慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	抗認知症薬開発に向けた新たなコリン作動性神経賦活機序の解明
Sub Title	Investigation of a novel mechanism of cholinergic activation for cognitive impairment treatment
Author	奥田, 隆志(Okuda, Takashi)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	コリン作動性神経は中枢神経系において認知機能などに重要である。コリン作動性神経末端において、アセチルコリン合成の前駆体であるコリンは高親和性コリントランスポーター(CHT1)によって細胞外から輸送される。この輸送はアセチルコリン合成の律速段階となる。我々は、輸送基質であるコリンがCHT1の細胞内移行を誘導することによりその細胞表面発現量を制御することを新たに見出した。また、テトラヒドロピリミジン系薬がCHT1の競合的阻害剤であることを新たに見出した。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2009～2010 課題番号：21790091 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21790091seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年６月１０日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2009～2010
課題番号：21790091
研究課題名（和文） 抗認知症薬開発に向けた新たなコリン作動性神経賦活機序の解明
研究課題名（英文） Investigation of a novel mechanism of cholinergic activation for cognitive impairment treatment

研究代表者
奥田　隆志（OKUDA TAKASHI）
慶應義塾大学・薬学部・講師
研究者番号：00322040

研究成果の概要（和文）：コリン作動性神経は中枢神経系において認知機能などに重要である。コリン作動性神経末端において、アセチルコリン合成の前駆体であるコリンは高親和性コリントランスポーター（CHT1）によって細胞外から輸送される。この輸送はアセチルコリン合成の律速段階となる。我々は、輸送基質であるコリンがCHT1の細胞内移行を誘導することによりその細胞表面発現量を制御することを新たに見出した。また、テトラヒドロピリミジン系薬がCHT1の競合的阻害剤であることを新たに見出した。

研究成果の概要（英文）：Cholinergic neurons are involved in cognitive function in the central nervous system. At the cholinergic presynaptic terminals, acetylcholine synthesis relies on the high-affinity choline transporter (CHT1) for efficient choline supply from extracellular fluid. The choline uptake is the rate-limiting step in acetylcholine synthesis. We find that extracellular substrate regulates the cell surface CHT1 by enhancing its internalization rate. We also find that tetrahydropyrimidines are competitive inhibitors of CHT1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学
キーワード：認知症、コリン作動性神経、アセチルコリン、コリントランスポーター、トラフィッキング

１．研究開始当初の背景

超高齢化社会到来に伴い、アルツハイマー病やレビー小体病などの認知症に向けた治療薬開発は急務である。認知症患者脳では前脳基底部から大脳皮質の広範な領域に投射するコリン作動性神経の脱落が顕著であり、認知機能障害の原因であると考えられている。本邦で認可されているアルツハイマー病治療薬はコリン作動性神経賦活作用をもつコリンエステラーゼ阻害剤ドネペジルのみで、しかも有効な患者の割合と効果持続時間は限定的である。ドネペジルとは作用点の異なる新たなコリン作動性神経賦活薬に対する医学的・社会的要請は強い。

コリン作動性神経は中枢・末梢神経系において認知機能に限らず多くの重要な生理機能を司り、その破綻は多くの病態に関与することはよく知られている。数十年前から、コリン作動性神経末端には特異的な高親和性コリン取り込み系が存在し、アセチルコリン合成の前駆体供給の役割を果たすと考えられてきた。カテコールアミンなど他の神経伝達物質合成の場合と異なり、アセチルコリン合成の律速段階は合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼの活性ではなく前駆体供給のコリン取り込み活性であったことから、その機能的重要性が強く指摘された。1980 年代にコリン取り込み活性を指標としたタンパク精製が国内外で多く試みられたが、分子的同定は困難を極め、コリン取り込み系はコリン作動性神経研究におけるブラックボックスとなった。1990 年代に入ってコリン取り込み系の分子実体として高親和性コリントランスポーターの存在が予想された。しかし、国内外の多くのグループが同定を試みるも成功には至らなかった。我々は試行錯誤の末に世界に先駆けて高親和性コリントランスポーターを発現クローニングすることに成功し、CHT1 (choline transporter 1) と名付けた (Okuda et al., Nature Neurosci., 2000)。さらに、免疫組織化学的解析を行い、コリン作動性神経に特異的に局在することを明らかにした。CHT1 は Na^+依存的にコリンを輸送し、ヘミコリニウム-3 (HC-3) によって特異的に阻害された。CHT1 の生理的重要性は遺伝子欠損マウスがアセチルコリン合成能を欠き呼吸不全で致死であることから明らかとなった。コリン取り込みがアセチルコリン合成の律速段階であることから、高親和性コリントランスポーター CHT1 はコリン作動性神経において極めて重要な機能分子であると共に、アルツハイマー病などの認知症やその他のコリン作動性神経変性疾患に対する効果的な創薬に向けての新しい標的となりうる。CHT1 を標的としたコリン取り込み促進という全く新しい作用機序をもつコリン作動性神経賦活薬は、効果的な抗認知症薬開発の有力候補として期待されると考えられた。本研究開始当初の頃には、コリン取りこみ制御機構はコリン作動性神経機能に重要な機構として国内外でも注目を集め、CHT1 は重要な研究対象になりつつあった (Sarter and Parikh, Nature Rev. Neurosci., 2005)。特に CHT1 トラフィッキングによるアセチルコリン合成制御は、コリン作動性神経機能において極めて重要な機構として分子機序の解析が始まっていたが、その生理的な制御機構はよく知られていなかった。また、国内外において CHT1 を標的とするコリン作動性神経賦活薬開発に関する報告は為されておらず、そのような試みも知られていなかった。

２．研究の目的

CHT1 のトラフィッキングや機能調節の分子機構を明らかにすると共に、そこで得られた情報を利用してコリン取り込み促進薬のスクリーニング系の構築と探索を行いリード化合物を見出すことを最終目的とした。CHT1 の機能調節においては細胞内トラフィッキングが最も重要な役割を果たすため、CHT1 トラフィッキングはアセチルコリン合成制御に重要な機構であるだけでなく、コリン取り込み促進薬のスクリーニングにおいて重要な基礎情報を提供する。まず、リガンド依存性 CHT1 細胞内移行の分子機構を明らかにすることにした。これらの成果を踏まえた上で、コリン取り込み促進薬の評価系の構築を行い、ハイスループットスクリーニングによりリード化合物を見出すことを目的とした。

３．研究の方法

(1) CHT1 細胞内移行がリガンド依存的であるという予備的結果を得ていたので、この詳細な機構の解析を行った。培養細胞発現系、前脳基底部初代培養神経細胞、脳シナプトソーム分画の系において、基質であるコリンや阻害剤であるヘミコリニウムの前処理による細胞表面 CHT1 発現量の変動を調べた。[^{3}H]ヘミコリニウムを用いたリガンド結合実験、および細胞表面選択的なタンパクビオチン化・脱ビオチン化を用いたウエスタンブロットにより CHT1 細胞内移行の詳細な反応速度論的解析を行った。

(2) HEK293 細胞の CHT1 恒常的高発現株を用いてコリン取り込み促進化合物のスクリーニング系の構築を行った。[^{3}H]コリンを用いたコリン取り込み実験によるスクリーニングが理想であったが、培養細胞のコリン取り込みバックグラウンドは高い上に操作的にも多量処理には適していなかった。ヘミコリニウム-3 は親水性の CHT1 リガンドであり、細胞表面の CHT1 量を定量化するのに適しているため、[^{3}H]ヘミコリニウム-3 を用いたリガンド結合実験により細胞表面の CHT1 発現量を増大させる化合物のスクリーニングを行うことにした。結合実験の条件検討を行い、アッセイの最適化を行った。構築したスクリーニング系を用いて、市販の化合物ライブラリー (Microsource 社) から細胞表面 CHT1 量の増大作用をもつ化合物のハイスループットスクリーニングを行った。

(3) 未知の CHT1 トラフィッキング制御機構を明らかにするには、CHT１結合タンパク及び複合体成分の同定が不可欠である。CHT１細胞内領域に結合するタンパク質がトラフィッキング制御に関与することが示唆され

るので、CHT1 内の 7 つの細胞内領域それぞれの GST 融合タンパク質を大量発現・精製してカラムに結合させ、ブタ脳組織から CHT1 結合タンパク質の精製・同定を試みた。また、脊髄 cDNA ライブラリーを作製し、酵母 two-hybrid 法による CHT1 細胞内領域の結合タンパク質の探索を行った。

（4）CHT1 のオリゴマー化の可能性が考えられたため、CHT1 が属する SLC5 ファミリーのトランスポーター（SGLT1, SMVT）なども対象にして、培養細胞発現系において架橋処理や免疫沈降などによりホモオリゴマー形成に関する検討を行った。

４．研究成果

（1）脳シナプトソーム、前脳基底部初代培養神経細胞、培養細胞発現系において、輸送基質であるコリンが CHT1 の細胞内移行を誘導することによりその細胞表面発現量を制御することを新たに見出した。これは既知のクラスリン依存性経路とは異なる経路で選択的にトラッフィキングが制御されると考えられた。阻害剤であるヘミコリニウム-3 は CHT1 の細胞内移行を阻害することも分かった。また、CHT1 の細胞内移行は細胞外 pH に依存し、低 pH で促進・高 pH で抑制されることも新たに見出した。基質誘導による細胞内移行は、トラフィッキングにより CHT1 の細胞表面発現量を制御する新たなフィードバック機構であり、アセチルコリン合成速度に影響を与える重要な現象であると考えられる。

（2）トラフィッキング制御を利用した CHT1 リガンド評価系を構築して、化合物ライブラリーからリガンドスクリーニングを行い、古くから駆虫薬として知られるニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストのテトラヒドロピリミジン系薬（morantel, pyrantel, oxantel）が CHT1 の競合的阻害剤であることを新たに見出した。Morantel > pyrantel > oxantel の順に、脳シナプトソームや培養細胞発現系における CHT1 に対してμM レベルの阻害定数を示した。既知のリガンドはヘミコリニウム-3 など全てコリンアナログであるので、これは異なる骨格をもつリガンドの最初の例である。

（3）CHT1 のオリゴマー化についての検討を行い、CHT1 が属する SLC5 ファミリーのトランスポーター（SGLT1, SMVT）が培養細胞発現系においてホモオリゴマーを形成することを明らかにした。架橋処理や免疫沈降などの結果から、これらは培養細胞発現系では少なくともダイマーを形成して機能すると推測された。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. Fujii, T., Masai, M., Misawa, H., Okuda, T., Takada-Takatori, Y., Moriwaki, Y., Haga, T., and Kawashima, K. Acetylcholine synthesis and release in NIH3T3 cells coexpressing the high-affinity choline transporter and choline acetyltransferase. *J. Neurosci. Res.* 査読有 87, 3024-3032 (2009)
2. Moriwaki, Y., Watanabe, Y., Shinagawa, T., Kai, M., Miyazawa, M., Okuda, T., Kawashima, K., Yabashi, A., Waguri, S., and Misawa, H. Primary sensory neuronal expression of SLURP-1, an endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligand. *Neurosci. Res.* 査読有 64, 403-412 (2009)
3. Horiguchi, K., Horiguchi, S., Yamashita, N., Irie, K., Masuda, J., Takano-Ohmuro, H., Himi, T., Miyazawa, M., Moriwaki, Y., Okuda, T., Misawa, H., Ozak,i H., and Kawashima, K. Expression of SLURP-1, an endogenous alpha7 nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, in murine bronchial epithelial cells. *J. Neurosci. Res.* 査読有 87, 2740-2747 (2009)

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 神保美紗子、三澤日出巳、奥田隆志；シナプス小胞トランスポーターの細胞内移行シグナル配列の探索；第 124 回日本薬理学会関東部会（平成 23 年 6 月 4 日、東京大学）
2. 神保美紗子、三澤日出巳、奥田隆志；シナプス小胞トランスポーターの細胞内移行モチーフの探索；第 84 回日本薬理学会年会（震災により中止）（平成 23 年 3 月 23 日、パシフィコ横浜）
3. 小西麻未、野村有希、奥田隆志、三澤日出巳；テトラヒドロピリミジン系薬の新たな中枢神経作用点の同定；第 83 回日本薬理学会年会（平成 22 年 3 月 18 日、大阪国際会議場）
4. 矢嶋浩平、中田光、奥田隆志、三澤日出巳；SLC5 トランスポーターのオリゴマー形成におけるグリシンモチーフの役割；第 83 回日本薬理学会年会（平成 22 年 3 月 18 日、大阪国際会議場）
5. 野村有希、小西麻未、奥田隆志、三澤日出巳；テトラヒドロピリミジン系薬の新たな中枢神経作用点の同定；次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2009（平成 21 年 8 月 24 日、慶應義塾大学）

６．研究組織

(1)研究代表者

奥田　隆志（OKUDA TAKASHI）

慶應義塾大学・薬学部・講師
研究者番号：00322040

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし