

# EAAT3 日内変動による一過性脳虚血再灌流後の海馬 $Zn^{2+}$ 集積制御

新武享朗<sup>1, 2)</sup> ● 東 洋一郎<sup>1)</sup> ● 清水孝洋<sup>1)</sup> ● 清水翔吾<sup>1)</sup> ● 齊藤源顕<sup>1)</sup> ●

●高知大学医学部 薬理学講座<sup>1)</sup>, 日本学術振興会特別研究員 (DC1)<sup>2)</sup>

## 要約

睡眠時に発症する脳卒中は覚醒時に比べ、致死率が高く予後が重篤である。脳内  $Zn^{2+}$  の一部は海馬グルタミン酸神経細胞のシナプス小胞内に貯蔵されている。この貯蔵  $Zn^{2+}$  は脳虚血時に細胞外へ過剰放出され、シナプス後細胞に集積し神経細胞死を誘導する。一方、脳内の神経細胞に広く分布する興奮性アミノ酸トランスポーター (excitatory amino acid transporters: EAATs) の一つである EAAT3 は細胞内に L-システインを取り込み、抗酸化作用を有するグルタチオン (GSH) 生合成を促進し、神経保護的に作用することが知られている。また、中脳において EAAT3 は日内変動することが報告されている。しかしながら、脳卒中発症時刻による神経傷害の重篤度の変化に脳虚血後の  $Zn^{2+}$  集積変化ならびに EAAT3 発現の日内変化が関与するか否かは明らかになっていない。本稿では、睡眠期と比較して覚醒期でマウス海馬における EAAT3 発現および GSH レベルの増加が認められ、これらの増加が脳虚血モデルマウス海馬における  $Zn^{2+}$  集積細胞数の増加の抑制に関与することが見出されたので報告する。

**KEY WORDS** 脳虚血, 脳内  $Zn^{2+}$ , 興奮性アミノ酸トランスポーター (EAAT3), グルタチオン (GSH)

## はじめに

脳卒中は早朝に発症することが多く、日内変動が認められる<sup>1-3)</sup>。一方、睡眠時における発症は覚醒時に比して、致死率が高く、予後が重篤であることが報告されている<sup>3)</sup>。近年、夜行性であるマウスを用いた検討においても、マウスの覚醒期である夜間の一過性脳虚血処置は神経細胞死および脳浮腫、神経学的欠損スコアが減少することが報告されている<sup>4)</sup>。しかしながら、脳虚血傷害に対する感受性の日内変動の機序は不明な点が多く残されている。

哺乳類の脳内において、 $Zn^{2+}$  の一部は海馬グルタミン酸神経細胞のシナプス小胞内に貯蔵されており、その他の大部分は亜鉛結合分子に結合したり遊離型の  $Zn^{2+}$  として存在したりしている。通常、脳内  $Zn^{2+}$  はこのようにして恒常性が維持され学

習・記憶など脳機能において重要な役割を担っているが、脳虚血後の海馬においては神経細胞内へ過剰な  $Zn^{2+}$  集積が惹起され脳内  $Zn^{2+}$  の恒常性が破綻することが多くの研究により明らかとなっている。また、 $Zn^{2+}$  キレーターにより脳虚血後の神経細胞内  $Zn^{2+}$  集積を阻止することで神経細胞死が阻止されることが報告されており、神経細胞内への  $Zn^{2+}$  集積は脳虚血後の海馬の神経細胞死誘導に関与していることが指摘されている<sup>5-7)</sup>。

ナトリウム依存性興奮性アミノ酸トランスポーター (excitatory amino acid transporter: EAAT) の一つである EAAT3 は脳内の神経細胞に広く分布している。EAAT3 はグルタミン酸トランスポーターとして同定され<sup>8)</sup>、シナプス間隙のグルタミン酸クリアランスに関与していると考えられていたが、現在ではこのグルタミン酸クリアランスはアストロサイトに分布する EAAT1 と EAAT2 が主に担っていると報告されている<sup>9,10)</sup>。一方、EAAT3 は L-

システインとの親和性が高く、細胞内にL-システインを取り込むことで、グルタチオン (GSH) 生合成に大きく関与している<sup>11)</sup>。EAAT3欠損マウスを用いた検討では、一過性脳虚血処置後の海馬において野生型マウスに比してGSHレベルの低下ならびに細胞内Zn<sup>2+</sup>集積の促進と神経細胞死の増悪化が惹起され、これらは膜透過性L-システイン前駆体により阻止されることが報告されている<sup>12,13)</sup>。GSHは抗酸化作用がよく知られているが、GSHのチオール基はZn<sup>2+</sup>と結合し、細胞内Zn<sup>2+</sup>の恒常性維持の役割も担っている<sup>14)</sup>。このことからEAAT3は細胞内GSH生合成を介して脳虚血後の海馬の神経保護に関与していることが示唆されている。また、中脳においてEAAT3の発現が日内変動し夜間において最も増加することが報告されている<sup>15)</sup>。本稿では、脳虚血の処置時刻によってZn<sup>2+</sup>集積レベルが変化するか否か、ならびにその変化にEAAT3が関与するか否かについて検討した知見を紹介する。

## 1 脳虚血処置時刻による Zn<sup>2+</sup> 集積細胞数の変化

著者らは脳虚血処置時刻によってZn<sup>2+</sup>集積細胞数が変化するかを明らかにするため、高知大学動物実験施設における明期開始4時間後 (09:00 am) と暗期開始4時間後 (11:00 pm) において雄性C57BL/6マウスの両側総頸動脈を40分間閉塞することで一過性脳虚血を誘導し、再灌流3日後の海馬における細胞内Zn<sup>2+</sup>集積についてN-(6-Methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide (TSQ) を用いて検討した。その結果、明期・暗期のいずれの時間帯においても一過性脳虚血処置3日後の海馬のCA3領域ならびにhilus領域において細胞内Zn<sup>2+</sup>集積が惹起されていたが、hilus領域のZn<sup>2+</sup>集積細胞数は明期と比して暗期開始4時間後の一過性脳虚血処置群で有意に低値であった。また、再灌流3日後の海馬における神経細胞死をFluoro-Jade B染色により検討したところ、hilus領域の一過性脳虚血による神経細胞死は明期と比して暗期開始4時間後の一過性脳虚血処置

群で有意に減少していた。一方、CA3領域におけるZn<sup>2+</sup>集積細胞数並びに神経細胞死は処置時刻による有意な差異は認められなかった。さらに、抗NeuN抗体を用いた免疫組織化学染色法により再灌流3日後の生存神経細胞数を検討したところ、やはり再灌流3日後のhilus領域においてのみ明期開始4時間後処置群に比して暗期開始4時間後処置群は生存細胞数が有意に多かった。一過性脳虚血再灌流後に惹起される神経細胞内Zn<sup>2+</sup>集積はアポトーシスやネクローシスなど神経細胞死の引き金になることが知られている。すなわち、以上の知見は脳虚血処置時刻による海馬hilus領域の神経細胞死の変化に細胞内Zn<sup>2+</sup>集積が関与していることを示唆している (図1)。

## 2 Zn<sup>2+</sup> 集積細胞数の変化における EAAT3 の関与

EAATはグルタミン酸トランスポーターとして同定され、5つのサブタイプが存在する。また、EAATの機能変化は脳虚血再灌流後の海馬神経細胞死の増悪化に関与していることが報告されている。そこで、一過性脳虚血による細胞内Zn<sup>2+</sup>集積と神経細胞死の処置時刻による変化にEAATが関与するか否かを検討するため、暗期開始4時間後のマウス脳室内へ非選択的EAAT阻害薬またはvehicleを投与し、その直後に一過性脳虚血処置を施した。その結果、非選択的EAAT阻害薬投与群はvehicle投与群と比べて再灌流3日後の海馬のhilus領域における細胞内Zn<sup>2+</sup>集積ならびに神経細胞死が有意に増悪化していた。さらに、EAATのサブタイプについて検討するため、選択的EAAT3阻害薬または特異的EAAT2阻害薬、vehicleを暗期開始4時間後に脳室内前投与したマウスに一過性脳虚血処置を施したところ、選択的EAAT3阻害薬を前投与したマウスは海馬のhilus領域における細胞内Zn<sup>2+</sup>集積がvehicle投与群と比して有意に増加していた。一方、特異的EAAT2阻害薬投与群はvehicle投与群とほぼ同程度であった。EAATファミリーのサブタイプの内、EAAT3は中枢神経系の神経細胞に広く分布し、

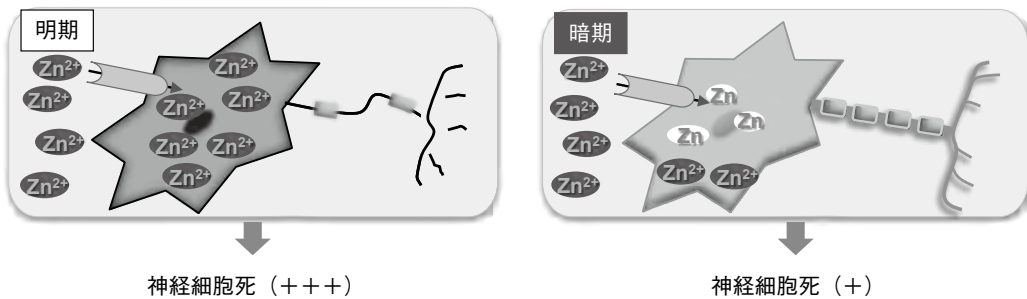


図 1 海馬神経細胞における  $Zn^{2+}$  集積および細胞死の日内変化

EAAT1およびEAAT2はグリア細胞, EAAT4とEAAT5はそれぞれ小脳プルキンエ細胞と網膜に分布している。すなわち, 今回の研究成果は暗期の一過性脳虚血処置による細胞内 $Zn^{2+}$ 集積並びに神経細胞死の軽減にEAAT3が関与していることを示唆している。

### 3 海馬 EAAT3 発現の日内変化

マウス中脳におけるEAAT3は夜間にタンパク質レベルの発現が増加する日内変動を示すことが報告されている<sup>15)</sup>。海馬においてもEAAT3発現に日内変動が存在するか否かをウエスタンブロット法により検討したところ, 明期開始4時間後と比較して暗期開始4時間後の海馬EAAT3の発現レベルが有意に増加していた。近年, EAAT3はグルタミン酸トランスポーターとしての機能よりもGSH生合成の律速基質であるL-システインの細胞内取り込みに大きく関与していることが明らかになってきた。また, EAAT3欠損マウスは野生型マウスと比較してGSHレベルが低下しており, 一過性脳虚血後の細胞内 $Zn^{2+}$ 集積並びに神経細胞死の増悪化が惹起され, 膜透過性L-システイン前駆体の前投与により増悪化が阻止されるこ

とが報告されている<sup>15)</sup>。そこで, 暗期開始4時間後のEAAT3発現増加に伴って神経細胞内のGSHレベルが増加するか否かを抗GSH-N-ethylmaleimide抗体を用いた免疫組織化学染色法により検討したところ, 明期開始4時間後と比して暗期開始4時間後の海馬においてGSHレベルが増加していた。すなわち, 暗期の海馬におけるGSHレベルの増加にEAAT3発現の日内変動が関与していることが示唆された。L-システインならびにGSHはその構造内にチオール基を持ち, これを介して非酵素的に $Zn^{2+}$ と結合することで細胞内の $Zn^{2+}$ レベルを低下させる作用を有している。すなわち, 上述の研究成果は暗期の一過性脳虚血処置による細胞内 $Zn^{2+}$ 集積ならびに神経細胞死の軽減にEAAT3の発現増加を介したGSH生合成の促進が関与していることを示唆している。

### おわりに

本稿において, マウスの覚醒期である暗期では睡眠期である明期と比して一過性脳虚血後の海馬神経細胞内 $Zn^{2+}$ 集積および神経細胞死が減少することが明らかになり, さらに海馬における

EAAT3発現ならびに細胞内GSHレベルが暗期で増加していることも見出した。L-システインならびにGSHはその構造内にチオール基を持ち、これを介して非酵素的にZn<sup>2+</sup>と結合することで細胞内のZn<sup>2+</sup>レベルを低下させる作用を有している。つまり、これらの知見は暗期の一過性脳虚

血処置による細胞内Zn<sup>2+</sup>集積ならびに神経細胞死の軽減にEAAT3の発現増加を介したGSH合成の促進が関与していることを示唆している(図2)。また、今回の研究成果は、脳卒中発症時刻による神経傷害の重篤レベルの変化に対する機序解明の一助となることが期待される。

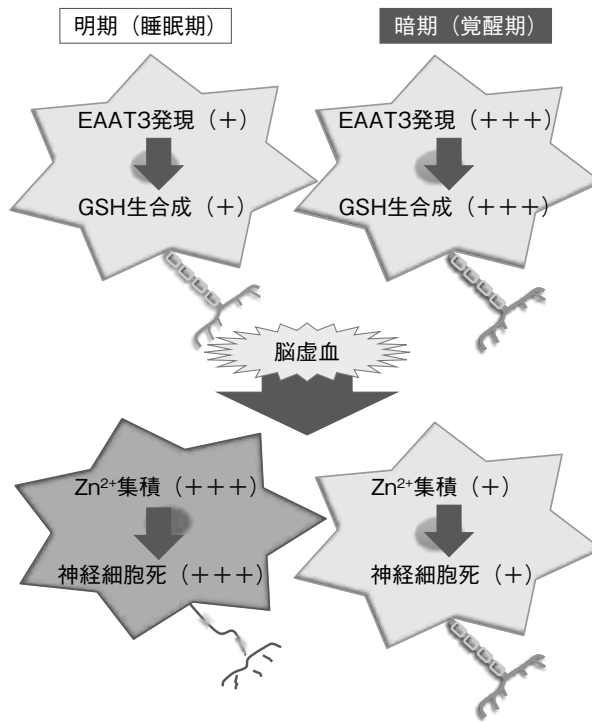


図2 海馬の脳虚血再灌流傷害の日内変化におけるZn<sup>2+</sup>集積ならびにEAAT3発現の関与

## 文 献

- 1) Argentino C, et al. Circadian variation in the frequency of ischemic stroke. *Stroke* 21:387-389, 1990
- 2) Elliott WJ. Circadian variation in the timing of stroke onset: A meta-analysis. *Stroke* 29 : 992-996, 1998
- 3) Jiménez-Conde J, et al. Does sleep protect against ischemic stroke? Less frequent ischemic strokes but more severe ones. *J Neurol* 254: 782-788, 2007
- 4) Beker M, et al. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Mol Neurobiol* 55: 2565-2576, 2018
- 5) Lee JY, et al. Zinc released from metallothionein-III may contribute to hippocampal CA1 and thalamic neuronal death following acute brain injury. *Exp Neurol* 184: 337-347, 2003
- 6) Tsuchiya D, et al. Mild hypothermia reduces zinc translocation, neuronal cell death, and mortality after transient global ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 22 : 1231-1238, 2002
- 7) Koh JY, et al. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 272: 1013-1016, 1996
- 8) Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360 : 467-471, 1992
- 9) Faden AI, et al. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244 : 798-800, 1989
- 10) Watase K, et al. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 10 : 976-988, 1998
- 11) Zerangue N, Kavanaugh M. Interaction of L-cysteine with a human excitatory amino acid transporter. *J Physiol* 493: 419-423, 1996
- 12) Choi B, et al. Decreased cysteine uptake by EAAC1 gene deletion exacerbates neuronal oxidative stress and neuronal death after traumatic brain injury. *Amino Acids* 48: 1619-1629, 2016
- 13) Won S, et al. EAAC1 Gene Deletion Alters Zinc Homeostasis and Exacerbates Neuronal Injury after Transient Cerebral Ischemia. *J Neurosci* 30: 15409-15418, 2010
- 14) Chen C, Liao S. Zinc toxicity on neonatal cortical neurons: involvement of glutathione chelation. *J Neurochem* 85: 443-453, 2003
- 15) Kinoshita C, et al. Rhythmic oscillations of the microRNA mir -96-5p play a neuroprotective role by indirectly regulating glutathione levels. *Nat Commun* 5: 3823, 2014

## The regulation of ischemia-induced hippocampal Zn<sup>2+</sup> accumulation via EAAT3 diurnal fluctuation

Takaaki Aratake<sup>1, 2)</sup>, Youichirou Higashi<sup>1)</sup>, Takahiro Shimizu<sup>1)</sup>,  
Shogo Shimizu<sup>1)</sup>, Motoaki Saito<sup>1)</sup>

Department of Pharmacology, Kochi Medical School, Kochi University<sup>1)</sup>  
Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science<sup>2)</sup>

Ischemic stroke during sleep shows a higher mortality rate and a worse prognosis than that during wakefulness. A fraction of brain Zn<sup>2+</sup> is stored in synaptic vesicles of glutamatergic neurons in hippocampus. Under ischemic conditions, this stored Zn<sup>2+</sup> is massively released to extracellular space and this released Zn<sup>2+</sup> accumulates in postsynaptic neurons, resulting in neuron death. Excitatory amino acid transporter (EAAT) 3 is a member of the EAAT family and widely expressed in neurons in the central nervous system. EAAT3 transports extracellular L-cysteine into intracellular space and intracellular L-cysteine increases the synthesis of glutathione, which has an antioxidant property, for protecting neurons. In the mouse mesencephalon, EAAT3 exhibits a diurnal variation. However, it is unclear whether changes in ischemic Zn<sup>2+</sup> accumulation and temporal changes in EAAT3 expression are involved in time-of-day variations in susceptibility to ischemic neuronal injury. In this article, we present EAAT3 expression and GSH level are increased in the mouse hippocampus during wakefulness than that during sleep, and then these increases are involved in the suppression of ischemia-induced Zn<sup>2+</sup> accumulation cells.

*Keyword:* brain ischemia, brain Zn<sup>2+</sup>, excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3), glutathione (GSH)

### *Address for correspondence*

Department of Pharmacology, Kochi Medical School, Kochi University,  
Kohasu, Okoh-cho, Nankoku 783-8505, Japan  
E-mail address: B18d6b01@s.kochi-u.ac.jp



### ■ 新武享朗 略歴

- 2016年 ● 高知大学 卒業 (理学)
- 2018年 ● 高知大学大学院総合人間自然科学研究科 修士課程修了 (医学)  
博士課程 進学
- 2019年 ● 日本学術振興会 特別研究員 (DC1)