

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840033

研究課題名(和文)小胞型グルタミン酸トランスポーターの構造生物学

研究課題名(英文)Structural biology of Vesicular glutamate transporter

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題により、構造生物学的手法を用いて、ホモログタンパク質の結晶構造解析は飛躍的にその解像度を上げることができた。また、その成果については現在論文作成中であり、平成27年度中の論文化を目指す。また、小胞型グルタミン酸トランスポーターと同じ内膜系トランスポーターの解析についてPNAS、J.Neurochemに論文が提出できた事は、小胞型グルタミン酸トランスポーターの解析にフィードバックできる成果である。

研究成果の概要(英文)：In this project, I got the resolution data that is all most enough to publish. I am now making the article for this paper and I am now also making the better crystals. In the 2015, we will publish those results. And we also got the two papers in PNAS and J. Neurochem.. Those papers are related to inner membrane transporter that is same as vesicular glutamate transporter. Those data are also feedback to the analysis of Vesicular glutamate transporter.

研究分野：構造生物学

キーワード：VGLUT グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) はシナプス小胞内へのグルタミン酸を充填する能動輸送タンパク質であり、興奮性シグナル伝達の必須因子である。これまでの研究から、VGLUT の輸送に必須のアミノ酸残基や、グルタミン酸輸送の駆動力、Cl⁻ による制御機構があり、生体代謝産物との競合的阻害効果のある事等が明らかとなっていた。このことは、VGLUT を構造生物学的に解析する事で、興奮性シグナル伝達の必須因子である VGLUT を生化学的により理解を深められるだけでなく、そこをターゲットとした、創薬ターゲットにもつながる事となる。しかし、構造生物学的解析が進んでいなかったために、VGLUT の構造と制御機構を原子レベルで明らかに出来ていなかった。また、興奮性シグナル伝達以外の抑制性シグナル伝達や、その他神経シグナル伝達の研究もほとんど進んでおらず、これまで多くの構造が解かれているトランスポーターは、細胞膜型トランスポーターで、小胞型トランスポーターの研究も進んでいない。

2. 研究の目的

小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) はグルタミン酸をシナプス小胞内へ充填する膜分子でグルタミン酸化学伝達に必須である。VGLUT はシナプス小胞において V-ATPase が形成する膜電位差を駆動力とし、Cl⁻ の存在下、L がたグルタミン酸を輸送する。D-グルタミン酸や L-アスパラギン酸は VGLUT の基質ではない。VGLUT は 1-3 の三つのアイソフォームが存在し、それぞれイソ型の脳内分布は異なっている。それぞれのイソ型を遺伝的に欠損したマウスを用いて、VGLUT のグルタミン酸化学伝達における本質的な意義が明らかにされてきている。しかし、リコンビナント VGLUT を用いた良い機能評価系がなかったため、VGLUT の構造・機能研究は進んでいなかった。

2006 年に研究者は昆虫細胞を用いた VGLUT の大量発現・精製・人工膜との再構成系を構築し、世界で初めてトランスポーターの機能を単一タンパク質で解析する事に成功した。この系を用いて、VGLUT のグルタミン酸輸送が膜電位を駆動力としている事を確認し、グルタミン酸輸送に必須のアミノ酸残基を同定するとともに、グルタミン酸輸送は Cl⁻ により制御される事を見いだした。その後、ケトン体を含む一連の代謝産物が Cl⁻ と競合しこれがてんかん症状に関与する事、この制御に正の協同性が見られる事を明らかにした。

このように機能的、疾患病態学的にも重要なこのトランスポーターを構造生物学的に明らかにする事は創薬ターゲットや、機能を知る上でも重要である。また、構造生物学的に VGLUT を明らかにしていくことは他の小胞

型神経伝達物質トランスポーターをリードした研究となる事となる。ホモログタンパク質の結晶構造解析については、すでに結晶を得ており、さらに様々な条件検討から、立体構造解析の出来る回折データを得る事をその目的とし、変異体については、既に同定した必須アミノ酸残基また、これまで構築した精製トランスポーターの機能解析システムを用いて、小胞型トランスポーターや、オルガネラトランスポーターの機能解析から、VGLUT の機能・構造解析に還元していく。とともにほ乳類小胞型グルタミン酸トランスポーターの機能解析に向けての基盤を築く。

3. 研究の方法

結晶構造解析手法については、以前海外で二年半 Robert Stroud 教授と Robert Edwards 教授との共同研究で培った膜タンパク質結晶構造解析手法を用いて研究を行った。この方法は、大腸菌への発現系を用いて、VGLUT ホモログタンパク質を大量に発現させる。このタンパク質を界面活性剤を用いて可溶化し、タグを用いた精製と、FPLC を用いて分子量で分取する。分取したタンパク質を様々な結晶化条件で結晶化するというものであった。これまでの結晶は蒸気拡散法を用いた結晶化がその中心であったが、これに加えて LCP 法を用いた結晶化についても行った。これらの結果により、ホモログタンパク質の結晶構造解析の解像度は飛躍的に上昇し、いまだ、位相差結晶についてはデータ作成中であるが、分子置換法を用いたモデリングにも成功した。

また、機能解析については、これまで研究者が構築したタンパク質の大量発現・精製再構成系を用いて、小胞型グルタミン酸トランスポーターのホモログタンパク質の変異体、小胞型グルタミン酸トランスポーターの変異体、その他内膜系トランスポーターの機能解析を行った。変異体解析については、トランスポーター自身が電位差を感知する事、イオンと、電荷のある基質を認識・輸送する事から、電荷のある膜貫通領域のアミノ酸を中心に変異をして、構築した系で解析を行った。

4. 研究成果

本研究課題により、生化学、構造生物学両面から、成果を残すことができた。まず、構造生物学的な側面としては、まだ論文化という形にはなっていないが、小胞型グルタミン酸トランスポーターの結晶化論文において、重要な結晶構造の解像度について、飛躍的に解像度を上げることができた。また、位相差

結晶は未だに良い解像度を取ることができていないが、既に解かれた結晶構造を用いた、分子置換法を用いて、モデリングをするにも至っている。このことは、既に重要残基等の同定にもつながっており、構造生物学的解析後の生化学的解析にも大きく影響するデータを蓄積できていると考えている。以上のことから、平成27年度内の論文かを目指しているが、波及効果等非常に大きなものとなっている。また、生化学的解析については、3報の論文を提出することができた。これらはともに小胞がグルタミン酸トランスポーターを用いたものではないが、VGLUTと同じ、内膜系トランスポーターであり、駆動力が必要な二次性能動輸送体である。また、論文の内の一は小胞型GABAトランスポーターという、VGLUTと同じく、神経伝達物質をシナプス小胞内へ濃縮するトランスポーターの一つである。最近 in pressとなった論文はVGLUTと同じSLC17ファミリーのトランスポーターである。これらの論文については、トランスポーターは異なっているが、機能解析という点において、過去の研究成果に対し、新たな切り口から、より詳細な分子輸送メカニズムを解析することにつながったばかりか、これらの機能解析データは、同じ内膜系トランスポーターであるVGLUTの機能解析、構造解析に還元することができることから、その影響は非常に大きい。

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, Juge N., Omote H., Moriyama Y.
Vesicular GABA transporter (VGAT) transports α -alanine. *J. Neurochem* 127 482-6 (2013)
DOI. 10.1111/jnc.12393

査読有

- 2, Juge N., Moriyama S., Miyaji T., Kawakami M., Iwai H., Fukui T., Nelson N., Omote H., Moriyama Y.,
Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter is a H⁺-coupled polyspecific nutrient and drug exporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 3356-61 (2015)
DOI. 10.1073/pnas.1417102112

査読有

- 3, Togawa N., Juge N., Miyaji T., Hiasa M., Omote H., Moriyama Y.,
Wide expression of type I Na⁺/phosphate cotransporter 3 (NPT3/SLC17A2), a membrane potential-driven organic anion transporter.
Am. J. Physiol. Cell Physiology. In Press.

〔学会発表〕(計 4件)

- 1, 樹下成信
マラリア原虫クロロキントランスポーター (pfCRT)の機能解析
日本薬学会第 136 年会(H27.3.26-28 神戸)
- 2, 樹下成信
小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)の機能解析
日本薬学会第 135 年会(H26.3.27-30 熊本)
ポスター発表
- 3, 樹下成信
小胞型抑制性アミノ酸トランスポーター(VIAAT)はベータアラニンを輸送する。
第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (H25. 11.21-22 東京) 口頭発表
- 4, 樹下成信
小胞型 GABA トランスポーター(VGAT)はベータアラニンを輸送する。生化学会中国四国支部会 (H25. 5.30-31 徳島)口頭発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

6. 研究組織

(1)研究代表者

樹下成信

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