

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08555

研究課題名(和文) 血中短鎖脂肪酸濃度を決定付ける肝短鎖脂肪酸取込み調節機構の解明

研究課題名(英文) Clarification the regulation of short chain fatty acids transport function in the liver.

研究代表者

福富 俊之 (Fukutomi, Toshiyuki)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：30439187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血中短鎖脂肪酸の濃度決定には、肝臓における短鎖脂肪酸の取込みが大きく寄与する。ヒト肝臓に発現する有機酸輸送体OAT7とOAT2は、それぞれ酪酸とプロピオン酸を輸送する肝臓における短鎖脂肪酸の輸送体であるが、その調節機構は未だ不明である。本研究は、肝臓における短鎖脂肪酸の取込み調節機構の解明を目指し、酪酸輸送体OAT7/プロピオン酸輸送体OAT2の輸送機能調節機構を明らかにすることを目的とした。その第一段階として、OAT7/OAT2の輸送機能調節候補分子として、それらの相互作用タンパク質を探索した。特にOAT7とその相互作用タンパク質の結合様式を明らかにし、輸送機能調節の可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで栄養素としての位置づけが大きかった短鎖脂肪酸を単なる栄養素としてではなく、エネルギー恒常性維持を中心とした生理現象に重要なシグナル分子として捉え、血中の短鎖脂肪酸の濃度調節機構を解明するものである。特に、血中の短鎖脂肪酸の濃度を決定づけるのに重要な肝臓での短鎖脂肪酸取込み調節機構を明らかにすることに着目した。本研究成果の一つである酪酸輸送体OAT7相互作用タンパク質と酪酸輸送機能調節の可能性は、肝臓での酪酸取込みの新たな知見であり、エネルギー恒常性維持の理解が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Short chain fatty acids, including acetate, propionate and butyrate, have been shown to regulate various metabolic processes such as energy and lipid metabolism. Of these short chain fatty acids, butyrate has been identified as a ligand for GRP41/43. Butyrate blood levels would correlate with GLP-1 production and one of the determinants of the butyrate level is its uptake/release by the liver.

Human organic anion transporter 7 (OAT7) / organic anion transporter 2 (OAT2) expressed at hepatocyte membrane, has been functionally characterized as an exchange transporter of butyrate / propionate with sulfate conjugated steroids.

The purpose of this study is to clarify the regulation of butyrate / propionate transports function. As a first step we attempted to identify OAT7 / OAT2 interacting proteins by yeast two-hybrid and immunoprecipitation followed by mass spectrometry in human liver cell lines. One of the proteins identified by yeast two-hybrid was likely to regulate OAT7 function.

研究分野：薬理学

キーワード：短鎖脂肪酸 輸送体 トランスポーター プロテオミクス 酪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酢酸、プロピオン酸、酪酸など炭素数 2 から 4 の短鎖脂肪酸は、ヒトの体内では合成されず腸内細菌によるセルロースなどの食物繊維成分の分解によって生成される。生成された短鎖脂肪酸の 99%以上は大腸粘膜細胞により取込まれ、同細胞の生理機能維持に重要な役割を果たし、同時にエネルギー源として大量に消費されることが知られている。さらに、吸収された一部が門脈系に入り、肝臓へと達する。門脈系に入った短鎖脂肪酸の 90%以上は肝臓に取込まれ、残りが血中に向かい体循環系に存在するとされる。つまり、血中の短鎖脂肪酸濃度を決定付ける役割を肝臓における短鎖脂肪酸取込みが担っている。腸管内に比べれば遥かに低い量の血中短鎖脂肪酸が、全身諸臓器におけるエネルギー源の維持や成長、脂肪合成・代謝に重要な役割を果たしている。さらに近年では、短鎖脂肪酸はその受容体を介し脂肪細胞のレプチン分泌応答、脂肪蓄積の抑制、体内エネルギーバランスの調節等に関与することが報告されており、短鎖脂肪酸は単なる栄養素としてだけでなく、シグナル分子としての役割も担うことが明らかになった^{1), 2)}。血中の短鎖脂肪酸濃度の調節は生体にとって極めて重要な機構であり、その破綻は様々な代謝疾患の原因となる。従って、血中短鎖脂肪酸の濃度調節に寄与する肝臓における短鎖脂肪酸の取込み機構を明らかにすることは、エネルギー恒常性維持やその破綻に起因する肥満や糖尿病に代表される生活習慣病等の代謝疾患の分子基盤の理解に非常に有用である。

これまでに、申請者の所属研究室において、ヒト肝臓特異的に発現し、肝細胞血管側膜上に存在する短鎖脂肪酸、特に酪酸を輸送する新規有機酸トランスポーター OAT7 の分子同定に成功している³⁾。また、有機酸トランスポーター OAT2 が短鎖脂肪酸であるプロピオン酸を輸送することも報告⁴⁾しており、肝臓における酪酸及びプロピオン酸の輸送体を明らかにしている。OAT7 及び OAT2 の肝臓への短鎖脂肪酸取込みは、血中短鎖脂肪酸の濃度決定に重要である事が予想されるが、現在までにそれらの取込み調節機構は未だ不明なままである。

2. 研究の目的

酪酸やプロピオン酸等の短鎖脂肪酸は、微量ではあるが血中に存在し、エネルギー恒常性維持を中心とした生理現象に重要な役割を果たす。その機能破綻は肥満や糖尿病に代表される生活習慣病等の代謝疾患を惹起する。血中短鎖脂肪酸の濃度決定には、肝臓における短鎖脂肪酸の取込みが大きく関連する。その為、肝臓における短鎖脂肪酸の取込み調節機構を解明することは、エネルギー恒常性維持機構の理解のみならず、その破綻に起因する様々な代謝疾患の分子基盤の理解に極めて有用である。これまでに当研究室において、ヒト肝臓に発現する有機酸トランスポーター OAT7 と OAT2 が、それぞれ酪酸とプロピオン酸を輸送することを報告し、肝臓における短鎖脂肪酸の輸送体を明らかにしている^{3), 4)}。しかし、その調節機構は未だ不明なままある。

よって、本研究は、血中短鎖脂肪酸濃度を決定付ける肝臓における短鎖脂肪酸の取込み調節機構の解明を目指し、酪酸輸送体 OAT7 およびプロピオン酸輸送体 OAT2 の機能調節機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝臓由来細胞株

ヒト肝臓由来細胞株である Huh7 細胞および HepG2 細胞を用いた。培養液に終濃度 10% に調整した FBS を含む DMEM を用いて、温度 37℃、5% CO₂ の条件下で培養した。

(2) 酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法を用いた相互作用タンパク質探索と結合確認

OAT7 の相互作用タンパク質の探索には、bait に OAT7 の C 末端の細胞内ドメインを用い、prey にはヒト肝臓 cDNA ライブラリーを用いた。

OAT7 相互作用タンパク質の 1 つである PDZK1 と OAT7 の結合確認と詳細な結合様式の検討には、bait に OAT7 および OAT1-4 の C 末端をそれぞれ用い、prey に PDZK1 の全長および PDZK1 の四つの PDZ ドメイン (PDZ1-4) をそれぞれ用いた。

(3) 免疫沈降法を用いたヒト肝臓由来細胞内の OAT7 と PDZK1 の相互作用確認

Huh7 細胞ライセートに OAT7 抗体および IgG をコンジュゲートしたアガロースビーズを混合し、免疫沈降を行った。得られた沈降物を SDS-PAGE にて展開した後、PDZK1 抗体を用いたウェスタンブロット法により PDZK1 の存在を確認した。加えて、PDZK1 抗体を用いた免疫沈降法と OAT7 を用いたウェスタンブロット法も同時に行った。

(4) プロテオミクスによる相互作用タンパク質の探索

免疫沈降法と LC-MS/MS (HPLC と質量分析計の組合せ) を用いた。OAT7 抗体を用いた免疫沈降法を行い、Huh7 細胞ライセートより沈降物を得た。得られた沈降物を SDS-PAGE にて展開し、クマシーブルー染色によりタンパク質を確認した。沈降物を展開したゲルレーンを全て約 5mm 幅に短冊状に切り取り、トリプシンを用いたゲル内消化を行った後に消化ペプチドを抽出した。抽出した消化ペプチドを濃縮・精製し、LC-MS/MS により分析した。分析後、UniProt および NCBI のタンパク質データベースを用いてタンパク質を同定し、同定されたタンパク質を OAT7 相互作用候補タンパク質とした。

(5) トランスポーターの輸送機能解析

アフリカツメガエル卵母細胞に OAT7 と PDZK1 の両遺伝子および OAT7 の単独遺伝子を導入し、酪酸と酪酸の交換基質の一つであるエストロン硫酸の放射性ラベル体を用いて、輸送活性を測定し、PDZK1 の有無における OAT7 の輸送機能を比較した。

また、Huh7 細胞を用いて、siRNA 法により内因性 PDZK1 をノックダウンしたものと非処理のもの、Huh7 細胞に PDZK1 をリポフェクション法により過剰発現したものと非処理のものを上記の放射性ラベルされたエストロン硫酸を用いて輸送機能を比較した。

4. 研究成果

(1) Y2H 法による OAT7 相互作用タンパク質の探索と結合確認

Y2H 法を用いて OAT7 の相互作用タンパク質の探索を行った。Bait に OAT7 の細胞内ドメインの C 末端、prey にヒト肝臓 cDNA ライブラリーを用いた結果、細胞内支持タンパク質である PDZK1 を同定した。OAT7 と同定された PDZK1 の結合確認を bait に OAT7-C 末端、prey に PDZK1 全長を用いて行った。また、OAT7 の属する OAT ファミリーの輸送体と PDZK1 の結合を bait に OAT1-4 の C 末端と prey に PDZK1 の全長を用いて Y2H 法を行った。その結果、C 末端に PDZ モチーフを持つ OAT7 (PDZ モチーフ: -TQF) と OAT4 (PDZ モチーフ: -TSL) が PDZK1 と結合することが確認された。

		C terminal				Leu	GFP
hOAT7-WT	V E V T Q F*	+	+				
hOAT4-WT	V E S T S L*	+	+				
hOAT1-WT	Q E K N G L*	-	-				
hOAT2-WT	M K Q V Q N*	-	-				
hOAT3-WT	P G L G S S*	-	-				

図1. Y2H法によるOATファミリーC末端とPDZK1の結合確認

本結果より、PDZK1 との結合には OAT タンパク質の PDZ モチーフが関与する事が示唆された (図 1.)

(2) OAT7 と PDZK1 の結合部位の検討

OAT7 と PDZK1 の結合には、OAT7 の C 末端が関与し、C 末端に PDZ モチーフを持つ OAT 分子のみが PDZK1 との結合を示したことより、OAT7 の PDZ モチーフについて検討した。OAT7-C 末端の PDZ モチーフ (-T-Q-F) を削除したものとそのままのもの (野生型) およびモチーフを決定付けるアミノ酸を 1 つアラニンに置換したものの 2 種類 (-T-Q-A と -A-Q-F) と PDZK1 全長との結合を Y2H 法により検討した。また、GST プルダウン法によっても同様の配列を用いて検討した。その結果、PDZ モチーフが野生型の配列のみ PDZK1 と結合することが明らかになった (図 2.)

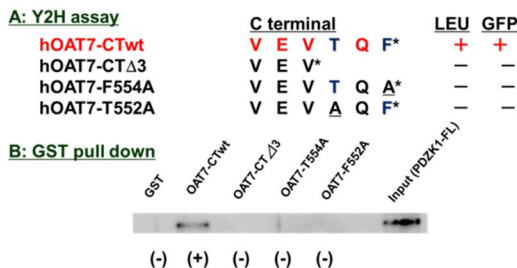


図2. OAT7-C末端PDZモチーフ野生型および変異型とPDZK1の結合確認

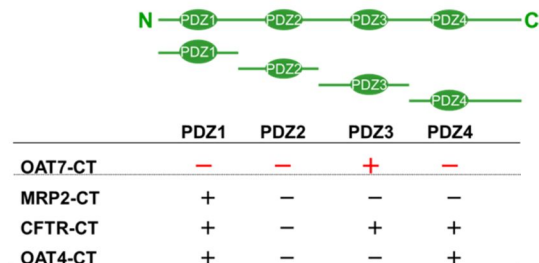


図3. OAT7-C末端とPDZK1の各PDZドメインの結合確認

また、PDZK1 は 4 つの PDZ ドメインを持つことから、どのドメインに OAT7 が結合するかを確認する為、OAT7 の C 末端と PDZK1 の各 PDZ ドメイン (PDZ1-4) の結合を Y2H 法によって検討した。その結果、PDZ3 と OAT7 の C 末端が結合する事が明らかになった (図 3.)。ポジティブコントロールとして、既に PDZK1 と結合する事が報告されている輸送体である MRP2、CFTR と OAT4 の C 末端を用いて結合確認を行った。

以上より、OAT7 の C 末端の PDZ モチーフと PDZK1 の PDZ ドメインである PDZ3 が結合する可能性を強く示唆した。

(3) ヒト肝臓由来細胞内における OAT7 と PDZK1 の結合確認

ヒト肝臓由来細胞株である Huh7 細胞を可溶化し、免疫沈降法を用いて OAT7 と PDZK1 の結合を確認した。OAT7 抗体で免疫沈降した後に PDZK1 抗体でウェスタンブロットを行うとともに PDZK1 抗体で免疫沈降をした後に OAT7 抗体でウェスタンブロットを行った。その結果、OAT7 抗体を用いた免疫沈降物に PDZK1 の存在が確認でき、PDZK1 抗体を用いた免疫沈降物に OAT7 が確認できた。以上より、Huh7 細胞中において OAT7 と PDZK1 が結合することが示唆された (図 4.)

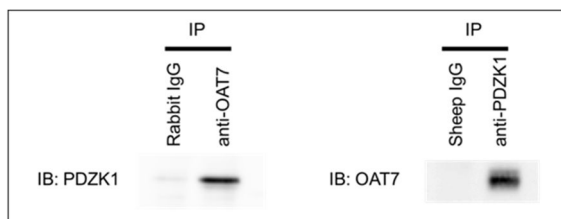


図4. 免疫沈降法によるOAT7とPDZK1の結合確認

(4) PDZK1によるOAT7の輸送機能調節の解析

アフリカツメガエル卵母細胞を用いて、OAT7の輸送機能を放射性ラベルされたエストロン硫酸の輸送能を指標として測定した。OAT7単独発現とOAT7とPDZK1を共発現した時のOAT7の輸送活性を比較した。また、Huh7細胞を用いて、同様の手法によりOAT7の輸送能を測定した。Huh7細胞に内在するPDZK1をノックダウンした時のOAT7の輸送活性の変化およびPDZK1を過剰発現した時のOAT7輸送活性の変化を検討した。その結果、PDZK1の存在によりOAT7の輸送活性が変動することが示唆された(data not shown)。しかしながら、再現性確認およびより詳細な解析が必要不可欠である為、今後、追加実験によりさらなる検討を予定している。

(5) プロテオミクスによる相互作用タンパク質の探索

PDZK1以外のOAT7結合タンパク質を見出すため、免疫沈降法とLC-MS/MSを用いたプロテオミクス解析を行った。Huh7細胞を可溶化した後、OAT7抗体を用いて免疫沈降を行い、得られた免疫沈降物に含まれるタンパク質を同定した。同定したタンパク質に対して遺伝子オントロジー解析を行い、OAT7結合タンパク質の生物学的プロセス、細胞の構成要素、分子機能(図5.)を明らかにした。OAT2についても同様に行い、骨格系のタンパク質等を同定したが(data not shown)。さらなる検討が必要である為、追加実験を予定している。

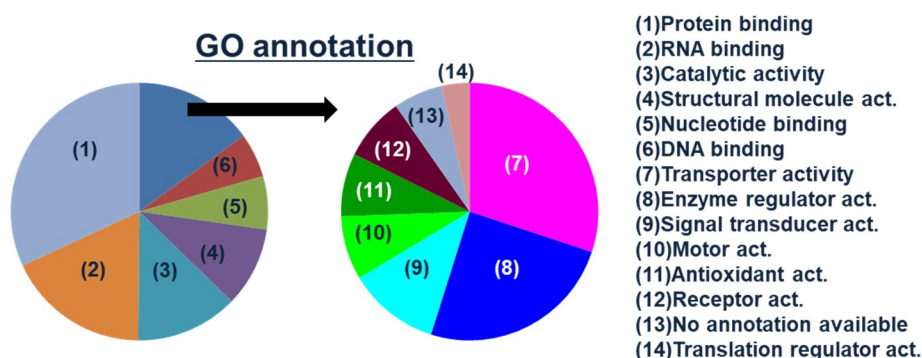


図5. OAT7結合タンパク質のGO annotation

同定したOAT7結合タンパク質より、脂肪酸関連タンパク質を抽出した結果、Fatty acid desaturase 2、7-dehydrocholesterol reductase、Fatty acid-binding protein, epidermalを見出すことに成功した(表1.)。

表1. 脂肪酸関連タンパク質

【Candidate proteins: Identification of fatty acid related proteins】

- Fatty acid desaturase 2 [FADS2_HUMAN]
- 7-dehydrocholesterol reductase [DHCR7_HUMAN]
- Fatty acid-binding protein, epidermal [FABP5_HUMAN]

以上より、本研究成果として、酪酸輸送体OAT7とプロピオン酸輸送体OAT2の結合タンパク質を同定することに成功した。特に、OAT7結合タンパク質として同定した細胞内支持タンパク質PDZK1は、OAT7の輸送機能を調節する可能性を示唆した。加えて、OAT7とPDZK1の詳細な結合様式を明らかにした。これらは、肝における酪酸輸送の調整機序の理解が進むと考えられる。今後、OAT2結合タンパク質およびPDZK1以外のOAT7結合タンパク質に対し、さらなる検討を行うことにより、より肝での短鎖脂肪酸取り込み調節機構への理解が進むと期待される。

<引用文献>

- 1) Kimura I et al., *PNAS*, 2011
- 2) Kimura I et al., *Nat Commun*, 2013
- 3) Shin et al., *Hepatology*, 2007
- 4) Islam et al., *J Pharmacol Sci*, 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Toshiyuki Fukutomi, Toru Kimura, Naohiko Anzai, Hiroyuki Sakurai.
2. 発表標題 Identification of interacting proteins for a liver-specific butyrate transporter OAT7
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

杏林大学医学部薬理学教室ホームページ http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/pharmaco/index.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
研究 分 担 者	木村 徹 (Toru Kimura) (30433725)	杏林大学・医学部・学内講師 (32610)	