

VNUTのATP輸送活性には塩素イオンが必須である。塩素イオンがないと見かけ上活性は認められないが、4 mM以上で活性化される。そして10mM以上でプラトーとなる。この事はプリン性化学伝達が塩素イオンにより制御される可能性を示唆している。この時、塩素イオンはVNUTで輸送されない事を証明した。しかも、この塩素イオンの効果はDIDSで拮抗することがわかった。すなわち、VNUTは塩素イオンをアロステリックなモジュレーターとして用いていることがわかった。

さらに、現在、塩素イオンおよびDIDS, ATPの結合部位を精製VNUTを限定分解しMASS解析により解明しつつある。このため、我々は大腸菌を用いたhVNUTの大量発現精製系を新たに開発した。このVNUTはもちろん100%の活性を維持している。大腸菌に置ける活性を保持したヒトトランスポーターの大量発現精製系は世界初である。

さらに、部位特異的変異導入法により様々な変異体を作製した。変異体VNUTを精製し、その機能を調べた。VGLUT (vesicular glutamate transporter)と同じ部位のアミノ酸が輸送活性に必須であることがわかった。

(2)VNUTの組織・細胞分布

プリン性化学伝達研究で最も解明が遅れている問題は、どの細胞がATPを分泌するのかよくわかっていない点にある。この問題をVNUTの特異的抗体（調製済み）を用い間接蛍光抗体法と免疫電子顕微鏡法および細胞分画法と間接蛍光抗体法により解明した。

脳(海馬)においては既に神経以外に一部のアストロサイトに発現していることを見いだしている。神経では、VNUTの一部はシナプス小胞に一部はdense granuleに局在した。アストロサイトにおいては、VNUTはdense-core vesicleに局在した。Lysosomeには全く存在しなかった。

この他、全身の組織における「VNUTの分布を解析した。多くの内分泌細胞の分泌顆粒や血小板のbeta granuleなど ATPが蓄積すると考えられていたオルガネラにほぼもれなくVNUTが発現局在していることを突き止めた。

(3)神経とアストロサイトにおけるATPの開口放出機構

(2)の成果により、神経やアストロサイトにおいてATPは小胞内に蓄積され開口放出されると考えられる。実際、神経においては、VNUTの発現をRNAiにより抑制すると神経からのATP分泌が抑制された。ATP分泌は脱分極によりトリガーされた。Ca²⁺要求性やボツリヌス毒素の効果などはexocytosisされることを支持していた。VNUTは神経におけるATP分泌に必須であることがわかった。

同様の方法により、我々は海馬のアストロサイトにおいてグルタミン酸刺激によりATPが分泌されること、このATPの分泌はVNUT発現をRNAiにより阻害すると完全にブロックされることを見いだしている。すなわち、アストロサイトにおいてもATPは開口放出されており、VNUTが必須であると結論した。

VNUT KO miceについては成果を得つつあるが、その詳細の発表は現時点ではみあわせたい。

4. 考察 まとめ

VNUTは分泌小胞にATPを蓄積するための分子装置であり、プリン性化学伝達の必須因子であることを証明した。

5. 発表論文

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.

Iwatsuki, K., Ichikawa, R., Hiasa, M., Moriyama, Y., Torii, K., and Uneyama, H.
(2009) Identification of the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in taste cells.

Biochem Biophys Res Commun, 388, 1-5

森山 芳則. (2009) ATPとアスパラギン酸の化学伝達をつかさどる小胞型トランスポーターの発見. *蛋白質 核酸 酵素*. 54, 148-55.

森山 芳則. (2010) プリン作動性化学伝達のミッシングリンク: 小胞型ヌクレオチドトランスポーター. *日薬理誌*. 135, 14-19