

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06068

研究課題名（和文）ノルアドレナリン合成に関わる小胞型アスコルビン酸トランスポーターの同定

研究課題名（英文）Identification of vesicular ascorbic acid transporter essential for noradrenaline synthesis

研究代表者

表 弘志 (Omote, Hiroshi)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：10273707

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ノルアドレナリンは副腎クロマフィン顆粒内でドーパミンから合成される。しかし、この反応に必要なアスコルビン酸がどのようにして顆粒内に輸送されているのかは不明である。本研究では、GLUT8がこの顆粒にアスコルビン酸を蓄積するトランスポーターであると考え解析を進めた。免疫組織化学的手法および、ウェスタンブロットで解析したところ、GLUT8はクロマフィン顆粒に局在していた。また、GLUT8遺伝子をノックダウンしたところ、ノルアドレナリンおよびアスコルビン酸の分泌量が低下した。以上の結果はGLUT8がクロマフィン顆粒へのアスコルビン酸蓄積を介してノルアドレナリン生合成に関わっていることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではGLUT8が分泌小胞に存在し、アスコルビン酸の蓄積を介してノルアドレナリン生合成に関わっている事を明らかにしている。コラーゲンのヒドロキシ化やペプチドホルモンのアミド化も小胞内で行われており、GLUT8もしくは他のGLUTが同様に関わっている可能性が高い。

アスコルビン酸は最もよく知られたビタミンであり、その欠乏により壊血病などを引き起こす。本研究の成果はこれまで不明であった細胞内のアスコルビン酸動態を理解する上で重要なものであるとともに、オキシトシンやバソプレシンといったアミド化されるホルモンの生合成機構や関連する疾患の理解にも重要である。

研究成果の概要（英文）：Noradrenaline is synthesized from dopamine within adrenal chromaffin granules. Ascorbic acid is accumulated in this granule and is well known as an essential cofactor for this reaction. However, molecular mechanism of ascorbic acid accumulation to this granule is unknown. In this study, we analyzed contribution of GLUT8 for noradrenaline synthesis through ascorbic acid accumulation to these granules. Immunohistochemical and Western blot analysis revealed that exclusive localization of GLUT8 in chromaffin granules. Furthermore, GLUT8 gene knock down decreased noradrenaline and ascorbic acid secretion from isolated chromaffin cells. These results suggest that GLUT8 is involved in noradrenaline synthesis through ascorbic acid accumulation to chromaffin granules.

研究分野：生体膜生化学

キーワード：ノルアドレナリン クロマフィン顆粒 ドーパミン ヒドロキシラーゼ アスコルビン酸 ビタミンC
GLUT8 グルコーストランスポーター トランスポーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アスコルビン酸 (ビタミンC) は最もよく知られたビタミンであり、コラーゲンの水酸化のほか、ノルアドレナリンの生合成、ペプチドホルモンの α アミド化、DNAやヒストンの脱メチル化、ラジカルの除去など多岐にわたる生理作用を持っている。アスコルビン酸の欠乏は壊血病等の重篤な疾患を引き起こすことからその生理機能や作用機序の解明の重要性は広く認識されている。これらの機能のうち、ノルアドレナリンの合成、ペプチドホルモンのアミド化とコラーゲンの水酸化は分泌小胞や小胞体などの内腔で起きる (図1)。このことは、アスコルビン酸が小胞内へ運び込まれる事が必須であることを示している。1998年に細胞膜型のアスコルビン酸トランスポーターが発見され、生体内でのアスコルビン酸輸送の問題は解決したかに見えたが、小胞内への輸送については未解決な問題として残されている。

副腎髄質のクロマフィン細胞はノルアドレナリンとアドレナリンの合成に関わっている事が知られている。この細胞ではチロシンヒドロキシラーゼによってチロシンから生成されたドーパがドーパデカルボキシラーゼによりドーパミンに変換される。ドーパミンは小胞型モノアミントランスポーター (VMAT) によってクロマフィン顆粒に運び込まれ、その後小胞内のドーパミン β ヒドロキシラーゼ (D β H) により、ノルアドレナリンに変換される。この際に D β H はアスコルビン酸を必要とする。しかし、どのようにしてアスコルビン酸が小胞内に運ばれるかは明らかにされていない。実際、ノルアドレナリンを合成する副腎髄質のクロマフィン顆粒にアスコルビン酸が蓄積している事は 80年代から知られており、未知の輸送体の存在が推定されていた。しかし、小胞内にアスコルビン酸を輸送するトランスポーターの実態は不明なままとなっていた。

これまでアスコルビン酸トランスポーターが同定されてこなかった理由として、我々は小胞内にアスコルビン酸そのものを運ぶトランスポーターは存在しないものと考えた。その代わりに酸化型のアスコルビン酸を運ぶトランスポーターが存在し、シトクローム b561 が小胞内でこれを還元する事によってアスコルビン酸に変換するものと考えた。興味深いことに、グルコーストランスポーター (GLUT) には酸化型アスコルビン酸を輸送できるものがある。GLUT は 3つのサブファミリーからなり、そのうちクラス III GLUT は細胞内膜系に存在するが、その生理機能は明らかにされていない (図2)。

以上の観点から、細胞内膜系に発現するクラス III GLUT の中に小胞に局在し、酸化型アスコルビン酸を運ぶトランスポーターが存在するものと考えた。

2. 研究の目的

小胞内へアスコルビン酸を運ぶトランスポーターを同定し、その生理機能を明らかにする。これまでの我々の解析からクラス III GLUT の一つである GLUT8 を候補トランスポーターとして同定した。本研究では GLUT8 のクロマフィン細胞での局在、ノルアドレナリン合成およびクロマフィン顆粒へのアスコルビン酸蓄積への関与を検討した。

3. 研究の方法

ラットの副腎からクロマフィン顆粒を分画し、ウェスタンブロット法にて GLUT8 の局在を解析した。また、クロマフィン細胞をラットの副腎からパパインを用いて単離し、免疫組織化学法により細胞内局在を解析した。ノルアドレナリン合成はウシの副腎髄質から単離したクロマフィン顆粒を用いて反応を行い、ドーパミンから生成されたノルアドレナリンを HPLC 法で分析した。GLUT8 遺伝子ノックダウン実験は単離したラットクロマフィン細胞を用いて常法にしたがって行い、KC1 刺激により放出されたノルアドレナリンおよびアスコルビン酸量を HPLC 法で測定した。

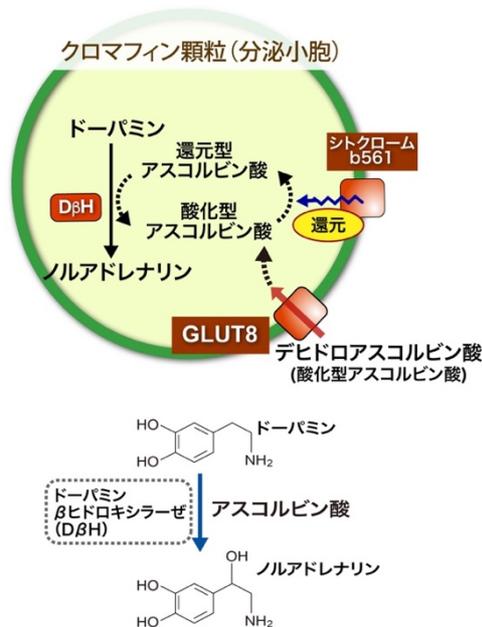


図1 分泌小胞でのノルアドレナリン合成

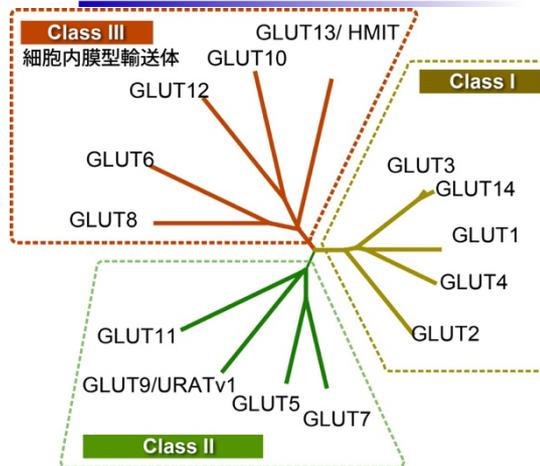


図2 グルコーストランスポーターファミリー

4. 研究成果

(1) GLUT8 の局在

GLUT8 がクロマフィン顆粒に存在しているか、ウエスタンブロット法および、免疫組織化学的手法で解析した。ラット副腎から調整したマイクロソームおよびクロマフィン顆粒分画を得て解析したところ、GLUT8 はクロマフィン顆粒分画にのみ存在した。一方、 Na^+/K^+ -ATPase はマイクロソーム分画に存在した。また、単離クロマフィン細胞を免疫組織化学的に解析したところ、GLUT8 は細胞内の顆粒に存在し、クロマフィン顆粒のマーカであるクロモグラニンと共局在を示した (図3)。一方、ゴルジ体、小胞体のマーカとは一致しなかった。これらの結果は GLUT8 が細胞膜ではなくクロマフィン顆粒膜に存在していることを示している。

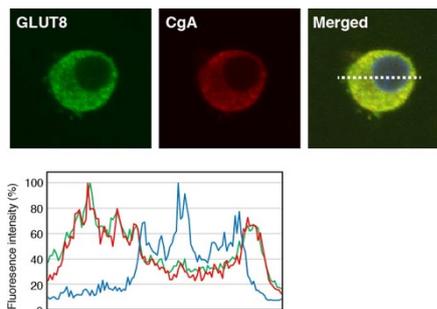


図3 副腎クロマフィン細胞でのGLUT8の局在

(2) クロマフィン顆粒でのノルアドレナリン合成とグルコーストランスポーター

クロマフィン顆粒でのノルアドレナリン合成に GLUT が関わっているか、GLUT 阻害剤の効果を検討した。その結果、単離したウシクロマフィン顆粒によるノルアドレナリン合成は GLUT 阻害剤、シトクロム b561 阻害剤、V-ATPase 阻害剤および VMAT 阻害剤によって阻害された。以上の結果はノルアドレナリンの合成が顆粒内で起きており、それに GLUT が関わっている事を示唆している。

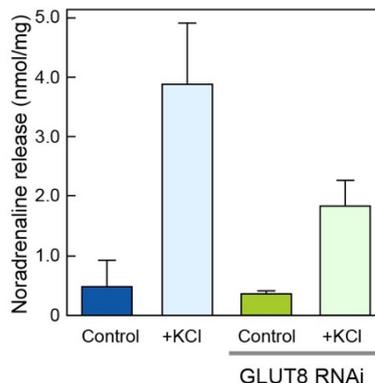


図4 副腎クロマフィン細胞からのノルアドレナリン放出

(3) クロマフィン細胞からのノルアドレナリンおよびアスコルビン酸分泌に対する GLUT8 ノックダウンの効果

ノルアドレナリンはクロマフィン顆粒内で合成され、開口放出によって細胞外に分泌される。したがって、細胞外に分泌されたノルアドレナリン量は顆粒内に蓄積されている量を反映している。ラットからクロマフィン細胞を単離し、KCl で刺激をかけるとノルアドレナリンの分泌が認められた。一方、GLUT8siRNA で処理した細胞ではノルアドレナリンの分泌は有意に低下した (図4)。この結果はクロマフィン顆粒内のノルアドレナリン量が低下したことを示す。同様にアスコルビン酸の分泌量を測定したところ、こちらも RNAi 処理によって分泌量の低下が認められた。以上の結果は、GLUT8 がクロマフィン顆粒でのノルアドレナリンの合成に必須であり、また、顆粒内へのアスコルビン酸の蓄積に関わっていることを示唆している。

以上の結果は GLUT8 が副腎クロマフィン細胞のクロマフィン顆粒に存在し、アスコルビン酸蓄積を介してノルアドレナリン合成に関わっている事を示唆している。GLUT8 は酸化型のアスコルビン酸を輸送できることから、顆粒内に輸送された酸化型アスコルビン酸がシトクロム b561 によって還元されてアスコルビン酸となり、 $\text{D}\beta\text{H}$ の補酵素としてノルアドレナリン合成に寄与しているものと思われる。クロマフィン顆粒を用いた実験においてシトクロム b561 阻害剤がノルアドレナリン合成を阻害した事はこの結論を支持している。

アスコルビン酸を必要とするコラーゲンのプロリン残基のヒドロキシ化やペプチドホルモンの α アミド化も小胞内で行われている。GLUT8 もしくは他の細胞内膜系 GLUT が酸化型アスコルビン酸の輸送を通してこれらの反応に関わっている可能性が高い。本研究の成果はクロマフィン顆粒へのアスコルビン酸の蓄積とノルアドレナリン合成への GLUT8 の関与を明らかにするとともに、これまで不明であった、細胞内のアスコルビン酸動態を理解する上で重要なものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉馴美穂、土岐達也、山本弘輝、三谷真智子、森山芳則、日浅未来、表弘志
2. 発表標題 グルコーストランスポーター（GLUT8）は副腎クロマフィン細胞でのノルアドレナリン合成に関わっている
3. 学会等名 第64回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 表 弘志、吉馴 美穂、土岐 達也、山本 弘輝、三谷 真智子、森山 芳則、日浅 未来
2. 発表標題 グルコーストランスポーター（GLUT8）は副腎クロマフィン細胞でのノルアドレナリン合成に関わっている
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第49回討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 表弘志
2. 発表標題 グルコーストランスポーター（GLUT8）は副腎クロマフィン細胞でのノルアドレナリン合成に関わっている
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第48回討論会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------