グルタミン酸とミトコンドリア

グルタミン酸神経毒性を規定するミトコンドリア因子

宝田 剛志, 福森 良, 米田 幸雄

要約: 脳梗塞発症時には、梗塞部位における細胞外グルタミン酸 (Glu) 濃度の異常な上昇に伴って、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の過度の活性化を介する遅発性神経細胞死が引き起こされる。動物実験では脳虚血負荷後に海馬 CA1 領域および扁桃体に限局する遅発性の神経細胞脱落が観察されるが、この脳内部位選択的な脆弱性の出現機序は未だ明らかにはなっていない。我々はこの選択的脆弱性を引き起こす“障害因子”の探索を行ってきたが、最近ミトコンドリアでのエネルギー代謝調節に重要な役割を果たすアンカッピングプロテイン (uncoupling protein: UCP) の一つであり、かつミトコンドリアに Ca^{2+} を輸送するユニポーターの候補分子である UCP2 が、選択的に海馬由来神経細胞で高発現する事実を見出した。さらに、培養神経細胞にレンチウイルスベクターを用いて UCP2 を過剰発現させると、Glu 神経毒性が著明に増強されることが明らかとなった。また、NMDA 受容体を人工的に発現させた HEK293 細胞を使用した解析では、UCP2 が NMDA 曝露に伴うミトコンドリア内 Ca^{2+} 流入を選択的に促進させるだけでなく、この際には NMDA 受容体と UCP2 が相互作用する可能性を確認した。一方、エタノールの薬理作用出現に、NMDA 受容体活性化後の UCP2 を介するミトコンドリア内 Ca^{2+} 流入が関与する可能性を見出した。本稿では、我々の上記研究成果を踏まえて、Glu 神経毒性におけるミトコンドリア因子の関与に関する新知見を紹介したい。

1. はじめに

脳梗塞発症時には、梗塞部位における細胞外グルタミン酸 (Glu) 濃度の異常な上昇によって、*N*-methyl-

D-aspartate (NMDA) 受容体の過度の活性化を介する遅発性神経細胞死が引き起こされる(1,2)。また、神経細胞のシナプス部に発現する NMDA 受容体は神経細胞保護的であるのに対して、シナプス外に発現する NMDA 受容体は神経細胞障害的に働くとされる(3)。したがって、NMDA 受容体阻害薬の適用は、神経細胞保護的に働く NMDA 受容体の活性阻害によって、時として虚血性神経細胞死をむしろ増悪する可能性が考えられる。さらに、動物実験では脳虚血負荷後に海馬 CA1 領域および扁桃体に限局する遅発性の神経細胞脱落が観察されるが、この脳内部位選択的な脆弱性の出現機序は未だ明らかにはなっていない。我々は、NMDA が大脳皮質由来神経細胞では障害性を示さずに、海馬由来細胞でのみ神経細胞死が観察されるという、脳虚血負荷後の脳部位選択的な細胞死と近似する *in vitro* 実験系を樹立することに成功した(4)。この時には、両者間の細胞内 Ca^{2+} 濃度には著明な相違がみられないので、細胞内 Ca^{2+} 濃度以外に選択的脆弱性を引き起こす“障害因子”が、この脳内部位間における相違に関与する可能性が高いと推察される。

ミトコンドリアは細胞のエネルギーを生み出すオルガネラであるとともに、cytochrome c の放出によって細胞死を誘導する、まさに細胞の生死を調節する細胞内小器官である。近年、cytochrome c の放出担体を制御する cyclophilin D のノックアウトマウスでは、虚血後の神経細胞死が大幅に減少すること(5)や、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入を阻害すると Glu による神経細胞死がほぼ完全に抑制されること(6)が報告されている。これらの報告から、我々は選択的脆弱性の発生機序をミトコンドリアに焦点を当てて研究してきた。その結果、NMDA 曝露後の大脳皮質および海馬由来神

神経細胞におけるミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度を比べたところ、海馬由来神経細胞で約 2 倍程度高い事実を見出した(7)。

ミトコンドリア内への Ca^{2+} 流入は、ミトコンドリア内膜上に発現するユニポーターによってミトコンドリアマトリックス電位 ($\Delta\Psi$) 依存的に招来されると考えられる(8)。実際に、ミトコンドリア脱共役剤である carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone や 2,4-dinitrophenol 等の処理により $\Delta\Psi$ が消失したミトコンドリアでは、ミトコンドリア内への Ca^{2+} 取り込みがみられない(9)。ミトコンドリア内への Ca^{2+} 流入は、細胞質への Ca^{2+} 流入に続いて速やかに出現し(10)、細胞質 Ca^{2+} 濃度の制御と恒常性維持に貢献しているが、病理的条件下における過度のミトコンドリア内 Ca^{2+} 流入は、cyclophilin D との協調的な作用によって mitochondrial permeability transition (mPT) の形成を引き起こし、ミトコンドリア内膜の物質透過性が亢進されて、cytochrome c の流出により細胞死を惹起すると理解される(11)。

細胞質からミトコンドリアへ Ca^{2+} を輸送する担体は、電気生理学的にはミトコンドリアの内膜上に発現する可能性は提唱されていたが、最近ミトコンドリアへの Ca^{2+} ユニポーター分子として MCU が同定された(12, 13)。我々は、ミトコンドリアでのエネルギー代謝調節機構で重要な役割を果たすアンカッピングプロテイン (uncoupling protein : UCP) の一種であり、ミトコンドリアに Ca^{2+} を輸送するユニポーターの候補分子として注目を浴びる UCP2(14) が、選択的に海馬由来神経細胞で高発現する事実を見出した(7)。上記発見に基づいて、神経細胞の生存性維持機構における、UCP2 を中心とするアンカッピングプロテインの病態生理学的意義を追究した我々の近年の研究成果について概説したい。

2. マウス初代培養神経細胞を使用した解析

UCP2 は、褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜においてプロトン透過させ、熱を産生する UCP1 のファミリータンパク質として同定された。UCP2 は膜 6 回貫通型の構造を取り、プロトン透過するカチオンチャネルの働きを持つと考えられている(15, 16)。まず、神経細胞における UCP2 のミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入および Glu 誘発性神経細胞毒性にあたえる影響について検討する目的で、マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞に UCP2 遺伝子をコードしたレンチウイルス (LV-UCP2) を感染させ、UCP2 強制発現条件下にて以下の実験を実施した。LV-UCP2 を培養神経細胞に感

染させることにより、ほぼ全ての神経細胞において抗 UCP2 抗体の免疫染色性増強が認められた。同神経細胞について、 Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬である fluo-3 と rhod-2 を利用し、NMDA 曝露に伴う細胞内およびミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度の変化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。fluo-3 は、細胞内 Ca^{2+} により蛍光を発する Ca^{2+} 蛍光指示薬であるのに対して、rhod-2 は細胞内加水分解後のカチオン電荷により、電気的陰性度の高いミトコンドリアに集積する Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬である。その結果、UCP2 過剰発現神経細胞では、NMDA 曝露に伴う rhod-2 蛍光強度上昇は有意に増加したが、fluo-3 蛍光強度上昇は著明な影響を受けなかった。一方、初代培養神経細胞に UCP2 に対する shRNA のコードレンチウイルスを感染させると、NMDA 曝露に伴う rhod-2 蛍光強度上昇は有意に減少した。以上の実験的事実から、UCP2 は細胞内への Ca^{2+} 流入には影響を与えずに、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入を促進する働きを持つと推察される。

続いて、マウス大脳皮質由来培養神経細胞に LV-UCP2 を感染後、種々の濃度の Glu を 1 時間曝露し、その 24 時間後に細胞障害を検出するために propidium iodide (PI) 染色を実施したところ、Glu 曝露に伴う PI 陽性細胞数の増加は UCP2 強制発現によりさらに上昇した。したがって、UCP2 はミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入を促進して、その結果 Glu 誘発性の神経細胞毒性を増悪させると推察される。

3. NMDA 受容体人工発現系を使用した解析

HEK293 細胞に NMDA 受容体を人工的に発現させて、NMDA 受容体と UCP2 との関連性についてさらに検討した。この NMDA 受容体人工発現系の構築は、NMDA 受容体のチャネル形成に必須な GluN1 サブユニットおよび Glu 結合部位の存在する GluN2A あるいは GluN2B サブユニットを発現させることにより行った。GluN1/2A あるいは GluN1/2B の 2 種類の NMDA 受容体人工発現系の薬理学的特性を検討するために、これら人工発現系に fluo-3 を導入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定したところ、GluN1/2A および GluN1/2B の両発現系において、NMDA 曝露に伴う fluo-3 蛍光強度の速やかな上昇は、NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 添加により直ちに減弱した。一方、GluN2B サブユニット選択的なアンタゴニストである ifenprodil は、GluN1/2A 人工発現系では NMDA 曝露に伴う fluo-3 蛍光強度上昇に影響を与えなかったのに対して、GluN1/2B 発現系では ifenprodil

添加により NMDA 誘発性 fluo-3 蛍光強度上昇は速やかに減弱した。以上の結果より、我々が開発した NMDA 受容体人工発現系は、確かな薬理学的特性を有することが確認された(17)。

次いで、これら人工発現系に NMDA 受容体と共に UCP2 を強制発現させ、UCP2 の影響を検討することとした。強制発現 UCP2 の局在性を免疫染色法により検討した結果、UCP2 はミトコンドリア染色試薬である mito-tracker Green FM とほぼ共局在した。GluN1/2A あるいは GluN1/2B の 2 種類の NMDA 受容体人工発現系に fluo-3 あるいは rhod-2 を導入し、種々の濃度の NMDA 曝露に伴う細胞内およびミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度変化を共焦点レーザー顕微鏡で測定したところ、GluN1/2A および GluN1/2B のどちらを発現させた細胞においても、UCP2 の過剰発現は NMDA 曝露に伴うミトコンドリアへのカルシウム流入を有意に上昇させた。しかしながら、 Ca^{2+} ionophore である A23187 によるミトコンドリア内 Ca^{2+} 流入には、NMDA の場合とは異なり、UCP2 強制発現による著明な変化はみられなかった(18)。

UCP2 を介するミトコンドリア内 Ca^{2+} 流入の NMDA 受容体特異性を検討する目的で、免疫沈降法による GluN1 と UCP2 の相互作用の可能性について検討した。GluN1/2A あるいは GluN1/2B の NMDA 受容体人工発現系に、Flag 標識 UCP2 を導入し、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、Flag 抗体免疫沈降物中に GluN1 サブユニットが検出された(18)。以上の実験的事実から、詳細なメカニズムは不明であるが、UCP2 は NMDA 受容体と複合体を形成する可能性が示唆される。

4. アルコールと UCP2

哺乳動物におけるアルコールによる中枢抑制作用には、GABA 受容体の関与が周知であるが(19-21)、NMDA 受容体関与の可能性も示唆されている(22)。例えば、培養海馬神経細胞における NMDA 誘発性電位変化は、5~50 mM のエタノールによって濃度依存的に阻害される(23)。また、培養小脳顆粒神経細胞では NMDA 受容体活性化後の cGMP 産生がエタノールにより抑制されること(24)、あるいはエタノール感受性が GluN1 と GluN2A サブユニットの 3 番目と 4 番目の膜貫通ドメインに起因する可能性が報告されている(25)。

我々は、アルコールによるミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入に対する影響を調べる目的で、マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞に rhod-2 を導入し、その後 50~250 mM のエタノールを添加して、Glu あるいは NMDA によるミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入量を共焦点顕微鏡で測定した。その結果、エタノール添加群では非添加群と比べ、Glu および NMDA 曝露に伴うミトコンドリアへのカルシウムの流入が著明に減少した。しかしながら、同濃度のエタノールは細胞内への Ca^{2+} 流入に著明な影響を与えなかった。培養神経細胞にレンチウイルスを用いて UCP2 を過剰発現後、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定したところ、エタノール添加群では UCP2 過剰発現にかかわらず NMDA 曝露に伴うミトコンドリア Ca^{2+} 流入が抑制されたが、UCP2 過剰発現群ではエタノールのミトコンドリア Ca^{2+} 流入抑制作用が著明に増強された。同様に、UCP2 過剰発現は Glu 誘発性神経細胞死に対するエタ

図1 グルタミン酸神経毒性における UCP2 の関与

ノールの保護作用を有意に増強した。

さらに, NMDA 受容体人工発現系を用いて, アルコールの影響を同様に検討した結果, UCP2 過剰発現はエタノールによるミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入抑制を著明に増強した。興味深いことに, この抑制効果は GluN1/2A 発現細胞に比べて, GluN1/2B 発現細胞においてより強く出現した。エタノールによる UCP2 を介するミトコンドリア Ca^{2+} 流入の抑制機構の詳細は不明であるが, 今後のさらなる研究は NMDA 受容体の機能不全に関連する様々な神経精神疾患および神経変性疾患の症状改善や治療に新たな展開をもたらすものと示唆される。

5. 今後の展望

本研究結果より, UCP2 が NMDA 受容体を介するミトコンドリア Ca^{2+} 流入を選択的に促進させ, その結果 Glu 誘発性の神経細胞毒性が増悪される事実が判明した (図 1)。NMDA 受容体を介する Ca^{2+} 流入は, カイニン酸受容体チャネルや電位依存性 Ca^{2+} チャネルからの流入に比べ, ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入が起こりやすいとの報告 (26, 27) も見受けられることから, 本研究により明らかとなった UCP2 と GluN1 との相互作用が, NMDA 受容体を介する神経細胞毒性出現メカニズム解明の突破口となると推察される。神経細胞の NMDA 脆弱性を決定するミトコンドリア内在性因子の発見は, 脳科学分野における NMDA 受容体の重要性を勘案するまでもなく, 種々の神経変性疾患や

神経精神疾患の発症メカニズム解明を通じて, 予防性食品や治療性医薬品の開発促進の観点からも, 広く国民の健康と福祉の維持とともに新産業創出にも貢献すると期待される。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Sattler R, et al. J Mol Med. 2000;78:3-13.
- 2) Mitani A, et al. J Neurosci. 2003;23:7176-7182.
- 3) Hardingham GE, et al. Trends Neurosci. 2003;26:81-89.
- 4) Kambe Y, et al. J Neurochem. 2008;105:1886-1900.
- 5) Schinzel AC, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:12005-12010.
- 6) Stout AK, et al. Nat Neurosci. 1998;1:366-373.
- 7) Kambe Y, et al. Neurochem Int. 2011;59:10-20.
- 8) Kirichok Y, et al. Nature. 2004;427:360-364.
- 9) Gunter TE, et al. Cell Calcium. 2000;28:285-296.
- 10) Young KW, et al. Cell Calcium. 2007;Aug 29.
- 11) Basso E, et al. J Biol Chem. 2005;280:18558-18561.
- 12) De Stefani D, et al. Nature. 2011;476:336-340.
- 13) Baughman JM, et al. Nature. 2011;476:341-345.
- 14) Graier WF, et al. Cell Calcium. 2008;44:36-50.
- 15) Chavin KD, et al. J Biol Chem. 1999;274:5692-5700.
- 16) Boss O, et al. Diabetes. 2000;49:143-156.
- 17) Fukumori R, et al. Neurochem Int. 2010;57:730-737.
- 18) Fukumori R, et al. Neurochem Int. 2012;61:498-505.
- 19) Crews FT, et al. Int Rev Neurobiol. 1996;39:283-367.
- 20) Wu PH, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2005;312:1082-1089.
- 21) Wallner M, et al. Br J Pharmacol. 2008;154:288-298.
- 22) Woodward JJ. Crit Rev Neurobiol. 2000;14:69-89.
- 23) Lovinger DM, et al. Science. 1989;243:1721-1724.
- 24) Hoffman PL, et al. J Neurochem. 1989;52:1937-1940.
- 25) Ren H, et al. J Biol Chem. 2012;287:27302-27312.
- 26) Peng TI, et al. Mol Pharmacol. 1998;53:974-980.
- 27) Young KW, et al. Cell Calcium. 2008;43:296-306.