

機関番号：23903  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590151  
 研究課題名(和文) HCT-15細胞型Na<sup>+</sup>依存性グリセロールトランスポーターの  
 同定と輸送機能解明  
 研究課題名(英文) Identification and Functional Analysis of the Na<sup>+</sup>-Dependent  
 Glycerol Transporter in HCT-15 Cells  
 研究代表者  
 湯浅 博昭(YUASA HIROAKI)  
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
 研究者番号：20191471

研究成果の概要(和文)：発現クローニング法及び遺伝子データベースのバイオインフォマティク検索法により Na<sup>+</sup>依存性グリセロールトランスポーターの同定に取り組んだが、同定には至らなかった。一方、アクアグリセロポリン群がトランスポーター様メカニズムによるグリセロール輸送機能を有することが見い出された。Na<sup>+</sup>依存性グリセロールトランスポーターの実体ではないとみられるが、興味深い知見であり、グリセロール動態に関わるトランスポーター群の全容解明に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Identification of the Na<sup>+</sup>-dependent glycerol transporter, which was attempted by the expression cloning method and the bioinformatic approach using gene databases, was unsuccessful. But it was found that, interestingly, aquaglyceroporins can transport glycerol by a carrier-mediated type of mechanism. Although any of them is unlikely to be the molecular entity of the Na<sup>+</sup>-dependent glycerol transporter, the finding would help identifying transporters involved in glycerol disposition and understanding their roles.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：グリセロール，担体輸送，トランスポーター，ナトリウム依存性，クローニング，アクアポリン

## 1. 研究開始当初の背景

薬物等の腸管吸収に関する一連の研究のなかで、我々は、受動輸送によると一般に考えられていたグリセロールの腸管吸収(膜透過)に Na<sup>+</sup>依存性トランスポーターが介在することを示唆する知見を得た。グリセロールが脂肪を構成する栄養物質であることを考えると、糖類ほかと同様に、トランスポーター

一介在性の能動的吸収機構の関与は十分にあり得ると推察される。一般には脂肪(トリグリセリド)の成分として経口摂取されるグリセロールは、モノグリセリド(脂肪酸エステル)として吸収されるほか、遊離のグリセロールとしても吸収されるとされ(20%強)、このトランスポーター介在性吸収の寄与は無視できないと予想される。このような背景

のもとに、我々は、“新規な（未知の） $\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーターの存在”を仮説として提唱した。

ラット小腸組織を用いての当初の機能解析に続いて、同様なグリセロール輸送機能を有するモデル培養細胞系の検索にも取り組み、HCT-15細胞を見出した。しかし、HCT-15細胞で見出されたグリセロール輸送特性はラット小腸のものとは若干異っており、“複数のサブタイプからなる $\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーター群の存在”を新たに示唆する結果ともなった。

水チャンネルとして知られるアクアポリン（AQP）群において、グリセロール透過能を有するサブタイプであるアクアグリセロポリン群の存在が既に知られているが、チャンネルメカニズムによる膜透過の特徴（非飽和性かつ $\text{Na}^+$ 非依存性）は、我々が見出したグリセロールの輸送特性（飽和性かつ $\text{Na}^+$ 依存性）とは合致しない。 $\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーター群とアクアグリセロポリン群との間には、グルコース輸送におけるSGLT群（ $\text{Na}^+$ 依存性トランスポーター、能動輸送型）とGLUT群（促進拡散型トランスポーター）の関係に似た役割分担が想定される場所である。

以上のように、我々は、能動輸送型の $\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーターの存在を新たに指摘し、その同定ならびに輸送機能解明を試みるべく、研究を進めてきている。

## 2. 研究の目的

本研究では、HCT-15細胞型 $\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーターの同定ならびに輸送機能解明に取り組んだ。これにより、このトランスポーターの構造と基質及び阻害薬の認識特性をはじめとする輸送機能を分子レベルで把握し、 $\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーター群の全貌の解明ならびに薬学的応用利用への糸口とすることを旨とするものである。

グリセロールはエネルギー代謝の中間物質として種々の生理反応および病態に関わっていることから、腸管吸収にとどまらず、グリセロールの体内動態特性ならびに $\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーター群の役割は非常に興味深い。とりわけ薬学的には、医薬品開発の標的あるいは薬物送達の経路としての可能性に期待が寄せられるところである。

また、グリセロール動態に関わるトランスポーター群の全容解明ならびに $\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーター群との比較の観点から、グリセロール透過能を有することが知られているアクアグリセロポリン群の機能も探ることとした。

## 3. 研究の方法

HCT-15細胞型 $\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーターの同定のための方法として、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた発現クローニング法を採用することにした。HCT-15細胞から抽出した総mRNAをもとに分画を進め、アフリカツメガエル卵母細胞への導入により誘導されるグリセロール輸送活性を指標にした絞込みにより、探索対象のトランスポーターのmRNAを同定する方法である。なお、細胞（HCT-15）の利用には、組織（小腸）に比べてmRNAの抽出（及び精製）が容易であるという利点がある。

発現クローニングによる方法を補完するものとして、遺伝子データベースのバイオインフォマティク検索（in silico EST検索）による方法にも取り組んだ。この方法では、候補となり得る機能未知のトランスポーター様タンパク質をコードする遺伝子を選別してクローニングし、HEK293細胞一過性発現系でのグリセロール輸送活性評価により、グリセロールトランスポーターの探索を試みた。

グリセロール輸送活性評価は、グリセロール（ $^3\text{H}$ 標識体）の細胞内取込を測定する方法により行った。アクアグリセロポリン群の機能についても、クローン化遺伝子を導入したアフリカツメガエル卵母細胞発現系あるいはHEK293細胞発現系（安定発現系）を用い、グリセロール（ $^3\text{H}$ 標識体）の細胞内取込を評価、解析する方法により検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 発現クローニング

$\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーターの同定のための第1の方法として、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現クローニングに取り組んだ。

まず、その準備段階として、発現系の構築を試みた。アクアグリセロポリン類のひとつであるヒトAQP9（hAQP9）のcRNAを卵母細胞に導入、発現させることにより、高いグリセロール輸送活性が誘導され、hAQP9の発現に成功したものと判断された。また、導入遺伝子（cRNA及びmRNA）由来のタンパク質の機能評価系として利用可能と判断された。

続いて、HCT-15細胞由来のmRNAの導入によるグリセロール輸送活性の誘導の検討を始めたが、再現性良くグリセロール輸送活性を検出するには至らなかった。同類の $\text{Na}^+$ 依存性グリセロールトランスポーターが存在するとみられるラット小腸からの全mRNAを用いた検討も試み、導入mRNAに由来するグリセロール輸送活性の上昇傾向をみとめたが、該当のmRNA（cDNA）を絞り込む作業を進めるのに十分なレベルではなかった。mRNAの精製及び発現期間等の最適条件設定を探っ

たが、成功には至っていない。

## (2) バイオインフォマティク検索

第2の方法として、発現クローニングと並行して、遺伝子データベース検索 (in silico EST 検索) による方法にも取り組んだ。候補となり得る機能未知のトランスポーター様タンパク質をコードする遺伝子を検索したうえで、臓器分布に関するデータベース情報を利用し、候補を絞り込んだ。RT-PCR クローニングにより 35 遺伝子の cDNA を得たが、HEK293 細胞を用いた一過性導入試験系においてグリセロール輸送活性を誘導する遺伝子を見い出すには至らなかった。

## (3) アクアグリセロポリン群のグリセロールトランスポーターとしての特性

Na<sup>+</sup>依存性グリセロールトランスポーターの同定には至らなかったが、関連の成果として、チャネルメカニズムによるグリセロール透過能を有するとされてきたアクアグリセロポリン群がトランスポーター様の機能特性を有することを見い出した。hAQP9、次いで hAQP10、さらに hAQP3 がトランスポーター様メカニズムによりグリセロールを輸送することが明らかとなった。ただし、これらの hAQP 類のトランスポーター様機能に Na<sup>+</sup>要求性はなく、本研究で探索対象とした Na<sup>+</sup>依存性グリセロールトランスポーターの実体ではないことも明らかとなった。

特に腸管での発現の多い hAQP10 と hAQP3 は、Na<sup>+</sup>依存性グリセロールトランスポーターと連携して腸管でのグリセロール動態に関わっている可能性が考えられる。興味深い知見であり、グリセロール動態に関わるトランスポーター群の全容解明に役立つものと考えられる。各 hAQP で見出された輸送機能特性の概要は、以下の通りである。

### ① hAQP9

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用い、hAQP9 の輸送機能解析を行った。hAQP9 を介するグリセロール輸送は、顕著な濃度依存性 (飽和性) 及び温度依存性を示す一方、Na<sup>+</sup>非依存的であり、促進拡散型の担体輸送的特性を示した。グリセロール輸送の濃度依存性をミカエリス-メンテン型のモデルで解析した結果、ミカエリス定数 ( $K_m$ ) は 10  $\mu$ M 程度であった。hAQP9 を介するグリセロール輸送は、構造類似物質であるモノアセチン、モノブチリン、ジグリセロールにより顕著に阻害され、構造類似物質による競合の可能性が示唆された。これも担体輸送の特徴を示唆するものである。また、1,2-エタンジオール及び 1,2-プロパンジオールによっても著しく阻害を受けた。さらに、1,2-プロパンジオールの阻害効果は、その光学異性体間で異な

り、S体がR体よりも強い阻害効果を示した。これらの結果は、hAQP9 がグリセロール及び炭素数2及び3の短炭素鎖の1位及び2位に水酸基を有する一部の類似物質を特異的に基質 (ないし阻害剤) として認識することを示唆するものである。

### ② hAQP10

hAQP10 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞でのグリセロール取り込みは、水を注入した卵母細胞と比べてはるかに大きく、hAQP10 を介する効率的なグリセロール輸送が確認された。さらに、hAQP10 を介するグリセロール取り込みは、顕著な濃度依存性 (飽和性) を示し、担体輸送的特性を示した。 $K_m$  は 13  $\mu$ M 程度であった。しかし、興味深いことに、若干ではあるが非飽和性の輸送成分も認められ、そのクリアランス ( $CL_{ns}$ ) は 0.008  $\mu$ M/min/oocyte 程度であった。これは、hAQP10 が hAQP9 と同様にトランスポーター様メカニズムによってグリセロールを輸送することを示唆すると共に、一部、非飽和性のチャネル様メカニズムを併せ持つことを示唆するものである。まず、トランスポーター様メカニズムによるとみられる飽和性の輸送成分に注目して、低濃度域でのグリセロール取り込みを評価した。その結果、hAQP10 を介するグリセロール取り込みに Na<sup>+</sup>及び Cl<sup>-</sup>イオンの影響はなかった。また、グリセロール誘導体であるモノアセチンなどにより顕著に阻害され、構造類似物質による競合の可能性が示唆された。また、特に 1,2-プロパンジオールについて、R体よりもS体の阻害効果が強いという立体特異性が認められた。これらの結果は、促進拡散型のトランスポーター様メカニズムを示唆するものである。さらに、これを強く裏付けるものとして、トランスポーター様メカニズムに特徴的とされている trans stimulation 現象も観察された。

グリセロールと同様に hAQP10 を介して輸送されることが報告されている尿素についても、輸送解析を行った。その結果、グリセロール輸送で認められたような濃度依存性は認められず、Na<sup>+</sup>及び Cl<sup>-</sup>イオンの影響も認められなかった。さらに、トランスポーター様メカニズムにおいて高い親和性を示す良好な基質であるグリセロールが尿素輸送を阻害しなかったことから、尿素輸送におけるトランスポーター様メカニズムの関与はないものと考えられる。したがって、尿素は、チャネル様メカニズムによってのみ輸送されているものと考えられる。

このように、hAQP10 を介する低濃度のグリセロール輸送はトランスポーター様メカニズムによるものであり、高濃度のグリセロール輸送と尿素輸送はチャネル様メカニズムによるものであることが示唆され、輸送される

水溶性低分子物質の種類や濃度によって輸送機構が異なるという双機能的な特徴を持つことが示唆された。

### ③ hAQP3

HEK293 細胞安定発現系を用い、hAQP3 の輸送機能解析を行った。hAQP3 を介するグリセロール取り込みは、hAQP9 及び hAQP10 と同様に顕著な濃度依存性（飽和性）を示し、トランスポーター様メカニズムの関与が示唆された。その飽和性輸送はミカエリス-メンテンモデルに適合し、 $K_m$  は 35  $\mu$ M 程度であった。しかし、興味深いことに、若干ではあるが非飽和性の輸送成分も認められ、そのクリアランス ( $CL_{ns}$ ) は 0.48  $\mu$ l/min/mg protein 程度であった。これは、hAQP3 が非飽和性のチャネル様メカニズムを併せ持つことを示唆するものであり、hAQP10 と同様の双機能的特性を有することが示唆された。

トランスポーター様メカニズムの特徴として、 $K^+$  及び  $Li^+$  感受性が見出されたが、グラミシジン（脱分極剤）の効果がなかったことから、膜電位の関与はないと考えられる。また、DNP（代謝阻害剤）の阻害効果もほとんどなかったことから、促進拡散的なメカニズムである可能性が高いと考えられる。この点では、hAQP9 及び hAQP10 と同様であるが、 $K^+$  及び  $Li^+$  感受性は hAQP3 のみに見られる興味深い特徴である。さらに、顕著な温度依存性を示すという面でも、トランスポーター様メカニズムに特有の性質が確認された。一方、チャネル様メカニズムは、 $K^+$  及び  $Li^+$  感受性や温度依存性を示さなかった。なお、hAQP3 の特徴とされている pH 感受性の面では、トランスポーター様メカニズムとチャネル様メカニズムとの間に大きな差はなかった。

トランスポーター様メカニズムによるグリセロール輸送は、構造類似物質であるモノアセチン等により顕著に阻害され、これらが競合基質として認識される可能性が示唆された。特に 1,2-プロパンジオールについては R 体よりも S 体の阻害効果が強いという立体特異性も認められた。これらの阻害特性は、hAQP9 及び hAQP10 の性質と共通しており、またトランスポーター様メカニズムに特有の性質でもある。ただし、hAQP3 は、より多様なアルコール類を認識することも示唆された。

## 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 2 件）

- ① Megumi Ishii, Kinya Ohta, Takahiro Katano, Kimihiko Urano, Jun Watanabe, Aki Miyamoto, Katsuhisa Inoue, Hiroaki

Yuasa: Dual functional characteristic of human aquaporin 10 for solute transport. *Cell. Physiol. Biochem.*, in press. (査読有)

- ② Yuriko Ohgusu, Kinya Ohta, Megumi Ishii, Takahiro Katano, Kimihiko Urano, Jun Watanabe, Katsuhisa Inoue, Hiroaki Yuasa: Functional characterization of human aquaporin 9 as a facilitative glycerol carrier. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **23**, 279 - 284, 2008. (査読有)

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 宮本明希, 太田欣哉, 片野貴大, 浦野公彦, 渡辺 淳, 井上勝央, 湯浅博昭: ヒトアクアポリン 3 のグリセロール輸送特性. 第 25 回日本薬物動態学会年会, 2010 年 10 月 8 日 (さいたま).
- ② 石井めぐみ, 太田欣哉, 片野貴大, 浦野公彦, 渡辺 淳, 井上勝央, 湯浅博昭: ヒトアクアポリン 10 の物質輸送における双機能的特性. 第 24 回日本薬物動態学会年会, 2009 年 11 月 27 日 (京都).
- ③ 片野貴大, 杉本さや香, 浦野公彦, 宮本明希, 太田欣哉, 井上勝央, 渡辺 淳, 湯浅博昭: ヒトアクアポリン 3 の glycerol 輸送機構の双機能的特性. 第 55 回日本薬学会東海支部大会, 2009 年 7 月 11 日 (名古屋).
- ④ 石井めぐみ, 太田欣哉, 片野貴大, 浦野公彦, 渡辺 淳, 井上勝央, 湯浅博昭: ヒトアクアポリン 10 の促進拡散型グリセロール輸送担体としての機能解析. 第 23 回日本薬物動態学会年会, 2008 年 10 月 30 日 (熊本).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

湯浅 博昭 (YUASA HIROAKI)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号: 20191471

### (2) 研究分担者

井上 勝央 (INOUE KATSUHISA)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号: 50315892  
太田 欣哉 (OHTA KINYA)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 90448704

### (3) 連携研究者

なし