

博士論文

促進性グルコーストランスポーターGLUT12の  
機能と発現に関する研究

令和 2 年 9 月

松尾 俊佑

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士後期課程 薬科学専攻

## 目次

参考文献	2
略語	3
第一章 序論	5
第二章 実験材料と方法	10
第三章 結果	19
第四章 考察、展望	36
引用文献	42
謝辞	48

## 参考論文

### **Functional characterization and tissue localization of the facilitative glucose transporter GLUT12.**

Shunsuke Matsuo, Miki Hiasa, and Hiroshi Omote

*The Journal of Biochemistry* (in press)

## 略語

ATP	adenosine 5'-triphosphate
ADP	adenosine 5'-diphosphate
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
cDNA	complimentary DNA
cpm	count per minute
Da	Dalton
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DDW	distilled water
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
DTM	n-decyl- $\beta$ -D-thiomaltopyranoside
DTT	dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence amplification
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
G3PDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
HBSS	Hank's balanced salt solution
HRP	horseradish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
O.D	optical density
OG	n-octyl- $\beta$ -D-glucoside
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride
RI	radioisotope

RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TB	terrific broth
TBS	tris-buffered saline
tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

#### アミノ酸の一文字表記

G	glycine	A	alanine	M	methionine
V	valine	L	leucine	F	phenylalanine
I	isoleucine	S	serine	Y	tyrosine
T	threonine	D	aspartic acid	W	tryptophan
N	asparagine	E	glutamic acid	H	histidine
Q	glutamine	K	lysine	P	proline
R	arginine	C	cysteine		

#### DNA の一文字表記

A	adenine	T	thymine
G	guanine	C	cytosine

## 第一章 序論

多くの細胞にとってグルコースは解糖系やTCA回路で代謝されてエネルギーを生み出すだけでなく、様々な生体物質へ転換される必須な栄養素である。グルコースは細胞膜上にある **facilitative glucose transporter (GLUT)** や、**sodium-glucose cotransporter(SGLT)**によって細胞内に取り込まれ利用される。GLUT はMFS(Major Facilitator Superfamily)に属する12回膜貫通型のトランスポーターで細胞膜に発現し、受動輸送である促進拡散によってグルコースを取り込むことが知られている(1)。細胞内に取り込まれたグルコースはヘキソキナーゼによってグルコース-6-リン酸に変換されるため、一方向性のグルコース取り込みが受動輸送によって起きる(2)。一方でSGLTは細胞内外のナトリウム濃度勾配を駆動力としてグルコースを能動輸送するグルコースとナトリウムの共輸送体である(3)。SGLTが小腸や腎臓の刷子縁膜に発現しグルコースの体内への吸収に関わるのに対し、GLUTはほとんどの細胞に存在して細胞膜を隔てたグルコース輸送とグルコースホメオスタシスに関わっている。

GLUTには14のサブタイプが知られており、アミノ酸配列の相同性によりクラスI~IIIに分けられる(図1)。クラスIにはGLUT1~4、14が含まれる。その中でもGLUT1、GLUT4は疾患に関わることから特に研究が進められている(2,3)。GLUT1は多くの細胞に発現しているが、特に赤血球や血液脳関門では主な糖輸送体として機能している(4,5)。また、がん細胞に多く発現しており、大量のエネルギーを消費するがん細胞へのエネルギー供給経路になっている(2,6)。GLUT4は筋肉や脂肪組織に発現するインスリン感受性のトランスポーターであり、インスリン刺激によって細胞内小器官から細胞膜上に移動し血中のグルコースを細胞内に取り込む(7)。低親和性のグルコーストランスポーターとして知られるGLUT2は小腸において基底膜側に発現しておりグルコースの放出、拡散に関わっている(8)。クラスIIには小腸でフルクトースを細胞内に輸送するGLUT5や、尿酸を基質とするGLUT9などがある(9-11)。GLUT7、GLUT11の機能は解明されていない。クラスIIIにはGLUT6、8、10、12、13が分類される。クラスIIIの特徴としてN末端に細胞内膜系への発現シグナル配列であるダイロイシンモチーフを有する(1)。これにより、細胞膜上のみでなく小胞や分泌顆粒などの細胞内小器官での機能が示唆される。これまでの報告ではGLUT8、GLUT10

がそれぞれ分泌小胞やミトコンドリアに発現していること、グルコース以外にデヒドロアスコルビン酸を輸送することがわかっている(12-15)。また GLUT13 は脳の神経に発現しており、グルコースを輸送しないがプロトンと *myo*-イノシトールを共輸送する能動輸送体として機能するなど、細胞膜上で機能する他のクラスとは異なる性質を有するものが多い(16, 17)。

GLUT12は2002年に乳がん細胞ライン化細胞のMCF-7から発見された(18)。GLUT12 はがん細胞だけでなく骨格筋や脂肪細胞、小腸、胎盤、心臓、前立腺、脳、腎臓など生体に広く分布している(18, 19)。また、遠位尿細管や集合管では細胞のアピカル側に発現していることが報告されている(20)。GLUT12 はクラス IIIのその他の GLUT と同様に細胞内在性を示しており、代謝組織では GLUT4 と同様にインスリン感受性も報告されている(21)。近年では、がん細胞の浸潤や増殖に関与する事が明らかになり、がん治療のターゲット候補として注目され始めている(22, 23)。しかし基質に対する速度論解析や細胞内局在を解析した報告はなく、その生理機能は不明なままである。近年になってプロトン勾配やナトリウムイオン勾配で輸送が制御される事が報告され、GLUT 共通の性質である促進拡散だけでなく能動輸送を行う可能性が示唆された(24, 25)。これまで GLUT ファミリー内でグルコースを能動輸送するトランスポーターは確認されておらず、非常に大きな発見である。しかし、Wilson-O'Brien らが MDCK 細胞を用いて、プロトン勾配形成によりグルコース輸送量が増加することを示したが、Pujol-Giménez らのアフリカツメガエル卵細胞を用いた研究ではナトリウムイオンの存在によってグルコース輸送量は増大する一方で、プロトンは輸送量に影響しなかった。このように、これら能動輸送に関する結果は一致しておらず、詳細は不明なままである。GLUT の生理機能解明を困難にしている原因のひとつが輸送活性測定系にあると考える。

これまで行われてきているグルコース輸送実験の多くはアフリカツメガエル卵細胞や CHO 細胞などを用いた培養細胞系の実験である。GLUT 本来の基質である D-グルコースは細胞内で代謝されるため、正確な輸送量を測定することができない。そのため 2-デオキシグルコース(2-DG)が用いられているが、2-DG も細胞内でヘキソキナーゼにより代謝されるため、この酵素の活性の影響下での測定となる(図 2)(26)。一方で、大腸菌での発現・精製再構成系を用いれば、目的のトランスポーターを大量に発現・精製することが可能で、リポソームに再構成することでその他のタンパク質の影響や細胞内代謝を気にすることなく本来の

基質であるグルコースを用いた迅速な実験が可能である。このようなシステムでの解析は GLUT12 では行われていなかった。内膜系での機能や、輸送メカニズムが明らかになっていない GLUT12 の解析はグルコース動態や GLUT クラス III の働きを知る上で非常に重要であると考えられる。そのため本研究では GLUT12 の精製・再構成系を構築し、グルコース輸送解析を行った。

また、GLUT12 は骨格筋や脂肪組織、腎臓などの組織での発現が報告されているが、クラス III のその他 GLUT と同様に、乳腺上皮細胞や MDCK 細胞では細胞内組織に発現することがわかっている(12, 18, 24, 27-31)。このことは、インスリン依存性のグルコース輸送だけがその機能ではないことを示唆している。そのため、グルコース輸送解析に加えて、マウス組織を用いて腎臓や小腸、そしてこれまで解析がされていなかった内分泌系での GLUT12 の詳細な発現部位の解析を行った。

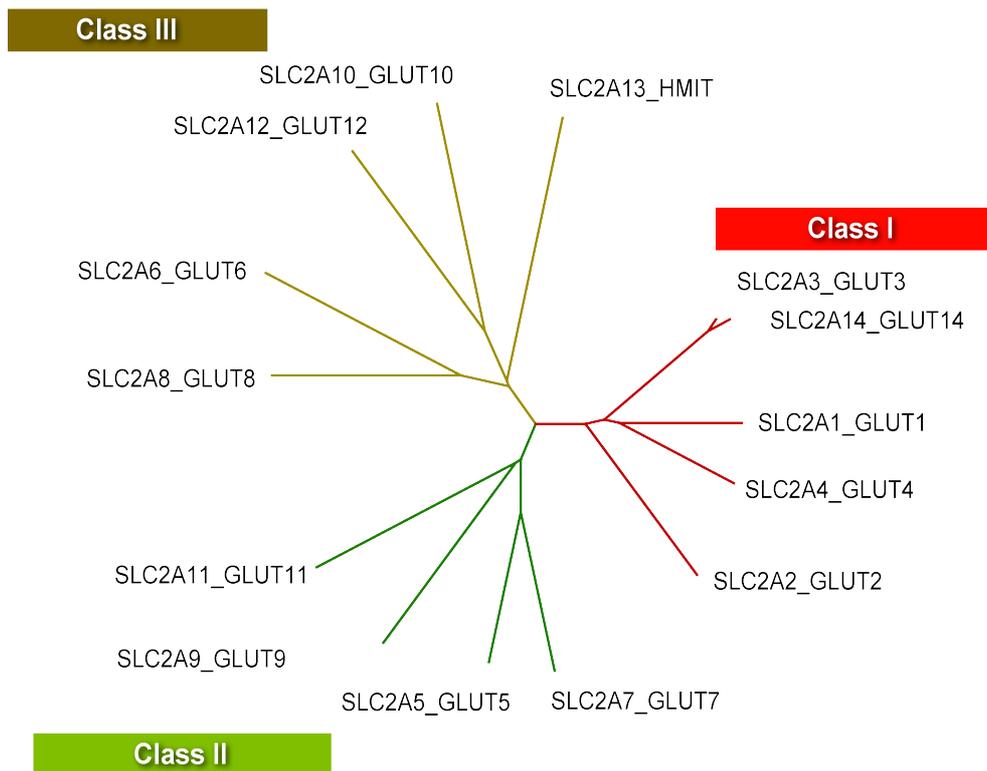


図 1 GLUT ファミリー

GLUT は SLC2 ファミリーに属するグルコーストランスポーターである。アミノ酸の相同性により、クラス I～III に分類され、14 のサブタイプが存在する。

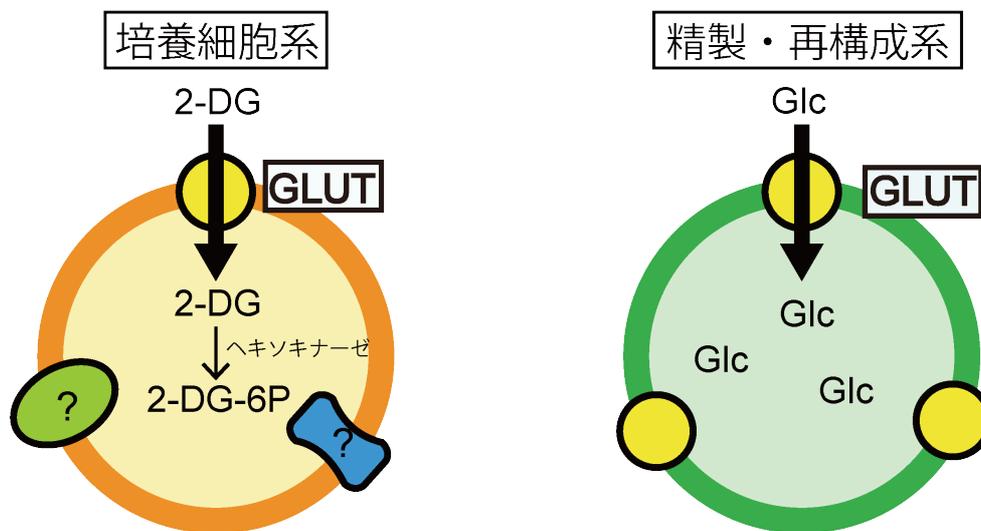


図2 培養細胞系と精製再構成系

培養細胞を用いた実験では、細胞内代謝や細胞内物質、その他のトランスポーターの影響を受ける可能性がある。精製・再構成系ではGLUTのみの機能を測定することができ、GLUT本来の基質であるグルコースの使用が可能である。

## 第二章 実験材料と方法

### <大腸菌発現用プラスミドの作製>

ヒト GLUT1(Mammalian Gene Collection clone ID:40085220)、ヒト GLUT12(clone ID:30371087)の 5'-末端、3'-末端由来の配列にベクター末端配列に相同な 15 塩基を 5'-末端に付加したプライマーを用いて PCR を行った。反応液(全量 16  $\mu$ L)の組成は下記の通りである。

鋳型 DNA	0.5 $\mu$ L
2.5 mM dNTP mix	2.0 $\mu$ L
10 $\mu$ M forward primer	2.0 $\mu$ L
10 $\mu$ M reverse primer	2.0 $\mu$ L
10 $\times$ Pfx50 PCR buffer	1.6 $\mu$ L
Pfx50 DNA polymerase (Invitrogen)	0.3 $\mu$ L

各プライマー配列は以下の通りである。

#### hGLUT1

forward primer 5'- CGGGGGATCCGAATTCATGGAGCCCAGCAGCAAGAA -3'

reverse primer 5'- CGCACCTCATCTCGAGCACTTGGGAATCAGCCCCCAG -3'

#### hGLUT12

forward primer 5'- CGGGGGATCCGAATTCATGGTACCTGTTGAAAACAC -3'

reverse primer 5'- CGCACCTCATCTCGAGGGTCTCTGGAGAAAGCTGCCT -3'

各遺伝子において以下のサイクルを行った。

94°C	2 分	} 25 サイクル
94°C	30 秒	
55°C	30 秒	
68°C	3 分	
68°C	5 分	

各 PCR 産物 30 ng と、EcoRI、XhoI、High buffer を含む反応液で 37°C、4 時間制限酵素処理した  $\beta$ -pET-28a(+)- $\alpha$  ベクター 50 ng を混合し、In-fusion HD enzyme (TaKaRa) 0.5  $\mu$ L を加え、全量を 5  $\mu$ L とし、50°C で 30 分反応させた。これをコンピテントセル DH5 $\alpha$  に加え、30 分氷上に置いた後、42°C で 45 秒ヒートショックし、SOC 培地 250  $\mu$ L を加えた。37°C で 1 時間置いた後、30  $\mu$ g/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地で一晚培養した。得られたコロニーから 30  $\mu$ g/mL のカナマイシンを含む LB 培地で大腸菌を培養し、ミニプレップ法によりプラスミドを回収した。このプラスミドの塩基配列を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いて DNA シーケンサー (ABI 3500 ジェネティックアナライザ) で確認した。

#### <タンパク質の発現と精製>

精製には Shani Leviatan らの方法を用いた(32)。各 GLUT 大腸菌発現用プラスミドを大腸菌 C43(DE3)株にヒートショック法により導入し、30  $\mu$ g/mL カナマイシンを含む TB 培地 [12% trypton、24% yeast extract、170 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、550 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、4% グリセロール] で、37°C で培養した。O.D<sub>600</sub> が 0.6 となったら終濃度が 1 mM となるように IPTG、10 mM となるように D-グルコースを加えて 12°C で 16 時間培養し、タンパク質の発現を誘導した。以降の全ての操作は 4°C で行った。

その後、遠心操作 (1,200  $\times$ g、15 分、4°C) で菌体を回収した。これを sonication buffer [50 mM MOPS-Tris pH 8.0、100 mM NaCl、10 mM KCl、20% グリセロール、10  $\mu$ g/mL leupeptin、10  $\mu$ g/mL pepstatin A、1 mM PMSF] に懸濁し、遠心 (5,900  $\times$ g、10 分、4°C) して上清を除いた。再び sonication buffer で菌体を懸濁し、ソニケーション (SONICS 社 VC-505、出力 25%、30 秒 $\times$ 8 回) により菌体を破砕した後、遠心 (5,900  $\times$ g、10 分、4°C) した。上清を回収し、再び遠心 (5,900  $\times$ g、5 分、4°C) した。上清を回収し、超遠心 (120,000  $\times$ g、1 時間、4°C) により得られた沈澱物を膜画分とした。これを solubilization buffer [50 mM MOPS-Tris pH 8.0、100 mM NaCl、10 mM KCl、10% グリセロール、10  $\mu$ g/mL leupeptin、10  $\mu$ g/mL pepstatin A、1 mM PMSF] に懸濁し、タンパク質濃度を測定した後 10 mg/mL となるよう solubilization buffer で希釈した。終濃度 1.5%(w/v)となるよう Fos-

Choline 14 (affymetrix) を加え、氷上で 15 分間可溶化した。超遠心 (210,000 ×g、30 分、4°C) により得られた上清を可溶性画分とした。

Ni-NTA super flow レジン (Qiagen) 1 mL に solubilization buffer で 2 倍希釈した可溶性画分を 2 時間転倒混和し吸着させた。混合液をカラム (1.0×5 cm) に充填し、これを 10 mL の wash buffer I [50 mM MOPS-Tris pH 8.0、100 mM NaCl、10 mM KCl、10% グリセロール、5 mM イミダゾール、0.1% DTM、10 µg/mL leupeptin、10 µg/mL pepstatin A、1 mM PMSF] で洗浄し、次いで 20 mL の wash buffer II [50 mM MOPS-Tris pH 8.0、10% グリセロール、45 mM イミダゾール、0.1% DTM (affymetrix)] で洗浄した後に、3 mL の elution buffer [50 mM MOPS-Tris pH 7.0、300 mM イミダゾール、20% グリセロール、0.1% DTM] で溶出した。

#### <リポソームの調製>

大豆の L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (Sigma type II-S) を 20 mg 試験管に計りとり、20 mM MOPS-NaOH pH 7.0、1 mM DTT を 2 mL 加えた。チップ式ソニケーター (SONICS 社 VC-505、出力 25%)にて、液が澄明で均一となるまでソニケーションを行った。

500 µL ずつチューブに分注して使用時まで-80°Cにて保管した。

#### <蛋白質定量>

##### BIO-RAD protein assay kit (Bio-Rad)

総量 800 µL になるように蒸留水でタンパク質溶液を希釈した。200 µL の BIO-RAD Protein Assay 試薬 (Bio-Rad) を加え、ボルテックスし、O.D<sub>595</sub> の吸光度を分光光度計 (UV-1800: 島津製作所) で測定した。牛血清アルブミン (BSA) をスタンダードとして、タンパク質量を定量した。

### Schaffner & Weissmann 法(33)

総量 300  $\mu$ L になるようにタンパク質溶液を蒸留水で希釈し、A 液 [1 M Tris-HCl pH 8.0, 1%(w/v) SDS] 30  $\mu$ L を加え懸濁した。B 液 [50%(w/v) TCA] を 100  $\mu$ L 加え懸濁し、15 分以上室温放置した。ニトロセルロースメンブレンフィルター (pore size 0.45  $\mu$ m ; ADVANTEC) に吸引濾過した。ニトロセルロースメンブレンを C 液 [5% TCA] で洗い、staining solution [Amido scwartz 10B 0.2 g、メタノール 90 mL、酢酸 20 mL] で 5 分間染色した。Destaining solution [メタノール:蒸留水:酢酸=90:8:2 by volume] でバックグラウンドが白くなるまで脱色し、elution solution [50%(v/v) エタノール、25 mM NaOH、50  $\mu$ M EDTA] 3 mL で溶出した。数回ボルテックスし、完全に溶出した後、O.D<sub>630</sub> の吸光度を測定した。

### <SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロット法>

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemili らの方法で行った(34)。サンプルは、1  $\times$  SDS Sample Buffer [2% SDS、2%  $\beta$ -メルカプトエタノール、10% glycerol、125 mM Tris/HCl pH 6.8、0.02% Bromophenol blue] にて変性 (30 分、室温) させた。Electrode buffer [12 mM Tris、0.72% Glycine、0.013% EDTA、0.025% SDS]、11%のポリアクリルアミドで、10 mA、約 16 時間電気泳動した。CBB 染色は泳動後のゲルを CBB 染色液 [5% 酢酸、50% メタノール、0.25% CBB] に入れ、約 30 分染色した。固定液 [20% メタノール、10% 酢酸] で 30 分振盪し、その後バックグラウンドが透明になるまで脱色液 [5% メタノール、7% 酢酸] で脱色した。

ウエスタンブロットでは泳動後のゲルから蛋白質をニトロセルロースメンブレン (pore size 0.45  $\mu$ m ; ADVANTEC) に blotting buffer [25 mM Tris、1% Glycine、0.02% SDS、20% メタノール]、0.35 A の電流にて 2 時間転写し、その後メンブレンを 0.5% BSA を含む TEN buffer [25 mM Tris-HCl pH 7.4、1 mM EDTA、140 mM NaCl] にて 3 時間ブロッキングした。次いで 0.5%の BSA を含む TEN buffer で 100-1,000 倍に希釈した一次抗体(GLUT1 : GTX100684、GLUT12 : GTX37419 ; GenTex)と室温にて 2 時間反応させた。メンブレンを、wash buffer [0.1% Tween 20 (和光純薬) を含む TEN buffer] を用いて、室温 10 分 $\times$ 3 回洗浄し、wash buffer

で 2,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Organon Teknica) と室温にて 30 分反応させた。反応後、wash buffer で、随時液を交換しながらメンブレンを 2-3 時間室温にて洗浄した。最後に、ECL kit (Amersham Bioscience) を用い抗体のシグナルを検出した。

#### <GLUT による D-グルコース輸送活性測定>

10 mM MOPS-Tris pH 7.5、2 mM MgSO<sub>4</sub>、20 μg 精製 GLUT、2 mg リポソーム、0.5% OG(affymetrix)を混合し、氷上で 15 分間可溶化した後、-80 °Cにて 15 分間静置した。凍結後これを取り出し、迅速に解凍し、その後直ちに dilution buffer [10 mM MOPS-Tris pH 7.5、2 mM MgSO<sub>4</sub>] にて 50 倍以上に希釈し、130,000 ×g、4°Cで 1 時間遠心した。ペレットを dilution buffer 200 μL で懸濁し、再構成プロテオリポソームを得た。

Dilution buffer にリポソームと終濃度が 0.2 mM になるよう [<sup>3</sup>H]D-グルコース (放射比活性 1 MBq/μmol) を加え、20 °C水浴で 30 秒反応させた。反応液を分取し、ニトロセルロースメンブレンフィルター (pore size : 0.22 μm GSWP ; Millipore)に通した。氷上で冷やした dilution buffer 2 mL を 3 回通し洗浄した。メンブレンフィルターをクリアゾル 6 mL に入れ、含まれる放射能 (リポソーム内に取り込まれた基質の量に相当する) を液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 4810TR ; パーキンエルマー) により計測した。各阻害剤は 20 °Cで 10 分間プレインキュベーションした。フロレチンは 100%の DMSO で溶解し、反応液中の DMSO 濃度は 1%以下になるよう調整した。

#### <データ解析>

測定値は、平均±標準誤差で示した。統計学的有意差は、one-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Dunnett 法を用いて検定した。\**p* < 0.05 で示した。

## <免疫組織化学>

### マウス灌流固定

7週齢オスのC57BL/6マウスを麻酔し、腹部・胸部を切開して肝臓・心臓を露出した。左心室にカニューレを挿入して右心房に切り込みを入れてから、HBSS [10×HBSS(GIBCO)を希釈し、1.26 mM CaCl<sub>2</sub>、0.49 mM MgCl<sub>2</sub>、0.83 mM MgSO<sub>4</sub>、0.35 g/mL NaHCO<sub>3</sub>、フェノールレッドを添加して1×溶液を作製] を灌流し、肝臓が灰褐色になるまで脱血した。脱血後、固定液 [4% パラホルムアルデヒド(ナカライテスク)、0.2% ピクリン酸(和光純薬)を含む0.1 M ナトリウムリン酸緩衝液(pH 7.4)] を10分間灌流して固定した。マウスから組織を採取し、固定液に30分間漬けて追加固定した後、PBSで10分間×3回洗浄した。10%、15%、20% ショ糖を含むPBSに4時間×2回ずつ浸漬して脱水した後、O.T.C.compound(SAKURA)に包埋して液体窒素で凍結し、Cryostat 2800 Frigocut-E(Leica)により厚さ6µmの凍結切片を作製した。切片はMASコートスライドガラス(松浪ガラス)に採り、30分間風乾してから染色に使用するまで-80℃保存した。

### 間接蛍光法による組織切片の免疫染色

切片を0.1% TritonX-100を含むPBSで、室温で30分間処理して脂質膜を可溶化した。PBSで2回洗浄した後、2% ヤギ血清(GIBCO)と0.5%(w/v) BSAを含むPBSで、室温で30分間ブロッキングした。一次抗体を室温で1時間反応させた後、PBSで洗浄(5分間×4回)して一次抗体を除いた。その後、二次抗体を室温で1時間反応させ、PBSで洗浄(5分間×7回)して二次抗体を除いた。Perma Flour Aqueous Mountant(IMMUNON)で切片を封入した後、共焦点レーザー顕微鏡 OLYMPUS FV300(OLYMPUS) または蛍光顕微鏡 Olympus BX60(OLYMPUS)で観察した。

## HRP 法による組織切片の免疫染色

切片を 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含むメタノールで 30 分間内在性ペルオキシダーゼ不活化処理を行った。0.05% Tween20 を含む PBS(PBST)で洗浄し、1.5% ヤギ血清 (GIBCO)を含む PBS で、室温で 30 分間ブロッキングした。一次抗体を室温で 1 時間反応させた後、PBST で洗浄(5 分間×4 回)して一次抗体を除いた。その後、二次抗体を室温で 30 分間反応させ、PBST で洗浄(5 分間×4 回)して二次抗体を除いた。VECTASTAIN ABC kit(Vector)で室温、30 分反応させた後、PBST で 10 分間×4 回洗浄し、DAB 反応を 1-2 分間行った。その後、ddw で洗浄して DAB を洗浄した。切片を封入した後、蛍光顕微鏡 Olympus BX60(OLYMPUS)で観察した。

### <一次抗体>

抗マウス GLUT12 ウサギ抗血清

(マウス GLUT12 ペプチド(560-CSLEQISVELAKANYVK-576)から作製)

: 200 倍希釈

使用した一次抗体はシグマアルドリッチに受託依頼し作製した。抗体作製に使用したペプチド領域はその他 GLUT と交差性のない細胞質側に露出した部分であり、ウエスタンブロット法により、ヒト GLUT1、マウス GLUT6, マウス GLUT8, マウス GLUT10, マウス GLUT13 と交差性がないことを確認している。ヒト GLUT1 とマウス GLUT1 のアミノ酸配列の同一性は 97% である。

### <二次抗体>

Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes、A-11034)

: 500 倍希釈

Biotinylated anti-rabbit IgG 抗体 (フナコシ) : 500 倍希釈

## <RT-PCR>

### Total RNA の調製

C57BL/6 マウス(オス、7 週齢)より臓器を採取した。750  $\mu$ L の ISOGEN II (ニッポンジーン)を加え、ホモジナイズした後、常温で 15 分間静置した。12,000  $\times$ g、室温で 15 分間遠心した。水層を回収し、等倍量のイソプロパノールを加えて混和した後、12,000  $\times$ g、室温で 10 分間遠心した。上清を除き、0.5 mL の 75% エタノールで 1 度洗った後、上清を完全に除き、DEPC 処理した超純水に懸濁して total RNA を得た。

### Total RNA の精製

RNeasy mini kit(QIAGEN)を用いた。調製した total RNA に DNase I buffer、400 U/mL Ribonuclease inhibitor、200 U/mL DNase I を添加し、37°C で 30 分間インキュベートして DNase 処理した。350  $\mu$ L の RLT buffer を加えて混和し、250  $\mu$ L の 100% ethanol を加え、RNeasy スピンカラムに充填して 16,000  $\times$ g、常温で 15 秒間遠心した。500  $\mu$ L の RPE buffer を添加し、16,000  $\times$ g、常温で 2 分間遠心した。RNase free water を添加して常温で 1 分間静置後、16,000  $\times$ g、常温で 1 分間遠心し、精製 total RNA を得た。

### 逆転写反応

精製した total RNA 1  $\mu$ g に、Prime Script RT Master Mix(タカラバイオ)を添加し、RNase free water で全量を 20  $\mu$ L にした後、37°C で 15 分間、85°C で 5 秒間反応させた。

### PCR

逆転写反応産物に PCR 反応液(Q5 DNA ポリメラーゼ(NEW ENGLAND Biorabs) 0.1 nit、dNTP 0.2 mM、各プライマー 5 pmol)を調整し PCR を行った。ポ

ジティブコントロールにはハウスキーピング遺伝子である G3PDH を用いた。目的産物の増幅に用いたプライマーとその増幅産物(bp)は以下に記した。PCR 反応産物に loading buffer(TaKaRa)を混ぜ、5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後のゲルを ethidium bromide で 30 分間染色した後、UV にてシグナルを検出した。

<増幅プライマー>

mGLUT12 (139 bp)

forward primer 5'- CAGTCGTCCCAGCTGCTTACAA -3'

reverse primer 5'- ATGGCGCGGCCTCTAATTC -3'

mG3PDH (150 bp)

forward primer 5'- TGTGTCCGTCGTGGATCTGA -3'

reverse primer 5'- TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG -3'

各遺伝子において以下のサイクルを行った。

98°C	30 秒	} 31 サイクル
98°C	30 秒	
60°C	30 秒	
72°C	10 秒	

## 第三章 結果

### <各 GLUT の精製>

今回の研究では、コントロールとして GLUT1 を用いた。本来であればコントロールとして GLUT12 と同じクラスIIIの GLUT を用いるべきであると考えが、クラスIIIは機能解析が進んでおらず、新規に機能解明する GLUT12 のコントロールとしては不相当と判断した。そこでクラスは異なるが、GLUT の中で最も解析が進んでいる GLUT1 をコントロールとして使用した。

ヒト GLUT1、ヒト GLUT12 の N 末端と C 末端に親水性の  $\alpha$ ヘリックスタンパク質 (YaiN、YbeL) を融合したタンパク質を発現するプラスミドを作成した。この大腸菌発現用プラスミドを導入した大腸菌 C43(DE3)株を 12°Cで培養し IPTG で発現を誘導した。大腸菌をソニケーションで細胞破碎後、界面活性剤 Fos-Choline 14 で膜タンパク質を可溶化し Ni-NTA カラムクトグラフィーにより GLUT を精製した(図 3)。GLUT1、GLUT12 いずれにおいてもタンパク質の回収量は VGLUT や VNUT に比べると低く、培養液 2 L から約 0.5 mg であった。精製 GLUT を SDS-電気泳動およびウエスタンブロットで解析するとアミノ酸配列から計算された分子量よりやや小さな分子量の位置にメジャーバンドとして泳動された。GLUT1 においては理論値より低い分子量の位置にバンドが出る傾向がある(35, 36)。また、精製度は GLUT1、GLUT12 それぞれ 40.6%、45.6%であったが輸送活性測定には問題ない精製度であると判断した。

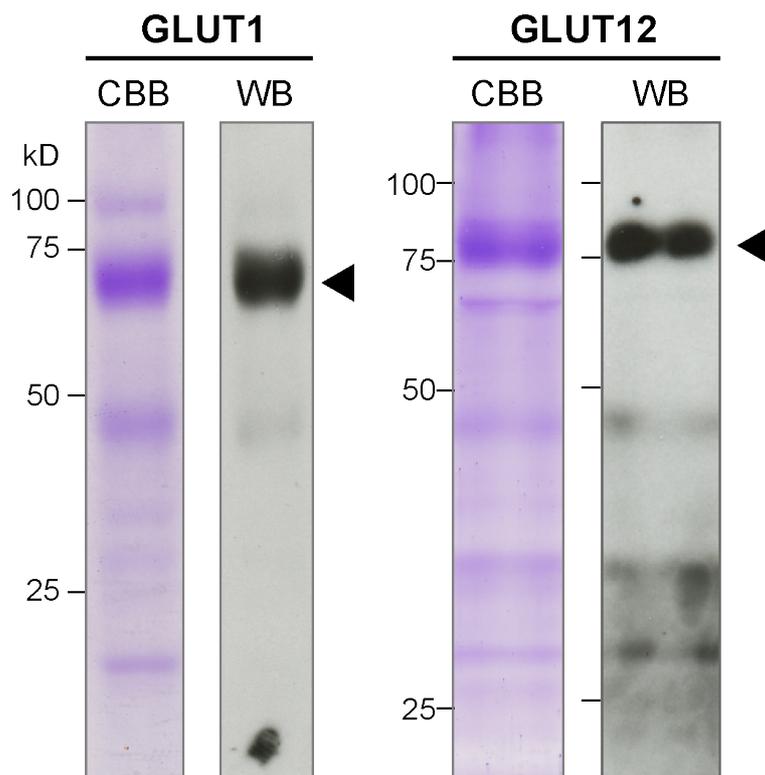


図3 GLUT1、GLUT12の精製

Ni-NTA elution 画分を SDS-PAGE で泳動後、CBB 染色とウエスタンブロッティング法によりそれぞれ確認した。CBB 染色には 10  $\mu$ g、W.B.には 1  $\mu$ g を泳動した。目的のバンドを矢頭で示した。各精製 GLUT のアミノ酸配列から計算された理論値は精製 hGLUT1 : 83.0 kDa、精製 hGLUT12 : 95.8 kDa。得られたバンドから計算した値は GLUT1 : 69.1 kDa、GLUT12 : 81.1 kDa であった。

### <GLUT によるグルコース輸送活性測定>

精製した各 GLUT20  $\mu\text{g}$  を 2 mg の大豆レシチンと混ぜ、凍結融解希釈法にてリポソームに組み込み、プロテオリポソームを得た。プロテオリポソームに RI 標識した D-グルコースを添加し、一定時間後にサンプリングしニトロセルロースフィルターでろ過した。取り込まれた RI 標識グルコース量を液体シンチレーションカウンターで測定した。これまで当研究室で輸送活性測定に用いてきた 27°C では反応が速いため、20°C で反応させた。

その結果、GLUT1、GLUT12 をそれぞれ再構成したリポソームにおいて時間依存的にグルコースの取り込み量が増加した(図 4)。一方、GLUT を含まないリポソームの取り込み量はプロテオリポソームに比べて 4~5 pmol と小さく、時間変化を示さなかった。バックグラウンド値が 4~5 pmol であるのは、リポソームへのグルコースの吸着であると考えられる。

これまで GLUT12 の速度論解析は行われておらず、 $K_M$  値や  $V_{\text{max}}$  値といった親和性や最大輸送速度は示されていなかった。そこで、各グルコース濃度で輸送活性を測定した(図 5)。解析の結果、GLUT1 と GLUT12 は典型的なミカエリス・メンテン型のキネティクスを示し、 $K_M$  値はそれぞれ  $11.6 \pm 2.2 \text{ mM}(n=3)$ 、 $6.4 \pm 1.6 \text{ mM}(n=3)$ であった。 $V_{\text{max}}$  値はそれぞれ  $1.4 \pm 0.1 \mu\text{mol/mg/min}(n=3)$ 、 $1.2 \pm 0.1 \mu\text{mol/mg/min}(n=3)$ であった(図 5)。GLUT1 の  $K_M$  値はこれまでの報告と同様のレンジの結果が得られており、本測定系で輸送活性が正しく測定できていることを示している(37-43)。GLUT12 は GLUT1 よりやや高いがほぼ同等の親和性であった。最大輸送速度はほぼ同じ値であった。

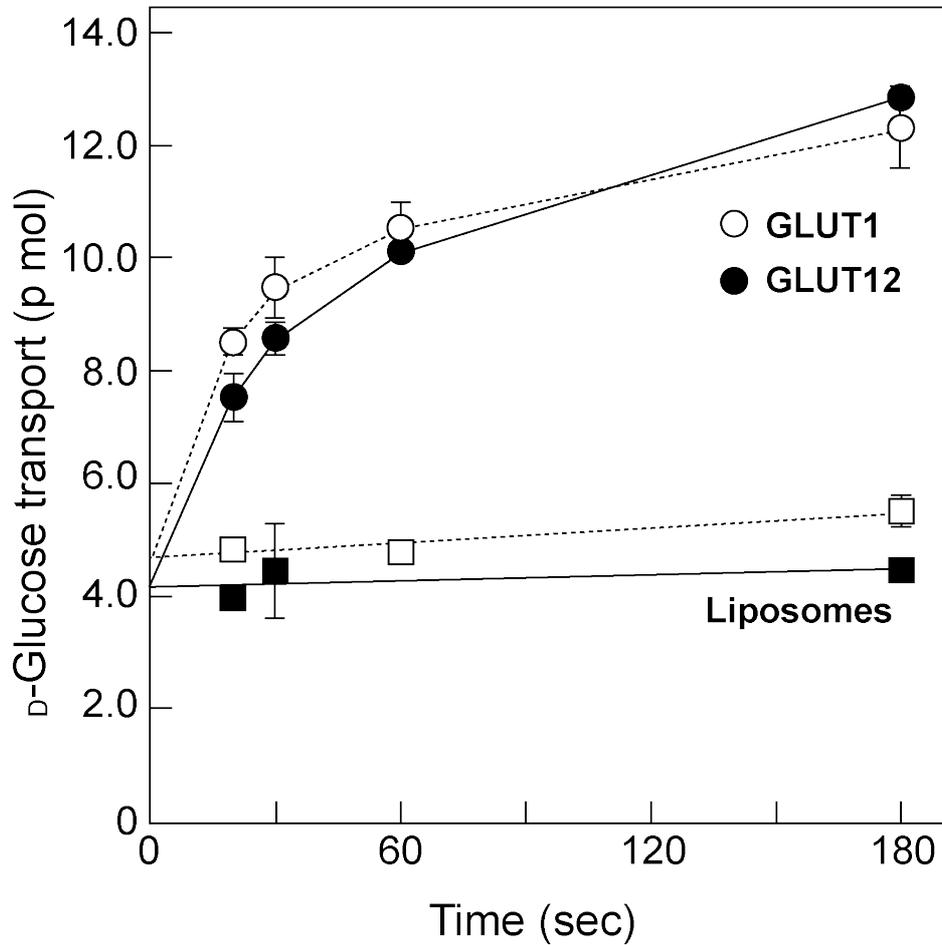


図4 GLUT1、GLUT12によるグルコース輸送のタイムコース  
 精製した GLUT1、GLUT12 をそれぞれリポソームに再構成し D-グルコースの取り込み量を測定した。グルコース濃度は 0.2 mM。反応温度は 20°C。○：GLUT1 を再構成したリポソーム、●：GLUT12 を再構成したリポソーム、□・■：再構成をしていないリポソーム。(n=3)

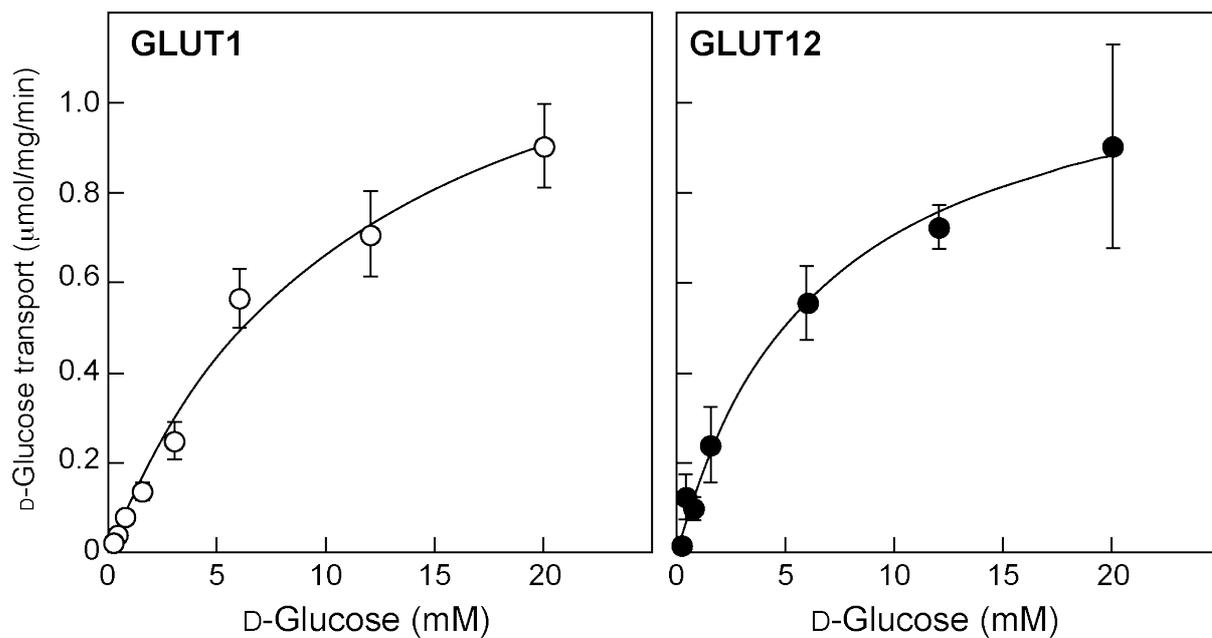


図5 GLUT1、GLUT12による濃度依存的なグルコース輸送

GLUT1、GLUT12をそれぞれ再構成したリポソームにD-グルコースを添加し(グルコース濃度:0.2、0.4、0.8、1.5、6、12、20 mM)、20°Cで30秒反応させた。左:GLUT1 右:GLUT12。GLUT1、GLUT12の $K_M$ 値はそれぞれ $11.6 \pm 2.2$  mM、 $6.4 \pm 1.6$  mM。Vmax値はそれぞれ $1.4 \pm 0.1$   $\mu\text{mol/mg/min}$ 、 $1.2 \pm 0.1$   $\mu\text{mol/mg/min}$ となった。(n=3)

さらに GLUT12 の性質を明らかにするため、GLUT ファミリー共通の阻害剤であるフロレチンの効果について検討した (図 6)。GLUT12 では 100  $\mu$ M のフロレチン添加で  $73 \pm 2.5\%$  ( $n=3$ ) の阻害がみられた。一方、GLUT1 では活性はバックグラウンドレベルに低下した。フロレチンは GLUT の阻害剤として広く使用されており、グルコース輸送がフロレチン感受性を示した事はグルコース輸送活性が GLUT を介したものであることを示している(1)。

次に、各種糖の効果について検討した。アスコルビン酸、デヒドロアスコルビン酸、GLUT13 の基質である *myo*-イノシトール、D-グルコース以外の単糖類や二糖類、細胞内物質を添加し、グルコース輸送に対する影響を解析した。各試薬を GLUT1、GLUT12 を再構成したリポソームに添加し、20°C で 30 秒プレインキュベーションした。その後 D-グルコースを添加し取り込み量を測定した。アスコルビン酸を添加しても輸送量に影響はなかったが、デヒドロアスコルビン酸により  $55 \pm 8.3\%$  ( $n=3$ ) の阻害がみられた。GLUT1 でも同様に  $53 \pm 8.5\%$  ( $n=3$ ) の阻害が見られた。

GLUT ファミリーは L-グルコースを認識しないことが知られており、実際に本研究で検討したところ L-グルコースは GLUT1 によるグルコース輸送を阻害しなかった(4, 44, 45)。同様に GLUT12 においても L-グルコースは影響しなかった。また、*myo*-イノシトール、単糖類の D-ガラクトース、D-フルクトースは GLUT12 に影響しなかったが、二糖類のマルトース、スクロース添加でそれぞれ  $55 \pm 12.3\%$  ( $n=3$ )、 $58 \pm 3.7\%$  ( $n=3$ ) 阻害された。GLUT1 についても検討した結果、同様の結果が得られ、マルトース、スクロースでの阻害はそれぞれ  $68 \pm 19.6\%$  ( $n=3$ )、 $71 \pm 3.4\%$  ( $n=3$ ) であった。

GLUT1 は ATP によってその活性が制御されることが示唆されている(46, 47)。GLUT12 に ATP、ADP を添加すると、それぞれ  $54 \pm 3.9\%$  ( $n=3$ )、 $45 \pm 4.5\%$  ( $n=3$ ) の阻害がみられた。GLUT1 では ATP、ADP 添加によりそれぞれ  $68 \pm 5.7\%$  ( $n=3$ )、 $71 \pm 1.6\%$  ( $n=3$ ) 阻害された。また、グルコース代謝物であるグルコース-6-リン酸(G-6-P)、グルコース-1-リン酸(G-1-P)添加により、GLUT12 ではそれぞれ  $39 \pm 12.8\%$  ( $n=3$ )、 $34 \pm 1.8\%$  ( $n=3$ ) 阻害された。GLUT1 においても同様に G-6-P、G-1-P 添加でそれぞれ  $62 \pm 2.7\%$  ( $n=3$ )、 $55 \pm 3.6\%$  ( $n=3$ ) 阻害された。

GLUT12 で GLUT 阻害薬のフロレチンを様々な濃度添加しグルコース輸送量の変化を検討した。フロレチンの濃度が上がるに従ってグルコース輸送量は低下し、濃度依存的な阻害がみられた(図 7)。IC<sub>50</sub> は 36  $\mu$ M であった。これまでの

報告では GLUT1 での IC<sub>50</sub> 値は 20 μM 程度であり(48)、これまでの結果も含めて GLUT12 は GLUT1 と同様の性質を有していることが示唆された。

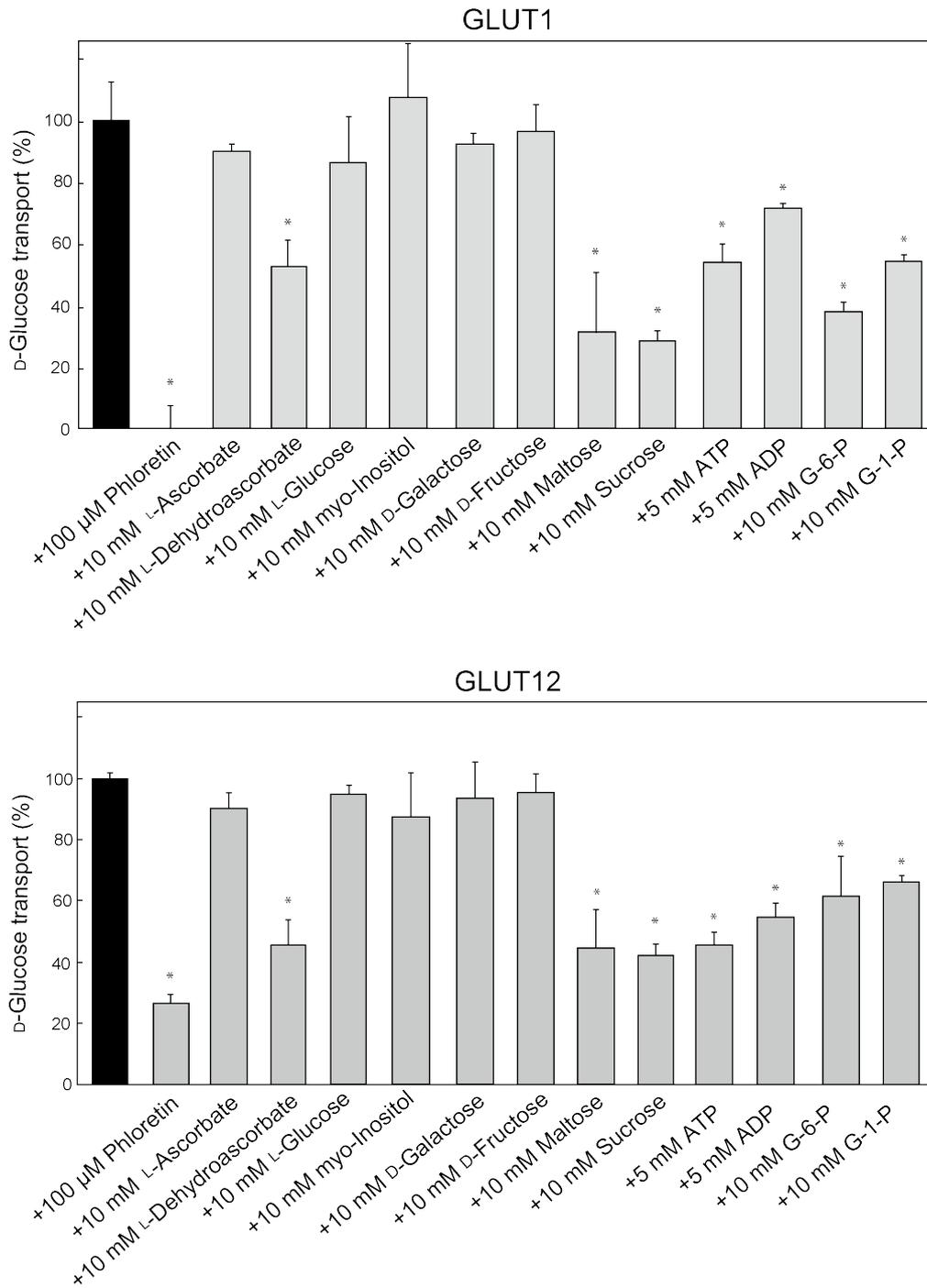


図6 各種糖、細胞内物質の効果の検討

GLUT1、GLUT12 を再構成したリポソームに各試薬を添加し 20°Cで 10 分間プレインキュベーションした。その後 0.2 mM になるよう D-グルコースを添加し、20°Cで 30 秒反応させた。(n=3)

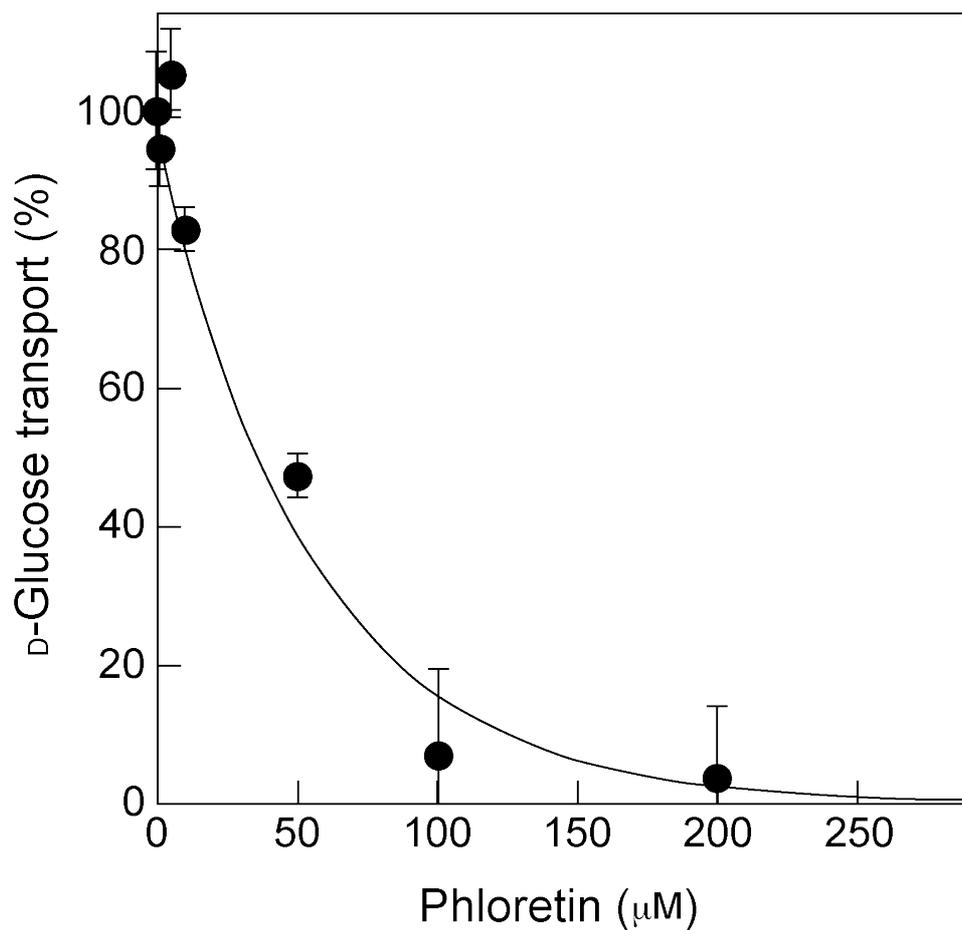


図7 GLUT12によるグルコース輸送のフロレチン濃度依存性

GLUT12を再構成したリポソームに、フロレチンを添加し(1、5、10、50、100、200 μM)、20°Cで10分プレインキュベーションした。その後0.2 mMになるようD-グルコースを添加し、20°Cで30秒反応させた。IC<sub>50</sub>値は36 μMとなった。

(n=3)

### <タンパク質レベルにおけるマウス GLUT12 の発現>

GLUT12 は骨格筋や小腸、胎盤、心臓、前立腺、脳、腎臓など生体に広く発現している(18, 19)。遠位尿細管、集合管ではアピカル側に発現していることが示されている(20)。しかし、腎臓以外で詳細な組織発現解析は行われていなかった。そこで、腎臓や小腸に加えて、これまで解析されていなかった内分泌組織の解析を行った。

マウス GLUT12 特異的抗体を作製し、間接蛍光法、HRP 法によりマウスにおける GLUT12 の発現部位を解析した。

腎臓では、これまでの報告と同様に遠位尿細管、集合管のアピカル側に強いシグナルが得られた(図 8)。皮質では近位尿細管には認められなかったが、糸球体タコ足細胞にシグナルが見られた。一方、遠位尿細管は皮質にのみシグナルが認められ、髄質では見られなかった。したがって、遠位尿細管では集合管に近い領域で GLUT12 は特に発現していると考えられる。集合管では皮質から髄質、腎乳頭(papilla)にいたるまでシグナルが得られた。

空腸では小腸上皮細胞のアピカル側にシグナルが得られた(図 9)。

また、興味深いことに内分泌組織である脳下垂体で GLUT12 の発現がみられた(図 10)。脳下垂体では前葉のみで発現がみられ、中葉、後葉ではシグナルは得られなかった。内分泌組織である脳下垂体前葉で発現がみられたことから、その他の内分泌組織にも GLUT12 が関わっている可能性があると考え、甲状腺と副腎を解析した。

甲状腺では濾胞上皮細胞で発現がみられた(図 11)。

副腎では皮質にはシグナルがなく、カテコールアミンを合成、分泌する髄質のみで強い発現がみられた(図 12)。

いずれの組織においても間接蛍光法と HRP 法で同様の結果が得られた。

### <mRNA レベルにおけるマウス GLUT12 の発現>

マウスの各組織から mRNA を抽出しマウス GLUT12 特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、空腸、腎臓、副腎、甲状腺、脳下垂体、大脳で目的の位置にバンド(139 bp)を検出した(図 13)。この結果は免疫組織化学法の

結果と一致した。逆転写反応を行わなかったサンプル(-RT)では、バンドは検出されなかった。

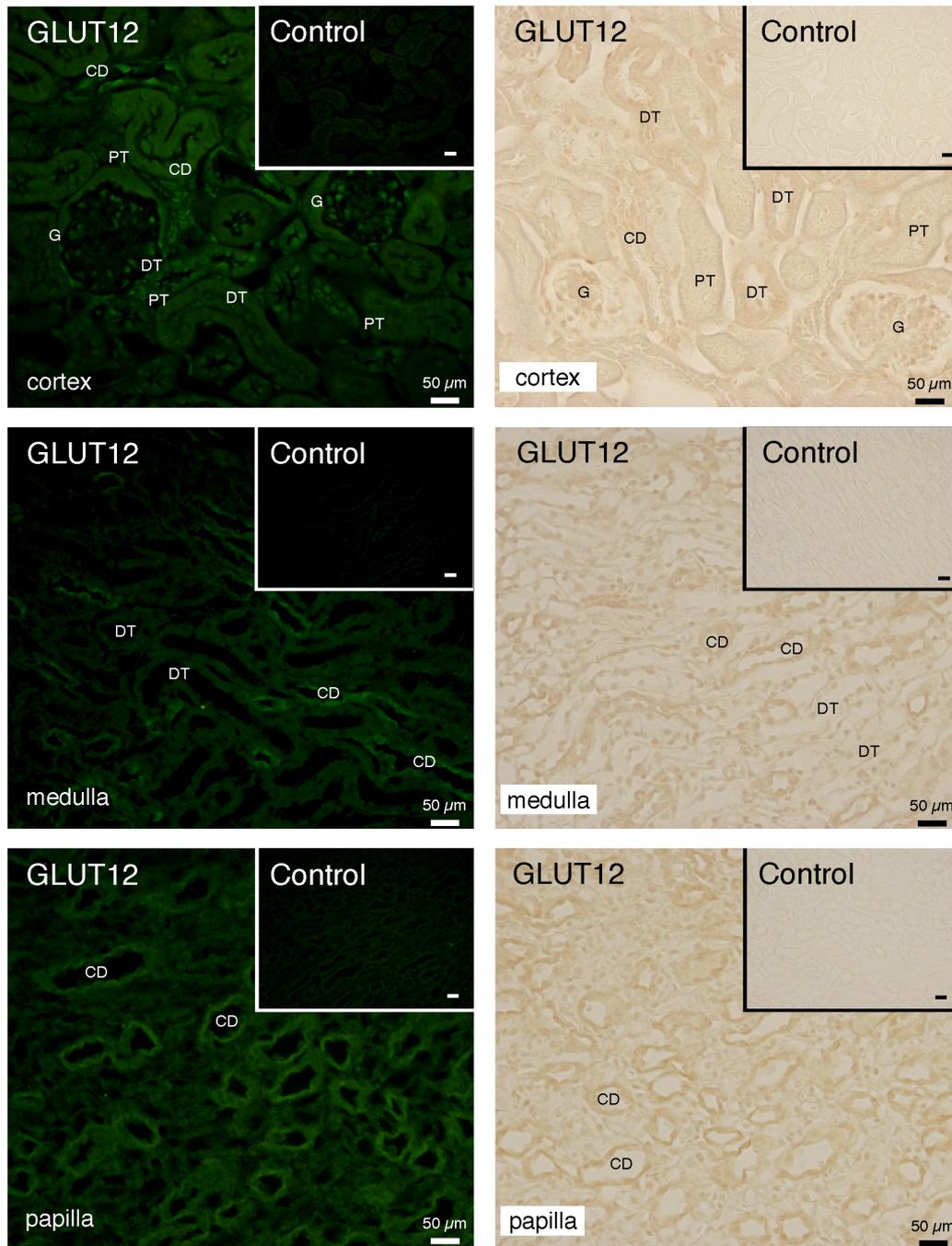


図8 マウス腎臓における GLUT12 の発現

間接蛍光抗体法(左)、HRP法(右)を用いてマウスの腎臓を免疫染色した。ネガティブコントロールとして免疫していないウサギの血清を使用した。

G : glomerulus、CD : collecting duct、DT : distal tubule、PT : proximal tubule

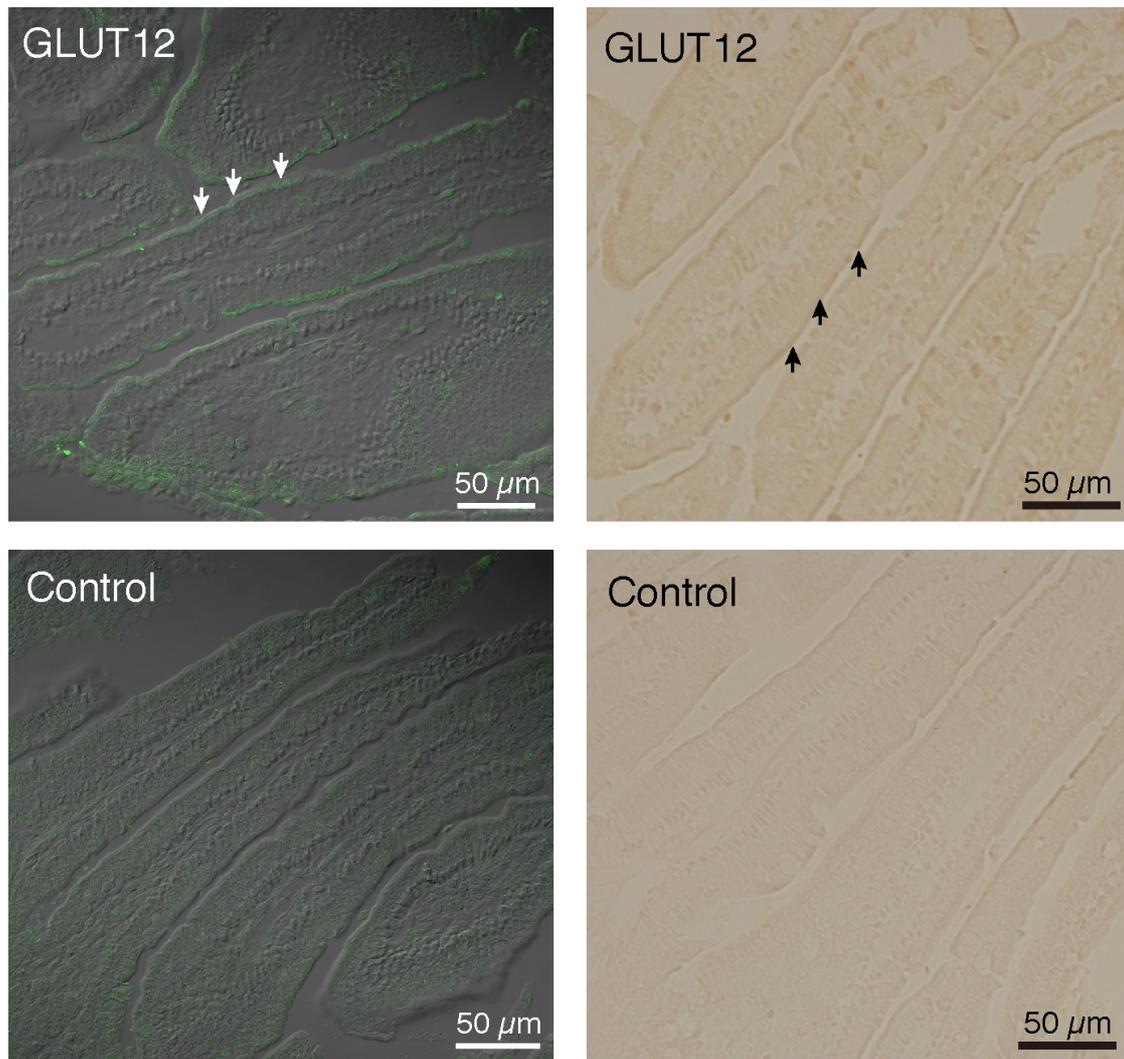


図9 マウス空腸における GLUT12 の発現  
間接蛍光抗体法(左)、HRP 法(右)を用いてマウスの空腸を免疫染色した。ネガティブコントロールとして免疫していないウサギの血清を使用した。

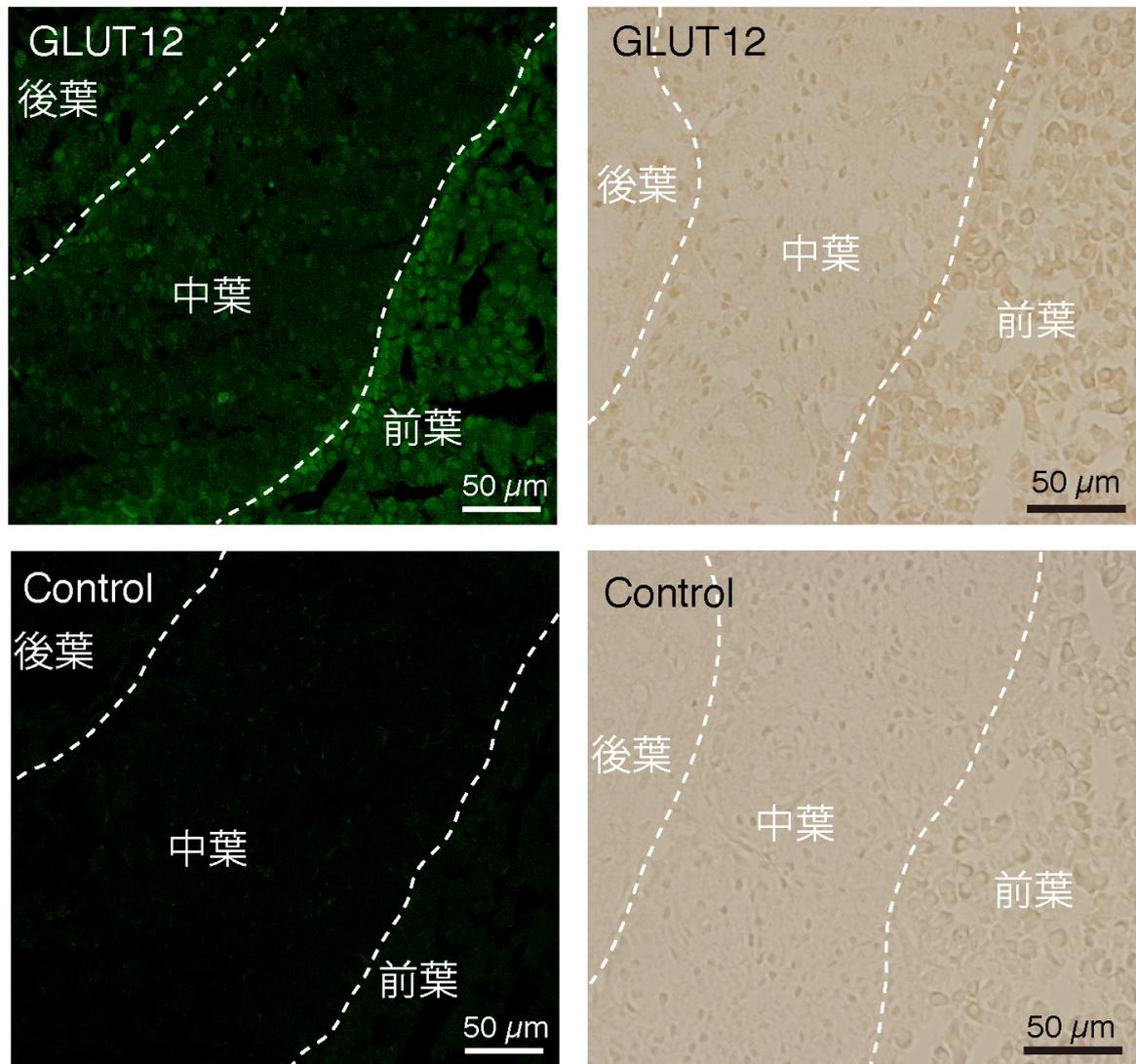


図 10 マウス脳下垂体における GLUT12 の発現  
間接蛍光抗体法(左)、HRP 法(右)を用いてマウスの脳下垂体を免疫染色した。ネガティブコントロールとして免疫していないウサギの血清を使用した。

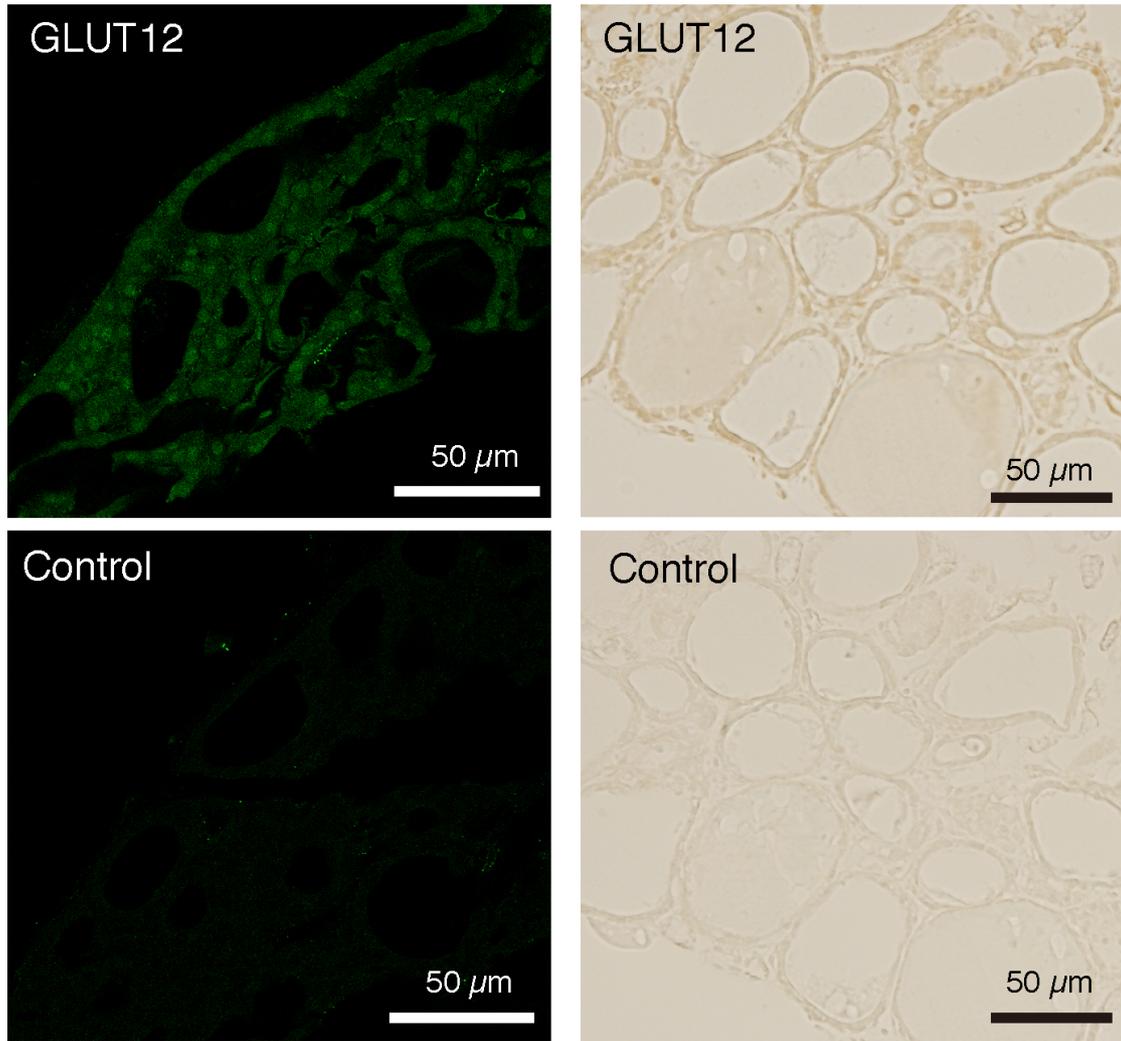


図 11 マウス甲状腺における GLUT12 の発現  
間接蛍光抗体法(左)、HRP 法(右)を用いてマウスの甲状腺を免疫染色した。ネガティブコントロールとして免疫していないウサギの血清を使用した。

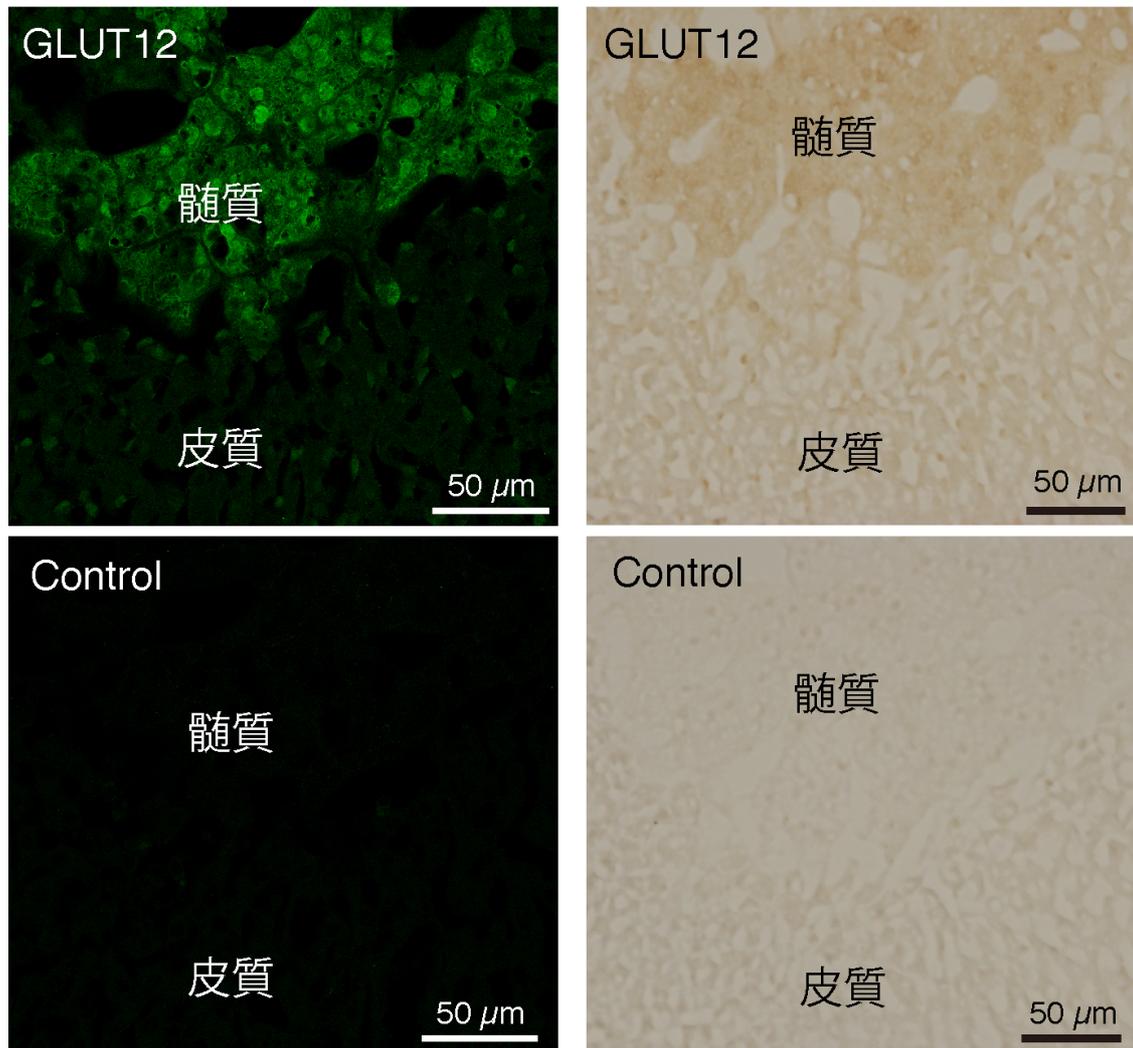


図 12 マウス副腎における GLUT12 の発現  
間接蛍光抗体法(左)、HRP 法(右)を用いてマウスの副腎を免疫染色した。ネガティブコントロールとして免疫していないウサギの血清を使用した。

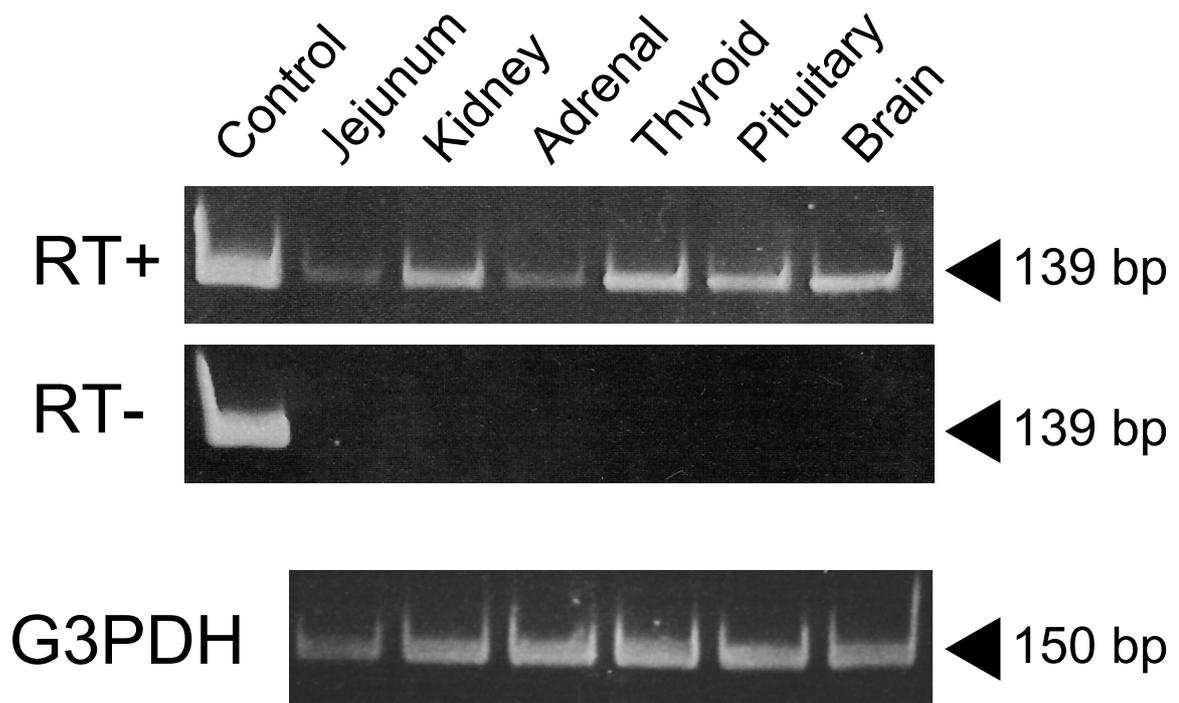


図 13 RT-PCR によるマウス GLUT12 の発現解析  
 マウスの各組織から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により GLUT12 を検出した。Control としてマウス GLUT12 の cDNA を用いた。

## 第四章 考察・展望

GLUT は細胞内へのグルコースの取り込みや蓄積されたグルコースの細胞外への分泌に関わっており、グルコースホメオスタシスに必要不可欠なタンパク質である。また、GLUT の欠損は中枢神経系を中心に深刻な症状を示すことからその生理機能、輸送機構の解析がなされてきた。GLUT1 や GLUT4 などの細胞膜型トランスポーターが属するクラス I に比べて、クラス III は主に細胞内膜系に存在しているとされており、その機能はほとんど分かっていない(1)。本研究では、クラス III に属する GLUT12 の機能に焦点を当て解析した。

これまで GLUT の輸送機能の解析は赤血球を用いた系やアフリカツメガエル卵細胞、CHO 細胞や HEK 細胞などの強制発現系が用いられてきた(4, 24, 25, 49)。これらの細胞では細胞内に取り込まれたグルコースは解糖系、ペントースリン酸回路や TCA 回路などによって速やかに代謝されてしまうため、正確なグルコース輸送活性を測定することは困難である。このため、これまでの実験系では 2-デオキシグルコースなどグルコースのアナログを用いた解析が行われてきた。本研究では GLUT12 の輸送機能を解析するために、大腸菌での発現、精製、リポソーム再構成による輸送活性測定系を構築した。精製再構成系は基質が細胞内で代謝を受ける GLUT にとって有用な手法と考える。本研究で用いた大腸菌発現系は目的タンパク質の N 末端と C 末端に親水性の  $\alpha$ ヘリックスタンパク質 (YaiN、YbeL) を融合することで、活性を持った真核生物膜タンパク質を発現、精製できるものである(32)。この系を用いて小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)、小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT)、有機アニオントランスポーター(NPT3)、マラリア原虫クロロキントランスポーター(PfCRT) などの輸送機能が解析されている(50–54)。

この系を用いて GLUT1、GLUT12 を発現させ、界面活性剤で可溶化後、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーで部分精製することができた。凍結希釈融解法でリポソームに再構成したところ、時間依存的なグルコース取り込み活性が見られ、容量応答曲線から GLUT1 の D-グルコースに対する  $K_M$  値は約 12 mM とこれまでに報告されている GLUT1 の  $K_M$  値に近いがやや大きな値であった。これまでに報告されている 2-デオキシグルコースに対する  $K_M$  値は CHO 細胞を用いた系では 0.7 mM から 2 mM と報告されている(37–39)。また、ツメガエル卵細胞を用

いた系では 6.9 mM から 9.8 mM と報告されている(40–43)。リポソーム再構成系では埋め込み方向や膜脂質の種類の問題などから細胞や膜小胞を用いた系に比べてやや大きな  $K_M$  値を示す傾向がある(53)。また、本研究では大腸菌発現系を用いており、糖鎖付加の状況が動物細胞培養系とは異なる。GLUT1 に関しては、グリコシル化されない変異型 GLUT1 の 2-デオキシグルコースに対する親和性は 2 倍程度低下する(37)。これらのことを考えると、本研究で得られた  $K_M$  値は妥当なものであり、GLUT 輸送機能解析系としての有用性を示している。

同様に精製された GLUT12 の  $K_M$  値は約 6 mM と GLUT1 の約半分の値となり、GLUT1 と同様に高親和性のグルコーストランスポーターグループに属することが明らかになった。これは  $K_M$  値が十数 mM という低い親和性の GLUT2 とは異なる機能を持っている事を示唆している(55)。GLUT2 は小腸上皮細胞や腎臓尿細管細胞の基底膜側に存在し、SGLT によって細胞内に吸収されたグルコースを濃度勾配に従って血流側へ放出している。また、膵臓ランゲルハンス氏島では血中グルコース濃度の上昇に対応して細胞内グルコース濃度を変動させることで、血糖応答性に関与している(1, 56, 57)。高親和性の  $K_M$  値を示したことは、GLUT12 がこのような機能に関わっていない事を示唆している。

精製 GLUT12 は GLUT1 と同様にフロレチンで阻害され、フロレチンの濃度依存性を解析した結果、濃度依存的にグルコース輸送量は低下し、 $IC_{50}$  は 36  $\mu$ M となった。GLUT1 では  $IC_{50}$  は 20  $\mu$ M 程度であり、同程度の親和性を示す(48)。GLUT12 の糖特異性を検討したところ、還元型ビタミン C であるアスコルビン酸は影響しなかったが、酸化型のデヒドロアスコルビン酸で阻害された。この事は GLUT1 と同様に GLUT12 がデヒドロアスコルビン酸輸送に関わっている可能性を示している(58)。アスコルビン酸はナトリウムイオン依存性ビタミン C トランスポーター (SVCT) によって細胞内に取り込まれるが、酸化型であるデヒドロアスコルビン酸は GLUT によって輸送される事が近年報告されている(14, 59)。これは GLUT の新しい機能として重要と考える。また、GLUT12 は L-グルコースによって阻害されなかった。同じクラス III に属する GLUT13 の基質である *myo*-イノシトールは GLUT1、GLUT12 いずれも阻害せず、特異的な基質であると考えられる(17)。グルコース以外の糖類の効果を検討した結果、ガラクトース、フルクトースは認識しなかったが、二糖のマルトース、スクロースによって、グルコース輸送は阻害された。浸透圧の影響も考えられたが、同じ濃度の単糖、イノシトールやアスコルビン酸が活性を抑制していないことから二糖そのもの

による阻害と思われる。阻害様式は不明だが、マルトース、スクロースは D-グルコースを含んでいるため競合による阻害と考える。二糖は乳腺を除き生体内にはほとんど存在せずその意味するところは不明である。GLUT12 は乳腺細胞にも発現していることから同じ二糖であるラクトースとの関連も考えられる(31)。

GLUT1 には ATP 結合部位が存在することや、細胞内 ATP によってグルコースの結合親和性が低下することが報告されており、細胞内のエネルギー状態によって輸送が制御されている可能性がある(46,47)。今回の結果から、GLUT12 も ATP や ADP によって活性が低下した事からこれらのヌクレオチドによって制御を受ける可能性が示唆された。また、グルコース代謝物であるグルコース-6-リン酸、グルコース-1-リン酸も GLUT12 を阻害した。これらヌクレオチドや代謝物による GLUT 制御は細胞内のエネルギー状態に依存するものと思われるが、その詳細は不明なままで今後の展開が待たれる。このような解析には本研究で用いた精製再構成系が重要になってくるであろう。以上の結果から、GLUT12 は GLUT1 と同様の輸送活性と阻害特性を示し、GLUT12 が GLUT1 と似た性質を持つトランスポーターであることがわかった。

抗マウス GLUT12 抗体を作製し、免疫組織化学法、RT-PCR を用いてマウスの各組織の GLUT12 発現部位を解析した。これまでの報告と同様に GLUT12 は小腸絨毛上皮、腎臓の遠位尿細管、集合管のアピカル膜に発現していた(20)。これらの部位では GLUT12 がグルコースの取り込みや再吸収に関わっていると思われる。より詳細に見ると GLUT12 は腎臓では皮質の遠位尿細管に発現しているが、髄質の遠位尿細管では見られなかった。一方、集合管は皮質、髄質、腎乳頭 (Papilla) のアピカル側に広く発現が認められた。髄質の遠位尿細管では発現が認められなかったことから、GLUT12 は遠位尿細管でも集合管に近い終端部にのみ存在しているものと思われる。グルコースの取り込みが主に近位尿細管で行われることを考えると、この分布はこれまでに受け入れられているグルコース再吸収モデルとは一致しない(60)。小腸上皮細胞にも受動輸送を行う GLUT12 が存在している事が報告されており、高濃度のグルコースが存在している時に受動輸送体である GLUT12 が取り込みに関わっている可能性が示唆される。一般に尿中グルコースは 1 mM 以下であることと本研究から GLUT12 の  $K_M$  値が約 6 mM であることを考えると、尿中にグルコースが排泄される高血糖状態での腎臓でのグルコース回収に関わっているのかもしれない(61)。GLUT12 がナト

リウムイオンあるいはプロトンに依存したグルコース輸送をするという報告もあり、タンパク質レベルでの輸送機能解析が重要であろう(24, 25)。

今回の研究で、興味深いことに GLUT12 は脳下垂体前葉、甲状腺、副腎髄質などの内分泌細胞に発現することがわかった。脳下垂体前葉ではペプチドホルモンが合成、分泌されている。ペプチドホルモンは分泌小胞内でペプチジルグリシン  $\alpha$ -アミド化オキシゲナーゼによって、C 末端がアミド化されるが、この酵素の活性にはアスコルビン酸が必要であることが報告されている(62, 63)。また、副腎髄質ではアドレナリンやノルアドレナリンなどのカテコールアミンが合成、分泌されている。ドパミンからノルアドレナリンの合成は分泌小胞内でドパミン  $\beta$ -ヒドロキシラーゼにより行われている。この反応には補酵素としてアスコルビン酸が必要であることが報告されている(64, 65)。今回の実験で GLUT12 はデヒドロアスコルビン酸によって阻害を受けた。GLUT12 はデヒドロアスコルビン酸を基質とする可能性があり、脳下垂体、副腎髄質において分泌小胞内にアスコルビン酸を供給する経路となっているのかもしれない(図 14)。GLUT12 はクラス III に属しているが、内膜系での機能は不明なままである。今後、GLUT12 の生理的意義を解析するにあたり内分泌系での機能は本質的に重要と考える。

本研究から GLUT12 は GLUT1 とよく似た生化学的特徴を持つことが解明できた。しかし、その発現組織と局在は異なっており、また、転写因子や相互作用分子にも違いがある(表 1)。発現部位の違いや、異なる制御機構(発現量、タンパク質相互作用等)を有することで、GLUT1 と GLUT12 は似た生化学的特徴を持つが生体内では異なる働きをすることが示唆される。集合管での GLUT12 の局在はこれまで示されてきたグルコース再吸収とは異なるメカニズムの存在を示唆している。また、本研究により内分泌系に多く発現が見られたことから、アスコルビン酸動態との関連が示唆される。アスコルビン酸輸送体として SVCT が単離されているが細胞膜型のトランスポーターであり、細胞内のアスコルビン酸動態は全くわかっていない。

しかし、GLUT12 の細胞内の局在やデヒドロアスコルビン酸を輸送するかはまだ不明なままである。今後、デヒドロアスコルビン酸輸送機能解析、RNA 干渉やノックアウトマウスを用いたカテコールアミンの内在量・分泌量測定、培養細胞を用いて小胞・顆粒に発現するタンパク質との共局在を解析するなどの詳細な発現解析等により GLUT12 の生理的意義を解明していく必要がある。

脳下垂体、甲状腺、副腎髄質の機能は生体の恒常性を維持するうえで非常に大

きな役割を担っている。GLUT12 がカテコールアミンやホルモンの合成、分泌に関わっているならば、GLUT12 をターゲットとした薬物の開発が様々な疾患の治療につながるであろう。

表1 GLUT1 と GLUT12 の相違点

	GLUT1	GLUT12
発現組織	赤血球や血液脳関門など ほぼすべての細胞	骨格筋、脂肪細胞、小腸、 胎盤、心臓、前立腺、脳、 腎臓、 <b>脳下垂体、甲状腺、 副腎髄質</b>
発現部位	細胞膜	細胞膜、細胞内小器官
K <sub>M</sub> 値	<b>11.6 ± 2.2 mM</b>	<b>6.4 ± 1.6 mM</b>
V <sub>max</sub> 値	<b>1.4 ± 0.1 μmol/mg/min</b>	<b>1.2 ± 0.1 μmol/mg/min</b>
転写因子	AR、ARNT::HIF1A、 ASCL1	ALX3、AR、ARNT2、 ARNT::HIF1A、ASCL1
相互作用分子	GIPC、AKT、 stomatin、neuropilin	TBC1D4

GLUT1 と GLUT12 について、これまでの報告と本研究により得られた結果をまとめた(1, 4, 5, 18–20)。本研究により得られた結果は**太字**で示した。転写因子は JASPAR データベースを使用し、スコア > 0.8 のものを記載した。各 GLUT と相互作用する可能性のある分子を、SPRING データベースを用いて探索し、物理的・機能的に相互作用を示すものを記載した(66–70)。

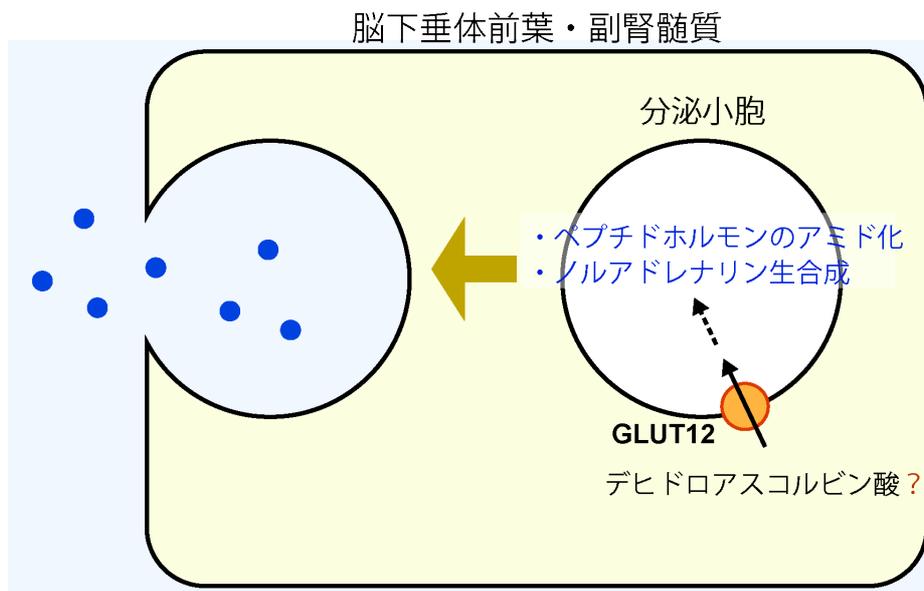


図 14 分泌小胞での GLUT12 の役割

GLUT12 のグルコース輸送はデヒドロアスコルビン酸(DHA)によって阻害されたことから、GLUT1 と同様に DHA 輸送を行う可能性がある。さらに、脳下垂体前葉や副腎髄質に発現しており、分泌小胞への DHA 輸送を GLUT12 が担っている可能性がある。

## 引用文献

1. Mueckler M, Thorens B (2013) The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med* 34(2–3):121–138.
2. Yamamoto T, et al. (1990) Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 170(1):223–230.
3. Shepherd PR, Kahn BB (1999) Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341(4):248–257.
4. Wheeler TJ, Peter CH (1981) Kinetic Properties of the Reconstituted Glucose Transporter from Human Erythrocytes. *J Biol Chem* 256(1):8907–8914.
5. Koranyi L, et al. (1991) Glucose transporter gene expression in rat brain: Pretranslational changes associated with chronic insulin-induced hypoglycemia, fasting, and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2(3):244–252.
6. Younes M, Lechago L V, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J (1996) Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res* 56(5):1164–1167.
7. James DE, Brown R, Navarro J, Pilch PF (1988) Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature* 333(6169):183–185.
8. Stümpel F, Burcelin R, Jungermann K, Thorens B (2001) Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: Evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci* 98(20):11330–11335.
9. Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO (1992) Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem* 267(21):14523–14526.
10. Vitart V, et al. (2008) SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet* 40(4):437–442.
11. Anzai N, et al. (2008) Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem* 283(40):26834–26838.

12. Flessner LB, Moley KH (2009) Similar [DE]XXXL[LI] motifs differentially target GLUT8 and GLUT12 in Chinese hamster ovary cells. *Traffic* 10(3):324–333.
13. Lee YC, Huang HY, Chang CJ, Cheng CH, Chen YT (2010) Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: Mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome. *Hum Mol Genet* 19(19):3721–3733.
14. Corpe CP, Eck P, Wang J, Al-Hasani H, Levine M (2013) Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. *J Biol Chem* 288(13):9092–9101.
15. Németh CE, et al. (2016) Glucose transporter type 10—lacking in arterial tortuosity syndrome—facilitates dehydroascorbic acid transport. *FEBS Lett* 590(11):1630–1640.
16. Di Daniel E, et al. (2009) Evaluation of expression and function of the H<sup>+</sup>/myo-inositol transporter HMIT. *BMC Cell Biol* 10(5):54.
17. Uldry M, et al. (2001) Identification of a mammalian H<sup>+</sup>-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J* 20(16):4467–4477.
18. Rogers S, et al. (2002) Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(3):E733-738.
19. Macheda ML, Kelly DJ, Best JD, Rogers S (2002) Expression during rat fetal development of GLUT12 - a member of the class III hexose transporter family. *Anat Embryol (Berl)* 205(5–6):441–452.
20. Linden KC, et al. (2006) Renal expression and localization of the facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT12 in animal models of hypertension and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(1):F205–213.
21. Stuart CA, Howell MEA, Zhang Y, Yin D (2009) Insulin-stimulated translocation of glucose transporter (GLUT) 12 parallels that of GLUT4 in normal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 94(9):3535–3542.
22. Pujol-Gimenez J, et al. (2015) Could GLUT12 be a Potential Therapeutic Target in Cancer Treatment? A Preliminary Report. *J Cancer* 6(2):139–143.
23. Matsui C, Takatani-Nakase T, Maeda S, Nakase I, Takahashi K (2017) Potential Roles of GLUT12 for Glucose Sensing and Cellular Migration in MCF-7 Human Breast Cancer Cells Under High Glucose Conditions. *Anticancer Res*

- 37(12):6715–6722.
24. Wilson-O'Brien AL, Patron N, Rogers S (2010) Evolutionary ancestry and novel functions of the mammalian glucose transporter (GLUT) family. *BMC Evol Biol* 10:152.
  25. Pujol-Giménez J, Pérez A, Reyes AM, Loo DDF, Lostao MP (2015) Functional characterization of the human facilitative glucose transporter 12 (GLUT12) by electrophysiological methods. *Am J Physiol Cell Physiol* 308(12):C1008-1022.
  26. Sapir G, et al. (2019) [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,D<sub>8</sub>]2-deoxyglucose phosphorylation by hexokinase shows selectivity for the β-anomer. *Sci Rep* 9(1):19683.
  27. Miller PJ, Finucane KA, Hughes M, Zhao FQ (2005) Cloning and expression of bovine glucose transporter GLUT12. *Mamm Genome* 16(11):873–883.
  28. Macheda ML, Williams ED, Best JD, Wlodek ME, Rogers S (2003) Expression and localisation of GLUT1 and GLUT12 glucose transporters in the pregnant and lactating rat mammary gland. *Cell Tissue Res* 97(8):2035–2042.
  29. Purcell SH, et al. (2011) Improved insulin sensitivity by GLUT12 overexpression in mice. *Diabetes* 60(5):1478–1482.
  30. Chiarelli N, et al. (2011) Characterization and expression pattern analysis of the facilitative glucose transporter 10 gene (*slc2a10*) in *Danio rerio*. *Int J Dev Biol* 55(2):229–236.
  31. Yu Q, et al. (2013) Functional Analyse of GLUT1 and GLUT12 in Glucose Uptake in Goat Mammary Gland Epithelial Cells. *PLoS One* 8(5):e65013.
  32. Leviatan S, Sawada K, Moriyama Y, Nelson N (2010) Combinatorial method for overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 285(31):23548–23556.
  33. Schaffner W, Weissmann C (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 56(2):502–514.
  34. LAEMMLI UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685.
  35. Kasahara T, Kasahara M (1996) Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 315:177–182.
  36. Kapoor K, et al. (2016) Mechanism of inhibition of human glucose transporter GLUT1 is conserved between cytochalasin B and phenylalanine amides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(17):4711–4716.

37. Asano T, et al. (1991) The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem* 266(36):24632–24636.
38. Wong HY, Law PY, Ho YY (2007) Disease-associated Glut1 single amino acid substitute mutations S66F, R126C, and T295M constitute Glut1-deficiency states in vitro. *Mol Genet Metab* 90(2):193–198.
39. Mori H, et al. (1994) Substitution of tyrosine 293 of GLUT1 locks the transporter into an outward facing conformation. *J Biol Chem* 269(15):11578–11583.
40. Burant CF, Bell GI (1992) Mammalian facilitative glucose transporters: Evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* 31(42):10414–10420.
41. Bentley PA, Shao Y, Misra Y, Morielli AD, Zhao F-Q (2012) Characterization of bovine glucose transporter 1 kinetics and substrate specificities in *Xenopus* oocytes. *J Dairy Sci* 95(3):1188–1197.
42. Klepper J, et al. (2001) Functional consequences of the autosomal dominant G272A mutation in the human GLUT1 gene. *FEBS Lett* 498(1):104–109.
43. Lange P, Gertsen E, Monden I, Klepper J, Keller K (2003) Functional consequences of an in vivo mutation in exon 10 of the human GLUT1 gene. *FEBS Lett* 555(2):274–278.
44. Deng D, et al. (2015) Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature* 526(7573):391–396.
45. Hresko RC, Kraft TE, Quigley A, Carpenter EP, Hruz PW (2016) Mammalian Glucose Transporter Activity Is Dependent upon Anionic and Conical Phospholipids. *J Biol Chem* 291(33):17271–17282.
46. Carruthers A, Helgerson AL (1989) The human erythrocyte sugar transporter is also a nucleotide binding protein. *Biochemistry* 28(21):8337–8346.
47. Levine KB, Cloherty EK, Fidyk NJ, Carruthers A (1998) Structural and Physiologic Determinants of Human Erythrocyte Sugar Transport Regulation by Adenosine Triphosphate. *Biochemistry* 37(35):12221–12232.
48. Tuccinardi T, et al. (2013) Oxime-based inhibitors of glucose transporter 1 displaying antiproliferative effects in cancer cells. *Bioorganic Med Chem Lett* 23(24):6923–6927.
49. Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI (1991) Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate

- specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* 30(21):5139–5145.
50. Togawa N, et al. (2015) Wide expression of type I Na<sup>+</sup>-phosphate cotransporter 3 (NPT3/SLC17A2), a membrane potential-driven organic anion transporter. *Am J Physiol Physiol* 309(2):C71–C80.
  51. Kato Y, Omote H, Miyaji T (2013) Inhibitors of ATP Release Inhibit Vesicular Nucleotide Transporter. *Biol Pharm Bull* 36(11):1688–1691.
  52. Iwai Y, Kamatani S, Moriyama S, Omote H (2019) Function of essential chloride and arginine residue in nucleotide binding to vesicular nucleotide transporter. *J Biochem* 165(6):479–486.
  53. Juge N, et al. (2015) *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter is a H<sup>+</sup>-coupled polyspecific nutrient and drug exporter. *Proc Natl Acad Sci* 112(11):3356 LP – 3361.
  54. Hiasa M, et al. (2014) Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Sci Rep* 4(1):6836.
  55. Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B (2002) GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 524(1–3):199–203.
  56. Augustin R (2010) The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62(5):315–333.
  57. Thorens B (2015) GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* 58(2):221–232.
  58. Vera JC, Rivas CI, Fischbargt J, Golde DW (1993) Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* 364(6432):79–32.
  59. Padayatty SJ, Levine M (2016) Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis* 22:463–493.
  60. Mather A, Pollock C (2011) Glucose handling by the kidney. *Kidney Int* 120:S1–S6.
  61. Griffin NK, Smith MA, Jenkins PA, Werther G, Baum JD (1979) Relationship between urinary and blood glucose in diabetic children. *Arch Dis Child* 54(5):371–374.
  62. Glembotski CC (1985) Further characterization of the peptidyl  $\alpha$ -amidating enzyme in rat anterior pituitary secretory granules. *Arch Biochem Biophys*

- 241(2):673–683.
63. Chikuma T, Hanaoka K, Peng Loh Y, Kato T, Ishii Y (1991) A colorimetric assay for measuring peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 198(2):263–267.
  64. Menniti FS, Knoth J, Peterson DS, Diliberto EJ (1987) The in situ kinetics of dopamine beta-hydroxylase in bovine adrenomedullary chromaffin cells. Intravesicular compartmentation reduces apparent affinity for the cofactor ascorbate. *J Biol Chem* 262(16):7651–7657.
  65. Huyghe BG, Klinman JP (1991) Activity of membranous dopamine  $\beta$ -monooxygenase within chromaffin granule ghosts. Interaction with ascorbate. *J Biol Chem* 266(18):11544–11550.
  66. Wieman HL, et al. (2009) An essential role for the Glut1 PDZ-binding motif in growth factor regulation of Glut1 degradation and trafficking. *Biochem J* 418(2):345–367.
  67. Barthel A, et al. (1999) Regulation of GLUT1 Gene Transcription by the Serine/Threonine Kinase Akt1. *J Biol Chem* 274(29):20281–20286.
  68. Zhang J-Z, Hayashi H, Ebina Y, Prohaska R, Ismail-Beigi F (1999) Association of Stomatin (Band 7.2b) with Glut1 Glucose Transporter. *Arch Biochem Biophys* 372(1):173–178.
  69. Roy S, et al. (2017) Multifaceted Role of Neuropilins in the Immune System: Potential Targets for Immunotherapy. *Front Immunol* 8:1228.
  70. White MA, et al. (2018) GLUT12 promotes prostate cancer cell growth and is regulated by androgens and CaMKK2 signaling. *Endocr Relat Cancer* 25(4):453–469.

## 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、終始、有益なる御指導、御鞭撻を賜りました当生体膜生化学研究室、表弘志准教授、同日浅未来助教に謹んで感謝いたします。

種々の有益な御指導、ご教授を賜りました本学自然生命科学研究支援センターゲノム・プロテオーム解析部門宮地孝明研究教授、同樹下成信助教に謹んで感謝いたします。

研究の遂行にあたり、有益な御指導、ご教授を賜りました森山芳則教授に謹んで感謝いたします。

岡山大学における研究活動に、深いご理解とご協力を賜りました佐賀大学医学部附属病院薬剤部一同に謹んで感謝いたします。

本論文の審査にあたり、御精読、御懇切なる御指導を賜りました岡山大学薬学部分子生物学研究室、垣内力教授、神経生物物理学研究室、井上剛准教授、構造生物薬学研究室、安井典久准教授に深く感謝いたします。

最後に、大学生活を支えていただいた家族、友人、そして研究活動をともにし、最後まで応援していただいた研究室員一同に謹んで御礼申し上げます。

2020年9月 松尾 俊佑