

## 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 25 年 5 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21370057

研究課題名（和文）

マルチトランスポーターマシンの分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanism of the multi-transport machinery

研究代表者

表 弘志 (Hiroshi Omote)

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（和文）：VGLUTはSLC17ファミリーに属するトランスポーターで膜電位を駆動力としてシナプス小胞にグルタミン酸を輸送する、グルタミン酸化学伝達の必須因子となっている。SLC17型トランスポーターは膜電位依存性のアニオン輸送活性とNa<sup>+</sup>勾配によって駆動されるリン酸輸送活性を併せ持つ特異なトランスポーターである。本研究ではSLC17型トランスポーターの輸送機構とその生理的意義について解析した。

研究成果の概要（英文）：The vesicular glutamate transporter (VGLUT) is a member of the SLC17 family and transports glutamate into synaptic vesicles using a membrane potential as a driving force. VGLUT plays essential roles in glutamatergic signal transmission. The SLC17 family members are unique transporter which two distinct transport activity ,membrane potential driven anion transport and Na<sup>+</sup> gradient driven inorganic phosphate transport. In this study, we investigated functional mechanism and roles of SLC17 transporters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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、トランスポーター、タンパク質、生化学、神経、輸送

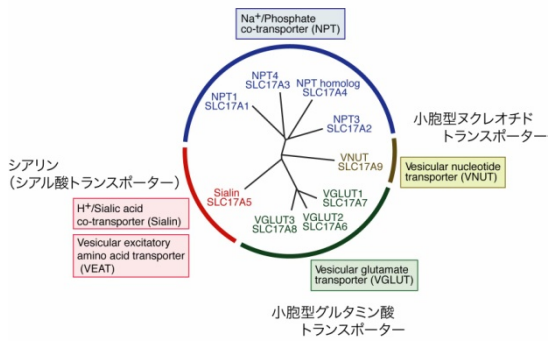
### 1. 研究開始当初の背景

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している。小胞型グルタミン酸輸送体(Vesicular Glutamate Transporter, VGLUT)はシナプス小胞にグルタミン酸を輸送・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。

## 2. 研究の目的

SLC17型トランスporterファミリー



VGLUT を含む SLC17 ファミリーのトランスporterはいずれも膜電位を駆動力として、アニオン性の基質を輸送するトランスporterである。また、SLC17 型トランスporterは塩素イオンで活性化される興味深い特徴を持っているが、その輸送機構は明らかになっていない。本研究では VGLUT を中心に、SLC17 型トランスporterの分子機構を明らかにしようとするものである。

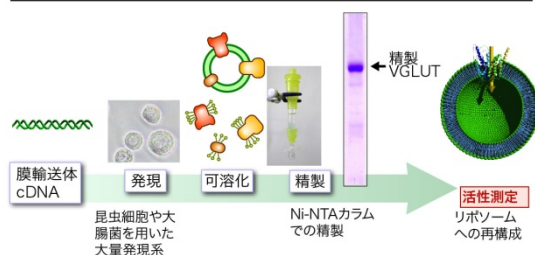
## 3. 研究の方法

NPT1、NPT4、NPT3、NPT ホモログ、VGLUT2、VNUT および VEAT を大量発現するため、組換えバキュロウィルスを作成した。昆虫細胞 High Five にこれを感染させ、これらのトランスporterを発現させた。この細胞から、トランスporterを可溶化後、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porterは凍結・融解・希釈法でリボソーム中に再構成し、輸送活性を測定した。

## 4. 研究成果

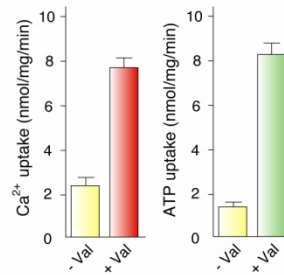
これらの SLC17 ファミリートランスporterを精製、再構成し、輸送活性を測定したところ、VNUT をのぞきいずれも、Na<sup>+</sup>勾配を駆動力とするリン酸輸送活性と膜電位を駆動力とするアニオン輸送活性を持っていた。NPT1 はもともと腎臓の論さん輸送体として単離されたものであるが、生理的にはアニオン性の薬物を原尿へと排出する薬剤排出トランスporterである事が明らかになった。この活性は VGLUT によるグルタミン酸輸送と同様に塩素イオンで活性化される。興味深い

### 輸送体の大量発現と精製・活性測定系



事に NPT1 は尿酸も基質として認識し、輸送した。最近の遺伝学的調査により、NPT1 が痛

Stoichiometry of ATP and Ca<sup>2+</sup> uptake



風関連遺伝子として報告されており、本研究の成果はこのトランスporterの活性が体内尿酸濃度の決定に関わっている事を示している。

また、小胞型ヌクレオチドトランスporterは膜電位を駆動力として ATP などのヌクレオチドを小胞内に輸送するトランスporterである。このトランスporterの輸送機能解析から、VNUT が二価カチオンもヌクレオチドとともに輸送する事が明らかになった。二価カチオンはクロマフィン顆粒などに蓄積されている事が明らかになっているが、これまでその理由は明らかにされていなかった。本研究の成果は VNUT が分泌小胞への二価カチオン蓄積に関わっている事を示している。一方、VNUT はリン酸を輸送しなかった。VNUT は ATP を輸送し、リン酸によって中程度に阻害される。VNUT においては ATP のリン酸結合部位形成のためにリン酸結合部位が機能しなくなっているものと推定した。

VGLUT の Arg184 は全ての SLC17 ファミリーに保存されており、いずれのトランスporterにおいても、この残基の変異は電位依存性のアニオン輸送活性のみを阻害した。

また興味深い事に電位依存性のアニオン輸送活性のみが塩素イオン依存性を示した。塩素イオンによる活性化はグルタミン酸結合を変化させない事から、アロステリックな活性因子である事が明らかになった。また、塩素イオンによる活性化には強い正の協同性が見られ、VGLUT がオリゴマーとして機能している事を示唆した。この事はクロスリンク実験等から確認した。このような塩素イオンによる活性化は電位依存性のアニオン輸送のみに見られ、リン酸輸送は典型的なミカエリス・メンテン型であり、モノマーとして機能しているものと推定した。

したがって、膜電位を駆動力とするアニオン輸送活性にはオリゴマー間の相互作用が重要であり、一方、Na<sup>+</sup>勾配によって駆動され

るリン酸輸送ではモノマーが機能ユニットとなる事が明らかになった。

#### 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 10 件)

① **Omote, H.**, \*Moriyama, Y. (2012) Vesicular Neurotransmitter Transporters: An approach for studying transporters with purified proteins.

*Physiology* 28, 39-50. doi: 10.1152/physiol.00033.2012.

② Togawa N, Miyaji T, Izawa S, **Omote, H.**, \*Moriyama Y. (2012) A Na<sup>+</sup>-phosphate cotransporter homologue (SLC17A4 protein) is an intestinal organic anion exporter.

*Am J Physiol Cell Physiol.* **302**, C1652-C1660. doi: 10.1152/ajpcell.00015.2012.

③ Miyaji, T., Sawada, K., **Omote, H.**, \*Moriyama, Y. (2011) Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter.

*J. Biol. Chem.* **286**, 42881-42887. doi: 10.1074/jbc.M111.277269.

④ Miyaji, T., **Omote, H.**, \*Moriyama, Y. (2011) Functional characterization of vesicular excitatory amino acid transport by human sialin.

*J. Neurochem.* **119**, 1-5. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07388.x.

⑤ \***Omote, H.**, Miyaji, T., Juge, N. and Moriyama, Y. (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport.

*Biochemistry* **50**, 5558-5565. doi: 10.1021/bi200567k.

⑥ Komatsu, T., Hiasa, M., Miyaji, T., Kanamoto, T., Matsumoto, T., Otsuka, M., Moriyama, Y. and \***Omote, H.** (2011) Characterization of the human MATE2 proton-coupled polyspecific organic cation exporter.

*Int J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 913-918. doi: 10.1016/j.biocel.2011.03.005.

⑦ Juge, N., Gray, J.A., **Omote, H.**, Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R.H., Nicoll, R.A. and \*Moriyama, Y. (2010) Metabolic control of vesicular

glutamate transport and release.

*Neuron* **68**, 99-112. doi:

10.1016/j.neuron.2010.09.002.

⑧ 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. doi: 10.1074/jbc.M110.122721.

⑨ Sonoda, Y., Cameron, A., Newstead, S., **Omote, H.**, Moriyama, Y., Kasahara, M., \*Iwata, S., \*Drew, D. (2010) Tricks of the trade used to accelerate high-resolution structure determination of membrane proteins.

*FEBS* **584**, 2539-2547. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.015.

⑩ Juge, N., Muroyama, A., Hiasa, M., **Omote, H.** and \*Moriyama, Y. (2009) Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl<sup>-</sup>/γ-aminobutyrate co-transporter.

*J. Biol. Chem.* **284**, 35073-35078. doi: 10.1074/jbc.M109.062414.

[学会発表] (計 7 件)

①表 弘志、NPT ホモログは新規尿酸排出トランスporterである、日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会、2012 年 12 月 22-24 日、岡山

②表 弘志、NPT ホモログは新規尿酸排出トランスporterである、生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012 年 11 月 15-16 日、京都

③表 弘志、小房型グルタミン酸トランスporterの活性制御、日本生体エネルギー研究会 第 36 回討論会、2011 年 12 月 20-22 日、京都

④表 弘志、小房型神経伝達物質トランスporterの機能制御、生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2011 年 11 月 24-25 日、岡山

⑤表 弘志、小房型ヌクレオチドトランスporterによる二価カチオン輸送、日本生体エネルギー研究会 第 36 回討論会、2010 年 11 月 19-20 日、大阪

⑥表 弘志、小房型神経伝達物質トランスporterとシアル酸輸送、第 82 回日本生化学

会大会、2009年10月21-10月24日、神戸

⑦表 弘志、小胞型抑制性アミノ酸トランスポーター(VIAAT)による Cl<sup>-</sup>輸送日本生体エネルギー研究会 第 35 回討論会、2009年12.18-12.20、旭川医科大学

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 4件)

①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:岡山大学  
種類:特許  
番号:第 5219146 号  
取得年月日:平成 25 年 3 月 15 日  
国内外の別:国内

②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:岡山大学  
種類:特許  
番号:第 4752068 号  
取得年月日:平成 23 年 6 月 3 日  
国内外の別:国内

③名称:Novel SLC-17-type transporter protein in mammal and use thereof.  
発明者:Moriyama, Y., Omote, H., Sawada, K.  
権利者:岡山大学  
種類:特許(EU)  
番号:EP 2159281B1  
取得年月日:2012 Sep 26  
国内外の別:国外

④名称:Methods for screening modulators of SLC17-type anion transport activity  
発明者:Moriyama, Y., Omote, H., Sawada, K.  
権利者:岡山大学  
種類:特許(米国)  
番号:US7,951,595B2  
取得年月日:2011 May 31  
国内外の別:国外

⑤名称:Novel Transporter protein in mammal and utilization of the same.  
発明者:Moriyama, Y., Omote, H., Otsuka, M., Matsumoto, T., Hiasa, M.  
権利者:岡山大学  
種類:特許(米国)  
番号:US7,892,728B2  
取得年月日:2010, Nov. 4  
国内外の別:国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/seika/home/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

表 弘志 (Hiroshi Omote)

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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし