

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82674

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892030

研究課題名(和文)細胞外へのアスコルビン酸排出を担う輸送体の同定

研究課題名(英文)Identification of transporter excrete ascorbic acid from cell inside

研究代表者

天野 晶子 (AMANO, AKIKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：00737398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンC(アスコルビン酸)は、抗老化作用を持つ必須の栄養素である。マウスなど殆どの哺乳類は肝臓でアスコルビン酸を合成するが、ヒトは合成能を欠損している。ヒトにおけるアスコルビン酸の体内動態は未だ不明な点が多く、特にアスコルビン酸を細胞外に排出する輸送体は同定されていない。本研究では、アスコルビン酸の排出輸送体を探索するため、ヒト大腸がん由来CACO-2細胞およびヒト肝がん由来HepG2細胞を用いて、細胞内アスコルビン酸濃度を最大限高める培養条件を決定した。これらの培養細胞および培養条件を用いることで、細胞内アスコルビン酸の排出を評価し、アスコルビン酸排出輸送体の同定が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Vitamin C (ascorbic acid) is an anti-aging nutrition. Although almost mammals including mouse can synthesize ascorbic acid in the liver, human lacks the ascorbic acid-synthesizing ability. In vivo kinetics of ascorbic acid is not fully understood. Especially, transporter which excretes ascorbic acid from inside to outside in cell has not been identified. In this study, to identify the transporter of ascorbic acid, I determined the optimal culture conditions that increase the intracellular concentration of ascorbic acid at a maximum level in CACO-2 cells from human colon cancer and HepG2 cell line from human hepatocarcinoma. By using these cell lines and culture conditions, we could evaluate the excretion of intracellular ascorbic acid to identify ascorbic acid-excretion transporter.

研究分野：生化学、基礎老化学

キーワード：アスコルビン酸 トランスポーター ビタミン

1. 研究開始当初の背景

加齢指標タンパク質 30(SMP30)は、加齢で減少するタンパク質として発見、同定された。SMP30 は、ビタミンC(アスコルビン酸)生合成に必須の酵素、グルコラクトナーゼ(GNL)である(Kondo Y *et al*, Proc Natl Acad Sci, 2006)。マウスなどほとんどの哺乳類は、肝臓でアスコルビン酸を合成するが、ヒトは合成能を欠いているため、体外からアスコルビン酸を摂取する必要がある。また、私たちが開発した SMP30/GNL ノックアウト(KO)マウスは、ヒトと同様にアスコルビン酸を合成できない。

アスコルビン酸は、2 段階の酸化反応により 2 電子を供与する水溶性の強力な抗酸化物質である。これまでに私たちは、アスコルビン酸が不足した SMP30/GNL KO マウスの脳では、活性酸素種が顕著に増加することを明らかにした(Kondo Y, Sasaki T, Sato Y, Amano A *et al*, Biochem Biophys Res Commun, 2008)。さらに、長期間アスコルビン酸が不足した SMP30/GNL KO マウスは、平均寿命が短縮し(Ishigami A *et al*, Biochem Biophys Res Commun, 2004)、早期に加齢性難聴を引き起こす(Kashio A, Amano A, *et al*, Biochem Biophys Res Commun, 2009)ことを報告した。このように、アスコルビン酸は生体に必須の栄養素であり、老化とも密接な関係が窺える。

アスコルビン酸は 2 電子を供与した後、デヒドロアスコルビン酸となる。生体では 9 割以上がアスコルビン酸として存在しており、アスコルビン酸濃度は臓器ごとに異なる。しかし生体内におけ

るアスコルビン酸の体内動態は、未だ不明な点が多い。細胞内のアスコルビン酸濃度は、合成(ヒト以外の主に肝実質細胞)、取込み、消費や分解、排出のバランスで成り立つと考えられる。細胞外のアスコルビン酸は、特異的輸送体である Sodium -dependent vitamin C transporter (SVCT)1 および SVCT2 により、デヒドロアスコルビン酸はグルコーストランスポーター (GLUT)1、GLUT 3 および GLUT 4 により、細胞内へ取込まれる。一方、アスコルビン酸の消費や分解を直接定量することは技術的に困難である。また、細胞外へアスコルビン酸を排出する輸送体は現在までに同定されていない。

肝臓の実質細胞は、アスコルビン酸を合成して細胞外へ排出すると考えられる。そこで、アスコルビン酸の細胞レベルでの動態を理解するため、アスコルビン酸を合成できない SMP30/GNL KO マウスの初代培養肝実質細胞を用いて、初めに SVCTs の発言を制御する因子を検討した。その結果、細胞内外のアスコルビン酸濃度は SVCT1 および SVCT2 の 発現制御因子であることを見出した (Amano A. *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 2010)。しかし、SMP30/GNL KO マウスの飼育や初代培養細胞の単離には、多くの時間と労力が必要である。そこで、研究の効率化を図るため、SMP30/GNL KO マウスと、温度感受性ガン遺伝子 (SV40 ラージ T 抗原 tsA58) を全身に発現した Immortomouse を交配し、その交雑仔の肝臓から、SMP30/GNL が欠損した不死化肝実質細胞株の樹立に成功した (Amano A. *et al.*, J. Biochem., 2011)。この細胞はアスコ

ルビン酸合成能を欠くため、細胞内へのアスコルビン酸取込み量と細胞外への排出量を正確に測定することが可能となる。また、培養温度を変えることによりガン遺伝子 tsA58 の発現を誘導し、細胞増殖を制御することができる。

ヒトにおいて経口摂取したアスコルビン酸は、腸管細胞の頂端側から取り込まれて基底膜側に排出されると考えられる。その後、肝実質細胞に一旦取り込まれた後、細胞外に排出され全身に移行すると考えられる。そこで、本研究ではヒトの細胞株を用いて、アスコルビン酸の細胞レベルでの動態を解析した。

2. 研究の目的

アスコルビン酸の細胞レベルでの動態を理解するため、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞およびヒト大腸がん由来 CACO-2 細胞を用いて、アスコルビン酸を細胞外に排出する特異的輸送体の探索を試みた。

3. 研究の方法

アスコルビン酸の排出評価系を確立するためには、一旦細胞内に取り込ませた後、培地中に排出されたアスコルビン酸を測定する必要がある。私たちは、高速液体クロマトグラフィーと電気化学器を用いた細胞内アスコルビン酸の高感度測定系を開発している。そこで、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞およびヒト大腸がん由来 CACO-2 細胞を用いて、アスコルビン酸を最大限細胞に取込ませる培養条件を検討した。即ち、細胞を様々な濃度のアスコルビン酸を含む培地で培養し、経時的に細胞と培養上清を回収した。回収した細胞および培養上清中のアスコルビン酸濃度は、高速液体クロマトグラフィーと電気化学検出器を用いて定量した。

4. 研究成果

HepG2 細胞および CACO-2 細胞を用いて、細胞生存率に影響を与えずに、細胞内アスコルビン酸濃度を最大にする培地中アスコルビン酸濃度および培養時間を決定した。また、アスコルビン酸添加培地(細胞なし)および培養上清中(細胞あり)のアスコルビン酸濃度は、1 時間後には、培養前に比べて半分以下にまで分解が認められた。そこで、一定時間ごとに同濃度の新しい培地へ交換したところ、交換しない場合と比較して高い細胞内アスコルビン酸濃度を得られることが分かった。これらの培養細胞および培養条件を用いることで、細胞内アスコルビン酸の排出を評価、アスコルビン酸排出輸送体の同定が可能となる。

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. Nishijima, K., Ohno, T., Amano, A., Kishimoto, Y., Kondo, Y., Ishigami, A., Tanaka, S. : Bone Degeneration and Its Recovery in SMP30/ GNL - Knockout Mice. J. Nutr. Health Aging (2016) (in press) 査読有
2. Amano, A., Tsunoda, M., Aigaki, T., Maruyama, N., Ishigami, A. : Effect of ascorbic acid deficiency on catecholamine synthesis in adrenal glands of SMP30/GNL knockout mice. Eur. J. Nutr. 53, 177-185 (2014) 査読有

3. Sato, Y., Amano, A., Kishimoto, Y., Takahashi, K., Handa, S., Maruyama, N., Ishigami, A. : Ascorbic acid prevents protein oxidation in livers of SMP30/GNL knockout mice. Geriatr. Gerontol. Int. 14, 989-95 (2014) 査読有

〔学会発表〕(計1件)

1. 天野晶子、ビタミンCのもつ生体内での多様な働きと輸送機構の解析、首都大バイオコンファレンス、2015年11月6日、首都大学東京（東京都八王子市南大沢）

6. 研究組織

(1)研究代表者

天野 晶子 (AMANO AKIKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号:007377398