

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590288
 研究課題名 (和文) ヒト糖輸送体の機能部位の解析

研究課題名 (英文) Structure and function of human glucose transporter GLUT1

研究代表者

笠原 敏子 (KASAHARA TOSHIKO)
 帝京大学・医学部・講師
 研究番号：60328086

研究成果の概要：

ヒト促進拡散系糖輸送体は種を超えて、共通のスーパーファミリー Major Facilitator Superfamily に属する。これまでに、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 2 種の糖輸送体間で網羅的キメラ解析を行い、糖輸送の親和性を決定する唯一のアミノ酸を同定した。ヒト糖輸送体 GLUT1 もおいても、対応するアミノ酸が糖輸送の親和性を決定していることを、酵母の全糖輸送体欠損株の異種発現系を用い、明らかにした。

交付額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：糖輸送体・基質認識・酵母

1. 研究開始当初の背景

(1) グルコースは大腸菌から哺乳動物に至るまで広範な生物において重要な栄養源であり、細胞膜を通過して細胞内にグルコースを取り込むには、糖輸送体はこれら生物になくはないものである。また、これら糖輸送体は種を超えて、共通のファミリー、Major Facilitator Superfamily (MFS) に属する。糖輸送の 3 次元構造に基礎をおいたアミノ酸残基レベルでの分子機構はいまだいかなる生物においても明らかにされていない。

(2) 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は遺伝学的な操作法が確立しており、全ゲノム配列か

ら全糖輸送体が明らかになっている真核生物である。また、その生活環境から、広範囲な濃度の糖を利用するので、17 個という多数の糖輸送体をもつ。酵母は構造の解析に必須の大量培養も容易で、糖輸送体の基質認識機構を分子レベルで解明するには最適の材料である。

2. 研究の目的

糖輸送体の変異はヒトにおいては Fanconi-Bickel 症候群や GLUT1 欠乏症候群など、重篤な病気を引き起こす。ヒトの糖輸送体 GLUT も酵母 *Saccharomyces*

*cerevisiae*の糖輸送体と同じMFSに属する。同じファミリー内では同じ機構で基質認識が行われていることが推測される。遺伝学、分子生物学の様々な解析方法が確立している酵母を用い、糖輸送体の3次元構造に基礎をおいたアミノ酸レベルでの機能解析を行う。ついで、酵母の糖輸送体で得られた成果をもとに、ヒト糖輸送体で対応するアミノ酸残基の役割を解析し、ヒト糖輸送体の基質認識機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

- (1)酵母の親和性の異なる糖輸送体間で系統的・網羅的なキメラ輸送体を作成し、グルコースを制限した寒天培地上で高親和性糖輸送体を選択する条件を確立し、選択された高親和性糖輸送活性をもつ輸送体の性質を解析することから、高親和性糖輸送活性に必須のアミノ酸残基を同定する。
- (2)さらに、これらアミノ酸残基を各々他の19個のアミノ酸に置き換えた変異体を作成し、その糖輸送の性質を解析し、輸送の親和性を決定しているアミノ酸を同定する。
- (3)ヒト糖輸送体 GLUT1 において、このアミノ酸に対応するアミノ酸残基の役割を他の19個のアミノ酸に置き換えた変異体の糖輸送の性質から解析する。この時、GLUT1の発現は、内在性糖輸送体をすべて欠損している酵母の変異株で GLUT1 を細胞膜上に発現するようにさらに変異を加えた S7 株 (Wieczorke et al, Cell. Physiol. Biochem., 13, 123-134, 2003) を用いる。

4. 研究成果

- (1)酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の2種の糖輸送体、高親和性の Hxt2 (グルコースに対する K_m が 3.3mM) と低親和性の Hxt1 ($K_m=46mM$)、の網羅的なキメラ輸送体を DNA レベルで作成し、各々、酵母の主要な糖輸送体 Hxt1-7, Gal2 欠損株に導入した。
 - ①高親和性糖輸送体 Hxt2 の12個の膜貫通領域(TM)を低親和性糖輸送体 Hxt1 の対応する TM とランダムに置き換え $2^{12}=4096$ 通りのキメラ輸送体を作成した。高親和性糖輸送活性をもつ細胞のみが生育できる、0.1%グルコースをC源とする寒天培地で高親和性糖輸送活性をもつ輸送体を選択し、解析した。その結果、Hxt2 の4個の TM1,5,7,8 が高親和性糖輸送活性に必要なことがわかった。Hxt2 の他の TM を Hxt1 に置き換えたキメラ輸送体 C1578 は Hxt2 と同様の活性を示した (Biochem. J. 372, 247-252, 2003)。
 - ②Hxt2 の4個の TM1,5,7,8 において、Hxt1 と異なるアミノ酸は 20 個であった。C1578 のこの20個のアミノ酸を対応する Hxt1 のアミノ酸とランダムに置き換えた変異体から高親和性糖輸送活性をもつものを寒天培地

上で選択し解析した結果5個の高親和性糖輸送に必要なアミノ酸を同定した。(J. Biol. Chem. 281, 18532-18538, 2006)。

③高親和性糖輸送活性に必要な5個のアミノ酸残基を各々他の19個のアミノ酸に置き換え $19 \times 5 = 95$ 個の変異輸送体を作成し、それらの糖輸送活性を解析した (成果発表 雑誌論文②)。

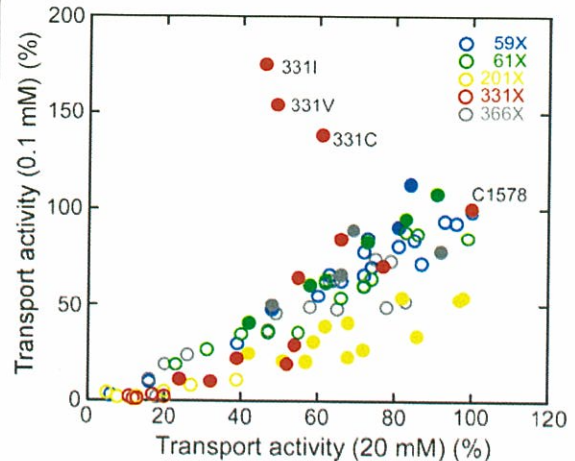


図 1

図1において、5個のアミノ酸 (Leu-59, Leu-61, Leu-201, Asn-331, Phe-366) のそれぞれの変異体を5色で表している。縦軸が0.1mM グルコースを基質とした輸送活性、横軸が20mM グルコースを基質とした輸送活性。C1578の輸送活性を100%としてあらわしている。Asn-331の変異体(図で赤色の331X)のみC1578より顕著に高い活性を示す変異体が出現した。さらに各変異輸送体の糖輸送の kinetics を調べた (図2)。

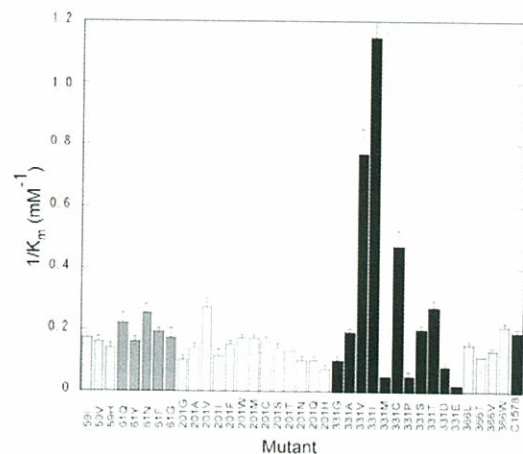


図 2

縦軸は糖輸送の親和性の逆数 ($1/K_m$)。グラフのバーの高さが高いほど、親和性が高いことを表す。横軸に Leu-59 変異体(59X)、

Leu-61 変異体(61X)、Leu-201 変異体(201X)、Asn-331 変異体(331X)、Phe-366 変異体(366X)を表す。右端の変異を入れない C1578 輸送体と比べて Asn-331 の変異体のみが親和性を幅広く変化していた。Ile, Val, Cys で置換した 331I, 331V, 331C 変異体で C1578 より高親和性の輸送活性が観察された。Asn-331 が親和性を決定するアミノ酸残基であることを示した。

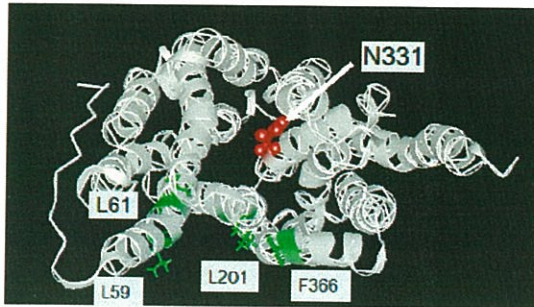


図 3

Hxt2 糖輸送体が属する MFS のバクテリアの 3 個のホモログ(LacY, GlpT, EmrD)で結晶構造が報告されている。GlpT を鋳型として、homology model を作成した (図 3)。細胞の内側からみた図である。5 個のアミノ酸のうち Asn-331(N331)のみが中央の pore (輸送される基質の通り道) に面していた。

(2) ヒト糖輸送体 GLUT1 において、Asn-331 に対応する Ile-287 がどのような役割をしているかを調べた (成果発表 雑誌論文①)。

① GLUT1 の Ile-287 を他の 19 個のアミノ酸で置換した変異体を作成し、輸送活性を解析した(図 4)。

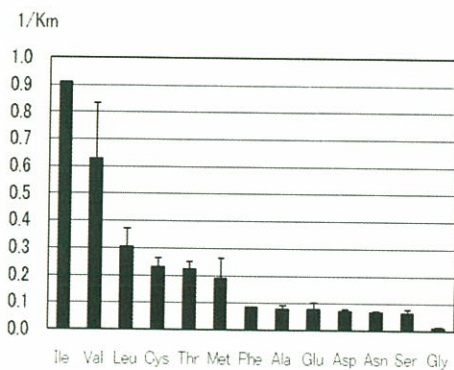


図 4

縦軸が 1/Km。横軸が置換したアミノ酸で表した各変異体。左端の Ile が wild-type ($K_m=1.1\text{mM}$)。

Ile-287 を他のアミノ酸で置き換えると親和性が変化することから、酵母糖輸送体 C1578 と同様にヒト糖輸送体 GLUT1 においても、このアミノ酸が輸送の親和性を決定していることを示していた。

② ヒト糖輸送体の阻害剤、細胞の外側の糖の結合部位に作用する phloretin、内側の糖の結合部位に作用する cytochalasin B の阻害の形式を各変異体で調べた。

cytochalasin B の Inhibition constant(K_i)は変わらないが、phloretin の K_i は変化した。前者は non-competitive inhibition、後者は competitive inhibition であることから、Ile-287 の場所が細胞の外側にある糖の結合部位もしくは周辺に位置することを示唆していた。

③ さらに C1578 の Asn-331 変異体と GLUT1 の Ile287 変異体の間には、親和性の高低を決定するアミノ酸の種類が一致していた (図 5)。

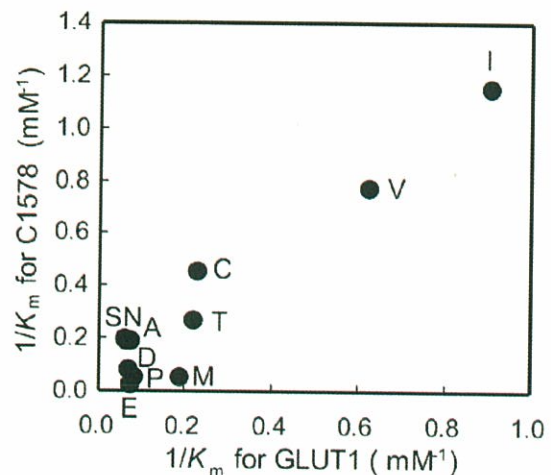


図 5

縦軸が酵母糖輸送体 C1578 の各 Asn-331 各変異体の $1/K_m$ 、横軸がヒト糖輸送体 GLUT1 の Ile-287 各変異体の $1/K_m$ 。両者において Ile>Val>Cys の順で高親和性糖輸送を担っていた。これらのアミノ酸は side chain の短い小さいアミノ酸であることが共通している。

④ 前述の C1578 の homology model から、Asn-331 が他の TM 領域にある 3 個のアミノ酸 (TM5 の Phe-208, TM8 の Leu-357, TM10 の Tyr-427) と van der Waals interaction の範囲にあった(図 6)。

Asn-331 の場所がある一定の長さの side chain をもつ小さいアミノ酸であることが、van der Waals interaction するために重要であり、この力によって、基質の通る pore の形状を決めていると考えられる。この親和性決定の機構が酵母、ヒトの高親和性輸送体で共通していると考えられる。

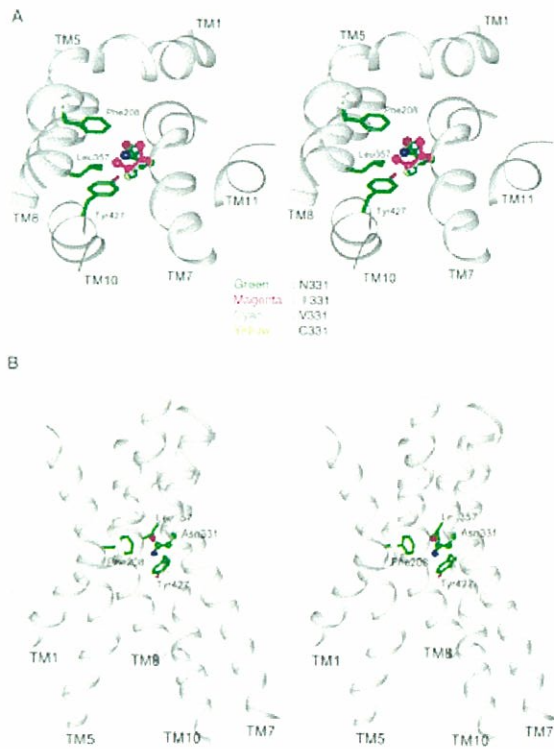


図 6

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 2 件)

① Kasahara, T., Maeda, M., Boles, E. and Kasahara, M.
 “Identification of a key residue determining substrate affinity in the human glucose transporter GLUT1”
 Biochim. Biophys. Acta 1788, 1051-1055, 2009
 査読 有

② Kasahara, T., Maeda, M., Ishiguro, M. and Kasahara, M.
 “Identification by comprehensive chimeric analysis of a key residue responsible for high affinity glucose transporter by yeast Hxt2”
 J. Biol. Chem. 282, 13146-13150, 2007
 査読 有

[学会発表] (計 6 件)

① 笠原敏子、笠原道弘
 酵母の親和性の異なる糖輸送体に共通する親和性決定の鍵となるアミノ酸残基
 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会

2008 年 12 月 9 日

神戸ポートアイランド

② 笠原道弘、笠原敏子

ヒト糖輸送体 GLUT1 の基質親和性を規定するアミノ酸残基

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会

2008 年 12 月 9 日

神戸ポートアイランド

③ 笠原敏子、笠原道弘

酵母 Hxt family に属するグルコース輸送体のそれぞれの基質親和性を規定する膜貫通領域 7 にある部位

酵母遺伝学フォーラム第 41 回研究報告会

2008 年 9 月 10-12 日

北海道大学学術交流会館

④ 笠原敏子、前田真理、E. Boles、笠原道弘

A key residue responsible for determining affinity for glucose in human glucose transporter GLUT1 expressed in a heterologous yeast system

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会

2007 年 12 月 11 日

パシフィコ横浜

⑤ 笠原道弘、前田真理、笠原敏子

酵母糖輸送体 Hxt7 の膜貫通部位 5,7,8 の Cysteine-scanning mutagenesis による糖輸送に關与するアミノ酸残基の同定

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会

2007 年 12 月 11 日

パシフィコ横浜

⑥ 前田真理、笠原敏子、石黒正路、笠原道弘

酵母の糖輸送体 Hxt2 の高親和性基質認識に關与するアミノ酸残基間の相互作用

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会

2007 年 12 月 11 日

パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

(5) [その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 敏子 (KASAHARA TOSHIKO)

帝京大学・医学部・講師

研究番号：60328086

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし