

Title	シナプス前性機能素子の局在制御機構
Sub Title	Regulatory mechanisms for endocytosis of presynaptic molecules
Author	奥田, 隆志(Okuda, Takashi)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>クラスリン依存性エンドサイトーシス・シグナル配列検索系を新規に構築した。この系を用いて小胞GABAトランスポーターVGATのエンドサイトーシス・シグナル配列の探索を行い, N末端領域内のPhe-44を中心とする新しいタイプのシグナル配列を見出した。VGATはこのシグナル配列を介してAP2と結合し, クラスリン依存性エンドサイトーシスによってシナプス小胞に局在することを明らかにした。</p> <p>A novel assay was devised to search a signal sequence of the clathrin-mediated endocytosis. We found a novel endocytic signal sequence within the N-terminal region of the vesicular GABA transporter VGAT. VGAT is targeted to synaptic vesicles via the clathrin-mediated endocytosis pathway in which this signal sequence is involved.</p>
Notes	<p>研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2013～2015 課題番号：25430074 研究分野：神経生化学</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25430074seika

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.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430074

研究課題名(和文) シナプス前性機能素子の局在制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms for endocytosis of presynaptic molecules

研究代表者

奥田 隆志 (Okuda, Takashi)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：00322040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：クラスリン依存性エンドサイトーシス・シグナル配列検索系を新規に構築した。この系を用いて小胞GABAトランスポーターVGATのエンドサイトーシス・シグナル配列の探索を行い、N末端領域内のPhe-44を中心とする新しいタイプのシグナル配列を見出した。VGATはこのシグナル配列を介してAP2と結合し、クラスリン依存性エンドサイトーシスによってシナプス小胞に局在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A novel assay was devised to search a signal sequence of the clathrin-mediated endocytosis. We found a novel endocytic signal sequence within the N-terminal region of the vesicular GABA transporter VGAT. VGAT is targeted to synaptic vesicles via the clathrin-mediated endocytosis pathway in which this signal sequence is involved.

研究分野：神経生化学

キーワード：小胞型トランスポーター エンドサイトーシス シグナル配列

1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは、栄養成分・シグナル分子の取り込みだけでなく、膜タンパク質の細胞内移行や受容体を介するシグナル伝達など多彩な細胞機能に関与する。多種のエンドサイトーシス経路の中で、クラスリン依存性の経路はエンドサイトーシスの中で最も研究が進展している。G タンパク質共役型受容体や増殖因子受容体などではリガンド結合によりクラスリン依存性エンドサイトーシスが促進される場合が多く、その制御機構は細胞内シグナル伝達に多大な影響を及ぼす。神経系では、シナプス伝達機能素子の細胞内局在はクラスリン依存性エンドサイトーシスで制御されるものが多く、特に神経伝達物質トランスポーターなどのシナプス小胞の機能素子ではクラスリン依存性エンドサイトーシスはその局在に重要な影響を及ぼす。

クラスリン依存性エンドサイトーシスにおいては、これまでに受容体などのカーゴの細胞内領域に存在するチロシンモチーフやジロイシンモチーフなど幾つかのエンドサイトーシス・シグナル配列が同定されてきた。これらのコンセンサス配列は非常に短く、多様なアミノ酸配列が許容される。カーゴとアダプタータンパク質の相互作用は比較的弱く、一過性の複合体を形成することによりアダプタータンパク質が次のラウンドのエンドサイトーシスに効率よくリサイクルされるものと考えられる。しかし、未だにカーゴとクラスリン系アダプタータンパクとの相互作用ならびにその制御の分子機構は不明な点が多く、特にシナプス小胞の神経伝達物質トランスポーターでは細胞内局在制御機構が不明なものが多い。

2. 研究の目的

本研究では、培養細胞発現系における再構成的アプローチによるクラスリン依存性エンドサイトーシス・シグナル配列検索系を新しく構築して、幾つかのシナプス小胞に局在する神経伝達物質トランスポーターをモデル分子としてエンドサイトーシス・シグナル配列の探索を行う。更にシグナル配列に結合

するタンパク質を同定することにより、それらの相互作用の分子機構とその時空間的な制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) エンドサイトーシス・シグナル配列のスクリーニング

ムスカリン M2 受容体の第 3 細胞内領域に VGAT の各細胞質側領域を挿入したキメラ受容体を HEK293 細胞に発現させ、親水性リガンド *N*-[³H]methylscopolamine を用いたリガンド結合実験を行い、クラスリン依存的な定常的細胞内移行を評価した。

(2) シグナル配列変異体の細胞内局在の解析

VGAT の各種変異体を HEK293 細胞や PC12D 細胞に発現させ、親水性ビオチン化試薬を用いた細胞表面発現量の定量化や、抗体染色により、細胞内局在を解析した。また、各種変異体をラット海馬初代培養神経細胞に発現させ、抗体染色によりシナプス局在などを解析した。

(3) in vitro 結合実験

VGAT の細胞質側領域を His タグあるいは GST 融合タンパク質として大腸菌で大量発現させ、精製した。これらの組換えタンパク質を用いて、ラット脳可溶画分、あるいはバキュロウィルス-昆虫細胞発現系で作製した AP2 各サブユニット組換えタンパク質との相互作用をプルダウンアッセイにより解析した。

4. 研究成果

G タンパク質共役型受容体の一つであるムスカリン性アセチルコリン受容体 M2 サブタイプをレポーター分子として利用し、目的タンパク質の細胞質側領域を各々ムスカリン M2 受容体の第 3 細胞内ループ欠損部位に挿入したキメラ受容体を作製した。これらを GTP 水解活性欠損のダイナミン・ドミナントネガティブ変異体共発現下あるいはクラスリン・ドミナントネガティブ変異体共発現下で培養細胞に発現させ、細胞表面のムスカリン

受容体のみ結合する親水性リガンド [³H]NMS を用いたリガンド結合実験によりダイナミン依存的あるいはクラスリン依存的な定常的エンドサイトーシスの解析を行った。予備実験として小胞アセチルコリントランスポーター-VAcHT の細胞質側領域を検討したところ、C 末端領域に既知のエンドサイトーシス・シグナル配列を確認することができた。次に、シグナル配列がよく知られていない小胞 GABA トランスポーター-VGAT シグナル配列の探索を行った。各細胞質側領域を検討したところ、N 末端領域において Phe-44 を中心とする新しいタイプのエンドサイトーシス・シグナル配列を同定した。VGAT の各種変異体を HEK293 細胞や PC12D 細胞に発現させて細胞内局在を解析した結果、Phe-44 を中心とするシグナル配列が VGAT のエンドサイトーシスに重要であった。VGAT のシグナル配列を Ala に置換させた変異体をラット海馬初代培養神経細胞に発現させてシナプスでの局在を解析したところ、シナプス小胞より形質膜に多く局在しており、このシグナル配列は VGAT のシナプスにおけるエンドサイトーシスに重要であることが分かった。

次に、VGAT の N 末端領域を His タグあるいは GST 融合タンパク質として大腸菌で大量発現・精製した。これらを用いてラット脳可溶画分のプルダウンアッセイを行った結果、クラスリン系アダプタータンパク質 AP2 と相互作用することを見出した。この結合は、Phe-44 を中心とするシグナル配列に依存的であった。AP2 は alpha, beta2, mu2, sigma2 からなるヘテロ四量体であるが、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系による AP2 各サブユニットの組換えタンパク質との相互作用を解析した結果、VGAT は alpha/sigma2 複合体と特異的に結合することを見出し、その結合様式はジロイシンモチーフと類似していることが分かった。

VGAT は Phe-44 を中心とするシグナル配列を介して AP2 と結合し、クラスリン依存性エンドサイトーシスを介してシナプス小胞に局在すると考えられる。

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)

[学会発表](計5件)

1. 奥田隆志;小胞神経伝達物質トランスポーターのエンドサイトーシス・局在の分子機構;第88回日本薬理学会年会;平成27年3月;名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
2. 森崎祐太, 坪田充司, 森脇康博, 奥田隆志, 山中宏二, 三澤日出巳;オステオポンチンはマウス脊髄におけるアルファ運動ニューロンサブタイプの新規マーカーである;第37回日本神経科学大会;平成26年9月;パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
3. 奥田隆志, 美濃田茜, 三澤日出巳;シナプス小胞トランスポーターのエンドサイトーシス・シグナル配列の同定;第9回トランスポーター研究会年会;平成26年6月;名古屋市立大学(愛知県名古屋市)
4. 岩崎愛里, 中田俊輔, 森脇康博, 奥田隆志, 山中宏二, 阿部陽一郎, 安井正人, 三澤日出巳;筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおけるアクアポリン4の発現変動;日本薬学会第134年会;平成26年4月;熊本大学(熊本県熊本市)
5. 奥田隆志; Identification of an endocytic signal of the vesicular GABA transporter;第36回分子生物学会年会;平成25年12月;神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

[図書](計2件)

1. 奥田隆志;高親和性コリントランスポーター;脳科学辞典(日本神経科学学会);DOI:10.14931/bsd.5380(2014)
2. 奥田隆志;小胞アセチルコリントランスポーター;脳科学辞典(日本神経科学学会);DOI:10.14931/bsd.2191(2014)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

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・准教授

研究者番号：00322040

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし