

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K07258
研究課題名（和文）新規カリウム汲み出しポンプによる小胞体カルシウムシグナリング制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of calcium signaling in endoplasmic reticulum by novel K+ pump

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小胞体に発現する膜輸送タンパク質（ER-ATPase）の生理機能の解明を目的とした。ER-ATPase過剰発現細胞では小胞体のK+輸送活性が有意に増加した。ER-ATPaseノックダウン細胞では小胞体内Ca²⁺レベルが有意に増加した。ER-ATPaseをノックダウンすることで細胞増殖能が有意に低下し、ER-ATPaseの発現レスキューにより増殖能は有意に回復した。またER-ATPaseノックダウン細胞において小胞体ストレスマーカーであるGRP78の発現が有意に増加した。以上より、ER-ATPaseは小胞体K+ポンプとして機能しており、小胞体Ca²⁺動態に重要であ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

本研究では、小胞体においてK+ポンプとして機能する膜輸送タンパク質ER-ATPase（仮称）を見出し、小胞体Ca²⁺動態における生理的役割を明らかにした。本成果は、「新規K+ポンプの関与する小胞体Ca²⁺シグナリング制御機構」という細胞恒常性維持機構の新規概念につながることで期待される。生命活動における小胞体Ca²⁺シグナリングの重要性から考えて、本研究の学術的意義および多くの研究分野への普遍的波及効果は高い。またER-ATPaseの機能低下が、様々な病態発症に關与する小胞体ストレスを引き起こすことから、今後の研究により新たな病態発症機構が解明されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the physiological function of a membrane transport protein (ER-ATPase) expressed in the endoplasmic reticulum (ER). K+-transport activity in the ER was significantly increased in ER-ATPase-overexpressing cells. ER Ca²⁺ levels were significantly increased in the ER-ATPase knockdown cells. ER-ATPase knockdown significantly decreased cell proliferation, and the rescue of ER-ATPase expression significantly restored the decreased proliferation. The expression of GRP78, a marker of ER stress, was significantly increased in ER-ATPase-knockdown cells. These results suggest that ER-ATPase functions as an ER K+-pump and is important for ER Ca²⁺ dynamics.

研究分野：細胞生理学

キーワード：小胞体 K+ポンプ カルシウム 小胞体ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多機能オルガネラである小胞体は、タンパク質合成や修飾、脂質合成などの機能に加えて、細胞内の Ca^{2+} 貯蔵庫 (ストア) としても働いており、 Ca^{2+} シグナルの形成に極めて重要な役割を担っている。小胞体から放出される Ca^{2+} は、多様な生体機能に寄与しており、細胞内 Ca^{2+} 濃度は、時空間的に厳密に制御されている。その破綻は、心疾患、神経変性疾患、糖尿病など重篤な病態発症に直結する。これまで小胞体 Ca^{2+} 輸送機構の研究は国内外で盛んに行われており、小胞体から Ca^{2+} を放出する分子 (リアノジン受容体 (RyR) チャネルや IP_3 受容体チャネル)、小胞体へ Ca^{2+} を取り込む Ca^{2+} ポンプ (SERCA)、また原形質膜では細胞外へ Ca^{2+} を汲み出す Ca^{2+} ポンプ (PMCA) が同定されている。さらに、 Ca^{2+} 放出により生じる小胞内腔の負電荷を中和する K^+ チャネル (TRIC チャネル) が発見され、その欠損が小胞体 Ca^{2+} シグナリングに異常を引き起こすことから、 Ca^{2+} シグナリングが K^+ 輸送により制御されていることが明らかになった。しかし、TRIC チャネルにより小胞体に取り込まれた K^+ を再び細胞質へ戻し、小胞体内外の K^+ ホメオスタシスを回復・維持する分子メカニズムについては全く研究が進んでおらず未解明である。

2. 研究の目的

我々は、様々な細胞の小胞体に発現する「ER-ATPase (論文投稿中のため仮称)」が K^+ -ATPase (K^+ ポンプ) として機能することを見出した。ポンプとして機能する ER-ATPase であれば ATP 加水分解エネルギーを利用し、小胞体から細胞質へ濃度勾配に逆らった K^+ 汲み出しが可能である。本研究は、(1)ER-ATPase の小胞体における K^+ 汲み出し機構およびその制御メカニズム、(2)小胞体 Ca^{2+} シグナリングにおける生理的意義、(3)ER-ATPase の機能破綻による病態発症機構の解明を目的とし、 K^+ ポンプの関与する小胞体 Ca^{2+} シグナリング制御機構という新規概念の実証を目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞は、10% FBS、100 U/ml penicillin-streptomycin solution を含む DMEM を用いて培養した。ヒト ER-ATPase 発現ベクターを PEI-MAX を用いたリポフェクション法により導入し、細胞を 24 時間培養した。ノックダウン実験では、ヒト ER-ATPase に対する siRNA もしくはコントロール siRNA を lipofectamine 3000 を用いたリポフェクション法により導入し、細胞を 24、48、72 および 96 時間培養した。レスキュー実験として、siRNA をトランスフェクションした 24 時間後に、プラスミドベクターを PEI-MAX を用いてトランスフェクションし、更に 48 時間培養した。

免疫細胞染色

HEK293 細胞を 0.1 mM CaCl_2 、0.1 mM MgCl_2 を含んだ PBS (PBS (++)) で洗浄した後、氷冷した 100% methanol を用いて室温で 5 分間細胞を固定した。PBS (++) で 5 分間 3 回洗浄した後、permeabilization buffer (0.3% Triton X-100、0.1% BSA を含む PBS (++)) を用いて室温で 15 分間インキュベーションし、細胞膜の透過性を上昇させた。GSDB (17% goat serum、450 mM NaCl、0.3% Triton X-100 を含む 20 mM phosphate buffer (pH 7.4)) を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。GSDB で希釈した一次抗体と 4 で一晩反応させた。Permeabilization buffer で 5 分間 3 回洗浄した後、GSDB で希釈した二次抗体を室温で 1 時間遮光して反応させた。PBS (++) で 5 分間 3 回洗浄した後、PBS (++) で希釈した DAPI solution を室温で 10 分間反応させた。PBS (++) で 5 分間 2 回および蒸留水で 5 分間洗浄した後、fluorescence mounting medium (Dako) でカバーガラスをスライドガラスに固定した。共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM780) を用いて観察した。

SDS-PAGE およびウエスタンブロット

ミニプロテイン Tetra セル (Bio-Rad) を用いて 4.5% アクリルアミド濃縮用ゲル、7.5% アクリルアミド分離用ゲルを作製し、SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE で分離したサンプルを PVDF 膜に 100 V で 1 時間転写した。転写後、PVDF 膜を 5% skim milk を含む TBS を用いてブロッキングした。5% skim milk を含む TBS-T で希釈した一次抗体と 4°C で一晩振とうした。TBS-T で 5 分間 3 回洗浄し、5% skim milk を含む TBS-T で希釈した二次抗体と室温で 1 時間振とうした。抗体反応後、TBS-T で 5 分間洗浄した。Western Lighting ECL pro または SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate を用いて化学発光させた後、LAS4000 により検出した。なお、一次抗体として抗 Xpress 抗体 (5,000 倍希釈)、抗 ER-ATPase 抗体 (5,000 倍希釈)、抗 GRP78 抗体 (2,500 倍希釈)、抗 β -actin 抗体 (5,000 倍希釈) を用い、二次抗体として AP182 または AP192 抗体 (5,000 倍希釈) を用いた。

細胞増殖能測定

24-well collagen plate 上に 3×10^4 個の HEK293 細胞を播種し、37 °C で培養した。24 時間後に siRNA をトランスフェクションし、siRNA 処理から 24 時間後、48 時間後、72 時間後、96 時間後に細胞数を計測した。ER-ATPase 発現プラスミドを用いたレスキュー実験の際には、 4×10^4 個の HEK293 細胞を播種し、24 時間後に siRNA をトランスフェクションした。さらに 24 時間後に発現ベクターをトランスフェクションした。siRNA のトランスフェクションから 48 時間、72 時間および 96 時間後に細胞数を計測した。

$^{86}\text{Rb}^+$ 輸送活性の測定

24-well collagen plate で HEK293 細胞を培養した。ER-ATPase 発現ベクターをトランスフェクションする際に、培養メディウム (D-MEM) に $^{86}\text{Rb}^+$ (2.5×10^5 cpm/sample) を添加し、37 °C で 24 時間インキュベーションした。20 mg/mL saponin を加えた培養メディウムに交換し、原形質膜の透過処理を 5 分間行った後、wash buffer (150 mM RbCl を含んだ PIPES-NaOH (pH 7.2)) で 1 回洗浄した。細胞外溶液を efflux buffer (150 mM RbCl, 30 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 5 mM NaN_3 , 100 mM ouabain, 2 mM ATP) に交換し、37 °C で 15 分間インキュベーションした。インキュベーション後、wash buffer で 2 回洗浄し、lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, protease inhibitor) で細胞を可溶化した後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

Ca^{2+} イメージング

24-well collagen plate で 24 時間培養した HEK293 細胞に各種 siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に培養メディウムを交換し、さらに 24 時間後に細胞をピペッティングして剥がし懸濁した。懸濁液を poly-L-lysine でコートした glass based dish (IWAKI) にまき、37°C で 5% CO_2 存在下において培養した。12 時間後、メディウムを除去し、5 mM Fura 2-AM を含む D-MEM 200 ml 中において 37°C で 30 分間インキュベーションした。その後、 Ca^{2+} -free 溶液 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, 10 mM D (+)-glucose を含む 10 mM Hepes buffer (pH 7.35)) で 3 回洗浄し測定に用いた。測定には Aquacosmos (浜松ホトニクス) を用い、340 nm/380 nm (蛍光強度 530 nm) の ratio 値を測定した。

4. 研究成果

ER-ATPase 過剰発現 HEK293 細胞における $^{86}\text{Rb}^+$ 輸送活性の検討

K^+ の代替イオンである $^{86}\text{Rb}^+$ を用いて、小胞体における ER-ATPase の K^+ 輸送機能について検討した。ER-ATPase 過剰発現細胞における ATP 依存的な $^{86}\text{Rb}^+$ 放出レベルは、mock 細胞よりも有意に増加した (図 1)。一方、当研究室のこれまでの研究で見出した ER-ATPase の K^+ 依存性 ATPase 活性を有意に減少させる変異体 (E/Q 変異体) 発現細胞では、mock 細胞に比べて有意な ATP 依存的な $^{86}\text{Rb}^+$ 放出レベルの上昇は見られなかった (図 1)。ER-ATPase は小胞体に過剰発現することから、ER-ATPase 発現細胞において上昇した ATP 依存的な $^{86}\text{Rb}^+$ 放出は小胞体からであると考えられる。ER-ATPase は小胞体から細胞質に K^+ を排出する K^+ ポンプ (ATPase) として機能することが示唆された。

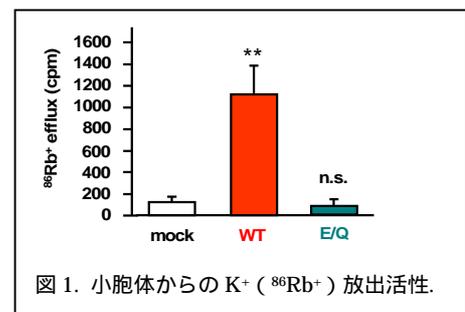


図 1. 小胞体からの K^+ ($^{86}\text{Rb}^+$) 放出活性。

ER-ATPase の発現変化が小胞体内 Ca^{2+} レベルに与える効果の検討

ER-ATPase が欠損することによる小胞体機能への影響を検討するため、siRNA をトランスフェクションした HEK293 細胞において、 Ca^{2+} インジケーターである Fura-2-AM を用いた Ca^{2+} イメージングを行った。Thapsigargin (TG) は SERCA を阻害し Ca^{2+} リークチャネルを活性化することで小胞体内に貯蔵された Ca^{2+} を放出する。従って、 Ca^{2+} -free 溶液により細胞外からの Ca^{2+} 流入を抑制した条件において thapsigargin を処理することで見られる細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の一過性の上昇レベルから小胞体内 Ca^{2+} レベルが評価できる。コントロールおよび ER-ATPase の siRNA をトランスフェクションした細胞間における thapsigargin 誘導性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇レベルについて比較したところ、ER-ATPase ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べて thapsigargin 誘導性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇レベルが有意に増加した (図 2)。従って、ER-ATPase の発現レベルが低下すると小胞体内 Ca^{2+} レベルの増加 (Ca^{2+} オーバーロード) が引き起こされることが示唆された。

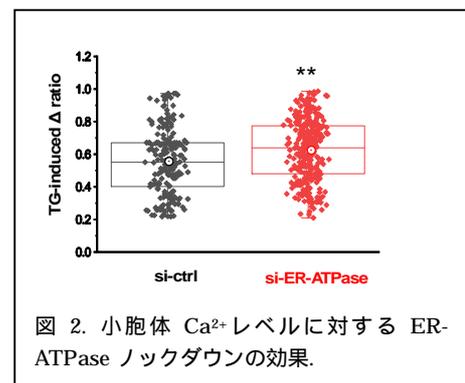


図 2. 小胞体 Ca^{2+} レベルに対する ER-ATPase ノックダウンの効果。

次に ER-ATPase の過剰発現による小胞体内 Ca^{2+} レベルの変化について検討した。ER-ATPase

および緑色蛍光タンパク質 GFP を発現する pIRES2-AcGFP ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションした。GFP の蛍光により ER-ATPase 発現細胞および未発現細胞を選別し、発現細胞における Fura-2-AM による $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定した。ノックダウン実験の結果とは対照的に、ER-ATPase (WT) 過剰発現細胞では mock 細胞と比較して thapsigargin 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇レベルが有意に低下した (Figure 10)。一方、E/Q 変異体の過剰発現細胞では、WT 発現細胞とは異なり、thapsigargin 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇レベルの有意な低下は見られなかった。以上の結果より、ER-ATPase の K^+ ATPase としての機能が小胞体の Ca^{2+} ホメオスタシスに関与している可能性が示唆された。

ER-ATPase の発現が細胞増殖に及ぼす効果の検討

ER-ATPase の生理機能を明らかにするため、siRNA を用いたノックダウン実験を行った。ER-ATPase の siRNA をトランスフェクションした細胞 (ノックダウン細胞) では、ネガティブコントロール siRNA をトランスフェクションした細胞 (コントロール細胞) と比較して、ER-ATPase 発現量が約 20% まで減少した。また、抗 ER-ATPase 抗体を用いた免疫細胞染色においても、ノックダウン細胞ではコントロール細胞と比較して小胞体における抗 ER-ATPase 抗体の蛍光強度が顕著に減少した。そこで、細胞増殖に対する ER-ATPase ノックダウンの効果を検討した。HEK293 細胞において siRNA をトランスフェクション後 72 時間および 96 時間において、ノックダウン細胞ではコントロール細胞と比較して細胞数が有意に減少した (図 3)。

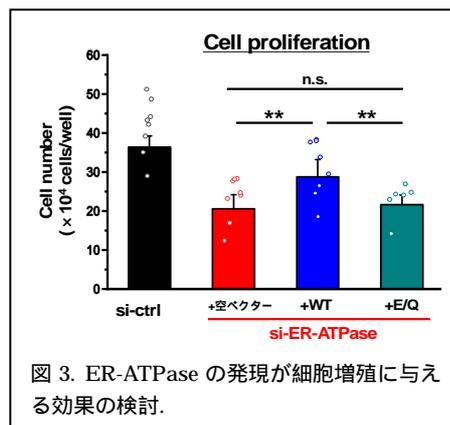


図 3. ER-ATPase の発現が細胞増殖に与える効果の検討。

次に、ER-ATPase ノックダウンによる細胞増殖能の低下が、発現ベクターをトランスフェクションすることによる ER-ATPase の発現レスキューにより回復されるか検討した。siRNA をトランスフェクションし 24 時間後に、空ベクターまたは ER-ATPase 発現ベクターを再度トランスフェクションした。空ベクターのトランスフェクションでは、ER-ATPase のノックダウンによる細胞増殖抑制に変化は見られなかったが、ER-ATPase 発現ベクターをトランスフェクションすることで細胞増殖抑制が有意に回復した (図 3)。一方、興味深いことに、 K^+ 輸送活性が消失した E/Q 変異体を発現させてもノックダウンによる細胞増殖抑制の有意な回復は見られなかった (図 3)。

小胞体ストレス誘導に対する ER-ATPase のノックダウンの効果

小胞体の Ca^{2+} 貯蔵レベルの異常に伴う Ca^{2+} シグナルの異常は小胞体 (ER) ストレスを惹起することが報告されている (Groenendyk et al., 2021)。そこで、ER-ATPase のノックダウンにより小胞体ストレスが誘導されるかについて検討した。小胞体ストレス時に発現が亢進するタンパク質である GRP78 に着目し、抗 GRP78 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。ER-ATPase のノックダウンにより有意な細胞数の低下が見られたトランスフェクション 72 時間および 96 時間後において、GRP78 の発現レベルが有意に増加した (図 4)。また、トランスフェクション 96 時間後の免疫細胞染色においても、ER-ATPase のノックダウンにより GRP78 抗体の蛍光強度が顕著に増加した。従って、ER-ATPase の発現低下は小胞体ストレスを誘導することが示唆された。

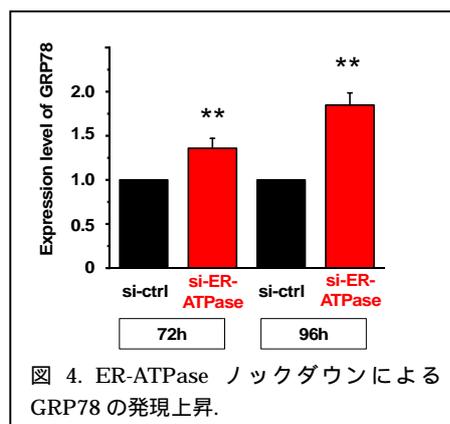


図 4. ER-ATPase ノックダウンによる GRP78 の発現上昇。

ER-ATPase と機能関連する各種膜輸送タンパク質の機能解析

ER-ATPase を過剰発現させることで、リソソームに発現する ATP13A2 の酵素活性が減少することを見出した。詳細にその機能を検討したところ、ATP13A2 がリソソームにおいて H^+ , K^+ -ATPase として機能することが明らかとなった。また癌細胞において細胞内小胞に異常発現する Na^+ , K^+ -ATPase との機能関連を検討する過程において Na^+ , K^+ -ATPase の新規病態生理機能を見出した。さらに、プロテオーム解析により種々のイオンチャネルとの関連性が示唆され、機能的関連性、イオンチャネルの新規機能についての検討を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujii Takuto, Sugimoto Kenji, Noda Takafumi, Shimizu Takahiro, Matsuya Yuji, Sakai Hideki	4. 巻 567
2. 論文標題 Inhibition of gastric H ⁺ ,K ⁺ -ATPase by new dihydropyrazole derivative KYY-008	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 177 ~ 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.056	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 Shimizu Takahiro, Yanase Nobuhiro, Fujii Takuto, Sakakibara Haruka, Sakai Hideki	4. 巻 1864
2. 論文標題 Regulation of TRPV1 channel activities by intracellular ATP in the absence of capsaicin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183782 ~ 183782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2021.183782	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, Katoh Mizuki, Nagamori Shushi, Koizumi Keiichi, Fukuoka Junya, Tabuchi Yoshiaki, Sawaguchi Akira, Okumura Tomoyuki, Shibuya Kazuto, Fujii Tsutomu, Takeshima Hiroshi, Sakai Hideki	4. 巻 24
2. 論文標題 Survival of detached cancer cells is regulated by movement of intracellular Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102412 ~ 102412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102412	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 Shimizu Takahiro, Fujii Takuto, Ohtake Hironao, Tomii Toshie, Takahashi Ryuta, Kawashima Kentaro, Sakai Hideki	4. 巻 235
2. 論文標題 Impaired actin filaments decrease cisplatin sensitivity via dysfunction of volume sensitive Cl ⁻ channels in human epidermoid carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 9589 ~ 9600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.29767	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 Shimizu Takahiro, Fujii Takuto, Sakai Hideki	4. 巻 8
2. 論文標題 The Relationship Between Actin Cytoskeleton and Membrane Transporters in Cisplatin Resistance of Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 597835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.597835	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 Fujii Takuto, Katoh Mizuki, Ootsubo Manami, Nguyen Oanh T. T., Iguchi Mayumi, Shimizu Takahiro, Tabuchi Yoshiaki, Shimizu Yasuharu, Takeshima Hiroshi, Sakai Hideki	4. 巻 237
2. 論文標題 Cardiac glycosides stimulate endocytosis of GLUT1 via intracellular Na ⁺ , K ⁺ ATPase 3 isoform in human cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 2980 ~ 2991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30762	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 Shimizu Takahiro, Fujii Takuto, Hanita Keisuke, Shinozaki Ryo, Takamura Yusaku, Suzuki Yoshiro, Kageyama Teppei, Kato Mizuki, Nishijo Hisao, Tominaga Makoto, Sakai Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 Polycystic kidney disease 2-like 1 channel contributes to the bitter aftertaste perception of quinine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-31322-3	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 Fujii Takuto, Shimizu Takahiro, Kaji Yukino, Katoh Mizuki, Sakai Hideki	4. 巻 658
2. 論文標題 Activation of mouse Otop3 proton channels by Zn ²⁺	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.066	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, Nagamori Shushi, Wiriyasernkul Pattama, Zheng Shizhou, Yago Asaka, Shimizu Takahiro, Tabuchi Yoshiaki, Okumura Tomoyuki, Fujii Tsutomu, Takeshima Hiroshi, Sakai Hideki	4. 巻 14
2. 論文標題 Parkinson's disease-associated ATP13A2/PARK9 functions as a lysosomal H ⁺ ,K ⁺ -ATPase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-37815-z	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 -

[学会発表] 計33件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤井拓人, 清水貴浩, 加藤瑞希, 永森收志, 小泉桂一, 奥村知之, 藤井努, 竹島浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 細胞内Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaseの動態変化が関与する剥離がん細胞の細胞死回避メカニズム.
3. 学会等名 生理研研究会「上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井拓人, 清水貴浩, 加藤瑞希, 永森收志, 小泉桂一, 奥村和之, 藤井努, 竹島浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 がん細胞内小胞のNa ⁺ ,K ⁺ -ATPase 3-isoformの局在変化が関与するアノイキス回避機構.
3. 学会等名 第68回中部日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井拓人, 清水貴浩, 加藤瑞希, 永森收志, 小泉桂一, 奥村和之, 藤井努, 竹島浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 細胞内Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaseの原形質膜移行が関与するがん細胞アノイキス耐性機構.
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦基, 藤井拓人, 清水貴浩, 田淵圭章, 酒井秀紀.
2. 発表標題 小胞体に発現する新規K ⁺ ポンプの生理機能解明.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井拓人, 加藤瑞希, 清水貴浩, 田淵圭章, 清水康晴, 竹島 浩, 酒井秀紀
2. 発表標題 小胞局在ナトリウムポンプを標的としたがん細胞グルコース輸送体の動態制御機構
3. 学会等名 生理研研究会 「細胞の局所コミュニティ研究会」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuto Fujii, Mizuki Katoh, Takahiro Shimizu, Shushi Nagamori, Keiichi Koizumi, Junya Fukuoka, Yoshiaki Tabuchi, Akira Sawaguchi, Tomoyuki Okumura, Kazuto Shibuya, Tsutomu Fujii, Hiroshi Takeshima, Hideki Sakai
2. 発表標題 Localization and function of Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase 3-isoform in the attached and detached cancer cells
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuto Fujii, Mizuki Katoh, Takahiro Shimizu, Shushi Nagamori, Keiichi Koizumi, Junya Fukuoka, Yoshiaki Tabuchi, Akira Sawaguchi, Tomoyuki Okumura, Kazuto Shibuya, Tsutomu Fujii, Hiroshi Takeshima, Hideki Sakai
2. 発表標題 Inhibition of translocation of intracellular Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase 3-isoform by cardiac glycosides in cancer cells
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井拓人, Nguyen Thi Tu Oanh, 清水康晴, 清水貴浩, 酒井秀紀
2. 発表標題 ヒキガエル毒素由来強心配糖体のがん細胞Na ⁺ , K ⁺ -ATPaseに対する効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井拓人、河合俊輔、清水貴浩、奥村知之、藤井努、酒井秀紀
2. 発表標題 胃がん細胞におけるchloride intracellular channel 3の発現と機能
3. 学会等名 第67回 中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水貴浩、水口麻衣、藤井拓人、酒井秀紀
2. 発表標題 LRRC8Eによる容積感受性アニオンチャネルの不活性化制御機構の解明
3. 学会等名 第67回 中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井拓人、清水颯人、清水貴浩、高橋康史、永森收志、酒井秀紀
2. 発表標題 胃壁細胞の酸分泌刺激状態と休止状態における膜構造とイオン輸送機能の解析
3. 学会等名 生理研研究会「上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬玉花、藤井拓人、村山資、伊原大輔、清水貴浩、田淵明子、酒井秀紀
2. 発表標題 自閉症関連カチオンATPase の神経細胞における発現と機能
3. 学会等名 富山薬学研究会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nguyen Thi Tu Oanh、藤井拓人、大坪愛実、清水貴浩、酒井秀紀
2. 発表標題 ヒキガエル由来強心配糖体による抗がんメカニズムの解明
3. 学会等名 富山薬学研究会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本侑弥、清水貴浩、藤井拓人、酒井秀紀
2. 発表標題 Ussing チェンバーを用いたハムスター単離類粘膜における薬物透過の評価
3. 学会等名 富山薬学研究会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水口麻衣、清水貴浩、川島健太郎、藤井拓人、酒井秀紀
2. 発表標題 LRRC8E が関与する 容積感受性アニオンチャンネル電流のカチオン依存的不活性
3. 学会等名 富山薬学研究会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安井元規、清水貴浩、杉本健士、藤井拓人、松谷裕二、酒井秀紀
2. 発表標題 PC12 細胞の電位依存性カルシウムチャネル電流に対するジヒドロピラゾール誘 導体の効果
3. 学会等名 富山薬学研究会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井拓人、清水貴浩、竹島 浩、酒井秀紀
2. 発表標題 がん細胞の剥離により惹起される新規カルシウムシグナルの分子機構
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井拓人、清水貴浩、竹島 浩、酒井秀紀
2. 発表標題 がん細胞剥離により誘導される新規カルシウムシグナリング
3. 学会等名 第98回 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水貴浩、大竹宏尚、藤井拓人、酒井秀紀
2. 発表標題 アクチンフィラメントにより制御される癌細胞のシスプラチン感受性の分子機構
3. 学会等名 第98回 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 影山哲平, 櫻井大雅, 清水貴浩, 中尾裕之, 岩本真幸, 藤井拓人, 永森收志, 中野実, 老木成稔, 酒井秀紀.
2. 発表標題 単分子測定法によるヒト TMEM16F の機能解析.
3. 学会等名 生理研研究会「上皮膜輸送と細胞極性形成機構の統合的理解を目指して」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井拓人, 加藤瑞希, 清水貴浩, 田淵圭章, 清水康晴, 竹島浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 がん細胞特異的小胞を標的としたグルコース輸送体の動態制御機構.
3. 学会等名 生理研研究会「上皮膜輸送と細胞極性形成機構の統合的理解を目指して」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水貴浩, 柳瀬宜広, 藤井拓人, 榊原陽香, 酒井秀紀.
2. 発表標題 TRPV1チャネルのホスホイノシタイドによる制御機構
3. 学会等名 第69回中部日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦基, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 細胞内の小胞体に発現する新規K ⁺ ポンプの生理機能解明.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川めぐみ, 清水貴浩, 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機能における膜蛋白質複合体形成の役割.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 がん細胞におけるNa ⁺ , K ⁺ -ATPaseとCl ⁻ チャンネルの新規病態生理機能.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井拓人, 加藤瑞希, 清水貴浩, 田淵圭章, 清水康晴, 竹島浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 強心配糖体は細胞内Na ⁺ , K ⁺ -ATPaseを標的としてヒトがん細胞におけるGLUT1依存性のグルコース取り込みおよび解糖系を抑制する.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井拓人, 永森收志, Wiriyasermkul Pattama, 田淵圭章, 清水貴浩, 竹島浩, 酒井秀紀.
2. 発表標題 リソソームにおけるカチオンポンプの新規生理機能.
3. 学会等名 生理研研究会「細胞の局所コミュニティ研究会」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井拓人, 沼田佳久, 清水貴浩, 奥村知之, 藤井努, 酒井秀紀
2. 発表標題 強心配糖体を用いたCTC制御機構の解明.
3. 学会等名 第6回CTC臨床応用研究会.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井拓人, 加藤瑞希, 清水貴浩, 酒井秀紀
2. 発表標題 Pathophysiological function of the sodium pump abnormally expressed in intracellular vesicles of gastrointestinal cancer cells
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水貴浩, 白井佳暖, 鍋島彰太, 藤井拓人, 酒井秀紀
2. 発表標題 The role of hydrophilic subunit cavity in the function of transmembrane protein 16F
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 影山哲平, 櫻大雅, 清水貴浩, 中尾裕之, 岩本真幸, 藤井拓人, 永森收志, 中野実, 老木成稔, 酒井秀紀
2. 発表標題 The functional analysis of human TMEM16F at the single-molecule level
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤瑞希, 緒方萌乃, 田淵圭章, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀
2. 発表標題 Is expression of the Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase 4 isoform testis-specific?
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井拓人, 加藤瑞希, 清水貴浩, 酒井秀紀
2. 発表標題 強心配糖体によるグルコース輸送体GLUT1の動態変化を介したがん細胞解糖系抑制機構
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学薬学部 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 富山大学薬学部 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

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