



Substitution of Tyrosine 293 of GLUT1 Locks the Transporter into an Outward Facing Conformation

森, 啓行

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1554

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001554>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	もり 森 啓 行 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第1039号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成8年3月31日
学位論文題目	Substitution of Tyrosine 293 of GLUT1 Locks the Transporter into an Outward Facing Conformation (糖輸送担体GLUT1の293番目のアミノ酸であるタイロシンの置換により、GLUT1は外向構造に固定される。)
審査委員	主査 教授 春日 雅人 教授 千原 和夫 教授 片岡 徹

論文内容の要旨

緒言

哺乳類動物細胞における促通拡散型の糖輸送は、糖輸送担体 (GLUT) のファミリーにより媒介される。糖輸送担体は、その三次元構造を変化 (conformational change) させ、糖結合部位を細胞内外に順次露呈することにより糖輸送を行うのではないかと予想されている。一方、GLUTの各種 isoformにおいて、第7膜貫通部位の外側部に位置すると予測されるQQXSGXNXXFYの amino acid motif は高度に保存されており、糖輸送のメカニズムにおいて重要な働きを有することが予測される。

我々は、GLUT1に対する site-directed mutagenesis の手法を用いて、この amino acid motif の最外側に存在する2つのチロシン残基 (Tyr²⁹², Tyr²⁹³) に amino acid substitution を導入し、種々の検討を加えることで、この2つのチロシン残基が糖輸送においてどのような働きを有しているかを解析した。

方法

Kunkel法を用いて、human GLUT1 (HepG2型糖輸送担体) cDNAの第7膜貫通部位最外側に存在する Tyr²⁹², Tyr²⁹³ をそれぞれイソロシン、フェニルアラニンに置換した4種類の変異体 (Y292I, Y292F, Y293I, Y293F) を作成した。野生型及びこれらの変異 GLUT1 cDNA を、サイトメガロウイルス IEI プロモーター及びネオマイシン耐性遺伝子を有する発現ベクター pRC/CMV に組み込み、リン酸カルシウム法にて Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に遺伝子導入を行った。ネンマイシン耐性株を選択し、さらに GLUT1 の C 末端に対する抗体による Western blotting 法にて、野生型及び変異型 GLUT1 発現細胞株ともに untransfected 細胞株 (CHO-K1) に比し約7倍程度の発現を有するクローンを選択した。これら野生型及び変異型 GLUT1 発現細胞株に対して、Sodium Borohydride による細胞表面に存在する GLUT1 の糖鎖標識、2-Deoxy- [2,6-³H] -D-glucose を基質とした糖輸送能の測定を行った。次に、細胞内外からそれぞれ特異的に GLUT1 を標識する cytochalasin B, ATB-BMPA を用いた光標識実験を行い、特に表現型で変化が起こった Y293I 変異

株に関しては、さらにATB-BMPA標識が細胞内外リガンドの存在下でどのように阻害されるかを検討し、この変異株の特性を追求した。

結果

GLUT1のC末端領域に対する抗体を用いて行ったWestern blotting法にて、4種類の変異型GLUT1発現細胞株は、野生型GLUT1発現細胞株とほぼ同等のGLUT1蛋白を発現しており、遺伝子導入を行っていない細胞株(CHO-K1)に比し約7倍の発現量を持つことが確認された。

[³H]標識Sodium Borohydrideを用いた糖鎖の標識実験により、野生型及び4種類の変異型GLUT1とも細胞表面に過剰発現していることが確認された。

これらの野生型及び4種類の変異型GLUT1発現細胞株を用いて、引き続き2-Deoxy-D-glucoseの取り込み実験、細胞内外からそれぞれ特異的にGLUT1を標識するcytochalasinB、ATB-BMPAを用いた光標識実験を行った。Y292I、Y292F、Y293F変異体に関しては、Y292I変異体においてcytochalasinBの標識が野生型に比し軽度の低下を示した以外には、ほぼ野生型と同様の表現型を示した。一方、Y293I変異体においては2-Deoxy-D-glucoseの取り込み実験で、V_{max}が野生型の14%と著明に低下していた。さらに、Y293I変異体においてATB-BMPAを用いた細胞外からの標識は野生型と同程度であったが、cytochalasinBを用いた細胞内からの標識は野生型の4.5±2.1%と著明に低下しており、CHO-K1よりも低値をとった。

Y293I変異体において認められたcytochalasinBの標識の低下について、さらに検討を加えるために細胞内外リガンドの存在下でのATB-BMPAの標識阻害実験を行った。細胞外リガンドのATB-BMPA及び4,6-O-ethylidene-D-glucoseによる阻害実験から、Y292I変異体は野生型に比し細胞外リガンドに対して約2倍の親和性を持っていることが、確認された。一方、細胞内リガンドのcytochalasinB存在下でのATB-BMPAの標識阻害がY293I変異体において全く認められなかったことから、Y293I変異体の細胞内リガンドに対する親和性は野生型の250分の1に低下していると考えられた。以上のことからY293I変異体は、常に細胞外側のリガンド結合部位を露呈し細胞内側のリガンド結合部位を露呈できないような形態に固定されており、そのために糖輸送活性が低下しているのではないかと予想された。

考察

GLUT1はN末端、C末端を細胞内に向けた12回細胞膜を貫通する膜蛋白で、促進拡散により糖輸送を行う。この糖輸送は、GLUT蛋白が3次元構造を変化させリガンド結合部位を順次細胞内外に露呈することで進行すると推測されている。我々はこれまでに、第7膜貫通ドメイン内のグルタミン残基(Gln²⁸²)が、細胞外側から特異的にGLUT1を標識するATB-BMPAの結合に重要なアミノ酸であることや、第10膜貫通ドメイン内にあるプロリン残基(Pro³⁸⁵)が、GLUTの構造変化に重要な役割を果たすアミノ酸であることを報告してきた。

GLUT1の第7膜貫通ドメインの外側部に位置すると予想されるQ²⁸²QLSGINAVFY²⁹³アミノ酸モチーフは、種を越えて高度に保存されている。このアミノ酸モチーフの最外側に位置する2つのタイロシン残基(Tyr²⁹²、Tyr²⁹³)の糖輸送における役割を明らかにする目的で、それぞれイソロイシン、フェニルアラニンに置換した4種類の変異GLUT1(Y292I、Y292F、Y293I、Y293F)を作成した。このうちY292I、Y292F、Y293F変異体は野生型とほぼ同様の表現型を示したのに対して、Y293I変異体では著明な糖輸送活性の低下とともに、細胞内側リガンドであるcytochalasinBによる

標識の著名な低下が認められた。これらの表現型の変化は、Y293Fという1アミノ酸置換により、GLUT1が細胞外側リガンド結合部位を常に露呈したような形態に固定されることによるものと予測された。

D-Glucoseのアナログを用いた解析では、グルコースはC-1位を先頭にし、C-4、C-6位が遅れてGLUTの外側当結合部位に接近するが、その際C-4、C-6位を疎水性のアルキル基に置換すると外側糖結合部位との親和性が増加することが確認されている。このことから、外側糖結合部位にグルコースが接近した時、GLUTの外側糖結合部位に存在する疎水性の部分がグルコースのC-6の部位を外側から覆うように取りまき、グルコースを細胞外液からGLUT内の糖輸送路のより内部へと送り込むことにより糖輸送が遂行されるのではないかと予想される。

第7膜貫通ドメインの外側に位置する $Q^{282}QLSGINAVFY^{293}$ のアミノ酸モチーフは Q^{282} がATB-BMPAの結合に重要なアミノ酸であることから、外側糖結合部位形式に関与していると考えられている。最外側の Tyr^{293} がこの外側結合部位の疎水性を形成するのに重要なアミノ酸であると予想され、同じ芳香族のフェニルアラニンに置換したY293F変異体では表現型は不変であったのに対し、イソロイシンに置換したY293I変異体では糖の取り込みが低下した。これはイソロイシンの側鎖が疎水性ではあるが、タイロシンやフェニルアラニンに比し小さいため外側糖結合部位の疎水性の形成及び引き続き起こるグルコースの輸送には適さないためではないかと考えられた。

まとめ

GLUT1の第7膜貫通ドメインにある293番目のタイロシンは、糖輸送において重要な働きを有し、このタイロシンをイソロイシンに置換した変異GLUT1は外向きに固定された形態をとる。

論文審査の結果の要旨

促通拡散を行う糖輸送担体 (GLUT) は、細胞膜を12回貫通する分子量約5万の膜蛋白で、その各種isoformにおいて、N末端、C末端が細胞内に存在し、中央部に大きな細胞内ループを持つという極めて類似した構造をとっている。GLUTはその3次元構造を変化させ、その糖結合部位を順次、細胞内外に露呈することにより糖輸送を行いつたのではないかと予想されている。これらのGLUT各種isoformにおいて、第7膜貫通部位の細胞膜内の外側部に位置する $Q^{282}QXSGXNXXFY^{293}$ のアミノ酸モチーフは種を越えて高度に保存されており、糖輸送において重要な働きを持つ可能性が予測されている。

本研究では、このアミノ酸モチーフのC末端に位置する2つのタイロシン残基 (Y292, Y293) の片方をフェニルアラニンあるいはイソロイシンに置換したGLUT1の変異体 (Y292I, Y292F, Y293I, Y293F) を作成しCHO細胞に過剰発現させて、糖輸送能測定や、細胞内外糖結合部位に特異的に結合するリガンドを用いた標識実験を行い、野生型GLUT1と比較することにより、これらのタイロシン残基の働きを検討した。

その結果、Y292F, Y292I, Y293F変異体は、野生型とほぼ同様の表現型を示したのに対して、Y293I変異体では著名な糖輸送活性の低下と共に、細胞内外リガンドであるcytochalasinBによる標識の著名な低下が認められた。また、Y293I変異体では、細胞外側リガンドのATB-BMPAの標識が、cytochalasinB存在下で全く阻害されなかった。以上からGLUT1の293番目のタイロシン残基は糖輸送において重要な働きを有し、Y293I変異体は、細胞外側リガンド結合部位を常に露呈し、外向きに

固定され内向き構造をとれないような形態をとることが推測された。

本研究は、グルコーストランスポーターについて、その構造と機能の相関を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった第7膜貫通ドメイン内の2つのチロシン残基（Y292, Y293）の機能について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。