

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06760

研究課題名(和文) 配糖体の体内動態を制御する促進拡散型トランスポーターの同定

研究課題名(英文) Exploring a facilitative glycoside transporter in mammalian cells

研究代表者

井上 勝央 (Inoue, Katsuhisa)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50315892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ポリフェノールは植物が生成する抗酸化物質であり、主に糖と結合した配糖体として存在している。物理化学的な性質に基づく配糖体の組織・細胞移行性は低いと想定されるが、生体において抗炎症作用、抗腫瘍作用など様々な薬理効果を示すことから、配糖体の体内動態には特異的なトランスポーターの関与の可能性が指摘されている。そこで本研究では、配糖体の細胞内取り込みに対する簡便な評価系の構築およびその評価方法を用いた輸送解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生体内におけるポリフェノールの体内動態に特異的なトランスポーターが関与することを示唆するものであり、その分子機構の解明に繋がる基礎的知見を与えるものである。本知見をもとに、配糖体トランスポーター分子を同定することで、配糖体の薬効発現が期待される細胞・組織の特定や組織移行性に優れた配糖体の構造予測などが可能になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Polyphenols are potent antioxidants that exist primarily as glycosides in plants. Glycosides show various pharmacological effects such as anti-inflammatory and antitumor effects in our body despite low membrane permeability based on their physicochemical properties, thereby implicating a possible involvement of specific transporters. In this study, we constructed a simple assay system for the intracellular uptake of glycosides and evaluated functional characteristics of glucoside transport.

研究分野：医療薬学

キーワード：トランスポーター 配糖体 蛍光 グルコシダーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

配糖体は植物界に広く分布する天然物有機化合物であり、植物中に含まれる生物活性物質の多くは配糖体の形で存在している。その構造中には、基本骨格であるアグリコンに、グルコースやガラクトースなどの単糖、あるいはルチノースなどの二糖を結合したものが多く認められ、この配糖体への変換は、植物が産生する化合物に親水性を付加し、器官間、組織間の移動や細胞内の液胞などのオルガネラへ無毒化した形で貯蔵することを可能にしている。したがって、配糖体は、アグリコンの細胞膜透過を制限するための形態と考えられる。

物理化学的特性に基づく配糖体の生体膜透過性は、植物細胞だけでなく、哺乳類細胞においても小さいと推測されるため、細胞内で配糖体が薬理効果を発揮するためには、膜透過を媒介するトランスポーターの必要性が指摘されている。しかし、フラボノイド等の配糖体について小腸様細胞 (Caco-2 細胞) などの培養細胞を用いた輸送研究が多数、実施されているが、未だ明確な膜透過現象は観察されておらず、配糖体の部分構造であるグルコースに対するトランスポーター (GLUTs/SLC2A: glucose transporters, SGLTs/SLC5A: Na⁺-dependent glucose transporters) の発現系を用いた検討においても再現性が高い輸送活性は認められていない。したがって、配糖体の輸送には、未だ機能が同定されていないトランスポーターあるいはトランスポーター様のタンパク質が関与する可能性が考えられる。

一方、皮膚の色調に関与するメラニンメラノーマ細胞におけるチロシナーゼにより産生され、その阻害活性を有する様々な天然化合物が同定されている。なかでも、フェノール性配糖体であるアルブチンは、肌の美白成分、日焼けによるシミ・ソバカスを防ぐ医薬部外品有効成分として実用化されている。このことは、細胞外のアルブチンがメラノサイト・メラノーマの細胞内チロシナーゼと相互作用できることを示すとともに、類似の配糖体化合物も同様の相互作用をおこす可能性を示唆している。

2. 研究の目的

チロシナーゼに対する配糖体の阻害効果より、メラノサイト・メラノーマの細胞膜において配糖体に特異的なトランスポーターが存在することが考えられる。そこで本研究課題では、配糖体トランスポーターを利用したメラノーマへの特異的薬物送達を志向した治療戦略を提案するために細胞膜における配糖体の取り込みに関わるトランスポーターの探索を行った。

3. 研究の方法

細胞における配糖体の輸送活性を高感度に検出するために、細胞内に配糖体加水分解酵素である GBA3 (cytosolic beta-glucosidase) を安定発現させた HEK293 を作製し、蛍光アグリコンである 4-methylumbelliferone (4-MU) の配糖体を用いて、GBA3 を介した加水分解により生成する 4-MU の蛍光強度を定量し、輸送活性を評価した。また、その輸送特性を明らかにするため、各種阻害剤存在下における蛍光強度の変化を測定した。

配糖体に特異的なトランスポーターを同定するため、各種候補遺伝子の cDNA を哺乳類発現ベクターに組み込み、GBA3 を安定発現した HEK293 細胞に一過性に発現させ、4-MU の配糖体の輸送活性を評価した。

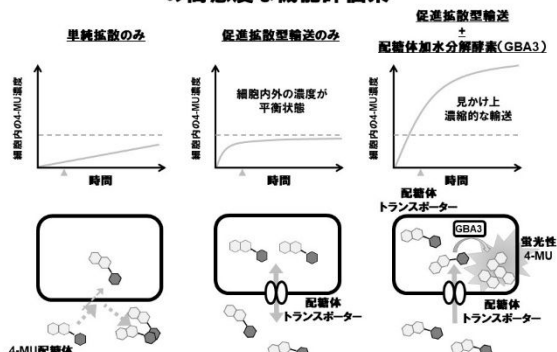
4. 研究成果

配糖体の細胞膜透過を評価するために、右図に示すストラテジーを考案し、その実施とコンセプトの検証を行った。

GBA3 の遺伝子導入による β -グルコシダーゼ活性の上昇を確認するために、ヒト GBA3 を HEK293 細胞に一過性に発現させ、配糖体基質として 4-MU-グルコシド (4MU-Glc) を使用して、細胞内および細胞外の β -グルコシダーゼ活性を測定した。GBA3 の一過性発現により、細胞内 β -グルコシダーゼ活性は約 80 倍に増加し、GBA3 の発現が確認された。しかし、基質を含まない取り込み溶液と本細胞を 60 分間インキュベートしたところ、取り込み溶液中に細胞内と同等の β -グルコシダーゼ活性が認められた。このことから、細胞質に存在する GBA3 は細胞外に分泌されることが明らかとなった。本評価系において、細胞外の β -グルコシダーゼは配糖体の輸送活性の評価を困難とすることから、本分泌機構を抑制する必要性が考えられた。

ヒト GBA3 は 469 個のアミノ酸からなる可溶性タンパク質であり、その N 末端には分泌経路に関わるシグナルペプチドは認められない。そこで、GBA3 の細胞外への流出を防ぎ、細胞外 β -グルコシダーゼ活性を低下させるために、各オルガネラ局在化シグナル配列を有するタンパク質、

GBA3を用いた蛍光性4-MUによる配糖体トランスポーターの高感度な機能評価系



β -グルコシダーゼは配糖体の輸送活性の評価を困難とすることから、本分泌機構を抑制する必要性が考えられた。

Lifect、ヒストン H2B およびカルネキシンを GBA3 と融合させ、それぞれ、細胞骨格、核および小胞体に局在化する GBA3 融合タンパク質の発現コンストラクトを作製した(Lifect-GBA3、H2B-GBA3 および Calnexin-GBA3)。これら発現ベクターを HEK293 細胞に一過性に発現させ、細胞内および細胞外の α -グルコシダーゼ活性を測定した結果、細胞内酵素活性は、H2B-GBA3 を除き、野生型 GBA3、Lifect-GBA3 およびカルネキシン-GBA3 で同等であり、細胞外酵素活性は、Lifect-GBA3、H2B-GBA3 および Calnexin-GBA3 で著しく低下した。このことから GBA3 融合タンパク質は標的細胞小器官に固定化され、細胞外への分泌が抑制されていることが示唆された。細胞内/細胞外活性比は、Lifect-GBA3 を発現した HEK293 細胞 (Lifect-GBA3/HEK293 細胞) で最も高かったことから、以降の実験は本細胞を用いて行った。

Lifect-GBA3 の細胞内局在を確認するために、mCherry で標識した Lifect-GBA3 融合タンパク質を蛍光顕微鏡により観察したところ、F-アクチンと類似の分布を示した。

次に、各種配糖体 4-MU を Lifect-GBA3/HEK293 細胞に添加し、細胞内への配糖体の取り込みおよび細胞内の GBA3 を介して生成する 4-MU の蛍光強度の時間変化について検討した。4MU-Glc (10 μ M) の添加により、4-MU の蛍光強度は時間依存的に増加し、120 分まで時間に比例して増加した。その蛍光強度の増加は、4MU-Glc および 4-MU-ガラクトシド (4MU-Gal) よりも 4-MU-アラビノシド (4MU-Ara) で大きいことが示された。

4-MU 配糖体からアグリコンである 4-MU への代謝変換には、配糖体の膜透過過程とそれに続く GBA3 による加水分解を伴う。そこで、本反応における律速段階を決定するために、Tween20 処理により細胞膜透過過程を無視できる細胞と通常細胞を用いて、各種 4-MU 配糖体の存在下における 4-MU の蛍光強度を比較した。4MU-Glc および 4MU-Gal の添加系において、Lifect-GBA3/HEK293 細胞の Tween20 処理により、蛍光強度が約 2 倍に増加することが示された。しかし、Tween20 処理による変化は 4MU-Ara については認められなかった。これらの結果より、Lifect-GBA3/HEK293 細胞における 4MU-Glc および 4MU-Gal 代謝の全体的な反応における律速段階は、それら配糖体の膜透過過程であることが示唆された。

配糖体の生体膜透過にトランスポーターが関与する可能性を探るために Lifect-GBA3/HEK293 細胞における 4MU-Glc 添加後の 4-MU 生成に対する阻害剤の影響について検討した。その結果、フロリジンのアグリコンであるフロレチンが 4-MU 生成を著しく阻害することが明らかとした。一方、フロレチンは Tween20 透過処理した細胞では 4MU-Glc の加水分解を阻害しなかった。さらに、ケンペロール 3,7-ジグルコシドのプレニル化誘導体であるイカリイン、およびケルセチンも同様に阻害効果を示した。これらの結果より、配糖体の細胞内取り込みにトランスポーターが関与することが示唆された。しかし、GLUT1 の阻害剤であるサイトカラシン B と MCT1 の特異的阻害剤である AR-C155858 による阻害は認められなかった。

これまでに配糖体輸送への関与が示唆されている GLUTs と SGLT1 の Lifect-GBA3/HEK293 細胞における発現を確認するため、RT-PCR による解析を行った結果、GLUT1 mRNA の高発現が認められた一方、GLUT2、GLUT5 および SGLT1 の mRNA は検出されなかった。上述のように、GLUT1 の強力な阻害剤であるサイトカラシン B が Lifect-GBA3/HEK293 細胞における 4-MU の生成に対して阻害効果を示さなかったことを合わせて考えると、配糖体輸送への GLUT1 の寄与は小さいことが示された。実際、GLUT1 (および GLUT2、GLUT5 および SGLT1) の一過性発現の影響は認められなかった。

配糖体の膜透過を制御し得るトランスポーターを探索するために、天然に存在するフラボノイドと強く相互作用することが報告されているトランスポーターを選択し、Lifect-GBA3/HEK293 細胞における一過性発現の影響を検討した。様々な構造の化合物の輸送に関与する OATPs (OATP1A2、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1)、OATs (OCT1、OAT1、OAT3)において、コントロールに比較して有意な増加は観察されなかった。

以上の結果より、本研究において、配糖体の輸送活性の評価系を構築し、その評価系を用いて、HEK293 細胞に配糖体を輸送する促進拡散型トランスポーターが発現することを明らかにした。そのトランスポーターは他の配糖体やフロレチンにより阻害されることが示唆された。その分子実体の同定には至らなかったが、従来、輸送への関与が示唆されているトランスポーター以外の分子が関与していることが推察された。

本研究成果は、配糖体の膜輸送のメカニズムを理解するのに役立つとともに、食品や植物由来天然成分に含まれる様々な配糖体化合物の体内動態を把握するための分子基盤を与えるものである。また、自然界に存在する豊富な天然化合物の有用性の拡大や再評価に繋がる可能性も期待できる。さらには、配糖体輸送系の存在が示唆されるメラノーマに対する治療戦略を含め、配糖体トランスポーターを標的とした新たな創薬展開やその薬物治療の最適化に役立つものと思われる。

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 0件）

1. 著者名 Masaki Takahashi, Hisanao Kishimoto, Yoshiyuki Shirasaka, Katsuhisa Inoue	4. 巻 35
2. 論文標題 Functional Characterization of Monocarboxylate Transporter 12 (SLC16A12/MCT12) as a Facilitative Creatine Transporter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet	6. 最初と最後の頁 281-287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2020.01.008	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 趙冠雲、岸本久直、横目亜美、高橋正樹、白坂善之、井上勝央
2. 発表標題 配糖体化合物の生体膜透過機構の解明
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋正樹、岸本久直、白坂善之、井上勝央
2. 発表標題 MCT12介在性creatine輸送機構解明
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鷺巢百恵、高橋正樹、岸本久直、白坂善之、井上勝央
2. 発表標題 転移性メラノーマ細胞における膜動輸送に対するカルシウムイオノフォアの影響
3. 学会等名 日本薬剤学会 第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Takahashi, Hisanao Kishimoto, Yoshiyuki Shirasaka, Katsuhisa Inoue
2. 発表標題 Functional characterization of SLC16A12/MCT12 as a creatine efflux transporter in a mammalian expression system
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋正樹、岸本久直、白坂善之、井上勝央
2. 発表標題 SLC16A12 を介した creatine の促進拡散機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京薬科大学薬学部薬物動態制御学教室HP https://www.ps.toyaku.ac.jp/yakubutsudotai/</p>
--

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