

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15000

研究課題名(和文)膜輸送体による食後過血糖抑制機構の解明と過血糖抑制に働く新規生体内基質の探索

研究課題名(英文) Mechanism of postprandial hyperglycemia due to transporter gene knockout and identification of endogenous substrates

研究代表者

加藤 将夫 (KATO, YUKIO)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：30251440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、生体内のほぼすべての臓器に存在し、主に有機カチオン性化合物を認識して細胞内に取り込む膜輸送体 solute carrier について、その生体内での役割を解明する目的で、遺伝子欠損マウスを作製した。メタボローム解析を行ったところ、絶食時の小腸組織において糖新生の変化を示唆するデータを得た。その詳細な分子機構は不明であるが、新たな血糖調節機構や糖尿病をはじめとする代謝性疾患の病態解明につながる可能性がある。そこで、本研究では糖代謝のどこにOCTN1が関与するかを解明するとともに、その生体内基質の探索を目的とした。

研究成果の概要(英文)：We have previously established gene knockout mice for the solute carrier membrane transporter which is expressed in ubiquitous organs and mainly accepts organic cations as substrates. Our previous metabolome analyses using both wild-type and knockout mice have suggested possible change in glucose metabolism in the body due to the gene knockout. Identification of the molecular mechanism may lead to clarifying the regulatory mechanism for glucose homeostasis and diabetics. Therefore, the aim of the present study is to clarify the role of this transporter in glucose metabolism and to identify its endogenous substrates.

研究分野：薬物動態学

キーワード：膜輸送体 ブドウ糖 ミトコンドリア メタボローム 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

Carnitine/organic cation transporter 1 (OCTN1)は、SLC22A family に属する膜輸送体であり、12 回膜貫通領域を持ち、551 アミノ酸から構成されている(Tamai et al. 1997)。ヒトでは肝臓、腎臓、骨髄をはじめ、生体内にユビキタスに発現している。OCTN1 は in vitro において tetraethylammonium、quinidine、pyliramine などの様々な有機カチオンを認識することが報告されているほか、carnitine や ergothioneine (ERGO)、acetylcholine など内因性及び生体内基質も認識する(Yabuuchi et al. 1999; Peltekova et al., 2004; Grundemman et al., 2005; Pochini et al., 2012)。これらの中で ERGO は、遺伝子発現系を用いた in vitro の解析により OCTN1 の良好な基質であることが報告されている(Grundemman et al., 2005)。しかし、OCTN1 の生理的な役割は未だほとんど解明されていない。

細胞の生存や成長には、エネルギーや生体内物質の合成などに働く代謝経路が必要不可欠である。細胞の主なエネルギー源はグルコースであり、その分解の経路を解糖という。解糖は、グルコース 1 分子が 10 段階の酵素反応によって炭素 3 個のピルビン酸 2 分子に分解され、その過程で 2 分子の ATP を産生する。ピルビン酸は CO₂ とアセチル CoA に酸化され、それを再びエネルギー産生に使用するのが Tricarboxylic acid (TCA)回路である。TCA 回路は糖、脂質、アミノ酸などからエネルギーを回収する。絶食時、肝臓が貯蔵グリコーゲンを使い果たしたときは、解糖生成物の乳酸やピルビン酸、TCA 回路中間体、多くのアミノ酸骨格などから TCA 回路を経てグルコースが合成される(糖新生)。グルコースの血中濃度(血糖)は、膵β細胞から分泌されるインスリンによって制御されるが、それがうまく機能しなくなると高血糖となる。高すぎる血糖は細胞毒であるため、糖代謝を改善し高血糖を治療することが生命機能の維持に重要である。

我々は、OCTN1 の生理的役割の解明のため、*octn1* 遺伝子欠損マウス(*octn1*^{-/-})を作製し、その絶食時の小腸組織をメタボローム解析したところ(Kato et al., 2010)、*octn1*^{-/-}において wild-type と比較して 9 種のアミノ酸と、TCA 回路の一部の基質濃度が高かった。これより、絶食時に組織中で起こる糖新生への OCTN1 の関与の可能性が考えられた。OCTN1 は膜輸送体であるため糖代謝物や糖代謝酵素の補酵素を輸送するとも考えられるが、そのような報告はなく、糖代謝のどこに関係するかは不明である。

2. 研究の目的

本研究は糖代謝に及ぼす OCTN1 の関与を解明することを目的とした。本研究により、新たな血糖調節機構や糖尿病をはじめとする代謝性疾患の病態解明につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 試薬および実験動物

Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM)、poly-L-lysine、geneticin、超脱水アセトニトリルは和光純薬(Osaka, Japan)より、BioRad protein assay kit は BioRad laboratories (Hercules, CA, USA)より購入した。これら以外の試薬はすべて市販試薬特級以上を用いた。

HEK293 細胞の培養

HEK293 細胞は 10 % FBS 含有 DMEM 培地 (44 mM sodium pyruvate, 100 U/mL peniciline G, 100 μg/mL streptomycin)に懸濁し、10 cm dish に播き、37 °C、5 % CO₂ インキュベーター (Hirasawa, Tokyo, Japan)中で培養した。培地をアスピレーターで取り除いた後、5 mL PBS で洗い、0.02 % EDTA 含有 0.1 % trypsin を添加し細胞をはがした。はがした細胞は遠沈管に回収し、遠心後、上清を取り除き培地で懸濁した。HEK293/hOCTN1 細胞は 10 cm dish に 2.0 × 10⁶ cells/ dish、24 well dish には 0.5 × 10⁵ cells/well で細胞懸濁液を播き、HEK293/mock 細胞は 10 cm dish に 2.0 × 10⁶ cells/ dish、24 well dish には 0.5 × 10⁵ cells/well で細胞懸濁液を播いた。OCTN1 安定発現細胞には G418 (1 g/10 mL)を DMEM 培地 10 mL に対して 100 μL 加え、37 °C、5 % CO₂ インキュベーターで培養した。

通常培養と飢餓培養

Poly-L-lysine コートは 100 mg/mL poly-L-lysine を 24 well プレートに 500 μL ずつ加え、15 分室温で放置した後に poly-L-lysine を吸い、PBS 1 mL で 2 回 wash し、30 分以上を乾燥させた後、細胞播種を行った。Poly-L-lysine コートを施した 24 well プレートで 78 時間培養後、回収したサンプルを通常培養とした。細胞播種 60 時間後に培地を吸い、あらかじめ 37 °C に温めておいた 1 mM glucose を含む飢餓培地を 700 μL 入れた後、飢餓培地を吸い新たな飢餓培地を 500 μL 入れ、37 °C、5% CO₂ インキュベーターで 12 時間培養後、培地を吸い、Transport buffer (TB, 123 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM Galactose, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 20 mM HEPES, 4.14 mM NaHCO₃ pH 7.4 with NaOH)を 700 μL 入れた後、4 mM glutamine を含む TB を 1 mL 入れ、6 時間 37 °C でインキュベーションし、氷冷 TB 1 mL を入れて除くことを繰り返し、3 回洗浄した。細胞を風乾した後、蒸留水 150 μL を入れて細胞をセルスクレイパーで剥がし、さらに蒸留水 150 μL を入れて洗いこみをして、超音波処理で細胞を完全に粉砕し、細胞サンプルとした。細胞タンパク質量は BSA を標準とし、常法に従い Protein Assay Kit を用いて測定した。

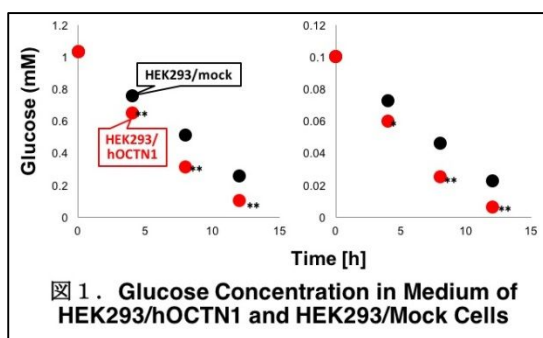
誘導体化

アミノ基特異的に反応する 3-aminopyridyl-N-hydroxysuccinimidyl

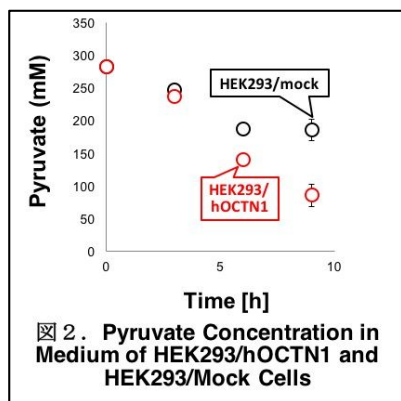
carbamate (APDS, Shimbo et al., 2009)を用い、測定前にアミノ酸を誘導体化し、逆相クロマトグラフィーと ESI-MS/MS を用いることにより定量を行った。

4. 研究の成果

OCTN1 の グルコース代謝に及ぼす役割解明のため、HEK293/hOCTN1 および対照として HEK293/mock に 2 種類の濃度のグルコース添加後の培地中からの消失を追跡した(図1)。両細胞間でグルコース消失に顕著な差はなかったものの、HEK293/OCTN1 の方が若干、消失が早かった(図1)。一方、ガラクトー



スの消失には違いが見られず、グルコース特異的な働きであることが示唆された。グルコースは解糖系によって TCA 回路基質であるピルビン酸にまで代謝される。そこで次に、ピルビン酸についても同様の解析を行ったところ、HEK293/mock に比べ HEK293/hOCTN1 でやや消失が早かった



(図2)。そこで、OCTN1 によるピルビン酸輸送の可能性を考え、両細胞への $[^{14}\text{C}]$ pyruvate の取り込みを観察したが、通常培養条件下および、FCCP を添加し ATP を枯渇させた状態ともに、取り込み量はほぼ同等であり、輸送は示されなかった(図3)。以上より、OCTN1 は何らかの働きによってグルコースやピルビン酸の代謝に関わることが示唆された。そこで、ピルビン酸以降の TCA 回路に及ぼす OCTN1 の役割を探るため、HEK293/hOCTN1 と HEK293/mock における TCA 回路基質およびアミノ酸濃度を測定し

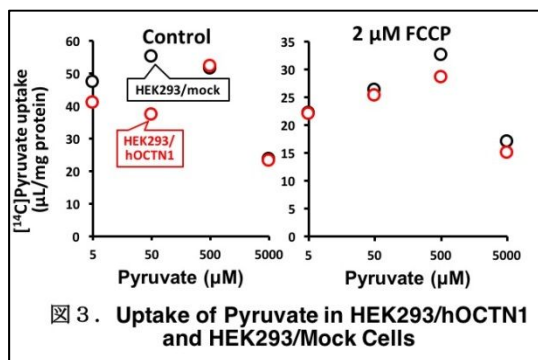


図3. Uptake of Pyruvate in HEK293/hOCTN1 and HEK293/Mock Cells

た(図4)。LC-MS/MS で測定された TCA 回路基質濃度は、培養条件ごとの変動が大きく、OCTN1 安定発現細胞株と空ベクター導入細胞の間で必ずしも明確な濃度の違いが観察されなかったものの、5 種の必須アミノ酸や ケトグルタル酸からリンゴ酸までの化合物の細胞内濃度が HEK293/hOCTN1 において高い傾向にあった(図5)。したがって OCTN1 の TCA 回路における何らかの役割が支持された。今後は、より生理的な培養細胞と遺伝子ノックダウン等の手法を組み合わせることにより、糖代謝に及ぼす役割を定量的に解明できるものと考えられた。

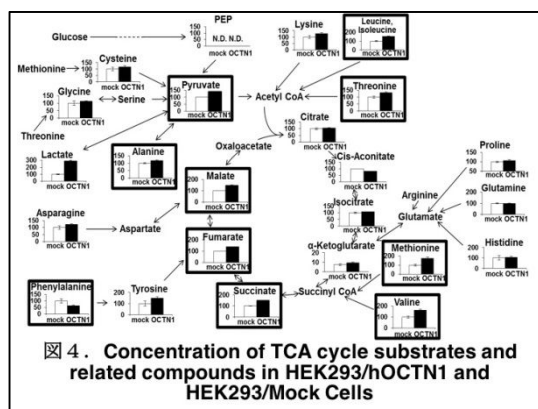


図4. Concentration of TCA cycle substrates and related compounds in HEK293/hOCTN1 and HEK293/Mock Cells

< 引用文献 >

- (1) Gründeman D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, Jung N, Rubbert A, Schömig E. Discovery of the ergothioneine transporter. Proc Natl Acad Sci USA 102: 5256-5261, 2005.
- (2) Kato Y, Kubo Y, Iwata D, Kato S, Sudo T, Sugiura T, Kagaya T, Wakayama T, Hirayama A, Sugimoto M, Sugihara K, Kaneko S, Soga T, Asano M, Tomita M, Matsui T, Wada T, and Tsuji A. Gene Knockout and Metabolome Analysis of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1. Pharm Res 27: 832-840, 2010.
- (3) Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. Nat Genet 36: 471-475, 2004.

- (4) Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Pani G, Siminovich KA, Indiveri C. The human OCTN1 (SLC22A4) reconstituted in liposomes catalyzes acetylcholine transport which is defective in the mutant L503F associated to the Crohn's disease. *Biochim Biophys Acta* 1818: 559-565, 2012.
- (5) Shimbo K, Oonuki T, Yahashi A, Hirayama K, Miyano H. Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 23: 1483-1492, 2009.
- (6) Sugiura T, Kato S, Shimizu T, Wakayama T, Nakamichi N, Kubo Y, Iwata D, Suzuki K, Soga T, Asano M, Iseki S, Tamai I, Tsuji A, Kato Y. Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in mouse small intestine and liver. *Drug Metab Dispos* 38: 1665-1672, 2010.
- (7) Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett* 419: 107-111, 1997.
- (8) Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. Novel membrane transporter OCTN mediates multispecific bidirectional, and pH-dependent transporter of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 768-773, 1999.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) 加藤将夫、三田村萌恵、松本 聡
トランスポーター介在性ブレインフードとしてのエルゴチオネイン
FOOD Style 21(2): 21-24, 2017. 査読無
- (2) Abouzed TK, Munesue S, Harashima A, Masuo Y, Kato Y, Kahilo KKK, Yamamoto H, Yamamoto Y. Preventive effect of salicylate and pyridoxamine on diabetic nephropathy. *J Diabetes Res Article ID* 1786789, 2016. 査読有
- (3) Naka K, Jomen Y, Ishihara K, Kim J, Ishimoto T, Bae E, Mohny R, Stirdivant SM, Oshima H, Oshima M, Kim DW, Nakauchi H, Takihara Y, Kato Y, Ooshima A, Kim SJ. Dipeptide species regulate nutrient signalling essential for the maintenance of chronic myelogenous leukaemia stem cells. *Nat Commun* 6: 8039, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- (1) Kato Y, Masuo Y and Nakamichi N. Role of

ABC xenobiotic transporters in drug disposition in the skin. In "The Best of the Rest – Drug Transport across Non-traditional Biological Barriers," 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, October 25-29, 2015, Orange County Convention Center, Orlando. (招待講演)

- (2) Kato Y, Masuo Y and Nakamichi N. ABC transporters involved in xenobiotics disposition in the skin. Meet the Experts: Transporter Conference Tokyo 2015, May 13, 2015, Tokyo Marriott Hotel, Japan. (招待講演)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunyaku/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 将夫 (KATO, Yukio)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号: 30251440

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

山本 靖彦 (YAMAMOTO, Yasuhiko)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 20313637

北村 正典 (KITAMURA, Masanori)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号: 80453835

中道 範隆 (NAKAMICHI, Noritaka)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号: 10401895

(4)研究協力者

なし