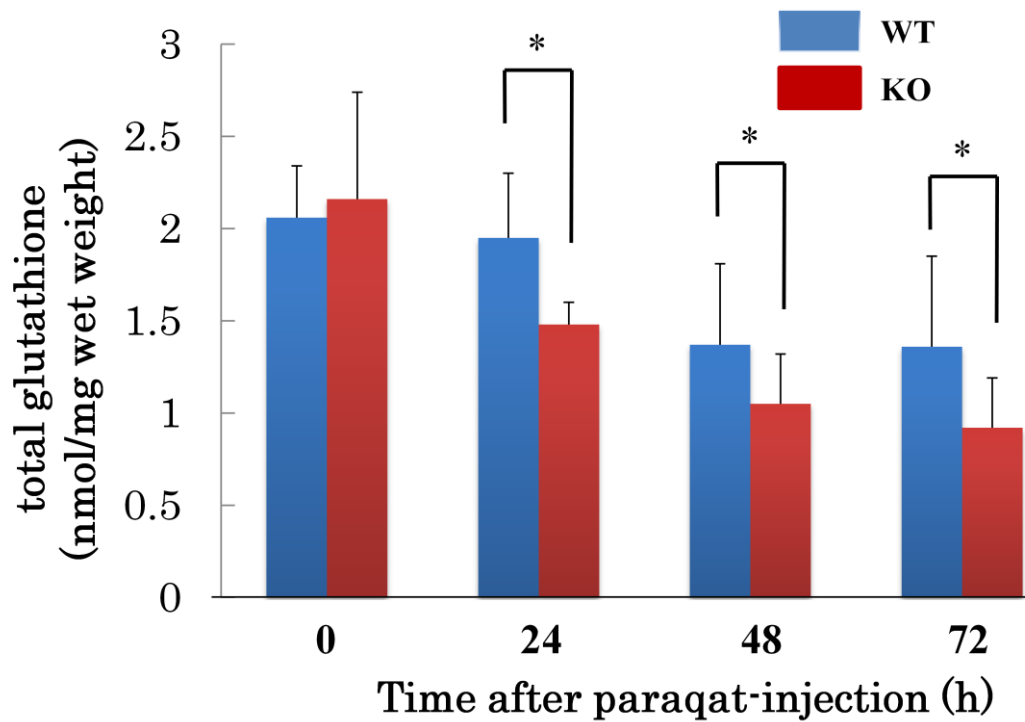


Fig. 4 パラコート投与による肺組織の total GSH レベル

雄の野生型 (WT) と xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスに、生理食塩水に溶かしたパラコート(45 mg/kg body weight)を腹腔内に単回投与した。投与後 24、48、72 時間後に肺を採取し、総グルタチオンレベルを酵素リサイクリング法により測定した。0 時間は、パラコートを投与していないコントロールマウスのグルタチオンレベルを示している。

(n=5~12) * p <0.05

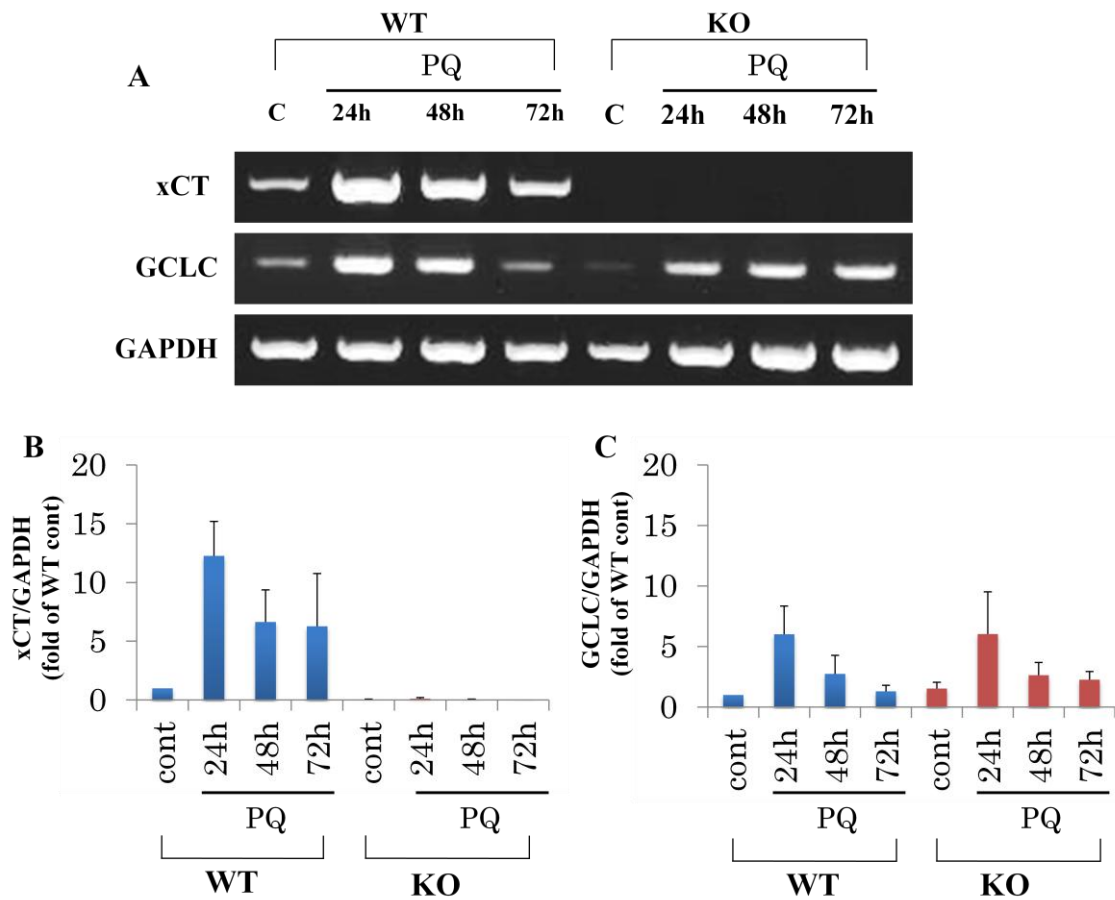


Fig. 5 パラコート投与における肺組織での xCT と GCLC の発現

雄の野生型 (WT) と xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスに、生理食塩水に溶かしたパラコート (45 mg/kg body weight) を腹腔内に単回投与した。投与後 24、48、72 時間後に肺を採取し、xCT および GCLC mRNA 発現を半定量 RT-PCR (A), real-time RT-PCR (B, xCT; C, GCLC) で解析した。cont は生理的食塩水を投与し、24 時間後の肺でのそれぞれの mRNA 発現レベルを示している (n=4)。

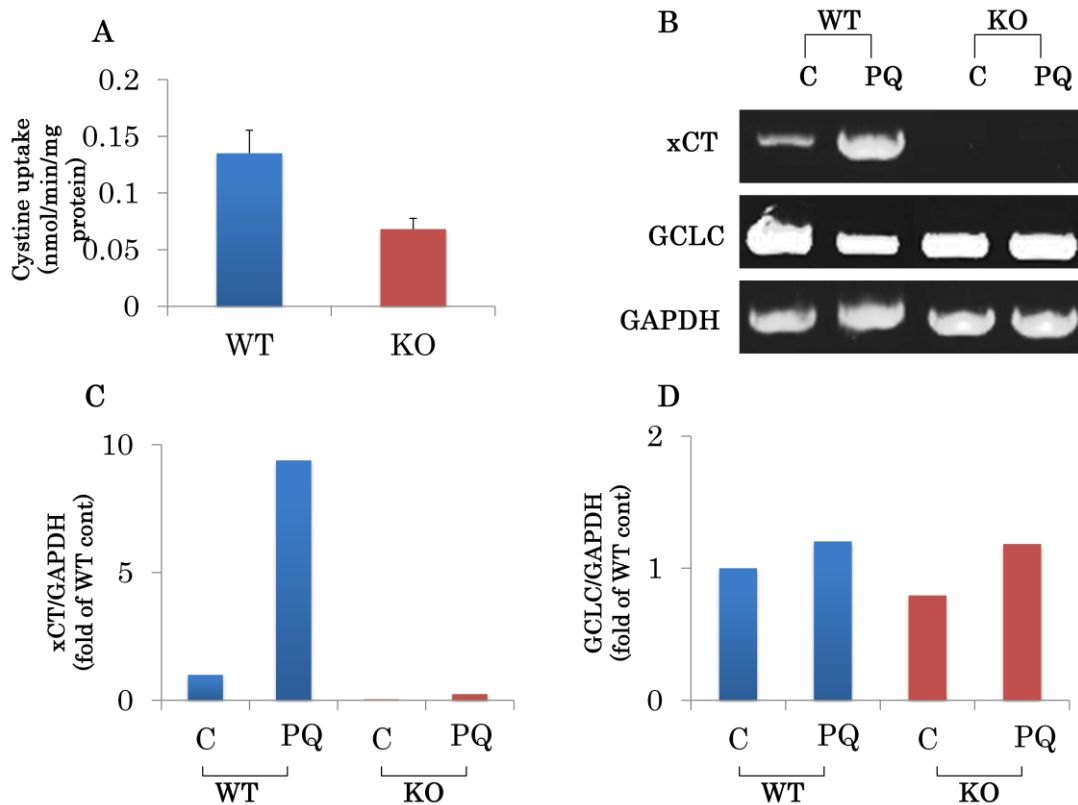


Fig. 6 肺胞マクロファージにおける xCT の発現

マウスの気管を 0.1%EDTA 含有リン酸緩衝液で 5 回洗浄し、遠心分離することで肺胞マクロファージを分離した。1 時間培養することにより dish に接着させた。A, 肺胞マクロファージのシスチンの取り込み活性を ^{14}C -シスチンを用いて測定した。45 mg/kg パラコートの単回投与後、気管を洗浄し、肺胞マクロファージを分離し、1 時間後に dish に接着した細胞から RNA を抽出し、xCT と GCLC mRNA の発現を半定量 RT-PCR (B) および real-time RT-PCR (C, xCT; D, GCLC) を用いて解析した。

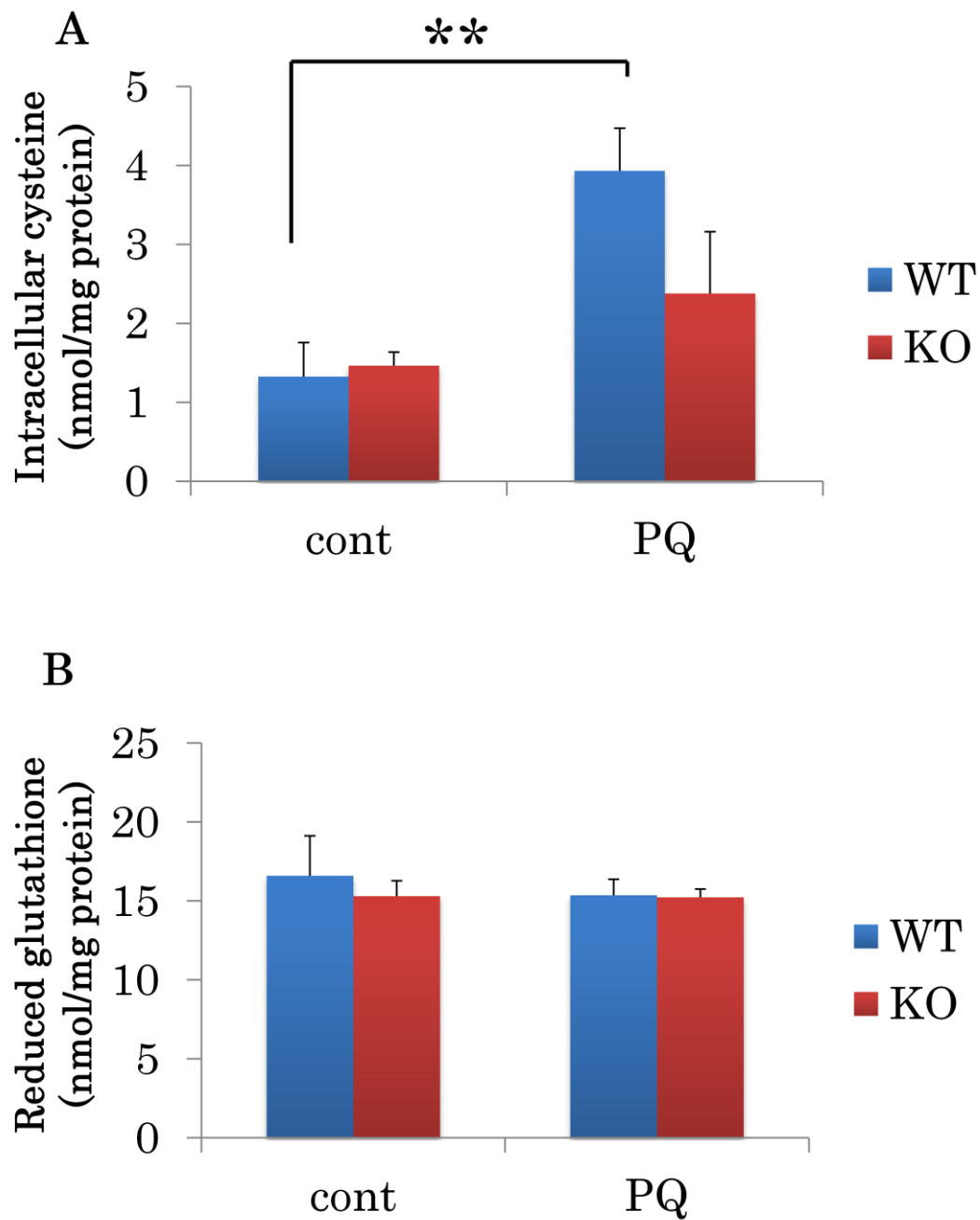


Fig. 7 パラコート投与における肺胞マクロファージのシステインレベルと GSH レベル
 雄の野生型 (WT) と xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスに、生理食塩水に溶かしたパラコ
 ート(45 mg/kg body weight)を腹腔内に単回投与した。投与 24 時間後に、マウスの気
 管を 0.1%EDTA 含有リン酸緩衝液で 5 回洗浄し、遠心分離することで肺胞マクロファ
 ージを分離した。1 時間培養することにより dish に接着させた。その後、
 monobromobimane を用いた HPLC により細胞内のシステインレベルおよび還元型グ
 ルタチオンレベルを測定した。(n=4) ** $p < 0.05$

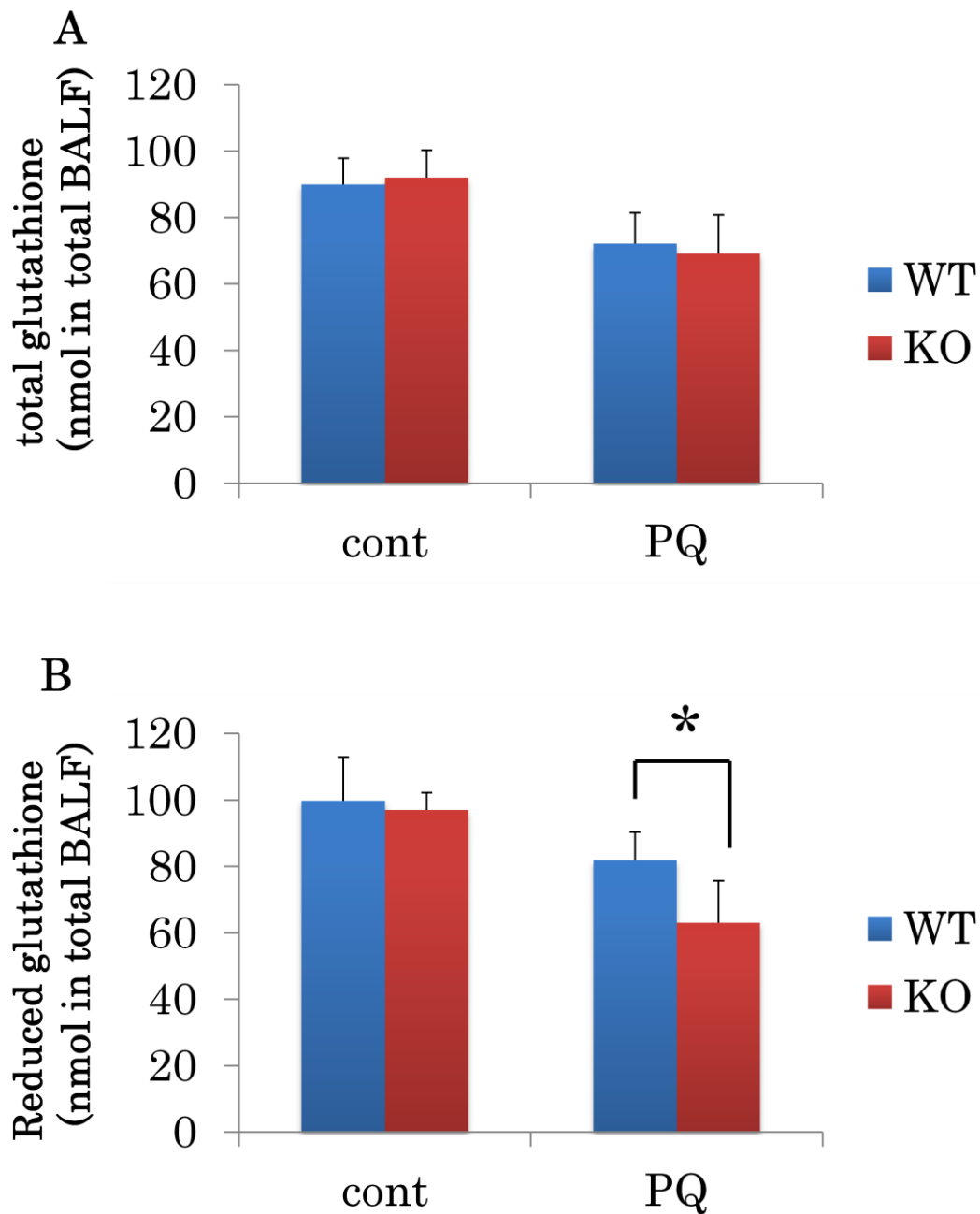


Fig. 8 パラコート投与における BALF の total および還元型グルタチオンレベル
 雄の野生型 (WT) と xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスに、生理食塩水に溶かしたパラコ
 ート(45 mg/kg body weight)を腹腔内に単回投与した。投与 24 時間後に気管を
 0.1%EDTA 含有リン酸緩衝液で洗浄し、遠心分離した上清を気管支肺胞洗浄液 (BALF)
 として採取した。A, total GSH レベルを酵素リサイクリング法により測定した。(n=8)
 B, monobromobimane を用いた HPLC により還元型グルタチオンレベルを測定した。
 (n=6) * $p < 0.05$

第二章 xc系によるシスタチオニンの輸送とその機能

緒言

様々なクロマトグラフィー法や質量分析といった検出法を組み合わせ、生体内の代謝産物を網羅的に解析する手法をメタボローム解析という。このメタボローム解析を応用することで、病気のマーカー物質の探索や遺伝子変異による代謝経路の変調の解析に利用することができる。

生体内でのシステインの生合成経路は、トランススルフェーション経路と呼ばれ、メチオニンからホモシステイン、シスタチオニンを経て合成される(60,61)。この経路においては、シスタチオニン- β -シターゼ (CBS) およびシスタチオニン- γ -リアーゼ (CGL) という二つのビタミン B6 依存的な酵素が関係しており、CBS は、ホモシステインからのシスタチオニン合成を触媒し、CGL は、シスタチオニンからのシステイン合成を触媒する。

個体レベルでは、CBS は、肝臓および腎臓において構成的な発現が認められており、脳においても肝臓や腎臓と比較すると弱いながら、構成的な発現が確認されている(62)。免疫組織化学的な実験により、脳での CBS の発現は、グリア細胞、特にアストロサイトでの発現が強いことが観察されている(63)。一方、CGL は、肝臓、腎臓、膵臓、胃、小腸において構成的に発現が認めらる(64)。さらに、Guangdong らは、心臓および大動脈、血管管内皮、血管平滑筋細胞でも CGL が構成的に発現することを確認している(65)。培養細胞を用いた実験により、CGL は ATF4 によってその発現が調節されることがわかっている(66)。

血中のホモシステインの濃度調節には、加齢などの生理的要因、ホモシステイン代謝に必要なビタミン B6, B12 または葉酸などの補酵素の不足、喫煙やコーヒー摂取などの生活習慣およびホモシステイン代謝に関わる酵素の欠損あるいは活性低下など、様々な要因が関わっている。これらの要因によって増加したホモシステインは、アテローム性動脈硬化症や脳卒中などの血管疾患の危険因子とみなされている(67)。さらに、CBS ホモ欠損およびヘテロ欠損マウスは、重篤なホモシステイン血症を生じ、血管内皮細胞を障害し、心血管機能の低下を引き起こすことが報告されている(68-70)。一方、血中シスタチオニンの濃度調節にもビタミン B6 欠乏や CGL の欠損あるいは活性低下が関わっており(71-73)、これらの要因によって、シスタチオニンが尿中に認められるシスタチオニン尿症を引き起こすが、血中で上昇したシスタチオニンは、特別な臨床症状を伴わないと考えられている。

最近の研究では、CBS と CGL は、トランススルフェーション経路によるシステイン合成だけではなく、硫化水素 (H_2S) の産生も触媒することが明らかとなった。 H_2S は、脳および心血管系において神経伝達や血管弛緩に関わる低分子シグナル伝達分子であると同時に還元物質でもあり、生体内において酸化ストレス防御に重要な役割を担うことが明らかとなってきている(65,74,75)。

本章では、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) を使用して、**xCT** 遺伝子欠損 (**KO**) マウスおよびその野生型 (**WT**) マウスから抽出した各組織中の代謝産物の網羅的解析を行った。その結果、**KO** および **WT** マウス由来の各組織間で、同定できたメタボライトにほとんど差は見られなかった。しかし、胸腺および脾臓において、唯一、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を見出した。そこで、シスタチオニンがシスチン・グルタミン酸トランスポーターの生理的基質となっていると考え、**WT** と **KO** マウスおよびそれらマウス由来の胚性線維芽細胞 (**MEF**) を用いてこの可能性を検討した。

実験方法

1. 試薬および試薬調製

DL-プロパルギルグリシン (DL-propargylglycine, PPG) は SIGMA (St. Louis, USA) より購入した。これを生理食塩水に溶解し、5 mg/mL に調製した。L-シスタチオニン (L-cystathionine) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。L-シスタチオニンは水に不溶のため、0.06 N HCl に溶解し、20 mM に調製した。特に記載がない場合、試薬は和光純薬工業株式会社もしくは SIGMA-ALDRICH (St. Louis, USA) から購入した。

2. 実験動物

8-12 週の C57BL/6J 野生型 (WT) マウスと C57BL/6J 由来の xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスを使用した(18)。xCT-KO マウスは、C57BL/6J マウスと 10 回以上バッククロスを行ったマウスを使用した。4~6 匹を同一ケージで飼育し、市販の固形飼料 (オリエンタル酵母株式会社, 東京) と水道水を自由摂取させた。室温は 22±2 °C、湿度 40~60%、12 時間の明暗周期で飼育を行った。

3. 細胞培養

xCT 遺伝子欠損マウス胚由来線維芽細胞 (KO-MEF) および野生型マウス胚由来線維芽細胞 (WT-MEF) は筑波大学より提供された。細胞は、10%牛胎仔血清(fetal bovine serum, FBS)、50 U/ml ペニシリン、50 µg/ml ストレプトマイシン、50 µM 2-メルカプトエタノール(2-ME)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)を用いて、5%CO₂、37 °C の条件下で培養した。

また、実験条件によってシスチン欠乏培地を用いる時は、10%FBS、50 U/ml ペニシリン、50 U/ml ストレプトマイシン、4 mM L-グルタミン、0.2 mM L-メチオニン、1 mM Sodium Pyruvate を含む Sigma 社の DMEM 4.5 g/L glucose(L-グルタミン、L-メチオニン、L-シスチン、ピルビン酸ナトリウム不含)を用いた。

4. シスタチオニン血症モデルマウスの作製と血漿および各組織の採取

WT および KO マウスに対して、50 mg/kg PPG をマウス腹腔内に 3 日間投与することにより、シスタチオニン血症マウスを作製した(76)。同様に、生理食塩水を投与したマウスをコントロールとして使用した。PPG 投与によるマウスの見かけ上の変化は、WT および KO マウスで観察されなかった。投与 3 日目の 24 時間後に、血漿および各組織を採取した。

ペントバルビタール(50 mg/kg)投与後、ヘパリン処理を行った 22G 針 (TERUMO, 東京) と 1 mL シリンジ (TERUMO, 東京) を用いて、マウス下大静脈により末梢血を

採取した。採取後直ちに、遠心分離にかけ、血漿を分離した。分離した血漿は、アミノ酸測定用および HPLC 分析によるシステイン測定用に処理した。採血後のマウスから 0.02~0.05 g の範囲で肝臓および脾臓、胸腺を摘出して秤量し、組織アミノ酸分析のために、0.5 mL の 5%トリクロロ酢酸 (TCA) に沈めた。また、各組織の一部は、液体窒素によって急速に凍結し、-80 °Cで保存した。

これらの動物実験は、山形大学農学部動物実験委員会により承認され、それに基づいて実施された。

5. 細胞外液中アミノ酸分析のサンプリング

100 μ L の血漿または phosphate buffered saline(PBS)+G (終濃度で 0.1%グルコースと 0.01%Ca²⁺、Mg²⁺を含む) と 10 μ L 50% スルフォサリチル酸を混合し、30 分氷上放置したのち、-20 °Cで保存した。分析に用いるときに解凍し、遠心分離 (0°C-15,000 rpm-15 min) し、析出タンパク質を除き、上清をフィルター (Millex®-LH, MILLIPORE, Billerica, MA, USA) に通し、これをアミノ酸分析用サンプルとした。

6. 組織内アミノ酸のサンプリング

0.5 mL の 5%TCA 中に沈めた各組織を、ポリトロンでホモジェナイズした。これにさらに 0.5 mL の 5%TCA を加え、30 分間氷上に放置した。その後、遠心分離 (4 °C、6000 rpm、15 分間) し、上清を回収した。それぞれの上清を 5%TCA で 2 倍希釈し、溶液中の TCA を除くため、0.01 N HCl 飽和ジエチルエーテルにより除去した。エーテル抽出済みのサンプル 800 μ L を試験管に取り、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。ここにアミノ酸分析用バッファー(pH2.2)を 100 μ L 加えて混合し、フィルターに通した。これをアミノ酸分析用サンプルとした。

7. 細胞内アミノ酸のサンプリング

35 mmdish に播種した WT および KO-MEF を、37 °Cに温められた PBS+G 約 5 ml で 3 回洗い、37 °Cに温められた PBS+G、0.1 mM シスタチオニンを添加した PBS+G、または 0.1 mM シスチンを添加した PBS+G を 0.5 mL 加え、15 分間 37°Cで保温した。15 分後、PBS+G は、細胞外アミノ酸分析用サンプリングとして回収し、細胞は、以下のように細胞内アミノ酸分析用として回収した。細胞 (xCT-WT および KO-MEF) を、氷冷 PBS 約 5 mL で 3 回洗い、氷冷 5%トリクロロ酢酸 (TCA) 1 mL を加え、氷上に 30 分間放置した。放置後、TCA を試験管に回収した。dish には、0.5 N NaOH を 0.5 ml 加えて一晩放置し、タンパク質定量用サンプルとした。回収した TCA は、0.01 N HCl 飽和ジエチルエーテル抽出を行い、TCA を除去した。エーテル抽出済みのサンプル 800 μ L を試験管に取り、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。ここにアミノ酸分析用バッファー(pH2.2)を 100 μ L 加え混合し、フィルターに通した。これをアミ

ノ酸分析用サンプルとした。

8. アミノ酸分析

細胞内外サンプルのアミノ酸分析は、ニンヒドリン発色法を用いたアミノ酸分析装置（日立 L-8800 型拘束アミノ酸分析計，東京都）で分析した。HPLC 分離には、陽イオン交換樹脂カラム（4.6 mm I.D. × 60 mm、HITACHI、東京都）を使用し、バッファー用ポンプを 0.35 mL/min に設定し、カラムからの溶出液に一定流量（0.3 mL/min）のニンヒドリン試液を混合して加温されている反応カラムに通し、比色計のフローセルに入れ、ニンヒドリンの吸光度を測定し、自動記録計により記録した。バッファーの pH を段階的に上げていき酸性度の高いアミノ酸より溶出させた。シスタチオニンは、およそ 45.2 分で検出され、他の交雑物のピークとは独立していたので、この吸光度のピーク面積を、シスタチオニンの濃度計算に用いた。組織中または細胞中において、算出されたシスタチオニン量は湿重量またはタンパク質量で標準化し、湿重量当たりの量（nmol/wet weight g）またはタンパク質量当たりの量（nmol/mg protein）で表した。また、血漿においては、算出されたシスタチオニンの濃度（ μM ）として表した。

9. 組織からの total RNA 抽出

胸腺、脾臓および肝臓からの total RNA 抽出は、第一章と実験方法 4 と同様な操作により抽出した。

10. 細胞からの total RNA 抽出

100 mmdish に播種された細胞（xCT-WT-MEF と xCT-KO-MEF）を、24 時間培養した後、0.1 mM シスタチオニンまたはシスチンを添加したシスチン欠乏培地に培地を交換し、さらに 8 時間培養した。その後、これらの細胞からの total RNA 抽出は第一章の実験方法 5 と同様な操作により抽出した。

11. cDNA の合成

第一章の実験方法 6 と同様な操作により、RNA から cDNA を作製した。

12. real-time PCR による標的 mRNA の発現量の相対的定量

第一章の実験方法 8 と同様な操作により、標的 mRNA の相対的な発現量を定量した。Table 4 に使用したプライマーセットを示した。CBS 以外の遺伝子のプライマーセットを使用して増幅される増幅産物を TA クローニングにより pGEM®-T easy Vector（promega, 東京都中央区）に組み込んだプラスミドを用いて、任意の割合で連続的に希釈した希釈系列（Standard）を作製した。CBS は、野生型マウスから採取した肝臓の mRNA を逆転写し cDNA を合成し、これを特異的プライマーセットを用いて増幅し、

この増幅産物を任意の割合で連続的に希釈し希釈系列(Standard)を作製した。GAPDH をハウスキーピング遺伝子として使用して、GAPDH の算出された初期鋳型量に対する標的遺伝子の算出された初期鋳型量の割合として表した。Fig. 10 に表した組織における発現相対定量では、CBS および CGL は WT の肝臓での発現量を 1 とし、xCT は胸腺での発現量を 1 とし、その倍数 (fold) として表した。また、Fig. 18 に表した細胞における発現相対定量では、全ての遺伝子において、0h における WT-MEF での発現量を 1 としその倍数 (fold) として表した。

13. シスチン取り込み活性の阻害能の測定

Na⁺非存在下でのシスチン取り込み活性を測定するために、NaCl を塩化コリンに置き換えた PBS を使用した。細胞を 37 °C に温められた PBS+G (終濃度で 0.1% グルコースと 0.01% Ca²⁺、Mg²⁺を含む) 約 5 ml で 3 回洗い、37 °C に温められた uptake 液 (PBS+G に終濃度でシスチンを 0.02 mM と [¹⁴C] で標識されたシスチン 0.1 μCi/ml を含む) 0.5 ml を加え、37 °C で 2 分間保温した。このとき、シスタチオニンおよびグルタミン酸、ロイシン、セリン、アルギニン 0.2 mM で添加した uptake 液をそれぞれ用意し、コントロールに対するシスチン取り込み活性の阻害を測定した。シスタチオニンによるシスチン輸送阻害の濃度依存性を調べる実験では、シスタチオニンを 0.1-2 mM 含む uptake 液を用いた。2 分後、uptake 液を除き、氷冷の PBS で 3 回洗った。これに 0.5 N NaOH を 0.5 mL 加え、一晩放置した。このうちの 0.2 mL を用いて、シンチレーター 3 ml と 0.2 M Tris conc HCl (10:1) 0.1 ml と混合した後、シンチレーションカウンターで測定した。また、残りのうちの 0.1 ml を用いて、Lowry 法によってタンパク質量を定量した。シスチン取り込み活性は、比活性の値から、シスチンの取り込み量を算出し、1 分間あたりタンパク質あたり (nmol/min/mg protein) で表した。

14. 細胞内の総グルタチオンの定量

WT および KO-MEF を 35 mm dish に播種 (2.0 × 10⁵ cells/dish) し、24 時間培養した。その後、シスチン欠乏培地に培地を交換し、0.1 mM シスタチオニンを添加有無でさらに培養し、経時的にサンプリングを行った。氷冷 PBS 約 5 ml で 3 回洗い、氷冷 5% トリクロロ酢酸 (TCA) 1 ml を加えて、氷上に 30 分間放置した。30 分後、TCA を試験管に回収し、TCA を除くために、0.01 N HCl 飽和ジエチルエーテル抽出を行い、GSH 定量用サンプルとした。さらに、dish には 0.5 N NaOH を 0.5 ml 加えて一晩放置し、タンパク質定量用サンプルとした。

総グルタチオンの定量は、サンプルを 0.4 mL 使用して、第一章の実験方法 11 と同様な操作により測定した。イクリング法) により定量した(49)。

15. HPLC によるシステイン測定用のサンプリング

WT および KO-MEF を 35 mm dish に播種 (2.0×10^5 cells/dish) し、24 時間培養した。その後、シスチン欠乏培地に培地を交換し、0.1 mM シスタチオニンを添加有無でさらに培養し、経時的に第一章の実験方法 13 と同様な操作により HPLC サンプリングを行った。

16. HPLC によるシステインの定量

細胞内システイン量は第一章の実験方法 14 と同様な操作により測定した。

17. タンパク質の定量

タンパク質の定量は第一章の実験方法 15 と同様な操作により測定した。

18. 統計処理

値は平均±標準偏差で表した。フィッシャー最小有意差法を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ で有意であるとみなした。

結 果

1. マウスのメタボローム解析

野生型 (WT) および xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスから心臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胸腺、肺、精巣、大脳、小脳、血漿を採取し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) により各組織中の代謝産物を網羅的に解析した。219 種類の代謝物が同定されたが、そのほとんどの代謝物に関して、それぞれの組織において WT マウスおよび KO マウスの間に有意な差はなかった(77)。しかしながら、唯一シスタチオニンが、WT マウスの胸腺と脾臓において検出された一方で、KO マウスでは全く検出されなかった (Fig. 9)。

2. 胸腺および脾臓における CBS と CGL の発現解析

各マウスの胸腺と脾臓、肝臓から抽出した RNA を用いて、xCT、シスタチオニン β -シンターゼ (CBS)、およびシスタチオン γ -リアーゼ (CGL) の mRNA 発現を real-time PCR を用いて解析した。以前の報告通り、WT マウスの胸腺および脾臓においては、xCT mRNA の構成的な発現が確認された (Fig. 10C)。一方、WT および KO マウスの胸腺および脾臓において、CBS と CGL mRNA の発現は認められなかった (Fig. 10A, B)。これらの結果から、WT と KO マウス両方とも、胸腺と脾臓でトランススルフレーション経路においてシスタチオンを合成する酵素の CBS とシスタチオンを分解する酵素の CGL が発現しないにもかかわらず、WT マウスの胸腺と脾臓には、シスタチオンが明確に存在することが示された。このことから、WT マウスの胸腺と脾臓に存在するシスタチオンは、血中にわずかに存在するシスタチオンが、xCT によってこれらの組織内に取り込まれた可能性が示唆された。

3. PPG 投与による各組織および血漿におけるシスタチオニンの変動

上述の可能性を *in vivo* でさらに調べるため、シスタチオン血症モデルを作製し、血中シスタチオンが増大したときに、WT および KO マウスの胸腺および脾臓におけるシスタチオン量の変動するかどうかを解析した。両マウスでの通常状態の血漿中シスタチオン量はかなり低く、検出限界に近いレベルである(18)。DL-プロパルギルグリシン (PPG) は、CGL の阻害剤であり、肝臓および血中のシスタチオン量を著しく増大させ、シスタチオン血症を発症させることができる(76)。PPG を生理食塩水に溶解し、マウス腹腔内に 50 mg/kg の分量で 3 日間連続投与した。3 日目投与の 24 時間後に、血漿および胸腺、脾臓、肝臓中のシスタチオン量を測定した。その結果、コントロールと比較して、PPG 投与により、WT および KO マウスの肝臓および血漿中のシスタチオン量は著しく増大した (Fig. 11A, B)。肝臓中シスタチオン量は、それぞれ、WT-control 10.7 ± 2.73 nmol/g, WT-PPG 2108.4 ± 746.30 nmol/g, KO-control

9.4±7.59 nmol/g, KO-PPG 2931.1±1255.41 nmol/g であり、PPG 投与により WT ではおよそ 197 倍、KO ではおよそ 311 倍に上昇した。血漿中シスタチオン濃度は、それぞれ、WT-control 0.9 ±0.38 μM, WT-PPG 34.4 ±13.65 μM, KO-control 0.8 ±0.5 μM, KO-PPG 42.3 ±12.40 μM であり、PPG 投与によって WT ではおよそ 40 倍、KO ではおよそ 52 倍に上昇した。血漿および肝臓において WT と KO との間での統計学的有意差はなかったため、WT および KO マウスでは、同程度のシスタチオン血症を発症したと考えられた。このとき、胸腺中シスタチオン量は、それぞれ、WT-control 40.6 ±24.66 nmol/g, WT-PPG 1674.5 ±789.29 nmol/g, KO-control 0.0 ±0.00 nmol/g, KO-PPG 23.7 ±6.20 nmol/g であり、PPG 投与によって WT ではおよそ 41 倍になった (Fig. 11C)。脾臓中シスタチオン量は WT-control 5.5 ±0.56 nmol/g, WT-PPG 271.0 ±41.29 nmol/g, KO-control 0.0 ±0.00 nmol/g, KO-PPG 33.0 ±8.31 nmol/g であり、PPG 投与によって WT ではおよそ 49 倍に上昇した (Fig. 11D)。このように、著しく血漿シスタチオンが上昇した条件下において、WT マウスの胸腺および脾臓中のシスタチオン量は著しく増大したのに対し、KO マウスでは、胸腺、脾臓共にほとんどシスタチオンの増加は見られなかった (Fig. 11C, D)。これらの結果より、血中のシスタチオンは、xCT によって輸送される生理的な基質であり、胸腺および脾臓中に蓄積しているシスタチオンは、xCT の発現に依存していることが示唆された。

4. シスチン取り込みに対するシスタチオンの阻害効果

シスタチオンは、xCT によって輸送される生理的基質であるとする仮説を検証するために、野生型マウス胚由来線維芽細胞 (WT-MEF) を用いて、シスタチオンが細胞のシスチン取り込み活性を阻害するかどうかを実験した。0.1~2.0 mM のシスタチオンを共存させてシスチンの取り込み活性を調べたところ、濃度依存的に取り込み活性が抑えられた (Fig. 12A)。次に、0.2 mM のシスタチオンまたは各種アミノ酸 (グルタミン酸、ロイシン、セリン、アルギニン) 共存下で、終濃度で 0.02 mM のシスチンの取り込み活性を Na⁺非存在下で測定した。その結果、シスタチオンは、グルタミン酸と比較するとその効果は小さいものの、有意にシスチン取り込みを阻害した (Fig. 11B)。中性アミノ酸トランスポーターで輸送されるロイシンやセリン、塩基性アミノ酸トランスポーターで輸送されるアルギニンは、シスチン取り込みに影響しなかった。さらに、0.1 mM のジエチルマレイン酸 (DEM) を 24 時間処理した細胞では、Keap1-Nrf2 経路により xCT の発現が誘導されるため、シスチン取り込み活性は無処理のものと比較して、約 2 倍に増大したが、この上昇したシスチン取り込み活性もまた、シスタチオンによって有意に阻害された。

5. 細胞外シスタチオンと細胞内グルタミン酸との交換輸送

シスタチオンが、**xCT** を介するグルタミン酸との交換輸送によって取り込まれることを証明するため、**WT-MEF** を **0.1 mM** のシスタチオンを含むバッファーで、**37 °C**、**15 分間**保温し、細胞内からのグルタミン酸の放出を測定した (**Fig. 13**)。その結果、シスタチオンを含むバッファーでインキュベートすることにより、細胞外へのグルタミン酸の放出が有意に増加することが明らかとなった。また、**xCT** の誘導剤であるジエチルマレイン酸で刺激した細胞の場合は、グルタミン酸の放出が亢進することが示された。一方、同様の実験を **KO-MEF** で行ったところ、ジエチルマレイン酸処理の有無にかかわらず、グルタミン酸の放出促進は認められなかった。

この時、同時に細胞内のシスタチオン濃度を測定した (**Fig. 14**)。 **WT-MEF** において、**0.1 mM** シスタチオン添加バッファーで **37 °C**、**15 分間**保温すると、細胞内にシスタチオンの有意な蓄積が認められた。ジエチルマレイン酸処理した **WT-MEF** の場合、シスタチオンの蓄積は、約 **5 倍**に増加した。一方、同様の実験を **KO-MEF** で行ったところ、細胞内にごくわずかのシスタチオンの蓄積が認められたが、ジエチルマレイン酸処理した細胞でもその量はほとんど変化しなかった。このことから、**KO-MEF** で検出されたシスタチオンは、細胞外液から非特異的に取り込まれたものであると考えられた。

ポジティブコントロールとして、シスタチオンと同量 (**0.1 mM**) のシスチンを添加した場合でも、**WT-MEF** においてグルタミン酸の放出は増大した。しかし、**KO-MEF** を用いて同様な実験を行った場合、細胞外へのグルタミン酸の放出は増大せず、ジエチルマレイン酸処理によっても変化しなかった (**Fig. 13**)。以上の結果から、細胞外のシスタチオンは、**xCT** を介して細胞内のグルタミン酸と交換輸送されることが明らかとなり、**xCT** の生理学的な基質であることが示された。

6. シスチン欠乏下におけるシスタチオンの細胞保護効果の検討

以前の研究により、培養細胞は、グルタチオン (**GSH**) 合成のためのシステインを **xCT** を介するシスチンの供給に依存しており、もし培養細胞をシスチン欠乏条件下または **xCT** を阻害する条件下で培養すると、**GSH** が枯渇し、細胞は死滅することが示された(78)。このシスチン欠乏による細胞死が、シスタチオン添加により回避されるかどうかを調べるために、シスチン欠乏培地に **0.1 mM** のシスタチオンを添加して **WT-MEF** および **KO-MEF** を培養した。シスチン欠乏培地では、**WT** および **KO-MEF** は **24 時間**以内に死滅したが、シスチン欠乏培地にシスタチオンを添加した場合、**WT-MEF** は生存し、増殖能力も示した。これに対し、**KO-MEF** は、シスタチオンを添加しても細胞の死滅は回避されなかった (**Fig. 15**)。

次に、シスチン欠乏による細胞内システインの枯渇とそれに続く細胞内グルタチオンの減少をシスタチオンが補償するかどうかを検討するために、**0.1 mM** シスタチオン

ンを含むシスチン欠乏培地で培養した際の細胞内のシステインおよび GSH 量を測定した。WT-MEF において、シスチン欠乏によって細胞内システイン量および GSH 量は、培養 12 時間までに急激に減少し、培養 24 時間目では、システインおよび GSH 量はほぼ測定できないレベルまで減少した。一方、シスタチオニン添加の場合では、システイン量は維持され、細胞内 GSH 量は、一過的に減少したが、培養 24 時間目では、実験開始時の GSH 量のおよそ 30%まで回復した(Fig. 16A, C)。同様の実験を KO-MEF で行ったところ、シスタチオニン添加の有無にかかわらず、細胞内システインおよび GSH 量は、培養 12 時間で測定できないレベルまで減少し、その後に回復することはなかった (Fig. 16B, D)。これら結果により、xCT によって取り込まれたシスタチオニンが、システインに変換され、GSH 合成に使用されたと考えられた。

このことを検証するために、xCT、シスタチオニン γ -リアーゼ (CGL)、および GCLC の発現を調べた。WT および KO-MEF を 0.1 mM シスタチオニンの有無で 8 時間培養した。その後、total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を実施した。シスチンが含まれた通常の培地で培養した WT-MEF での発現量を基準として、他の処理での遺伝子の発現量を相対比で表した。この結果、WT-MEF において、シスチン欠乏条件下では、xCT, CGL, GCLC 全ての mRNA 発現の増強が認められた。これらの遺伝子は、シスタチオニン添加の場合でもシスチン欠乏と同程度の発現増強が認められた。一方、KO-MEF においては、シスチン添加の通常培養条件下においても、CGL, GCLC の発現量は、WT-MEF と比較して有意に高くなっており、これらの発現量は、シスチン欠乏下、シスタチオニン添加によっても WT-MEF の通常培養と比較して高い発現を示した (Fig. 17)。これらの結果により、シスチン欠乏により引き起こされる細胞死のシスタチオニンによる保護効果は、シスチン欠乏によって発現増強された xCT を介して取り込まれたシスタチオニンが、同じく発現増強した CGL によってシステインに分解され、このシステインを用いて GCLC によって GSH が合成されるためであることが示唆された。

考 察

本章では、組織における種々の代謝物に対する xCT の関わりについて調べる目的で、メタボローム解析により、各組織におけるメタボライトを KO マウスと WT マウスとで比較した。その結果、両者にほとんど差は認められなかった。しかし、KO と WT マウスの胸腺および脾臓において、唯一、シスタチオニン量に明確な違いが認められた。このことを踏まえ、さらに解析を行ったところ、シスタチオニンが、xCT の生理的な基質となっており、胸腺や脾臓のような免疫系組織では、もっぱら、xCT の働きによって、組織中のシスタチオニンが維持されていることが示された。当研究室において、xCT は、胸腺や脾臓だけではなく、パイエル板、腸間膜リンパ節、鼠径リンパ節、骨髄など、いわゆる免疫組織に構成的に発現していることが見出されている。これらの免疫系組織においても、おそらく xCT の働きによってシスタチオニンが組織中に蓄積しており、これが、何らかの生理機能を果たしているものと推定される。

本研究により、細胞外のシスタチオニンは、xCT を介して細胞内に取り込まれることが明らかとなったが、Patel らは、xc 系の阻害剤に関する研究の中で、シスタチオニンが、xCT を介するグルタミン酸の取り込みをある程度阻害することを報告している(79)。しかし、彼らは、シスタチオニンが、xCT の基質になるかどうかの解析は行っていない。本研究において、シスタチオニンが xCT を介してグルタミン酸と交換輸送されることを初めて示した。Fig. 18 に示すように、pH 7.4 付近では、シスチンは、19.2% の分子が、3 極性の電荷構造をとる。xc 系は、この 3 極性のシスチン分子を認識することが示されている(80)。シスタチオニンの pKa の値(81)から計算すると、pH 7.4 では、6.8% のシスタチオニンが、3 極性の電荷構造を持つことになる。一方、グルタミン酸は、pH 7.4 では、ほぼすべて 3 極性の電荷構造をとると考えられる。Fig. 12 に示すように、シスタチオニンによるシスチン取り込み阻害効率は、グルタミン酸と比較すると小さいが、これは中性の緩衝液中では 3 極性のグルタミン酸の方が、シスタチオニンよりも多く存在するため、見かけ上、同じ濃度では、シスタチオニンの方が阻害効率が低くなっていると考えられる。したがって、xCT に対する親和性は、グルタミン酸より、むしろシスタチオニンの方が高い可能性がある。

哺乳類細胞においては、シスチンを取り込むアミノ酸輸送系として b⁰⁺系が知られている。b⁰⁺系は、卵の発生過程に見られる胚盤胞で最初に報告されたアミノ酸輸送系であり(82)、タンパク質本体としては、b⁰⁺AT が輸送と司っている(83)。b⁰⁺AT は、主に腎臓と小腸に発現することが知られており、xCT とは異なり、中性アミノ酸や塩基性アミノ酸を基質とする。4 極性のシスチンが、この輸送体の基質であり、シスタチオニンも 4 極性の分子は、b⁰⁺系で輸送されることが考えられる。xCT KO マウスの胸腺や脾臓においては、シスタチオニンがまったく検出されなかったことから、b⁰⁺系は、これらの組織では発現しておらず、WT マウスで検出されたシスタチオニンは、もっぱら xCT に依存していると考えられる。最近、真菌の一種である酵母の細胞膜上に発現す

るシスチントランスポーター、*CgCYN1* によるシスチン取り込みは、シスタチオニン添加によって強く阻害されることが報告されている(84)。このトランスポーターもまた、エネルギーに依存せずに細胞外のシスチンを取り込むことや、その構造が、12回の膜貫通領域を有し、細胞膜上に発現するといった *xCT* との類似性が認められる。しかしながら、*xCT* は 4F2hc という細胞膜移行に関わるシャペロンを必要することや *CgCYN1* と *xCT* は構造的に全く異なるトランスポーターファミリーに属すること、*CgCYN1* によるシスチン取り込みはグルタミン酸によって阻害されないことから、酵母に発現する *CgCYN1* は、*x_c*系とは異なるシスチン輸送系であると言える。さらに、*CgCYN1* のシスチン取り込みは、構造的に似たシスタチオニンやランチオニン、セレノシスチンが輸送基質であるのに対して、*x_c*系は、グルタミン酸やホモシステイン酸、 α -アミノアジピン酸といった 3 極性型のアミノ酸を取り込むことが特徴として挙げられる (Fig. 18)。同じ 3 極性型に成り得るアスパラギン酸やホモシスチンは、*x_c*系の輸送基質にならないことが分かっているが、それはその分子のサイズが *xCT* の基質結合領域と合致しないためと考えられている。*CgCYN1* は、おそらく、*b⁰⁺*系と同様に 4 極性のシスチンやシスタチオニンを認識して輸送する輸送体であると考えられる。

シスタチオニンの生理的役割については、トランススルフェーション経路の中間代謝物という以外ではまだ不明なところが多い。最近、PPG 投与によって肝臓中に増大したシスタチオニン自身が、ツニカマシン誘導性小胞体ストレスによって引き起こされる脂肪肝の防止や肝障害および腎障害を緩和するという報告がなされた(85)。胸腺は、加齢に伴って退縮し徐々に脂肪細胞に置き換わることが知られている。退縮の過程で、成熟 T リンパ球の末梢への供給が減少するため、個体レベルでは免疫系機能の低下をきたすことになる(86)。胸腺においては、*xCT* によって輸送されたシスタチオニンが、種々の刺激で誘導される小胞体ストレスのようなストレスから胸腺細胞を保護しているのかもしれない。当研究室では、以前、*xCT* が小胞体ストレスで誘導されることを見出した(15)。この誘導は、*xCT* 遺伝子上流にあるアミノ酸応答領域(amino acid response element: AARE)に、小胞体ストレスで活性化された ATF4 という転写因子が作用することによって引き起こされると考えられている。Fig. 17 に示した通り、シスチン欠乏によって、*xCT* および CGL mRNA の著しい増大が認められた。これらの遺伝子の発現増強は、シスチン欠乏によって引き起こされた小胞体ストレスにより、転写因子の ATF4 が活性化したためであると考えられる。最近、Dickhout らは、CGL が小胞体ストレスによって ATF4 を介して誘導されることを示した (66)。また、ATF4 欠損細胞においては、*xCT* の発現が抑制されており、グルタチオンレベルも野生型細胞に比べて有意に低いことが示されている。ATF4 は、*xCT* の発現制御に重要な転写因子であることが示されていることから(87,88)、今後、個体レベルでのチオール代謝制御において、ATF4 がどのような役割を果たしているか、さらに研究を進める必要があると思われる。

グルタミン酸は、哺乳類の中樞神経系において興奮性アミノ酸神経伝達物質として、学習や記憶といった様々な脳機能に関与している(89)。グルタミン酸を介する神経伝達は、数種類のグルタミン酸受容体によって制御されている。シナプス間隙に放出されたグルタミン酸は、主に、グリア細胞や神経細胞が発現する興奮性アミノ酸トランスポーター (EAAT) ファミリーによって速やかに回収されており(32-34)、グルタミン酸受容体を介してグルタミン酸作動性神経細胞の過剰な興奮毒性による神経細胞死を防いでいる。グルタミン酸の興奮毒性による神経細胞死は、虚血再灌流などの脳血管障害などに深く関与する(90,91)。例えば、グリア細胞に発現する EAAT1 や EAAT2 は、細胞外のグルタミン酸の取り込みに重要であり、これらを欠損したマウスは、細胞外グルタミン酸濃度が高くなり、日常的に顕著な痙攣発作を起こしたり、ペンチレンテトラゾールなどの痙攣誘発剤に対して感受性が高くなることが報告されている(92,93)。我々は、最近、xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスとその野生型 (WT) マウスを解析し、脳における細胞外グルタミン酸濃度が、WT マウスに比べて KO マウスで有意に低いこと示しており、脳において xc 系の活性は、細胞外グルタミン酸濃度の制御に寄与することを明らかにした(35)。ヒトの脳内には、シスタチオンが大量に存在することが報告されている(94)。これは、脳において、CBS の発現量に対して CGL の発現量が低いためだと考えられている。また、シスタチオンは、サルのような高等な精神神経機能を有する神経組織にも多いことから、脳機能との間に何らかの関係があるのではないかと考えられている(95-97)。すでに述べたように、xCT は、脳で構成的に発現している。脳内でも特にクモ膜および最後野や脳弓下器官といった脳室周辺器官における発現が顕著で、手綱核、視床下部、第3脳室の上皮細胞にも発現している(16)。また、最近、我々のラットグリオーマ C6 細胞を用いた実験で、6-ヒドロキシドーパミンによって xCT の発現が増強されることを示している(98)。この結果から、ドーパミン分泌性ニューロンのシナプス近傍に存在するグリア細胞では、xCT の発現は高い状態に維持されていることが考えられる。さらに、脳での CBS の発現は、グリア細胞/アストロサイトでの発現が強いことが観察されていることから(63)、シナプス間隙におけるグルタミン酸の取り込みに、xCT とシスタチオンが関与する可能性が考えられた。本研究によって、シスタチオンは、xCT を介して輸送されることが明らかとなったが、脳においては、xCT による細胞内シスタチオンと細胞外グルタミン酸との交換輸送が部分的に起こり、EAAT とともに、シナプス間隙中のグルタミン酸濃度の調節に寄与しているのかもしれない。最近、中樞神経系以外のグルタミン酸の働きについて注目が高まっている(99)。Pacheco らは、樹状細胞に発現する xc 系によって放出されたグルタミン酸が、T リンパ球の活性化を制御していることを報告している(100)。一般に、xCT によって細胞内に取り込まれたシスチンは、速やかに還元されてシステインとなるため、細胞内のシスチンは、ほとんど検出されない。もし、シスタチオンが、胸腺の樹状細胞、マクロファージ、または、ストローマ細胞中に xCT を介して蓄積しているとすれば、そのシス

タチオニンは、細胞外のグルタミン酸と交換輸送される可能性がある。つまり、神経系と同様、細胞内のシスタチオニンと細胞外のグルタミン酸との xCT を介した交換輸送が、免疫系組織における細胞外グルタミン酸濃度の制御に寄与しているのかもしれない。

Fig. 16 に示す通り、WT-MEF のシスチン欠乏培地を用いての培養においてシスタチオニンを添加したとき、細胞内システイン量は、通常の培養条件の時と同程度に維持されているにもかかわらず、細胞内グルタチオン量は、通常の培養条件の時の 30%程度だった。この結果は、システインの一部は、グルタチオン合成以外に使用されていることを示唆している。小胞体ストレス状態では、タンパク質合成を調節する真核生物タンパク質合成開始因子-2 α (eukaryotic initiation factor-2 α : eIF-2 α) がリン酸化され、新規のタンパク質合成が阻害されることが報告されている(101-103)。ゆえに、シスタチオニンから合成されたシステインが、タンパク質合成に使用されているため、グルタチオン量が減少したと考えるのは妥当ではない。最近、小胞体ストレス条件下では、シスタチオニン γ -リアーゼ (CGL) がミトコンドリアに移行し、ミトコンドリアのシステインおよび硫化水素 (H_2S) の維持に寄与することが報告された(104)。つまり、シスチン欠乏による小胞体ストレスによって、CGL がミトコンドリアに移行する可能性がある。本研究で観察されたシステインと GSH 量が相関しないという結果は、xCT によって取り込まれたシスタチオニンが、ミトコンドリア内に入り、そこでシステイン合成が行われ、ミトコンドリア内にシステインが捕捉されているため、細胞質でのグルタチオン合成に使用されにくい状態にあるからだと考えられた。最近の研究で、バクテリアにおいても、シスチンを取り込むトランスポーターが存在し、過酸化水素による酸化ストレスから自身を防御する働きがあることが示されている(105)。また、リソソーム上にも H^+ 依存的にリソソームから細胞質へのシスチン放出を司るシスチントランスポーターが存在することから(106,107)、ミトコンドリア内膜に存在するトランスポーターファミリー (SLC25) が、シスタチオニンの細胞質からの取り込みに寄与しているかもしれない。xCT によって細胞内に取り込まれたシスタチオニンがミトコンドリア内に移動するかどうか、また、その際、どのように取り込まれているかは今後さらに研究する必要がある。

これまでに、多くのがん細胞 (特に、肺、大腸、中枢神経系) において xCT の過剰発現が確認されており(21)、xCT の機能を抑えることで、がんの増殖や浸潤を抑制できることを示した報告も複数ある。本研究では、シスタチオニンが xCT の生理的基質であることを示したが、この結果を応用することによって、xCT が関与する種々のがんの診断が可能になるかもしれない。放射性同位体である ^{18}F (半減期: 110 分) で標識したグルコースやチロシンの誘導体を用いて、がん組織で発現が増大するグルコーストランスポーターや中性アミノ酸トランスポーターの L 系を介して取り込ませることによって、微小な癌化部位を可視的に診断する方法が試されている(108-110)。この方法を応用して xCT の輸送基質であるグルタミン酸誘導体を使用したがん診断も行われて

いる(111)。しかしながら、グルタミン酸は、興奮性アミノ酸トランスポーター (EAAT) から細胞内に取り込まれるため、特に脳腫瘍のようながんの診断には不向きである。そこで、グルタミン酸ではなくシスタチオニンの誘導体を開発できれば、より効率良くがんの診断ができるかもしれない。上述のように、3極性のシスタチオニンは、xCT に対する親和性が、グルタミン酸より高い可能性がある。このようなことに加えて、b⁰⁺系が、シスタチオニンを輸送するかどうかなど、他のトランスポーターとシスタチオニンの取り込みとの関連性についての知見を集めることで、がんの診断に有用な分子を開発が可能になるものと思われる。

CBS は本来、セリンとホモシステインからシスタチオニンと水 (H₂O) を産生する酵素であるが、セリンの代わりにシステインを用いると、シスタチオニンと H₂S が産生される。最近、H₂S は、一酸化窒素のように血管弛緩作用や神経機能調節作用があることが示されており(65,112)、H₂S と脳機能との関連が研究されている。Morikawa らは、低酸素刺激によってアストロサイトで産生される H₂S は、脳血管を弛緩させ血流量を増大させることで、低酸素症における脳機能障害を緩和させることに寄与することを明らかにした(113)。一方で、Qu らは、長時間にわたる脳梗塞時には血漿システインレベルの上昇が起きることに注目し、この際に、過剰に産生された H₂S が、脳梗塞部位を拡大させることを報告している(114)。x_c系によるシスチン取り込みが駆動力となる細胞外へのシステイン放出は、神経細胞保護に寄与するが、一方で、xCT を介して放出されたグルタミン酸は、興奮毒性にも寄与すると考えられる。しかしながら、細胞内のシスタチオニンと細胞外グルタミン酸との交換輸送が起こるならば、グルタミン酸放出による細胞毒性は回避され、xCT が神経細胞保護的に機能すると考えられる。本研究はシスタチオニンとグルタミン酸との交換という脳における xCT の新しい生理機能を示唆したものである。

Table.4 Real-time RT-PCR におけるプライマーセット

Gene	Forward	Reverse
xCT	Dr 4 3F (5'-CAT TGT ATG GGA CAA GAAACC-3')	Dr 4 end (5'-GGC ACT AGA CTC AAG AAC TGT-3')
GCLC	MAO64953-F (5'-GAT GTG GAC ACC CGA TGC AG-3')	MAO64953-R (5'-CAG GAT GGT TTG CAA TGA ACT CTC-3')
CBS	mCBS F2 (5'-GAT TGGCTA CGA CTT CAT CC-3')	mCBS R (5'-AGT CCT TCC TGT GCG ATG AG-3')
CGL	mCTH F2 (5'-TGG ATC CAG CTT TGA AGG CAG C-3')	mCTH R1 (5'-CAG TTC TGC GTA TGC TCC GTAA-3')
GAPDH	MAO050371-F (5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3')	MAO050371-R (5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3')

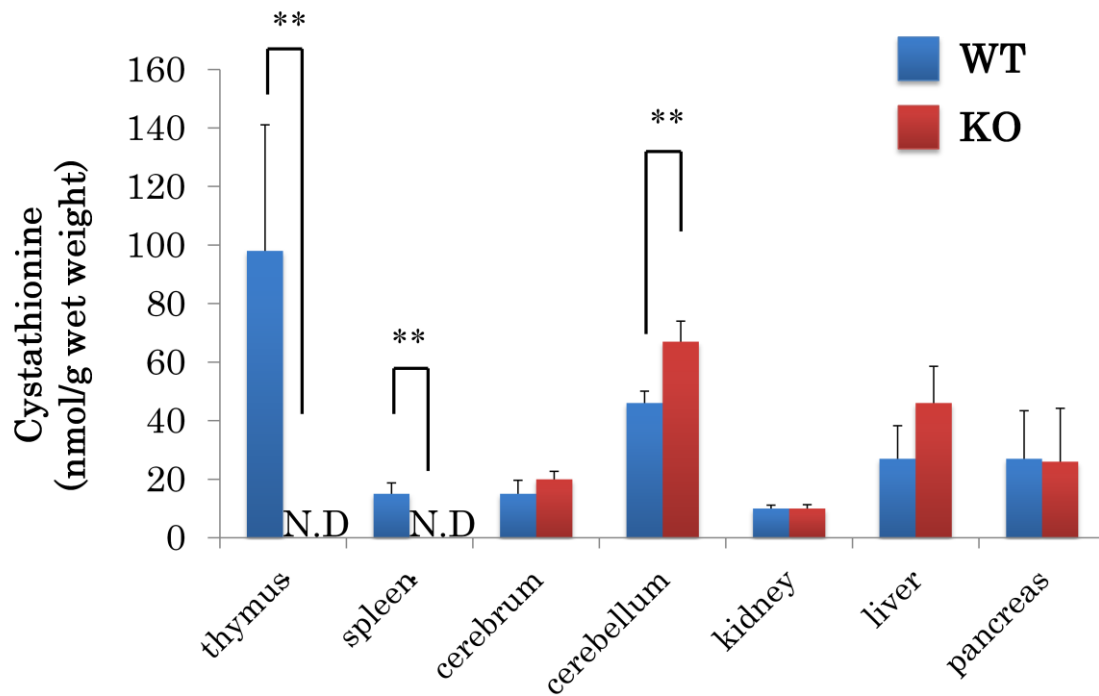


Fig. 9 各組織におけるシスタチオン量
 雄の野生型マウス (WT) と xCT 遺伝子欠損マウス (KO) から、各組織を採取し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) を使用して測定した。(n=3-4)
 N.D., not detected. ** $p < 0.01$

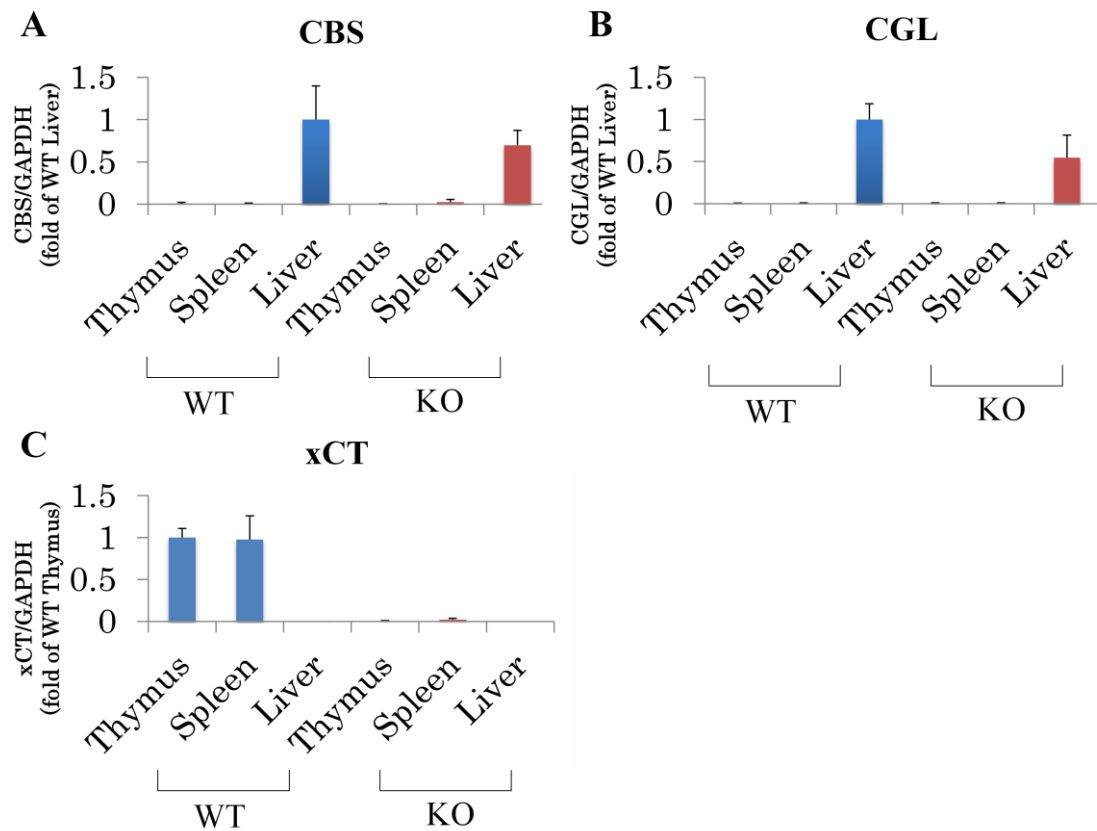


Fig. 10 各組織における xCT mRNA、CBS mRNA および CGL mRNA 発現
 雄の野生型マウス (WT) と xCT 遺伝子欠損マウス (KO) の各組織から RNA を抽出し、xCT mRNA、CBS mRNA および CGL mRNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析した。CBS mRNA と CGL mRNA は、WT の肝臓での発現量を 1 とし、xCT mRNA は、WT の胸腺での発現量を 1 として、その相対比で表した。(n=2-3)

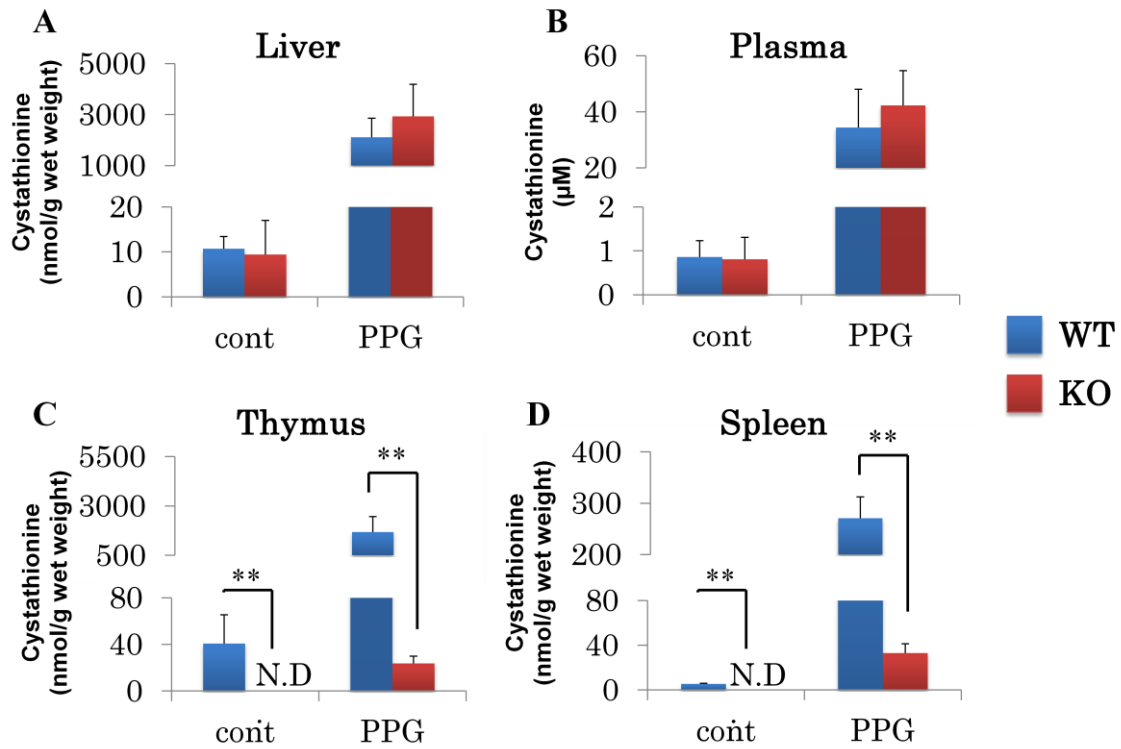


Fig. 11 シスタチオン血症におけるシスタチオニンの変動
 雄の野生型 (WT) と xCT 遺伝子欠損 (KO) マウスに、DL-プロパルギルグリシン (PPG) を生理的食塩水に溶かし、50 mg/kg で腹腔内に 3 日間連続投与した。最後の投与の 24 時間後に、血液および肝臓、胸腺、脾臓を摘出し、血漿 (A) および各組織 (A, 肝臓; B, 胸腺; C, 脾臓) 中のシスタチオン量をアミノ酸分析装置によって測定した (n=6)。
 ** $p < 0.01$

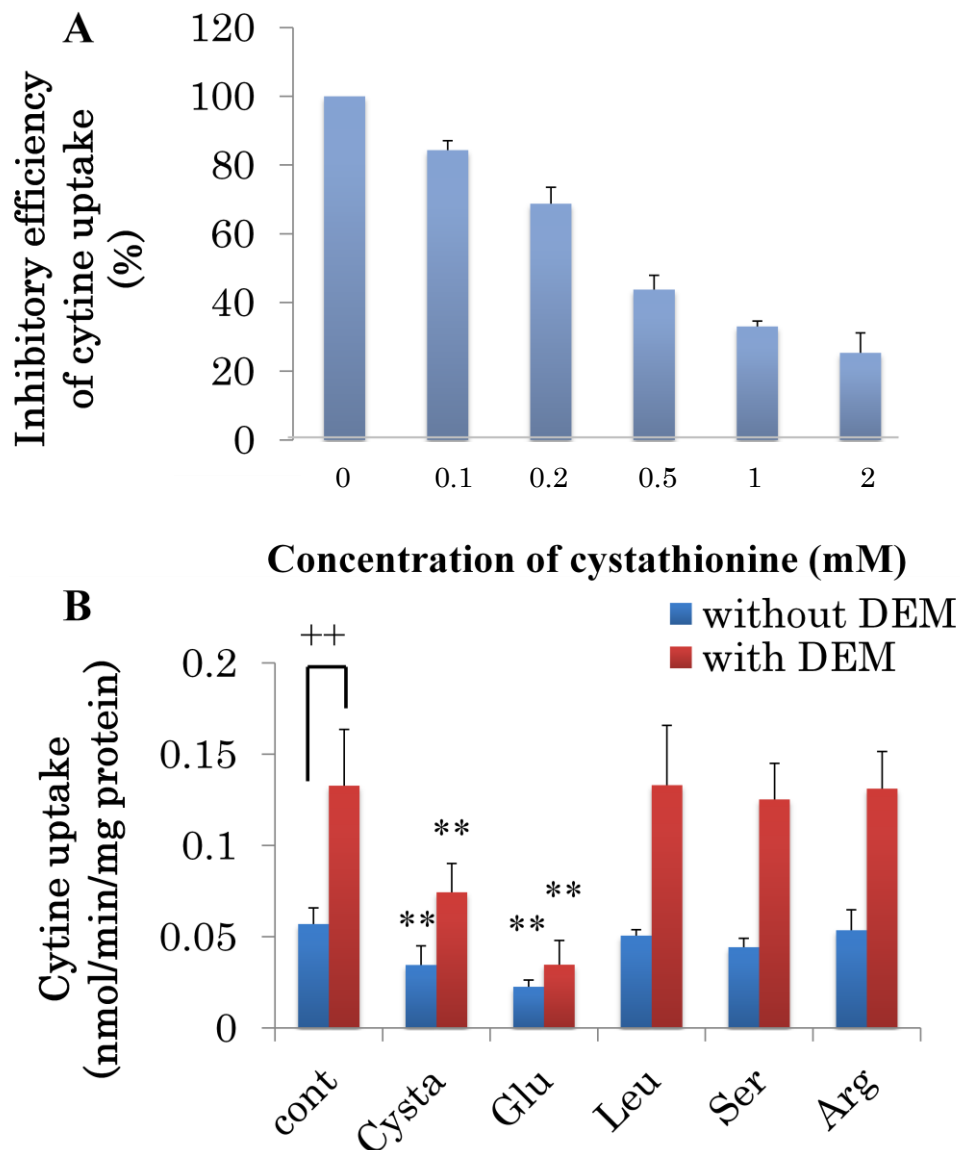


Fig. 12 野生型マウス由来胚性線維芽細胞株 (WT-MEF) のシスチン取り込み活性に対するシスタチオンへの影響

播種 24 時間後の WT-MEF において、示された濃度のシスタチオン (Cysta) 共存下で ^{14}C 標識シスチンを用いたシスチン取り込み活性を測定した (A)。 Na^+ -free 条件下でシスチン取り込み活性を各アミノ酸 (シスタチオン, Cysta; グルタミン酸, Glu; ロイシン, Leu; セリン, Ser; アルギニン, Arg) の存在下で測定した (B)。なお、シスチン濃度は $20 \mu\text{M}$ であり、各アミノ酸は $200 \mu\text{M}$ である。(n=6) ** $p < 0.01$ vs 0.0 (A), each cont (B). ++ $p < 0.01$

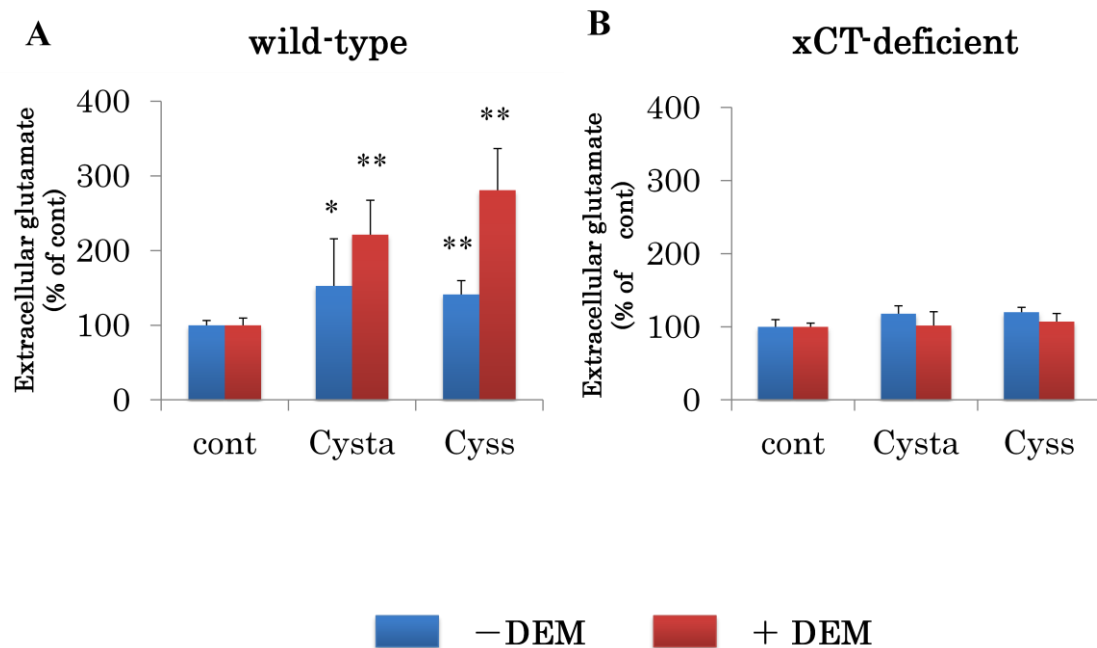


Fig. 13 シスタチオン添加による野生型マウス由来 (WT-MEF) および xCT 遺伝子欠損マウス由来胚性線維芽細胞 (KO-MEF) からのグルタミン酸の放出
 WT-MEF および KO-MEF を播種 24 時間後に、100 μ M DEM を添加し、さらに 24 時間培養した。培地を除去し、0.1% グルコースおよび 0.01% Ca^{2+} , Mg^{2+} 含有リン酸緩衝液 (PBS+G) に液換えし、無添加 (cont)、100 μ M シスタチオン添加 (Cysta)、100 μ M シスチン添加 (Cyss) し、さらに 15 分間培養した。その後、それぞれの細胞外グルタミン酸量をアミノ酸分析装置で測定した。(n=3-8)。 * p <0.05, ** p <0.01 vs each cont.

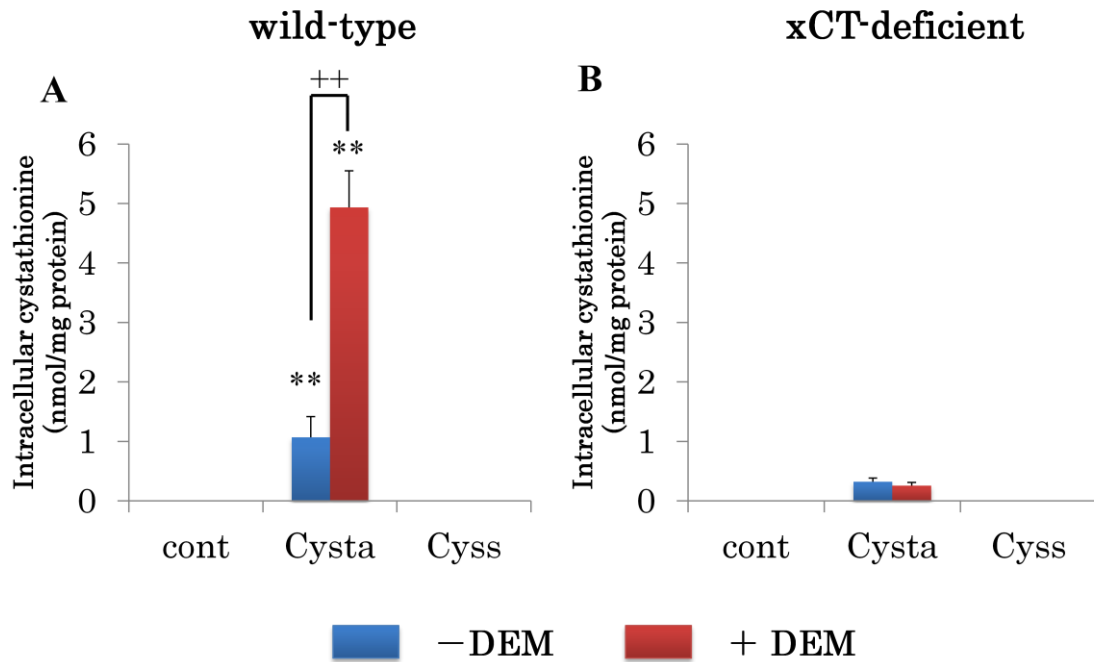


Fig. 14 シスタチオン添加による野生型マウス由来 (WT-MEF) および xCT 遺伝子欠損マウス由来胚性線維芽細胞 (KO-MEF) における細胞内シスタチオン量の比較 WT-MEF および KO-MEF を播種 24 時間後に、100 μ M DEM を添加し、さらに 24 時間培養した。培地を除去し、0.1% グルコースおよび 0.01% Ca^{2+} , Mg^{2+} 含有リン酸緩衝液 (PBS+G) に液換えし、無添加 (cont)、100 μ M シスタチオン添加 (Cysta)、100 μ M シスチン添加 (Cyss) し、さらに 15 分間培養した。その後、それぞれの細胞内シスタチオン量をアミノ酸分析装置で測定した。(n=3-8)。 ** $p < 0.01$ vs each cont. ++ $p < 0.01$

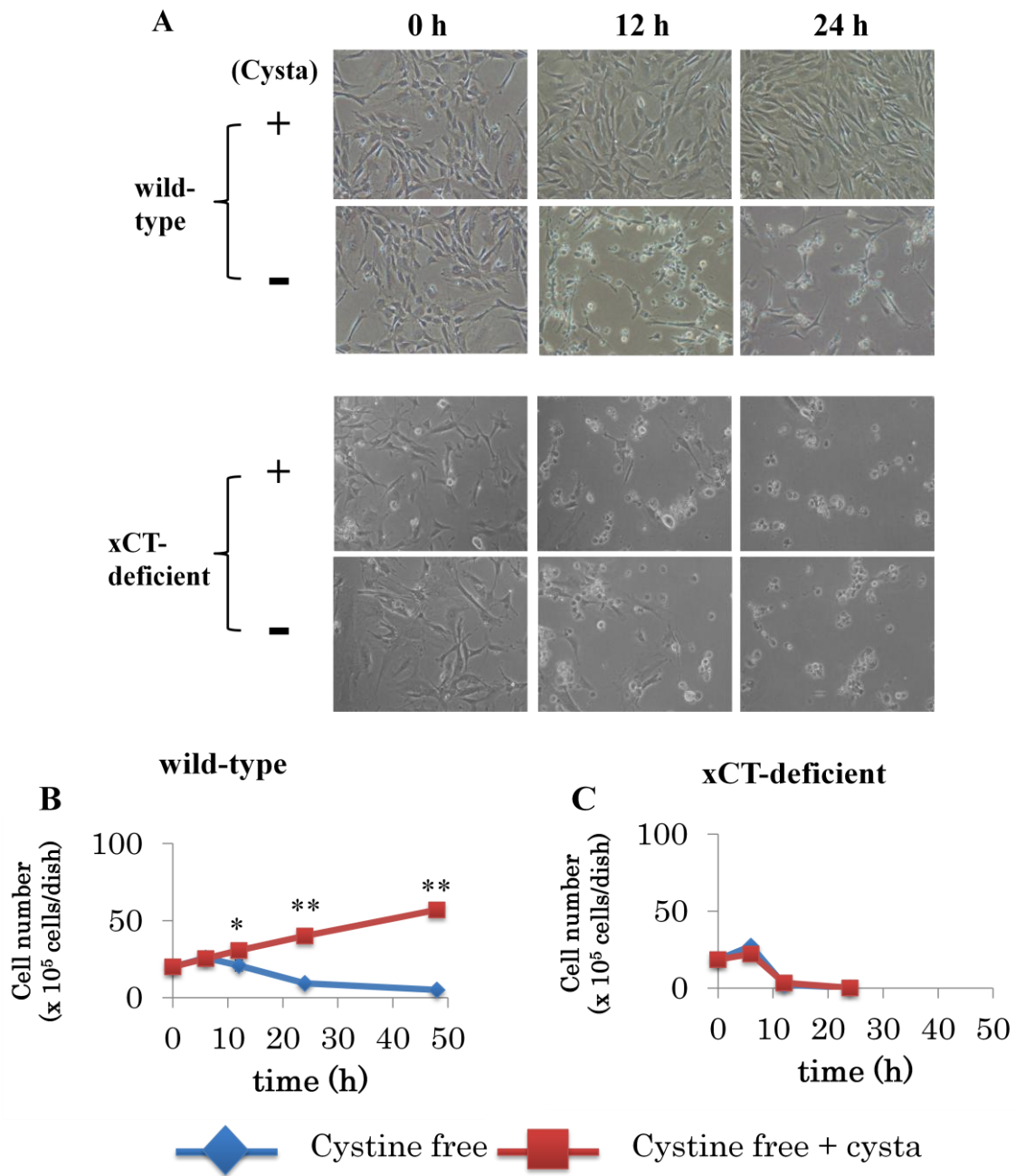


Fig. 15 野生型マウス由来 (WT-MEF) および xCT 遺伝子欠損マウス由来胚性線維芽細胞 (KO-MEF) におけるシスタチオニンの細胞生存への影響

WT-MEF および KO-MEF を播種し、24 時間培養後にシスチン欠乏培地に液換えし、さらにシスタチオニン (cysta) の有無の条件下で培養した。その後、0、12、24 時間後に、Nikon digital sight DE-U1 を使用して撮影した (A)。また、0、6、12、24、48 時間後に、トリパンブルーを用いて細胞生存数を計測した。(n=4)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Cystine free of each time point.

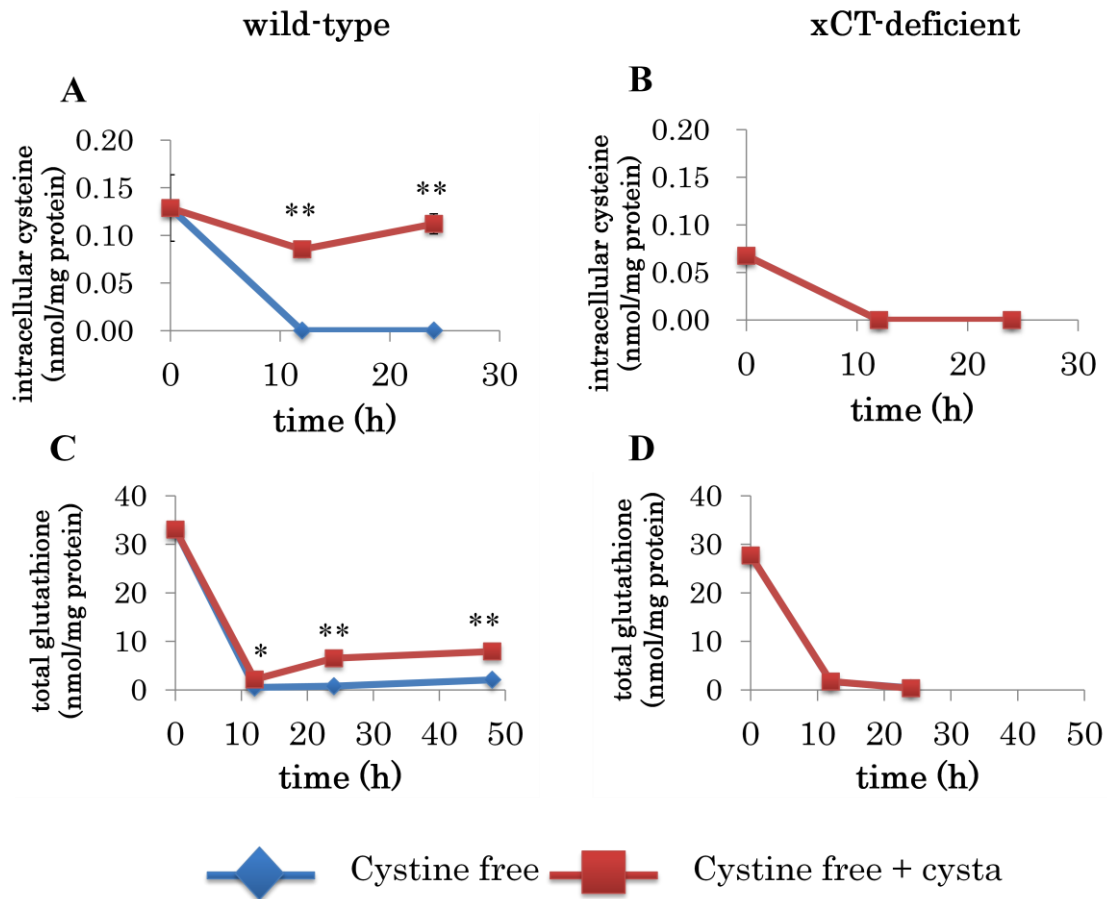


Fig. 16 野生型マウス由来 (WT-MEF) および xCT 遺伝子欠損マウス由来胚性線維芽細胞 (KO-MEF) におけるシスタチオニンの細胞内システイン量とグルタチオン量への影響

WT-MEF および KO-MEF を播種 24 時間後に、シスチン欠乏培地に液換えし、シスタチオニン (cysta) の有無の条件下で培養した。0、12、24 時間後に monobromobimane を用いた HPLC によって細胞内システイン量を測定した(A and B)。(n=4)。また、0、12、24、48 時間後に酵素リサイクリング法を用いて細胞内グルタチオン量を測定した (C and D)。(n=2-5) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Cystine free of each time point.

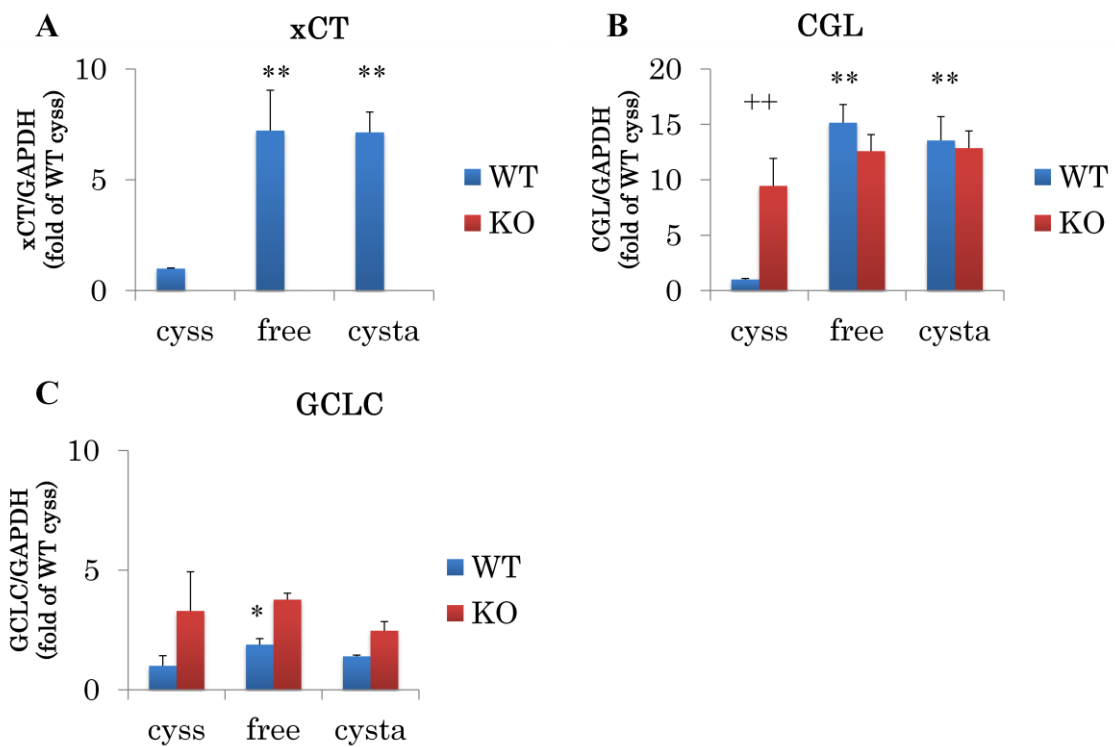


Fig. 17 野生型マウス由来 (WT-MEF) および xCT 遺伝子欠損マウス由来胚性線維芽細胞 (KO-MEF) におけるシスタチオニンの xCT mRNA および GCLC mRNA、GCL mRNA 発現への影響

WT-MEF および KO-MEF を播種し、24 時間培養後、シスチン欠乏培地に液換えし、無添加 (free) および 100 μ M シスタチオン添加 (cysta)、100 μ M シスチン添加 (cyss) して、さらに 8 時間培養した。その後、RNA を抽出した。xCT、GCLC および CGL mRNA の発現は、real-time PCR 法を用いて解析した (A, xCT; B, CGL; C, GCLC)。それぞれの遺伝子において、WT-MEF のシスチン添加条件での発現を 1 として、その相対比として表した。(n=3) * p <0.05, ** p <0.01 vs each cyss. ++ p <0.01

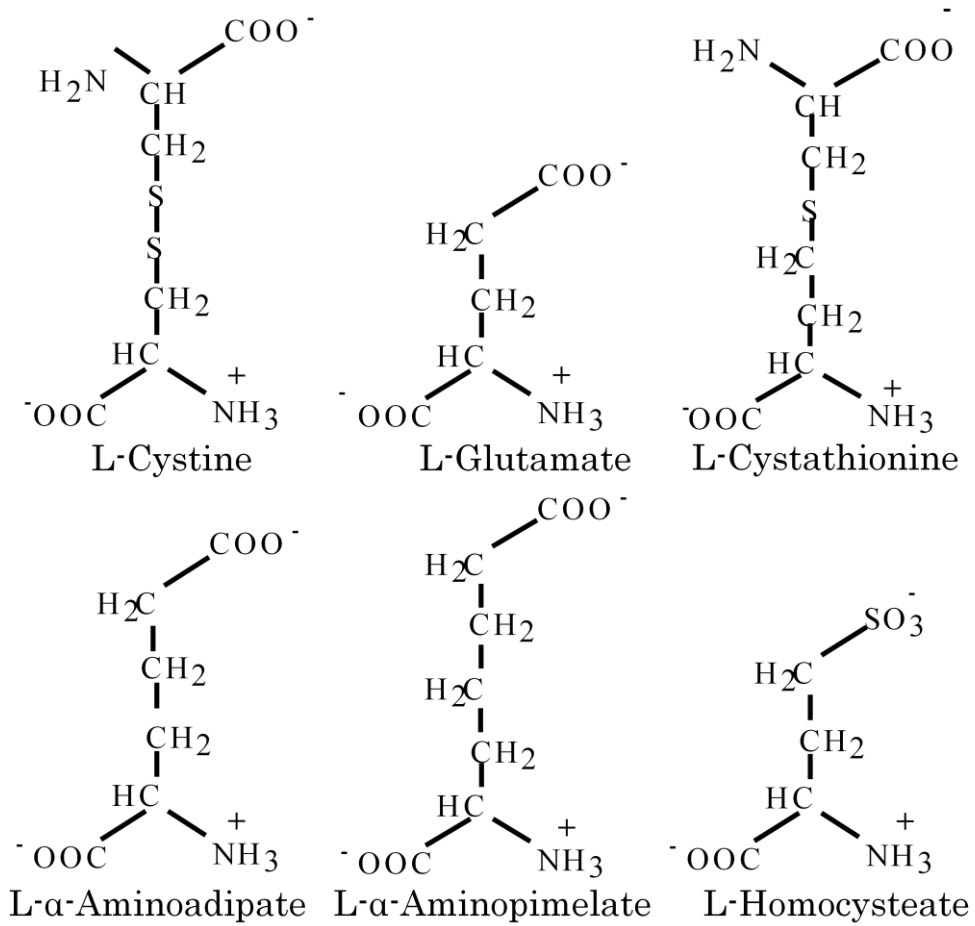


Fig. 18 xCT の輸送基質の構造

xCT の輸送基質を 3 極性型の構造式で示した。

結 語

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、トランススルフェーション経路の中間代謝物であるシスタチオニンは、**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。

謝 辞

博士論文作成にあたり、終始御指導御鞭撻を賜りました佐藤英世教授に深く御礼申し上げます。メタボローム解析において各組織の解析をして頂いた慶応義塾大学先端生命科学研究所の曾我朋義教授、適切なお助言を頂きました木村賢一教授、福島道広教授、永井毅教授、五十嵐喜治教授、木村直子教授には心より感謝致します。そして、研究生生活を共にし、数々の助言、励ましを頂いた山形大学農学部食品栄養化学研究室の皆様にも心より感謝を申し上げます。

2014年3月吉日 小林 翔

引用文献

1. Christensen, H. N. (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiological Reviews* **70**, 43-77
2. Bannai, S., and Kitamura, E. (1980) Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *The Journal of Biological Chemistry* **255**, 2372-2376
3. Takada, A., and Bannai, S. (1984) Transport of cystine in isolated rat hepatocytes in primary culture. *The Journal of Biological Chemistry* **259**, 2441-2445
4. Bannai, S. (1986) Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* **261**, 2256-2263
5. Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., and Bannai, S. (1999) Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 11455-11458
6. Bassi, M. T., Gasol, E., Manzoni, M., Pineda, M., Riboni, M., Martin, R., Zorzano, A., Borsani, G., and Palacin, M. (2001) Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* **442**, 286-296
7. Sato, H., Tamba, M., Kuriyama-Matsumura, K., Okuno, S., and Bannai, S. (2000) Molecular cloning and expression of human xCT, the light chain of amino acid transport system xc. *Antioxidants & Redox Signaling* **2**, 665-671
8. Chillaron, J., Roca, R., Valencia, A., Zorzano, A., and Palacin, M. (2001) Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *American journal of physiology. Renal Physiology* **281**, F995-1018
9. Fenczik, C. A., Zent, R., Dellos, M., Calderwood, D. A., Satriano, J., Kelly, C., and Ginsberg, M. H. (2001) Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 8746-8752
10. Sasaki, H., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Sato, K., Maehara, K., Wang, H., Tamba, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Bannai, S. (2002) Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 44765-44771
11. Siow, R. C., Sato, H., Leake, D. S., Pearson, J. D., Bannai, S., and Mann, G. E. (1998) Vitamin C protects human arterial smooth muscle cells against atherogenic lipoproteins: effects of antioxidant vitamins C and E on oxidized LDL-induced adaptive increases in cystine transport and glutathione. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **18**, 1662-1670

12. Sato, H., Fujiwara, K., Sagara, J., and Bannai, S. (1995) Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages by bacterial lipopolysaccharide. *The Biochemical Journal* **310 (Pt 2)**, 547-551
13. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development* **13**, 76-86
14. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., and Yamamoto, M. (2003) Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes to Cells* **8**, 379-391
15. Sato, H., Nomura, S., Maebara, K., Sato, K., Tamba, M., and Bannai, S. (2004) Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**, 109-116
16. Sato, H., Tamba, M., Okuno, S., Sato, K., Keino-Masu, K., Masu, M., and Bannai, S. (2002) Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain. *The Journal of Neuroscience* **22**, 8028-8033
17. Taguchi, K., Tamba, M., Bannai, S., and Sato, H. (2007) Induction of cystine/glutamate transporter in bacterial lipopolysaccharide induced endotoxemia in mice. *Journal of Inflammation* **4**, 20
18. Sato, H., Shiiya, A., Kimata, M., Maebara, K., Tamba, M., Sakakura, Y., Makino, N., Sugiyama, F., Yagami, K., Moriguchi, T., Takahashi, S., and Bannai, S. (2005) Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 37423-37429
19. Ishii, T., Bannai, S., and Sugita, Y. (1981) Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol in vitro. Role of the mixed disulfide of 2-mercaptoethanol and cysteine. *The Journal of Biological Chemistry* **256**, 12387-12392
20. Okuno, S., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Tamba, M., Wang, H., Sohda, S., Hamada, H., Yoshikawa, H., Kondo, T., and Bannai, S. (2003) Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *British Journal of Cancer* **88**, 951-956
21. Huang, Y., Dai, Z., Barbacioru, C., and Sadee, W. (2005) Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Research* **65**, 7446-7454
22. Dai, Z., Huang, Y., Sadee, W., and Blower, P. (2007) Chemoinformatics analysis identifies cytotoxic compounds susceptible to chemoresistance mediated by glutathione and cystine/glutamate transport system xc. *Journal of Medicinal*

- Chemistry* **50**, 1896-1906
23. Lyons, S. A., Chung, W. J., Weaver, A. K., Ogunrinu, T., and Sontheimer, H. (2007) Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Research* **67**, 9463-9471
 24. Chung, W. J., Lyons, S. A., Nelson, G. M., Hamza, H., Gladson, C. L., Gillespie, G. Y., and Sontheimer, H. (2005) Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *The Journal of Neuroscience* **25**, 7101-7110
 25. Savaskan, N. E., Heckel, A., Hahnen, E., Engelhorn, T., Doerfler, A., Ganslandt, O., Nimsky, C., Buchfelder, M., and Eyupoglu, I. Y. (2008) Small interfering RNA-mediated xCT silencing in gliomas inhibits neurodegeneration and alleviates brain edema. *Nature Medicine* **14**, 629-632
 26. Nabeyama, A., Kurita, A., Asano, K., Miyake, Y., Yasuda, T., Miura, I., Nishitai, G., Arakawa, S., Shimizu, S., Wakana, S., Yoshida, H., and Tanaka, M. (2010) xCT deficiency accelerates chemically induced tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 6436-6441
 27. Ye, Z. C., and Sontheimer, H. (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Research* **59**, 4383-4391
 28. Shukla, K., Thomas, A. G., Ferraris, D. V., Hin, N., Sattler, R., Alt, J., Rojas, C., Slusher, B. S., and Tsukamoto, T. (2011) Inhibition of xc(-) transporter-mediated cystine uptake by sulfasalazine analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**, 6184-6187
 29. Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C., and Stockwell, B. R. (2003) Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* **3**, 285-296
 30. Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., 3rd, and Stockwell, B. R. (2012) Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060-1072
 31. Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., Masuko, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Kai, K., Takahashi, E., Imamura, Y., Baba, Y., Ohmura, M., Suematsu, M., Baba, H., and Saya, H. (2011) CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* **19**, 387-400
 32. Nieoullon, A., Canolle, B., Masméjean, F., Guillet, B., Pisano, P., and Lortet, S. (2006) The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it

- represent a major actor at the brain excitatory synapse? *Journal of Neurochemistry* **98**, 1007-1018
33. Danbolt, N. C. (2001) Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* **65**, 1-105
 34. Maragakis, N. J., and Rothstein, J. D. (2004) Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiology of Disease* **15**, 461-473
 35. De Bundel, D., Schallier, A., Loyens, E., Fernando, R., Miyashita, H., Van Liefferinge, J., Vermoesen, K., Bannai, S., Sato, H., Michotte, Y., Smolders, I., and Massie, A. (2011) Loss of system x(c)⁻ does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *The Journal of Neuroscience* **31**, 5792-5803
 36. Sakakura, Y., Sato, H., Shiiya, A., Tamba, M., Sagara, J., Matsuda, M., Okamura, N., Makino, N., and Bannai, S. (2007) Expression and function of cystine/glutamate transporter in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* **81**, 974-982
 37. Angelini, G., Gardella, S., Ardy, M., Ciriolo, M. R., Filomeni, G., Di Trapani, G., Clarke, F., Sitia, R., and Rubartelli, A. (2002) Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1491-1496
 38. Bannai, S., and Tateishi, N. (1986) Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *The Journal of Membrane Biology* **89**, 1-8
 39. Deneke, S. M., Baxter, D. F., Phelps, D. T., and Fanburg, B. L. (1989) Increase in endothelial cell glutathione and precursor amino acid uptake by diethyl maleate and hyperoxia. *The American Journal of Physiology* **257**, L265-271
 40. Clark, D. G., McElligott, T. F., and Hurst, E. W. (1966) The toxicity of paraquat. *British Journal of Industrial Medicine* **23**, 126-132
 41. Forman, H. J., Aldrich, T. K., Posner, M. A., and Fisher, A. B. (1982) Differential paraquat uptake and redox kinetics of rat granular pneumocytes and alveolar macrophages. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **221**, 428-433
 42. Aldrich, T. K., Fisher, A. B., and Forman, H. J. (1983) Paraquat inhibits mixed-function oxidation by rat lung. *Journal of Applied Physiology* **54**, 1089-1093
 43. Rose, M. S., Smith, L. L., and Wyatt, I. (1974) Evidence for energy-dependent accumulation of paraquat into rat lung. *Nature* **252**, 314-315
 44. Sharp, C. W., Ottolenghi, A., and Posner, H. S. (1972) Correlation of paraquat toxicity with tissue concentrations and weight loss of the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **22**, 241-251

45. Witschi, H., Kacew, S., Hirai, K. I., and Cote, M. G. (1977) In vivo oxidation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate by paraquat and diquat in rat lung. *Chemico-Biological Interactions* **19**, 143-160
46. Guo, X., Shin, V. Y., and Cho, C. H. (2001) Modulation of heme oxygenase in tissue injury and its implication in protection against gastrointestinal diseases. *Life Sciences* **69**, 3113-3119
47. Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., and Yamamoto, M. (2000) Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 16023-16029
48. Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Hashimoto, T., Sasaki, H., Wang, H., Ishii, T., Mann, G. E., and Bannai, S. (2001) Effect of oxygen on induction of the cystine transporter by bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 10407-10412
49. Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* **27**, 502-522
50. Cotgreave, I. A., and Moldeus, P. (1986) Methodologies for the application of monobromobimane to the simultaneous analysis of soluble and protein thiol components of biological systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **13**, 231-249
51. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275
52. Watanabe, H., and Bannai, S. (1987) Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* **165**, 628-640
53. Sato, H., Watanabe, H., Ishii, T., and Bannai, S. (1987) Neutral amino acid transport in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 13015-13019
54. Iyer, S. S., Ramirez, A. M., Ritzenthaler, J. D., Torres-Gonzalez, E., Roser-Page, S., Mora, A. L., Brigham, K. L., Jones, D. P., Roman, J., and Rojas, M. (2009) Oxidation of extracellular cysteine/cystine redox state in bleomycin-induced lung fibrosis. *American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **296**, L37-45
55. Venet, F., Chung, C. S., Huang, X., Lomas-Neira, J., Chen, Y., and Ayala, A. (2009) Lymphocytes in the development of lung inflammation: a role for regulatory CD4+ T

- cells in indirect pulmonary lung injury. *Journal of Immunology* **183**, 3472-3480
56. Miura, K., Ishii, T., Sugita, Y., and Bannai, S. (1992) Cystine uptake and glutathione level in endothelial cells exposed to oxidative stress. *The American Journal of Physiology* **262**, C50-58
 57. Duong, C., Seow, H. J., Bozinovski, S., Crack, P. J., Anderson, G. P., and Vlahos, R. (2010) Glutathione peroxidase-1 protects against cigarette smoke-induced lung inflammation in mice. *American journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **299**, L425-433
 58. Rennard, S. I., Basset, G., Lecossier, D., O'Donnell, K. M., Pinkston, P., Martin, P. G., and Crystal, R. G. (1986) Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *Journal of Applied Physiology* **60**, 532-538
 59. Lowry, M. H., McAllister, B. P., Jean, J. C., Brown, L. A., Hughey, R. P., Cruikshank, W. W., Amar, S., Lucey, E. C., Braun, K., Johnson, P., Wight, T. N., and Joyce-Brady, M. (2008) Lung lining fluid glutathione attenuates IL-13-induced asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **38**, 509-516
 60. Finkelstein, J. D. (2000) Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **26**, 219-225
 61. Stipanuk, M. H. (2004) Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annual Review of Nutrition* **24**, 539-577
 62. Namekata, K., Enokido, Y., Ishii, I., Nagai, Y., Harada, T., and Kimura, H. (2004) Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 52961-52969
 63. Enokido, Y., Suzuki, E., Iwasawa, K., Namekata, K., Okazawa, H., and Kimura, H. (2005) Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *The FASEB Journal* **19**, 1854-1856
 64. Ishii, I., Akahoshi, N., Yu, X. N., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G., and Kimura, H. (2004) Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *The Biochemical Journal* **381**, 113-123
 65. Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A. K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S. H., and Wang, R. (2008) H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* **322**, 587-590
 66. Dickhout, J. G., Carlisle, R. E., Jerome, D. E., Mohammed-Ali, Z., Jiang, H., Yang, G.,

- Mani, S., Garg, S. K., Banerjee, R., Kaufman, R. J., Maclean, K. N., Wang, R., and Austin, R. C. (2012) Integrated stress response modulates cellular redox state via induction of cystathionine gamma-lyase: cross-talk between integrated stress response and thiol metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 7603-7614
67. Herrmann, W., and Knapp, J. P. (2002) Hyperhomocysteinemia: a new risk factor for degenerative diseases. *Clinical Laboratory* **48**, 471-481
68. Eberhardt, R. T., Forgione, M. A., Cap, A., Leopold, J. A., Rudd, M. A., Trolliet, M., Heydrick, S., Stark, R., Klings, E. S., Moldovan, N. I., Yaghoubi, M., Goldschmidt-Clermont, P. J., Farber, H. W., Cohen, R., and Loscalzo, J. (2000) Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *The Journal of Clinical Investigation* **106**, 483-491
69. Jiang, X., Yang, F., Tan, H., Liao, D., Bryan, R. M., Jr., Randhawa, J. K., Rumbaut, R. E., Durante, W., Schafer, A. I., Yang, X., and Wang, H. (2005) Hyperhomocystinemia impairs endothelial function and eNOS activity via PKC activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25**, 2515-2521
70. Weiss, N., Heydrick, S., Zhang, Y. Y., Bierl, C., Cap, A., and Loscalzo, J. (2002) Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **22**, 34-41
71. Davis, S. R., Quinlivan, E. P., Stacpoole, P. W., and Gregory, J. F., 3rd. (2006) Plasma glutathione and cystathionine concentrations are elevated but cysteine flux is unchanged by dietary vitamin B-6 restriction in young men and women. *The Journal of Nutrition* **136**, 373-378
72. Ishii, I., Akahoshi, N., Yamada, H., Nakano, S., Izumi, T., and Suematsu, M. (2010) Cystathionine gamma-Lyase-deficient mice require dietary cysteine to protect against acute lethal myopathy and oxidative injury. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 26358-26368
73. Kraus, J. P., Hasek, J., Kozich, V., Collard, R., Venezia, S., Janosikova, B., Wang, J., Stabler, S. P., Allen, R. H., Jakobs, C., Finn, C. T., Chien, Y. H., Hwu, W. L., Hegele, R. A., and Mudd, S. H. (2009) Cystathionine gamma-lyase: Clinical, metabolic, genetic, and structural studies. *Molecular Genetics and Metabolism* **97**, 250-259
74. Abe, K., and Kimura, H. (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience* **16**, 1066-1071
75. Kimura, Y., and Kimura, H. (2004) Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB Journal* **18**, 1165-1167
76. Barber, T., Triguero, A., Martinez-Lopez, I., Torres, L., Garcia, C., Miralles, V. J., and

- Vina, J. R. (1999) Elevated expression of liver gamma-cystathionase is required for the maintenance of lactation in rats. *The Journal of Nutrition* **129**, 928-933
77. Sugimoto, M., Ikeda, S., Niigata, K., Tomita, M., Sato, H., and Soga, T. (2012) MMMDB: Mouse Multiple Tissue Metabolome Database. *Nucleic Acids Research* **40**, D809-814
78. Cho, Y., and Bannai, S. (1990) Uptake of glutamate and cysteine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. *Journal of Neurochemistry* **55**, 2091-2097
79. Patel, S. A., Warren, B. A., Rhoderick, J. F., and Bridges, R. J. (2004) Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system xc(-): an obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine. *Neuropharmacology* **46**, 273-284
80. Bannai, S., and Kitamura, E. (1981) Role of proton dissociation in the transport of cystine and glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *The Journal of Biological Chemistry* **256**, 5770-5772
81. Aitken, S. M., and Kirsch, J. F. (2003) Kinetics of the yeast cystathionine beta-synthase forward and reverse reactions: continuous assays and the equilibrium constant for the reaction. *Biochemistry* **42**, 571-578
82. Van Winkle, L. J., Campione, A. L., and Gorman, J. M. (1988) Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 3150-3163
83. Lee, W. S., Wells, R. G., Sabbag, R. V., Mohandas, T. K., and Hediger, M. A. (1993) Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic, and neutral amino acid transport. *The Journal of Clinical Investigation* **91**, 1959-1963
84. Yadav, A. K., and Bachhawat, A. K. (2011) CgCYN1, a plasma membrane cystine-specific transporter of *Candida glabrata* with orthologues prevalent among pathogenic yeast and fungi. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 19714-19723
85. Maclean, K. N., Greiner, L. S., Evans, J. R., Sood, S. K., Lhotak, S., Markham, N. E., Stabler, S. P., Allen, R. H., Austin, R. C., Balasubramaniam, V., and Jiang, H. (2012) Cystathionine protects against endoplasmic reticulum stress-induced lipid accumulation, tissue injury, and apoptotic cell death. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 31994-32005
86. Lynch, H. E., Goldberg, G. L., Chidgey, A., Van den Brink, M. R., Boyd, R., and Sempowski, G. D. (2009) Thymic involution and immune reconstitution. *Trends in Immunology* **30**, 366-373
87. Lewerenz, J., and Maher, P. (2009) Basal levels of eIF2alpha phosphorylation

- determine cellular antioxidant status by regulating ATF4 and xCT expression. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 1106-1115
88. Lewerenz, J., Sato, H., Albrecht, P., Henke, N., Noack, R., Methner, A., and Maher, P. (2012) Mutation of ATF4 mediates resistance of neuronal cell lines against oxidative stress by inducing xCT expression. *Cell Death and Differentiation* **19**, 847-858
89. Riedel, G., Platt, B., and Micheau, J. (2003) Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research* **140**, 1-47
90. Namura, S., Maeno, H., Takami, S., Jiang, X. F., Kamichi, S., Wada, K., and Nagata, I. (2002) Inhibition of glial glutamate transporter GLT-1 augments brain edema after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience Letters* **324**, 117-120
91. Chapman, A. G. (2000) Glutamate and epilepsy. *The Journal of Nutrition* **130**, 1043S-1045S
92. Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., and Wada, K. (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* **276**, 1699-1702
93. Watanabe, T., Morimoto, K., Hirao, T., Suwaki, H., Watase, K., and Tanaka, K. (1999) Amygdala-kindled and pentylentetrazole-induced seizures in glutamate transporter GLAST-deficient mice. *Brain Research* **845**, 92-96
94. Roberts, E., Frankel, S., and Harman, P. J. (1950) Amino acids of nervous tissue. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **74**, 383-387
95. Awapara, J., Landua, A. J., Fuerst, R., and Seale, B. (1950) Free gamma-aminobutyric acid in brain. *The Journal of Biological Chemistry* **187**, 35-39
96. Tallan, H. H., Moore, S., and Stein, W. H. (1954) Studies on the free amino acids and related compounds in the tissues of the cat. *The Journal of Biological Chemistry* **211**, 927-939
97. Tallan, H. H., Moore, S., and Stein, W. H. (1958) L-cystathionine in human brain. *The Journal of Biological Chemistry* **230**, 707-716
98. Massie, A., Schallier, A., Kim, S. W., Fernando, R., Kobayashi, S., Beck, H., De Bundel, D., Vermoesen, K., Bannai, S., Smolders, I., Conrad, M., Plesnila, N., Sato, H., and Michotte, Y. (2011) Dopaminergic neurons of system x(c)⁻-deficient mice are highly protected against 6-hydroxydopamine-induced toxicity. *The FASEB Journal* **25**, 1359-1369
99. Julio-Pieper, M., Flor, P. J., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2011) Exciting times beyond the brain: metabotropic glutamate receptors in peripheral and non-neural

- tissues. *Pharmacological Reviews* **63**, 35-58
100. Pacheco, R., Oliva, H., Martinez-Navio, J. M., Climent, N., Ciruela, F., Gatell, J. M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (2006) Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. *Journal of Immunology* **177**, 6695-6704
 101. Sonenberg, N., and Hinnebusch, A. G. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**, 731-745
 102. de Haro, C., Mendez, R., and Santoyo, J. (1996) The eIF-2 α kinases and the control of protein synthesis. *The FASEB Journal* **10**, 1378-1387
 103. Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M., and Ron, D. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell* **11**, 619-633
 104. Fu, M., Zhang, W., Wu, L., Yang, G., Li, H., and Wang, R. (2012) Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 2943-2948
 105. Ohtsu, I., Wiriyathanawudhiwong, N., Morigasaki, S., Nakatani, T., Kadokura, H., and Takagi, H. (2010) The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 17479-17487
 106. Kalatzis, V., and Antignac, C. (2003) New aspects of the pathogenesis of cystinosis. *Pediatric Nephrology* **18**, 207-215
 107. Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C., and Gasnier, B. (2001) Cystinosis, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *The EMBO Journal* **20**, 5940-5949
 108. Strauss, L. G., Clorius, J. H., Schlag, P., Lehner, B., Kimmig, B., Engenhardt, R., Marin-Grez, M., Helus, F., Oberdorfer, F., Schmidlin, P., and et al. (1989) Recurrence of colorectal tumors: PET evaluation. *Radiology* **170**, 329-332
 109. Hoh, C. K., Hawkins, R. A., Glaspy, J. A., Dahlbom, M., Tse, N. Y., Hoffman, E. J., Schiepers, C., Choi, Y., Rege, S., Nitzsche, E., and et al. (1993) Cancer detection with whole-body PET using 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Journal of Computer Assisted Tomography* **17**, 582-589
 110. Kaira, K., Oriuchi, N., Shimizu, K., Tominaga, H., Yanagitani, N., Sunaga, N., Ishizuka, T., Kanai, Y., Mori, M., and Endo, K. (2009) ¹⁸F-FMT uptake seen within primary cancer on PET helps predict outcome of non-small cell lung cancer. *Journal*

of Nuclear Medicine **50**, 1770-1776

111. Baek, S., Mueller, A., Lim, Y. S., Lee, H. C., Lee, Y. J., Gong, G., Kim, J. S., Ryu, J. S., Oh, S. J., Lee, S. J., Bacher-Stier, C., Fels, L., Koglin, N., Schatz, C. A., Dinkelborg, L. M., and Moon, D. H. (2013) (4S)-4-(3-18F-fluoropropyl)-L-glutamate for imaging of xC transporter activity in hepatocellular carcinoma using PET: preclinical and exploratory clinical studies. *Journal of Nuclear Medicine* **54**, 117-123
112. Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., and Wang, R. (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO Journal* **20**, 6008-6016
113. Morikawa, T., Kajimura, M., Nakamura, T., Hishiki, T., Nakanishi, T., Yukutake, Y., Nagahata, Y., Ishikawa, M., Hattori, K., Takenouchi, T., Takahashi, T., Ishii, I., Matsubara, K., Kabe, Y., Uchiyama, S., Nagata, E., Gadalla, M. M., Snyder, S. H., and Suematsu, M. (2012) Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 1293-1298
114. Qu, K., Chen, C. P., Halliwell, B., Moore, P. K., and Wong, P. T. (2006) Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke; a Journal of Cerebral circulation* **37**, 889-893