

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06114

研究課題名(和文)小胞型神経伝達物質トランスポーターの脂質制御機構の解明

研究課題名(英文)Vesicular neurotransmitter transporters interact with lipid

研究代表者

樹下 成信 (Juge, Narinobu)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助教

研究者番号：60646917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経化学伝達は神経伝達物質が小胞に濃縮され、開口放出されることで開始する。

二次性能動輸送体で駆動力が必要な小胞型神経伝達物質トランスポーターは、駆動力を利用して神経伝達物質を輸送する。タンパク質-脂質間相互作用の研究は近年盛んに行われているが、脂質環境が不明または個々の細胞で脂質組成が異なるため、その相互作用様式も各タンパク質により異なることから、一貫した手法が確立されていない。研究代表者はこれまで小胞型神経伝達物質トランスポーターの研究を行う中で、その一つである小胞型グルタミン酸トランスポーター：VGLUTが脂質の制御をうけていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質-タンパク質相互作用解析は最近の一つのトピックスとして非常に進んできている分野ではあるが、本研究により、新たに、神経のシグナル伝達に関わるトランスポーターについても同様に脂質制御を受けているということを示した。そしてこれが、生理機能として重要であったことは、今後、神経シグナル伝達解析において、重要な手がかりとなるばかりか、脂質による制御があったことは、今後の神経化学研究においても重要な知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neurotransmitter is an essential for synaptic transmission in the mammalian central nervous system, and is involved in all brain functions and in various neurological diagnoses. Vesicular neurotransmitter transporters (VNTs) are one of major protein families. They have three isoforms, and transport neurotransmitter into synaptic vesicles for excitatory signal transmission in the central nervous system. VNTs are located not only on synaptic vesicles, but also on the plasma membrane during the transduction of neurons. VNTs are also involved in various biochemical regulation processes. A few VNTs are regarding the functional diversity and differences in the localization of VNTs, more work is needed in order for us to identify all functions and mechanisms of VNTs.

We got new data about the lipid-vesicular neurotransmitter transporter interaction.

研究分野：生物化学

キーワード：トランスポーター グルタミン酸 神経化学伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)はグルタミン酸のシナプス小胞充填を司るトランスポーターである。VGLUTの欠損は、グルタミン酸のシナプス前細胞からの放出量が減少もしくはゼロとなり、記憶障害や行動障害をもたらすことから、グルタミン酸化学伝達の必須因子である。これまで主に生体試料であるシナプス小胞を用いた解析により、グルタミン酸はV-ATPaseが作り出す電気化学的ポテンシャルのうち、膜電位を駆動力とした二次性能動輸送体であることや、基質特異性が高く、この輸送はCl⁻に対する濃度依存性があることが明らかにされている。Cl⁻生理学的解析からグルタミン酸化学伝達は中枢神経のみならず、末梢にも存在しており、血糖調節や、骨のリモデリング、神経因性疼痛にも関与している(*Biochemistry* **50** 5558-65)。しかし、その分子輸送メカニズムは適切な輸送解析システムがなかったため未だに不明な点が多い。

私は制御システムの解明の一端として、脂質による制御機構を明らかにすることとした。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでVGLUTの精製タンパク質を用いた1分子解析システムを構築し研究成果を挙げている。この系はVGLUTを昆虫細胞に大量発現し、その膜画分を可溶化して、アフィニティーカラムで精製し、精製したタンパク質を人工膜に再構成するものである。これを用いてVGLUTのグルタミン酸輸送における必須残基を明らかにするとともに(2006年JBC)、Cl⁻とケトン体のような生体代謝産物によるVGLUTの制御機構『アニオンスイッチ』を明らかにした(2010年Neuron)。さらに、制御機構を構造生物学的に明らかにするために、構造生物学を学んだ。これにより、VGLUT大腸菌ホモログタンパク質の結晶構造解析を行った。さらに、JST さきがけの「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端基盤技術」研究領域に採択され、ほ乳類VGLUTの構造解析を行っている。

以上の先行研究成果によりVGLUTはオリゴマー化して機能している知見は得ていたが、なぜオリゴマー化しているのかはまったく不明なままだった。最近、研究代表者はVGLUTのオリゴマー化制御機構について、ブレイクスルーした。つまり、VGLUTはリン脂質によりオリゴマー化が制御されていたのである。実際、脂肪酸、リン脂質添加時でVGLUTの会合度が大きく変化

した。これらの制御機構はVGLUT 大腸菌ホモログタンパク質にはない制御機構で、オリゴマー化制御機構の解明は、神経シグナル伝達の全貌解明において非常に重要な機構であると考え、その解明をすることを本研究の目的としている。

3. 研究の方法

研究の方法として、下記、3つの方法により、研究を行なった。

(1) 生化学的手法を用いた解析

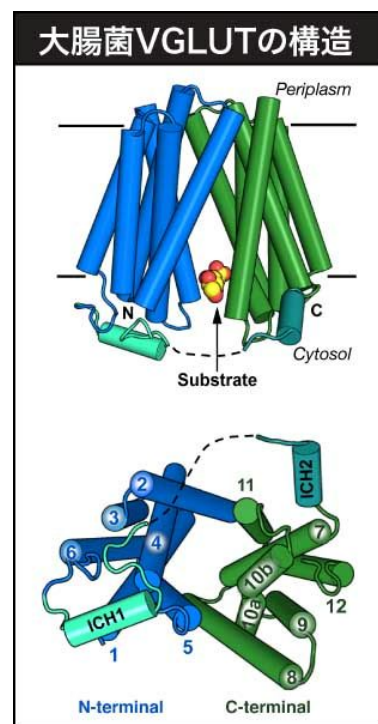
生化学的解析としてタンパク質の生成にも利用する分子排除クロマトグラフィー(SEC)や精製後でのタンパク質を解析で用いることが可能で、構造をとったままで電気泳動可能なBN-PAGEを用いた解析を主に行う。変化が起こる場合は、さらに、分析超遠心機などを用いた解析等も行い、変化の有無を確認する。

(2) 分子間力顕微鏡を用いた解析

分子間力顕微鏡 (AFM) はタンパク質の構造を解析する上で非常に有効なツールである。マイカステージ上にのせたプロテオリポソームや、Ni 処理をしたマイカに精製タンパク質をステージとして、カンチレバーで走査して実験を行う。VGLUT を含めた小胞型神経伝達物質トランスポーターは一般的に細胞膜外ドメインが大きいことから、プロテオリポソームを展開したもので十分に実験が可能である。実験を行なった上で、得られたデータをもとに、その高さを解析ソフトにより計測する。

(3) 構造生物学的解析

研究代表者はこれまでほ乳類 VGLUT の結晶構造解析のため、結晶条件のスクリーニングを行っている。これまでの結果により、VGLUT は脂質の種類により単量体、多量体が変わることが明らかとなっている。すでに、それぞれの状態の高純度タンパク質の発現系と精製系については確立済みで、これらの熱安定性も非常に高いことを確認している。結晶が出来次第、Spring-8 や高エネルギー研究所のビームラインを用いた解析を行い、結晶の条件をよ



り詳細に検討していく。ビームラインの確保等については、創薬等技術支援基盤プラットフォーム：BINDS 等を利用した支援も受ける予定である。さらに、最近の結晶構造解析の主流である、クライオ電子顕微鏡についても創薬等基盤プラットフォーム (BINDS) の支援を受け、構造変化を捉える実験をおこなった。

4. 研究成果

(1) 大腸菌ホモログタンパク質の結晶構造解析

長年構造の取れて来なかった大腸菌ホモログタンパク質の結晶構造解析について、ついにその構造を解き、論文化をすることができた。このトランスポーターは哺乳類トランスポーターと 30% 程度のアイデンティティーを持ち、プロトンと糖の輸送体として機能していることが明らかにした。哺乳類の小胞型神経伝達物質トランスポーターは膜電位を駆動力とすることから、駆動のメカニズムは異なるものの、小胞型神経伝達物質トランスポーターは多機能性トランスポーターとしてプロトンを駆動力とした糖の輸送体としても機能する。このことから、輸送基質等は異なってもそのメカニズムを知る上で、今回の構造が解析されたことは重要な知見である。

発現系として大腸菌に発現し、様々な界面活性剤を試して、可溶化率、凝集性の低いものを選択後、得られたタンパク質を脂質と再構成して、その輸送活性を確認した。Ratio metric なプロトン指示薬を用いて基質の輸送を確認したり、RI 標識した糖を用いて基質輸送を速度論的に解析した。その結果、pH 勾配依存的に、輸送が増すことや、部位特異的変異導入法により、輸送に必要なアミノ酸残基を同定することもできた。これらのアミノ酸残基は哺乳類のトランスポーターとも相同性が高い残基であり、その重要性が示唆された。

First Crystal を結晶化のスクリーニングキットを用いて解いたところ、異方性があり、一方向性のみ解像度が高い結晶を得ることができた。その後、モノオレインの脂肪酸の中で結晶を作成する Lipidic cubic phase 法など様々な結晶化条件をためすことで、異方性の低い高解像度の結晶を native および基質結合状態で得ることに成功した。これらを解析することで、3.8 オングストロームの解像度で論文を発表するに至った。これは構造的にモノマーで構造を解析できた。

(2) 哺乳類小胞型神経伝達物質トランスポーターの脂質制御機構の解明

これまでの小胞型神経伝達物質トランスポーターの解析から、小胞型神経伝達物質トランスポーターはオリゴマーとして機能している可能性はあったが、その詳細なメカニズムは不明なままだった。また、それが何により制御されているのかという点も不明なままだった。

今回、脂質に着目し、脂質添加に伴う構造変化をはじめに解析した。脂質は大きく分類してグリセロリン脂質とスフィンゴ脂質の2種類に大別される。その両方共が脂質トランスポーターの制御器関わっていることを明らかにした。実際、サイズ排除カラムにより、分子量のことなるピークを検出し、BN-PAGEでもことなる分子量のバンドを検出した。これらのことから、小胞型神経伝達物質トランスポーターはオリゴマー化していることや、さらに特定脂質を認識し、構造を変化していることも明らかとなった。このことをさらに解析するため分析超遠心機を用いてその分子量変化や、構造変化を確認すると、モノマー、オリゴマーの分子量変化を起こしていることや、構造の指標となる摩擦比も異なっていた。以上のことは、構造変化を起こしていたことを示唆している。

さらに、特定濃度を変化した、プロテオリポソームを作成し、活性変化や、AFMを用いて解析した。するとAFMでは上記と同様の構造変化を示し、活性変化についても特定脂質の濃度依存的に活性変化を示すことが明らかとなった。これらのことは小胞型神経伝達物質トランスポーターが脂質により大きな構造変化、輸送変化に影響を及ぼしていることを明らかとした。

(3) 今後の展開

これまでの研究により、小胞型神経伝達物質トランスポーターが脂質により制御を受けていることを明らかとすることができた。そこで今後の展開として、すべての小胞型神経伝達物質トランスポーターで脂質制御機構があるのか。また、それらが構造変化するのか。といったことを明らかにしていきたいと考えている。また、なぜ、そのような脂質制御機構も必要なのか。という点についてもより詳細に検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Leano Jonathan B., Batarni Samir, Eriksen Jacob, Juge Narinobu, Pak John E., Kimura-Someya Tomomi, Robles-Colmenares Yaneth, Moriyama Yoshinori, Stroud Robert M., Edwards Robert H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Structures suggest a mechanism for energy coupling by a family of organic anion transporters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawakami M., Juge N., Kato Y., Omote H. Moriyama Y. & Miyaji T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Efficient mass spectral analysis of active transporter over expressed in Escherichia Coli.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Proteome Res.	6. 最初と最後の頁 1108-1119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.7b00777.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawasaki T., Matsumoto T., Iwai Y., Kawakami M., Juge N., Omote H., Nabekura T. & Moriyama Y	4. 巻 1860
2. 論文標題 Purification and reconstitution of polyspecific H ⁺ /organic cation antiporter human MATE1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta Biomembr	6. 最初と最後の頁 2456-2464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2018.07.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagarathinam K., Nakada-Nakura Y., Parthier C., Terada T., Juge N., Jaenecke F., Liu K., Hotta Y., Miyaji T., Omote H., Iwata S., Noumura N., Stubbs M.T. & Tanabe M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Outward open conformation of a major facilitator superfamily multidrug/H ⁺ antiporter provides insights into switching mechanism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 4005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06306-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 樹下成信
2. 発表標題 創薬xAI
3. 学会等名 岡山大学Society5.0シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樹下成信
2. 発表標題 生活習慣による脂質組成変化と神経学伝達の関係性について
3. 学会等名 日本衛生学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------