

脳内 D-セリンの小胞内蓄積機構と生合成連関の解明

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

日浅 未来

1. はじめに

D-セリンは脳に多く含まれるアミノ酸である。コアゴニストとしてグルタミン酸NMDA受容体に結合し、その機能を調整することで長期増強やシナプス可塑性だけでなく、神経変性疾患や精神疾患にも関与する伝達物質である (Panatier A et al., 2006; Henneberger C et al., 2010)。D-セリンの脳内量は厳密に調節されており、その合成酵素セリンラセマーゼは脳内D-セリン調節因子のひとつである。また、D-セリンは神経やアストロサイトで合成され小胞内に蓄積され、細胞外へと開口放出される。しかしその小胞内蓄積を預かるトランスポーターの分子は不明であった (Mothet JP et al., 2005; Martineau M et al., 2013)。本研究では、申請者がごく最近発見した、小胞型D-セリントランスポーター (vesicular D-serine transporter; 以下VDseTと略) に注目した。VDseTに限らず、小胞型伝達物質トランスポーターは分泌小胞に局在し、伝達物質の小胞内充填と放出を担うため、伝達物質の蓄積・放出細胞 (領域) の特定に重要な分子である。D-セリンの小胞内蓄積や放出機構、放出細胞を知ることは、神経の生理学や、精神疾患の病態の解明に重要である。本研究ではVDseTが中枢神経系においてD-セリンの蓄積と分泌に関わることを証明すること、小胞上でラセマーゼが合成したD-セリンをVDseTが効率的に小胞内に濃縮するという、ラセマーゼとVDseTの機能・生合成連関についての解析を目的とした。なお、VDseTは未発表のため遺伝子名は伏せて報告させていただく。

2. 方法、結果

① VDseTの精製・再構成系による輸送活性測定

VDseTのN末端とC末端に可溶性タンパク質YbeL(β)を付加したプラスミドを(pET β -hVDseT)を大腸菌C43株にヒートショック法により導入し、VDseTタンパク質を大量に発現させた。得られたタンパク質をFos-Choline 14にて可溶化し、Ni-NTA Superflow レジンにて精製した。得られた精製VDseTタンパク質をFoF₁-ATPaseと共に凍結融解希釈法にてリポソームに組み込み、再構成プロテオリポソームとした。このVDseT再構成プロテオリポソームにカリウムイオンを含むbuffer中、2 mM ATPと100 μ M [³H]D-セリンを添加し反応させ、Sephadex G-50 fineを充填したスピнкаラムにアプライし、遠心 (760 \times g、2分、4°C) 後、その溶出液中に含まれる [³H]D-セリン (リポソーム内に取り込まれた基質の量に相当) を液体シンチレーションカウンターにより計測した。

その結果、ATPを添加したプロテオリポソームではD-セリンの取り込み活性がみられた。この取り込みはATP非存在下では見られず、VDseTは、FoF₁-ATPaseがH⁺をリポソーム内に輸送した結果生じたH⁺の電気化学的勾配あるいは膜電位を駆動力としていと考えられる。また、この取り込み活性は、H⁺イオノフォアであるCCCPによって阻害され、K⁺イオノフォアであるバリノマイシンを添加した場合は変化しなかった。K⁺-H⁺交換反応を行うナイジェリシン、膜透過性アミンである(NH₄)₂SO₄を添加しプロトン勾配を消失させるとD-セリン輸送は消失した。以上の結果は、VDseTはD-セリンとH⁺を対向輸送することを示唆している。

②VDseT局在領域・小胞の同定

VDseT特異的抗体を作製し、免疫組織学的手法、ウェスタンブロット法にてVDseTが発現、局在する細胞および小胞の特定を試みた。マウスを灌流固定し、得られた組織切片をHRP法にて免疫染色すると、前脳腹側淡蒼球、小脳プルキンエ細胞、大脳皮質や海馬でVDseTの強いシグナルが見られた。特に海馬の透明層と歯状回門においてVDseTが高発現していた。間接蛍光抗体法にて二重染色し、海馬透明層ではVDseTはシナプス小胞のマーカーのSynaptophysinやアストロサイトマーカーのGFAPと一部共局在していた。次に、海馬の神経細胞とアストロサイトの初代培養細胞を用いて解析した。RT-PCR法にて神経細胞、アストロサイトの両方にVDseTが発現していることを確認した。海馬初代培養神経細胞にて免疫染色すると、VDseTは細胞体や軸索・樹状突起に発現し、Synaptophysinと共局在し、シナプス小胞上に発現していた。マウスの全脳膜画分、または全脳や海馬からシナプス小胞画分を調製して電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した後、VDseT抗体でウェスタンブロットを行った結果、シナプス小胞画分においてバンドを検出した。マウスの海馬から単離したシナプス小胞画分を用いた免疫電子顕微鏡法においても、VDseTはSynaptophysinと共局在した。これらの結果はVDseTが海馬神経細胞のシナプス小胞に局在することを示唆している。海馬初代培養アストロサイトにおいても同様の実験を行い、アストロサイト膜画分を用いたウェスタンブロットにてバンドを検出した。小胞マーカーとの二重染色を行うと、VDseTとVAMP2との一部共局在が見られた。これらの結果は、VDseTはアストロサイトにおいて、VAMP2陽性小胞に発現していることを示唆している。

3. 考察

本研究により、新たに見いだしたトランスポーター分子VDseT が H^+ との対向輸送によりD-セリンを輸送することが明らかとなった。これまでに同定されている小胞型の神経伝達物質トランスポーターのうち、負電荷を持つ伝達物質を輸送する小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) 等では膜電位を駆動力とし、小胞の内側が正の膜電位のみを用いてグルタミン酸輸送する。一方で小胞型モノアミントランスポーター (VMAT) や小胞型GABAトランスポーター (VGAT) は H^+ との対向輸送で電氣的に中性もしくは陽性の伝達物質を輸送する。中性であるD-セリンが H^+ の対向輸送で小胞内に取り込まれる事は分泌小胞のエネルギー論と一致している。

VDseTが海馬の神経細胞とアストロサイトの両方に発現していることが明らかとなった。D-セリンは当初、アストロサイトから分泌される伝達物質 (グリオトランスミッター) として報告されていたが、近年では神経からも放出されることが報告されている (Rosenberg D et al., 2010 and 2013)。VDseTは神経細胞とアストロサイトそれぞれにおいて小胞型のD-セリントランスポーターとして機能し、D-セリンの開口放出に関与するのではないかと考えられる。VDseTが神経細胞ではシナプス小胞に、アストロサイトでは分泌性のVAMP2陽性細胞に局在することもこの考えを支持している。

D-セリンはL-セリンからセリンラセマーゼによって生合成される。セリンラセマーゼは神経やアストロサイトに発現し、その脳内分布はNMDAのそれと一致することから、D-セリンの生合成だけでなく、D-セリンの生理機能発現に重要な役割を果たしていると考えられている (Wolosker H et al., 1999)。アストロサイトではラセマーゼがシナプス小胞様小胞に結合し、小胞内へのD-セリン蓄積に直接的に関与していることが報告されている (Martineau M et al., 2013)。本研究ではVDseTがラセマーゼと機能関連しているのではないかと考え、解析を試みたが、機能を保持したラセマーゼの精製には成功したもののVDseTとの結合実験やVDseTとのリポソームへの組み込みまでには至らなかった。今後の課題としたい。

本研究より、D-セリンを小胞内に蓄積する役割を担うVDseTの機能と局在が明らかとなった。D-セリンは統合失調症やうつ病などの精神疾患に関与することから本研究は医学・薬学的にも重要な創薬ターゲットとなりうる。今後も継続して研究を続けていく予定である。

4. 参考文献

- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232-236 (2010)
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5606-5611 (2005)
- Martineau M, Shi T, Puyal J, Knolhoff AM, Dulong J, Gasnier B, Klingauf J, Sweedler JV, Jahn R, Mothet JP. Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *J. Neurosci.* 33, 3413-3423 (2013)
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125, 775-784, 2006
- Rosenberg D, Kartvelishvily E, Shleper M, Klinker CM, Bowser MT, Wolosker H. Neuronal release of D-serine: a physiological pathway controlling extracellular D-serine concentration. *FASEB J.* 24, 2951-2961 (2010)
- Rosenberg D, Artoul S, Segal AC, Kolodney G, Radzishevsky I, Dikopoltsev E, Foltyn VN, Inoue R, Mori H, Billard JM, Wolosker H. Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *J. Neurosci.* 33, 3533-3544 (2013)
- Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13409-13414 (1999)