



Title	Cloning and expression of a bovine glutamate transporter
Author(s)	井上, 浩
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40699">https://hdl.handle.net/11094/40699</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	井上 浩
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13674号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Cloning and expression of a bovine glutamate transporter (ウシグルタミン酸トランスポーター(GLAST)のクローニングと機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌
	(副査) 教授 米田 悅啓 教授 三木 直正

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

グルタミン酸トランスポーターは中枢神経系においてシナプスで放出されたグルタミン酸を特異的に細胞内に取り込むことによって細胞外のグルタミン酸濃度を低レベルに保ち、グルタミン酸の興奮性神経毒性から細胞を防御していると考えられている。また、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、痙攣などの神経変性疾患、脳虚血後の遅延性細胞死などの現象と深く関わっていることで注目されている。

しかしグルタミン酸トランスポーターの基質認識部位やオリゴマリゼーションなど分子の構造と輸送メカニズムの関係はよく分かっていない。これらの機能解析を行うため、まずウシ網膜のcDNAライブラリーよりグルタミン酸トランスポーター(GLAST)をクローニングし、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて種々の解析を行った。

#### 【方法ならびに成績】

グルタミン酸トランスポーターの遺伝子ファミリーに属するクローンを単離するため、グルタミン酸トランスポーターの遺伝子に共通なアミノ酸よりオリゴヌクレオチドプローブを作成し、ウシ網膜のcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果得たクローンの約90%はラットやヒトで報告されている既知のグルタミン酸トランスポーターのGLASTと非常に相同性の高いものであった。このことからまずウシ網膜で主要なグルタミン酸トランスポーターと考えられるこのクローンをcDNAライブラリーより単離し、その全長の塩基配列を決定した。その結果、ラットGLAST/GluT-1と96%，ヒトGLASTと97%のアミノ酸配列の相同性を持ち、GLASTのウシホモローグと考えられた。さらにアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて生理学的、薬理学的特性を解析した。ウシGLASTのL-グルタミン酸の取り込みに対するKm値は約38.1μMであった。またウシGLASTを介した [<sup>14</sup>C]グルタミン酸の取り込みは、DL-threo-β-hydroxyaspartate, L-CCG-IIIなどの阻害剤によって特異的にブロックされた。

次に、グルタミン酸トランスポーターでバクテリアからヒトまで生物種間で高く保存されたアミノ酸残基に着目し、膜貫通部位あるいはその付近に位置すると考えられる親水性の4つのアミノ酸残基に部位特異的点変異を導入することによりアミノ酸を置換した。

アフリカツメガエル卵母細胞発現系において、これら4種類の点変異タンパク(H328A, D400A, Q415A, D472A)のグルタミン酸取り込み能に対する影響を検討したところ、H328A, D400A, D472Aを発現した卵母細胞への [<sup>14</sup>C]

グルタミン酸の取り込みは完全にコントロールレベルにまで低下していた。唯一 Q415A は野生形に対して約10%の取り込みを残していた。L-アスパラギン酸に関しても同様の結果を得た。

次に電気生理学的に影響を検討した。アフリカツメガエル卵母細胞発現系において、膜電位を-60mV に固定しグルタミン酸の取り込み時にこれらの分子を通って流れるイオン電流を測定した。その結果、グルタミン酸取り込み時にうち向きのイオン電流が計測される野生型に対して変異型では完全にイオン電流も欠失していることが観察された。またこれらの変異によりグルタミン酸取り込み能のみでなく、Cl<sup>-</sup>チャネルとしての活性も欠失していることがわかった。

またアフリカツメガエル卵母細胞発現系でこの完全に機能を欠失する変異型である D472A と野生型 GLAST タンパクを同時に発現させることによるグルタミン酸取り込み能に対する影響を検討した。その結果、一定量の野生型 cRNA とともにインジェクションした D472A の cRNA の容量依存的にグルタミン酸の取り込みが低下することが認められた。このことからこのタンパクの野生型と変異型がオリゴマーを形成し取り込み機能の低下をきたすと考えられた。

### 【総括】

全ての生物種のグルタミン酸トランスポーターで保存されている 3 つのアミノ酸に部位特異的点変異を導入することによりグルタミン酸取り込み能は完全にブロックされた。

これらのアミノ酸は基質の認識や、グルタミン酸トランスポーターで基質の輸送に不可欠な Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> イオンの認識など、この分子で重要な機能を担っている可能性が示唆された。

また野生型と変異型を同一細胞に発現させるとグルタミン酸の取り込みが dose-dependent に阻害された。このことから GLAST は少なくとも 2 量体以上で機能していることが示唆された。またこれらのオリゴマーはそれぞれのサブユニットが単独で機能しているわけではなく、オリゴマーの集合体となって初めて機能すると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

中枢神経系において、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は、その細胞外濃度が持続的に上昇するとグルタミン酸レセプターの過剰刺激を介して、神経細胞に細胞死を起こさせることが知られている。一方グルタミン酸トランスポーターはグルタミン酸を特異的に細胞内へ輸送することにより、このグルタミン酸の興奮性神経毒性より細胞を防御している。

本研究では、ウシ網膜において細胞外のグルタミン酸濃度を調節する最も主要な分子であると考えられる GLAST の cDNA を単離し、その一次構造を決定するとともに、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、その生理学的、薬理学的な特性を明らかにした。

さらに部位特異的点変異を導入することにより、グルタミン酸トランスポーターの基質認識などの重要な機能に関する可能性の強いアミノ酸残基を同定した。また、これらの変異型を野生型の GLAST とアフリカツメガエル卵母細胞に共発現させることによりグルタミン酸の取り込み能が低下することから、この分子がオリゴマーを形成して機能することを明らかにした。

これらの知見はグルタミン酸トランスポーターの分子メカニズムの解明に貢献するだけでなく、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患やその病態の解明にも寄与するものであり、学位授与に値する。