

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07064

研究課題名(和文) グルコース輸送体の小胞型輸送システムと生理・病態作用の解明

研究課題名(英文) Physiology/Pathophysiology and transport system of vesicular-type glucose transporter

研究代表者

日浅 未来 (Hiasa, Miki)

岡山大学・医歯薬学域・講師

研究者番号：30587720

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、内膜系に局在するグルコーストランスポーター(GLUT)の発現と局在、機能、生理作用について解析し、GLUT10、8、12が血管平滑筋細胞に発現すること、小胞体に特にGLUT10、12が局在することを明らかにした。また、GLUT12の精製タンパクを用いた解析にて、GLUT12はGLUT1と同様の輸送特性を持つこと、デヒドロアスコルビン酸を基質とする可能性を見出した。これまで機能未知であった内膜型GLUTsが小胞体でデヒドロアスコルビン酸輸送体として機能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

主なグルコーストランスポーター(GLUT)は細胞膜に局在して細胞内にグルコースなどの糖類を取り込んでエネルギー供給などの生体恒常性の維持に関与しているが、そのファミリーの中には機能未知のGLUTがあることが知られている。本研究はGLUT10、12が小胞体局在型のデヒドロアスコルビン酸輸送体であることを示唆している。小胞体内に輸送されたデヒドロアスコルビン酸はアスコルビン酸に還元され、補酵素として機能すると考えられる。特にGLUT10は関与する遺伝子疾患も知られており、その病態生理の解明が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the expression, localization, function, and physiological effects of vesicular-type glucose transporters localized in organelles and found that GLUT10, 8, and 12 are expressed in vascular smooth muscle cells and that GLUT10 and 12 are localized in the endoplasmic reticulum. In addition, analysis of purified GLUT12 protein revealed that GLUT12 has similar transport properties to GLUT1 and may recognize dehydroascorbic acid as a substrate. This suggests that vesicular-type GLUTs, whose function has been unknown, function as dehydroascorbate transporters in the endoplasmic reticulum.

研究分野：生化学

キーワード：トランスポーター アスコルビン酸 デヒドロアスコルビン酸 線維芽細胞 血管平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

グルコーストランスポーター (GLUT) は 12 回膜貫通型の輸送体であり、グルコーストランスポーターファミリー (SLC2A ファミリー) に属している (図 1)。13 種のサブタイプが存在し、クラス I ~ III に分類される。クラス I に属する GLUT1-4 は細胞膜に局在し、細胞内にグルコースを取り込んで血糖値の調節や細胞へのエネルギー供給などの生体恒常性の維持に関与している。クラス II には細胞膜に局在し、グルコースに加えてフルクトースを輸送する GLUT5,7,11 や腎臓で尿酸再吸収に関わる GLUT9 が属している。最後のクラス III には GLUT6,8,10,12,13 が属しているが他のクラスの GLUTs とは異なり細胞内膜に局在し、グルコースの他に myo-inositol やデヒドロアスコルビン酸 (DHA) を基質とするものがあることがわかってきている。クラス I、II に属する GLUTs についてはその生理的意義について多くの研究がなされているが、クラス III に属する GLUTs については細胞内局在や基質、生理作用など不明な点が多い。クラス III に属する GLUTs については、その多くが細胞内膜に局在し、デヒドロアスコルビン酸 (DHA) を基質として認識することが知られている。また、GLUTs の中でも GLUT10 は、大動脈や中径の動脈の蛇行、拡張、延長、狭窄、動脈瘤などを特徴とする心血管系疾患である Arterial tortuosity syndrome (ATS、動脈蛇行症候群) の原因遺伝子であることが判明している (Coucke et al. 2006)。しかし、GLUT10 の機能欠損が ATS の症状発現にどのように関与しているのか、よくわかっていない

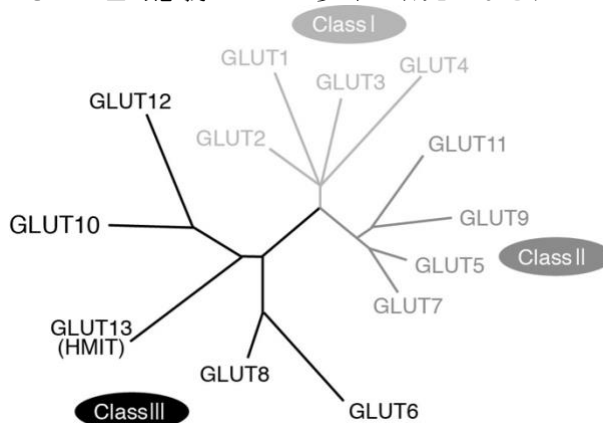


図 1: GLUT ファミリーの系統樹

2. 研究の目的

本研究では、クラス III に属する GLUTs が細胞内膜局在型のトランスポーター (輸送体タンパク質) であり、基質として酸化型ビタミン C である DHA を認識することに注目した。生体内ではアスコルビン酸、いわゆるビタミン C は還元作用をもつ補酵素として機能し、コラーゲン合成や骨形成といった生理作用を示す。ビタミン C が不足すると血管壁の損傷や出血を伴う壊血病を発症する。アスコルビン酸の酸化により生じた DHA は種々の酵素を触媒として再びアスコルビン酸へと還元され、利用されている。クラス III に属する GLUTs が線維芽細胞の小胞体に局在し、DHA を小胞体内へ輸送・蓄積する働きを担っているのではないかと考えた。GLUTs が機能欠損すると、小胞体内へ DHA が輸送されず、結果としてアスコルビン酸を補酵素とする水酸化酵素等によるコラーゲン合成がうまくいかなくなると考えられる。GLUT10,8,12 に注目し、これらが小胞型 DHA トランスポーターとして機能することを証明し、その生理作用と病態生理を明らかにしようと考えた。その証明のため、GLUT10,8,12 の DHA 輸送メカニズム、組織発現や細胞内での局在オルガネラ、DHA とコラーゲン合成の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

① GLUTs の発現、局在オルガネラの解析

GLUT10 は特に心筋に多く発現すると報告されているが、血管内皮細胞や血管壁周辺の線維芽細胞での発現量比といった研究はなされていない。リアルタイム PCR や特異的抗体を用いた Western blotting 法、免疫組織化学法により GLUT10, 8, 12 の心筋、血管壁、線維芽細胞での詳細な発現・局在を解析した。また、特異的抗体を作製し、免疫組織学的手法を用いて、GLUTs 特異的抗体と各種オルガネラマーカーとの二重染色を行い、GLUTs がどのオルガネラに局在するのか解析した。

② GLUTs の精製タンパクを用いた輸送解析

大腸菌を用いたトランスポータータンパク質の大量発現・精製、輸送活性測定系を用いて GLUTs を単一のタンパク質として精製し、人工膜小胞に埋め込み、細胞夾雑物などの影響がない状態で、GLUTs の輸送活性を測定した。輸送特性 (速度定数、駆動力、基質特異性、各種阻害剤の効果など) を調べた。

4. 研究成果

①マウス大動脈を用いて GLUT10, 8, 12 の発現を解析した。RT-PCR による解析から、マウス大動脈において GLUT10, 8, 12 は遺伝子レベルで発現していることが分かった。大動脈組織にて間接蛍光抗体法を行った結果、中膜と一部外膜にて GLUT10, 8, 12 の発現が見られた。さらに大動脈中膜に存在する血管平滑筋細胞 (VSMC) のマーカーである α -アクチンの抗体、抗 α -SMA 抗体と二重染色を行った結果、共局在が見られた (図 2 左)。GLUT10, 8, 12 は大動脈の中膜に多く局在していることが示された。

大動脈の中膜には、VSMC が多く存在している。マウス大動脈の中膜から VSMC を単離し、実験に用いた。VSMC のマーカーである抗 α -SMA 抗体を用いた免疫染色を行い、 α -SMA 陽性であることを確認した。単離 VSMC について RT-PCR 法を用いて解析した結果、GLUT10, 8, 12 の発現が見られた (図 2 右)。次に、VSMC において GLUT10, 8, 12 の免疫染色を行った結果、GLUT10, 8, 12 はそれぞれ VSMC に発現していた。これら GLUTs の発現を確認するため、それぞれの特異的抗体と小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリアのマーカーである PDI, GM130, CoxIV を用いて二重染色を行い、得られた画像から、ピアソンの相関係数を算出した。その結果、GLUT10 は、PDI と多く共局在していた。また、COXIV ともわずかに共局在していたが、GM130 とはほとんど共局在していなかった。GLUT8 は、PDI, GM130, CoxIV のいずれにおいてもほとんど共局在していなかった。GLUT12 は、PDI と多く共局在していた。CoxIV も部分的に共局在が観察されたが、GM130 とはほとんど共局在していなかった。

以上の結果から、VSMC には GLUT10, 8, 12 がそれぞれ発現しているが、小胞体に特に多く発現しているのは GLUT10, 12 であることが示された。VSMC は主にエラスチンを産生することから、エラスチン合成の際の水酸化機構に GLUTs が輸送する DHA が必須であると考えられる。

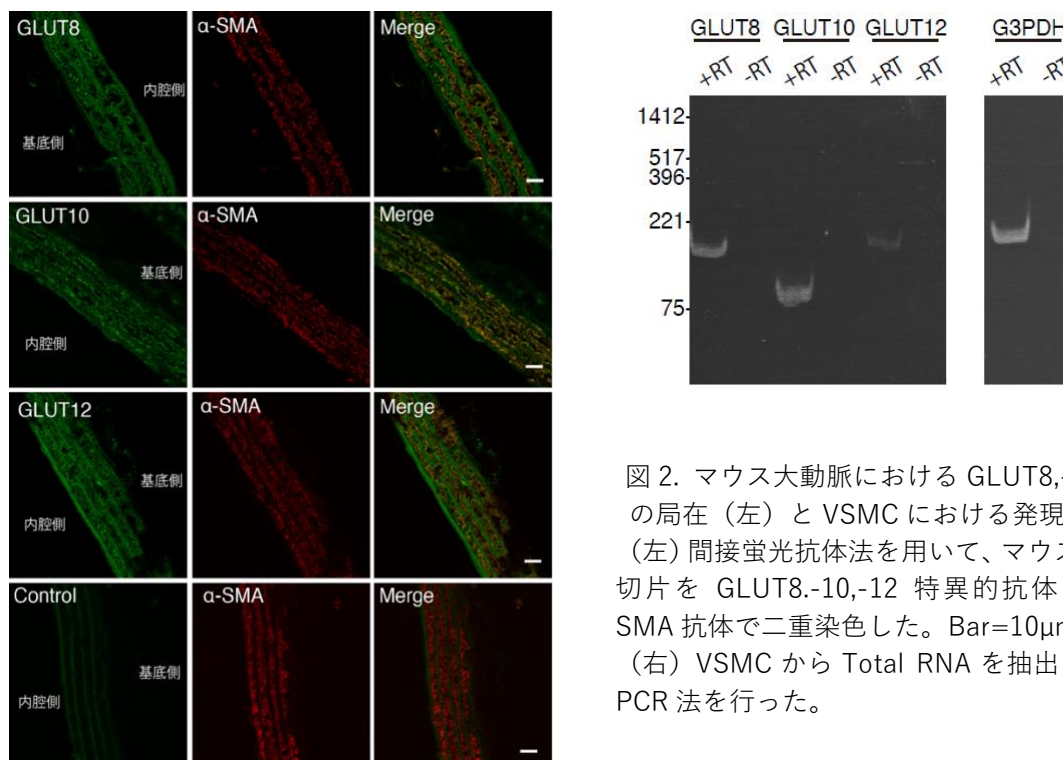


図 2. マウス大動脈における GLUT8,-10,-12 の局在 (左) と VSMC における発現 (右) (左) 間接蛍光抗体法を用いて、マウス大動脈切片を GLUT8,-10,-12 特異的抗体と抗 α -SMA 抗体で二重染色した。Bar=10 μ m (右) VSMC から Total RNA を抽出し、RT-PCR 法を行った。

②GLUT12 について、GLUT12 タンパクを大腸菌に大量発現させ、精製し、人工膜小胞に再構成して輸送活性を測定した。その結果、クラス I と同様の輸送特性を示した。その輸送活性はフロレチンにより阻害され、DHA によっても阻害が見られた。GLUT12 は DHA 基質とする可能性がある。GLUT12 の各組織における発現を解析したところ、これまで報告されていた腎臓や小腸に加え脳下垂体前葉や甲状腺といった内分泌細胞への局在を見出した。GLUT12 が DHA 酸を基質とする可能性があることから、GLUT12 が分泌小胞内へ輸送する DHA が、アスコルビン酸へと還元され、ペプチドホルモン類の C 末端アミド化へ関与することが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuo Shunsuke, Hiasa Miki, Omote Hiroshi	4. 巻 168
2. 論文標題 Functional characterization and tissue localization of the facilitative glucose transporter GLUT12	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 611 ~ 620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa090	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日浅未来
2. 発表標題 小胞型ポリアミントランスポーター（VPAT）の機能と生理作用
3. 学会等名 日本ポリアミン学会 第12 回年会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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