

9839 生体時計ホルモン・メラトニンの分泌制御因子としての
NaCl依存性興奮性アミノ酸輸送系に関する研究

助成研究者：森山 芳則 (岡山大学 薬理学部 生理化学)
共同研究者：山田 浩司 (岡山大学 薬理学部 生理化学)
林 美都子 (岡山大学 薬理学部 生理化学)
八代 聖基 (岡山大学 薬理学部 生理化学)

約24時間の周期を持つ生物リズムはサーカディアンリズム(概日リズム)とも呼ばれ、動物はもとより植物や単細胞生物に至るまで広く見られる現象である。哺乳類の場合、松果体より分泌されるメラトニンが時間情報を伝達するホルモンとして機能している。従って、概日リズムを分子レベルで理解するためには、松果体におけるメラトニンの合成・分泌機構を明らかにすることが必要である。メラトニンの合成・分泌は、時計中枢(視交叉上核)からの交感神経入力のON/OFFにより、セロトニンNアセチル基転移酵素(SNAT)の量が増減することにより制御されていると考えられていた。すなわちメラトニン合成の正の制御機構のみがわかっていた。一方、我々は、松果体細胞がグルタミン酸作動性の内分泌細胞であることを見だしその性質を調べた。その結果、松果体にはグルタミン酸を伝達物質とするシグナル伝達系が存在していること、この伝達系がメラトニンの合成を負に制御していることを明らかにした。この新しい負の制御系の発見は時計情報を正確に制御するために重要であると考えられる。この内在性グルタミン酸作動性系の概要につき述べる。

さらに、我々は、松果体のグルタミン酸信号を終止させる機能を持つ、NaClで活性化されるグルタミン酸輸送体を同定した。この輸送系は松果体細胞の原形質膜に存在しており、神経のグルタミン酸再吸収系(GLT-1)の新しいホモログである。この輸送系の性質についても述べたい。

9839 生体時計ホルモン・メラトニンの分泌制御因子としての NaCl依存性興奮性アミノ酸輸送系に関する研究

助成研究者：森山 芳則 (岡山大学 薬理学部 生理化学)
共同研究者：山田 浩司 (岡山大学 薬理学部 生理化学)
林 美都子 (岡山大学 薬理学部 生理化学)
八代 聖基 (岡山大学 薬理学部 生理化学)

はじめに

約24時間の周期を持つ生物リズムはサーカディアンリズム(概日リズム)とも呼ばれ、動物はもとより植物や単細胞生物に至るまで広く見られる現象である。哺乳類の場合、概日リズムの中核は「視交叉上核」と呼ばれる神経細胞集団にあり、この活動シグナルが交感神経を通じて松果体に伝えられる。松果体はこのシグナルをメラトニンという液性情報に変えて血中に放出する内分泌器官である。放出されたメラトニンは受容体を介して時間情報を細胞に伝達する。従って、松果体は時間情報の変換器とも考えられ、メラトニンの合成・分泌機構を明らかにすることは概日リズムを理解するために極めて重要な課題である。

メラトニンの合成は以下のカスケードにより起こると考えられている。すなわち、夜間に神経末端より放出されたノルアドレナリンが松果体細胞上の β 受容体に結合し、Gsタンパク質を介して細胞内のcAMP濃度を上昇させる。その結果、Aキナーゼが活性化され、転写因子CREBを活性化する。そして、NAT mRNAが増加し、酵素活性が上昇する。明け方には交感神経からのノルアドレナリン入力なくなり、NAT活性もなくなる。しかしながら、ノルアドレナリン入力とNAT mRNAの変動リズムは必ずしも一致しておらず、ノルアドレナリン入力のON/OFFだけで、メラトニンの合成リズムを説明するのはむづかしい。

私は4年程前に、ふとしたきっかけで神経のシナプス小胞にしか存在しないと考えられる小胞型のグルタミン酸トランスポーターが松果体に存在していることをみいだした。この発見がきっかけとなり、(1)松果体細胞がグルタミン酸作動性の内分泌細胞であること、(2)松果体細胞はグルタミン酸をメラトニン合成の負の制御因子として用いていることがわかってきた。本文で、この新しい内分泌制御機構について簡単に述べ報告書に代える。

1. マイクロベシクルとグルタミン酸の開口放出

内分泌細胞には少なくとも2種類の分泌小胞が含まれている。ホルモンを含んだ分泌顆粒とマイクロベシクルと呼ばれる電子密度の低い小胞である。マイクロベシクルの機能は未知であったが、シナプス小胞と形態的に似ていることから内分泌細胞におけるカウ

ターパートであらういわれていた。松果体細胞はマイクロベシクルを豊富に含む一方で分泌顆粒はまれにしか観察されず、マイクロベシクル研究のための優れた素材である。我々は松果体のマイクロベシクルの精製法を確立し、構成タンパク質について調べた。マイクロベシクルはシナプシンを欠いているが、シナプトフィジンや SV2B 等のシナプス小胞のマーカータンパク質の他、シナプトタグミンのような開口放出に必要なタンパク質を含んでいた。さらに、液胞型 ATPase はマイクロベシクルの主要な構成タンパク質であり、ATP を添加すると膜内外にプロトンの電気化学的ポテンシャル差を形成した。そして、このエネルギーを利用して興奮性アミノ酸であるグルタミン酸が小胞内へ取り込まれた。このグルタミン酸の輸送は小胞型グルタミン酸輸送体によるものであった。松果体細胞は小胞型グルタミン酸輸送体が発現している神経以外では初めての例である。

さて、マイクロベシクルに含まれるグルタミン酸は果たして実際に細胞外へ分泌されるのであろうか？ 答えは YES であった。筆者らはラット松果体細胞の初代培養系を用いて、グルタミン酸が開口放出されることを見いだした。この分泌は Ca^{2+} 存在下に細胞を脱分極刺激することにより起こる。さらに、ボツリヌス E 型毒素で細胞を処理すると SNAP25 が切断されるとともにグルタミン酸の分泌が阻害された。シナプス小胞の開口放出と同様に、L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} の流入によりマイクロベシクルと原形質膜とが融合し、内部のグルタミン酸が流出すると考えられる。

2. グルタミン酸によるメラトニンの負の合成制御

松果体細胞同士はシナプスを作らないが、プロセスを介してお互いに接触している。マイクロベシクルは触手（プロセス）部分に多く存在しており、この部分からグルタミン酸が分泌されているものと考えられる。松果体細胞はグルタミン酸をパラクリン型の情報伝達分子として用いているのだろう。松果体にとって、このグルタミン酸の出力はどのような意味があるのだろうか？ 開口放出という大がかりな装置が使われている以上、松果体細胞の主要な生理機能と関係があるにちがいない。

松果体細胞の主要な機能といえばメラトニンの合成・分泌である。筆者らは早速グルタミン酸のメラトニンの合成・分泌に及ぼす効果を調べてみた。予想通り、グルタミン酸は交感神経刺激（すなわち、ノルアドレナリン刺激）により亢進したメラトニンの合成を強く抑制した（松果体を 0,5 mM のグルタミン酸で処理すると完全にメラトニンの合成能が消失する）。マイクロベシクル中のグルタミン酸濃度は数十 mM に達しており、放出後も阻害に必要なグルタミン酸濃度は十分に確保できる。

グルタミン酸によるメラトニンの合成阻害は、受容体を介した反応であると考えられる。私はこのシグナル伝達系に代謝型受容体が関与していることを見いだした。松果体細胞にはクラス II の代謝型受容体が発現している。このタイプの受容体は G_i タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼと負に共役しており、細胞内 cAMP 濃度を低下させる。実際、グルタミン酸が受容体に結合すると、松果体細胞の cAMP 濃度が低下し、その結果、

NAT 活性が60%程度低下した。この活性低下によってグルタミン酸によるメラトニン合成阻害の一部が説明できた。これは代謝型グルタミン酸受容体が内分泌機能を制御していることを示した初めての例である。

3. 興奮性アミノ酸出力の消去系

神経から放出された興奮性アミノ酸は、その信号を終結させ細胞毒性を軽減するためにすばやく細胞内に再吸収される。松果体細胞にも同様の再吸収系が存在している。筆者らは、 Na^+ により駆動される強力な興奮性アミノ酸の輸送系を見いだした。この輸送系は松果体細胞の原形質膜に存在し、培地中のグルタミン酸やアスパラギン酸を能動的に取り込んだ。この輸送系はジヒドロカイニン酸で阻害された。その推定アミノ酸配列や免疫化学的性質から、GLT-1タイプと類似した新しいイソフォームであると結論した。現在、この輸送体の性質を分子レベルで調べている(投稿準備中)。この輸送系は松果体内においてグルタミン酸の termination system として機能している。従って、この輸送系によりグルタミン酸によるメラトニン合成抑制系が調節されているものと考えられる。

4. メラトニン合成・分泌の自律性調節

以上の結果から、松果体の新しい姿が浮かび上がってきた。すなわち、松果体細胞はグルタミン酸信号を発し、終了させ、かつ信号を受け取り、自身の内分泌機能を制御している内分泌細胞である。Fig. 1にこれまでの結果をまとめた。ホルモン分泌制御の観点から眺めると、松果体は脳による正の制御を受けるとともに、自身で自身の機能を負に制御していることになる。しかも、内分泌細胞であるにもかかわらず古典的神経伝達物質を情報伝達因子として用いている。このような型のホルモン分泌制御はこれまでに知られていない。筆者らはこの制御を自身が自身の機能を制御するという意味から「自律性内分泌制御：autonomous endocrine regulation」と命名した。

筆者らは現在、「自律性制御」に関与する個々の因子を明らかにしつつ、この制御系が概日リズムとどのように連動しているのかを明らかにする方向で研究を展開している。我々が見いだしたこの負の制御システムが真に生理的に重要であるならば、概日リズムを示す交感神経による正の制御システムと照応して変動しているはずだからである。また、松果体細胞は哺乳類の細胞としては例外的に高濃度のDアスパラギン酸を細胞質中に含んでいる。このDアスパラギン酸もこの自律的内分泌制御機構と関係している可能性が高い。哺乳類におけるDアスパラギン酸の生理機能と作用機構はこれまで全くわかっていなかったが、松果体のメラトニン分泌の調節機構という観点から、突破口が開かれる可能性が高い。

我々の研究はマイクロベシクルの構造と機能を考察する事から出発している。マイクロベシクルは他の内分泌細胞にも含まれており、それぞれ細胞に特有の伝達物質を濃縮している。従って、「自律性内分泌制御」は松果体に特有のものではなく、むしろ、多くの内分泌器官に共通するホルモン分泌の普遍的な制御システムである可能性がある。今後、

この方面での研究も展開したいと考えている。

本文中で述べた我々の研究論文を以下に記す。ソルトサイエンス振興財団の援助により1998、1999年度の研究発表が可能となりました。記して感謝致します。

文献

- 1) Moriyama, Y., and Yamamoto, A. (1995) *FEBS Lett.* 367, 233-236.
- 2) Moriyama, Y., and Yamamoto, A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 22314-22320.
- 3) Moriyama Y., et al., (1995) *NeuroReport* 6, 1757-1760.
- 4) Moriyama, Y. et al., (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 11424-11429.
- 5) Moriyama, Y., Yamamoto, A., Yamada, H., Tashiro, Y., and Futai, M. (review) (1996) *Biol. Chem.* 377, 155-165.
- 6) Moriyama Y. (review) (1996) *J. Exp. Biol.* 199, 1447-1454.
- 7) Yamada, H. et al., (1996) *J. Pineal Res.* 21, 175-191.
- 8) Yamada, H. et al., (1996) *J. Pineal Res.* 21, 165-174.
- 9) Yatsushiro, S. et al., (1997) *J. Neurochem.* 69, 340-347.
- 10) Yamada, H. et al., (1997) *Neurosci. Lett.* 228, 103-106.
- 11) Yamada, H. et al., (1997) *J. Neurochem.* 69, 1491-1498.
- 12) Yamada, H. et al., (1998) *J. Neurosci.* 18, 2056-2062.
- 13) Hayashi, M. et al., (1998) *J. Neurochem.* 71, 356-365.
- 14) Yamada, H. et al., (1998) *J. Neurosci.* 18, 4946-4952.
- 15) Moriyama, Y. et al., (1998) *Neurosci. Lett.* 248, 57-60.
- 16) Ishio, S. et al., (1998) *Neurosci. Lett.* 249, 143-146.
- 17) Yatsushiro, S. et al., (1999) *NeuroReports*, 10, 1592-1603.
- 18) Kim, H. S. et al., (1999) *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 632-534.
- 19) Hayashi, M. et al., (1999) *Neurosci. Lett.*, 267, 37-40.
- 20) Moriyama, Y. et al., (2000) *J. Exp. Biol.*, in press.

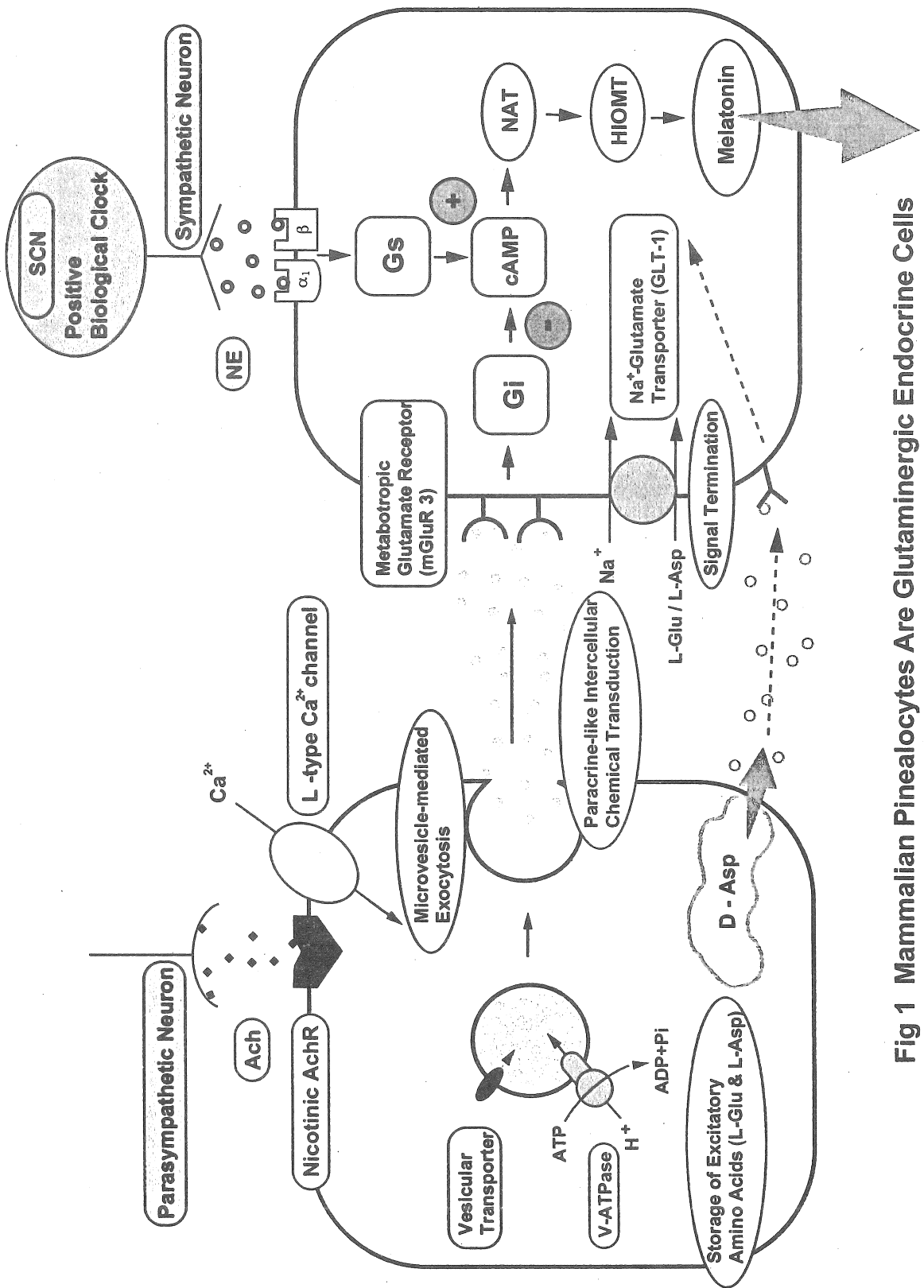


Fig 1 Mammalian Pinealocytes Are Glutamergic Endocrine Cells

Studies on Na⁺-dependent Glutamate transporter as a Regulatory Mechanism for Melatonin Synthesis

Yoshinori Moriyama

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University,
Okayama 700-8530, JAPAN

Tel and Fax: (81)-86-251-7933; E. mail: moriyama@pheasant.pharm.okayama-u.ac.jp

Melatonin is a hydrophobic hormone that affects many physiological functions, such as the circadian rhythm and seasonal reproduction. In mammals, melatonin synthesis is under photoperiodic control by way of the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus. At night, the SCN sends stimulatory signals to the pineal gland through sympathetic neurons. Norepinephrine released from nerve endings binds to the adrenergic receptors on the plasma membranes of pinealocytes and activates adenylate cyclase through a heterotrimeric guanine-nucleotide-binding protein. The resultant increase in the concentration of cAMP stimulates the transcription of the serotonin *N*-acetyltransferase gene, causing stimulation of melatonin output. Thus, melatonin synthesis is positively controlled by sympathetic neurons. In contrast, exogenous L-glutamate inhibits synthesis and secretion of melatonin, suggesting a negative regulatory role of L-glutamate. We found that pinealocytes equip endogenous glutaminergic systems and use L-glutamate as a negative modulator for melatonin synthesis. The glutaminergic system is composed of machineries for glutamate signal output (exocytosis of glutamate), input (metabotropic glutamate receptor type 3-mediated inhibitory cAMP cascade), and termination. A plasma-membrane-type Na⁺-dependent glutamate transporter is responsible for glutamate signal termination. Although several isoforms has been identified so far, the pinealocytes Na⁺-dependent glutamate transporter was found to be novel isoform. Although the pineal gland contains several cell species, no other cell types, including glial-like cells, express these transporters. The Na⁺-dependent glutamate transporter seems to be involved in the regulation of melatonin synthesis.