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

Title	神経疾患に関連するコリン作動性神経機能素子の機能解析
Sub Title	Functional properties of choline transporter mutants associated with congenital myasthenic syndrome
Author	奥田, 隆志(Okuda, Takashi)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	高親和性コリントランスポーター（CHT1）は、コリン作動性神経末端においてNa+依存的なコリン取り込みを示し、アセチルコリン前駆体供給の役割を担う。CHT1はコリン作動性神経に特異的に発現している。CHT1を介するコリン輸送はアセチルコリン合成の律速段階であるため生理的に重要であり、実際にCHT1遺伝子欠損マウスはコリン取り込み能の欠如により生後間もなく致死となる。CHT1遺伝子変異を原因とする疾患の一つに、常染色体劣性遺伝性の先天性筋無力症候群がある。これは神経筋接合部に関わる分子の遺伝子変異を原因とする疾患であり、筋力低下や易疲労性、呼吸不全などの症状を引き起こし、重症の場合は致死となる。本研究では、先天性筋無力症候群に関連する変異について、19種類のCHT1変異体（D48G, G65E, S94R, P105S, R107H, Y111H, V112E, Y175C, P210L, S263F, I291T, A296T, P310L, V344L, R361Q, Y414N, F418V, R446G, S487P）を部位特異的変異導入により作製し、HEK293T細胞に発現させて各変異体の機能特性を調べた。まず、形質膜発現量を評価するため、親水性のビオチン化試薬を用いて形質膜タンパク質を精製し、ウエスタンブロットで解析した。その結果、R107H, Y175C, P310L, V344L, R446G以外の14種類の変異体では形質膜発現量が野生体に比べて25%以下であった。次に、CHT1変異体のコリン取り込み活性を評価したところ、全ての変異体について野生体の25%以下であった。本研究結果から、19種類のCMS関連CHT1変異体全てにおいてコリン取り込み活性の顕著な低下がみられ、その多くは形質膜発現量の低下に起因することが明らかとなった。 At cholinergic presynaptic terminals, the high-affinity choline transporter CHT1 mediates Na+-dependent choline uptake for acetylcholine synthesis. CHT1 is exclusively expressed in cholinergic neurons. CHT1-mediated choline uptake is pivotal for cholinergic function because choline uptake is the rate-limiting step in acetylcholine synthesis. In fact, genetic deletion of CHT1 in mice causes lethal respiratory paralysis. Recent studies revealed that mutations within the human CHT1 gene were associated with human diseases, such as congenital myasthenic syndrome. To examine the functional impact of the CHT1 mutations identified in this syndrome, we generated a series of 19 mutants by site-directed mutagenesis (mutants: D48G, G65E, S94R, P105S, R107H, Y111H, V112E, Y175C, P210L, S263F, I291T, A296T, P310L, V344L, R361Q, Y414N, F418V, R446G, and S487P) and examined functional properties of these CHT1 mutants expressed in HEK293T cells. Cell-surface biotinylation assays using a membrane-impermeable biotin reagent were performed to assess CHT1 cell-surface expression. Immunoblot analysis showed that most of the mutants (except for R107H, Y175C, P310L, V344L, and R446G) showed less than 25% of cell-surface expression level compared with the wild type. We next measured choline uptake activity of each mutant. All 19 mutants showed impaired choline uptake activity compared with the wild type (0-25%). These results indicate that most of the CHT1 mutants show impaired choline uptake activity with a concomitant change in cell-surface expression level.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230081

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.

2024年4月10日

2023年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

研究代表者	所属	薬学部	職名	准教授	補助額	500千円（特Ｂ）
	氏名	奥田 隆志	氏名（英語）	Takashi Okuda		

研究課題（日本語）

神経疾患に関連するコリン作動性神経機能素子の機能解析

研究課題（英訳）

Functional properties of choline transporter mutants associated with congenital myasthenic syndrome

１．研究成果実績の概要

高親和性コリントランスポーター（CHT1）は、コリン作動性神経末端においてNa+依存的なコリン取り込みを示し、アセチルコリン前駆体供給の役割を担う。CHT1はコリン作動性神経に特異的に発現している。CHT1を介するコリン輸送はアセチルコリン合成の律速段階であるため生理的に重要であり、実際にCHT1遺伝子欠損マウスはコリン取り込み能の欠如により生後間もなく致死となる。CHT1遺伝子変異を原因とする疾患の一つに、常染色体劣性遺伝性の先天性筋無力症候群がある。これは神経筋接合部に関わる分子の遺伝子変異を原因とする疾患であり、筋力低下や易疲労性、呼吸不全などの症状を引き起こし、重症の場合は致死となる。本研究では、先天性筋無力症候群に関連する変異について、19種類のCHT1変異体（D48G, G65E, S94R, P105S, R107H, Y111H, V112E, Y175C, P210L, S263F, I291T, A296T, P310L, V344L, R361Q, Y414N, F418V, R446G, S487P）を部位特異的変異導入により作製し、HEK293T細胞に発現させて各変異体の機能特性を調べた。まず、形質膜発現量を評価するため、親水性のビオチン化試薬を用いて形質膜タンパク質を精製し、ウエスタンブロットで解析した。その結果、R107H,　Y175C, P310L, V344L, R446G以外の14種類の変異体では形質膜発現量が野生体に比べて25%以下であった。次に、CHT1変異体のコリン取り込み活性を評価したところ、全ての変異体について野生体の25%以下であった。本研究結果から、19種類のCMS関連CHT1変異体全てにおいてコリン取り込み活性の顕著な低下がみられ、その多くは形質膜発現量の低下に起因することが明らかとなった。

２．研究成果実績の概要（英訳）

At cholinergic presynaptic terminals, the high-affinity choline transporter CHT1 mediates Na+-dependent choline uptake for acetylcholine synthesis. CHT1 is exclusively expressed in cholinergic neurons. CHT1-mediated choline uptake is pivotal for cholinergic function because choline uptake is the rate-limiting step in acetylcholine synthesis. In fact, genetic deletion of CHT1 in mice causes lethal respiratory paralysis. Recent studies revealed that mutations within the human CHT1 gene were associated with human diseases, such as congenital myasthenic syndrome. To examine the functional impact of the CHT1 mutations identified in this syndrome, we generated a series of 19 mutants by site-directed mutagenesis (mutants: D48G, G65E, S94R, P105S, R107H, Y111H, V112E, Y175C, P210L, S263F, I291T, A296T, P310L, V344L, R361Q, Y414N, F418V, R446G, and S487P) and examined functional properties of these CHT1 mutants expressed in HEK293T cells. Cell-surface biotinylation assays using a membrane-impermeable biotin reagent were performed to assess CHT1 cell-surface expression. Immunoblot analysis showed that most of the mutants (except for R107H, Y175C, P310L, V344L, and R446G) showed less than 25% of cell-surface expression level compared with the wild type. We next measured choline uptake activity of each mutant. All 19 mutants showed impaired choline uptake activity compared with the wild type (0-25%). These results indicate that most of the CHT1 mutants show impaired choline uptake activity with a concomitant change in cell-surface expression level.

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）