

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32305

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22719

研究課題名(和文)炎症性の難病を制御するプロスタグランジン輸送体の細胞内局在制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of subcellular localization of the prostaglandin transporter

研究代表者

中村 吉伸(Nakamura, Yoshinobu)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：60880317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタグランジン(PG)膜輸送体SLC02A1はPG作用調節に重要な役割を果たし、その機能喪失は肥厚性皮膚骨膜症(PDP)と非特異性多発性小腸潰瘍(CEAS)の2つ難病の原因となる。我々は、SLC02A1が細胞種によって細胞膜と細胞内小胞の異なる局在を示し、その局在の違いによりPG作用を「減弱」と「増強」の相反する方向に調節することを発見したが、その局在制御機構は不明であった。本研究では、翻訳後修飾であるN型糖鎖修飾がSLC02A1の細胞膜発現量を調節する局在制御因子の一つであることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDPとCEASはいずれも有効な治療法がない指定難病である。どちらもSLC02A1が原因遺伝子として同定されているが、SLC02A1の機能喪失によって病態が形成される仕組みは十分に解明されていない。本研究成果であるN型糖鎖がSLC02A1の細胞内局在を調節するという発見は、種々の細胞に幅広く発現するSLC02A1の生理的役割を理解する上で重要な知見であり、将来的にPDPとCEASの病態解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Prostaglandin (PG) transporter SLC02A1 plays an important role in the regulation of PG actions. Its loss of function is responsible for two refractory diseases, pachydermoperiostosis (PDP) and chronic enteropathy associated with SLC02A1 (CEAS). We found that SLC02A1 localizes differently at the plasma membrane and/or intracellular vesicles depending on the cell types. This differential localization modulates PG actions in opposite directions, "attenuated" and "enhanced," however the mechanisms of subcellular localization of SLC02A1 remain unclear. In this study, we found that N-glycosylation, a post-translational modification, is one of the localization regulators that modulates the plasma membrane expression levels of SLC02A1.

研究分野：薬物動態学、薬理学

キーワード：SLC02A1 プロスタグランジン N型糖鎖修飾 細胞内局在

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肥厚性皮膚骨膜炎(PDP)と非特異性多発性小腸潰瘍(CEAS)は、有効な治療法がない遺伝性の難病であり、その病態解明と治療法の開発が望まれている。両難病の原因遺伝子である *Solute carrier organic anion transporter family member 2A1* (SLCO2A1)は炎症制御に関わる生理活性脂質プロスタグランジン E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)を輸送するトランスポーターであり、細胞外 PGE<sub>2</sub>の細胞内取込みに働く。取込まれた PGE<sub>2</sub>は速やかに PG 代謝酵素 HPGD によって分解される。したがって、SLCO2A1 は PGE<sub>2</sub>の作用終結に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、SLCO2A1 の機能喪失によって難病の病態が形成される仕組みはよく分かっていない。

両難病の病態形成機序は異なり、PDP は①SLCO2A1 のみならず HPGD 機能喪失でも発症すること、②PG 合成酵素 COX-2 選択的阻害薬の投与で症状が改善することから体内の過剰な PGE<sub>2</sub>が原因と考えられている。一方、CEAS は①HPGD 機能喪失で発症しないこと、②病理所見が PGE<sub>2</sub> 欠乏を原因とする薬剤性消化管潰瘍と類似することから、PDP とは逆に PGE<sub>2</sub>の欠乏が原因と予想されている。しかし、この欠乏は従来の SLCO2A1 の PGE<sub>2</sub> 取込み機能だけでは合理的に説明できない。

我々は、これまでにマクロファージや大腸がん細胞など一部の細胞では、SLCO2A1 が細胞膜でなくリソソームなどの細胞内小胞に発現し、合成された PGE<sub>2</sub> の小胞内取込みに働くことで PGE<sub>2</sub> の開口分泌に寄与することを見出した(*Biochem Pharmacol*, **98**:629-638, 2015; *Exp Cell Res*, **341**:123-131, 2016)。またこうした SLCO2A1 を介した PGE<sub>2</sub> 分泌が発熱応答を調節すること(*J Neurosci*, **38**:5584-5595, 2018)、さらにマクロファージ特異的 *Slco2a1* 欠損マウスでは薬剤誘発性の消化管炎症が増悪することを見出してきた(*Sci Rep*, **10**:4883, 2020)。これらの知見から、細胞内の発現部位の違いによって SLCO2A1 は PGE<sub>2</sub> 作用の「減弱」と「増強」の相反する役割を担うこと、またこの役割の違いによって CEAS と PDP の病態形成原因の違いを説明できる可能性があることが分かってきた。しかし、細胞種によって SLCO2A1 の細胞内局在が異なる理由は不明である。そこで現在、SLCO2A1 の細胞内局在制御メカニズムを明らかにすべく研究を行っている。

### 2. 研究の目的

研究開始時点において SLCO2A1 の複数のアイソフォームや、特定の細胞内小器官に局在に必要なアミノ酸配列、および足場タンパク質等は見つかっていなかったため、翻訳後修飾が細胞内局在を制御しているのではないかと考えた。N 型糖鎖修飾はアスパラギン残基に糖鎖が付加される翻訳後修飾であり、トランスポーターを含む多くの膜タンパク質の細胞内局在や活性調節に関わる。これまでに、SLCO2A1 と同じ SLCO スーパーファミリーであるヒト SLCO1B1 およびラット *Slco1a1* において N 型糖鎖が細胞内局在と基質の輸送活性を調節することが報告されている。そこで本研究では SLCO2A1 の細胞内局在調節因子の候補として糖鎖に着目し、N 型糖鎖が SLCO2A1 の局在と機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) SLCO2A1 に付加する N 型糖鎖の特徴

ヒト SLCO2A1 強制発現細胞、およびマウス臓器およびから抽出したタンパク質をグリコシダーゼで処理した後、ウェスタンブロットにより SLCO2A1 に付加している N 型糖鎖の分子サイズを検討した。

#### (2) N 型糖鎖修飾部位の同定

N 型糖鎖修飾部予測サイト NetNGlyc-1.0 により得られた予測アスパラギン残基(N)を糖鎖が付加されないグルタミン(Q)に置換した SLCO2A1 変異体発現細胞を作製し、ウェスタンブロットにより N 型糖鎖修飾部位の同定を行った。

#### (3) N 型糖鎖が SLCO2A1 の輸送活性および細胞内局在に及ぼす影響

野生型および糖鎖変異型 SLCO2A1 発現細胞を用いて、輸送活性は基質 PGE<sub>2</sub> 同位体(PGE<sub>2</sub>-d4)および 6-carboxyfluorescein(6-CF)の細胞内取込み試験により、細胞内局在は免疫細胞染色および細胞膜画分を用いたウェスタンブロットにより検討した。

### 4. 研究成果

まず SLCO2A1 に N 型糖鎖が修飾されていることを調べるため、ヒト野生型 SLCO2A1 強制発現 HEK293 細胞(WT)の抽出タンパク質について抗 SLCO2A1 抗体を用いたウェスタンブロッ

トを行った。その結果、SLCO2A1 由来のバンドは 70 kDa 付近に観察され、マンノース型糖鎖を切断する Endoglycosidase H(Endo H)、および複合型糖鎖を切断する Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) を処理することによって、バンドは 70 kDa から 50 kDa 付近にシフトした (図 1)。また、このバンドの移動は糖鎖付加酵素阻害薬 Tunicamycin の処置 (1  $\mu$ g/mL, 48 hr) によっても観察された。さらに、マウス肺、腎臓、および脾臓においても 70 kDa 付近に Slco2a1 由来のバンドが観察され、いずれも PNGase F 処理によって 50 kDa 程度にシフトした。したがって、SLCO2A1 には計 20 kDa 相当のマンノース型および複合型糖鎖が結合していることが示唆された。

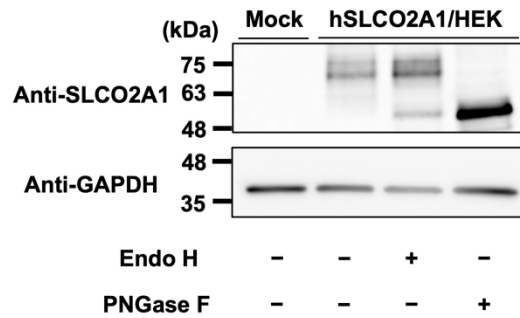


図1 グリコシダーゼ処置によるSLCO2A1の分子サイズ変化

次に、N 型糖鎖が付加するアスパラギン残基を特定するため、NetNGlyc-1.0 により N 型糖鎖修飾が予測された N134、N478、および N491 の 3 ヶ所をグルタミン(Q)に置換した変異体発現 HEK293 細胞を作製し、ウェスタンブロットにより SLCO2A1 の分子量を調べた。各変異によって分子量の低下が観察され、特に三重変異体(TM)では 50 kDa 付近にバンドが観察され、最も小さい分子量となった (図 2)。また、TM に対し Endo H 及び PNGase F を処置したところ、処置前後で分子量に変化はなかった。これらの結果から、SLCO2A1 の N134、N478、および N491 の 3 箇所に N 型糖鎖が付加され、他の部位には付加されていないことが示された。

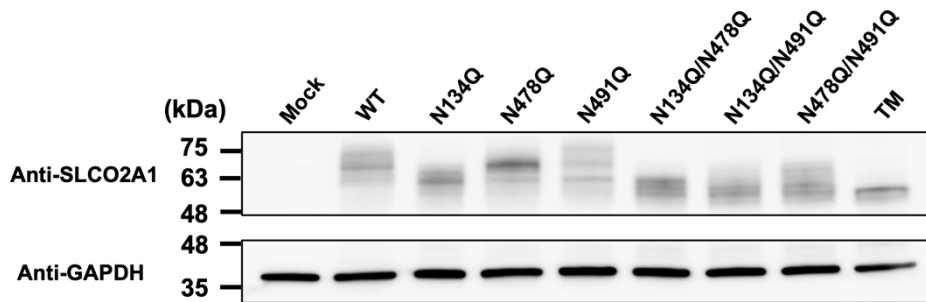


図2 各種N型糖鎖変異体におけるSLCO2A1の分子サイズ

N 型糖鎖修飾部位の変異が SLCO2A1 の基質取込みに及ぼす影響を調べたところ、N478Q を除く他の全ての変異で PGE<sub>2</sub>-d4 および 6-CF の取込み活性が WT より低く、特に TM における PGE<sub>2</sub>-d4、6-CF 取込み活性はそれぞれ WT の 15% および 18% まで低下した。一方、WT-TM 間で細胞全体における SLCO2A1 発現量に有意な差はなく、PGE<sub>2</sub> に対する親和性についても顕著な変化はなかった。したがって、変異による SLCO2A1 取込み活性の低下は細胞膜上の発現量変化に起因する可能性が考えられた。

そこで次に、SLCO2A1 と Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase(細胞膜マーカー)の免疫細胞共染色により細胞膜上の SLCO2A1 発現陽性率を検討したところ、WT に比べて TM で約 4 割の有意な低下が観察された。また、WT および TM から Abcam 社の Plasma Membrane Protein Extraction Kit を用いて細胞膜面分を単離し、ウェスタンブロットを行ったところ、TM の細胞膜上の SLCO2A1 発現量は WT の 4 分の 1 まで有意に低下していた。したがって、TM における基質取込み活性の低下は、細胞膜上の SLCO2A1 発現量の低下による可能性が高いと考えられた。また、N 型糖鎖修飾部位の変異による SLCO2A1 バンドサイズの変化と PGE<sub>2</sub> 取込み活性の低下は HEK293 のみならず HepG2 や A549 など他の細胞でも観察された。以上の結果より、N 型糖鎖は SLCO2A1 の細胞膜発現量を調節する局在制御因子の一つであることが見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Nakamura Yoshinobu, Kozakai Hina, Nishio Tsubura, Yoshida Kazuki, Nakanishi Takeo	4. 巻 44
2. 論文標題 Phenolsulfonphthalein as a surrogate substrate to assess altered function of the prostaglandin transporter SLC02A1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100452 ~ 100452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2022.100452	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Nakanishi Takeo, Nakamura Yoshinobu, Umeno Junji	4. 巻 223
2. 論文標題 Recent advances in studies of SLC02A1 as a key regulator of the delivery of prostaglandins to their sites of action	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 107803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pharmthera.2021.107803	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 -

1. 著者名 Nakanishi Takeo, Sakiyama Shiori, Takashima Hiroki, Honda Ryokichi, Shumba Melody N., Nakamura Yoshinobu, Kasahara Kazuo, Tamai Ikumi	4. 巻 405
2. 論文標題 Toxicological implication of prostaglandin transporter SLC02A1 inhibition by cigarette smoke in exacerbation of lung inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2020.115201	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川田 日向子, 中村 吉伸, 相澤 千里, 中西, 猛夫
2. 発表標題 プロスタグランジン膜輸送体SLC02A1におけるN型糖鎖の役割
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西尾 円来, 中村 吉伸, 小酒井 陽奈, 吉田 一貴, 中西, 猛夫
2. 発表標題 フェノールスルホンフタレインを用いたプロスタグランジン膜輸送体SLC02A1機能評価
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 吉伸, 伊藤 政明, 岡田 俊昭, 岡田 泰伸, 松岡 功, 中西, 猛夫
2. 発表標題 低張性刺激がSLC02A1のプロスタグランジンE2輸送能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 吉伸, 伊藤 政明, 岡田 俊昭, 岡田 泰伸, 松岡 功, 中西, 猛夫
2. 発表標題 低張性刺激がSLC02A1のプロスタグランジンE2輸送及びMaxi-Clチャンネル活性に及ぼす影響
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 吉伸, 小酒井 陽奈, 西尾 円来, 青木 滯士, 中西 猛夫
2. 発表標題 プロスタグランジン膜輸送体SLC02A1の新規基質フェノールレッドの輸送特性解析
3. 学会等名 第36回 日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 吉伸, 中西 猛夫
2. 発表標題 プロスタグランジン膜輸送体SLC02A1による海馬PGD2濃度調節
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 吉伸, 中西 猛夫
2. 発表標題 SLC02A1による脳の領域特異的なプロスタグランジンD2動態制御機構
3. 学会等名 第35回 日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 吉伸, 坂口 貴俊, 中西 猛夫
2. 発表標題 プロスタグランジン膜輸送体SLC02A1による中枢神経系におけるPGD2濃度調節機構
3. 学会等名 第15回 トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中西 猛夫, 中村 吉伸, Melody N. Shumba
2. 発表標題 タバコ煙抽出物がプロスタグランジン膜輸送体SLC02A1に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Melody Shumba, Yoshinobu Nakamura, Takeo Nakanishi
2. 発表標題 Effect of cigarette smoke extract on the function and expression of transporter SLC02A1
3. 学会等名 第5回トランスポーター研究会関東部会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高崎健康福祉大学薬学部 分子動態制御学研究室ウェブページ <a href="https://www.molecularkinetics.org">https://www.molecularkinetics.org</a>
---

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