

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650035

研究課題名(和文) SPA法を用いた新世代トランスポーター輸送活性測定システム

研究課題名(英文) Novel Transport Assay System by SPA Method

研究代表者

表 弘志 (Omote, Hiorshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：10273707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：トランスポーターによる物質輸送は栄養素の取り込み、薬物の体内濃度調節、神経伝達など生命を維持するために不可欠な働きを担っている。このため、トランスポーター機能の解析は基礎生物学、医学、薬学上重要な課題となっている。これまで輸送活性の測定はトランスポーターのcDNAを導入した培養細胞が多く用いられてきたが、交差する他のトランスポーターによる影響など多くの問題を抱えている。

このような背景をもとに、これまでの問題を解決する新しいトランスポーター活性測定法を着想した(SPA法)。本研究ではSPA法を用いた新しい輸送活性測定システムを開発する事を目的とした。

研究成果の概要(英文)：Membrane transporters play essential roles in various cellular activities such as nutrient uptake, control of drug concentration and neuronal signal transmission. Therefore, measurement of transport activity is important for basic biology, medical science and pharmacology. So far, function of transporters is measured using heterologous expression system. However, it has difficulty due to artifact by other transporters presented in the cells.

In this study, we have aimed to develop novel transport assay system with SPA method. In this system, purified transporter is embedded in the liposomes and attached to SPA scintillation beads through appropriate tags. We found that this technique is useful for future transporter study.

研究分野：生化学

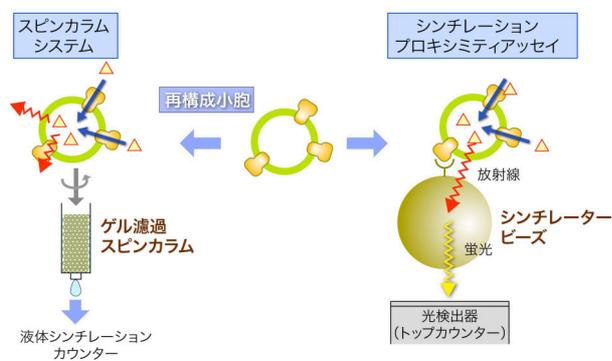
キーワード：トランスポーター 輸送活性測定 リポソーム spa

1. 研究開始当初の背景

トランスポーターによる物質輸送は栄養素の取り込み、薬物の体内濃度調節、神経伝達など生命を維持するために不可欠な働きを担っている。このため、トランスポーター機能の解析は基礎生物学、医学、薬学上重要な課題となっている。

輸送活性の測定はトランスポーターの cDNA を導入した培養細胞が多く用いられている。これらの系ではトランスポーターが細胞表面に存在し、かつ細胞内へ物質を取り込む場合にしか測定できない。また、夾雑する他のトランスポーターによる影響を排除する事は難しい。これに対し、申請者らは任意のトランスポーターを精製して輸送を測定する方法を開発した。ここでは、昆虫細胞に大量発現させたトランスポーターを精製しリポソームに再構成する。これに RI 標識した基質を取り込ませ、ゲル濾過でリポソームを分離する。この方法により、全てのトランスポーターの活性を測定する事が可能になった。しかし、この方法はゲル濾過で分離するため、煩雑で熟練を要する問題を抱えていた。

この様な背景をもとに、これまでの問題を解決する新しいトランスポーター活性測定法を着想した(SPA 法)。この方法はシンチレーターを内包したビーズにリポソームを吸着させる事で、リポソームを分離する事なく測定できる画期的なものである。



2. 研究の目的

本研究では SPA 法を用いた新しい、輸送活性測定システムを開発する事を目的として、以下の点について検討した。

- (1) タグ付きトランスポーターの作製、(2) タグと SPA ビーズの種類の見直し、(3) SPA ビーズへのリポソームの結合条件、(4) 輸送活性測定

3. 研究の方法

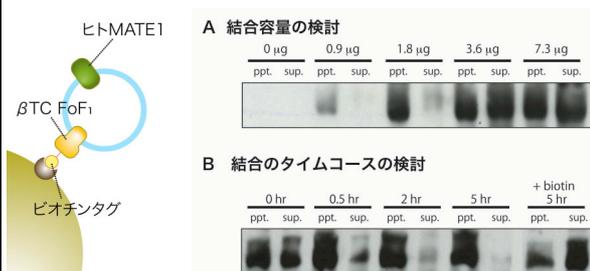
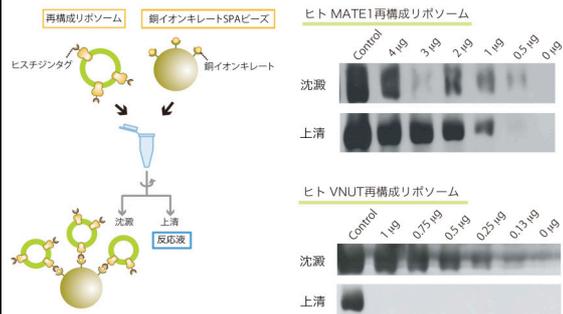
SPA ビーズにトランスポーターを結合させるため、His タグやビオチンタグを持つトランスポーターの発現系を構築した。このプラス

ミドを用いてトランスポーターを精製した。精製トランスポーターをリポソームに再構成し、His タグやビオチンタグを介して SPA ビーズへのリポソームの結合を検討した。トランスポーターの結合はウェスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

本研究では F_0F_1 -ATPase (H^+ ポンプ)、小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)、小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)、小胞型モノアミントランスポーター(VMAT) および MATE 型薬剤排出トランスポーターをターゲットとして、His タグまたは、ビオチン化タグ付きトランスポーターを作製した。

これらのトランスポーターを Ni-NTA カラムを用いて精製し、リポソームに埋め込んだ。このリポソームとストレプトアビジン SPA ビーズまたは銅キレート SPA ビーズの結合条件を検討した。その結果、銅キレート SPA ビーズへ His タグタンパク質を含むリポソームを結合させる事ができた。

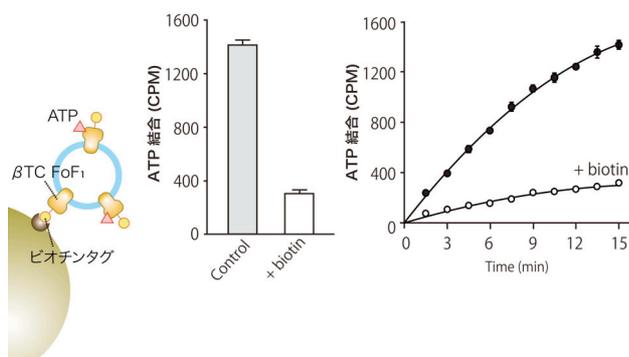


また、ビオチン化タグを結合した F_0F_1 -ATPase とともに、タグを持たないトランスポーターを同時にリポソームに再構成し、このリポソームのストレプトアビジンビーズへの結合条件を検討した。

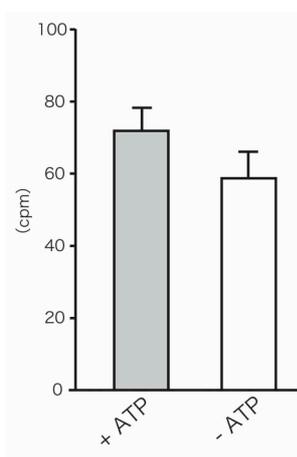
MATE および VNUT を用いて解析した結果、リポソームのビーズへの結合が観察された。この結合はビオチンによって阻害されたため、ビオチン化 F_0F_1 -ATPase を介して結合し

たものと結論した。

この SPA ビーズを用いて F_0F_1 -ATPase への ATP の結合を測定した所、時間依存的な ATP の結合が観察された。この結合はビオチンで



阻害された。したがって、ビオチン化タグを介して SPA ビーズに結合したリポソーム上の F_0F_1 -ATPase への ATP の結合と結論した。



MATE とビオチン化タグ F_0F_1 -ATPases を再構成したリポソームをストレプトアビジン SPA ビーズに結合させ、放射性ニコチンの輸送を測定した。ATP を添加する事で、 F_0F_1 -ATPase が H^+ をリポソーム内に輸送し、その結果形成されたリポソーム内外の H^+ 濃度勾配を駆動力として、MATE が基質をリポソーム内に輸送する。ATP 添加によって有意な基質の取り込みが観測された。バックグラウンドがまだ高いが条件を最適化する事で、改善する予定である。

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 6 件) 全て査読有り

1. Juge N, Moriyama S, Miyaji T, Kawakami M, Iwai H, Fukui T, Nelson N, *Omote H, Moriyama Y. (2015) *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter is a

H^+ -coupled polyspecific nutrient and drug exporter.

Proc Natl Acad Sci USA, **112**, 3356-3361. doi: 10.1073/pnas.1417102112.

2. Hiasa, M., Miyaji, T., Haruna, Y., Takeuchi, T., Harada, Y., Moriyama, S., Yamamoto, A., *Omote, H., Moriyama, Y. (2014) Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Scientific Reports* **4**, 6836. doi: 10.1038/srep06836

3. Shitan, N., Minami, S., Morita, M., Hayashida, M., Ito, S., Takanashi, K., Omote, H., Moriyama, Y., Sugiyama, A., Goossens, A., Moriyasu, M., Yazaki, K. (2014) Involvement of the leaf-specific multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter Nt-JAT2 in vacuolar sequestration of nicotine in *Nicotiana tabacum*. *Plos One* 9(9):e108789.

4. Hiasa, M., Togawa, N., Miyaji, T., Omote, H., Yamamoto, A., Moriyama, Y. (2014) Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol Rep.* 2, pii. e12034. doi: 10.14814/phy2

5. Kato Y., Omote H., Miyaji T. (2013) Inhibitors of ATP release inhibit vesicular nucleotide transporter. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 1688-1691.

6. Juge N., Omote H., and Moriyama Y. (2013) Vesicular GABA transporter (VGAT) transports β -alanine. *J. Neurochem.* **127**, 482-486.

[学会発表] (計 4 件)

① 表 弘志、小胞型ポリアミントランスポーターの同定、生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014 年 11 月 20 日、徳島

② 表 弘志、精製再構成法を用いた新規トランスポーター機能の発見、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、京都

③ 表 弘志、小胞型ポリアミントランスポーターの同定、日本生体エネルギー研究会第 40 回討論会、2014 年 12 月 12 日、松山

④ 表 弘志、精製再構成系が明らかにする、小胞型神経伝達物質トランスポーターと疾患の関わり、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、横浜

〔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 (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：1027370

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし