博士論文

小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT)の蛍光性アナログを用いた、ヌクレオチド結合に対する塩化物イオンとArg119 残基の役割の解析

平成 31 年 3 月

岩井　佑磨

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士課程

参考論文

Yuma Iwai, Setsuko Kamatani, Sawako Moriyama, and Hiroshi Omote (2019) Function of essential chloride and arginine residue in nucleotide binding to vesicular nucleotide transporter. *The Journal of Biochemistry* **165**, *in press*

目次

略語 1

第 1 章　序論 5

1-1 細胞膜型神経伝達物質トランスポーター

1-2 小胞型神経伝達物質トランスポーター

1-3 SLC17 アニオントランスポーターファミリー

1-4 Type I リン酸トランスポーター (NPT)

1-5 シアリン/小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター(VEAT)

1-6 小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT)

1-7 小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT)

1-8 塩化物イオンによる制御

1-9 課題と本研究の目的

第 2 章　方法 25

2-1 大腸菌を用いたヒト VNUT の発現系と R119A 変異型プラスミドの構築

2-2 大腸菌 C43 株の形質転換

2-3 VNUT の発現と精製

2-4 大腸菌 ATP 合成酵素(F_oF_1-ATPase)の精製

2-5 タンパク質の定量

2-6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

2-7 TNP-ATP の蛍光測定

2-8 野生型及び R119A 変異型 VNUT の TNP-ATP タイトレーション

2-9 TNP-ATP タイトレーションのデータ解析

2-10 ビオチン-11-ATP による光化学修飾

2-11 データ処理

第 3 章　結果 33

第 1 節　TNP-ATP の VNUT 依存的蛍光の増強と特異性..... 34

第 2 節　TNP-ATP の VNUT への結合に対する塩化物イオンとケト酸の効果..... 42

第 3 節　必須 Arg 残基のヌクレオチド結合における役割..... 49

第 4 章　考察 55

第 5 章　総括及び展望 63

引用文献 65

略語

ADP	Adenosine 5’-diphosphate
AMP	Adenosine 5’-monophosphate
ASCT	Neutral amino acid transporters
ATP	Adenosine 5’-triphosphate
Bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
BNPI	Brain specific Na^+/Pi transporter
CBB	Coomassie brilliant blue
cDNA	complementary DNA
DAT	Dopamine transporter
DDW	Distilled and deionized water
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'- stilbenedisulfonic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNPI	Differential-associated Na^+/Pi cotransporter
DDTM	n-Dodecyl-1-thio-β-$_D$-maltoside
EAAT	Excitatory amino acid transporter
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediamine-*N’,N’,N’,N’*-tetraacetic acid
GABA	γ-Aminobutyric acid
GAT	γ-Aminobutyric acid transporter
GLYT	Glycine transporter
GTP	Guanosine 5’-triphosphate
IPTG	Isopropyl-β-$_D$-thiogalactopyranoside
ITP	Inosine 5’-triphosphate
kDa	kilo-Dalton
K_d	Dissociation constant
MFS	Major facilitator superfamily
MOPS	3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA

NET	Norepinephrine transporter
NMDA	*N*-Methyl-$_D$-aspartic acid
NPT	Na^+-Dependent inorganic phosphate transporter
OG	Octyl β-$_D$-glucopyranoside
PAH	p-Amino hippuric acid
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
SERT	Serotonin transporter
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SLC	Solute carrier
TB	Terrific broth
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
UTP	Uridine 5'-triphosphate
V-ATPase	Vacuolar H^+-ATPase
VAChT	Vesicular acetylcholine transporter
VEAT	Vesicular excitatory amino acid transporter
VGLUT	Vesicular glutamate transporter
VIAAT	Vesicular inhibitory amino acid transporter
VNUT	Vesicular nucleotide transporter
VMAT	Vesicular monoamine transporter
VPAT	Vesicular polyamine transporter

DNA 塩基の一文字表記

A	Adenine	**G**	Guanine
C	Cytosine	**T**	Thymine

アミノ酸の一文字表記

A	(Ala)	Alanine
C	(Cys)	Cysteine
D	(Asp)	Aspartic acid
E	(Glu)	Glutamic acid
F	(Phe)	Phenylalanine
G	(Gly)	Glycine
H	(His)	Histidine
I	(Ile)	Isoleucine
K	(Lys)	Lysine
L	(Leu)	Leucine
M	(Met)	Methionine
N	(Asn)	Asparagine
P	(Pro)	Proline
Q	(Gln)	Glutamine
R	(Arg)	Arginine
S	(Ser)	Serine
T	(Thr)	Threonine
V	(Val)	Valine
W	(Trp)	Tryptophan
Y	(Tyr)	Tyrosine

第 1 章

序論

化学伝達では、シナプス小胞などの分泌小胞に蓄積された神経伝達物質が開口放出されることで、情報が伝えられる(Chaudhry *et al.* 2008a、Chaudhry *et al.* 2008b、Omote *et al.* 2011、Hnasko *et al.* 2012)。細胞外に放出された神経伝達物質は、ターゲットになる細胞の細胞膜上に存在する受容体に結合し、刺激を伝達する。その後、過剰な神経伝達物質は、細胞膜上のトランスポーターによって、細胞内に再取り込みされることで情報の伝達が収束する(**図 1-1**)。このような化学伝達のシステムは、神経のみならず、細胞間の普遍的な情報伝達システムとして生体内で広く用いられている。

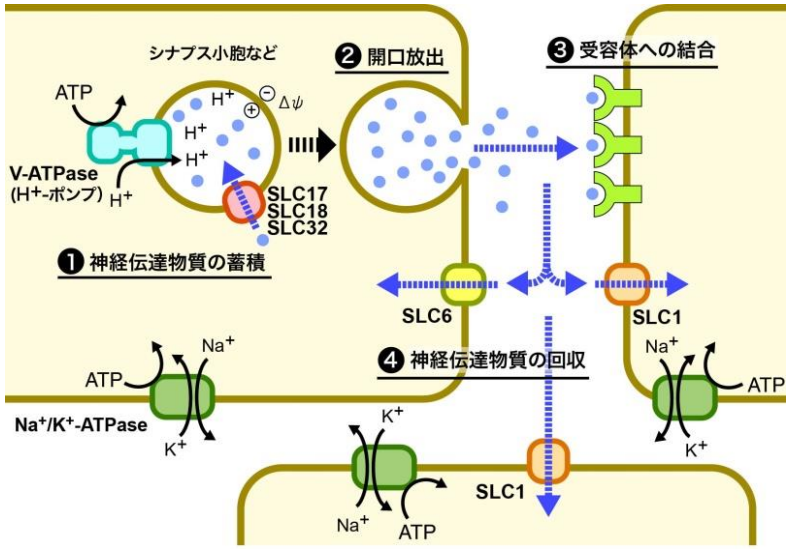


図 1-1. 化学伝達

化学伝達では、シナプス小胞に蓄えられた神経伝達物質が開口放出され、受容体に結合することで情報を伝える。化学伝達では、以下の 4 つのステップが関与している。(1)小胞型神経伝達物質トランスポーター(SLC17、18、32)が小胞へ神経伝達物質を蓄積する。(2)刺激によって分泌小胞の内容物は、開口放出される。(3)細胞外に放出された神経伝達物質は受容体に結合し、情報を伝える。(4)細胞膜型神経伝達物質トランスポーター(SLC1、6)が細胞内へ神経伝達物質を再取り込みする。

化学伝達システムには、様々なトランスポーターが深く関与している。シナプス小胞などの分泌小胞には、液胞型 H^+-ATPase (V-ATPase)が存在し、ATP の加水分解によって得られたエネルギーを利用し、H^+を小胞内に輸送する。これにより小胞の内外に形成された H^+の電気化学的勾配を利用して、小胞型の神経伝達物質トランスポーターが神経伝達物質を小胞内に輸送する。細胞外に開口放出された神経伝達物質は、細胞膜型の神経伝達物質トランスポーターによって細胞内に取り込まれる。このトランスポーターは、Na^+/K^+-ATPase が作り出す、細胞膜を介したNa^+やK^+の電気化学的勾配を駆動力として神経伝達物質を輸送する。このように、トランスポーターは、化学伝達において不可欠な役割を果たしている。化学伝達に関わるトランスポーターの欠損及び機能不全は、化学伝達の異常を引き起こし、生体内の恒常性に大きな影響を与える(Rees *et al.* 2000、Verheijen *et al.* 1999)。したがって、ここにあげたトランスポーター、特に神経伝達物質トランスポーターの機能を理解することが化学伝達の全体像を理解する上で必須となっている。

神経伝達物質トランスポーターは、分泌小胞に存在する小胞型神経伝達物質トランスポーターと細胞膜にある細胞膜型トランスポーターの2つに大別できる(**表 1-1**)。このうち、小胞型神経伝達物質トランスポーターは、SLC17、SLC18、SLC32 の 3 つのファミリーから構成され、それぞれアニオン性、カチオン性および電気的に中性な神経伝達物質を輸送する。一方、細胞膜型の神経伝達物質トランスポーターは、グルタミン酸を輸送する SLC1 と、セロトニンなどのアミン類や GABA などを輸送する SLC6 ファミリーから構成されている。

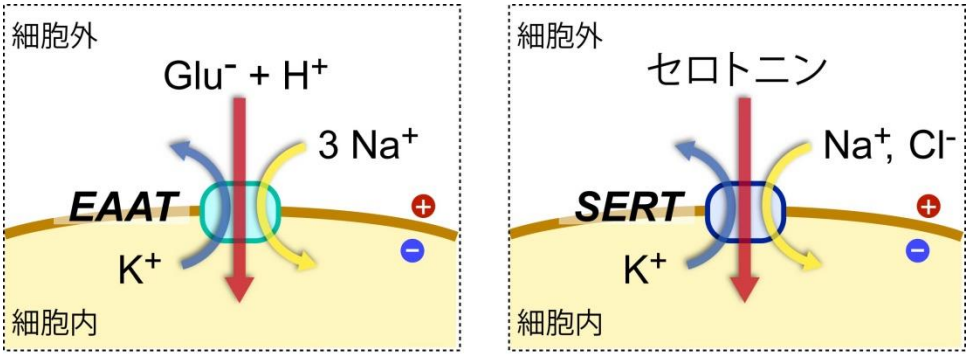
表 1-1 神経伝達物質トランスポーター

	ファミリー（ザブタイプ）		トランスポーター	基質	関連文献
小胞型	SLC17	A6-A8 A9 A5	VGLUTs VNUT VEAT	グルタミン酸 ATP アスパラギン酸	Reimer *et al.* 2004, 2013 Omote *et al.* 2011, 2013, 2016
	SLC18	A1, 2 A3 B1	VMATs VAChT VPAT	セロトニン、 ノルアドレナリン、 ドーパミン アセチルコリン ポリアミン	Eiden *et al.* 2004 Knoth *et al.* 1981 Erickson *et al.* 1992,1994 Hiasa *et al.* 2014c
	SLC32	A1	VGAT	GABA, グリシン	Gasnier *et al.* 2004 Juge *et al.* 2009, 2013
細胞膜型	SLC1	A1-A7 A5	EAATs ASCTs	グルタミン酸、 アスパラギン酸 アラニン、 セリン、 システイン	Kanai *et al.* 2004 茂里ら 2006 Herman *et al.* 2007
	SLC6	A4 A2 A3 A1, 11, 13 A9	SERT NET DAT GATs GLYTs	セロトニン ノルアドレナリン ドーパミン GABA グリシン	Chen *et al.* 2004 Rees *et al.* 2006

1-1 細胞膜型神経伝達物質トランスポーター

SLC1(興奮性アミノ酸トランスポーター、EAAT)ファミリーは、グルタミン酸、アスパラギン酸トランスポーターであるEAAT1-EAAT5と中性アミノ酸を輸送するASCT1、ASCT2から構成されている(**図 1-2**)。EAAT は、高親和性のグルタミン酸トランスポーターで、Na^+、K^+、H^+の電気化学的勾配を利用して細胞内へグルタミン酸を輸送する (**図 1-2**)(Kanai *et al.* 2004、茂里ら 2006、Herman *et al.* 2007)。

一方、カチオン性の神経伝達物質や GABA などは、SLC6 ファミリーに属するトランスポーターによって細胞内に再取り込みされる (**図 1-2**)。SLC6 ファミリーには、ノルアドレナリンを輸送するNET、ドーパミンを輸送するDAT、セロトニンを輸送するSERT、GABA を輸送するGAT、グリシンを輸送する GLYT などがある(Chen *et al.* 2004)。このファミリーのトランスポーターのDAT、NET、SERT は、コカインなどの向精神薬のターゲットとしても知られている。また、GLYTの変異は、過度の驚愕反応を引き起こす過剰驚愕症(びっくり病)の原因因子としても知られている(Rees *et al.* 2006)。



SLC2:
EAAT1～EAAT5
（グルタミン酸、アスパラギン酸）
ASCT1, ASCT2
（アラニン、セリン、システイン）

SLC6:
GAT1～GAT3（GABA）
NET（ノルアドレナリン）
DAT（ドーパミン）
SERT（セロトニン）
GLYT1, GLYT2（グリシン）
PROT（プロリン）
など

図 1-2. 細胞膜型神経伝達物質トランスポーター

SLC1ファミリーには、グルタミン酸を回収するEAAT が属している。SLC6ファミリーには、中性アミノ酸やアミンなどの輸送体が属しており、GABA やノルアドレナリンなどを細胞内に再取り込みする。このファミリーには、ベタイン、タウリンやクレアチンの輸送体も存在する。

1-2 小胞型神経伝達物質トランスポーター

小胞型神経伝達物質トランスポーターは、SLC17、SLC18、SLC32 の 3 つのファミリーからなり、このうち SLC32 ファミリーは、GABA やグリシンといった電気的に中性で抑制性の神経伝達物質を小胞内に輸送する。(**図 1-3**)。SLC32 ファミリーのメンバーは、小胞型 GABA トランスポーター(VGAT：Vesicular GABA Transporter)のみであり、GABA の他にグリシンも輸送することから、小胞型抑制性アミノ酸トランスポーター (VIAAT：Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter)とも呼ばれる(Gasnier *et al.* 2004)。精製 VGAT を用いた実験から、VGAT が小胞の内側が正の膜電位を駆動力として、2 個の塩化物イオンと 1 個の神経伝達物質を輸送していることが明らかになっている(Juge *et al.* 2009)。また、このトランスポーターは、GABA、グリシンの他にβ-アラニンを輸送している(Juge *et al.* 2013)。

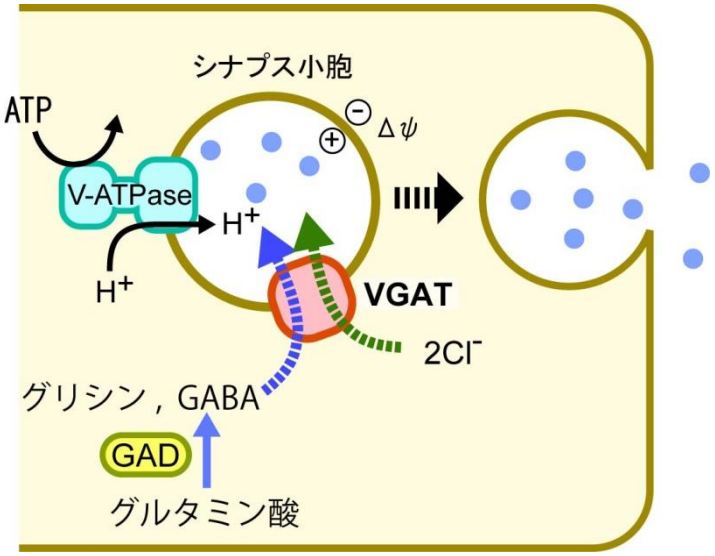


図 1-3. SLC32: 小胞型 GABA トランスポーター(VGAT)

VGAT は、SLC32 ファミリーの唯一の構成員であり、2 個の塩化物イオンと GABA または、グリシンを共輸送する。いずれも抑制性の神経伝達に関わる。GABA は、GAD（グルタミン酸デカルボキシラーゼ）によってグルタミン酸から合成される。

SLC18 ファミリーは、12 回膜貫通型の MFS(Major Facilitator Superfamily)に属するトランスポーターで、カチオン性の神経伝達物質を小胞内に輸送蓄積している(**図 1-4**)(Eiden *et al.* 2004)。このファミリーには、小胞型モノアミントランスポーター(VMAT1、2:Vesicular Monoamine Transporter)、小胞型アセチルコリントランスポーター(VAChT:Vesicular Acetylcholine Transporter)、および小胞型ポリアミントランスポーター(VPAT:Vesicular Polyamine Transporter)が存在する。いずれもカチオン性のアミンを内側が正の膜電位に逆らって輸送するために、H^+との対向輸送を行なっている(Knoth *et al.* 1981)。VMAT は、セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン、ヒスタミンなどのアミン類を幅広く認識輸送し、レゼルピンやテトラベナジンによって阻害される(Eiden *et al.* 2004, Erickson *et al.* 1992)。一方、VAChT は、アセチルコリンを特異的に輸送し、ベサミコ―ルによって阻害されることが知られている(Erickson *et al.* 1994, Eiden *et al.* 2004)。最近になって SLC18 の新しいメンバーとして VPAT が同定された(Hiasa *et al.* 2014c)。このトランスポーターは、H^+の電気化学的勾配を駆動力としてスペルミン、スペルミジンなどのポリアミンを小胞内に輸送する。興味深いことに VPAT は、ポリアミンだけでなく、セロトニンも輸送することができる。

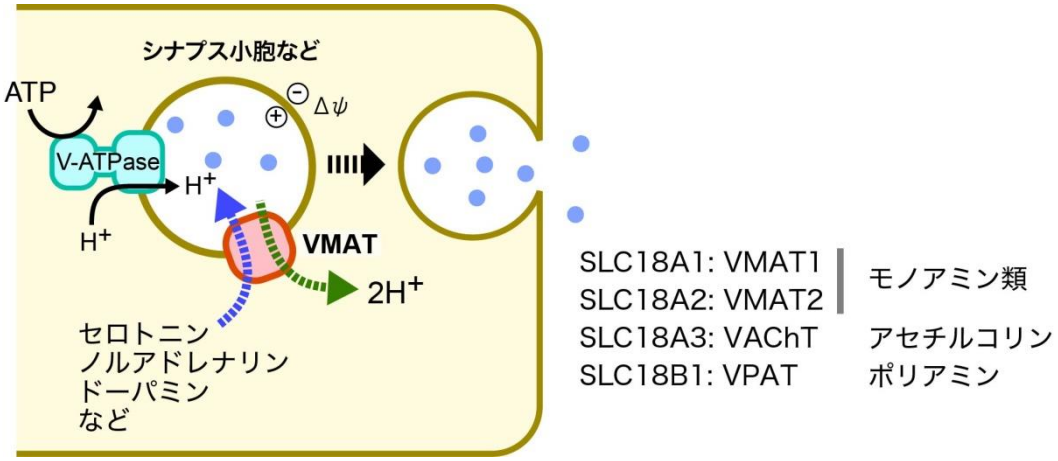


図 1-4. SLC18 ファミリー

SLC18 ファミリーは、各種のアミンを H^+との対向輸送で小胞内に輸送する。

1-3 SLC17 アニオントランスポーターファミリー

SLC17 ファミリーは、アニオン性の基質を輸送するトランスポーターファミリーで、SLC18 と同じく 12 回膜貫通型の MFS に属している(**図 1-5**)(Reimer *et al.* 2004、2013、Omote *et al.* 2011、2013、2016)。SLC17 ファミリーは、アニオン性の薬物を輸送する NPT1-4(SLC17A1-A4)、アスパラギン酸を輸送する小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター(Sialin/VEAT:Vesicular Excitatory Amino Acid Transporter)、グルタミン酸を輸送する小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT:Vesicular Glutamate Transporter)、そして、ATP を輸送する小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT:Vesicular Nucleotide Transporter) から構成される(**図 1-5**)。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ポーターで、植物から動物まで真核生物に幅広く存在している。

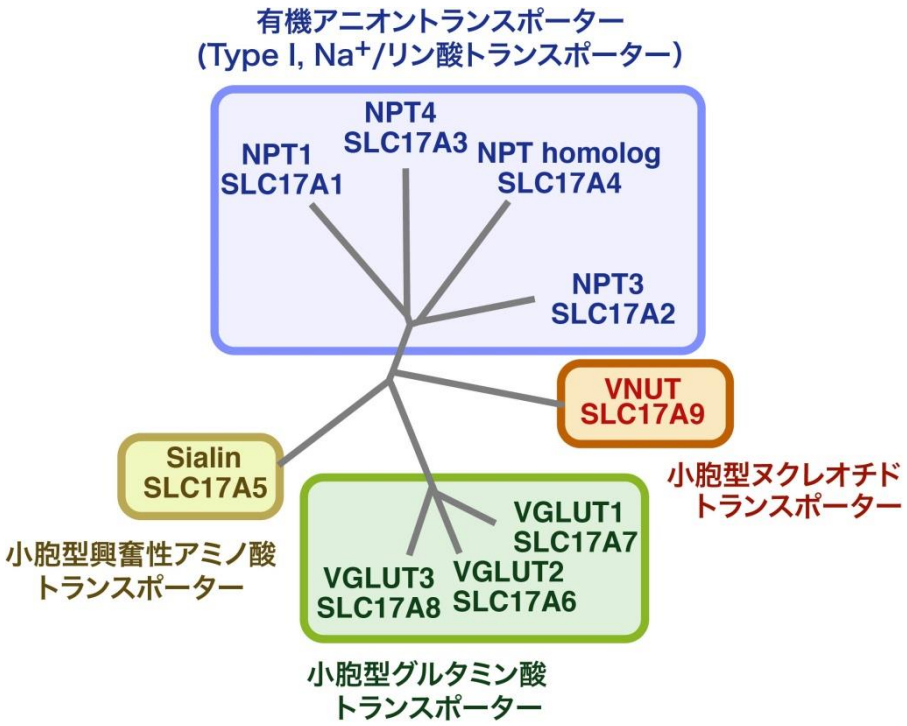


図 1-5. SLC17 ファミリー

SLC17 ファミリーは、9 つのメンバーからなり、いずれも膜電位を駆動力として有機アニオンを輸送する。

1-4 Type I リン酸トランスポーター(NPT)

SLC17 ファミリーのうち、NPT 1-4 は、腎臓尿細管細胞、肝細胞や小腸上皮細胞のアピカル膜に存在し、様々なアニオン性の薬物を体外へ排出する薬物排出トランスポーターとして機能している(**図 1-6**)(Omote *et al.* 2015、Miyaji *et al.* 2013、Reimer *et al.* 2013)。NPT は、Type I リン酸トランスポーターとしてウサギ腎臓の mRNA からクローニングされたが、リン酸に対する K_M が 50 mM 程度と親和性が低く、腎臓でのリン酸再吸収への関与は低い(Werner *et al.* 1991)。その後の発現系を用いた解析から、このトランスポーターが膜電位を利用して、塩化物イオン依存的に薬物を排泄するトランスポーターであることが明らかになった (Bush *et al.* 1996、Jutabha *et al.* 2003、Iharada *et al.* 2010)。NPT1 と NPT4 は、腎臓の尿細管細胞のアピカル膜に、NPT ホモログは、小腸上皮細胞のアピカル膜や肝細胞に存在し、p-ヒドロキシ馬尿酸(PAH)、アスピリン、尿酸、エストロン硫酸、ベンジルペニシリン、ファロペネムなどを輸送することが明らかになっている (Bush *et al.* 1996、Uchino *et al.* 2000、Jutabha *et al.* 2003、Iharada *et al.*2010、Togawa *et al.*2012)。また、NPT1 と NPT4 の多型は、痛風との関連性が指摘されており、尿酸排泄での役割が注目されている (Dehghan *et al.* 2008、Iharada *et al.* 2010、Reimer *et al.* 2013)。

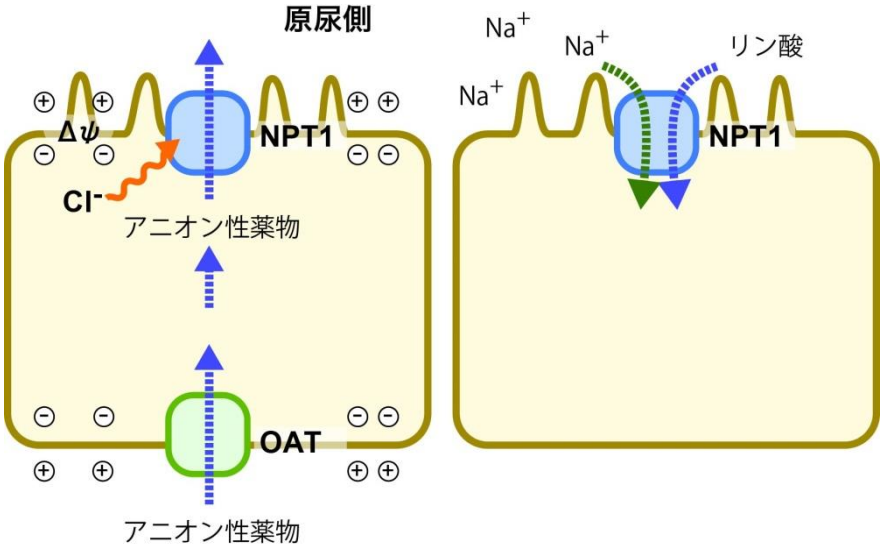


図 1-6. NPT（Type I リン酸トランスポーター/有機アニオントランスポーター）

NPT サブファミリーは、腎臓尿細管細胞などのアピカル膜でアニオン性の薬物を排泄する薬物排泄トランスポーターとして働いている。その活性は、塩化物イオン依存的である。また、Type I リン酸トランスポーターとして Na^+/リン酸共輸送活性を持っている。

1-5 シアリン/ 小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター(VEAT)

シアリン/ VEAT は、シナプス小胞において、膜電位駆動型、塩化物イオン依存性のアスパラギン酸、グルタミン酸トランスポーターとして働いている(**図 1-7**)(Miyaji *et al.* 2008)。このトランスポーターは、もともとサラ病などのシアル酸蓄積症の原因遺伝子として単離された(Verheijen *et al.* 1999)。シアリンは、リソソーム膜にあって、糖脂質や糖タンパク質の分解によって生じたシアル酸を細胞質へ輸送するトランスポーターで、H^+とシアル酸、乳酸などを共輸送する。この遺伝子の変異はリソソームへのシアル酸の異常蓄積と、リソソームの機能異常を引き起こす(Aula *et al.* 2000、Miyaji *et al.* 2011a)。一方、VEAT は、神経のシナプス小胞にも存在し、小胞の内側が正の膜電位を駆動力としてアスパラギン酸とグルタミン酸を輸送する(Miyaji *et al.* 2008)。したがって、シアリン/VEAT は、リソソームに存在するときとシナプス小胞に存在するときで輸送する基質、駆動力、輸送方向が異なるトランスポーターと言える。アスパラギン酸は NMDA 受容体のリガンドとして機能することから、VEAT は、アスパラギン酸化学伝達に深く関わっているものと推定されている。

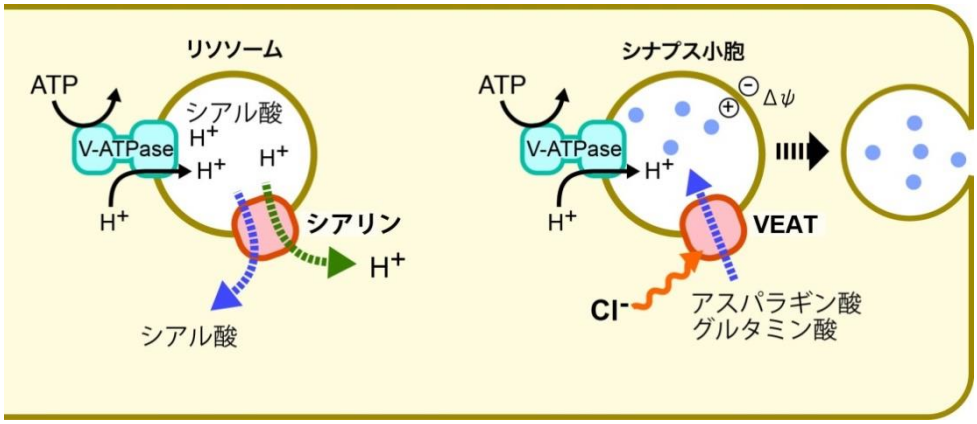


図 1-7. シアリン/VEAT

シアリン/VEAT は、リソソームでシアル酸/H^+共輸送体として、シナプス小胞では、膜電位を駆動力とするアスパラギン酸、グルタミン酸トランスポーターとして働く。存在場所によって機能が異なるトランスポーターである。VEAT のアスパラギン酸グルタミン酸輸送活性は、塩化物イオンによって活性化される。

1-6 小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)

グルタミン酸は、主要な興奮性神経伝達物質として中枢神経系や抹消組織で広く使われている(Fonnum *et al.* 1984)。VGLUT は、神経末端のシナプス小胞にあり、グルタミン酸を小胞内に輸送・蓄積するグルタミン酸化学伝達において重要な役割を果たしている(**図 1-8**)。VGLUT は、VGLUT1、VGLUT2、VGLUT3 の 3 つのアイソフォームがあり、VGLUT1 は、大脳皮質、海馬、小胞皮質、VGLUT2 は、視床、脳幹、深部小脳核に存在している(Bellocchio *et al.* 1998, Fremeau *et al.* 2001)。一方、VGLTU3 は、線条体、海馬、大脳皮質のなどの限られた細胞にのみ存在している(Gras *et al.* 2002)。3 つのアイソフォームが異なる分布をしていることは、これらの VGLUT に機能の違いがあることを示唆しているがその詳細は不明である。

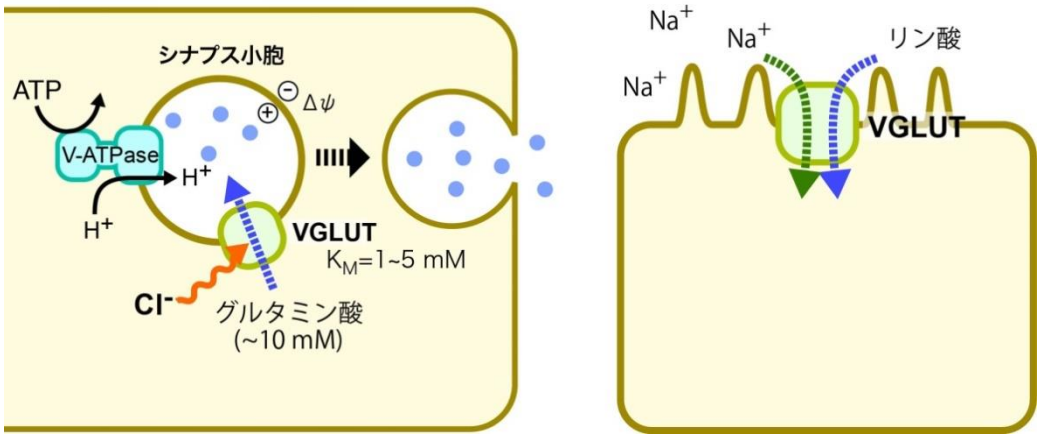


図 1-8. VGLUT

VGLUT は、シナプス小胞にグルタミン酸を輸送する小胞型グルタミン酸トランスポーターである。VGLUT は、膜電位を駆動力として負電荷を持つグルタミン酸を小胞内に輸送する。この活性は、塩化物イオンを必要とする。基質特異性は厳密で、アスパラギン酸やグルタミンを認識しない。基質に対する親和性は低く 1-5 mM 程度である。また、VGLUT は、NPT と同様に Na^+/リン酸共輸送活性を持っていることが知られている。

VGLUT1 は、NPT1 のホモログとして単離され、腎臓には存在せず脳に特異的に存在していることから BNPI (Brain specific Na/Pi transporter) と名付けられた。Takamori らは、ヒト膵臓腫瘍細胞株を用いた発現系とラット BNPI の特異的抗体を用いた解析により、BNPI が、シナプス

小胞のグルタミン酸トランスポーターであることを明らかにした (Takamori *et al.* 2000)。VGLUT2 は、膵臓由来の AR42J 細胞の分化に関連した因子として単離され、DNPI (Differential-associated Na^+/Pi cotransporter)と名付けられた(Aihara *et al.* 2000)。その後、BNPI と同様に DNPI も小胞型のグルタミン酸トランスポーターであることが明らかになり、VGLUT2 と再定義された(Herzog *et al.* 2001、Hayashi *et al.* 2001)。VGLUT は、中枢神経系以外にも網膜や脊髄後根神経節など様々な神経系に存在している。また、神経以外にも、膵臓ランゲルハンス氏島、松果体、小腸 L 細胞、破骨細胞、精巣、胃粘膜組織などで VGLUT が存在していることが明らかになっている(Moriyama *et al.* 2004)。*VGLUT2* 遺伝子を破壊した遺伝子欠損マウスは、胎生致死もしくは、生まれてすぐに死に至る(Moechars *et al.* 2006)。一方、*VGLUT1* 遺伝子を破壊すると、グルタミン酸による神経化学伝達の低下を引き起こすとともに、生後数週間で死亡するケースが多く見られる。また、協調運動障害、失明、驚愕反応促進などの障害を引き起こす(Fremeau *et al.* 2004)。これらのことは、VGLUT1、2 が中枢神経系の機能に不可欠であることを意味している。一方、*VGLUT3* 遺伝子破壊実験から VGLUT3 が炎症性および神経障害性疼痛に関わっていることが報告されている(Seal *et al.* 2008)。また、*VGLUT3* 遺伝子欠損マウスは、マウスモデルにおいて聴覚障害をも引き起こすことが知られている(Seal *et al.* 2009)。

VGLUT の K_M は、1-5 mM 程度とグルタミン酸に対する親和性は低い(**図 1-9**)。これは、細胞質に 5-10 mM と比較的高濃度のグルタミン酸が存在することに対応している。VGLUT の D-グルタミン酸に対する特異性は高く、アスパラギン酸やグルタミン、グルタミン酸アナログを認識しない (Naito *et al.* 1985)。また、VGLUT の阻害剤として、色素であるエバンズブルー、トリパンブルー、ローズベンガルなどで強く阻害される (Roseth *et al.* 1995)。これらの阻害剤は、グルタミン酸に対して拮抗的で K_i は 40-200 nM 程度である。また、VGLUT だけでなく他の SLC17 ファミリーのトランスポーターも阻害する (Togawa *et al.* 2012、Kato *et al.* 2017、Miyaji *et al.* 2008)。

VGLUT のグルタミン酸輸送機構は、精製タンパク質の再構成系を用いて詳細に解析された(Juge *et al.* 2006)。部位特異的変異導入により、必須残基として、His128、Arg184、Asp191 の 3 つの残基が同定されている(**図 1-9**)。これらの残基のうち His128 と Asp191 は、VGLUT 間で

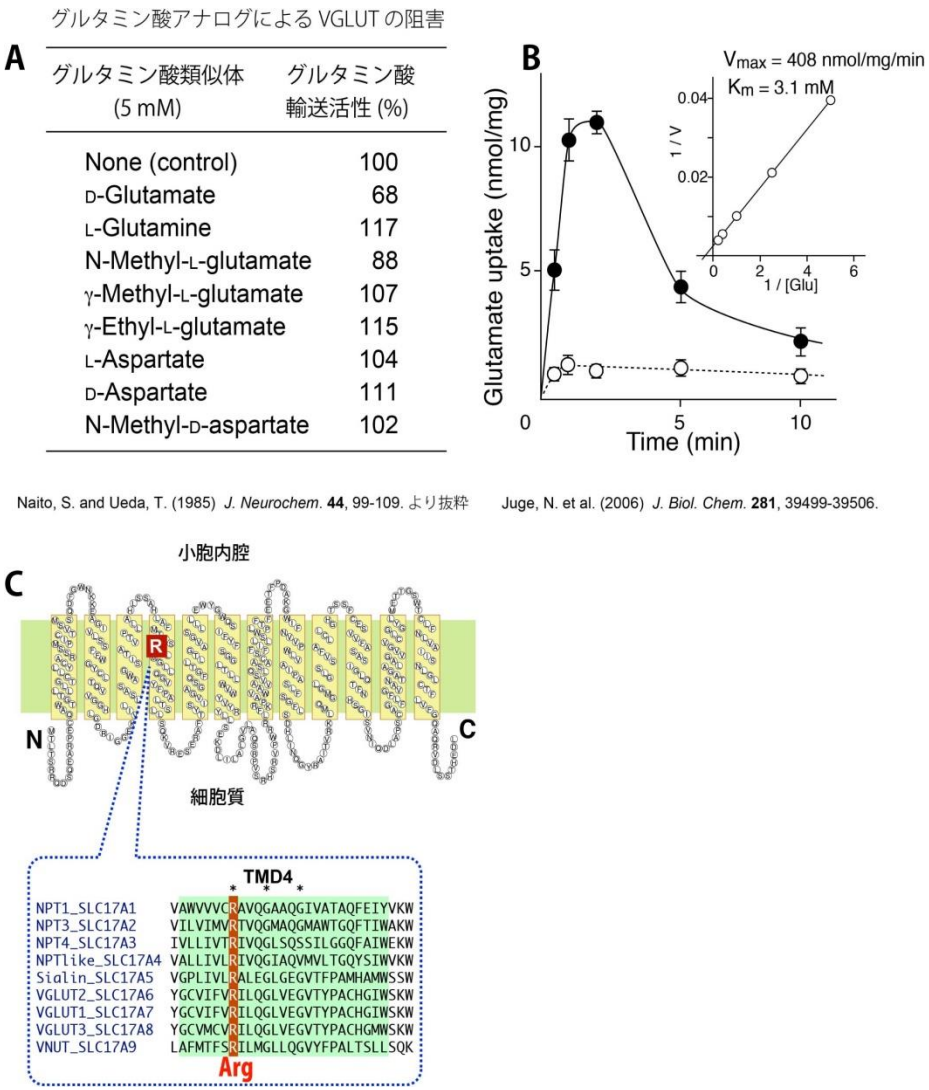


図 1-9. VGLUT の生化学的特性

(A) VGLUT は、$_D$-グルタミン酸存在下では、グルタミン酸輸送を阻害する。すなわち、$_D$-グルタミン酸に対する特異性は高いが、多くのグルタミン酸アナログでは、認識しない。

(B) VGLUT の K_M は、3.1 mM であり、基質親和性は低い。

(C) VGLUT の第 4 膜貫通領域には、全ての SLC17 メンバーに保存された Arg 残基があり、この残基を Ala に置換すると活性を失う。

のみ保存され、4 番目の膜貫通領域にある Arg184 はすべての SLC17 メンバーに保存されている(Omote *et al.* 2011)。Arg184 は、SLC17 ファミリー全体に完全保存されているので、このファミリー全体に共通する機能を持っているものと考えられている。また、VGLUT は、膜電位依

存型のグルタミン酸輸送活性に加えて、Na^+勾配を駆動力とするNa^+/リン酸共輸送活性を持つ。この活性は、グルタミン酸輸送と異なり、エバンズブルーやグルタミン酸によって阻害されず、また、塩化物イオンを必要としない。同様に、グルタミン酸輸送活性もリン酸によって阻害されない。Na^+/リン酸共輸送活性は、グルタミン酸輸送に必須な 3 つの残基の変異によって影響を受けない。したがって、VGLUT は、膜電位駆動型のグルタミン酸輸送と Na^+勾配を駆動型のNa^+/リン酸共輸送という異なる 2 つの活性を持つトランスポーターとなっている。

1-7 小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)

VNUT は、ATP などのヌクレオチドを分泌小胞に輸送するトランスポーターであり、プリン作動性化学伝達に不可欠な因子として働いている(**図 1-10**)(Sawada *et al.* 2008、Hiasa *et al.* 2014a、Moriyama *et al.* 2017)。開口放出によって細胞外へ放出されたヌクレオチドは、ターゲットとなる細胞のプリン受容体に結合することでシグナルを伝達する(Burnstock *et al.* 2007)。プリン作動性化学伝達は、体内の様々なところで使用されており、痛覚の伝達、神経-グリア相互作用、血液凝固、味覚、血圧制御、免疫応答などに深く関わっている(Burnstock *et al.* 2007、Hiasa *et al.* 2014a、Hiasa *et al.* 2014b)。プリン作動性化学伝達で使用されるヌクレオチドは、副腎髄質クロマフィン細胞のクロマフィン顆粒や、膵臓ランゲルハンス氏島β細胞のインスリン顆粒など様々な分泌小胞に高濃度に蓄積されている。これらの小胞には、ヌクレオチドを取り込む活性があることが知られていたが、どのトランスポーターがそれを担っているかは長らく不明なままであった(Aberer *et al.* 1978)。VNUT は、SLC17 ファミリーの 9 番目のメンバーとしてゲノム配列からその存在が明らかになり、クローニングされた(Sawada *et al.* 2008)。このトランスポーターは、ヌクレオチドを蓄積するクロマフィン顆粒に存在しており、精製 VNUT をリポソームに再構成したところ ATP を輸送した。このことから、この新しいトランスポーターが小胞型ヌクレオチドトランスポーターであることが明らかになった(Sawada *et al.* 2008)。VNUT は、他の SLC17 メンバーと同様に膜電位依存的、塩素イオン依存的にアニオンであるヌクレオチドを輸送し、エバンズブルーや DIDS によって阻害される。VNUT の ATP に対する K_M は、0.2 - 3 mM と、VGLUT のグルタミン酸輸送に比べるとやや高い基質親和性を持つ(Aberer *et al.* 1978、Bankston *et al.* 1996、Gualix 1996、Sawda *et al.* 2008、Miyaji *et al.* 2011b)。基質特異性は、

VGLUT ほど強くはなく、ATP のほか ADP や GTP、ITP など多くのヌクレオチドを認識し輸送する。また、ATP は、生体内では Mg^{2+}イオンと複合体を形成しており、これに対応して VNUT は、ATP-Mg 複合体も輸送することができる(Miyaji *et al.* 2011b)。VNUT も VGLUT と同様に第 4 膜貫通ヘリックスに必須 Arg 残基(Arg119)を持つ。この残基を Ala に置換すると活性を失うこと、塩化物イオンとケト酸による制御を受けることから、基質は、異なるが VGLUT と同様なメカニズムでヌクレオチドを輸送していると考えられている(Miyaji *et al.* 2011b、Kato *et al.* 2017)。

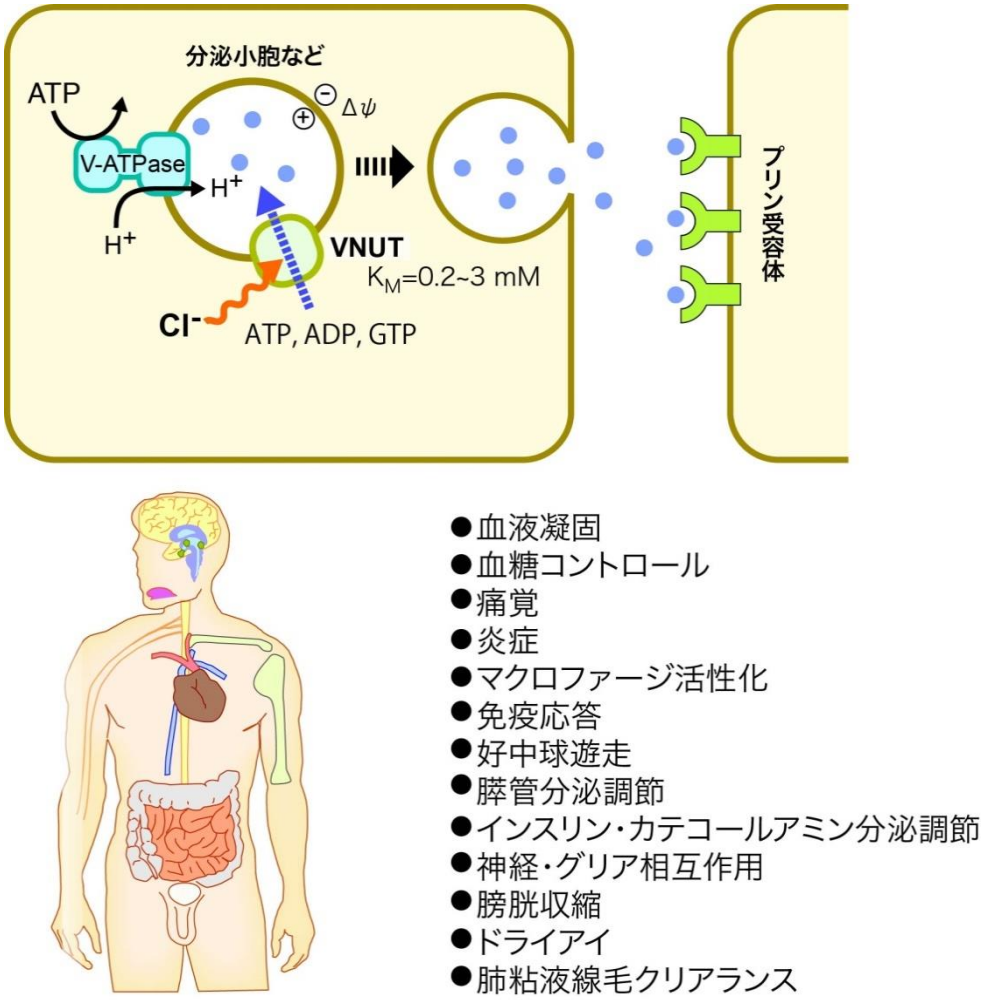


図　1-10.　VNUT

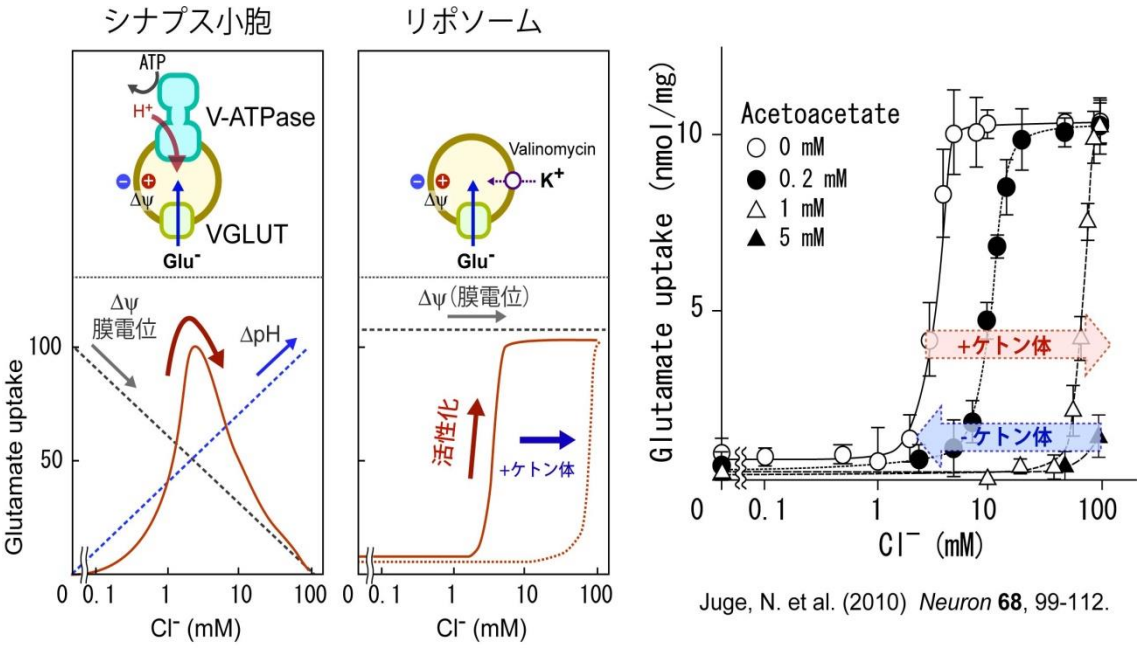
VNUT は、ATP をはじめとするヌクレオチドを分泌小胞に輸送するトランスポーターであり、プリン作動性の化学伝達に必須な因子である。VNUT は血糖コントロールや痛みの伝達、炎症、免疫応答など多様な生理現象に関わっている。

VNUT の生理機能の解明は、遺伝子破壊実験などを通して進展している(Masuda *et al.* 2016、Sakamoto *et al.* 2014)。*VNUT* 遺伝子を破壊したマウスにおいて、体重、行動などは、ほぼ正常なものであったが、副腎からのノルアドレナリン、アドレナリン分泌が抑制されていた。一方、膵臓ランゲルハンス氏島からのインスリン分泌は、促進されていた(Sakamoto *et al.* 2014)。興味深いことに *VNUT* 遺伝子欠損マウスでは、血糖値が低下しており、インスリン負荷試験からインスリン感受性が向上していることが明らかになった。そのほかにも VNUT は、神経因性疼痛、炎症性疼痛、血小板凝集、好中球の遊走などに関わっており、生物の生存に必須ではないが、多彩な生理機能を持つことが明らかになっている(Shinozaki *et al.* 2014、Hiasa *et al.* 2014a、Kato *et al.* 2017、Harada *et al.* 2018、Masuda *et al.* 2016)。

1-8 塩化物イオンによる制御

VGLUT をはじめとする SLC17 ファミリーのトランスポーターは、いずれも強い塩化物イオン依存性を示す(Omote *et al.* 2011、El Mestikawy *et al.* 2011)。塩化物イオン非存在下では、活性を全く示さないが、2-5 mM の塩化物イオンによって強く活性化される(**図 1-11**)。単離したシナプス小胞では、2 相性の塩化物イオン依存性を示し、2-5 mM の塩化物イオンによって強く活性化され、高濃度の塩化物イオンによって活性は、低下することが報告されている(Naito *et al.* 1985)。シナプス小胞の場合、V-ATPase が ATP を加水分解し H^+を小胞内に輸送する。これによって小胞内が正の膜電位と小胞内が酸性の pH 勾配が形成される。この膜電位と pH 勾配の形成は、塩化物イオン濃度に依存し、低濃度の塩化物イオン存在下では、膜電位、高濃度の塩化物イオン存在下では、pH 勾配が優勢となる (Johnson *et al.* 1987)。したがって、シナプス小胞のような分泌小胞でのグルタミン酸輸送は、高濃度の塩化物イオン存在下で活性が低下する(Naito *et al.* 1985、Juge *et al.* 2006、El Mestikawy *et al.* 2011)。一方、精製した VGLUT のみを含むリポソームでは、H^+ポンプの影響を受けないので、1 相性の活性化のみが見られる(Juge *et al.* 2010)。

VGLUT は、イソロイシンとロイシンの代謝中間産物であるα-ケト酸によって阻害される(Tavares *et al.* 2000, Reis *et al.* 2000)。このメカニズムは、Jugeらによって、精製VGLUTを用いて詳細に解析された(Juge *et al.* 2010)。塩化物イオンによる活性化は、Hill 係数 3-4 の強い正



Juge, N. et al. (2010) *Neuron* **68**, 99-112.

Omote, H. et al. (2016)
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicaol. **56**, 385-402.

図　1-11.　塩化物イオンとケト酸による活性の調節

VGLUT は、塩化物イオン非存在下では活性を示さず数 mM の塩化物イオンによって強く活性化される。この活性化は、ケト酸によって阻害される。ケト酸は、塩化物イオンに対する親和性を低下させることで VGLUT の活性を抑制する。このような調節システムは、SLC17 ファミリーに共通である。

の協働性を示し、アセト酢酸やピルビン酸など多様なケト酸によって競合的に阻害されることが明らかになった。すなわち、ケト酸は、塩化物イオンに対する親和性を低下させることで VGLUT の活性を低下させる(Juge *et al.* 2010)。ケトン体として知られるアセト酢酸は、脂質代謝の亢進によって産生されるケト酸であり、飢餓状態、高脂肪食、激しい運動時や糖尿病性ケトアシドーシスによって、血中濃度は、数 mM まで上昇する。これによって、VGLUT を介してグルタミン酸化学伝達が抑制される。ケトン体は、神経の過剰興奮によるてんかん発作を抑制することが知られており、生体内の代謝が神経活動をコントロールしていることになる(Vining *et al.* 1999)。このような機能を持つケト酸は、アセト酢酸の他に、ピルビン酸、フェニルピルビン酸、α-ケトイソバレリン酸、α-ケトイソカプロイン酸、α-ケトメチルバレリン酸などが報告されており、糖代謝、脂質代謝、アミノ酸代謝とグルタミン酸化学伝達が密接な関係になることを示唆して

いる(**図 1-12**)(Tavares *et al.* 2000、Reis *et al.* 2000、Juge *et al.* 2010)。

VNUTも同様にケト酸によって塩化物イオンと拮抗的に阻害される。最近になってKatoらによって、ビスホスフォネート製剤として用いられるクロドロン酸がケト酸と同様な効果を持つことが報告された(Kato *et al.* 2017)。クロドロン酸のVNUTに対するIC_{50}は16 nMと非常に小さく、また特異的にVNUTを阻害する。クロドロン酸は、塩化物イオンと拮抗的にVNUTに作用し、塩化物イオンによる活性化を抑制する。このことは、塩化物イオン結合部位に対して作用する薬を創生することが可能であることを意味している。実際、クロドロン酸はVNUTが関わる神経障害性疼痛や炎症性疼痛を抑制する。

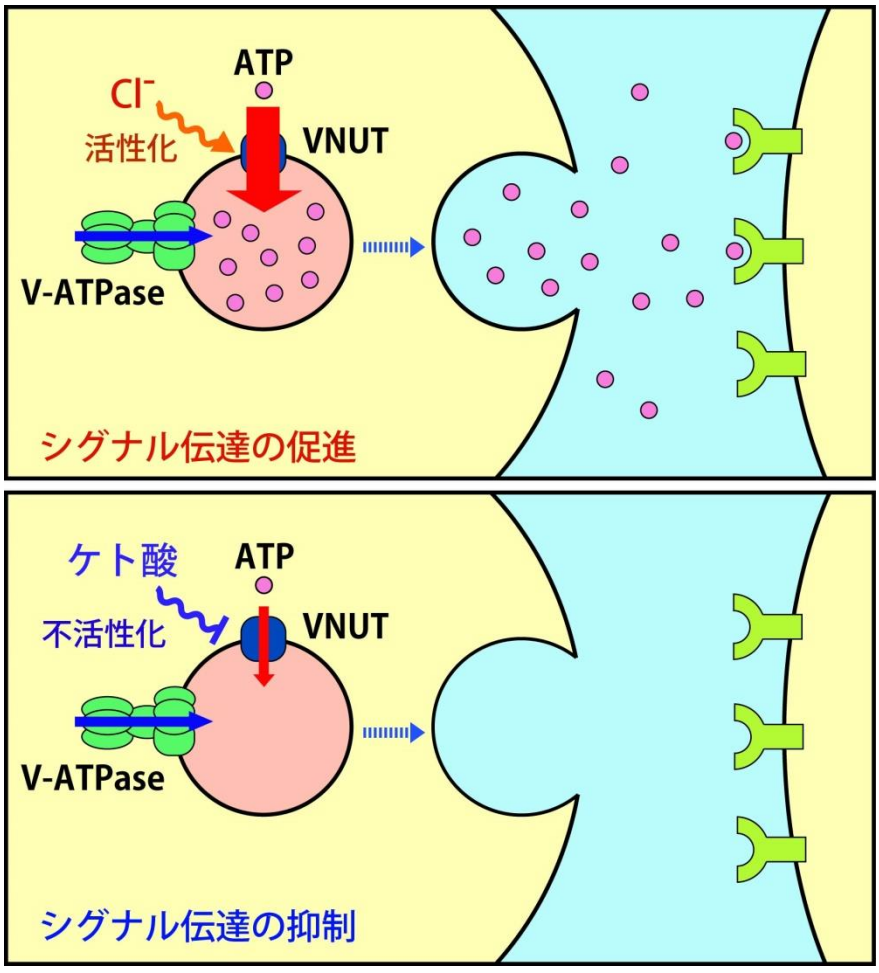


図　1-12.　塩化物イオンとケト酸による活性のシグナル伝達の調節

塩化物イオンとケト酸は、VGLUTやVNUTの活性調節を通して、化学伝達をコントロールしている。

1-9 課題と本研究の目的

このように、塩化物イオンによる活性制御は、SLC17 ファミリーに共通する特徴であり、グルタミン酸やプリン作動性化学伝達を調節することで、生体内の様々な生理現象をコントロールしている。この制御メカニズムの解明は、VNUT や VGLUT が関与すると考えられているてんかんや疼痛、炎症、糖尿病、骨粗鬆症など様々な疾患に対する新規治療薬開発につながると考えている。

これまでの流れを整理すると、VGLUT では、Arg184 残基が基質輸送に必須の残基であることが明らかになっている。また、これらの残基は、SLC17 ファミリーに属する VNUT でも同様であり必須 Arg 119 残基が存在する(Omote *et al.* 2011)。また、一定濃度の塩化物イオン濃度領域で強い活性化を示すことが明らかになっており、これらの因子が基質輸送に重要な役割を果たしていることは明らかである(Miyaji *et al.* 2011b、Kato *et al.* 2017)。しかし、その詳細な活性制御メカニズムは、不明なままにされてきた。その理由の一つは、塩化物イオン非存在下では活性がないため、解析が困難であったためである。同様に、必須 Arg 残基の機能も不明なままである。これらの因子の機能を解析するためには基質結合など、輸送の部分反応を解析する必要がある。しかし、最も研究の進んでいる VGLUT は基質に対する親和性が低く、また、基質特異性が極めて高く、アナログを認識しない。

そこで、本研究では、より広範囲な基質を認識する VNUT をターゲットとして、ATP アナログを用いて塩化物イオン・ケト酸・必須 Arg 残基のヌクレオチド結合に対する役割を解析した。基質結合を測定するために蛍光性の ATP アナログである TNP-ATP に着目した。TNP-ATP は、これまでも、ミオシン ATPase の基質結合部位の研究やミトコドリア ATPase、Na^+/K^+ATPase など様々な生体エネルギー転換機構の研究に用いられてきた(Kormer *et al.* 1982、Watanabe *et al.* 1982、Moczydlowski *et al.* 1981a, b)。TNP-ATP は、水溶液中では、蛍光量子収率が極めて低い化合物であり、タンパク質に結合していない状態での蛍光は、極めて小さい。一方、蛋白質に結合することで蛍光強度が大きく増大する。この蛍光強度の増大は、結合する蛋白質によって大きく異なり、ミトコンドリア ATPase で約 7 倍、Na^+/K^+ATPase で約 15 倍もの増大が報告されている(Grubmeyer *et al.* 1981、Moczydlowski *et al.* 1981a, b)。このような性質を利用して、TNP-ATP を VNUT の基質結合の解析に応用することができれば、塩化物イオンや必須 Arg

残基が基質結合へ及ぼす影響解析することが可能ではないかと考え、本研究を行なった。

第2章

方法

2-1 大腸菌を用いたヒト VNUT の発現系と R119A 変異型プラスミドの構築

ヒト VNUT(NM_001302643)発現プラスミド、pET-ββhVNUT は Leviatan らが作成したものを用いた(Leviatan *et al*. 2010) (**図 2-1**)。このプラスミドは大腸菌内で活性型の真核生物の膜タンパク質を大量発現するものである。Arg119 残基を Ala に置換した変異型 VNUT を発現するプラスミドは PCR を用いて作成した。

変異型プライマーhVNUTR119Afw (5'-GACCTTCTCAGCCATCCTCAT-3')と hVNUTrv2 プライマー(5'-CGTGGTCTCCATCAAGTAGCCGCC-3')を用い、pET-ββhVNUT プラスミドを鋳型として、Pfx50 (ThermoFisher/Invitrogen、Waltham、MA、USA) を用いて PCR 増幅した。変異を含む 829 bp の増幅断片と T7fw プライマー(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')をプライマーとして、再度 PCR 増幅した。得られた 1695 bp の断片を *Eco*RI と *Pst*I で切断し、同じ酵素で切断した pET-BBhVNUT プラスミドに TaKaRa Mighty Ligation Kit(Takara Biomedicals、Osaka、Japan)でライゲーションした。得られたプラスミド中でヒト VNUT をコードする全領域の塩基配列を決定し、R119A 変異(CGC→GCC)が入っていることを確認した。このプラスミドを pET-ββhVNUT -R119A とした。

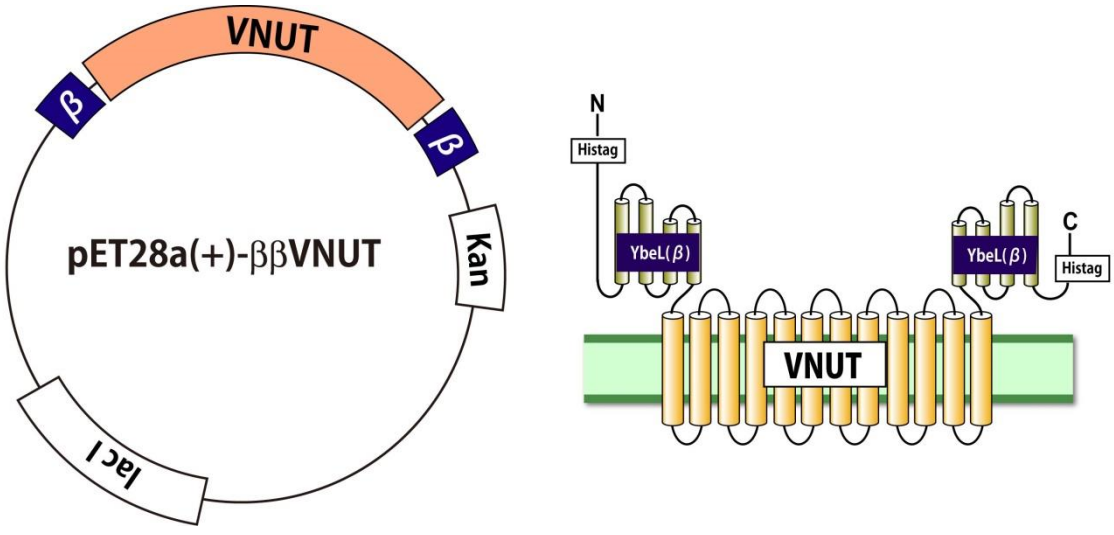


図 2-1. pET-ββVNUT プラスミド

VNUT の N 末端と C 末端の細胞質領域に大腸菌由来のαヘリカルタンパク質(Ybel β)を融合し、大腸菌内で VNUT を活性保持したまま大量に発現できる。

2-2 大腸菌 C43 株の形質転換

pET-ββhVNUT プラスミド 0.1 μg を大腸菌 C43(F^- *ompT* $hsdS_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* λ(DE3))株 50 μL に加え、氷上で 30 分静置した。42°C の水浴で 45 秒インキュベーションした後、SOC 培地を 300 μL を加え、37°C で 1 時間インキュベーションした。これを 30 μg/mL のカナマイシンを含む LB 寒天培地に播種し、37℃で 16 時間培養して形質転換した C43 株を得た。

2-3 VNUT の発現と精製

VNUT の精製は、Leviatan らの方法に従った(Leviatan *et al.* 2010)。形質転換した C43 株を 30 μg/mL のカナマイシンを含む 5 mL の TB 培地で、37℃にて 1 晩培養後、1L の TB 培地に移し OD_{600} が 0.6～0.8 になるまで培養した。18℃に冷やした後、終濃度が 1 mM になるように IPTG を添加し、さらに 16 時間培養した。

以下、すべてのステップを 4℃で行った。培養液を 2,800 × g、4℃、15 分間遠心して菌体を回収し、30 mL の Sonication Buffer (20 mM MOPS/Tris pH7.0、300 mM スクロース、2 mM PMSF) で懸濁した。懸濁液を 5,856 × g で 15 分間遠心した。沈殿を Sonication buffer 20 mL (1 mM ATP、10 μg/mL ロイペプチン、10 μg/mL ペプスタチン A) で懸濁し、超音波処理 (VCX500：Sonics & Materials Inc.、Newtown、CT、USA、出力 25%、30 秒 × 10 回) で細胞を破砕した。これを 6,000 × g にて 10 分間、4℃で遠心しデブリを取り除いた。上澄を 160,000 × g、1 時間、4℃で超遠心して膜画分を得た。これを Solubilization Buffer (40 mM Tris/HCl pH 8.0、100 mM NaCl、10 mM KCl、20%(v/v) グリセロール、2 mM PMSF、10 μg /mL ロイペプチン、10 μg /mL ペプスタチン A)で懸濁後、タンパク質濃度が 10 mg/mL になるように希釈した。終濃度が 1.5%(w/v)になるように、Fos-Choline-14 (Anatrace Inc.、Cleveland、OH、USA) を加えて膜タンパク質を可溶化した。10 分間氷上でインキュベートした後、160,000 × g、1 時間、4℃にて超遠心し、上清を可溶性画分とした。

Ni-NTA Super flow レジン (Qiagen、Hilden、Germany)を Econo-Column (Bio-Rad Laboratories、Richmond、CA、USA、1.0 cm × 5 cm) に充填し、Buffer A (40 mM MOPS/Tris pH 8.0、100 mM NaCl、10 mM KCl、20%(v/v) グリセロール、20 mM イミダゾール) で平衡

化した。ここに、0.1%(w/v)の DDTM を含む Buffer A で 2 倍希釈した可溶性画分を 3 回通してタンパク質を吸着させた。その後、10 mL の Wash Buffer1 (40 mM MOPS/Tris pH8.0、100 mM NaCl、10 mM KCl、20%(v/v) グリセロール、20 mM イミダゾール、0.1%(w/v) DDTM、2 mM PMSF、10 μg/mL ロイペプチン、10 μg/mL ペプスタチン A)と 10 mL の Wash Buffer 2 (40 mM MOPS/Tris pH8.0, 20%(v/v) グリセロール、50 mM イミダゾール、 0.1%(w/v) DDTM、2 mM PMSF、10 μg/mL ロイペプチン、10 μg/mL ペプスタチン A)で洗浄した。精製 VNUT は、Elution Buffer (50 mM MOPS/Tris pH7.5、20%(v/v) グリセロール、300 mM イミダゾール、0.1%(w/v) DDTM、2 mM PMSF) でカラムから溶出し、分注後-80℃で保存した。

2-4 大腸菌 ATP 合成酵素(F_oF_1-ATPase)の精製

大腸菌 F_oF_1-ATPase の精製は、Moriyama らの方法で行なった(Moriyama *et al.* 1991)。F_oF_1-ATPase の大量発現プラスミド pBWU13(Ap^R pMB1 origin *atpI'BEFHAGDC*)を大腸菌 DK8(*Hfr*PO1 *bglR thi1 relA1 ilv*::*Tn*10 (Tet^R) Δ*atpBEFHAGDC*)株に導入し、50 μg/mL イソロイシン、50 μg/mL バリン、2 μg/mL チアミンおよび 0.5%(v/v) グリセロールを含む Tanaka 培地(Tanaka *et al.* 1967)中で 37℃で培養した。菌体を 4℃で回収後、Disruption Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM $MgCl_2$、0.5 mM EDTA、1 mM PMSF、1 μg/mL ロイペプチン、1 μg/mL ペプスタチン、10%(v/v) グリセロール、1 mM DTT)で懸濁した。菌体は、フレンチプレス(1,000 kg/cm^2)を用いて破砕し、17,000 × g、10 分間、4℃で遠心し上清を回収した。これを 210,000 × g、80 分間、4℃で超遠心し、膜画分を沈澱として回収した。得られた膜画分を MOPS 緩衝液(20 mM MOPS/Tris pH 7.0、1 mM $MgSO_4$、1 mM DTT、1%(w/v) OG)に懸濁し、終濃度 2%(w/v)の OG を添加した。これを 260,000 × g で 30 分間、4℃で遠心して F_oF_1-ATPase を可溶化した。同じ緩衝液を含む 10%-30%(v/v)のグリセロール密度勾配(4 mL)の上に可溶化した F_oF_1-ATPase を上層した。これを 330,000 × g、4℃で 5 時間遠心分離した。F_oF_1-ATPase は、チューブの底から 1.5 mL 回収した。精製 F_oF_1-ATPase は分注後-80℃で保存した。

2-5 タンパク質の定量

タンパク質定量には Schaffner-Weissmann 法を用いた(Schaffner *et al.* 1973)。

総量 300 μL になるようにタンパク質を蒸留水で希釈し、SDS Buffer (1 M Tris/HCl pH8.0, 1%(w/v) SDS)を 30 μL 加え、懸濁後、50%(v/v) TCA を 100 μL を加えてよく混合し、20 分間室温で静置した。吸引濾過器を用いて、サンプルをニトロセルロースメンブレンフィルター(pore size 0.45 μm、ADVANTEC Inc、Tokyo、Japan)で濾過し、5%(v/v) TCA でフィルターを洗浄した。フィルターを Staining solution (0.25%(w/v) Amido scwartz 10 B, Methanol : Acetic acid : H_2O＝9: 2 : 9 体積比) で 5 分間染色した。Destaining solution (Methanol : H_2O : Acetic acid＝90: 8: 2、体積比) でバックグラウンドが白くなるまで脱色し、3 mL の Elution solution(50%(v/v) Ethanol、25 mM NaOH、50 μM EDTA)で溶出した。溶出液の 630 nm の吸光度を測定した。標準物質には、ウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。

2-6 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

SDS-ポリアクリアルアミド電気泳動(SDS-PAGE)は Laemmli の方法で行なった(Laemmli *et al.* 1970)。サンプルに 5×SDS sample buffer (10%(w/v) SDS、5%(v/v) β-メルカプトエタノール、30%(v/v) グリセロール、250 mM Tris/HClpH 6.8、0.02%(w/v) ブロモフェノールブルー)を 1/5 volume 加え、室温で 30 分間変性させた。10%(w/v)アクリルアミドゲルを用いて泳動 buffer (12 mM Tris、0.72%(v/v) グリシン、0.013%(w/v) EDTA、0.025%(w/v) SDS) 中で電気泳動した。泳動後のゲルを CBB 染色液 (5%(v/v) Acetic acid、50%(v/v) Methanol、0.25%(w/v) CBB) で 30 分間振とうし、固定液 (10%(v/v) Acetic acid、 20%(v/v) Methanol) で 30 分間振とうした。その後、脱色液 (7%(v/v) Acetic acid、 5%(v/v) Methanol) で脱色した。

2-7 TNP-ATP の蛍光測定

ATP アナログである TNP-ATP (Sigma-Aldrich、 St. Louis、MO、USA)の蛍光は Hitachi F-2500 分光蛍光光度計を用いて測定した。

MOPS Buffer (20 mM MOPS/NaOH pH 7.5、20%(v/v) グリセロール、0.02%(w/v) DDTM、100 mM K Acetate または、100 mM KCl) に 1 μM の TNP-ATP と 0.5 μM の VNUT を加え 15℃で測定した。VNUT のモル濃度は分子量を 79,179 として計算した。励起波長を 410 nm、蛍光波長を 534 nm、励起側のスリットを 5 nm、蛍光側のスリットを 10 nm に設定した。各条件で 3 回ずつ測定を実施した。コントロールとして Elution Buffer (50 mM MOPS/Tris pH7.5、20%(v/v) グリセロール、300 mM イミダゾール、0.1%(w/v) DDTM、2 mM PMSF) を VNUT の代わりに加え、同様の実験を行なった。

2-8 野生型及び R119A 変異型 VNUT の TNP-ATP タイトレーション

野生型及び R119A 変異型 VNUT を MOPS Buffer (20 mM MOPS/NaOH pH 7.5、20%(v/v) グリセロール、0.02%(w/v) DDTM、100 mM K Acetate または、100 mM KCl) に溶かし、TNP-ATP を段階的に添加して濃度を 0.01 μM から 1000 倍の 10 μM まで (Mg^{2+}イオン添加条件では 0.03 μM から 30 μM まで) 変化させ、励起波長 410 nm の光を照射したときの、534 nm の蛍光を測定した。各条件でコントロールとして Elution Buffer (50 mM MOPS/Tris pH7.5、20%(v/v) グリセロール、300 mM イミダゾール、0.1%(w/v) DDTM、2 mM PMSF)を VNUT の代わりに加え、同様の実験を行った。各条件で 3 回ずつ測定を実施した。また、体積増加による希釈を補正した。ATP のタイトレーションも同様に行なった。

2-9 TNP-ATP タイトレーションのデータ解析

各測定条件における VNUT を加えた場合と Elution Buffer を加えた場合の蛍光強度の差を求め、3 回の実験結果の平均値を、以下の式にフィッティングさせた。

解析には KaleidaGraph (Synergy Software、Reading、CA、USA) を用いた。

$$F = F_{max} \times [\text{TNP-ATP}] / (K_d + [\text{TNP-ATP}]) + C \qquad (式\ 1)$$

F: 蛍光強度

$\mathbf{F_{max}}$: TNP-ATP が VNUT に最も多く結合したときの蛍光強度

[TNP-ATP]: TNP-ATP 濃度 (μM)

$\mathbf{K_d}$: 解離定数 (μM)

C: 定数

ATP タイトレーションの実験では、競合阻害モデルに基づき以下の式にフィッティングさせた。

$$F = F_{max} \times [\text{TNP-ATP}] / (K_d \{1 + [\text{ATP}] / K_{dATP}\} + [\text{TNP-ATP}]) \qquad (式\ 2)$$

[ATP]: ATP 濃度

$\mathbf{K_{dATP}}$: ATP の解離定数 (μM)

50%阻害濃度(IC_{50})は、Henderson's plot より算出した(Henderson 1972)。

横軸に(F_0 / F)を縦軸に[ATP] / (1 – F / F_0)をとり、データをプロットした。直線の傾きから IC_{50} を算出した。

$$[\text{ATP}] / (1 - F / F_0) = IC_{50} (F_0 / F) + C \qquad (式\ 3)$$

$\mathbf{F_0}$: ATP 非存在下の時の蛍光強度

2-10 ビオチン-11-ATP による光化学修飾

ビオチン-11-ATP (PerkinElmer, Inc.、Waltham、MA、USA)による VNUT の光化学修飾は、Kato らの報告を改変して行った(Kato 2017)。精製 VNUT 1.5 μg を 25 μL の 20 mM MOPS/NaOH pH 7.5、100 mM KCl および 0.02%(w/v) DDTM を含む緩衝液に加え、その後、終濃度 10 μM のビオチン-11-ATP を添加した。反応液を氷上に静置し、UV トランスイルミネーター(302 nm、GelDock-2000、Bio-Rad、Hercules、CA、USA)にて 4 分間 UV を照射した。その後、5 μL の SDS-PAGE 用 5×SDS sample buffer を加えて、室温で暗所 30 分間処理した。サンプルは 9%(w/v)の ポリアクリルアミドゲルによる SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース/セルロース混合膜に 300 mA, 2 時間で転写した。転写したニトロセルロース膜は 0.5%(w/v) BSA を含む TEN 緩衝液 (25 mM Tris-HCl pH 7.4、1 mM EDTA、140 mM NaCl)で 1 時間、室温にてブロッキングした後、0.1 μg/mL の HRP-ストレプトアビジン(Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA) を含む TEN 緩衝液で 1 時間、室温でインキュベートした。その後、0.1%(v/v)の Tween-20 を含む TEN 緩衝液でニトロセルロース膜を 4 回洗浄した。ニトロセルロース膜上のビオチン化タンパク質は ECL キット(Enhanced chemiluminescence kit、PerkinElmer Inc.、Boston、MA、USA)を用いて可視化し, ImageQuant LAS-4000 イメージアナライザー (GE Healthcare、Chicago、IL、USA) のリニアモードで撮影した。ビオチン化タンパク質は ImageJ version1.52a を用いて定量した(Rasband *et al.* 1997)。

2-11 データ処理

各データは、平均値と標準誤差を示した。有意差は、Dunnett's テストで検定した。

第3章

結果

第1節　TNP-ATP の VNUT 依存的蛍光の増強と特異性

本研究では、大腸菌による真核生物膜タンパク質発現系を用いてヒト VNUT を精製し、解析に用いた。VNUT cDNA を導入した発現ベクターpET-ββhVNUT を大腸菌 C43 株に導入し、TB 培地で O.D. 600 が 0.6 になるまで培養後、IPTG で発現を誘導し、18℃で 16 時間培養した。ここから、大腸菌を回収し細胞を破砕後、膜画分を得た。これを界面活性剤 Fos-choline-14 で可溶化し、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーで VNUT を精製した(**図 3-1**)。

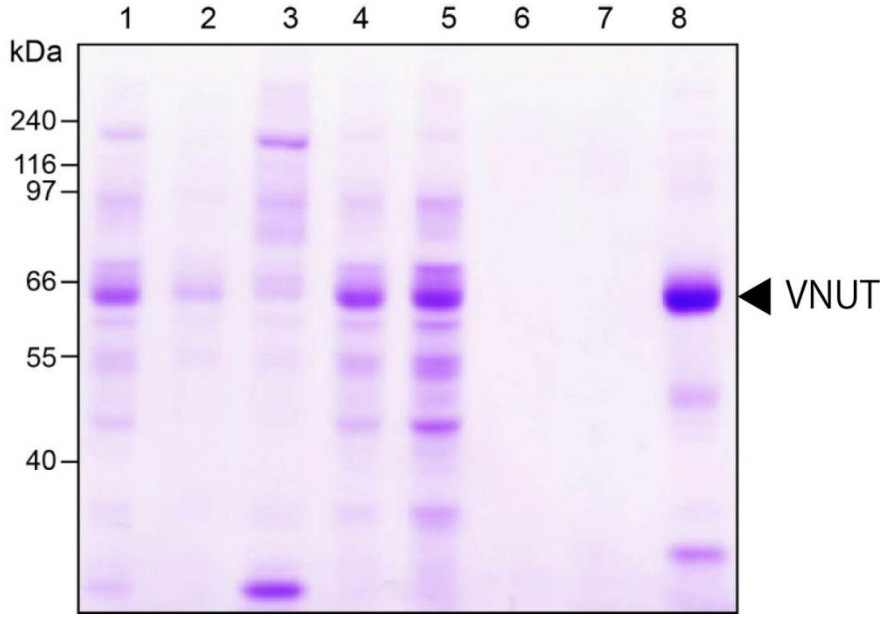


図　3-1. ヒト VNUT の精製

ヒト VNUT 発現プラスミドを大腸菌 C43 株へ形質転換した。取得した形質変換体を用いて、大量発現し、Fos-choline-14 で可溶化後、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーで精製した。

レーン 1、膜画分（20 μg）; レーン 2、可溶性画分（10 μg）; レーン 3、不溶性画分（10 μg）; レーン 4、非吸着画分（10 μg）; レーン 5、Wash1（10 μg）; レーン 6、Wash2（2.8 μg）; レーン 7、溶出画分 1（1.4 μg）; レーン 8、溶出画分 2（10μg）。本研究においては、レーン 8 のサンプルを用いて解析を行った。

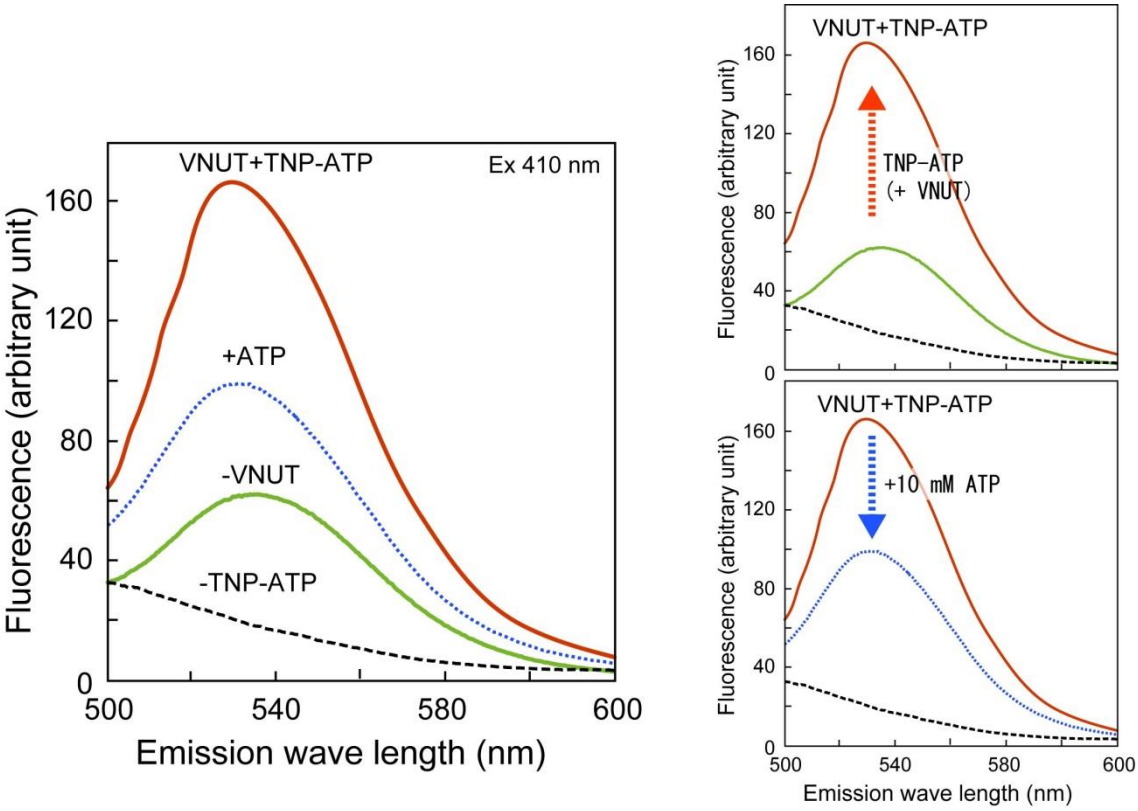


図 3-2. TNP-ATP の蛍光スペクトル

0.02%の DDTM を含む反応液中に 1 μM の TNP-ATP を添加し、410 nm の励起光を照射し、蛍光スペクトルを測定した。実験は 15℃で行なった。黒破線、0.5 μM VNUT; 緑、1 μM TNP-ATP; 青点線 1 μM TNP-ATP + 0.5 μM VNUT + 10 mM ATP; 赤、1 μM TNP-ATP + 0.5 μM VNUT

TNP-ATP は、ATPase などのヌクレオチド結合タンパク質に結合すると蛍光が増強される。0.02% DDTM 存在下で TNP-ATP の蛍光スペクトルを測定したところ、534 nm をピークとする蛍光が観察された。この蛍光は、VNUT を加えることにより、約 2.6 倍増強された**(図 3-2)**。この蛍光の増強が VNUT の ATP 結合部位への結合によるものかを確かめるために 10 mM の ATP を加えたところ、蛍光強度が低下した。このことは、TNP-ATP の VNUT への結合が ATP と競合していることを示唆している。

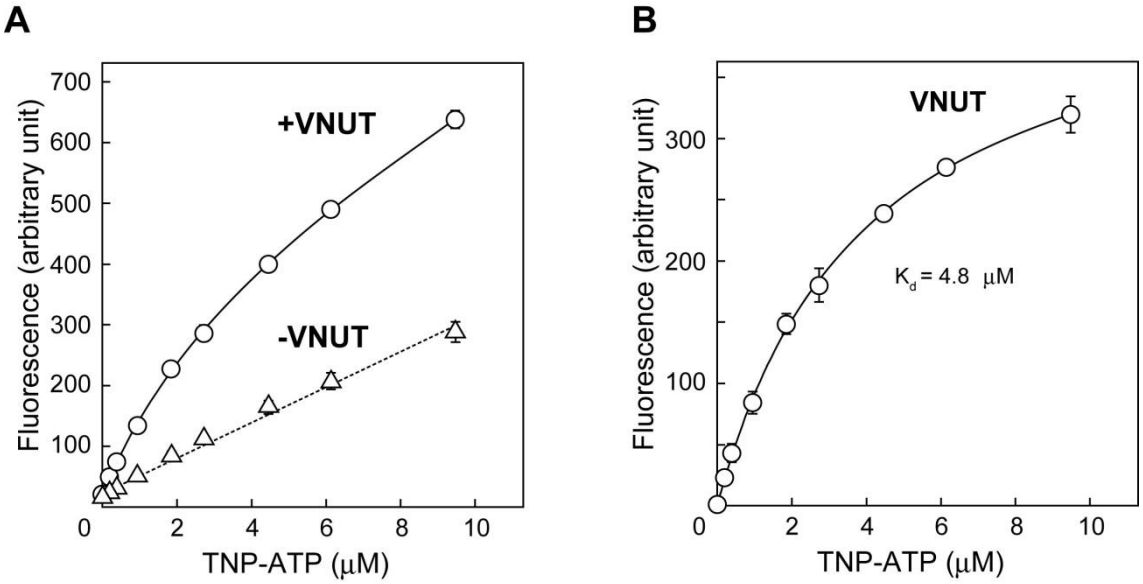


図 3-3. TNP-ATP 蛍光の VNUT 依存的用量応答曲線

(A) 図 3-2 と同様に 534 nm の TNP-ATP の蛍光強度を測定した。コントロールでは VNUT の代わりに同じ体積の Elution Buffer を加えた。◯、0.5 μM VNUT; △、コントロール

(B) VNUT 存在下の蛍光強度から非存在下のものを差し引いたものをプロットした。これに式 1 を用いてフィッテイングした。(n = 3)

VNUT への TNP-ATP の結合の親和性を求めるために異なる濃度の TNP-ATP 存在下での蛍光強度を測定した(**図 3-3**)。TNP-ATP 濃度を増加させると用量依存的に蛍光が増大するカーブを示した。一方、VNUT 非存在下では蛍光強度と TNP-ATP 濃度は直線関係を示し、これを差し引くと飽和曲線を描き、式 1 でフィッティングしたところ、解離定数 K_d = 4.8 μM を得た(**図 3-3B**)。これを 2 重逆数プロットすると、直線性を示し、測定した範囲内で解離定数は 1 つのみであった(**図 3-4**)。TNP-ATP の蛍光の増幅が VNUT に特異的に結合したものであるか検討するために、VGLUT2 を用いて同様な解析を行なったところ、VNUT で見られるような強い蛍光の増大は観察されなかった(**図 3-5**)。

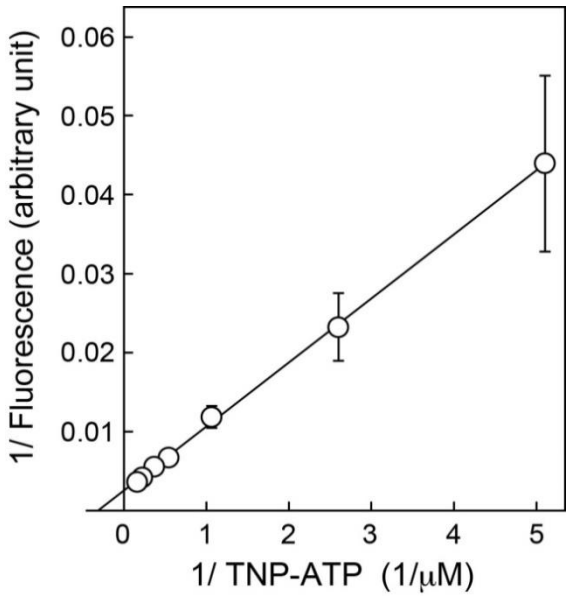


図 3-4. VNUT 依存的な TNP-ATP 蛍光の 2 重逆数プロット

図 3-3B の結果を 2 重逆数プロットした。

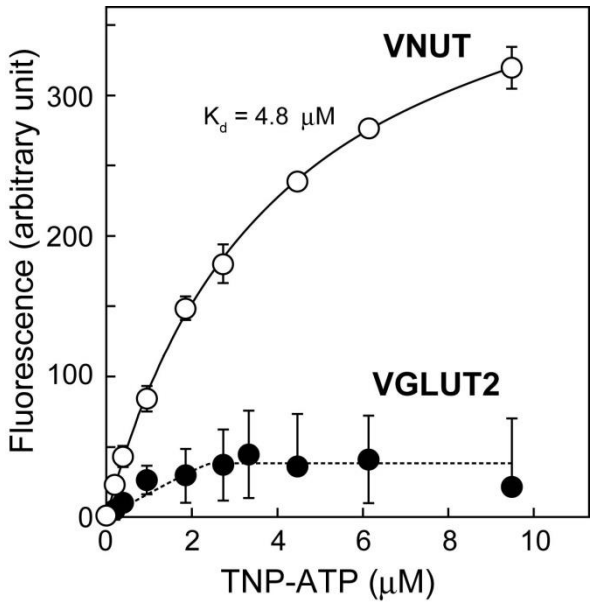


図 3-5. VGLUT2 依存的な TNP-ATP の蛍光

図 3-3 と同様に VGLUT2 存在下での TNP-ATP 蛍光の濃度依存性を測定した。

○、0.5 μM VNUT； ●、0.5 μM VGLUT2 (n = 3)。

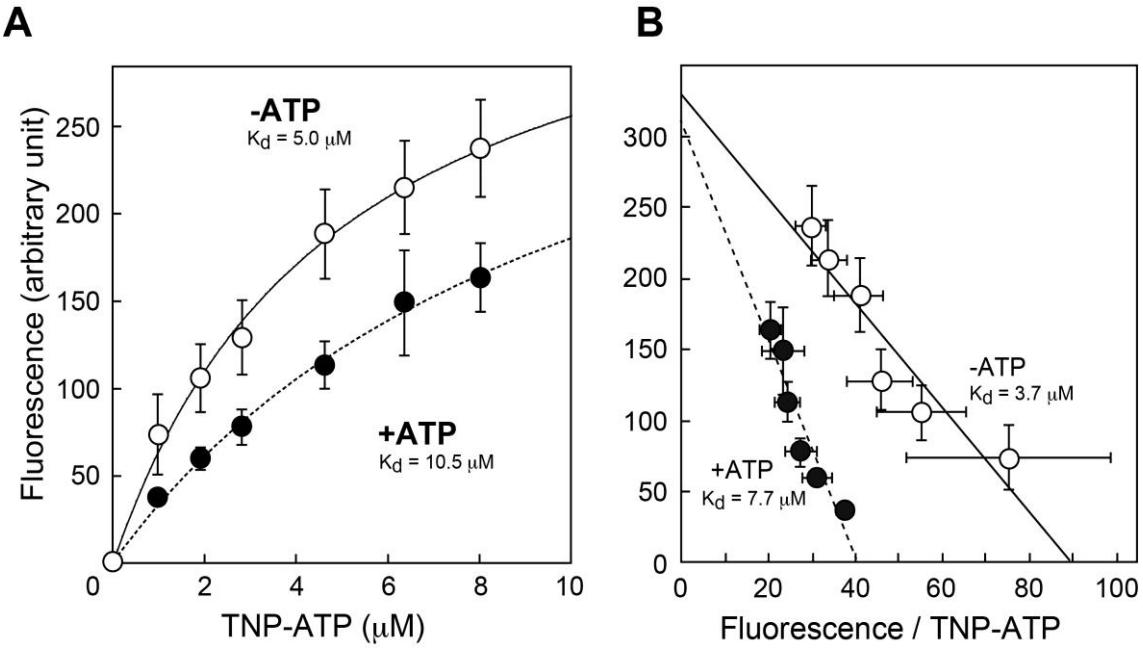


図 3-6. TNP-ATP の VNUT への結合に対する ATP の効果

図 3-3 と同様に TNP-ATP 蛍光の濃度依存性を 5 mM の ATP 存在下および、非存在下で測定した。○、5 mM ATP 存在下; ●、5 mM ATP 非存在下(n = 3)。

(A) TNP-ATP 蛍光の濃度依存性。曲線は式 1 でフィッティングしたものを示した。これにより、算出した解離定数を示した。

(B) Eadie-Hofstee プロット。回帰直線の傾きから解離定数を算出した。

TNP-ATP が VNUT の ATP 結合部位に結合しているかを知るために、TNP-ATP の蛍光に対する ATP の効果を検討した(**図 3-6**)。ATP 非存在下では、TNP-ATP に対する解離定数は 5.0 μM であったが、ATP 存在下では 10.5 μM と約 2 倍に上昇した。Eadie-Hofstee プロットから、ATP は TNP-ATP の VNUT への結合を競合的に阻害していることが示された。

ATP の結合定数を求めるために、TNP-ATP の蛍光を各種 ATP 濃度下で測定した(**図 3-7**)。その結果、Henderson プロットは直線を示し、単一の結合定数を持つことが示唆された。このプロットから、 ATP に対する見かけの親和性は 7.7 mM であった。一方、競合阻害モデルに基づいて算出すると、ATP に対する解離定数は 5.8 mM であった。この値は報告されている精製再構成系を用いた K_M 値(0.6-0.8 mM)に比べると約 10 倍程度大きな値であった(Sawada *et al.*

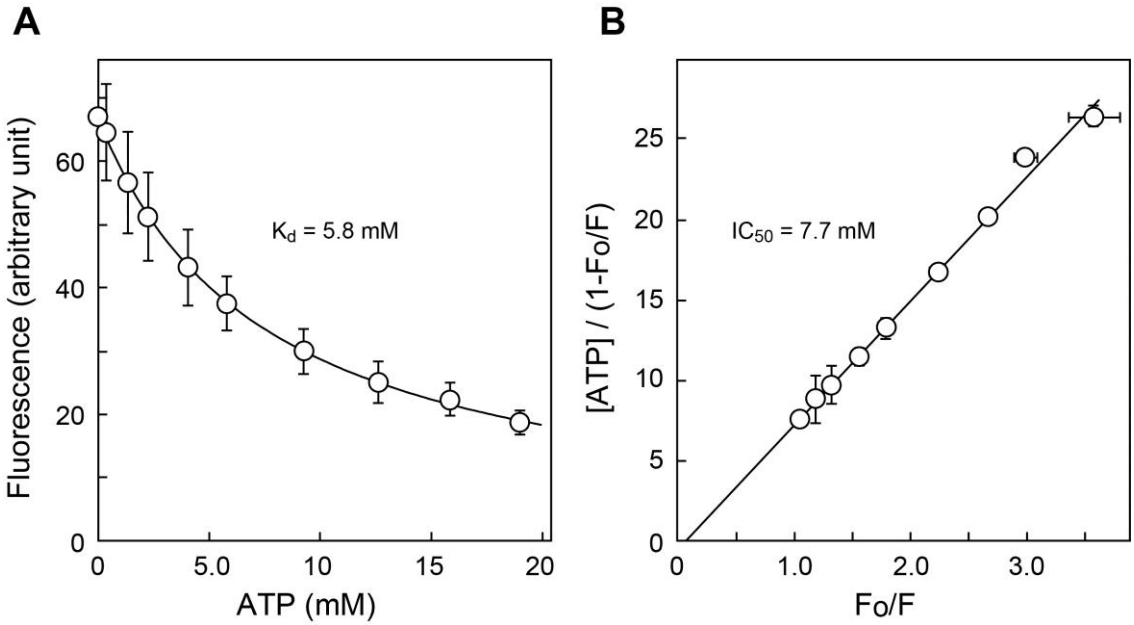


図 3-7. TNP-ATP の VNUT への結合に対する ATP の親和性

図 3-3 と同様に、TNP-ATP の蛍光を異なる ATP 濃度下で測定した(n = 3)。

(A) 蛍光の TNP-ATP 濃度依存性。曲線は式 2 でフィッティングしたものを示した。これにより、算出した解離定数を示した。

(B) Henderson プロット。回帰直線の傾きから IC_{50} 値を求めた。

2008, Miyaji *et al.* 2011)。

さらに TNP-ATP 結合の特異性を確かめるために、エバンズブルーの効果を検討した。エバンズブルーはアゾ色素の一つで、VNUT を含む SLC17 ファミリーに共通する阻害剤である(Kato *et al.* 2013)。シナプス小胞を用いたグルタミン酸輸送の解析から、エバンズブルーなどのアゾ色素は、VGLUT の基質であるグルタミン酸に対して競合的に阻害することが報告されている(Roseth *et al.* 1995)。したがって、TNP-ATP が VNUT の ATP 結合部位に結合するならば、エバンズブルーによってその親和性は低下するものと期待した。その結を図 3-8 に示す。2 μM のエバンズブルー存在下では TNP-ATP の親和性は低下したが、2 相性を示した。式 1 を

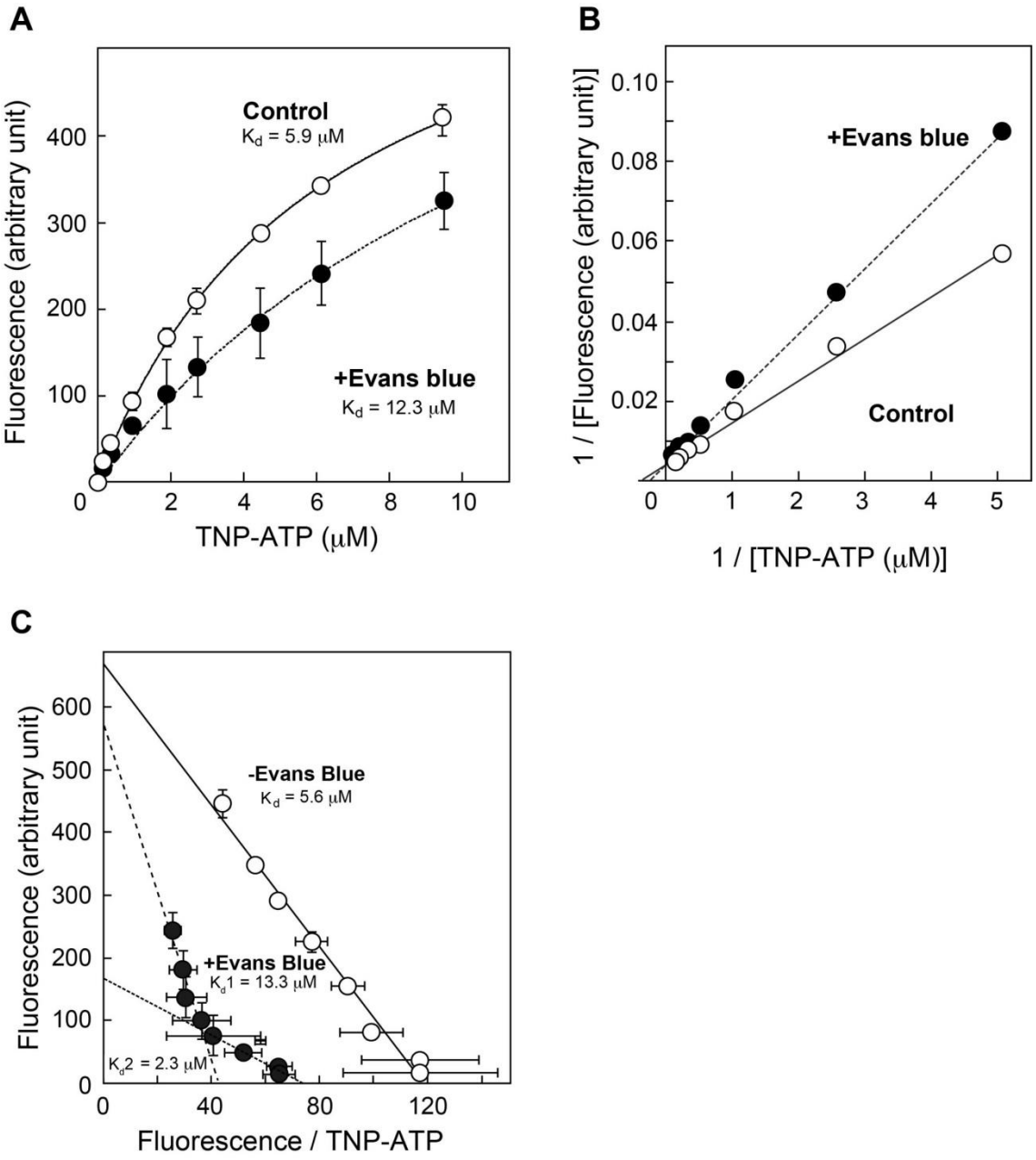


図 3-8. エバンズブルーによる TNP-ATP 結合の阻害

図 3-3 と同様に、TNP-ATP の蛍光をエバンズブルー存在下および非存在下で測定した。○、2 μM エバンズブルー非存在下； ●、2 μM エバンズブルー存在下(n = 3)。

(A) TNP-ATP の蛍光の濃度依存性。曲線は式 1 でフィッティングしたものを示した。これにより、算出した解離定数を示した。

(B) 二重逆数プロット。

(C) Eadie-Hofstee プロット。図中の解離定数は直線の傾きから算出した。

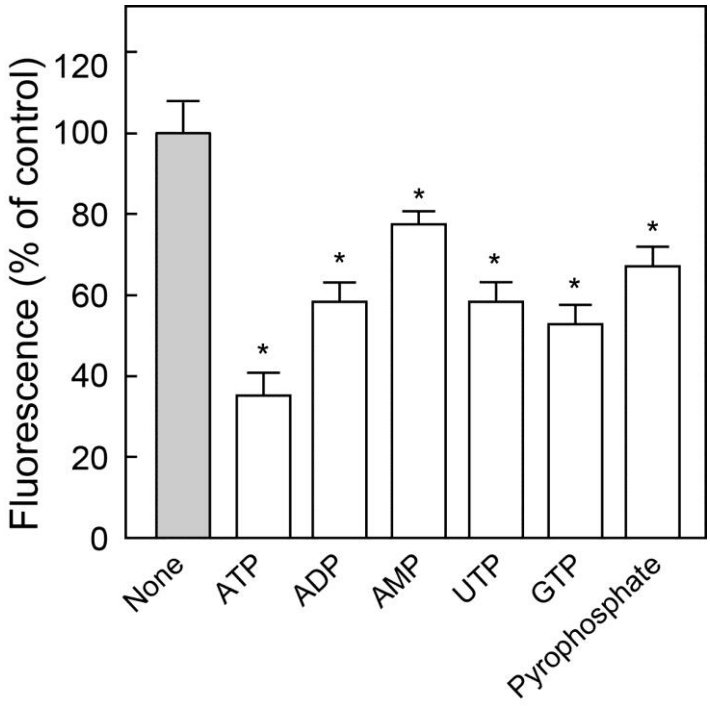


図 3-9. TNP-ATP 結合に対する各種ヌクレオチド、ピロリン酸の効果

図 3-3 と同様に、TNP-ATP の蛍光を 10 mM の各種リガンド存在下で測定し、リガンド非存在下のものに対する相対値で示した(n = 3)。（＊, p<0.001）

用いて得られた解離定数は 2 相性を示し、直線の傾きから算出した解離定数は 2.3 μM と 13.3 μM であった(**図 3-8C**)。低親和性の結合部位はエバンズブルーに対して競合的であった。2 相性を示した理由は不明である。

TNP-ATP が VNUT の基質結合部位に結合しているかを検討するために、TNP-ATP 結合のヌクレオチド特異性を検討した(**図 3-9**)。10 mM の各種ヌクレオチドおよびピロリン酸はいずれも TNP-ATP の結合を阻害した。阻害の強さは、ATP > ADP > AMP の順番であり、ピロリン酸も結合を阻害したことから、ヌクレオチドのピロリン酸基が結合に重要であることが示された。一方、UTP や GTP による阻害は ATP による阻害より弱く、アデニンリングも認識に関わっていることを示唆している。この結果は再構成系実験から得られた VNUT の基質特異性とよく似ている(Sawada *et al*. 2008)。これらの結果は、TNP-ATP が VNUT の基質結合部位に結合していることを示唆している。

第2節　TNP-ATP の VNUT への結合に対する塩化物イオンとケト酸の効果

制御因子である塩化物イオンがどのように VNUT を活性化しているか、そのメカニズムは不明なまである。本節では、ATP 輸送の部分反応である ATP 結合過程に対する塩化物イオンとケト酸の効果を解析した。塩化物イオン存在下と非存在下で TNP-ATP の結合を測定したところ、塩化物イオンが非存在下でも TNP-ATP を結合した(**図 3-10**)。解離定数はいずれも 4.8 μM であった。このことは、ATP の結合に塩化物イオンが必要ではないことを示している。さらに、ケト酸であるアセト酢酸、ピルビン酸の TNP-ATP の結合に対する効果を検討した(**図 3-11**)。ピルビン酸は、塩化物イオンの有無にかかわらず、TNP-ATP の結合に大きな影響を与えなかった。

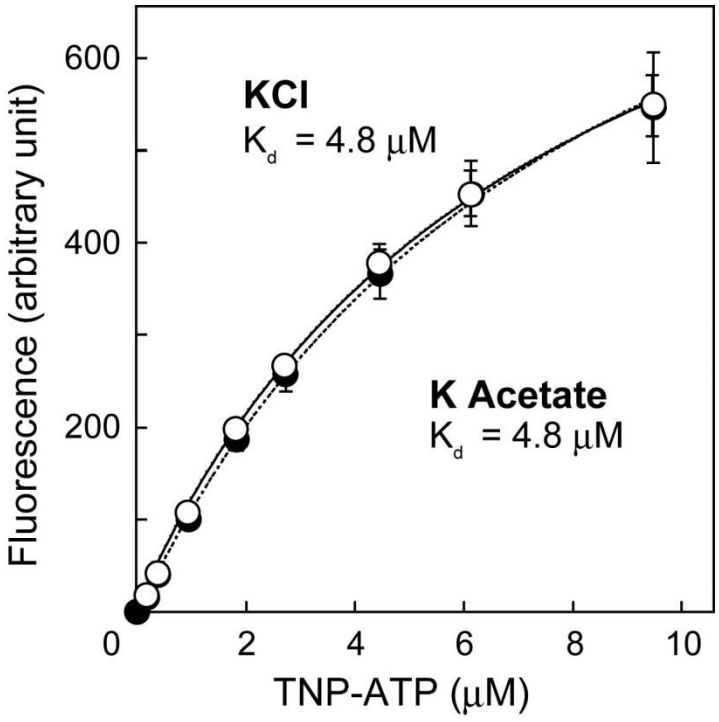


図　3-10.　TNP-ATP 結合に対する塩化物イオンの効果

図 3-3 と同様に、TNP-ATP の蛍光の濃度依存性を KCl 存在下もしくは酢酸カリウム存在下で測定した。式 1 を用いてフィッティングし、解離定数を算出した。

○、100 mM KCl 存在下；　●、100 mM 酢酸カリウム存在下(n = 3)。

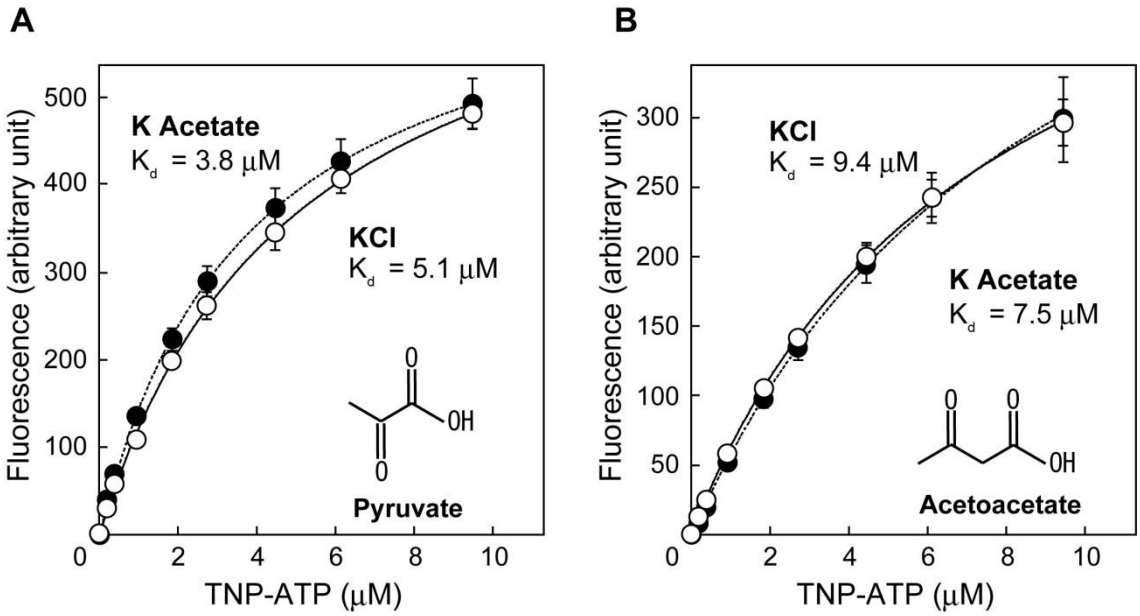


図 3-11. TNP-ATP 結合に対するアセト酢酸とピルビン酸の効果

図 3-3 と同様に、TNP-ATP の蛍光の濃度依存性を KCl 存在下もしくは、酢酸カリウム存在下で測定した。式 1 を用いてフィッティングし、解離定数を算出した。

○、100 mM KCl 存在下； ●、100 mM 酢酸カリウム存在下(n = 3)。

(A) 1 mM ピルビン酸存在下、**(B)** 1 mM アセト酢酸存在下

また、ケトン体でもあるアセト酢酸は、やや親和性を低下させたものの、活性の低下を説明できるような大きな変化は見られなかった。同様に VNUT 特異的阻害剤であるクロドロン酸の効果も検討した**(図 3-12)**。序論で述べたように、クロドロン酸は、塩化物イオンと競合して VNUT を阻害する。クロドロン酸も TNP-ATP の結合に対して影響を与えず、解離定数は塩化物イオン存在下で 5.6 μM、非存在下で 5.8 μM であった。

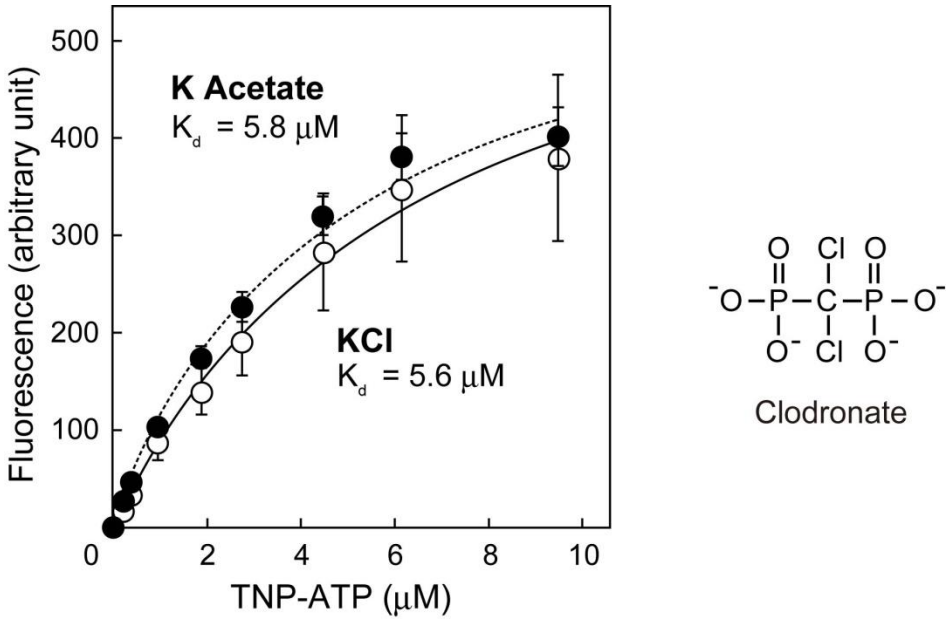


図 3-12　TNP-ATP 結合に対するクロドロン酸の効果

図 3-3 と同様に、TNP-ATP の蛍光の濃度依存性を 1 μM クロドロン酸存在下で測定した。式 1 を用いてフィッティングし、解離定数を算出した。

○、100 mM KCl 存在下； ●、100 mM 酢酸カリウム存在下(n = 3)。

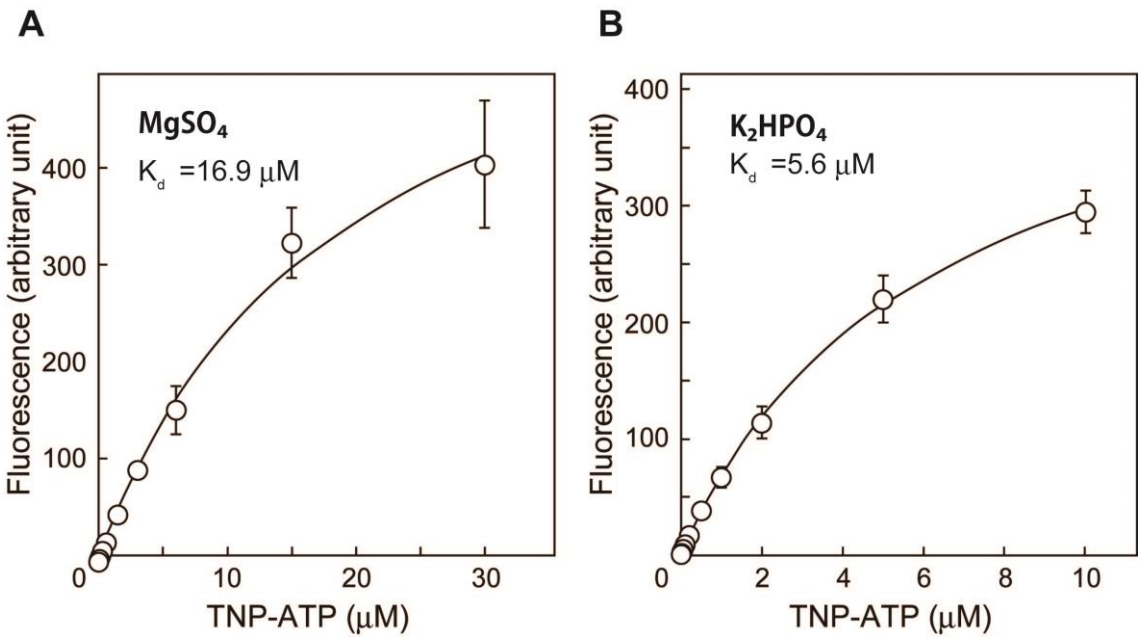


図 3-13　TNP-ATP 結合に対する Mg^{2+} イオンとリン酸の効果

図 3-3 と同様に、TNP-ATP の蛍光の濃度依存性を測定した。式 1 を用いてフィッティングし、解離定数を算出した。

(A) 5 mM $MgSO_4$、100 mM KCl 存在下、**(B)** 5 mM K_2HPO_4、100 mM NaCl 存在下。

表 3-1.　TNP-ATP の結合に対する各種リガンドの効果

VNUT	Condition	K_d (μM)
Wild-type	100 mM KCl	4.8 ± 0.1
Wild-type	100 mM K acetate	4.8 ± 0.1
Wild-type	5 mM $MgSO_4$, 100 mM KCl	16.9 ± 3.0
Wild-type	5 mM K_2HPO_4, 100 mM NaCl	5.6 ± 0.6
Wild-type	1 mM acetoacetate, 100 mM KCl	9.4 ± 0.6
Wild-type	1 mM acetoacetate, 100 mM K acetate	7.5± 0.2
Wild-type	1 μM clodronate, 100 mM KCl	5.6 ± 0.4
Wild-type	1 μM clodronate, 100 mM K acetate	5.8 ±0.8
Wild-type	1 mM pyruvate, 100 mM KCl	5.1 ± 0.2
Wild-type	1 mM pyruvate, 100 mM K acetate	3.8 ±0.1
Wild-type	2 μM Evans Blue, 100 mM KCl	12.3 ±2.3

生体内では、ATP は、Mg^{2+}イオンと結合して複合体を形成している。そこで、TNP-ATP の結合に対する Mg^{2+}イオンの効果を検討した(**図　3-13A**)。その結果、Mg^{2+}イオン存在下では、TNP-ATP の解離定数は、16.9 μM と約 3 倍上昇し、親和性が低下した。また、基質特異性を見た実験(**図 3-9**)から、ピロリン酸が TNP-ATP の結合に影響を与えることが明らかになった。そこで、リン酸の効果について検討した(**図 3-13B**)。リン酸存在下での解離定数は 5.6 μM と非存在下と変化せず、TNP-ATP の結合に影響を与えなかった。

以上の結果は表 3-1 にまとめた。

ビオチン-11-ATP による光化学修飾

TNP-ATP を用いた実験から、塩化物イオン非存在下でもヌクレオチドを結合できることが示された。これをさらに確かめるために、ビオチン化 ATP を用いた化学修飾実験で解析した。ビオチン-11-ATP は、ATP のアデニンにリンカーを介してビオチンが結合している ATP アナログである(**図 3-14**)。Katoらにより VNUT のヌクレオチド結合に対するクロドロン酸の影響を評価するために用いられている(Kato *et al.* 2017)。0.02%(w/v)の DDTM 存在下でビオチン-11-ATP と VNUT を混和し UV 照射すると、VNUT のビオチン化が見られた(**図 3-14**)。このビオチン化は、UV 照射を行なわない条件下では見られなかった。ビオチン-11-ATP が ATP 結合部位に結合しているとすると、ATP によってビオチン化は阻害されるはずである。実際、このビオチン化は、5 mM の ATP もしくは、10 μM の TNP-ATP で、それぞれ 68%, 66%に低下した。VNUT の ATP に対する K_d が 5.8 mM、TNP-ATP に対する K_d が 4.8 μM であること、非可逆的な化学修飾であり標識が強く出ることを考えると、この標識阻害値は、妥当な値だと考えられる。KCl の代わりに酢酸カリウムを加えた塩化物イオン非存在下の条件でも、VNUT はビオチン化され、塩化物イオンがビオチン-11-ATP の結合に必要ではないことを示している。興味深いことに、このビオチン化は、20 mM のピルビン酸存在下では、コントロールの 1.7 倍と強く促進された(**図 3-14**)。このような促進は、F_oF_1-ATPase を用いた標識実験では見られなかったことから、VNUT 特異的な現象であると推定される(**図 3-15**)。また、F_oF_1-ATPase では、ATP 結合サブユニットであるβサブユニットのみが標識され、ATP 非結合部位であるαサブユニット(分子量 55 kDa)は、標識されなかった。このことは、ビオチン-11-ATP による非特異的なタンパク質標識がないことを示している。

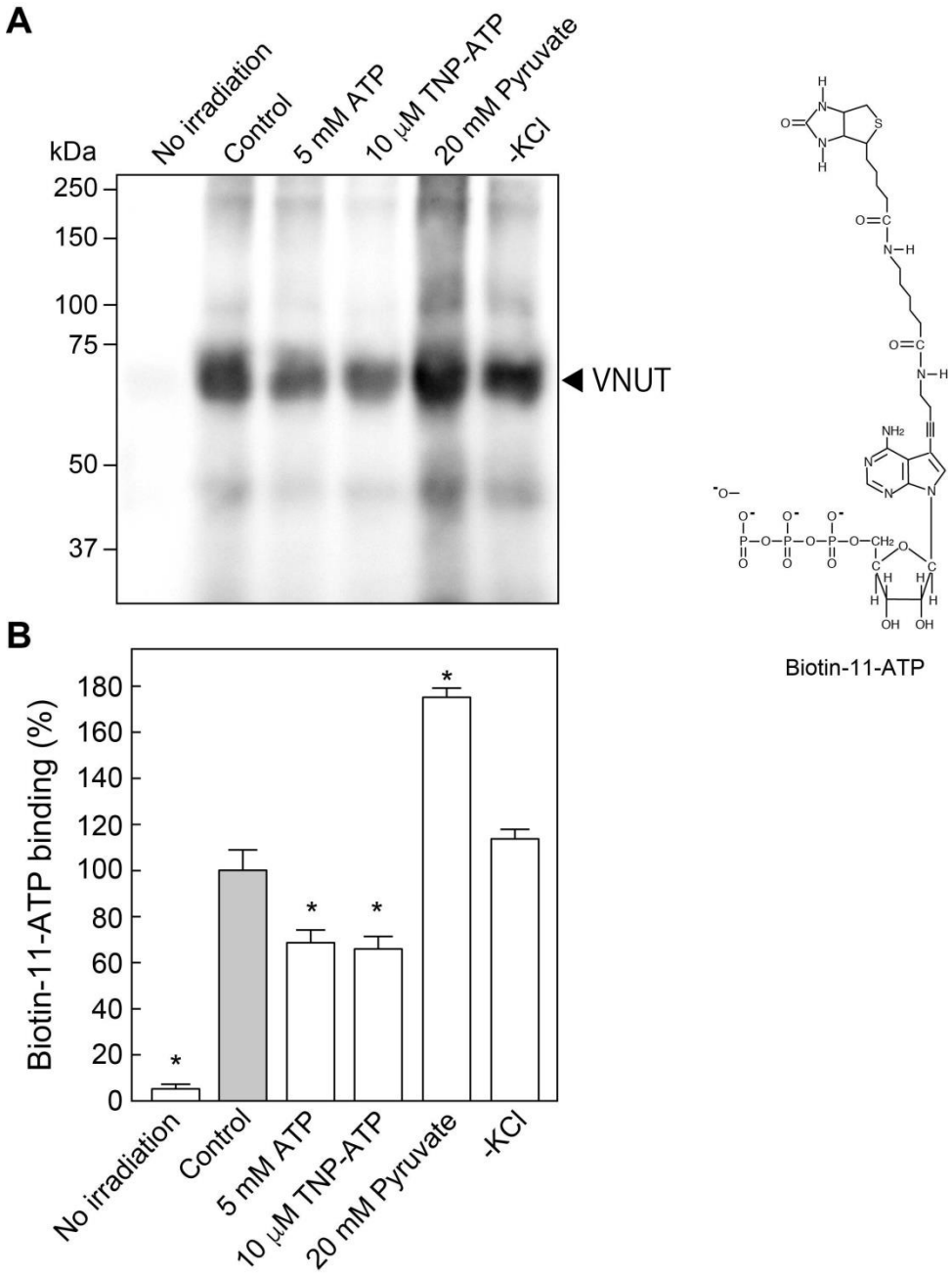


図 3-14　ビオチン-11-ATP による VNUT の標識

(A) 0.02%の DDTM 存在下で VNUT と 10 μM のビオチン-11-ATP を混和し、トランスイルミネーターで UV 照射した。UV 照射後、SDS 電気泳動によってサンプルを分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ストレプトアビジン-HRP 処理後、ビオチン化タンパク質を ECL kit で検出した。ImageQuant LAS-4000 カメラでイメージを撮影した。

(B) 取り込んだ画像を定量化し、コントロールに対する相対値で示した(n = 3)。

(*, p<0.001)

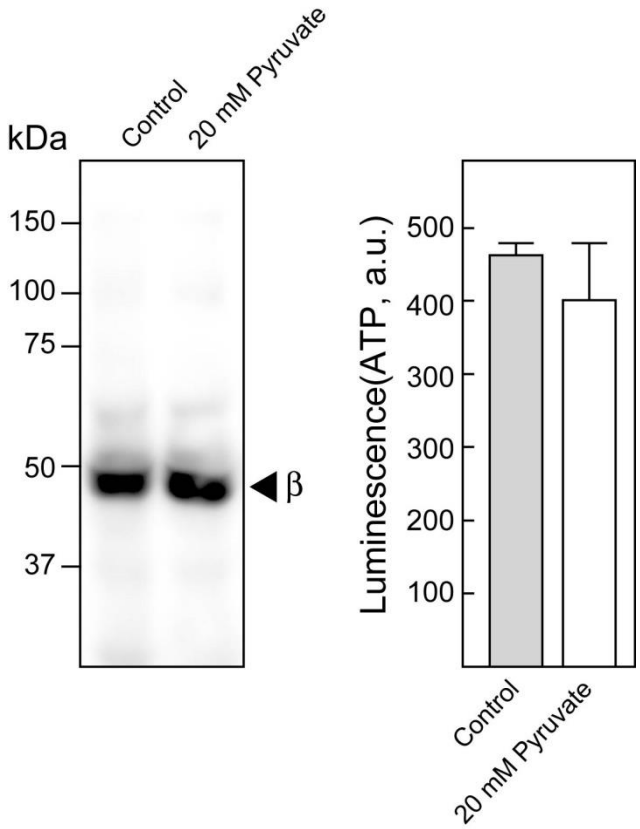


図 3-15 ビオチン-11-ATP による F_oF_1-ATPase の標識

1%(w/v)の OG 存在下で精製 FoF_1-ATPase と 10 μM のビオチン-11-ATP を混和し、トランスイルミネーターで UV 照射した。その後、図 3-14 と同様に解析した(n = 3)。

第3節　必須 Arg 残基のヌクレオチド結合における役割

第 4 膜貫通領域の Arg119 残基は SLC17 ファミリー全体に保存されている必須残基であり、変異導入によって輸送活性を失うが、その詳細な機能は不明である。そこで、この残基がヌクレオチド結合に対して与える役割を明らかにするために R119A 変異型 VNUT を用いて、TNP-ATP の結合を解析した**(図 3-16)**。その結果、変異型 VNUT は、野生型 VNUT に比べ、TNP-ATP を結合することができたが、その解離定数は 5.7 – 8.1 μM とやや高い値を示した。しかし、輸送活性の喪失を説明するものでは無かった。さらに、変異型 VNUT への TNP-ATP の

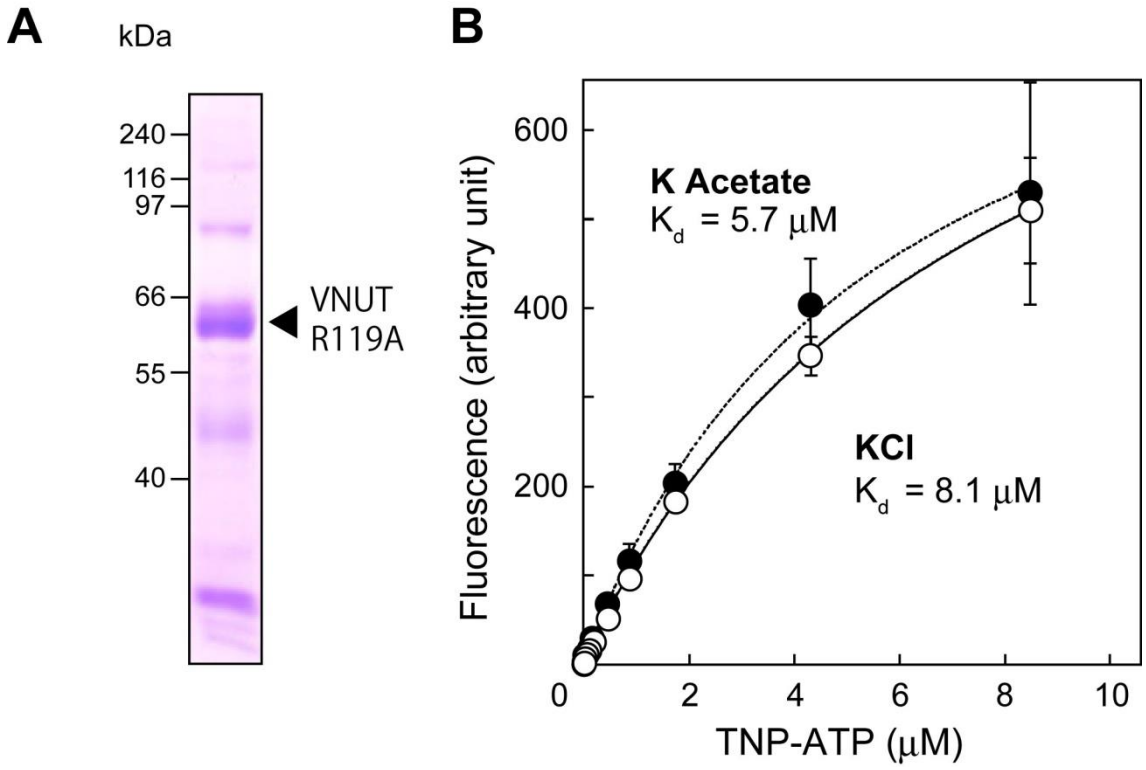


図　3-16　Arg119→Ala 変異型 VNUT への TNP-ATP の結合

(A) R119A VNUT の精製。精製した R119A VNUT を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色した。

(B) 図 3-3 と同様に R119A VNUT を用いて TNP-ATP 蛍光の濃度依存性を測定した。○、100 mM KCl 存在下； ●、100 mM 酢酸カリウム存在下(n = 3)。

結合が VNUT の ATP 結合部位であるか確かめるために、ATP との競合実験を行なった(**図 3-17**)。その結果、10 mM の ATP によって TNP-ATP の解離定数は 7.6 μM から 15.1 μM へと約 2 倍上昇した。2 重逆数プロットおよび Eadie-Hofstee プロットから、TNP-ATP の結合は、ATP に対して競合的であった。R119A VNUT に対する ATP の解離定数を求めるために ATP 濃度を変化させて TNP-ATP の蛍光強度の変化を測定した(**図 3-18**)。ATP に対する解離定数を競合阻害モデルに基づいて計算すると、12.3 mM となり、野生型の 5.8 mM に対して約 2 倍高い値となった。Henderson プロットは直線性を示し、測定した範囲内で異なる K_d 値を持つ ATP 結合部位は見られなかった。

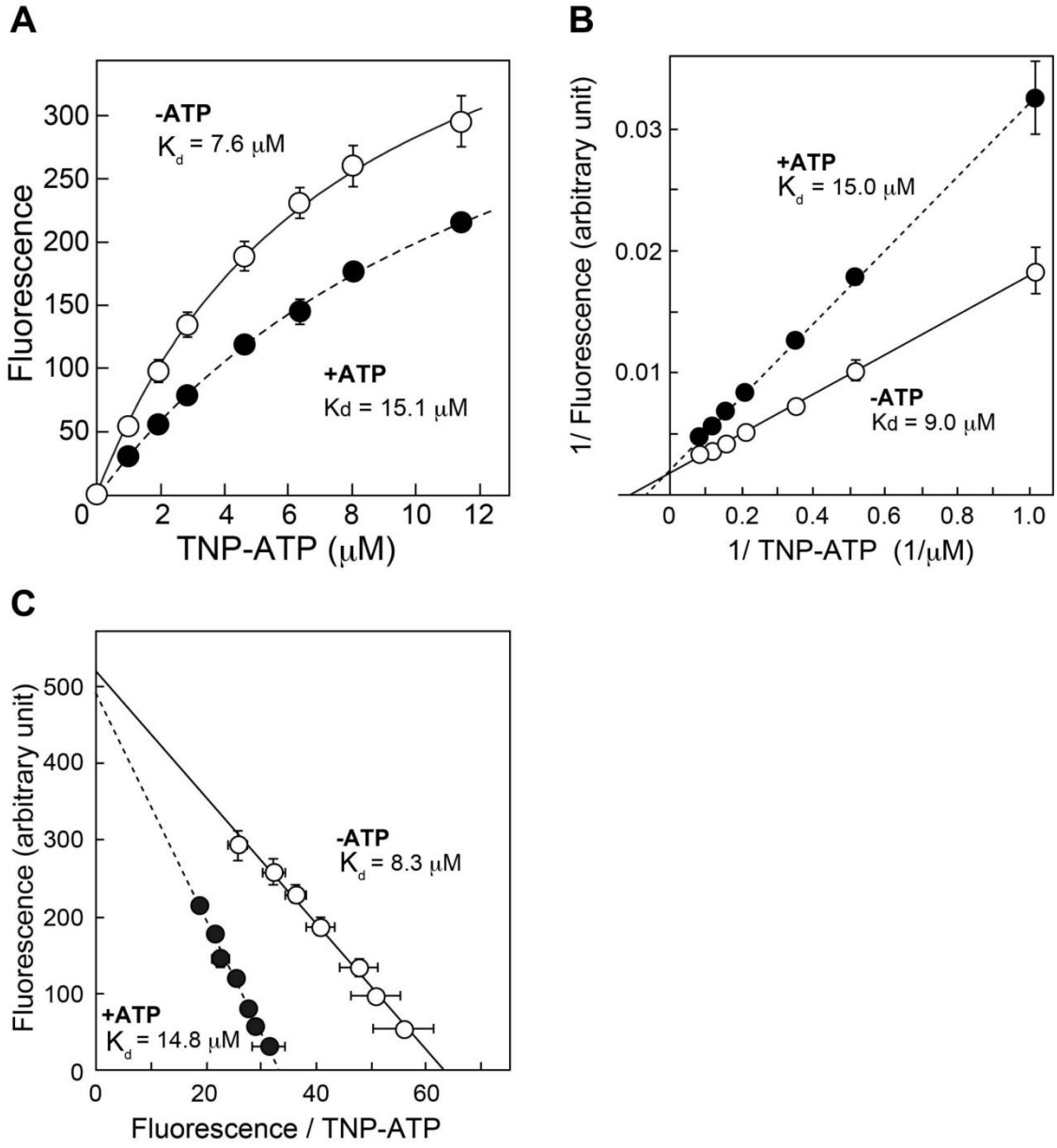


図 3-17　R119A VNUT への TNP-ATP の結合に対する ATP の効果

(A) 図3-3と同様にR119A VNUTを用いてTNP-ATP蛍光の濃度依存性を10 mMのATP存在下および非存在下で測定した。100 mM KClを含む反応液を用いた。図中の曲線および解離定数は式1に基づいてフィッティングによって得られたものを示した。

(B) 2重逆数プロット。図中の解離定数は直線の傾きから算出した。

(C) Eadie-Hofstee プロット。図中の解離定数は直線の傾きから算出した。

○、10 mM ATP 非存在下； ●、10 mM ATP 存在下(n = 3)。

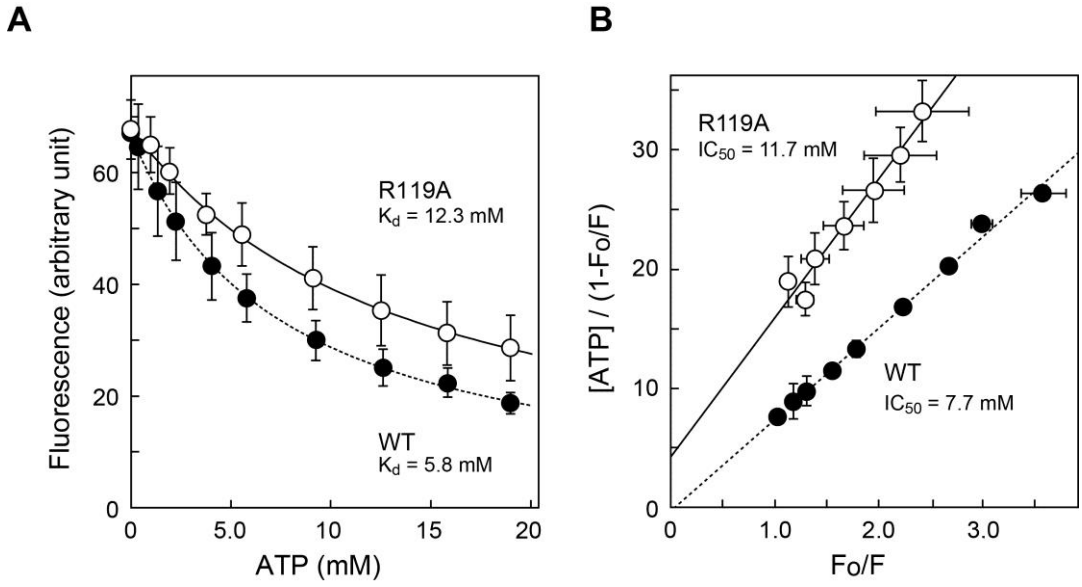


図 3-18　R119A VNUT への TNP-ATP の結合に対する ATP の親和性

(A) 図 3-7 と同様に R119A VNUT を用いて TNP-ATP 蛍光の ATP 濃度依存性を KCl 存在下で測定した。黒丸は、図 3-7 野生型のものである。図中の曲線および解離定数は式 2 に基づいてフィッティングによって得られたものを示した。

(B) Henderson プロット。図中の定数は直線の傾きから算出した。

○、R119A 変異型 VNUT； ●、野生型 VNUT(n = 3)。

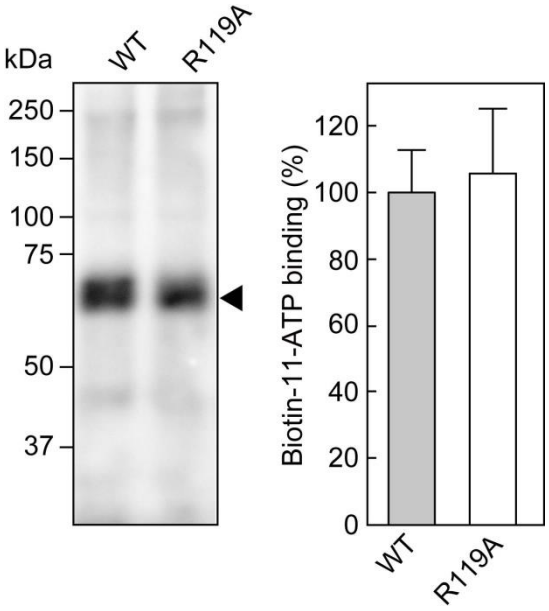


図 3-19　R119A VNUT へのビオチン-11-ATP の結合

図 3-14 と同様に R119A VNUT を用いてビオチン-11-ATP の R119A VNUT への結合を解析した。その後、図 3-14 と同様に解析した(n = 3)。

さらに、R119A 変異型 VNUT が ATP を結合できるか確認するために、ビオチン-11-ATP を用いて標識実験を行なった(**図 3-19**)。予期した通り、R119A VNUT は野生型と同様にビオチン-11-ATP で標識された。このことは R119A 変異型 VNUT が ATP を結合できることを示している。R119A 変異は ATP 輸送活性を失うが、それは ATP 結合能を失うためではないことを示唆している。

第4章

考察

VGLUT や VNUT を含む SLC17 ファミリーは、化学伝達や薬物排出など、生体機能を維持するために必須な役割を果たしている。塩化物イオンとケト酸は、これらのトランスポーターの活性制御を通して、グルタミン酸やヌクレオチドを用いた化学伝達をコントロールしている。したがって、このしくみを明らかにすることは、これらのトランスポーターの分子メカニズムを知るだけでなく、化学伝達の制御機構の解明につながる重要な課題である。しかし、塩化物イオン非存在下では活性がないため、輸送に果たす役割の解析は困難であった。本研究では、活性制御の仕組みを理解するためには輸送の素過程に対する塩化物イオンの効果を明らかにしていくことが重要と考え、素過程の一つである基質結合過程に着目した。VGLUT は、基質特異性が高く基質アナログを認識しないため、幅広い基質を認識する VNUT をターゲットとして ATP アナログを用いて解析した。その結果、塩化物イオンも必須 Arg 残基も ATP 結合に必要でないことが明らかになった。

TNP-ATP は、高親和性 ATP プローブとして、様々な ATP 結合タンパク質の解析に用いられてきた(Bishop *et al.* 1987、Weber *et al.* 1996、 Liu *et al.* 1997、 Stewart *et al.* 1998)。TNP-ATP は、ATP より 100 倍～1,000 倍親和性が高く、ATPase によってゆっくりと加水分解される(Weber 1996)。また、タンパク質と結合することで蛍光が増大される分子である。本研究で TNP-ATP を用いて解析したところ、VNUT の添加によって TNP-ATP の蛍光は、約 2.6 倍増大した。これらの TNP-ATP による蛍光の増大が、VNUT のような ATP 結合タンパク質を用いた解析で報告があるものの、タンパク質の種類によって大きく異なっていた。そのため、VNUT に特異的に反応しているか、また ATP や阻害剤であるエバンスブルーを用いて解析する必要があった。VNUT への特異性を確かめるために、同じファミリーに属する VGLUT でも同様に解析したが、このような蛍光の大きな変化は見られなかったことから、TNP-ATP の結合は、VNUT に特異的である。また、VNUT の基質結合部位へ TNP-ATP が結合しているかを解析するために ATP 存在下及び非存在下での蛍光変化を解析した。このような VNUT に対する TNP-ATP の蛍光の増大は、濃度依存的で、二重逆数プロットをとったところ直線性を示し、単一の解離定数が得られた。また、この結合は、ATP によって阻害され、その様式は競合阻害であった。このことは、TNP-ATP が単一の解離定数をもって、ATP 結合サイトへ結合していることを示唆している。TNP-ATP の結合は、ATP の他に ADP や GTP、UTP など各種のヌクレオチドで阻害され、その阻害のパターンは報告されている VNUT の基質特異性とよく似ていた (Sawada *et al.* 2008)。また、SLC17 ファミリーの共通の阻害剤であるエバンズブルーでも見かけの親和性が低下した。エバンズブルーは、基質と拮抗して阻害作用を示す化合物として知られている(Roseth *et al.* 1995)。したがって、エバンズブルーは、VNUT の基質結合部位へ結合、もしくは、別の場所に結合し、基質結合部位へ影響を与えているものと考えられる。今回、エバンズブルーは、二相性の阻害様式を示したことについては、探究していないが、基質と競合阻害する化

合物としてこれまでも用いられてきており、それらに加え基質の近傍にも作用している可能性も考えられる。いずれの場合でも、TNP-ATP の結合がエバンズブルーで阻害されたことは、TNP-ATP が VNUT の ATP 結合部位に結合していることを示唆している。競合阻害は、必ずしも同一の結合部位を意味しないが、基質特異性が同様であったこととエバンズブルーで阻害されたことは、TNP-ATP が VNUT の基質結合部位に結合していることを示唆している。ATP の競合阻害実験から得られた界面活性剤存在下での ATP の解離定数は、6 mM であった。Henderson プロットが直線を示したことから VNUT は、単一の ATP 結合部位を持つものと推定される。一方、TNP-ATP の解離定数は、約 5 μM であり、ATP に対して約 1,000 倍高い親和性を示した。このことは、TNP-ATP が VNUT の高親和性 ATP アナログであることを示している。これに対し、再構成リポソームを用いた輸送活性測定から得られた ATP に対する K_M は、0.6 - 0.8 mM と本研究より約 10 倍小さい値が報告されている(Sawada *et al.* 2008、Miyaji *et al.* 2011)。この違いは、精製再構成系では膜電位により小胞にアニオン性の ATP が引きつけられるのに対し、今回の実験系では膜電位が存在しないからと考えている。その他の可能性として界面活性剤存在の影響も考えられる。

ATP 輸送を制御している塩化物イオンやケト酸を反応系に添加し、TNP-ATP の結合に影響しているかを調べたところ、大きな差は得られなかった。この結果は、塩化物イオンやケト酸は、ATP の結合段階には関与していないことを示唆している。同様の結果が、ビオチン-11-ATP を用いた光化学修飾実験でも再現された。ビオチン-11-ATP による VNUT の光化学修飾も ATP や TNP-ATP で阻害されたことは、この分子が VNUT の ATP 結合部位に結合していることを示唆している。TNP-ATP がリボースの 2', 3'OH 基に蛍光団が結合しているのに対して、ビオチン-11-ATP は、ATP のアデニンリングにリンカーを介してビオチンが結合している ATP アナログである。異なる 2 つのプローブで同様の結果が得られたことは、塩化物イオンが ATP の結合に必要でないこと、ケト酸は ATP 結合過程を阻害しないことを強く示唆している。したがって、塩化物イオンは、ATP 結合のステップ以外の過程で重要な役割をしていると考えられる。また、ビオチン-11-ATP を用いた実験では、ピルビン酸存在下でビオチン-11-ATP の光化学修飾が促進された。このような促進は、F_oF_1-ATPase では見られず、VNUT に特異的な現象と思われる。促進の理由は確かではないが、ピルビン酸によって ATP の親和性が上がったかもしくは、ATP 結合部位の構造が変化し、化学修飾の反応性が上がった可能性がある。

VNUT の基質輸送反応は、次の 4 つのステップからなる(**図 4-1**)。まず①小胞の外側である細胞質側を向いた状態で基質を結合する。次に、②基質を結合した状態の VNUT が小胞の内側を向く。③内向き構造へと変換した後、VNUT は基質を小胞内へと放出する。最後に、④空になった VNUT が外向き構造へと変換され、また元の状態に戻る。このような一連の動きを繰り返して、VNUT はヌクレオチドを小胞内へと輸送している。本研究の成果により、これらのステップのうち、塩化物イオンは基質の結合ステップに関わっていないことが示唆された。したがって、塩化物イオンは基質結合・解離ステップ以外の過程に関わっているものと推定できる。塩化物イオンによる活性化は SLC17 ファミリーに共通する性質であり、ファミリー内で同じ役割を担っているものと考えられている。VGLUT では膜電位駆動型のグルタミン酸輸送活性があり、これには塩化物イオンと必須 Arg 残基が必要である(Juge *et al.* 2006)。また、VGLUT はグルタミン酸輸送活性に加え、Na^+とリン酸の共輸送活性を有する(**図 1-8、4-1**)。興味深いことにこの活性は、塩化物イオンと必須 Arg 残基を必要としない(Juge *et al.* 2006)。この活性では、Na^+とリン酸を輸送したのち、空のトランスポーターが内向きから外向きへ構造変換する。この反応ステップはグルタミン酸輸送と共通であることから、塩化物イオンは、この過程には必要でないものと考えられる(**図 4-1**)。もし、VGLUT と VNUT が同じ輸送機構であるならば、塩化物イオンは、空のトランスポーターの内向き外向き構造変換には関わっていないことになる。塩化物イオンは、ATP の結合ステップに関わっていないので、残るのは ATP を結合した後の外向きから内向きへの構造変換ステップとなる。この過程に塩化物イオンが関わっていると考えている。また、ケトン体やケト酸は、塩化物イオンによる活性化を阻害することから、この過程を制御することで生体内でのグルタミン酸や ATP を用いた情報伝達を制御しているものと考えられる。SLC17 ファミリーにおいての構造的な研究は、いまだ報告されていないが、SLC6A3 である DAT では、三環系抗うつ薬を阻害剤として用いて、基質結合について生化学的研究が報告されている(Boja *et al.* 1992)。これらの阻害様式は、低親和性と高親和性の 2 相性の結合様式を示し、このうち低親和性の結合は、アロステリックな阻害様式を示すことが生化学的手法を用いて解析されている。これらの結果を基に、LeuT(Leucine transporter)を用いた薬物のスクリーニングとその作用機序ならびに結合状態での結晶構造解析が行われた (Neubauer *et al.*2006、singh *et al.* 2007)。これらの経緯から、トランスポーター研究における本研究のような

生化学的な研究では、塩化物イオンや必須 Arg 残基が基質結合後の構造変換に寄与しているのではないかと考察したが、今後この仮説を立証するためにも複数の生化学的な知見や、構造解析的な報告が期待される。

序論で述べたように、塩化物イオンによる VGLUT の制御はシナプス小胞を用いた解析から、活性化フェーズと阻害フェーズの 2 相性を示すことが知られていた(**図 1-11**)(Naito *et al.* 1985)。阻害フェーズについては CLC3 Cl^-チャネルによって塩化物イオンが小胞内に流入し、その結果、膜電位が消失する可能性が考えられたが、CLC3 ノックアウトマウスから単離されたシナプス小胞や精製 VGLUT の再構成系でも同様の結果が得られたことから否定されている(Juge *et al.* 2006、Schenck *et al.* 2009、 Juge *et al.* 2010)。また、Wolosker らはシナプス小胞を用いた生化学的な解析から、塩化物イオンによる阻害メカニズムとしてグルタミン酸結合部位に塩化物イオンが結合することをあげている(Wolosker *et al.* 1996)。しかし、これも精製 VGLUT のみを含むリポソーム再構成系の実験では高濃度の塩化物イオンによる阻害が見られず、同様に、本研究から塩化物イオンによる基質結合の阻害が起きなかった(Juge *et al.* 2010)。したがって、

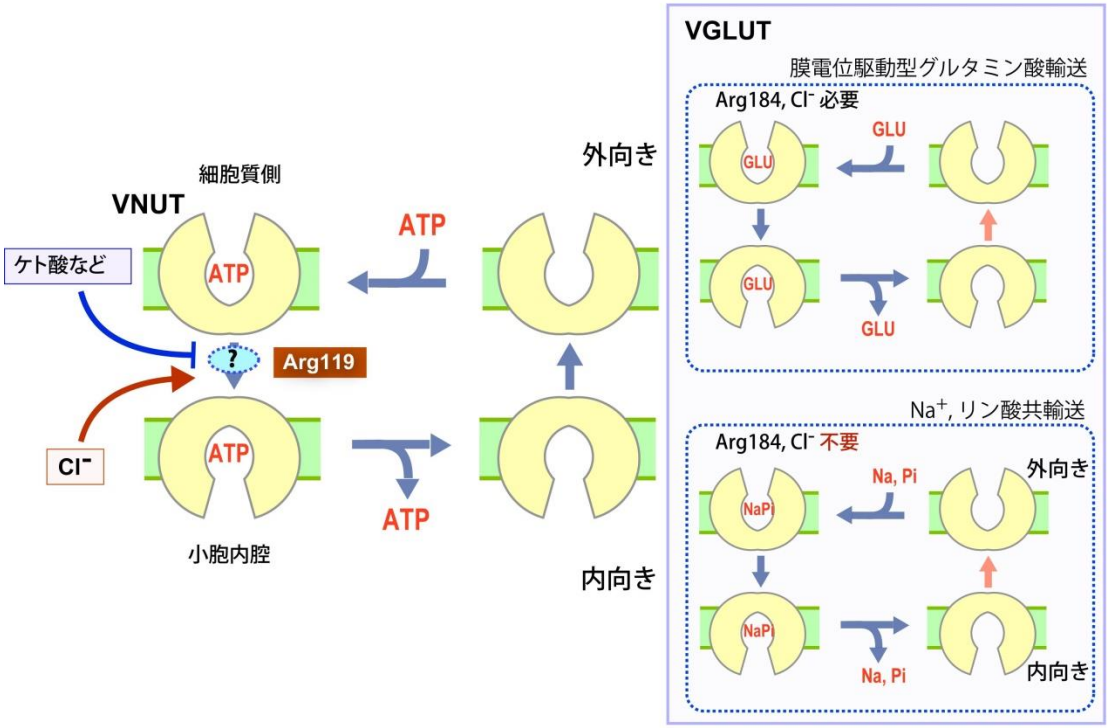


図 4-1 VNUT への ATP 結合に対する塩化物イオンとケト酸及び Arg119 残基の役割

高濃度の塩化物イオンによる阻害では、V-ATPase が形成する膜電位の低下によるものと考えるのが妥当である(**図 1-11**)。これに対し、Schenckらは、VGLUT がグルタミン酸・Cl^- / H^+対抗輸送活性を持っており、低濃度塩化物イオン存在下の活性化フェーズでは、グルタミン酸・Cl^-共輸送により活性化されるとした(Schenck *et al.* 2009)。同様なモデルが Preobraschenski らによって提唱されている(Preobraschenski *et al.* 2014)。しかし、Juge らは、精製 VGLUT のみを含むリポソーム再構成系の実験から、塩化物イオンは、膜電位に影響を与えないこと、塩化物イオンが輸送されないことを示し、塩化物イオンは、VGLUT のアロステリックな活性化因子であることを明らかにした(Juge *et al.* 2010)。本研究から、塩化物イオンは、基質結合後の内向き外向き構造変換をアロステリックに制御している可能性が示唆された。

本研究では、必須 Arg 残基が ATP 結合に果たす役割についても検討した。Arg119 残基は、第 4 膜貫通領域に存在し、全ての SLC17 ファミリーのメンバーに保存されている(**図 1-9**)。一般的に、膜貫通領域の保存性荷電残基は基質結合や輸送に重要な役割を果たしていることが多い。実際、Arg119 を Ala に置換すると活性が消失することから、輸送に必須な残基として働いている。VGLUT の変異導入解析でも同様の結果が報告されており、SLC17 ファミリーに共通する重要な役割を担っているものと思われる。しかし、変異体は、ほとんど活性が無いために Arg119 がどのような機能を持っているかは不明なままであった。本研究から、 R119A 変異型 VNUT が TNP-ATP を結合したことから、この Arg 残基は基質の結合には、重要でないことが示唆された。同様な結果がビオチン-11-ATP を用いた化学標識実験でも得られており、塩化物イオンや Arg119 残基は、基質の結合過程には重要でないことを示唆している。また、VGLUT では、Arg119 に対応する残基である Arg184 を Ala に置換した変異体では、塩化物イオン要求性のグルタミン酸輸送活性を失うのに対し、Na^+/リン酸輸送活性は消失しない。このことは、両活性に共通な空のトランスポーターの内向き外向き構造変換にこの残基が必要でないことを示唆している。したがって塩化物イオンと同様に、VNUT の必須 Arg119 残基も基質を結合した後の外向き構造から内向き構造へ構造変化する際に関与している可能性がある(**図 4-1**)。

塩化物イオンとケト酸による活性制御は生体内においても重要である。ケトン体としても知られるアセト酢酸は、脂質代謝の亢進によって生じ、VGLUT の阻害を通じてんかん発作を抑制する(Bough *et al.* 2007、Juge *et al.* 2010)。同様にVGLUTを阻害するケト酸としてピルビン酸、フェニルピルビン酸、α–ケトイソバレリン酸、α–-ケトイソカプロイン酸、α–ケトメチルバレリン酸があり、これらは、それぞれアラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンのケト酸である。また、ピルビン酸は、糖代謝の中間産物であり、ケトン体は、脂質代謝の中間産物である。したがって、生体内の代謝とグルタミン酸化学伝達、プリン作動性化学伝達が密接につながっていることを示している。先に述べたように、VNUT は、プリン作動性化学伝達の重要な役割を担っており、疼痛、炎症、血液凝固、免疫応答などその生理機能は多岐にわたる(**図1-10**)。これらの生理現象は、プリン作動性化学伝達の制御を通してコントロールすることが可能となる。

近年、クロドロン酸が VNUT 特異的な阻害剤であることが報告された(Kato *et al.* 2017、Moriyama *et al.* 2018)。クロドロン酸は、ビスホスホネート薬に分類されている薬剤であり骨粗しょう症の治療薬である(Bell *et al.* 1997)。クロドロン酸は、VNUT を数 nM で阻害し、VGLUT など他の SLC17トランスポーターの活性を阻害しない。興味深いことに、クロドロン酸は、ケト酸と同様に塩化物イオンと拮抗する形で VNUT を阻害し、神経障害性疼痛や炎症性疼痛を抑制することができる(Kato *et al.* 2017)。このことは、塩化物イオンとケト酸による制御メカニズムがVNUTが関わる疾患の創薬ターゲットとなりうることを示している。今後、VNUTをターゲットとした創薬を推し進めるためには、VNUT の構造や塩化物イオンとケト酸による制御メカニズムの詳細を明らかにしていく必要がある。

第 5 章

総括及び展望

本研究の総括

1) TNP-ATP は、VNUT 特異的に結合する高親和性の蛍光性 ATP アナログであり、ATP やエバンズブルーで競合的阻害を示したことから、VNUT のヌクレオチド結合部位へ結合していることが示唆された。
2) VNUT に対する TNP-ATP の蛍光強度の増大は、精製再構成系を用いた解析から得られる結果を支持する結果であり、ビオチン-11-ATP でも同様の親和性パターンを示した。
3) 基質アナログを用いた解析により、塩化物イオンやケト酸は、基質結合に影響しないことがしめされた。
4) 基質輸送に必須の残基である Arg119 残基は、基質結合に関与していないことがしめされた。

展望

これまで神経化学伝達において重要な役割として、SLC17 ファミリーは、塩化物イオンやケト酸による活性制御メカニズムや基質輸送に必須の残基である必須 Arg 残基の存在が明らかになっていたが詳細は不明であった。本研究において、基質結合ステップには関与していないという結果だが、素過程の一つの過程を否定することが出来た。今後の展望として、考察で述べたように、実際にトランスポーターが基質を結合した後に、内向きから外向き構造へ構造変化する際に、影響を与えているのかを実証しなくてはならない。更なる、変異導入による生化学的方法での解析や、結晶構造解析、SLC17 ファミリー以外での構造解析の結果を参考に分子メカニズムを解明していく必要があると考えている。また、前述したように、SLC17 ファミリーの塩化物イオンによる活性化は、強い正の協同性がありその時の Hill 係数が 3-4 であることから 3 量体以上の複合体を形成していることが示唆されている(Juge *et al.* 2010)。これらを踏まえると塩化物イオンやケト酸、また必須 Arg 残基は、複合体形成に関与している可能性も否定できない。これらのことから塩化物イオンやケト酸、必須 Arg 残基と複合体形成の解析を行う必要性がある。将来的に塩化物イオンやケト酸の制御をコントロールできることが可能になれば、疼痛コントロールや、てんかん発作を抑制したり、臨床分野でも新薬開発のターゲットとして、治療という観点からも大きく社会貢献できる研究であると考えている。

引用文献

1. Aberer, W., Kostron, H., Huber, E. and Winkler, H. (1978) A characterization of the nucleotide uptake of chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem. J.* **172**, 353-360.
2. Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I. and Takeda, J. (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na^+-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J. Neurochem.* **74**, 2622–2625.
3. Aula, N., Salomäki, P., Timonen, R., Verheijen, F., Mancini, G., Månsson, J.E., Aula, P. and Peltonen, L. (2000) The spectrum of SLC17A5-gene mutations resulting in free sialic acid-storage diseases indicates some genotype-phenotype correlation. *Am. J. Hum. Genet*. **67**, 832-840.
4. Bankston, L.A. and Guidotti, G. (1996) Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J. Biol. Chem.* **271**, 17132-17138.
5. Bell, N.H. and Johnson, R.H. (1997) Bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Endocrine* **6**, 203–206.
6. Bellocchio, E.E., Hu, H., Pohorille, A., Chan, J., Pickel, V. M. and Edwards, R. H. (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J. Neurosci.* **18**, 8648–8659.
7. Bishop, J.E., Al-Shawi, M.K. and Inesi, G. (1987) Relationship of the regulatory nucleotide site to the catalytic site of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase. *J. Biol. Chem*. **262**, 4658–4663.
8. Boja JW, McNeill RM, Lewin AH, Abraham P, Carroll FI, Kuhar MJ. (1992) Selective dopamine transporter inhibition by cocaine analogs. *Neuroreport.* **11**, 984-986.

9. Bough, K.J. and Rho, J.M. (2007). Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia* **48**, 43–58.
10. Burnstock, G. (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* **87**, 659–797.
11. Busch, A.E., Schuster, A., Waldegger, S., Wagner, C.A., Zempel, G., Broer, S., Biber, J., Murer, H. and Lang, F. (1996) Expression of a renal type I sodium/phosphate transporter (NaPi-1) induces a conductance in Xenopus oocytes permeable for organic and inorganic anions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5347-5351.
12. Chaudhry, F.A., Boulland, J.L., Jenstad, M/, Bredahl, M.K. and Edwards, R.H. (2008a) Pharmacology of neurotransmitter transport into secretory vesicles. *Handb. Exp. Pharmacol.* **184**, 77-106.
13. Chaudhry, F.A., Edwards, R.H. and Fonnum, F. (2008b) Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. *Annu. Rev. Pharmacl. Toxicol.* **48**, 277-301.
14. Chen, N.H., Reith, M.E. and Quick, M.W. (2004) Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch*. **447**, 519-531.
15. Dehghan, A., Kottgen, A., Yang, Q., Hwang, S.J., Kao, W.L., Rivadeneira, F., Boerwinkle, E., Levy, D., Hofman, A., Astor, B.C., Benjamin, E.J., van Duijn, C.M., Witteman, J.C., Coresh, J. and Fox, CS. (2008) Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *Lancet* **372**, 1953–1961.
16. Eiden, L.E., Schäfer, M.K., Weihe, E. and Schütz, B. (2004) The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch*. **447**, 636-640.

17. El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, A., Fortin, G.M., Descarries, L. and Trudeau, L.E. (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat. Rev. Neurosci*. **12**, 204-216.

18. Erickson, J.D., Eiden, L.E. and Hoffman, B.J. (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10993-10997.

19. Erickson, J.D., Varoqui, H., Schäfer, M.K., Modi, W., Diebler, M.F., Weihe, E., Rand, J., Eiden, L.E., Bonner, T.I. and Usdin, T.B. (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J. Biol. Chem.* **269**, 21929-21932.

20. Fonnum, F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* **42**, 1-11.

21. Fremeau, R.T., Jr., Troyer, M.D., Pahner, I.,Nygaard, G.O., Tran, C.H., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J. and Edwards, R.H. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* **31**, 247–260.

22. Fremeau, R.T., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A. and Edwards, R.H. (2004) Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* **305**, 1815–1819.

23. Gasnier, B. (2004) The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers Arch*. **447**, 756-759.

24. Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotoni- nergic neurons. *J. Neurosci*. **22**, 5442–5451.

25. Gualix, J., Abal, M., Pintor, J., Garcia-Carmona, F. and Miras-Portugal, M.T. (1996) Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *J. Biol. Chem.* **271**, 1957-1965.

26. Grubmeyer C, Penefsky HS. (1981) Cooperatively between catalytic sites in the mechanism of action of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem*. **256**, 3728-3734.
27. Harada, Y., Kato, Y., Miyaji, T., Omote, H., Moriyama, Y. and Hiasa, M. (2018) Vesicular nucleotide transporter mediates ATP release and migration in neutrophils. *J. Biol. Chem.* **293**, 3770-3779.
28. Hayashi, M., Otsuka, M., Morimoto, R., Hirota, S., Yatsushiro, S., Takeda, J., Yamamoto, A. and Moriyama, Y. (2001) Differentiation-associated Na^+-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. *J. Biol. Chem.* **276**, 43400–43406.
29. Henderson, P.J.F. (1972) A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem. J.* **127**, 321–333.
30. Herman, M. and Jahr C.E. (2007) Extracellular Glutamate Concentration in Hippocampal Slice. *J. Neurosci*. **27**, 9736–9741.
31. Herzog, E., Bellenchi, G.C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J. Neurosci.* **21**, RC181.
32. Hiasa, M., Togawa, N. and Moriyama, Y. (2014a) Vesicular nucleotide transport: a brief history and the vesicular nucleotide transporter as a target for drug development. *Curr. Pharm. Des*. **20**, 2745-2749.
33. Hiasa, M., Togawa, N., Miyaji, T., Omote, H., Yamamoto, A. and Moriyama, Y. (2014b) Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol. Rep.* **2**, e12034.
34. Hiasa, M., Miyaji, T., Haruna, Y., Takeuchi, T., Harada, Y., Moriyama, S., Yamamoto, A., Omote, H. and Moriyama, Y. (2014c) Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Sci. Rep*. **4**, 6836.

35. Hnasko, T.S. and Edwards, R.H. (2012) Neurotransmitter corelease: mechanism and physiological role. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 225-243.

36. 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^--dependent urate exporter. *J. Biol. Chem.* **285**, 26107-26113.

37. Johnson, R.G. Jr. (1987) Proton pumps and chemiosmotic coupling as a generalized mechanism for neurotransmitter and hormone transport. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **493**, 162-177.

38. Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H. and Moriyama, Y. (2006) Vesicular glutamate transporter contains two Independent transport machineries. *J. Biol. Chem.* **281**, 39499–39506.

39. Juge, N., Muroyama, A., Hiasa, M., Omote, H. and Moriyama, Y. (2009) Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl^-/γ-aminobutyrate co-transporter. *J. Biol. Chem.* **284**, 35073-25078.

40. 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.

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

42. Jutabha, P., Kanai, Y., Hosoyamada, M., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Iribe, Y., Babu, E., Kim, J.Y., Anzai, N., Chatsudthipong, V. and Endou, H. (2003) Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule. *J. Biol. Chem.* **278**, 27930-27938.

43. Kanai, Y. and Hediger, M.A. (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch*. **447**, 469-479.

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

45. Kato, Y., Hiasa, M., Ichikawa, R., Hasuzawa, N., Kadowaki, A., Iwatsuki, K., Shima, K.,

Endo, Y., Kitahara, Y., Inoue, T., Nomura, M., Omote, H., Moriyama, Y. and Miyaji, T. (2017) Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* pii: 201704847.

46. Knoth, J., Zallakian, M. and Njus, D. (1981) Stoichiometry of H^+-linked dopamine transport in chromaffin granule ghosts. *Biochemistry* **20**, 6625-6629.
47. Kormer ZS, Kozlov IA, Milgrom YM, Novikova IYu. (1982) Using 2'(3')-O-trinitrophenyl derivatives of adenine nucleotides to study the structure and mechanism of functioning of soluble mitochondrial ATPase. *Eur J Biochem.* **121**, 451-5.
48. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
49. Leviatan, S., Sawada, K., Moriyama, Y. and Nelson, N. (2010) Combinatorial method for overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli. J. Biol. Chem*. **285**, 23548–23556.
50. Liu, R. and Sharom, F.J. (1997) Fluorescence studies on the nucleotide binding domains of the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry* **36**, 2836–2843.
51. Masuda, T., Ozono, Y., Mikuriya, S., Kohro, Y., Tozaki-Saitoh, H., Iwatsuki, K., Uneyama, H., Ichikawa, R., Salter, M.W., Tsuda, M. and Inoue, K. (2016) Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat. Commun.* **7**, 12529.
52. Miyaji, T., Echigo, N., Hiasa, M., Senoh, S., Omote, H. and Moriyama, Y. (2008) Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11720-11724.
53. Miyaji, T., Omote, H. and Moriyama, Y. (2011a) Functional characterization of vesicular excitatory amino acid transport by human sialin. *J. Neurochem.* **119**, 1-5.
54. Miyaji, T., Sawada, K., Omote, H. and Moriyama, Y. (2011b) Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *J. Biol. Chem.* **286**, 42881–42887.

55. Miyaji, T., Kawasaki, T., Togawa, N., Omote, H. and Moriyama, Y. (2013) Type 1 sodium-dependent phosphate transporter acts as a membrane potential-driven urate exporter. *Curr. Mol. Pharmacol.* **6**, 88-94.

56. Moechars, D., Weston, M. C., Leo, S., Callaerts-Vegh, Z., Goris, I., Daneels, G., Buist, A., Cik, M., van der Spek, P., Kass, S., Meert, T., D'Hooge, R., Rosenmund, C. and Hampson, R. M. (2006) Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J. Neurosci.* **26**, 12055–12066.

57. Moczydlowski EG, Fortes PA. (1981a) Inhibition of sodium and potassium adenosine triphosphatase by 2',3'-O-(2,4,6-trinitrocyclohexadienylidene) adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **256**, 2357-66.

58. Moczydlowski EG, Fortes PA. (1981b) Characterization of 2',3'-O-(2,4,6-trinitrocyclohexadienylidine)adenosine 5'-triphosphate as a fluorescent probe of the ATP site of sodium and potassium transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem*. **256**, 2346-56.

59. Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M. and Futai, M. (1991) One-step purification of Escherichia coli H^+-ATPase (F_oF_1) and its reconstitution into liposomes with neurotransmitter transporters. *J. Biol. Chem.* **266**, 22141-22146.

60. Moriyama, Y. and Yamamoto, A. (2004) Glutamatergic chemical transmission: look! Here, there, and anywhere. *J. Biochem.* **135**, 155-163.

61. Moriyama, Y., Hiasa, M., Sakamoto, S., Omote, H. and Nomura, M. (2017) Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signal*. **13**, 387–404.

62. Moriyama, Y. and Nomura, M. (2018) Clodronate: a vesicular ATP release blocker. *Trends Pharmacol. Sci.* **39**, 13–23.

63. Naito, S. and Ueda, T. (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* **44**, 99–109.

64. Neubauer HA, Hansen CG, Wiborg O. (2006) Dissection of an allosteric mechanism on the

serotonin transporter: a cross-species study. *Mol Pharmacol*. **4**, 1242-1250.

65. Omote, H., Miyaji, T., Juge, N. and Moriyama, Y. (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry* **50**, 5558–5565.
66. Omote, H. and Moriyama, Y. (2013) Vesicular neurotransmitter transporters: an approach for studying transporters with purified proteins. *Physiology (Bethesda)* **28**, 39–50.
67. Omote, H., Miyaji, T., Hiasa, M., Juge, N. and Moriyama, Y. (2016) Structure, Function, and Drug Interactions of Neurotransmitter Transporters in the Postgenomic Era. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **56**, 385-402.
68. Preobraschenski, J., Zander, J.F., Suzuki, T., Ahnert-Hilger, G. and Jahn, R. (2014) Vesicular glutamate transporters use flexible anion and cation binding sites for efficient accumulation of neurotransmitter. *Neuron* **84**, 1287–12301.
69. Rasband, W.S. (1997-2012) ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/
70. Rees, M.I., Harvey, K., Pearce, B.R., Chung, S.K., Duguid ,I.C., Thomas, P., Beatty, S., Graham, G.E., Armstrong, L., Shiang, R., Abbott, K.J., Zuberi, S.M., Stephenson, J.B., Owen, M.J., Tijssen, M.A., van den Maagdenberg, A.M., Smart, T.G., Supplisson, S. and Harvey, R.J. (2006) Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nat. Genet.* **38**, 801-806.
71. Reimer, R.J. and Edwards, R.H. (2004) Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch*. **447**, 629-635.
72. Reimer, R.J. (2013) SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol. Aspects Med.* **34**, 350-359.
73. Reis, M., Farage, M. and Wolosker, H. (2000) Chloride-dependent inhibition of vesicular glutamate uptake by alpha-keto acids accumulated in maple syrup urine disease. *Biochim. Biophys. Acta*. **1475**, 114-118.
74. Roseth, S., Fyske, E. M. and Fonnum, F. (1995) Uptake of L-glutamate into rat brain

synaptic vesicles: Effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J. Neurochem.* **65**, 96–103.

75. Sakamoto, S., Miyaji, T., Hiasa, M., Ichikawa, R., Uematsu, A., Takayanagi, R., Yamamoto, A., Omote, H., Nomura, M. and Moriyama, Y. (2014) Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Sci. Rep*. **4**, 6689.
76. Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A. and Moriyama, Y. (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5683–5686.
77. Schaffner, W. and Weissmann, C. (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem*. **56**, 502–514.
78. Schenck, S., Wojcik, S.M., Brose, N. and Takamori, S. (2009) A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat. Neurosci*. **12**, 156–162.
79. Seal, R.P., Akil, O., Yi, E., Weber, C. M., Grant, L., Yoo, J., Clause, A., Kandler, K., Noebels, J. L., Glowatzki, E., Lustig, L. R. and Edwards, R. H. (2008) Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron* **57**, 263–275.
80. Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C. J., Basbaum, A.I. and Edwards, R.H. (2009) Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* **462**, 651–655.
81. Shinozaki, Y., Nomura, M., Iwatsuki, K., Moriyama, Y., Gachet, C. and Koizumi, S. (2014) Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Sci. Rep*. **4**, 4329.
82. Singh SK, Yamashita A, Gouaux E. (2007) Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature*. **448,** 952-956.
83. Stewart, R.C., VanBruggen, R., Ellefson, D.D. and Wolfe, A.J. (1998) TNP-ATP and TNP-ADP as probes of the nucleotide binding site of CheA, the histidine protein kinase in

the chemotaxis signal transduction pathway of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 12269–12279.

84. Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C. and Jahn, R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **407**, 189–194.
85. Tanaka, S., Lerner, S.A. and Lin, E.C. (1967) Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J. Bacteriol.* **93**, 642-648.
86. Tavares, R.G., Santos, C.E., Tasca, C.I., Wajner, M., Souza, D.O. and Dutra-Filho, C.S. (2000) Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J. Neurol. Sci.* **181**, 444-449.
87. Togawa, N., Miyaji, T., Izawa, S., Omote, H. and Moriyama, Y. (2012) A Na^+-phosphate cotransporter homologue (SLC17A4 protein) is an intestinal organic anion exporter. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C1652-C1660.
88. Uchino, H., Tamai, I., Yabuuchi, H., China, K., Miyamoto, K., Takeda, E. and Tsuji, A. (2000) Faropenem transport across the renal epithelial luminal membrane via inorganic phosphate transporter Npt1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 574-577.
89. Verheijen, F.W., Verbeek, E., Aula, N., Beerens, C.E., Havelaar, A.C., Joosse, M., Peltonen, L., Aula, P., Galjaard, H., van der Spek, PJ. and Mancini, G.M. (1999) A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat. Genet.* **23**, 462-465.
90. Vining, E.P. (1999) Clinical efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Res*. **37**, 181–190.
91. Watanabe T, Inesi G. (1982) The use of 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate for studies of nucleotide interaction with sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem.* **257**, 11510-6.
92. Weber, J. and Senior, A.E., (1996) Binding and hydrolysis of TNP-ATP by *Escherichia coli*

F_1-ATPase. *J. Biol. Chem.* **271**, 3474–3477.

93. Werner, A., Moore, M.L., Mantei, N., Biber, J., Semenza, G. and Murer, H. (1991) Cloning and expression of cDNA for a Na/Pi cotransport system of kidney cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9608–9612.
94. Wolosker, H., de Souza, D. O. and de Meis, L. (1996) Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J. Biol. Chem*. **271**, 11726–11731.
95. 茂里 康, 島本啓子 (2006) 神経伝達物質アミノ酸トランスポーターの機能, *生物物理* **46**, 10-14.

謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、終始、有益なる御指導、御鞭撻を賜りました当生体膜生化学研究室、表弘志准教授に謹んで感謝いたします。

種々の有益な御指導、ご教授を賜りました本学自然生命科学研究支援センター ゲノム・プロテオーム解析部門 宮地孝明研究教授、同 樹下成信助教、生体膜機能生化学研究室 日浅未来助教に謹んで感謝いたします。

岡山大学における研究活動に、深いご理解とご協力を賜りました現職上司 和歌山県立医科大学附属病院薬剤部 岩城久弥部長をはじめ薬剤部一同に謹んで感謝いたします。

本論文の審査にあたり、御精読、御懇切なる御指導を賜りました岡山大学薬学部環境生物薬学研究室 三好伸一教授、免疫生物学研究室 古田和幸准教授、毒性学研究室 児玉進准教授に深く感謝いたします

ともに実験を進めご協力を頂きました、川嵜達也講師、加藤百合特任助教、松尾俊佑修士、竹内智也博士、原田結加特任助教、河上麻美代修士、釜谷節子学士、板野隼也学士、渡邊健介学士をはじめ、御協力を賜りました研究室員一同に謹んで御礼申し上げます。

不自由無い研究生活を支えて下さった、家族や友人に心から感謝いたします。

最後になりましたが、本研究の遂行にあたり、御懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました恩師、森山芳則教授に謹んで感謝いたします。

2019 年 3 月

岩井 佑磨