

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390044

研究課題名(和文)

新規脳内薬物トランスポーターの機能解析と中枢神経疾患治療への応用

研究課題名(英文)

Analysis of functional significance of a newly discovered brain-specific transporter

研究代表者

中島 晶 (NAKAJIMA AKIRA)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：20419237

研究成果の概要(和文)：

新たに見出された薬物トランスポーターSLC10A4の安定発現細胞を作製し、胆汁酸であるケノデオキシコール酸およびウルソデオキシコール酸の輸送に寄与することを明らかにした。SLC10A4を発現している小脳由来TE671細胞を用い機能解析を行った結果、プロテアーゼであるトロンビンによってタウロコール酸の輸送活性が上昇することを発見し、その基質結合能が既知の胆汁酸トランスポーターに比較して高いことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We have focused on a newly discovered human brain-specific transporter SLC10A4, which is specifically localized in the substantia nigra. Over-expression cell of human SLC10A4 was successfully generated using human HepG2 cell. A low SLC10A4-mediated uptake of bile acids, such as chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid, was observed in the transformant. The expression of SLC10A4 was investigated in various cultured cells using immunoblot analysis. Finally, human brain-derived TE671 (medulloblastoma) cells were found that they had a stable expression of SLC10A4. It was noteworthy finding that the uptake of taurocholic acid was induced by thrombin pretreatment in the TE671 cells and the Km value was higher than that of known sodium taurocholate co-transporting polypeptides, such as ASBT and NTCP. We considered that SLC10A4 was special brain transporter, could be activated and responsible for the uptake of bile acids when blood clotting was occurred following blood vessel damage or tissue injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：トランスポーター、胆汁酸、黒質、in silico

## 1. 研究開始当初の背景

最近、我々の研究グループは胆汁酸輸送能を有する *oatp* 系トランスポーターの脳内ホモログを探索し、新規に脳局在型トランスポーター (SLC10A4: GenBank AY704414, Slc10a4: GenBank AY704415) を単離し、胆汁酸の輸送能を有することを確認した。さらに、ノザンプロテオミクスにてその局在を検討したところ、脳内ドーパミン支配領域である脳黒質に特異的に局在することを明らかにした。本部位の神経細胞の減少や神経変性は、難病指定疾患であるパーキンソン病やハンチントン病、統合失調病のモデルとされる覚醒剤精神病の原因となることが知られている。しかし、その発症機序として MPTP 様の神経毒による誘発説や覚醒剤によるシナプス間隙へのドーパミンの放出増加が有力視されているものの、未だ明確な説明はなされていない。一方、後藤等は、これまで否定的と考えられていた脳内胆汁酸の存在を証明し (*J Lipid Res.* 45:295,2004)、胆汁酸の脳内生理機能への関与を示している。以上の知見は、胆汁酸トランスポーターの脳内存在は、脳内に胆汁酸が合目的に輸送されることを示し、胆汁酸の中枢における新たな生理活性と、その輸送制御による活性制御の可能性を示すものである。そればかりか、その生理活性はパーキンソン病や統合失調症と関連する可能性をも予想させた。

## 2. 研究の目的

本研究は新たに見出された脳黒質に局在する薬物トランスポーターを取り上げ、その機能を解析し、その病態との関連を明らかにすることによって、脳機能に及ぼす胆汁酸およびその輸送機構の役割を、さらには機能制御による神経精神疾患の予防と治療の方策確立の基盤とすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 薬物トランスポーター SLC10A4 の輸送基質の探索

SLC10A4 の機能解析を行うため SLC10A4 発現ベクターを作製し、培養細胞 (MDCKII、CHO-K1) に遺伝子導入を行うことで SLC10A4 安定発現株を樹立した。樹立した発現細胞株を用いて輸送基質の探索を行った。

### (2) SLC10A4 および OATP1B3 (既知の胆汁酸トランスポーター) の定量系の開発

SLC10A4: LC/MS/MS を用い、4 種のトリプシン消化ペプチド配列 (1: SLLVTLVLF: 1102.70, 552.40 [M+2H]<sup>2+</sup>→726.7, 807.4 ; 2: QSAEAGIF: 821.39, 411.70 [M+2H]<sup>2+</sup>→639.2, 657.6 ; 3: DTPLNHGLNVF: 1225.61,

613.70 [M+2H]<sup>2+</sup>→441.1, 1329.8 ; 4: DPLDEDTDISYK: 1653.69, 827.75 [M+2H]<sup>2+</sup>→441.1, 1329.8) を選択した。OATP1B3: ISITQIER: 480.28→646.3, 759.3, 846.3 を選択した。IS として、GAPDH の VIPELNKG を設計した。

### (3) *in silico* 解析

GEO 登録情報を利用した *in silico* 解析を行った。

### (4) 培養細胞を用いた機能解析

各種培養細胞における SLC10A4 発現状態を検討し、安定に SLC10A4 を発現している細胞の探索を行った。

### (5) (6) ヒト小脳由来 TE6771 細胞を用いた SLC10A4 の機能解析

TE671 細胞を用いて、SLC10A4 の機能解析を行った。タウロコール酸は、安定同位体元素標識タウロコール酸 (d4) を内部標準物質として LC/MS/MS により定量した。

### (7) プロテオーム解析による *in vitro* 評価系の開発

培養細胞を用いて、網羅的にタンパク質発現を解析する評価系を開発した。測定には微量高速液体クロマトグラフを接続したリニアイオントラップ/フーリエ変換型ハイブリッド質量分析装置を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 薬物トランスポーター SLC10A4 の輸送基質の探索

胆汁酸、抱合ステロイド、甲状腺ホルモン、プロスタノイド、また本トランスポーターは黒質に局在することからドーパミンの取り込みを検討したところ、胆汁酸であるケノデオキシコール酸およびウルソデオキシコール酸の輸送が観察された。しかしそのコントロール細胞 (エンブティベクター導入) に対する取り込み比は 1.3~1.8 倍程度と低いものであった。この理由として発現量が低いことが考えられたため、アデノウイルス発現系の構築を行うこととした。SLC10A4 遺伝子を挿入したコスミドベクターを作製し、SLC10A4 遺伝子発現ウイルスを調製した後、HepG2 細胞をはじめとする数種の培養細胞に感染させて機能解析を試みた。しかしながら、ケノデオキシコール酸の取り込み比は、安定発現細胞と同程度であった。

以上の結果より、脳黒質に局在する SLC10A4 は、胆汁酸の輸送に関与することが明らかとなった。

## (2) SLC10A4 の定量系の開発

はじめに LC 条件を検討し、標品ペプチドを用いて 1 fmol~10 pmol までの検量線を作成した。続いて、試料の前処理方法 (SDS 補助消化法、MeOH 補助消化法、ゲル内消化法、チューブゲル消化法、in-solution 法、modified in-solution 法、stage-tip 法) について種々検討した結果、modified in-solution 法を基本とすることとした。しかしながら、回収率に問題があることから、ペプチド修飾化蛋白質を IS とする新規測定法の検討を行った。

## (3) *in silico* 解析

*in silico* による機能解析も有用であることが知られてきたが、SLC10A4 の発現プロファイル情報は、NCBI の GEO に 443 登録されていた。その中で注目すべき情報として、パーキンソン病患者剖検脳の黒質 (PD) プロファイル (GDS2821) およびハンチントン病患者血液試料プロファイル (GDS1332) から、slc10a4 発現が発症により減少傾向にあることを確認した。

本研究成果は、脳内における SLC10A4 および胆汁酸の役割・機能を解明する上で重要な手がかりになるものと考えられる。

## (4) 培養細胞における発現解析

*In vitro* で継代可能な培養細胞における SLC10A4 の発現について検討したところ、ヒト小脳由来 TE671 細胞で安定に発現していることをウエスタンブロット法によって見出した。本研究成果は、SLC10A4 の機能解析を詳細に検討する上で重要な発見であると考えられる。

## (5) ヒト小脳由来 TE671 細胞を用いた SLC10A4 の機能解析：プロテアーゼ活性化トランスポーターの発見

SLC10A4 は、構造から胆汁酸トランスポーターファミリーに分類され、ヒトまたはラットにおいて主に黒質、小脳、脳幹、胎盤、小腸、コリン作動性神経に発現しているが機能は明かではない。しかしながら、(1) の研究成果より、SLC10A4 を強制発現させた細胞における胆汁酸の取り込み活性は期待したほど高いものではなかった。その理由を探るため、SLC10A と SLC10A1、SLC10A2、SLC10A3、SLC10A4、SLC10A5、SLC10A6、SLC10A7 のアミノ酸構造を比較した。その結果、N 末長の違いを見出した。すなわち、取り込む基質が既知である SLC10A1、SLC10A2、SLC10A6 に比べて、基質の明らかになっていない SLC10A3、SLC10A4、SLC10A5 の方が、細胞外にあると推定される N 末側の構造が長いことを見出した。

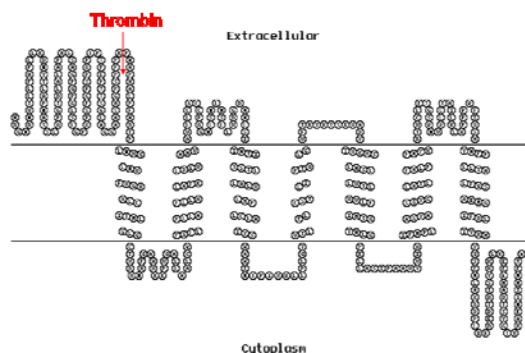


図1 SLC10A4 推定二次構造

SLC10A4 の N 末側の構造を精査したところ、プロテアーゼであるトロンビンの切断部位構造を有することを見出した (図1)。

そこで、トロンビン処置したヒト小脳由来 TE671 細胞における胆汁酸輸送能の変化を検討した結果、トロンビン処置後のタウロコール酸細胞内輸送能は、未処置細胞に比較してタウロコール酸濃度依存的に上昇し、また飽和化現象が認められた (図2)。今回の輸送能は Eadie-Hofstee プロットより、Km が 1.76 nM、Vmax が 38.7 pg/mg protein・min と求められ、既知の胆汁酸トランスポーターに比較して基質結合能が高いことが示された。

以上より、ヒト小脳由来 TE671 細胞にプロテアーゼによって活性化される胆汁酸トランスポート活性を見出すことに成功した。

血液凝固系に代表される様に、プロテアーゼによる生体内生理機能制御は古くから知られている。近年、Vellani らは GPCR (G タンパク質共役型受容体) であるプロテアーゼ活性化受容体 (PAR1-4) が、細胞障害や血液凝固により放出されるプロテアーゼで活性化され、痛みや痛覚過敏の進展に関与していることを示している (*Molecular Pain*, 2010, 6: 61)。例えば、PAR1、PAR3 及び PAR4 は、トロンビンで活性化される (Vergnolle et al., *TRENDS Pharmacol. Sci.*, 2001, 22: 146)。すなわち、トロンビンは血管障害や組織障害による血液凝固によって放出され、一次知覚神経終末に発現する PAR1 を活性化し、末梢神経障害の病態発現に関与している。一方、胆汁酸は、タンパク質溶解作用を持ち、神経軸索を溶かすことが知られている。従って、トロンビンによって胆汁酸の取り込みが増加することを発見した本研究成果は、脳内における胆汁酸の役割と病態との関係を解明する上で非常に重要であると考えられる。

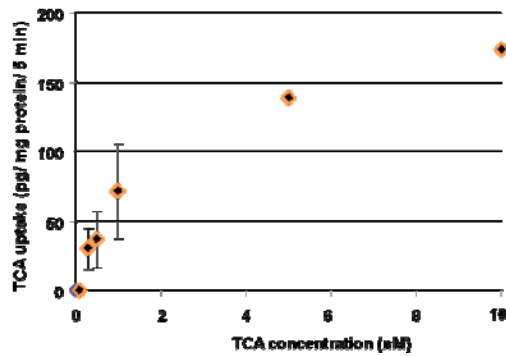


図2 トロピン処理 TE671 細胞のタウロコール酸濃度依存的取り込み

(6) ヒト小脳由来 TE671 細胞を用いた SLC10A4 の機能解析：タウロコール酸輸送への糖鎖の影響

MDR1 の細胞外ループでは N-グリコシル化が起こることが知られ、それにより P-糖タンパク質の機能は影響されないことが報告されている。そこで、そこで、N-グリコシダーゼあるいは O-グリコシダーゼ処置したヒト小脳由来 TE671 細胞における胆汁酸輸送能の変化を検討した。

表1 各処置後の TE671 細胞におけるタウロコール酸の取り込み

添加量 (nM)	対照 *(pg/5 min)	0.5U トロピン *	0.25 mU O-グリコシダーゼ *	0.25 mU N-グリコシダーゼ *
0	3.8			
0.3	4.1 ± 0.4	5.5 ± 0.6	39.4 ± 7.3	83.6 ± 21.9
1.0	5.4 ± 4.8	9.0 ± 0.9	27.9 ± 0.4	80.4 ± 11.9
3.0	5.7 ± 0.5	10.4 ± 1.2	33.7 ± 5.5	73.5 ± 3.7

その結果、グリコシダーゼ処置により、TE671 細胞からのタウロコール酸の検出量が対照に比較して 5.2~20.4 倍に増加することが示された。

Mochizuki らは、胆汁酸トランスポーターの一つである ABCB11 の輸送活性発現には N-グリカン構造が必要であることを示している (*Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 2007, 292: G818)。図3には、SLC10A4 の N 末側細胞外ループ中の推定 N-あるいは O-グリコシル化部位を示しているが、グリコシダーゼ処理により胆汁酸の輸送能が上昇するとすれば、新規の活性化機序の発見であると考えられる。

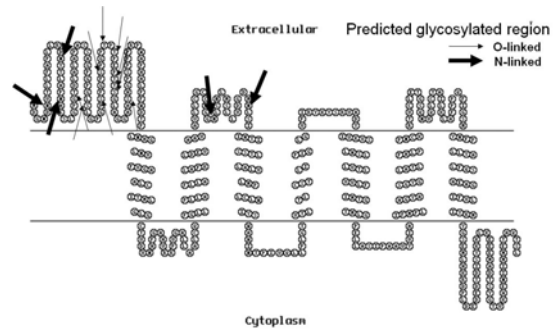


図3 SLC10A4 細胞外ループ推定糖付加部位

(7) プロテオーム解析による *in vitro* 評価系の開発

SLC10A4 発現細胞の分子変動を探索する目的でプロテオーム解析法を選択し、はじめに培養細胞膜画分のタンパク質発現を評価する測定系の開発を行った。プロテオーム解析には、大別して二次元電気泳動法と LC/MS 法があるが、我々は最新式の微量高速液体クロマトグラフィーリニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析装置 (LC-MS) を利用した。その結果、試料の前処理法を NTCB/Lys-C/トリプシン消化法と LC-MS を駆使することにより、解析対象タンパク質数が 4,800 個を超える評価系の開発に成功した (表2)。本データをタンパク質データベースの一つである MASCOT 検索を行った結果、4,078 個 (検出したタンパク質 4,803 個の約 85%) のタンパク質を同定した。

本研究成果は、SLC10A4 の機能制御による神経精神疾患のタンパク質レベルでの解析を行うための重要な基盤研究となると考えられる。

表2 培養細胞系で同定したタンパク質数

細胞	画分	試料数	タンパク質数	同定したタンパク質数
A	膜	3	3,487	2,883
	可溶性1	6	2,582	2,078
	可溶性2	6	2,815	2,231
	*膜+可溶性	15	4,803	4,078

\*膜画分および可溶性画分の結果を合わせて、タンパク質同定数を整理した結果。

我々は新たに見出された脳黒質に局在する薬物トランスポーター SLC10A4 を取り上げ、SLC10A4 安定発現細胞を作製し、弱いながらも胆汁酸であるケノデオキシコール酸およびウルソデオキシコール酸の輸送に寄与することを明らかにした。SLC10A4 の機能を検討するために、各種培養細胞における SLC10A4 発現状態を検討し、ヒト小脳由来 TE671 細胞において安定に発現していること

を見出した。TE671 細胞を用い機能解析を行った結果、プロテアーゼの一つであるトロンビンによってタウロコール酸の輸送活性が上昇することを発見し、その基質結合能が既知の胆汁酸トランスポーターに比較して高いことが明らかになった。トロンビンが細胞障害や血液凝固系の活性化により放出されるプロテアーゼであることを鑑み、脳における血管障害等と脳黒質等における組織障害の進展にプロテアーゼによるトランスポーターの活性化が関与している可能性を提示し、新しい病態発症機序解明のための基盤となったと考える。以上のことより本研究結果は、神経精神疾患の予防と治療の方策確立の基盤となることも期待される。

#### 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 13 件)

1. Saigusa D, Suzuki N, Takahashi M, Shiba K, Tanaka S, Abe T, Hishinuma T, Tomioka Y. Simultaneous determination of guanidinosuccinic acid and guanidinoacetic acid in urine using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. (2010) 677:169-75. 査読有
  2. Nakajima A, Saigusa D, Tetsu N, Yamakuni T, Tomioka Y, Hishinuma T. Neurobehavioral effects of tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant, in mice. *Toxicol Lett*. (2009) 189:78-83. 査読有
  3. Kaneko I, Suzuki K, Matsuo K, Kumagai H, Owada Y, Noguchi N, Hishinuma T, Ono M. Cysteinyl leukotrienes enhance the degranulation of bone marrow-derived mast cells through the autocrine mechanism. *Tohoku J Exp Med*. (2009) 217:185-91. 査読有
  4. Munakata M, Nishikawa M, Togashi N, Nio E, Kobayashi Y, Omura K, Haginoya K, Tanaka S, Abe T, Hishinuma T, Chida N, Tsuchiya S, Onuma A. The nutrient formula containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid benefits the fatty acid status of patients receiving long-term enteral nutrition. *Tohoku J Exp Med*. (2009) 217:23-8. 査読有
  5. Hishinuma T, Suzuki K, Yamaguchi H, Yamagishi H, Koike T, Ohara S, Shimosegawa T, Mano N, Goto J. Simple quantification of lansoprazole and rabeprazole concentrations in human serum by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. (2008) 870:38-45. 査読有
- [学会発表] (計 34 件)
1. 阿部拓哉ら、胆汁酸トランスポーター SLC10A4 の機能解析、日本薬学会第 132 年会、平成 23 年 3 月 28 日～31 日、札幌
  2. 阿部拓哉ら、ヒト小脳由来 TE671 細胞におけるプロテアーゼ活性化トランスポーターの機能解析、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月 28 日～31 日、静岡 (要旨集)
  3. 金光祥臣ら、LC/MS/MS を用いた OATP1B3 の絶対定量と過剰発現細胞のプロテオーム解析、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月 28 日～31 日、静岡 (要旨集)
  4. 三枝大輔ら、HPLC/PDA 法を用いた体内動態解析による抗アルツハイマー病天然薬物ノビレチンの脳内移行の証明、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月 28 日～31 日、静岡 (要旨集)
  5. 陣野大輔ら、ZIC-HILIC カラムを用いたロイコボリン及びメトトレキサートの分離分析系の構築、第 49 回日本薬学会東北支部大会、平成 22 年 10 月 24 日、郡山
  6. 松本周平ら、アコニット酸関連物質の高感度定量系の確立、第 49 回日本薬学会東北支部大会、平成 22 年 10 月 24 日、郡山
  7. 三枝大輔ら、Guanidinosuccinic acid 及び関連化合物の LC/MS/MS を用いた定量系の確立、第 48 回日本薬学会東北支部大会、平成 21 年 10 月 18 日、仙台
  8. 三枝大輔ら、新生児マウスにおける tetrabromobisphenol A 投与による行動変化及び脳蓄積性に対する定量的解

析、日本薬学会第 129 年会、平成 21  
年 3 月 26 日～28 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 晶 (NAKAJIMA AKIRA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師  
研究者番号：20419237  
(H20-H23)

菱沼 隆則 (HISHINUMA TAKANORI)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：20199003  
(H20 研究代表者)

(2) 研究分担者

眞野 成康 (MANO NARIYASU)  
東北大学病院・教授  
研究者番号：50323035  
(H20-H23)

富岡 佳久 (TOMIOKA YOSHIHISA)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：00282062  
(H21-H23)

山口 浩明 (YAMAGUCHI HIROAKI)  
東北大学病院・助教  
研究者番号：80400373  
(H20)

(3) 連携研究者

なし