慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	小胞型神経伝達物質トランスポーターのエンドサイトーシス機構の解析
Sub Title	Molecular mechanisms of endocytosis of vesicular neurotransmitter transporters
Author	奥田, 隆志(Okuda, Takashi)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2018
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	小胞型神経伝達物質トランスポーターは神経伝達物質をシナプス小胞に充填する重要な役割を担う。小胞型神経伝達物質トランスポーターがクラスリン依存性エンドサイトーシスを介し細胞内に移行することは, シナプス伝達の持続に不可欠である。クラスリン依存性エンドサイトーシスではクラスリンアダプタータンパク質AP2が標的膜タンパク質の細胞質側領域に存在する短いシグナル配列を認識して結合する。主要なシグナル配列は, チロシンモチーフ(YXXΦ, Φは大型の疎水性アミノ酸残基を表す)とジロイシンモチーフ((D/E)XXXL(L/I))である。AP2はα, β2, μ2, σ2の4つのサブユニットから構成されるヘテロ四量体であり, チロシンモチーフとジロイシンモチーフは, μ2とα/σ2にそれぞれ結合することが明らかになっている。申請者は, 小胞型GABAトランスポーターVGATと小胞型グルタミン酸トランスポーターVGLUT1の細胞質側領域内に共通して存在する新規のエンドサイトーシス・シグナル配列を同定した。 本研究では, このシグナル配列とAP2との結合様式を明らかにするため, 東京大学の小川治夫博士・豊島近博士との共同研究により, シグナル配列を含むペプチドとAP2の複合体についてX線結晶構造解析を目指した。AP2を構成する4つのサブユニットを大腸菌に共発現させ, グルタチオンセファロースとNi-NTA agaroseによるカラム精製, 並びにゲルろ過クロマトグラフィーによってAP2複合体を精製した。発現・精製系の改良により, 精製タンパクの収量は1L培養液あたり1 mgとなった。次に, この精製AP-2を用いてAP2単体の結晶化を試みた。結晶化溶液の沈殿剤濃度やpHについて主に条件検討を行っているが, 現時点では結晶化に成功していない。 Vesicular neurotransmitter transporters play essential roles in the loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. Internalization of vesicular neurotransmitter transporters via the clathrin-mediated endocytosis is indispensable for sustaining synaptic transmission. The major endocytic clathrin adaptor AP2 recognizes and binds to a short endocytic signal sequence within the cytoplasmic region of the cargo in the clathrin-mediated endocytosis. The most common endocytic signals are the tyrosine (YxxΦ, where Φ represents a bulky hydrophobic residue) and dileucine ([DE]XXXL[LI]) motifs. AP2 is a heterotetramer consisting of α, β2, μ2, and σ2 subunits. The tyrosine and dileucine motifs are recognized by AP2 μ2 and α-σ2 hemicomplex, respectively. We found a novel endocytic signal sequence shared by the vesicular GABA transporter VGAT and vesicular glutamate transporter VGLUT1. In this study, X-ray crystal structure analysis of AP2 in complex with a peptide from VGAT is aimed at clarifying the binding mode of the peptide with AP2 (in collaboration with Drs. Haruo Ogawa and Chikashi Toyoshima, the University of Tokyo). The four subunits of the AP2 core were co-expressed in Escherichia coli. The AP2 complex was bound to glutathione-sepharose and Ni-NTA agarose, and then purified by gel filtration. The yield was 1 mg of purified AP2 per liter of culture. Crystallization conditions were examined by varying the precipitant concentration and pH in preliminary experiments.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2017000001-20170138

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2017 年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

2018 年 4 月 5 日

研究代表者	所属	薬学部	職名	准教授	補助額	300 （A） 千円
	氏名	奥田 隆志	氏名（英語）	Takashi Okuda		

研究課題（日本語）

小胞型神経伝達物質トランスポーターのエンドサイトーシス機構の解析

研究課題（英訳）

Molecular mechanisms of endocytosis of vesicular neurotransmitter transporters

１．研究成果実績の概要

小胞型神経伝達物質トランスポーターは神経伝達物質をシナプス小胞に充填する重要な役割を担う。小胞型神経伝達物質トランスポーターがクラスリン依存性エンドサイトーシスを介し細胞内に移行することは、シナプス伝達の持続に不可欠である。クラスリン依存性エンドサイトーシスではクラスリンアダプタータンパク質 AP2 が標的膜タンパク質の細胞質側領域に存在する短いシグナル配列を認識して結合する。主要なシグナル配列は、チロシンモチーフ（YXXΦ，Φ は大型の疎水性アミノ酸残基を表す）とジロイシンモチーフ（(D/E)XXXL(L/I)）である。AP2 は α，β2，μ2，σ2 の 4 つのサブユニットから構成されるヘテロ四量体であり、チロシンモチーフとジロイシンモチーフは、μ2 と α/σ2 にそれぞれ結合することが明らかになっている。申請者は、小胞型 GABA トランスポーター VGAT と小胞型グルタミン酸トランスポーター VGLUT1 の細胞質側領域内に共通して存在する新規のエンドサイトーシス・シグナル配列を同定した。本研究では、このシグナル配列と AP2 との結合様式を明らかにするため、東京大学の小川治夫博士・豊島近博士との共同研究により、シグナル配列を含むペプチドと AP2 の複合体について X 線結晶構造解析を目指した。AP2 を構成する 4 つのサブユニットを大腸菌に共発現させ、グルタチオンセファロースと Ni-NTA agarose によるカラム精製、並びにゲルろ過クロマトグラフィーによって AP2 複合体を精製した。発現・精製系の改良により、精製タンパクの収量は 1 L 培養液あたり 1 mg となった。次に、この精製 AP-2 を用いて AP2 単体の結晶化を試みた。結晶化溶液の沈殿剤濃度や pH について主に条件検討を行っているが、現時点では結晶化に成功していない。

２．研究成果実績の概要（英訳）

Vesicular neurotransmitter transporters play essential roles in the loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. Internalization of vesicular neurotransmitter transporters via the clathrin-mediated endocytosis is indispensable for sustaining synaptic transmission. The major endocytic clathrin adaptor AP2 recognizes and binds to a short endocytic signal sequence within the cytoplasmic region of the cargo in the clathrin-mediated endocytosis. The most common endocytic signals are the tyrosine (YxxΦ, where Φ represents a bulky hydrophobic residue) and dileucine ([DE]XXXL[LI]) motifs. AP2 is a heterotetramer consisting of α, β2, μ2, and σ2 subunits. The tyrosine and dileucine motifs are recognized by AP2 μ2 and α-σ2 hemicomplex, respectively. We found a novel endocytic signal sequence shared by the vesicular GABA transporter VGAT and vesicular glutamate transporter VGLUT1. In this study, X-ray crystal structure analysis of AP2 in complex with a peptide from VGAT is aimed at clarifying the binding mode of the peptide with AP2 (in collaboration with Drs. Haruo Ogawa and Chikashi Toyoshima, the University of Tokyo). The four subunits of the AP2 core were co-expressed in Escherichia coli. The AP2 complex was bound to glutathione-sepharose and Ni-NTA agarose, and then purified by gel filtration. The yield was 1 mg of purified AP2 per liter of culture. Crystallization conditions were examined by varying the precipitant concentration and pH in preliminary experiments.

３．本研究課題に関する発表

発表者氏名 （著者・講演者）	発表課題名 （著書名・演題）	発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）