

助成番号 0646

## 塩素イオンによるグルタミン酸化学伝達の機能制御機構

森山 芳則

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体膜機能生化学研究室

**概要** グルタミン酸は記憶・学習・行動など我々の精神活動を支える興奮性神経伝達物質である。小胞型グルタミン酸トランスポーター(vesicular glutamate transporter, VGLUT)は、グルタミン酸のシナプス小胞内濃縮を司る膜分子であり、グルタミン酸化学伝達の必須因子である。VGLUT は3種のイソ型(VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3)で構成されている。VGLUT によるグルタミン酸輸送の分子メカニズムはわかっていない。さらに、これらのイソ型はいずれも低濃度の塩素イオンにより活性化されることが知られている。塩素イオンが存在しないと活性はほぼ0であるが、2-5 mMで最大活性(100)を示す。一方、10 mM以上になると濃度依存的にVGLUT 活性は低下する。塩素イオンによるこの効果はVGLUT に対する直接作用であるかどうか証明されていなかった。我々はVGLUT の構造と機能を解析する方法を確立し、それを用いて(1)輸送に必須のアミノ酸残基を決定し、(2)塩素イオンの効果がVGLUT に対する直接作用なのかどうか、直接作用ならばそのメカニズム、を解析した。その結果、Areg184, His128, Glu191 が輸送活性に重要であることが判明した。結晶構造がわかっている大腸菌のグリセロール三リン酸トランスポーターを参考にしてVGLUT の3D構造モデルを作製したところ、これら三つのアミノ酸残基はほぼ同じ領域にmapされ、この部分に基質認識部位が存在すると考えられる。おそらく、この三つのアミノ酸残基がそれぞれグルタミン酸のCOO<sup>-</sup>とNH<sub>4</sub><sup>+</sup>部位を認識しているのではないかと考えられる。また、塩素イオンによる効果がVGLUT への直接効果であることを証明した。我々の結果は、グルタミン酸の化学伝達はVGLUT の機能制御を介して低濃度の塩素イオンで厳密に制御されていることを示しており、この維持・制御に塩素イオンが関わっている可能性を支持している。

グルタミン酸は記憶・学習・行動など我々の精神活動を支える興奮性神経伝達物質である。小胞型グルタミン酸トランスポーター(vesicular glutamate transporter, VGLUT)は、グルタミン酸のシナプス小胞内濃縮を司る膜分子であり、グルタミン酸化学伝達の必須因子である。VGLUT は3

種のイソ型(VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3)で構成されている(文献1)(図1)。VGLUT によるグルタミン酸輸送の分子メカニズムはわかっていない。さらに、これらのイソ型はいずれも低濃度の塩素イオンにより活性化されることが知られている。塩素イオンが存在しないと活性はほぼ0であ

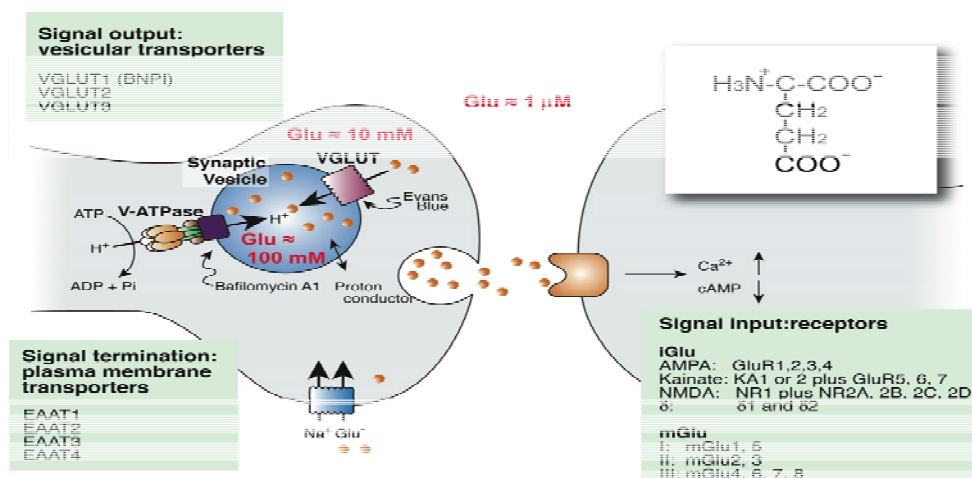


図1 三要素から構成されるグルタミン酸化学伝達システム

るが、2-5 mM で最大活性(100)を示す。一方、10 mM 以上になると濃度依存的に VGLUT 活性は低下する。塩素イオンによるこの効果は VGLUT に対する直接作用であるかどうか証明されていなかった(文献2-5) (図1)。

我々は VGLUT の構造と機能を解析する方法を確立し、それを用いて(1) 輸送に必須のアミノ酸残基を決定し、(2) 塩素イオンの効果が VGLUT に対する直接作用なのかどうか、直接作用ならばそのメカニズム、を解析した。

### 新しい VGLUT 機能測定系の確立: 精製 VGLUT による再構成系

VGLUT の構造と機能を解明するための最も単純かつ強力な方法は、VGLUT を精製しリポソームに再構成しその輸送機能を測定することである。しかしながら、この操作には膜タンパクの大量発現、可溶化、精製といった操作が

必要であり、これまでほとんど研究が進んでいなかった。

我々は、昆虫細胞による発現系を用いて VGLUT を大量発現させ、それを可溶化、アフィニティー・カラムにより精製し、それを大腸菌の F-ATPase と一緒にリポソームに組み込む測定系を構築した。大腸菌の F-ATPase は ATP 依存性プロトンポンプであり、ATP を加水分解することでプロトンを輸送し、小胞内外にプロトンの電気化学的ポテンシャル差を形成する。生体内で VGLUT は vacuolar ATPase が形成する膜電位を輸送エネルギーとして用いている。同じ駆動システムを F-ATPase を用いて作ろうとしたわけである(図2)。大腸菌 F-ATPase の迅速調製法は以前に確立していた(文献6)。図3に、この方法による VGLUT の精製と F-ATPase との再構成結果を示した。タンパクをクマージー色素で染色。VGLUT がほぼ単一に精製され、F-ATPase と再構成されていることがわかる。

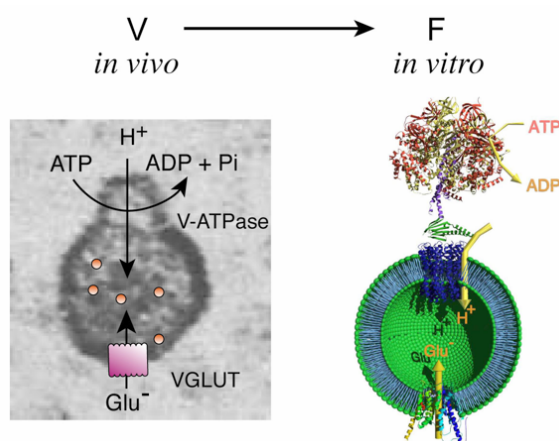


図2 VGLUT 機能測定系の原理

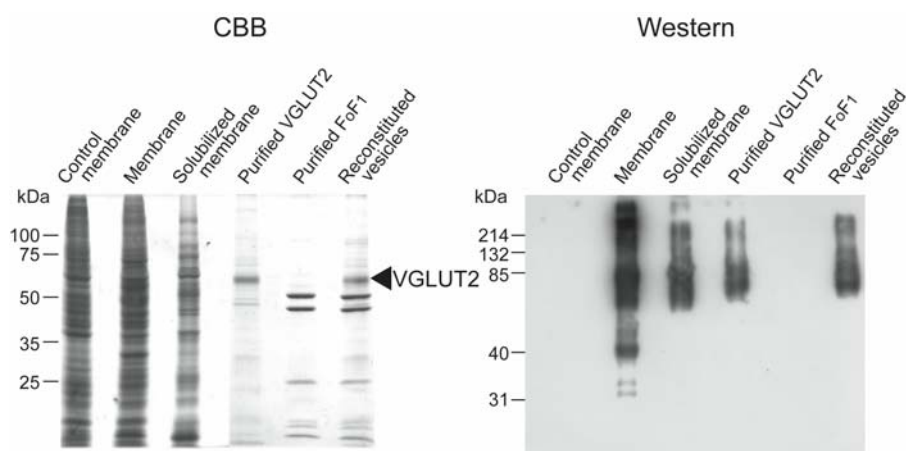


図3 VGLUT2 の精製と再構成

調製したプロテオリポソームに ATP を添加すると、グルタミン酸が能動輸送された(図4)。輸送は膜電位を駆動力とする能動輸送と、エネルギーを必要としない受動拡散の二つの様式が組み合わさっていた(図4, 表1)。再構成されたグルタミン酸輸送はシナプス小胞のそれと一致した(表1)。以上、精製トランスポーターの機能測定法が確立できたと結論した。

### 必須アミノ酸残基の同定

精製 VGLUT によるグルタミン酸輸送の比活性はシナプス小胞のその1,000倍であり、新しい測定法が大変に高感度であることがわかった。従って、この方法と部位特異的変異導入法を組み合わせることにより VGLUT の必

須アミノ酸残基を同定することが可能である。我々は膜貫通領域において保存された極性残基に変異を導入し、変異トランスポーターをそれぞれ精製・再構成し、それらの機能を測定した。その結果、Areg184, His128, Glu191 が輸送活性に重要であることが判明した(図5)。

結晶構造がわかっている大腸菌のグリセロール三リン酸トランスポーターを参考にして VGLUT の 3D構造モデルを作製した(図6)。これら三つのアミノ酸残基はほぼ同じ領域に map され、この部分に基質認識部位が存在すると思われる。おそらく、この三つのアミノ酸残基がそれぞれグルタミン酸の COO<sup>-</sup>と NH<sub>4</sub><sup>+</sup>部位を認識しているのではないかと考えられる(図7)。

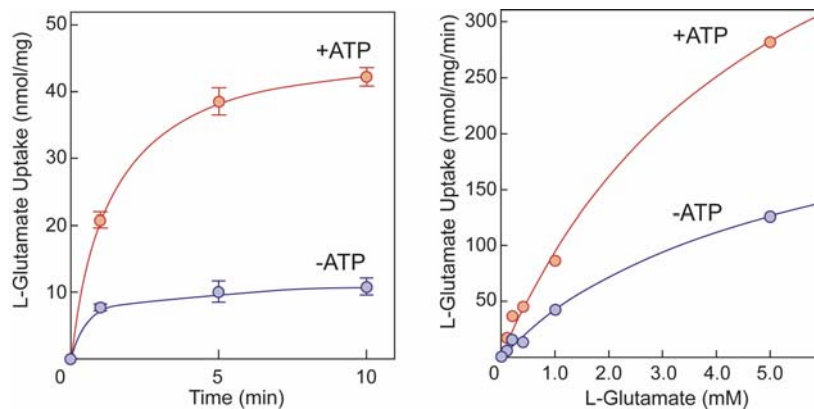


図4 再構成 VGLUT2 における L-グルタミン酸の取り込み

表1 L-グルタミン酸の取り込みに及ぼすリガンドの影響

System	L-Glutamate Uptake (nmol/mg)
Complete	48.4±4.1
-VGLUT	0.15±0.02
-F <sub>0</sub> F <sub>1</sub>	2.0±0.09
-ATP	10.7±1.4
Complete + 1 mM NaN <sub>3</sub>	6.8±1.3
Complete + 1 μM Bafilomycin A1	41.3±1.7
Complete + 1 μM Evans Blue	10.3±1.4
Complete + 10 mM DL-Asp	47.5±1.8
Complete + 1 mM N-ethylmaleimide	45.1±3.5
Complete + 1 μM CCCP	13.1±2.6
Complete + 2 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	46.2±4.5
Complete + 2 μM Valinomycin	22.6±2.0
Complete + 2 μM Nigericin	35.2±1.5
Complete + 2 μM Val. + 2 μM Nig.	8.7±0.8

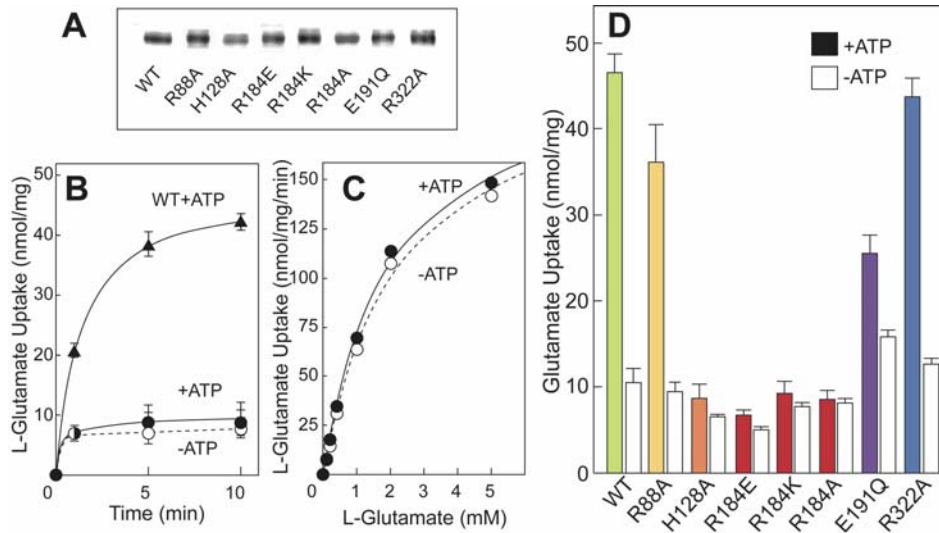


図5 変異極性残基のグルタミン酸輸送機能に及ぼす影響

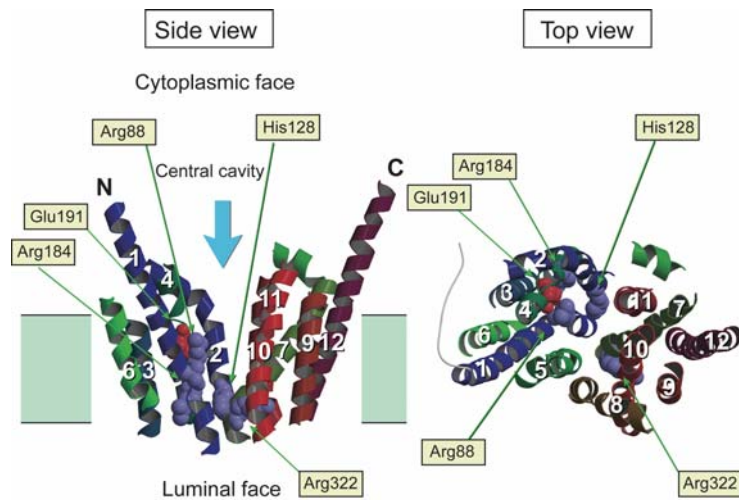


図6 VGLUTの3D構造モデル

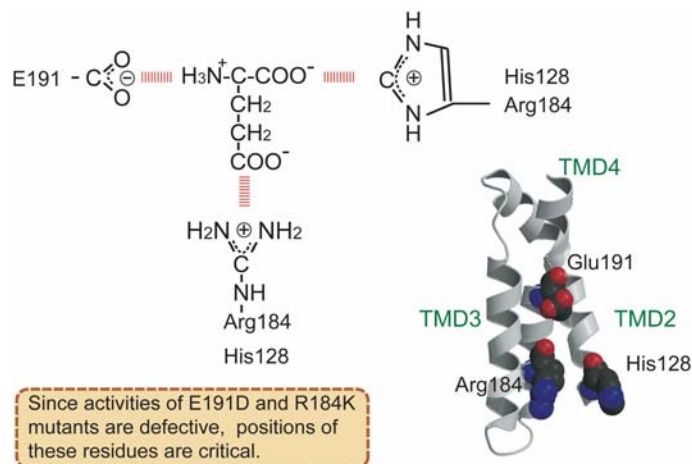


図7 三つのアミノ酸残基による基質認識モデル



### VGLUT は塩素イオン要求性である。

さて、我々は、精製した VGLUT を用いて、塩素イオンによる効果が VGLUT への直接効果であることを証明した(図8)。すなわち、再構成リポソームにおいても、シナプス小胞の場合と同様の塩素イオンによる活性化効果を認められた。反応液中に塩素イオンが存在しないときは全く活性が認められない。しかし低濃度の塩素の添加により活性が現れ4 mM程度で最大となり、10 mM以上になると次第に低下していく。この低下は pH 勾配の上昇に伴う膜電位の低下(すなわち駆動力の低下)によるものである。塩素イオンの効果は臭素イオンでも代替できるが、その他のイオンではできない。また、ある種の blocker の存在により競合されることから、特定の結合部位が存在するものと考えられる。

現在は、ある修飾剤でこの部位を修飾し、アミノ酸残基の同定を試みている。同定されたアミノ酸残基に変異を導入し、塩素イオンの影響を調べる予定である。

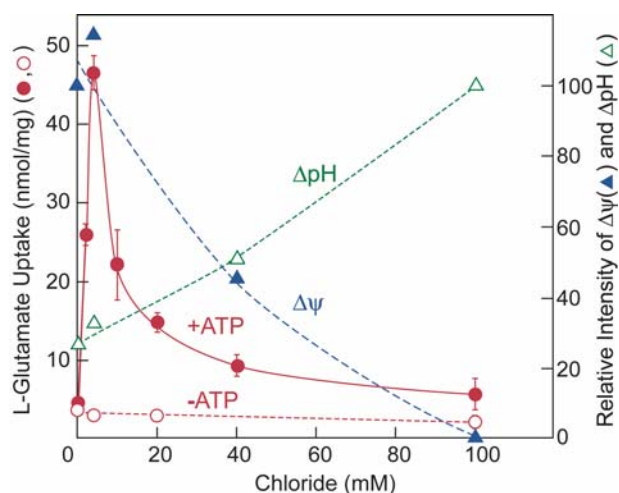


図8 VGLUT の塩素イオン要求性

### 終わりに

グルタミン作動性神経のシナプス小胞内に含まれるグルタミン酸は約 100 mM という一定値で維持されており、その維持・制御機構の解明は神経科学における長年の課

題の一つである。我々の結果は、グルタミン酸の化学伝達は VGLUT の機能制御を介して低濃度の塩素イオンで厳密に制御されていることを示しており、この維持・制御に塩素イオンが関わっている可能性を支持している。

### 文献

- 1) Moriyama, Y., and Yamamoto, A. (2004) Glutamatergic chemical transmission: Look! Here, there, and anywhere. *J. Biochem.* **135**, 155-163
- 2) Naito, S., and Ueda, T. (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* **44**, 99-109
- 3) Maycox, P.R., Deckwerth, T., Hell, J.W., and Jahn, R. (1988) Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **263**, 15423-15428
- 4) Hartinger, J., and Jahn, R. (1993) An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* **268**, 23122-23127
- 5) Moriyama, Y., and Yamamoto, A. (1995) Vesicular L-glutamate transporter in microvesicles from bovine pineal glands: driving force, mechanism of chloride anion-activation, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **270**, 22314-22320
- 6) Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M., and Futai, M. (1991) One-step purification of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase (F0F1) and its reconstitution into liposomes with neurotransmitter transporters. *J. Biol. Chem.* **266**, 22141-22146

### 発表論文

- Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H., and **Moriyama, Y.** (2006) Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J. Biol. Chem.* **281**, 39499-39506.

No. 0646

## Regulation of Glutamatergic Chemical Transduction by Chloride

Yoshinori Moriyama

Department of Membrane Biochemistry, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and  
Pharmaceutical Sciences.

### Summary

Vesicular glutamate transporters (VGLUTs) mediate glutamate signaling through its ability to uptake L-glutamate into secretory vesicles using electrochemical gradient of  $H^+$  generated by V-ATPase. In spite of physiological importance of VGLUTs, molecular mechanism of glutamate transport is far less understood due to lack of efficient assay system. We established a new system of VGLUT2 that use over expression system in combination of co-reconstitution of  $F_oF_1$ -ATPase. VGLUT2 was over expressed in the insect cells by recombinant baculovirus infection and purified through Ni-NTA column chromatography after solubilization of membranes by octyl- $\beta$ -glucoside. Reconstituted proteoliposome exhibited marked glutamate transport activity driven by membrane potential generated by  $F_oF_1$ -ATPase. Kinetic analysis showed that purified VGLUT has similar properties as like synaptic vesicles. Mutagenic analysis was carried out using our new system to identify the essential of VGLUT. Mutations were introduced to charged conserved residues in the transmembrane domain. Mutations on His128 and Arg184 greatly reduced transport activity suggesting essential roles of these residues on glutamate transport. Amino acid replacement of Arg88 and Glu191 also reduced activity whereas Arg322 mutant exhibited wild-type activity. Using the procedure, we found that low concentration of chloride (around 4 mM) strikingly stimulated glutamate transport by purified VGLUT. The chloride dependency is an intrinsic property of purified VGLUT: it activates the transport activity through binding at the specific binding site. Thus, VGLUT is a chloride anion-dependent transporter. Our study raises a possibility that chloride anion regulates glutamatergic signal transmission through regulation of VGLUT moiety.