

平成 28 年 3 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670123

研究課題名(和文) シナプス小胞D-セリンパッケージングトランスポーターの分子同定

研究課題名(英文) Identification of a Vesicle specific D-serine transporter in the brain.

研究代表者

金井 好克 (Yoshikatsu, Kanai)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60204533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：D-セリンは中枢神経系に存在するD-アミノ酸であり、神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体であるNMDA受容体のコ・アゴニストとして、様々な神経機能や疾患に関与することが知られている。しかし、その放出機序や輸送体など神経細胞におけるD-セリン動態の制御機構については未だ不明の部分が多い。本研究では、輸送体 γ -Asc-1の機能と局在を解析し、これがD-セリン輸送を担い、神経細胞からのD-セリン放出制御に寄与することを明らかにした。本研究による成果は、脳内D-セリンの生理学的、病態学的研究に新しい展開をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：D-serine is an endogenous D-amino acid abundant in the mammalian brain. The main target of D-serine is the NMDA receptor, which has important roles in learning, memory and neurodegenerative diseases. However, how D-serine is regulated in the brain still remains to be clarified. Here we have revealed that γ -Asc-1 is a neuron specific D-serine transporter and involved in the neuron-derived D-serine release in the brain. Our findings would provide a new insight into the neural D-serine study and contribute to the understanding of D-serine function in the brain.

研究分野：神経薬理学

キーワード：受容体 チャンネル 輸送系 シグナル情報伝達系

1. 研究開始当初の背景

D-セリンは哺乳類中枢神経系に高い濃度で存在するD-アミノ酸であり、NMDA型グルタミン酸受容体のコ・アゴニストとして様々な神経機能や疾患に関与することが知られる。これまでD-セリンは主にグリア細胞から放出されると考えられてきたが、一方でD-セリンは神経細胞からも放出されることが明らかにされ、神経伝達を修飾し得る因子として大きな関心が寄せられている(*Curr Opin.* 16, 72-5, 2013, Review)。神経細胞においてD-セリンを輸送する主なトランスポーターはAsc-1であると報告されているが、他のD-セリントランスポーターの存在の可能性も示唆されており、D-セリン放出の制御機構については未だ未解明の部分が多く残されている。

研究代表者らは、SLC7アミノ酸トランスポーターファミリーの研究を進める過程で、Dセリンを含む小型中性アミノ酸を輸送するy⁺Asc-1を同定した。そして、このy⁺Asc-1が神経系特異的に発現し、特に神経細胞に局在していることから、神経細胞からのD-セリン放出に寄与するトランスポーターの有力な候補と考えられた。しかし、y⁺Asc-1は、Dセリンのみでなく、L-セリン、アラニン、システインも輸送するため、Dセリン放出に寄与するトランスポーターとして機能するためには、Dセリン特異性を賦与する何らかの機構が必要となる。そこでDセリンを生成するセリンラセマーゼの局在を検討したところ、神経細胞における発現が確認された。これらより、y⁺Asc-1とセリンラセマーゼが分子複合体を形成し、セリンラセマーゼによって生成したDセリンを他のアミノ酸との競合を受けずに効率よくシナプス小胞内に取り込むという仮説を設定した。

2. 研究の目的

y⁺Asc-1が神経細胞においてD-セリン放出に寄与するトランスポーターであることを実証し、この解析を通して神経細胞からのD-セリン

放出制御機構を明らかにする。また、y⁺Asc-1と、D-セリンの生成を担うセリンラセマーゼが分子複合体を形成し、高い特異性をもってD-セリンを輸送する分子装置を構成することを実証する。

3. 研究の方法

(1)再構成系を用いたy⁺Asc-1トランスポーターアッセイ

精製y⁺Asc-1をリポソームに再構成したプロテオリポソームを用いてD-セリン取り込み能及び基質特異性を解析した。D-セリンを含んだy⁺Asc-1の基質選択性、H⁺濃度勾配に対する依存性を検討した。

(2)神経細胞初代培養を用いたD-セリンリ放出アッセイ

y⁺Asc-1は海馬に強い発現が認められることから、マウス海馬神経細胞初代培養を用いた解析を行った。D-セリンはKClによる脱分極刺激により神経細胞から放出されることが既に報告されている。この実験系を用い、脱分極刺激後の海馬神経細胞より放出されるD-セリン量を野生型マウスとy⁺Asc-1ノックアウトマウスで比較した。

(3)y⁺Asc-1とセリンラセマーゼの機能共役の検証

抗y⁺Asc-1抗体を用いてマウス海馬より調整した試料の免疫沈降を行い、セリンラセマーゼとの物理的共役をウェスタンプロットで検証した。また、y⁺Asc-1を中心とするD-セリン取り込みシステムの全貌を明らかにするため、免疫沈降試料の質量分析による検討も行った。これらの実験には、y⁺Asc-1を欠損させたy⁺Asc-1ノックアウトマウスを対照として用いた。

4. 研究成果

プロテオリポソームを用いたD-セリン取り込

み測定の結果、 γ -Asc-1 は H^+ 濃度勾配依存的に D-セリンを取り込むことが示唆された。基質特異性については D-セリンを加えた、小型中性アミノ酸に選択性があることを明らかにした。

さらに、マウス脳における γ -Asc-1 局在の詳細な解析を行ったところ、海馬に極めて強い発現を確認した(図 1)。海馬神経細胞初代培養を用いて、培養液中に放出される D-セリン量を測定した結果、野生型マウスは KCl による脱分極刺激後に約 1.5 倍に上昇したが、これに対してノックアウトマウスより調整した細胞では 1.2 倍程のわずかな上昇を確認するのみであった(図 2)。しかし、大脳皮質神経細胞初代培養では野生型マウス、ノックアウトマウスともに KCl 刺激後の D-セリン放出量は 1.5 倍程度で、両者に差はなかった。これらの結果より、 γ -Asc-1 は海馬神経細胞における D-セリントランスポーターであり、神経細胞からの D-セリン放出に深く関与していることが示唆された。また、この放出が海馬と大脳皮質では異なることから、D-セリン輸送は脳部位により異なる機構が存在することが示唆された。



図 1 γ -Asc-1 脳内分布(上) in situ hybridization(下) Western Blotting

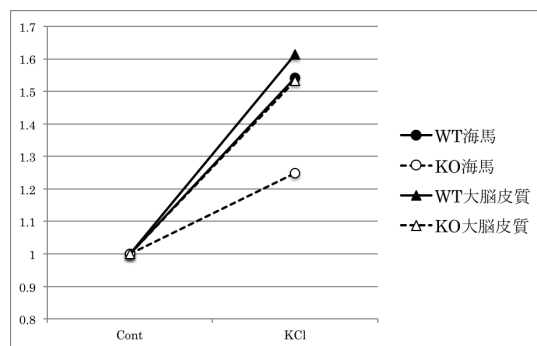


図 2 海馬神経細胞及び大脳皮質神経細胞 KCl 刺激後の培養液中の D-ser 放出量

また、 γ -Asc-1 とセリンラセマーゼの物理的共役については、通常の免疫沈降による解析では確認出来ておらず、 γ -Asc-1 とセリンラセマーゼが条件依存的に共役している可能性や、足場となる第三の分子の必要性なども想定して解析を続行し、 γ -Asc-1 が如何に D-セリンのみを選択的に輸送しうるか全貌解明を目指す。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 5 件)

Hanaoka H, Ohshima Y, Suzuki Y, Yamaguchi A, Watanabe S, Uehara T, Nagamori S, Kanai Y, Ishioka NS, Tsushima Y, Endo K, Arano Y.

Development of a Widely Usable Amino Acid Tracer: ^{76}Br - α -Methyl-Phenylalanine for Tumor PET Imaging.

J Nucl Med.2015 May;56(5):791-7.

doi: 10.2967/jnumed.114.152215.

Wongthai P, Hagiwara K, Miyoshi Y, Wiriyasermkul P, Wei L, Ohgaki R, Kato I, Hamase K, Nagamori S, Kanai Y.

Boronophenylalanine, a boron delivery agent for boron neutron capture therapy, is transported by ATB0+, LAT1 and LAT2.

Cancer Sci. 2015 Mar;106(3):279-86.
doi: 10.1111/cas.12602.

Kaira K, Sunose Y, Oriuchi N, Kanai Y,
Takeyoshi I.

CD98 is a promising prognostic
biomarker in biliary tract cancer.

Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2014
Dec;13(6):654-7.

Isoda A, Kaira K, Iwashina M, Oriuchi
N, Tominaga H, Nagamori S, Kanai Y,
Oyama T, Asao T, Matsumoto M,
Sawamura M.

Expression of L-type amino acid
transporter 1 (LAT1) as a prognostic
and therapeutic indicator in multiple
myeloma.

Cancer Sci. 2014 Nov;105(11):1496-502.
doi: 10.1111/cas.12529.

永森收志、金井好克
がんとアミノ酸トランスポーター
生化学 2014 86:338-344

[学会発表] (計 13 件)

金井好克

「トランスポーターからみた全身疾患と臨
床検査」

日本臨床検査自動化学会第 28 回春季
セミナー特別講演

平成 26 年 4 月 5 日、金沢

Kanai Y

“Transporters in pharmacology and
molecular target drug discovery”

5th Asia Pacific ISSX Meeting 2014

May 11, 2014 Tianjin China

金井好克

「生体膜表面で輸送体の機能共役を実現
するトランスポートソーム」

第 1 回生体界面研究会

平成 26 年 6 月 13 日、東京

Kanai Y

“Amino acid transporters: novel
molecular targets for cancer
diagnosis and therapeutics”

17th World Congress of Basic and
Clinical Pharmacology

July 14, 2014 Cape Town

Kanai Y

“From transporter to transportsome:
Protein-protein interactions
assemble membrane transport
functions”

6th Special Conference of ISN

September 22, 2014 Tokyo

金井好克

栄養素トランスポーター:病態形成におけ
る役割と分子標的創薬への応用」第 11 回
Metabolic Syndrome Forum in Tokyo

平成 26 年 10 月 30 日、東京

金井好克

「アミノ酸トランスポーターの機能と病態」

日本甲状腺学会基礎甲状腺学シンポジ
ウム

平成 26 年 11 月 14 日、大阪

金井好克

「トランスポーターの分子実体の解明と分
子標的創薬への応用」

バイオインフォマティクス・ジャパン

第 6 回新たな創薬パラダイムの創出

平成 27 年 1 月 9 日、東京

金井好克
「トランスポーターの生体恒常性維持における役割と疾患治療標的としての意義」
第44回日本心脈管作動物質学会
イブニングセミナー
平成27年2月6日、高松

金井好克
「トランスポーターを標的とした創薬」
未来医療セミナー
平成27年3月9日(月)、大阪

Kanai Y
“Amino Acid Transporters in Amino Acid Sensing and Nutritional Regulation”
Experimental Biology 2015
March 29, 2015, Boston

Nagamori S
Functions and roles of amino acid transporters.
The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR 2014)
Sep. 3, 2014, Utsunomiya

永森收志、大垣隆一、金井好克
膜輸送複合体 transportsome における輸送機能共役の解析 –再構成プロテオソームによる実証
第2回生体界面研究会
2015年2月20日、大阪

(図書) (計0件)

(産業財産権)

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

{その他}

ホームページ等

大阪大学医学系研究科生体システム薬理学ウェブサイト
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/pharma1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井好克 (KANAI, Yoshikatsu)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60204533

(2) 研究分担者

大垣隆一 (OHGAKI, Ryuichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20467525

(3) 研究分担者

奥田傑 (OKUDA, Suguru)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 50511846

(4) 研究分担者

永森收志 (NAGAMORI, Shushi)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90467572