

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15499

研究課題名(和文)機能未知トランスポーターの炎症応答における重要性・制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of importance of an orphan transporter in inflammatory responses

研究代表者

水野 忠快 (MIZUNO, Tadahaya)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：90736050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「炎症刺激時に発現量変動する輸送担体は炎症応答の修飾因子である」という仮説の下、機能未知輸送担体SLC2A6の個体レベルでの重要性解析、及びその分子機構解析を目的としている。SLC2A6ノックアウト(KO)マウスでは、LPS投与による生存率が低下する等、炎症刺激に対する感受性の増加が認められた。初代培養マクロファージにおいて、KOによる炎症性サイトカインの変化は認められなかったものの、炎症時の解糖系亢進が減弱した。ChIP-seqデータの解析、並びにルシフェラーゼアッセイにより、SLC2A6は転写因子RelAにより発現量制御を受けていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、公知データベースに由来する発現量データ解析を通じ、500種類ほどのうちの3割が機能未知であるトランスポーターの機能同定に取り組むものである。トランスポーターを標的とする承認薬の割合は少なく、2008年の統計では全体の8.1%程度であった。本研究は、機能未知トランスポーターSLC2A6が炎症刺激時の解凍系亢進に重要であることを見出し、機能未知トランスポーターの機能解明に際して一つの方法論を提示するものである。すなわち本研究成果は、機能未知トランスポーターの機能同定を促進し、トランスポーターを介した生体現象制御機構の解明、及び同機構に基づく創薬の活性化につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The solute carrier family is an important protein class governing compound transport across membranes. However, some of its members remain functionally unidentified. The goal of this study is to elucidate the importance of an orphan transporter SLC2A6 in vivo and to clarify the molecular mechanism. Lipopolysaccharide (LPS)-shock susceptibility was revealed in SLC2A6-knockout mice. Metabolomics and in vitro analyses showed that SLC2A6 functions as a glycolysis modulator in inflammatory macrophages although SLC2A6 depletion did not affect inflammatory cytokine expression or releases. ChIP-seq data analysis revealed RelA-mediated regulation of SLC2A6 and the regulatory regions around the promoter region and intron regions. We conclude that SLC2A6 is a transporter that is regulated by RelA and modulates inflammatory responses by affecting the metabolic shift of macrophages in response to inflammatory stimuli.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：トランスポーター 炎症 転写因子 転写制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトゲノム上において 400 超のトランスポーター遺伝子が見出されているものの、3 割以上の生理学的な重要性・機能は不明である。この現状を説明しうる可能性として、状態変化に応答して限定的な状況下で主に機能するトランスポーターの重要性は通常状態では見出されず、未知とされている可能性が挙げられる。実際、申請者は、脂質排出トランスポーターである ABCA1 を解析し、脂質蓄積時に ABCA1 の分解経路が変化することを見出している(引用文献①参照)。このように疾患等の状態変化時に変動するトランスポーターは、新たな環境に適応すべく物質輸送をダイナミックに制御しているものと推察される。

(2) 申請者は、これまでの研究背景から(引用文献①、②参照)、現代の主要な保健医療的課題の一つである動脈硬化症に着目し、マクロファージが泡沫化した際に誘導されるトランスポーターとして SLC2A6 を見出した。本トランスポーターは、一部グルコースなどの糖が基質として報告されているものの、その生理学的な重要性・機能は全く明らかになっていない。申請者は、マクロファージにおいて、炎症刺激によって SLC2A6 が非常に強く(30 倍程度)誘導されることを見出した。細胞免疫染色法により、主に細胞内、特にリソソーム膜での本トランスポーターの局在が認められたことも踏まえると、SLC2A6 はマクロファージ細胞内での物質輸送を制御し、炎症時の応答に寄与しているものと考えられる。しかし現状では分子機構や個体レベルでの重要性は不明である。

### 2. 研究の目的

機能未知トランスポーター、SLC2A6 の炎症応答における個体での重要性と分子機構を解明し、新たな炎症応答制御の作用点を発見する。「疾患時に発現変動するトランスポーターは新たな環境での物質輸送を担い、同疾患の修飾因子となる」という仮説を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 炎症応答における個体での重要性の解析

作出済みの SLC2A6 ノックアウトマウスとコントロールマウスに対し、リポポリサッカライド (LPS) を腹腔内投与し、生存率を評価した。同様に腹腔内投与した際の血漿中 TNF $\alpha$  レベルを ELISA により測定した。高脂肪食により 6 カ月飼育した後、生化学検査を行った。

#### (2) 炎症応答における分子機構の解析

マウス腹腔内マクロファージ等の初代培養マクロファージをノックアウトマウスより調整し、LPS などの炎症刺激をした際の炎症性サイトカイン等の mRNA を定量的 PCR により評価した。同様に炎症刺激をした際の初代培養マクロファージをメタボローム解析に供し、SLC2A6 が経路作用する経路の同定に取り組んだ。炎症刺激時の発現量変動機構を解明するため、公共データベースより、炎症刺激時の ChIP シーケンスデータを取得し、SLC2A6 の転写制御を担う因子の解析を実施した。SLC2A6 のプロモーター近傍領域、イントロン領域におけるオープンな領域を公共データベースより見出し、見出した転写因子が実際に SLC2A6 の制御に関わるか否かを、ルシフェラーゼアッセイにより評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) SLC2A6 ノックアウトマウスは LPS 刺激に対し高い感受性を示す

本トランスポーターの個体レベルでの重要性を評価すべく、炎症刺激として頻用されている LPS を腹腔内投与し、生存率を評価したところ、ノックアウト群ではコントロール群に対し有意に生存率が低下した(図 1)。同様に LPS を腹腔内投与した際の血漿中 TNF $\alpha$  レベルを評価したところ、KO 群では有意に上昇していた。以上より、SLC2A6 は、個体において、LPS 刺激に対する炎症応答が KO マウスでは過剰になっているものと推察された。一方、高脂肪食を与え、脂肪肝モデルを作成し、各種生化学検査値を評価した際には、肝障害マーカーである AST、ALT や、ビリルビン値、コレステロール等の脂質は特にコントロール群との違いは認められなかった。

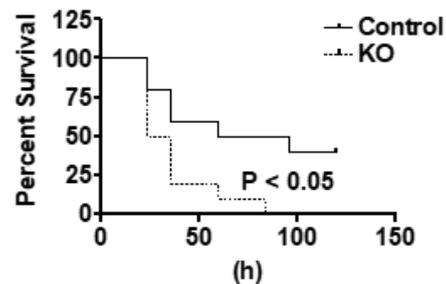


図 1. ノックアウトマウスの LPS 投与後の生存率

#### (2) SLC2A6 欠損はマクロファージの炎症性サイトカインに影響を与えない

SLC2A6 は、炎症刺激によりマクロファージにおいて非常に強く誘導される。そこで SLC2A6 ノックアウトマウスにおける LPS 刺激に対する過剰な炎症応答は、マクロファージの機能破綻にあると考察し、ノックアウトマウス由来の初代培養マクロファージにおける、炎症刺激時の炎症性サイトカインの mRNA を定量した。しかし、個体の血中においては TNF $\alpha$  の変化が認められたにも関わらず、マクロファージにおいては特に変化が認められなかった。また ELISA によるタンパク質レベルでの定量においても変化は認められなかった。以上より、SLC2A6 ノックアウトによる in vivo での表現型は、サイトカインの変化に大きく依存するものではないと推察

された。

### (3) SLC2A6 欠損はマクロファージの炎症応答における解糖系亢進を阻害する

Pathway	Compounds	Fisher's exact test p
Glycolysis/Gluconeogenesis	G1P;DHAP;PEP;Acetyl CoA;Pyruvate;3PG;Lactate;	0.000504
HIF-1 signaling pathway	2-Oxoglutarate;ATP;Pyruvate;Acetyl CoA;Lactate;	0.003821
Pentose and glucuronate interconversions	G1P;DHAP;2-Oxoglutarate;Ru5P;Pyruvate;UDP-glucose;	0.006747
Carbon fixation in photosynthetic organisms	DHAP;S7P;F1,6P;3PG;Ru5P;Ribulose 1,5-diphosphate;Pyruvate;PEP;	0.007031
Glycerolipid metabolism	DHAP;Glycerophosphate;3PG;UDP-glucose;	0.010344
Ascorbate and aldarate metabolism	2-Oxoglutarate;GDP-mannose;Threonate;Pyruvate;UDP-glucose;	0.015947
Fructose and mannose metabolism	GDP-mannose;DHAP;Lactate;	0.027701
Galactose metabolism	G1P;DHAP;UDP-glucose;	0.027701
Fatty acid biosynthesis	Dodecanoate;Acetyl CoA;Octanoate;	0.027701
Lipopolysaccharide biosynthesis	S7P;Ru5P;UDP-N-acetylglucosamine;	0.027701
Inositol phosphate metabolism	Acetyl CoA;DHAP;G6P;	0.027701
Inflammatory mediator regulation of TRP channels	ATP;Histamine;Serotonin;	0.027701
Glucagon signaling pathway	G1P;F1,6P;3PG;2-Oxoglutarate;Acetyl CoA;Pyruvate;PEP;Lactate;	0.030313
Phosphotransferase system (PTS)	PEP;Pyruvate;G6P;N-Acetylglucosamine 6-phosphate;	0.036435
Thermogenesis	ADP;Acetyl CoA;NADH;ATP;	0.036435
Insulin resistance	Acetyl CoA;Pyruvate;G6P;UDP-N-acetylglucosamine;	0.036435

図 2. ノックアウトマウス由来マクロファージのメタボロームのパスウェイ解析結果

SLC2A6 はトランスポーターであるため、個体における表現型も物質の輸送が起因しているものと推察される。そこで SLC2A6 が作用する経路を同定すべく、SLC2A6 ノックアウトマウス由来の初代培養マクロファージをメタボローム解析に供し、パスウェイ解析を実施した。再現性試験も含めた複数回の結果を Stouffer's Z により統合解析した結果、解糖系の濃縮が認められた(図 2)。一般にマクロファージでは、炎症刺激を受けた際に、炎症応答を円滑にすべく解糖系が亢進する代謝リプログラミングが起きるとされている。実際にマクロファージにおいて解糖系の指標である乳酸の細胞外分泌を評価したところ、コントロールマウス由来マクロファージでは炎症刺激による乳酸分泌が上昇したものの、ノックアウトマウス由来マクロファージでは認められなかった。以上より、SLC2A6 はマクロファージにおいて炎症刺激時の解糖系亢進に寄与しているものと推察される。

### (4) SLC2A6 はプロモーター近傍、イントロン領域に転写制御領域において転写因子 RelA による発現量制御を受ける

SLC2A6 の炎症刺激時における発現量上昇は、mRNA レベルで認められるため、転写制御によるものであると考えられる。LPS 等の Toll-like receptor リガンドのシグナリングにより活性化し、炎症関連遺伝子の転写制御を司る RelA に着目し、公共データベースである GEO dataset (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) より、炎症刺激時のマクロファージを対象とした、RelA による ChIP-sequence データを解析した結果、確かに SLC2A6 のプロモーター領域近傍とイントロン領域に RelA の結合することが見出された。これらの領域を ChIP-sequence データの網羅的な解析を可能とする web アプリケーション ChIP-atlas (<https://chip-atlas.org/>) により、解析したところ、DNase 感受性、ヒストンのメチル化、RNA polymerase II の結合といった、転写因子が結合可能な領域であることが示唆された。またこれらの領域を、DNA 配列から結合する転写因子を推定する TRAP 解析 ([http://trap.molgen.mpg.de/cgi-bin/trap\\_form.cgi](http://trap.molgen.mpg.de/cgi-bin/trap_form.cgi)) に供したところ、確かに RelA がハイスコアで推定された。以上を元に、当該領域を含むルシフェラーゼベクターを構築し、ルシフェラーゼアッセイを実施したところ、確かにこれらの領域は LPS 刺激時にプロモーター活性を上昇した。以上より、SLC2A6 は、プロモーター近傍、およびイントロン領域において、RelA による転写制御を受けているものと推察される。

### (5) まとめ

本研究により、炎症刺激時に発現量が顕著に上昇する SLC2A6 は、マウスにおける炎症刺激に対する感受性、およびマクロファージにおける炎症刺激時の解糖系亢進に、寄与していることが明らかとなった。これらの成果は FEBS Letters に投稿し、受理されている(引用文献③)。刺激応答時の変化に着目することにより、確かに刺激応答を修飾するトランスポーターを見出すことはできたものの、詳細な分子機構の解明には至らず、今後の検討課題である。

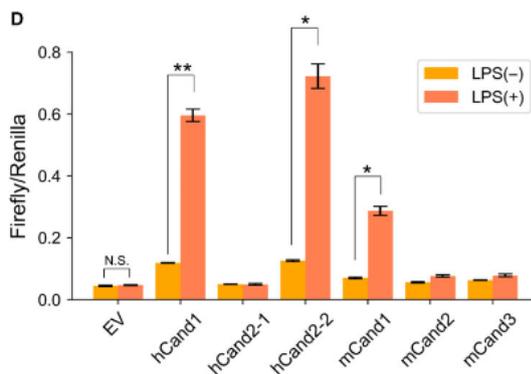


図 3. ルシフェラーゼアッセイによる候補領域のプロモーター活性化能の評価

### <引用文献>

- ① Mizuno T, Hayashi H, Kusuhara H. "Cellular Cholesterol Accumulation Facilitates Ubiquitination and Lysosomal Degradation of Cell Surface-Resident ABCA1." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Jun;35(6):1347-56. doi:

- 10.1161/ATVBAHA.114.305182. Epub 2015 Apr 2
- ② Mizuno T, Hayashi H, Naoi S, Sugiyama Y.  
“Ubiquitination is associated with lysosomal degradation of cell surface-resident ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) through the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) pathway.”  
Hepatology. 2011 Aug;54(2):631-43. doi: 10.1002/hep.24387. Epub 2011 Jun 26.
- ③ Maedera S, Mizuno T, Ishiguro H, Ito T, Soga T, Kusuhara H.  
“GLUT6 is a lysosomal transporter that is regulated by inflammatory stimuli and modulates glycolysis in macrophages.”  
FEBS Lett. 2019 Jan;593(2):195-208. doi: 10.1002/1873-3468.13298. Epub 2018 Dec 4.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

著者名: Maedera S, Mizuno T, Ishiguro H, Ito T, Soga T, Kusuhara H  
論文標題: GLUT6 is a lysosomal transporter that is regulated by inflammatory stimuli and modulates glycolysis in macrophages.  
雑誌名: FEBS Letters  
巻: 593  
発行年: 2019 年  
最初と最後の頁: 195-208

[学会発表] (計 3 件)

- ① 第 32 回日本薬物動態学会、東京 (2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日)  
“Functional Analysis of Lysosomal Transporter SLC2A6 as an Orphan Transporter”  
伊藤拓也、水野忠快、望月達貴、楠原洋之
- ② 第 39 回生体膜シンポジウム、金沢 (2017 年 10 月 26-27 日)  
“オーファントランスポーター SLC2A6 のリソソームに着目した機能解析”  
伊藤拓也、水野忠快、望月達貴、楠原洋之
- ③ KSAP 2017 Annual Meeting, Seoul, Korea (2017 年 10 月 13-14 日)  
“The Analysis of an Orphan Transporter SLC2A6”  
Tadahaya Mizuno, Takuya Ito, Shotaro Maedera, Hiromu Ishiguro, Hiroyuki Kusuhara

[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.f.u-tokyo.ac.jp/~molpk/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者  
いません。

(2) 研究協力者  
研究協力者氏名: 前寺 正太郎 (大学院生)  
ローマ字氏名: MAEDERA Shotaro

研究協力者氏名: 石黒 拓 (大学院生)  
ローマ字氏名: ISHIGURO Hiromu

※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、研究者個人に帰属されます。