

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07301

研究課題名(和文) 希少糖を用いたナトリウム・グルコース共輸送体の糖透過性の分子構造基盤解析

研究課題名(英文) Molecular and structural analysis of sugar selectivity for sodium glucose cotransporters using rare sugars

研究代表者

神鳥 和代 (KAMITORI, Kazuyo)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：40457338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ナトリウム・グルコース共輸送体(SGLT)1による糖輸送の分子メカニズム明らかにするため、野生型と変異体の糖選択性を電気生理学的手法により解析した。野生型によりグルコース、ガラクトース、アロースが輸送された。また糖結合部位周辺の複数のアミノ酸は変異により糖選択性が変化することから、輸送する糖の構造を決定するカギとなることを示した。さらにそれぞれの変異体と糖の結合様式を、分子モデリングにより明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SGLTはグルコースなど単糖の細胞内への取り込みを担っているが、機能が正常に制御されないと糖尿病や癌を引き起こすため、新たな治療薬開発のターゲットになっている。そこでSGLTによる糖輸送機構を分子レベルで理解する必要性が高まっている。本研究での希少糖と電気生理学的手法、さらに分子モデリングを用いた解析により、SGLTによる糖輸送機構や糖特異性について新たな知見を得た。これらの成果は治療薬の設計や希少糖の生理作用の解析など、医療、健康分野での応用につながる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of sugar transport by the sodium glucose cotransporter (SGLT)1, the sugar selectivity of wild type and mutants was analyzed by electrophysiological techniques. The wild type transported glucose, galactose, and allose. Several mutants at the amino acids around the sugar binding site altered the sugar selectivity, showing that these residues are the keys to determine the sugars to be transported. Molecular modeling was used to clarify the binding state of each sugar to the SGLT1 mutant.

研究分野：糖の生理学

キーワード：トランスポーター 希少糖 電気生理学 アフリカツメガエル卵母細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) SGLT をターゲットとした薬剤の開発; ナトリウム・グルコース共輸送体(SGLT)は、体内でグルコースなどの単糖とナトリウムを細胞内に取り込む膜タンパク質である。ヒトでは 5 つのサブタイプが同定されており(hSGLT1-5)、そのうち SGLT1 は主に小腸におけるグルコースおよびガラクトースの吸収に参与している。また腎臓で再吸収されるグルコースの約 90%は SGLT2 により輸送される。この働きを利用した SGLT2 阻害薬は新しいタイプの糖尿病治療薬として 2014 年以降複数承認され、さらに開発が進んできた。また SGLT は種々の癌細胞で高発現し、グルコース取り込みおよび増殖を促進することから、癌の治療法開発のターゲットともなっている。このような背景から SGLT の分子レベルでの糖輸送機構を理解する必要性が高まっていた。

(2) 希少糖を利用した糖輸送機構解析; 研究代表者が所属する香川大学では、自然界に稀にしか存在しない単糖(希少糖)の生産方法が確立されて研究が進んでおり、多種類の希少糖を解析ツールとして入手可能である。SGLT は糖とともにナトリウムイオンを輸送して電流を生じることから、電気生理学的手法により解析が可能である。希少糖と電気生理学的手法を駆使することにより、SGLT による糖輸送機構や糖特異性について新たな知見を得て、糖尿病や癌の治療法、治療薬の開発につながると考えた。

2. 研究の目的

(1) SGLT による希少糖の輸送と他の糖の輸送に対する影響; 希少糖の中で D-アロースは細胞周期の停止とグルコースの取り込み抑制を引き起こし癌細胞の増殖を抑制すること、D-アルロース(別名: D-プシコース)は、腸ホルモン GLP-1 の分泌を促し、食後高血糖を抑制することが知られている。このような生理的作用を持つことからこれらの希少糖は糖トランスポーターにより細胞内に輸送されて効果を発揮すると考えられたが、その作用の分子機構は不明であった。そこで希少糖は SGLT により輸送されるのか、またグルコースなど他の糖の輸送に影響を与えるかを電気生理学的に解析し、希少糖の生理作用について分子レベルで理解し、薬剤開発のための知見を得ることを目的とした。

(2) 糖結合部位のアミノ酸配列と糖選択性の関係; SGLT の糖結合部位のアミノ酸配列は種やサブタイプを超えて相同性が高いが、それぞれ糖選択性が異なっている。例えばヒトでは SGLT1 はグルコースとガラクトース、SGLT2 および 3 はグルコースのみ、SGLT4 はグルコース、マンノース、フラクトース、腸炎ビブリオ菌由来 SGLT(vSGLT)はガラクトースのみを輸送する。本研究ではアミノ酸配列、糖選択性の比較から、分子モデリングによりそれぞれの SGLT の糖結合部位と糖の立体配置を予想する。次に糖との結合に関与すると考えられるアミノ酸残基の変異体の糖特異性を解析する。さらに野生型 SGLT とは異なる糖特異性を示す変異体については、輸送される糖との結合様式を予測し、希少糖の利用や阻害剤の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル卵母細胞を採取し、コラゲナーゼ溶液で処理して分離した。SGLT cDNA から RNA ポリメラーゼを用いて RNA を合成し、卵母細胞に導入した。

(2) RNA 導入の 3~4 日後に、膜電位固定法を用いて糖添加により生じる電流値を解析した。

(3) 分子モデリング; SGLT および単糖の分子モデリングは、ソフトウェア Modeler を用いて行った。

4. 研究成果

(1) hSGLT1 wild type の糖選択性; hSGLT1 による 8 種類すべてのアルドヘキソースの輸送能を電気生理学的に解析した結果、これまでの報告の通りグルコース、ガラクトースで電流が観察された。グルコースについては $K_m=1.74 \pm 0.30$ mM, $V_{max}=631 \pm 97$ nA、ガラクトース $K_m=3.12 \pm 0.58$ mM, $V_{max}=615 \pm 107$ nA (それぞれ $n=4$) で、ほぼ同程度の輸送能であった。また高濃度(>20mM)のアロース(希少糖の 1 種; Fig1)で電流が観察されたことから、アロースを低親和性で輸送することが明らかになった。その他の 5 種類のアルドヘキソースによる電流は観察されなかった(Fig2)。

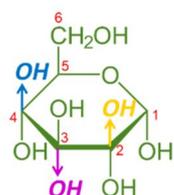


Fig1 六単糖の構造

緑; グルコース
青; ガラクトース
黄; マンノース
マゼンダ; アロース

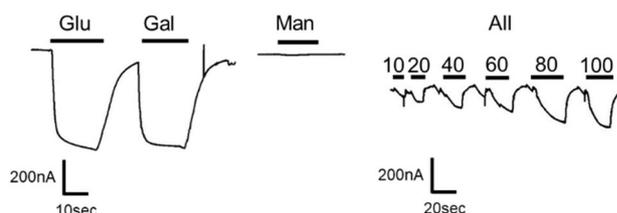


Fig2 SGLT1 wild type による糖輸送能の解析

(2) 2位、3位炭素近傍のアミノ酸による糖選択性決定；糖の2位、3位炭素近傍のアミノ酸が糖選択性を決定すると推測し、それらの変異体を作製した。そのうち K321Q がグルコース、ガラクトースに加えてマンノース、アロースを輸送した。分子モデリングから、この変異によりマンノース、アロースが結合できるスペースが生じたと考えられた(Fig3)。

(3) グルコース・ガラクトース選択性の分子機構；hSGLT1 はグルコースとガラクトース、hSGLT2 および 3 はグルコースのみ、vSGLT はガラクトースのみを輸送する。グルコースとガラクトースは4位炭素の水酸基の向きが逆であり、SGLT と結合した際に4位付近に位置するアミノ酸がこれら2つの糖の選択性のカギとなると考えた。分子モデリングとアミノ酸配列の比較から、SGLT1 のスレオニン 287 (T287) が重要であると予測し、vSGLT と同じアスパラギンとなる変異体(T287N)を作製した。その結果グルコースの輸送能が減弱し、vSGLT に近い糖特異性を示した(Fig4)。このことから 287 番のアミノ酸はグルコース・ガラクトースの選択性の決定に重要な役割を果たしていると考えられた。

(4) マンノース、フラクトース輸送の分子機構；hSGLT4 はグルコース、マンノース、フラクトースを輸送するという特徴的な糖特異性を示す。hSGLT1 と糖結合部位付近の配列を比較すると 83、287、290 番の3ヶ所のアミノ酸が異なっていることから、これらの配列が糖特異性に寄与していると考えた。そこで SGLT1 から SGLT4 型にアミノ酸を変えた変異体について解析を行った。まず Y290C はガラクトースの輸送能が減弱した。次に T287A/Y290C の2アミノ酸変異体はマンノースの輸送能を獲得した。さらに糖結合部位のアミノ酸配列が hSGLT4 と一致する H83L/T287A/Y290C の3重変異体がグルコース、マンノースに加えてフラクトース、L-ソルボースを輸送することを明らかにした。この結果はこれら3ヶ所のアミノ酸が糖特異性を決定することを裏付けている。また分子モデリングによりこの3重変異体とそれぞれの糖との結合様式を予測し、フラクトースは六員環構造で結合していることを示した(Fig5)。

(5) その他の成果、測定法の確立；hSGLT2 および 3 の測定系を確立した。またホヤ由来 SGLT をクローニングし、測定系を確立した。これらについて希少糖や変異株などを用いて糖選択性の解析を開始した。一方、電気生理学実験の結果を検証するため糖の放射線ラベル体を用いた輸送能測定法を確立した。これらの結果や手法は、今後広く糖輸送体の基質予測やその阻害剤の設計に役立つと期待される。

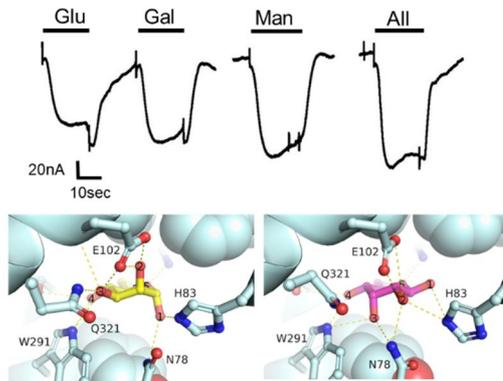


Fig3 K321Qによる糖輸送
マンノース(黄)、アロース(マゼンタ)の結合様式

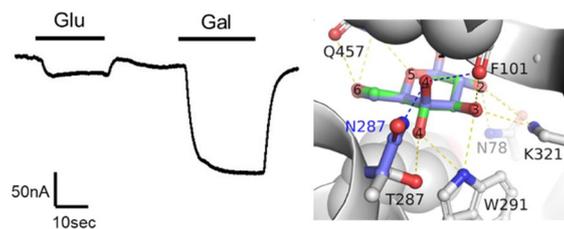


Fig4 T287Nによる膜輸送
グルコース(緑)、ガラクトース(青)の結合様式

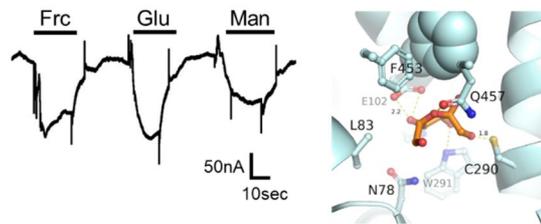


Fig5 H83L/T287A/Y290Cによる糖輸送
フラクトース(橙)の結合様式

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kamitori K, Shirota M, Fujiwara Y.	4. 巻 434
2. 論文標題 Structural Basis of the Selective Sugar Transport in Sodium-Glucose Cotransporters.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 167464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmb.2022.167464.	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazuyo Kamitori, Susumu Mochizuki, Ken Izumori, Kazuya Akimitsu, Yuichiro Fujiwara
2. 発表標題 Molecular analysis and physiological significance of D-allulose and D-tagatose transport by glucose transporters
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神鳥 和代, 藤原 祐一郎
2. 発表標題 カタコウレイボヤ由来の新規ナトリウム・グルコーストランスポーターSGLTは多くの種類の糖を輸送する
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神鳥 和代, 城田 松之, 藤原 祐一郎
2. 発表標題 ナトリウム・グルコース共輸送体SGLTの糖選択性の分子メカニズム
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神鳥 和代、城田 松之、藤原 祐一郎
2. 発表標題 ナトリウム-グルコース共輸送体SGLTにおける 糖の選択的輸送機構
3. 学会等名 第73回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本郁子、井上圭介、前川聖、神鳥和代、徳田雅明、吉田裕美、神鳥成弘
2. 発表標題 希少糖D-アロースに対してヒトヘキソキナーゼ3は高い酵素活性を持つ
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神鳥 和代、城田 松之、藤原 祐一郎
2. 発表標題 ナトリウム・グルコース共輸送体SGLTによるさまざまな単糖の輸送機構
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 神鳥和代、藤原祐一郎
2. 発表標題 ナトリウム・グルコース共輸送体SGLTの糖選択性の分子基盤
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神鳥和代、藤原祐一郎
2. 発表標題 ナトリウム・グルコース共輸送体SGLTの糖選択性の分子基盤
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神鳥和代、藤原祐一郎
2. 発表標題 ナトリウム・グルコース共輸送体の糖選択性に関わる分子構造基盤解析
3. 学会等名 2019年度 生理研研究会@大阪
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuyo Kamitori, Yuichiro Fujiwara
2. 発表標題 Sugar specificity and structural analyses of Na ⁺ /D-glucose co-transporters
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神鳥和代、藤原祐一郎
2. 発表標題 Structural and molecular basis of Na ⁺ /D-glucose co-transporters hexose specificity
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	藤原 祐一郎 (FUJIWARA YUICHIRO) (20532980)	香川大学・医学部・教授 (16201)	

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