

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249005

研究課題名（和文） プリン性化学伝達の出力装置の構造・機能と生理的意義

研究課題名（英文） Structure, function and physiological significance of vesicular nucleotide transporter (VNUT)

研究代表者

森山 芳則 (MORIYAMA YOSHINORI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10150658

研究成果の概要（和文）：

プリン作動性化学伝達とは ATP を伝達物質として用いる細胞間情報伝達系である。中枢だけではなく全身に分布しており、痛みや味覚触覚などの感覚受容や、神経再生・血液凝固や糖代謝、血圧、炎症など多彩な生理機能を制御している。

小胞型ヌクレオチドトランスポーター(Vesicular nucleotide transporter, VNUT)はプリン作動性化学伝達の出力系を構成する基盤膜分子である。VNUT は、ATP を分泌するといわれている細胞にもれなく発現しており、その発現を抑制すると、その程度に応じて ATP 分泌が抑制された。この結果は、VNUT 機能を制御することで、プリン作動性化学伝達の出力を制御することができることを示唆している。本研究により、VNUT の構造と機能を追求し、その特性を明らかにした。特筆すべきは VNUT を制御するための二つのツールを開発したことである。すなわち、(1) *in vivo* でも有効な VNUT 活性制御剤を開発した。(2) VNUT のノックアウトマウスを作製した。このマウスでは VNUT により駆動されるプリン作動性化学伝達が消失ないし大幅に低下している。すなわち、VNUT を自在に制御することでプリン作動性化学伝達の全体像を解明する事ができる。

研究成果の概要（英文）：

ATP is a major chemical transmitter in purinergic signal transmission, which distributes throughout the body and plays an essential role in various physiological and pathological processes such as the reception of chemical senses and pains, neuroregeneration, platelet aggregation, inflammation. Before secretion, ATP is stored in the secretory vesicles. Vesicular nucleotide transporter (VNUT) is responsible for vesicular storage of nucleotide and thus plays an essential role in the purinergic chemical transmission. This study revealed structural and functional relationship, and physiological significance of VNUT. In particular we established (1) potent and reversible modifiers of VNUT and (2) knockout mice. Using these two tools, we can control purinergic chemical transmission *in vitro* and *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2010年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2011年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
総計	28,500,000	8,550,000	3,7050,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生化学、化学伝達、トランスポーター、プリン作動性、ATP、ノックアウトマウス、神経、アストロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

神経をはじめとする多くの細胞はモノアミン等の伝達物質を分泌し、他の細胞にシグナルを伝達している。これが化学伝達である。分泌過程は伝達物質の分泌小胞への濃縮と開口放出により構成されている。小胞型神経伝達物質トランスポーターはシナプス小胞などの分泌小胞に伝達物質を濃縮するための分子装置であり、化学伝達に必須である。これまでに知られる5つの伝達物質のうち、4種に対応する小胞型神経伝達物質トランスポーターは既に同定されている。

**ATP**はプリン性化学伝達を司る伝達物質であり、プリン受容体を介して、痛みや味覚などの感覚受容や、神経再生、炎症、血液凝固や骨代謝、血管収縮、免疫など多彩な生理機能を制御している (Burnstock G. *Physiol. Rev.* 87, 659, 2007)。ATPは神経やグリア細胞の分泌小胞に蓄積し開口放出されることから小胞型ATPトランスポーターの存在が仮定されていた。しかしながら、4半世紀にわたる追求にも関わらずその正体は不明であった。そのため、いつ・どこから・どのようにしてATPが分泌されるのかというプリン性化学伝達の根幹の問題が未解決のまま取り残されていた。

代表者は、真核細胞のトランスポーターを生化学的に取り扱う一般的な方法を開発し、それを用いて小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) の構造と機能を世界に先駆け解析した (JBC.2006)。この成果が基盤となり SLC17 アニオン輸送体ファミリーの9番目のメンバー SLC17A9 が小胞型ATPトランスポーターに他ならない事を実証した (PNAS. 2008)。SLC17A9はATP以外にGTP, ADP等のヌクレオチドを能動的に輸送することから小胞型ヌクレオチドトランスポーター (**vesicular nucleotide transporter, VNUT**) と命名した。VNUTはプリン性化学伝達の起点を解析するための唯一かつ強力な膜分子プローブである。VNUTの発見によりプリン性化学伝達のミッシングリンクが埋まり、プリン性化学伝達の全体像を解明することが可能となった。

## 2. 研究の目的

VNUTはプリン性化学伝達の出力機構を解明する強力な唯一の膜分子である。本研究により、VNUTの構造・輸送と制御の分子機構・生理的意義を統合的に解明し、プリン性化学伝達の全体像を明らかにすることを目

的とした。次のサブテーマで実施した。

1. 結晶構造を解析する。
2. 輸送と制御の分子機構を生化学的に解明する。
3. ATP分泌細胞と蓄積顆粒を同定、その分泌機構を解明する。
4. 活性調節剤を開発する。
5. ノックアウトマウスを作製し、ATP分泌の生理的意義を解明する。

## 3. 4. 研究の方法及び結果

サブテーマごとに記載した。

### VNUTの結晶を調製した。

PNASに報告した方法は昆虫細胞内でヒトVNUT(hVNUT)とマウスVNUT(mVNUT)を発現させ可溶化後、アフィニティーカラムで精製するものであった。この方法の収率を100倍向上させた大腸菌による大量発現・精製系を構築した。一回の精製により数十mgのほぼ純粋な機能を維持したVNUTが調製できる (JBC.2010)。この標品を用いて結晶作成を試み、微結晶を得ている。しかし構造解析に進むには至っていない。構造解析に適した結晶の最適条件を決定中である。イスラエルとの共同研究として実施している。

### VNUTの輸送と制御の分子機構を一部解明した。

我々は精製VNUTだけをタンパク成分とするリポソームによるATP輸送測定系を確立している。この方法を用い、これまでにVNUTは塩素イオン(5mM以上)で活性化され膜電位により駆動されることを証明した (Neuron.2010)。この塩素イオンによる活性化は結合部位への結合の結果であり、DIDSのような化学修飾剤と競合阻害することを明らかにした。部位特異的変異導入と化学修飾法を組み合わせ、ATP輸送に必要なアミノ酸残基と塩素イオンの結合部位を決定した (JBC.2011)。同時に、放射性ATPを用いた光親和性標識 (PNAS.2008a)によりラベルされるアミノ酸残基を生化学的に同定する。塩素イオンとDIDSとが競合することも利用する。予備的にはVNUTのアプラー配列近傍にこの部位が存在するという証拠を得た。塩素イオンの結合によりこの近傍に蛍光団を導入しenergy transfer起こる事を実証した。現在、この現象をもとにVNUTの機能単位(3量体ないし4量体)を決定中である。

### VNUT をプローブにして ATP 分泌細胞と蓄積顆粒を同定し、その分泌機構を一部解明した。

VNUT が中枢の神経・アストロサイト・複数の内分泌細胞・末梢の神経末端・味蕾の味細胞・血小板・だ腺分泌細胞など広範に発現・分布していることがわかった。これらの細胞は ATP あるいはそれ以外のヌクレオチドを蓄積・分泌していることがわかっている (Burnstock G 2007, *Physiol. Rev.*87, 659) 神経とアストロサイトの ATP 分泌に VNUT がどのように関わっていることを実証した。すなわち、単離した脳、初代培養細胞 (海馬神経とアストロサイト) での VNUT 含有小胞を組織化学・免疫電子顕微鏡法・細胞分画により同定した。海馬神経の VNUT 小胞はシナプス小胞の一種であり、アストロサイトのそれはペプチド含有分泌顆粒であった。培養細胞での ATP 分泌の性質を調、開口放出のクライテリアを満足する事、脱分極刺激で開口放出されること、VNUT の発現を RNAi で抑えると分泌が阻害程度に応じて抑制されることを見いだした (Cerebral Cortex 2011)。

さらに、内分泌細胞 (ランゲルハンス氏島の  $\beta$  細胞と  $\alpha$  細胞) と小腸の L 細胞ならびに血小板における ATP (ADP) 分泌機構を調べた。後述する VNUT ノックアウトマウスを用いて整合性のある結果が得られた。現在、論文公表を急いでいる。

### VNUT の活性調節剤を開発した。

VNUT を *in vitro* および *in vivo* で特異的に阻害する物質があれば VNUT の機能研究に大いに役立つに違いない。しかも、それが毒性の少ないものであればさらによい。そのような低分子の生体内成分 (ケトン体) を発見した (特願 2008-70207)。ケトン体 (特にアセト酢酸) は塩素イオン結合部位において塩素イオンの親和性を低下させ、結果として可逆的に VNUT を阻害する。アセト酢酸は培地に添加するだけで培養した神経からの ATP 分泌を阻害する。すなわち、アセト酢酸はプリン性化学伝達を、可逆的に元から断つことができる (Neuron.2010)。さらに、この実験系を改良して、アセト酢酸よりも10倍程度 *in vivo* においても有効な調節剤を開発した。これを用いる事により、少なくともある種のプリン作動性化学伝達を自在に制御することが可能である。

### VNUT ノックアウトマウスを作製した。ATP 分泌の生理的意義を一部解明した。

VNUT マウスを作成した。予想通り、このマウスは VNUT が関与するプリン作動性化学伝達を消失している。これにより複数の表現系が

現れている。現在、論文発表を急いでいる。

VNUT はプリン作動性化学伝達の出力機構を解明する鍵分子である。本研究により VNUT を用いて ATP 分泌を自在に制御し、生理・病理レベルの変動を定量的に解明し、次世代のプリン作動性化学伝達研究の基盤を構築できた。特に、VNUT を制御するための二つのツールを開発した。すなわち、(1) *in vivo* でも有効な VNUT 活性制御剤を開発した。活性を維持した VNUT の大量精製システムと構造生物学的成果により、活性を制御する分子スイッチを見いだした。この分子スイッチは塩素イオンと結合することにより恒常的に活性化 (オン) 状態にあるが、ケトン体等の代謝中間体により可逆的にオフされ、*in vivo* で化学伝達が制御できる。(2) VNUT のノックアウトマウスを作製した。このマウスでは VNUT により駆動されるプリン作動性化学伝達が消失ないし大幅に低下している。プリン作動性化学伝達の出力系に焦点をあてたオンリーワン (独創)・ナンバーワン (独走) 研究が展開できた。世界のプリン作動性化学伝達の基礎・臨床研究を強力に牽引し、プリン作動性化学伝達の出力研究における圧倒的優位性を確保することができたと考えている。

## 6. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

以下のオリジナル論文は全て査読有り。

1. Togawa N, Miyaji T, Izawa S, Omote H, Moriyama Y. (2012) A Na<sup>+</sup>/phosphate co-transporter homologue (SLC17A4 protein) is an intestinal organic anion exporter. *AmJPhys.* [Epub ahead of print]
2. Miyaji T, Sawada K, Omote H, Moriyama Y. (2011) Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *J Biol Chem.* **286** : electric version.
3. Larsson M, Sawada K, Morland C, Hiasa M, Ormel L, Moriyama Y. Gundersen V. (2011) Functional and Anatomical Identification of a Vesicular Transporter Mediating Neuronal ATP Release. *Cereb. Cortex.* **21** : electric version.
4. Omote H, Miyaji T, Juge N, Moriyama Y. (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry.* **28**;50(25):5558-5565. (review)
5. Miyaji T, Omote H, Moriyama Y. (2011) Functional characterization of vesicular

- excitatory amino acid transport by human sialin. *J. Neurochem.* **119** (1) 1-5.
6. Mihara H, Boudaka A, Sugiyama T, **Moriyama Y**, Tominaga M. (2011) Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4)-dependent calcium influx and ATP release in mouse esophageal keratinocytes. *J Physiol.* **589**:3471-3482.
  7. Komatsu T, Hiasa M, Miyaji T, Kanamoto T, Matsumoto T, Otsuka M, **Moriyama Y**, Omote H. (2011) Characterization of the human MATE2 proton-coupled polyspecific organic cation exporter. *Int J Biochem Cell Biol.* **43**(6):913-918.
  8. Juge N, Omote H, Gray JA, Miyaji T, Inoue T, Hara C, Uneyama H, Edwards RH, Nicoll RA, **Moriyama Y**. (2010) Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release. *Neuron*, **68**: 99-112.
  9. Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, Hiasa M, Anzai N, Omote H, and **Moriyama Y**. (2010) Type 1 sodium dependent phosphate transporter (SLC17A1 protein) is a Cl<sup>-</sup>-dependent urate exporter. *J Biol Chem.* **285**: 26107-26113.
  10. Leviatan S, Sawada K, **Moriyama Y**, Nelson N. (2010) A combinatorial method for overexpression of membrane proteins in *E. coli*. *J Biol Chem.* **285**: 23548-23556.
  11. Tokunaga A, Tsukimoto M, Harada H, **Moriyama Y**, Kojima S. (2010) Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *J Biol Chem.* **285**: 17406-17416.
  12. Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, **Moriyama Y**, and Shinozaki K. (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**:2361-2366.
  13. Juge N, Muroyama A, Hiasa M, Omote H, **Moriyama Y**. (2009) Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl<sup>-</sup>/gamma-aminobutyrate Co-transporter. *J Biol Chem.* **284**: 35073-35078.
  14. Iwatsuki K, Ichikawa R, Hiasa M, **Moriyama Y**, Torii K, Uneyama H. (2009) Identification of the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in taste cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **388**: 1-5.
  15. Morita M, Shitan N, Sawada K, Van Montagu MC, Inzé D, Rischer H, Goossens A, Oksman-Caldentey KM, **Moriyama Y**, Yazaki K. (2009) Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**: 2447-2452.
  16. 森山芳則 (2011) 構成的手法によるトランスporter研究の最前線：化学伝達を制御するイオンスイッチの発見、*生化学 Vol.83 No.4*: 294-303
- [学会発表] (計 9 件)
1. 森山芳則  
Highlighting the Molecular Basis of Purinergic Transmission  
ISN-ESN-2011(メガロンアテネ国際会議センター)2011、8/29
  2. 森山芳則  
小胞型 ATP トランスporter-VNUT の構造・機能・制御  
Structure, function and regulation of vesicular transporter (VNUT) ,a missing link of purinergic chemical transmission. シンポジウム発表〈ATP トランスporter (VNUT) によるプリン性科学伝達研究の新展開〉(Neuro2010 第 53 回日本神経化学会(神戸)大会、第 33 回日本神経科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会、合同大会(神戸コンベンションセンター) 2010、9/2
  3. 森山芳則  
「The role of vesicular nucleotide transporter in neuron/glia interaction」  
The role of neuroglia for the formation,function and plasticity of synapses  
( DFG-Priority Programme 1176-Final Symposium in Kaiserslautern Germany (at the Fraunhofer-Centre) 招待講演ドイツ、2010、8/27
  4. 森山芳則  
Vesicular aspartate and nucleotide transporters  
(GRC on Membrane Transport Proteins 2010 (University of New England) 招待講演 アメリカ ポートランド、2010、8/18
  5. 森山芳則  
有機溶質のトランスporter：基質輸送の電気生理学的特性と病態との関連  
〈新しいトランスporter研究法により導かれた小胞型神経伝達物質トランスporterの分子機能〉シンポジウム発表  
〈Molecular properties of vesicular neurotransmitter transporters as revealed

with novel transporter technology)

第 87 回日本生理学会大会 (いわて県民情報交流センター) 2010、5/19

#### 6. 森山芳則

シグナル分子トランスポーターの新たな展開

New developments in signaling-molecule transporters

〈小胞型神経伝達物質とトランスポーターの分子機構と制御〉第 83 回 日本薬理学会 (大阪国際会議場) 2010、3/16 口頭発表

#### 7. 森山芳則

小胞型神経伝達物質トランスポーターの輸送機構

〈タンパク機能原理に基づく神経活動探索分子ツール〉第 32 回日本神経科学大会シンポジウム (名古屋国際会議場) 2009、9/17 口頭発表

#### 8. 森山芳則

神経伝達物質トランスポーターの構造・機能・制御: 化学伝達の人工制御を目指して 第 2 回 Bimonthly Symposium トランスポーターシンポジウム: トランスポーター研究の新たな展開-トランスポーターを標的とした創薬への動向- (神戸、神戸臨床研究情報センター) 2009、6/2

#### 9. 森山芳則

Vesicular glutamate transporter acts as a metabolic regulator

「the 2009 Annual meeting of Korean Endocrine Society」韓国ソウル、2009、5/2

[図書] (計 1 件)

森山芳則、学研メディカル秀潤社、細胞工学 Vol.31 No.5 (特集記事) 小胞型神経伝達物質トランスポーター: 機能制御と薬物標的としての意義、2012 年 5 月号

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 興奮性化学伝達調節剤およびそのスクリーニング法

発明者: 森山芳則、表弘志、樹下成信

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2009/055208

出願年月日: 平成 21 年(2009) 3 月 17 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 2 件)

名称: 哺乳動物における新規トランスポータータンパク質およびその利用

発明者: 森山芳則、表弘志、大塚正人、松本拓也、日浅未来

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 第 4752068 号

取得年月日: 平成 23 年(2011) 6 月 3 日

国内外の別: 国内

名称: 哺乳動物における新規 SLC17 型トランスポータータンパク質およびその利用

発明者: 森山芳則、表弘志、澤田啓介

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 第 07951595 号

取得年月日: 平成 23 年(2011) 5 月 31 日

国内外の別: 国外

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 芳則 (MORIYAMA YOSHINORI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 10150658

結晶構造生物学研究の第一人者である Nathan Nelson 教授 (テルアビブ大) と共同で VNUT の結晶構造を解析している。分子生物学・生化学実験は任用する研究補助員一名、博士学生 3 名、修士学生 5 名が担当する。細胞生物学研究は博士修士学生各一名が担当する。森山は全体総括と生化学実験を担当した。