氏　　　名	細　川　　浩（ほそ かわ ひろし）
学位(専攻分野)	博士　(人間・環境学)
学位記番号	人　博　第 42 号
学位授与の日付	平 成 10 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	人 間・環 境 学 研 究 科 人 間・環 境 学 専 攻
学位論文題目	A study of neuron specific cationic amino acid transporter rCAT3 神経特異的塩基性アミノ酸輸送体 rCAT3 の研究
論文調査委員	(主　査) 教 授 小 林 茂 夫　　教 授 津 田 謹 輔　　助教授 石 原 昭 彦

論　文　内　容　の　要　旨

アルギニンは，非必須の塩基性アミノ酸でアスパラギン酸から尿素回路により合成される。神経細胞では，アルギニンは蛋白質の材料であるだけでなく，一酸化窒素やアグマチンなど細胞間の情報伝達物質の前駆体である。神経細胞では，アルギニンを取り込む輸送体は知られていなかった。本研究は，神経細胞の輸送体をコードする遺伝子を単離し，輸送体の性質を解明することを目的とした。各章の要旨は次の通りである。

第一章では，脳型アルギニン輸送体遺伝子を単離し，その活性，発現特異性を明らかにした。脳のアルギニンの輸送は，y 型と呼ばれるナトリウム非依存性の塩基性アミノ酸輸送体が担う。y 型塩基性アミノ酸輸送体は，CAT1, CAT2a, CAT2b という14回膜貫通型の蛋白質として同定されているが，いずれも神経細胞に発現していない。そこで，神経細胞に特異的な輸送体をコードする cDNA の単離に着手した。CAT1 の膜貫通領域をもとにプライマーを作製し小脳をソースにして PCR 法を用いてプローブを作製した。このプローブでラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし一つのクローンを単離した。このクローンの塩基配列を解析した結果，新しい遺伝子と分かったので rCAT3 と名付けた。予測されるアミノ酸配列から，この蛋白質は14回膜貫通型であり，ロイシンジッパー，アスパラギン—糖付加部位，PKC 依存性リン酸化領域を持っていた。rCAT3 の遺伝子産物の活性を測定する目的で COS7 細胞に rCAT3 を発現させ [^{14}C]L-アルギニンの取込を測定した。rCAT3 を発現させた COS7 細胞は [^{14}C]L-アルギニンの取込を時間依存的，濃度依存的に促進し，その Km 値は 103μM であった。アミノ酸特異性を調べる目的で過剰のアミノ酸を投与したところ [^{14}C]L-アルギニンの取込はアルギニン，リジン，オルニチンを添加した時に抑制された。この取込抑制が，リジン，オルニチンによる rCAT3 の活性阻害か，それとも拮抗抑制かを区別する目的で [^{3}H]L-リジン，[^{3}H]L-オルニチンの取込を測定した。それらは時間依存的，濃度依存的に取り込まれ，Km 値はほぼ同じであった。このことから，rCAT3 は，アルギニン，リジン，オルニチンを非選択的に取り込む高親和性の塩基性アミノ酸輸送体であることが分かった。立体異性体特異性を調べる目的でD型のアルギニンを投与したところ，[^{14}C]L-アルギニンの取込は抑制された。このことより立体異性体に対して選択性があることを示した。つぎにアルギニンの誘導体で一酸化窒素合成酵素の抑制剤でもある L-NAME, L-NMMA, L-NIO を添加したところ L-NMMA, L-NIO ではアルギニンの取込は抑制されたが L-NAME では抑制されなかった。つぎにイオンによる制御を測定する目的でナトリウムイオン，塩素イオンを置換したところ [^{14}C]L-アルギニンの取込は変化しなかった。そこで，ナトリウム，塩素イオンは [^{14}C]L-アルギニンの取込を制御しないことが分かった。アルギニンは正に荷電しているので，細胞内の電位変化で [^{14}C]L-アルギニンの取込が調節されている可能性が考えられた。細胞外に KCl を添加した時，KCl の濃度依存的に [^{14}C]L-アルギニンの取込は抑制された。このことは，脱分極がアルギニンの取込を抑制することを示唆する。さらに，様々な臓器から RNA を抽出し，ノーザンブロット法で発現分布を検討した。すると，rCAT3 の mRNA は脳特異的に発現していること，3.4kb の大きさの転写産物であることが分かった。脳切片の in-situ ハイブリダイゼーションから，rCAT3 は脳全体にわたって発現しており，特に，中脳，視床，視床下部で強く発現していた。また，

神経細胞に特異的に発現していることが分かった。

第二章では，神経細胞株 B103 の神経突起伸長が外部のアルギニンに依存すること，アルギニンの流入が CAT3 に依存することを明らかにした。

rCAT3 は神経細胞特異的に発現している塩基性アミノ酸輸送体であることがわかった。そこで，神経細胞における生理的な役割を検討した。様々な細胞株をノーザンブロット法で検索し，rCAT3 の転写産物が多い B103 細胞を実験対象に選んだ。B103 細胞のアルギニンの取り込みの時間依存性，濃度依存性，Km 値，薬理学的性質は，一章で rCAT3 を発現させた COS7 細胞の値とほぼ一致した。そこで，B103 細胞のアルギニン輸送はづrCAT3 によることが示唆された。B103 細胞は dbcAMP 刺激での突起伸長が知られている。そこで，外部からのアルギニン流入が突起伸長に影響するかどうかを解析した。外部のアルギニン濃度に依存した突起伸長が生じることが分かった。この突起の伸長は，rCAT3 のアンチセンスオリゴで消失するので，rCAT3 で調節されている可能性がある。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は，多様な分子生物学的，細胞生物学的な実験手法を組み合わせて，神経細胞におけるアルギニン輸送体，及びその生理的役割を明らかにしたものである。申請者は，神経細胞特異的な塩基性アミノ酸輸送体の遺伝子を新たにクローニングし rCAT3 と名づけた。その遺伝子を発現させて生じた蛋白質の性質を解明した。さらにインビトロの系を用いて，rCAT3 を介したアルギニンの流入が神経細胞の突起伸長に必須であることを示した。神経系においては，アルギニンは単にタンパク質の材料であるだけでなく，一酸化窒素，あるいはアグマチンなど神経伝達物質の前駆体でもある。特に，一酸化窒素の産生は，細胞外のアルギニン濃度に依存する可能性があることから，アルギニンを細胞内に取り込む塩基性アミノ酸輸送体は注目を集めていた。申請者は，いち早くこの点に着目して研究し，以下の成果を修めている。

第一章では，存在が示唆されていたが遺伝子が同定されていなかった神経細胞特異的な塩基性アミノ酸輸送体のクローニングに世界に先駆けて成功し，一次構造を決定した。そのアミノ酸輸送体は，y 型塩基性アミノ酸輸送体ファミリーに属すること，他のメンバーと同様に塩基性アミノ酸輸送体に特異的な14回膜貫通型であることを明らかにした。このことは，タンパク質の構造—機能関連を考える上で重要な知見である。また，発現系を用いて rCAT3 のタンパク質としての機能を解析し，アルギニンを取り込む活性があること，リジン，オルニチンをも取り込む活性があることを示し，高親和性の y 型塩基性アミノ酸輸送体であることを証明した。さらに活性の制御機構に着目し，ナトリウムや塩素イオンでは活性は変化しないが，カリウムイオンの添加によって濃度依存性に活性が抑制されることを示した。これは細胞内の電位変化で活性が調節されることを示唆するもので，神経細胞に発現していることを考慮すると，神経活動によって調節されているのかもしれない。今後，調節機構や，生理的役割を研究する上で基礎となる知見と言えよう。

rCAT3 の発現パターンは，脳特異的であり，3.4kb の転写産物であることが分かった。さらに，in-situ ハイブリダイゼーション法で，脳のほぼ全域での発現，特に中脳，視床，視床下部で強い発現があることを明らかにした。このことは，それらの部位におけるアルギニン流入の生理的意義を考える上で重要である。これら rCAT3 のクローニングと特性解析は，新規の遺伝子構造を解明しただけにとどまらず，様々な分野の基礎となる知見を得た点で，高く評価できる。

第二章では，神経細胞における rCAT3 の生理的役割を解析している。これまで，アルギニンの流入に関してはタンパク質の解析に重点がおかれており，その生理的役割はほとんど判明していなかった。申請者は，脳組織に由来する様々な細胞株をノーザンブロット法で検索し，神経細胞由来の細胞株 B103 に rCAT3 が発現していることを確認している。その細胞株を用いて rCAT3 の生理機能の解析を行い，アルギニンの流入は rCAT3 だけで行われることを示した。このことは，rCAT3 が，神経細胞でのアルギニン流入を担うことを示唆するものである。

さらに dbcAMP 刺激による B103 の神経突起伸長が外部のアルギニンに依存していること，そのアルギニンの流入は rCAT3 に依存していることを証明した。今までに，細胞外アルギニンによって神経突起伸長が調節されるという報告はない。この結果は情報伝達物質としてアルギニンが関与することを示唆しており，独創的な成果と言えよう。また，流入したアルギニンがどのように神経突起伸長を調節するのかという点に着目して，実験を行っている。そこでは，流入したアルギニンが一酸化窒素に変換され，さらに cGMP を介して神経突起伸長が行われることを明らかにした。これは，外部から流

入したアルギニンから一酸化窒素が作られることを示しており，一酸化窒素生成の新しい調節系を指摘している重要な知見である。

以上のように，本論文は，アルギニン輸送経路とその生理学的役割に関して注目すべき成果を上げており，行動調節機構論分野にふさわしい研究である。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また，平成10年1月29日，論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果，合格と認めた。