

モルヒネ長期作用に関わる新規因子 addicisin の機能解析

秋月 さおり

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座

平成 20 年 12 月

(目次)

1. 序論
2. 第一部 モルヒネ長期作用関連因子 addicsin の同定および機能解析
 - 2.1 背景
 - 2.2 材料および方法
 - 2.2.1 モルヒネ長期作用関連因子のサブトラクショナルクローニング
 - 2.2.2 染色体マッピング
 - 2.2.3 *in situ* ハイブリダイゼーション
 - 2.2.4 Kinetic PCR
 - 2.2.5 マウス各種臓器からの RNA 抽出とノーザンブロット
 - 2.2.6 マウス脳タンパク質の精製とウェスタンブロット
 - 2.2.7 addicsin ポリクローナル抗体の作製
 - 2.2.8 免疫組織染色法
 - 2.3 結果
 - 2.3.1 addicsin の同定
 - 2.3.2 addicsin はマウス第6染色体上の 41.5 cM の位置に存在する
 - 2.3.3 addicsin mRNA はマウス各臓器にユビキタスに発現する
 - 2.3.4 addicsin タンパク質の局在について
 - 2.3.5 addicsin の発現量はモルヒネ慢性投与により増加する
 - 2.4 考察
3. 第二部 addicsin および addicsin 結合因子 Arl6ip1 によるグルタミン酸トランスポーターEAAC1 の調節機構
 - 3.1 背景
 - 3.2 材料および方法
 - 3.2.1 酵母ツーハイブリッドスクリーニングによる Arl6ip1 の同定
 - 3.2.2 培養細胞の調製と発現ベクターのトランスフェクション
 - 3.2.3 グリセロールグラジエント法
 - 3.2.4 免疫沈降法
 - 3.2.5 Arl6ip1 抗体の作製
 - 3.2.6 マウス各種臓器からの RNA 抽出と RT-PCR
 - 3.2.7 マウス脳タンパク質の精製とウェスタンブロット

- 3.2.8 免疫組織染色法
- 3.2.9 GeneSwitch システムによる細胞株の樹立
- 3.2.10 グルタミン酸取り込みアッセイ
- 3.2.11 addicsin siRNA 実験
- 3.2.12 ビオチン化アッセイによる細胞表面発現タンパク質の検出
- 3.3 結果
 - 3.3.1 Arl6ip1 の同定
 - 3.3.2 Arl6ip1 は addicsin と結合する
 - 3.3.3 addicsin- Arl6ip1 結合領域の同定
 - 3.3.4 Arl6ip1 mRNA はマウス各臓器にユビキタスに発現する
 - 3.3.5 Arl6ip1 タンパク質のマウス脳における発現
 - 3.3.6 C6BU-1 株を用いたコンディショナル過剰発現系の構築
 - 3.3.7 EAAC1 を介したグルタミン酸取り込みに addicsin または Arl6ip1 が及ぼす影響
 - 3.3.8 Arl6ip1 に対する PMA の影響の観察
 - 3.3.9 addicsin YL 変異体を用いた解析
- 3.4 考察
- 4. 結論
- 5. 謝辞
- 6. 参考文献

1. 序論

モルヒネは、ケシの絞り汁より得られる植物性アルカロイドであり、強力な鎮痛・鎮静効果の他、摂食促進、血圧の中樞性調節、飲水行動の抑制、下垂体ホルモンの分泌調節、免疫調節などの作用をもつ。ケシは、紀元前5000年頃の遺跡より発見されているほどその使用の歴史は古い。古代エジプトにおいてもケシの絞り汁を鎮痛・鎮静作用のあるものとして使用していた記録が残っている。その後、ケシは、エジプトよりギリシア、また、ローマ帝国、ヨーロッパ全体、アジアへと戦争と共に広がるにつれて、鎮痛剤としてよりはむしろ麻薬として用いられるようになった[1]。

近代に入り、1805年には、ドイツの化学者フリードリヒ・ゼルテュルナーがケシよりモルヒネを単離することに成功し、夢を司るギリシア神モルフェウスの名をとって「モルヒネ」と命名した。この単離されたモルヒネは水溶性であったことから血中に直接注入できるという利点があり、医療用鎮痛剤として広く用いられることとなった。そして同時にその作用機序についての研究が盛んになっていった。

モルヒネを含むケシ産物をオピエートと総称するが、これは先述したように植物性アルカロイドであり、生体から見れば外来性の物質である。しかしながら、モルヒネが非常に強力な作用また即効性を持つことから、モルヒネに対する受容体が生体内に存在するのではないかということが長年にわたり推測されていた。1950年代にはオートラジオグラフィーを用いた実験より脳内にオピエートと作用する受容体が存在することが示唆された[2]。その後、1973年から1975年にかけての詳細な解析により、中枢神経系にオピエートレセプターが存在することが明らかになった[3]。次いで、その内因性リガンドとしてエンケファリンとエンドルフィンが発見されるに至り[4]、これらをオピオイドと総称することになったことから、オピエートおよびオピオイドに対する受容体を「オピオイド受容体」と称することになった。

オピオイド受容体は7回膜貫通型受容体（GPCR）に分類され、特定のリガンドが特定の受容体と作用することが知られている。オピオイド受容体には δ （デルタ）、 κ （カッパー）および μ （ミュー）の3種類のサブタイプが存在し、このうちモルヒネに対する特異性が最も強いのは μ 受容体である[5]。 μ 受容体は扁桃核、青斑核に多く存在する。この7回膜貫通型受容体はGタンパク質共役型受容体であり、三量体Gタンパク質を介して細胞内にシグナルを伝え

る。このシグナルは、細胞質あるいは核に伝達され、それぞれ急性作用と長期作用を引き起こす。

急性作用には膜上のイオンチャンネルが関与する。 μ および δ 受容体は K^+ チャンネルを開口して K^+ を細胞外に流出させ、膜を過分極状態にさせる。これは活動電位持続時間 (Action Potential Duration, APD)の短縮をおこし、結果として Ca^{2+} の細胞内流入が減少する。 κ 受容体については K^+ チャンネルには作用せず、直接 Ca^{2+} チャンネルに作用するが、やはり細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制する。この Ca^{2+} の細胞内流入は神経伝達物質の遊離を抑制する。その結果、興奮性シナプス後電位 (EPSP, Excitatory PostSynaptic Potential)が抑制される。例えば、オピオイド受容体が多く存在する腸管神経叢では、モルヒネ投与によって神経伝達物質アセチルコリンの遊離が抑制された結果、腸管の収縮抑制がおこり腸の機能が妨げられるが、これはまさしくモルヒネの代表的な急性作用の一つである [5]。

一方で、モルヒネ連続投与による耐性・依存形成は長期作用に分類される。モルヒネを連続的に投与すると脳内の cAMP 量が増大する。Sharma らは、ラット由来の神経細胞株である NG108-15 細胞を用いた解析により、アデニル酸シクラーゼ活性変化と、それに引き続く cAMP 産生量変化によりモルヒネ耐性依存現象を解明するモデルを提唱した [6]。すなわち、培地にモルヒネを添加するとその刺激でアデニル酸シクラーゼ活性が上昇し、それに伴い細胞内の cAMP 量が増加する。cAMP が一定量に達すると、アデニル酸シクラーゼ活性の上昇も停止し、均衡状態、つまり生体内でのホメオスタシスを保つ。この均衡状態が耐性・依存状態の維持を表している。この均衡状態において、モルヒネを除去すると、その刺激により既に十分量の cAMP が存在するにもかかわらず、アデニル酸シクラーゼ活性が増大し、それに伴い cAMP 量も急速に増えるが、その後、生体内でのホメオスタシスにより自然に減少して正常レベルに戻る。過去の研究から、この cAMP の下流で cAMP Response Element Binding Protein (CREB) が活性化することが明らかとなっている [7]。CREB は転写因子であることから、これにより転写調節を受ける後期遺伝子が、モルヒネ耐性・依存の形成に関与していると考えられている [8]。

本研究では、モルヒネの長期作用、すなわち CREB の活性化により発現調節を受ける後期遺伝子群の機能に注目し、モルヒネ耐性・依存形成のメカニズムへアプローチすることを試みた。第一部では、モルヒネ耐性・依存形成に関与

する後期遺伝子群の同定に関する研究を行った。第二部では、この後期遺伝子群として新規同定した addicsin およびその関連因子が、神経細胞局在型グルタミン酸トランスポーターの機能を調節することを明らかにした。

2. 第一部 モルヒネ長期作用関連因子 addic sin の同定および機能解析

2.1 背景

モルヒネは数ある麻薬の中でも耐性・依存の形成が起こりやすく、これが鎮痛薬としてのモルヒネの連続使用を妨げる一つの要因となっている。「耐性」とは、連続投与による生体適応反応であり、初回投与時と同様の薬効を得るために用量の増加を要することを指す。モルヒネの連用によって、その主作用である鎮痛作用に加えて、鎮静、呼吸抑制などの抑制性の作用に対する耐性が形成されることが知られている。「依存」とは身体的依存と精神的依存の両方を意味する。身体的依存とは、使用の中止による禁断症状の出現を指す。精神的依存とは、使用を中止した際に再摂取要求が高まることを指す。さらに、モルヒネの連用により「逆耐性」が形成される。逆耐性とは、薬物の連続使用を中断し、退薬期間において体内から完全に薬物が消失した後においても薬物の効果が認められる状態を指す。この退薬期間中に同じ薬物を摂取した際には過剰な反応が引き起こされる。また、いわゆる「フラッシュバック」と呼ばれる、断薬中であっても精神的あるいは身体的なストレスに遭遇した際に忽然と薬物乱用時の異常状態が現れてパニックに陥る現象も逆耐性に含まれる。現在では、これらの表現型は、脳神経のネットワークそのものの質的变化に起因して出現すると考えられており、神経の可塑的な変化を原因としていると推測されている[9]。

本研究の前段階において、Ikemoto らは、モルヒネの長期作用によって、(1)耐性・依存および逆耐性が形成されること、(2)脳神経のネットワークの質的变化が起こっている可能性があること、(3)細胞内ではオピオイド受容体-cAMPの系が活性化されていること、の以上3点に注目し、モルヒネを長期投与した際に、cAMPによって調節を受ける領域として知られている cAMP Response element (CRE)を介した転写調節機構の変化の有無を *in situ* Protein-DNA binding assay (ISDB)により解析した[10, 11]。その結果、モルヒネを反復投与したマウスの扁桃体において、生理食塩水を反復投与したマウスには見られないような CRE に結合する転写因子タンパク質総量の明らかな変化が見られた。また、このシグナルの変化が、モルヒネ反復投与より退薬後 14 日間経過したマウス脳内においても保持され続けていることを発見した。この結果は、モルヒネ反復投与により、扁桃体において、CRE に応答するシグナルの長期的な変化が起こったことを示唆するものであった。

扁桃体は、辺縁系に属する領域の一つである。その研究の歴史は古く、19 世

紀後半には、扁桃体を損傷させたアカゲザルの情動性の低下、また攻撃性の拡大などから、扁桃体が情動に関わることが推測されていた[1]。しかし、その後の研究より、現在では扁桃体は単なる情動の座というだけではなく、情動的な出来事に伴った記憶・学習の形成と貯蔵に関与することが明らかとなっている。

一方、CRE-CREB を介した転写調節系については、これが記憶・学習に影響を及ぼし、神経可塑性に関与することが、1990 年代後半のカンデルらのアメフラシを用いたえらひっこめ反射の実験により明らかにされている[12] [13]。すなわちアメフラシのニューロン培養系における LTP (Long Term Potentiation (長期増強)) 作用がタンパク合成阻害剤および RNA 合成阻害剤により抑制されることから、長期記憶のモデルとされる LTP には新規にタンパク質が合成される必要があるといえる。その際には、ニューロン内の cAMP 濃度が上昇し、CREB の発現量が増加する。また、CRE 領域を含むオリゴヌクレオチドやアメフラシの CREB に対する抗体をこのニューロン内に注入することにより LTP の発現が抑制される。これらのことから、CREB が長期記憶保持に重要な役割を果たしていることが分かる[14]。その後、CREB トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを使用した解析結果から、哺乳類においてもこの機構が保持されていること、つまり、CREB シグナル系の増強が長期記憶・学習能力の上昇、すなわち神経可塑性の発現に繋がり、逆にこの系が阻害されると長期記憶・学習が獲得されないということが明らかとなった[15]。

これらの知見と前述の Ikemoto らの実験結果をあわせて考えてみると、扁桃体における CREB を介した遺伝子発現がモルヒネ耐性・依存および逆耐性の形成、すなわち神経可塑性の発現に必須である可能性が示唆される。そこで、モルヒネ長期作用時に cAMP-CREB によって発現が調節されているとおもわれる後期遺伝子群を同定することで、モルヒネ長期作用の分子生理基盤を明らかにすることが可能ではないかと考えた (図 1)。具体的には、モルヒネを反復投与したマウスの扁桃体を材料としてサブトラクションスクリーニングを行い、モルヒネ耐性・依存関連遺伝子の同定を試みた。その結果、Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC、別名 Osteonectin)をはじめとするいくつかの因子を同定することに成功した。生理機能解析の結果、SPARC は CREB 下流因子であり、またモルヒネによる逆耐性形成の原因因子であったことから[16] 本ストラテジーの有効性が証明された。本章では同スクリーニングで共に同

定した新規因子 addiccin の機能解析について報告する。

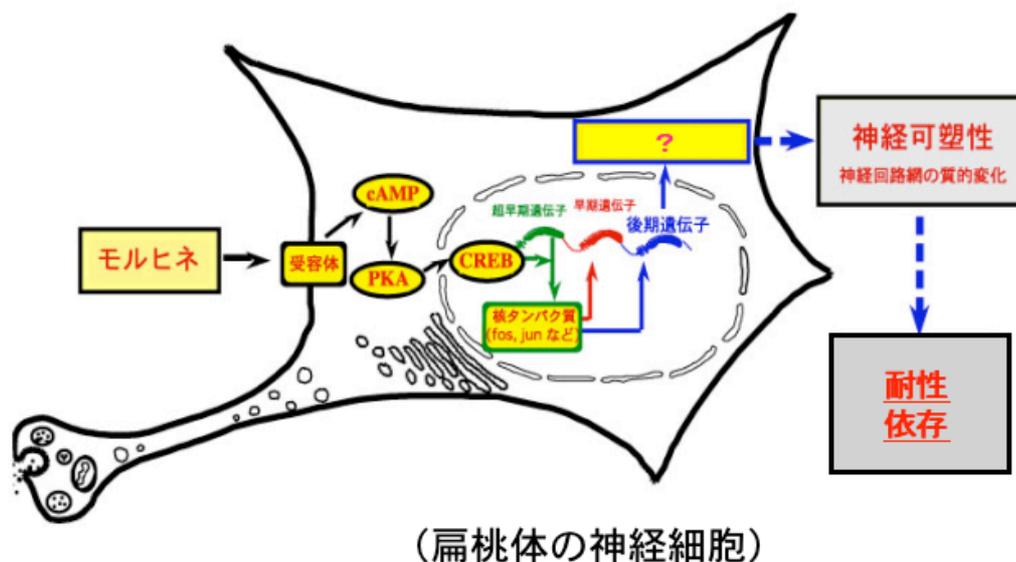


図1 モルヒネ長期作用の分子生基盤についての仮説

モルヒネ長期作用によって、扁桃体神経細胞上の μ オピオイドレセプターを介したシグナルは、その下流に存在する cAMP-CREB シグナル伝達系を介して後期遺伝子群の発現に影響を及ぼしていると考えられる。そしてこの後期遺伝子群の発現が神経可塑性を引き起こし、耐性や依存のフェノタイプの発現に寄与するものと推測される。

2.2 材料および方法

*分子生物学に関わる一般的な手法については Molecular Cloning 2nd Edition および Current Protocols in Molecular Biology を参考にした。

2.2.1 モルヒネ長期作用関連因子のサブトラクションクローニング

モルヒネ反復投与マウスを作製するため、ddY マウス（オス、6週齢）に7日間にわたってモルヒネの濃度を段階的に上げながら1日2回慢性投与した。1回毎のモルヒネの投与濃度は10、20、40、80、100、100、100 mg/kg とした。また、モルヒネの急性作用をみるためには、100 mg/kg のモルヒネを1回のみ投与した（図2）。なお、動物の飼育は産業技術総合研究所の定める動物飼育ガイドラインに従って安全かつ適切に行った。モルヒネ慢性投与マウスおよび生理食塩水を投与した陰性コントロール用マウスのそれぞれの扁桃体（5匹分）を摘出し、mRNA を抽出した。5 μ g の mRNA 溶液を用いて Lamda Zap II フェージベクターにクローニングして cDNA ライブラリーを作製し、サブトラクションクローニングに用いた。

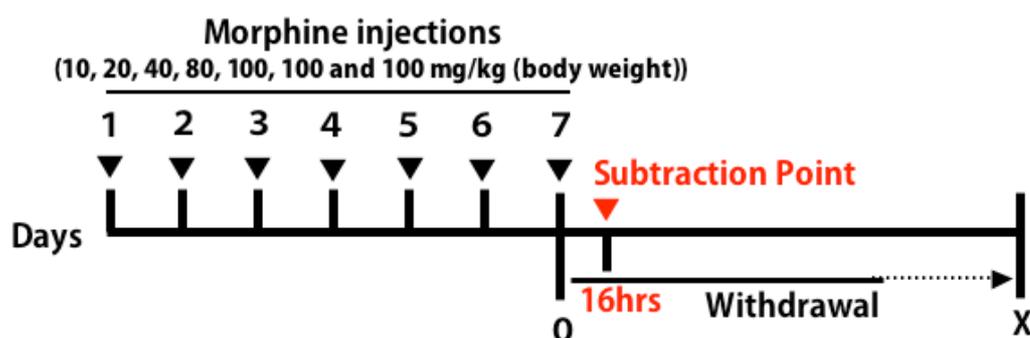


図2 モルヒネ反復投与スケジュール

モルヒネ耐性・依存マウスを作製するために、金子らの方法に従ってモルヒネの反復投与を行った。1日2回 12 時間毎、投与用量を徐々に上げながら7日間連続して投与を行った。投与用量については図中に示したとおり。

2.2.2 染色体マッピング

addicisin の染色体上の局在を決定するために、Mouse / Hamster Radiation Hybrid Panel (invitrogen)を用い、付属のプロトコールに従って解析を行った。PCR 反応は以下の条件で行った。

<PCR サイクル>

94°C-30 秒、53°C-20 秒、72°C-45 秒 (30 サイクル)

<プライマー配列>

5'-GCCACAGTGCCATCTTATCGTAGG-3'

5'-CCCAGGAGGTTGACATTTAGTTTG-3'

2.2.3 *in situ* ハイブリダイゼーション

RNA プローブを作製するために addicisin の全長配列を pBluescript SK(-)にサブクローニングし、制限酵素処理により直鎖状にした。これをエタノール沈殿により回収し、RNA プローブのテンプレートとした。このテンプレート DNA 1 μg を用いて *in vitro* transcription 反応を行い、DIG ラベルしたプローブを作製した。反応産物を電気泳動することによりそのプローブの生成を確認した。マウスの組織切片はクリオスタット (マイクロ・エッジ・インスツルメント) を用いて 16 μm の厚さのものを作製した。組織切片を 4%パラホルムアルデヒドにより 15 分間固定し、その後 PBS にて洗浄し、内因性のアルカリホスファターゼ活性を低下させるために 0.2 N の HCl にて室温で 20 分間処理した。その後 PBS で洗浄し、2mg/ml のグリシンでマスキングを行った。その後 PBS で洗浄し、0.1M のトリエタノールアミン処理、0.1M の無水酢酸によるアセチル化を行い、2 x SSC で洗浄したのち、50%ホルムアミド/50% 2 x SSC にて 55°C で 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。続いてハイブリダイゼーションバッファーを 85°C で 10 分間加熱し、プローブを混合し (x 25-200 希釈)、再度 85°C で 3 分間加熱してから切片に添加して、55°C で一晩かけてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションバッファーの組成は以下の通り：50%ホルムアミド、20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、230 $\mu\text{g/ml}$ yeast tRNA、1.25 x Denhardt's solution、10% dextran sulfate、300 mM NaCl、0.25% SDS、5 mM EDTA (pH 8.0)。翌日、フリーのプローブを洗浄するために、5 x SSC/50%ホルムアミドで 1 回、2 x SSC/50%ホルムアミドで 20 分間 x 3 回 (いずれも 55°C) の洗浄を行った。その後 TNE バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、500 mM NaCl、1 mM

EDTA) にて 37°C で 10 分間洗浄し、その後 RNase A (1 μ g/ml) を加えて 37°C で 30 分間 RNase 処理を行い、続いて再度 TNE バッファーにて 37°C で 10 分間洗浄を行った。その後、RNase 処理による切断産物を除去するために、再度 2 x SSC にて 55°C で 20 分間、続いて 0.2 x SSC にて 55°C で 20 分間 x 2 回の洗浄を行った。次いで DIG 抗体反応系に切り替えるため、DIG バッファー 1 (0.1 M Tris-HCl(pH 7.6)、150 mM NaCl) にて室温で 5 分間洗浄し、その後 1.5% blocking reagent/DIG バッファー 1 にてブロッキング処理を行った。続いて DIG バッファー 1 で x 500 希釈した anti-DIG 抗体 (Roche) にて室温で 30 分間抗体反応を行った。続いて DIG バッファー 1 にて室温で 15 分間 x 2 回洗浄し、DIG バッファー 3 (100 mM Tris-HCl (pH 9.5)、100 mM NaCl、50 mM MgCl₂) にて室温で 3 分間洗浄し、NBT/BCIP 溶液 (Roche) により発色させ、シグナルを検出した。発色反応の停止は蒸留水で行った。

2.2.4 Kinetic PCR

マウス扁桃体内側基底核をパンチアウトし、mRNA を調製し、この mRNA と random primer を用いて Superscript II 逆転写酵素 (200 U/ μ l) (invitrogen) の添付のプロトコールに従って 1st strand cDNA を合成した。PCR 産物の増幅は、94°C 30 秒-55°C 45 秒-72°C 90 秒で、addicsin については 23-30 サイクル、GAPDH については 18-25 サイクルにて増幅を行った。用いたプライマーの配列は以下のとおり。

<addicsin (496 bp) >

5'-TGCCTGGGACGATTTCTTCC-3'

5'-ATCTTCCTGCTGTTCCAAGG-3'

<GAPDH (580 bp)>

5'-AAACCCATCACCATCTTCCA-3'

5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'

2.2.5 マウス各種臓器からの RNA 抽出とノーザンブロット

グアニジン-トリチオネート抽出法にて総 RNA の抽出を行った。20 μ g の総 RNA を 1% の変成ホルマリンゲルにて電気泳動し、NYTRAN ナイロンフィルター (Sigma-Aldrich) に転写した。addicsin の全長を ³²P でラベルしたプローブを用いて 65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、

2 x SSC および 0.2 x SSC での洗浄を行い、BAS2000 システム (FUJIFILM) にてシグナルの検出を行った。コントロールとして、GAPDH をプローブとして用いた。

2.2.6 マウス脳タンパク質の精製とウェスタンブロット

マウスより脳を取り出し、0.5 mM PMSF を含む 0.32M sucrose にて Dounce homogenizer (WHEATON)を用いてホモジナイズし、700 g にて 10 分間遠心分離を行った。次いでこの上清画分をさらに 30,000 g にて 60 分間超遠心分離し、上清画分 (S2) およびペレット画分 (P2)を得た。それぞれの画分を 12% SDS-PAGE により展開してウェスタンブロッティングに供した。ブロット終了後、メンブレンを 0.1%の Tween 20 を含む PBS (PBS-T)にて希釈した 10%スキムミルク溶液にてブロッキングを行い、以下の抗体抗原反応に用いた。ウサギ抗 addicisin 抗体の希釈は 1:2000 で行い、HRP-結合型ヤギ抗ウサギ二次抗体(ICN)の希釈は 1:20000 で行った。PBS-T による抗体の洗浄後、ECL システム (GE Healthcare)にてシグナルの検出を行った。

2.2.7 addicisin ポリクローナル抗体の作製

addicisin のアミノ酸残基 17-31 番目にあたるペプチド(GSDRFARPDFRDISK)を合成し、C末端のシステイン残基を介して Keyhole Limpet Hemocyanin と結合させたものを抗原としてウサギに免疫することにより抗 addicisin 抗体を作製した。

2.2.8 免疫組織染色法

免疫組織化学用の切片は灌流固定を行ったマウスから採取した脳よりマイクロームを用いて 25 μ m 厚で作製した。もしくは、マウスより脳を取り出し直後にドライアイスを用いて凍結させたサンプルを用いて、クリオスタットにて 16 μ m 厚の切片を作製した。アルカリホスファターゼ法による染色は、4% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液により室温で 15 分間固定を行った後、VECTASTAIN TM Elite ABC kit (Vector)を用いて染色反応を行った。尚、染色反応は、添付のプロトコールに従って行った。一次抗体の抗原反応は 4°Cで一晩行った。シグナルを蛍光にて検出する場合は、4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液により室温で 15 分間固定を行い、PBS にて洗浄し、二次抗体のホストの血清を 1%加え

た PBS にて室温で 30 分間ブロッキングを行った。次いで 1%血清+0.03% Triton X-100 を加えた PBS で一次抗体を希釈し、4°Cで一晩抗体抗原反応を行い、PBS で洗浄した。二次抗体のホストの血清を 1%加えた PBS にて二次抗体を希釈し、室温で 30 分間の抗体抗原反応を行い、PBS にて洗浄した後、サンプルを封入して観察した。使用した抗体の希釈濃度は以下のとおり；

Polyclonal rabbit anti-adducin (1.7 mg/ml,1:50)

Monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) (4.9 mg/ml, 1:500)

Monoclonal anti-c-Myc (Roche) (1:100)

Alexa Flour 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) (1:500)

2.3 結果

2.3.1 addicsin の同定

モルヒネ反復投与マウスを用いたサブトラクションクローニングより新規因子を同定することに成功した。cDNA 塩基配列解析の結果、新規遺伝子であることが判明したため、我々はこの因子を「addicsin」と名付けた。この cDNA は 72 bp の 5'非翻訳領域、546 bp の単一のオープンリーディングフレームおよび 758 bp の 3'非翻訳領域を含んでいた (図 3A)。3'非翻訳領域にはポリアデニル化シグナル配列 (1357-1362 bp) および poly(A)領域(1375-1394 bp)が含まれていた。addicsin のアミノ酸配列は 188 アミノ酸より成り、予想される分子量は 23 kDa であった。また、addicsin は N 末端側に位置する 18-20 アミノ酸および C 末端側に位置する 138-140 アミノ酸の位置にそれぞれ PKC リン酸化モチーフを持っていた。また、Kyte and Doolittle 法[17]による解析により、addicsin はその内部に二カ所の疎水性領域 (48-82, 100-135 a.a.) を持つことが明らかとなった (図 3B)。

A

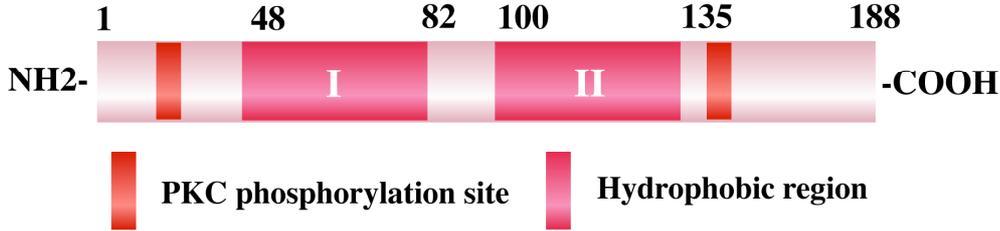
```

1 ggctttcatccagctggttgcgctgcccgcctccagattccgaaggcgaagctcgcg 60
61 aagcagaggaacATGGACGTGAACCTCGCCCCGCTCCGTGCCTGGGACGATTTCTTCCCG 120
1 M D V N L A P L R A W D D F F P 16
121 GGCTCTGATCGTTTCGCCCGCCGACTTCAGGGACATTTCCAAATGGAACAACCGTGTA 180
17 G S D R F A R P D F R D I S K W N N R V 36
181 GTGAGCAATCGCTCTATTACCAGACCAACTACCTGGTGGTGGCTGCCATGATGATTTTCG 240
37 V S N L L Y Y Q T N Y L V V A A M M I S 56
241 GTTGTGGGTTTCTGAGCCCCTTCAACATGATCCTCGGAGGAGTCATTGTGGTGGTGGT 300
57 Y V G F L S P F N M I L G G V I V V L V 76
301 TTCATGGGGTTCGTGTGGGCAGCGACAATAAAGACATCCTCCGCCGGATGAAGAAGCAG 360
77 F M G F V W A A H N K D I L R R M K K Q 96
361 TACCCAACGGCCTTCGTGATGGTGGTCATGCTAGCCAGCTACTTCTCATATCCATGTTTC 420
97 Y P T A F V M V V M L A S Y F L I S M F 116
421 GGGGTGTGATGGTCTTTGTGTTCCGCATCACTCTTCTTGTGTTGATGTTTCATCCAC 480
117 G G V M V F V F G I T L P L L L M F I H 136
481 GCATCCCTGAGACTTCGCAACCTCAAGAACAAGCTGGAAAATAAAATGGAGGGAATCGGC 540
137 A S L R L R N L K N K L E N K M E G I G 156
541 CTGAAGAAACTCCGATGGGCATTATCCTGGATGCCTTGAACAGCAGGAAGATAACATC 600
157 L K K T P M G I I L D A L E Q Q E D N I 176
601 AACAAATTTGCTGACTACATCAGCAAAGCGAGGGAGtaagcacagccccagtgacgg 660
177 N K F A D Y I S K A R E * 188
661 ggccccgcagcaggaatccggttgcactttcccccttggttcagaccattttcagttctgt 720
721 ggtttttaaacagaaggtgcacgtcttaccacccacctctccaaggcatcatgcac 780
781 aggccactgctaagatctccgatatgacccatagaaggcctcagaaactgcaaaaatac 840
841 agaccactctccccgttgtgtctgaagtgtccgggtgtgcttttgaaaaagagtgtggatt 900
901 agacggcccacagtgccatcttatcgtaggggaagaagtcocctgtagagcctggaggcaatg 960
961 tggaggacatgaagatcagttaaagtogaggatggtgtgtgcagcctgtttctaatgct 1020
1021 gtcagacatccccctcaaaaatccccctaaagactctgatgtgtcgggtatgtagtttagcg 1080
1081 gtattatTTTTgttTTTTaaaccagaggctatcacttgggcacctgtttgatgtgcag 1140
1141 tggaaactgggtcagccagttgTTtataTTTTgtttacgaatatgaaggtagctgttttag 1200
1201 gacaatgtttgttaaattttgtaaaatttttaaagggttagtaatatgctttcaccag 1260
1261 caggtgtttcttgcaaaactaaatgtcaacctcctggggtaggggtgggggtggggggat 1320
1321 ggttacaaactctgtaacttctgttattcttgttaagaataaatacaatagaacaaaaaa 1380
1381 aaaaaaaaaaaaaa 1394

```

Bold letters : putative PKC phosphorylation motifs
Single underline : hydrophobic regions
Double underline : polyadenylation signal

B



M.W. 23 kDa

図3 addicsin cDNA 塩基配列および二次構造

A. 新規同定した addicsin の全長配列。 B. addicsin の二次構造。

2.3.2 addicsin はマウス第6染色体上の41.5 cMの位置に存在する

addicsin の染色体上の局在を決定するために行った Mouse/Hamster Radiation Hybrid Panel 法の結果、addicsin はマウス第六染色体上の41.5 cMに位置することが明らかになった。この近傍にはマイクロサテライトマーカーであるD6Mit326が存在していた(図4)。

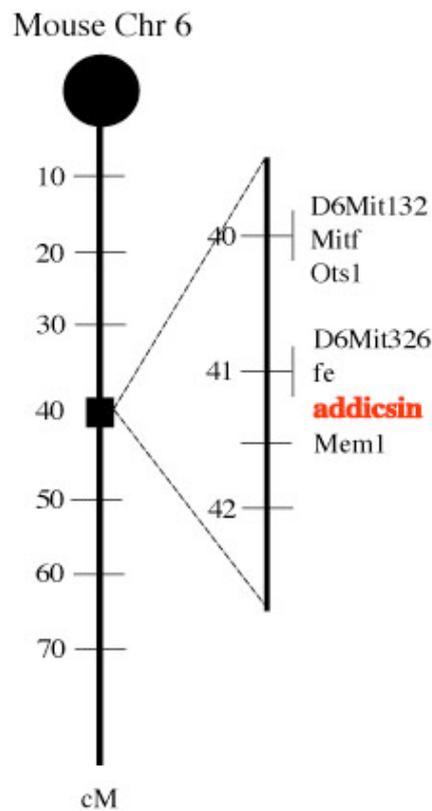


図4 addicsin の染色体マッピング

2.3.3 addicin mRNA はマウス各臓器にユビキタスに発現する

addicin RNA のマウス各種臓器における発現についてノーザンブロット法による解析を行った。解析には、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、筋肉、精巢および腸より調製した総 RNA を用いた。その結果、addicin は解析した全ての臓器でのユビキタスな発現が認められた (図 5A)。次に、脳内での発現についてさらに詳細に解析するために、脳を、皮質、小脳、海馬、嗅球、中脳および橋の 6 部位に分けて総 RNA を調製し、ノーザンブロットを行ったところ、addicin は全ての部位に発現していた (図 5A)。また、マウス脳凍結切片を作製して *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、addicin mRNA は、各種領域の神経細胞において発現しているのが観察された (図 5B)。さらに、マウスの発生段階の脳における addicin mRNA の発現状況を解析するために、胎生 11 日目から生後 42 日目までの 8 点の総 RNA を調製してノーザンブロット法による解析を行った。その結果、addicin mRNA は、生後 5 日目に最高値 (胎生 11 日目の約 5 倍) を示し、その後は胎生 11 日目の約 2 倍の定レベルを保持して発現していることが明らかになった (図 5C)。

A

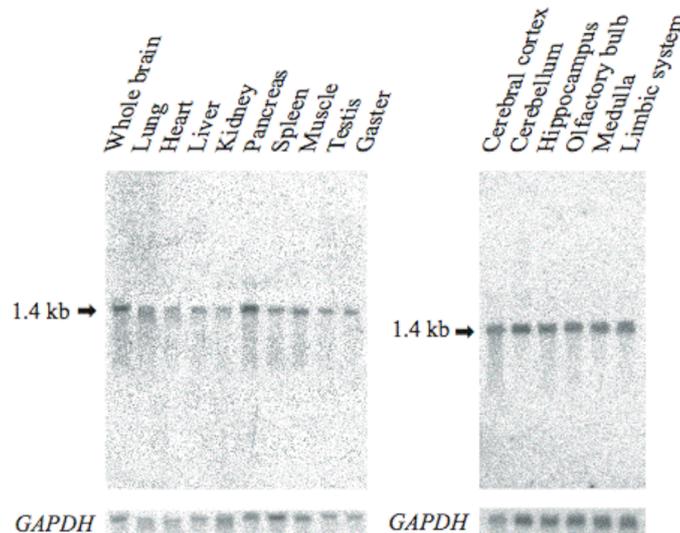
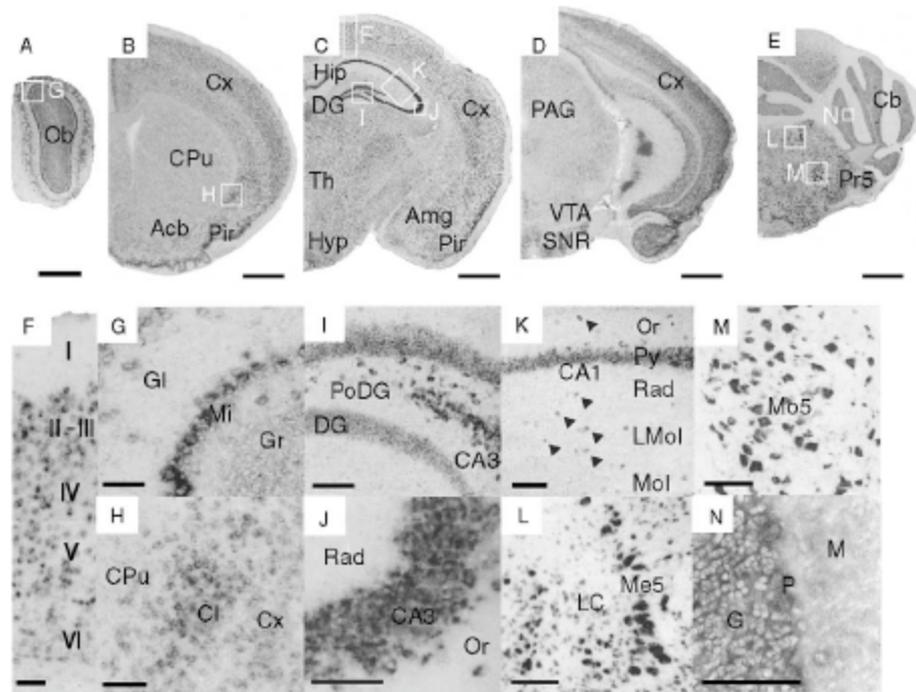


図5 A, B addicin mRNA の局在および発生段階における脳内での発現

A. ノーザンブロット解析による addicin mRNA の局在解析。
Addicin mRNA はいずれの臓器および脳の領域内においてもユビキタスに発現している。

B

B. in situ ハイブリダイゼーションによる adducin のマウス脳各領域における発現解析。神経細胞における強い発現が認められる。

Abbreviations : Acb, accumbens nucleus; Amg, amygdala nucleus; CA1, hippocampus CA1 field; CA3, hippocampus CA3 field; Cb, cerebellum; Cl, claustrum; CPu, caudate putamen; Cx, cerebral cortex; DG, dentate gyrus; G, granular cell layer of cerebellum; Gl, glomerular cell layer of olfactory bulb; Gr, granular cell layer of olfactory bulb; Hip, hippocampus; Hyp, hypothalamus; LC, locus coeruleus; LMol, stratum lacunosum-moleculare layer of hippocampus; M, molecular cell layer of cerebellum; Me5, mesencephalic trigeminal nucleus; Mi, mitral cell layer of olfactory bulb; Mo5, motor trigeminal nucleus; Mol, molecular layer of dentate gyrus; Ob, olfactory bulb; Or, stratum oriens layer of hippocampus; P, Purkinje cell layer of cerebellum; PAG, periaqueductal gray; PoDG, polymorph layer of dentate gyrus; Pir, piriform cortex; Pr5, principal sensory trigeminal nucleus; Py, pyramidal cell layer of hippocampus; Rad, stratum radiatum of hippocampus; SNR, substantia nigra; Th, thalamus; VTA, ventral tegmental area.

C

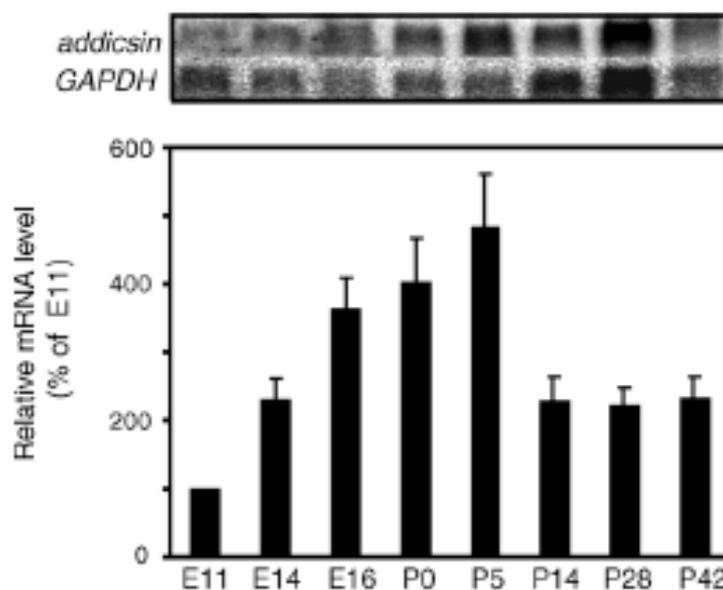


図5C addicisin mRNA の局在および発生段階における脳内での発現

C. マウス能発生過程における addicisin mRNA の発現変化。Addicisin mRNA 量は E11 から P5 にかけて増加し、以降は一定の発現レベルを保っている。

2.3.4 addicisin タンパク質の局在について

addicisin タンパク質のマウスにおける発現について調べるために、まず addicisin タンパク質を特異的に認識する抗体の作製を試みた。作成した抗体を用いてマウス全脳ライセートに対するウェスタンブロット解析を行った結果、予想分子量である 23 kDa 付近に単一のバンドを検出した (図 6A)。また、抗原ペプチドによる抗体吸収実験の結果、この抗体が addicisin を特異的に認識していることが判明した。また、addicisin タンパク質を一過性に過剰発現させた NG108-15 細胞では染色強度が増加したことから、作成抗体が addicisin タンパク質を特異的に認識すると考えられた (図 6B)。

次に、各種培養細胞系を用いて addicisin タンパク質の発現について検討をしたところ、検討したすべての培養細胞株において addicisin タンパク質の発現が

確認された (図 6C)。また、皮質、小脳、海馬、嗅球、中脳および橋の 6 部位における脳内での addicsin タンパク質の発現についても検討したところ、RNA の発現解析の結果と同様、addicsin は解析を行った全ての部位において発現していた (図 6D)。また、マウス脳切片を用いて免疫組織染色解析を行い addicsin タンパク質の詳細な発現解析を行った。その結果、addicsin タンパク質の神経細胞特異的な発現と海馬介在細胞における発現が観察された (図 7)。

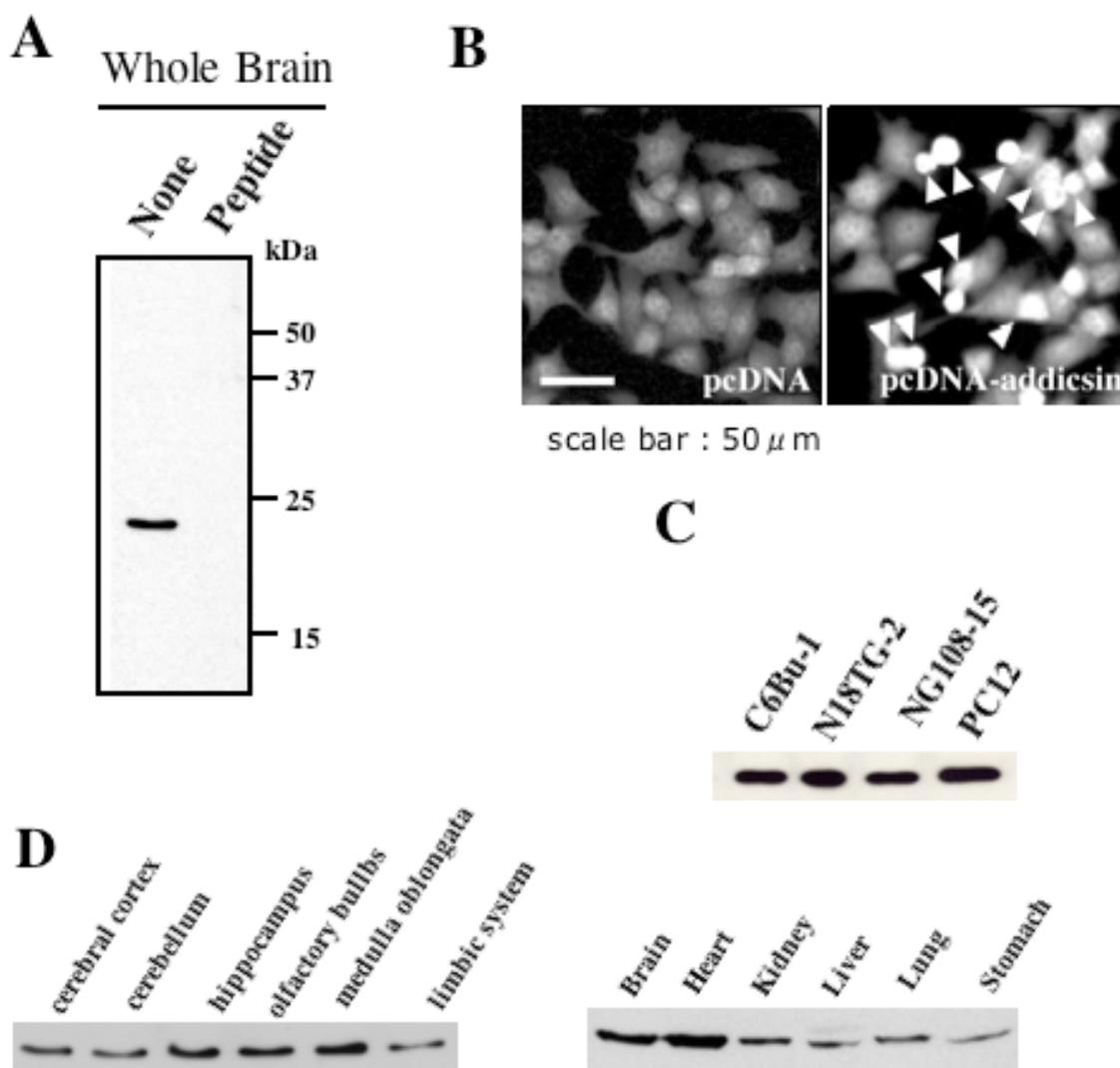


図 6 addicsin タンパク質の局在

A. マウス全脳ライゼートを用いた抗 addicsin 抗体の特異性の検討。B. 強制発現系を利用した抗 addicsin 抗体の特異性の検討。C. 各種神経系培養細胞系における addicsin の発現解析。D. マウス脳内各領域およびマウス各組織を用いた発現解析。

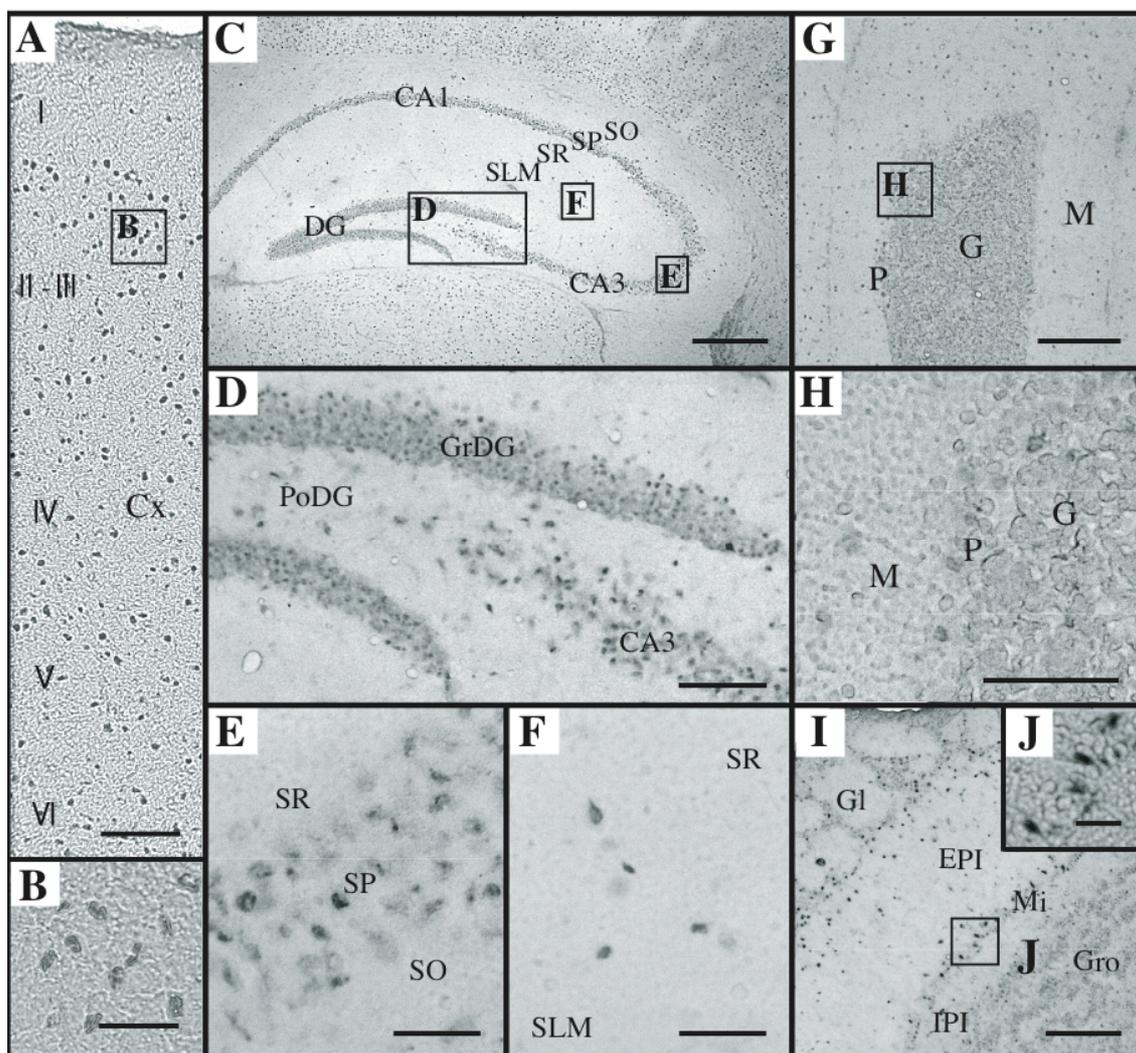


図7 脳各領域における adducin タンパク質の発現

A および B は大脳皮質、C-F は海馬、G および H は小脳、I および J は、嗅球。Adducin mRNA と同様に神経細胞への局在が観察される。

Abbreviations : CA1, hippocampus CA1 field; CA3, hippocampus CA3 field; Cx, cerebral cortex; DG, dentate gyrus; EPI, external plexiform layer of the olfactory bulb; GrDG, granular cell layer of the dentate gyrus; G, granular cell layer of the cerebellum; Gl, glomerular layer of the olfactory bulb; Gro, granule layer of the olfactory bulb; IPI, internal plexiform layer of the olfactory bulb; M, molecular layer of the cerebellum; Mi, mitral cell layer of the olfactory bulb; P, Purkinje cell layer of the cerebellum, PoDG, polymorph layer of the dentate gyrus; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; SLM, stratum lacunosum-moleculare; mf, mossy fibre.

次に、addicsin の細胞内局在を調べるために、マウス脳ライセートを PBS、NaCl、Na₂CO₃ および TritonX-100 のそれぞれの溶液にて溶解し、ウェスタンブロットを行った。その結果、addicsin はいずれの溶液で溶解した際にも全て S2 画分に存在することが明らかになった (図 8A)。また、addicsin の全長配列を組み込んだ pcDNA3.1 発現ベクターを COS7 細胞にトランスフェクションして行った免疫組織染色の結果、addicsin 陽性シグナルは核の周りに凝集して観察された (図 8B)。

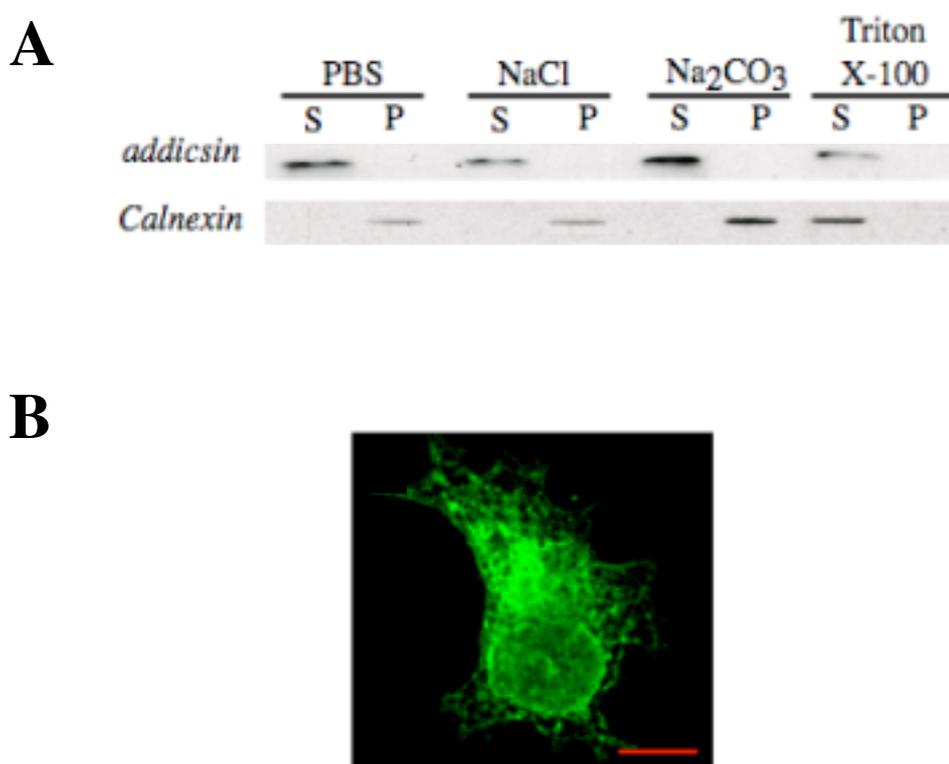


図8 addicsin の細胞内局在

- A. マウス全脳ライセートを用いた細胞内局在解析。小胞体膜一回貫通型タンパク質であるcalnexinとは異なる挙動を示すことから、addicsin は小胞体内や細胞内オルガネラ内には局在しないことが示唆される。
- B. 強制発現系を用いた免疫組織化学解析。核の周りの細胞内オルガネラ付近にaddicsinの局在を示す強いシグナルが観察される。また、細胞膜上の発現も認められる。

2.3.5 addicsin の発現量はモルヒネ慢性投与により増加する

モルヒネ反復投与により addicsin の発現量に変化が認められるかどうかを確認するために、モルヒネ反復投与マウスおよびコントロールとして生理食塩水反復投与マウス、またモルヒネの拮抗阻害薬であるナロキソンをモルヒネと同時に投与したマウスより各々凍結切片を作製し、サブトラクシオンクロニングの材料とした扁桃体に着目して *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、addicsin mRNA 量を検定した。その結果、投与より 16 時間後の扁桃体内側基底核において、モルヒネ反復投与マウスでのみ addicsin 陽性シグナルの増加が観察された (図 9A-b)。次いで、この陽性シグナルの増加を確認するために、上記と同様の三種類のマウスの扁桃体より調製した mRNA を用いて kinetic PCR を行った。その結果、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果と同様に、モルヒネを反復投与したマウスの扁桃体でのみ約 3.6 倍の addicsin の発現量の増加が見られた (図 9B, Chr-M)。さらに、投与スケジュール終了直後においても addicsin の発現量は増加していた (図 9C, Chr-M)。しかしながら、この発現量の増加は、モルヒネ 100 mg / kg の単回投与のみを行ったマウスにおいては観察されなかった (図 9B, Acu-M)。

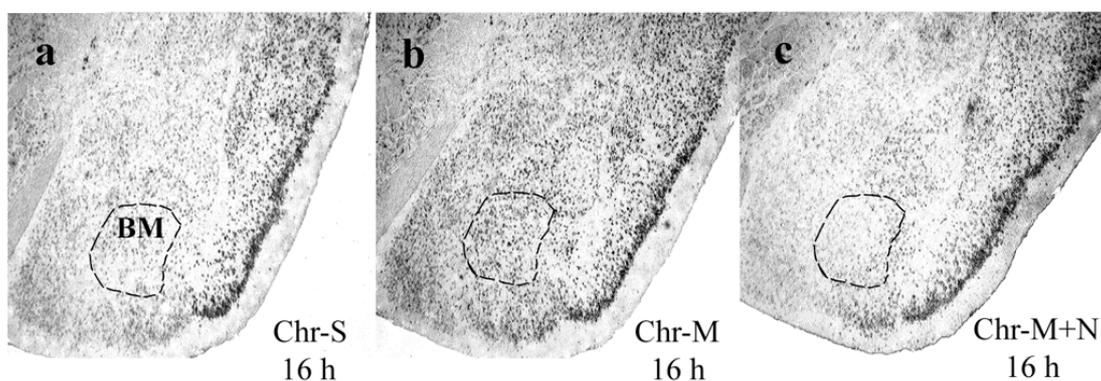
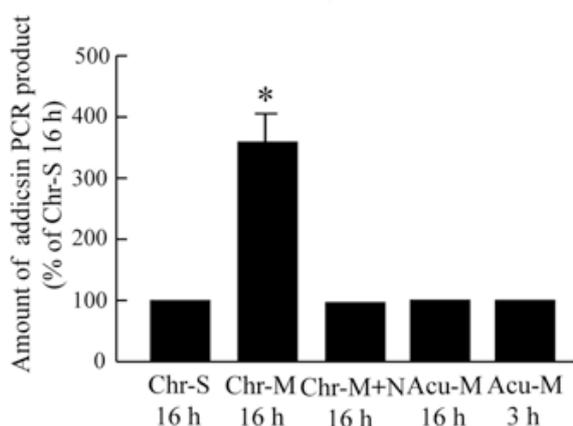
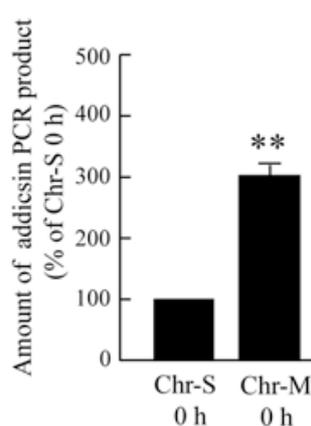
A**B****C**

図9 モルヒネ反復投与による扁桃体内側基底核における addicisin mRNA の発現

A. in situ ハイブリダイゼーション法による addicisin mRNA の発現解析。B., C. RT-PCR 法による扁桃体内側基底核における addicisin mRNA の発現解析。モルヒネ反復投与マウスの扁桃体では addicisin のシグナルの上昇が見られる。反復投与後 0 時間後のシグナルの上昇は耐性依存との関連を、また反復投与後 16 時間後のシグナルの上昇はこの時点で形成されている逆耐性との関連を示唆するものである。
* $p < 0.0001$ vs Chr-S 16 h; one-way ANOVA; ** $p < 0.0001$ vs Chr-S 0 h; unpaired t-test. BM, basomedial amygdala nucleus. Chr-S, Chronic Saline. Chr-M, Chronic Morphine. Chr-M+N, Chronic Morphine and Naloxone. Acu-M, Acute Morphine

2.4 考察

addicsin mRNA と addicsin タンパク質の局在を調べた結果、両者は組織レベルにおいても脳の領域レベルにおいても同様にユビキタスに発現していた。さらに脳内の領域に注目して行った addicsin 抗体を用いた免疫組織染色の結果、addicsin タンパク質は、海馬錐体細胞などの神経細胞に局在することが観察された (図 7)。In situ hybridization の結果も、免疫組織染色の結果と同様に、addicsin mRNA の神経細胞特異的な発現を支持するものであった (図 5B)。従って、addicsin は、神経細胞に特異的に局在することが考えられ、神経細胞特異的な機能の発現に関与している可能性がある。また脳の発達段階における addicsin mRNA の脳内発現量は生後 5 日目をピークとして増加し、その後ピーク時の半分の量を保っていた (図 5C)。この発現量の増加時期は、新生ニューロンが盛んに産生される時期、ならびにシナプスが形成される時期と重なっている。従って、addicsin は、発生期には神経新生やシナプス形成において重要な役割を果たす可能性が示唆される。

細胞内の局在については、addicsin タンパク質が S2 上清画分に存在することから、細胞膜には局在しないことが推測された。そこで、細胞内オルガネラ膜に局在している可能性を考慮し、界面活性剤を含む各種溶液でマウス脳ライセートを調製して addicsin タンパク質の局在を解析した。その結果、コントロールとして用いた小胞体膜 1 回貫通型タンパク質である calnexine の局在とは異なり、addicsin タンパク質は、どの溶液で溶解してもすべて S2 上清画分に存在していた (図 8A)。従って、addicsin タンパク質が水溶性タンパク質であることが示唆された。しかし、addicsin タンパク質は疎水性領域を持つことから、この領域が膜への局在ではなく、他の機能に関与する可能性が推測された。

モルヒネ反復投与 16 時間後における addicsin の発現量の増加、およびモルヒネ反復投与後 0 時間における addicsin の発現量の増加は、モルヒネとモルヒネ拮抗阻害薬ナロキソンを同時投与した場合には消失した。また、モルヒネ単回投与においてもこの増加は認められなかった。この結果は、addicsin の遺伝子発現の増加が、オピオイド受容体を介していること、ならびに、モルヒネ反復投与特異的な現象であることを示唆するものである。今回用いたモルヒネ反復投与方法は、Kaneto らの方法に準拠しており、この系においては、モルヒネ耐性・依存が形成されることが既に証明されている[18]。我々

も、ホットプレートを用いた鎮痛耐性実験等を行い、この系においてモルヒネ耐性・依存が形成されていることを追試済みである。従って、反復投与終了直後 (Chr-M 0h) において特異的に観察される addicisin の発現の増加は、モルヒネによる耐性・依存に関連している可能性が高い。また、反復投与 16 時間後のポイントは、我々がモルヒネ長期作用関連因子のクローニングを行ったポイントであり、また、このポイントにおいては同クローニングにて addicisin と共に同定したモルヒネ逆耐性形成関連因子である SPARC の mRNA の発現量が正常レベルの 2 倍の値を示すことが明らかとなっている[16]。従って、このポイントでは、モルヒネ耐性・依存に加えて逆耐性も形成されていることが推測される。よって、addicisin は、モルヒネ耐性・依存および逆耐性の形成に関与していることが考えられる。

扁桃体は、現在では単なる情動の座というだけではなく、情動的な出来事に伴った記憶・学習の形成と貯蔵に関与することが明らかとなっている。また、近年、扁桃体の機能異常が、自閉症や双極性障害などの精神障害を引き起こすという研究結果が相次いで報告されている[19, 20]。過去の実験で、我々は、モルヒネ長期作用時に扁桃体での CRE を介した後期遺伝子発現が亢進することを見いだしており[10, 11, 21]、これは、扁桃体の機能異常と関連している可能性がある。従って、今回のサブトラクションクローニングで単離同定した addicisin や SPARC が、精神疾患にも深く関与していても不思議ではない。また、この機能異常は平常時とは異なる神経ネットワークを必要とすることから、神経可塑性と関連している可能性がある。将来、addicisin トランスジェニックマウスを用いた解析により、addicisin とモルヒネ耐性・依存および逆耐性、さらには神経可塑性との関わりが解明されるものと思われる。

3. 第二部 addicin および addicin 結合因子 Arl6ip1 によるグルタミン酸トランスポーターEAAC1 の調節機構

3.1 背景

神経回路網の基本単位であるニューロンは、脳神経系における情報処理活動において最も中心的な役割を果たしている。ニューロンに入力された情報は一方向に神経終末へと伝わる。情報受け渡しの場となる神経細胞間の膜と膜との接合部位はシナプスと呼ばれ、この間には数 100 Å の間隙があり、これをシナプス間隙という。情報の伝達は神経伝達物質を前シナプス（神経終末）から後シナプス（樹状突起上のスパイン）へと受け渡すことで行われる。すなわち、前シナプスにて合成されシナプス小胞に蓄積された神経伝達物質は、神経の興奮にともなって前シナプス終末に活動電位が到達した際、ATP 依存的にシナプス小胞膜と前シナプスの細胞膜が融合して細胞間隙に放出される。そしてこの神経伝達物質が後シナプスの膜上に存在するレセプターに結合することで情報伝達が行われる。この神経伝達物質の一つであるグルタミン酸は、興奮性神経伝達物質として記憶、学習、また認知などの高次神経機能に密接に関与しており、非常に重要な物質である[22]。

シナプス間隙に放出されたグルタミン酸は、その濃度が高すぎると神経毒性が高まり、脳虚血、てんかん、神経変性疾患などを引き起こす原因となる。そのため、正常な状態ではこのグルタミン酸の細胞間の濃度は細胞膜上に存在するグルタミン酸トランスポーター（Excitatory Amino Acid Transporter: EAAT）により常に適切に保たれている[23]。すなわち、グルタミン酸トランスポーターは、シナプス前部より放出されたグルタミン酸をシナプス間隙より取り除き、細胞外の濃度を低く保ってグルタミン酸の興奮毒性より細胞を保護する役割を果たしている（図 10）。この EAAT は $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ 依存性トランスポーターであり、グルタミン酸 1 分子の取り込みに連動して、2~3 分子の Na^+ の流入、1 分子の H^+ の細胞内への流入と細胞外へ 1 分子の K^+ の流出が起きる。またこれらとは別に、基質取り込みと連動していない Cl^- の流入が存在する。

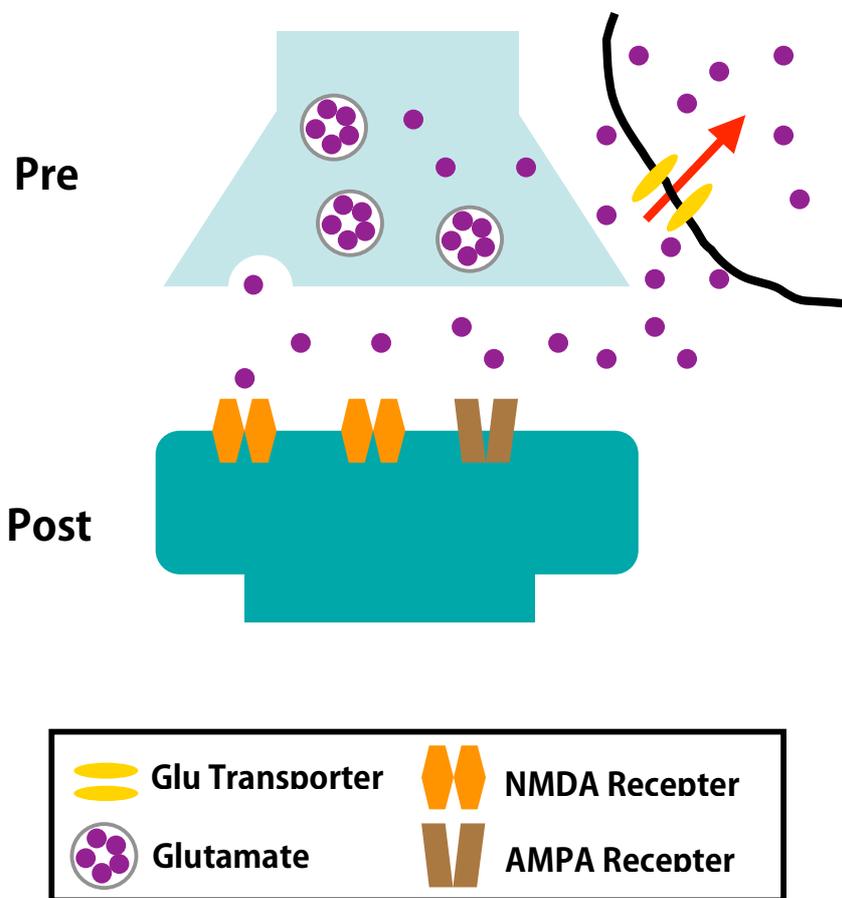


図 10 グルタミン酸トランスポーターの機能

グルタミン酸トランスポーターの機能を表した模式図。グルタミン酸トランスポーターは細胞外のグルタミン酸の量を細胞内に再取り込みすることで、グルタミン酸濃度を適切に保っている。

グルタミン酸トランスポーターは、その分子の局在から、細胞膜に存在する細胞膜型と、シナプス小胞に存在する小胞型に大きく二分される。細胞膜型グルタミン酸トランスポーターは、現在までに、GLAST(EAAT1)、GLT-1(EAAT2)、EAAC1(EAAT3)、EAAT4 および EAAT5 の5種類が同定されている[24]。これら細胞膜型グルタミン酸トランスポーターは局在する細胞の種類によりグリア細胞局在型と神経細胞局在型にさらに二分される。グリア細胞局在型には、GLAST(EAAT1)、GLT-1(EAAT2) [25-27]、神経細胞局在型にはEAAC1(EAAT3) [28, 29]、EAAT4[30]および EAAT5[31] [32]がそれぞれ属することが知られている。一方、小胞型グルタミン酸トランスポーターは現在までに、BNPI(VGLUT1) [33]、DNPI(VGLUT2) [34]および VGLUT3[35]の3種類が同定されている。VGLUTはATP や H⁺および Cl⁻に対する依存性を有し、グルタミン酸に対する基質特異性が高い点等EAATとはかなり性質が異なっている。

これまでモルヒネ依存形成とグルタミン酸トランスポーターとの関与については、グリア細胞局在型トランスポーターGLT-1に関してのみ以下のように報告されている。それらは、(1) モルヒネ依存時にGLT-1の発現量が線条体および視床において減少する[36]、(2) トランスポーター阻害薬であるTBOAの側脳室内投与によりモルヒネ依存状態が悪化する[37, 38]、および(3) μ オピオイド受容体が多く発現している青斑核へのGLT-1導入によりモルヒネ依存が減弱する[39]、という報告である。

一方、2001年に、神経細胞局在型グルタミン酸トランスポーターEAAC1(EAAT3)に結合し、EAAC1を介したグルタミン酸の取り込みを抑制する効果をもつ因子としてGTRAP3-18が同定された[40]。興味深いことに、このGTRAP3-18は、我々がモルヒネ耐性依存関連因子として同定したaddicininのラットホモログであった(図11)。この報告は、モルヒネ耐性依存現象に神経型グルタミン酸トランスポーターが深く関与することを示唆するものである。そこで我々は、addicininタンパク質によるEAAC1調節機構を詳細に調べる目的で、酵母ツーハイブリッド法を用いてaddicininタンパク質と相互作用する因子を探索することを試みた。その結果、機能未知因子であるADP-ribosylation like factor interacting protein 1 (Arl6ip1) [41]を単離同定することに成功した。本章では、Arl6ip1タンパク質がaddicininタンパク質と拮抗的に作用しながらEAAC1のグルタミン酸取り込み能を調節していることについて報告する。

```

Mouse addicsin 1 MDVNLAPLRAWDDFFPGSDRFARPDFRDISKWNNRVVSNLLYYQTNYLVVAAMMISVVGF 60
Rat GTRAP3-18 1 ..... 60
*****

Mouse addicsin 61 LSPFNMI LGGVIVVLVFMGFVWAH NKDILRRMKKYPTAFVMVVMLASYFLISMFGGVM 120
Rat GTRAP3-18 61 .....I.....T..... 120
*****;*****

Mouse addicsin 121 VVFGITLPLLLMFIHASLRLRN LKNKLENKMEGIGLKKTPMGIILDALEQQEDNINKFA
Rat GTRAP3-18 121 .....F.....S..... 180
*****;*****

Mouse addicsin 181 DYISKARE 188
Rat GTRAP3-18 181 ..... 188
*****

```

図 11 addicsin と GTRAP3-18 とのアミノ酸配列の比較

3.2 材料および方法

*分子生物学に関わる一般的な手法については Molecular Cloning 2nd Edition および Current Protocols in Molecular Biology を参考にした。

3.2.1 酵母ツーハイブリッドスクリーニングによる Arl6ip1 の同定

Matchmaker Two-hybrid System 3 (Clontech)を用いて酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。全長 addicisin cDNA を bait ベクターである pGBKT7 ベクターにサブクローニングし、bait として用いた。モルヒネ反復投与マウス扁桃腺より作製した cDNA ライブラリーを prey ベクターである pACT2 にサブクローニングし、これを prey として用いた。両構築物を酵母 AH109 株に同時にトランスフェクションし、20 mg /ml の X-alpha-gal (Clontech)を含むトリプトファン、ロイシンおよびヒスチジン欠損 SD 培地に撒き、30°Cで培養してブルーカラーセレクションを行った。陽性コロニーを培養し、Zymoprep (Zymo Research Corp)を用いてプラスミドを精製後、その cDNA 塩基配列を解析した。さらに単離した遺伝子を同定するため、この cDNA 塩基配列を元に BLAST ならびに FASTA 検索を行った。次に、Arl6ip1 のコーディング領域をクローニングするために、マウス全脳総 RNA サンプルより RT-PCR を行った。使用したプライマー配列および PCR のサイクルは以下のとおりである。

<プライマー配列>

5'-AAGAATTCATGGCGGAGGGGGATAACCGCA-3'

5'-TTCTCGAGCTCATTTTTCTTTTCTTTTGC -3'

<PCR サイクル>

94°C-30 秒、53°C-45 秒、72°C-60 秒 (30 サイクル)

3.2.2 培養細胞の調製と発現ベクターのトランスフェクション

NG108-15 細胞株および COS7 細胞株を実験に使用した。10% FBS を含む DMEM 低グルコース培地 (Sigma) を用いて 37°C、CO₂ 5%の条件で培養した。発現ベクターは、pcDNA3.1 発現ベクターに addicisin 全長、addicisin 欠損体または Arl6ip1 全長 cDNA をサブクローニングすることで作成した。作成した発現ベクターは、Lipofectamine 2000 (invitrogen)を用いて NG108-15 細胞株および COS7 細胞株に添付のプロトコールに従って導入した。ウェスタンブロットに用いる細胞抽出液は、培養ディッシュを PBS で 2 回洗浄し、RIPA Buffer (50 mM

Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA)にて細胞を懸濁し、4°Cに 20 分間静置した後、15,000 rpm、20 分間、4°Cでの遠心分離を行い、その上清を得ることにより調整した。

3.2.3 グリセロールグラジエント法

Tomoda らの論文に従い[42]、グリセロールグラジエント法を行った。グリセロール作製用バッファー (10 mM Tris-Hcl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β -メルカプトエタノール) にて 10%グリセロール溶液および 40%グリセロール溶液を作製し、グラジエントゲルメーカーにてグリセロール密度勾配液を作製した。この勾配上に 3.2.2 の方法に従って得た細胞抽出液を重層し、Hitachi RPS40T ローターを用いて 130,000 x g、24 時間、4°Cでの超遠心分離を行った。遠心分離終了後、0.5 mL ずつ分画化し、12% SDS-PAGE により展開してウェスタンブロッティングに供した。

3.2.4 免疫沈降法

2.2.6 および 3.2.2 の方法に従って免疫沈降用試料を調製した。ウサギ抗体に対しては Protein-A Sepharose ビーズ、マウス抗体に対しては Protein-G Sepharose ビーズを用いた。BSA による前処置後、目的の抗体をビーズに結合させるために 4°Cで 30 分間反応させた。その後 3,000 rpm、10 秒間の遠心操作でビーズを沈降後、RIPA 溶液にて 3 回洗浄した。さらに、細胞抽出液を添加して 4°Cで 1 時間以上攪拌し、RIPA 溶液にて 5 回洗浄後に免疫沈降産物が結合したビーズを得た。この免疫沈降産物が結合したビーズを 2 x SDS サンプルバッファーにて懸濁し、95°Cで 2 分間熱変性後、12% SDS-PAGE により展開してウェスタンブロッティングに供した。

3.2.5 Arl6ip1 抗体の作製

Arl6ip1 のアミノ酸 185-199 番目にあたるペプチド(CGMAKREINKLLKQKE)を合成し、N 末端のシステイン残基を介して Keyhole Limpet Hemocyanin と結合させたものを抗原としてウサギに免疫することにより抗 Arl6ip1 抗体を作製した。

3.2.6 マウス各種臓器からの RNA 抽出と RT-PCR

マウス各種臓器からの RNA 抽出は 2.2.5 に記載のとおりに行った。Arl6ip1、addicsin、GAPDH(コントロール)を検出するためのプライマーは以下のとおり。

<Arl6ip1 (381 bp)>

5'-TGTCTGGTGTTCCTGCTTT-3'

5'-GTTTGTTTATCTCCCTTTTG-3'

<addicsin (496 bp)>

5'-TGCCTGGGACGATTTCTTCC-3'

5'-ATCTTCCTGCTGCTGTTCCAAGG-3'

<GAPDH (434 bp)>

5'-GTGGCAGTGATGGCATGGACT-3'

5'-TTCATTGACCTCAACTACATG-3'

3.2.7 マウス脳タンパク質の精製とウェスタンブロット

マウス脳タンパク質の精製とウェスタンブロットについては 2.2.6 に記載のとおりに行った。抗体の希釈濃度は以下のとおり；

Polyclonal rabbit anti-Arl6ip1 (3.7 mg/ml, 1:250)

Polyclonal rabbit anti-addicsin (1.7 mg/ml, 1:100)

Monoclonal anti c-Myc (Roche) (0.4 mg/ml, 1:500)

Monoclonal anti-V5 (Invitrogen) (0.8 mg/ml, 1:5000)

Monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) (4.9 mg/ml, 1:2,000)

Monoclonal anti-Actin (Chemicon) (1.0 mg/ml, 1:200)

HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Chemicon) (0.5 mg/ml, 1:2,000)

HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (MP Biomedicals) (1.0 mg/ml, 1:20,000)

3.2.8 免疫組織染色法

免疫組織染色は上記 2.2.8 に記載の方法に従って行った。使用した抗体の希釈濃度は以下のとおり；

Polyclonal rabbit anti-Arl6ip1 (3.7 mg/ml, 1:250)

Polyclonal rabbit anti-addicsin (1.7 mg/ml, 1:50)

Monoclonal anti-V5 (Invitrogen) (0.8 mg/ml, 1:200)

Monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) (4.9 mg/ml, 1:500)

Alexa Flour 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) (1:500)

3.2.9 GeneSwitch システムによる細胞株の樹立

GeneSwitch System (Invitrogen)を用い、添付のプロトコールに従って Arl6ip1 (C6BU-1/pSw-Arl6ip1)、 addicsin (C6BU-1/pSw-addicsin)、 および addicsinY110A/L112A (C6BU-1/pSw-addicsinY110A/L112A) の 3 種類の長期安定発現株を作製した。GeneSwitch System の概略を図 12 に示す。これらの細胞株は選択マーカーである 100 μ g/ml のハイグロマイシンおよび 250 μ g/ml のゼオシン存在下、10% FBS-DMEM 中にて、37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。目的とするタンパク質を発現させるために、アッセイの 24 時間前から 10 nM の Mifepristone に暴露した。

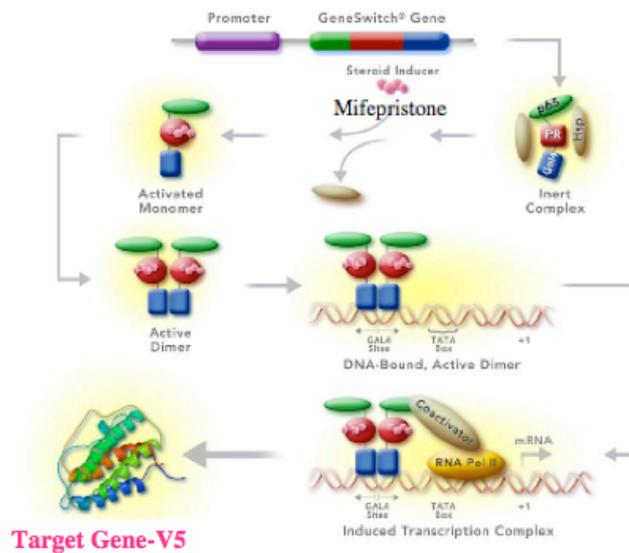


図 12 GeneSwitch System の概要

3.2.10 グルタミン酸取り込みアッセイ

目的のタンパク質を発現する C6BU-1/pSwitch 細胞を 24 穴 PRIMARIA プレート (FALCON BD) に継体細胞数が約 1×10^4 個/well になるように細胞を播種し、60-70%コンフルエントな状態になったときに 10 nM の Mifepristone (コントロールは 2.2 mM のエタノール) にて 37°C で 24 時間の発現誘導をかけた。次いで、100nM の PMA (ネガティブコントロールには DMSO) を培地に加えて 30 分間処理することで PKC シグナル系を活性化させた。細胞を、37°C に保温した Na^+ 溶液 (5 mM Tris-HCl, 10 mM HEPES, 2.5 mM KCl, 1.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 1.2 mM K_2HPO_4 , 10 mM glucose, 140 mM NaCl) もしくは Ch^+ 溶液 (5 mM Tris-HCl, 10mM HEPES, 2.5 mM KCl, 1.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 1.2 mM K_2HPO_4 , 10 mM glucose, 140 mM choline chloride) にて 3 回洗浄後、0.5 μM の L- [^3H] Glutamate (2.5 $\mu\text{Ci/ml}$) (GE Healthcare Bio-Science) および 30 mM unlabeled Glutamate (Sigma) を加えて 37°C で 5 分間インキュベートした。次に、4°C に冷却した Ch^+ 溶液にて 3 回洗浄を行うことにより Glutamate の取り込みを停止させた。Lysis 溶液 (100 mM NaOH) にて細胞を溶解後、液体シンチレーションカウンター (Beckman Coulter) にて放射活性を測定した。このライセートの一部を用いて DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories) にてタンパク質濃度を測定した。1 つの系につき同一アッセイを 5 回行い、単位タンパク質重量あたりの細胞外グルタミン酸取り込み能の平均値を算出した。カイネティクス解析は、unlabeled Glutamate 濃度を变化させた場合 (8 点) の単位タンパク質重量あたりの細胞外グルタミン酸取り込み能を測定し、これらの結果を基に Eadie-Hofstee プロット法[43, 44]によって反応速度と親和性を算出した。

3.2.11 addicisin siRNA 実験

目的の細胞を 12 ウェルプレートに播種し、実験開始 24 時間前に Lipofectamine 2000 により二本鎖 siRNA を C6BU-1-pSW-Arl6ip1 細胞株に導入した。導入時の siRNA の濃度は 60 pmol/well とした。導入方法は添付のプロトコールに従った。使用した addicisin siRNA のセンス鎖の塩基配列は以下のとおり；

addicisin siRNA#1 : 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3'

addicisin siRNA# 2 : 5'-UUUGCAAGAAACACCUGCUdGdG-3'

control siRNA : 5'-AGCAGGUGUUUCUUGCAAAdTdT-3'

3.2.12 ビオチン化アッセイによる細胞表面発現タンパク質の検出

pGeneSwitch システムにて目的の遺伝子を組み込んだ安定発現細胞株を用いて実験を行った。選択マーカーである $100\ \mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシンおよび $250\ \mu\text{g/ml}$ のゼオシンを含む 10% FBS-DMEM での培養を行った細胞の培地中に、アッセイの 24 時間前から $10\ \text{nM}$ の Mifepristone を加え、目的のタンパク質の発現を誘導した。次いで、 $100\ \text{nM}$ の PMA (ネガティブコントロールには DMSO) を培地に加えて 30 分間処理することで PKC シグナル系を活性化させた。細胞を PBS- Ca^+ - Mg^+ 溶液($138\ \text{mM NaCl}$, $2.7\ \text{mM KCl}$, $1.5\ \text{mM KH}_2\text{PO}_4$, $9.6\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1\ \text{mM MgCl}_2$, $0.1\ \text{mM CaCl}_2$, pH7.3)にて 3 回洗浄し、 $0.5\ \text{mg/ml}$ の EZ-Link sulfo-NHS-Biotin を含む PBS- Ca^+ - Mg^+ 溶液にて 30 分間 4°C でインキュベートした。次いで $100\ \text{mM}$ のグリシンを含む PBS- Ca^+ - Mg^+ 溶液にて 2 回洗浄後、同溶液にて 20 分間 4°C でインキュベートして過剰なビオチンを消失させた。その後 $200\ \mu\text{l}$ の RIPA 溶液にて細胞を回収し、 $15,000\ \text{rpm}$ で 30 分間 4°C にて遠心分離して得られた上清を全ライセートとして得た。この上清を 50% ボリュームのアビジンビーズにて懸濁し、室温で 60 分間反応させた後、 $15,000\ \text{rpm}$ で 10 分間 4°C にて遠心分離して得られた上清を細胞内画分とした。このビーズを RIPA バッファーにて 6 回洗浄し、2 x の SDS サンプルバッファーと合わせて 30 分間室温で反応させた後、 $15,000\ \text{rpm}$ で 30 分間 4°C にて遠心分離して得られた上清をビオチン化された細胞膜画分として得た。これらのサンプルを SDS-PAGE にて展開し、ウェスタンブロットに供した。

3.3 結果

3.3.1 Arl6ip1 の同定

酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングの結果、モルヒネ反復投与マウスの扁桃体ライブラリーより addicsin と相互作用を示す陽性クローンを最終的に複数得た。これら陽性クローンの cDNA 塩基配列を解析した結果、addicsin、EAAC1、そして ADP-ribosylation like factor interacting protein 1 (Arl6ip1) の cDNA 塩基配列の一部がクローニングされていることが明らかとなった (図 13A)。そこで、Arl6ip1 の全長を RT-PCR によりクローニングして pACT2 ベクターに組み込み、pGBKT7-addicsin との相互作用を再確認した結果、両者は結合を示した。Arl6ip1 は、203 アミノ酸からなるタンパク質で、そのアミノ酸配列はゼブラフィッシュからヒトまで脊椎動物間で高度に保存されていた (図 13A)。また、Arl6ip1 は、PKC リン酸化モチーフ (94-96, 115-117, 128-130 a.a.)、グリコシル化モチーフ (6-9 a.a.)、カゼインキナーゼ II リン酸化モチーフ (18-21, 128-131 a.a.) を持ち、その内部には疎水性領域 (42-61, 66-88, 136-153, 158-180 a.a.) が存在していた。アミノ酸配列より予想される分子量は 25 kDa であった (図 13B)。

A

Mouse	1	MAEGDNRSSNLLAVETASLEEQLQGWEVMLMADKVLRWERAWFPPAIMGVVSLFLIIY	60
Rat	1	60
Human	1T...A.....V.....	60
Zebrafish	1K.A...Q..SQ.....I.AG.QI...KP...G.LVS.TTI..TL..	60
		*****:*:**** **:.*****:* .*:****:.*** *:.*.:** :**	60
Mouse	61	YLDPSVLSGVSCFVMFLCLADYLVPILAPRIFGSNKWTTEQQRFHEICSNLVKTRRRAV	120
Rat	61	120
Human	61	120
Zebrafish	61T.L..T..I.....T...V.....G....Q..VL	120
		*****:*:** **:.***** ****:*****.*****:**.:	120
Mouse	121	GWVKRLFSLKEEKPKMYFMTMIISLAAVAVGQQVHNLLTYLIVTFVLLPGLNQHGI	180
Rat	121T.....	180
Human	121T.....V.....SL.....	180
Zebrafish	121A.....LSV.S..V...I.....F.....S.L.....	180
		*****:*****:;:* **:.****:*****:*****: ;*****	
Mouse	181	LKYIGMAKREINKLLKQKEKKNE	203
Rat	181	203
Human	181	203
Zebrafish	181	T..A.....	203
		** *****	203

(Identity)
 Mouse:Rat=99.6%
 Mouse:Human=96.6%
 Mouse:Zebrafisha=78.8%

B

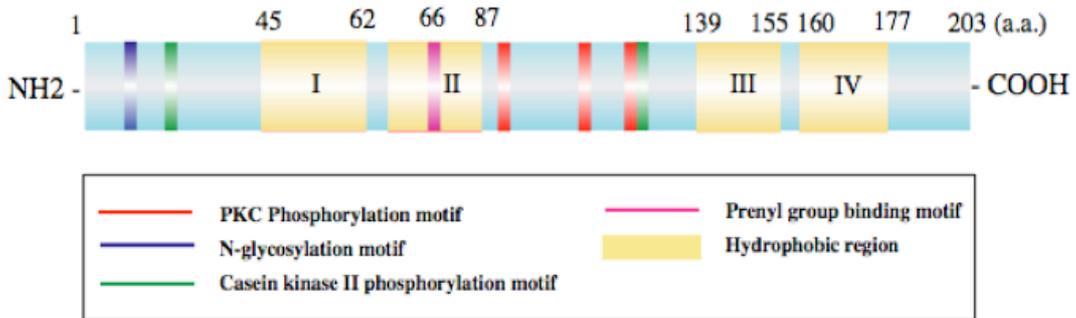


図 13 Arl6ip1 のアミノ酸配列および二次構造

- A. 各種生物種間における Arl6ip1 の全長アミノ酸配列の比較。
- B. Arl6ip1 の二次構造。

3.3.2 Arl6ip1 は addicsin と結合する

酵母ツーハイブリッド法によるクローニングの結果を再確認するために、全長 addicsin または全長 Arl6ip1 を発現ベクターに組み込んで COS7 細胞にトランスフェクションし、免疫沈降実験を行った。その結果、addicsin は、Arl6ip1 により、また逆に、Arl6ip1 は addicsin によりそれぞれ免疫沈降されたことから、両因子は *in vitro* 系において結合することが明らかとなった (図 14A)。次に、上記の細胞を RIPA 溶液に溶解し、その細胞抽出液をグリセロールグラジエント勾配により分画し、ウェスタンブロット法を用いて addicsin および Arl6ip1 の局在を検出した結果、両タンパク質の存在画分のピークは共にフラクション 17-18 であった (図 14B)。さらに、addicsin の分画サンプルには、addicsin の分子量である 23 kDa に加えて 40 kDa 前後のバンドが検出された。このバンドはフラクション 15-18 に存在していた (図 14B)。次に Arl6ip1 の発現を検出するためにウサギ抗 Arl6ip1 抗体を作製した。ウェスタンブロットを行った結果、予想分子量である 25 kDa 付近に単一のバンドを検出した (図 15A)。このバンドは、免疫前のウサギ抗血清では検出されなかったことから、この抗体は Arl6ip1 を特異的に検出し得ると判断して以降の実験に用いた。本抗体を用いてマウス全脳ライセートを用いた *in vivo* 免疫沈降実験を行った結果、addicsin と Arl6ip1 の結合が認められた (図 15B)。

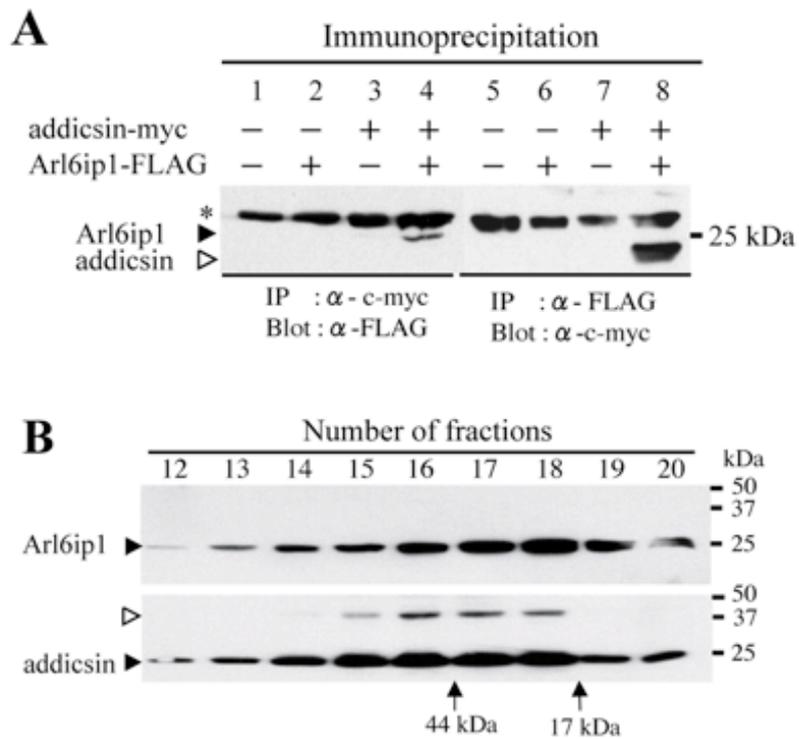


図 14 addicsin と Arl6ip1 の結合

A. 強制発現系を用いた addicsin と Arl6ip1 との免疫沈降実験。

B. グリセロール勾配法による細胞分画化実験。▷ は addicsin のホモダイマーを示す。

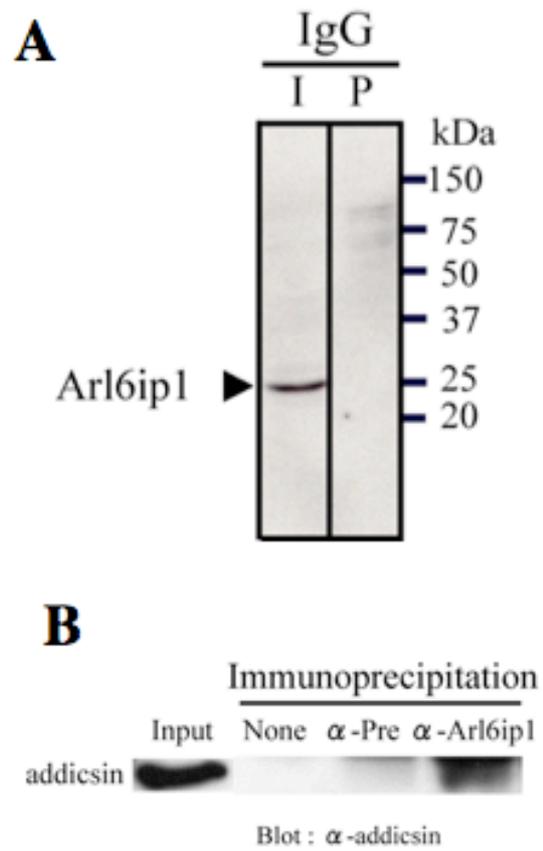


図 15 in vivo 免疫沈降実験

- A. マウス全脳ライセートを用いた抗 Arl6ip1 抗体の特異性の検討。
B. in vivo 免疫沈降実験。

3.3.3 addicsin-Arl6ip1 結合領域の同定

免疫沈降実験により、addicsin と Arl6ip1 が結合することが判明したので、次に両者の結合領域を同定するために addicsin の欠損変異体 d1-d4 を作製した (図 16A および C)。変異体の特徴としては、d1 変異体が C 末端欠損、d2 変異体が N 末端欠損、d3 変異体が C 末端側に位置する PKC リン酸化モチーフの欠損、そして d4 変異体が addicsin の持つ 2 つの疎水性ドメインの一部を欠損している。これらの変異体を用いた免疫沈降実験の結果、d4 変異体を用いた場合に限り addicsin と Arl6ip1 との結合を示すバンドが検出されなかった。このことから、両者の結合には addicsin のアミノ酸 103-117 の領域が必須であることが示唆された (図 16B)。addicsin 変異体と EAAC1 との免疫沈降実験では、明らかな結合領域の同定はできなかった (図 16C)。

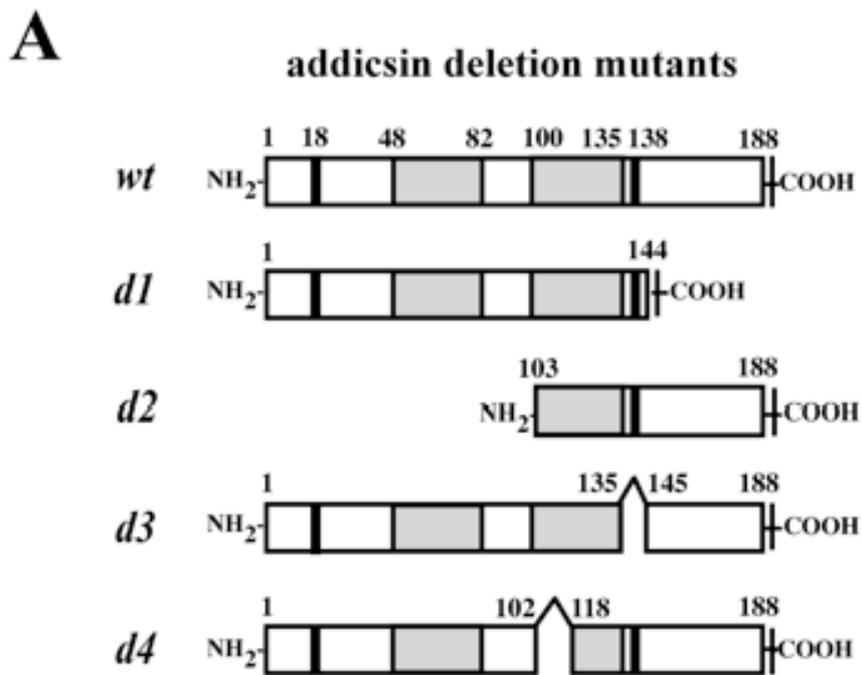


図 16 addicsin 変異体を用いた addicsin-Arl6ip1 結合の領域の決定

A. addicsin の各種変異体の模式図。

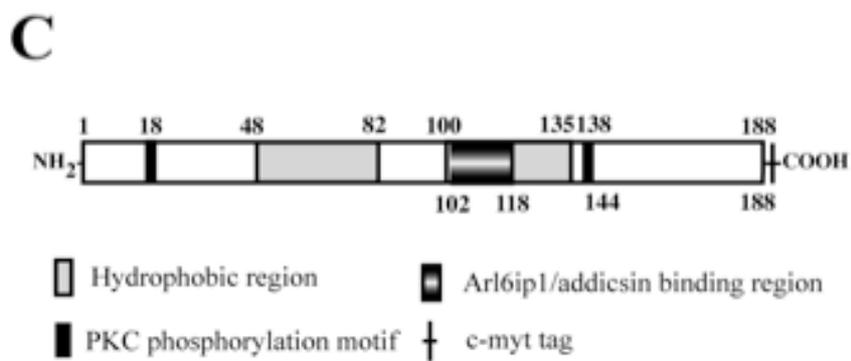
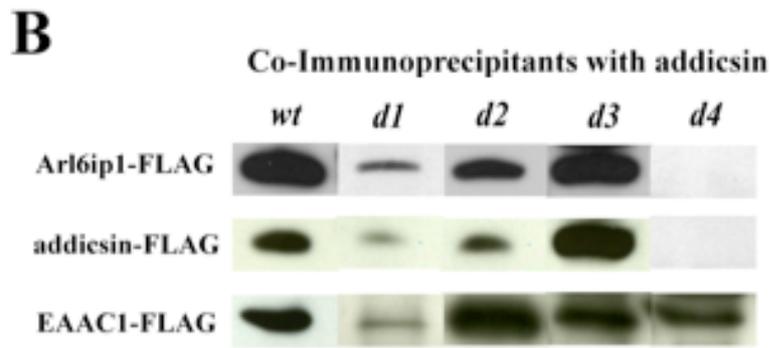


図 16 addicsin 変異体を用いた addicsin-Arl6ip1 結合の領域の決定

B. これらの変異体を用いた免疫沈降実験結果。Addicsin-Arl6ip1 複合体および Addicsin-Addicsin 複合体の形成には Addicsin のアミノ酸 103-117 の領域を必要とする。

C. addicsin 模式図。

3.3.4 Arl6ip1 mRNA はマウス各臓器にユビキタスに発現する

Arl6ip1 mRNA の各種組織における発現分布を明らかにするために、Arl6ip1 を特異的に検出するプライマーを設計し、マウス脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、腸、精巣、卵巣、尿管および皮膚から抽出した総 RNA を用いて RT-PCR 解析を行った。その結果、Arl6ip1 mRNA はどの組織にもユビキタスに発現していることが明らかになった (図 17A)。また、addicsin mRNA を検出するプライマーを用いて RT-PCR 解析を行った結果、いずれの組織にもユビキタスに発現しており、addicsin mRNA と Arl6ip1 mRNA の両者の局在は一致していた。次いで、大脳皮質、小脳、海馬、嗅球、中脳および橋を用いたマウス脳内各部位における RT-PCR 解析を行った結果、Arl6ip1 は、addicsin mRNA と同様に、脳内で一様に発現していた (図 17B)。

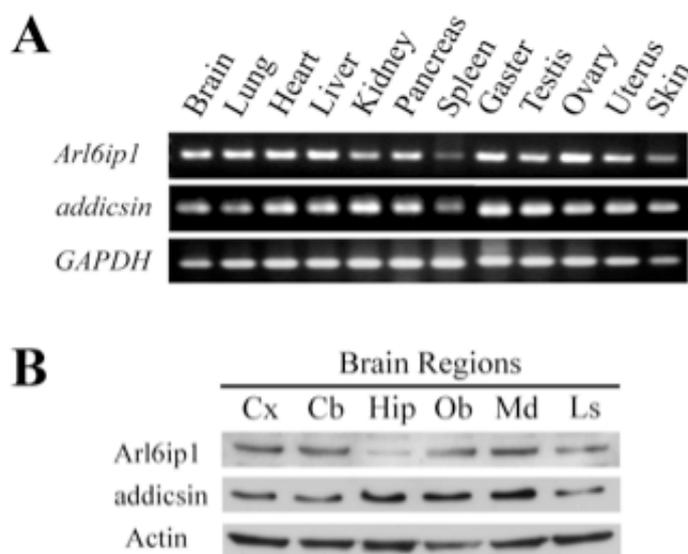


図 17 addicsin と Arl6ip1 の共局在

A. RT-PCRによるaddicsinおよびArl6ip1の発現解析。Arl6ip1はaddicsinと同様のユビキタスな局在を示す。B. ウェスタンブロット法によるaddicsinおよびArl6ip1の脳内発現解析。Arl6ip1はAddicsinと同様に脳内の全ての領域に発現が認められる。

3.3.5 Arl6ip1 タンパク質のマウス脳における発現

Arl6ip1 タンパク質を検出する抗体を用いて、マウス脳内における発現分布を免疫組織染色により検討した。その結果、Arl6ip1 タンパク質は大脳皮質、海馬、小脳の神経細胞に特異的に発現していることが明らかになり、これは addicisin タンパク質と同様の発現パターンであった (図 17C)。

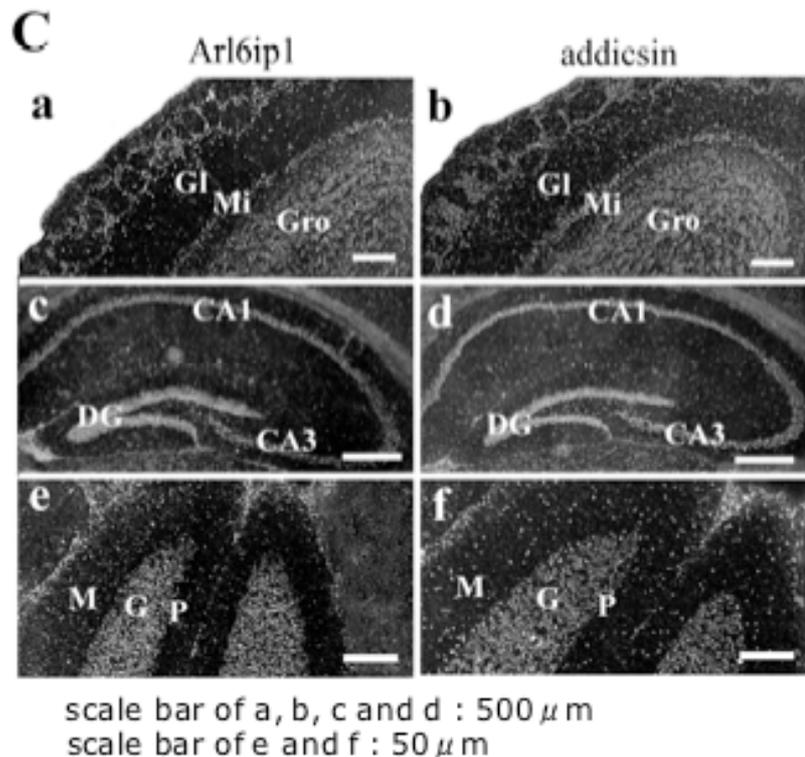


図 17 addicisin と Arl6ip1 の共局在

C. 免疫組織染色による。addicisinおよびArl6ip1の脳内発現解析。神経細胞特異的な発現が観察される。(a, b) 嗅球、(c, d) 海馬、(e, f) 小脳

Abbreviations: CA1, hippocampus CA1 field; CA3, hippocampus CA3 field; DG, dentate gyrus; G, granular cell layer of the cerebellum; Gl, glomerular layer of the olfactory bulb; Gro, granule layer of the olfactory bulb; M, molecular layer of the cerebellum; Mi, mitral cell layer of the olfactory bulb; P, Purkinje cell layer of the cerebellum.

3.3.6 C6BU-1 株を用いたコンディショナル過剰発現系の構築

C6BU-1 ラットグリオーマ細胞株は、5種類の細胞局在性グルタミン酸トランスポーターのうち EAAC1 のみを発現する。そこで、C6BU-1 細胞株を用いて GeneSwitch システムによるコンディショナル過剰発現細胞株 C6BU-1/pSW-addicisin を構築した。最初に、addicisin タンパク質の誘導と誘導時における細胞障害性を検討するために、様々な濃度の Mifepristone 存在下にて細胞の形態観察および LDH アッセイを行った。その結果、Mifepristone 10nM 存在下では、addicisin タンパク質が誘導されたうえに細胞障害性も認められなかったことから、10 nM が実験に用いる最適な Mifepristone 濃度であることが判明した (図 18A)。次に、C6BU-1/pSW-addicisin と同様に、C6BU-1 細胞を用いて GeneSwitch システムによるコンディショナル過剰発現細胞株 C6BU-1/pSW-Arl6ip1 を構築した。最初に、Arl6ip1 タンパク質の誘導と誘導時における細胞障害性を検討するために、様々な濃度の Mifepristone 存在下で形態観察および LDH アッセイを行った。その結果、Mifepristone 10 nM 存在下では、Arl6ip1 タンパク質が誘導されたうえに細胞障害性も認められなかったことから、10 nM が実験に用いる最適な Mifepristone 濃度であることが判明した (図 18B)。

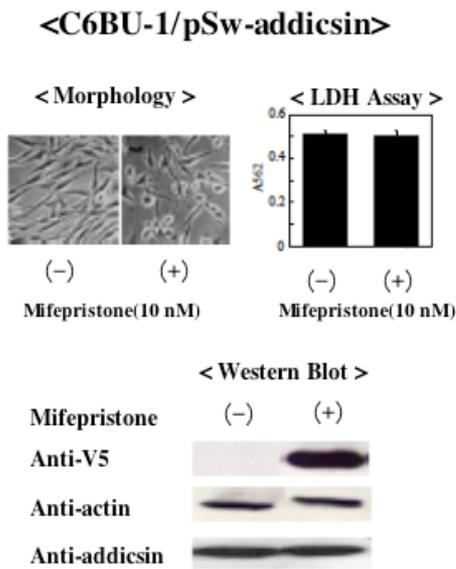
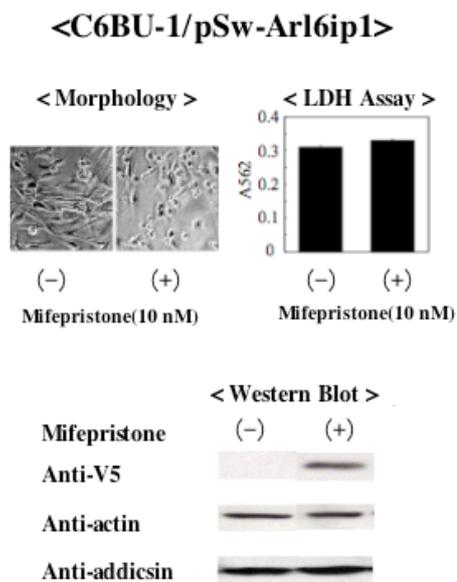
A**B**

図 18 C6BU-1/pSw-addicsin 細胞株および C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株の構築

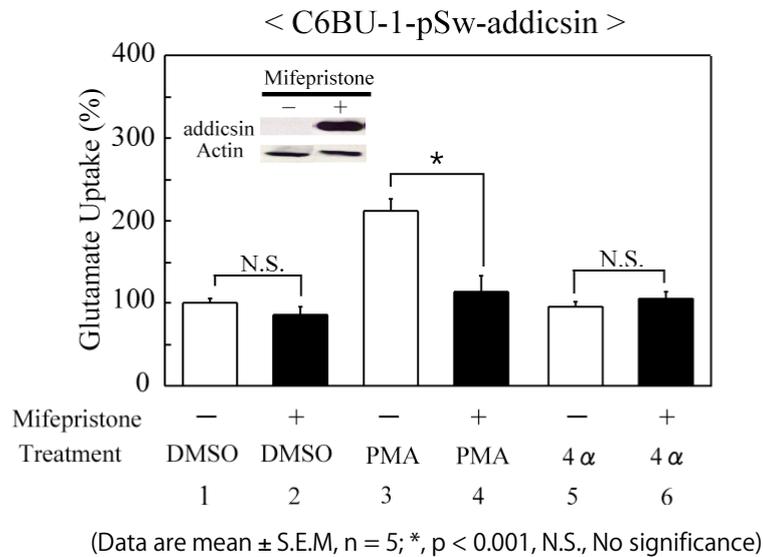
A. C6BU-1/pSw-addicsin 細胞株の構築およびその特性に関する検討。
 B. C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株の構築およびその特性に関する検討。
 形態観察および LDH アッセイの結果、この誘導系における細胞毒性は観察されなかった。

3.3.7 EAAC1 を介したグルタミン酸取り込みに addicisin または Arl6ip1 が及ぼす影響

3.3.6 で構築した C6BU-1 コンディショナル過剰発現系を用いて、addicisin または Arl6ip1 が EAAC1 のグルタミン酸取り込み能に及ぼす影響を検討した。その結果、addicisin タンパク質を過剰発現させた C6BU-1/pSw-addicisin 細胞株においては、EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込みが Mifepristone による addicisin の誘導依存的に抑制されていることが明らかとなった (図 19A)。続いて、C6BU-1/pSw-Arl6ip1 を用いて実験を行った。その結果、Arl6ip1 タンパク質を過剰発現させた C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株においては、EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込みが Mifepristone による誘導依存的に促進されていることが明らかとなった (図 19B)。本結果は、C6BU-1/pSw-addicisin 細胞株を用いた実験結果とは全く逆の結果であった。

さらに、C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株を用いて、グルタミン酸の取り込みに関するカイネティクス解析を行った。Eadie-Hofstee プロット法により反応速度ならびに親和性を計算した結果、C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株では、PMA 刺激依存的に親和性は増加したが (DMSO:Km = 824 μ M, PMA:Km = 647 μ M)、反応速度は一定値を示した ($V_{\max} = 1.5 \times 10^3$ pmol/mg/min) (図 19C)。さらに、Arl6ip1 を強制発現させた細胞株に addicisin の 2 種類の二本鎖 siRNA (siRNA #1 または siRNA #2) を導入し、グルタミン酸取り込み能に対する効果を観察した結果、C6BU-1/pSw-Arl6ip1 における EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込み量は、addicisin の二本鎖 siRNA を導入することで約 2 倍に増大することが明らかとなった (図 19D)。

A



B

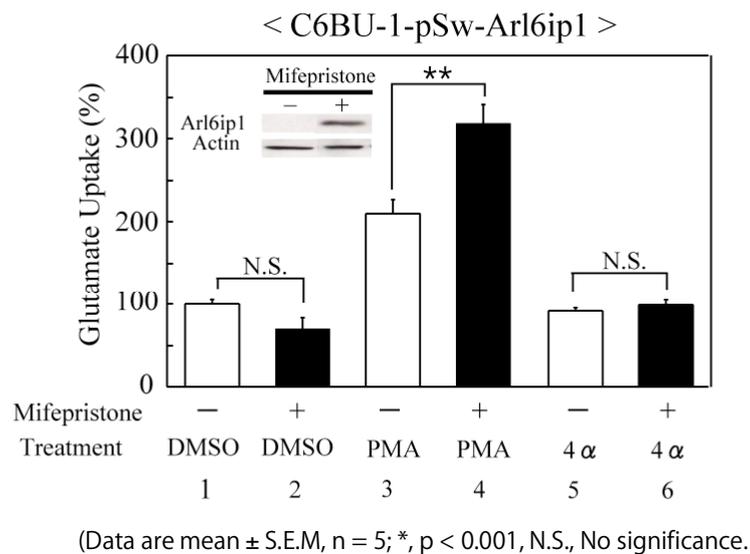
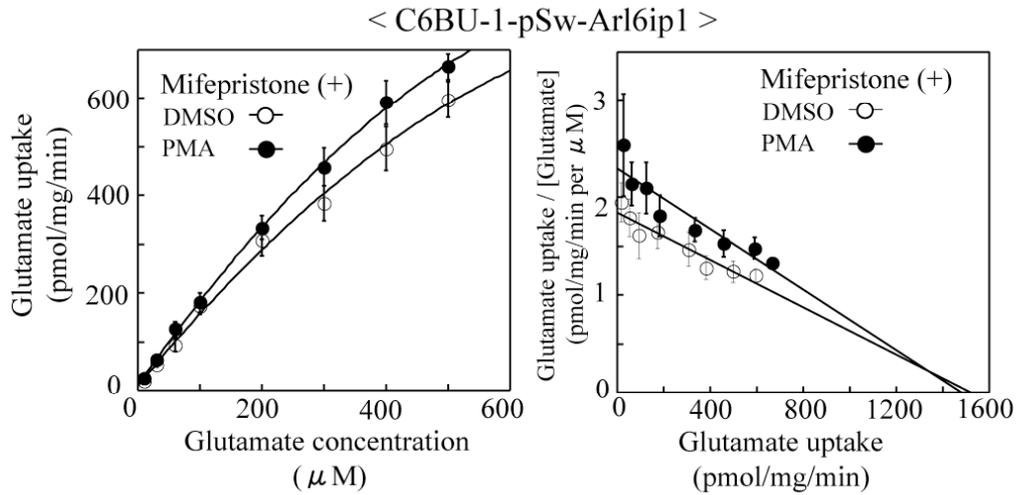


図 19A, B C6BU-1/pSw-addicsin または C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株を用いた EAAC1 のグルタミン酸取り込み能の検討

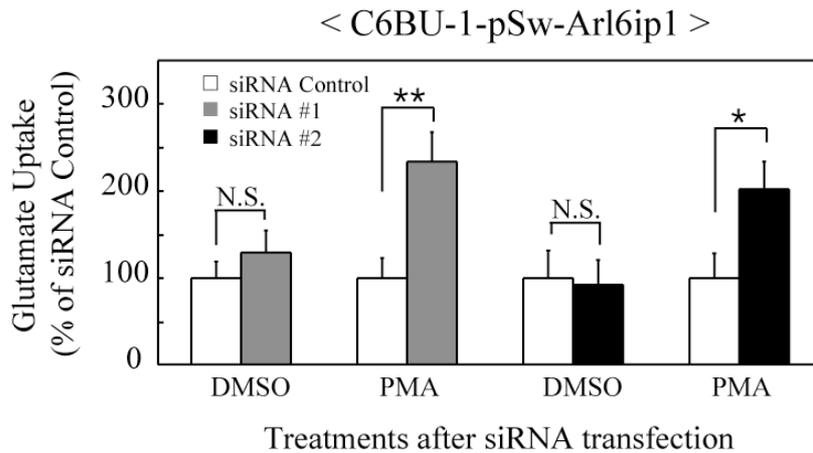
A. C6BU-1/pSw-addicsin 細胞株を用いたグルタミン酸取り込みアッセイ。Addicsin の過剰発現が、EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込みを抑制している。

B. C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株を用いたグルタミン酸取り込みアッセイ。Arl6ip1 の過剰発現が、EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込みを促進している。

C



D



(Data are mean \pm S.E.M, n = 12 for siRNA #1, n = 8 for siRNA #2; *, p < 0.05, **, p < 0.01, N.S., No significance)

図 19C, D C6BU-1/pSw-addicsin または C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株を用いた EAAC1 のグルタミン酸取り込み能の検討

C. C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株を用いた kinetics 解析。D. Addicsin 二本鎖 si RNA を用いた C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株におけるグルタミン酸の取り込み能の検討。Addicsin が存在しないことに加えて Arl6ip1 が過剰発現しているため、EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込みは約 2 倍にも増加している。

3.3.8 Arl6ip1 に対する PMA の影響の観察

C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株を用いて、PMA 処理が Arl6ip1 タンパク質の発現量とその局在に及ぼす影響を検討した。まず、PMA 処理により Arl6ip1 タンパク質の発現量が変化するかどうかを検討した結果、タンパク質の発現量には変化が無いことが明らかとなった (図 20A)。次に、免疫組織化学的手法を用いて、PMA 処理の有無によって Arl6ip1 タンパク質の細胞内局在変化を観察した結果、Arl6ip1 タンパク質の細胞内オルガネラ付近における局在が観察されたが、PMA 処理による局在の変化は見られなかった (図 20B)。さらに、細胞膜表面に存在するタンパク質のみをビオチン化する実験系により Arl6ip1 タンパク質の細胞膜における局在を検討したが、PMA 処理とは無関係に Arl6ip1 は細胞膜には存在しないことが明らかになった (図 20C)。

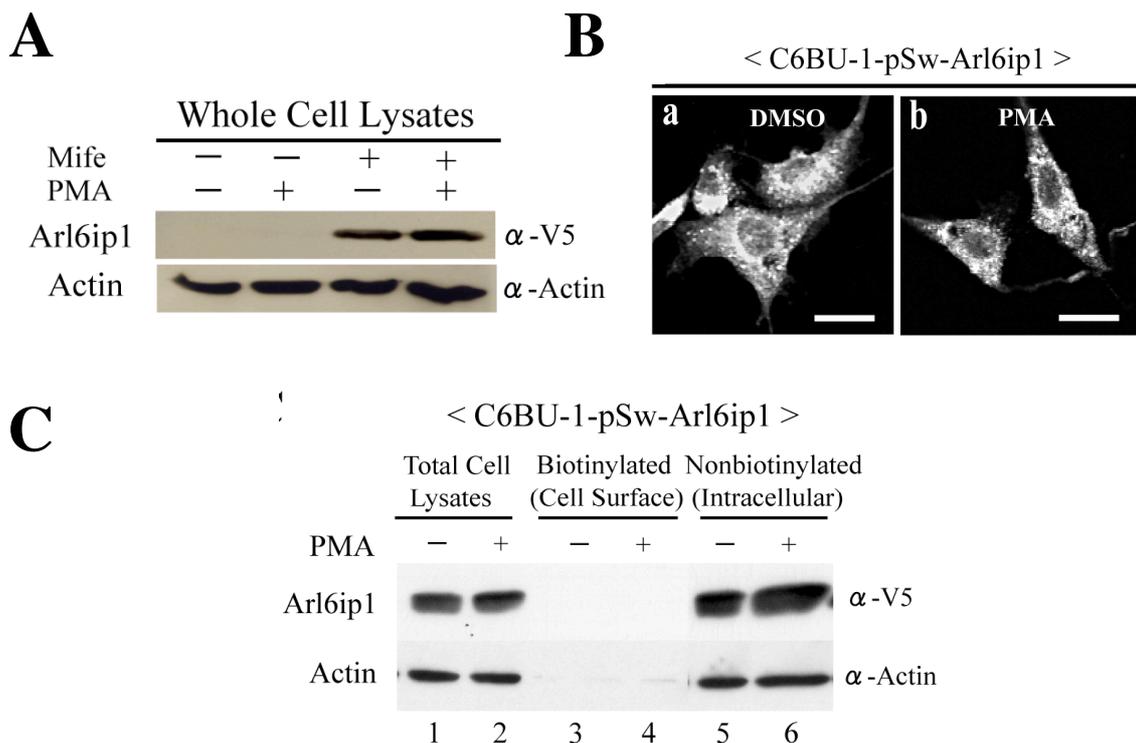


図 20 C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株における Arl6ip1 の細胞内局在の解析

A. ウェスタンブロット法を用いた Arl6ip1 発現量の解析。PMA 処理による発現量の増減は認められない。B. 免疫組織染色法を用いた Arl6ip1 局在解析。C. 細胞表面ビオチン化ラベル実験による Arl6ip1 の局在解析。PMA の影響による Arl6ip1 の細胞内局在変化は観察されない。

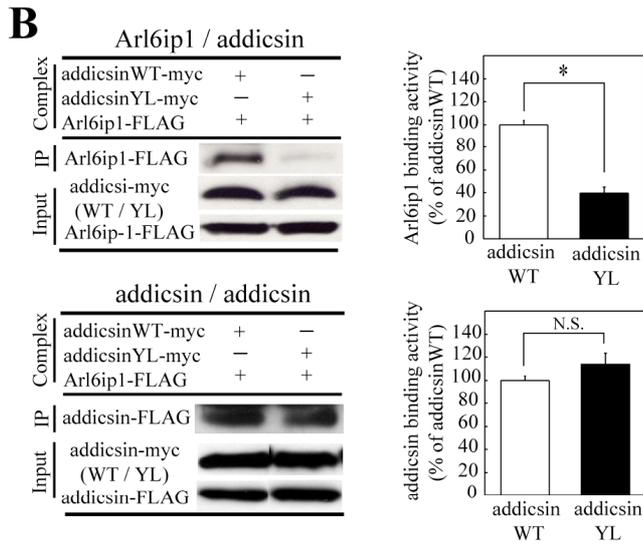
3.3.9 addicsin YL 変異体を用いた解析

Arl6ip1 タンパク質の過剰発現時に観察される PMA 刺激依存的な EAAC1 のグルタミン酸の取り込み能の増大は、3.3.8 の結果から、Arl6ip1 タンパク質が EAAC1 タンパク質に直接的に作用した結果ではなく、むしろ、addicsin タンパク質と作用した結果、addicsin タンパク質をオルガネラ上にトラップする可能性が示唆された。そこで、この可能性を検証する目的で、Arl6ip1 タンパク質と addicsin タンパク質の結合がグルタミン酸取り込み能に及ぼす影響を検討することにした。addicsin-Arl6ip1 タンパク質の免疫沈降実験の結果より、Arl6ip1 タンパク質は、addicsin タンパク質の 103-117 番目の領域に結合することが分かっていたため、この領域に注目し、その配列の特徴を調べた。その結果、110 番目のチロシン残基と 112 番目のロイシン残基が種間で高度に保存されていることが明らかになった (図 21A)。そこで、このチロシン残基とロイシン残基をそれぞれアラニン残基に置換した変異体 (addicsin YL 変異体) を作成し、免疫沈降実験を行ったところ、addicsin YL 変異体タンパク質は、Arl6ip1 タンパク質との結合能力が 40% 以下に低下していることが明らかになった (図 21B)。一方で、この addicsin YL 変異体タンパク質自身が addicsin と複合体を形成することは可能であった (図 21B)。そこで、GeneSwitch システムを用いたコンディショナル安定発現細胞株 (C6BU-1/pSw-addicsinYL) を作製し、addicsin YL 変異体タンパク質が EAAC1 を介したグルタミン酸取り込み能に及ぼす影響について検討した。まず、addicsin YL 変異体タンパク質の細胞膜における局在の有無を、ビオチンラベルの系を用いて検討したところ、野生型 addicsin タンパク質が細胞膜に局在しているのに対して、addicsin YL 変異体タンパク質は、細胞膜に局在していなかった。また PMA 処理による addicsin YL 変異体タンパク質の局在ならびに発現量の変化も見られなかったことから、addicsin YL 変異体タンパク質は EAAC1 への結合能力が欠損している可能性が示唆された (図 21C)。一方、興味深いことに、C6BU-1/pSw-addicsin YL 細胞株を用いたグルタミン酸取り込み実験の結果、addicsin YL 変異体タンパク質は、種々の条件下における Mifepristone による発現誘導の有無にかかわらず、EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込み量に影響を与えないことが明らかとなった (図 21D)。

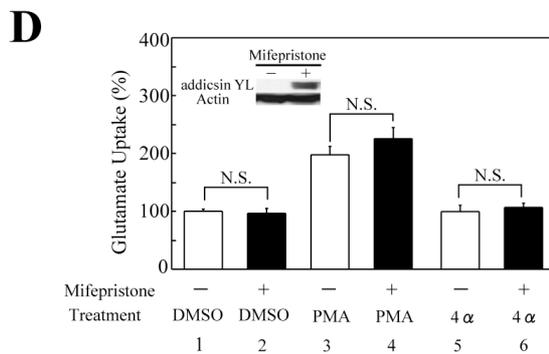
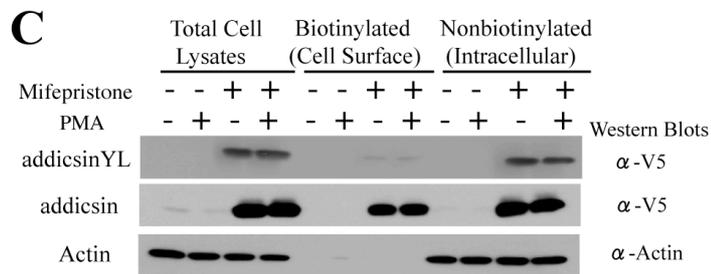
A

Human	102	VMVMLA-SYFLISMFGG	118
Mouse	102	VMVMLA-SYFLISMFGG	118
Rat	102	VMVMLA-SYFLISMFGG	118
Zebrafish	103	VFLVMVV-SYFLMSLFGG	119
Drosophila	131	ILAGALLGGYLLHLLSA	148

* *



(Data are mean ± S.E.M, n = 3; *, p < 0.001, N.S., No significance)



(Data are mean ± S.E.M, n = 5; N.S., No significance)

図 21 addicsin YL 変異体を用いた EAAC1 のグルタミン酸取り込み能の解析

A. addicsin YL 変異体のアミノ酸置換部位。110 番目のチロシン残基と 112 番目のロイシン残基が種間で高度に保存されていることが分かる。B. addicsin YL 変異体を用いた免疫沈降実験。Addicsin YL 変異体は Arl6ip1 と複合体を形成することができないが、Addicsin とは結合可能である。C. 細胞表面ビオチン化ラベル実験による addicsin YL 変異体の局在解析。Addicsin YL 変異体は細胞膜上に局在していない。D. addicsin YL 変異体を用いた EAAC1 グルタミン酸取り込み能の解析。Addicsin YL 変異体は PMA 刺激下でも EAAC1 のグルタミン酸取り込み能に影響を及ぼさない。

3.4 考察

我々は、addicsin タンパク質と相互作用するものとして Arl6ip1 タンパク質を同定した。マウス各組織および各領域における Arl6ip1 の発現は、いずれも addicsin の発現と一致していた (図 17)。また、Arl6ip1 タンパク質の細胞内局在パターンは、addicsin タンパク質のと同様にオルガネラに認められた (図 8 および 20)。さらに、Arl6ip1 タンパク質は、addicsin タンパク質の疎水性領域内のアミノ酸 103-117 残基を介して直接結合し、ヘテロダイマーを形成する (図 14-16)。従って、両タンパク質が形成する複合体は、生体内においてなんらかの重要な生理的作用を担う可能性が高いと思われた。

長期安定発現株である C6BU-1/pSw-addicsin 細胞株および C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株を用いて行ったグルタミン酸取り込み実験の結果、C6BU-1/pSw-addicsin 細胞株では EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込み量は減少し (図 19A)、一方、C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株では EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込み量は増加することが示された (図 19B)。この増加は、addicsin siRNA を導入することにより約 2 倍の値を示した (図 19D)。これらの結果より、Arl6ip1 タンパク質と addicsin タンパク質が EAAC1 に対して拮抗的に作用することが示唆された。事実、C6BU-1/pSw-Arl6ip1 細胞株を用いたグルタミン酸取り込み実験の Eadie-Hofstee プロット解析の結果も拮抗阻害のパターンを示し、Arl6ip1 タンパク質が、EAAC1 のグルタミン酸取り込みに関して、addicsin タンパク質とは逆の作用をもたらすという推測を強く支持していた。

PMA 刺激条件下では、EAAC1 は小胞体から細胞膜へと小胞輸送され、その結果グルタミン酸の細胞内への取り込みが促進される [45]。本実験においても、C6BU-1 細胞を用いた実験系においては、EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込み量が PMA 処理により約 2 倍に増加することを確認している。この条件下で Arl6ip1 が直接的に EAAC1 に相互作用しているとすれば、Arl6ip1 の細胞膜上における発現の増加が観察されるはずである。一方、Arl6ip1 が間接的に EAAC1 に相互作用しているとすれば、Arl6ip1 の局在変化は起きないと推測される。そこで、PMA 刺激時における Arl6ip1 タンパク質の細胞内局在パターンの変化の有無を、免疫組織染色法および細胞表面ビオチン化アッセイにより解析した。その結果、Arl6ip1 の細胞内局在は PMA 刺激によっては変化しないことを確認した (図 20)。

これまでの実験から、Arl6ip1 が EAAC1 に間接的に作用し、EAAC1 のグルタ

ミン酸取り込み能を促進するということが示唆されたので、addicsinとArl6ip1の結合がEAAC1のグルタミン酸取り込み能に及ぼす影響をさらに解析するために、addicsinとArl6ip1とのヘテロダイマーを形成しないようなaddicsin変異体の作成を試みた。両者の結合領域の配列中に存在する種間で高度に保存されたチロシン残基およびロイシン残基に着目し、これらをアラニン残基に置換したaddicsin YL変異体を作製した (図21A)。予想通り、このaddicsin YL変異体は、Arl6ip1とは結合できず、一方で野生型addicsinタンパク質、addicsin YL変異体とはホモダイマーを正常に形成することが可能であった (図21B)。よって、このC6BU-1/pSw-addicsin YL変異体株においては、細胞内におけるaddicsinタンパク質とArl6ip1タンパク質との相互作用が打ち消され、その分フリーとなったaddicsinタンパク質によって、addicsinホモダイマーの量が増加することが予想され、結果としてEAAC1を介したグルタミン酸取り込み量が減少することが推測された。しかし、理由は不明であるが、このC6BU-1/pSw-addicsin YL変異体株中にて形成されたaddicsin YLホモダイマーは、細胞膜上に局在せず、結果として、EAAC1を介したグルタミン酸の取り込み量の変化も認められなかった (図21C, D)。よって、これらの結果から、addicsinタンパク質のArl6ip1タンパク質またはEAAC1との結合が、細胞内グルタミン酸取り込み量の調節に必須であることが示唆された。

以上の結果より、次のようなモデルを構築した (図22)。すなわち、addicsinタンパク質は、細胞膜上のEAAC1と直接的に相互作用することでEAAC1のグルタミン酸取り込み能を阻害し、その結果、細胞内に取込まれるグルタミン酸の量は減少する。一方で、Arl6ip1タンパク質は、addicsinタンパク質との結合能はあるものの、オルガネラに存在し、またPMA刺激によっても細胞膜上へ移動しない。その結果、Arl6ip1タンパク質とヘテロダイマーを形成したaddicsinタンパク質は、オルガネラにトラップされる。従って、Arl6ip1タンパク質とヘテロダイマーを形成したaddicsinタンパク質は、細胞膜上のEAAC1と結合することができず、結果的にEAAC1ネガティブレギュレーターとしてのaddicsinタンパク質の機能を阻害し、EAAC1が取込むグルタミン酸の量を増加させる。

EAAC1を介したグルタミン酸の取り込みの変化はPMA刺激に依存的に起こったため、上記モデル系の細胞内のシグナルカスケードにはPKCシグナルが関与していることが考えられる。EAAC1、addicsinおよびArl6ip1はいずれもPKCリン酸化モチーフを持つことも、PKCシグナルの関与を支持するものである。ま

た、PKC α はEAAC1の膜局在を制御しているという報告がある[46]。このことから、addicsinおよびArl6ip1はこのPKC α を介した一連のカスケードに参与する可能性が推測される。

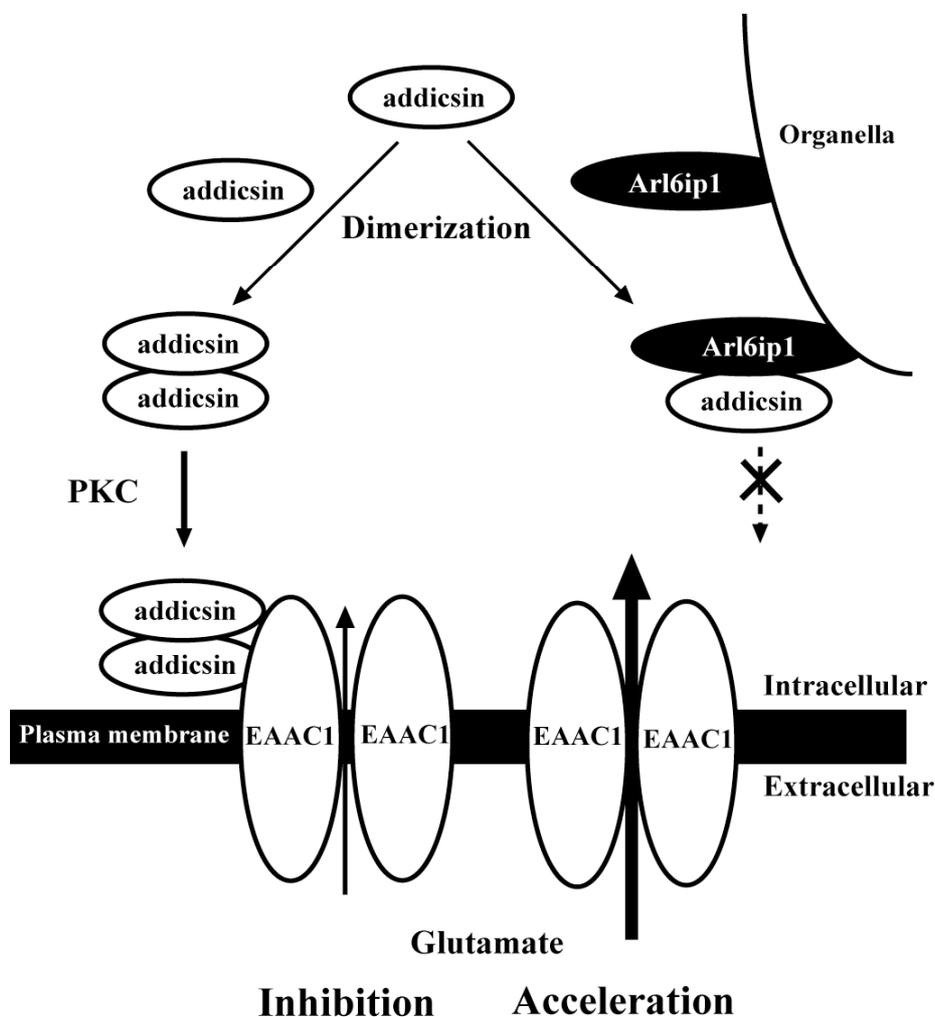


図 22 addicsin の細胞内機能モデル

addicsin のホモダイマーは EAAC1 に結合してその取り込み機能を抑える。一方で、Arl6ip1 と結合した addicsin は細胞内オルガネラ付近にトラップされ、EAAC1 と結合することができず、結果として取り込み機能は促進される。

シナプス間隙における細胞外のグルタミン酸の大半は、グリア細胞局在型のトランスポーターであるGLASTおよびGLT-1により細胞内に取り込まれていることが知られている。一方で、神経細胞局在型のグルタミン酸トランスポーターは、シナプス間隙における細胞外グルタミン酸の除去に寄与する割合は低く、主要な役割を果たしているとは言い難い。それでは、神経細胞局在型のグルタミン酸トランスポーターが存在する意義とは何なのだろうか。

最近になって、EAAC1がグルタミン酸の取込み以外にも複数の機能を持つという、神経型トランスポーターの新たな一面を明らかにするような報告が相次いでいる。Kiryuらは、EAAC1が、アポトーシス誘導因子であるX-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)の機能を促進するミトコンドリアタンパク質holocytochrome *c* synthetase (HCCS)と結合することにより、XIAPの機能を拮抗的に阻害することで、Caspase-3によるアポトーシス経路を阻害すると報告している[47]。また、Lilingらの報告によると、C6BU-1細胞では、モルヒネ慢性投与によりPTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome Ten)がユビキチンE3リガーゼであるNedd4を活性化し、このNedd4がEAAC1をユビキチン化してプロテアソーム分解系へ導くという[48]。EAAC1が複数の機能を持つというこれらの報告は、EAAC1と相互作用する addicsinも複数の生理機能作用を持つ可能性を示唆している。興味深いことに、Aoyamaらは、EAAC1がシステインを取り込むこと、ならびにこの取込みにaddicsinが関与することを明らかにしており、加えてaddicsinを細胞内に強制発現させると、細胞内に取込まれたシステインから合成されるグルタチオンの濃度が低下して細胞死に繋がることを報告している[49-52]。

一方addicsinに関しても、我々が示した以外にも複数の機能をもつことが明らかになってきた。Maierらは、addicsinがER-Golgi traffickingを制御するsmall GTPaseであるRabと相互作用し、細胞内traffickingを妨げると報告している[53]。Liuらは、Reticulon 2B (RTN2B)が、EAAC1およびaddicsinと複合体を形成すること、またEAAC1の小胞輸送を阻害することを報告している[54]。さらに、addicsinを導入した神経細胞では神経突起形成が阻害されることが報告されている[53]。

我々は、本研究において、モルヒネ反復投与によりEAAC1のネガティブレギュレーターであるaddicsinタンパク質の発現量が増加するという結果を得ている。最近、この結果と一致するような以下の知見が報告された。Lilingらは、モルヒネ反復投与によりEAAC1がタンパク質分解系に導かれ、その結果、細胞内に

取り込まれるグルタミン酸の量が減少することを明らかにしている[48]。また、Maoらは、モルヒネ反復投与によりラット脊髄中のEAAC1の発現量が減少することを報告している[55]。これらの結果は、*in vivo*において、モルヒネ反復投与によりEAAC1の発現量が減少し、且つ、addicsinタンパク質の発現量が増加するという可能性を示している。その結果として、モルヒネ長期作用時には、EAAC1を介したグルタミン酸の取り込み能が著しく低下することが推測される（図23）。EAAC1ノックアウトマウスにおいては、加齢依存的な神経変性疾患が誘導される[50]。また、EAAC1およびaddicsinタンパク質はシステインの取り込みに関与するが、これは生体内でグルタチオンを作る原料となる。アルツハイマー病やパーキンソン病患者の脳内ではこのグルタチオン濃度が減少している[52]。従って、これらの報告を合わせて考えると、addicsinタンパク質およびEAAC1が、神経変性疾患に通じる未知のカスケードに関連する可能性が考えられる。神経変性疾患は、神経可塑性の異常により発症すると現在では考えられていることから、addicsinタンパク質およびEAAC1は神経可塑性発現に深く関与する因子であると思われる。一方で本研究では、モルヒネ長期作用に関わる因子としてaddicsinを同定したが、モルヒネ長期作用もまた神経可塑性により引き起こされる[56]。このことから、addicsinが持つ二つの側面、すなわち、1) モルヒネ長期作用時に発現量が増加すること、また、2) 神経型グルタミン酸トランスポーターEAAC1を調節すること、はいずれも神経可塑性の新たな分子生理基盤を反映したものであると考えることができる（図24）。

今後、addicsinトランスジェニックマウス、またノックアウトマウスなどを作製して*in vivo*の解析を行うことで、この神経障害カスケードを解明することができると思われる。

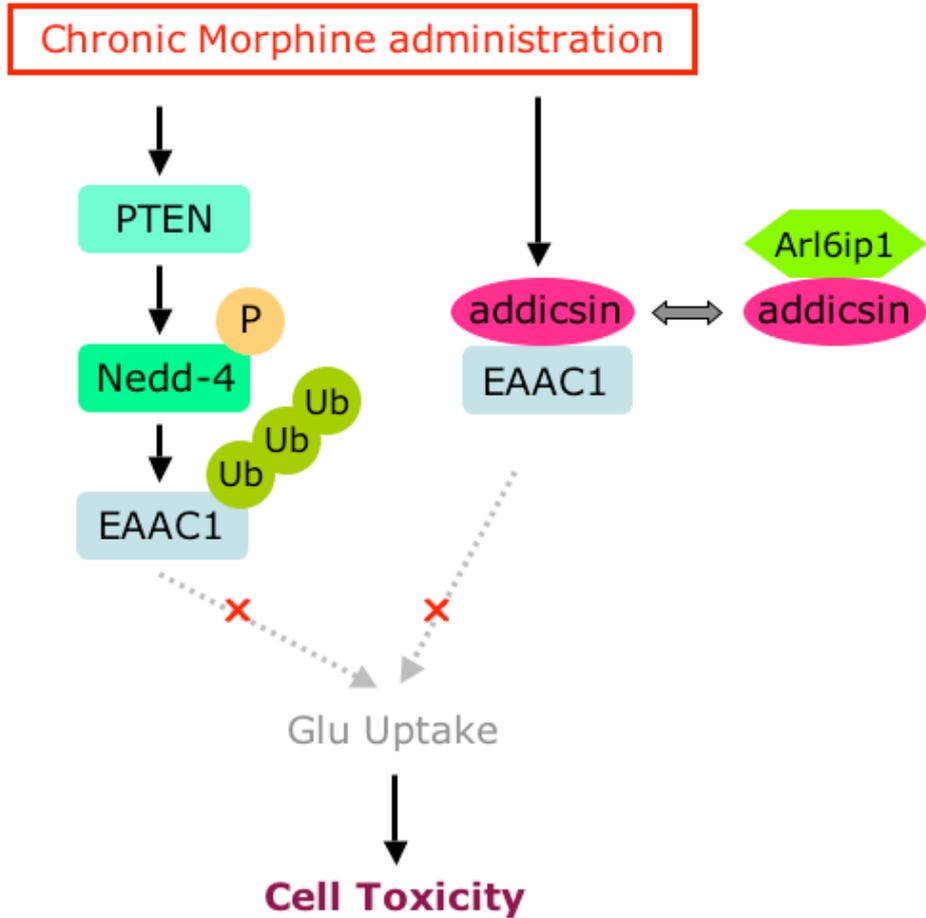


図 23 モルヒネ長期作用時における addicisin と EAAC1 との関連

モルヒネ反復投与によりグルタミン酸の系以外でも EAAC1 の機能が阻害されることが報告されている。

addicisin作用→細胞外Glu濃度上昇→細胞ダメージ→神経回路組み替え？

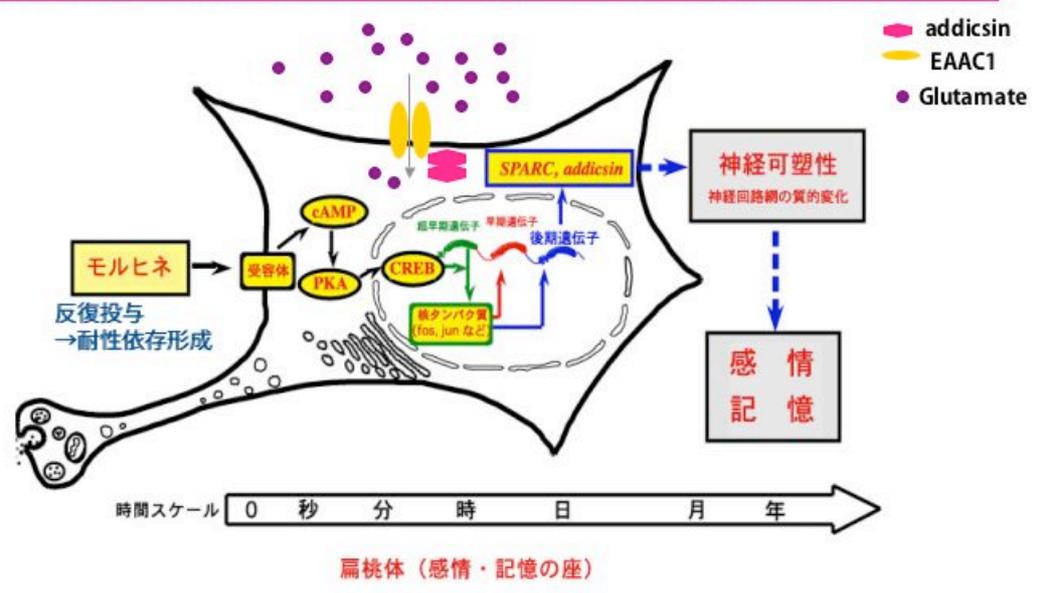


図 24 モルヒネ長期作用時に addicisin が神経可塑性に関連する可能性

モルヒネ反復投与によりモルヒネ耐性依存が形成された状態では、addicisin の発現が増加し、その結果 EAAC1 の働きは阻害され、細胞外には高濃度のグルタミン酸が存在する状態になる。高濃度のグルタミン酸は細胞傷害性を持つため、細胞にダメージが生じ、その結果既存の神経回路の使用が不可能となり、新たな神経回路が生じる、つまり神経回路の組換えがおこり、神経可塑性が引き起こされる可能性が考えられる。同様にモルヒネ反復投与により発現量が上昇する SPARC は、細胞外に分泌されるとその抗接着性により細胞同士の接触を妨げることが分かっており、この作用も既存の神経回路の使用を不可能にするとおもわれる。

4. 結論

本研究では、モルヒネ耐性・依存および逆耐性に関連する因子として新規同定した addicisin が、神経細胞局在型グルタミン酸トランスポーターEAAC1 のネガティブレギュレーターであること、また、Arl6ip1 と拮抗的に相互作用することで EAAC1 のグルタミン酸取込み能の調節を行う、という新たな機構を発見した。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導者いただきました産業技術総合研究所の池本光志先生に厚く御礼申し上げます。また、実験方法の指導やディスカッションをしていただきました産業技術総合研究所の落石知世研究員にも感謝致します。実験材料を提供していただき、多くの助言をいただきました大阪市立大学の木山博資先生と桐生-瀬尾寿美子先生にもお礼申し上げます。

論文博士取得の機会を与えて下さり、長年にわたり暖かく見守って下さった奈良先端科学技術大学院大学の竹家達夫先生に感謝致します。

最後に、研究および家庭において、常にサポートしてくれた家族に心より感謝致します。

2008年12月 秋月 さおり

6. 参考文献

1. Snyder, H.S., *Nou to Yakubutsu*. 1st ed. Scientific American Library Vol. 5. 1990, New York Tokyo Kagaku Dojin.
2. Clark, W.A. and B.A. Mc, *Spectrophotometric determination of morphine and of codeine*. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim), 1954. **43**(1): p. 39-42.
3. Pert, C.B., G. Pasternak, and S.H. Snyder, *Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain*. Science, 1973. **182**(119): p. 1359-61.
4. Guillemin, R., N. Ling, and R. Burgus, *[Endorphins, hypothalamic and neurohypophysial peptides with morphinomimetic activity: isolation and molecular structure of alpha-endorphin]*. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D, 1976. **282**(8): p. 783-5.
5. Inoki, R., et al., *Opioido*. Kagaku Zokan, ed. O.P.K.-K. Chintsu-Yaku. Vol. 120. 1991, Kyoto, Japan: Kagaku Dojin.
6. Sharma, S.K., W.A. Klee, and M. Nirenberg, *Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(8): p. 3092-6.
7. Montminy, M.R. and L.M. Bilezikjian, *Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene*. Nature, 1987. **328**(6126): p. 175-8.
8. Valverde, O., et al., *Modulation of anxiety-like behavior and morphine dependence in CREB-deficient mice*. Neuropsychopharmacology, 2004. **29**(6): p. 1122-33.
9. Sakutaro Tadokoro, H.K.a.K.O., *Koudouyakurigakunojissen: Seiwashoten*.
10. Ikemoto, M., et al., *Decrease in CRE binding activity by chronic morphine administration in mouse brain*. Neuroreport, 1995. **6**(2): p. 262-4.
11. Wang, X.B., et al., *In situ DNA-protein binding: a novel method for detecting DNA-binding activity of transcription factor in brain*. Neurosci Lett, 1992. **146**(1): p. 25-8.
12. Dash, P.K., B. Hochner, and E.R. Kandel, *Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation*. Nature, 1990. **345**(6277): p. 718-21.
13. Abel, T. and E. Kandel, *Positive and negative regulatory mechanisms that mediate*

- long-term memory storage*. Brain Res Brain Res Rev, 1998. **26**(2-3): p. 360-78.
14. Martin, K.C., et al., *Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage*. Cell, 1997. **91**(7): p. 927-38.
 15. Kida, S., *Analysis of a role and function of CREB in memory consolidation and reconsolidation by inducible of CREB activity in forebrain*. saibou kougaku, 2002. **21**(9): p. 1011-1016.
 16. Ikemoto, M., et al., *Increased sensitivity to the stimulant effects of morphine conferred by anti-adhesive glycoprotein SPARC in amygdala*. Nat Med, 2000. **6**(8): p. 910-5.
 17. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.
 18. Kaneto, H., et al., *A scoring system for abstinence syndrome in morphine dependent mice and application to evaluate morphine type dependence liability of drugs*. Jpn J Pharmacol, 1973. **23**(5): p. 701-7.
 19. Blumberg, H.P., et al., *Amygdala and hippocampal volumes in adolescents and adults with bipolar disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2003. **60**(12): p. 1201-8.
 20. Schultz, R.T., *Developmental deficits in social perception in autism: the role of the amygdala and fusiform face area*. Int J Dev Neurosci, 2005. **23**(2-3): p. 125-41.
 21. Osugi, T., et al., *Modulation by chronic morphine administration of single-stranded cAMP response element (ssCRE) binding proteins in the mouse cerebellum*. Brain Res Mol Brain Res, 1994. **21**(3-4): p. 256-62.
 22. Isiura, S., *Wakaru nou to shinkei*. 1999: Yodosha.
 23. Zerangue, N. and M.P. Kavanaugh, *Flux coupling in a neuronal glutamate transporter*. Nature, 1996. **383**(6601): p. 634-7.
 24. Danbolt, N.C., *Glutamate uptake*. Prog Neurobiol, 2001. **65**(1): p. 1-105.
 25. Rothstein, J.D., et al., *Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate*. Neuron, 1996. **16**(3): p. 675-86.
 26. Rothstein, J.D., et al., *Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6591-5.
 27. Tong, G. and C.E. Jahr, *Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation*. Neuron, 1994. **13**(5): p. 1195-203.

28. Kanai, Y., et al., *Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system*. Neuroreport, 1995. **6**(17): p. 2357-62.
29. Rothstein, J.D., et al., *Localization of neuronal and glial glutamate transporters*. Neuron, 1994. **13**(3): p. 713-25.
30. Furuta, A., et al., *Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4*. Neuroscience, 1997. **81**(4): p. 1031-42.
31. Arriza, J.L., et al., *Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 4155-60.
32. Pow, D.V. and N.L. Barnett, *Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina*. Neurosci Lett, 2000. **280**(1): p. 21-4.
33. Fujiyama, F., T. Furuta, and T. Kaneko, *Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex*. J Comp Neurol, 2001. **435**(3): p. 379-87.
34. Herzog, E., et al., *The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(22): p. RC181.
35. Schafer, M.K., et al., *Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50734-48.
36. Ozawa, T., et al., *Changes in the expression of glial glutamate transporters in the rat brain accompanied with morphine dependence and naloxone-precipitated withdrawal*. Brain Res, 2001. **905**(1-2): p. 254-8.
37. Fujio, M., et al., *Facilitative effect of a glutamate transporter inhibitor (2S,3S)-3-{3-[4-(trifluoromethyl)benzoylamino]benzyloxy}aspartate on the expression of methamphetamine-induced behavioral sensitization in rats*. J Pharmacol Sci, 2005. **99**(4): p. 415-8.
38. Sekiya, Y., et al., *Facilitation of morphine withdrawal symptoms and morphine-induced conditioned place preference by a glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate in rats*. Eur J Pharmacol, 2004. **485**(1-3): p. 201-10.

39. Ozawa, T., et al., *Effect of gene transfer of GLT-1, a glutamate transporter, into the locus coeruleus by recombinant adenoviruses on morphine physical dependence in rats*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(1): p. 221-6.
40. Lin, C.I., et al., *Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 84-8.
41. Ingley, E., et al., *A novel ADP-ribosylation like factor (ARL-6), interacts with the protein-conducting channel SEC61beta subunit*. FEBS Lett, 1999. **459**(1): p. 69-74.
42. Tomoda, K., et al., *The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 2302-10.
43. Hofstee, B.H., *Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics*. Nature, 1959. **184**: p. 1296-8.
44. Eadie, G.S., *The Inhibition of Cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine*. J Biol Chem, 1942. **146**(1): p. 85-93.
45. Davis, K.E., et al., *Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma*. J Neurosci, 1998. **18**(7): p. 2475-85.
46. Gonzalez, M.I., M.G. Kazanietz, and M.B. Robinson, *Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(4): p. 901-10.
47. Kiryu-Seo, S., et al., *Unique anti-apoptotic activity of EAAC1 in injured motor neurons*. EMBO J, 2006. **25**(14): p. 3411-21.
48. Yang, L., et al., *Morphine induces ubiquitin-proteasome activity and glutamate transporter degradation*. J Biol Chem, 2008. **283**(31): p. 21703-13.
49. Aoyama, K., et al., *Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction*. Eur J Neurosci, 2008. **27**(1): p. 20-30.
50. Aoyama, K., et al., *Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse*. Nat Neurosci, 2006. **9**(1): p. 119-26.
51. Watabe, M., K. Aoyama, and T. Nakaki, *Regulation of glutathione synthesis via interaction between glutamate transport-associated protein 3-18 (GTRAP3-18)*

- and excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) at plasma membrane. Mol Pharmacol, 2007. 72(5): p. 1103-10.*
52. Watabe, M., K. Aoyama, and T. Nakaki, *A dominant role of GTRAP3-18 in neuronal glutathione synthesis. J Neurosci, 2008. 28(38): p. 9404-13.*
 53. Maier, S., et al., *GTRAP3-18 serves as a negative regulator of Rab1 in protein transport and neuronal differentiation. J Cell Mol Med, 2008.*
 54. Ruggiero, A.M., et al., *The endoplasmic reticulum exit of glutamate transporter is regulated by the inducible mammalian Yip6b/GTRAP3-18 protein. J Biol Chem, 2008. 283(10): p. 6175-83.*
 55. Mao, J., et al., *Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. J Neurosci, 2002. 22(18): p. 8312-23.*
 56. Nestler, E.J., *Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. Nat Rev Neurosci, 2001. 2(2): p. 119-28.*