

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570132  
 研究課題名（和文） 小房型グルタミン酸トランスポーターによる輸送の分子機構  
 研究課題名（英文） Transport Mechanism of Vesicular Glutamate Transporter  
 研究代表者  
 表 弘志（OMOTE HIROSHI）  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
 研究者番号：10273707

**研究成果の概要：**小房型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)はV-ATPaseがATPの加水分解によって形成するH<sup>+</sup>の電気化学的勾配を駆動力とし、グルタミン酸を小胞内に輸送するトランスポーターである。この研究ではVGLUTによるグルタミン酸輸送の分子機構を明らかにすべく、VGLUTを含むSLC17型ファミリートランスポーターの輸送機構を速度論的に解析した。

**交付額**

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

**研究分野：**生体膜生化学

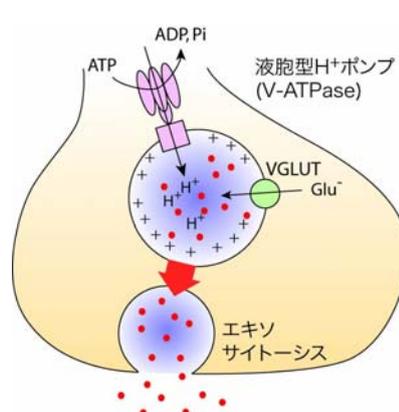
科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：生体膜・チャネル・トランスポーター・能動輸送、タンパク質、生化学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

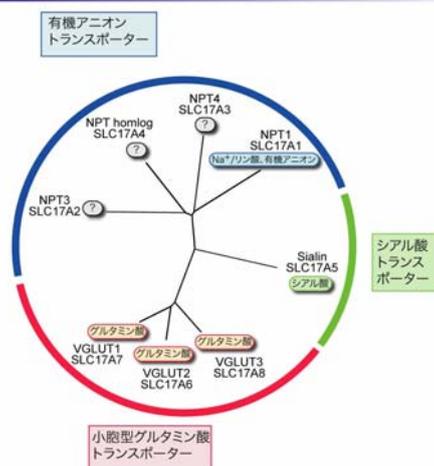
グルタミン酸は中枢神経系等で興奮性のシグナル伝達物質として作用し、高次精神活動において重要な役割を果たしている。小房型グルタミン酸輸送体(Vesicular Glutamate Transporter, VGLUT)はシナプス小胞等の分泌小胞にグルタミン酸を蓄積するトランスポーターである。分泌小胞等に蓄積されたグル

タミン酸は刺激に応じてエキソサイトーシスによって細胞外へ放出され



る。したがって、VGLUTはグルタミン酸シグナリングの要となる分子であるといえる。VGLUTはV-ATPase（液胞型H<sup>+</sup>ポンプ）がATPの加水分解によって作り出すH<sup>+</sup>の電気化学的勾配をエネルギー源として、グルタミン酸アニオンを膜小胞の中へ輸送する。VGLUTはSLC17型有機アニオントランスポーターファミリーに属しており、このファミリーにはリソソームのシアル酸トランスポーターや腎臓の有機アニオントランスポーターとして機能しているNPTが含まれている。

### SLC17 アニオントランスポーターファミリー



申請者らはVGLUTのグルタミン酸輸送機構を解明すべく、大量発現させたVGLUTを精製し、リポソームに埋め込んだ系を用いて解析してきた。その結果、VGLUTがグルタミン酸輸送にCl<sup>-</sup>を必要とする事を見いだした。さらに、変異導入による解析から、膜貫通領域のHis128、Arg184、Glu191の三つのアミノ酸残基がグルタミン酸輸送に必要である事を明らかにした。

興味深い事に、VGLUTは膜電位駆動型グルタミン酸輸送の他にNa<sup>+</sup>勾配駆動型のリン酸輸送活性を示し、この活性は上記3つの残基の変異によって影響されなかった。また、グルタミン酸輸送に必須な因子であるCl<sup>-</sup>はNa<sup>+</sup>勾配駆動型のリン酸輸送には必要でなかった。以上のことは、VGLUTがCl<sup>-</sup>依存性、基質特異

性、駆動力、必須残基の異なる2種類の輸送活性を持つ非常にユニークなトランスポーターである事を示している。

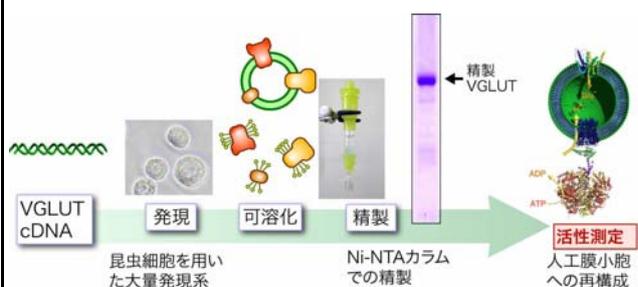
### 2. 研究の目的

このようにVGLUTは全く異なる二つの輸送活性を合わせ持つなど、他のトランスポーターに見られない興味深い特徴を持っている。この研究はこれまでの成果によって明らかになった上記特徴がどのようなメカニズムによって成り立っているのかを理解し、VGLUTによる輸送の分子機構を明らかにする事を最終目標としている。具体的には同じSLC17ファミリーに属するトランスポーターとの比較や変異導入と反応速度論的な解析により、①グルタミン酸、リン酸やCl<sup>-</sup>の認識に関わる残基の同定、②Cl<sup>-</sup>によるグルタミン酸輸送活性制御の分子機構、③既に同定したグルタミン酸輸送に必須な残基の役割を明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

小型グルタミン酸トランスポーターを含むSLC17型トランスポーターcDNAをGateway Insect Cell Expression Systemでバキュロウイルスに組み込んだ。組み換えウイルスを昆虫細胞sf9またはHigh Fiveに感染させ、組換えタンパク質を大量発現させた。

昆虫細胞を超音波破砕機で破砕し、膜面分を調製した。この膜小胞から、界面活性剤を



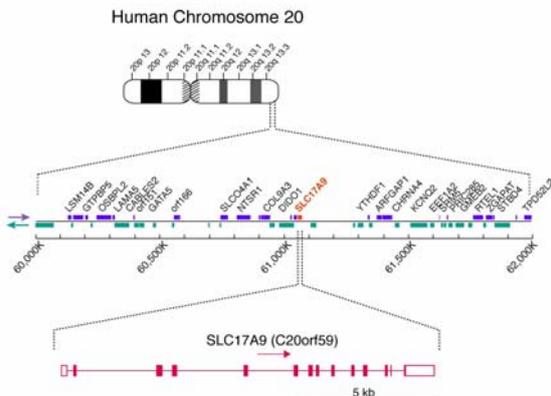
SLC17型トランスポーターの大量発現・精製・活性測定システム

用いて、膜蛋白質を可溶化し、Ni-NTAカラムクロマトグラフィーで精製した。精製したトランスポーターは凍結融解希釈法でリポソームに再構成した。

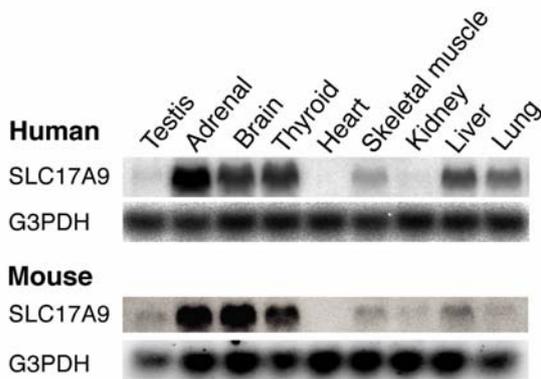
#### 4. 研究成果

VGLUTを含むSLC17型トランスポーターの輸送機能の解析にはファミリー内のトランスポーターの比較解析が有効であると考えた。VGLUTと同様に膜電位を駆動力として神経伝達物質であるATPを輸送するトランスポーターの存在が予測されていたが、その実体は長らく不明なままであった。我々はこの未知のトランスポーターがVGLUTのホモログではないかと考え、SLC17ファミリーに未知のメンバーがないかヒトゲノムを探索したところ、20番染色体に9番目のSLC17ファミリー遺伝子が存在する事を発見した。

#### Gene structure of SLC17A9

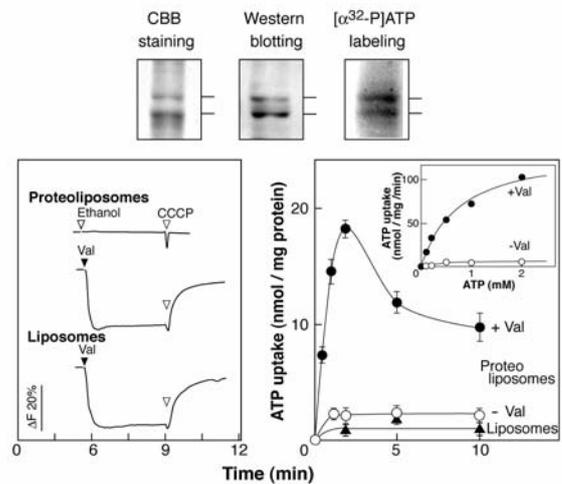


#### Northern blot analysis of SLC17A9



この新規遺伝子SLC17A9は副腎と脳に強く発現していた。マウス副腎の免疫染色及び、電子顕微鏡を用いた解析からSLC17A9蛋白質は副腎のクロマフィン顆粒に局在している事が明らかになった。この顆粒にはATPを輸送する未知のトランスポーターが存在する事が知られており、我々が見つけたSLC17A9がATP輸送体である事を示唆した。そこで、VGLUTの場合と同様にSLC17A9蛋白質を大量発現、精製する系を構築した。

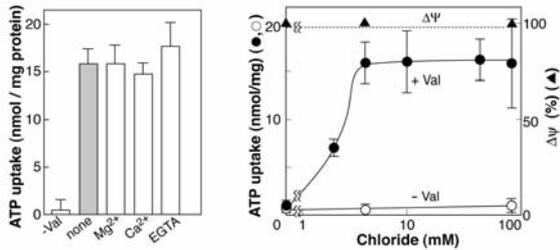
#### ATP uptake by purified reconstituted VNUT



精製トランスポーターをリポソームに組み込み、バリノマイシンを用いた拡散膜電位により、小胞の内側が正の膜電位を形成させた。そこに放射性ATPを添加したところ、時間依存的なATPの取り込みが見られた。

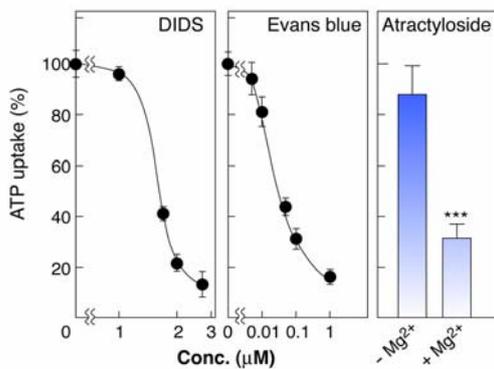
このATP輸送活性は膜電位によって駆動され、pH勾配やNa<sup>+</sup>勾配には影響されなかった。また、ATP以外にADPやGTPなど様々なヌクレオチドを輸送した。さらに興味深い事にこのトランスポーターはVGLUT同様にCl<sup>-</sup>イオンを活性に必要とした。また、このトランスポーターはVGLUTの阻害剤であるエバンズブルーで阻害された。これらの結果はこのトランスポーターがVGLUTと共通の機構で機能している事を示している。このトランスポーターがATPだけでなく色々なヌクレオチドを輸送する事

## Divalent cation and chloride ion dependence of ATP uptake



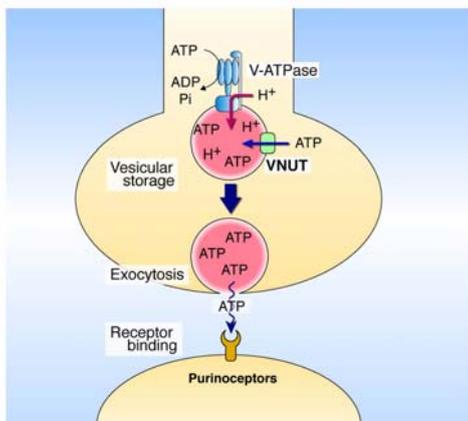
から小胞型ヌクレオチドトランスポーター、VNUTと名付けた。

## Effect of DIDS, Evans blue and atractyloside on ATP uptake



VNUTが生体内でヌクレオチドトランスポーターとして機能している事を確認するために、ATPを蓄積、開口放出する事が知られている松果体細胞を用いてRNAi実験を行った。その結果、SLC17A9遺伝子のノックダウンによって

## Purinergic neurotransmission system

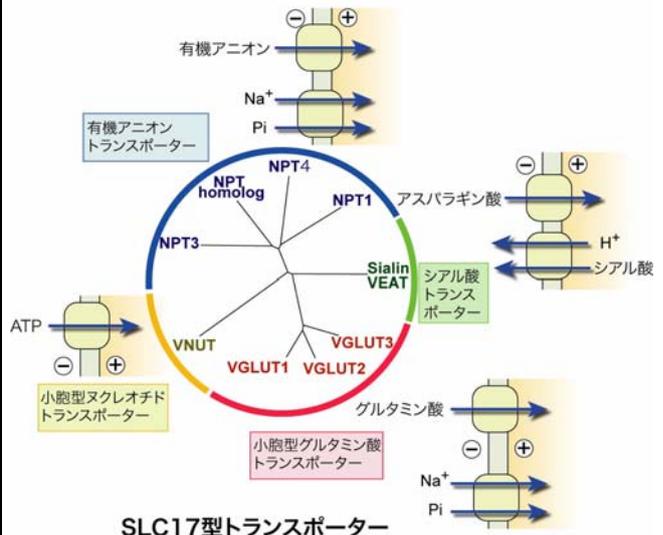


ATPの開口放出が抑制されることが示された。

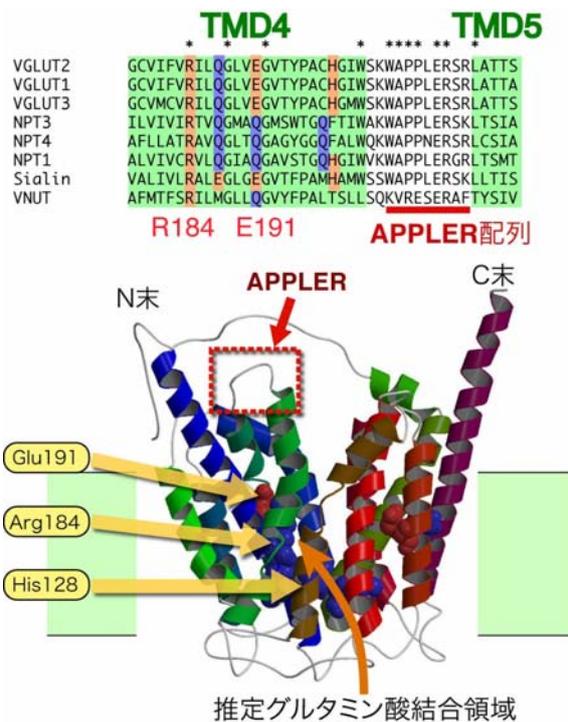
以上の結果はVNUTが長らく探し求められていた小胞型のATP輸送体の実体であり、そのメカニズムはVGLUTとよく似通っている事を示している。

同様にして、SLC17ファミリーの5番目のメンバーであるシアリンが小胞型アスパラギン酸トランスポーター(VEAT)である事を見いだした。このトランスポーターは膜電位を駆動力として、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸を輸送している。このトランスポーターもVGLUTと同様に、Cl<sup>-</sup>イオンを活性に必要とした。

新しく見つけたVNUTとVEATは基質特異性が異なるものの、膜電位依存性、Cl<sup>-</sup>要求性、エバンズブルーによる阻害などVGLUTと共通の性質を保持していた。この事はこれら3つのトランスポーターが同じメカニズムで作動している事を示している。



これら3つのトランスポーターにはVGLUTのArg184に対応する残基が保存されており、いずれのトランスポーターもこの残基をAlaに置換すると活性を失った。この事からArg184がグルタミン酸やATP等の有機アニオン輸送に必要な残基である事が示された。



一方、His128はVGLUTによるグルタミン酸輸送には必要であったが、VNUTやVEATには保存されていない。VEATはグルタミン酸とアスパラギン酸を輸送できるにもかかわらず、この残基が保存されていない。VGLUTはVEATと異なりアスパラギン酸を輸送しない。したがって、His128はVGLUT特異的な機能、グルタミン酸特異性に関わっている可能性が示唆された。

また、Glu191を他の残基に置換するとVGLUTのグルタミン酸輸送活性が大きく低下した。この残基はVEATとVGLUTには保存されているが、ヌクレオチド輸送体であるVNUTには保存されていない。したがって、Glu191はグルタミン酸、アスパラギン酸認識に関わるが、有機アニオントランスポーターとして必須な残基ではない事が明らかになった。

VGLUT、VNUT、VEATはいずれもCl<sup>-</sup>を必要とするが、これら3つのトランスポーターに完全に保存されている残基はArg184とAPPLER配列のGlu210、Arg211だけである。この事はこれら3つの残基の重要性を示している。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- 1 小胞型神経伝達物質トランスポーターの局在化機構  
表弘志、\*森山芳則  
蛋白質核酸酵素 **53**, 2220-2224, 2008 (査読有り)
- 2 Identification of a vesicular aspartate transporter.  
Miyaji T., Echigo N., Hiasa M., Senoh S., Omote H., \*Moriyama Y.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 11720-11724, 2008 (査読有り)
- 3 Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics.  
\*Moriyama Y., Hiasa M., Matsumoto T., Omote H.  
*Xenobiotica* **38**, 1107-1118, 2008 (査読有り)
- 4 Identification of a vesicular nucleotide transporter.  
Sawada K., Echigo N., Juge N., Miyaji T., Otsuka M., Omote H., Yamamoto A., \*Moriyama Y.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 5683-5686, 2008 (査読有り)
- 5 Role of glutamate residues in substrate recognition by human MATE1 polyspecific H<sup>+</sup>/organic cation exporter.  
Matsumoto T., Kanamoto T., Otsuka M., Omote H., \*Moriyama Y.  
*Am J Physiol Cell Physiol.* **294**, C1074-C1078, 2008 (査読有り)
- 6 薬物排出のアンカートランスポーター、MATEの構造と機能  
日浅未来、表弘志、\*森山芳則  
蛋白質核酸酵素 **53**, 52-58, 2008 (査読有り)
- 7 A novel variant of mouse MATE-1 H<sup>+</sup>/organic cation antiporter with a long hydrophobic tail.  
Kobara A., Hiasa M., Matsumoto T., Otsuka

M., Omote H., \*Moriyama Y.  
*Arch Biochem Biophys.* **469**, 195-199, 2008  
(査読有り)

**8** Functional characterization of  
testis-specific rodent multidrug and  
toxic compound extrusion 2, a class III  
MATE-type polyspecific H<sup>+</sup>/organic cation  
exporter.

Hiasa M., Matsumoto T., Komatsu T., Omote  
H., \*Moriyama Y.  
*Am J Physiol Cell Physiol.* **293**,  
C1437-C1444. 2007 (査読有り)

**9** 小胞型グルタミン酸トランスポーターの  
分子機構

\*表弘志、樹下成信

生化学 **79**, 956-960, 2007 (査読有り)

[学会発表] (計4件)

**1** 表弘志、小胞型抑制性アミノ酸トラン  
スポーター(VIAAT)の輸送機構解析、生体エ  
ネルギー研究会、2007年11月16日、山口大  
学

**2** 表弘志、SLC17型トランスポーターの新  
メンバー、小胞型ヌクレオチドトランスポ  
ーター(VNUT)の発見、生体エネルギー研究会、  
2008年11月7日、東京医科歯科大学

**3** Hiroshi Omote, Functional  
Characterization of Purified Human  
Multidrug And Toxic Compound Extrusion 1,  
JBMB, Dec9, 2008, Kobe

**4** Hiroshi Omote, Xenobiotic Transport By  
The MATE Family In Prokaryotes, Gordon  
Research Conference, March 23, 2009,  
Galveston, TX, USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

表弘志 (OMOTE HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准  
教授

研究者番号: 10273707