

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590202

研究課題名(和文) 核酸代謝調節の臓器間ネットワークにおける核酸塩基トランスポーターの役割

研究課題名(英文) Physiological role of a novel nucleobase transporter in the utilization of extracellular purine nucleobases

研究代表者

井上 勝央 (Inoue, Katsuhisa)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50315892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸の主要な合成経路として、細胞外の核酸塩基やヌクレオシドを利用するsalvage経路が知られているが、核酸塩基の細胞内への供給に關与する輸送担体は不明である。本研究では、プリン核酸塩基を特異的に輸送する輸送担体としてENBT1を同定し、その輸送特性を明らかにした。ENBT1の発現は、核酸合成が盛んな肝臓で高いだけでなく、肺を含む多くの組織でも認められ、その輸送を介した細胞内へのプリン核酸塩基の蓄積は、その代謝酵素活性に依存することが示された。したがって、各組織への核酸塩基の分布は、各組織における細胞内の核酸塩基レベル、その代謝酵素及びENBT1の活性により、規定されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purine salvage pathway plays a major role in the production of nucleotides, relying heavily on the supply of nucleobases and nucleosides from extracellular sources. Although specific transporters have been suggested to be involved in facilitating their transport across the plasma membrane in mammals, those which are responsible for utilization of extracellular nucleobases remain unknown. In this research project, we identified ENBT1 as a facilitative and purine-selective nucleobase transporter that mediates, in cooperation with salvage enzymes, the cellular uptake of extracellular purine nucleobases, a key step in the efficient utilization of nucleobases.

研究分野：医療系薬学

キーワード：核酸塩基 トランスポーター 促進拡散 代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

核酸(核酸塩基、ヌクレオシド及びヌクレオチド)は、DNA や RNA のポリマー分子を介した遺伝情報の保持と読み出しをはじめ、ATP や NAD 等のモノマー分子による細胞のエネルギー代謝調節など、生命活動の維持に不可欠な基本構成成分である。核酸は体内でヌクレオチドの形で合成され、その生成過程には、アミノ酸や糖などを出発物質として一から合成する *de novo* 経路と食餌由来あるいは不要となった核酸(核酸塩基及びヌクレオシド)を再利用する salvage 経路が存在する。後者の経路は核酸塩基の合成に必要な多量の ATP を節約することができるため、多くの細胞は、主として salvage 経路を介したヌクレオチド合成を主体的に利用していると考えられている。

salvage 経路の第一段階は細胞外からの核酸塩基及びヌクレオシドの取り込みである。これらの核酸は、物理化学的に水溶性が高いため、単純拡散による細胞膜透過が低い。したがって、効率的な細胞内への核酸の取り込みを担う細胞膜トランスポーターの関与が古くから指摘されてきた。特にヌクレオシドに関しては、古くから様々な組織や臓器においてトランスポーターを介した輸送現象が確認されていたことから、精力的な輸送研究が行われ、現在ではヌクレオシドの取り込みに働くトランスポーターの分子実体として、ENTs/SLC28A ファミリー及びCNTs/SLC28 ファミリーに属するトランスポーター群が同定されている。

一方、ヌクレオシドの構成成分である核酸塩基の細胞内取り込みや膜透過に関する情報は少ない。1970 年代を中心に、主要な核酸塩基である hypoxanthine や adenine について培養細胞や赤血球などでの輸送について検討されて、その輸送は細胞内外の基質の濃度勾配に従う促進拡散型の輸送メカニズムであることが示唆されているが、その分子機構の解明には至っていないのが現状である。

最近、我々はゲノム情報を利用した *in silico* スクリーニングでトランスポーター様蛋白質をコードする遺伝子群を絞込み、その核酸塩基の輸送活性スクリーニングにより、新規な核酸塩基トランスポーターとして SNBT1/Slc23a3 を同定した (Yamamoto et al, *J Biol Chem*, 285, 522-531, 2010)。ラット SNBT1 は、小腸にのみに発現し、Na⁺ 依存的に uracil や hypoxanthine などの核酸塩基を輸送し、その機能はラット小腸における核酸塩基の輸送特性とよく合致することから、SNBT1 は消化管における核酸塩基の吸収に関与する分子実体であると考えられる。しかし、この SNBT1 の輸送特性は、これまでに確認されている促進拡散型の核酸塩基トランスポーターの特性とは大きく異なるため、SNBT1 以外の核酸塩基に特異的なトランスポーターの存在が考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類生物におけるプリン核酸代謝の調節機構の解明ならびにその機構に基づく薬の副作用発現や薬物送達への応用の可能性を明らかにするために下記の項目について検討した。

- (1) プリン核酸塩基の細胞膜透過に関わるトランスポーター分子の同定
- (2) プリン核酸塩基トランスポーターと核酸代謝酵素との関連性
- (3) 核酸塩基トランスポーターを介したプリン核酸塩基代謝調節の生理機構

3. 研究の方法

核酸塩基に特異的なトランスポーターを同定するため、ヒト及びマウス・ラット染色体データベースの情報をもとに、機能未知のトランスポーター及びトランスポーター様遺伝子の検索を行った。次に、候補遺伝子の cDNA を哺乳類発現ベクターに組み込み、HEK293 細胞に一過性に発現させ、³H]adenine の細胞内取り込み輸送活性を評価した。活性が認められた遺伝子がコードするトランスポーターを ENBT1 と命名し、その機能特性を明らかにするため、ENBT1 安定発現株を作製し、放射ラベルされたプリン核酸塩基の取り込み活性を指標に輸送解析を行った。

また、核酸塩基の輸送における代謝酵素との協奏的効果を検討するため、プリン核酸塩基の代謝酵素を欠損しているマウス皮膚線維芽細胞由来 A9 細胞を用い、ENBT1 及び核酸代謝酵素 (APRT、HPRT1) を一過性に発現させ、プリン核酸塩基の輸送について解析を行った。

4. 研究成果

(1) プリン核酸塩基の細胞膜透過に関わるトランスポーター分子の同定

一連の探索により得られた候補遺伝子を HEK293 細胞に一過性に導入し、³H]adenine の取り込み評価を行ったところ、ヒト SLC43A3 を発現させた細胞において顕著な取り込み活性の増大が認められた。そこで本遺伝子を安定導入した MDCK 細胞を作製し、同様の検討を行った結果、³H]adenine、³H]hypoxanthine 及び³H]guanine について高い輸送活性が認められた。一方、ピリミジン塩基である³H]uracil では、わずかな輸送活性のみであり、³H]adenosine、³H]thymidine、³H]uridine 等のプリン及びピリミジンのヌクレオシドに対する輸送活性は全く認められなかった。このことから本トランスポーターはプリン骨格を有する核酸塩基に特異的な基質認識性を示し、ピリミジン骨格を有する核酸塩基やヌクレオシドは基質としない可能性が示唆された。また、哺乳類における ascorbate のトランスポーターは原核生物の核酸塩基トランスポーターのオー

ソログであることから、 $[^{14}\text{C}]$ ascorbate の輸送についても検討したが、その輸送活性は認められなかった。以後の実験では、高い輸送活性の認められたプリン核酸塩基のひとつとして adenine を取り上げ、本トランスポーターの輸送機能評価を行った。

まず、その輸送機能の速度論解析を進めるにあたり、 $[^3\text{H}]$ adenine (5 nM) 取り込みの時間推移を確認した。本遺伝子を導入した細胞での $[^3\text{H}]$ adenine 取り込みは、mock 細胞での取り込みよりも著しく大きく、1 分程度までほぼ時間に比例して増大した。そこで以降の取り込み評価は 40 秒で行った。

本トランスポーターによる adenine 輸送の駆動力を調べるため、細胞外のイオン及び pH の影響について検討したが、いずれの影響も認められなかった。したがって、本トランスポーターは、促進拡散型の輸送様式により、adenine を細胞内外の濃度勾配に従って輸送しているものと考えられる。そこで本トランスポーターを ENBT1 (equilibrative nucleobase transporter1) と命名した。

ENBT1 による基質認識特性をさらに探るため、adenine 輸送に対する各種化合物の影響について検討を行った。先に輸送活性の認められた adenine、guanine、hypoxanthine は顕著な阻害効果を示し、プリン塩基ないし誘導体である purine や 6-thioguanine、mercaptapurine においても阻害効果が認められた。一方、ピリミジン塩基である thymine、uracil、cytosine、uracil の誘導体である 5-FU は阻害効果を示さず、adenosine をはじめとするプリン及びピリミジンのヌクレオシド類も阻害効果を示さなかった。これらの結果も、先の輸送活性評価の結果と一致しており、ENBT1 がプリン塩基に特異的であることを強く支持するものであった。また、ヌクレオシドトランスポーターの代表的な阻害剤である NBMPR による阻害効果の程度は小さく、ENBT1 の特性はヌクレオシドトランスポーター類とは大きく異なることが示唆された。その他の核酸塩基関連物質の中では、acyclovir、papaverine が阻害効果を示した他、核酸塩基輸送系の阻害剤として知られる decynium-22 が低濃度で非常に強い阻害効果を示した。

次に、ENBT1 による核酸塩基取り込みの速度論解析を行った。プリン核酸塩基 ($[^3\text{H}]$ adenine、 $[^3\text{H}]$ guanine、 $[^3\text{H}]$ hypoxanthine) の取り込み速度は、濃度の上昇に伴って増大し、一定値に近づく傾向を示した。すなわち、担体輸送に特徴的な取り込みの飽和性が見られた。この濃度依存的な取り込み速度の変化を Michaelis-Menten 型の担体輸送モデルで解析した結果、ENBT1 の adenine、guanine、hypoxanthine に対する Michaelis 定数 (K_m) は、それぞれ 0.94 μM 、1.70 μM 、1.32 μM と算出された。一方、 $[^3\text{H}]$ adenine 取り込みに対する guanine、hypoxanthine の IC_{50} 値は、それぞれ 70、350 μM と算出された。また、 $[^3\text{H}]$ hypoxanthine 取り込みに対する adenine の IC_{50}

値についても算出したところ、13 μM と算出された。

理論上、トランスポーターを介する輸送において、共通の結合部位で基質と阻害剤の競合が起こる場合、基質の K_m 値と IC_{50} 値は一致するが、ここで得られた値では大きな乖離が見られた。この要因として、細胞内でプリン核酸塩基をヌクレオチドに変換する salvage 酵素である APRT (adenine phosphoribosyl transferase)、HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) が ENBT1 を介した輸送活性に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

(2) プリン核酸塩基トランスポーターと核酸代謝酵素との関連性

APRT は、adenine を特異的に AMP へ変換する酵素であり、guanine、hypoxanthine を基質としない。同様に、HPRT1 は、hypoxanthine、guanine に対して特異的に働き、それぞれから IMP、GMP を合成する酵素である。したがって、両者の間には基質の交差性は認められない。また、これらの酵素の基質親和性は極めて高く、 K_m 値は数 μM とされている。そのため、トランスポーターに対する親和性が酵素に対する親和性より十分に低い場合、基質濃度が上昇すると、ENBT1 を介した膜輸送過程が機能的には飽和するには至らない状況下で、酵素反応の飽和現象を生じると考えられる。 $[^3\text{H}]$ adenine、 $[^3\text{H}]$ guanine、 $[^3\text{H}]$ hypoxanthine の取り込みの見かけの K_m 値は、APRT、HPRT1 による酵素反応の K_m 値と同水準にあることから、取り込み課程の律速段階は酵素反応であると考えられ、見かけの K_m 値は ENBT1 に対してではなく、酵素への親和性を反映している可能性が示唆された。一方、 IC_{50} 値の評価においては、 $[^3\text{H}]$ adenine 取り込みに対する hypoxanthine、guanine の阻害効果は、トランスポーターである ENBT1 に対する直接的な阻害効果を反映したものになっていると考えられる。同様の考察が $[^3\text{H}]$

hypoxanthine 取り込みに対する adenine の IC_{50} 値にも適応できる。したがって、各プリン塩基の ENBT1 に対する IC_{50} 値が、それぞれの ENBT1 に対する親和性を表しているものと考えられ、その値から推測される K_m 値は APRT あるいは HPRT1 に対する K_m の 10 ~ 300 倍となっており、ENBT1 に対する親和性は相対的に低いことが示唆された。

そこで、ENBT1 の輸送活性に及ぼすプリン塩基の salvage 酵素の影響を検討するため、APRT/HPRT1 欠損型 A9 細胞を用いてプリン核酸塩基の取り込みを評価した。A9 細胞自体の $[^3\text{H}]$ adenine 取り込み活性は低く、ENBT1 の導入でも、その活性の増大は認められなかった。しかし、adenine の代謝酵素である APRT を ENBT1 と共に導入した A9 細胞では、顕著な $[^3\text{H}]$ adenine の取り込みの増大が見られた。guanine に関しても、同様に、ENBT1 の単独導入による取り込み上昇は見られなかった

が、HPRT1 と ENBT1 との共導入により、取り込み上昇がみられた。これらは、adenine 及び guanine に特異的な代謝酵素の存在下では、細胞内の核酸代謝が亢進し、ENBT1 による各核酸塩基の輸送が効率的に進行することを示唆するものである。

一方、古くから研究で用いられる細胞株である HeLa 細胞において、ENBT1 介在性の ^3H adenine 取り込みが認められたため、内因性の ENBT1 及び APRT の遺伝子発現抑制の効果を検討したところ、ENBT1 の発現抑制により ^3H adenine 取り込みは著しく低下し (70%程度)、APRT の発現抑制の効果 (60%程度の低下)をやや上回るレベルに達した。salvage 経路による adenine の代謝過程において、ENBT1 を介する取り込み輸送が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

(3) 核酸塩基トランスポーターを介したプリン核酸塩基代謝調節の生理機構

核酸代謝調節に関わる ENBT1 の生理機能を探るため、ENBT1 の臓器分布及び細胞内分布について検討した。ENBT1 の mRNA は、全ての臓器において高いレベルで発現していたが、特に肝臓と肺での発現が高いことが明らかとなった。また、肝臓及び肺の組織の免疫染色により、ENBT1 は肝実質細胞及び肺胞上皮細胞に発現していることが明らかとなった。さらに、肝臓においては、組織の蛍光免疫染色により、ENBT1 は肝実質細胞の類洞膜 (血管側膜) に局在することが明らかとなった。

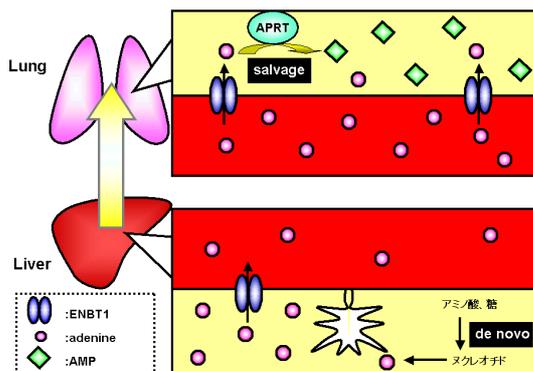


図 1 臓器間での ENBT1 を介した核酸代謝

これらのことから、ENBT1 の生理的役割を以下のように考察した (図 1)。すなわち、*de novo* 経路が活発に働く肝臓では、核酸塩基が多量に生成されて、他の諸臓器への供給源となっており、その際における肝実質細胞から血中への排出輸送経路として、ENBT1 が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。核酸塩基の供給を受ける側の諸臓器では、ENBT1 が核酸塩基の取り込み輸送経路として働き、細胞内の核酸代謝酵素と連携して構成される salvage 経路の最初の段階の役割を担っているものと考えられる。また、恒常的に強い酸化的ストレス等に曝され易く、それ

に由来する損傷の修復等のために高い salvage 経路活性を有する肺においては、肝臓と並んで ENBT1 の発現が高くなっている可能性が考えられる。これは、トランスポーターによる輸送と代謝酵素による代謝を切り離して考えるのではなく、一連の連携した機能として捉えることが重要である事例として注目される。また、本研究の成果は、核酸代謝の異常を端とするような病態の解析や、核酸類似薬物などの薬物療法を最適化するための基礎情報として有用と考えられる。

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 5 件)

Mai Furumiya M, Katsuhisa Inoue, Kinya Ohta, Yayoi Hayashi, Hiroaki Yuasa: Transcriptional regulation of PCFT by KLF4, HNF4 α , CDX2 and C/EBP α : implication in its site-specific expression in the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 431, 158 - 163, 2013.

Svetlana M. Nabokina, Katsuhisa Inoue, Veeramani S. Subramanian, Judith E. Valle, Hiroaki Yuasa, Hamid M. Said: Molecular identification and functional characterization of the human colonic thiamine pyrophosphate transporter. *J. Biol. Chem.*, 289, 4405 - 4416, 2014.

Mai Furumiya, Katsuhisa Inoue, Chihiro Nishijima, Takahiro Yamashiro, Erina Inaoka, Kinya Ohta, Yayoi Hayashi, Hiroaki Yuasa: Noncompetitive inhibition of proton-coupled folate transporter by myricetin. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 29, 312 - 316, 2014.

Katsuhisa Inoue, Hiroaki Yuasa: Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 29, 12 - 19, 2014.

Mai Furumiya, Takahiro Yamashiro, Katsuhisa Inoue, Chihiro Nishijima, Kinya Ohta, Yayoi Hayashi, Hiroaki Yuasa: Sustained inhibition of proton-coupled folate transporter by myricetin. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 30, 154 - 159, 2015.

[学会発表] (計 9 件)

Katsuhisa Inoue, Hiroaki Yuasa: Molecular and functional identification of novel transporters. 27th The Japanese Society for the Study of Xenobiotics Annual Meeting. Nov. 20 - 22, 2012 (Tokyo, Japan).

古川純士, 井上勝央, 太田欣哉, 湯浅博昭: 核酸塩基利用における新規核酸塩基トランスポーターと核酸代謝酵素の機能的協働効果. 第28回日本薬物動態学会年会, 2013年10月9日-11日(東京)

伊藤悠子, 太田欣哉, 井上勝央, 湯浅博昭: aquaporin 10 の新たな機能としての核酸塩基輸送: HEK293 細胞一過性発現系における uracil 輸送の解析. 日本薬学会第134年会, 2014年3月28日-30日(熊本)

Katsuhisa Inoue: Molecular mechanism of intestinal folate absorption and its modulation by flavonoids. 2nd Asian International Symposium of Traditional Medicines, May 10, 2014 (Tokyo, Japan).

古川純士, 井上勝央, 太田欣哉, 湯浅博昭: 新規促進拡散型核酸塩基トランスポーターの機能解析: 核酸代謝酵素との機能的協働. 第9回トランスポーター研究会年会, 2014年6月14日-15日(名古屋)

井上勝央: 核酸塩基トランスポーターの同定とそのDDSへの応用. 第30回日本DDS学会, 2014年7月30日-31日(東京)

井上勝央: トランスポーターと代謝酵素との協奏効果を利用した医薬品の標的化. 第4回理研公開シンポジウム, 2014年9月26日(東京)

Furukawa M, Katsuhisa Inoue, Kinya Ohta, Hiroaki Yuasa: Functional characterization of a novel nucleobase transporter: cooperation with salvage enzymes in cellular nucleobase utilization. 19th NA ISSX/29th JSSX Meeting, Oct. 19 - 23, 2014 (San Francisco, California, U.S.A.).

古川純士, 井上勝央, 太田欣哉, 湯浅博昭: 核酸塩基利用における核酸塩基トランスポーターENBT1と核酸代謝酵素との協働効果. 第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2014年11月20日-21日(徳島)

〔図書〕(計 件)

井上勝央, 湯浅博昭: メトトレキサートによる関節リウマチ治療と葉酸トランスポーター. 「トランスポーターと疾患研究

の最前線(別冊・医学のあゆみ)」, 楠原洋之編, 医歯薬出版, pp. 127 - 132, 2014.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 勝央 (INOUE Katsuhisa)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 50315892

(2) 研究分担者

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

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