

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 3月 31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790067

研究課題名（和文） アスパラギン酸とプリン性化学伝達の生理的意義について

研究課題名（英文）

The physiological significance of aspartergic and purinergic neurotransmission.

研究代表者

宮地 孝明 (MIYAJI TAKAAKI)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助教

研究者番号：40550314

研究成果の概要（和文）：

神経は伝達物質をシナプス小胞内に濃縮しシナプス間隙に開口放出することで、後シナプス側にシグナルを伝達する（化学伝達）。我々は、アスパラギン酸、ATPをシナプス小胞内に濃縮する小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター（VEAT）、小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT）を世界に先駆け同定した。本研究課題は、VEATとVNUTを通じ、アスパラギン酸及びプリン性化学伝達の生理的意義を解明することを目的とした。その結果、主に（1）神経障害を引き起こすサラ病のVEAT遺伝子変異によりアスパラギン酸輸送活性が欠損していること、（2）VNUTは二価金属カチオンをATPとのキレート体として輸送し、小胞内に二価金属カチオンを貯めること、（3）VEATとVNUTは塩素イオンによる活性化とケトン体による抑制という分子スイッチを持つこと、（4）アスパラギン酸化学伝達は酸化ストレスに関与していることを見いだした。以上より、アスパラギン酸及びプリン性化学伝達の出力系の分子メカニズム、及びそれらの生理的意義の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

Neurotransmitter is stored in synaptic vesicles, is released upon depolarization-evoked stimulation, and binds to specific receptor, which in turn leads to neurotransmission. We identified vesicular excitatory amino acid transporter (VEAT) and vesicular nucleotide transporter (VNUT), which are responsible for vesicular storage of neurotransmitter. In this study, we investigated the physiological significance of aspartergic and purinergic neurotransmission using VEAT and VNUT as molecular probes. We found that (1) VEAT mutants causing Salla disease are devoid of aspartate transport activity, (2) VNUT transports divalent cation complexed with ATP, physiologically, (3) ketone bodies inhibit aspartate, glutamate and ATP release by competing with Cl⁻, (4) aspartergic neurotransmission is associated with oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：小胞型ヌクレオチドトランスポーター、小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター、化学伝達、サラ病、塩素イオン、ケトン体

1. 研究開始当初の背景

神経は伝達物質をシナプス小胞へ濃縮しシナプス間隙に開口放出することで、後シナプス側にシグナルを伝達する（化学伝達、図1）。小胞型神経伝達物質トランスポーターはシナプス小胞に神経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4種類が同定されており、これらのトランスポーターを搭載した分泌小胞には対応する基質（伝達物質）がそれぞれ濃縮されており、その近傍で開口放出される（表1）。つまり、小胞型神経伝達物質トランスポーターは化学伝達の種類と開始点を決定する分子プローブといえる。しかしながら、アスパラギン酸とATPを小胞内に濃縮するそれぞれのトランスポーターが同定されていなかった。アスパラギン酸は興奮作用を示すNMDA受容体の天然のリガンドであり、一部の神経のシナプス小胞に含まれている。また、ATPはプリン性化学伝達のシグナル分子であり、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など多彩な生理機能を制御する。

表1 これまでに発見された小胞型神経伝達物質トランスポーター
□ 枠が最近、我々が同定したトランスポーターである。

発見	トランスポーター	遺伝子	神経伝達物質
2008	小胞型アスパラギン酸トランスポーター (VEAT)	SLC17A5	アスパラギン酸 グルタミン酸
2008	小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT)	SLC17A9	ATP ADP GTP
2002- 2000	小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT)	SLC17A6-8	グルタミン酸
1997	小胞型抑制性アミノ酸トランスポーター (VIAAT)	SLC32A1	GABA グリシン
1994	小胞型アセチルコリントランスポーター (VAChT)	SLC18A3	アセチルコリン
1992	小胞型モノアミントランスポーター (VMAT)	SLC17A1-2	セロトニン ドーパミン ヒスタミン アドレナリン

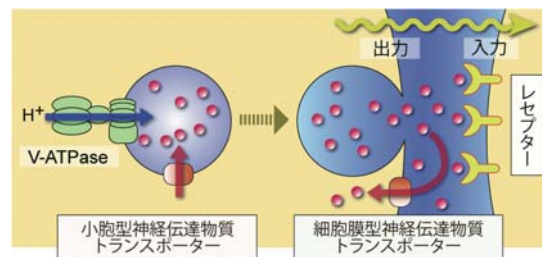


図1 神経化学伝達のメカニズム

我々は世界に先駆け、シアル酸蓄積症の原因遺伝子であるリソソーム・H⁺/シアル酸トランスポーター（シアリン、SLC17A5）が小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター（Vesicular excitatory amino acid transporter: VEAT）として機能すること、また、SLC17ファミリーに機能未知な9番目のメンバーが小胞型ヌクレオチドトランスポーター（Vesicular nucleotide transporter: VNUT）として機能することを見いだした。

以上の発見により、出力機構に着目したアスパラギン酸とATPの化学伝達に関する研究の幕が切れておとされた。

2. 研究の目的

本研究課題は、我々が新たに見いだしたVEATとVNUTに着目し、アスパラギン酸とプリン性化学伝達の生理的意義を解明することを目的とした。そのために、部位特異的変異導入法による分子メカニズムの解明、モデル生物を利用したそれぞれの化学伝達の生理的意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

①輸送活性測定法

我々は、真核細胞のトランスポーターの構造と機能を解析する普遍的な方法を確立した（*J.Biol.Chem.* 2006 **51** 39499-506）。すなわち、任意のトランスポーターを昆虫細胞で大

量に発現させ、界面活性剤にて可溶化・アフィニティー精製し、トランスポーターのみを含む人工膜小胞を調製し輸送機能を測定するというものである（図2）。この方法は、野生型や変異体の単一トランスポーターの輸送機能を定量的に解析することができる。小胞内へのアスパラギン酸や ATP の輸送活性を評価できる唯一の方法である。VEAT と VNUT を部位特異的変異導入し、上記の方法にて輸送活性測定する。

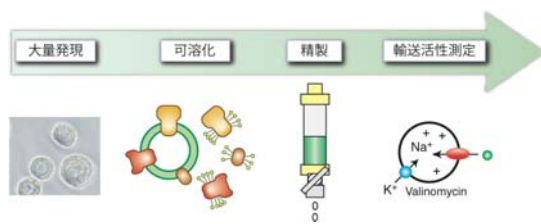


図2 輸送活性測定系

②モデル生物の解析

モデル生物としてショウジョウバエに着目した。ショウジョウバエは神経の発生過程や化学伝達について詳しく研究され、ヒトと同様の化学伝達システムが報告されている (*Brain Res. Rev.* 2004 47 18-32)。また、ほ乳類よりも世代交代が早く、解析も容易である。ショウジョウバエ VEAT とショウジョウバエ VNUT の輸送活性測定し、GAL4-UAS 法、免疫染色法により発現・局在を解析する。さらに、VEAT と VNUT の遺伝子をそれぞれノックアウトし、その表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) VEAT はシアル酸蓄積症の原因遺伝子である。シアル酸蓄積症は神経障害を引き起こすサラ病と致死性の乳児シアル酸蓄積症に分類されるが、なぜサラ病において神経障害を引き起こすのかわかっていなかった。我々はシアル酸蓄積症を引き起こす遺伝子変異体を複数解析し、興奮性アミノ酸とシアル酸輸送活性を評価した。その結果、神経障

害を引き起こす変異体は一貫してアスパラギン酸輸送活性を欠損していた。一方、シアル酸輸送活性は半分程度保持されていた。また、致死性の変異はシアル酸輸送活性を欠損していた。以上の結果から、アスパラギン酸化学伝達はサラ病の神経障害である学習、言語、運動機能などに重要な役割を担っていることを示した（図3）。

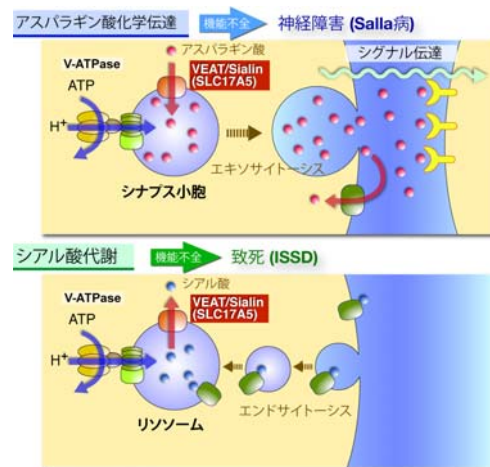


図3 アスパラギン酸化学伝達とサラ病

(2) ATP が濃縮された分泌小胞にはカルシウムやマグネシウムなどの二価金属カチオンも貯まっていることがわかってきた。しかしながら、2価金属カチオンを運ぶ分子は不明であった。我々は、VNUT が ATP とのキレート体として二価金属カチオンを輸送することを生化学的に証明し、VNUT 遺伝子を特異的にノックダウンすると、VNUT の発現低下に伴って、二価金属カチオンの濃縮量も低下することを見いだした。したがって、VNUT は金属イオントランスポーターとしての一面もあわせ持つことを明らかにした。

(3) 興奮性神経伝達物質を輸送する小胞型トランスポーターは塩素イオンにより活性化されることがわかってきたが、その意義は長らく不明であった。我々は、代謝産物であるケトン体が塩素イオンと競合することを見いだした（図4）。すなわち、興奮性化

学伝達は活性化のオンとオフを塩素イオンとケトン体を用いて制御していた（分子スイッチ）。しかも、この反応はタンパク質・細胞・組織・個体レベルにて観察され、伝達物質の過剰放出により引き起こされるてんかん症状をケトン体投与により改善できることを示した。

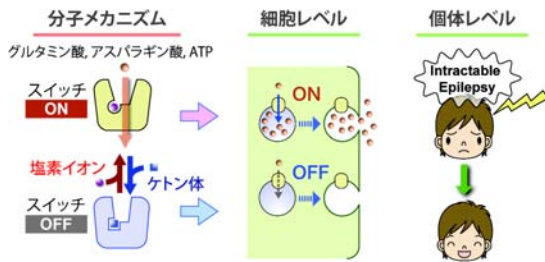


図4 興奮性化学伝達における塩素イオンの意義

(4) ヒト VEAT とヒト VNUT のショウジョウバエにおけるカウンターパートを見いだした。輸送機能と発現部位はヒトと同様であった。これらのノックアウトショウジョウバエを作成し、その表現型を解析した（図5）。その結果、いくつかの表現型を観察することができた。特に興味深い表現型として、VEAT 遺伝子破壊ショウジョウバエは酸化ストレス耐性を獲得した。これは全く新しい生理的意義である。

今後これら遺伝子破壊ショウジョウバエを用いた表現型解析により、アスパラギン酸とプリン性化学伝達の生理的意義の解明を通じて、新規創薬ターゲットの同定を目指す予定である。

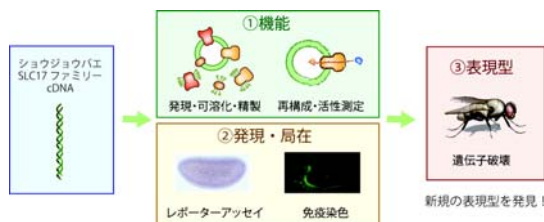


図5 モデル生物による化学伝達の生理的意義の解明

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12件)

- ① Togawa N, Miyaji T, Izawa S, Omote H, Moriyama Y. A Na⁺/phosphate co-transporter homologue (SLC17A4 protein) is an intestinal organic anion exporter. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 査読有 302巻、2012、C1652-1650.
- ② Miyaji T, Sawada K, Omote H, Moriyama Y. Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *J. Biol. Chem.* 査読有 286巻、2011、42881-42887.
- ③ Miyaji T, Omote H, Moriyama Y. Functional characterization of vesicular excitatory amino acid transport by human sialin. *J. Neurochem.* 査読有、119巻、2011、1-5.
- ④ Komatsu T, Hiasa M, Miyaji T, Kanamoto T, Matsumoto T., Otsuka M, Omote H, Moriyama Y. Characterization of the human MATE2 proton coupled polyspecific organic cation exporter. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 査読有、43巻、2011、913-918.
- ⑤ Juge N, Gray JA, Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C, Uneyama H, Edwards RH, Nicoll RA, Moriyama Y. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 査読有、68巻、2010、99-112.
- ⑥ Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, Hiasa M, Anzai N, Omote H, Moriyama Y. Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl⁻ dependent urate exporter. *J. Biol. Chem.* 査読有、285巻、2010、26107-26113.
- ⑦ Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki K. The ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有、107巻、2010、2361-2366.
- ⑧ Omote H, Miyaji T, Juge N, Moriyama Y.

Vesicular neurotransmitter transporter:

Bioenergetics and regulation of glutamate

transport. *Biochemistry* 査読有、50巻、2011、5558-5565.

⑨ **Miyaji T.**, Omote H, Moriyama Y. A vesicular transporter that mediates aspartate and glutamate neurotransmission. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有、33巻、2010、1783-1785.

⑩ **宮地孝明**、森山芳則 任意のトランスポーターの大量発現法 生物物理、査読有、51巻、2011、2-3.

〔学会発表〕(計4件)

① **宮地孝明** プリン性化学伝達における小胞型ヌクレオチドトランスポーターの意義、第38回 岡山脳研究セミナー、2011年6月、

岡山

② **宮地孝明** et al. ショウジョウバエ小胞型興奮性アミノ酸トランスポーターの機能解析、Neuro2010、2010年9月、神戸

③ **宮地孝明** 小胞型神経伝達物質トランスポーターの機能解析、第5回トランスポーター研究会、2010年7月、東京

④ **宮地孝明** et al. ショウジョウバエ小胞型興奮性アミノ酸トランスポーターの機能解析、第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2010年11月、富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮地 孝明 (MIYAJI TAKAAKI)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助教

研究者番号：40550314