

ある報告がなされた。すなわち、細胞質の IP_3 ではなく核内の IP_3 産生および核内 Ca^{2+} 濃度の上昇が心肥大応答に重要であるという報告である¹¹⁾。核内で上昇した Ca^{2+} がカルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK) を活性化し、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) をリン酸化し、脱抑制をかけることで転写を促進し、心肥大応答へと至る経路が想定されている。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に続く NFAT の活性化のみならず、核内 Ca^{2+} 濃度の上昇も重要な役割を果たしていることは興味深い。しかしながら、どのような経路で核内 IP_3 産生が増加するのか、これまでに報告された細胞膜や細胞質で起きる反応との関連はあるのか、また TRPC チャンネルと核内 IP_3 産生との関係などは今後の課題である。さらに、我々の報告を含めいづれも TRPC を介して流入する Ca^{2+} の重要性を指摘しているものの、L 型 Ca^{2+} チャンネルとの関係あるいは生理的心肥大と病的な心肥大との違いをどのように説明するのかなどについても今後詳細に検討していかなければならない。

10. おわりに

我々は NFAT 活性化を引き起こす細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇経路について次のようなスキームを提唱した (図 1)。受容体刺激により $G\alpha_q$ を介して PLC が活性化され、DAG が産生される。DAG は TRPC3/TRPC6 を活性化し膜電位を脱分極方向にシフトさせる。また、TRPC3/TRPC6 を介したイオン流入は脱分極しやすい状態を作り L 型 Ca^{2+} チャンネルの活性化を引き起こす。L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 濃度の上昇が、NFAT の核移行さらには心肥大応答を引き起こす。TRPC を心筋に過剰発現させたトランスジェニックマウスは、細胞内への陽イオン流入が増加するため最終的に脱分極を引き起こし、L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入が亢進するため心肥大を引き起こすことは想像できるし、実際のトランスジェニックマウスでも心肥大が形成された^{3,4)}。これに対しノックアウトマウスでは、特定の TRPC をノックアウトすると他の TRPC の発現が亢進し機能を相補するため、それぞれの TRPC の機能を *in vivo* で解析するのは困難な状況である。TRPC のドミナントネガティブ体の発現あるいは選択的な阻害剤を用いた解析が必要なかもしれない。いづれにしても、TRPC を介したシグナリングの重要性を個体レベルで示す必要があり、今後の進展が待たれる。

1) Heineke, J. & Molkenkin, J.D. (2006) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 589-600.

- 2) Onohara, N., Mishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., & Kurose, H. (2006) *EMBO J.*, 25, 5305-5316.
- 3) Nakayama, H., Wilkin, B.J., Bodi, I., & Molkenkin, J.D. (2006) *FASEB J.*, 20, 1660-1670.
- 4) Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Hill, J.A., & Olson, E.N. (2006) *J. Clin. Invest.*, 116, 3114-3126.
- 5) Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima, T., & Ito, H. (2007) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 42, 498-507.
- 6) Bush, E.W., Hood, D.B., Papst, P.J., Chapo, J.A., Minobe, W., Bristow, M.R., Olson, E.N., & McKinsey, T.A. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 33487-33496.
- 7) Riddle, E.L., Schwartzman, R.A., Bond, M., & Insel, P.A. (2006) *Circ. Res.*, 96, 401-411.
- 8) Arimoto, T., Takeishi, Y., Takahashi, H., Shishido, T., Niizeki, T., Koyama, Y., Shiga, R., Nozaki, N., Nakajima, O., Nishimaru, K., Abe, J., Endoh, M., Walsh, R.A., Goto, K., & Kubota, I. (2006) *Circulation*, 113, 60-66.
- 9) Clapham, D.E. (2006) *Nature*, 426, 517-524.
- 10) Smyth, J.T., DeHaven, W.I., Jones, B.F., Mercer, J.C., Trebak, M., Vazquez, G., & Putney Jr., J.W. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 1147-1160.
- 11) Wu, X., Zhang, T., Bossuyt, J., Li, X., McKinsey, T.A., Dedman, J.R., Olson, E.N., Chen, J., Brown, J.H., & Bers, D.M. (2006) *J. Clin. Invest.*, 116, 675-682.

黒瀬 等, 西田 基宏

(九州大学大学院薬学研究薬効安全性学分野)

TRPC channels and cardiac hypertrophy
Hitoshi Kurose and Motohiro Nishida (Department of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

小胞型グルタミン酸トランスポーターの分子機構

1. はじめに

トランスポーターは物質輸送を通じて多様な生理現象に本質的に関わっており、トランスポーターの機能を知るとは生理現象の理解に必要な不可欠である。しかし、哺乳類のトランスポーターの構造と機能には未知の部分が多く残されている。本稿では、最近の研究から明らかになってきた小胞型グルタミン酸トランスポーターのユニークな特性について紹介したい。

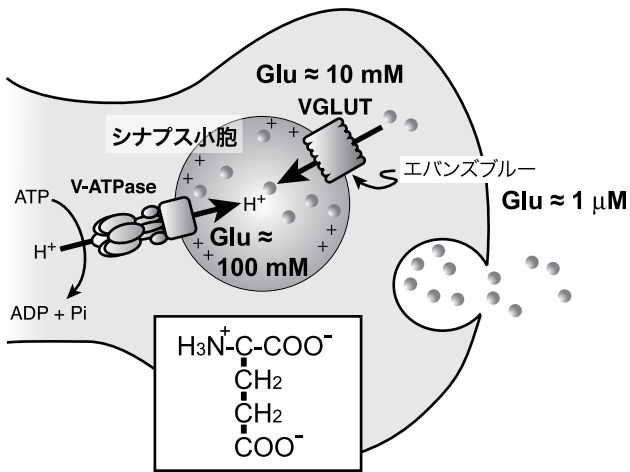


図1 シナプス小胞へのグルタミン酸の濃縮
VGLUTはV-ATPaseが作り出した膜電位を駆動力としてグルタミン酸を小胞内へ濃縮する。濃縮されたグルタミン酸は開口放出によって細胞外へ分泌される。

2. 小胞型グルタミン酸トランスポーター

グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質としてグルタミン酸作動性神経等で広く使われている。小胞型グルタミン酸トランスポーター (vesicular glutamate transporter, VGLUT) はシナプス小胞へのグルタミン酸の濃縮を司るトランスポーターである^{1,2)} (図1)。VGLUTにより小胞内に蓄積されたグルタミン酸は、開口放出により細胞間隙へ放出されてシグナルを伝達する。また、グルタミン酸は中枢神経系だけでなく様々な末梢の組織においても情報伝達物質として使われており、VGLUTはシグナリングに必須な因子として機能している³⁾。したがって、VGLUTの発現はグルタミン酸シグナリングのよい指標となっている。

3. VGLUTの発見

VGLUTには三つのアイソフォームがあり、VGLUT1は脳に特異的なNa⁺/リン酸トランスポーター (BNPI) として、VGLUT2は睪腺AR42J細胞の分化に応じて発現する因子 (DNPI) として単離された^{4,5)}。いずれも細胞膜に存在するI型Na⁺/リン酸トランスポーター (NPT) ファミリーと相同性を有し、シアリン (シアル酸トランスポーター) とともにSLC17ファミリーを形成している。シナプス小胞等にグルタミン酸を濃縮するトランスポーターの存在は生化学的に知られていたが、その実体は長らく不明であった。しかし、VGLUT1と2がグルタミン酸作動性神経のシナプス小胞に特異的に発現していることや、NPT

が生理的には有機アニオントランスポーターとして機能していることから、VGLUTは小胞型グルタミン酸トランスポーターであると推定された。実際に、線虫のVGLUTオルソログであるEAT-4の変異ではグルタミン酸シグナリングが異常をきたしていた⁶⁾。VGLUT cDNAを導入した細胞から単離した分泌小胞は膜電位に依存してグルタミン酸を輸送し、その生化学的性質がシナプス小胞のグルタミン酸トランスポーターのものと一致したことから、VGLUTが小胞型グルタミン酸トランスポーターであることが同定された⁷⁾。

VGLUT1と2は中枢神経系では相補的に分布しており、オーバーラップしていない。すなわち、VGLUT1は主に大脳皮質や海馬に、VGLUT2は視床等に発現している。一方、VGLUT3はグルタミン酸作動性神経には発現しておらず、その生理的機能は未だ不明である。また、グルタミン酸シグナリングは中枢神経系だけでなく末梢の非神経組織にも見られ、VGLUT1と2は松果体、ランゲルハンス島、破骨細胞、精巣などでも小胞へのグルタミン酸の蓄積にあずかっている。

4. 生化学的諸性質

ヒトVGLUT1, 2, 3はそれぞれ560, 582, 589残基からなり、VGLUT1とVGLUT2および3との相同性はそれぞれ78%, 81%である。VGLUTを含むSLC17ファミリーはMFS (major facilitator superfamily) の特徴を持ち、12回の膜貫通ヘリックスを有すると推定されている⁸⁾。アミノ末端とカルボキシル末端は細胞質側に露出しており、小胞へのターゲティングにカルボキシル末端領域が関わっていることが明らかになっている。

VGLUTの生化学的特徴はシナプス小胞等を用いて解析されてきた^{9,10)}。V-ATPaseはATPの加水分解によってH⁺を小胞内に輸送し、膜電位を形成する。VGLUTは形成された膜電位を駆動力としてアニオン型のグルタミン酸を小胞内へ輸送する (図1)。これにより、グルタミン酸を小胞内へ10倍程度濃縮することができる¹¹⁾。この点で同じ小胞型の情報伝達物質トランスポーターであるVMAT (vesicular monoamine transporter) と大きく異なる。VMATはH⁺との交換輸送によりモノアミン類を輸送するため、pH勾配に依存し、約10,000倍の濃度勾配を形成する¹²⁾。VMATの基質に対する親和性は高いが特異性は低い。一方、VGLUTのグルタミン酸に対するK_mは約1mMであり親和性は低い、基質特異性は非常に高く、グルタミンやアスパラギン酸は輸送されない。また、L-グルタミン酸を

D-グルタミン酸よりも好む。VGLUTによるグルタミン酸輸送は低濃度の Cl^- で活性化され、10mM以上の高濃度で阻害されるユニークな二相性の Cl^- 依存性を示す。また、グルタミン酸輸送はエバンズブルー、シカゴスカイブルー、ローズベンガル等のアニオン系色素で阻害される。これらの色素はグルタミン酸に対して競合阻害を示すこと

から、基質結合部位近傍に結合するものと思われる¹³⁾。

VGLUTはもともとNPT1のホモログとして単離されており、ツメガエル卵にVGLUT cDNAを注入すると Na^+ 駆動型のリン酸輸送活性が見られることから、NPTと同様なリン酸輸送活性を持つと推定されている⁴⁾。しかし、この活性が本当にVGLUTによって担われているかどうかは

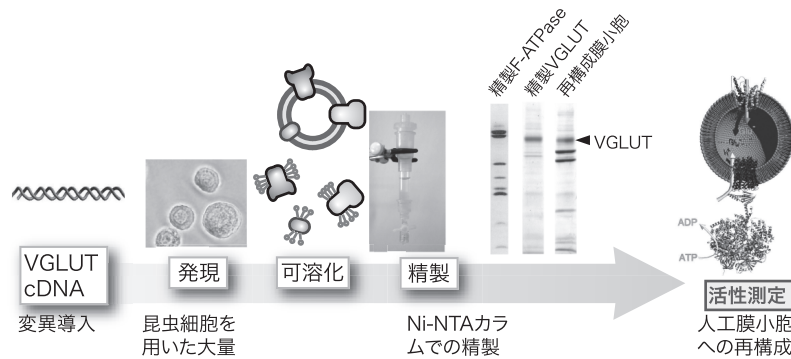


図2 VGLUTの大量発現と精製再構成

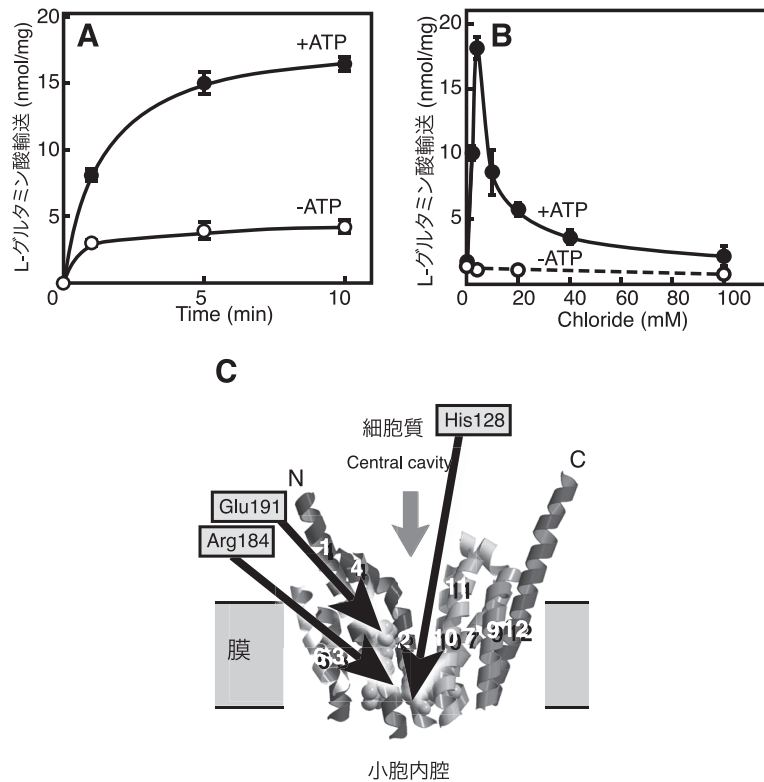


図3 精製VGLUTによるグルタミン酸輸送

A. グルタミン酸輸送のタイムコース B. グルタミン酸輸送の Cl^- 依存性。ATP存在下でのグルタミン酸の能動輸送は Cl^- によって制御を受けるのに対して、ATP非存在下のグルタミン酸の受動輸送は Cl^- の影響を受けない。C. VGLUTの構造モデルと必須残基

明らかではない。

5. 精製再構成系を用いた解析

これまでのVGLUTの機能解析は、培養細胞を用いた強制発現系やシナプス小胞膜等を用いて行われてきた。しかし、このような方法では、VGLUTのものとしての特徴、すなわちCl⁻依存性やリン酸輸送活性が本当にVGLUTによるものなのかは明確でない。また、発現量や細胞内局在の問題もあり、変異導入による機能解析は全くなされていなかった。

筆者らはこの問題を解決するために、昆虫細胞を用いたVGLUTの大量発現系と精製再構成系を開発した(図2)^{14,15)}。この系ではF-ATPaseを精製VGLUTとともにリボソームに組み込むことで、ATP依存的にH⁺の電気化学的勾配を形成させている。

VGLUT cDNAを持つ組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞(High Five)から調製した膜小胞をオクチルグルコシドで可溶化した後、Ni-NTAカラムクロマトグラフィーでVGLUTを精製した。この精製VGLUTと精製した大腸菌のF-ATPaseをリボソームに再構成した。この再構成プロテオリボソームにATPとグルタミン酸を加えると、ATP依存的なグルタミン酸の取り込みが見られた(図3)。この系を用いたグルタミン酸輸送の解析から、精製VGLUTが(1)H⁺の電気化学的勾配のうち膜電位を駆動力とすること、(2)グルタミン酸に対する高い特異性を持つこと、(3)二相性のCl⁻効果、すなわち4mMのCl⁻で活性化され、それ以上の高濃度で阻害されること、(4)膜電位に依存した能動輸送にCl⁻は必須な因子であるのに対して、グルタミン酸の濃度勾配に従った受動輸送ではCl⁻は不必要であることが明らかになった。VGLUT活性の強いCl⁻依存性は、Cl⁻がグルタミン酸シグナリングの新たな調節因子として働いている可能性を示唆している。

さらに、リン酸輸送活性に関して面白い知見が得られた。すなわち、(1)精製VGLUTがNa⁺/リン酸共輸送活性を持つこと、(2)グルタミン酸やグルタミン酸輸送の阻害剤であるエバンズブルーで阻害されないこと、(3)Na⁺/リン酸共輸送活性はCl⁻を必要としないことが明らかになった。これらのことはVGLUT自身がグルタミン酸輸送とリン酸輸送の二つの異なる活性を持っていることを示している。さらに、グルタミン酸結合部位とリン酸結合部位が異なること、二つの輸送のメカニズムが異なることがわかる。

6. 変異導入解析

トランスポーターの基質認識部位には膜貫通領域中の荷電アミノ酸残基が関わることが多い。そこで、膜貫通領域に存在し、保存性の高い残基に注目して変異を導入した。変異型VGLUTも野生型と同様に精製して、輸送活性を測定したところ、His128, Arg184, Glu191の三つの残基がグルタミン酸輸送に必須であることがわかった。これらの残基はVGLUTの予測構造モデルでは膜貫通領域内で近傍に位置して基質結合部位を形成しているものと推定された(図3)。興味深いことに、これらの変異型VGLUTはグルタミン酸輸送活性を失っていたにもかかわらず、Na⁺/リン酸共輸送活性を保持していた。

したがって、グルタミン酸輸送活性とNa⁺/リン酸共輸送活性は、駆動力、基質、基質結合部位、Cl⁻依存性、必須残基が全く異なることになる。VGLUTはメカニズムの全く異なる二つの活性を合わせ持つという点で非常に面白いトランスポーターであると言えよう。二つの異なるシステムを単一ポリペプチド鎖の中にどのようにして織り込んでいるのか興味深い。

7. おわりに

ヒト・ゲノムプロジェクトにより、500を超えるトランスポーターの存在が明らかになった。これらのトランスポーターは様々な生理機能を持っており、生体の機能・恒常性を維持している。しかし、哺乳類トランスポーターの構造機能相関の解明は未だ充分に手をつけられていない領域として残されたままである。これはトランスポーターがベクトル的な物質の移動を担う点で、一般の酵素に無い難しさがあるためである。多くの哺乳類トランスポーターの機能解析は培養細胞系を用いて行われてきたが、夾雑物の影響等のシステムを持つ限界がある。したがって、精製トランスポーターを用いた機能測定系の確立はトランスポーターの諸性質を疑義無く明らかにするためには必須な技術である。我々がVGLUTで開発した方法はVGAT, MATE等でも成功しており、他のトランスポーターにも応用できる汎用的なものと考えている。我々の研究で用いた手法が哺乳類トランスポーターの機能解析のブレークスルーとなることを期待している。

- 1) Reimer, R.J. & Edwards, R.H. (2004) *Pflugers. Arch.*, 447, 629-635.
- 2) Takamori, S. (2006) *Neurosci. Res.*, 55, 343-351.

- 3) Moriyama, Y. & Yamamoto, A. (2004) *J. Biochem.*, 135, 155-163.
- 4) Ni, B., Rosteck Jr., P.R., Nadi, N.S., & Paul, S.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 5607-5611.
- 5) Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I., & Takeda, J. (2000) *J. Neurochem.*, 74, 2622-2625.
- 6) Lee, R.Y.N., Sawin, E.R., Chalfie, M., Horvitz, H.R., & Avery, L. (1999) *J. Neurosci.*, 19, 159-167.
- 7) Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C., & Jahn, R. (2000) *Nature*, 407, 189-194.
- 8) Jung, S.K., Morimoto, R., Otsuka, M., & Omote, H. (2006) *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 547-549.
- 9) Naito, S. & Ueda, T. (1985) *J. Neurochem.*, 44, 99-108.
- 10) Moriyama, Y. & Yamamoto, A. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 22314-22320.
- 11) Burger, P.M., Mehl, E., Cameron, D.L., Maycox, P.R., Baumert, M., Lottspeich, F., De Camilli, P., & Jahn, R. (1989) *Neuron*, 3, 715-720.
- 12) Parsons, S.M. (2000) *FASEB J.*, 14, 2423-2434.
- 13) Roseth, S., Fykse, E.M., & Fonnum, F. (1995) *J. Neurochem.*, 65, 96-103.
- 14) Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H., & Moriyama, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 39499-39506.
- 15) Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M., & Futai, M. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 22141-22146.

表 弘志, 樹下 成信
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
膜蛋白質機能科学, 生体膜機能生化学)

Molecular mechanism of vesicular glutamate transporter
Hiroshi Omote and Narinobu Juge (Laboratory of Membrane Biochemistry, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan)

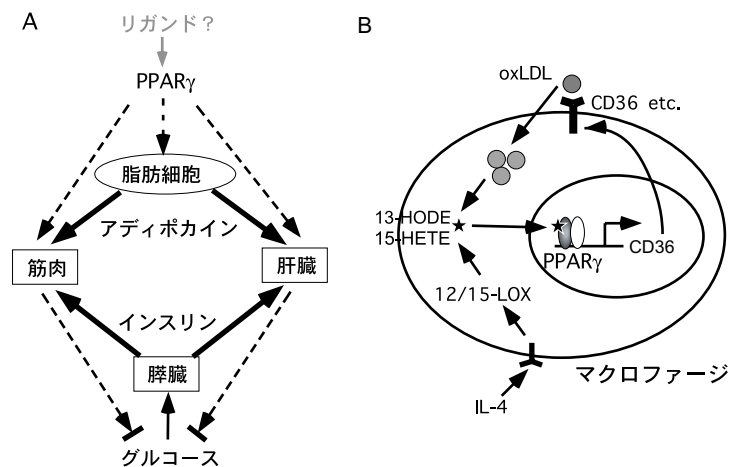


図1 PPAR γ の機能
A. PPAR γ が関与する血糖値の維持機構. B. マクロファージにおける PPAR γ の役割.

核内受容体 PPAR γ の機能と内在性リガンドによる活性調節

はじめに

ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプターガンマ (peroxisome proliferator-activating receptor gamma; PPAR γ) は、核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子である。PPAR γ は肥満や2型糖尿病との関連で注目されており、機能解析や創薬に関する研究が数多く存在する。一方で、PPAR γ を活性化する内在性のリガンドは多岐にわたっており、内在性リガンドと PPAR γ の機能との関連が十分明らかになっているとは言い難い。本稿では PPAR γ の機能について概説した後、構造生物学的視点に立った内在性リガンドによる活性化機構を述べる。最後に、PPAR γ に残されている課題について考察したい。

1. PPAR γ の機能

脂肪細胞の分化誘導において中心的な役割を担っているのが PPAR γ である。in vitro の研究において、PPAR γ 遺伝子の強制発現により繊維芽細胞から脂肪滴を含む脂肪細胞が分化すること、PPAR γ アゴニストの投与により分化が増強されることが確認されている¹⁾。ノックアウトマウスを用いた in vivo の研究では、ホモで致死になってしまうため、キメラマウスを用いて脂肪細胞の分化が検討され