

シスチントランスポーターの個体における発現と生理的病態的機能

( 課題番号 13470031 )

平成 13 年度～平成 15 年度科学研究費補助金 ( 基盤研究(B)(2) ) 研究成果報告書

平成 16 年 3 月

研究代表者 坂 内 四 郎

( 筑波大学 基礎医学系 教授 )

## 研究組織

研究代表者 坂内 四郎 (筑波大学 基礎医学系 教授)  
研究分担者 佐藤 英世 (筑波大学 基礎医学系 講師)  
(山形大学 農学部 助教授、平成 15 年  
10 月より)

## 交付決定額 (配分額)

	(直接経費)	(間接経費)	(合計)
平成 13 年度	6,200 千円	0 千円	6,200 千円
平成 14 年度	4,000 千円	0 千円	4,000 千円
平成 15 年度	3,700 千円	0 千円	3,700 千円
総計	13,900 千円	0 千円	13,900 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Hashimoto, T., Sasaki, H., Wang, H., Ishii, T., Mann, G., & Bannai, S. (2001) Effect of oxygen on induction of the cystine transporter by bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 276: 10407-10412
2. Sato, H., Tamba, M., Okuno, S., Sato, K., Keino-Masu, K., Masu, M., & Bannai, S. (2002) Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system  $x_c^-$ , in the mouse brain. *J. Neurosci.* 22: 8028-33
3. Sasaki, H., Sato, H., K-Matsumura, K., Maebara, K., Wang, H., Tamba, M., Ito, K., Yamamoto, M., & Bannai, S. (2002) Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J. Biol. Chem.*, 277: 44765-44771
4. Ruiz, E., Siow, R.C.M., Bartlett, S.R., Jenner, A.M., Sato, H., Bannai, S., & Mann, G.E. (2003) Vitamin C inhibits diethylmaleate-induced L-cystine transport in human vascular smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 103-110
5. Okuno, S., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Tamba, M., Wang, H., Sohda, S., Hamada, H., Yoshikawa, H., Kondo, T., & Bannai, S. (2003) Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 88: 951-956
6. Wang, H., Tamba, M., Kimata, M., Sakamoto, K., Bannai, S., & Sato, H. (2003) Expression of the activity of cystine/glutamate exchange transporter, system  $x_c^-$ , by xCT and rBAT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 611-618

## (2) 口頭発表

1. Bannai, S. & Sato, H. (2002) Cystine/glutamate exchange transporter: occurrence and redox regulation of its expression. *Oxygen Club of California 2002 World Congress "Oxidants and Antioxidants in Biology"*, Santa Barbara, California, USA
2. 坂内四郎、佐藤英世 (2002) 酸化ストレスとトランスポーターの発現制御 第75回日本薬理学会 シンポジウム「トランスポーターの機能調節と薬物標的」 熊本

## 研究成果

### 概要

シスチントランスポーター $x_c^-$ 系は、細胞内グルタミン酸との交換輸送により、細胞外のシスチンを細胞内へ輸送する。また、その活性は酸化ストレスで誘導される。最近、我々はこの $x_c^-$ 系の担体タンパクの cDNA クローニングに成功し、xCT と 4F2hc という二つの異なるタンパク質から成るヘテロダイマーとして輸送活性を示す系であることを明らかにした。本研究では、輸送担体そのものと考えられる xCT の遺伝子について、組織での発現、転写レベルでの発現調節を明らかにし、さらに、xCT 遺伝子をノックアウトしたマウスを作製し、その表現型を解析することにより $x_c^-$ 系の個体における生理機能と病態との関連を解明することを目指した。得られた結果は以下のとおりである。

1. シスチントランスポーター $x_c^-$ 系の主成分である xCT タンパク質をコードする xCT 遺伝子の脳における発現を *in situ* hybridization 法により調べた。その結果、xCT は髄膜に強く発現し、また、最後野など、一部の脳室周囲器官にも顕著な発現がみられ、脳脊髄液におけるシスチン・システイン比、すなわち、レドックス・バランスを調節している可能性が考えられた。
2. シスプラチン耐性を示すヒト卵巣癌細胞を用い、 $x_c^-$ 系が細胞のグルタチオンを増やすことによりシスプラチン耐性に寄与していることを明らかにした。
3. xCT 遺伝子の 5' 上流部のプロモーター解析を行い、シスチントランスポーターの親電子薬による活性誘導のメカニズムを解析した。親電子薬による誘導には ARE といわれるエレメントと転写因子 Nrf2 が関与していることを明らかにした。
4. xCT の遺伝子 5' 上流部のプロモーター解析を行い、シスチントランスポーターのシスチン欠乏による活性誘導には 2 個存在するアミノ酸応答エレメントとして知られている配列と転写因子 ATF4 が関与していることが示された。
5. xCT 遺伝子をノックアウトしたマウスの作製に成功した。このマウスは、現時点で 3 ヶ月まで見かけ上正常に成育しており、繁殖も可能であることがわ

かった。表現型の解析は今後の課題である。

上記の成果のうち、アミノ酸応答エレメントに関するものは、論文として投稿準備中である。また、xCT 遺伝子ノックアウトマウスの作製は、先ず、第一エクソンの一部を欠くものを作製した。しかし、結果として転写が起こり、二つ目のメチオニンからの翻訳が行われ、x<sub>c</sub>系の活性が残ってしまった。なぜ転写が起こったのか、原因は不明であるが、このマウスから、挿入されていたネオマイシン耐性遺伝子部分を除去することにより、x<sub>c</sub>系を完全に欠如したマウスを作製することができた。このような曲折を経たため、ノックアウトマウスの詳細な解析は本研究期間中には間に合わなかった。