

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860062

研究課題名(和文)血球細胞におけるヌクレオチド蓄積・放出機構解明と病態に関する研究

研究課題名(英文)Mechanism of nucleotide accumulation and release in blood cells

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血球細胞はATPやADPなどのヌクレオチドを蓄積、または放出して情報伝達するがその詳細な機構は不明であった。本研究では小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)に注目し、特に血小板について解析した。その結果VNUTが血小板の密顆粒に局在し、血小板のヌクレオチドの蓄積と放出を制御していることを明らかにした。さらにVNUTの強力な阻害剤であるグリオキシル酸を見いだした。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of nucleotide accumulation and release in blood cells are unclear. In this study, we analyzed vesicular nucleotide transporter (VNUT) function and localization in platelet. VNUT was localized in dense granules and play crucial roles in nucleotide accumulation and release in platelets. We also found an effective VNUT inhibitor, glyoxylate.

研究分野：薬学

キーワード：血小板 ヌクレオチド ATP VNUT 化学伝達

1. 研究開始当初の背景

ATP や ADP 等のヌクレオチドを伝達物質とする化学伝達をプリン作動性化学伝達といい、痛みや味覚の伝達、血液凝固、血管収縮等の多彩な生理機能に關与している。プリン作動性化学伝達においてヌクレオチドの放出に関する研究は遅れており、様々な説が提唱されていた。2008 年に、小胞内へのヌクレオチド蓄積に預かるトランスポーター (Vesicular Nucleotide Transporter; VNUT) が、申請者の所属する研究室で見いだされたことが契機になり、分泌小胞へのヌクレオチドの充填・開口放出説が再浮上した。VNUT はヌクレオチドの分泌小胞内への蓄積に必須の分子であり、その活性によりヌクレオチドの開口放出量が規定される。

2. 研究の目的

本研究では血球系の細胞に注目した。血球系の細胞 (あるいは細胞断片) には ATP が蓄積されており、重要な役割を果たしている。例えば血小板の密顆粒には ADP や ATP などのヌクレオチドが蓄積しており、放出されて血液凝固の初発因子となることは古くから知られた事実である。しかしながら、血小板の密顆粒にどのような機構でヌクレオチドが蓄積されるのか未解決のままである。好中球においては、自ら分泌した ATP によってその遊走が制御されている。本研究では、分泌小胞内へのヌクレオチド蓄積に預かる小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) に焦点をおき、血球系細胞におけるヌクレオチド分泌様式とその破綻による病態発現の解明を目的としている。

3. 研究の方法

我々のグループが開発した VNUT のノックアウトマウスと特異的阻害剤を活用する。血小板及び好中球やそれらのモデル細胞における VNUT の局在と機能 (小胞内への ATP 輸送) およびヌクレオチドの開口放出を、免疫電子顕微鏡法・阻害剤・ノックダウン技術を用い解明する。VNUT ノックアウトマウスにおける血小板・好中球機能を測定し、VNUT の生理作用を解明する。蓄積機構破綻による血液凝固機能への影響、好中球遊走能の変化とそれに伴う細菌感染防御機能への影響を解析する。

4. 研究成果

血小板について、免疫組織学的手法を用い、血小板の密顆粒膜に VNUT が局在することを見いだした。血小板の密顆粒膜を用いた ATP 輸送活性測定の特徴 (速度論、阻害剤) は VNUT のものと一致した。VNUT が血小板のヌクレオチド蓄積と分泌を司ることを証明するために巨核芽球由来の培養細胞である MEG-01 を用いて RNA 干渉法を行った。RNA 干渉法による VNUT 発現抑制の結果、MEG-01 からの ATP

分泌および細胞膜での輸送能が低下した。また、VNUT 欠損マウスの血小板では凝集が遅くなる傾向が見られた。以上の結果は、血小板密顆粒でのヌクレオチド輸送を司る分子が VNUT であることを示唆している。(Physiological Reports に発表、雑誌論文 3)。本研究成果は生化学会や Purines in Bonn 等で成果発表した (学会発表 [4] [13])。また、VNUT に関してその他の細胞にて機能解析し、論文や総説にまとめた (雑誌論文 2, 4, 7, 9)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 9 件)

1. Hiasa M, Miyaji T, Haruna Y, Takeuchi T, Harada Y, Moriyama S, Yamamoto A, Omote H, Moriyama Y. Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Sci. Rep.*, 4, 6836, 2014 査読有
2. Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, Ichikawa R, Uematsu A, Iwatsuki K, Shibata A, Uneyama H, Takayanagi R, Yamamoto A, Omote H, Nomura M, Moriyama Y. Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Sci. Rep.*, 4, 6689, 2014 査読有
3. Hiasa M, Togawa N, Miyaji T, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol Rep.* 2, e12034, 2014 査読有
4. Harada Y, Hiasa M. Immunological identification of vesicular nucleotide transporter in intestinal L cells. *Biol Pharm Bull.* 37, 1090-1095, 2014 査読有
5. Hiasa M, Kurokawa M, Akita H, Harada M, Niki K, Ohta K, Shoji M, Echigo N, Kuzuhara T. Suppression of increased blood glucose levels in mice by Awa-ban tea following oral administration of mono-

- and disaccharides. *J Funct Foods.*, 8, 188-192, 2014 査読有
6. **Hiasa M**, Kurokawa M, Ohta K, Esumi T, Akita H, Niki K, Yagi Y, Echigo N, Hatakeyama D, Kuzuhara T. Identification and purification of resorcinol, an antioxidant specific to Awa-ban (pickled and anaerobically fermented) tea. *Food Res Int.* 54, 72-80, 2013 査読有
 7. Sesma JI, Kreda SM, Okada SF, van Heusden C, Moussa L, Jones LC, O'Neal WK, Togawa N, **Hiasa M**, Moriyama Y, Lazarowski ER. The vesicular nucleotide transporter (VNUT) regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. *Am J Physiol Cell Physiol.* 304, C976-984, 2013 査読有
 8. **Hiasa M**, Isoda Y, Kishimoto Y, Saitoh K, Kimura Y, Kanai M, Shibasaki M, Hatakeyama D, Kirino Y, Kuzuhara T. Inhibition of monoamine oxidase A and stimulation of behavioural activities in mice by the inactive prodrug form of the anti-influenza agent oseltamivir. *Br J Pharmacol.* 169(1), 115-129, 2013 査読有
 9. **Hiasa M**, Togawa N, Moriyama Y. Vesicular Nucleotide Transport: a Brief History and the Vesicular Nucleotide Transporter as a Target for Drug Development. *Curr Pharm Des.*, 20, 2745-2749, 2014 査読有
- [学会発表](計 16 件)
- [1] ○**Miki Hiasa**, Physiological function of vesicular nucleotide transporter (VNUT) in purinergic cells. (小胞型ヌクレオチドトランスポーターと ATP 分泌、その生理作用) 第 88 回日本薬理学会年会(名古屋), 2015 年 3 月 18 日、招待講演
 - [2] **日浅未来**, 宮地孝明, 竹内智也, 表弘志, 森山芳則、新規小胞型ポリアミントランス
 - ランスポーターの発現と機能解析、日本薬学会第 135 年会(神戸), 2015 年 3 月 26 日、口頭
 - [3] ○**日浅未来**, 宮地孝明, 竹内智也, 表弘志, 森山芳則、中枢における新規小胞型ポリアミントランスポートの発現および機能解析、第 87 回日本生化学会大会(京都), 2014 年 10 月 16 日、口頭・ポスター
 - [4] ○ **Miki Hiasa**, Vesicular nucleotide transporter (VNUT) in platelets. Purines 2014 (Bonn, German), 24 July, 2014 (Symposium) 招待講演
 - [5] ○**日浅未来**, Max Larsson, 澤田啓介, 宮地孝明, 表弘志, Vidar Gundersen, 森山芳則、神経細胞における小胞型ヌクレオチドトランスポーターの局在と機能、第 86 回日本生化学会大会(横浜), 2013 年 9 月 12 日、口頭・ポスター
 - [6] 森山 理美、**日浅未来**、網膜におけるプリン性化学伝達の生理的意義に関する研究 小胞型ヌクレオチドトランスポーターの発現と局在、日本薬学会第 135 年会(神戸), 2015 年 3 月 26 日、口頭
 - [7] 竹内 智也、原田 結加、**日浅未来**、宮地 孝明、表 弘志、森山 芳則、マスト細胞における小胞型ポリアミントランスポートの発現と機能、日本薬学会第 135 年会(神戸), 2015 年 3 月 26 日、口頭
 - [8] 表 弘志、坂本 昌平、宮地 孝明、**日浅未来**、市川 玲子、岩槻 健、畝山 寿之、高柳 涼一、野村 政壽、森山 芳則、小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT)は血糖値の制御に関わる、日本薬学会第 135 年会(神戸), 2015 年 3 月 26 日、口頭
 - [9] ○宮地孝明、**日浅未来**、春名由佳、森山佐和子、表弘志、森山芳則、新規ポリア

- ミントランスポーターの同定とその機能解析、第 87 回日本生化学会大会（京都）2014 年 10 月 16, 17 日、口頭・ポスター
- [10] ○Yuika Harada and **Miki Hiasa**,
Expression and localization of VNUT in intestinal L cells. Purines 2014 (Bonn, German), 23-27 July, 2014 poster
- [11] ○Shohei Sakamoto, Takaaki Miyaji, **Miki Hiasa**, Reiko Ichikawa, Akira Uematsu, Ken Iwatsuki, Atsushi Shibata, Hisayuki Uneyama, Ryoichi Takayanagi, Akitsugu Yamamoto, Hiroshi Omote, Masatoshi Nomura, Yoshinori Moriyama, Vesicular nucleotide transporter (Vnut) regulates glucose metabolism、
(Purines 2014 in bonn) 2014 (H26) 7/23-27
- [12] ○表弘志、坂本昌平、宮地孝明、**日浅未来**、市川玲子、岩槻健、畝山寿之、高柳涼一、野村政壽、森山芳則、小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)による内分泌制御、(セッション名：恒常性維持のためのホルモン分泌調節) 第 87 回日本内分泌学会学術総会(福岡国際会議場) 2014(H26)4/24-4/26)4/26
- [13] ○外川奈津子、**日浅未来**、宮地孝明、表弘志、森山芳則、血小板における VNUT を介したヌクレオチド蓄積機構。日本薬学会第 134 年会（熊本）2014 年 3 月 30 日 口頭
- [14] ○原田結加、**日浅未来**、森山芳則、小腸 L 細胞における小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) の局在、日本薬学会第 134 年会（熊本）2014 年 3 月 30 日 口頭
- [15] ○宮地孝明、**日浅未来**、表弘志、森山芳則、副腎における小胞型ヌクレオチドトランスポーターの ATP 濃縮と放出機構、

日本薬学会第 134 年会（熊本）2014 年 3 月 30 日 ポスター

- [16] ○樹下成信、**日浅未来**、表弘志、森山芳則、小胞型抑制性アミノ酸トランスポーター(VIAAT)は -アラニンの小胞内充填を司る、第 54 回（平成 25 年度）日本生化学会中国・四国支部例会（徳島）（2013 (H25) 5/31-6/1) 6/1 口頭

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/seika/home/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：