

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790076

研究課題名（和文） 動物細胞のポリアミン輸送機構の解明

研究課題名（英文） Identification and characterization of polyamine transport systems in mammalian cells

研究代表者

東 恭平 (Kyohei Higashi)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：10463829

研究成果の概要（和文）：ポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）は生物に普遍的に存在する塩基性生理活性物質であり、細胞増殖・分化に必須の因子である。本研究では、ポリアミンの細胞内濃度調節機序の解明を目指し、前者では動物細胞のポリアミン輸送蛋白質の同定とその輸送機構の解明、後者ではスペルミン輸送に対するヘパラン硫酸の効果について検討し、以下に述べる新知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Polyamines (putrescine, spermidine, spermine) play important roles in cell proliferation and differentiation. In this study, identification and characterization of polyamine transport system in mammalian cells, and effect of heparan sulfate on spermine transport have been studied. New findings in this study have been described below.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生理活性アミン、ポリアミン、輸送、プトレスシン、スペルミジン、スペルミン、ヘパラン硫酸

1. 研究開始当初の背景

低分子塩基性生理活性物質ポリアミンは、通常 2 価カチオンであるプトレスシン $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]$ 、3 価カチオンであるスペルミジン $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]$ 、4 価カチオンであるスペルミン $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]$ より成る。これらポリアミンは 1 価のイオンを除くと、細胞内では低分子として Mg^{2+} と共に二大成分であり、細胞増殖・分化に重要な役割を果たす。細胞内ポリアミン量は生合成系、分解

系、および輸送系により厳密に調節されており、種々の刺激に応答してその量の変動する。実際、細胞内ポリアミン量は細胞増殖が盛んな細胞で多く、例えば微生物では対数増殖期の細胞のほうが静止期の細胞よりポリアミンを多く含む。また動物では前立腺、睪臓及び唾液腺など、蛋白質・核酸合成の盛んな組織にポリアミン量が多いが、加齢と共に減少する。動物細胞のポリアミン輸送系が細胞内濃度維持に重要であり厳密な調節を受けるといふ特徴は、1980 年代後半から明らかとな

っている。

(1) 動物実験でポリアミン生合成律速酵素阻害剤 (α -difluoromethylornithine; DFMO)による抗癌効果が、ポリアミン欠乏食を与えると上昇する (Nakaike S. *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 1988, 79, 501-508)。

(2) DFMO 添加による細胞内ポリアミン量の枯渇は、細胞増殖阻害を引き起こすが、外からポリアミンを添加すると細胞内にポリアミンが取り込まれ、細胞増殖速度が回復する。ポリアミン枯渇時の輸送活性は、ポリアミン存在下に比べて 5 倍以上高い (Kakinuma Y., *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 1988, 176, 409-414)。

(3) 細胞内ポリアミン量が蓄積すると、細胞内ポリアミン濃度の負の調節因子であるアンチザイムの合成が誘導され、ポリアミン輸送活性が阻害される (He Y. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 203, 608-614)。

これらの特徴のうち、アンチザイムと結合する膜蛋白質の探索を目的として、多大な努力が成されてきたが、未だポリアミン特異的輸送蛋白質は同定されていない。私達のグループは、大腸菌では 5 種、酵母では 9 種のポリアミン輸送蛋白質の同定及び機能解析を独占して行い、世界に先駆けてポリアミン輸送系の生理的意義を見出してきた (Igarashi K and Kashiwagi K., *Biochem. J.* 1999, 344, 633-642)。現在までに私達が同定した酵母ポリアミン輸送系の特徴の一つとして、薬物排出蛋白質が多いことが挙げられる。そこで、動物細胞のポリアミン輸送蛋白質を同定するため、腎臓に局在する薬物排出蛋白質に注目した。

2. 研究の目的

腎臓の近位尿細管細胞における有機カチオン系薬物輸送は、側底膜側 (血管側)から薬物を取り込み、刷子縁膜 (尿細管側)で薬物を

尿中へと排出されることで成される。Human organic cation transporter 2 (hOCT2)、hOCT2-A 及び hOCT3 は側底膜側に局在し、human organic cation/carnitine transporter 1 (hOCTN1)、hOCTN2、human multidrug and toxin extrusion 1 (hMATE1) 及び hMATE2-K は刷子縁膜に局在する (Koepsell H. *et al.*, *Pharm. Res.* 2007, 24, 1227-1251)。現在までに、hOCT2 がプトレスシン、アグマチン、スペルミジンを、hMATE1 がアグマチンを取り込むことが報告されている (Winter TM. *et al.*, *Mol. Pharm.* 2011, 8, 133-142 及び Sala-Rabanal M. *et al.*, *Mol. Pharm.* 2013, 10, 1450-1458)。そこで本研究では、上記 8 種の薬物排出蛋白質がポリアミン輸送活性を有するかどうかを詳細に検討した。更に hOCT2 のポリアミン輸送に関わるアミノ酸残基の同定を行った。

スペルミンの取り込みは、ヘパラン硫酸 (HS)プロテオグリカンであるグリピカン-1(GPC1)の HS とスペルミンの結合を介したエンドサイトーシスに依ることが示唆されている (Belting M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 47181-47189)。そこで、スペルミン輸送におけるヘパラン硫酸の重要性について詳細に検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞に hOCT1、hOCT2、hOCT2-A、hOCT3、hOCTN1、hOCTN2、hMATE1 及び hMATE2-K cDNA を形質導入した。24 時間培養後、 $[^{14}\text{C}]$ プトレスシン、 $[^{14}\text{C}]$ アグマチン、 $[^{14}\text{C}]$ スペルミジン、又は $[^{14}\text{C}]$ スペルミンを外から添加した。細胞内に取り込まれた $[^{14}\text{C}]$ ポリアミン量は、液体シンチレーションカウンタにより測定した。

(2) 部位特異的変異導入 (site-directed mutagenesis)は、PCR を用い overlap extension 法により行った。

4. 研究成果

(1) HEK293 細胞に hOCT2 cDNA を形質導入し、ポリアミン輸送活性を pH7.4 の条件下で測定した。その結果、hOCT2 がプトレスシン、アグマチン、スペルミジンを取り込むことを確認した。プトレスシン、アグマチン及びスペルミジンの K_m 値はそれぞれ 6.50、3.27、6.76 mM、 V_{max} 値は 4.39、3.14、2.34 nmol/min/mg protein であった。次に hOCT1、hOCT2-A、hOCT3、hOCTN1、hOCTN2、hMATE1 及び hMATE2-K cDNA を形質導入し、ポリアミン輸送活性を測定した結果、hOCT3 がアグマチンを取り込むことが新たに明らかとなった。アグマチンの K_m 値は 4.09 mM、 V_{max} 値は 4.00 nmol/min/mg protein であった。hOCTs 又は hMATEs によるスペルミンの輸送活性は pH7.4 の条件下では認められなかった。hOCT2 によるポリアミン輸送活性はプトレスシン>アグマチン>スペルミジンであり、トリアミンよりもジアミンに親和性が高かったことから、pH によりスペルミジン、スペルミンの輸送活性が変化するかどうかを pH 7.0~9.0 の条件下で検討した。その結果、pH の増加に伴いスペルミジン、スペルミンの輸送活性の増加が認められ、pH8.6 の時が最も活性が高かった。pH8.6 でのスペルミジン、スペルミンの K_m 値はそれぞれ 2.11、2.05 mM、 V_{max} 値は 2.20、0.128 nmol/min/mg protein であった。以上の結果より、pH 増加に伴うスペルミジン及びスペルミン輸送活性の増加は、基質親和性の増加に依ることが示唆された。

hOCT2 は 555 アミノ酸残基からなる 12 回膜貫通蛋白質であり、上述の様にポリアミン輸送活性を有する。一方、hOCT2 のスプライシングバリエントである hOCT2-A は 483 アミノ酸残基からなる 9 回膜貫通蛋白質である

が、ポリアミン輸送活性がほとんど認められなかったことから、hOCT2 の COOH 末端側がポリアミンの認識に関与していることが考えられた。そこで、部位特異的変異導入法を用い、プトレスシン、アグマチン、スペルミジン輸送に関与する hOCT2 のアミノ酸残基の同定を行った。その結果、Asp⁴²⁷、Glu⁴⁵⁶、Asp⁴⁷⁵、Glu⁵¹⁶ 及び Glu⁵³⁰ が上記 3 種のポリアミン輸送活性に必須であることが明らかとなった。更に Glu⁴⁴⁸ はプトレスシンとアグマチンの輸送に、Glu⁵²⁴、Glu⁵²⁷ 及び Asp⁵⁵¹ はスペルミジン輸送にそれぞれ重要であることが明らかとなり、二価と三価のアミンで hOCT2 の基質認識部位が異なることが示唆された。

(2) スペルミンの取り込みは、ヘパラン硫酸 (HS) プロテオグリカンであるグリピカン-1 (GPC1) のヘパラン硫酸とスペルミンの結合を介したエンドサイトーシスに依ることが示唆されている (Belting M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 47181-47189)。HEK293 細胞に hGPC1 cDNA を形質導入し、スペルミンの輸送活性を検討した。その結果、hGPC1 によるスペルミンの取り込み活性は認められたが、スペルミンに対する k_m 値は 1.74 mM、 V_{max} 値は 41.3 pmol/min/mg protein であり、親和性は低かった。DFMO を用いて細胞内ポリアミン量を減少させると、ヘパラン硫酸の硫酸化度の増加を示唆する報告がある。そこで、HEK293 細胞及び CHO-K1 細胞をポリアミンの有無で培養し、ヘパラン硫酸を抽出後、その硫酸化度をポストカラム HPLC 法で調べた。その結果、硫酸化度に大きな変化は認められなかった。驚いたことに、細胞内ポリアミン量を減少させるとヘパラン硫酸の発現量が減少していた。現在そのメカニズムを検討中である。またヘパラン硫酸欠損株 pgsA-745 のスペルミン輸送活性は、野生型で

ある CHO-K1 と比べほとんど変化が認められなかったことから、生理条件下においてヘパラン硫酸はポリアミン輸送に関与していないことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

1. Effect of molecular sizes of chondroitin sulfate on interaction with L-selectin. Igarashi N, Takeguchi A, Sakai S, Akiyama H, Higashi K and Toida T. *Int. J. Carbohydr. Chem.*, 査読有, in press.
2. Role of polyamines at the G1/S boundary and G2/M phase of the cell cycle. Yamashita T, Nishimura K, Saiki R, Okudaira H, Tome M, Higashi K, Nakamura M, Terui Y, Fujiwara K, Kashiwagi K, and Igarashi K. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 査読有, **45**, 1042-1050 (2013).
3. Sequence analysis and domain motifs in the porcine skin decorin glycosaminoglycan chain. Zhao X, Yang B, Solakylidirim K, Joo EJ, Toida T, Higashi K, Linhardt RJ, Li L. *J Biol Chem.* 査読有, 288, 9226-9237 (2013).
4. Simultaneous determination of uronates found in polysaccharides from natural products by HPLC with fluorometric detection. Matsumoto A, Hosoyama S, Higashi K, and Toida T. *Carbohydr. Res.*, 査読有, **358**, 82-88 (2012)
5. Inverse correlation between stroke and urinary 3-hydroxypropyl mercapturic acid, an acrolein-glutathione metabolite. Yoshida M, Mikami T, Higashi K, Saiki R, Mizoi M, Fukuda K, Nakamura T, Ishii I, Nishimura K, Toida T, Tomitori H, Kashiwagi K, and Igarashi K. *Clin. Chim. Acta*, 査読有, **413**, 753-759 (2012)
6. Correlation between antizyme 1 and differentiation of vascular smooth muscle cells cultured in honeycomb-like type-I collagen matrix. Ishii I, Suzuki T, Kaneko H, Uchida M, Suzuki Y, Higashi K, Yagi S, Ariyoshi N, Igarashi K, and Kitada M. *Amino Acids*, 査読有, **42**, 565-575 (2012)
7. Photochemical preparation of a novel low molecular weight heparin. Higashi K, Hosoyama S, Ohno A, Masuko S, Yang B, Sterner E, Wang Z, Linhardt RJ, and Toida T. *Carbohydr. Polym.*, 査読有, **67**, 1737-1743 (2012)
8. Controlled photochemical depolymerization of K5 heparosan, a bioengineered heparin precursor. Higashi K, Ly M, Wang Z, Masuko S, Bhaskar U, Sterner E, Zhang F, Toida T, Dordick JS, and Linhardt RJ. *Carbohydr. Polym.*, 査読有, **86**, 1365-1370 (2011)
9. Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. Hamdan FF, Gauthier J, Araki Y, Lin DT, Yoshizawa Y, Higashi K, Park AR, Spiegelman D, Dobrzeniecka S, Piton A, Tomitori H, Daoud H, Massicotte C, Henrion E, Diallo O; S2D Group, Shekarabi M, Marineau C, Shevell M, Maranda B, Mitchell G, Nadeau A, D'Anjou G, Vanasse M, Srour M, Lafrenière RG, Drapeau P, Lacaille JC, Kim E, Lee JR, Igarashi K, Haganir RL, Rouleau GA, Michaud JL. *Am. J. Hum. Genet.*, 査読有, **88**, 306-316

(2011)

10. Ozonolysis of the double bond of the unsaturated uronate residue in low-molecular-weight heparin and K5 heparosan.
Masuko S*, Higashi K*, Wang Z, Bhaskar U, Hickey AM, Zhang F, Toida T, Dordick JS, and Linhardt RJ. *Carbohydr. Res.*, 査読有, **346**, 1962-1966 (2011) (*: contributed equally)

[学会発表] (計 16 件)

1. 照井祐介, Suni D. Saroj, 坂本明彦, 吉田健人, 東恭平, 斎木遼太郎, 栗原新, 鈴木秀之, 戸井田敏彦, 柏木敬子, 五十嵐一衛. 大腸菌プトレスシン輸送蛋白質 PotFGHI 及び PtuP の生理的意義の解明. 日本薬学会 133 年会, 2013 年 3 月 30 日, 横浜
2. 安井千晶, 平田麻梨重, 奥山貴則, 東恭平, 穂山浩, 戸井田敏彦. スギヒラタケ摂取による急性脳症の原因究明. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 30 日, 横浜
3. 大室詳悟, 萩原裕樹, 東恭平, 西村和洋, 戸井田敏彦. マフノリ由来酸性多糖の構造解析と TLR4 との相互作用. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日, 横浜
4. 今村正隆, 東恭平, 降幡知己, 西村和洋, 五十嵐一衛, 戸井田敏彦. グリコサミノグリカン鎖合成に対するポリアミンの効果. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日, 横浜
5. 萩原裕樹, 東恭平, 萩田拓, 花岡宏史, 上原知也, 荒野泰, 戸井田敏彦. センチネルリンパ節を標的とした糖鎖リガンドの開発日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日, 横浜
6. 向野杏, 東恭平, 細山沙織, 若井潤, 鈴木

- 木翔, 西村和洋, 富取秀行, Robert J. Linhardt, 戸井田敏彦. アオヤギ貝腸およびミズダコ軟骨由来コンドロイチン硫酸 E 及び K 構造の同定. 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 15 日, 福岡
7. 東恭平, 武内芳貴, 宮正樹, 戸井田敏彦. 日本近海に生息する板鰓類のコンドロイチン硫酸解析. 第 31 回日本糖質学会年会, 2011 年 9 月 19 日, 鹿児島
 8. Higashi K, Uemura T, Toida T, Kashiwagi K, and Igarashi K. Properties of polyamine uptake by human organic cation transporter 2 and 3. International Congress on Polyamines, 2012 年 9 月 5 日, Istanbul, Turkey
 9. Higashi K, Mukuno A, Hosoyama S, Takeuchi Y, Wakai Y, Suzuki S, Nishimura K, Tomitori H, Linhardt RJ and Toida T. Identification and Characterization of Novel Chondroitin Sulfate E and K derived from *Mactra Chinensis* and *Paroctopus dofleini*. Gordon Research Conference on Proteoglycans, 2012 年 7 月 9 日, Andover, NH, USA
 10. 東恭平, 真野貴, 和田竜哉, 戸井田敏彦. 機能性食品に含まれるコンドロイチン硫酸の HPLC による迅速・簡易定量. 日本食品化学学会, 第 18 回総会・学術大会, 2012 年 6 月 22 日, 札幌
 11. 松本成永, 東恭平, 西村和洋, 戸井田敏彦. 天然物由来ウロン酸の分析. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 30 日, 札幌
 12. 東恭平, Mellisa Ly, Zhenyu Wang, 増子小夜香, Ujjiwal Bhaskar, Eric Sterner, Fuming Zhang, 戸井田敏彦, Jonathan S Dordick, Robert J. Linhardt. 光分解法による低分子 K5 ヘパロサンの調製. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日, 札幌

13. 幾尾由紀子, 西村和洋, 林大輔, 齋木遼太郎, 朴恵林, 石井伊都子, 三村花華, 小林カオル, 千葉寛, 柏木敬子, 東恭平, 戸井田敏彦, 五十嵐一衛. 脳梗塞における新規マーカーとしてのアクロレインによるインターロイキン6及びC反応性タンパク質の産生誘導機構. 日本薬学会第132年会, 2012年3月29日, 札幌
14. 七谷圭, 佐伯千香, 富永昂, 東恭平, 五十嵐一衛, 古川壮一, 森永康, 赤井政郎, 魚住信之. シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 のバイオフィルム形成に関するポリアミン合成酵素系の検討. 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012年3月24日 京都
15. 東恭平, 細山沙織, 大野麻美, 増子小夜, Bo Yang, Eric Sterner, Zhenyu Wang, Robert J. Linhardt, 戸井田 敏彦. 光分解による新規低分子ヘパリンの調製. 第30回日本糖質学会年会, 2011年7月13日 長岡
16. Higashi K, Uemura T, Toida T, Kashiwagi K, and Igarashi K. Polyamine transport by human organic cation transporter 2-A. Gordon Research Conference on Polyamines, 2011年6月20日, Waterville Valley, NH, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bunseki/index.htm>

1

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 恭平 (Kyohei Higashi)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：10463829