

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460067

研究課題名(和文) プリン作動性化学伝達におけるATP分泌機構と生理的意義の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism and physiological significance of vesicular ATP release in purinergic chemical transmission

研究代表者

宮地 孝明 (Miyaji, Takaaki)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：40550314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)は分泌小胞内へのATPの充填装置であり、プリン作動性化学伝達の必須因子である。本研究課題は、神経・内分泌系におけるATP分泌機構とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。我々は、VNUTノックアウトマウスでは、高血糖・インスリン抵抗性、炎症性・神経因性疼痛、炎症が改善していることを明らかにした。さらに、VNUT特異的阻害剤を医薬品の中から新たに同定し、VNUTノックアウトマウスと同じ治療効果があることを実証した。以上より、VNUT阻害剤は生活習慣病等の良い治療薬になることを明らかにし、新しい創薬基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Vesicular nucleotide transporter (VNUT) is responsible for vesicular storage and release of ATP, and is essential for purinergic chemical transmission. The aim of this research project was to reveal the molecular mechanism of vesicular ATP release and its physiological significance in nervous and endocrine systems. We showed that VNUT knockout mice improve hyperglycemia, insulin resistance, inflammatory and neuropathic pain, and the accompanying inflammation. In addition, we found VNUT specific inhibitor among the existing drugs, and demonstrated that VNUT inhibitor have the therapeutic effects as well as VNUT knockout mice. In summary, VNUT plays an important roles in onset of neurological and endocrine diseases, and the VNUT inhibitor is a suitable target of drug discovery.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：プリン作動性化学伝達 小胞型ヌクレオチドトランスポーター ATP

1. 研究開始当初の背景

ATP は分泌小胞に充填された後、開口放出され (出力) プリン受容体を介して多彩な生理機能を発揮する (入力) (プリン作動性化学伝達)。神経・内分泌系においては、プリン作動性化学伝達は、学習、記憶などの高次精神活動、痛覚などの感覚受容、血圧や血糖などの代謝調節等を制御しているため、大きな関心を集めている (*Physiol. Rev.* **87**, 659, 2007)。しかし、これまでに得られた結果は、全て受容体とそれ以後のシグナル伝達カスケードの研究成果に基づくものであり (*Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 973-1011, 2011) ATP 分泌機構に関わる研究はその現象論にとどまっていた (*Eur. J. Physiol.* **452**, 589-597, 2006)。

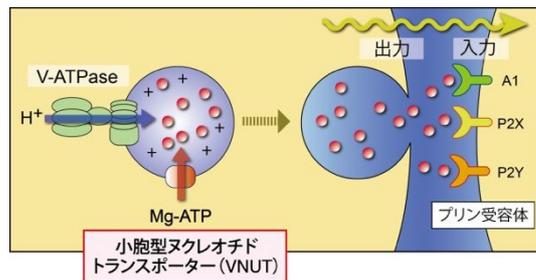


図1 プリン作動性化学伝達

こうした状況下、我々は、真核生物のトランスポートターを機能解析できる普遍的な方法を開発し、ATP を分泌小胞に充填する小胞型ヌクレオチドトランスポートター (Vesicular nucleotide transporter, VNUT) を同定した (*PNAS* **105**, 5683-5686, 2008、*JBC* **286**, 42881-42887, 2011、図1)。VNUT の発見により ATP 出力機構を解析するための強力かつ有効な膜分子が誕生した。VNUT は、ATP を分泌するといわれていた神経や内分泌細胞にもれなく発現しており、その発現を抑制すると、その程度に応じて ATP 分泌が抑制された。この結果は、VNUT 機能を制御することで、プリン作動性化学伝達の出力を制御可能であることを示唆している。

そこで、我々は VNUT を制御するために、二つのツール、VNUT ノックアウトマウスと VNUT 阻害剤を開発した。VNUT は塩素イオンにより活性化 (オン) され、ケトン体 (特にアセト酢酸) により可逆的にオフされる分子スイッチを持っている (*Neuron* **68** 99-112, 2010)。アセト酢酸は小胞型グルタミン酸トランスポートター (VGLUT) にも同様に有効であった。我々は、この点を改良し、VNUT に特異性が高く強力なグリオキシル酸を見いだした。以上、二つの研究ツールを用いることで、プリン作動性化学伝達における VNUT の役割を直接的・定量的に解明し、ATP 出力機構の根幹問題を解決することが可能になった。

2. 研究の目的

本研究課題は、神経・内分泌系における ATP の分泌機構とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。代表的な ATP 放出細胞である神経細胞、副腎クロマフィン細胞、膵臓β細胞を中心に解析し、血糖制御と疼痛における VNUT の役割を明らかにする。さらに、臨床的に応用可能な VNUT 特異的阻害剤を開発し、新しい創薬基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

VNUT の精製・再構成

ヒト VNUT の N 末端と C 末端領域にアフィニティー精製するためのヒスタグと、αヘリックス構造を持つ可溶性タンパク質である YbeL (β) を付加したプラスミドを大腸菌に導入し、VNUT を大量発現させた。膜画分を 1.5% Fos-choline 14 (界面活性剤) にて可溶化し、可溶性画分を Ni-NTA アフィニティーカラムにて精製した。精製 VNUT を人工膜小胞に凍結融解希釈法にて再構成した。

再構成人工膜小胞の ATP 輸送活性測定

再構成人工膜小胞内を 150 mM Na⁺、外を 150 mM K⁺にし、2 μM バリノマイシン (K⁺イオノファ) を加え、内側が正の膜電位差を形成させた。これに 100 μM [³H]-ATP を加え、2分後に Sephadex G50 fine カラムにアプライし、700 x g、2分、4分 で遠心した。液体シンチレーションカウンターにて小胞内に取り込まれた [³H]-ATP (溶出液) を定量した。

神経細胞からの ATP 放出の定量

各細胞を Krebs-Ringer にてプレインキュベーションし、高カリウムによる脱分極刺激をした。5-20分後に上清を回収し、ルシフェラーゼ法にて ATP を定量した。

糖負荷試験

18時間絶食したマウスに、2g/kg グルコースを経口投与し、経時的な血糖値と血中インスリン量を測定した。阻害剤は試験の1時間前に静脈注射した。血糖値とインスリン量はそれぞれグルテストセンサーと ELISA kit により定量した。

鎮痛効果の評価

炎症性疼痛は、雄の C57BL/6 マウス (試験時に 22-30 g) の後肢の裏に完全フロイントアジュバンド (CFA: 1 mg/mL を 20 μL) を投与し、3日後と 14日後の熱痛覚過敏を plantar 試験により、機械痛覚過敏を von Frey 試験により評価した。また、カラゲニン投与 (1% を 20 μL) の場合は、投与後 4時間後に評価した。

神経因性疼痛は、雄の C57BL/6 マウス (試験時に 22-30 g) の坐骨神経を部分結紮 (Seltzer 法) し、10日後の機械痛覚過敏を von Frey 試験により評価した。生理食塩水あるいは VNUT 阻害剤は、試験開始 1時間前に静脈注射した。

抗炎症効果の評価

炎症性疼痛モデルマウスの足の浮腫を疼痛反応の試験前にデジタルノギスで計測した。カラゲニン浮腫の場合は、カラゲニン投与1時間前に生理食塩水あるいはVNUT阻害剤を静脈投与した。CFA浮腫の場合は、毎日、生理食塩水あるいはVNUT阻害剤を腹腔内投与した。サイトカインは、カラゲニン投与2時間後に採血し、血清からビーズベースアッセイ法により定量した。

4. 研究成果

(1) VNUT ノックアウトマウスはVNUTを欠損しており、シナプス小胞においては、その他の小胞型神経伝達物質トランスポーター等の発現に影響はなかった。VNUT ノックアウトマウスから海馬神経細胞を単離し、ATP放出を評価したところ、脱分極刺激によるATP放出は消失していた。また、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸やアスパラギン酸放出も低下していた。

VNUT ノックアウトマウスの副腎クロマフィン顆粒を単離し、ATP輸送活性が消失していることを明らかにした。カテコールアミン輸送に影響はなかった。VNUT ノックアウトマウスから髄質クロマフィン細胞を単離し、ATP放出を評価したところ、ATP放出は消失していた。また、カテコールアミンの合成、分泌も低下していた。以上より、VNUT ノックアウトマウスでは、代表的なATP放出細胞でのプリン作動性化学伝達の出力が消失し、その結果、その他の化学伝達が影響を受けていることを明らかにした。

(2) 免疫電子顕微鏡法により、VNUTが膵臓β細胞のインスリン含有顆粒に局在することを明らかにした。また、高血糖刺激により、ATPはインスリンと共に放出され、このATP放出はVNUT ノックアウトマウスでは消失していた。一方で、VNUT ノックアウトマウスからのインスリン分泌が増加していた。したがって、ATPはインスリン分泌のネガティブレギュレーターとして機能していた。

血糖制御におけるVNUTの生理的役割を明らかにするために糖負荷試験した。VNUT ノックアウトマウスは野生型に比べ、高血糖になりにくいことを明らかにした。一方で、血中インスリン値はVNUT ノックアウトマウスの方が低かったため、インスリン負荷試験した。その結果、VNUT ノックアウトマウスはインスリン感受性が改善していることを明らかにした。興味深いことに、VNUT ノックアウトマウスの外見はいたって健康であり、野生型と全く変わらなかった。以上より、VNUTは副作用の少ない糖尿病のよい創薬標的になると期待される。

(3) 精製・再構成による輸送活性測定法により、VNUT阻害剤を探索した。その結果、骨粗鬆症治療薬・ビスホスホネート製剤のクロドロン酸が $IC_{50}=15.6\text{ nM}$ という極めて低濃度でVNUTを阻害することを見出した。他の

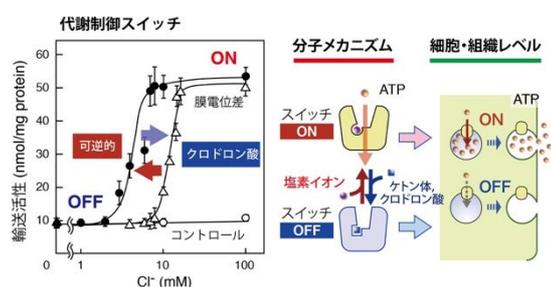


図2 VNUTのアロステリック阻害剤の同定

小胞型神経伝達物質トランスポーターの阻害効果を調べたが、いずれも強い阻害効果は示さなかった。また、クロドロン酸は、塩素イオンによるアロステリック活性化機構を競合的、かつ、可逆的に阻害した(図2)。さらに、クロドロン酸は、グリオキシル酸よりも100倍以上強力で特異性も高かったため大幅な改良に成功したといえる。

クロドロン酸は神経細胞に取り込まれ、選択的、かつ、可逆的に、100 nMという低濃度でATP放出を完全に阻害した。その他、アストロサイト、ミクログリア、免疫細胞からもATPが放出されることが知られており、クロドロン酸はミクログリアと免疫細胞からのATP放出も低濃度で阻害した。このことからクロドロン酸は抗炎症効果があることが示唆された。一方で、アストロサイトにクロドロン酸は取り込まれなかった。

(4) VNUT阻害剤であるクロドロン酸の効果を*in vivo*で評価した。アジュバンド、カラゲニンによる炎症性疼痛モデルマウスを作製した。これらのマウスにクロドロン酸を投与すると、鎮痛効果を発揮した。また、非炎症部位ではクロドロン酸は無効であった。VNUT ノックアウトマウスは痛みを感じにくくなっており、クロドロン酸も無効であった。既存薬と比較すると、クロドロン酸は、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)であるアセトアミノフェン、ジクロフェナクよりも強力であり、非麻薬性オピオイドであるトラマドールと同等の鎮痛効果を発揮した。

VNUT ノックアウトマウスでは予想通りアジュバンド、カラゲニン浮腫が小さくなっていった。アジュバンドまたはカラゲニン浮腫を生じた野生型マウスにクロドロン酸を投与すると、やはり浮腫が小さくなり、抗炎症効果があることを明らかにした。血中の炎症性サイトカインを測定したところ、クロドロン酸を投与することで、炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-6が正常時まで抑制されていることを明らかにした。既存薬と比較すると、クロドロン酸は、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)であるジクロフェナクよりも強力であり、ステロイドであるヒドロコルチゾンやプレドニゾロンと同等の抗炎症効果を発揮した。

神経因性疼痛モデルマウスにクロドロン酸を投与すると、強力な鎮痛効果を発揮した(図3)。VNUT ノックアウトマウスは痛み

を感じにくくなっており、クロドロン酸も無効であった。既存薬と比較すると、クロドロン酸はプレガバリンやガバペンチンよりも強力であり、眠気などの副作用を生じなかった。クロドロン酸の *in vivo* での分子標的も VNUT であるといえる。

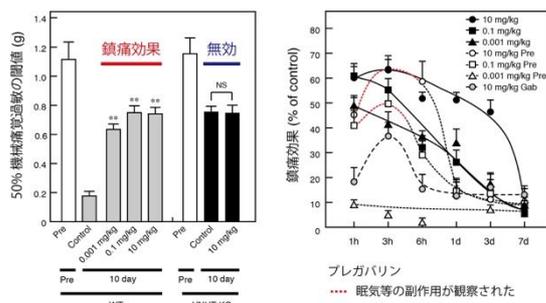


図3 神経因性疼痛に対するVNUT阻害剤の鎮痛効果

以上より、VNUTは神経因性疼痛、炎症性疼痛とその炎症の発症、血糖制御に重要であることを明らかにした。VNUT阻害剤の治療効果からも、VNUTはこれらの疾患の良い創薬標的であることを実証した。糖負荷マウスにVNUT阻害剤を投与すると、やはりVNUTノックアウトマウスと同様に、高血糖が低減していた。プリン作動性化学伝達は様々な疾患の発症に関与しているため、VNUT阻害剤の適用範囲はかなり広いと期待できる。特に、神経因性疼痛を合併した糖尿病(糖尿病性神経因性疼痛)に対してVNUT阻害剤は、鎮痛作用、血糖低下作用、インスリン分泌促進作用、インスリン抵抗性改善作用、抗炎症作用等が期待できる。これほど多くの治療効果を発揮する医薬品は他に例がない。

また、本研究は、ケミカルバイオロジーによる小胞型神経伝達物質トランスポーターの制御により、化学伝達を *in vivo* で選択的にコントロールした最初の報告である。医薬品開発に至れば、疼痛や炎症性疾患において、最初のトランスポーター創薬になる。

さらに、クロドロン酸はすでに欧米で骨粗鬆症治療薬として承認されているため、ヒトに対する安全性が実証され、薬物動態もわかっている。既存医薬品の中から、新しい薬効を見いだす手法はドラッグリポジショニングと呼ばれ、新薬の開発期間の短縮、研究開発コストの低減等が期待される。VNUTの阻害効果は、既知の薬効よりも1000倍以上強力であったため、ドラッグリポジショニングによる新しい治療戦略を提供することができる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

1. Kato Y., Hiasa M., Ichikawa R., Hasuzawa N., Kadowaki A., Iwatsuki K., Shima K., Endo Y., Kitahara Y., Inoue T., Nomura M., Omote H., Moriyama Y., **Miyaji T.**

Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain.

Proc. Natl Acad. Sci. USA 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1704847114 (2017).

2. Yamaji N., Takemoto Y., **Miyaji T.**, Mitani-Ueno N., Yoshida KT., Ma JF.

Reducing phosphorus accumulation in rice grains with an impaired transporter in the node. *Nature* 査読有 541, 92-95 (2017).

3. Fujino Y., Minamizaki T., Hayashi I., Kawakami A., **Miyaji T.**, Sakurai K., Yoshioka H., Kozai K., Okada M., Yoshiko Y.

Comparative proteome analysis of wild-type and klotho-knockout mouse kidneys using a combination of MALDI-IMS and LC-MS/MS.

Proteomics Clin. Appl. 査読有 DOI: 10.1002/prca.201600095. (2017).

4. Takeuchi T., Harada Y., Moriyama S., Furuta K., Tanaka S., **Miyaji T.**, Omote H., Moriyama Y., Hiasa M.

Vesicular polyamine transporter mediates vesicular storage and release of polyamine from mast cells.

J. Biol. Chem. 査読有 292, 3909-3918 (2017).

5. Nakagomi H., Yoshiyama M., Mochizuki T., Miyamoto T., Komatsu R., Imura Y., Morizawa Y., Hiasa M., **Miyaji T.**, Kira S., Araki I., Fujishita K., Shibata K., Shigetomi E., Shinozaki Y., Ichikawa R., Uneyama H., Iwatsuki K., Nomura M., de Groat W., Moriyama Y., Takeda M., Koizumi S. Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase. *Sci. Rep.* 査読有 6, 29761 (2016).

6. Omote H., **Miyaji T.**, Hiasa M., Juge N., Moriyama Y.

Structure, function, and drug interaction of neurotransmitter transporters in the post-genome era.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 査読有 56, 385-402 (2016).

7. Ueno D., Sasaki A., Yamaji N., **Miyaji T.**, Fujii Y., Takemoto Y., Moriyama S., Che J., Moriyama Y., Iwasaki K., Ma J.F.

A polarly localized transporter for efficient manganese uptake in rice.

Nature Plants 査読有 1, DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.170 (2015).

8. Juge N., Moriyama S., **Miyaji T.**, Kawakami M., Iwai H., Fukui T., Nelson N., Omote H., Moriyama Y.

Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter is an H⁺-coupled polyspecific nutrient and drug exporter.

Proc. Natl Acad. Sci. USA 査読有 112, 3356-3361 (2015).

9. Togawa N., Juge N., **Miyaji T.**, Hiasa M., Omote H., Moriyama Y.

Wide expression of type I Na⁺/phosphate cotransporter 3 (NPT3/SLC17A2), a membrane potential-driven organic anion transporter.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. 査読有 309 (2) C71-80 (2015).

10. Miyaji T., Kuromori T., Takeuchi Y., Yamaji N., Yokosho K., Shimazawa A., Sugimoto E., Omote H., Ma J.F., Shinozaki K., Moriyama Y. AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*.

Nature Commun. 6, 査読有 DOI: 10.1038/ncomms6928 (2015).

11. Hiasa M., Miyaji T. (First co-author), Haruna Y., Takeuchi T., Harada Y., Moriyama S., Yamamoto A., Omote H., Moriyama Y. Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter.

Sci. Rep. 査読有 4, DOI:10.1038/srep06836 (2014).

12. Sakamoto S., Miyaji T. (First co-author), Hiasa M., Ichikawa R., 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. 査読有 4, DOI:10.1038/srep06689 (2014).

13. 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. 査読有 2 (16) DOI: 10.14814/phy2.12034 (2014).

〔学会発表〕(計12件)

招待講演

1. 宮地孝明

小胞型ヌクレオチドトランスポーターの同定から創薬展開へ

千里ライフサイエンスセミナーK2～トランスポーターと創薬：構造と病態からのアプローチ～、2016年7月6日、大阪

2. Takaaki Miyaji

Clean biochemical approach identified ascorbate transporter in chloroplast

International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB) 2016, 2016年6月5-10日、アメリカ

3. 宮地孝明

「創薬を指向した真核生物トランスポーターの構造と機能に関する研究」

日本薬学会 第136年会、2016年3月26-29日、横浜：日本薬学会奨励賞受賞講演

4. Takaaki Miyaji

Clean biochemical approach reveals physiological function of plant transporter

31th IPSR international symposium、7th Symposium on Plant Stress Science、2015年3月2-3日、岡山

シンポジウム

5. 宮地孝明

「プリン作動性化学伝達のミッシングリンク：小胞型ヌクレオチドトランスポーターが関わる生理現象とその創薬展開」

第89回日本生化学会、2016年9月25-27日、仙台

6. 宮地孝明

「クリーンバイオケミカル手法による植物ビタミンCトランスポーターの同定と機能解析」

第11回トランスポーター研究会年会、2016年7月2-3日、京都

7. 宮地孝明

「再構成手法によるストレス耐性物質トランスポーターの探索」

日本植物学会第78回大会、2014年9月12-14日、横浜

口頭・ポスター発表

8. 葉緑体ビタミンCトランスポーターの同定とその生理的役割

宮地孝明、黒森崇、竹内優、山地直樹、横正健剛、嶋澤厚、杉本絵理子、表弘志、馬建鋒、篠崎一雄、森山芳則

第10回トランスポーター研究会、2015年6月20-21日、東京：優秀発表賞受賞演題

9. AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*.

宮地孝明、黒森崇、竹内優、山地直樹、横正健剛、嶋澤厚、杉本絵理子、表弘志、馬建鋒、篠崎一雄、森山芳則

第56回日本植物生理学会、2015年3月16-18日、東京

10. 葉緑体のアスコルビン酸トランスポーターの同定とその生理的役割

宮地孝明、黒森崇、竹内優、山地直樹、横正健剛、嶋澤厚、杉本絵理子、表弘志、馬建鋒、篠崎一雄、森山芳則

日本薬学会第135年会、2015年3月25-28日、神戸

11. 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

宮地孝明、日浅未来、春名由佳、森山佐和子、表弘志、森山芳則

第87回日本生化学会大会、2014年10月15-18日、京都、口頭・ポスター発表

12. Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter

Takaaki Miyaji, Keisuke Sawada, Hiroshi Omote, Yoshinori Moriyama

Purines2014, 2014年7月23-27日、ドイツ、ポスター発表

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：アスコルビン酸トランスポーター
発明者：森山芳則、**宮地孝明**、表弘志、黒森
崇、篠崎一雄
権利者：国立大学法人岡山大学
種類：特許権
番号：特願 2013-155640、PCT/IB2014/063104
出願年月日：平成 25 年 7 月 19 日出願、平成
26 年 7 月 15 日出願
国内外の別： 国内と国外

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮地 孝明 (MIYAJI TAKAAKI)
岡山大学自然生命科学研究支援センタ
ー・准教授
研究者番号：40550314