

令和 2 年 8 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08531

研究課題名(和文)パーキンソン病関連カチオンポンプATP13A2の機能解明による創薬基盤の構築

研究課題名(英文) Physiological and pathophysiological properties of Parkinson's disease-related cation pump ATP13A2

研究代表者

藤井 拓人 (Fujii, Takuto)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：50567980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経細胞のリソソームに発現するパーキンソン病(PD)病因遺伝子であるATP13A2のイオン輸送機能異常が関与するPD発症メカニズムの解明を目的とした。ヒトATP13A2過剰発現細胞において、ATP13A2由来の酵素活性は、酸性条件においてK⁺濃度依存性を示した。また、⁸⁶Rb⁺を用いたトレーサー解析により、ATP13A2はリソソーム膜においてK⁺排出ポンプとして機能することを見出した。PD患者において報告されている変異によりATP13A2の発現もしくはK⁺輸送機能が著しく減少したことから、ATP13A2のK⁺輸送機能の異常がPD病態と関連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

神経細胞のリソソームに発現するPD病因遺伝子のATP13A2がK⁺排出ポンプとして機能し、その輸送機能異常がPD病態に関連することを見出した。これは、「カチオンポンプの機能異常が引き起こすPD発症機構」という新たな概念であり、従来のドパミン補充療法とは異なるPD治療の新しい創薬基盤の構築につながる成果である。従って、本研究の学術的意義、臨床的意義および社会的貢献度は大きいと考えられる。さらに、ATP13A2はリソソームの機能維持に重要な役割を担っていることから、難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定されている種々のリソソーム病発症機構の解明および創薬展開など他分野への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) is one of the most common movement disorders. Dysfunction of ATP13A2, a lysosomal orphan P-type ATPase, diminishes lysosomal acidification and degradation, and induces mitochondrial dysregulation in PD pathogenesis. Therefore, ATP13A2 has potential as a therapeutic target for PD, however, conclusive evidence for cation substrates of ATP13A2 has not yet been provided. In this study, we found that ATPase activity of ATP13A2 was increased in a K⁺ concentration-dependent manner at acidic pH. ATP-dependent ⁸⁶Rb⁺ (K⁺ analog) efflux from lysosomes was significantly increased in ATP13A2-expressing cells. Interestingly, PD-associated mutations strongly reduced the ATPase activity and ⁸⁶Rb⁺ efflux of ATP13A2. These results suggest that ATP13A2 functions as an acidic-activated K⁺ pump in lysosomes, and dysfunction of K⁺ efflux by ATP13A2 may be implicated in PD.

研究分野：分子生理学

キーワード：カチオン輸送ポンプ ATP13A2 パーキンソン病 リソソーム 神経細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(以下 PD)は、神経伝達物質であるドパミンを産生する神経細胞が加速度的に減少することで、運動障害や自律神経障害が引き起こされる難治性の神経変性疾患であり、高齢化に伴い有病率は増加している。PD 治療薬は豊富であるが、現在多くの薬剤はドパミンの補充対症療法が主であり、根本的な治療法の確立が社会的に強く求められている。PD の発症は様々な分子が関連する複雑なメカニズムであり、PD 病態の全容は明らかになっていない。

本研究では、PD の重要な病因遺伝子 Park9 として同定された ATP13A2 に着目する。ATP13A2 は、構造的特徴から「カチオン輸送ポンプ(ATPase)」であると推定されている。ATP13A2 は、体内に広く分布しているが、特に脳に多く発現しており、神経細胞のリソソームに局在している。遺伝性 PD において ATP13A2 には多くの変異が報告されており、我が国においても変異を有する家系が存在することが報告されている。これらの変異は、PD 病態において特徴的であるリソソーム機能異常や PD の神経変性原因分子である α -synuclein の異常蓄積を引き起こすなど、PD 発症に ATP13A2 が深く関与していることが示唆されている(Gitler et al., Nat. Genet., 2009; Bento et al., Nat. Commun., 2016)。このように、ATP13A2 は、PD 治療の創薬ターゲットとして注目されているにもかかわらず、ATP13A2 の輸送イオン種、イオン輸送メカニズムについてはこれまで未解明であった。

2. 研究の目的

ATP13A2 を標的とした新規 PD 治療薬の開発には ATP13A2 のイオン輸送機能の解明が必須である。本研究は、ATP13A2 の輸送イオン種を突き止め、ATP13A2 のイオン輸送機能異常が関与する PD 発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト ATP13A2 のクローニングおよび変異体の作製

ヒト脳よりクローニングした ATP13A2 の全長 cDNA を Xpress-Tag 付加サイトを N 末端領域に有する pcDNA4/His ベクターに組み込んだ。PD 患者において報告されている ATP13A2 の各種変異体(R449Q、G533R、A746T、R980H、D513N)は、KOD -Plus- Mutagenesis Kit を用いて作製した。ATP13A2 の配列は、Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて DNA シーケンサーABI 3500 により確認した。

細胞培養およびトランスフェクション

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞は、10%FBS、100U/ml penicillin-streptomycin を含む D-MEM を用いて 37 °C、5 % CO₂ 存在下で培養した。HEK293 細胞に ATP13A2 発現ベクターを PEI-Max を用いたリポフェクション法によるトランスフェクションにより導入し、24 時間培養後に各種実験に用いた。

免疫細胞染色

トランスフェクションして、24 時間後の細胞を氷冷した 100%メタノールを用いて固定した。0.1 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂ を含んだ PBS (PBS (++)) で 5 分間 3 回洗浄し、0.3 % TritonX-100、0.1 % bovine serum albumin を含んだ PBS (++) (permeabilizing buffer) を用いて細胞膜の透過性を上昇させた。次に 17 % goat serum、450 mM NaCl、0.3 % TritonX-100 を含む 20 mM phosphate buffer (pH7.4) (GSDB) を用いて、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、GSDB で各 100 倍に希釈した一次抗体(抗 Xpress 抗体と抗 LAMP1 抗体)と 4 °C で一晩反応させた。Permeabilizing buffer で 5 分間 3 回洗浄し、GSDB で 100 倍希釈した二次抗体 (Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 568 標識抗ウサギ IgG 抗体) と室温にて 1 時間遮光して反応させた。PBS (++) で 5 分間 3 回洗浄し、DAPI solution と室温で 15 分間遮光して反応させた。PBS (++) で 5 分間 3 回、蒸留水 5 分間 2 回洗浄し、Fluorescence Mounting Medium でカバーガラスをスライドガラスに固定し、共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM780) を用いて観察した。

HEK293 細胞からの膜画分の調製

トランスフェクションして 24 時間後にメディアムを除き、PBS で洗浄し、5 mM EDTA を含む PBS を加えてセルスクレーパーで細胞をかき集め、4 °C、800 × g で 3 分間遠心した。細胞ペレットを protease inhibitor カクテル (10 mg/ml PMSF、1 mg/ml Leupeptin、1 mg/ml Pepstatin A) を加えた LIS buffer (0.5 mM MgCl₂、10 mM Tris-HCl (pH7.4)) に懸濁し、氷中で 10 分間インキュベーションした。Dounce Homogenizer を用いて 40 回ホモジナイズし、さらに Tris-sucrose buffer (50 mM sucrose、10 mM Tris-HCl、(pH7.4)) を同量加えて 40 回ホモジナイズした。この懸濁液を 4 °C、800 × g で 10 分間遠心し、上清を 4 °C、100,000 × g で 90 分間遠心した。この沈殿を 1/2 に希釈した Tris-sucrose buffer で再懸濁し、細胞の膜画分とした。

SDS-PAGE およびウェスタンブロット

細胞の膜画分を、SDS-PAGE sample buffer (2 % SDS、5 % β -mercaptoethanol、10 % glycerol、65 mM Tris-HCl (pH6.8)、0.001% bromophenol blue) で処理し、泳動 buffer (25 mM Tris、192

mM glycine, 0.1% SDS) 中で 0.05 A で泳動した。SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、0.5 g/ml スキムミルクにより室温でブロッッキングした。一次抗体として、抗 Xpress 抗体を 5000 倍希釈で用いた。TBS-Tween (0.1 % Tween20 を含む TBS) で洗浄した後、二次抗体として HRP 標識した抗マウス IgG 抗体 (3000 倍希釈) で反応させ、Western Lightning ECL pro による化学発光を LAS-4000 system を用いて検出した。

ATP 加水分解活性の測定

ATPase 活性測定は ATPase が ATP を加水分解して生じる遊離無機リン酸を Yoda-Hokin 法により 320nm の比色を定量することによって求めた (Yoda et al., 1970; Fujii et al., 2015)。50 μg の膜画分を、17 mM HEPES-Tris (pH 5.5-7.4)、2 mM MgCl₂、1 mM ATP、1 mM NaN₃、0 - 160 mM NaCl、0 - 160 mM KCl を含んだ 1 ml の溶液において 37 °C で 30 分間反応させた。1 ml の反応停止液 (4.5 % モリブデン酸溶液と 60 % 過塩素酸を 3 : 1 で混合) で反応溶液を停止した。3 ml 酢酸 n-ブチルと反応溶液を混合し、4 °C、1000 × g で 5 分間遠心した。上清を 320 nm 波長の光を用いて吸光度を測定した。なお輸送イオン種の検討の際には、反応溶液中のカチオンを NMDG-Cl に置換した。

4. 研究成果

強制発現細胞における ATP13A2 の細胞内局在の検討

ATP13A2 発現細胞と mock 細胞の膜画分を調製し、抗 Xpress 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、ATP13A2 発現細胞においてのみ目的分子サイズである 125kDa 付近にシングルバンドが観察された (図 1A)。他方、ローディングコントロールである Na⁺, K⁺-ATPase の発現レベルは両細胞間において有意な差は見られなかった。また、抗 Xpress 抗体とリソソーム膜マーカーである LAMP1 の抗体を用いた免疫細胞染色において、ATP13A2 の蛍光シグナルの大部分は LAMP1 のシグナルと一致した (図 1B)。

ATP13A2 発現細胞における ATPase 活性の測定

ATP13A2 は輸送イオン種などの詳細が明らかにされていない。そこで、ATPase が ATP を加水分解する際に生じる無機リン酸量を定量することで、ATP13A2 の P 型 ATPase としての機能を検討した。ATP13A2 発現細胞と mock 細胞から膜画分を調製し、各膜画分における ATP 加水分解活性を測定した。通常、P 型 ATPase の酵素活性は、pH 7.4 条件において最大を示すが、160 mM [K⁺]、5 mM [Na⁺] で pH 7.4 という溶液条件では、ATP13A2 発現細胞の ATPase 活性は mock 細胞と比べて有意な活性上昇は観察されなかった。しかし、反応溶液の pH を 6.5 に変化させたところ、ATP13A2 発現細胞の活性は、mock 細胞の活性に比べて有意に上昇した (図 2A)。P 型 ATPase では、第四および第五膜貫通ドメイン間の細胞質内ループに存在するアスパラギン酸残基をアスパラギン残基へと変異させることで活性が消失する。このアスパラギン酸残基は、ATP13A2 においても保存されている。対応する 513 番目のアスパラギン酸残基をアスパラギン残基へと変異させた D513N 変異体を作製し、ATPase 活性を測定したところ、野生型 (WT) 発現細胞において見られた活性上昇が、D513N 発現細胞において消失した (図 2B)。なお D513N 変異体の発現量は、WT と比較して有意な差は見られなかった。以上の結果より、ATP13A2 は P 型 ATPase としての機能を有することが示された。

ATP13A2 の輸送イオン種の検討

160 mM KCl、5 mM NaN₃、2 mM MgCl₂、1 mM ATP、17 mM HEPES-Tris buffer (pH 6.5) という溶液条件下で ATP13A2 由来の ATPase 活性が観察されたことから、K⁺および Na⁺が ATP13A2 の輸送イオン種である可能性を考えた。まず、160 mM KCl を NMDG-Cl に置換し溶液中の K⁺を除去したところ、ATPase 活性は、mock 細胞と同程度まで減少した (図 2C)。他方、溶液中の Na⁺濃度を 5 mM から 1 mM に減少させても ATP13A2 活性に有意な変化は見られなかった (図 2)。従って、

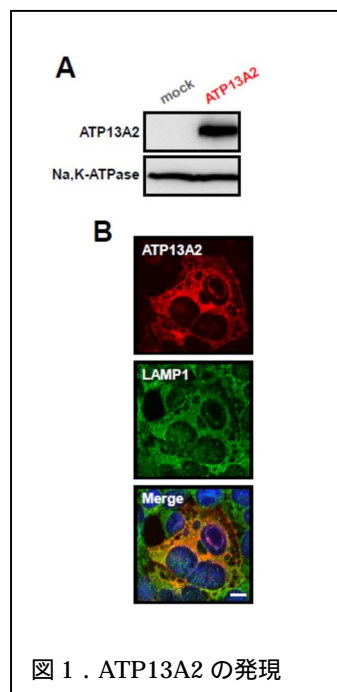


図 1. ATP13A2 の発現

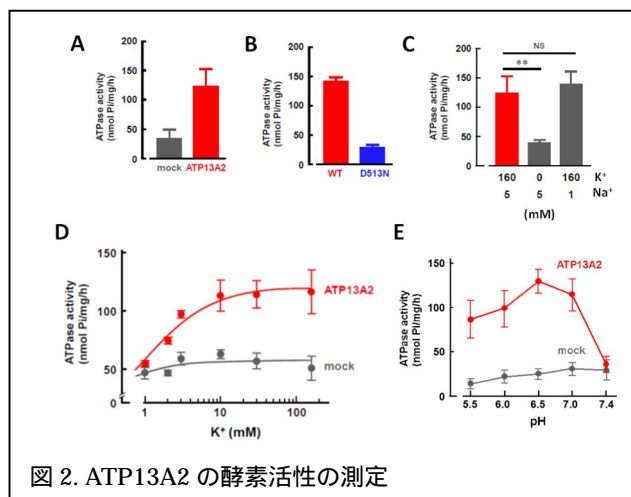


図 2. ATP13A2 の酵素活性の測定

ATP13A2 活性は反応溶液中の K^+ 濃度に依存することが示唆された。ATP13A2 活性の K^+ 濃度依存性について検討したところ、ATP13A2 発現細胞の ATPase 活性は K^+ 濃度的に上昇し、その EC_{50} 値は約 1.95 mM と算出された (図 2D)。

リソソームは小胞体やミトコンドリアと同様にカルシウムストアとしての機能を有している。 Ca^{2+} -ATPase の活性は 10 μ M 付近で最大活性を示すことから (Zhao et al., 2015)、反応溶液の遊離 $[Ca^{2+}]$ を 20 μ M にした条件で ATP13A2 発現細胞の ATPase 活性を測定したが、活性の有意な変化は見られなかった。また、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} の存在下で ATPase 活性を測定したが、ATP13A2 由来の活性に変化は見られなかった。

ATP13A2 の pH 感受性の検討

ATP13A2 由来の ATPase 活性が pH 7.4 ではなく pH 6.5 において観察されたことから、ATP13A2 活性の pH 依存性について検討した。反応溶液の pH を 5.5、6.0、6.5、7.0、7.4 に変化させ酵素活性を測定した。ATP13A2 発現細胞の ATPase 活性は、pH 7.0 以下の反応溶液において観察され、pH 6.5 で最大活性を示した (図 2E)。他方、pH 7.4 では有意な酵素活性は観察されなかった。 Na^+ 、 K^+ -ATPase や Ca^{2+} -ATPase (SERCA) など多くの P 型 ATPase は pH 7.4 において活性を有することから ATP13A2 はこれまで報告されていないユニークな pH 依存性を示す P 型 ATPase である可能性が示唆された。

パーキンソン病に関連する ATP13A2 変異体の発現および ATPase 活性の検討

これまで国内外のパーキンソン病患者において複数の ATP13A2 の変異が報告されている。本研究では、中でも複数の患者で報告されている R449Q、G533R、A746T、R980H 変異体を作製した (図 3A)。抗 Xpress 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、A746T と R449Q 変異体発現細胞における ATP13A2 の発現レベルに有意な変化は見られなかったが、G533R と R980H 変異体では、ATP13A2 の発現レベルが著しく低下した (図 3B)。また、興味深いことに、A746T と R449Q 変異体発現細胞の ATPase 活性は、それぞれ WT 発現細胞に比較して著しく減少した (図 3C)。

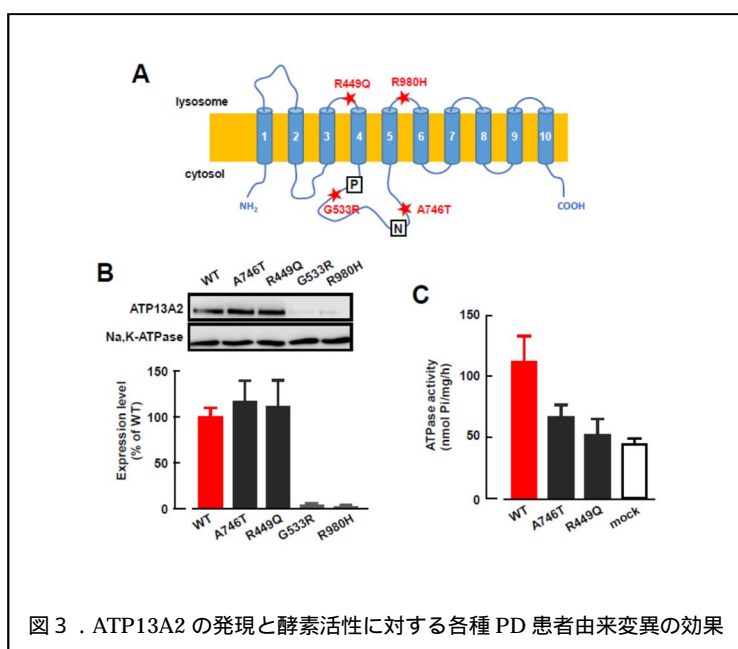


図 3 . ATP13A2 の発現と酵素活性に対する各種 PD 患者由来変異の効果

リソソームにおける ATP13A2 の K^+ 輸送機能の解析

ATP13A2 の酵素活性が反応溶液中の K^+ に依存することから、リソソーム膜における K^+ 輸送機能について $^{86}Rb^+$ を用いたトレーサー実験により検討した。ATP13A2 強制発現細胞もしくは mock 細胞を $^{86}Rb^+$ を含んだ培養液で 24 時間処理した後、低濃度サポニンにより原形質膜を選択的に透過させ、リソソームからの ATP 依存的な $^{86}Rb^+$ 排出量を測定した。ATP13A2 発現細胞では未発現細胞に比べて有意に排出レベルが増加し、この $^{86}Rb^+$ 排出量の増加はリソソーム阻害剤のパフィロマイシンにより阻害された (図 4A)。また、酵素活性を阻害するパーキンソン病関連変異体 (A746T、R449Q 変異体) 発現細胞では、 $^{86}Rb^+$ 排出量が未発現細胞と同レベルまで減少した (図 4B)。従って、ATP13A2 が ATP 依存的にリソソームから K^+ を排出していることが示唆された。

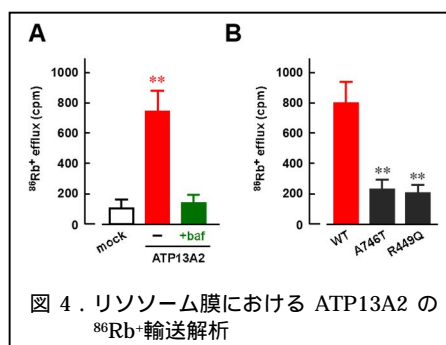


図 4 . リソソーム膜における ATP13A2 の $^{86}Rb^+$ 輸送解析

ATP13A2 と機能関連する分子の同定

ATP13A2 強制発現細胞を用いて ATP13A2 の酵素活性を変化させる分子の探索を行った。申請者らが小胞体に発現し、カチオンポンプとして機能することを見出した新規膜タンパク質 (ER-ATPase と仮称) を ATP13A2 と共発現させることで ATP13A2 の酵素活性は著しく減少した (図 5)。他方 ER-ATPase の機能に有意な変化は見られなかった。従って、ER-ATPase は ATP13A2 と機能調節分子である可能性が示唆された。現在、神経細胞において ER-ATPase と ATP13A2 との機能関連の

分子メカニズムの詳細を検討中である。

総括

本研究より、ATP13A2 はリソソームにおいて酸性条件において活性化される K^+ 排出ポンプとして機能しており、パーキンソン病においてはその酵素活性および K^+ 排出機能が抑制されることが明らかとなった。本成果は、ATP13A2 を標的とした新規 PD 治療法の創出にむけた研究基盤となると考えられる。現在、本研究成果をまとめ論文投稿中である。また、ATP13A2 との機能連関の可能性について検討した Na^+, K^+ -ATPase および H^+, K^+ -ATPase の新規生理機能および病態生理機能について論文および学会報告を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawai Shunsuke, Fujii Takuto, Shimizu Takahiro, Sukeyama Kenta, Hashimoto Isaya, Okumura Tomoyuki, Nagata Takuya, Sakai Hideki, Fujii Tsutomu	4. 巻 70
2. 論文標題 Pathophysiological properties of CLIC3 chloride channel in human gastric cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-020-00740-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Yanjun, Takahashi Yasufumi, Hong Sung Pil, Liu Fengjie, Bednarska Joanna, Goff Philip S., Novak Pavel, Shevchuk Andrew, Gopal Sahana, Barozzi Iros, Magnani Luca, Sakai Hideki, Suguru Yoshimoto, Fujii Takuto, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 High-resolution label-free 3D mapping of extracellular pH of single living cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13535-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujii Takuto, Phutthathiraphap Siriporn, Shimizu Takahiro, Takeshima Hiroshi, Sakai Hideki	4. 巻 518
2. 論文標題 Non-morphogenic effect of Sonic Hedgehog on gastric H ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 605 ~ 609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Takuto, Shimizu Takahiro, Takeshima Hiroshi, Sakai Hideki	4. 巻 154
2. 論文標題 Cancer cell-specific functional relation between Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase and volume-regulated anion channel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 103 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.154.103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Takuto, Shimizu Takahiro, Kushiro Keiichiro, Takeshima Hiroshi, Takai Madoka, Sakai Hideki	4. 巻 153
2. 論文標題 Negative regulation of gastric proton pump by desialylation suggested by fluorescent imaging with the sialic acid-specific nanoprobe	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 261 ~ 266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.153.261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤井拓人, 酒井秀紀	4. 巻 41
2. 論文標題 胃酸分泌機構の分子・細胞生理	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 消化と吸収	6. 最初と最後の頁 88 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Phutthathiraphap Siriporn, Hayashi Yoshihiro, Fujii Takuto, Kosugi Atsushi, Okada Kotaro, Kadozaki Tetsuo, Ishise Toru, Sakai Hideki, Onuki Yoshinori	4. 巻 66
2. 論文標題 Inhibition of Gastric H ⁺ ,K ⁺ -ATPase Activity in Vitro by Dissolution Media of Original Brand-Name and Generic Tablets of Lansoprazole, a Proton Pump Inhibitor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 896 ~ 900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Takuto, Shimizu Takahiro, Yamamoto Shota, Funayama Keisuke, Fujita Kyosuke, Tabuchi Yoshiaki, Ikari Akira, Takeshima Hiroshi, Sakai Hideki	4. 巻 1864
2. 論文標題 Crosstalk between Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase and a volume-regulated anion channel in membrane microdomains of human cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 3792 ~ 3804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2018.09.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Takuto, Sakai Hideki	4. 巻 43
2. 論文標題 Regulation of Trafficking of Glucose Transporter by Cardiac Glycosides in Hepatocellular Carcinoma Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 MEMBRANE	6. 最初と最後の頁 194 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.5360/membrane.43.194	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Takahiro, Higuchi Taiga, Toba Toshihiro, Ohno Chie, Fujii Takuto, Nilius Bernd, Sakai Hideki	4. 巻 7
2. 論文標題 The asparagine 533 residue in the outer pore loop region of the mouse PKD2L1 channel is essential for its voltage-dependent inactivation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1392 ~ 1401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyazaki Yuu, Ichimura Atsuhiko, Sato Shun, Fujii Takuto, Oishi Shinya, Sakai Hideki, Takeshima Hiroshi	4. 巻 820
2. 論文標題 The natural flavonoid myricetin inhibits gastric H ⁺ , K ⁺ -ATPase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 217 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2017.12.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計44件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Fujii T., Phutthatiraphap S., Shimizu T., Sakai H.
2. 発表標題 Negative-regulation of gastric proton pump by N-terminal polypeptide of Sonic Hedgehog
3. 学会等名 Basel Life 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 拓人, 清水 颯人, 清水 貴浩, 高橋 康史, 永森 収志, 酒井 秀紀
2. 発表標題 胃酸分泌細胞の膜依存的な異なる酸分泌機能ユニット
3. 学会等名 生体コモンスペース研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井拓人, 大坪愛実, Nguyen Thi Tu Oanh, 加藤瑞希, 清水貴浩, 竹島浩, 酒井秀紀
2. 発表標題 癌細胞内ナトリウムポンプを起点としたグルコース輸送体トラフィック制御機構
3. 学会等名 2019 年度 生理研研究会 『上皮膜・間質の機能連関と病態発現機構解明のためのストラテジー』
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井拓人, 大坪愛実, Nguyen Thi Tu Oanh, 加藤瑞希, 清水貴浩, 竹島 浩, 酒井秀紀
2. 発表標題 強心配糖体によるがん細胞内ナトリウムポンプを介したグルコース輸送体トラフィック制御機構
3. 学会等名 第66回中部生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 貴浩, 川島健太郎, 藤井 拓人, 酒井 秀紀
2. 発表標題 容積感受性アニオンチャンネル電流のLRRC8Eによる制御
3. 学会等名 第66回中部生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 拓人, 酒井 秀紀
2. 発表標題 がん細胞特異的ナトリウムポンプ複合体を標的とした新規がん治療法開発基盤の構築
3. 学会等名 Bio Japan 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤瑞希, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀
2. 発表標題 ヒト肝がん細胞におけるThyroid Adenoma Associated (THADA)の病態生理機能の解明
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部 第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 隆大, 清水貴浩, 大野智恵, 松田夏穂, 藤井拓人, 酒井秀紀
2. 発表標題 容積感受性外向き整流性Cl ⁻ チャネルの機能調節因子の解明
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部 第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井 佳暖, 清水貴浩, 藤井拓人, 鍋島 彰大, 酒井秀紀
2. 発表標題 膜タンパク質TMEM16Fのイオン/リン脂質輸送メカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部 第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住吉 志萌, 清水貴浩, 藤田恭輔, 藤井拓人, 渡辺志郎, 酒井秀紀
2. 発表標題 アラキドン酸による容積感受性外向き整流性Cl ⁻ チャネルの制御
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部 第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村山 資, 藤井拓人, 伊原 大輔, 清水貴浩, 田淵 明子, 酒井秀紀.
2. 発表標題 自閉症に関連するカチオンポンプの病態生理機能の解明
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部 第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujii T, Ootsubo M, Shimizu T, Tabuchi Y, Takeshima H, Sakai H.
2. 発表標題 Anti-cancer effects of cardiac glycosides by regulating the membrane distribution of glucose transporter-1.
3. 学会等名 The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (3rd TAA-Pharm Symposium) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawashima K, Shimizu T, Fujii T, Sakai H.
2. 発表標題 The functional regulation of volume-sensitive anion channels by LRRC8E.
3. 学会等名 The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (3rd TAA-Pharm Symposium) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murata N, Sugimoto K, Miura Y, Shimizu T, Fujii T, Matsuya Y, Sakai H.
2. 発表標題 Effects of dihydropyrazole derivatives on Cl ⁻ secretion in rat colonic mucosa.
3. 学会等名 The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (3rd TAA-Pharm Symposium) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimizu T, Fujii T, Sakai H.
2. 発表標題 An asparagine residue in the outer pore loop regulates the voltage-dependent inactivation of PKD2L1 channels.
3. 学会等名 The 49th NIPS International Symposium (Ion channels: looking back, seeing ahead) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujii T, Shimizu T, Takeshima H, Sakai H.
2. 発表標題 Anti-cancer effects of cardiac glycosides through activation of volume-regulated anion channel.
3. 学会等名 The 49th NIPS International Symposium (Ion channels: looking back, seeing ahead) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujii T, Phutthathiraphap S, Shimizu T, Sakai H.
2. 発表標題 Non-morphogenic function of Sonic Hedgehog as a negative regulator of gastric H ⁺ ,K ⁺ -ATPase
3. 学会等名 9th FAOPS congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakai H, Murata N, Sugimoto K, Miura Y, Shimizu T, Fujii T, Matsuya Y.
2. 発表標題 Inhibition of prostaglandin E2-induced Cl ⁻ secretion by dihydropyrazole derivatives in rat colon.
3. 学会等名 9th FAOPS congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimizu T, Yanase N, Fujii T, Sakakibara H, Sakai H.
2. 発表標題 The regulation of TRPV1 channel gating by intracellular ATP.
3. 学会等名 9th FAOPS congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井拓人, 大坪愛実, 井口真由美, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 強心配糖体による肝ガン細胞のグルコーストランスポーターのトラフィック制御.
3. 学会等名 日本膜学会第40年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井拓人, 高橋康史, 周縁殊, 清水貴浩, 永森収志, 酒井秀紀.
2. 発表標題 胃酸分泌細胞の頂端膜間微小スペース構造および構成分子の解明.
3. 学会等名 平成30年度生理研研究会「生体コモンスペース研究会」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井拓人, 大坪愛実, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 強心配糖体によるヒト肝がん細胞のグルコース取込み抑制機構.
3. 学会等名 第65回 中部日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢後壘沙佳, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 小胞体に発現するオーファンP型ATPaseの生理機能解明.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鄭仕州, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 パーキンソン病に関連するリソソーム局在P型ATPaseの病態生理機能の解明.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大坪愛実, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 強心配糖体によるヒト肝ガン細胞のグルコース輸送体 (GLUT1) のトラフィック制御機構.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗栖章紘, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 新規プロトンチャネルOtopetrin3の機能解析.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井秀紀, 藤井拓人, 清水貴浩, 竹島 浩.
2. 発表標題 がん細胞特異的なNa, K-ATPaseと細胞容積感受性アニオンチャネルの機能連関
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井拓人, 清水貴浩, 久代京一郎, 竹島 浩, 高井まどか, 酒井秀紀.
2. 発表標題 シアル酸蛍光ナノプローブを用いた胃プロトンポンプのネガティブフィードバック機構の可視化
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井拓人, 大坪愛実, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 強心配糖体による癌細胞のグルコーストランスポーター局在制御
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井拓人, 高橋康史, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 胃酸分泌刺激による壁細胞頂端膜界面の構造変化
3. 学会等名 平成29年度生理研研究会「生体界面研究会」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村田望, 杉本健士, 三浦優佳, 清水貴浩, 藤井拓人, 松谷裕二, 酒井秀紀.
2. 発表標題 ジヒドロピラゾール誘導体の大腸粘膜イオン輸送に対する効果
3. 学会等名 平成29年度生理研研究会「体内環境の維持機構における上皮膜輸送の多角的・統合的理解」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水貴浩, 鍋島彰太, 藤井拓人, 小澤茂喜, 酒井秀紀.
2. 発表標題 TMEM16Fの機能的多様性の連関機構の解析
3. 学会等名 第64回中部日本生理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井拓人
2. 発表標題 SICMを用いた胃酸分泌細胞頂端膜界面の形状解析
3. 学会等名 ナノ計測勉強会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鍋島彰太, 清水貴浩, 藤井拓人, 小澤茂喜, 酒井秀紀.
2. 発表標題 TMEM16F変異体のリン脂質スクランブラーゼ活性とアニオンチャネル機能の解析
3. 学会等名 第39回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上貴斗, 出口徳泰, 藤田恭輔, 阿波加隼也, 田淵圭章, Ursula Seidler, 清水貴浩, 藤井拓人, 酒井秀紀.
2. 発表標題 胃酸分泌細胞基底側膜のCl ⁻ 輸送タンパク質SLC26A7の機能解析
3. 学会等名 第39回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村田望, 杉本健士, 三浦優佳, 清水貴浩, 藤井拓人, 松谷裕二, 酒井秀紀.
2. 発表標題 ラット単離大腸粘膜のCl ⁻ 輸送に対するジヒドロピラゾール誘導体の阻害効果
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第129回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川島健太郎, 大野智恵, 清水貴浩, 藤井拓人, 酒井秀紀.
2. 発表標題 細胞容積調節性アニオンチャネルの構成因子LRRC8Eの機能
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第129回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳瀬宣広, 清水貴浩, 藤井拓人, 榊原陽香, 酒井秀紀.
2. 発表標題 TRPV1チャネルの外向き電流に対する細胞内ATPの効果
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第129回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松田夏穂, 清水貴浩, 藤井拓人, 富井寿詠, 酒井秀紀.
2. 発表標題 細胞容積調節機構に關与するアニオンチャネルの機能制御分子
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第129回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Siriporn Phutthathiraphap, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 胃プロトンポンプ活性に対するSonic hedgehogの効果
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第129回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井拓人, Siriporn Phutthathiraphap, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 Sonic hedgehogによる胃プロトンポンプ活性の制御
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井拓人, 周緑殊, 清水貴浩, 高橋康史, 酒井秀紀.
2. 発表標題 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡を用いた胃酸分泌細胞頂端膜形態のナノスケールダイナミクス解析
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井秀紀, 藤井拓人, 清水貴浩.
2. 発表標題 ヒト大腸上皮のK+およびCl-チャネルの機能
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水貴浩, 藤井拓人, 酒井秀紀.
2. 発表標題 Transmembrane channel-like protein (TMC)4の電気生理学的解析
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学医学薬学研究部 薬物生理学研究室ホームページ
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphy1/index-j.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----