

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07336

研究課題名(和文)小胞型アスコルビン酸輸送システムの同定とその機能

研究課題名(英文)Identification of the vesicular ascorbic acid transport system

研究代表者

表 弘志 (Hiroshi, Omote)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ドーパミンからノルアドレナリンを合成するドーパミン ヒドロキシラーゼは副腎髄質のクロマフィン顆粒内に存在しており、アスコルビン酸(ビタミンC)を補酵素として必要とする。また、アスコルビン酸がこの顆粒内に蓄積していることは古くから知られていた。しかし、小胞内にアスコルビン酸を輸送蓄積するトランスポーターは不明のままであった。本研究では小胞内へアスコルビン酸を輸送するトランスポーターを同定し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。クロマフィン顆粒に酸化型であるデヒドロアスコルビン酸を輸送するトランスポーターが存在することを顆粒を用いた実験などから見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスコルビン酸はノルアドレナリンの合成、コラーゲンや胆汁酸の合成、ラジカルの除去など、生命の生存に必須な役割を果たしている。アスコルビン酸の欠乏は壊血病等の疾患を引き起こすことからその生理機能や作用機序の解明の重要性が広く認識されている。本研究はこれまで未知のまま残されていた小胞でのアスコルビン酸作用を明らかにするものであり、歴史的、栄養学的にも重要な意義を持っている。

研究成果の概要(英文)：Dopamine-beta-hydroxylase catalyzes conversion of dopamine to noradrenaline in the lumen of chromaffin granule of adrenal cortex. This enzyme requires ascorbic acid (vitamin C) as a cofactor. Previous studies indicated that ascorbic acid is accumulated in this granule. However, molecular mechanism of ascorbic acid transport to this granule was not understood yet. In this study, we tried to identify the transporter responsible to vesicular ascorbic acid accumulation and reveal molecular mechanism of ascorbic acid transport to the vesicle. We successfully identified the vesicular transport the is located in the chromaffin granule of adrenal cortex by PCR, immunohistochemistry and western blot analyses.

研究分野：生化学

キーワード：アスコルビン酸 デヒドロアスコルビン酸 小胞型トランスポーター ノルアドレナリン 副腎 クロマフィン顆粒 輸送

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 1. 研究開始当初の背景

アスコルビン酸は必須ビタミンの一つとして、コラーゲンや胆汁酸の合成、鉄の吸収促進、シトクローム **P450** の活性化、ラジカルの除去など、生命の生存に必須な役割を果たしている。アスコルビン酸の欠乏は壊血病等の疾患を引き起こすことからその生理機能や作用機序の解明の重要性が広く認識されている。

神経化学の分野においては、アスコルビン酸はドーパミンからのノルアドレナリン・アドレナリンの生合成という極めて重要な反応に関わっている。ドーパミンは小胞型モノアミノトランスポーター (**VMAT**) によって分泌小胞内に運び込まれ、その後小胞内のドーパミン βヒドロキシラーゼ (**DβH**) により、ノルアドレナリンに変換される。**DβH** はこの際にアスコルビン酸を必要とする。アスコルビン酸はペプチド系のホルモンの生合成にも重要な役割を果たしている。バゾプレッシン、オキシトシン等のペプチド性ホルモンはペプチドアミド化モノオキシゲナーゼ (**PAM**) によって **C** 末端がアミド化されている。この酵素はシナプス小胞内に存在し、アスコルビン酸を補酵素として必要としている。また、小胞体でのコラーゲンの水酸化にアスコルビン酸が必要な事はよく知られている。

これらの酵素はいずれも小胞内に存在しており、アスコルビン酸は細胞質から小胞内に運び込まなければならない。しかし、どのようにしてアスコルビン酸が小胞内に運ばれるかは明らかにされていない。

実際、ノルアドレナリンを合成する副腎髄質のクロマフィン顆粒にアスコルビン酸が蓄積している事は **80** 年代から知られており、未知の輸送体の存在が推定されていた。しかし、小胞内にアスコルビン酸を輸送するトランスポーターは多くの研究者が探索してきたが、実態は不明なままとなっている。

これまでアスコルビン酸トランスポーターが同定されてこなかった理由として、我々は小胞内にアスコルビン酸そのものを運ぶトランスポーターは存在しないものと考えた。その代わりに酸化型のアスコルビン酸であるデヒドロアスコルビン酸を運ぶトランスポーターが存在し、シトクローム **b561** が小胞内でこれを還元する事によってアスコルビン酸にするものと想起した。

## 2. 研究の目的

本研究では副腎クロマフィン細胞に存在するクロマフィン顆粒にデヒドロアスコルビン酸を輸送するトランスポーターを同定することを目的としている。このトランスポーターはアスコルビン酸を必要とする他の組織においても存在しているか明らかにする。

## 3. 研究の方法

PCR 法によりマウスおよびラットの副腎に存在するトランスポーターを解析し、存在が認められたものについて、免疫組織化学的手法により副腎クロマフィン細胞に存在するか解析した。また、ラット副腎からクロマフィン顆粒を単離し、ウェスタンブロット法によりこの顆粒に存在するトランスポーターを解析した。

GLUT8 のバクテリアを用いた発現系を構築した。この系では目的タンパク質の N 末端と C 末端に大腸菌由来のヘリックスタンパク質を融合する事で真核生物の膜タンパク質を活性のある形で大量発現させることができる。この系を用いて、GLUT8 を大量発現し、Fos-choline-14 を用いて可溶性後 Ni-NTA カラムクロマトグラフィーで精製した。

## 4. 研究成果

(1) アスコルビン酸トランスポーターとして Na<sup>+</sup>イオンとの共輸送によって細胞内にアスコルビン酸を輸送する細胞膜型のトランスポーター (SVCT) が同定されている。しかし、このトランスポーターは細胞内小胞には存在していないことから、他の候補を検索した。興味深いことにグルコーストランスポーター (GLUT) は酸化型アスコルビン酸であるデヒドロアスコル

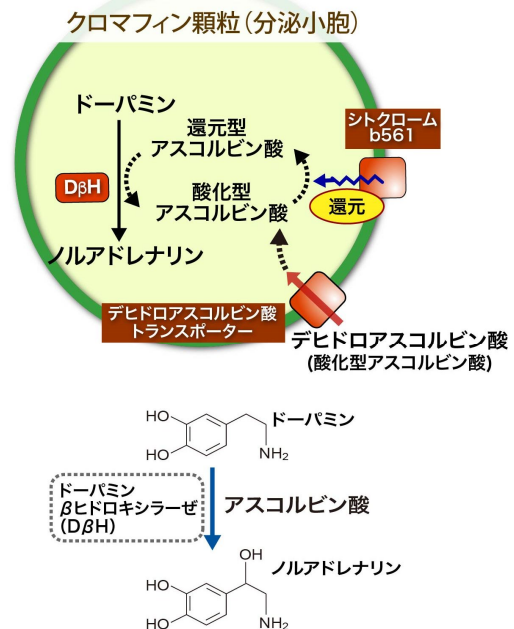


図1 分泌小胞でのノルアドレナリン合成

ビン酸を受動輸送で運ぶことが報告されている。副腎クロマフィン顆粒にはシトクロム b561 が存在することから、グルコーストランスポーターが運んだデヒドロアスコルビン酸を b561 が還元することによってアスコルビン酸が顆粒内に蓄積するものと考えた。グルコーストランスポーターは細胞膜にあってグルコースを運搬する促進拡散輸送体であるが、3つのサブファミリーのうちクラス III サブファミリーは細胞内オルガネラに存在していることが近年明らかになってきた。

(2)そこで、ラットおよびマウスの副腎の mRNA を単離し、RT-PCR 法によりクラス III サブファミリーグルコーストランスポーターの発現を検討した。その結果、GLUT8 の発現が認められた。

(3) GLUT8 に特異的な抗体を用いて免疫組織化学的手法でマウス副腎を解析したところ、副腎髄質に強い発現が見られた。このシグナルは細胞膜ではなく細胞に見られた。一方、副腎皮質に有意なシグナルは見られなかった。

(4)マウス副腎からクロマフィン顆粒を単離しウェスタンブロット法で解析したところ、クロマフィン顆粒画分にクロマフィン顆粒に局在する小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)とともに、GLUT8 の存在が認められた。これらのトランスポーターはミクローム画分や細胞膜画分には認められなかった。また、クロマフィン顆粒画分のグルコース輸送活性を測定したところ、フロレチン感受性のグルコース輸送活性がみとめられた。フロレチンはグルコーストランスポーターの阻害剤であることから、GLUT 型グルコーストランスポーターが存在することが示唆された。

(5)また、バクテリアに大量発現させ精製した GLUT8 をリポソームに再構成し、グルコース輸送活性を測定した。再構成リポソームは時間依存的なグルコース輸送活性を示し、その活性はフロレチンで阻害された。GLUT8 によるグルコース輸送活性はアスコルビン酸では阻害されなかったが、酸化型アスコルビン酸であるデヒドロアスコルビン酸によって阻害された。

以上の結果から、GLUT8 がクロマフィン顆粒などの分泌小胞に存在しデヒドロアスコルビン酸を輸送しているものと考えている。デヒドロアスコルビン酸として小胞内に輸送されたのち、還元されてアスコルビン酸になるものと推定している。本研究の成果はノルアドレナリン合成の機構を明らかにすると同時に、ビタミン C の細胞内動態を理解する上で重要なものである。

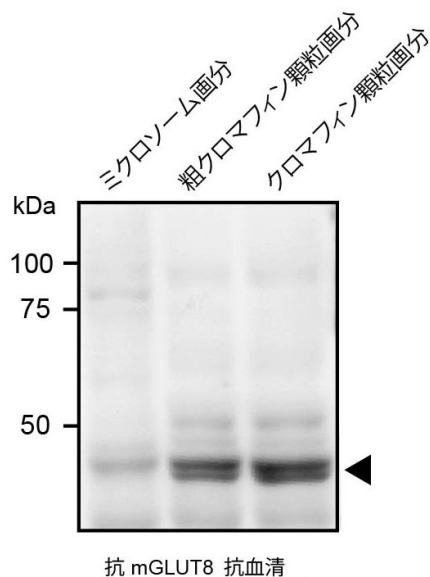


図 GLUT8は副腎髄質クロマフィン顆粒に存在する

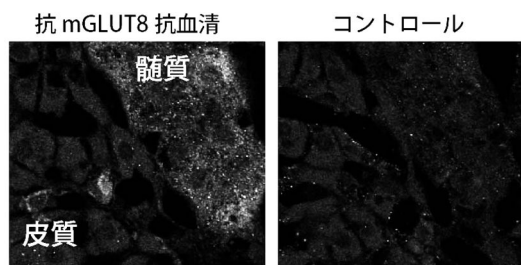


図 GLUT8は副腎髄質クロマフィン細胞に存在する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwai Yuma, Kamatani Setsuko, Moriyama Sawako, Omote Hiroshi	4. 巻 165
2. 論文標題 Function of essential chloride and arginine residue in nucleotide binding to vesicular nucleotide transporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 479~486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 表弘志
2. 発表標題 小胞型ヌクレオチドトランスポーターにおけるC-イオンと必須アルギニン残基の役割
3. 学会等名 生体エネルギー研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----