

令和 3 年 10 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14697

研究課題名（和文）小胞容量測定系の確立

研究課題名（英文）Establishment of vesicular quantal size

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） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：小胞容量変化を測定する中で、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されることを明らかにした。

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、オリゴマーは脂質により制御されていること。さらに特定脂質により、小胞型神経伝達物質トランスポーターの輸送活性や、オリゴマーの形質が変化していることを明らかにした。この成果は神経科学伝達上必須の事柄であり、脂質代謝異常による神経病や精神疾患が指摘されている昨今、この結合部位を介した創薬につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築した系はこれまで解析のできなかった小胞容量の変化の継時変化を測定できうる系として非常に有用である。また、測定方法の違いに伴い、これまでの既存の方法に比べて粒子サイズが若干多く検出されるという点があるが、非破壊的にサンプルを測定できる点も魅力的である。今後この系を用いることで、これまで不明だった、様々な条件での小胞容量変化の測定にも用いることができ、その汎用性は高い。

研究成果の概要（英文）：Since we are establishing the new quantal size measurement system, we found new interaction between lipid and vesicular neurotransmitter transporters.

we show that vesicular neurotransmitter transporters are functionally oligomerized, and their transport activities are regulated by an abundance of specific phospholipid. Our findings indicate a new relationship between vesicular neurotransmitter transporters localization and phospholipid dynamics in the biological membrane.

研究分野：神経科学

キーワード：小胞型神経伝達物質トランスポーター 小胞容量変化

1. 研究開始当初の背景

シナプス小胞は開口放出刺激により神経伝達物質を細胞外に放出するまでの間、小胞内に濃縮、蓄積している細胞内小器官である。

応募者は、小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)を始めて構築し、生化学的解析を世界に先駆け実施した(*JBC* 281 39499 (2015))。この系を様々な小胞型トランスポーターに応用し、応募者自身が主筆として、マラリア原虫の小胞型輸送体の分子輸送メカニズムの解明(*PNAS* 112 3356 (2015)) VGLUT 制御機構の解明(*Neuron* 68 99 (2010)) を成し遂げた。そして、本申請の着想に至った、小胞容量変化に起因する分子輸送メカニズムを解明した(*J. Biol. Chem.*284 35073 (2009)、*J.Neurochem.* 127 482 (2013))。

本申請では、この系で培った研究成果を活かして、シナプス小胞が伝達物質の充填とともに容量が変化するのか。という神経科学上の問題を解決したい。つまり、小胞型トランスポーターが基質である伝達物質を能動輸送する際、小胞膜内外に浸透圧差が生じる。浸透圧差はシナプス小胞の容量変化につながると考えられているが(*Edwards Neuron* 55 835 (2007))、未だに実証されていない。本研究ではこの問題にナノ粒子アナライザーを用いてアプローチする。

2. 研究の目的

これまでのシナプス小胞の容量変化は電気生理学的手法を用いて神経刺激による開口放出を行う方法で測定されてきた。しかし、小胞型神経伝達物質トランスポーターをノックアウトしたシナプス小胞を用いていたことから、経時的な容量変化を定量できなかった。

本研究で用いる方法では、容量変化と、粒子数を同時に計測することができる。濃縮

する基質濃度やイオン濃度は RI 標識化合物を用いて解析できることから、これまで明らかにされていなかった、**神経伝達物質濃縮量と、容量変化量を定量的に明らかにできる。**

シナプス小胞に存在するトランスポーターやイオンチャネルは V-ATPase が ATP を加水分解する事で作り出す、H⁺の電気化学的ポテンシャルを駆動力として、神経伝達物質の濃縮や、イオン循環を行っている。しかし、これまでの研究では、容量変化については考慮されていない。**応募者の研究は新たな物理定数を定義する上での先駆けとなる。**

実際、本研究を遂行することで、これまで考えられていなかった小胞型神経伝達物質トランスポーターの脂質による制御機構を明らかにすることができた。これは、小胞型神経伝達物質トランスポーターが神経化学伝達の過程で、様々な脂質組成の中を移動することになる。その過程でシナプス小胞上ではグルタミン酸を濃縮し、細胞膜上では、機能をストップする必要があるが、この現象と密接に関与していることがわかった。

3. 研究の方法

1. シナプス小胞容量測定系の構築と、神経伝達物質濃縮に伴う容量変化を定量的に解析する。

興奮性のシグナル伝達は脳全体の 80% を占めると言われていることから、グルタミン酸の取り込みによるシナプス小胞の容量変化から系の構築ができると考えている。実際に初期データではあるが、シナプス小胞の粗分画を用いて初期データとして ATP および神経伝達物質添加に伴う粒子の変化を詳細に解析した。電子顕微鏡の負染色では全く解析できなかった、事項について左図に示す通り、駆動力を作り出す ATP 及び神経伝達物質の添加による粒子径変化とそ

の粒子数の分布に観察する事に成功している。これを元に容量変化の最適条件を検討する。同じサンプルを用いた RI 標識神経伝達物質の取り込み量、VGLUT ノックアウトマウスを用いた解析から、トランスポーター発現量と蓄積量、それに伴う容量変化の相関性を検討した。シナプス小胞は V-ATPase が ATP を加水分解する事で作り出す H⁺ の濃度勾配を駆動力として、神経伝達物質の蓄積や、イオン循環が起きている。それにより生じた容量変化を計測する事で、浸透圧変化に伴う ATP 加水分解エネルギーの利用を算出し、新たなエネルギー伝播経路を詳細に明らかにした。

2. 神経伝達物質濃縮に関わる制御機構を解明する。

小胞容量変化を同定する中で、容量変化を規定する脂質と小胞型神経伝達物質トランスポーターの相互作用を明らかにした。

今回は小胞型神経伝達物質トランスポーターで相互作用を発見した。SEC プロファイルから、脂質の添加により溶出時間が変化することを確認するとともに、Native-PAGE や SDS-PAGE のデータで補完する。また、金沢大学との研究協力により、原子間力顕微鏡を用いた解析により、相互作用を明らかにした。

4 . 研究成果

まず、脂質による制御に関しては、SEC プロファイル等から、VGLUT は精製後オリゴマーを形成しており、脂質の解離に伴い、モノマー型に変化すること、そこに脂質を添加すると、再度オリゴマー化するという、VGLUT のモノマー、オリゴマーのフォームを自由に作成することに成功した。さらに、数日おこななくとも、モノマー化する化合物も発見することができた。さらにその様子は高速原子間力

顕微鏡 (HS-AFM) を用いることで観察することもできた。ただ、こちらについては、オリゴマー時のタンパクの移動が早く、かつ、VGLUT には長い N 末、C 末領域があり、これらが、VGLUT のオリゴマー化に影響している可能性がある。

VGLUT は神経において、シナプス小胞上に存在して、グルタミン酸を輸送することが知られているが、神経化学伝達過程においてエキソサイトーシス、エンドサイトーシスをする上で様々な脂質組成の膜上を移動する。異なる脂質膜の移動に伴い、オリゴマーの構造や、輸送が変化するのではないか? と考え、まず、それぞれの脂質組成を調べてみると、もちろん他の脂質組成も変化しているが、特定脂質の量が異なっていることがわかった。そこで、様々な脂質組成の膜を作成し、特に、Non-特定脂質 1、Non 特定脂質 2、Synaptic Vesicle タイプ、Plasma membrane タイプの脂質を用いて、VGLUT と再構成した上で、マイカ基板上に展開し、その様子を HS-AFM を用いて観察した。

すると、それぞれのパーティクルはオリゴマー化している形で観察され、そのサイズは大きな変化はなかったが、高さに変化のあることが明らかとなった。このことから、それぞれのオリゴマーのフォームを脂質が変化させていることとなる。

さらに Plasma membrane 型、Synaptic vesicle 型の輸送解析を行ってみると、Synaptic vesicle 型にのみ、グルタミン酸輸送活性が存在することが明らかとなった。この輸送活性については、グルタミン酸濃度や、VGLUT の特徴である、Cl⁻依存性についても測定してみたが、Plasma membrane 型でグルタミン酸輸送活性が存在することはなかった。一方、VGLUT のもう一つの輸送型である、ナト

リウム依存性リン酸輸送については、Synaptic vesicle 型、Plasma membrane 型ともに存在することがわかった。

以上のことから、VGLUT はグルタミン酸輸送において、Plasma membrane 型の輸送はなかった。このことは、神経の環境と照らし合わせると、グルタミン酸の細胞外への放出を防いでいるということがわかる。今回の研究結果は、VGLUT のオリゴマー化を示すのみならず、脂質という制御因子が明らかになると、神経のダイナミクスとの関連を明らかにすることができた。

本研究で確立した測定系は上記で非常に重要なリポソームサイズの測定にも用いたほか、今後脂質変化に伴う影響の測定にも用いることが可能である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1、Kawakami M., Juge N., Kato Y., Omote H. and Moriyama Y. Efficient mass spectral analysis of active transporter over expressed in *Escherichia Coli*. *J. Proteome Res.* **17**, 1108-19 (2018) 査読有

2、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.

Outward open conformation of a major facilitator superfamily multidrug/H⁺ antiporter provides insights into switching mechanism.

査読有 *Nat. Commun.* **9**, 4005 (2018)

3、Kawasaki T., Matsumoto T., Iwai Y., Kawakami M., Juge N., Omote H., Nabekura T. & Moriyama Y. Purification and reconstitution of polyspecific H⁺/organic cation antiporter human MATE1.

査読有 *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860**, 2456-64 (2018)

4、Neuronal inhibition and seizure suppression by acetoacetate and its analog, 2-phenylbutyrate

Kadwaki A., Sada N., Juge N., Wakasa A., Moriyama Y., Inoue T.

Epilepsia **58**, 845-57 (2017) 査読有

[学会発表](計 2 件)

1、樹下 成信 「PfCRT 変異体の速度論的解析」第 11 回トランスポーター研究会 2017 年 7 月 6~7 日 仙台 ポスター発表

2、Narinobu Juge 「Structural analysis of Vesicular glutamate transporter」JST CREST-PRESTO joint international symposium 2016.11.05-06 Japan

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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