

## 別記様式第 6 号 (第 16 条第 3 項, 第 25 条第 3 項関係)

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	浅野 昌也
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 SKF-10047, a prototype Sigma-1 receptor agonist, augmented the membrane trafficking and uptake activity of the serotonin transporter and its C-terminus-deleted mutant via a Sigma-1 receptor-independent mechanism. (シグマ 1 受容体のプロトタイプ・アゴニスト SKF-10047 は、シグマ 1 受容体を介さずセロトニントランスポーターとその C 末端欠損変異体の膜輸送と取り込み能を増強する)			
論文審査担当者			
主 査	教授	丸山 博文	印
審査委員	教授	今泉 和則	
審査委員	教授	岡本 泰昌	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>セロトニントランスポーター (SERT) は、神経終末から放出されたセロトニン (5-HT) を神経終末に再取り込みしセロトニン神経伝達を終了させるタンパク質である。SERT の機能は膜輸送機構により調節される。これまでの研究により、①SERT の C 末端欠損変異体 (SERT ΔCT) は、折り畳み不全タンパク質であり、膜輸送が阻害され小胞体 (ER) に停留すること、②プロテアソーム阻害剤の処置は、SERT の膜輸送を障害し SERT を ER に停留させ、SERT ΔCT と同様な状態を作ること、③ER ストレスを軽減させる効果のあるケミカルシャペロンの 4-phenylbutyric acid (4-PBA) は、SERT の膜輸送を亢進させ SERT、SERT ΔCT の取り込み活性を上昇させることを明らかにしている。SERT の膜輸送を亢進させ ER ストレスを緩和させる薬物は、SERT に関わる精神神経疾患の、また、ER ストレス関連疾患の治療法開発の糸口として有用である可能性がある。一方、小胞体タンパク質のシグマ 1 受容体は、アゴニストによりシグマ 1 受容体が有するシャペロン活性が上昇することが知られている。そこで、本研究では、従来からよく知られているシグマ 1 受容体のアゴニストである SKF-10047 (SKF) が SERT 機能に与える影響を検討することと、その作用メカニズムを調べることを目的とした。</p> <p>はじめに、野生型 SERT と SERT ΔCT の セロトニン取り込み活性とタンパク発現に対する SKF-10047 の効果を検討した。電気穿孔法を用いて COS-7 細胞に野生型 SERT と SERT ΔCT を発現させ、シグマ 1 受容体のアゴニストである SKF-10047 (SKF) をそれぞれ 24 時間処置した。その後、単位タンパク質あたりの [<sup>3</sup>H]5-HT の取り込み量を、あるいは、細胞 1 個当たりの蛍光 SERT 基質の取り込み量の平均を SERT の取り込み活性として測定した。その結果、SKF 500 μM の処置は野生型 SERT の取り込み活性を有意に上昇させ、SERT ΔCT では濃度依存的に顕著に取り込み活性を増大させた。一方、ウェスタンブロッティングによるタンパク発現の検討では、SKF は野生型 SERT に対し SERT 完全糖鎖修飾体を増加させ、未成熟糖鎖修飾体を減少させた。また SERT ΔCT でも同様に未成熟糖鎖修飾体を減少させた。この結果から SKF は膜輸送を促進させることにより、SERT 機能を高めていることが示唆された。</p> <p>次に、シグマ 1 受容体ノックダウン時の SERT ΔCT の セロトニン取り込み活性に対する SKF-10047 の効果を検討した。シグマ 1 受容体の shRNA と SERT ΔCT を電気穿孔法により COS-7 細胞または AD293 細胞に遺伝子導入し、シグマ 1 受容体の発現をノックダウンさせた細胞を作製し、同様の方法で取り込み活性を測定した。その結果、コントロール細胞群とシグマ 1 受容体ノックダウン細胞群の間で、取り込み活性に対する SKF の上昇効果の違いはみられなかった。この結果から SKF はシグマ 1 受容体を介さずに、SERT 機能を調節していることが示唆された。</p>			

さらに、SKF 処置により変動する遺伝子の cDNA アレイによる解析とタンパク発現変化の確認をした。AD293 細胞を用いて、SKF 無処置群と 200  $\mu$ M SKF24 時間処置群間で mRNA 発現量の変化を cDNA アレイにより解析した。SKF 処置群で上昇がみられた複数の遺伝子の中で、SNARE タンパク質であり、膜輸送に関与する Syntaxin3 (STX3) に着目した。ウエスタンブロッティングでは、SKF48 時間処置により STX3 タンパク発現が上昇することを確認した。

最後に、STX3 過剰発現時、ノックダウン時における SERT  $\Delta$ CT の セロトニン取り込み活性に対する SKF-10047 の効果を検討した。STX3 発現プラスミドあるいは siRNA と SERT  $\Delta$ CT を電気穿孔法により COS-7 細胞に遺伝子導入し、同様の方法で取り込み活性を測定した。その結果、コントロール細胞群と比較して STX3 過剰発現細胞群で取り込み活性に対する SKF の上昇効果は有意に増強した。一方、STX3 ノックダウン細胞では、取り込み活性に対する SKF の効果は変化なかった。この結果から SKF の SERT  $\Delta$ CT 機能に対する増強効果の一部に STX3 が関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、シグマ 1 受容体アゴニスト SKF-10047 はシグマ 1 受容体を介さず膜輸送を促進することにより SERT 機能、特に折り畳み不全タンパクである SERT  $\Delta$ CT の機能を上昇させることが明らかとなった。SKF は SNARE タンパク質の STX3 の発現を増加させ、さらに STX3 の過剰発現が SKF の SERT  $\Delta$ CT 機能に対する上昇効果をさらに増強することから、SKF-10047 の SERT 機能に対する効果発現の一部に STX3 が関与していることが示唆された。

SERT は抗うつ薬のターゲットであり、うつ病や不安障害をはじめとする精神神経疾患と深く関与している。SKF-10047 は、これらの疾患や膜輸送不全による ER ストレスに起因する病態を改善する治療法の新たな糸口となるかもしれない。

以上の結果から、本論文は、シグマ 1 受容体アゴニスト SKF-10047 の折り畳み不全タンパク質に対する新たな作用とその機序の一端を明らかにした。この成果は ER ストレスが関与する様々な精神神経疾患の改善に寄与するものである。

よって審査委員会委員全員は、本論文が 浅野 昌也 に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

別記様式第 7 号（第 16 条第 3 項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	浅野 昌也
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 SKF-10047, a prototype Sigma-1 receptor agonist, augmented the membrane trafficking and uptake activity of the serotonin transporter and its C-terminus-deleted mutant via a Sigma-1 receptor-independent mechanism. (シグマ 1 受容体のプロトタイプ・アゴニスト SKF-10047 は、シグマ 1 受容体を介さずセロトニントランスポーターとその C 末端欠損変異体の膜輸送と取り込み能を増強する)			
最終試験担当者			
主 査	教授	丸山 博文	印
審査委員	教授	今泉 和則	
審査委員	教授	岡本 泰昌	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記 3 名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成 31 年 1 月 7 日の第 77 回広島大学研究科発表会（医学）及び平成 31 年 1 月 10 日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 セロトニントランスポーターの取り込み活性の測定方法</li> <li>2 STX3 以外の SKF-10047 が作用するタンパク質の可能性</li> <li>3 他の ER ストレス誘導薬物の SERT 機能に対する効果</li> <li>4 SKF-10047 の使用濃度の妥当性</li> <li>5 STX3 の局在と小胞輸送への関与メカニズム</li> <li>6 STX3 に関連した SKF の効果発現メカニズム</li> <li>7 SKF-10047 の SERT に対する効果の特異性</li> </ol> <p>これらに対し極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			