

# 構成的手法によるトランスポーター研究の最前線： 化学伝達を制御するイオンスイッチの発見

森山芳則

トランスポーターとは物質の膜透過を司る膜分子である。その活性は物質の二つのコンパートメント間の単位時間と単位当量における輸送量で定義される。構成的手法とは、遺伝子情報を基にして任意のトランスポーターを調製し、リポソームに組み込み活性を測定する操作である。ただの測定法にすぎないが、トランスポーターと対話するよい手段でもある。この方法を用いて明らかにした小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) の性質について述べたい。VGLUT は代謝と化学伝達との間に思いもかけない関係があることを語ってくれた。

## 1. はじめに

『刷り込み』とは、動物の生活史のある時期に、特定の物事がごく短時間で覚え込まれ、それが長時間持続する学習現象の一種である。生まれたばかりのガチョウの雛と目を合わせたばかりに、親と慕われ追いかけられたエピソードはどこかで聞いた話である。同じようなことが研究の世界でも起こるようだ。30年以上前にさかのぼるが、当時、筆者は薬学部の微生物学教室に所属し卒業実験に取り組んでいた。与えられたテーマは『大腸菌メリビオース輸送体の可溶化と再構成』というものであった。細菌の糖トランスポーターを膜より可溶化しリポソームに組み込んで輸送を再構成するという、今ならば何の変哲もない簡単な実験だが、当時はこの方法を確立することが、活性測定法を確立することに他ならず、トランスポーターを精製するための第一歩であると考えられていた (図1)。しかし、界面活性剤にもよいものが少なく、ウエスタンブロット法も開

発されていなかった。何例か成功例が報告されていたが、追試が効かないらしいなどという噂もささやかれていた。トリッキーで、ハイリスク (!)・ハイリターン (?). マニアックな感はあるが、科学に素人の学生が取り組むのには格好のテーマだったと思う。試行錯誤の連続で、なかなか前に進めなかったのだが、振り返るにここで刷り込みが起ったようだ。その後、V-ATPaseとその周辺を研究対象とするようになった<sup>1)</sup>。しかし、いつの間にかトランスポーターに戻っていた<sup>2)</sup>。この間、トランスポーター研究は大きく変わっていた。分子生物学の手法により重要なトランスポーターが次々と同定されていった。現在では、遺伝子破壊や遺伝子導入による生体の機能変化を質量分析計により測定することも当たり前になっている。気がつく、『可溶化と再構成』はどこかに消えてしまっていた。当たり前だろう。トランスポーターの機能を調べる有効な手段ができたのだから。一旦遺伝子が同定されると、その遺伝子を破壊し表現型を調べ、発現部位を特定し、培養細胞に発現させて機能を調べ、お約束の図がきれいに提示され、ハイインパクトのジャーナルに掲載されるようになった。でも何か変なのだ。肝心のタンパク質部分がすっぽり抜けてしまっているようなのだ。トランスポーターの輸送活性が添えられていても、とにかく遺伝子を発現させて、「活性がでてればいいんじゃない」と言わんばかりの強引なものも目につくようになった。しかし、生体エネルギー論 (bioenergetics) や速度論 (kinetics) を無視した強

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体膜機能生化学研究室 (〒799-7530 岡山市津島中1-1-1)

Recent progress on the transporter studies by the constitutive biochemistry: A switch to regulate chemical transmission identified

Yoshinori Moriyama (Department of Membrane Biochemistry, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan)

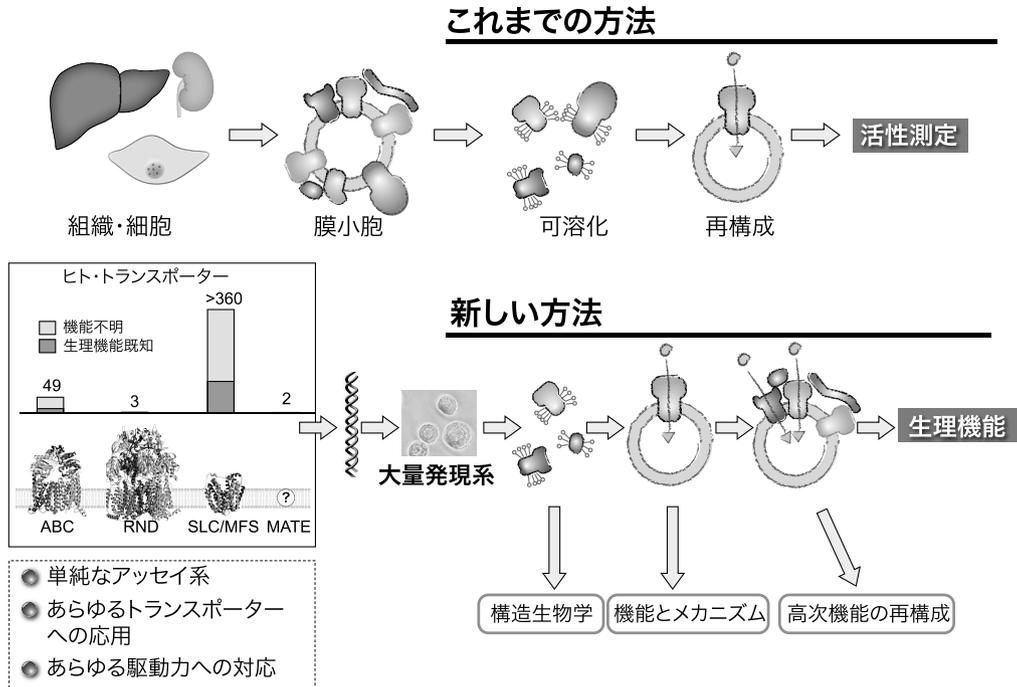


図1 トランスポーターの可溶化・再構成の今昔  
 輸送はベクトル反応であり、トランスポーター機能を測定するためには小胞構造が必要である。可溶化・再構成法はトランスポーター精製の活性測定法として捉えられていた。現在では、任意のトランスポーターのcDNAからタンパク質を発現・精製しリポソームに組み込み、機能を測定することが簡単にできるようになった。

引な結論は、ミスリードにつながるだろう。この抜けた穴を、『精製・再構成』で埋めることはできないだろうか。任意のトランスポーターのcDNAをもとにタンパク質を発現・精製し自在に機能をみるのができたならどんなによいだろう(図1)。こう考えたのが7年ほど前である。最初から大きな成果を期待していたわけではない。しかしながら、完全に定義された要素からなる再構成系から得られる結果には強い論理性と説得力があることがわかってきた。本稿でその顛末を述べたいと思う。

2. VGLUT がすべての始まり

グルタミン酸、アスパラギン酸、セロトニンなどのモノアミン類、ATPなどのヌクレオチド類、GABAやグリシン、アセチルコリンを古典的伝達物質と総称する。神経はこれらの伝達物質をシナプス小胞などの分泌小胞に貯えた後に開口放出し、受容体を介してポスト側の細胞を興奮させる。これが化学伝達であり、我々の精神・生命活動を支える情報伝達系の一つである。小胞型神経伝達物質トランスポーターは分泌小胞に存在し伝達物質の小胞内蓄積を司る能動輸送体である。これまでに古典的伝達物質に対する小胞型トランスポーターはすべて同定された(図2, 表1)<sup>2)</sup>。最も、D-セリンやアスコルビン酸やポリアミン類など、小胞に存在し伝達物質として機能していることが知られているにも関わらず、対応するトランスポーター

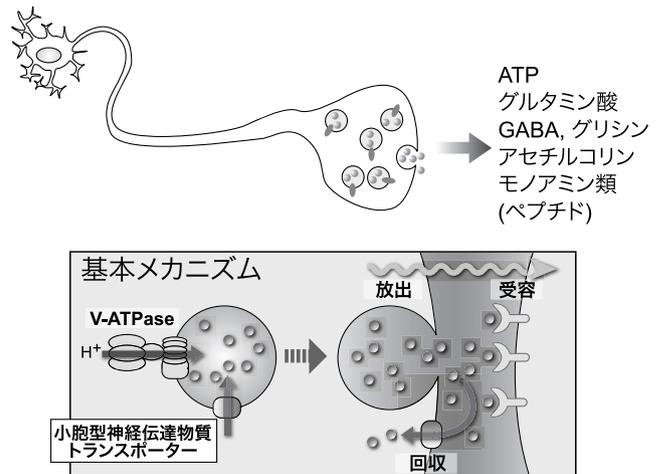


図2 小胞型神経伝達物質トランスポーターと化学伝達

がわかっていないものも幾つか残っている。

VGLUTはシナプス小胞内のグルタミン酸濃度を約100mMに維持する能動輸送体である。SLC17ファミリーに属しており、興奮性化学伝達のミッシングリンクであった<sup>2-5)</sup>。みつかった時は大騒ぎになったものだ。3種のイソ型が存在している。それぞれの遺伝子を破壊したマウスを用いて、グルタミン酸化学伝達の生理的意義について重要な成果が得られている<sup>5-10)</sup>。しかし華々しい成果の一方で、これまでの方法ではVGLUT自体の性質について新しいも

表 1

輸 送 体	遺伝子	発見	駆動力	基 質	Cl <sup>-</sup> の効果
小胞型ヌクレオチド トランスポーター (VNUT)	SLC17A9	2008	膜電位	ATP ADP GTP	アロステリック活性化
小胞型興奮性アミノ酸 トランスポーター (VEAT)	SLC17A5	2008	膜電位	アスパラギン酸 グルタミン酸	アロステリック活性化
小胞型グルタミン酸 トランスポーター (VGLUT)	SLC17A7 SLC17A6 SLC17A8	2000 2001 2002	膜電位	グルタミン酸	アロステリック活性化
小胞型抑制性アミノ酸 トランスポーター (VGAT)	SLC32A1	1997	膜電位	GABA グリシン	輸送基質 (2Cl <sup>-</sup> /1GABA)
小胞型アセチルコリン トランスポーター (VAchT)	SLC18A3	1994	ΔpH	アセチルコリン	効果無し
小胞型モノアミン トランスポーター (VMAT)	SLC18A1 SLC18A2	1992 1992	ΔpH	ヒスタミン セロトニン ドーパミン アドレナリン	効果無し

のは何一つとして得ることはできなかった。我々は自らが同定した VGLUT2 のことをさらに知りたく思い、昆虫細胞で発現し精製し再構成した<sup>11)</sup>。部位特異的変異導入法を組み合わせることにより、活性中心を構成するアミノ酸残基くらいはわかるであろう。方法は以前に記載したものと同じである<sup>12)</sup>。ミソは V-ATPase の代わりに大腸菌の F-ATPase を VGLUT とともにリボソームに組み込んだことである。このリボソームに ATP を添加すると、F-ATPase により膜内外に H<sup>+</sup> (プロトン) の電気化学的ポテンシャル差が形成され、ATP 依存的にグルタミン酸が能動輸送されるはずである。実験を始めて数カ月でシナプス小胞と同じ性質をもったグルタミン酸輸送を再現することができた<sup>11)</sup>。小胞のその百倍の比活性をもち、変異体の活性を数%以下の誤差で定量できることがわかった。これにより得られた成果は大きく二つある。一つは、予想通りグルタミン酸輸送に関わるアミノ酸残基が判明したことである。この結果にもとづき VGLUT によるグルタミン酸輸送モデルをつくった<sup>13)</sup>。もう一つは、活性が Cl<sup>-</sup> にほぼ 100% 依存していることの発見である (図 3)。この活性化機構については後述する。やってみて驚いたことは、その高い再現性と精度であった。この方法はトリッキーでもなんでもない。普通の酵素反応と同じ感覚で輸送活性も取り扱うことができる。これまで敬遠していた課題にも挑戦できる自信がもてた。

### 3. VGAT の奇妙な性質

続いて VGAT を解析した<sup>14)</sup>。VGAT は GABA だけではなくグリシンも輸送すると考えられていたが厳密な証明はなかった<sup>15)</sup>。精製した VGAT を用い、この問題に決着をつけようというわけである。VGLUT と同様 F-ATPase とと

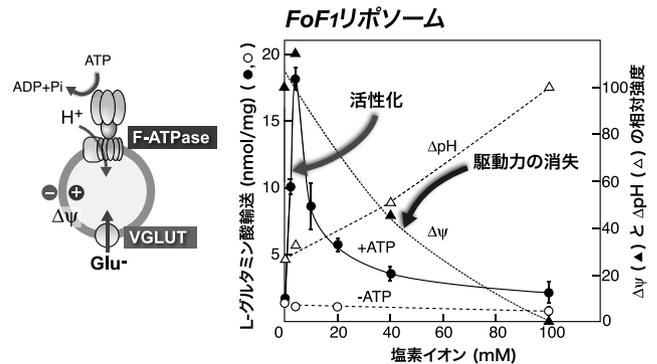


図 3 F-ATPase 含有リボソームでのグルタミン酸輸送における Cl<sup>-</sup> 二相性促進効果

VGLUT と F-ATPase とをリボソーム中に組み込み ATP を添加してグルタミン酸の能動輸送を測定した。Cl<sup>-</sup> がいないときは輸送活性は検出できないが、低濃度の Cl<sup>-</sup> で活性化され、10 mM 以上で阻害されるようになる。高濃度 Cl<sup>-</sup> 条件下での抑制効果と輸送の駆動力 (膜電位差) の減少が相関することに注意。文献 11) 参照。

もに再構成し ATP 添加により GABA とグリシンの輸送を測定した。VGAT がグリシンを輸送することはすぐにわかったのだが、奇妙なことに気がついた。すなわち、これらのアミノ酸の輸送が膜電位差で駆動されることである。GABA やグリシンは中性アミノ酸であり、生理的条件下では荷電していない。何故、こうした無荷電の物質が電気泳動的に移動する (輸送される) のだろうか? これらの輸送は当初考えられてきたような H<sup>+</sup> との逆輸送ではなく、アニオンとの共輸送かカチオンとの逆輸送なのではなかろうか。そこで GABA 輸送における各種塩の効果調べたところ、VGAT は VGLUT2 と同様に Cl<sup>-</sup> で強く活性化されることを見出した<sup>14)</sup>。この結果は VGAT が GABA と Cl<sup>-</sup> の共輸送体であることを示唆している。

この可能性を検証するため、我々は改めて測定系を改良することにした。すなわち、リポソームからF-ATPaseを除きVGATだけの単純なものにした。どうしてわざわざこのようなことをするかといえば、F-ATPaseは膜電位差をpH勾配に変換してしまうので、種々のCl<sup>-</sup>濃度存在下、膜電位差を一定にしつつ輸送活性を測定しづらいからである。断っておくが、この方法は、ATPを添加するだけで長く安定に一定のH<sup>+</sup>の電気化学的ポテンシャル差(膜電位差とpH勾配の和)を維持することができるため、変異体の輸送活性を測定するには適している。目的により一長一短があるということである。さて、VGATだけを含むリポソームを用いてpHジャンプやK<sup>+</sup>存在下でバリノマイシンを添加することによりそれぞれ一定の駆動力を課すると、膜電位差によりGABAとCl<sup>-</sup>が輸送された<sup>14)</sup>(図4)。pH勾配を課しても輸送は起きなかった。グリシンについても同様だった。さらに、213番目のグルタミン酸残基に変異を導入すると両者の輸送が消失した。化学量論を調べると二当量のCl<sup>-</sup>に対し一当量のGABA(あるいはグリシン)が輸送されていた。以上の結果から、VGATはGABA(グリシン)・Cl<sup>-</sup>共輸送体であると結論した<sup>14)</sup>。

この結果は、抑制性化学伝達においてCl<sup>-</sup>はポストシナプス側だけでなくプレ側にも重要であることを示している。VGATによりGABAとともに輸送されたCl<sup>-</sup>はその後小胞内でどうなるのだろうか。小胞内ではGABAは数十mMになっているので計算上はその倍のCl<sup>-</sup>が蓄積しているはずであるが、現実にはそうになっていない。GABA・グリシン作動性神経のシナプス小胞には取り込まれたCl<sup>-</sup>をくみだす仕組みがあるに違いない。

#### 4. SLC17ファミリーの真の姿

VGATの仕事と並行してVGLUTが属するSLC17ファミリーの他のメンバーについて調べた。このファミリーはリン酸トランスポーターファミリーと命名されていた<sup>3)</sup>(図5)。SLC17A1(NPT1)やSLC17A5(VGLUT2)やSLC17A6(VGLUT1)もアフリカツメガエル卵母細胞に発現させるとNa<sup>+</sup>依存性のリン酸輸送活性を示すからである<sup>16-18)</sup>。しかし、この輸送はリン酸に対するK<sub>m</sub>が高すぎ生理的な意味はないと考えられている。A1が馬尿酸を輸送し<sup>19)</sup>、A6、A7、A8(VGLUTs)がグルタミン酸を輸送するわけだから、他のメンバーも何らかのアニオンを輸送しているのであろう。こう推定し、発現場所に関する情報を加味して想像を逞しくし、精製・再構成し、最終的にA9は小胞型ヌクレオチドトランスポーター(vesicular nucleotide transporter, VNUT)<sup>20)</sup>、A5はアスパラギン酸トランスポーター(vesicular excitatory amino acid transporter, VEAT)<sup>21)</sup>、A1とA3は腎臓における尿酸排出トランスポーター<sup>22)</sup>であることを実証した(図5)。いずれのトランスポーターもそれぞれの化学伝達あるいは尿酸排泄機構におけるミッシングリンクであった。これらの研究の経緯については既に他で述べた<sup>2)</sup>。

一連の解析を通じてわかったことがある。VGLUT2だけでなくSLC17に属する全てのメンバーの輸送にはCl<sup>-</sup>が必須であるということである。前述したようにVGATも輸送のためにCl<sup>-</sup>を必要とする。この結果はCl<sup>-</sup>の化学伝達における重要性を示しているが、同時に素朴な疑問を生んだ。VGLUTやVNUTのCl<sup>-</sup>活性化機構はVGATと同じ

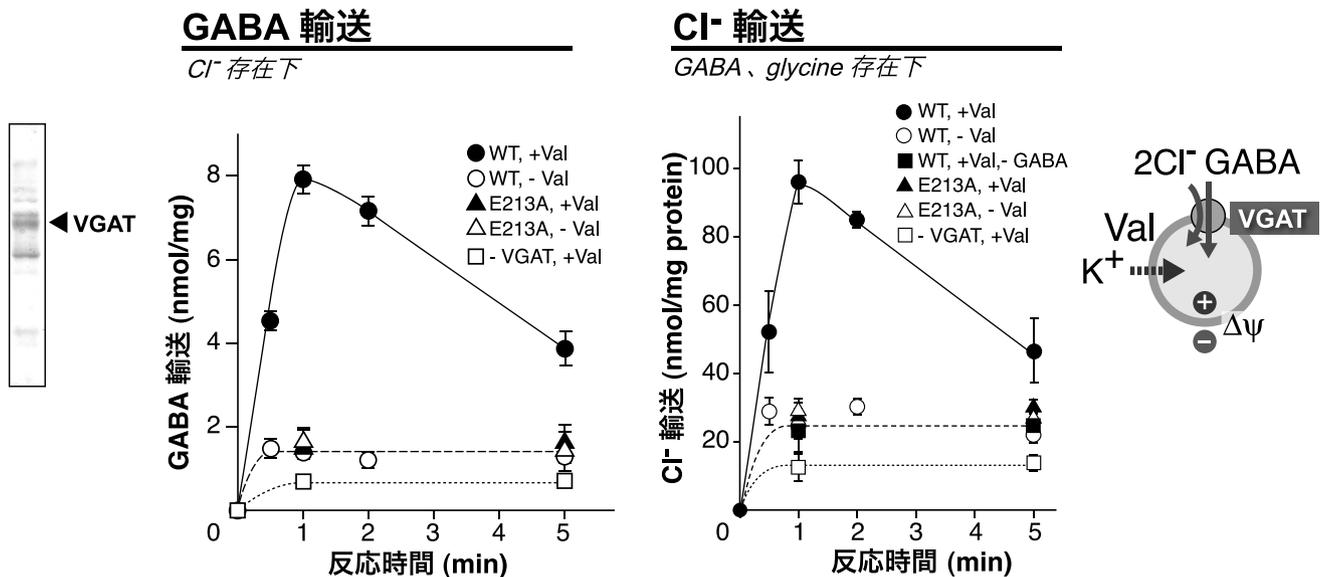


図4 VGATによるGABA/Cl<sup>-</sup>共輸送

昆虫細胞より図1の方法でVGATを精製・再構成し、膜電位依存性のGABAとCl<sup>-</sup>の輸送を測定した。GABA輸送にはCl<sup>-</sup>が必要であり、逆もそうである。文献14)参照。

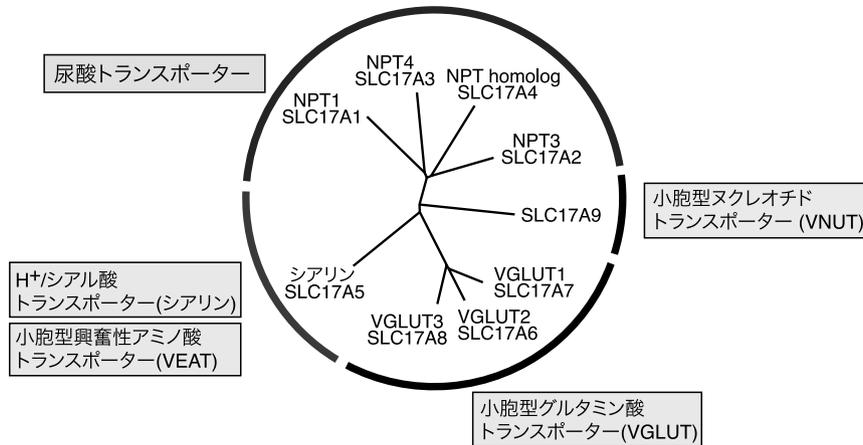


図5 SLC17ファミリーメンバーとその機能

なのだろうか、違うのだろうか？ この疑問が『化学伝達を制御する代謝スイッチ』という新しい概念に結びつくとは、その当時は考えもしなかった。

### 5. 絡まった糸

ここでVGLUTにおける $\text{Cl}^-$ による活性化に関するこれまでの知見を簡単にまとめたい。この現象を初めて見出したのは、ミシガン大学のUeda教授である<sup>23)</sup>。彼は測定液中に数mMの $\text{Cl}^-$ を加えておくと、ATP依存性グルタミン酸輸送活性が数倍に活性化されることに気付いた。この活性化は $\text{Cl}^-$ 濃度を10mM以上にすると逆に抑制に転じた。マックスプランク研究所のJahn教授と我々は、この活性化がアニオンチャネル阻害剤であるdiisothiocyanostilbenedisulfonic acid (DIDS)で競合することを見出し、 $\text{Cl}^-$ のVGLUTへの結合によるものであると推定した(図6)<sup>24,25)</sup>。一方、UCSFのEdwards教授はVGLUT1を細胞に発現させるとVGLUT1を組み込んだ小胞の $\text{Cl}^-$ 透過性が高まることを、プロトン透過性を指標にして間接的に示した<sup>26)</sup>。VGLUTは $\text{Cl}^-$ も運ぶトランスポーターではないかと考え

た訳である。この仮説は当時から探されていたシナプス小胞の酸性化に必要なアニオンチャネル(あるいはアニオントランスポーター)の実体がVGLUTそのものであることを示唆しており注目された。続いて我々は、前述の精製VGLUT2と大腸菌のF-ATPaseを組み込んだリポソームを用い、 $\text{Cl}^-$ がグルタミン酸輸送に必須であることを見出した<sup>11)</sup>。 $\text{Cl}^-$ がないと駆動力があっても輸送活性はほぼ0である(図3)。少量の $\text{Cl}^-$ を添加すると活性は急上昇し、5-6mMで最大値をとり10mM以上で段々と低下してくる。この活性の低下は前述したpH勾配への変換に伴う膜電位の減少量と大体一致した。我々の結果は、VGLUTが $\text{Cl}^-$ を輸送するかどうかには何も答ええないが、少なくとも $\text{Cl}^-$ の活性化がVGLUT2自身の性質であることを明確に示している。

こうした状況下、Schenckらは、精製VGLUT1と好熱菌のF-ATPaseとの共再構成系を用い、VGLUTの $\text{Cl}^-$ コンダクタンス仮説を証明したと宣言しグルタミン酸と $\text{Cl}^-$ の輸送機構モデルを提出した(図6)<sup>27)</sup>。すなわち、VGLUT1には少なくとも二つの輸送モードがあり、通常の条件下で

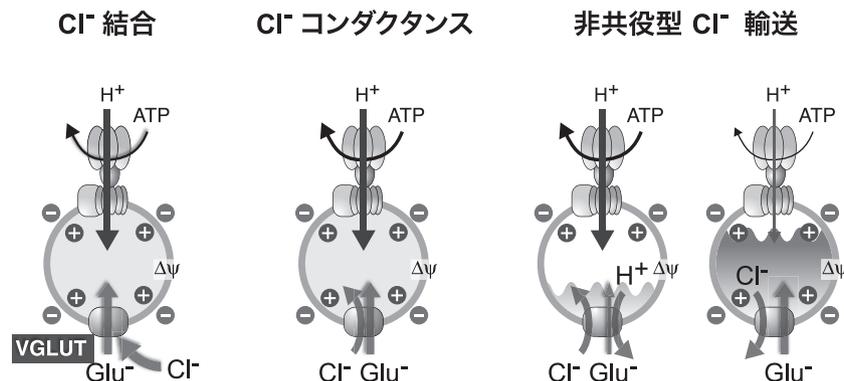


図6 VGLUTにおける $\text{Cl}^-$ 活性化の機構

これまでに三つの説が提出された。(左) $\text{Cl}^-$ はVGLUTに結合することで活性化する<sup>24,25)</sup>、(中央)VGLUTは $\text{Cl}^-$ 輸送体である<sup>26)</sup>、(右)VGLUTは $\text{Cl}^-$ 輸送体であるが、内部の $\text{Cl}^-$ によりイオン共役が変化する<sup>27)</sup>。

はグルタミン酸は  $\text{Cl}^-$  と共輸送されており、カウンターイオンとして  $\text{H}^+$  が逆輸送される。その一方で、小胞内部に  $\text{Cl}^-$  が高濃度存在するとき、例えば、シナプス小胞がリサイクルされて原形質膜より陥入した直後は、彼らによると小胞内部のイオン組成が外部環境と等しいはずであり、その場合は VGLUT1 がグルタミン酸と  $\text{Cl}^-$  の電氣的に中性 (つまり 1 対 1) の逆輸送をするようであるという。さらに、Schenck らによれば、高濃度の  $\text{Cl}^-$  で阻害されるのは駆動力が低下するためではなく、グルタミン酸と  $\text{Cl}^-$  が結合部位で競合するからであるという (図 3, 6)<sup>27)</sup>。従って、彼らの説によれば、駆動力である膜電位差を一定に保っても、高濃度の  $\text{Cl}^-$  存在下ではグルタミン酸輸送は低下するはずである。この説は Nature Neuroscience の News and Views でも取り上げられ大きな反響を呼んだ<sup>28)</sup>。しかしながら、彼らは最も重要な点、すなわち、グルタミン酸輸送に伴い  $\text{Cl}^-$  が実際に輸送されるのかどうかを確かめていなかった。

## 6. シンプルイズザベスト

VGLUT が実際に  $\text{Cl}^-$  を輸送するかどうかを確かめるストレートな方法は VGAT と同じアプローチ、すなわち、F-ATPase を除いた測定系を用いることである。前述したように駆動力をシンプルにして解釈を単純にするためである。さらにいえば、F-ATPase は測定系における最大の混入物であるために、F-ATPase による何らかの人工産物が結果に含まれてしまう可能性を予め取り除いておきたいからである。早速単一タンパク質にまで精製した VGLUT2 をリポソームに組み込み最も単純な測定系を作った。膜電位差は  $\text{K}^+$  存在下バリノマイシンを添加することで pH 勾

配は pH ジャンプにより形成した。当然ながら膜電位差によりグルタミン酸は能動輸送された。この輸送を様々な  $\text{Cl}^-$  濃度下で丹念に測定するとおもしろいことがわかってきた<sup>29)</sup>。すなわち、2 mM までは全く活性がない。2 から 5 mM にかけて指数関数的に活性化され、そのまま飽和し、以後 100 mM 以上になっても全く活性は低下せずそのまま維持される。すなわち、F-ATPase を除くことにより、これまでの実験系で観察されていた高濃度  $\text{Cl}^-$  における活性低下現象がなくなった (図 7)<sup>28)</sup>。やはりこの活性低下は F-ATPase による二次的効果なのだろう。活性が 0 から 100% にかわるせまい  $\text{Cl}^-$  濃度域における活性化のヒル係数はなんと 3.3 であり、非常に強い正の協調性がある。グルタミン酸が輸送される条件下で放射性同位体や蛍光プローブを用いた方法では  $\text{Cl}^-$  の輸送は全く検知できなかった。VGAT をポジティブコントロールとして、VMAT を含んだりポソームやただのリポソームをネガティブコントロールとして用い、結果の信頼性に万全を期した。内部に 0.1 M の  $\text{Cl}^-$  をトラップしても活性化は見られなかった。結局、コンダクタンス説を支持する証拠は何一つ見出すことができなかった。

## 7. スイッチの発見

研究において『ない』ことを証明することは難しい。 $\text{Cl}^-$  は VGLUT の輸送基質ではないことを確信はしたものの、この先どのように展開すればよいか考える日々が続いた。そうこうしているうちにある論文が目にとまった。楓尿症 (maple syrup urine disease) はトリプトファン代謝に関わる酵素の遺伝性疾患であるが、神経症状を示すことがわかっている。この論文は楓尿症患者の体内に蓄積する原因

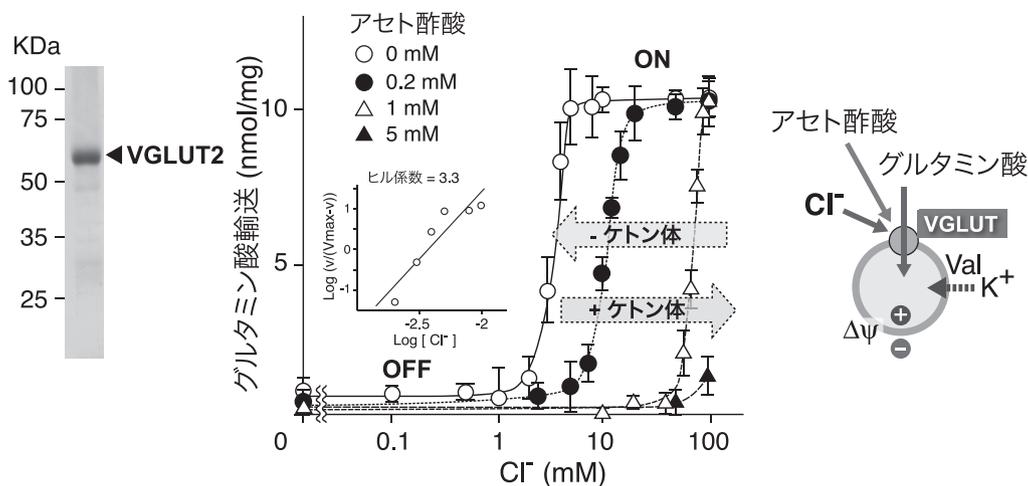


図 7  $\text{Cl}^-$  とケトン体による VGLUT 活性のスイッチング

VGLUT2 のみを含んだりポソーム (左) における膜電位依存性グルタミン酸輸送を測定した (右)。輸送活性は  $\text{Cl}^-$  濃度により大きく変動する。まるで  $\text{Cl}^-$  により活性スイッチがオン・オフされるようである。ケトン体によりこの依存性がシフトする (中央)。神経細胞内の  $\text{Cl}^-$  濃度は約 10 mM 程度なのでケトン体の増減によりこのスイッチが可逆的にオン・オフされることになる。文献 29) 参照。

物質である $\alpha$ ケト吉草酸によりシナプス小胞のグルタミン酸輸送の $\text{Cl}^-$ 感受性が変化することを示していた<sup>30</sup>。ここに面白いものが埋まっていることが直感された。はやる気持ちをおさえて、まず我々の系で彼らの主張が間違いないことを確認した。これは驚くべきことだ。何故なら、この結果は、 $\text{Cl}^-$ 結合部位と競合する生体内物質があることを意味しているからだ。もちろん、この物質がVGLUTにより輸送されないことは確かめた。

同様の効果をもつ生体内成分をスクリーニングした。ある、ある。意外に多くの物質がVGLUTを抑制したが、効力の強さから重要なのがケトン体、特にアセト酢酸であることがわかった。アセト酢酸はVGLUTの $\text{Cl}^-$ 効果を競合的に阻害した。すなわち、アセト酢酸が低濃度存在すると $\text{Cl}^-$ による活性化効果がより高濃度側にシフトした。アセト酢酸を除くと、 $\text{Cl}^-$ 依存性が回復する(図7)<sup>29</sup>。この結果は、一定量以上のアセト酢酸により、VGLUT活性をオン・オフできること、言い換えればVGLUTには活性スイッチが内在していることを示している。我々は、さらに、VGLUT1, VGLUT3, VEAT, VNUTなども同様の効果があることを確かめた。このスイッチング機構はSLC17ファミリーに共通する特性なのだ。哺乳類だけではなくショウジョウバエの仲間にも同じ効果がある。もちろん、VMATには $\text{Cl}^-$ 要求性は全くない。またVGATは前述したように $\text{Cl}^-$ による活性化機構は全く異なる。

かくして我々は、 $\text{Cl}^-$ はVGLUTやVNUTなどのアロステリックな活性化剤であると結論した。しかし現実には、VGLUTが $\text{Cl}^-$ を輸送すると考えている人が実に多い。何故こうした考えがすんなりと受け入れられるのだろうか？どうもVGLUT発見の緒にその原因がありそうだ。すなわち、SLC17として一番初めに同定されたNPT1(SLC17A1)は、 $\text{Na}^+$ 依存性のリン酸輸送だけでなく、カエル卵母細胞に発現させると大きなアニオン電流(large scale anion conductance)を発生することが知られている<sup>31</sup>。VGLUTはNPT1のホモログとして発見されたわけであり、 $\text{Na}^+$ 依存性のリン酸輸送活性も示すことがわかっている。そこでVGLUTについては誰も電気生理学的にlarge scale anion conductanceを測定していないにも関わらず、その存在をア・プリオリに受け入れてしまったのではなからうか。だとすると、この論文にはもちろん何らの落ち度もないのだが、やはり罪作りだと言わざるを得ない。ちなみに、NPT1におけるこの電流の素性はよくわかっていない。実際にNPT1を精製しリポソームに組み込んでみても、そのような活性は現れない<sup>22</sup>。我々はこのコンダクタンスはカエルの卵母細胞に発現させたために現れた何らかの人工産物だろうと考えている。

## 8. ギリシャ時代からの未解決問題

さて、ケトン体はブドウ糖とならぶエネルギー源としての意義だけでなく、グルタミン酸毒性を軽減し、抗てんかん作用を示すこともよく知られている<sup>32-35</sup>。特筆すべきは、ケトン体は抗てんかん薬が効かない難治性てんかん患者にも著効を示すことである。世界総人口の約1%がてんかんを患っており、その20-30%が難治性であることを考えるとそのインパクトは大きい。しかしながら、その機構についてはよくわかっていなかった。我々が見出したVGLUTのスイッチング制御によりこの現象を説明できる可能性がある。神経内部の $\text{Cl}^-$ 濃度は大体10 mM程度であり、血液中のケトン体濃度(通常0.3 mM程度)を考慮しても常にVGLUTはオンの状態にあると考えられる。飢餓やケトン食により血液内のケトン体濃度が増加すると、ケトン体はモノカルボン酸トランスポーター(monocarboxylic acid transporter, MCT)を介し神経に取り込まれVGLUTに到達し、スイッチをオフにすることができる。この仮説が正しければ、興奮性化学伝達が安全かつ可逆的に制御できるのではなからうか。

そこで我々は、培養した神経細胞からのグルタミン酸の小胞分泌がアセト酢酸で阻害されるかどうか調べた。予想通り、アセト酢酸を5 mM添加すると可逆的にグルタミン酸分泌が抑制された。続いて、脳のスライス標本を用いてグルタミン酸の量子放出における効果を調べ、予想通り大きな効果を認めた<sup>29</sup>。グルタミン酸受容体やmIPSCsにも全く影響がなかった。この結果は、アセト酢酸がグルタミン酸の小胞分泌を特異的に抑制していることを示している。さらに、我々は微小還流法により脳内に4アミノピリジン(4-aminopyridine)を還流してけいれんを誘発させ、アセト酢酸とグルタミン酸放出についての効果を調べた。還流液にアセト酢酸を添加するとけいれん症状が大幅に低下するとともにグルタミン酸の分泌が抑制された。この抑制は可逆的でありアセト酢酸を還流液から抜けば、けいれん症状はもとのように激しくなった。この間、対照として用いたドーパミンの分泌はアセト酢酸には全く影響を受けなかった。以上の結果は*in vivo*においてもアセト酢酸の増減によりVGLUTのスイッチをオン・オフできることを示している(図8)。飢餓がてんかんの治療に著効を示すことはヒポクラテスの時代から経験的に知られていたがその理由は不明であった<sup>32</sup>。このスイッチの発見は、紀元前から未解決の問題への一つの解答なのだ。

## 9. 化学伝達をオン・オフする

こうしてVGLUTの $\text{Cl}^-$ 要求性のメカニズムという問題が、個における興奮性化学伝達の制御という現象に結びついた。もちろん、現時点では、分子—細胞—個体が線で結

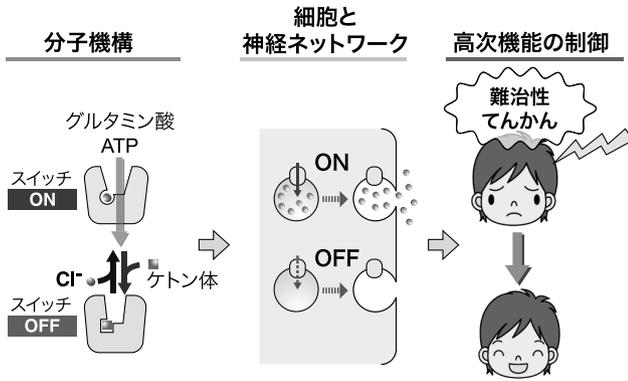


図8 代謝が興奮性化学伝達を制御する VGLUTの活性スイッチの発見により、代謝と化学伝達とが直結した。このスイッチをオン・オフすることで過剰な興奮性化学伝達が抑制できる。文献29) 参照。

びついたに過ぎない。今後、各点を結ぶ証拠と論理を丹念に紡いでいかなければならない。化学伝達をオン・オフするスイッチはVGLUTだけでなくVNUTやVEATももっている。グルタミン酸作動性化学伝達だけでなく、プリンやアスパラギン酸作動性化学伝達も個体レベルで制御できる可能性がある。そうするとスイッチ自体の構造が重要な問題となる。すなわち、VGLUTやVNUTなどに内在されているCl<sup>-</sup>/ケトン体結合部位の構造が同じなのか違うのか。我々の予備的調査によると、どうも同じではなさ

そうである。であるならば(どンドン想像が飛躍することをお許しいただきたい)、VGLUTやVNUTのスイッチだけを特異的にオフできる物質が存在する可能性がある。いいかえれば、グルタミン酸作動性化学伝達やプリン作動性化学伝達を特異的に元から遮断することができる可能性がある。さらに、ヒル係数が3以上という異常な活性化機構はどう説明できるのだろうか？これはVGLUTの活性型が三量体か四量体であることを示唆しているのかも知れない。量子放出におけるケトン体の効果もより詳細に詰める必要がある。神経/神経相互作用だけでなく神経/グリア・グリア/グリア相互作用における効果も是非知りたいところである。

10. 構成的手法再び

トランスポーターを精製しリボソームに組み込みその機能を測定することは、酵素学における精製と活性測定に相当する最も基本的な操作である。このことを「そうだ」と言い切ることがようやくできた。この方法は細菌・動物・植物の全てのトランスポーターに適用できる。この根本がしっかりしていると、どんな方向のトランスポーター研究に対しても臨機に応用展開することができよう。再構成はただの手法に過ぎないが、直接トランスポーターと対話する最も有効な方法である。Cl<sup>-</sup>要求性という単なるトラン

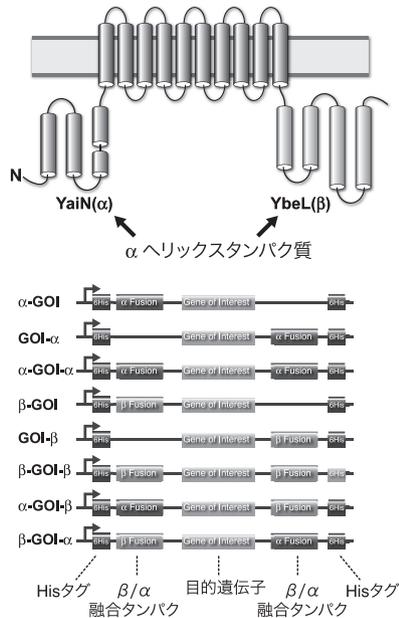
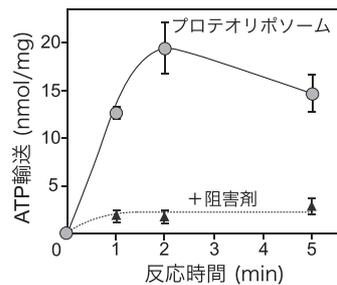
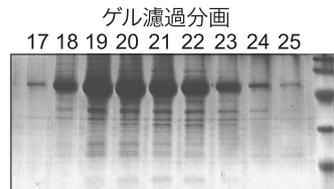


図9 Nelson法によるトランスポーターの大腸菌内発現系の構築 任意の動植物トランスポーターを大腸菌内で大量発現精製することができる。大腸菌由来の2種の親水性ペプチドcDNAを用いることがミソである(左上)。可能な八つの組み合わせを示した(左下)。この方法によるβVNUTの実施例を示した。精製の最終段階であるゲルクロマトグラフィー。各分画を一定量とりSDSゲル電気泳動後クマジーブリアントブルーにて染色した(右上)。この分画をリボソームに再構成しATP輸送を測定した。この方法で精製したトランスポーターはこれまでの例では全て活性を保持している(右下)。文献36) 参照。

ヒト小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)の精製と輸送活性



スポーターの性質を追求することが、化学伝達の人工制御につながることは想像もしなかったし、そういう装置が私たちの体内に組み込まれていたことを知ったことは驚きだった。再構成する要素を減らし、あるいは増やし、生命体でのイベントに近い現象を再現する方向も考えられる。この手法を構成的手法となづけた所以である。

最近、この手法に強力な助っ人が現れた。我々は昆虫細胞の発現系を用いてトランスポーターを発現・精製している。しかしこの方法では高々数 mg 程度の精製タンパク質が得られるにすぎない。なんとか大量に純粋でしかも活性を維持したトランスポーターを得ることができないのだろうか？ これはトランスポーターを扱った人が一様にもつ夢であろう。この夢が現実となった。テル・アビブ大学のネルソン教授が開発した膜タンパク質の大腸菌内発現システムを用い発現・精製したトランスポーターは完全に活性を維持している (図9)<sup>36)</sup>。大腸菌を1リットル培養することで純粋な任意のトランスポーターを数十 mg 得ることができるようになったのだ。我々は現在、化学伝達に関わる全てのトランスポーターをこのシステムにのせ変える作業を進めている。これにより構造生物学的な要求にも対応できるようになった。ふんだんにトランスポーターを使うことで、これまでは計画できなかった実験が可能となった。さらに、トランスポーターの膜上での方向性は常に問題にされるが、これを制御し自在に方向性を決定できるようにできる可能性がある。近い将来トランスポーターの工学的利用もできるだろう。

## 11. 終わりに

トランスポーターの機能を測定することは、トランスポーターと対話するということである。おしゃべりな子もいればシャイな子もいるし、まるで研究室で学生を相手にしているようである。実に楽しい。対話を通じて個々の隠れた能力を引き出し、思いもかけぬ関係を見つけることは無上の喜びである。VGLUTによると  $Cl^-$  によるスイッチ機構にはまだまだ多くの秘密が隠されているということだ (慣れてきてもなかなか教えてくれない)。表1の周辺からいろいろな声が漏れ聞こえるようになってきた。対話は続く。小胞型トランスポーター達はこれからどんな物語を語ってくれるのだろうか？ 同じ号の *Neuron* 誌に Jahn 教授が我々の論文についての解説を書いてくれた<sup>37)</sup>。その最後の文章を引用して筆をおく。I am sure that clean biochemical approaches as in the study of Juge et al. (2010) will be instrumental in providing answers to these important questions.

## 謝辞

本稿をトランスポーター研究の大先達である(故)平田

肇教授ならびに(故)笠原道弘教授にささげる。本研究は表弘志准教授とともに進めてきたものである。共同研究者として支えていただいている R. Edwards 教授, R. Nicolle 教授, N. Nelson 教授, 金井好克教授, 山本章嗣教授, 井上剛准教授, 大塚正人准教授, 樹下成信博士, 宮地孝明博士, 日浅未来博士, 居原田泰史博士, 澤田啓介博士, 越後典子博士 その他, 研究室で苦楽を共にした諸氏に心より感謝申し上げる。本研究の一部は, 科学研究費・基盤研究ならびに特定領域研究「トランスポートソーム」及び JST 戦略的国際科学技術協力推進事業の支援によるものである。

## 文 献

- 1) 森山芳則 (1993) 生化学, 6, 413-436.
- 2) 森山芳則 (2009) 蛋白質・核酸・酵素, 54, 148-155.
- 3) Reimer, R.J. & Edwards, R.H. (2004) *Pflugers Arch.*, 447, 629-635.
- 4) Moriyama, Y. & Yamamoto, A. (2004) *J. Biochem.*, 135, 155-163.
- 5) Freneau, R.T., Voglmaier, S., Seal, R.P., & Edwards, R.H. (2004) *Trends Neurosci.*, 27, 98-103.
- 6) Edwards, R.H. (2007) *Neuron*, 55, 835-858.
- 7) 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., & Hampson, R.M. (2006) *J. Neurosci.*, 26, 12055-12066.
- 8) 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., & Edwards, R. (2008) *Neuron*, 57, 263-275.
- 9) Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., & Edwards, R.H. (2009) *Nature*, 462, 651-655.
- 10) Smear, M.C., Tao, H.W., Staub, W., Orger, M.B., Gosse, N.J., Liu, Y., Takahashi, K., Poo, M.M., & Baier, H. (2007) *Neuron*, 53, 65-77.
- 11) Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H., & Moriyama, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 39499-39506.
- 12) 森山芳則 (1994) 植物細胞工学, 6, 70-75.
- 13) 表 弘志, 樹下成信 (2007) 生化学, 79, 956-960.
- 14) Juge, N., Muroyama, A., Hiasa, M., Omote, H., & Moriyama, Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 35073-35078.
- 15) Gasnier, B. (2004) *Pflugers Arch.*, 447, 756-759.
- 16) Werner, A., Moore, M. L., Mantel, N., Biber, J., Semenza, G., & Murer, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9608-9612.
- 17) Ni, B., Rosteck, P. R., Nadi, N.S., & Paul, S.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5607-5611.
- 18) Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I., & Takeda, J. (2000) *J. Neurochem.*, 74, 2622-2625.
- 19) Uchino, H., Tamai, I., Yamashita, K., Minemoto, Y., Sai, Y., Yabuuchi, H., Miyamoto, K., & Tsuji, A. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 254-259.
- 20) Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., & Moriyama, Y. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 5683-5686.

- 21) Miyaji, T., Echigo, N., Hiasa, M., Senoh, S., Omote, H., & Moriyama, Y. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11720–11724.
  - 22) Iharada, M., Miyaji, T., Fujimoto, T., Hiasa, M., Anzai, N., Omote, H., & Moriyama, Y. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 26107–26113.
  - 23) Naito, S. & Ueda, T. (1985) *J. Neurochem.*, **44**, 99–109.
  - 24) Hartinger, J. & Jahn, R. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 23122–23127.
  - 25) Moriyama, Y. & Yamamoto, A. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 22314–22320.
  - 26) Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Freneau, R.T., & Edwards, R. H. (2000) *Science*, **289**, 957–960.
  - 27) Schenck, S., Wojcik, S.M., Brose, N., & Takamori, S. (2009) *Nat. Neurosci.*, **12**, 156–162.
  - 28) Schweizer, F.E. (2009) *Nat. Neurosci.*, **12**, 111–112.
  - 29) Juge, N., Gray, J.A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Ueyama, H., Edwards, R.H., Nocoll, R.A., & Moriyama, Y. (2010) *Neuron*, **68**, 99–112.
  - 30) Reis, M., Farage, M., & Wolosker, H. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1475**, 114–118.
  - 31) Busch, A.E., Schuster, A., Waldegger, S., Wagner, C.A., Zemple, G., Broer, S., Biber, J., Murer, H., & Lang, F. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5347–5351.
  - 32) Bailey, E.E., Pfeifer, H.H., & Thiele, E.A. (2005) *Epilepsy Behav.*, **6**, 4–8.
  - 33) Bough, K.J. & Rho, J.M. (2007) *Epilepsia*, **48**, 43–58.
  - 34) Freeman, J., Veggiotti, P., Lanzi, G., Tagliabue, A., & Perucca, E. (2006) *Epilepsy Res.*, **68**, 145–180.
  - 35) Hartman, A.L., Gasior, M., Vining, E.P., & Rogawski, M.A. (2007) *Pediatr. Neurol.*, **36**, 281–292.
  - 36) Leviatan, S., Sawada, K., Moriyama, Y., & Nelson, N. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 23548–23556.
  - 37) Jahn, R. (2010) *Neuron*, **68**, 6–8.
-