

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790077
 研究課題名（和文） 抑制性シグナル伝達を司る小胞型 γ-アミノ酪酸トランスポーターの構造と機能解析
 研究課題名（英文） Structure and function of vesicular inhibitory amino acid transporter (VIAAT) involved in signal transmission.
 研究代表者
 室山 明子（MUROYAMA AKIKO）
 北陸大学・薬学部・助教
 研究者番号：00434473

研究成果の概要：小胞型 GABA トランスポーター（vesicular inhibitory amino acid transporter, VIAAT）はシナプス小胞に存在する GABA の能動輸送タンパクであり、GABA シグナルの出力に本質的に重要である。しかしながら、VIAAT 分子自体の構造や GABA の輸送機構に関する研究はほとんど進んでいない。私は、昆虫細胞を用いた高発現系から得られる精製 VIAAT と F-ATPase をリボソームに再構成することでできる VIAAT の輸送活性測定系を応用し、GABA 輸送に必須のアミノ酸残基を見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：VIAAT, GABA, 再構成系, リボソーム

1. 研究開始当初の背景

γ-アミノ酪酸（GABA）は精神活動の中でも抑制性のシグナル伝達を司る神経伝達物質である。GABA 作動系は神経が GABA を伝達物質として利用するためのシステムであり、GABA をシナプス小胞内へ濃縮し、細胞外へ放出する「出力系」、GABA シグナルを受け取る「入力系」、そして GABA シグナルを停止させる「終止系」で構成されている。入力系と終止系はそれぞれ GABA 受容体と細胞膜型 GABA トランスポーターが中心的な役割を果たしている。これらの系

は分子レベルの解析が進んでいる。一方、小胞型 GABA トランスポーター（vesicular inhibitory amino acid transporter, VIAAT）はシナプス小胞に存在する GABA の能動輸送タンパクであり、GABA シグナルの出力に本質的に重要である。VIAAT は分子量 56 kDa の 10 回膜貫通領域を持つ膜タンパクであり、その cDNA は 1997 年にクローニングされている（McIntire et al., *Nature* 389 (6653): 870-876, 1997)。しかしながら、これ以降、VIAAT 分子自体の構造や GABA の輸送機構に関する研究はほ

とんど進んでいない。

私はこれまで末梢、特に膵臓ランゲルハンス氏島(ラ氏島)におけるグルタミン酸シグナリングの生理機能についての研究を行ってきた(Muroyama et al., *Diabetes* 53: 1743-1753, 2004, Uehara et al., *Diabetes* 53: 998-1006, 2004, Hayashi et al., *J. Biol. Chem.* 278 (3): 1966-1974, 2003)。そして、ラ氏島で発現している新規グルタミン酸受容体を発見し、さらに、この受容体が血糖調節制御に関わっていることを見いだした。一連の研究の中で、私はVIAATに興味を抱いた。というのはラ氏島にはGABAのシグナリングも起こっており、VIAAT様のタンパクが発現している証拠を得ることができたからである。つまり、ラ氏島細胞からGABAが分泌されるにもかかわらず、ラ氏島細胞のライン化細胞であるMIN6 cellsのシナプス小胞様オルガネラにはVIAATが発現していなかった。さらに、ライン化細胞を用いVIAATの基質であるGABAの輸送活性を測定したところ、両者ではGABAに対する親和性に差が見られた。つまり、細胞のVIAATは神経において同定されたVIAATとは異なる新規のものであると考えられる(Hayashi et al., *Diabetes* 52: 2006-2074, 2003)。また、私は細胞のVIAATは既知のVIAATと一部共通する塩基配列を有することを明らかにした。したがって、ラ氏島細胞で見いだしたVIAAT様タンパクは神経のVIAATとは免疫学的にも遺伝子配列においても少し異なるイソ型であると考えられた(Hayashi et al., *Diabetes* 52: 2006-2074, 2003)。このVIAAT様タンパクの構造と機能を明らかにするためには、神経のVIAATの構造と機能を明らかにすることが、まず重要であると考えた。

私が以前所属していた研究室において、小胞型グルタミン酸トランスポーター、VGLUTのインビトロ機能測定系が開発された。これは、昆虫細胞を用いた精製VGLUTと精製した大腸菌由来のプロトンポンプを使用する。この系を用いることによりVGLUTの機能残基を同定することができた。私はこのインビトロ測定系をVIAATの活性測定に応用することにより、VIAATの構造と機能解析ができると考えた。実際、精製したVIAATと大腸菌由来のプロトンポンプを利用したインビトロVIAAT機能測定系の構築に成功した。この系は感度がよく、変異VIAATの活性測定から輸送に関与するアミノ酸残基を特定することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、GABAによる化学伝達において最も重要な膜タンパクの一つであるVIAATの構造と機能を分子レベルで明らかにする。そして、ラ氏島におけるVIAAT様タンパクを同定し、神経のVIAATと新規VIAATを比較する。そして、GABAシグナリング系の全貌を解明する。

具体的には以下の実験を行う。細胞がGABAを分泌するためにはGABAが小胞に能動輸送されることが必要である。そこで、インビトロVIAAT機能測定系を駆使しGABA輸送に関与するアミノ酸残基を同定する。VIAATはGABAだけでなくグリシンも基質とする。GABAとグリシンの輸送機構の違いを速度論的に解析する。ラ氏島細胞に発現する新規VIAATをクローニングし、既知のVIAATの輸送活性と比較する。

研究項目は(1)再構成系を用いたVIAATの構造と機能解析(2)膵臓ランゲルハンス氏島細胞における新規VIAATの構造と機能解析の2つに大別する。

3. 研究の方法

(1) 昆虫細胞とバキュロウイルス発現系によりラットVIAATのワイルドタイプ及び変異体タンパクを発現させ、細胞を回収し、膜画分を調製した。膜画分を2%オクチルグルコシドで可溶化し、遠心分離にて得られた上清をレジンと反応させた。レジンより60 mM イミダゾールにてタンパクを溶出した。一方、大腸菌F-ATPaseはグリセロール密度勾配遠心法により精製した。精製VIAATと大腸菌F-ATPaseは凍結融解法にてリポソームに再構成した。VIAATの輸送活性測定はセファデックスG-25をつめたカラムを用いた遠心法により行い、RIラベルされたGABA及びグリシンのリポソームへの取り込みを調べた。

(2) ラ氏島からmRNAを抽出し、キットを用いてcDNAライブラリーを作製した。以前ラ氏島において見つけた既知のVIAATと一部共通する塩基配列を用い、スクリーニングをした。

4. 研究成果

(1) VIAATにおけるGABAの輸送はATPに依存し(図1)、Km値は0.8 mM、Vmax値は41 nmol/min/mgであった。VIAATの輸送活性はF-ATPase阻害剤であるazideにより阻害されたが、V-ATPase阻害剤であるbafilomycin A1には阻害されなかった。ATPに依存的なGABAの取り込みはcarbonylcyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP)に感受性が大きいことから電気化学的ポテンシャル差を駆動力としていたと考えられた。また、Valinomycinによりコントロールと比べ24%まで減少し、K⁺存

在下においてnigericinにより57%まで減少した。そして,Valinomycinとnigericin共存下では活性はほとんど検出されなかった。さらに,プロトン勾配を消失する硫酸アンモニウムではGABAの取り込みはわずかに低下した。これらの結果から,このアッセイ系においてVIAATは主に膜電位差を輸送活性の駆動力とし,プロトン勾配も一部関与していることが明らかとなった。

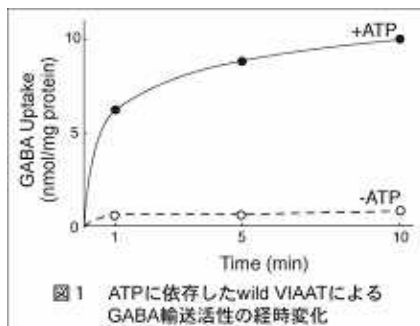
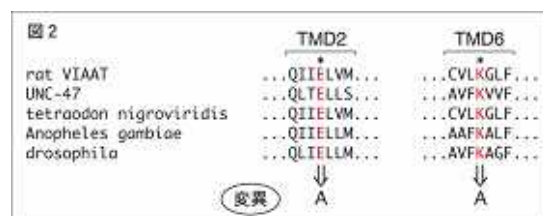


図1 ATPに依存したwild VIAATによるGABA輸送活性の経時変化

VIAAT 膜貫通領域 (TMD) において種の間で保存された電荷を持つアミノ酸に注目し,TMD2の213番目のグルタミン酸及びTMD6の351番目のリジンを部位特異的変異導入法によりアラニンに置換した(図2)。変異体Glu213Ala及びLys351AlaにおけるGABAの輸送活性を測定した。変異体Glu213AlaにおいてATPに依存したGABAの輸送はほぼ完全に阻害された。一方,変異体Lys351AlaにおけるGABAの輸送活性はワイルドタイプに比べ約80%であった。Glu213AlaのVmax値は検出できなかったが,Lys351AlaではKm値は1.0mM及びVmax値は50nmol/min/mgであった。したがって,VIAATにおけるGABAの輸送にはTMD2の213番目のグルタミン酸が必須であることが示唆された。



これまで,VIAATはグリシンも輸送すると考えられていたが,直接的な証拠はなかった。そこで,精製したVIAATとF-ATPaseをリポソームに再構成し,ATPに依存したグリシンの取り込みを検討した。グリシンの輸送においてKm値は2.8mM,Vmax値は5.3nmol/min/mgであり,GABAの輸送と比べ大きく異なった。さらに,イオノフォアやアンモニウムイオンの効果においても,GABAの輸送と比べ感受性が低かった。Glu213Alaにおいてグリシンの取り込みはほとんど検出できず,GABAと同様であった。

Lys351AlaではKm値は3.4mM,Vmax値は6.6nmol/min/mgであった。したがって,VIAATにおいてグリシンも輸送の基質になることが明らかとなった。さらに,VIAATのTM2にある213番目のグルタミン酸はGABAだけでなくグリシンの輸送にも必須であることが明らかになった。

(2)ラ氏島mRNA10µgから遺伝子ライブラリーを作製した。そして,約 1×10^8 pfu/mLのウイルス溶液を得た。これを用い一次スクリーニングをしたところ約40万個の遺伝子が得られた。最終的に8個の遺伝子が得られ,シークエンスを読んだところそのうち5個は既知のVIAATであり,残り3個は全て全長を含まない遺伝子であった。そこで,全長配列を含む遺伝子を得るため同じ遺伝子ライブラリーにおいて,N末に近いプローブを用い,スクリーニングをした。その結果41個の遺伝子が得られ,現在全ての遺伝子シークエンスを読んでいるところである。

(1)今回,VIAATにおけるGABA及びグリシンの輸送活性においてGlu213が必須のアミノ酸残基であることが明らかとなった。さらに,この高感度なインビトロ活性測定系を応用することにより,VIAAT輸送活性に必須の他のアミノ酸残基やVIAATの分泌小胞へのターゲティングに関わる分子基盤が明らかとなり,GABAシグナリングの全貌解明につながるだろう。

(2)今後,ラ氏島細胞に発現する新規VIAATをクローニングし,昆虫細胞とバキュロウイルス発現系により,タンパクを発現させ,インビトロ活性測定系を用いて輸送活性を測定する。そして,既知のVIAATと比較したいと考えている。

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2件)

(1) Akiko Muroyama, Makiko Inaka, Hiroaki Matsushima, Haruhiko Sugino, Yoshinori Marunaka, Yasuhide Mitsumoto Enhanced susceptibility to MPTP neurotoxicity in magnesium-deficient C57BL/6N mice.

Neurosci. Res. **63** (1): 72-75, 2009 査読有

(2) Mean-Hwan Kim, Shunsuke Uehara, Akiko Muroyama, Bertil Hille, Yoshinori Moriyama Duk-Su Koh

Glutamate Transporter-Mediated Glutamate Secretion in the Mammalian Pineal Gland.

J. Neurosci. **28** (43): 10852-10863, 2008
査読有

[学会発表](計9件)

(1) 川岸 緑
ストレス負荷 C57BL/6 マウスにおける MPTP
感受性の増大とドパミンの関与
日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 28 日
京都

(2) 豊島 李都子
MPTP 及び MPP⁺神経毒性に対する -リポ酸
の効果と作用機序
第 8 回日本ミトコンドリア学会年会 2008
年 12 月 19 日 東京

(3) 室山 明子
Glutamate Transporter-Mediated
Glutamate Secretion in the Mammalian
Pineal Gland.
BMB2008 2008 年 12 月 8 日 神戸

(4) 川岸 緑
ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞における
MPP⁺毒性に対するドパミンの影響
日本薬学会北陸支部第 119 回例会 2008 年
11 月 9 日 金沢

(5) 小林 星太
マウス脳シナプトソームにおける MPP⁺誘
発ミトコンドリア機能障害
第 51 回日本神経化学学会大会 2008 年 9 月
13 日 富山

(6) 樹下 成信
Vesicular inhibitory amino acid
transporter (VIAAT) transports
-alanine.
BMB2007 2007 年 12 月 14 日 横浜

(7) 川岸 緑
拘束ストレス負荷 C57BL/6 マウスにおける
MPTP 神経毒性の感受性増大について
日本薬学会北陸支部第 117 回例会 2007 年
11 月 11 日 金沢

(8) 稲中 牧子
Enhanced susceptibility to MPTP
neurotoxicity in magnesium-deficient
C57BL/6 mice. *Neuro* 2007 2007 年 9 月
12 日 横浜

(9) 稲中 牧子
マグネシウム欠損飼育 C57BL/6 マウスにお
ける黒質線条体ドパミン神経系 MPTP 感受
性増大について
日本薬学会北陸支部第 116 回例会 2007 年
7 月 7 日 金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室山 明子 (MUROYAMA AKIKO)
北陸大学・薬学部・助教
研究者番号: 00434473