

博士論文

小胞型グルタミン酸トランスポーター 1  
スプライシングバリエント (VGLUT1v) の  
局在と機能に関する研究

平成 29 年 9 月

森山 理美

岡山大学大学院  
医歯薬学総合研究科  
博士後期課程 薬科学専攻

## 参考論文

本研究の内容は以下の論文に発表した。

### **Function and expression of a splicing variant of vesicular glutamate transporter 1.**

Satomi Moriyama, Masafumi Iharada, Hiroshi Omote, Yoshinori Moriyama, Miki Hiasa.

*Biochim Biophys Acta-Biomembrane* **1859**: 931-940 (2017) IF: 3.687

## 目次

略語表 …………… 《1》

第一章 序論 …………… 《3》

第二章 材料及び方法 …………… 《12》

第三章 結果 …………… 《28》

第四章 考察 …………… 《51》

第五章 結語 …………… 《64》

引用文献 …………… 《65》

謝辞 …………… 《78》

## 略語

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid
ASD	Alternative splicing defective
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
ANOVA	Analysis of variance
bp	base pair
BPB	Bromophenol blue
BSA	Bovine serum albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cAMP	3', 5'-cyclic adenosine monophosphate
cDNA	Complementary DNA
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
DIDS	Diisothiocyanatostilbene disulfonic acid
DTT	Dithiothreitol
EAAT	Excitatory amino acid transporter
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factors
FOX	Forkhead box
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid
G <sub>i</sub>	Guanine nucleotide-binding proteins inhibitory
IP <sub>3</sub>	Inositol-3-phosphate
IPL	Inner plexiform layer
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
IS	Inner segment
LB broth	Luria-Bertani broth
mGluR	metabotropic glutamate receptor
MOI	Multiplicity of infection
MOPS	3-(N-morpholino) propane sulfonic acid
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
Octylglucoside	N-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside
OPL	Outer plexiform layer

OS	Outer segment
O.D.	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PFA	Paraformaldehyde
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecylsulfate
SLC17	Solute carrier 17
SLMVs	Synaptic-like microvesicles
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
TCA	Trichloroacetic acid
TMD	Transmembrane domain
VACHT	Vesicular acetylcholine transporter
VAMP2	Vesicle-associated membrane protein 2
VEAT	Vesicular excitatory amino acid transporter
VGAT	Vesicular GABA transporter
VGLUT	Vesicular glutamate transporter
VGLUT1v	Vesicular glutamate transporter 1 variant
VMAT	Vesicular monoamine transporter
VNUT	Vesicular nucleotide transporter
VPAT	Vesicular polyamine transporter
V-ATPase	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase
WB	Western blotting
$\Delta$ pH	H <sup>+</sup> gradient or pH gradient
$\Delta$ $\psi$	Membrane potential

## 第一章 序論

神経細胞や内分泌細胞は、アドレナリンやセロトニンなどのモノアミン類、アセチルコリン、GABA、グリシンやグルタミン酸、ATP等の様々な伝達物質を用いて他の細胞に情報を伝えている。この情報伝達を化学伝達という (Levitan and Kaczmarek, 1991)。神経細胞における化学伝達は次のような過程から構成されている。すなわち、上記各種の伝達物質がシナプス小胞内に濃縮される。その後、神経細胞が興奮することにより脱分極が起こり、神経末端部分の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが開口し、細胞質内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入する。その結果、SNARE等の開口放出タンパク質が働き、シナプス小胞と細胞膜が融合し、シナプス小胞内の伝達物質がシナプス間隙に放出 (開口放出) される。細胞外に放出された伝達物質は、標的細胞上の受容体に結合する。その結果、受容体は活性化され、受容体を介して細胞外  $\text{Na}^+$  及び  $\text{Ca}^{2+}$  の標的細胞内への流入、膜電位の変化、cAMP濃度変化などの二次反応が起こる。この二次反応が引き金となり、一連のカスケード反応が惹起される (Levitan and Kaczmarek, 1991; 河田ら, 2004; 真鍋ら, 2013)。細胞外に放出された伝達物質は、細胞膜に存在するトランスポーターにより細胞外から回収されるか、代謝酵素により分解されることで不活化され、その結果シグナル伝達は停止する。このように、化学伝達は伝達物質の小胞内蓄積と開口放出 (シグナル出力)、受容体と受容体以後の二次反応 (シグナル入力)、そして回収・分解 (シグナル停止) という要素から構成されている (Levitan and Kaczmarek, 1991; 河田ら, 2004; 真鍋ら, 2013)。

化学伝達は、以前は神経細胞と標的細胞間でのみ行われていると考えられていた。しかし現在では、グリア細胞や多くの内分泌細胞をはじめ各種の細胞にこれらの機能が備わっており、普遍的な細胞間情報伝達系であることがわかっている (Moriyama and Yamamoto, 2004; Zhang and Haydon, 2005; Verkhratsky et al., 2013)。

小胞型神経伝達物質トランスポーターはシナプス小胞のような分泌小胞膜上に存在する神経伝達物質の蓄積を司る一群の能動輸送体である (Gasnier, 2004; Reimer and Edwards, 2004; Lawal and Krantz, 2013; Moriyama, 2015; Omote and Moriyama, 2013; Omote et al., 2016; Reimer 2013)。表1に示したように、基質とする神経伝達物質の種類により、小胞型モノアミントランスポーター (VMAT)、小胞型アセチルコリントランスポーター (VACHT)、小胞型GABAトランスポ

ーター (VIAAT)、小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT)、小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター (VEAT)、小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT)、および小胞型ポリアミントランスポーター (VPAT) の7種類に大別されている (Gasnier, 2004; Reimer and Edwards, 2004; Lawal and Krantz, 2013; Moriyama, 2015; Omote and Moriyama, 2013; Omote et al., 2016; Reimer, 2013)。

いずれの小胞型神経伝達物質トランスポーターも液胞型  $H^+$  ATPase (vacuolar proton ATPase; V-ATPase) とエネルギー的に共役しており、ATP の加水分解によって形成される  $H^+$  の電気化学的勾配 (electrochemical gradient of proton) を輸送の駆動力として、基質とする神経伝達物質を能動輸送している (Maycox and Jahn, 1990; 森山, 1991; 1993; Njus et al., 1986)。これらの小胞型神経伝達物質トランスポーターの遺伝子を破壊したマウスでは、対応する神経伝達物質が小胞内に蓄積されず開口放出されなくなるため化学伝達が著しく低下しているか、もしくは全く欠いていることがわかっている (Fremeau et al., 2004ab; Wojcik et al., 2004; Tordera et al., 2007, Lawal and Krantz, 2013; King et al., 2014; Omote et al., 2016; Sakamoto et al., 2014; Moriyama et al., 2017)。従って、これらの小胞型神経伝達物質トランスポーターは化学伝達の必須因子である。

表 1 小胞型神経伝達物質トランスポーター一覽

Gene name	Protein name	Substrates	Driving force	References	Inhibitors	Tissue distribution
SLC17A5	Vesicular Excitatory Amino Acid Transporter (VEAT) (or sialin)	Glutamate Aspartate	$\Delta\psi$	Miyaji et al., 2008	Evans blue DIDS	Brain, liver, lung, pancreas, placenta, muscle, uterus, bladder, kidney, spleen
SLC17A6	Vesicular Glutamate Transporter 2 (VGLUT2)	Glutamate	$\Delta\psi$	Hayashi et al., 2001	Evans blue, DIDS	Brain, spinal cord, islets of Langerhans, testes, intestine, stomach
SLC17A7	Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1)	Glutamate	$\Delta\psi$	Takamori et al., and Bellochio et al., 2000	Evans blue, DIDS	Brain, spinal cord, islets of Langerhans, osteoclasts
SLC17A8	Vesicular Glutamate Transporter 3 (VGLUT3)	Glutamate	$\Delta\psi$	Freneau et al., Takamori et al., 2002	Evans blue DIDS	Brain, spinal cord, kidney, liver, ear
SLC17A9	Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT)	ATP (Mg-ATP) ADP(Mg-ADP)	$\Delta\psi$	Sawada et al., 2008	Evans blue, DIDS, Glyoxylate Clodronate Hiasa et al., 2014b; Kato et al., 2017	Brain, adrenal gland, thyroid, liver, lung, skeletal muscles, retina, pancreas, esophagus, taste buds
SLC18A1	Vesicular Monoamine Transporter 1 (VMAT1)	Serotonin Adrenaline Noradrenaline Dopamine	$\Delta\psi$ , $\Delta\text{pH}$ $2\text{H}^+$ /monoamine antiport	Liu et al., 1992	Reserpine	Adrenal gland, endocrine/paracrine cells of intestine and stomach
SLC18A2	Vesicular Monoamine Transporter 2 (VMAT2)	Serotonin Adrenaline Noradrenaline Histamine Dopamine	$\Delta\psi$ , $\Delta\text{pH}$ $2\text{H}^+$ /monoamine antiport	Erickson et al., 1992	Reserpine, Tetrabenazine	Brain, enterochromaffin like cells in stomach
SLC18A3	Vesicular Acetylcholine Transporter (VACHT)	Acetylcholine Serotonin	$\Delta\psi$ , $\Delta\text{pH}$ $2\text{H}^+$ /acetylcholine antiport	Erickson et al., 1994	Vesamicol	Brain, intestine
SLC18B1	Vesicular Polyamine Transporter (VPAT)	Spermine Spermidine Serotonin	$\Delta\psi$ , $\Delta\text{pH}$	Hiasa et al., 2014a	Reserpine, Tetrabenazine (weak)	Brain, lung, placenta, kidney, testis, liver
SLC32A1	Vesicular GABA Transporter (VGAT or VIAAT)	GABA Glycine	$\Delta\psi$ $2\text{Cl}^-$ /GABA cotransport	McIntire et al., 1997		Brain, islets of Langerhans, testis

これまでに見いだされた小胞型神経伝達物質トランスポーターとその性質につきまとめた (Hiasa et al., 2014c より改変)。同定を報告した文献を表中に示した。



グルタミン酸はタンパク質中に多く含まれるアミノ酸(食事性タンパク質 101 g 当たり 20 g 相当)であるだけでなく(栗原ら, 2000)、生体中に遊離した形で存在しており、脳においては興奮性アミノ酸として機能している(栗原ら, 2000)。グルタミン酸を伝達物質とする化学伝達をグルタミン酸作動性化学伝達といい、記憶・思考・行動などの高次精神活動を支える極めて重要な化学伝達である(Fagg and Foster, 1983; Mayer and Westbrook, 1987)。図 1 に示すように、グルタミン酸は VGLUTs によりシナプス小胞内に充填され、開口放出される(Maycox and Jahn, 1990; Edwards, 2007; Hacket and Ueda, 2015)。放出されたグルタミン酸は、多彩なグルタミン酸受容体に結合する。NMDA 受容体や AMPA 受容体等のイオン型受容体にグルタミン酸が結合した場合、細胞内にイオンが流入し脱分極する(Nakanishi, 1992; Hollman and Heinemann, 1994)。一方、グルタミン酸が Group I 代謝型グルタミン酸受容体に結合すると G タンパク質を介してホスホリパーゼ C が活性化する。その結果、細胞質から遊離した IP<sub>3</sub> が細胞内 Ca<sup>2+</sup> ストア上の IP<sub>3</sub> 受容体と結合し、Ca<sup>2+</sup> が放出されることになる(Fagg and Foster, 1983; Mayer and Westbrook, 1987)。Group II、III 代謝型グルタミン酸受容体に結合した場合は、Gi タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼが抑制され cAMP 量が低下する。グルタミン酸による化学伝達は、細胞膜型グルタミン酸トランスポーター(EAAT1-5)により細胞間隙のグルタミン酸が再吸収されることで停止する(Amara and Fontana, 2002)。グルタミン酸を開口放出したシナプス小胞は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、再びグルタミン酸を充填し、次の電気刺激の到達に備える(Maycox and Jahn, 1990; Edwards, 2007)。

VGLUTs は 12 回膜貫通領域をもつ SLC17 ファミリーに属するトランスポーターであり、これまでに VGLUT1、VGLUT2、VGLUT3 の 3 つのアイソフォームが同定されている。これらのアイソフォームはそれぞれ異なる組織に発現しており、その部位におけるグルタミン酸作動性化学伝達に関わっていることがわかっている(Fremeau et al., 2004a; Moriyama and Yamamoto, 2004; Edwards 2007)。

脳において VGLUT1 は大脳皮質、海馬、小脳に強く発現している。VGLUT2 は VGLUT1 と相補的な発現パターンを示しており、視床、脳幹、深部小脳核に特に多く発現している(Miyazaki, 2003; Fremeau et al., 2004a)。VGLUT3 は、VGLUT1 や VGLUT2 と異なり発現量が少なく、GABA 作動性神経細胞やモノアミン作動性神経細胞やアストロサイトに発現している(Fremeau et al., 2002; Herzog et al., 2004)。また詳細な局在は示されていないが肝臓や腎臓にも発現していると言われている(Fremeau et al., 2002; Herzog et al., 2004)。

VGLUTs は非神経細胞にも発現していることがわかっており、VGLUT1 は松果体細胞 (Morimoto et al., 2003)、膵臓のランゲルハンス氏島  $\alpha$  細胞 (Moriyama and Hayashi, 2003; Hayashi et al., 2003a)、破骨細胞 (Morimoto et al., 2006) 等に発現している。VGLUT2 は VGLUT1 よりも広く分布しており、ランゲルハンス氏島  $\alpha$  細胞や小腸 L 細胞等様々な分泌細胞に発現している (Moriyama and Hayashi, 2003; Hayashi et al., 2003b; Moriyama and Yamamoto 2004)。

VGLUTs の構造と機能に関する生化学的研究は遅れていたが、Moriyama らは精製した VGLUTs をリポソームに組み込みグルタミン酸を輸送する実験系 (再構成系) を構築し、VGLUTs の構造と機能が研究できることを示した (Juge et al., 2006; 2010; Omote et al., 2011; 2016)。Juge らは 12 回膜貫通領域をもつ大腸菌のグリセロール 3 リン酸トランスポーターとラクトーストランスポーターの 3 次元結晶構造 (Huang et al., 2003; Abramson et al., 2003) に基づき VGLUT2 の 3D 構造モデルを提唱し、部位特異的変異導入の結果を合わせ Arg184、His128、Glu191 が VGLUT のグルタミン酸輸送に重要なアミノ酸残基であることを報告した (Juge et al., 2006)。その後、複数のグループにより VGLUTs は①グルタミン酸を輸送するがアスパラギン酸は輸送しないこと、②グルタミン酸輸送は  $\Delta$ pH ではなく膜電位 ( $\Delta\psi$ ) で駆動されること、③SLC17 ファミリーの全てのトランスポーターに保存されている 4 番目の TMD (TMD4) のアルギニン酸残基 (ラット VGLUT2 では R184 に相当) が VGLUTs 活性に必須であること、④mM オーダーの Cl<sup>-</sup> が輸送活性に必要であること等が確認された (Juge et al., 2006; 2010; Omote et al., 2011; 2016; Schenck et al., 2009; Hakett and Ueda, 2015; Eriksen et al., 2016)。これまで 昆虫細胞発現系による VGLUT1-3 に関する機能的な差異は認められていない。

VGLUTs の生理的意義については対応する VGLUT 遺伝子をノックアウトしたマウスを用いて明らかにされてきた。VGLUT 1 をノックアウトしたマウスでは、記憶が形成維持されなくなるなど、行動、思考、記憶に支障が出るということがわかっている (Freneau et al., 2004b; Wojcik et al., 2004; Tordera et al., 2007; King et al., 2014)。当初は致死性であると考えられていたが、それは行動異常による摂食障害のためであることが判明した (Freneau et al., 2004b; Wojcik et al., 2004)。VGLUT2 の欠損は致死性である。VGLUT2 は胎児及び生後 10 日間は主要な小脳型グルタミン酸トランスポーターとして大脳・小脳で発現しており、その後 VGLUT1 の発現量が増加するとともに、VGLUT2 の発現量は低下していく (Edwards, 2007)。VGLUT3 の欠損は致死性ではなく、難聴となりまた痛覚も

低下することから、感覚受容と深い関わりがあることがわかっている (Seal et al., 2008; 2009)。

以上のことから、VGLUT1-3 がそれぞれグルタミン酸の濃縮と開口放出を通じて異なる生理機能と関わっていることが明らかにされてきた。グルタミン酸作動性化学伝達においてもアイソフォームの違いによりグルタミン酸作動性化学伝達の実出力 (グルタミン酸の充填率、放出速度、再充填にかかる時間等) が決定される等の多様性が存在する可能性がある。この仮定はモノアミンを小胞に充填する小胞型モノアミントランスポーター (VMAT1 及び VMAT2) にもヒスタミン輸送能の有無において機能的差異があり、発現する組織や局在するオルガネラも異なっていることから、モノアミン作動性化学伝達の実出力に大きな違いがあるということからも示唆できる (Lawal and Krantz, 2013)。

化学伝達において小胞型神経伝達物質トランスポーターが果たす役割の重要性から、小胞型神経伝達物質トランスポーターのアイソフォームだけでなくバリエーションの機能を評価することも重要である。小胞型神経伝達物質トランスポーターのスプライシングバリエーションは、ショウジョウバエの VMAT とほ乳類の VNUT にそれぞれ一つずつバリエーションが報告されている (Greer et al., 2005; Sesma et al., 2013)。昆虫の VMAT バリエーションについては、野生型と比べリサイクリングの効率が異なることが報告されている (Greer et al., 2005)。またそれだけでなく、このバリエーションはグリア細胞に発現しており、ヒスタミン輸送活性が高いことがわかっている (Romero-Calderon et al., 2008)。VNUT バリエーションについては N 末端の 18 アミノ酸残基が置き換わった VNUT2 が存在することがわかっている (Sawada らが同定した VNUT を VNUT1 とする)。VNUT2 は VNUT1 と同程度の ATP 輸送能を持っているが、肺胞上皮細胞においては VNUT1 が存在するムチン含有量の多い分泌顆粒ではなく、電子密度の低い小胞に局在していることがわかっている (Sesma et al., 2013)。VGAT においても、ラット膵臓  $\alpha$  細胞の分泌顆粒に存在している VGAT は、 $\beta$  細胞の SLMVs 及びラット脳シナプス小胞の VGAT とは分子量と抗体の反応性が異なっており、バリエーションである可能性が指摘されている (Hayashi et al., 2003c)。

2006 年、Nogami らはラット VGLUT1 にスプライシングバリエーションが存在する可能性を報告した (Nogami et al., 2006)。すなわち、Nogami らは *vglut1* 遺伝子の第 2 エクソンと第 3 エクソンの間に 75 塩基が挿入された mRNA を同定した。この mRNA はラットの網膜と松果体に存在していた (Nogami et al., 2006)。この挿入された 75 塩基は 25 個のアミノ酸残基に相当しており、その挿入位置

は VGLUT1 の TMD1 と TMD2 間の小胞内腔ループに当たると推定されている (図 2)。Nogami らは網膜、松果体における VGLUT1v mRNA を定量し VGLUT1 mRNA のそれぞれ約 70%、30% に相当していると報告している (Nogami et al., 2006)。

ラット松果体においては VGLUT1v の mRNA は生後 7 日まで急速に増加した後一週間定常状態となり、その後低下した。一方で、VGLUT1 mRNA は 63 日間ほぼ定常状態を維持していたことから、VGLUT1v がタンパク質として翻訳され機能した場合、VGLUT1 とは異なるグルタミン酸作動性化学伝達に関わっている可能性があることが示唆された (Yoshida et al., 2008)。しかしながら VGLUT1v に関する研究は、これ以後報告されていない。従って、VGLUT1v mRNA が翻訳されタンパク質レベルで発現し機能しているかどうかは不明である。

VGLUT1v は VGLUTs における初めてのスプライシングバリエーションである。VGLUT1v が実際にタンパク質として存在するかどうか、存在していた場合、VGLUT1v の機能や発現する組織を明確にすることは、これまでに得られた VGLUTs の構造と機能、さらにはグルタミン酸作動性化学伝達研究に新しい知見と研究対象を与えることに他ならない。VGLUT1v mRNA は網膜及び松果体といった特定の組織に発現し、動物種も齧歯類と限定されていることから (Nogami et al., 2006)、VGLUT1v は 3 つの VGLUTs (VGLUT1-3) と異なるグルタミン酸輸送機能を持つ可能性が考えられる。そこで本研究では、齧歯類特異的に発現する VGLUT1v mRNA が、タンパク質として存在することを実証し、昆虫細胞発現系において VGLUTs と同様の機能を有するかどうかを明らかにし、さらに、VGLUT1v の詳細な局在を解明することを目的とした (図 2)。

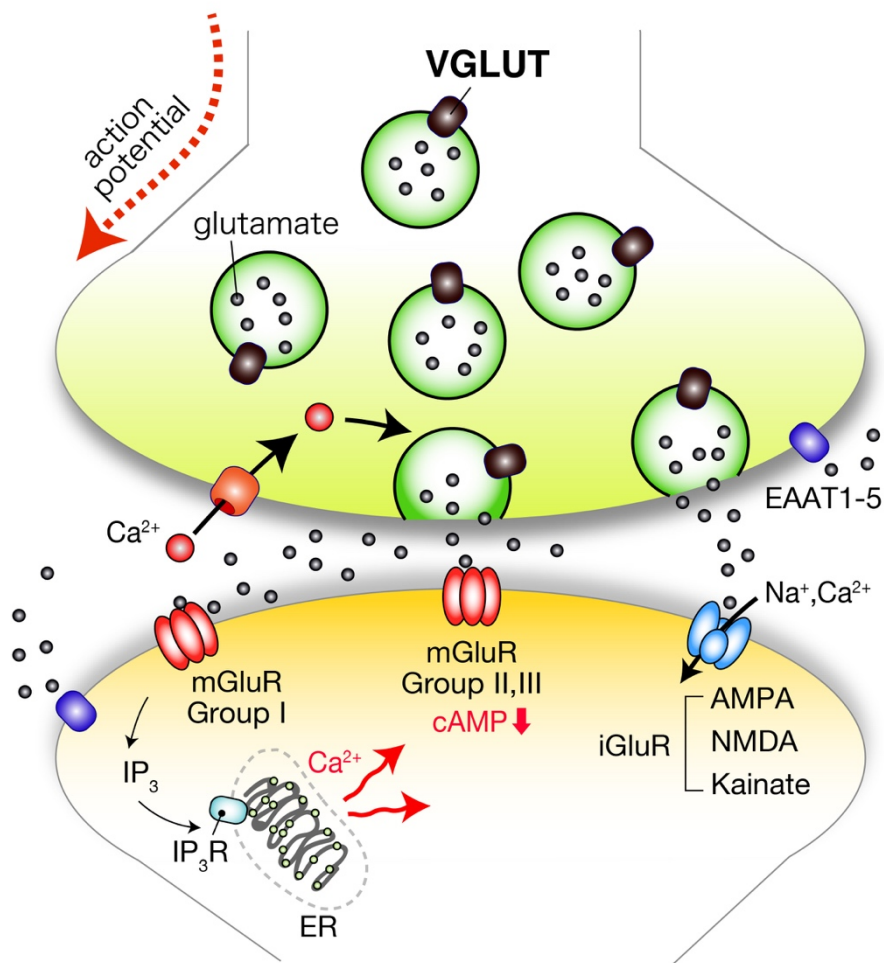


図1 グルタミン酸作動性化学伝達の概要

活動電位が神経終末に到達し細胞膜が脱分極することで  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが開口し、それに伴い細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する。その結果 VGLUT によってグルタミン酸が充填されたシナプス小胞は、細胞膜と融合し、小胞内のグルタミン酸がシナプス間隙に放出される。放出されたグルタミン酸は、AMPA、NMDA、Kainate 型のイオンチャンネル型受容体もしくは Group I - III の代謝型受容体 (mGluR) に結合し、シグナルが伝達される。代謝型受容体にグルタミン酸が結合した場合、G タンパク質を介してシグナル伝達が行われる。細胞膜に局在するグルタミン酸トランスポーター (EAATs) は、シナプス間隙のグルタミン酸を取り込み、化学伝達を終わらせる。(Fagg and Foster, 1983; Mayer and Westbrook, 1987; Amara and Fontana, 2002; Freneau et al., 2004a; Moriyama and Yamamoto, 2004; Edwards 2007)。

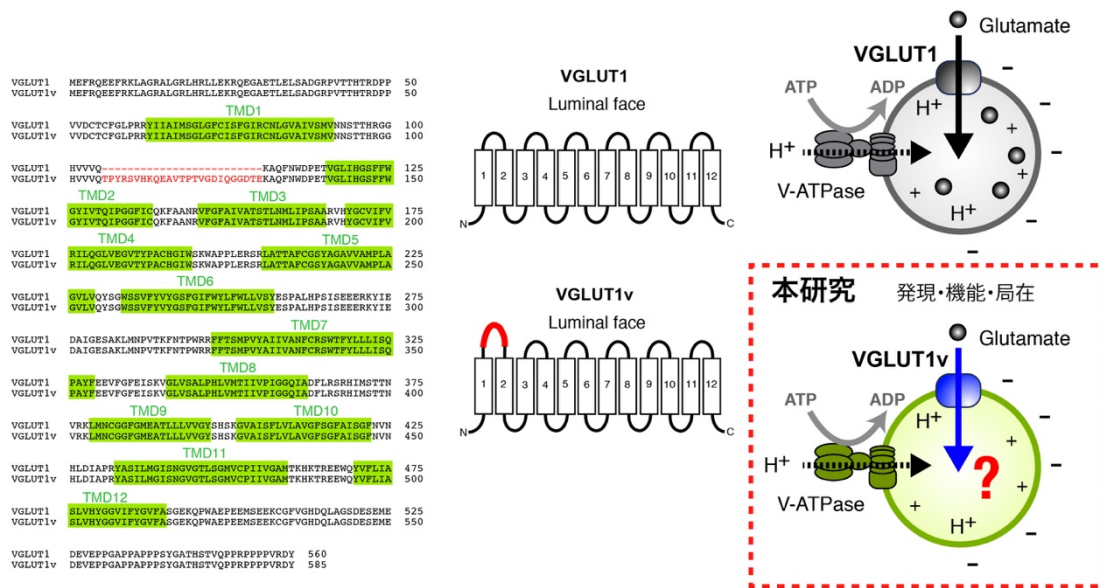


図2 本研究の目的

左図: VGLUT1 及び VGLUT1v のアミノ酸配列を示した。挿入された 25 アミノ酸配列を赤字で示した。中央図: VGLUT1 及び VGLUT1v のトポロジーモデルを示した。VGLUT1v に挿入されたアミノ酸は TMD1 と TMD2 のループに挿入されていることが推定されている (Nogami et al., 2006)。右図: 本研究は VGLUT1v がタンパク質として存在することを実証し、VGLUT1v の輸送機能及び網膜における局在を解明することを目的とした。

## 第二章 材料及び方法

### 実験動物

本研究で用いたラット及びマウスは清水実験材料から購入した。全ての動物実験は、国立大学法人岡山大学動物実験委員会の承認を得た上で、その規定に沿って遂行した（承認番号：OKU-2014538; OKU-2015557）。

### VGLUT1v 組み換え Bacmid の作製

VGLUT1v の cDNA (Accession No. EU253553) を以下のプライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 反応は 94°C 2 分間反応後、94°C 30 秒、52°C 30 秒、68°C 3 分を 30 サイクル繰り返し、68°C で 5 分間反応させ 4°C で保存した。

Sence primer                      5'-CACCATGGAGTTCCGGCAGG-3'

Antisence primer                  5'-TCAGTAGTCCCGGACAGGGG-3'

増幅した DNA 断片を TOPO クローニングシステム\* (Invitrogen) により pENTR/D-TOPO に組み込んだ。これを LR recombination (Invitrogen) により pDEST10 (Invitrogen) に組み換え、さらに Bac to Bac システム (Invitrogen) により DH10Bac に導入した。組み換え Bacmid は抗生物質 (10 µg/mL テトラサイクリン、50 µg/mL カナマイシン、7 µg/mL ゲンタマイシン) 添加 LB 寒天培地で 37°C、24 時間培養後に選択した。LB 寒天培地に IPTG と X-gal も添加した。組み換えが起こると βガラクトシダーゼが欠損し、コロニーが青く染まらないため、青く染まらない白いコロニーを選択し、組み換え Bacmid をミニプレップ法により抽出した。

\*Vector に 3'single-standed overhang をつけ、この overhang が TOPO-changed DNA fragment の 5' 末端と等しい。すなわち、プライマーに CACC をつけておけば、PCR 産物はダイレクトにクローニングされる。

### ミニプレップ法

抗生物質 [10 µg/mL テトラサイクリン、50 µg/mL カナマイシン、7 µg/mL ゲンタマイシン] を添加した LB 培地で、大腸菌 C43 を 37°C、一晩培養した。遠心して大腸菌を回収、そのペレットを Solution 1 [50 mM グルコース、25 mM Tris-

HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0] 200  $\mu$ L で懸濁した。Solution 2 [0.2 M 水酸化ナトリウム、1% SDS] を 200  $\mu$ L 加え、転倒混和し、室温で 5 分放置した。Solution 3 [3 M 酢酸カリウム、11.5% (v/v) 酢酸] を 200  $\mu$ L 加え、転倒混和し、4°C で 10 分放置した。16,000 $\times$ g、4°C で 15 分遠心し、上清を回収し、等量のイソプロパノールを加えた。転倒混和し、氷上で 10 分放置した。16,000 $\times$ g、4°C で 15 分遠心し、上清を除き、エタノール沈殿を行い、70% エタノールで 2 回洗った。TE Buffer [10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA] を無菌的に加え、4°C で保存した。

### 組み換えバキュロウイルスの作製

35 mm シャーレに Sf9 細胞 ( $8\times 10^5$  細胞/2 mL 培地/dish) をまき、細胞定着後 Grace's 培地 [Grace's Insect Medium (GIBCO)、10% FBS、0.35 mg/mL 炭酸水素ナトリウム、4 mg/mL イーストレイト (GIBCO)、3.3 mg/mL TC LACTALBUMIN HYDROLAYSATE (DIFCO)、100 U/mL ペニシリン G、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、0.25  $\mu$ g/mL ファンギソン、pH 6.1] 2 mL に換えて 27°C で感染兆候が見られるまで数日培養した。感染兆候が見られたら無菌的に培養液を回収し、500 $\times$ g、4°C で 5 分遠心し、培養液上清を P-1 viral stock として回収した。

### 組み換えウイルスの単離

100 mm シャーレに Sf9 細胞 ( $6\times 10^6$  細胞) をまき、10 倍希釈系列で  $10^{-5}$ - $10^{-9}$  に希釈した P-1 viral stock 1 mL を加えて室温で 1 時間振とうさせながら感染させた。感染後、培地を 1% sea plaque agarose を含む TNM-FH (SIGMA) に置換し、27°C で 5-7 日培養した。プラークが観察されたらこれをピックアップして、Sf9 細胞 ( $1.2\times 10^6$  細胞) をまいた 6 穴プレートに入れて再度感染させた。72 時間後、この培地を P-1 viral stock と同様に回収し、PCR にて確認した。その後細胞が死滅するまで培養し、培養上清を回収し、これを P-2 viral stock とした。

### 作製したウイルスの確認

P-1 及び P-2 viral stock 100  $\mu$ L を分取し、同量の 20% PEG/2.5 M 塩化ナトリウムを加えた。これを室温で 30 分放置したのち、16,000 $\times$ g、室温で 10 分の遠心操作により DNA を沈殿させた。沈殿した DNA を 80  $\mu$ L の滅菌水に溶かし、50°C で 1 時間 Proteinase K (1 mg/mL) 処理後、フェノール/クロロホルム抽出した水



層をエタノール沈殿し、10  $\mu$ L ウイルス DNA 溶液を得た。これを鋳型とし、VGLUT1v 特異的配列を持つ primer を用い PCR を行なった。

PCR 反応は、ウイルス DNA 溶液 2  $\mu$ L に Ex Taq Buffer (タカラバイオ)、0.375 mM dNTP mix、0.3  $\mu$ M primer、0.5 U Ex Taq (タカラバイオ) を加えて total volume 16  $\mu$ L にし、94°C 5 分の後、94°C 45 秒、55°C 45 秒、72°C 2 分を 30 サイクル繰り返し、72°C 7 分反応させた後、4°C で保存した。増幅された PCR 産物は、1% アガロースゲルで電気泳動し臭化エチジウム溶液で染色後、TRANSILLUMINATOR (フナコシ) で UV 照射し、撮影した。

### **High-tighter viral stock の調製**

蓋つきの 75 cm<sup>2</sup> フラスコに Sf9 細胞 (6 $\times$ 10<sup>6</sup> 細胞) をまき、定着後、P-2 viral stock を 100  $\mu$ L ずつ加えた。27°C で 96 時間培養した後、無菌的に培養液を回収し、500 $\times$ g、4°C で 10 分の遠心後、培養液上清を P-3 viral stock (High-tighter viral stock) として回収した。

### **ウイルス力価の検定**

100 mm シャーレに Sf9 細胞をまき (6 $\times$ 10<sup>6</sup> 細胞)、10 倍希釈系列で 10<sup>-5</sup>-10<sup>-9</sup> に希釈した High-tighter viral stock 1 mL を加えて室温で 1 時間振とうさせながら感染させた。感染後、培地を 1% sea plaque agarose を含む complete TNM-FH に置換し、27°C で 5-7 日培養した。プラークが観察されたらこれを計数し、viral stock 1 mL あたりの力価を算出した。

### **細胞の回収と膜画分の可溶化**

100 mm シャーレ 32 枚に Sf9 細胞をまき (6 $\times$ 10<sup>6</sup> 細胞)、30 分静置し上清を除去後、培地を 4 mL/dish 加えた。High-tighter viral stock を M.O.I.=1 で感染させ、27°C で培養した。感染 72 時間後の細胞をセルスクレーパー (28 cm, greiner bio-one) により回収し、700 $\times$ g、10 分間遠心して上清を取り除いた。これを Disruption Buffer [20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.1 M 酢酸ナトリウム、10% (v/v) グリセロール、0.5 mM DTT、1  $\mu$ g/mL ペプスタチン A (ペプチド研究所)、1  $\mu$ g/mL ロイペプチン (ペプチド研究所)] 40 mL 中に懸濁し、再度 700 $\times$ g、10 分間遠心して上清を取り除いた。これを Disruption Buffer 20 mL で懸濁し、氷で冷やしながら超音波装置 (TOMY Tip Sonicator UD-200、OUTPUT4、30 秒 $\times$ 10 回) を用いて破

碎後、700×g、10 分間遠心して上精を回収し、さらに 160,000×g、1 時間、4°C で超遠心した。得られた沈殿を膜画分とした。

この画分に Solubilization Buffer [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、10% グリセロール (v/v)、1 µg/mL ペプスタチン A、1 µg/mL ロイペプチン] 6 mL を入れ、ホモジナイザーで懸濁しタンパク質濃度が 15 mg protein/mL となるように調製した。これに終濃度 2% (w/v) の octylglucoside (Anatrace, Inc) を添加し、ホモジナイザーを用いて懸濁後、4°C、260,000×g、30 分遠心し、その上清を可溶化画分とした。Octylglucoside は 20% (w/v) の溶液を調製しておき、-20°C で保存したものをを用いた。

### アフィニティーカラムを用いた VGLUT1v の精製

Ni-NTA super flow レジン (QIAGEN、Hilden、Germany) 1 mL をエコノカラムに充填し、蒸留水にて洗浄した後 Solubilization Buffer で平衡化した。これを 15 mL プラスチックチューブに移し、上記の可溶化画分を入れ、4°C、4 時間攪拌しながら吸着させた。その後、Wash Buffer [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、5 mM イミダゾール、10% グリセロール、1% octylglucoside] で洗浄し、さらに 60 mM イミダゾールを含んだ Wash Buffer 3 mL を用いて VGLUT1v を溶出した。溶出した VGLUT1v を精製標品とし、分注して -80°C で保存した。

### F-ATPase の発現

F-ATPase の調製は Moriyama らの方法に従った (Moriyama et al., 1991)。すなわち、F-ATPase をコードする *unc* オペロンを欠損した大腸菌 DK8 株に *unc* オペロンを持つプラスミド pBWU13 を用いて形質転換した。この株を炭素源として 0.5% グリセロールを用い、50 µg/mL チミン、50 µg/mL イソロイシン、50 µg/mL バリン、2 µg/mL チアミンを添加した Tanaka 培地 [64 mM リン酸水素カリウム、34 mM リン酸二水素ナトリウム、20 mM 硫酸アンモニウム、0.3 mM 硫酸マグネシウム、10 µM 塩化カリウム、1 µM 硫酸鉄、10 µM 塩化亜鉛] で、37°C で培養した。O.D.600 nm が 1.0 になるまで培養した。培養後、4°C にて、10,000×g、15 分間遠心して菌体を集めた。菌体を 50 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT、10% (v/v) グリセロール、1 mM PMSF、0.2 mM EDTA-水酸化ナトリウム pH 7.0、1 µg/mL ペプスタチン A、1 µg/mL ロイペプチンにて懸濁し、同様の遠心操作で沈殿させた。

## **DK8 反転膜小胞の調製**

沈殿させた菌体を 50 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT、10% (v/v) グリセロール、1 mM PMSF、0.2 mM EDTA pH 7.0、1 µg/mL ペプスタチン A、1 µg/mL ロイペプチンで懸濁後、French Press (1,400 kgf/cm<sup>2</sup>, American Instrument Co., Inc.) を 2 回行い、菌体を破壊した。これを 4°C、15,000 ×g で遠心した。上清を注意深く採取し、さらに 100,000×g で一時間遠心し、膜画分を得た。この膜画分を 50 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT、10% グリセロール、1 mM PMSF、0.2 mM EDTA pH7.0、1 µg/mL ペプスタチン A、1 µg/mL ロイペプチンで懸濁した。

## **F-ATPase の精製**

上記の DK8 膜小胞画分に終濃度 2% (w/v) となるよう octylglucoside を加え、10 分間氷上で保冷した後、210,000×g で 30 分間遠心し、上清を得た。これを F-ATPase の可溶性画分という。続いて、20 mM MOPS-Tris pH 7.0、2 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT、1 mM PMSF の入った 10-30% (w/v) のグリセロール密度勾配を作り、この上に先ほどの上清を乗せ、スイングローター (SW55 Beckman) にて 330,000×g で 5 時間遠心した。遠心後、チューブを取り出し、底から注射針で穴をあけ目的の画分 (ボトムからおよそ分量) を採取し (Moriyama et al., 1991; Fig 5 参照)、300 µL ごとに分注し、使用するまで -80°C に保存した。

## **リポソームの調製**

大豆ホスファチジルコリン (Sigma type II S) を 10 mg/mL になるように緩衝液 [20 mM MOPS-NaOH pH 7.0、0.5 mM DTT] に懸濁し、バスタイプ超音波装置で半透明になるまで超音波処理した。調製したリポソームは分注し、-80°C で保存した。

## **リポソームへの再構成**

精製 VGLUT1v 10 µg と F-ATPase 90 µg をリポソーム 0.5 mg に混和し、-80°C で 10 分間静置し、凍結させた。直ちにこれを取り出し、迅速に解凍し Dilution Buffer [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、150 mM 酢酸ナトリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、0.5 mM DTT] で 30 倍に希釈し、200,000×g、4°C で 1 時間遠心した。沈殿に Dilution Buffer を 200 もしくは 400 µL 添加し、ホモジナイザーを用いて懸濁し、再構成リポソームを得た。

精製 VGLUT1v のみを含むリポソームは、上記の方法で F-ATPase を除き、調製した。その他の条件は同じである。

### VGLUT1v と F-ATPase の再構成リポソームにおけるグルタミン酸輸送活性測定

Moriyama らが確立した方法 (Moriyama et al., 1991) により測定した。再構成リポソーム (1-2  $\mu\text{g}$  タンパク質) を反応液 [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、150 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、4 mM 塩化カリウム] に添加し混和した後、27°C で 3 分間インキュベートした。終濃度 2 mM となるように ATP を添加し、その後終濃度 0.1 mM の [ $^3\text{H}$ ] -グルタミン酸 (0.5 MBq/ $\mu\text{mol}$ ; GE Healthcare, Lottle Chalfont, UK を 1:19=Hot:Cold の割合で調製した。) を加えた。反応液 500  $\mu\text{L}$  から経時的に 130  $\mu\text{L}$  ずつ取り、Sephadex G-50 fine スピнкаラム (GE Healthcare) にアプライし、760 $\times$ g、2 分、4°C で遠心した。その溶出液をクリアゾル 3 mL に混ぜ、中に含まれる放射能 (リポソーム内に取り込まれたグルタミン酸に相当する) を液体シンチレーションカウンター (PerkinElmer) により計測した。

### VGLUT1v 再構成リポソームにおけるグルタミン酸輸送活性測定

VGLUT1v のみをタンパク質成分として含むリポソームのグルタミン酸輸送はバリノマイシン添加により駆動力 (膜電位) を発生させ測定した。すなわち、反応液 [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、150 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、4 mM 塩化カリウム、2  $\mu\text{M}$  バリノマイシン、0.1 mM [ $^3\text{H}$ ] -グルタミン酸] を 27°C で 3 分間インキュベートし、上述の方法で調製した VGLUT1v リポソーム (50  $\mu\text{L}$ ) を加え反応開始した。 [ $^3\text{H}$ ] -グルタミン酸は 0.5 MBq/ $\mu\text{mol}$ ; GE Healthcare, Lottle Chalfont, UK と 0.1 mM L-グルタミン酸 (pH 7.0) を 1:19=Hot:Cold の割合で調製したものをを用いた。反応開始 1 分後、反応液 500  $\mu\text{L}$  から 130  $\mu\text{L}$  ずつサンプル液を取り、Sephadex G-50 fine スピнкаラムにアプライし、760 $\times$ g、2 分間、4°C で遠心した。アプライした時間を持って反応停止とした。その溶出液をクリアゾル 3 mL に混ぜ、中に含まれる放射能 (リポソーム内に取り込まれたグルタミン酸を) 液体シンチレーションカウンター (PerkinElmer) により計測した。

測定液中の Cl<sup>-</sup>濃度効果を検証した実験 (図 9) の場合は、上記の反応液の 150 mM 酢酸カリウムの濃度と塩化カリウムの濃度の合計が 150 mM になるように

調製した（例: Cl<sup>-</sup>が 0 の時は 150 mM 酢酸カリウムのみ、Cl<sup>-</sup>が 100 mM の時は 50 mM 酢酸カリウムと 100 mM 塩化カリウムとした。）。

DIDS による阻害効果を測定した実験（図 10）では、VGLUT1v リポソームを反応液 [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、150 mM 酢酸ナトリウム、5 mM 酢酸マグネシウム] 中で、①DIDS 非存在下（control）はこの条件で 27°C、2 分間インキュベートした。②10 μM DIDS 存在下の場合、27°C で 1 分間インキュベート後、DIDS を添加し、さらに 1 分インキュベートした。③Cl<sup>-</sup>で前処理する場合は（100 mM Cl<sup>-</sup>と 10 μM DIDS）、VGLUT1v リポソームを反応液 [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、50 mM 酢酸カリウム、100 mM 塩化カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム] に混和し 1 分インキュベートした後に、10 μM DIDS を添加し、さらにインキュベートした。④pre DIDS の場合は②において未反応の DIDS をできるだけ除くためにリポソームを卓上超遠心機（Optima™ MAX-TL）により 440,000×g、5 分間遠心し、沈殿物を迅速に Buffer [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、150 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム] に懸濁した。①-④をそれぞれ 50 μL ずつとり、total volume 0.5 mL の Buffer [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、50 mM 酢酸カリウム、100 mM 塩化カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、2 μM バリノマイシン、0.1 mM [<sup>3</sup>H]-グルタミン酸] を加えて 1 分後の取り込みを同様にして測定した。

### VGLUT と VGAT の <sup>36</sup>Cl 輸送活性測定

反応液 [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、150 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、10 mM グルタミン酸、2 μM バリノマイシン、10 mM <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> (740 MBq/g American Radiolabeled Chemicals)] を 27°C で 3 分間インキュベートし、ここに作製したリポソーム 0.5 μg を加え反応を開始した。VGAT における輸送を測定する場合は、上記の反応液中の 10 mM グルタミン酸を 10 mM GABA に置き換えた。反応液 150 μL から 130 μL を取り、Sephadex G-50 fine スピнкаラムにアプライした。760×g で 2 分間遠心し、その溶出液をクリアゾル 3 mL に溶かし、液体シンチレーションカウンター（PerkinElmer）により計測した。精製 VGAT は樹下成信博士（岡山大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）より提供を受けた。

### 網膜由来シナプス小胞画分を用いたグルタミン酸輸送活性測定

マウス網膜から調製したシナプス小胞画分（10 μg）を Assay Buffer [20 mM MOPS-Tris pH 7.0、0.1 M 塩化カリウム、0.2 M スクロース、5 mM 酢酸マグネシ

ウム]に懸濁し、阻害剤を添加あるいは未添加の状態で30°C、1分間インキュベートした。V-ATPaseの基質である5 mM ATPを加えて30°Cで1分間インキュベートした後、終濃度0.1 mMの $[^3\text{H}]$ -グルタミン酸(0.5 MBq/ $\mu\text{mol}$ ; GE Healthcare, Little Chalfont, UKを1:19=Hot:Coldの割合で調製した。)を添加して30°Cで5分間インキュベートした。反応液120  $\mu\text{L}$ から100  $\mu\text{L}$ をとり、0.45  $\mu\text{m}$  ニトロセルロースフィルター(Millipore)上にアプライ後、吸引濾過することで小胞をトラップし、氷冷したAssay Bufferで洗浄した。その後、ニトロセルロースフィルターをクリアゾル3 mLに混ぜ、液体シンチレーションカウンター(PerkinElmer)により中に含まれる放射能(トラップされた小胞に取り込まれたグルタミン酸に相当する)を計測した。

### ラット及びマウス脳、網膜膜画分の調製

7週齢のWisterラット及びC57BL/6マウス(オス)をジエチルエーテルで麻酔し、各臓器を蛍光灯下で単離した。SME Buffer[300 mM スクロース、10 mM MOPS-Tris pH7.0、5 mM EDTA、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ペプスタチンA、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ロイペプチン]で洗浄した後、SME Buffer中でホモジナイズした。1,000 $\times g$ 、10分、4°Cにて遠心し、上清を回収した。その後、さらに160,000 $\times g$ 、1時間、4°Cにて超遠心した。ペレットにSME Bufferを加えて懸濁した。

### 粗シナプス小胞画分調製

上記の方法で単離したラット脳(3匹分)を氷冷したSME Bufferで洗浄し、SME Buffer中でホモジナイズして破壊した。これを1,000 $\times g$ 、10分、4°Cにて遠心し、上清を回収した。上清を8,000 $\times g$ 、10分、4°Cにて遠心し、上清をさらに160,000 $\times g$ 、1時間、4°Cにて超遠心した。ペレットを2回SME Bufferで洗浄し、2 mLのSME Bufferで懸濁した。氷冷した50 mLの蒸留水に1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ペプスタチンA、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ロイペプチン、終濃度1 mMになるようMOPS-Tris pH 7.0を加え、30分間、4°Cで浸透圧ショックをかけた。その後、攪拌液を12,000 $\times g$  10分間遠心し、上清を100,000 $\times g$  1時間、4°Cで超遠心し、ペレットをSME Bufferで懸濁した。これを分注し-80°Cで粗シナプス小胞画分として保存した。

なお、網膜由来の粗シナプス小胞画分も同様にして調製した。1回の調製で10匹分の網膜を使用した。

## Total RNA の調製

Total RNA の調製は ISOGEN (ニッポンジーン) 付属のマニュアルを参考に行なった。7 週齢 C57BL/6 マウス (オス) より単離した脳及び網膜を PBS で洗浄し、組織 50-100 mg に 1 mL の ISOGEN を添加後、ペッスル (ビオラモ) を用いてホモジナイズし溶解させた。5 分間、室温にてインキュベート後、クロロホルムを 200  $\mu$ L 加え、ボルテックスした。その後 13,000 $\times$ g、15 分、4 $^{\circ}$ C で遠心し、水相を 600  $\mu$ L 分取した。イソプロパノールを 500  $\mu$ L 加え 10 分室温でインキュベートし、再び 13,000 $\times$ g、15 分、4 $^{\circ}$ C で遠心した。ゲル状となったペレットを回収し 80% エタノールを 1 mL 加えボルテックス後、13,000 $\times$ g、15 分、4 $^{\circ}$ C で遠心し得られたペレットを風乾させ、RNase-free water を 40  $\mu$ L 添加し溶解させた。RNA の濃度は 260 nm の吸光度測定にて計測した。RNA 濃度 (ng/ $\mu$ L) は次の式により求められる。RNA 濃度 (ng/ $\mu$ L) =O.D.260 nm $\times$ 40

## Total RNA の精製

DNaseI 処理するため、Total RNA に 10 $\times$ DNaseI Buffer、400 U/mL Ribonuclease inhibitor、200 U/mL DNaseI (タカラバイオ) を添加し、37 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートした。その後、精製するために RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いた。DEPC 処理滅菌水で 2 倍希釈し、 $\beta$ -メルカプトエタノールを添加した Buffer RLT (RNeasy Lysis Buffer) を 350  $\mu$ L を加え、さらに 100% エタノールを 250  $\mu$ L 加えピペッティングした。RNeasy Mini Spin Column に充填して遠心 (13,000 $\times$ g、室温、15 秒) した。その後、Buffer RPE (concentrated wash buffer for use with RNeasy, miRNeasy, and AllPrep Kits) を 500  $\mu$ L 添加し、遠心 (13,000 $\times$ g、室温、2 分) した。RNase-free water を 40  $\mu$ L 添加し、室温で 1 分間静置した後、遠心 (13,000 $\times$ g、室温、1 分) し、精製 Total RNA を得た。RNA の濃度は 260 nm の吸光度測定にて計測した。RNA 濃度 (ng/ $\mu$ L) は次の式により求められる。RNA 濃度 (ng/ $\mu$ L) =O.D.260 nm $\times$ 40

## 逆転写反応

PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ) を用いた。精製した Total RNA に、反応液 [5 $\times$ primer Script RT Master Mix、RNase Free dH<sub>2</sub>O] を添加し、全量を 20  $\mu$ L とした。37 $^{\circ}$ C で 15 分、85 $^{\circ}$ C で 5 秒間反応させ、cDNA を得た。プライマーは Random Primer (タカラバイオ) 及び Oligo (dT) Primer (タカラバイオ) を用いた。

## PCR 反応

逆転写反応産物 1  $\mu$ L に PCR 反応液 [10 $\times$ ExTaq buffer、dNTP mixture (終濃度 0.2 mM)、sence/antisence primer、ExTaq (1U) (タカラバイオ)] を添加して全量を 16  $\mu$ L とした。PCR 反応には TakaRa PCR Thermal Cycler (タカラバイオ) を使い、95 $^{\circ}$ C で 1 分間反応させた後、95 $^{\circ}$ C 30 秒、64 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分のサイクルを 33 回行い、さらにその後 72 $^{\circ}$ C で 3 分間反応させた。陽性対照には whole brain 由来 total RNA の逆転写産物を用いた。目的産物の増幅には下記のプライマーを使用した。増幅した DNA 断片は 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、臭化エチジウム溶液で染色後、TRANSILLUMINATOR (フナコシ) で UV 照射し、撮影した。

<増幅プライマー>

### mouse VNUT

Sence primer 5'-GGTCTGCCAAGGTGTCTAC-3'

Antisence primer 5'-GACTGATAAGGCGGTCGGAG-3'

### mouse VPAT

Sence primer 5'-ACGGAATAAGTACGCTGGGACTTG-3'

Antisence primer 5'-TAGCTGCTGCCCCACTCGAAAC-3'

### mouse G3PDH

Sence primer 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

Antisence primer 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

## ウェスタンブロット法

調製したサンプルに SDS Sample Buffer [1% SDS、10% 2-メルカプトエタノール、50% グリセロール、0.3% EDTA、6% Tris-HCl、1.0 mg/mL BPB] を加え、10% SDS-PAGE で電気泳動した。泳動後のタンパク質をニトロセルロースメンブレンフィルター (pore size 0.45  $\mu$ m、ADVANTEC) に 0.3 A、2 時間、転写した。その後、メンブレンを Blocking Buffer [25 mM Tris-HCl pH 7.4、1 mM EDTA、140 mM 塩化ナトリウム、0.5% BSA] 中で 3 時間振とうした。次に Blocking Buffer に 1000 倍希釈したウサギ抗血清と 2 時間反応させた。反応後、Wash Buffer [25 mM Tris-HCl pH 7.4、1 mM EDTA、140 mM 塩化ナトリウム、0.1% Tween 20] を用いて、15 分 $\times$ 2 回洗浄し、Wash Buffer で 2,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (二次抗体、MP Biomedicals) と 30 分反応させた。反応後、



Wash Buffer で随時 Wash Buffer を交換しながら、2-3 時間洗浄した。最後に、暗室内で ECL kit (GE Healthcare) を用いて発光させ、メンブレンと X 線フィルム (GE Healthcare) を挟んで、抗体のシグナルを検出した。

## **CBB 染色法**

SDS Sample Buffer を添加したサンプルを、10% SDS-PAGE した。泳動後のゲルを CBB 染色液 [5% 酢酸、50% メタノール、0.25% CBB] で 30 分間振とうし、固定液 [10% 酢酸、20% メタノール] で 30 分間振とうした。その後、脱色液 [7% 酢酸、5% メタノール] で随時液を交換しながら脱色した。

## **マウス及びラットの灌流固定**

7 週齢の Wister ラット及び C57BL/6 マウスをジエチルエーテルで麻酔し、腹部・胸部を切開して肝臓・心臓を露出した。左心室に 23G 翼付針および 21G 翼付針を挿入して右心房に切り込みを入れてから、HBSS [10×HBSS (GIBCO) を希釈し、1.26 mM 塩化カルシウム、0.49 mM 塩化マグネシウム、0.83 mM 硫酸マグネシウム、0.35 g/mL 炭酸水素ナトリウム、フェノールレッドを添加して 1×溶液を作製] を灌流し、肝臓が灰褐色になるまで脱血した。脱血後、固定液 [4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク)、0.2% ピクリン酸 (和光純薬) を含む 0.1 M ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) ] を 10 分間灌流して固定した。ラット及びマウスから組織を採取し、固定液に 30 分漬けて追加固定した後、PBS で 10 分間×3 回洗浄した。10%、15%、20% スクロースを含む PBS に 4 時間×2 回ずつ浸漬して脱水した後、O.T.C.compound (SAKURA) に包埋して液体窒素で凍結し、Cryostat 2800 Frigocut-E (Leica) により厚さ 6 μm の凍結切片を作製した。切片はシランコートスライドガラス (DAKO) に採り、30 分間風乾してから染色に使用した。

## **抗原ペプチド発現ベクターの作製**

VGLUT1v 及び VGLUT1 由来の配列に制限酵素サイトを付けた以下のプライマーを用い、VGLUT1v (T106 から E130) 及び VGLUT1 (G509 から Y560) の cDNA 領域を PCR により増幅した。各 PCR 産物及び pGEX4T-2 を H×Buffer 中で、制限酵素 EcoR I (タカラバイオ) と Xho I (タカラバイオ) で制限酵素処理した後、Takara Ligation Kit Ver.2.1 (タカラバイオ) でライゲーションし、pGEX4T-2-VGLUT1v 及び pGEX4T-2-VGLUT1 を得た。

<抗原用ペプチドのアミノ酸配列>

ラット VGLUT1v: T106-E130

VGLIUT1v: TPYRSVHKQEAVTPTVGDIIQGGDTE

ラット VGLUT1: G509-Y560

VGLUT1: GFVGHDLQLAGSDESEMEDEVPPGAPPAPPPSYGATHSTVQPPRPPPP  
VRDY (カルボキシル末端)

<制限酵素サイトを付加したプライマー>

ラット VGLUT1v

Sence primer 5'-ggatccccaggaattcccaccatacaggtctgtc-3'  
EcoR I site

Antisence primer 5'-gatgcgccgctcagtcactcagtatcccctccctg-3'  
Xho I site

ラット VGLUT1

Sence primer 5'-ggatccccaggaattcccggctttgttgccacgac-3'  
EcoR I site

Antisence primer 5'-gatgcgccgctcagtcagttagtcccggacaggggg-3'  
Xho I site

### 大腸菌 C43 への形質転換

1 ng pGEX4T-2-VGLUT1v 及び pGEX4T-2-VGLUT1 に大腸菌 C43 50 µL を加え、30 分氷上に放置した後、42°C 45 秒加温した。その後、SOC 培地 500 µL を加え、37°C 1 時間インキュベーションした後、50 µg/mL アンピシリン添加 LB 寒天培地で 37°C、16 時間培養し、形質転換した C43 大腸菌を得た。

### GST 融合ペプチドの発現と精製

形質転換した C43 大腸菌株を、50 µg/mL アンピシリンを含む LB 培地 1 L 中において 37°C で O.D.600 nm が約 0.5 になるまで培養した。終濃度が 1 mM となるように IPTG を加えてさらに 37°C で 3 時間培養し、目的のペプチドの発現を誘導した。これを 4,000×g、15 分、4°C で遠心して集菌し、沈殿物を Sonication Buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.0、50 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、2 mM PMSF、10 µg/mL ロイペプチン、10 µg/mL ペプスタチン A] に再懸濁して、超

音波破碎法 (TOMY Tip Sonicator UD-200、OUTPUT4、30 秒間×8 回) により破菌した。終濃度が 1% となるように Triton X-100 を加え、氷上に 5 分間静置して可溶化した。これを 40,000×g、4°C、30 分間遠心し、上清を Glutathione Sepharose 4B レジン (GE Healthcare) が 1 mL 入ったカラムに移し、4°C で一晩攪拌して吸着させた。30 mL の PBST [140 mM 塩化ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム、10 mM リン酸水素二ナトリウム、1.8 mM リン酸二水素カリウム、0.5% Triton X-100] で 3 回洗い、20 mM グルタチオンを含む PBS を 10 mL 加えて目的のペプチドを溶出した。

### ウサギ抗血清の作製

抗 VGLUT1 及び抗 VGLUT1v 血清の作製は、GST 融合ペプチドと等容量のコンプリートアジュバント (GIBCO) と等量混合した後、1-2 mg をメスの白ウサギ (約 2 kg) に数カ所皮下注射した。2 週間後同様の操作を繰り返した。さらに 2 週間後、インコンプリートアジュバント (GIBCO) と等量混合した各タンパク質を 1-2 mg をウサギに数カ所皮下注射した。その後は 1 週間おきに同様の操作を行い、半月後に耳の静脈から採血した。これらの血清を用いて、上述の VGLUT1、VGLUT1v 膜画分ならびに脳シナプス小胞膜及び網膜膜画分を用いたウェスタンブロット法により使用可能な程度に抗体価が高まった (相当する分子量付近に反応するバンドが検出できるようになった) 所で、大量に採血した。採血した血液は 37°C で一夜放置し、翌日 10,000×g 10 分遠心して上清を回収し、抗血清を得た。抗血清は分注し -80°C で保存した。

### 間接蛍光抗体法による組織切片の免疫染色

切片を 0.1% TritonX-100 を含む PBS [8.1 mM リン酸水素二ナトリウム、1.5 mM リン酸二水素カリウム、137 mM 塩化ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム] で室温、30 分間処理して脂質膜を可溶化した。続いて 2% ヤギ血清 (GIBCO)、0.5% BSA (シグマアルドリッチ) を含む PBS で室温、30 分間ブロッキングした。抗体は 0.5% BSA を含む PBS で希釈した。一次抗体 100 µL を室温で 1 時間反応させた後、PBS で 5 分間×4 回洗浄して一次抗体を除いた。その後、二次抗体 100 µL を室温で 1 時間反応させ、PBS で 5 分間×7 回洗浄して二次抗体を除いた。Perma Flour Aqueous Mountant (IMMUNON) で切片を封入した後、光学顕微鏡 OLYMPUS BX60 及び共焦点レーザー顕微鏡 OLYMPUS FV300 で観察し

た。光源は Ar レーザーと HeNe(R)レーザー、フィルターは BA510IF、BA550RIF、BA565IF を用いた。各種抗体及び希釈倍率は下記の〈使用した抗体〉に記した。

### 免疫電子顕微鏡法（金増感法）

金増感法は以前に報告された方法に従って行った (Burry et al., 1990; Morimoto et al., 2003; 山本, 2006)。組織を PBS で洗浄した後、小サンプル瓶に移し、4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液で室温、30 分間固定した。固定後、脱水処理し、OTC compound (Sakura FineTek, Tokyo Japan) に封入した。凍結切片 (6 mm) を作成し、シリコン処理したスライド上にマウントした。切片をリン酸緩衝液で 5 分、3 回洗浄した後、0.25% サポニン、5% BSA を含むリン酸緩衝液で室温、30 分間処理した。その後、Blocking Buffer [0.005% サポニン、10% ヤギ血清、0.1% cold water fish skin gelatin (SIGMA)] で 500 倍に希釈した抗 VGLUT1v 抗体を 4°C 一晩反応させ、その後、Wash Buffer [0.005% サポニン、リン酸緩衝液] で洗浄を繰り返した後、金粒子標識 2 次抗体を 2 時間反応させた。その後 Wash Buffer を用いて 6 回洗浄し、1% グルタルアルデヒドで 10 分間固定した。再び洗浄し gold enhancement kit (GoldenhanceEM Nanoprobes, Yaphank 社) を用いて IgG の結合の程度を増強して観察できるように (エンハンス) した。この切片を 1% 酸化オスミウムで 1 時間固定し、超薄切片を作製し、2% 酢酸ウラン水溶液にて室温、1 時間染色した後、鉛染色液 (シグマアルドリッチ) にて 1 分間染色した。日立 H-7100S 電子顕微鏡で観察した。

#### 〈使用した抗体〉

- 一次抗体
- ✚ ウサギ抗ラット VGLUT1v 抗血清 (本研究) : 1000 倍希釈 (間接蛍光抗体法)、500 倍希釈 (免疫電子顕微鏡法)
- ✚ ウサギ抗ラット VGLUT1 抗血清 (本研究、Hayashi et al., 2003b) : 1000 倍希釈 (間接蛍光抗体法)、500 倍希釈 (免疫電子顕微鏡法)
- ✚ ウサギ抗マウス VNUT 抗血清 (Sawada et al., 2008): 500 倍希釈
- ✚ ウサギ抗マウス VPAT 抗血清 (Hiasa et al., 2014): 500 倍希釈
- ✚ モルモット抗 VGAT 抗血清 (Synaptic Systems) : 1000 倍希釈
- ✚ マウス抗 VAMP2 モノクローナル抗体 (Synaptic Systems) : 200 倍希釈
- ✚ マウス抗 Synaptophysin モノクローナル抗体 (Progen) : 50 倍希釈
- ✚ マウス抗 GM130 モノクローナル抗体 (BD Biosciences) : 500 倍希釈

- ✚ マウス抗 VGLUT1 モノクローナル抗体 (Synaptic Systems) : 1000 倍希釈
- ✚ モルモット抗 VGLUT1 抗血清 (Synaptic Systems) : 1000 倍希釈
- 二次抗体
- ✚ Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes) : 500 倍希釈
- ✚ Alexa Fluor 568 標識抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) : 1000 倍希釈
- ✚ Alexa Fluor 568 標識抗モルモット IgG 抗体 (Molecular Probes) : 1000 倍希釈
- ✚ 1.4 nm 金コロイド標識抗ウサギ IgG 抗体 (Nanogold, Nanoprobes) : 500 倍希釈

## タンパク質定量

脂質の多いサンプルや界面活性剤存在下でのタンパク質定量は、Schaffner & Weissmann 法 (Schaffner and Weissmann, 1973) を用いた。サンプルを total volume 300  $\mu$ L になるように蒸留水に加え、ここに SDS Buffer [1 M Tris-HCl pH 8.0、1% SDS] を 30  $\mu$ L 加えた。懸濁後、50% TCA を 100  $\mu$ L 加えて懸濁し、20 分間室温放置した。ニトロセルロースメンブレンフィルター (pore size 0.45  $\mu$ m、ADVANTEC) に吸引濾過し、メンブレンは 5% TCA で洗浄した。メンブレンを Staining solution [0.25% Amido schwarz 10B、メタノール：酢酸：水=9：2：9] で 5 分間染色した。Destaining solution [メタノール：水：酢酸=90：8：2] でバックグラウンドが白くなるまで脱色し、Elution solution [50% (v/v) エタノール、25 mM 水酸化ナトリウム、50  $\mu$ M EDTA] 3 mL で溶出した。数回ボルテックスし、完全に溶出した後、O.D.630 nm で吸光度測定した。

その他のサンプルのタンパク質量は Protein assay kit (BIORAD) を用い定量した。サンプルに蒸留水を加え総量を 800  $\mu$ L とし、protein assay 試薬を 200  $\mu$ L 添加して混和した。室温で 10 分間静置した後、O.D.595 nm で吸光度測定した。標準タンパク質には BSA を用いた。

本研究において膜面分 (X mg)、再構成リポソーム (Y mg) の記載は、いずれもタンパク質量を示しており湿重量ではない。

## データ解析

図 7 はミカエリス・メンテン式\*に当てはめ、カレイダグラフによりプロットした。測定値は、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。有意差は、二群間の比較では

Student's *t* test、多重検定は one-way ANOVA により検定した。後者の post test として Dunnett's test を用いた。統計解析ソフトは GraphPad Prism 6 (MDF) を用いた。*\*P* < 0.05、*\*\*P* < 0.01、*\*\*\*P* < 0.001 で示した。

※ 
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

※ *v*: 反応速度、*K<sub>m</sub>*: 最大反応速度の 1/2 となる基質濃度、*V<sub>max</sub>*: 最大反応速度、[*S*]: 反応時の基質濃度

## 第三章 結果

### Sf9 細胞に発現させた VGLUT1v タンパク質の調製と網膜における VGLUT1v の発現

#### 1. 抗 VGLUT1v 血清及び VGLUT1・VGLUT1v 膜画分の調製と検証

Sf9 細胞に VGLUT1 及び VGLUT1v の cDNA を組み込んだ発現用ウイルスを感染させ VGLUT1 と VGLUT1v タンパク質をそれぞれ発現させ、2 章で記載した方法でそれらを可溶化し精製した。VGLUT1 及び VGLUT1v を検出するために、VGLUT1 と VGLUT1v の抗血清を調製した。図 3 には VGLUT1 及び VGLUT1v 最終標品を SDS-PAGE し、CBB 染色した結果を示した (図 3 左)。その結果、精製 VGLUT1 画分では約 57 kDa に、VGLUT1v 画分では約 65 kDa に強いバンドが検出された。VGLUT1v にはこのバンド以外のタンパク質バンドも染色程度が弱いながら多く見られた。続いて、VGLUT1 及び VGLUT1v を発現させた Sf9 細胞の膜画分をそれぞれタンパク質量として 1  $\mu$ g 及び 10  $\mu$ g を SDS-PAGE し、抗 VGLUT1 血清、抗 VGLUT1v 血清を用いてそれぞれウェスタンブロッティングを行なった (図 3 右)。抗 VGLUT1 血清は VGLUT1 及び VGLUT1v に相当する分子量 (約 57 と 65 kDa) のタンパク質を認識した。この条件下で、反応性には明確な差が認められ、VGLUT1 に相当する位置のタンパク質の方が VGLUT1v に相当するタンパク質に対する反応よりも明らかに強かった。この反応性の違いについては後ほど討論する。

以上の結果から、VGLUT1v cDNA を用いて Sf9 細胞に VGLUT1v が発現したこと、その VGLUT1v を抗 VGLUT1v 血清が認識していることが明らかとなった。

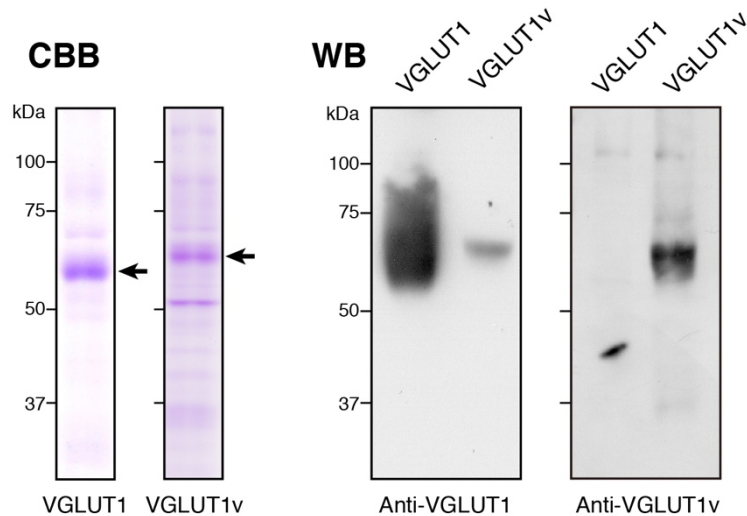


図3 VGLUT1 と VGLUT1v のタンパク質調製及び抗血清特異性の検討

左図: VGLUT1 及び VGLUT1v 精製タンパク質 (各 10  $\mu$ g) を用いて SDS-PAGE (10%) 後 CBB 染色した。矢印; VGLUT1 及び VGLUT1v の泳動位置を示した。

右図: VGLUT1 及び VGLUT1v 膜画分 (VGLUT1: 1  $\mu$ g、VGLUT1v: 10  $\mu$ g、それぞれ全タンパク質量) 及び抗血清 (Anti-VGLUT1、Anti-VGLUT1v) を用いてウェスタンブロッティング (WB) を行った。

## 2. ラット網膜における VGLUT1v の発現

ラット網膜より調製した膜画分に VGLUT1v がタンパク質レベルで存在しているかどうかを抗 VGLUT1 血清及び抗 VGLUT1v 血清を用い、ウェスタンブロッティングにより検証した。対照としてラット脳より調製した粗シナプス小胞画分を用いた。抗 VGLUT1 血清は脳の粗シナプス小胞画分に含まれる一本の強いバンドを認識した (図4左図)。一方、網膜の膜画分においては、抗 VGLUT1 血清は2つのバンド (約 57 kDa と約 65 kDa) を認識した (図4左図)。この2つのバンドのうち、下に検出されたバンドは、脳の粗シナプス小胞画分において検出されたバンドの位置と同程度であった。抗 VGLUT1v 血清を用いウェスタンブロッティングを行った結果、脳のシナプス小胞画分においては陽性のバンドが検出されなかった。その一方で、網膜の膜画分においては強いバンド (約 65 kDa) が検出された (図4中図)。予め抗 VGLUT1v 血清を抗原ペプチドで吸収させ、同様にウェスタンブロッティングを行なった結果、非吸収血清では認識された強いバンドが検出されなかった (図4右図)。



以上の結果は、網膜において VGLUT1v がタンパク質レベルで確かに存在すること、VGLUT1 と VGLUT1v の両タンパク質が存在していることを示している。

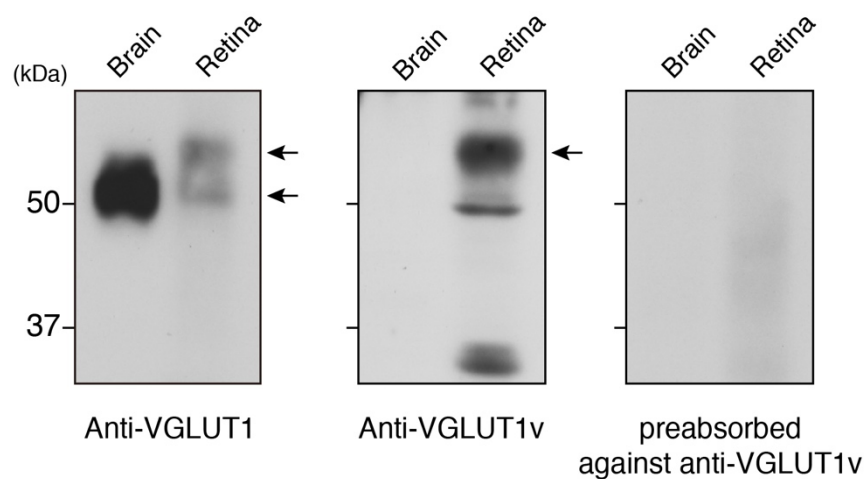


図 4 網膜における VGLUT1v の発現

左図: 脳粗シナプス小胞画分 (10  $\mu$ g) 及び網膜画分 (100  $\mu$ g) を、抗 VGLUT1 血清 (Anti-VGLUT1) を用いてウェスタンブロッティングを行なった。中央図: 同様のサンプルより、抗 VGLUT1v 血清 (Anti-VGLUT1v) を用いてウェスタンブロッティングを行った。右図: 予め抗 VGLUT1v 血清を抗原ペプチドで吸収させ、ウェスタンブロッティングを行なった (preabsorbed against anti-VGLUT1v)。矢印; バンドの検出位置を示した。

### 3. 網膜より調製した粗シナプス小胞画分におけるグルタミン酸輸送活性

網膜において VGLUT によるグルタミン酸輸送活性がみられるかどうかを検証するために、マウス網膜より調製した粗シナプス小胞画分を用いてグルタミン酸輸送活性測定を行なった (図 5)。網膜の粗シナプス小胞画分を含んだ反応液に ATP を添加し 5 分間インキュベートすることにより、網膜粗シナプス小胞画分はおよそ 0.15 nmol/mg protein のグルタミン酸を取り込んだ。この値はラット脳シナプス小胞のグルタミン酸輸送活性のおよそ 40% に相当した (Juge et al., 2010)。VGLUT 活性を阻害する DIDS (Juge et al., 2006) 及び、V-ATPase を阻害することで間接的に VGLUT によるグルタミン酸輸送を阻害する Bafilomycin A1 (Moriyama et al, 1990) を用いてそれぞれ測定した結果、グルタミン酸の取り込み活性は有意に減少した。以上の結果より、網膜における粗シナプス小胞画分には活性のある VGLUT が含まれると結論した。

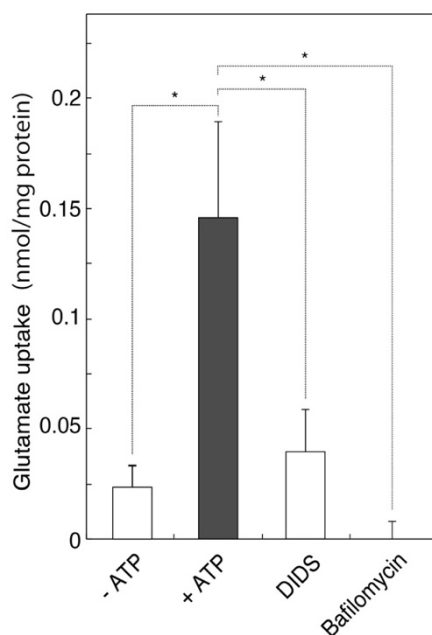


図 5 マウス網膜におけるグルタミン酸輸送活性測定

マウス網膜より調製した粗シナプス小胞 (10  $\mu$ g) を用いて ATP の添加 (+ATP)、不添加 (-ATP) によるグルタミン酸輸送活性を測定した。VGLUT 活性を阻害する DIDS (10  $\mu$ M) と V-ATPase を阻害する Bafilomycin A1 (50 nM) 存在下における輸送活性も測定した (5 分)。n=3。one-way ANOVA により多重検定し、post test として Dunnett's test を用いた。値は平均値 $\pm$ 標準誤差。\* $P < 0.05$ 。

## Sf9 細胞に発現させ調製した VGLUT1v タンパク質を用いた輸送機能

### 1. VGLUT1v のグルタミン酸輸送活性

Sf9 細胞に発現させ、精製した VGLUT1v タンパク質が果たして機能を保持しているかどうかを検証するため、F-ATPase を組み込んだ再構成リポソームを用いて VGLUT1v によるグルタミン酸輸送活性測定を行なった。

ATP の添加により、再構成リポソームはグルタミン酸を取り込んだ (図 6)。一方で、ATP を添加しない場合はこの輸送は大きく減じた。さらに、VGLUT1v が存在しないリポソームに ATP を添加しても、グルタミン酸の取り込みは観察されなかった。従って、VGLUT1v タンパク質と F-ATPase を共に再構成したりリポソームは、ATP 依存的にグルタミン酸輸送を行うと結論した。

次に、グルタミン酸輸送に対するグルタミン酸濃度依存性を検証した (図 7)。VGLUT1v によるグルタミン酸取り込み活性は、ミカエリス・メンテン型を示し、グルタミン酸濃度に依存して増大した。Lineweaver-Burk プロットすると、グルタミン酸に対する  $K_m$  は 1.4 mM、 $V_{max}$  は 83 nmol/min/mg protein であった (表 2)。ATP を添加しない場合においても、グルタミン酸取り込み活性はグルタミン酸濃度に従ってミカエリス・メンテン型で増大していた。この結果は、F-ATPase の能動輸送による駆動力の供給がない状態でも、グルタミン酸の取り込み活性があることを示しており、VGLUT1v の促進拡散 (輸送体を介し、極性分子の輸送を促進する) による活性が反映されたものであると考えられる。なお、同様の活性は解析が進んでいる VGLUT2 においても観察されている (Juge et al., 2006)。

さらに図 8 において、VGLUT1v によるグルタミン酸取り込み活性に対する Evans blue の効果を示した。Evans blue は VGLUTs の強力な阻害剤として知られている (Thompson et al., 2005)。低濃度 (1  $\mu$ M) の添加で VGLUT1v によるグルタミン酸輸送をほぼ完全に抑制した。

以上の結果から、VGLUT1v には他の VGLUTs と同様のグルタミン酸取り込み活性があると結論した。

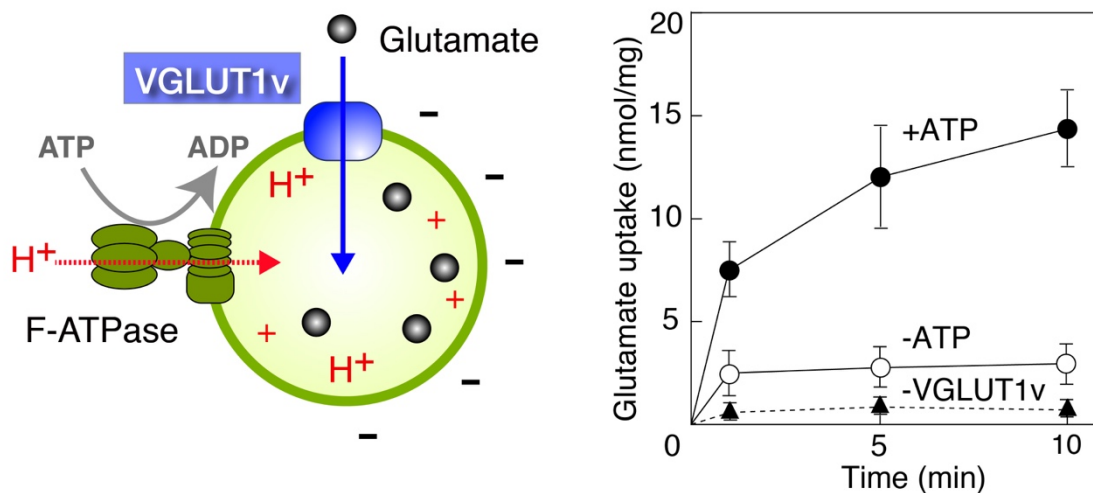


図6 VGLUT1vによるグルタミン酸輸送のタイムコース

左図: F-ATPase 及び VGLUT1v を組み込んだ再構成リポソームにおけるグルタミン酸輸送を模式的に示した。右図: VGLUT1v と F-ATPase を含む再構成リポソームのグルタミン酸輸送のタイムコース。ATP (2 mM) 存在下 (●)、あるいは非存在下 (○) におけるグルタミン酸取り込み活性を測定した (1 分、5 分、10 分)。VGLUT1v をリポソームに再構成していないサンプルを用いて同様に輸送活性を行なった (▲)。値は平均値±標準誤差。n=3。

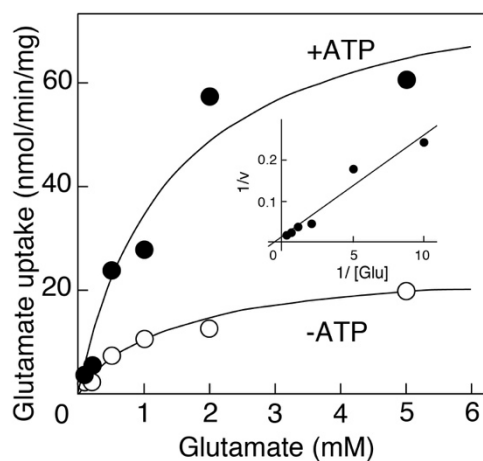


図7 VGLUT1vによるグルタミン酸輸送の濃度依存性

ATP の添加 (●; +ATP)、不添加 (○; -ATP) 時のグルタミン酸輸送活性を測定した (1 分)。それぞれ 0.1、0.2、0.5、1、2、5 mM のグルタミン酸濃度で測定した。Lineweaver-Burk プロットを図内に示した。

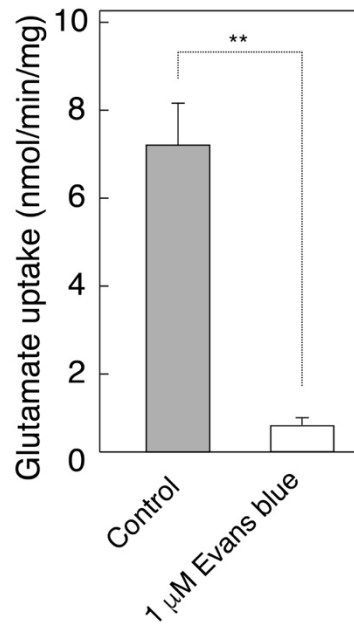


図8 Evans blue によるグルタミン酸輸送の阻害効果

VGLUTs の阻害剤である Evans blue (1 μM) を反応液に添加し、1 分インキュベートした後グルタミン酸輸送活性を測定した (5 分)。n=3。値は平均値±標準誤差。Student's t test により有意差を検定した。\*\* $P < 0.01$ 。

表2 VGLUT 1v の速度論的解析

Transporter	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (nmol/mg/min)
VGLUT1v	1.4	83
VGLUT1	1.3	103
VGLUT2	4.8	120
VGLUT3	1.5	63

図7から得られた VGLUT1v の速度論的パラメーター ( $K_m$ 、 $V_{max}$ ) を示した。VGLUT1、VGLUT2、VGLUT3 に対するパラメーターについても記載した (Juge et al., 2006; 2010)。

## 2. Cl<sup>-</sup>による VGLUT1v の活性制御

VGLUTs に共通し、他のトランスポーターファミリーにはない最も特徴的な性質は、Cl<sup>-</sup>の存在により VGLUTs が活性化することである (Juge et al., 2006; 2010)。VGLUT1v も同様な性質を持つかどうかを検証するため、まず Cl<sup>-</sup>濃度によるグルタミン酸輸送における影響を調べた (図 9)。

反応液中に Cl<sup>-</sup>が存在しない場合、取り込み活性は見られなかった。この取り込み活性は反応液中に 2 mM の Cl<sup>-</sup>を加えると約 40% の活性が見られ、4 mM の Cl<sup>-</sup>で活性が最大となり、その後一定となった。一方、この取り込み活性はカリウムイオノフォアであるバリノマイシンを添加せず、膜電位がない状態では観察されなかった。以上の結果から、VGLUT1v のグルタミン酸輸送は他の VGLUTs と同様に Cl<sup>-</sup>を必要とすることが示された。さらに、この実験系では H<sup>+</sup>の電気化学的勾配のうち膜電位のみが再構成リポソームにかかっていることから、VGLUT1v によるグルタミン酸輸送は他の VGLUTs と同様に、膜電位を駆動力とすることが明らかとなった。

VGLUTs の Cl<sup>-</sup>による活性化は、VGLUTs 上に存在するアニオン結合部位に Cl<sup>-</sup>が結合することで起こるためであり、VGLUTs が Cl<sup>-</sup>を輸送するためではないことが報告されている (Juge et al., 2010; Eriksen et al., 2016)。この点を VGLUT1v でも検証するため、VGLUT アニオン結合部位近傍に結合し Cl<sup>-</sup>による活性化を阻害することが知られている DIDS を用いて (Hartinger and Jahn 1993; Moriyama and Yamamoto, 1995; Juge et al., 2010)、VGLUT1v のグルタミン酸輸送に影響するかどうかを調べた (図 10)。

予め 10 μM の DIDS と反応させ、その後 100 mM の Cl<sup>-</sup>を添加した場合の VGLUT1v によるグルタミン酸輸送活性は、完全に抑制された。続いて、予め 100 mM の Cl<sup>-</sup>と VGLUT1v リポソームを混和し 10 μM の DIDS を添加した場合、DIDS の阻害効果は消失した。10 μM の DIDS 処理をしたリポソームを Cl<sup>-</sup>を添加した Buffer で洗浄した場合、VGLUT1v リポソームのグルタミン酸輸送活性は、ほとんど見られなかった。

以上のことから、VGLUT1v においても DIDS によるグルタミン酸輸送活性の阻害が認められ、予め Cl<sup>-</sup>を加えておくと DIDS による阻害を阻止できることがわかった。

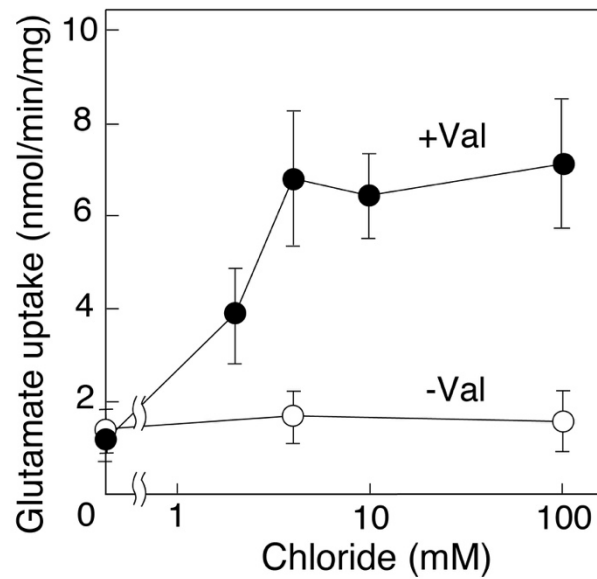


図9 VGLUT1vのグルタミン酸輸送活性におけるCl<sup>-</sup>の効果

VGLUT1vのグルタミン酸取り込み活性に対するCl<sup>-</sup>の効果をも、K<sup>+</sup>の拡散膜電位を利用して測定した。150 mMの酢酸ナトリウムを含む緩衝液で再構成リポソームを作製した。2 μMのバリノマイシンの添加(+Val; ●)、不添加(-Val; ○)によりグルタミン酸の1分後の取り込みを測定した。n=3。値は平均値±標準誤差。

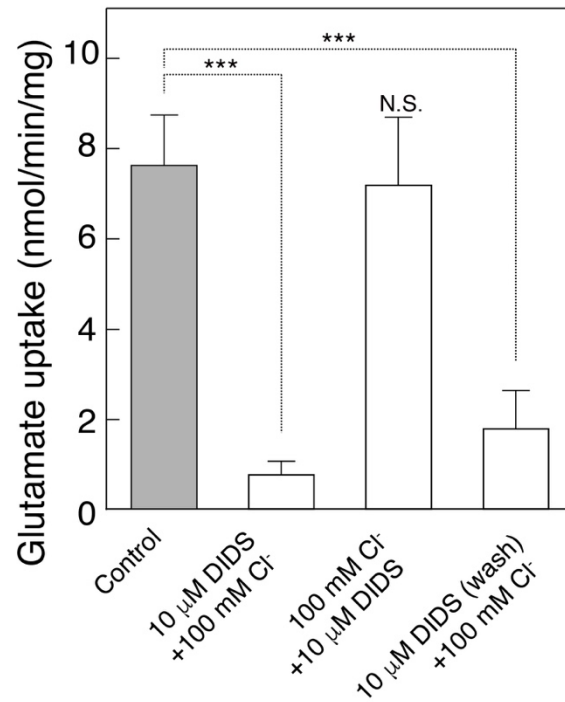


図 10 VGLUT1v における DIDS 阻害と Cl<sup>-</sup> の効果

VGLUT1v を含んだリポソームにバリノマイシンを加え、グルタミン酸輸送を測定した (control; 100 mM Cl<sup>-</sup> 添加による測定)。VGLUT1v を含んだリポソームに 10  $\mu$ M の DIDS を添加し 1 分インキュベートした後バリノマイシンを加え、グルタミン酸輸送を測定した (10  $\mu$ M DIDS + 100 mM Cl<sup>-</sup>)。予め 100 mM の Cl<sup>-</sup> を反応液に加えておき、10  $\mu$ M の DIDS を添加し 1 分インキュベートした後バリノマイシンを加えグルタミン酸輸送を測定した (100  $\mu$ M Cl<sup>-</sup> + 10  $\mu$ M DIDS)。さらに、10  $\mu$ M の DIDS 処理したリポソームを一回洗浄し、100 mM の Cl<sup>-</sup> を反応液に加えた (pre 10  $\mu$ M DIDS(wash) + 100 mM Cl<sup>-</sup>)。それぞれ反応時間は 1 分。n=3。one-way ANOVA により多重検定し、post test として Dunnett's test を用いた。値は平均値 $\pm$ 標準誤差。\*\*\* $P$  < 0.001、N.S.; 有意差なし。



### 3. VGLUT1v による Cl<sup>-</sup> 輸送能

他の VGLUTs と同様に VGLUT1v が Cl<sup>-</sup> を輸送基質としないかどうかを確認した (Juge et al., 2006)。陽性対照として Cl<sup>-</sup> を GABA とともに共輸送する VGAT を用い (Juge et al., 2009)、陰性対照として VGLUT1 およびリポソームを用いた。図 11 に示したように、VGLUT1v、VGLUT1、リポソームにおいてバリノマイシンの添加・不添加に関わらず Cl<sup>-</sup> の輸送は見られなかった。その一方で、VGAT は以前の報告通り、膜電位がない場合の約 2.5 倍の Cl<sup>-</sup> 輸送が確認できた。以上の結果より、VGLUT1v は他の VGLUTs と同様にグルタミン酸輸送に伴う Cl<sup>-</sup> の輸送はないと結論した。

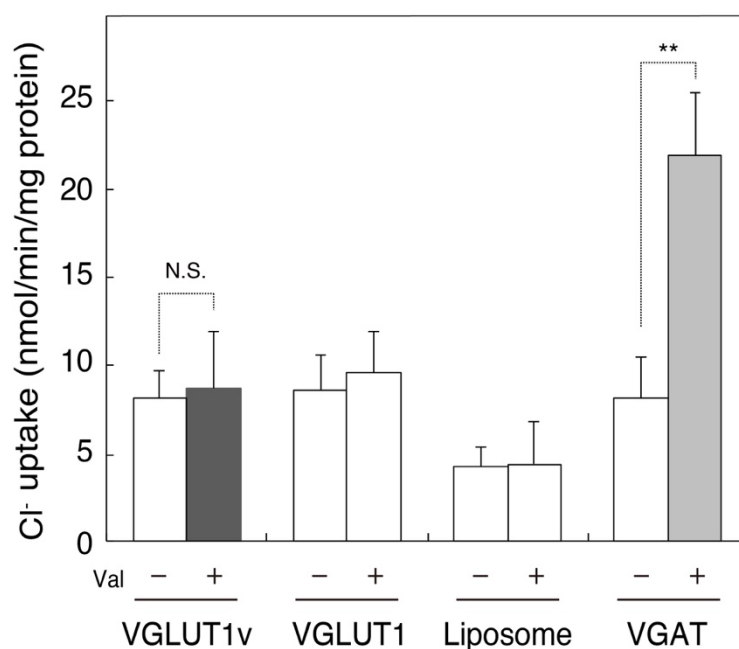


図 11 VGLUT1v による Cl<sup>-</sup> 輸送の検証

陽性対照として Cl<sup>-</sup> を輸送する VGAT を含んだリポソームを用い、陰性対照として VGLUT1 リポソームおよびリポソームを用いた。2  $\mu$ M バリノマイシンの添加 (Val<sup>+</sup>)、不添加 (Val<sup>-</sup>) の場合における 1 分後の放射性 Cl<sup>-</sup> の取り込みを測定した (1 分)。n=3。Student's t test により有意差を検定した。値は平均値 $\pm$ 標準誤差。N.S.; 有意差なし。\*\* $P < 0.01$ 。N.S.; 有意差なし。なお、本実験では VGLUT1、VGLUT1v 及びリポソームでの実験には 10 mM グルタミン酸を、VGAT については 10 mM GABA を加えた。

## 網膜における VGLUT1v の局在

### 1. 免疫組織化学的手法を用いた VGLUT1v の局在解析

これまでの解析から網膜において VGLUT1v タンパク質が存在し、グルタミン酸取り込み活性を持つことが明らかとなったことから、VGLUT1 および VGLUT1v の局在を、間接蛍光抗体法を用いて解析した。

([図 12](#)) は光学顕微鏡を用いて観察した網膜を示した。網膜の全層 (RPE; 網膜色素上皮、OS; 外節、IS; 内節、ONL; 外顆粒層、OPL; 外網状層、INL; 内顆粒層、IPL; 内網状層、GCL; 神経節細胞層) が観察でき、VGLUT1v は主に OPL にシグナルを示した。

次に共焦点顕微鏡を用いて観察した。観察範囲は蛍光強度が強く見られた OPL に焦点を当て、ONL から GCL までとした。抗 VGLUT1 血清により、OPL 及び IPL に陽性シグナルが存在することがわかった ([図 13](#))。この結果は、既に報告された VGLUT1 の局在に関する結果と同じであった ([Mimura et al., 2002](#); [Fyk-Kolodziej et al., 2004](#); [Gong et al., 2006](#))。

その一方で VGLUT1v は先に示した通り、抗 VGLUT1v 血清により、OPL に陽性シグナルが存在することがわかった ([図 13](#))。さらに、免疫前のウサギの血清と予め VGLUT1v の抗原ペプチドで吸収させた吸収抗体を用い免疫染色を行った場合、陽性反応は検出されなかった ([図 13](#))。ウェスタンブロッティングの結果とも合わせると、以上の結果は網膜には VGLUT1v が発現し OPL に局在していることを示している。網膜における VGLUT1v のより詳細な局在を明らかにするために、シナプス小胞マーカである synaptophysin と分泌性のオルガネラマーカである VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2) を用いて、VGLUT1v との二重染色をそれぞれ試みた。[図 14](#) に示すように、OPL において抗 VGLUT1v 血清の陽性反応部位は synaptophysin のそれとマージしていた ([図 14](#))。Synaptophysin は OPL 以外に、特に IPL において発現しており、この近傍の神経末端に存在するシナプス小胞を検出していると考えられる。さらに VAMP2 は、synaptophysin と同様の染色パターンを示した。すなわち、VAMP2 は OPL において VGLUT1v とマージしていた。

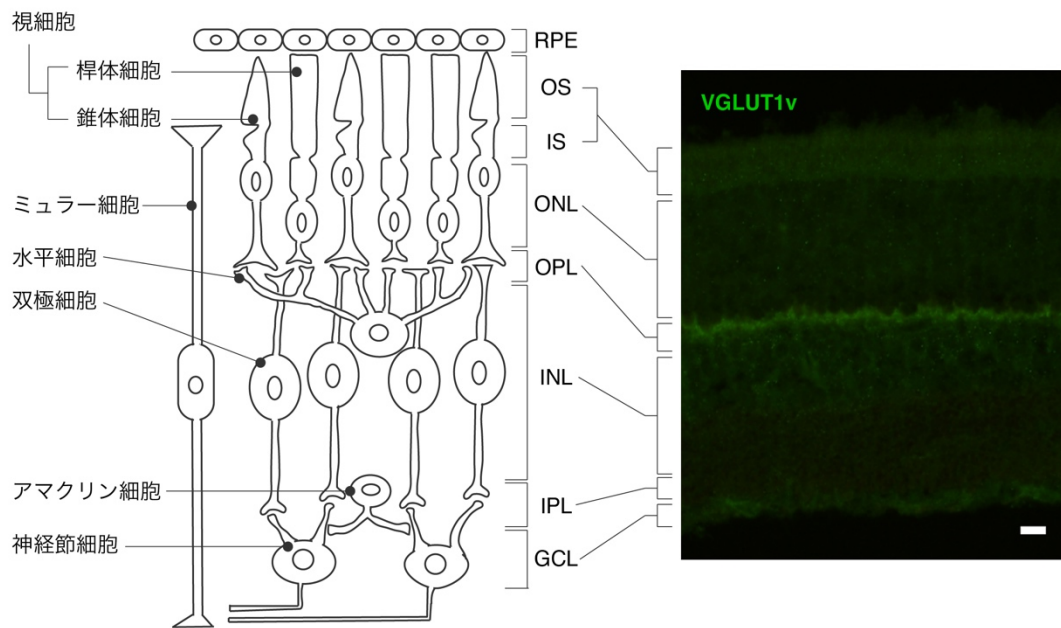


図 12 網膜における VGLUT1v の発現

蛍光顕微鏡を用いて網膜の全体図を観察した。左図に網膜の模式図を示した。網膜は桿体・錐体細胞（視細胞）、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞の5つの神経細胞とミュラー細胞（図には示していないがアストログリアも存在する）等のグリア細胞で構成されている。右図は抗 VGLUT1v 血清を用いて網膜を免疫染色した結果を示した。Bar = 10  $\mu$ m。RPE; retinal pigment epithelium; 網膜色素上皮細胞、OS; Outer segment; 外節、IS; inner segment; 内節、ONL; Outer nuclear layer; 外顆粒層、OPL; Outer plexiform layer; 外網状層、INL; Inner nuclear layer; 内顆粒層、IPL; Inner plexiform layer; 内網状層、GCL; Ganglion cell layer; 神経節細胞層

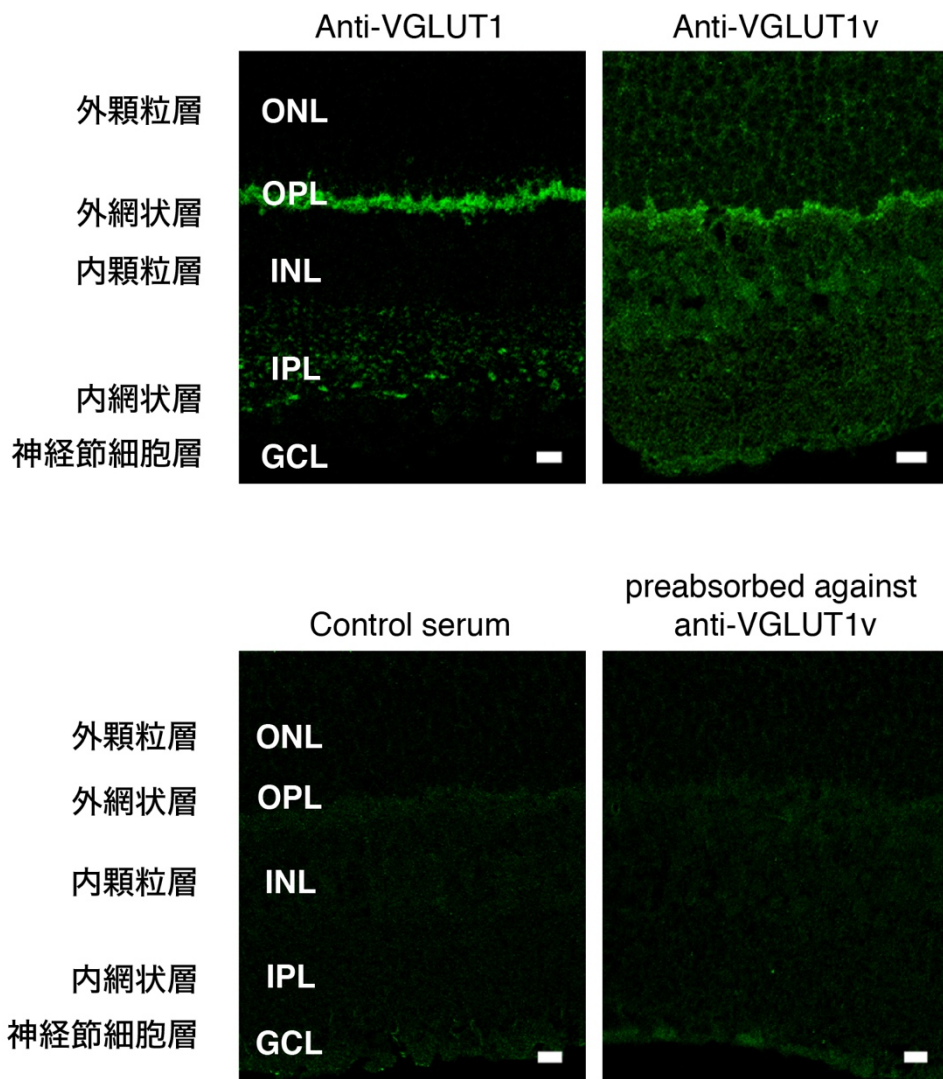


図 13 免疫染色による VGLUT1v の局在

間接蛍光抗体法によりラット網膜を用いて免疫染色を行ない、共焦点顕微鏡を用いて観察した。上段左: 抗 VGLUT1 血清を用いた。上段右: 抗 VGLUT1v 血清による免疫染色。下段左: 免疫前のウサギの血清による染色。下段右: 予め VGLUT1v の抗原ペプチドで吸収させた吸収抗体を用い免疫染色を行った。Bars = 10  $\mu$ m。ONL; Outer nuclear layer; 外顆粒層、OPL; Outer plexiform layer; 外網状層、INL; Inner nuclear layer; 内顆粒層、IPL; Inner plexiform layer; 内網状層、GCL; Ganglion cell layer; 神経節細胞層

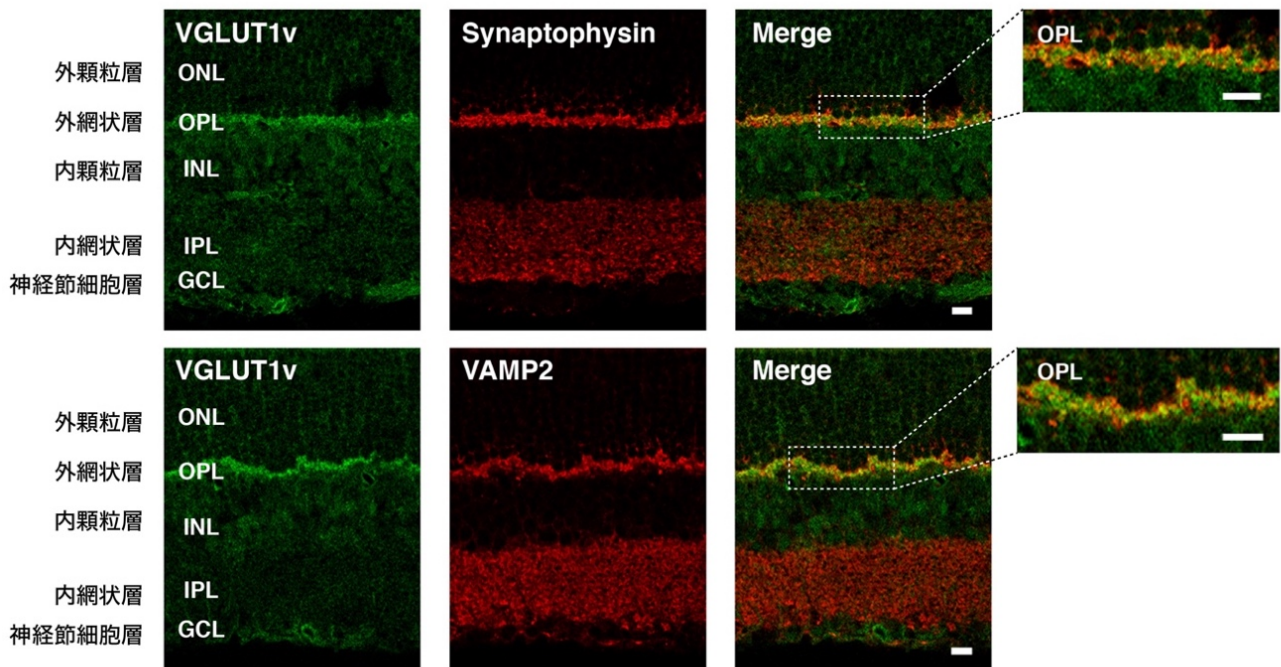


図 14 VGLUT1v と分泌小胞マーカーとの二重染色

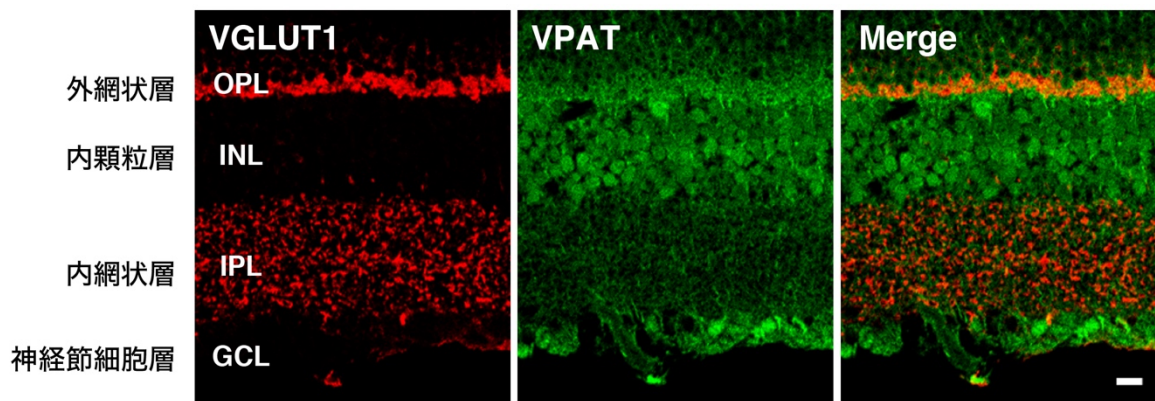
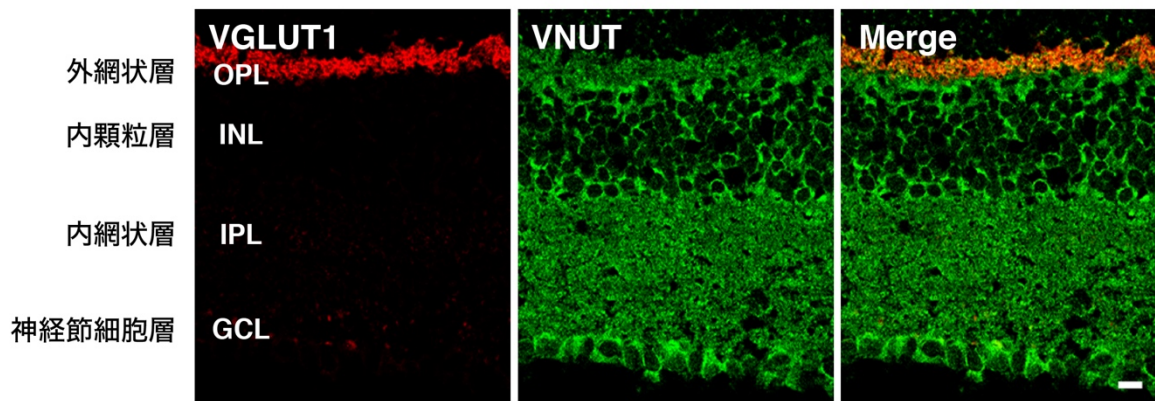
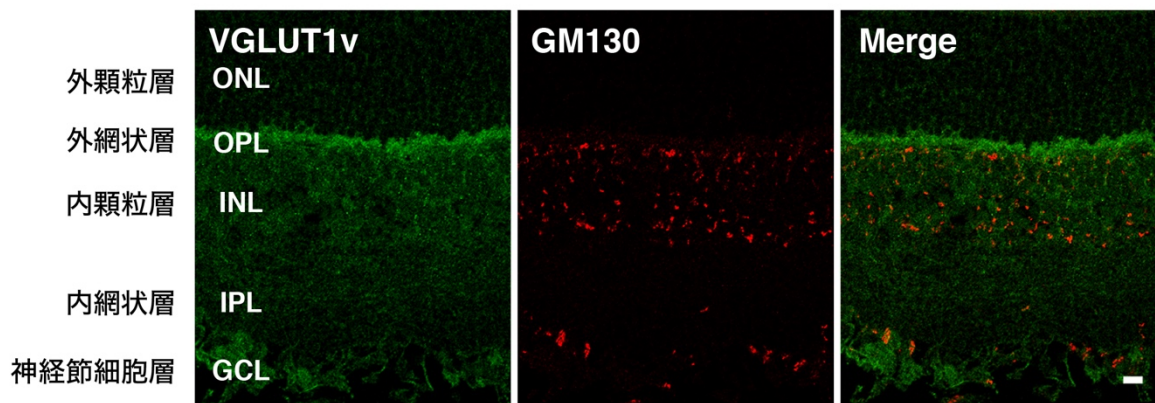
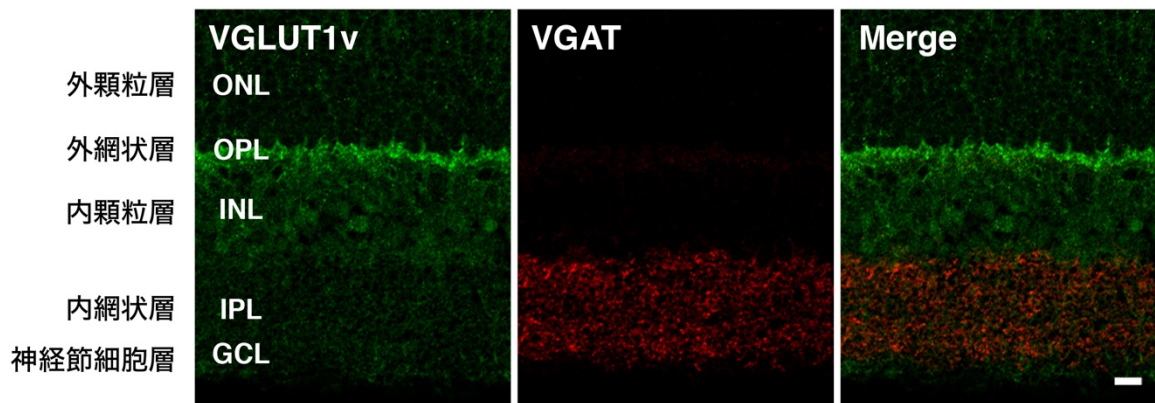
間接蛍光抗体法によりラット網膜を用いて免疫染色を行ない、共焦点顕微鏡を用いて観察した。上段: VGLUT1v (緑) と synaptophysin (赤) との二重染色。下段: VGLUT1v (緑) と VAMP2 (赤) との二重染色。Bars =10  $\mu$ m。ONL; Outer nuclear layer; 外顆粒層、OPL; Outer plexiform layer; 外網状層、INL; Inner nuclear layer; 内顆粒層、IPL; Inner plexiform layer; 内網状層、GCL; Ganglion cell layer; 神経節細胞層

## 2. 他の小胞型神経伝達物質トランスポーターとの共局在

ゴルジ体マーカーである GM130、その他の小胞型神経伝達物質トランスポーター (VGAT、VNUT、VPAT) との二重染色を試みた。抑制性シナプス小胞マーカーである小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) は、網膜の IPL に、GM130 は INL 及び GCL に発現しており VGLUT1v と異なる局在を示した (図 15)。ATP を小胞内に取り込む小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) 及びポリアミンを小胞内に取り込む小胞型ポリアミントランスポーター (VPAT) は、VGLUT1 と一部マージしていた。ATP 及びポリアミンは網膜において神経伝達物質として機能していることが示唆されており、視覚の化学伝達を調節している可能性が考えられている (Biedermann et al., 1998; Permet et al., 2007; Daimond, 2011)。

これらの物質の小胞内蓄積及び分泌に関わる VNUT と VPAT については、これまでに網膜で発現しているかどうかは知られていなかった。従って、網膜における VNUT 及び VPAT の発現に関する結果を補足資料として以下に添付した (補足図 1 及び図 2)。野生型マウスと VNUT ノックアウトマウスの網膜膜面分から Total RNA を抽出し、RT-PCR 法を行なった結果、VNUT (523 bp) を検出した。陽性対照として、マウスの脳から膜面分調製したサンプルを用いた。内在性コントロールには G3PDH (150 bp) を用いた (補足図 1 左)。また、野生型マウスと VNUT ノックアウトマウスの網膜膜面分 (各 30 µg) を用いて抗 VNUT 血清によりウェスタンブロッティングを行なった結果、VNUT のバンド (59 kDa) を検出した。同じメンブレンで synaptophysin も検出した (補足図 1 右)。網膜における VPAT の発現も上記と同様にして行なった (補足図 2)。RT-PCR 法によりマウス網膜サンプルにおいて VPAT (179 bp) を検出した。陽性対照としてマウスの脳から調製したサンプルを用いた。ウェスタンブロット法により、ラット網膜 (膜面分 100 µg) より VPAT のバンド (57 kDa) を検出した。抗 VPAT 血清を VPAT ペプチドに吸収させた後に反応させた結果、VPAT のバンドは検出されなかった。

以上の結果より VNUT 及び VPAT は網膜において確かに発現していることが示された。

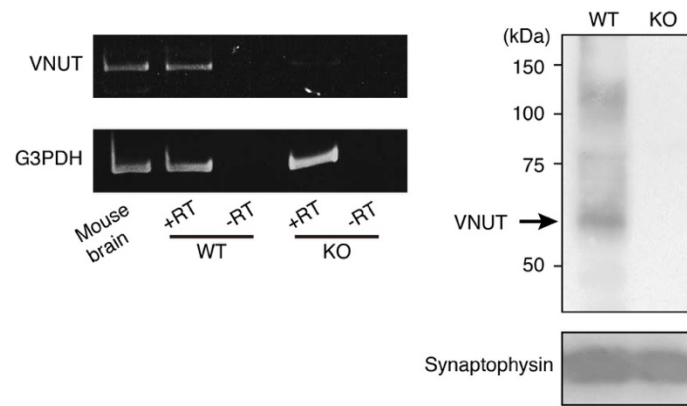


### 図 15 オルガネラマーカ―及び その他の小胞型神経伝達物質トランスポーターとの二重染色

間接蛍光抗体法によりマウス及びラット網膜を用いて免疫染色を行ない、共焦点顕微鏡を用いて観察した。1・2 段目: VGLUT1v (緑) と VGAT (赤) 及び VGLUT1v (緑) と GM130 (赤) との二重染色結果を示した。3・4 段目: VGLUT1 モノクローナル抗体 (赤) と抗 VNUT 血清 (緑) 及び抗 VGLUT1 血清 (赤) と抗 VPAT 血清 (緑) を用いて二重染色を行った。

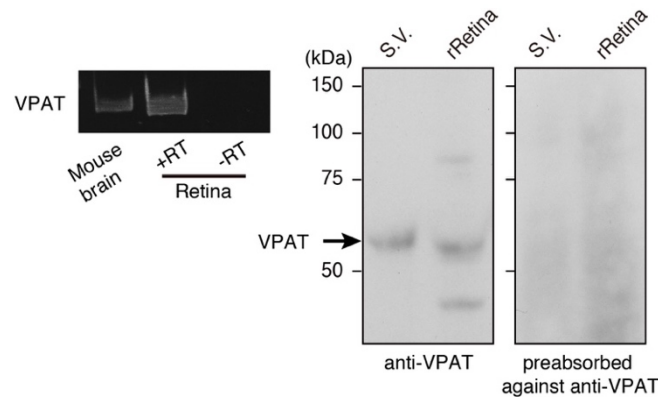
ONL; Outer nuclear layer; 外顆粒層、OPL; Outer plexiform layer; 外網状層、INL; Inner nuclear layer; 内顆粒層、IPL; Inner plexiform layer; 内網状層、GCL; Ganglion cell layer; 神経節細胞層。Bars = 10  $\mu$ m。





補足図 1 マウス網膜における VNUT の発現

左上段: 野生型マウスと (WT) VNUT ノックアウトマウス (KO) の網膜膜画分から Total RNA を抽出し、RT-PCR 法により VNUT (523 bp) を検出した。陽性対照として、膜画分調製したマウスの脳から調製したサンプルを用いた。左下段: 内在性コントロールには G3PDH (150 bp) を用いた。野生型マウスと VNUT ノックアウトマウスの網膜膜画分 (各 30  $\mu$ g) を SDS-PAGE 後、抗 VNUT 血清を用いたウェスタンブロット法により VNUT のバンドを検出した (右上段)。同じメンブレンで synaptophysin も検出した (Moriyama and Hiasa, 2015)。



補足図 2 マウス及びラット網膜における VPAT の発現

左図: RT-PCR 法により網膜において VPAT (179 bp) を検出した。陽性対照としてマウスの脳から調製したサンプルを用いた。右図: 陽性対照にラット脳のシナプス小胞画分を用い、ラット網膜 (膜画分 100  $\mu$ g) のウェスタンブロットティングを行なった。また、抗 VPAT 血清を VPAT ペプチドに吸収させ反応させた (preabsorbed against anti-VPAT)。

### 3. 免疫電子顕微鏡法を用いた VGLUT1v の局在解析

免疫電子顕微鏡法（金増感法）（Burry et al., 1990; Morimoto et al., 2003; 山本, 2006）を用いて VGLUT1v の局在部位をさらに検証した。図 16 に示したように、VGLUT1v は電子密度の低い内腔をもつ小胞に結合していることが確認できた。この視野には小胞の他、ミトコンドリア（M）、300 nm ほどの長さの構造を持つシナプスリボンが観察できた（Sterling and Matthews., 2005）。シナプスリボンとは、視細胞のような非常に速いグルタミン酸放出に関わる神経細胞に存在するオルガネラであり（Gray et al., 1971; Parsons et al., 2003; Sterling and Matthews., 2005）、その周辺にはグルタミン酸を濃縮した多数のシナプス小胞が局在することが知られている。OPL で観察されるシナプスリボンは視細胞由来であり、双極細胞に存在するシナプスリボンは IPL で観察される（Sterling and Matthews., 2005）。従って、この視野で観察したシナプスリボンを有する細胞は視細胞であると結論した。さらに、抗 VGLUT1 血清による電顕結果より、VGLUT1v が小胞に局在していることが確認できた（図 16 上段）。抗 VGLUT1 血清を用いた電顕写真においても、VGLUT1v と同様な結果が得られた（図 16 下段左）。一方で、コントロール血清を用いた電顕写真では、前述したような結合は見られなかった（図 16 下段右）。以上のことから、VGLUT1v は視細胞の小胞に局在すると結論した。

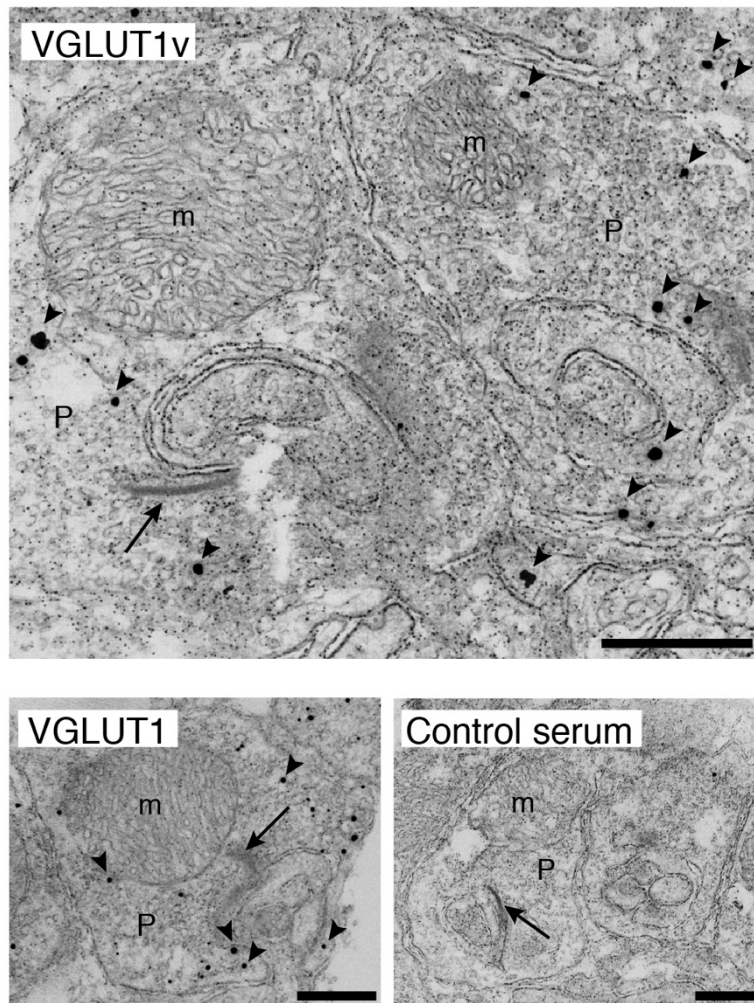


図 16 免疫電子顕微鏡法による VGLUT1 及び VGLUT1v の局在解析

免疫電子顕微鏡法（金増感法）により VGLUT1v 及び VGLUT1 の網膜における局在解析を行った。Control には免疫していない血清を 1 次抗体として用いた。m; ミトコンドリア、P; 視細胞、矢印; シナプスリボン。矢頭; 金コロイドで標識した VGLUT1v 及び VGLUT1 結合部位、Bars = 500 nm。

## その他末梢組織における VGLUT1v の局在

図 4 で示したように脳の粗シナプス小胞画分には抗 VGLUT1v 血清に反応するタンパク質は存在していなかった。このことは、脳において VGLUT1v が発現していないことを示している。間接蛍光抗体法においても、大脳皮質及び海馬において、抗 VGLUT1v 血清は反応せず、VGLUT1v が存在していないとするウェスタンブロッティングの結果を支持していた (図 17)。

また、VGLUT1v が網膜以外の組織に発現しているかどうかは、興味ある問題である。これまで、非神経細胞 (松果体、膵臓のランゲルハンス氏島、破骨細胞) において VGLUT1 が発現していることが報告されているが (Morimoto et al., 2003; 2006; Hayashi et al., 2003a, b)、局在解析において VGLUT1 と VGLUT1v の区別がつかなかったことから、これらの組織に VGLUT1v が発現している可能性が考えられる。そこで膵臓及び松果体を用いて間接蛍光抗体法により解析を試みた。

その結果、ランゲルハンス氏島において  $\alpha$  細胞の一部で VGLUT1 が発現している一方で、VGLUT1v の存在は確認できなかった (図 17)。ランゲルハンス氏島における VGLUT1 の発現は、過去に報告されたものと一致していた (Morimoto et al., 2003)。

松果体細胞では、VGLUT1、VGLUT1v がそれぞれ発現していた (図 17)。松果体細胞における VGLUT1 は、SLMV<sub>s</sub> に局在していることがわかっていることから (Morimoto et al., 2003)、VGLUT1v においても VGLUT1 と同様に SLMV<sub>s</sub> に発現・局在していることが示唆された。

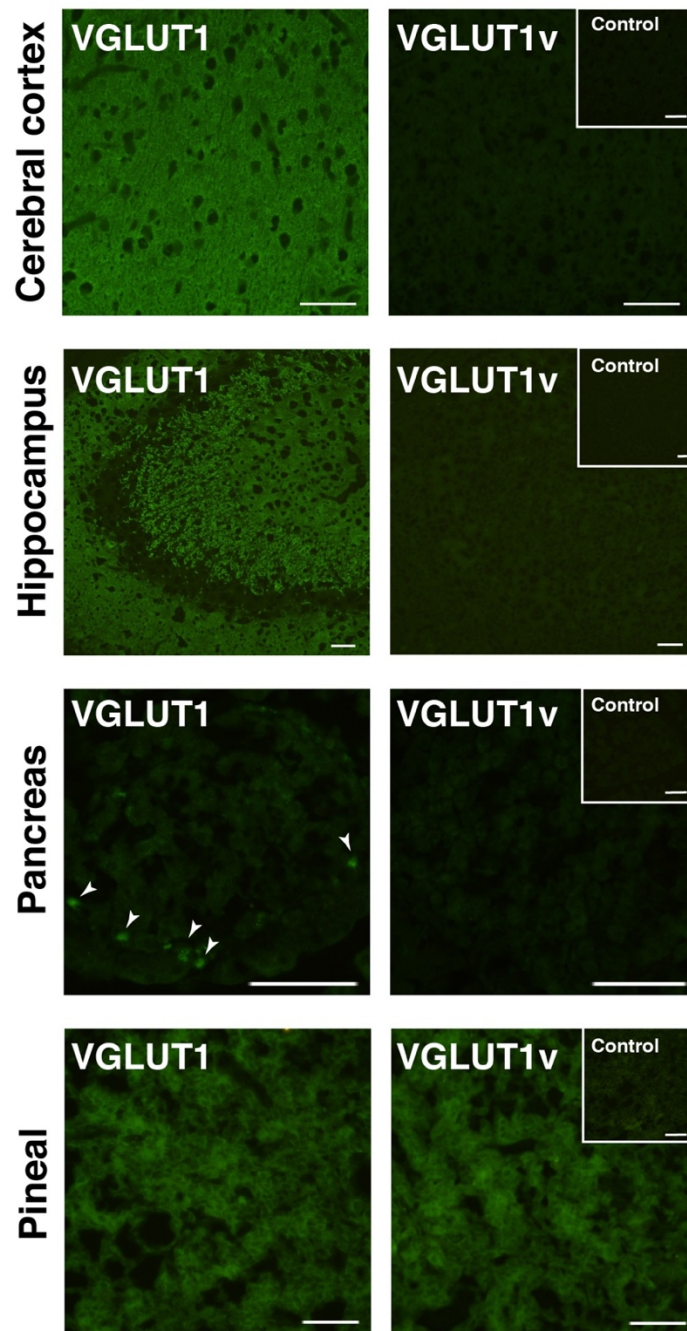


図 17 その他の組織における免疫組織化学的な解析

上段: 大脳皮質切片と海馬切片における VGLUT1 及び VGLUT1v の発現を間接蛍光抗体法により解析した。中段: ランゲルハンス氏島における VGLUT1、VGLUT1v の発現解析結果を示した。矢頭: VGLUT1 発現部位。下段: 松果体を用いて免疫染色を行った。各組織において免疫していない control 血清を用いた。Bars = 50  $\mu$ m。

## 第四章 考察

網膜は目の構成要素の一つであり、種々の神経細胞や支持細胞（ミュラー細胞やアストログリア）が規則正しく配列した層構造を示す（[図 18](#)）。光を受けた視細胞は過分極し、終末からのグルタミン酸放出を減少させる。この信号は双極細胞、神経節細胞と伝達され、中枢へ視覚情報が送り出される。介在ニューロンである水平細胞は視細胞や双極細胞の働きを、GABA を放出することで調節し、アマクリン細胞は神経節細胞の働きを調節していることが言われているが、詳細は不明である（[久野ら, 2005](#)）。網膜におけるグルタミン酸作動性化学伝達は、光を感じ始める生後数日のうち急速に発達するが、VGLUT1 をノックアウトしたマウスの網膜ではその反応が起こらないことが報告されており（[Blankenship et al., 2009](#)）、VGLUT1 は視覚において必須分子であると考えられる。本研究において、小胞型グルタミン酸トランスポーター1 スプライシングバリエント：VGLUT1v の輸送機能及び網膜における局在を解析した。

### ラット VGLUT1 と VGLUT1v の精製と特異抗体の調製について

ラット VGLUT1v を特異的に認識する抗血清を調製し、その特異性を検証するために昆虫細胞発現系により VGLUT1 及び VGLUT1v を前述の通り調製した。VGLUT1 と VGLUT1v はそれぞれ 92 mg、10.1 mg の昆虫細胞膜画分（全タンパク質量）より 0.7 mg、0.12 mg の最終標品（精製タンパク質）が得られており、タンパク質としての回収率はそれぞれ（膜画分のタンパク質量に対して）0.76 及び 1.2% であった。同様の方法で昆虫細胞により発現したラット VGLUT2 膜画分に対する精製タンパク質の回収率は 3% であった（[Juge et al., 2006](#)）。この値と比較すると本研究で得られた VGLUT1 と VGLUT1v の回収率はやや低いものの、発現量や手技とも妥当であることを示している。もっとも、CBB 染色した最終標品を見る限り、VGLUT1 についてはこれまでと同様の純度（夾雑タンパク質がほとんど観察されない）であるのに対し、VGLUT1v ではゲル全体に多数のタンパク質が観察され、明らかに純度が低いと思われる。

抗血清の特異性を検証するために昆虫細胞膜画分を用いた理由は、調製した抗血清が VGLUT1 及び VGLUT1v 以外のタンパク質を認識しないことも同時に確認したかったためである。実際に抗 VGLUT1 血清は VGLUT1 及び VGLUT1v の推定分子量（アミノ酸配列から推定した分子量）とされる位置付近を認識し

た。また、抗 VGLUT1v 血清は VGLUT1v の推定分子量とされる位置を認識する一方で、VGLUT1 に対しては反応しなかった。

図 3 のウェスタンブロット解析において、VGLUT1v を発現した昆虫細胞の膜画分を VGLUT1 のその 10 倍量をアプライしているにもかかわらず、VGLUT1v に対する抗 VGLUT1 血清の反応性が極端に低い。この反応性の差は、昆虫細胞膜における VGLUT1v の発現量が極めて低いためか、抗 VGLUT1 血清の VGLUT1v に対する反応性が何らかの理由で低くなったためではないかと考えられる。VGLUT1 と比較して VGLUT1v 最終標品の回収率に大きな差はないが、精製度が低いことは VGLUT1v の発現量が低いことを示唆している。

VGLUT のような SLC 型トランスポーターは alternative access model によって輸送過程の構造変化が起こると考えられており、ペリプラズム側を開くとともにサイトゾル側を閉じる、あるいはその逆を交互にとるような構造変化が起こるとされている (Kaback et al., 2011)。このことから、ペリプラズム側に相当する内腔側の 25 アミノ酸残基の付加によって、カルボキシル末端の存在するサイトプラズム側のコンフォメーションが大きく変わり、抗血清の反応性が低下した可能性も考えられる。この点は今後、精製した抗体 (IgG) と精製度を上げた VGLUT1v を用いて in vitro で解析することが重要である。さらに、VGLUT1v と強く結合している他のタンパク質により抗原部位がマスクされている可能性も考えられるが、その場合は SDS-PAGE による泳動位置が大きく変わってしまうと考えられる。しかし実際にはそのような現象は見られていない。従って、現時点では、図 3 の抗 VGLUT1 血清によるウェスタンブロットティングの結果(左図)は、昆虫細胞における VGLUT1v タンパク質の発現量が少ないために VGLUT1v に対する抗 VGLUT1 血清の反応性が見かけ上弱く見えたことが最も可能性が高いのではないかと考えている。トランスポーターの発現量は用いているウイルスの感染能や昆虫細胞の品質にも大きく左右される。後述するように純度の高い VGLUT1v はより詳細な機能研究に必要であり、より高純度な VGLUT1v の調製法は今後確立される必要がある。

一方、抗 VGLUT1v 血清は昆虫細胞の雑多な膜タンパク質や VGLUT1v が存在しない脳では反応を示さなかった。従って、この抗血清は十分な特異性を保持しており、これを用いて本研究の目的である VGLUT1v の実在と局在を明らかにすることが可能となった。

## 網膜における VGLUT1v の発現及び局在に関して

抗 VGLUT1v 血清を用いてラット網膜に VGLUT1v が存在するかどうかを検証した。網膜の膜面分を用いてウェスタンブロッティングを行なった結果、抗 VGLUT1 血清では 57 及び 65 kDa 付近にバンドが検出され、抗 VGLUT1v 血清では 65 kDa 付近にバンドが検出された。この反応は抗原タンパク質を用いて事前に抗血清を吸収した血清では見られなかったことから (図 4) 網膜には VGLUT1 および VGLUT1v の免疫学的カウンターパートが存在していることを示している。

VGLUT1 及び VGLUT1v のアミノ酸配列から推定した分子量はそれぞれ約 61.7 k、約 64.3 k であることから、本実験で算出された見かけの分子量の差 (8 k) が推定分子量間の差より大きく、SDS-PAGE による移動度が分子量の差を直接反映していない。このような例は特に V-ATPase のサブユニットや VNUT 等のトランスポーターにはよく観察されており (森山, 1993; Sawada et al., 2008)、VGLUT1 と VGLUT1v に限ったことではない。

ラット網膜を用いた間接蛍光抗体法による解析では、VGLUT1 は OPL、IPL に局在していた。VGLUT1 は視細胞、双極細胞、神経節細胞のシナプス形成層に局在することが報告されている (Mimura et al., 2002; Fyk-Kolodziej et al., 2004; Gong et al., 2006)。一方で、本研究により VGLUT1v は主に OPL に発現していることがわかった (図 12 及び図 13 右)。Nogami らによる *in situ* hybridization 解析では、VGLUT1v mRNA は主に IS に発現していた (Nogami et al., 2006)。従って、本実験結果を合わせると、VGLUT1v mRNA が IS でタンパク質へ翻訳された後、OPL (シナプス部) へ運搬されたと考える事ができる。

抗 VGLUT1v 血清はまた、OPL 以外にも OS/IS や INL に微弱ながら反応することが観察された。VGLUT1v は抗 VGLUT1 血清でも認識されるため、この反応が VGLUT1v の陽性反応であれば抗 VGLUT1 血清で同様な領域を認識するはずである。しかし、抗 VGLUT1 血清ではその領域は認識されていないため、抗 VGLUT1 血清の INL から GCL にかけて弱い蛍光反応は非特異的反応もしくはその他のアーティファクトではないかと考えられる。

もっとも先に討論したように抗 VGLUT1 血清は VGLUT1v を認識しにくい可能性もあり、この領域 (シナプス部以外) に VGLUT1v が存在する可能性を完全に否定することはできない。実際、神経における VNUT はシナプス部のみならず細胞全体に分布していることや (Moriyama et al., 2017)、網膜において VNUT がシナプス部に相当する OPL、IPL 以外の OS/IS に発現していたこと、さらに



INL にも VNUT、VPAT が発現している例がある (Moriyama and Hiasa, 2015; 図 15)。従って図 12 の OS/IS、INL における弱い蛍光も VGLUT1v 陽性シグナルである可能性がある。

免疫電子顕微鏡法では VGLUT1 及び VGLUT1v のより詳細な局在が確認できた。すなわち、電子密度の低い分泌小胞に局在していた。観察視野には視細胞や双極細胞、蝸牛の有毛細胞、松果体細胞に見られるシナプスリボンが存在していた (Sterling and Matthews., 2005; Rutherford 2015; Reuss 2010)。視細胞には桿体細胞と錐体細胞の 2 種類が存在しており、桿体細胞は明るさ、錐体細胞は色に対して感度が高い (藤田ら, 1992)。ヒトでは桿体細胞は約 1 億 2 千万、錐体細胞は約 650 万存在している言われているが、夜行性動物であるマウス、ラットなどの齧歯類、フクロウ、コウモリは視細胞のうちの多くが桿体細胞であり (藤田ら, 1992)、特に齧歯類では視細胞のうち 97% が桿体細胞であることが言われている (Joen CJ et al., 1998)。また、桿体細胞のシナプスは錐体細胞のシナプスと比較するとシナプス部が小さく形態が異なる (Sullivan et al., 2007)。従って、図 16 の VGLUT1 及び VGLUT1v は桿体細胞に局在している可能性が考えられる。さらに、図 14 のシナプス小胞マーカーとの二重染色より VGLUT1v は synaptophysin とマージしていたことから、図 16 で観察された VGLUT1 及び VGLUT1v が結合していた小胞は、シナプス小胞であると考えられる。

### VGLUT1v と他の小胞型トランスポーターとの共局在について

小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) 及び小胞型ポリアミントランスポーター (VPAT) はそれぞれプリン作動性化学伝達ならびにポリアミン作動性化学伝達を支える小胞型神経伝達物質トランスポーターである (Moriyama et al., 2017)。いずれも網膜に発現していた (Moriyama and Hiasa, 2015; 補足図 1 及び補足図 2)。VNUT 及び VPAT は網膜の OPL に局在し、VGLUT1 の局在と一部マージしていた (図 15)。使用した VGLUT1 モノクローナル抗体及び VGLUT1 抗血清は VGLUT1 及び VGLUT1v を認識すると考えられるものであるため、VGLUT1v と VNUT あるいは VPAT が近接して存在している可能性が考えられる。ATP とグルタミン酸は伝達物質として痛覚や聴覚等の感覚受容に重要な働きをしている (Burnstock, 2007; Moriyama et al., 2017; Reichenbach and Bringmann, 2016; Demas and Cline, 2016; Seal 2016)。すなわち、脊髄後角神経 (spinal dorsal horn neuron) には、VNUT と VGLUT3 を含んだシナプス小胞が存在し、それぞれ ATP とグルタミン酸を充填している。その神経末端から分泌される ATP とグ

ルタミン酸により痛覚が中枢に伝えられる (Moriyama et al., 2017; Reichenbach and Bringmann, 2016; Demas and Cline, 2016; Seal 2016)。VPAT の基質であるスペルミンやスペルミジンは神経ないしアストロサイトから分泌され、NMDA 受容体のポリアミン結合部位に結合することでグルタミン酸による化学伝達を増強していることがわかっている (Biedermann et al., 1998; Permet et al., 2007)。従って、本研究の成果をもとに、今後 VNUT と VPAT の局在を VGLUT1v と対比させ、詳細に (電子顕微鏡レベルで) 解析することは、VGLUT1v によるグルタミン酸作動性化学伝達機構がどのように制御されているのかを解明することにつながるものと考えている。

### VGLUT1v のグルタミン酸輸送機能に関して

続いて VGLUT1v が VGLUT としての機能を保持しているかどうかを検討した。本研究では VGLUT のもつ主要な性質のみを検討した。すなわち、①H<sup>+</sup>の電気化学的勾配を利用して VGLUT1v がグルタミン酸を取り込むか?、②その活性に Cl<sup>-</sup>が必要であるか? という 2 点である。その結果、VGLUT1v は①プロトンの電気化学的勾配を利用し VGLUT1v によりグルタミン酸を取り込み、②その活性には Cl<sup>-</sup>が必要であることがわかった。

アニオンチャネル阻害剤である DIDS を用いた実験結果 (図 10) より、VGLUT1v も他の VGLUTs と同様に DIDS によりグルタミン酸輸送が阻害され且つ、Cl<sup>-</sup>結合部位を有することがわかった。DIDS の VGLUT における結合部位については特定されていないが、グルタミン酸輸送が阻害された理由は、Cl<sup>-</sup>結合部位と DIDS 結合部位が同じもしくは近傍に位置し、DIDS が共有結合するためであると考えられている (Harteringer and Jahn, 1993; Moriyama and Yamamoto, 1995; Juge et al., 2006, 2010)。なお、DIDS 結合部位同様に Cl<sup>-</sup>結合部位は未だに特定されていない。DIDS が塩基性アミノ酸残基と共有結合すること、及び DIDS により SLC17 メンバー全てが強く阻害されることから (Sawada et al., 2008; Miyaji et al., 2008; Juge et al., 2010; Iharada et al., 2010; Togawa et al., 2012; 2015)、SLC17 メンバー全てに保存されている TMD 近傍の細胞質側に存在する塩基性残基、例えば TMD9 直前の位置に存在するアルギニン残基がその候補の一つであると推測している (図 19)。今後、これらの部位に変異を導入し DIDS の阻害効果がなくなるかどうか、Cl<sup>-</sup>の活性化効果が変わるかどうかを検証する必要がある。これらの結果が得られれば、さらに放射性 DIDS (<sup>3</sup>[H]H<sub>2</sub>DIDS) を用いて化学修飾しこの部位を特定する等を行う必要があると考えている。

VGLUT1v による Cl<sup>-</sup> 輸送能の検証 (図 11) では、VGLUT1v は VGLUT1 と同様に膜電位が存在する場合においても Cl<sup>-</sup> の輸送はされなかった。これは Cl<sup>-</sup> を基質として取り込まないことを意味し、VGLUT1 及び Juge ら (Juge et al., 2006) の結果も合わせると VGLUT1v は他の VGLUTs と同様に、VGLUT 活性に Cl<sup>-</sup> が必要だが基質としないと考えられる。

以上のことから VGLUT1v は他の VGLUTs と同様のグルタミン酸輸送活性を持つと結論した。

なお、VGAT が Cl<sup>-</sup> を輸送し、VGLUT1v を含む VGLUTs が輸送しないことの意味については現時点では不明である。

### VGLUT1v に挿入された 25 アミノ酸残基に関して

これまで報告された VGLUT1 の発現は、神経以外では松果体細胞の SLMVs、グリア細胞の SLMVs、膵臓ランゲルハンス氏島  $\alpha$  細胞のグルカゴン分泌顆粒、精原細胞のアクロソーム、破骨細胞のトランスサイトーシス小胞に見られ、機能していることが明らかとなっている (Moriyama and Hayashi, 2003; Moriyama and Yamamoto, 2004; Hayashi et al., 2003ab; Morimoto et al., 2003; 2006)。脳、膵臓及び松果体を用いて VGLUT1v が発現しているかどうかを検証したところ、松果体細胞に VGLUT1v が発現していた。先に示した網膜における VGLUT1v の発現結果と合わせると、VGLUT1v は光受容細胞に発現し、VGLUT1v は光受容におけるグルタミン酸作動性化学伝達に関与している可能性が考えられる。

Nogami らは VGLUT1v mRNA が齧歯類に局限されていると報告している (Nogami et al., 2006)。この点を、BLAST 解析により検証した。その結果、現在までに公開された遺伝子配列から解析すると VGLUT1v はやはりラット、マウス、シカネズミ、チャイニーズハムスター、ビーバーなどの齧歯類に限定して発現する VGLUT であることが明らかとなった (図 20)。また、ヒトではゲノム中に Exon 2a に相当する配列は見られなかった (図 21)。VGLUT1v の機能を考えると、このような局限した分布は VGLUT1v あるいは挿入された 25 アミノ酸残基の生理的意義が齧歯類に特有なものであり普遍的なものではないことを示唆している。もっとも、今後遺伝子解析が進み、齧歯類以外の動物にも VGLUT1v が発現する (している) ことが判明する可能性は十分に考えられる。

どのような分子機構により視細胞特異的 (松果体細胞特異的) 選択的スプライシングが起こるのかは興味深い問題である。線虫の *egl-15* 遺伝子は線維芽細胞成長因子 (FGF) 受容体をコードしており、Exon5A と Exon5B との使い分けに

より、2 種の受容体が生合成される。このうち、5A タイプの受容体は筋組織のみで発現しているが、その特異的発現には RNA 結合タンパク質 ASD-1 (alternative splicing defective-1)、FOX1、SUP-12 と *egl-15* 遺伝子のイントロン 4 との相互作用が重要であることが指摘されている (Kuroyanagi et al., 2007)。従って、*vglut1* 遺伝子と視細胞特異的 RNA 結合タンパク質との相互作用により、こうした結果が現れる可能性があると考えられる。実際、網膜特異的に多くの遺伝子が発現していることが知られている (Oshikawa et al., 2011)。

また、VGLUT1v に付加された小胞内部に露出すると推定されている 25 アミノ酸からなるペプチドの機能を考える上で、VMAT2 の TMD1 と TMD2 の間に存在する一つの大きなループ (86 アミノ酸残基) の機能は興味深い。すなわち、VMAT2 はシナプス小胞に存在する G タンパク質と相互作用しており、G タンパク質の活性化により VMAT2 のモノアミン輸送活性が抑制されることは以前から知られていた (Hoeltje et al., 2000)。Brunk らはこの現象を詳細に調べ、その制御の本質は VMAT2 と G タンパク質との相互作用であり、その作用は 86 アミノ酸残基に相当するループ領域が輸送されたモノアミン類の濃度センサーとして機能しているためであることを明らかにした (Brunk et al., 2007)。言い換えれば、VMAT2 が受容体としての機能を持ち、小胞内モノアミン情報を G タンパク質に伝え、未知のシグナル伝達に関わっていることを推定している。VGLUT1v も同様に考えることが可能であり、挿入された 25 アミノ酸残基のループ部分がグルタミン酸濃度センサーとして機能しており、その情報が何らかの機構により視細胞が感知している可能性が考えられる。この可能性を調べるためには、視細胞の分泌小胞において VGLUT1v と相互作用しているタンパク質を同定することが必要であろう。VMAT2 と同様に G タンパク質の一種である可能性も考えられる。

最後に、VGLUT1v が高いグルタミン酸輸送能を持っているのではないかという可能性を推定している。本研究で用いた VGLUT1v は純度の低いものであったが (図 3)、この純度の再構成リポソームでも、VGLUT1 などと比べても遜色のない活性を示している。この結果は、夾雑タンパク質のない純粋な VGLUT1v では高いグルタミン酸輸送活性を示す可能性を示唆している。この推定は VGLUT1v 含有シナプス小胞が速いグルタミン酸伝達を行うシナプスリボン近傍に存在することと符合している。今後、VGLUT1v の精製法を改善し純度の高い VGLUT1v を用いればこの推定の是非は明らかになるだろう。

以上、本研究において VGLUT1v がタンパク質として実在し、VGLUT としての機能を有するトランスポーターであることを実証できた。また、網膜のみならず松果体における VGLUT1v の発現を明確にすることができた。VGLUT1v が発現している動物種は、現時点においても齧歯類のみであることを再確認できた。今後は網膜における VGLUT1v の機能を検討したい。そのためには培養細胞を用いた実験系の確立や、実際にマウス・ラットを用いた行動実験等が必要となってくるだろう。VGLUT1 (VGLUT1v ではなく) ノックアウトマウスもしくはラットを作製し、網膜電図を用いて野生型と電位の変化を比較することも可能だと考えている。その際、マウス・ラットの週齢や生体リズムにも注意を払い、齧歯類における VGLUT1 (VGLUT1v) とは何なのか、齧歯類網膜における VGLUT1 (VGLUT1v) の存在意義を考えたい。

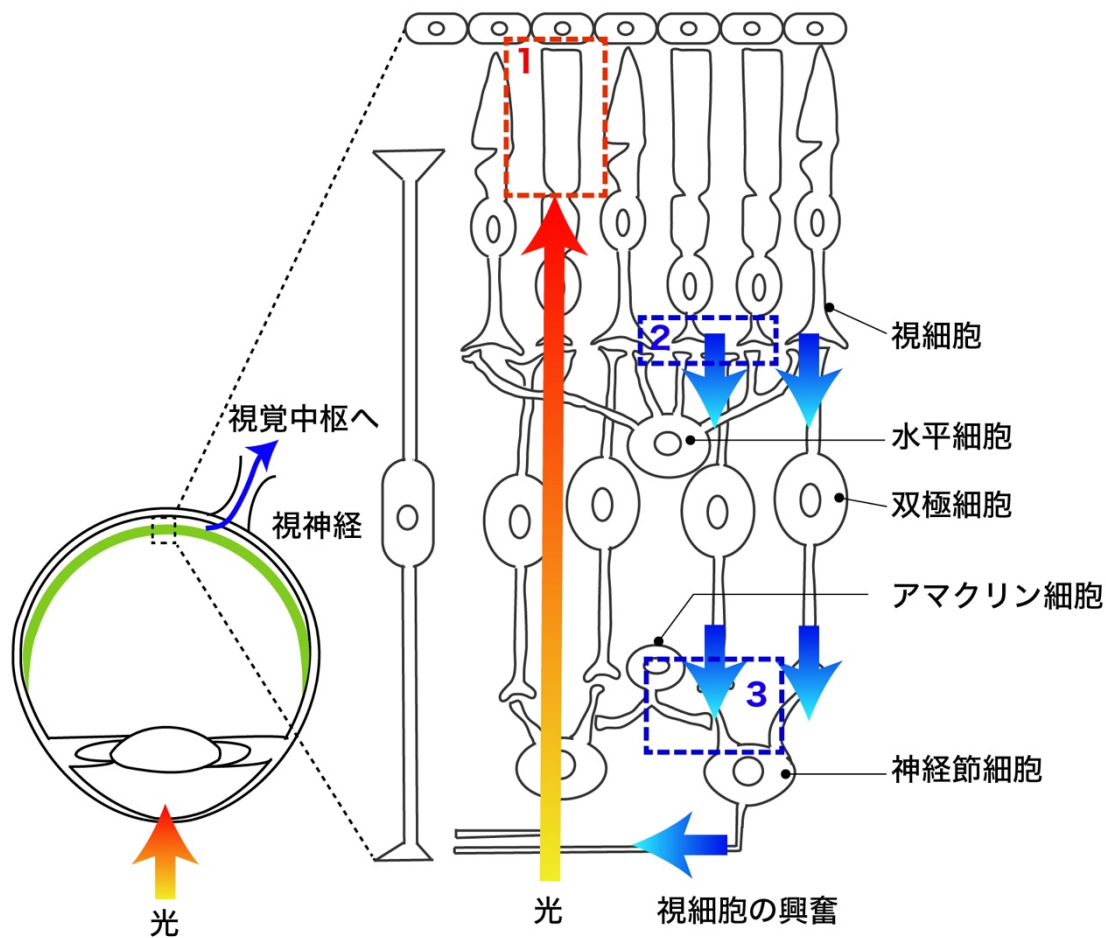


図 18 網膜の視覚情報化学伝達

網膜では、外界から入った光により 1 に示した桿体細胞の円板膜にあるロドプシンが分解され、細胞質基質にある酵素が活性化し cGMP が分解される。その結果、細胞膜の  $\text{Na}^+$  チャネルが閉じ過分極状態となり、終末から放出されるグルタミン酸が減少する。2 で視細胞からの信号を受け、3 で脱分極性及び過分極性の双極細胞がグルタミン酸を放出（興奮・抑制）し、神経節細胞の樹状突起に作用する。これを受け、神経節細胞は興奮・抑制の活動電位を発生し、視神経を通じて脳の視覚領域へと伝達される（藤田ら, 1992; 久野ら, 2005）。色覚を生じるメカニズムはさらに複雑であるとされており、水平細胞が双極細胞や色覚に関わる錐体細胞の働きを調節し、またアマクリン細胞も神経節細胞の働きを調節しているとされている。

SLC17A1_NPT1	-----MQMDNRLPPKVPVGFCSFRYGLSF	24
SLC17A2_NPT3	-----MDGKPTRKGPDFCSLRYLAL	22
SLC17A3_NPT4	-----MATKTELSPTARESKNAQDMQVDETLIPRKVPSLCSARYGAL	43
SLC17A4_NPThomolog	-----MSTGPDVKATVGDISSDGNLNVAQEECSRKGFCSRHGALAL	41
SLC17A5_Sialin	-----MRSFVRLARNDGEESTRPTLLPGAPRAEAAPVCCSARYNLAI	44
SLC17A6_VGLUT2	-----MESVKQRILAPGKGLKNFAGKSLGQIVRVLEKQDTGETIETLEDGKPLEVPERKAPLCDCTCFGLPRRYIIAI	75
SLC17A7_VGLUT1	-----MEFRQEFKRLAGRALGKLRHLLKREQEAGETLELSADGRPVTTQTRDPVVDCTCFGLPRRYIIAI	67
SLC17A8_VGLUT3	MPFKAPDFTFKELKPKGEGKVNAGVDSLGLQKRIKIDGTTTEEDNIELNEEGRPVCTSRPSPPLCDCHCCGLPKRYIIAI	80
SLC17A9_VNUT	-----MTLTSRRQDSQEARPEQAWTG	22
SLC17A1_NPT1	LIVHCCNVIITAQRACLNLTMVVMVNSTDPHGLPNTSTKLLDN-----IKNPMYNSPDIQGITLSSTSYGV	91
SLC17A2_NPT3	ILMFNSFTMITQRVLSIALIAMVNTTQQQLSNASTEGPVADAFNNSSI SIKEPFTKASVYQWSPETQGIIFSSINYGI	102
SLC17A3_NPT4	ILHFCNFTTIAQNVIMNIMVAMVNSTSPQQLNDSSEVLPVDSFGGLSKAPKSLFAKAPVYDWSPIQGIIFGAVGYGG	123
SLC17A4_NPThomolog	ILQLCNFSIYTOQMNLSIALIPAMVNTTAPPSPQNASATERPSTDSQGYWNETLKEFKAMAPAYDWSPEIQGIILSSLNYS	121
SLC17A5_Sialin	LAFPGFPIVYALRVNLGVALVDMVNSNTTLEDNRKSCAPEHSAPIKVHHN----QTGKYQWDAETQGWILGSPFFYGY	119
SLC17A6_VGLUT2	MSGLGFCISFGIRCNLGVAILVDMVNSNTIHRGGKVI-----KEKAKFNWDPETVGMHIGSFFWYG	135
SLC17A7_VGLUT1	MSGLGFCISFGIRCNLGVAILVDMVNSNTIHRGGKVI-----VQKAQFSNDPETVGLIHGSHFFWYG	127
SLC17A8_VGLUT3	MSGLGFCISFGIRCNLGVAILVDMVNSNTIHRGGKVI-----IQTAFNWDPEVGMHIGSFFWYG	140
SLC17A9_VNUT	LLLGLTCLLYCARSSMPICTVSMS-----QDFGNKKEAGIIVLSFFWYG	67
SLC17A1_NPT1	IIIQVPVGYFSGIYSTKMKIGFALCSSLVSLLLIPPAAGIG---VANVVCRAVQGAAGIIVATAQFPIYVKKWAPPLER	168
SLC17A2_NPT3	ILTLIPSGYLAFIFGAKMLGAGLLISSLLTFLTPLAADFG---VILVIMVTVQGMAGQMAWVQPTIWKWAPPLERS	179
SLC17A3_NPT4	ILTMAPSGYLAGRVGTRVVGISLFPATSFLLTCLIPLATDFG---IVLLIVLIVRIVQGLSQQSILGGQPAIWKWAPPLERS	200
SLC17A4_NPThomolog	FLAPIPSGYVAGIFGAKYVVGAGLFISSFLTFLIPLAANAG---VALLIVLIVRIVQGIQVNVLTGQYSIWKWAPPLERS	198
SLC17A5_Sialin	IITQIPGGYVASKIGKMLGPGILGTAVLTLTPAADLGI---VGPLIVLRLALEGLGEGVTPAMHAMWSSWAPPLERS	216
SLC17A6_VGLUT2	IITQIPGGYIASRLAANRVFGAAILTSTLNMFLPSAARVH---YGCVIIVRILQGLVEGVTYPACHGMIWSKWAPPLERS	192
SLC17A7_VGLUT1	IITQIPGGYIQKFAANRVFGAIVATSTLNMFLPSAARVH---YGCVIIVRILQGLVEGVTYPACHGMIWSKWAPPLERS	204
SLC17A8_VGLUT3	IMTQIPGGYISNKAANRVFGAIVATSTLNMFLPSAARVH---YGCVMCVRIQGLVEGVTYPACHGMWSSKWAPPLERS	217
SLC17A9_VNUT	CLTQVVGGHLDGRIGGKVVILLSASAWGSTAVTTPLLAHLSSAHLAFMTFSRILMGLLQGVYFPALTSLSQKVRRESERA	147
SLC17A1_NPT1	RLTSMSTSGFLGPPFIVLLVTGVICESLCPWMPVFIYFGACCGAVCLLWFLVLYDDEKDHPCISISEKEYITSSLVQVQV--	246
SLC17A2_NPT3	KLTTIAGSGSAFGSFIILCVGGLISQALSWPFIYFIFGSGTCVCCLLWFTVIYDFEMHHPICISVREKEHILGSLAQQP--	257
SLC17A3_NPT4	RLCSIALSGMLGCTAILLIGGFISFTLGGWPFYIFGGVGVCCVCLLWFTVIYDFVSYPIPIVAAWIGMVGGYLADF	278
SLC17A4_NPThomolog	QLTITAGSGMLGFSFIVLLAGGLLQCTIGWPFYIFGGVGVCCVCLLWFTVIYDFVFNHPIISAGEKRYIVCSLQADQ--	276
SLC17A5_Sialin	KLLSISYAGAQLGTVISLPLSGIICYNMNNTVYFFPFGTIGIFWFLWILVLSVDTFQKHKRIISHYKEYILSLSQNL--	274
SLC17A6_VGLUT2	RLATTSCGYSAGAVIAMPAGLILVQYTGWSSVFYIYGVSGFMVMYFLLVLSYSEFAKHPTITDEBERRYIESAIGESANL	292
SLC17A7_VGLUT1	RLATTSCGYSAGAVVAMPAGLVLYQYIGWSSVFIYGMFGIYIMFPWLLQAYECPAAHPTISEEERKYIETSIIGEGANV	284
SLC17A8_VGLUT3	RLATTSCGYSAGAVVAMPAGLVLYQYIGWSSVFIYGMFGIYIMFPWLLQAYECPAAHPTISEEERKYIETSIIGEGANV	297
SLC17A9_VNUT	FTYSIVGAGSQGTLLTGAVGSLLEWYQWSTIYFPGSGLTLLWVYRYLLEKDLILALGVLAQSRPVS-----219	219
SLC17A1_NPT1	--SSSRQSLPIKAILKSLPVVAISIGSFTFFWSHNIMTYTTPMPINSMHVNLIKENGFLSSLPYLPAWICGNLAGQLSDF	324
SLC17A2_NPT3	--SSPRAVPIKAMVTCPLPWAIFLGGFSPHFLLCTIILTYLPTYISTLLHVNIRDSGLVSSLPIIAAASCTILGQLADF	335
SLC17A3_NPT4	--GSSKQPLPIKAMLRSLPWSICLGCFSHOWLVSMTVVYIPTYISSVYHVNIRDNGLSALPPIVAAWIGMVGGYLADF	356
SLC17A4_NPThomolog	--CSPQWLPPIRAMIKSLPWAIVSVYFCEWLFYTIMAYTPTYISSVQLANRDSGLLSALPFPVVGICICTILGQLADF	354
SLC17A5_Sialin	--SSQK-SVPPVWPIKSLPLWAIIVAHFNSYNTFYTLTLLPTVMKILRFRNVQENGFLSSLPYLGSWLCCMILSGQADN	351
SLC17A6_VGLUT2	LGAMEKFTPWKRFFTSMPVYAIIVANFCRSWTFYLLLSIQPAYEEVFGFEISKVGMLSAVPHLVMTIIVPIGGQIADF	372
SLC17A7_VGLUT1	MNPLTKFSTPWKRFFTSMPVYAIIVANFCRSWTFYLLLSIQPAYEEVFGFEISKVGMLSAVPHLVMTIIVPIGGQIADF	364
SLC17A8_VGLUT3	VS-LSKFSSTPWKRFFTSMPVYAIIVANFCRSWTFYLLLSIQPAYEEVFGFEISKVGMLSAVPHLVMTIIVPIGGQLADY	376
SLC17A9_VNUT	----RHSRVPWRRLFRKPAVVAAVSQLSAACSFFILLSWLPTFEEETFPDAKG--WLFNVVWPLVAIPASLFSGFLSDH	293
SLC17A1_NPT1	FLTRNLSVIAIRKLFSTAAGFLLPVAVGCLPLSSTFYISIVIFLILAGATGSFCLGQVINGLDIAPRYFYGFIKACSTL	404
SLC17A2_NPT3	LLSRNLLRLITRKLFSSLLGLLPSICAVLPPVASSYVITILLIIPGTSNLCDSGFIINTLDIAPRYASFLMIGISRG	415
SLC17A3_NPT4	LLTKKFR-LITRKLFATILGSLPSSALVSLPYLNSGYITATALITSCGLSFLCQSGIYINVLDIAPRYASFLMIGASRG	435
SLC17A4_NPThomolog	LLSRKILLRLITRKLFATIGVLPSSVILVSLPWRSSHSMTMFLVLSAASSFCESGALVNLDIAPRYTGFGLKGLQV	434
SLC17A5_Sialin	LRAKNWFSFTRRREFSLIGMIGPAVFLVAGFICGDIYSLAVAFLLITSTLGGFCSSSGFISNHLDIAPRYAGLILGITNT	431
SLC17A6_VGLUT2	LRSKQLSTTTVRLKLMNCGFGMEATLLLIVVGFY-HTRGVAISPLVAVGFGSFAISGFNVNHLDIAPRYASILMGIISNG	443
SLC17A7_VGLUT1	LRSRRLMSTTVRLKLMNCGFGMEATLLLIVVGFY-HSKGVAISPLVAVGFGSFAISGFNVNHLDIAPRYASILMGIISNG	451
SLC17A8_VGLUT3	LRSRRLMSTTVRLKLMNCGFGMEATLLLIVVGFY-HTRGVAISPLVAVGFGSFAISGFNVNHLDIAPRYASILMGIISNG	455
SLC17A9_VNUT	LIN-QYRAITVRLKLMQGMGLGSSVFALCLGHT--SSFCESVFPASASIGLOTFNHSGISVNIQDLPASCSAGFLPGVANT	371
SLC17A1_NPT1	TGMIGGIIASTLTGLIILKQDPRESAWFKTFLILMAAINVTGLIFYLIVATARIQDWAKEKQHTRL-----467	467
SLC17A2_NPT3	FGLIAGIISSTATGFLISQDFESGWRNVFLSAVNMFGLVFLYTFGQALQDWAKERTLTRL-----478	478
SLC17A3_NPT4	FSSIAPIVIVPTVSGFLSODPEFGWRNVFLLFAVNLGLLFLYIFGAEADVQWAKERTLTRL-----498	498
SLC17A4_NPThomolog	FAHIAGAISPTAAGFISQDSEFGWRNVFLSAVNIISGLVFLYIFGRADVQWAKEQTFTHL-----497	497
SLC17A5_Sialin	FATIPGMGVPIAKSLTPDNTVGEWQTFYIAAIVNFCVCAIFFLFAKGEVQWALNDHGHRRH-----495	495
SLC17A6_VGLUT2	VGTLGSMVCPPIIVGAMTKNKREEWQYVFLIAALVHYGGVI FYAIFASGEKQWADPEETSEEBKCGPIHDEBLDBEETGDI	523
SLC17A7_VGLUT1	VGTLGSMVCPPIIVGAMTKKHTRREEWQYVFLIASLVHYGGVI FYGVFASGEKQWADPEEMSEEBKCGPIHDDQLAGSDDBE	523
SLC17A8_VGLUT3	VGTLGSMVCPPIIVGAMTRHKTREEWQYVFLIAALVHYGGVI FYGVFASGEKQWADPENLSEEBKCGPIHDDQLAEEIIBLN	535
SLC17A9_VNUT	AGALAGVGVGCLGGLMKTTG--SWTCFLFNVAIISNLGLCTFLVFGQAQRVDLSSTHEDL-----430	430
SLC17A1_NPT1	-----467	467
SLC17A2_NPT3	-----478	478
SLC17A3_NPT4	-----498	498
SLC17A4_NPThomolog	-----497	497
SLC17A5_Sialin	-----495	495
SLC17A6_VGLUT2	TONYINYGTTKSYGATTOANGGWPSGWEKKEEFPVQGEVODSHSYKDRVDYS---	582
SLC17A7_VGLUT1	MEDEAEPPGAPPAPPPSYGATHSTFQPPRPVPRDY-----560	560
SLC17A8_VGLUT3	HESFASPKKMSYGATSONCEVQKKEWKGQRGATLDREELTSYQNEERNFSTIS	589
SLC17A9_VNUT	-----430	430

図 19 SLC17 ファミリーのアミノ酸配列

Sawada et al., 2008 の Supplemental Fig.S2 を使用した。赤枠: 全てのアミノ酸配列に共通すること、TMD 以外のアミノ酸残基であること (結合しやすい箇所)、塩基性残基である箇所を示した。\*は SLC17 ファミリー全てに保存されている残基を示した。

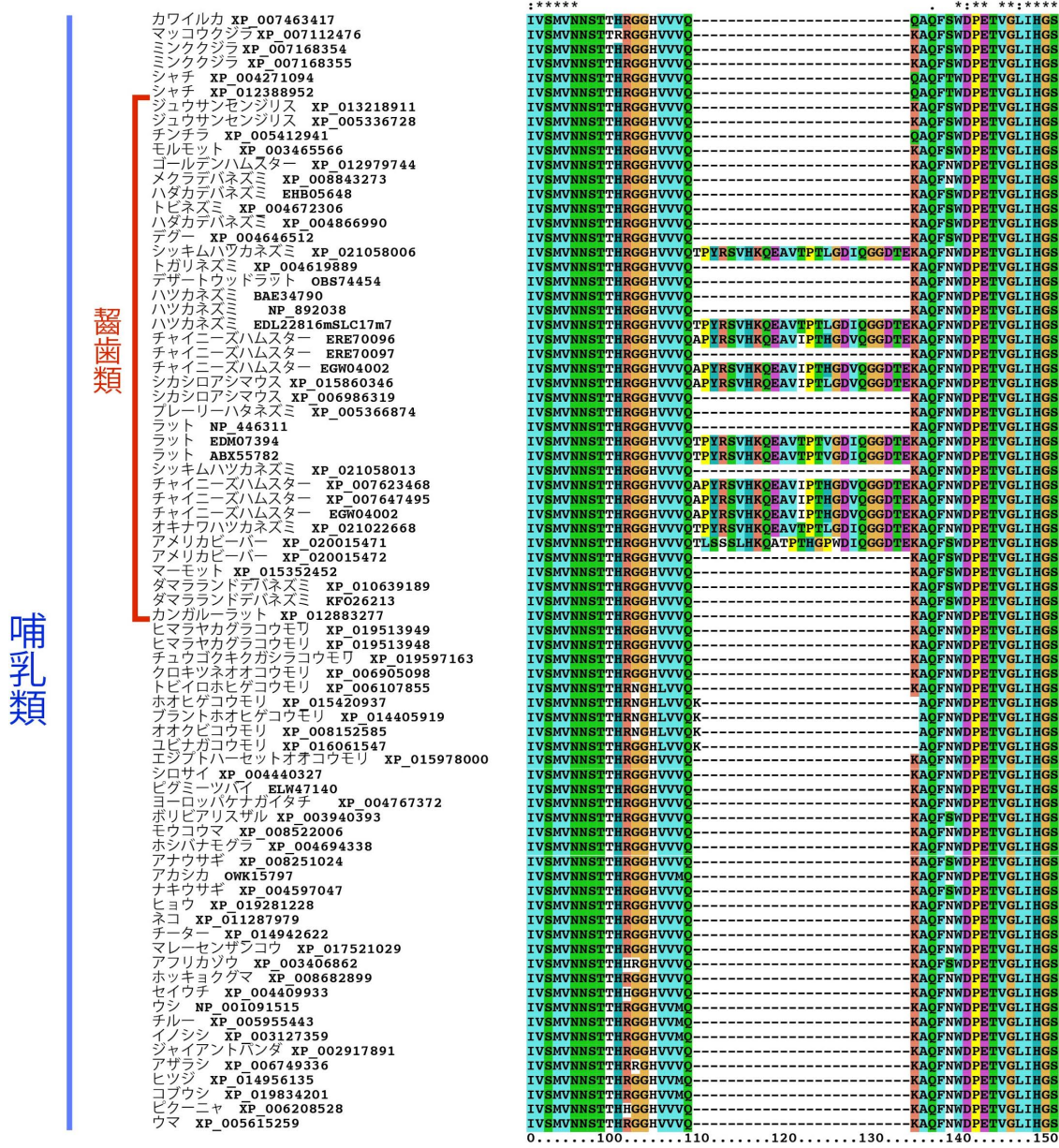


図 20 VGLUT1v を持つ動物

ラット VGLUT1 mRNA の配列を用いて脊椎動物の配列データベースを BLAST 検索し (Non-redundant) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), Clustal X Ver.2.0.12 によりアライメントした。TMD1-2 間のループ領域の配列を示した。“\*”は脊椎動物で完全に保存されている残基を示す。“.”と“.”は類似性のある置換残基を示す。次ページに続く。





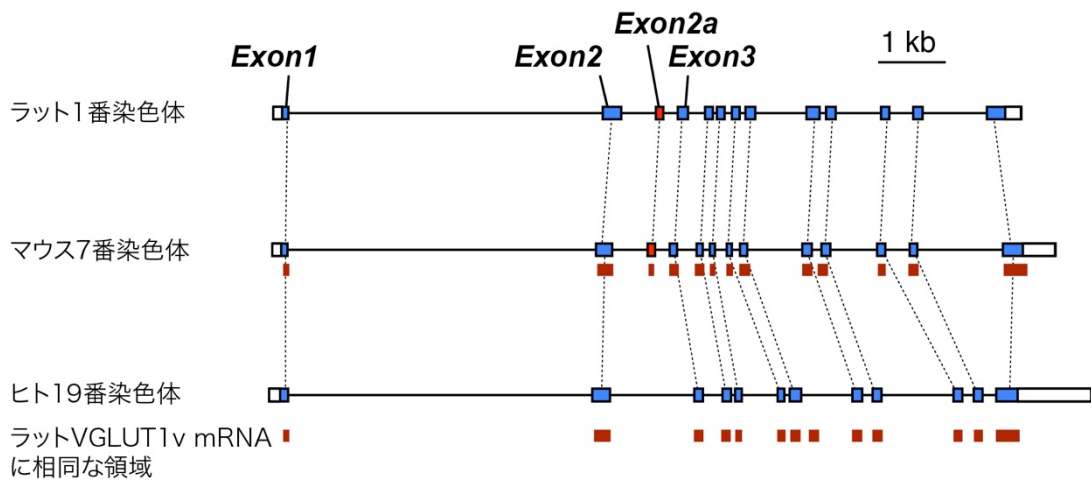


図 21 齧歯類とヒトにおける *vglut1* 遺伝子の Exon/Intron 構造

ラット、マウス、ヒトの *vglut1* 遺伝子の構造を示した。BLAST 解析によりヒットしたラット VGLUT1v mRNA に相同する領域を赤いバーで示した。VGLUT1v の特徴である 25 アミノ酸残基は Exon 2a に相当する。Exon 2a は齧歯類にのみ挿入されていた。ヒトゲノム中には該当する領域は存在しなかった。

## 第五章 結語

本研究は、齧歯類特異的に発現する VGLUT1v mRNA が、タンパク質として存在することを実証し、昆虫細胞発現系において VGLUTs と同様の機能を有するか、また、網膜における VGLUT1v の詳細な局在を解明することを目的とした。その結果、VGLUT1v は、VGLUTs と同様のグルタミン酸輸送機能を有すること、ラット網膜の視細胞の分泌小胞に局在していること、光を感受するもう一つの細胞である松果体において発現していることを明らかにした。

本研究の成果は、①VGLUTs メンバー（アイソフォームとバリエーション）の構造と機能的差異を明らかにすること、②VGLUT1v の光情報伝達における意義を解明すること、以上2点において今後有益な基礎的知見となり得るものと考えられる。

## 引用文献

Abramson J, Smimova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* **301**: 610-615.

Amara SG, Fontana AC. (2002) Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* **41**: 313-318.

Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT, Edwards RH. (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **289**: 957-960.

Biedermann B, Skatchkov SN, Brunk I, Bringmann A, Pannicke T, Bernstein H, Faude F, Germer A, Veh R, Reichenback A. (1998) Spermine/spermidine is expressed by retinal glial (Mueller) cells and controls distinct K<sup>+</sup> channels of their membrane. *Glia* **23**: 209-220.

Blankenship AG, Ford KJ, Johnson J, Seal RP, Edwards RH, Copenhagen DR, Feller MB. (2009) Synaptic and extrasynaptic factors governing glutamatergic retinal waves. *Neuron* **62**(2): 230-241.

Brunk I, Blex C, Rachakonda S, Holtje M, Winter S, Pathner I, Walther DJ, Ahnert-Hilger G. (2006) The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake. *J. Biol. Chem.* **281**: 33373-33385.

Burnstock G. (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* **287**: 659-797.

Burry RW, Vandr  DD, Hayes DM. (1992) Silver enhancement of gold antibody probes in pre-embedding electron microscopic immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem.* **40**(12): 1849-1856.

- Deman J, Cline HT. (2007) The blu Blur: mutation of a vesicular glutamate transporter reduces the resolution of zebrafish vision. *Neuron* **53**: 4-6.
- Diamond JS. (2011) Calcium-permeable AMPA receptors in the retina. *Front. Mol. Neurosci.* **4**: 27.
- Edwards RH. (2007) The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* **55**: 835-858.
- Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ. (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11658-11662.
- Erickson JD, Varoqui H, Schaefer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E, Rand J, Eiden LE, Bonner TI, Usdin TB. (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a “cholinergic” gene locus. *J. Biol. Chem.* **269**: 21929-21932.
- Eriksen J, Chang R, McGregor M, Silm K, Suzuki T, Edwards RH. (2016) Protons regulate vesicular glutamate transporters through an allosteric mechanism. *Neuron* **90**: 768-780.
- Fagg GE, Foster AC. (1983) Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* **9**: 701-719.
- Freneau RT, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudjry FA, Edwards R. (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 14488-14493.
- Freneau RT, Voglmaier S, Seal RP, Edwards R. (2004a) VGLUTs define subset of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* **27**: 98-103.

- Freneau RT, Kam T, Qureshi T, Johnson J, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Nicolle RA, Edwards R. (2004b) Vesicular glutamate transporter 1 and 2 target functionally distinct synaptic vesicle release sites. *Science* **304**: 1815-1819.
- Fyk-Kolodziej B, Dzhagaryan A, Qin P, Pourcho RG. (2004) Immunocytochemical localization of three vesicular glutamate transporters in the cat retina. *J. Comp. Neurol.* **475**: 518-530.
- Gasnier B. (2004) The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers Arch* **447**: 759-759.
- Greer CL, Crygoruk A, Patton DE, Ley B, Romero-Calderon R, Chang H-Y, Houshyar R, Bainton RJ, DiAntonio A, Krantz DE. (2005) A splice variant of the Drosophila vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in storage of dopamine, serotonin and octopamine. *J. Neurobiol.* **64**: 239-258.
- Gong J, Jellali A, Mutterer J, Sahel JA, Rendon A, Picaud S. (2006) Distribution of vesicular glutamate transporters in rat and human retina. *Brain Res.* **1082**: 73-85.
- Gray EG. (1971) On understanding the organization of the retinal receptor synapses. *Brain Res.* **35**(1):1-15
- Hackett JT, Ueda T. (2015) Glutamate release. *Neurochem. Res.* **40**: 2443-2460.
- Hartinger J, Jahn R. (1993) An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* **268**: 23122–23127.
- Hayashi M, Otsuka M, Morimoto R, Hirota S, Yatsushiro S, Takeda J, Yamamoto A, Moriyama Y. (2001) Differentiation-associated Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNP1) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. *J. Biol. Chem.* **276**: 43400-43406.

- Hayashi M, Yamada H, Uehara S, Morimoto R, Muroyama A, Yatsushiro S, Moriyama Y. (2003a) Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* **278**: 1966–1974.
- Hayashi M, Morimoto R, Yamamoto A, Moriyama Y. (2003b) Expression and localization of vesicular glutamate transporters in pancreatic islets, upper gastrointestinal tract, and testis. *J. Histochem. Cytochem.* **51**: 1375-1390.
- Hayashi M, Otsuka M, Morimoto R, Muroyama A, Uehara S, Yamamoto A, Moriyama Y. (2003c) Vesicular inhibitory amino acid transporter is present in glucagon-containing secretory granules in  $\alpha$ TC6 cells, mouse clonal  $\alpha$ -cells of islets of Langerhans. *Diabetes* **52**: 2066-2074.
- Herzog E, Gilchrist J, Gras C, Muzerelle A, Ravassard P, Giros B, Gaspar P, El Mestikawy S. (2004) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* **123**: 983–1002.
- Hiasa M, Miyaji T, Haruna Y, Takeuchi T, Harada Y, Moriyama S, Yamamoto A, Omote H, Moriyama Y. (2014a) Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Sci. Rep.* **4**: 6836.
- Hiasa M, Togawa N, Miyaji T, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. (2014b) Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol. Rep.* **2**: e12034.
- Hiasa M, Togawa N, Moriyama Y (2014c) Vesicular nucleotide transporter: a brief history and the vesicular nucleotide transporter as a target for drug development. *Curr. Pharm. Des.* **20**: 2745-2749.
- Hollmann M, Heinemann (1994) Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* **17**: 31-108.

- Hoeltje M, von Jagow B, Pahner I, Lautenschlager M, Hoertnagl, Nuernberg B, Jahn R, Anhert-Hilger G. (2000) The monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimetic GTPase Go2. *J. Neurosci.* **20**: 2131-2141.
- Huang Y, Lemieux M, Song J, Auer M, Wang DN. (2003) Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from *Escherichia coli*. *Science* **301**: 616-620.
- Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, Hiasa M, Anzai N, Omote H, Moriyama Y. (2010) Type I sodium-phosphate transporter (SLC17A1 protein) is a Cl<sup>-</sup>-dependent urate exporter. *J. Biol. Chem.* **285**: 26107-26113.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J. Neurosci.* **18**: 8936-8946.
- Juge N, Yoshida Y, Yatsushiro S, Omote H, Moriyama Y. (2006) Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J. Biol. Chem.* **281**: 39499-39506.
- Juge N, Muroyama A, Hiasa M, Omote H, Moriyama Y. (2009) Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl<sup>-</sup>/GABA co-transporter. *J. Biol. Chem.* **284**: 35073-35078.
- Juge N, Gray JA, Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C, Uneyama H, Edwards RH., Nicoll RA, Moriyama Y. (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* **68**: 99-112.
- Kaback HR, Smimova I, Kasho V, Nie Y, Zhou Y. (2011) The alternative access transport mechanism in Lac Y. *J. Membrane Biol.* **239**: 85-93.
- 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, Miyaji T. (2017) Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neurophathic



and inflammatory pain. *Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A.* an eletric version.  
1704847114

King MV, Kurian N, Qin S, Papadopoulou N, Westerink BH, Cremers TI, Epping-Jordan MP, Le Poul E, Ray DE, Fone K, Kendall DA, Marsden CA, Sharp TV. (2014) Lentiviral delivery of a vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)-targeting short hairpin RNA vector into the mouse hippocampus impairs cognition. *Neuropsychopharmacology* **39**: 464-476.

Kuroyanagi H, Ohno G, Mitani S, Hagiwara M. (2007) The Fox-1 family and SUP-12 coordinately regulate tissue-specific alternative splicing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 8612-8621.

Lawal HO, Krantz DE. (2013) SLC18: vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. *Mol. Aspects Med* **34**: 360-372.

Levitan IB, Kaczmarek LK. (1991) *The Neuron -Cell and Molecular Biology-Oxford*

Liu Y, Peter D, Roghani A, Sculdiner S, Prive GG, Eisenberg D, Brecha N, Edwards R. (1992) A cDNA that suppresses MPP<sup>+</sup> toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* **70**: 539-551.

Maycox PR, Jahn R. (1990) Amino acid neurotransmission: spotlight in synaptic vesicles. *Trends Neurosci.* **13**: 83-87.

Mayer ML, Westbrook GL. (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Progress in Neurobiology* **28**: 197-276.

McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards R, Jorgensen EM. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* **389**: 870-879.

- Mimura Y, Mogi K, Kawano M, Fukui Y, Takeda J, Nogami H, Hisano S. (2002) Differential expression of two distinct vesicular glutamate transporters in the rat retina. *Neuroreport* **13**: 1925-1928.
- Miyaji T, Echigo N, Hiasa M, Senoh S, Omote H, Moriyama Y. (2008) Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 11720-11724.
- Miyazaki T, Fukaya M, Shimizu H, Watanabe M. (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre–Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* **17**: 2563–2572.
- Morimoto R, Hayashi M, Yatsushiro S, Otsuka M, Yamamoto A, Moriyama Y. Co-expression of vesicular glutamate transporters (VGLUT1 and VGLUT2) and their association with synaptic-like microvesicles in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* **84**: 2066-2074 (2003)
- Morimoto R, Uehara S, Yatsushiro S, Juge N, Hua Z, Senoh S, Echigo N, Hayashi M, Mizoguchi T, Nonimiya T, Udagawa N, Omote H, Yamamoto A, Edwards RH, Moriyama Y. Secretion of L-glutamate from osteoclasts through transcytosis, *EMBO. J.* **25**: 4175-4186 (2006)
- Moriyama S, and Hiasa M. (2015) Expression of vesicular nucleotide transporter in the mouse retina. *Biol. Pharm. Bull* **39**: 564-569.
- Moriyama Y, Maeda M, Futai M. (1990) Energy coupling of L-glutamate transport and vacuolar H(+)-ATPase in brain synaptic vesicles. *J. Biochem.* **108**: 689-693.
- Moriyama Y, Iwamoto A, Hanada H, Maeda M, Futai M. (1991) One-step purification of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase (FoF1) and its reconstitution into liposomes with neurotransmitter transporters. *J. Biol. Chem.* **266**: 22141-22146.

- Moriyama Y, Yamamoto A. (1995) Vesicular L-glutamate transporter in microvesicles from bovine pineal glands. Driving force, mechanism of chloride anion activation, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **270**: 22314-22320.
- Moriyama Y, Hayashi M. (2003) Glutamate-mediated signaling in the islets of Langerhans: a thread entangled. *Trends in Pharmacol. Sci.* **24**: 511-517.
- Moriyama Y, Yamamoto A. (2004) Glutamatergic chemical transmission: Look! Here, there, and anywhere. *J. Biochem.* **135**: 155-163.
- Moriyama Y. Vacuolar H<sup>+</sup> -ATPase and the secondary transporters: Their identification, mechanism, function and physiological relevance. *YAKUGAKU ZASSHI* **135**(7): 883-894 (2015)
- Moriyama Y, Hiasa M, Sakamoto S, Omote H, Nomura M. (2017) Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signal*, an electric version.
- Nakanishi S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* **258**: 597-603.
- Nogami H, Ogasawara K, Mimura Y, Mogi K, Shutoh F, Hisano S. (2006) Developmentally-regulated expression of tissue-specific splice variant of rat vesicular glutamate transporter 1 in retina and pineal gland. *J. Neurochem.* **99**: 142-153.
- Njus D, Kelly PM, Harnadek GJ. (1986) Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **853**: 237-265.
- Omote H, Miyaji T, Juge N, Moriyama Y. (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry* **50**: 5558-5565.

- Omote H, Moriyama Y. (2013) Vesicular neurotransmitter transporters: an approach for studying transporters with purified proteins. *Physiology* **28**: 39-50.
- Omote H, Miyaji T, Hiasa M, Juge N, Moriyama Y. (2016) Use of recombinant protein structure, function, and drug interactions of transporters in the post-genome era. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **56**: 385-402.
- Oshikawa M, Tsutsui C, Ikegami T, Fuchida Y, Matsubara M, Toyama S, Usami R, Ohtoko K, Kato S. (2011) Full-length transcriptosome analysis of human retina-derived cell lines ARPE-19 and Y79 using the vector-capping method. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* **52**: 6662-6670.
- Parsons TD, Stertling P. (2003) Synaptic ribbon. Conveyor belt or safety belt? *Neuron* **37**(3): 379-382.
- Reichenbach A, Bringmann A. (2016) Purinergic signaling in retinal degeneration and regeneration. *Neuropharmacology* **104**: 194-211.
- Reimer RJ, Edwards R (2004) Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch* **447**: 629-635.
- Reimer RJ. (2013) SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol. Aspects Med.* **34**: 350-359.
- Permet. V., Bourgeois, P., and Di Polo, A. (2007) A role of polyamines in retinal glanglion cell excitotoxic death. *J. Neurochem.* **103**:1481-1490.
- Reuss S. (2010) Pineal ribbon synapses: regulated by the gland's central innervation. *Neuro. Endocrinol. Lett.* **31**(6): 761-765
- Romero-Calderon R, Uhlenbrook G, Borycz J, Simon AF, Grygoruk A, Yee SK, Shyer A, Ackerson LC, Maidment NT, Meinertzhagen IA, Hovermann BT, Krantz DE.

- (2008) A glial variant of the vesicular monoamine transporter is required to store histamine in the *Drosophila* visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**: e1000245.
- Rutherford MA. (2015) Resolving the structure of inner ear ribbon synapses with STED microscopy. *Synapse* **69**(5): 242-255.
- Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, Ichikawa R, Uematsu A, Iwatsuki K, Shibata A, Ueyama H, Takayanagi R, Yamamoto A, Omote H, Nomura M, Moriyama Y. (2014) Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Sci. Rep.* **4**: 6689.
- Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 5683-5686.
- Schaffner W, Weissmann C. (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**: 502-514.
- Schenck S, Wojcik SM, Brose N, Takamori S. (2009) A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nature Neurosci.* **12**: 156-162.
- Seal RP, Akil O, Yi E., Weber CM, Grant L, Yoo J, Clause A, Kandler K, Noebels J L, Glowatzki E, Lustig LR, Edwards RH. (2008) Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron* **57**: 263-275.
- Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH. (2009) Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* **462**: 651-655.
- Seal RP. (2016) Do the distinct synaptic properties of VGLUTs shape pain? *Neurochem. Int.* **98**: 62-68.

- Sesma JI, Kreda SM, Okada SF, van Heusden C, Moussa L, Jones LC, ON'eal WK, Togawa N, Hiasa M, Moriyama Y, Lazarowski ER. (2013) Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **304**: C976-984.
- Sterling P, Matthews G. (2005) Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci.* **28**(1): 20-29.
- Sullivan RK, Woldemussie E, Pow DV. (2007) Dendritic and synaptic plasticity of neuron in the human age-related macular degeneration retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **48**(6): 2782-2791
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. (2000) Identification of vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **407**: 189-194.
- Takamori S, Malherbe P, Broger C, Jahn R. (2002) Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO. reports* **3**: 798-803.
- Thompson CM, Davis E, Carrigan CN, Cox HD, Bridges RJ, Gerdes JM. (2005) Inhibitor of the glutamate vesicular transporter (VGLUT). *Curr. Med. Chem.* **12**: 2041-2056.
- Togawa N, Miyaji T, Izawa S, Omote H, Moriyama Y. (2012) A Na<sup>+</sup>-phosphate cotransporter homologue (SLC17A4 protein) is an intestinal organic anion exporter. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**: C1652-1660.
- Togawa N, Juge N, Miyaji T, Hiasa M, Omote H, Moriyama Y. (2015) Wide expression of type I Na<sup>+</sup>-phosphate cotransporter 3 (NPT3/SLC17A2), a membrane potential-driven organic anion exporter. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **309**: C71-80.
- Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, Brose N, Elizalde N, Lasheras B, DelEio J. (2007) Enhanced anxiety, depressive-like behavior and impaired recognition memory in

mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1).  
*Eur. J. Neurosci.* **25**: 281-290.

Verkhratsky A, Rodriguez JJ, Parpura V. (2012) Neurotransmitters and integration in neuronal-astroglial networks. *Neurochem. Res.* **37**: 2326-2338.

Wallén-Mackenzie A, Gezelius H, Thoby-Brisson M, Nygård A, Enjin A, Fujiyama F, Fortin G, Kullander K. (2006) Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *J. Neurosci.* **22**: 12294-12307.

Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, Siger A, Jahn R, Takamori S, Brose N, Rosenmund C. (2004) An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 7158-7163.

Yoshida S., Ina A., Konno J., Wu T., Shutoh F, Nogami H, and Hisano S. (2008) The ontogenic expressions of multiple vesicular glutamate transporters during postnatal development of rat pineal gland. *Neuroscience* **152**: 407-416.

Zhang Q, Haydon PG. (2005) Roles for gliotransmission in the nervous system. *J. Neural Transm.* **112**: 121125.

久野みゆき、安藤啓司、杉原泉、秋田恵一 (2005)『人体の正常構造と機能IV神経系 (2)』日本医事新報社、p.56-57.

栗原堅三、小野武年、渡辺明治、林祐造 (2000)『グルタミン酸の科学 旨味から神経伝達まで』講談社サイエンティフィック

藤田尚夫、藤田恒夫 (1992)『標準組織学 各論』医学書院

真鍋俊也、森寿、渡辺雅彦、岡野栄之、宮川剛 (2013)『脳神経科学イラストレイテッド』羊土社、p.170-175.

河田光博、稲瀬正彦 (2004) 『人体の正常構造と機能Ⅷ神経系 (1)』日本医事新報社、p.12-13.

森山芳則 (1991) シナプス小胞における神経伝達物質の濃縮機構、生化学、**63**: 202-207.

森山芳則 (1993) 動物細胞における液胞型 H<sup>+</sup>輸送性 A TPase の発見とその構造と機能に関する研究、生化学、**65**: 413-436.

山本章嗣 (2006) 顕微鏡：ナノワールドを読み解くパワフル技術 – 誰でもできる免疫電子顕微鏡法 –、細胞工学、**25**(12): 1464-1469



## 謝辞

本稿を終えるにあたって、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました当生体膜生化学研究室、森山芳則教授に謹んで感謝いたします。どのような状況においても、ひたすら研究に励むことができました。心より御礼申し上げます。

終始有益な御指導、御教授を賜りました当研究室、表弘志准教授に謹んで感謝いたします。

本研究を遂行する上で、基礎から御指導、御教授を賜りました当研究室、日浅未来助教に心より感謝いたします。

免疫電子顕微鏡法をはじめとした組織学研究の御教授を賜りました長浜バイオ大学の（故）山本章嗣教授に深く感謝いたします。

本研究の端緒を開いてくださった当研究室の卒業生であります居原田真史博士に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、様々なご助言をいただきました、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 宮地孝明准教授、樹下成信助教、及び、大阪大学医学系研究科 生体システム薬理学教室 永森收志准教授に深く感謝いたします。

本論文の審査にあたり、御精読、有益なる御助言を賜りました岡山大学薬学部 構造生物薬学教室 山下敦子教授、生体物理化学教室 須藤雄気教授、免疫生物学教室 古田和幸准教授に深謝いたします。

日々の研究生活において様々な場面で御協力いただきました、当研究室員の皆様に深く感謝いたします。

最後になりましたが、日々の研究生活を支えてくれた家族、友人に深く御礼申し上げます。