

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893154

研究課題名(和文) ショウジョウバエVNUTの同定とその生理的意義

研究課題名(英文) Identification drosophila VNUT

研究代表者

加藤 百合 (Kato, Yuri)

岡山大学・学内共同利用施設等・助教

研究者番号：10732042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ATPは小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)により分泌小胞に濃縮、開口放出され、プリン受容体に結合することで味覚・疼痛等の感覚受容などの多彩な生理作用を示す(プリン作動性化学伝達)。本研究では、モデル生物であるショウジョウバエに着目し、プリン作動性化学伝達におけるVNUTの生理的意義を解明することを目的とした。その結果、ショウジョウバエVNUTを同定し、新しいVNUT特異的阻害剤を発見した。また、VNUTノックアウトショウジョウバエの表現型解析を実施し、いくつかの表現型を見いだした。

研究成果の概要(英文)：ATP acts as a major chemical transmitter in purinergic chemical transmission, which is involved in a variety of neurological phenotypes such as sensory and pain perception. Vesicular nucleotide transporter (VNUT/SLC17A9) is responsible for vesicular storage and release of ATP in neuroendocrine cells. In this study, we identified drosophila VNUT and found a specific inhibitor of VNUT. VNUT<sup>-/-</sup> drosophila showed significant phenotypes.

研究分野：トランスポーター生化学

キーワード：ATP 小胞型ヌクレオチドトランスポーター シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

ATP は分泌小胞に充填後、開口放出され（出力）、プリン受容体を介して多彩な生理作用を発揮する。神経系においては、学習、記憶などの高次精神活動、痛覚などの感覚受容や睡眠調節等を制御しているため、プリン作動性化学伝達は大きな関心を集めている（図1: *Physiol. Rev.* 87, 659. 2007）。プリン受

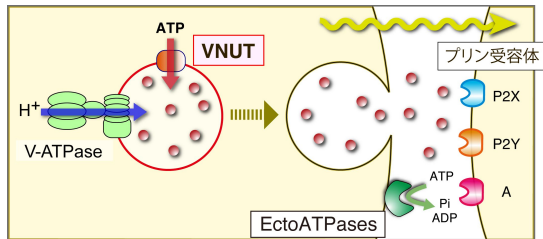


図1 プリン作動性化学伝達

容体とそれ以降のシグナル伝達については盛んに研究されているが、プリン作動性化学伝達の出力機構、すなわち ATP の開口放出機構は明らかになっていなかった。当研究室において、この過程を司る小胞型ヌクレオチドトランスポーター（Vesicular nucleotide transporter: VNUT）が同定された（*PNAS* 105, 5683-5686. 2008）。このことにより、プリン作動性化学伝達の出力系に着目した研究が可能となった。その後の研究により、VNUT は小胞型グルタミン酸トランスポーターと同様に、塩素イオンにて活性化（オン）され、ケトン体により可逆的にオフされる分子スイッチを持つことが明らかになった（*Neuron* 68, 99-112. 2010）。また、VNUT 遺伝子を破壊した（*VNUT*<sup>-/-</sup>）マウスでは、分泌小胞への ATP 濃縮が抑制され、開口放出が消失していた。更に、*VNUT*<sup>-/-</sup> マウスが外見に変化はなく健康であるにも関わらず、グルコース耐性やインスリン分泌の低下等が見られた（*Sci. Rep.* 4, 6689. 2014）。これらのことから、VNUT は副作用の少ない糖尿病をはじめとした様々な疾患の新しい創薬ターゲットになると期待される。

## 2. 研究の目的

プリン作動性化学伝達における VNUT の生理学的意義を解明するために、当研究室ではマウスを用いて研究しているが、マウスは世代交代が遅いため長期間に渡って表現型を解析する必要があり、脳構造も複雑である。そこで、本課題では、特に中枢神経系を迅速かつ簡便に解析するために、脳の構造がマウスより単純で世代交代の早いモデル生物、ショウジョウバエに着目した。プリン作動性化学伝達の生理・病理レベルでの制御機構を分子レベルで理解し、創薬ターゲットとしての VNUT の意義を解明することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 輸送活性測定法

我々は、任意のトランスポーターの活性を維持したまま、大腸菌にて大量発現・精製する手法を有している（*J. Biol. Chem.* 51, 39499-39506. 2006）。そこで、まずショウジョウバエ VNUT と推定しているタンパク質を大腸菌にて大量発現させた。その膜画分を界面活性剤にて可溶化し、His-tag によるアフィニティー精製した。目的の遺伝子の N 末端と C 末端に可溶性αヘリックスタンパク質を付加することで、目的のタンパク質がフォールディングされやすくなり、活性を維持することができる。精製したタンパク質を人工膜小胞に再構成し、K<sup>+</sup>イオノフォアであるバリノマイシン存在下で内側に正の膜電位差を形成させ、放射性標識した ATP の輸送活性を測定した（図2）。

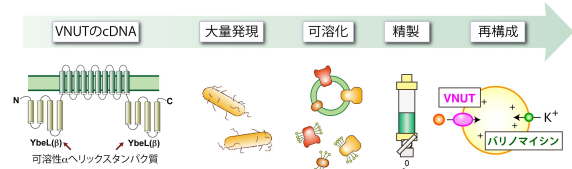


図2 ショウジョウバエVNUTの輸送活性測定法

## (2) モデル生物を用いた解析

ヒトとショウジョウバエは同様の化学伝達システムが報告されている。そこで、ほ乳類と比べて解析の容易なショウジョウバエをモデル生物として用い、*In situ* ハイブリダイゼーション法や間接蛍光抗体法にてショウジョウバエ VNUT の発現・局在を解析した。また、VNUT ノックアウトショウジョウバエをエンハンサートラップ法により作製し、野生型と VNUT 変異型での表現型を比較した。

## 4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ VNUT を同定し、その輸送特性を明らかにした。ショウジョウバエ VNUT はヒト VNUT の阻害剤である DIDS や Evans blue により完全に阻害された。競合阻害実験により、このトランスポーターは ATP だけではなく、ADP や GTP、GDP、UTP など幅広いヌクレオチドを認識することを見いだした。また、ショウジョウバエ VNUT もまた塩素イオンにて活性化されるスイッチを持つことが明らかになった。

(2) VNUT の生理的役割のあらたな研究ツール開発のために、輸送活性測定法を用いて VNUT 特異的阻害剤を探索した。その結果、既存の医薬品内で新しい VNUT 特異的阻害剤を発見した。この化合物は、他の小胞型神経伝達物質トランスポーターと比べて約 1000 倍もの選択性を持ち、 $IC_{50}$  は nM オーダーと低濃度で VNUT を阻害した。また、化合物存在下で VNUT の塩素イオン依存性を測定した結果、グラフが右にシフトしたことから、VNUT の活性制御スイッチである塩素イオンと競合していることを見いだした(図3)。この化合物は VNUT の ATP 結合部位には影響しないこと、可逆的に VNUT の ATP 輸送を阻害することを明らかにした。更に、この

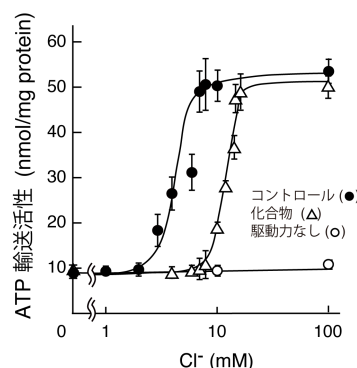


図3 VNUT の塩素イオン依存性

化合物は細胞レベルでも VNUT を介した ATP 放出を抑制した。

(3) VNUT のノックアウトショウジョウバエを作製し、表現型解析を実施した。その結果、いくつかの表現型を見いだした。現在、これらの表現型を詳細に解析している。

近年、VNUT は糖尿病や緑内障など様々な疾患に関与していることが報告されている。今後は、VNUT ノックアウト生物と同定した VNUT 特異的阻害剤を用いて、VNUT の生理的役割を解明し、VNUT をターゲットとした新しい疾患の治療法や創薬を模索する予定である(図4)。

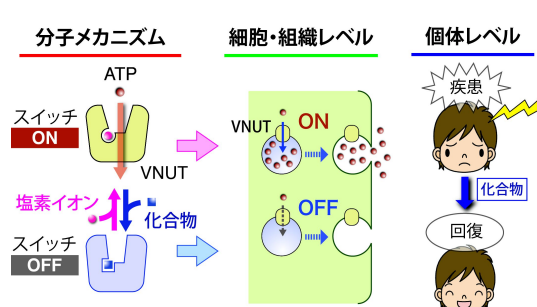


図4 VNUT 特異的阻害剤による疾患の治療

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

、**加藤百合** 小胞型ヌクレオチドトランスポーター特異的阻害剤の同定とプリン作動性化学伝達の *in vivo* 制御、日本薬学会第 136 年回、2016 年 3 月、横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 百合 (KATO YURI)

岡山大学・自然生命研究支援センター・特  
任助教

研究者番号：10732042