

氏名	ほりば なおし 堀 場 直
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 712 号
学位授与の日付	平 成 16 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	新規腎グルコーストランスポータ NaGLT1 の構造・機能に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 乾 賢 一 教授 高 倉 喜 信 教授 藤 井 信 孝

論 文 内 容 の 要 旨

1980年代後半から、分子生物学的手法により種々の膜輸送体(トランスポータ)のcDNAがクローニングされ、その分子の実体が明らかにされてきた。しかしながら、腎疾患・病態時における生理活性物質あるいは薬物の再吸収・分泌が、全て既知のトランスポータの発現・機能変動により説明され得るものではなく、生理的に重要な幾つかのトランスポータが未同定であると考えられる。近年、ヒト、マウスゲノムプロジェクト等の完了に伴い、ゲノム情報の完全な解読がなされつつあるが、現在までのところ多くの遺伝子について機能を含む情報は未解明であり、それら未知遺伝子群の中にトランスポータをコードする遺伝子が存在することが想定される。著者は、ランダムシークエンス法を用いてラット腎臓のmRNA発現データベースを構築し、発現クローニング法と組み合わせることで新規トランスポータのcDNAのクローニングを試みた。その結果、新規グルコーストランスポータの単離に成功し、以下の知見を得た。

I. 新規腎グルコーストランスポータ NaGLT1 の cDNA クローニングと構造・組織分布・細胞膜発現

ラット腎cDNAライブラリーより無作為に2,048コロニーを抽出し、部分塩基配列の解読を行った。BLASTプログラムを用いて遺伝子の同定を行い、ラット腎mRNA発現データベースを作成した。データベース中より未知遺伝子を抽出し、アフリカツメガエル卵母細胞(以下卵母細胞)発現系を用い、各種化合物の取り込み活性を指標にして、新規トランスポータのスクリーニングを行った。その結果、Na⁺依存性の α -メチルグルコピラノシド(α MeGlc)取り込み活性を有するクローンの単離に成功し、NaGLT1と名付けた。NaGLT1 mRNAは全長2,173 bp、推定アミノ酸残基数484、推定11回膜貫通型の構造を有していた。既知グルコーストランスポータファミリーであるSGLT及びGLUTとのアミノ酸相同性は22%以下であり、NaGLT1は新規グルコーストランスポータであると考えられた。ノーザンブロットイング及び単離ネフロン分節を用いたRT-PCR解析より、NaGLT1 mRNAは腎臓の近位尿管に強く発現すること、特異抗体を用いたウエスタンブロットイングより、NaGLT1タンパクは管腔側刷子縁膜に局在することが明らかとなった。ウエスタンブロットイングにおいて、非還元下では約97 kDa、還元下では45-50 kDaの位置にバンドが認められた。NaGLT1タンパクの推定分子量は51.7 kDaであることから、NaGLT1はホモダイマー、あるいは他のタンパクとのヘテロダイマーを形成することが推察された。

リアルタイムPCR法を用いてNaGLT1, SGLT1, SGLT2 mRNAの定量を行ったところ、NaGLT1 mRNA発現量は腎皮質、髄質ともSGLT1, SGLT2 mRNAに比べ有意に高く、腎皮質でSGLT2 mRNAの約3倍、腎髄質で約5倍を示した。mRNAレベルにおいて、NaGLT1はSGLTよりも高発現しており、発現量の点からは腎臓でのグルコース再吸収に、より大きく寄与していることが示唆された。

II. NaGLT1 の機能解析

卵母細胞発現系及びcDNA導入HEK293細胞を用いて、NaGLT1の輸送機能について検討した。卵母細胞発現系を用いて糖の類縁体の取り込みを検討したところ、NaGLT1を注入した卵母細胞では α MeGlc, D-グルコースで有意な取り込み上昇が認められたが、ガラクトース, 2-デオキシ-D-グルコース, マンノース, スクロース, マンニトールでは、対照の

水注入卵母細胞と比べて差は認められなかった。速度論的な解析より、NaGLT1 を介した α MeGlc 取り込みの K_m 値は 3.7 mM, Na^+ との共役比は 1:1 であることが明らかになった。従って、NaGLT1 は SGLT2 と同様、腎近位尿細管に局在する低親和性グルコーストランスポータの一つであることが示唆された。

NaGLT1 発現 HEK293 細胞では、 α MeGlc に加えフルクトースの取り込み活性が認められた。ラット腎臓刷子縁膜小胞を用いた解析において、 Na^+ 依存性のフルクトース輸送活性を見出した。そこで、速度論的解析、種々糖類縁体および阻害剤を用いた阻害実験による基質認識性について検討し、刷子縁膜小胞におけるフルクトース輸送に NaGLT1 が関与しているか否か検証した。刷子縁膜小胞における Na^+ 依存性のフルクトース取り込みは 2 相性を示し、 K_m 値はそれぞれ 0.3, 7.8 mM であった。NaGLT1 発現 HEK293 細胞における K_m 値は 4.6 mM であり、刷子縁膜小胞の低親和性の K_m 値と対応していた。フルクトース取り込みに対する糖類縁体および阻害剤の影響は、刷子縁膜小胞、NaGLT1 発現 HEK293 細胞でよく一致しており、低親和性の Na^+ 依存性フルクトーストランスポータは NaGLT1 であることが示唆された。

以上、ランダムシーケンス法と発現クローニング法を組み合わせることによって、新規の Na^+ 依存性グルコーストランスポータ、NaGLT1 をクローニングすることに成功した。NaGLT1 の全塩基配列とそれから推定される一次構造、並びに生理的機能の一部を明らかにすることができた。これらの研究成果は、単糖類の腎における動態を分子レベルで解明するための重要な基礎的知見であるとともに、糖尿病における血糖値の改善をターゲットとした創薬にも有用な情報になると考える。

論文審査の結果の要旨

分子生物学的手法を駆使してこれまでトランスポータをはじめとする数多くの膜蛋白質が単離・同定されてきたが、腎の生理機能を全て説明することはできない。申請者は、ヒトやマウスのゲノムプロジェクトで得られた塩基配列情報に着目し、既知遺伝子群の *in silico* での整理に基づく未知遺伝子群の抽出と、それらを中心とした基質輸送研究を行い、新規トランスポータのクローニングに成功すると共に以下の新知見を得た。

ラット腎 cDNA ライブラリーより無作為に 2,048 コロニーを抽出し、部分塩基配列の解読を行った、BLAST プログラムを用いて遺伝子の同定を行い、ラット腎 mRNA 発現データベースを作成した。データベース中からの未知遺伝子抽出と、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を中心とした基質輸送実験を進め、新規トランスポータの探索を行った。その結果、 Na^+ イオン依存性の α -メチルグルコピラノシド (α MeGlc) 取り込み活性を有するクローンの単離に成功し、NaGLT1 と名付けた。NaGLT1 mRNA は全長 2,173 bp, 推定アミノ酸残基数 484, 推定 11 回膜貫通型の構造を有していた。既知グルコーストランスポータファミリーである SGLT 及び GLUT とのアミノ酸相同性は 22% 以下であり、NaGLT1 は新規グルコーストランスポータであると考えられた。ノーザンブロットリング及び単離ネフロン分節を用いた RT-PCR 解析より、NaGLT1 mRNA は腎臓の近位尿細管に強く発現すること、特異抗体を用いたウエスタンブロットリングより、NaGLT1 タンパクは管腔側刷子縁膜に局在することが明らかとなった。リアルタイム PCR 法を用いて NaGLT1, SGLT1, SGLT2 mRNA の定量を行ったところ、NaGLT1 mRNA 発現量は腎皮質、髄質とも SGLT1, SGLT2 mRNA に比べ有意に高く、腎皮質で SGLT2 mRNA の約 3 倍、腎髄質で約 5 倍を示した。mRNA レベルにおいて、NaGLT1 は SGLT よりも高発現しており、発現量の点からは腎臓でのグルコース再吸収に、より大きく寄与していることが示唆された。

卵母細胞発現系及び cDNA 導入 HEK293 細胞を用いて、NaGLT1 の輸送機能について検討したところ、NaGLT1 は D-グルコースのみならずフルクトースの輸送も媒介することが判明した。また、速度論的な解析より、NaGLT1 を介した α MeGlc 取り込みの K_m 値は 3.7 mM, Na^+ イオンとの共役比は 1:1 であることが明らかになった。従って、NaGLT1 は SGLT2 と同様、腎近位尿細管に局在する低親和性グルコーストランスポータの一つであることが示された。さらに、ラット腎刷子縁膜小胞を用いた検討によって、NaGLT1 は尿細管管腔側における低親和性の Na^+ イオン依存性フルクトーストランスポータであることが示唆された。

以上、本研究はゲノム情報と分子生物学的手法を組み合わせることにより、新規グルコース/フルクトーストランスポータ NaGLT1 の分子実体を初めて明らかにするとともに、既知の分子情報では不十分であった腎臓の生理機能の再構築を可能とするものである。さらに、NaGLT1 を標的とした新しい血糖改善薬開発の可能性を示唆することから、トランスポ

一タ分子に基づいた創薬研究に貢献するところ大であり、医療薬剤学の発展に寄与するものとする。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものとする。

更に、平成16年6月2日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格とする。