

令和 3 年 8 月 14 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02407

研究課題名(和文) ポリアミン作動性化学伝達を司るトランスポーターの構造・機能・生理的意義

研究課題名(英文) Structure, function and physiological significance of vesicular polyamine transporter

研究代表者

森山 芳則 (Moriyama, Yoshinori)

久留米大学・医学部・客員教授

研究者番号：10150658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス小胞中のポリアミンは、開口放出され、NMDA受容体の結合部位に結合しグルタミン化学伝達を制御している。VPATはポリアミンの小胞濃縮を司るトランスポーターでありアミントランスポーターSLC18ファミリーの一つである。本研究において、精製VPAT封入リポソームを用い、ポリアミン輸送に必須のアミノ酸残基を同定した。VPATのモノアミンに対する輸送能が想定より低くポリアミンへの特異性が高いこと、蛍光性炎症マーカーを輸送することを実証した。ショウジョウバエ・ホモログもVPATと似た基質認識能を持っていた。これらの成果を統合し、化学伝達物質としてのポリアミンの生物学的意義を考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はVMAT, VAChT研究とポリアミン生物学化学の研究の歴史の上に立つものであり、両研究を本質的に発展させるものである。すなわち、生体アミンによる化学伝達は従来言われていたようにモノアミン類とアセチルコリンだけでなくポリアミンも含まれる広い範囲のものであること、またポリアミンはこれまで知られていたように遺伝子タンパク質発現時の制御調整因子としての機能だけでなく化学伝達物質としても機能することを示す証拠を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Spermine and spermidine are stored in synaptic vesicles, released through exocytosis, bind to the specific binding sites of NMDA receptors, and regulate glutamatergic chemical transmission. Vesicular polyamine transporter (VPAT), a member of the amine transporter family SLC18, is responsible for vesicular storage of polyamines. Using purified VPAT-containing liposomes, I identified amino acid residues essential for polyamine transport. I also showed that VPAT preferred polyamines as substrates than expected and transports a fluorescent inflammatory biomarker. Drosophila homolog also had a substrate recognition ability similar to that of mammalian VPAT. Based on these observations, I discussed biological significance of polyamines as chemical mediators.

研究分野：生化学

キーワード：トランスポーター 化学伝達 ポリアミン モノアミン シナプス小胞 分泌顆粒

1. 研究開始当初の背景

スペルミンやスペルミジンは細菌からヒトに至るまで生物に普遍的に存在するポリアミンであり、遺伝子複製や増殖・分化等に必須である (Pegg, 2016)。ポリアミンは、ほ乳類においては、遺伝子発現制御や代謝制御だけでなく、細胞間情報伝達物質として機能しており化学伝達を制御していることがわかって

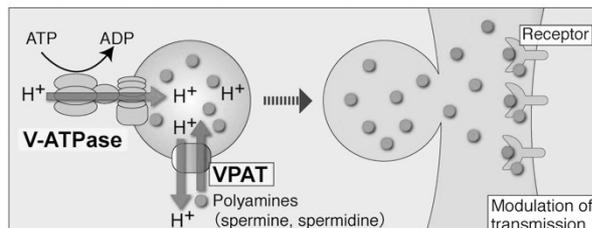


図1 小胞型ポリアミントランスポーター機構

てきた。すなわち、神経においてポリアミンは高濃度(0.1 M程度)シナプス小胞に濃縮され、シナプス間隙に開口放出される (Harman and Shaw, 1981; Masuko et al., 2003) (図1)。放出されたポリアミンはNMDA受容体やAMPA受容体の特異的結合部位に結合しグルタミン酸化学伝達を調整している (Williams 1997; Pegg, 2016)。低濃度では興奮性化学伝達が強く亢進される。このシグナリングの制御異常と統合失調症等の神経疾患の発症との間に密接な関係があることがわかってきた。神経系におけるポリアミンの作用は、ポリアミン作動性化学伝達によるものと考えられることができるが、その全貌は不明であった。申請者はポリアミンをシナプス小胞に濃縮する新規小胞型トランスポーターを同定し、小胞型ポリアミントランスポーター (**vesicular polyamine transporter, VPAT**) と命名した (Hiasa et al., 2014, Moriyama et al., 2017)。VPATは、神経系におけるポリアミンの蓄積・放出に対する強力な分子マーカーであり、VPATに焦点を合わせることでポリアミン作動性化学伝達の基本特性 (いつ、どこで、どのように駆動されるのか、興奮性化学伝達の調整以外にどのような生理機能を司るのか) が解明できることになった。

VPAT はアミン・トランスポーターファミリー (SLC18) の4番目のメンバーSLCB1 であり vesicular monoamine transporter 1 (SLC18A1, **VMAT1**), vesicular monoamine transporter 2 (SLC18A2, **VMAT2**), vesicular acetylcholine transporter (SLC18A3, **VAcHT**) に続くものである (Moriyama et al., 2017) (図2)。VMAT 及び VAcHT はそれぞれモノアミン及びアセチルコリンのシナプス小胞充填を司っており、モノアミン及びコリン作動性化学伝達に必須である。VPAT の発見により、生体が伝達物質として利用するアミン

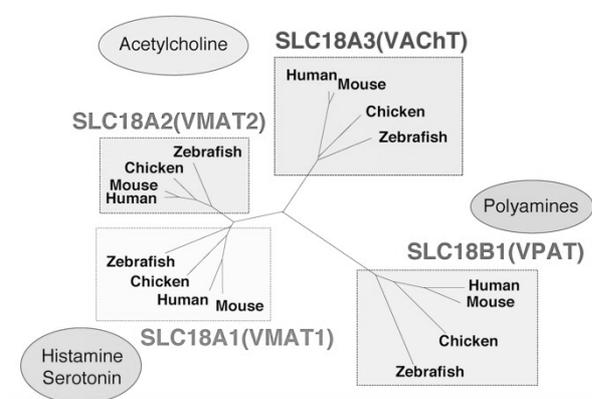


図2 SLC18ファミリー

類はモノアミン類だけでなく、ポリアミンも含むアミン全体に及ぶことも明らかとなった。

2. 研究の目的

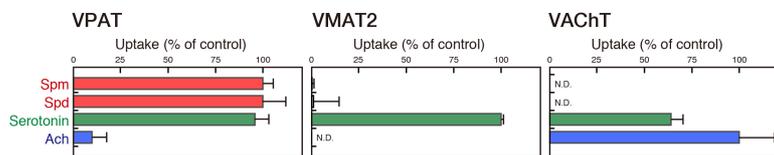
本研究により、VPAT の構造機能を解析する。VPAT は小胞型アミントランスポーターファミリーの一つ SLC18B1 によりコードされており動物に広く存在する。昆虫・ホモログの機能を解明する。これらの成果を統合し、化学伝達物質としてのポリアミンの生物学的意義を解明する。

3. 研究の方法

Nelson の方法 (Leviatan S et al., (2010) JBC 20525689) により大腸菌内で発現させた wild/mutant ヒト及びショウジョウバエ VPAT を界面活性剤 phoscholine で可溶化し

affinity 精製し大豆リン脂質リポソームに組み込んだ。(NH₄)₂SO₄ 希釈法(Adam Y et al., (2008) AmJPhys18287335)により人工的に pH 勾配を形成したりポソームへの基質の取り込みは centrifuge column 法により行った。抗 VPAT 抗体を用いた免疫組織化学は常法により行った。

4. 研究成果



ヒト及びマウス VPAT の大腸菌を用いた大量発現系を新たに構築し SDS ゲル電気泳動により VPAT を単一バンドになるまで精製した。VPAT をリポソームに組み込み各種アミンの輸送を測定した。その結果、以前の報告(Hiasa et al., 2014 Sci Rep 4, 6836)の結果を修正する必要があることを見出した。すなわち、serotonin は VMAT だけでなく VPAT の良い基質であり、VAcHT にも基質として認識されることを報告した。しかしこの結果は serotonin の膜透過性を考慮しないものであり、トランスポーターによる輸送は高々 30%程度であった。すなわち、SLC18 メンバーの基質特異性は高い。アクリジン系蛍光色素 CDg16 は活性化マクロファージの酸性顆粒内に蓄積し蛍光を発することから炎症の biomarker として用いることができる。この蓄積に *SLC18B1* が関わっていることが示唆されていた(Park SJ et al., 2018 Nature Commun. 30846702)。この結論を実証した。VPAT は CDg16 を pH 依存的に能動輸送した。VPAT は 12 回膜貫通型トランスポーターである。TMD4 の Arg 残基及び TMD7 の Asp 残基は既知の全ての SLC18B1 メンバーに保存されている。これらの Ala 変異体を精製しアミン輸送活性を測定した所、野生型の活性に比べ 80%低下していた。現在、変異体の基質特異性の変動について詳細に検討している。VPAT の特異抗体を調製し、これを用いて VPAT の発現部位を免疫組織化学的に調べた。神経やアストロサイト以外に広範な組織・細胞で VPAT が発現していることを明らかにした。なお、これまで、単離したオルガネラにおけるポリアミン輸送活性測定は輸送実験に使用するニトロセルロース膜へのポリアミンの非特異的吸着が高いために Masuko ら(2003, J Neurochem 12558981)以外では成功していない。今回、輸送測定系を改良し単離したオルガネラにおけるポリアミン輸送活性測定が定量的にできるようになった。ショウジョウバエの VPAT homologue の cDNA を都神経研齊藤博士宮下博士より分与いただき発現系を構築した。精製 VPAT homologue のアミン輸送活性を測定した結果、昆虫型 VPAT であることを実証した。

上記の成果の一部は代表者が当該年度に公表した下記の論文及び総説に含まれる。一部は現在論文を準備中である。

Moriyama Y et al., (2020) Vesicular polyamine transporter as a novel player in amine-mediated chemical transmission. BBA Biomembrane 1862, 183208.

Hasuzawa N et al., (2021) Quinacrine is not a vital fluorescence probe for vesicular ATP storage. Submitted for publication.

Hasuzawa N, et al., (2021) Clodronate, an inhibitor of the vesicular nucleotide

transporter. Ameliorates steatohepatitis and acute liver injury. *Sci Rep* 5192.

Moriyama Y, Shinohara Y. (2021) Strategies for transporter-targeted drug discovery. *Yakugaku Zasshi* 141:489–490.

Tatsushima K, et al, (2021) Vesicular ATP release from hepatocytes plays a role in the progression of nonalcoholic steatohepatitis. *BBA Molecular basis of disease* 166013.

Hasuzawa N, Moriyama S, Moriyama Y, Nomura M. (2020) Physiopathological roles of vesicular nucleotide transporter (VNUT), an essential component for vesicular ATP release. *BBA Biomembrane* 183408

Moriyama Y and Gasnier B. (2020) Transporters in acidic organelles. *BBA Biomembrane* 183458.

Nakamura S et al., (2020) The mitochondrial inner membrane protein LETM1 modulates cristae organization through its LETM domain. *Commun Biol* 32139798

Leano JB, et al., (2019) Structures suggest a mechanism for energy-coupling by a family of organic anion transporters. *Pros Biol* e3000260.

Mihara H, et al., (2018) Involvement of VNUT-exocytosis in transient receptor potential vanilloid 4-dependent ATP release from gastrointestinal epithelium. *ProsOne* e0206276.

Maruyama K et al., (2018) The ATP transporter VNUT mediates induction of dectine 1-triggered Candida nociception. *iScience* 30240621.

Kawasaki T, et al., (2018) Purification and reconstitution of polyspecific H⁺/organic cation antiporter. *BBA Biomembrane* 30028956.

Kinoshita M et al., (2018) Anti-depressant fluoxetine reveals its therapeutic effect via astrocytes. *EBioMedicine* 29887330.

Kawakami M, et al., (2018) Efficient mass spectral analysis of active transporters overexpressed in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* 29350038.

Harada Y, et al., (2018) vesicular nucleotide transporter mediates ATP-release and migration in neutrophils. *J Biol Chem* 29363573.

Omote H, Moriyama Y (2018) Reconstitution and transport analysis of eucaryotic transporters in the post-genomic era. *Methods Mol Biol* 29177840.

Moriyama Y, Nomura M (2018) Clodronate: a vesicular ATP release blocker. Trends Pharmacol Sci 29146440.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Hasuzawa N, Tatsushima K, Wang L, Kabashima M, Tokubuchi R, Nagayama Am Ashida Km Ogawa Y, Moriyama Y, Nomura M	4. 巻 11
2. 論文標題 Clodronate, an inhibitor of the vesicular nucleotide transporter, ameliorates steatohepatitis and acute liver injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5192-5215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83144-w	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 Moriyama Y, Shinohara Y	4. 巻 141
2. 論文標題 Strategies for transporter-targeted drug discovery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 489-490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00204-F	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 Tatsushima K, Hasuzawa N, Wang L, Hiasa M, sakamoto S, Ashida K, Sudo N, Moriyama Y, Nomura M	4. 巻 1867
2. 論文標題 Vesicular ATP release from hepatocytes plays a role in the progression of nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis	6. 最初と最後の頁 166013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1916/j.bbadis.2020.166013	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 Moriyama Y, Gasnier B	4. 巻 1862
2. 論文標題 Transporters in acidic organelles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Biomembrane	6. 最初と最後の頁 183458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183458	査読の有無 無
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 Hasuzawa N, Moriyama S, Moriyama Y, Nomura M	4. 巻 1862
2. 論文標題 Physiolopathological roles of vesicular nucleotide transporter (VNUT) , an essential component for vesicular ATP release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Bomembrane	6. 最初と最後の頁 183408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183408	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 Nakamura S, Matsui A, Akabane S, Tamura Y, Hatano A, Miyano Y, Omote H, Moriyama Y, Endo T, Oka T	4. 巻 5
2. 論文標題 The mitochondrial inner membrane protein LETM1 modulates cristae organization through its LETM domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 32139798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0832-5	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 Yoshinori Moriyama, Ryo Hatano, Satomi Moriyama, Shunsuke Uehara.	4. 巻 1862
2. 論文標題 Vesicular polyamine transporter as a novel player in amine-mediated chemical transmission.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta	6. 最初と最後の頁 183208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183208	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 Leano JB, Batarni S, Eriksen J, Juge N, Pak JE, Kimura-Someya T, Robles-Colmenares Y, Moriyama Y, Stroud RT, Edwards RH	4. 巻 17
2. 論文標題 Structures suggest a mechanism for energy coupling by a family of organic anion transporters.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ProsBiology	6. 最初と最後の頁 e3000260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000260.	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 Nakamura S, Matsui A, Akabane S, Tamura Y, Hatano A, Miyano Y, Omote H, Kajikawa M, Maenaka K, Moriyama Y, Endo T, Oka T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct role of the mitochondrial inner membrane protein LETM1 in the organization of cristae structures.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0832-5	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 Mihara H, Uchida K, Koizumi S, Moriyama Y	4. 巻 13
2. 論文標題 Involvement of VNUT-exocytosis in transient receptor potential vanilloid 4-dependent ATP release from gastrointestinal epithelium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pros One	6. 最初と最後の頁 e0206276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0206276	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 Maruyama K, Takeyama Y, Sugisawa E, Yamanoi Y, Yokawa T, Kondo T, Ishibashi KI, Sahoo BR, Takemura N, Mori Y, Kanemaru H, Kumagai Y, Matino MM, Yoshioka Y, Nishijo H, Tanaka H, Sasaki A, Ohno N, Iwakura Y, Moriyama Y, Nomura M, Akira S, Tominaga M.	4. 巻 6
2. 論文標題 The ATP transporter VNUT mediates induction of dectin-1-triggered candida nociception	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 306-318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2018.08/007	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 Kawasaki T, Matsumoto T, Iwai Y, Kawakami M, Juge N, Omote H, Nabekura T, Moriyama Y	4. 巻 1860
2. 論文標題 Purification and reconstitution of polyspecific H ⁺ -organic cation antiporter human MATE1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Biomembrane	6. 最初と最後の頁 2456-2464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2018.07.005	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 Kinoshita M, Hirayama Y, Fujishita K, Shibata K, Shinozaki E, Shigetomi E, Takeba A, Le HPN, Hayashi H, Hiasa M, Moriyama Y, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S	4. 巻 32
2. 論文標題 Anti-depressant fluoxetine reveals its therapeutic effect via astrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 72-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2018.05.036	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 Harada Y, Kato Y, Miyaji T, Omote H, Moriyama Y, Hiasa M	4. 巻 293
2. 論文標題 Vesicular nucleotide transporter mediates ATP release and migration in neutrophils	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem	6. 最初と最後の頁 3770-3779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.810168	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 Kawakami M, Kato Y, Juge N, Omote H, Moriyama Y, Miyaji T	4. 巻 17
2. 論文標題 Efficient mass spectral analysis of active transporters overexpressed in Escherichia coli	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Proteome Res	6. 最初と最後の頁 1108-1119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.102/acs.jproteome.7b00777	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 Omote H, Moriyama Y	4. 巻 1700
2. 論文標題 Reconstitution and transport analysis of eukaryotic transporters in the post-genome era	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 343-352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-745402_19	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 Moriyama Y Nomura M	4. 巻 39
2. 論文標題 Clodronate: a vesicular ATP release blocker	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trends in Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 12-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tips.2017.10.007	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yoshinori Moriyama
2. 発表標題 Vesicular transporters for polyamines and ATP
3. 学会等名 Gordon conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Moriyama Y
2. 発表標題 Physiological role of vesicular polyamine transporter
3. 学会等名 Gordon Reserch Conference Membrane Transporters (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moriyama Y
2. 発表標題 Structure and function of vesicular nucleotide transporter
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2018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
研究 分担者	野村 政壽 (NOMURA Masatoshi) (30315080)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	
研究 分担者	上原 俊介 (UEHARA Shunsuke) (90434480)	松本歯科大学・歯学部・講師 (33602)	

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