

# アミノ酸トランスポーターによる中枢神経系機能制御の解明に関する研究

著者	大西 勇気
著者別表示	Onishi Yuki
雑誌名	博士論文要旨Abstractおよび要約Outline
学位授与番号	13301甲第4898号
学位名	博士(薬学)
学位授与年月日	2019-03-22
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/00058901">http://hdl.handle.net/2297/00058901</a>

氏名	大西 勇氣
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	医薬保博甲 258 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	アミノ酸トランスポーターによる中枢神経系機能制御の解明に関する研究

論文審査委員	主査	檜井 栄一
	副査	金田 勝幸
	副査	松下 良
	副査	小川 数馬
	副査	深見 達基

アミノ酸トランスポーターによる中枢神経系

機能制御の解明に関する研究

**Functional expression of amino acid transporter in central nervous  
system**

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 博士課程

薬学専攻 薬理学研究室

氏名 大西 勇気

Regulation of branched-chain amino acids (BCAA) concentration in the central nervous system is important for maintaining its function. An abnormal increase in BCAA concentration causes cognitive impairment and epilepsy, while its decrease is reported to induce abnormality in motor coordination and autism. L-type amino acid transporter 1 (LAT1) (gene name: *Slc7a5*) is one of the amino acid transporters expressed in the blood brain barrier and is important for transportation of essential amino acids into the brain. However, the functional role of LAT1 expressed in neurons is still unknown. In this study, we aimed to elucidate the functional role of LAT1 in neurons by *in vitro* analysis using neural-like cells.

Mouse neuroblastoma (Neuro2a) cells that were induced to differentiate into neuron-like cells were subjected to hypoxia, and mRNA expression of the LAT family genes was measured. The results showed that hypoxic stimulation elevated the *Slc7a5* expression and decreased the *Slc7a8* expression. Furthermore, the elevated expression of *Slc7a5* in Neuro2a cells by hypoxic stimulation was not significantly altered by knockdown of *hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$*  (*HIF-1 $\alpha$* ) but was significantly suppressed by knockdown of *HIF-2 $\alpha$* . In addition, HIF-2 $\alpha$  binding to the promoter region of *Slc7a5* was increased when Neuro2a cells were stimulated by hypoxia.

Our results demonstrated that hypoxic stimulation to the neurons increased the expression of *Slc7a5* via HIF-2 $\alpha$ . This suggested that *Slc7a5* is a novel hypoxia response factor in the neuron.

#### 【背景・目的】

脳や脊髄を含む中枢神経系には、神経細胞とアストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞が存在し、血液脳関門により高度な恒常性が維持された環境におかれている。これらの細胞は脆弱であり、脳梗塞などの低酸素ストレスを受けると神経細胞死やアストロサイトの異常増殖が引き起こされる。一方、栄養素の一つであるアミノ酸はタンパク質合成の材料として受動的な働きを持つだけでなく、神経細胞やグリア細胞といった中枢神経系の細胞を含む様々な細胞においてシグナル伝達分子として能動的に働くことが報告されている。アミノ酸シグナルはトランスポーターを介したアミノ酸の細胞内への流入に始まり、Mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) シグナルへ統合される。さらにバリン、ロイシン、イソロイシンなどの分岐鎖アミノ酸の濃度調節は中枢神経系の機能維持に極めて重要である。中枢神経系内の分岐鎖アミノ酸濃度の上昇は認知障害やてんかん、筋緊張低下などの神経症状を引き起こし、その低下は運動協調性の異常や自閉症を引き起こすことが報告されている。L-type amino acid transporter 1 (LAT1) (遺伝子名: *Slc7a5*) は代表的な分岐鎖アミノ酸トランスポーターの一つであり、血液脳関門に存在する血管内皮細胞に発現し、脳内におけるアミノ酸輸送に重要な働きを担っている。しかし、神経機能恒性常維持における神経細胞の LAT1 の機能的役割は不明である。本研究では培養細胞を用いた *in vitro* 解析を行い、神経細

胞における LAT1 の機能的役割の解明を試みた。

#### 【方法】

**低酸素刺激による神経細胞における *Slc7a5* の発現解析**：マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を神経細胞様細胞へ分化誘導後、低酸素刺激を行い、低酸素応答遺伝子である *Glucose transporter 1 (Glut1)*、*Heme oxygenase 1 (Hmox1)* とアミノ酸トランスポーターである *Slc7a5*、*Slc7a8*、*Slc43a1*、*Slc43a2* の mRNA 発現量を Real-time PCR 法を用いて解析した。

**低酸素刺激による神経細胞の *Slc7a5* の発現上昇と Hypoxia inducible factor (HIF) シグナル**：Neuro2a 細胞を培養後、PLAT-E 細胞から回収した short hairpin RNA for HIF-1 $\alpha$  (shHIF-1 $\alpha$ )、shHIF-2 $\alpha$ 、Control shRNA (shControl) のレトロウイルスをインフェクションし、HIF-1 $\alpha$  と HIF-2 $\alpha$  のそれぞれのノックダウンを行った。その後、神経細胞様細胞へ分化誘導後、低酸素刺激を行い、正常酸素状態と低酸素状態における *HIF1 $\alpha$* 、*HIF2 $\alpha$* 、*Slc7a5* の mRNA 発現量の比較を Real-time PCR 法を用いて行った。また、Neuro2a 細胞を神経細胞様細胞へ分化誘導後、低酸素刺激を行い、抗 HIF-1 $\alpha$  抗体、抗 HIF-2 $\alpha$  抗体を用いた Chromatin immunoprecipitation assay 法により、*Slc7a5* プロモーター上への HIF-1 $\alpha$  と HIF-2 $\alpha$  のリクルートを検討した。

#### 【結果】

**低酸素刺激による神経細胞における *Slc7a5* の発現解析**：Neuro2a 細胞において低酸素状態では、正常酸素状態と比較し *Glut1* と *Hmox1* の mRNA 発現上昇を示し、細胞に低酸素刺激が誘導されていることが確認できた。また、Neuro2a 細胞へ低酸素を負荷することにより、*Slc7a5* の発現上昇、*Slc7a8* の発現低下が認められたが、*Slc43a1* と *Slc43a2* の発現に変化はなかった。

**低酸素刺激による神経細胞の *Slc7a5* の発現上昇と HIF シグナル**：Neuro2a 細胞への shHIF-1 $\alpha$  もしくは shHIF-2 $\alpha$  の導入群では正常酸素状態、低酸素状態いずれも *HIF1 $\alpha$*  と *HIF2 $\alpha$*  の mRNA 発現低下を示し、正常に Neuro2a 細胞の HIF-1 $\alpha$  と HIF-2 $\alpha$  がノックダウンされていることが確認できた。また、低酸素刺激による Neuro2a 細胞の *Slc7a5* の発現上昇が shHIF-2 $\alpha$  導入によって抑制されること、一方で shHIF-1 $\alpha$  導入では変化しないことが明らかとなった。また、Neuro2a 細胞への低酸素刺激によって、*Slc7a5* のプロモーター上への HIF-2 $\alpha$  のリクルートが上昇したが、HIF-1 $\alpha$  のリクルートに変化はなかった。

#### 【考察】

本研究結果により、神経細胞への低酸素刺激によって HIF-2 $\alpha$  を介した *Slc7a5* 発現が引き起こされることが明らかとなった。すなわち、*Slc7a5* が神経細胞における新たな低酸素応答因子であることが示唆された。

# 審査結果の要旨

本研究では培養神経細胞を用いた *in vitro* 解析と細胞特異的遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 解析により、神経細胞におけるアミノ酸トランスポーターLAT1(*Slc7a5*)の発現調節機構および機能的役割の解明を試みた。マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を神経細胞様細胞へ分化誘導後、低酸素刺激を行った。その結果低酸素刺激により、*Slc7a5*の発現上昇が認められた。さらに、低酸素刺激による *Slc7a5*の発現上昇は、HIF-2 $\alpha$ のノックダウンにより有意に抑制された。*SynapsinI-Cre* マウスを用いて神経細胞特異的 *Slc7a5* 欠損マウスを作製し、表現型解析および組織学的解析を行った。その結果、神経細胞特異的 *Slc7a5* 欠損マウスでは体重減少および下肢反射異常が認められた。また同マウスでは、脊髄においてアストロサイトの異常増殖、オリゴデンドロサイトおよび運動神経細胞数の減少が観察された。

以上の研究成績は、*Slc7a5*が神経細胞における新たな低酸素応答因子であることを示すとともに、LAT1(*Slc7a5*)がマウス個体の運動機能調節に関与する可能性を示し、様々な神経系疾患の新規治療法・治療薬開発の礎となることが期待される点で評価されるため、審査員会は本論文が博士（薬学）に値すると判断した。