

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08230

研究課題名(和文)小胞型伝達物質トランスポーターに注目したアストロサイト機能的小胞マーカーの研究

研究課題名(英文)Vesicular transmitter transporters as functional vesicular markers in astrocytes

研究代表者

日浅 未来(Hiasa, Miki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30587720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小胞型伝達物質トランスポーターは伝達物質の小胞内充填を司る膜タンパク質である。しかし、アストロサイトの分泌性小胞の特徴や種類についてはほとんど解明されていない。本研究では、アストロサイトにおける分泌性小胞の機能や特徴の解明を目的とし、アストロサイトで報告されている伝達物質のそれぞれ小胞型輸送体について局在と機能を解析した。ポリアミン輸送体であるVPAT、D-セリン輸送体のVDseT、ATP輸送体のVNUTについて解析し、それぞれ分泌性小胞に局在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アストロサイトの分泌性小胞には、有芯小胞やsynaptic like micro vesicle (SLMV)、リソソームなど数種類の小胞が報告されているが、それらの形態は多様であり、SLMVにしてもシナプス小胞とは異なり不均一な集団である。また、どの小胞にどの伝達物質が蓄積されているか不明であり、アストロサイトの分泌小胞の分類やマーカー分子等の開発はこれからの課題である。本研究では小胞マーカーとして小胞型伝達物質トランスポーターを用いることを提唱し、その一端を明らかにした。アストロサイトの分泌小胞解析のための分子マーカー類は脳機能研究において汎用性が高く、重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Vesicular transmitter transporters are active transporters of transmitters and are responsible for their vesicular storage and subsequent exocytosis. However, the features and functions of secretory vesicles in astrocytes are unknown. In this study, we investigated localization of vesicular nucleotide transporter, vesicular polyamine transporter, and vesicular D-serine transporter and found that these transporters localized in secretory vesicles.

研究分野：生化学

キーワード：小胞 アストロサイト 薬学 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、神経細胞は情報伝達で中心的役割を担う細胞として、その分布や反応性、細胞内構造など、多彩な研究が進んでいる。その一方で、グリア細胞のひとつであるアストロサイトは脳にて最大の population を占めているが、単なる支持細胞として認識されてきた経緯もあり、情報伝達関連の研究は遅れていた。しかしながら、近年、アストロサイトも分泌性の小胞を持ち、グルタミン酸や ATP、D-セリン等グリオトランスミッターと呼ばれる伝達物質を分泌し、グリア-グリア間、グリア-神経間の情報伝達(gliotransmission)において中心的役割を果たしていることが明らかとなり、大きな注目を集めている。先行研究によると、アストロサイトの分泌小胞には、有芯小胞や synaptic like micro vesicle (SLMV)、リソソームなど数種類の小胞が報告されているが、それらの形態は多様であり、SLMV にしてもシナプス小胞とは異なり不均一な集団である。さらに、どのような小胞にどのグリオトランスミッターが蓄積されているか不明であり、アストロサイトの分泌小胞の分類やマーカー分子等の開発はこれからの課題である。

小胞型伝達物質トランスポーターは分泌小胞に局在し、伝達物質の小胞内充填を司る膜タンパク質である。これまでに上記グリオトランスミッターを含む各種伝達物質の小胞型伝達物質トランスポーターが同定されている。発現する小胞型伝達物質トランスポーターの種類と局在および発現量により神経の化学伝達特性が決定される。アストロサイトにおいても発現する小胞型トランスポーターの種類・局在・量により、その分泌小胞の定性定量が決定できると考えられる。

2. 研究の目的

小胞型伝達物質トランスポーターは、細胞が分泌する伝達物質の種類と部位を示す分子マーカーである。そこで本研究ではアストロサイトがどのような小胞にどのような伝達物質を充填し、放出するのかを、小胞型伝達物質トランスポーターの局在と機能という観点から解析し、アストロサイトの分泌小胞を機能的な分類を試み、理解を深める。

3. 研究の方法

初代培養アストロサイトより小胞型伝達物質トランスポーターがどの小胞に局在するか組織化学的、生化学的に解析する。各種小胞型伝達物質トランスポーターの抗体および、マーカーとしてはこれまでに報告されている小胞マーカー(グラニタンパク、v-SNARE、オルガネラ等)の抗体を用いた。また、様々な小胞を含むアストロサイト膜画分をスクロース密度勾配遠心法により分画し、各分画にトランスポータータンパクが存在するか検定した。VNUT については VNUT ノックアウトマウスを用いて神経およびアストロサイトを初代培養し、ATP 分泌量を測定した。新たに見いだした阻害剤添加時の ATP 分泌量を測定した。VNUT ノックアウトマウス、WT マウスを用いて疼痛モデルマウスを作製し、in vivo での疼痛試験を行い、VNUT ノックアウトと VNUT 阻害剤の効果を検討した。

4. 研究成果

本研究では小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)、小胞型ポリアミントランスポーター(VPAT)、小胞型 D-セリントランスポーター(VDseT)、小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)についてアストロサイトでの発現と局在について解析した。VNUT はクロモグラニンと共局在し、dense granule に局在することを明らかにした。一方で VPAT はクロモグラニンと共局在せず、VAMP2 陽性の synaptic like micro vesicle (SLMV) に局在していた。VDseT はクロモグラニンと共局在せず、VAMP2 と一部共局在することから、少なくとも VAMP2 陽性の分泌性小胞に局在すると考えられる。VGLUT についてはアストロサイトではタンパクを検出することができなかった。

以上より、アストロサイトは複数の小胞型伝達物質トランスポーターをもち、その局在小胞、すなわちそれぞれの伝達物質蓄積小胞が異なることが示唆された。

VNUT については KO マウスを用いてさらに検討を進めた。VNUT KO マウスにカラゲニンや CFA を投与して炎症性疼痛モデルマウスを作製した。このモデルマウスは野生型マウスから作製した炎症性疼痛モデルマウスに比べて炎症や疼痛が減弱していた。野生型マウスから作製した炎症性疼痛モデルマウスに、新たに見いだした VNUT 阻害剤であるクロドロン酸を処理すると、強い鎮痛効果を示した。クロドロン酸による VNUT を介した ATP 放出の遮断効果を神経細胞、アストロサイト、マイクログリアを用いて検討した。その結果、神経細胞とマイクログリアでは細胞内にクロドロン酸が取り込まれ、ATP 放出遮断効果が見られた。一方で興味深いことに、アストロサイトではクロドロン酸の効果が見られなかった。この理由として、アストロサイトがクロドロン酸を取り込むための細胞膜型のトランスポーターを持たないことが考えられる。アストロサイトにおける VNUT を介した ATP 放出のメカニズムを検討するためには、クロドロン酸に変わる阻害剤を使用する必要があると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Kinoshita M, Hirayama Y, Fujishita K, Shibata K, Shinozaki Y, Shigetomi E, Takeda A, Le HPN, Hayashi H, **Hiasa M**, Moriyama Y, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S.
Anti-Depressant Fluoxetine Reveals its Therapeutic Effect Via Astrocytes. *EBioMedicine*. 32:72-83, 2018. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.05.036.
2. Harada Y, Kato Y, Miyaji T, Omote H, Moriyama Y, **Hiasa M**.
Vesicular nucleotide transporter mediates ATP release and migration in neutrophils. *J Biol Chem*. 293(10):3770-3779, 2018. doi: 10.1074/jbc.M117.810168.
3. 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.
Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114 (31) E6297-E6305, 2017.
doi: 10.1073/pnas.1704847114
4. Moriyama S, Iharada M, Omote H, Moriyama Y, **Hiasa M**.
Function and expression of a splicing variant of vesicular glutamate transporter 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1859(5), 931-940. 2017.
doi: 10.1016/j.bbmem.2017.02.002.
5. Takeuchi T, Harada Y, Moriyama S, Furuta K, Tanaka S, Miyaji T, Omote H, Moriyama Y, **Hiasa M**.
Vesicular polyamine transporter mediates vesicular storage and release of polyamine from mast cells. *J Biol Chem*. 292(9), 3909-3918, 2017. doi: 10.1074/jbc.M116.756197.
6. Nakagomi H, Yoshiyama M, Mochizuki T, Miyamoto T, Komatsu R, Imura Y, Morizawa Y, **Hiasa M**, Miyaji T, Kira S, Araki I, Fujishita K, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Ichikawa R, Uneyama H, Iwatsuki K, Nomura M, de Groat WC, Moriyama Y, Takeda M, Koizumi S.
Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase. *Sci Rep*., 6,29761, 2016. doi: 10.1038/srep29761.
7. Moriyama S, **Hiasa M**.
Expression of Vesicular Nucleotide Transporter in the Mouse Retina. *Biol Pharm Bull*. 39(4):564-9, 2016. doi: 10.1248/bpb.b15-00872.
8. Moriyama Y, **Hiasa M**, Sakamoto S, Omote H, Nomura M.
Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signal*. 13(3):387-404, 2017. doi: 10.1007/s11302-017-9568-1
9. 日浅未来、Polyamine のマスト細胞分泌顆粒内蓄積と分泌機構、臨床免疫・アレルギー科、69 257-263, 2018

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 日浅未来、VNUT を介した ATP 分泌とその制御 -神経系及び免疫系での作用機構-、第 92 回日本薬理学会年会 (大阪) 2019.3.15
2. 原田結加, 加藤百合, 宮地孝明, 表弘志, 森山芳則, 日浅未来、Vesicular nucleotide transporter mediates ATP release and migration in neutrophils.、第 91 回日本生化学会大会 (京都) 2018.9.2
3. 竹内智也, 原田結加, 森山理美, 古田和幸, 田中智之, 宮地孝明, 表弘志, 森山芳則, 日浅未来、マスト細胞における小胞型ポリアミントランスポーター (VPAT) の局在と機能、第 58 回日本生化学会中国・四国支部例会 (高松) 2017.5.20
4. 加藤百合, 日浅未来, 市川玲子, 蓮澤 奈央, 門脇敦志, 岩槻健, 島和弘, 遠藤康男, 北原吉朗, 井上剛, 野村 政壽, 表弘志, 森山芳則, 宮地孝明、骨粗鬆症治療薬クロドロン酸は小胞型ヌクレオチドトランスポーターを標的として慢性疼痛を改善する、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (神戸) 2017.12.7
5. 森山理美, 居原田真史, 表弘志, 森山芳則, 日浅未来、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ーションの発現と機能、第 58 回日本生化学会中国・四国支部例

会（高松）2017.5.20

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。