

# 研究報告書

## 「グルタミン酸のシナプス小胞充填機構の構造生物学的展開」

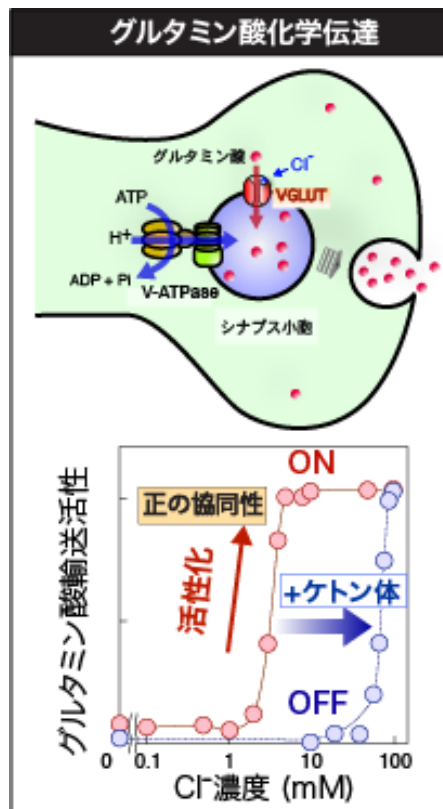
研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 樹下 成信

### 1. 研究のねらい

グルタミン酸は記憶・思考・行動といった高次精神活動を支える興奮性のシグナル伝達物質です。神経においてグルタミン酸はシナプス小胞というオルガネラに濃縮され、開口放出されて受容体に結合することで、シグナルを伝達します。グルタミン酸のシナプス小胞内への濃縮を司るのが、小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)です。VGLUT ノックアウトマウスを用いた解析等から、VGLUT がグルタミン酸科学伝達の必須因子であることは明らかにされてきましたが、内膜系のトランスポーターであることから、有効な活性測定系が見つからず、これまであまり研究が進んでいませんでした。私は 2006 年に小胞型グルタミン酸トランスポーターの一分子解析システムを構築し、詳細な解析を行ってきました。これにより、VGLUT には Cl<sup>-</sup>が必須で、VGLUT のグルタミン酸輸送に正の協同性を与えていること、そして、生体代謝産物で飢餓時や高脂肪食摂取時に増加するケトン体により Cl<sup>-</sup>結合部位が競合阻害されることなどを明らかにしました。さらに、2 年半の海外研究留学により結晶構造解析手法も学びました。そこで、本事業を通して VGLUT になぜ正の協同性が存在するのか？VGLUT の必須アミノ酸残基の同定、哺乳類及びホモログ VGLUT を用いた構造解析を行うことで、構造生物学的・生化学的視点から VGLUT を解析し、神経化学伝達の全貌解明に向けた VGLUT の役割を解明しています。



### 2. 研究成果

#### (1) 概要

小胞型グルタミン酸トランスポーターの構造生物学的・生化学的解析を行うにあたり、当初下記 4 つの研究テーマを設定し、研究を遂行してきた。

- (1) VGLUT 大腸菌ホモログタンパク質の結晶構造解析と基質共結晶体の作成。
- (2) 変異体を用いた VGLUT の速度論的解析
- (3) FRET を用いたオリゴマー解析

#### (4) 哺乳類 VGLUT の結晶構造解析

その中で、上記(2)～(4)についてはその性質上において、概要欄記載の正の協同性に関わる、タンパク質の性質により、タンパク質精製等非常に困難を極める結果となったが、この点を最近ブレークスルーすることに成功し、現在、論文作成に向けた研究の総仕上げをしているため、その点の記載を行う。また、(1)に関しては、共同研究者との関係上、概要に関しては詳細に記載するが、その内容は非公開の詳細として記載する。

#### (2) 詳細

##### (1) 大腸菌 VGLUT ホモログタンパク質を用いた機能、構造解析

こちらについては、inward、outward フォームを用いた解析結果を Nature 誌へ投稿中である。

##### (2)～(4) 哺乳類 VGLUT の機能構造解析と、私の構築した単一タンパク質機能解析システムの他のタンパク質への応用

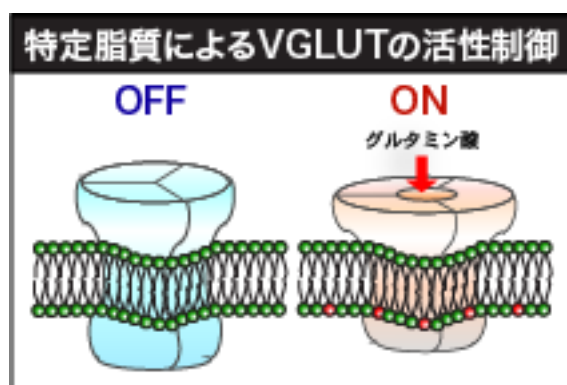
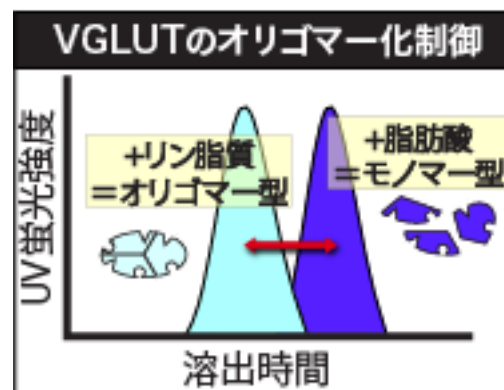
これまで VGLUT を精製し、機能解析や、多量体の解析をする上で、精製タンパク質がすでに多量体を組んでおり、精製後のタンパク質がうまくモノマー化しない。という問題点を上げてきた。実際、動的・静的光散乱手法や Native-PAGE を用いて解析しても、精製体はすでにオリゴマー化していた。

今回、たまたま精製タンパク質を脱塩後放置したものを SEC してみたところ、ピークの低分子側へのシフトが見られた。これを Native-PAGE すると、界面活性剤の量により4本のバンドを見ることができ、AFM の画像でも単量体として、確認することができた。このことから、VGLUT はテトラマーとして機能していることが推察される。

さらに驚くべきことに、これに脂質を添加すると、タンパク質が再会合し、オリゴマー化することを発見した。このことは多量体化に脂質が影響していることを AFM 及び Native-PAGE で見ることができた。

ではなぜ、VGLUT のオリゴマー化に脂質が関与し、脂質とタンパク質の相互作用があるのか。この点に関して、VGLUT が局在するシナプス小胞は開口放出時細胞膜にも存在することを以前の論文において電子顕微鏡画像で明らかにされていたことに着目した。これまでの研究成果により、シナプス小胞及び、細胞膜では脂質の組成(PC、PE、PS、PI 等)は異なっている。これらの脂質の組成の異なりにより、オリゴマー化・モノマー化の制御が働いているのではないかと考え、様々な脂質の組成の異なる Phospholipid や脂質単体による変化を調べた。

実際は、どのリン脂質でもオリゴマー化をすることが明らかとなった。このことは、Phospholipids の脂質の不飽和結合と、リン酸結合が、会合に重要であることを示唆するデータと言えるが、もう一つ、脂質組成により、Native-PAGE の分子量も異なることを明ら



かにすることができた。

脂質の組成の異なる様々な Lipid を VGLUT と mix すると、特定脂質の多い条件でのみ、Native-PAGE のバンド位置が若干変化した。これは、特定脂質の濃度を变化させた人工脂質でも同様の結果を得た。このことを、様々な観点から確認するため、機能解析や、金沢大学との共同研究で原子間力顕微鏡を用いた研究により、特定脂質の多い条件でのみ、輸送活性があり、さらに、膜外ドメインの高さの変化から、構造変化を起こしていることを明らかにした。

このことは、生体内の現象とどのようにリンクするのか。VGLUT はもともとシナプス小胞などの内膜系オルガネラに存在するトランスポーターであるが、シナプス小胞などは、常に、動的存在

であり、エキソサイトーシスやエンドサイトーシスの過程で細胞膜に局在することが知られている。また、それぞれの脂質組成を調べた研究から、内膜系では特定脂質が外膜に比べて多いことも知られている。これらから考えられる機構として、VGLUT は細胞膜に存在するとき、機能を OFF する必要があり、これを脂質が担っているのではないかと考えている。こちらについては、今後の課題として、研究していきたい。

さらに、生体試料を用いた解析でも VGLUT がオリゴマー化していることを明らかにした。VGLUT は製造過程で、様々なタンパク質と結合してシナプス小胞に輸送されてきている。また、VGLUT はシナプス小

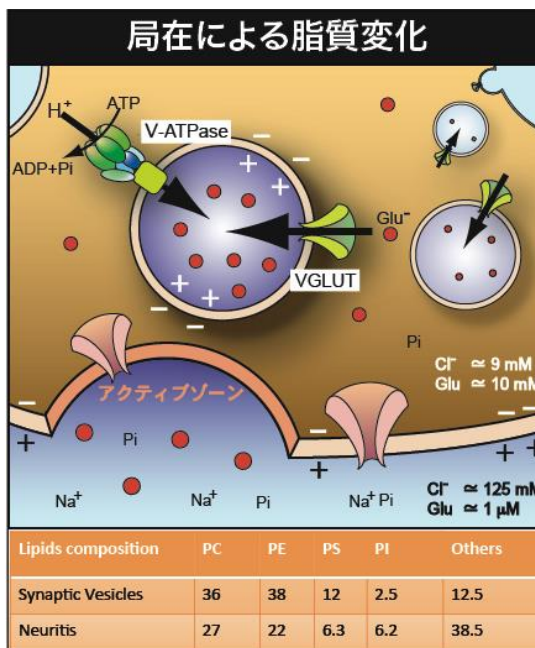
胞のみならず、細胞膜上にも存在することがすでに明らかにされており、これらの、会合や、機能変化は、生体内での動態と一致する結果といえ、これらを明らかにすることができたことは、VGLUT の今後の研究展開において、非常に大きな布石を得ることができたものと考えている。

ただ、今回、哺乳類 VGLUT の結晶構造を得ることは成功しなかったが、上記の脂質による構造変化や、脂質添加による、SEQ プロファイルの変化は構造解析にも非常に重要な知見といえ、これらを元に、結晶条件の再スクリーニングができることは、かなり大きな進展であると考えている。

そして、最後になるが、VGLUT の機能解析のみならず、阻害剤探索等の観点から、私の構築した機能解析システムを他のタンパク質へ応用し、様々な薬剤等を用いた解析に応用できることを確認することも、重要であった。こちらについては、エフォートとしては大きくないが、PfCRT という薬剤排出タンパク質でカチオン性薬剤のスクリーニングを行い、PNAS 誌に掲載されたり、VGLUT や、VGLUT と同じファミリーのトランスポーターの機能解析により、アニオン性薬剤を用いた解析にもこの系が有効であることを Epilepsia 誌、Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 誌で明らかにすることができた。

### 3. 今後の展開

本研究により、VGLUT が脂質により制御されていることが明らかとなったが、今後、未だ、



下記の点については未解明のままである。

(1) VGLUT の脂質結合部位

(2) なぜ、リン脂質により、オリゴマー化するのか。

(3) VGLUT のモノマー及びオリゴマー化した状態での結晶構造解析

VGLUT の脂質結合部位については、脂質が VGLUT に結合することが明らかとなって以降、疎水性結合や、リン酸結合部位と考えられる残基を中心に変異体を作成し、解析をしている。さらに、なぜ、オリゴマー化する必要があるのか。という点は、オリゴマー化に関わるアミノ酸残基を同定後に、これを変異したマウス等を用いた解析から明らかにしていきたいと考えている。これらについては、ソーティングに関与することが考えられるため、様々なソーティング関連タンパク質との相互作用変化等についても検討していく。

哺乳類 VGLUT の構造解析については今回の研究項目の中で唯一到達できなかった事項ではあるが、今回、制御機構がわかったことで、脂質との制御機構をベースとした構造解析を行うことが最重要であるということがわかった。検討事項が明確となったことで、条件のスクリーニング等も非常にやりやすくなったことから、早々の結果の排出に向けて努力をしていきたい。

#### 4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

構造生物学的・生化学的な哺乳類 VGLUT の解析において、VGLUT のオリゴマー化をコントロールすることができず、非常に苦労をしたが、第 9 回の領域会議後に、脂質が VGLUT のオリゴマーを制御していることを突き止めたことで、研究が飛躍的に進んだ。研究を進めることで、VGLUT のオリゴマー化、モノマー化を簡便にコントロールできるようになり、機能的にも、特定資質による活性制御があることを見出し、これが神経化学伝達上合理性の高い機能であることから、この発見は、構造生物学的展開としても、神経化学伝達の全貌解明という点においても、大きな布石となったと考えている。大腸菌型 VGLUT の結晶解析は 2016 年に投稿後却下され、その後新しい構造を追加して、再投稿をしている。本研究テーマでの研究機関内での論文文化は達成できなかったが、それぞれのテーマにおいて、近々に論文を提出できるデータを創出できたことは、非常に大きな成果である。と考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年 2 回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

シナプス小胞にグルタミン酸を充填する VGLUT の構造と機能を解明する過程において、脂質が VGLUT のオリゴマーを制御していることを AFM, Native PAGE により突き止めたことで、研究が飛躍的に進んだ。研究を進めることで、VGLUT のオリゴマー化、モノマー化を簡便にコントロールできるようになり、機能的にも、特定脂質による活性制御があることを見出し、これが神経化学伝達上合理性の高い機能であることから、この発見は、構造生物学的展開としても、神経化学伝達の解明に非常に大きな一歩となったと考える。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |   |
|---|
| 1. Neuronal inhibition and seizure suppression by acetoacetate and its analog, 2-phenylbutyrate.<br>Kadwaki A., Sada N., <b>Juge N.</b> , Wakasa A., Moriyama Y., Inoue T.<br><i>Epilepsia</i> <b>58</b> 845-57 (2017)  |
| 2. Wide expression of type I Na <sup>+</sup> /phosphate cotransporter 3 (NPT3/SLC17A2), a membrane potential-driven anion transporter.<br>Togawa N., <b>Juge N.</b> , Miyaji T., Hiasa M., Omote H., and Moriyama Y.<br><i>Am. J. Physiol. Cell Physiol.</i> <b>20</b> 582-92 (2015)                          |
| 3. Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter is a H <sup>+</sup> -coupled polyspecific nutrient and drug exporter.<br><b>Juge N.</b> , Moriyama S., Miyaji T., Kawakami M., Iwai H., Fukui T., Nelson N., Omote H., Moriyama Y.<br><i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>112</b> 3356-61 (2015) |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

企業からの招待講演

樹下成信

トランスポーターの生化学的・構造生物学的展開

GE ヘルスケア「初めてのライフサイエンス基礎講座」

岡山 H27.05.15 口頭発表

受賞

1. 上原記念生命科学財団 若手研究奨励

耐性化のない抗マラリア薬創生に向けた PfCRT の機能解析

2. 鈴木謙三記念医科学応用研究財団

小胞型神経伝達物質トランスポーターを標的とした新規シグナル伝達制御システムの開発