

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790097

研究課題名(和文) 新規のコリン作動性神経賦活薬の開発と作用機序の解明

研究課題名(英文) A novel cholinergic enhancer and its mechanism of action

## 研究代表者

奥田 隆志 (OKUDA TAKASHI)

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：00322040

研究成果の概要(和文)：コリン作動性神経末端において高親和性コリントランスポーター(CHT1)はアセチルコリン合成の律速段階であるコリン輸送を担う。CHT1のトラフィッキング制御機構や構造機能相関についてはよく知られていない。我々は、輸送基質であるコリンによって誘導されるCHT1細胞内移行の分子機構を明らかにした。また、CHT1の膜貫通トポロジーとオリゴマー構造についても明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The high-affinity choline transporter (CHT1) is responsible for choline uptake, the rate-limiting step in acetylcholine synthesis at the cholinergic presynaptic terminals. Little is known about the regulation of the CHT1 trafficking or the structure-function relationship of CHT1. We revealed molecular mechanisms of substrate-induced internalization of CHT1. We also revealed the transmembrane topology and oligomeric structure of CHT1.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：コリン作動性神経、アセチルコリン、コリントランスポーター、トラフィッキング、トポロジー、オリゴマー

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会到来に伴い、アルツハイマー病などの認知症に向けた治療薬開発は急務である。認知症患者脳では前脳基底部から大脳皮質の広範な領域に投射するコリン作動性神経の脱落が顕著であり、認知機能障害の原因であると考えられている。現在までにアルツハイマー病の治療薬として開発されているコリンエステラーゼ阻害剤は、アセチルコリン分解を抑制してシナプス間隙のアセチルコリン実効濃度を高める効果があり、認知障害に対して改善作用を有することが知ら

れている。アセチルコリン受容体作動薬やアセチルコリン遊離促進薬、あるいはアセチルコリンの前駆体であるコリンなどもコリン作動性神経機能を賦活する目的で臨床試験が行われてきているものの、明らかな改善効果は見出されていない。一方、アセチルコリン合成・放出量を増大させる賦活薬についてはこれまであまり注目されてこなかった。

コリン作動性神経末端において合成されるアセチルコリンの前駆体であるコリンは、高親和性コリン取り込み系によって細胞外から輸送される。この輸送系を担う高親和性

コリントランスポーター(CHAT1)は 2000 年にクローニングされ、コリン作動性神経に特異的に発現することが明らかとなっている (Okuda et al., *Nature Neurosci.*, 2000)。CHAT1 はアセチルコリン合成の律速段階を担うため、その活性はアセチルコリン合成量を制御する重要な因子であり、CHAT1 はコリン作動性神経賦活薬の重要なターゲットである。事実、CHAT1 ノックアウトマウスはアセチルコリン合成能を欠き、致死である。最近ではコリン取りこみ制御機構はコリン作動性神経機能に重要な機構として国内外でも注目を集め、CHAT1 は重要な研究対象になりつつある。特に CHAT1 トラフィックによるアセチルコリン合成制御は、コリン作動性神経機能において極めて重要な機構として分子機序の解析が始まっている。しかし、現在までに国内外において CHAT1 を標的とするコリン作動性神経賦活薬開発に関する報告は為されておらず、そのような試みも知られていない。コリン作動性神経の重要機能であるアセチルコリン合成・放出を薬剤で制御するには、アセチルコリン合成酵素の機能制御や二次的な制御よりも、律速段階となる CHAT1 機能を直接的に制御することが重要である。本研究はコリン作動性神経機能の分子理解に関する基礎研究として重要であるだけでなく、コリン作動性神経賦活の創薬に関する応用研究に向けての重要な橋渡しとなることが期待された。

## 2. 研究の目的

CHAT はコリン作動性神経賦活薬の重要なターゲットであるが、その基礎情報は不足しており、特に細胞内トラフィック制御機構や構造機能相関についてはよく知られていない。CHAT1 の細胞内移行や機能調節の分子機構、トポロジー・オリゴマー構造などの構造機能相関を明らかにすることを目的とした。またこれまでに行ってきたコリン取り込み促進薬のスクリーニングで見出された化合物の CHAT1 に対する作用機序を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 輸送基質によって誘導される CHAT1 細胞内移行の詳細な分子機構の解析を行った。主に培養細胞発現系を用いて、基質であるコリンや阻害剤であるヘミコリニウムの前処理による細胞表面 CHAT1 発現量の変動を生化学的に解析した。 $[^3\text{H}]$ ヘミコリニウムを用いたリガンド結合実験、および細胞表面選択的なタンパク質ビオチン化・脱ビオチン化を用いたウェスタンブロットにより CHAT1 細胞内移行の詳細な反応速度論的解析を行った。またクラスリン系エンドサイトーシスに重要な機能分子に対する siRNA 実験や薬理学

的実験を行った。

(2) 以前に HEK293 細胞の CHAT1 恒常的高発現株を用いてコリン取り込み促進化合物のスクリーニングを行った。そこで見出された候補化合物について、主に培養細胞発現系を用いたリガンド結合解析や基質輸送解析により、それらの作用機序に関する検討を行った。

(3) CHAT1 の膜貫通トポロジーについて検討するため、CHAT1 の各種 Cys 変異体を作製して HEK293 細胞に発現させ、親水性 SH 基反応ビオチン化試薬を用いたビオチン化実験を行った。また、培養細胞発現系において、架橋処理、免疫沈降、不活型変異体の共発現による基質輸送解析などにより CHAT1 のホモオリゴマー形成に関する検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) CHAT1 の活性制御機構を解析する過程で、輸送基質であるコリンが CHAT1 の細胞内移行を誘導することを見出し、その分子メカニズムを明らかにした (Okuda et al., *J. Neurosci.*, 2011)。ラット脳シナプトソーム、前脳基底部初代培養系、培養細胞発現系のいずれにおいても、コリンは直接的に CHAT1 の細胞内移行を促進して細胞表面発現量を低下させる一方、競合的阻害剤であるヘミコリニウム-3 (HC-3) は細胞内移行を阻害して細胞表面発現量を上昇させた。siRNA 実験や薬理学的解析の結果から、少なくとも株化細胞発現系においては、CHAT1 細胞内移行は主としてクラスリン非依存性・ダイナミン依存性のエンドサイトーシス経路を介すると考えられた。また、細胞外 pH が CHAT1 の細胞内移行を制御して細胞表面発現量を変化させることも明らかにした。低 pH は CHAT1 の細胞内移行を促進して細胞表面発現量を低下させる一方、高 pH は細胞内移行を阻害して細胞表面発現量を上昇させた。CHAT1 は pH 依存的な HC-3 結合・コリン取り込み活性を示すことが知られており、その pKa 値とよく一致することから (pKa:  $\sim 7.5$ )、細胞外のプロトンが CHAT1 に直接作用することにより細胞内移行を制御することが示唆された。これらの分子制御機構は不明であるが、基質やプロトンが細胞内移行に促進的な作用を示し、競合的阻害剤が逆の作用を示すことから、CHAT1 タンパクのコンフォメーション変化が引き金になると考えられる。CHAT1 のコンフォメーション変化とエンドサイトーシスの共役機構を明らかにすることが今後の課題である。最近の研究から、CHAT1 は予想に反して細胞内のシナプス小胞に多く局在することが明らかとなってきたが、シナプス外液のコリン濃度は 1-10  $\mu\text{M}$  と考えられるので

CHT1のコリンに対する親和性を考慮すると ( $K_m$ :  $\sim 1 \mu M$ )、細胞外のコリンによって常時誘導される細胞内移行が CHT1 の定常的な細胞内局在に大きく寄与しているかもしれない。

(2) 我々は以前に化合物ライブラリーから CHT1 のリガンドスクリーニングを行い、テトラヒドロピリミジン系化合物 (morantel, pyrantel, oxantel) が CHT1 の競合的阻害剤であることを新たに見出したが、スクリーニングの過程でアドレナリン受容体のブロッカーである phenoxybenzamine (PBZ) が CHT1 の特異的 [ $^3H$ ]HC-3 結合活性を上昇させることも見出していた。そこで、PBZ の CHT1 に対する作用について詳細に検討を行った。HEK293 において、PBZ は濃度・処理時間依存的に特異的 [ $^3H$ ]HC-3 結合活性を約 10 倍に増大させた。 [ $^3H$ ]HC-3 結合置換実験の結果から、PBZ は CHT1 の HC-3 に対する親和性を増加させることがわかった。一方、基質であるコリンに対しては、PBZ は見かけ上の親和性を約 1,000 倍減少させた。なお、親水性ビオチン化試薬を用いた細胞表面タンパクの解析では、PBZ は細胞表面 CHT1 量を変化させなかった。CHT1 の変異体解析に関する予備的実験から、PBZ は hCHT1 分子内の特定のシステイン残基をアルキル化すると考えられる。PBZ によるアルキル化で引き起こされる CHT1 のコンフォメーション変化は、基質結合と阻害剤結合に対して大きく相反する効果を及ぼすと推測される。

(3) 各種 Cys 変異体に対する親水性 SH 基反応ビオチン化試薬を用いたシステイン・スキャンニング法により、CHT1 の膜貫通トポロジーを決定した (図 1; Okuda et al., *J. Biol. Chem.*, 2012)。

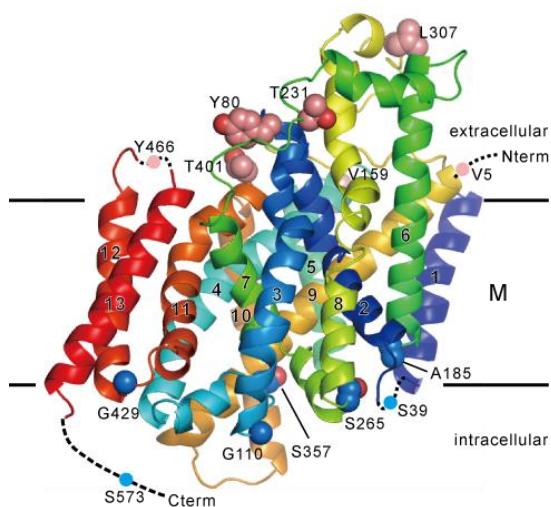


図 1 CHT1 高次構造のホモロジー・モデル

図 1 は、既に高次構造が明らかとなっているバクテリアのガラクトーストランスポーター (SGLT) とのホモロジーに基づいて構築した CHT1 のホモロジー・モデルである。変異を導入したアミノ酸残基の位置関係は予測通りであり、CHT1 は N 末端が細胞外、C 末端が細胞内に位置する 13 膜貫通タンパクであることが実験的に明らかとなった。

また、化学架橋・共免疫沈降・不活性型変異体共発現などの手法を用いて、CHT1 がホモオリゴマーを形成することを明らかにした。CHT1 は  $Na^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリー (SLC5) に属すが、この結果は SLC5 のメンバーにおけるホモオリゴマー形成の最初の実験的証拠となった。

#### 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 3 件)

1. Okuda, T., Osawa, C., Yamada, H., Hayashi, K., Nishikawa, S., Ushio, T., Kubo, Y., Satou, M., Ogawa, H., and Haga, T. Transmembrane topology and oligomeric structure of the high-affinity choline transporter. *J. Biol. Chem.* 査読有 287, 42826-42834 (2012)
2. Misawa, H., Hara, M., Tanabe S., Niikura, M., Moriwaki, Y., and Okuda, T. Osteopontin is an alpha motor neuron marker in the mouse spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 査読有 90, 732-742 (2012)
3. Okuda, T., Konishi, A., Misawa, H., and Haga, T. Substrate-induced internalization of the high-affinity choline transporter. *J. Neurosci.* 査読有 87, 3024-3032 (2011)

[学会発表] (計 2 件)

1. 小山沙織、美濃田茜、神保美紗子、三澤日出巳、奥田隆志；Substrate-induced internalization A novel screen for endocytic motifs of vesicular neurotransmitter transporters；第 35 回日本分子生物学会年会 (平成 24 年 12 月 11 日、福岡)
2. 神保美紗子、三澤日出巳、奥田隆志；シナプス小胞トランスポーターの細胞内移行モチーフの探索；第 124 回日本薬理学会関東部会 (平成 23 年 6 月 4 日、東京)

[図書] (計 3 件)

1. 奥田隆志、コリン作動性神経機能素子の制御機構、基礎老化研究 36 (3), 25-29 (2012)

2. 奥田隆志、高親和性コリントランスポーターの局在と機能、*Clinical Neuroscience* 30, 640-641 (2012)
3. 奥田隆志、神経変性疾患と創薬、新しい薬学事典 (朝倉書店) , 95-97 (2012)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥田 隆志 (OKUDA TAKASHI)  
慶應義塾大学・薬学部・講師  
研究者番号：00322040

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし