

平成20年10月31日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790591  
 研究課題名（和文）腎臓特異的な発現を示す新規ケトン体トランスポーターの生理機能の解明  
 研究課題名（英文）Identification of the physiological function of a novel ketone body transporter expressed specifically in kidney  
 研究代表者：  
 平田 拓（HIRATA TAKU）  
 杏林大学・医学部・助教  
 研究者番号：60372918

## 研究成果の概要：

ゲノムプロジェクトが終了した現在でも、輸送基質・生理機能の特定されていない、いわゆるオルファントランスポーターが数多く残されている。機能活性が見い出されたものであっても、従来の生理学研究で記載された輸送機能との対応付けが難しいものは、生理的役割を推察することが困難であり、生体内での機能を評価する手法が必要とされる。本研究では、有機イオントランスポーターファミリー（SLC22）に属し腎臓特異的に発現するオルファントランスポーター（OATN1）について、遺伝子ノックアウトマウスを作製し、メタボローム解析を適用して、尿中化合物の網羅的分析により生理機能を明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：分子生物学、腎臓生理学、生化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：トランスポーター、遺伝子、糖尿病、分析化学、生理学、生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロジェクトが終了した現在、ヒトにおいて約4万とも言われる遺伝子の存在が報告されたが、未だ全ての遺伝子の機能同定には程遠い状況である。トランスポーター（膜輸送体）においても、輸送基質が特定されていない、いわゆるオルファントランスポーターは数多く残されている。機能活性が見

い出されたものであっても、従来の生理学研究で記載された輸送機能との対応付けが難しいものは、生理的役割を推察することが困難であり、生体内での機能を評価する手法が必要とされる。多くの腎尿細管薬物トランスポーターを含むSLC22ファミリーには、有機アニオントランスポーター（OAT）、有機カチオントランスポーター（OCT）、及び有機カチオン/カルニチントランスポーター（OCTN）

の3つのサブグループが知られているが、最近、当研究グループはゲノムデータベースの解析により第4のサブグループが存在することを見出した。第4のサブグループ (OATN: novel organic anion transporter サブグループと命名) は、4つのオルファントランスポーターから成るが、本研究ではそのうちの一つである腎臓特異的に発現する新規オルファントランスポーターOATN1 について解析を行う。

## 2. 研究の目的

本研究ではOATN1の生理機能を明らかにすることを第一の目的とし、見出された生理機能から臨床への応用までも視野に含み解析を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) OATN1の生理機能の解析：OATN1の生理的役割を明らかにするため、ノックアウトマウスを作製し表現型解析を行う。ここで、OATN1はその発現が腎特異的であり管腔側膜に局在することを踏まえて、その機能状態が尿中排泄化合物の量と質に大きく影響すると予想し、OATN1ノックアウトマウスと野生型マウスの尿中化合物の網羅的な解析を行った。尿中化合物を網羅的に分析するための手法として、トランスポーターの研究分野では初の試みであるメタボローム解析の手法の一つであるキャピラリー電気泳動-質量分析 (CE-MS) 法を導入した。

(2) OATN1特異的阻害薬の探索：OATN1安定発現細胞を用いて行い、RI標識化合物である $[^3\text{H}]$ - $\beta$ -ヒドロキシ酪酸の取り込みを指標として行った。様々な非RI標識化合物を取り込み実験の溶液に添加し $[^3\text{H}]$ - $\beta$ -ヒドロキシ酪酸の取り込みと競合させ、取り込みの阻害効果を評価することで探索を行った。以上で見出した阻害薬をマウスに投与することで、OATN1の生理機能を再度評価し、臨床への応用について検討する。

## 4. 研究成果

(1) OATN1の生理機能の解析：ノックアウトマウスを作製し表現型解析を行ったところ、通常観察では顕著な表現型を見出すことが出来なかった。ここで、CE-MSを用いた野生型とOATN1ノックアウトマウスの尿中成分のディファレンシャルディスプレイを行ったところ、8つのピークにおいて有意に差のある化合物を見出し、MS/MS解析からそのうちの一つのピークが $\beta$ -ヒドロキシ酪酸であることが明らかになった。この化合物が実際にOATN1により輸送されることを安定発現細胞の輸送機能実験により確認した。 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸は、生体内のエネルギー代謝に重要なケトン体の一つであることから、OATN1がケトン体代謝 (再吸収) を通して生体内のエネルギー代謝に重要な働きを担っていることが明らかになった。

(2) OATN1特異的阻害薬の探索：阻害薬探索の結果、2,4-dichlorophenylacetate、3-phenylpropionic acid、4-phenylbutyric acidがOATN1の機能を阻害することが明らかになった。また、これらの化合物をマウスに投与すると、ケトン体の再吸収が阻害され尿中へのケトン体の排泄が促進されることが確認された。ここで有意なケトン体排泄が認められた阻害薬は、将来的に、ケトアシドーシス治療薬となりえる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. 金井好克、平田 拓：メタボロミクスによるトランスポーター研究の新展開、*実験医学*、査読無、26-1:18-23, 2008
2. Nakagawa H, Hirata T, Terada T, Jutabha P, Miura D, Harada KH, Inoue K, Anzai N, Endou H, Inui K, Kanai Y, Koizumi A: Roles of organic anion transporters in the renal excretion of perfluorooctanoic acid. *Basic*

Clin Pharmacol Toxicol. 査読有、  
2008 Jul;103(1):1-8

3. 平田 拓、金井好克：腎におけるプロスタグランジンシグナリングの新展開、Annual Review 2007 腎臓、中外医学社、査読無、2007、p. 42-49

[学会発表] (計 11 件)

1. 平田 拓：DNA マイクロアレイを用いたエネルギー代謝に関わる新規トランスポーター遺伝子の探索、第三回トランスポーター研究会、平成 20 年 6 月 7, 8 日、京都
2. 平田 拓：DNA マイクロアレイを用いたエネルギー代謝に関わる新規トランスポーター遺伝子の探索、第 81 回日本薬理学会年会、横浜、平成 20 年 3 月 19 日
3. 平田 拓：網羅的遺伝子発現プロファイリングによるエネルギー代謝に関わる新規トランスポーター遺伝子の探索。特定領域研究「G 蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」合同若手ワークショップ 2008、箱根、平成 20 年 1 月 26-28 日
4. 平田 拓：糖尿病モデルマウスを用いた網羅的遺伝子発現プロファイリング（エネルギー代謝に関わる新規トランスポーター遺伝子の探索）。第 36 回杏林医学会、東京、平成 19 年 11 月 17 日
5. Taku Hirata：Molecular Identification and Functional Characterization of a Novel Organic Anion Transporter OATN1. American Society of Nephrology 38<sup>th</sup> Annual Renal Week Meeting, San Francisco, U.S.A, Nov 4, 2007.
6. 平田 拓：糖尿病モデルマウスを用いた網羅的遺伝子発現プロファイリングによるエネルギー代謝に関わる新規トランスポーター遺伝子の探索。分子腎臓研究会第 13 回研究発表会、東京、平成 19 年 9 月 1 日。
7. Taku Hirata：Elucidation of function of an orphan transporter from SLC22 organic cation/anion/switterion transporter family by metabolome analysis. BioMedical Transporters 2007, Bern, Switzerland, Aug 13,

2007.

8. Kanokporn Phetdee：Identification and characterization of an intestinal amino acid transporter (AAT-4) in *Caenorhabditis elegans*. 16<sup>th</sup> international C. elegans meeting, University of California, Los Angeles, USA, June 27-July 1, 2007
9. Taku Hirata, Kanokporn Phetdee, Ellappan Babu, Sudarat Nimitvilai, Kazuya Nomura, Shohei Mitani, Keiko Andou, Yoshikatsu Kanai：Analysis of *C. elegans* SLC7 amino acid transporters. 16<sup>th</sup> international C. elegans meeting, University of California, Los Angeles, USA, June 27-July 1, 2007
10. 波多野亮：新規プロスタグランジン特異的トランスポーターOAT-PGの生理機能の解析。第 2 回トランスポーター研究会、平成 19 年 6 月 10 日、東京
11. 平田 拓：メタボローム技術を用いた新規有機イオントランスポーターOATN1の生理機能の解明。第 50 回日本腎臓学会学術総会、平成 19 年 5 月 25 日、浜松

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平田 拓 (HIRATA TAKU)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号：60372918

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし