



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	第 295 号
氏名	片野 貴大
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	促進拡散型 glycerol キャリアとしての aquaporin7 の機能特性
論文審査担当者	主査：平嶋 尚英 副査：湯浅 博昭, 今泉 祐治, 中村 克徳

氏名	かたの かたひろ 片野 貴大
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 295 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	促進拡散型 glycerol キャリアとしての aquaporin7 の機能特性
論文審査委員	(主査) 教授 平嶋 尚英 (副査) 教授 湯浅 博昭・教授 今泉 祐治・教授 中村 克徳

## 論文内容の要旨

### 【序論】

aquaporin (AQP) は微生物から植物、ヒトにまで幅広く存在することが明らかにされており、水分子のみを選択的に透過することから、水チャネルとして知られる。AQP は細胞の浸透圧調整や体内の水分量の調節等に関わっており、生体恒常性を維持する上で非常に重要な分子であるといえる。AQP の分子構造は 2 つの NPA モチーフと 6 回膜貫通領域からなり、この NPA モチーフが厳密な水分子の選択性に貢献することが知られている。一方、AQP の中でも、AQP3, 7, 9 及び 10 は glycerol 等の低分子化合物を輸送することから、aquaglyceroporin と呼ばれる。これら aquaglyceroporin 類による glycerol 輸送は、基質濃度に対して飽和性を持たないチャネル様輸送機能によるものと考えられてきた。ところが、本研究室における glycerol 輸送特性の検討の結果、肝臓に多く発現する AQP9 は促進拡散型 glycerol キャリアとしての性質を示し、小腸に多く発現する AQP10 は、glycerol キャリアの性質とともに、glycerol チャネルとしての性質も備えた双機能性を示すことが明らかとなった。他の aquaglyceroporin 類 (AQP3, AQP7) に関しても、同様な glycerol 輸送特性が予想される場所であり、glycerol 類似の薬物等の輸送への関与の可能性と併せて、非常に興味深い検討課題であるといえる。

aquaglyceroporin 類の基質である glycerol は、生体内において 2 分子の脂肪酸及びリン酸と結合したリン脂質として存在し、細胞膜を構成する。また、脂肪組織においては、3 分子の脂肪酸とエステル結合した triacylglycerol として貯蔵されている。カテコールアミン等の刺激により、triacylglycerol はホルモン感受性リパーゼによって脂肪酸と glycerol に分解され、これらは血液中に放出される。遊離脂肪酸がエネルギー源として利用されることは広く知られているが、血液中に放出された glycerol についても、肝臓での糖新生等のエネルギー源として利用されることがわかっている。さらに、飢餓状態においては、健常者及び肥満者の血漿中 glycerol の、それぞれ 75%及び 95%程度が glucose に変換される（これは糖新生の 40%及び 80%程度を占める）との報告もされており、glycerol はエネルギー源として重要な物質であるといえる。これまで、脂肪組織から血液中への glycerol の移行は、生体膜（脂質二重層）を介する単純拡散によるものと考えられてきたが、近年、AQP7 がその移行過程に関与することが明らかとなっている。しかし、その詳細はまだまだ十分には明らかとなっておらず、前述の AQP7 の glycerol 輸送特性の問題と併せて、興味深いところである。

以上のような背景のもとに、本研究では、AQP7 の glycerol 輸送特性の解明に取り組み、薬物動態への関与及び生理的

役割を探っていくための手掛かりとすることを旨とした。さらに、一連の glycerol 誘導体による阻害の様式、強さの比較検討により、基質認識特性を探ることを試みた。

## 【本論】

### 1. AQP7 による glycerol 輸送の速度論的特性

初めに、ヒト AQP7 を介した glycerol 輸送特性を検討するにあたり、AQP7 安定発現 MDCKII 細胞株を樹立した。AQP7 発現 MDCKII 細胞において、取り込み時間の経過に伴い $^3\text{H}$ glycerol の取り込みは著しく上昇し、取り込み開始後 20 分程度までその線形性を確認することができた (Fig. 1)。一方、mock 細胞での glycerol の取り込みは極めて小さく、MDCKII 細胞に存在する内因性の輸送メカニズムの寄与はほぼ無視できるものと考えられる。また、細胞膜を介した単純拡散による glycerol の透過性は非常に低いものと考えられる。なお、以降の実験では、AQP7 発現 MDCKII 細胞における glycerol 取り込みから mock 細胞におけるその値を差し引くことにより、AQP7 特異的な取り込みとして評価した。

AQP7 による glycerol 輸送の特性 (キャリア型あるいはチャネル型、あるいはその両方) について、まず、その濃度依存性の観点から検討した。その評価には取り込みクリアランスを用いたが、これは、細胞内への取り込み速度を、取り込み試験液中の基質濃度で除することにより得られるパラメーターであり、基質の取り込みが生体膜を介する単純拡散による場合や、飽和性を持たない輸送 (チャネル型) 特性を示す場合、その値は一定値を維持するが、飽和性を示す輸送 (キャリア型) 特性を示す場合は、取り込みクリアランスは基質濃度の増加に伴って減少する。今回の検討の結果 (Fig. 2)、AQP7 特異的な glycerol 取り込みクリアランスは、取り込み試験液中の glycerol 濃度の増加に伴い減少し、1 - 10 mM においてはほぼ検出不能なレベルに低下した。このことより、AQP7 による glycerol 輸送はキャリア型輸送特性のみを示すものと推察される。

本検討から得られた glycerol 濃度上昇に伴う取り込みクリアランスの変化を、ミカエリス-メンテン型のモデル式に当てはめ、ミカエリス定数 ( $K_m$ ) を求めたところ、その値は 11.9  $\mu\text{M}$  と算出された。これは、同じ aquaglyceroporin 類であるヒトの AQP9 (9.2  $\mu\text{M}$ ) 及び AQP10 (10.4  $\mu\text{M}$ ) と同程度の値であり、glycerol の親和性の面では良く似た性質を有するものと考えられる。また、その  $K_m$  値は血漿中 glycerol 濃度 (100  $\mu\text{M}$  程度) の値とも比較的近いといえ、血漿中レベルの変化に対応して輸送効率を変化させ、glycerol の細胞に取り込みの制御に関わっているものと推察される。

また、aquaglyceroporin 類について、urea 等の glycerol 以外の基質を輸送するとの報告がされており、本研究室の過去の報告からも、urea は AQP10 において、チャネル型の輸送メカニズムにより運ばれることが示唆されている。これを受け、AQP7 特異的な urea の取り込みについても検討した。しかし、今回の AQP7 発現 MDCKII 細胞での urea 取り込みは、mock 細胞での取り込みと同程度であり、AQP7 特異的な urea 取り込みはみられなかった。AQP10 による urea 輸送がチャネル型であることを考えると、glycerol 輸送の濃度依存性の検討から示唆されたように、AQP7 はチャネル型の輸送メカ

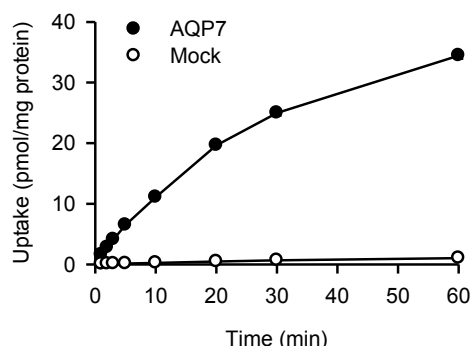


Fig. 1. Time course of glycerol uptake in MDCKII cells stably expressing AQP7

The uptake of  $^3\text{H}$ glycerol (0.05  $\mu\text{M}$ ) was evaluated at 37°C and pH 7.4. Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

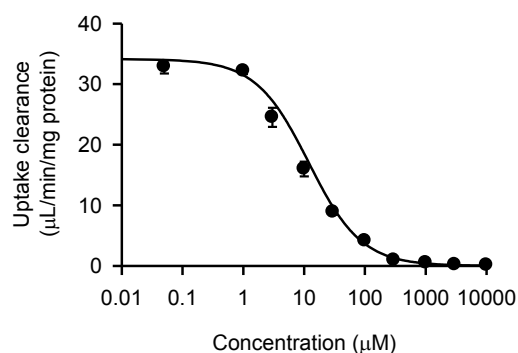


Fig. 2. Concentration dependence of glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells

The specific uptake of  $^3\text{H}$ glycerol was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4. The  $V_{\max}$  and  $K_m$  are 406  $\pm$  33 pmol/min/mg protein and 11.9  $\pm$  1.2  $\mu\text{M}$ , respectively, as the computer-fitted parameters with SE. Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

ニズムを持たないため、urea 輸送能を持たないものと推察される。

## 2. AQP7 による glycerol 輸送の制御因子

AQP7 による glycerol 輸送の制御因子に関して、まずイオン要求性を調べるため、取り込み試験液中の NaCl を他の塩類等で置換し、検討を行った。Na<sup>+</sup>イオンの K<sup>+</sup>イオンや choline イオンへの置換による AQP7 特異的取り込みの変化は観察されず、Na<sup>+</sup>イオン依存性はないものと示唆された。過去に当研究室における検討から、ヒト結腸癌由来 HCT-15 細胞に発現する Na<sup>+</sup>依存型の glycerol トランスポーターの存在が示唆されているが、AQP7 はその種のトランスポーターとは分子的に異なるものと考えられる。一方、取り込み試験液中の Cl<sup>-</sup>イオンを gluconate イオンに置き換えたとき、取り込みが半減し、Cl<sup>-</sup>イオンの取り込みへの関与の可能性が示唆されたが、NaCl の mannitol 置換においてはその取り込みに変化がみられないことから、AQP7 による glycerol 輸送が Cl<sup>-</sup>イオン依存性を示すのではなく、gluconate イオンそのものが輸送阻害活性を有する可能性があるものと考えられる。

また、取り込みの至適 pH についても検討を行った。取り込み試験液の pH 5.5 - 8.0 の条件において、AQP7 特異的 glycerol 取り込みは変化せず、H<sup>+</sup>の輸送への関与はないものと示唆された。なお、取り込み試験液の pH を 5.0 に設定した際に取り込みの有意な低下がみられたが、過度に低い pH であることから、生理的な意義は特になくとも推察される。さらに、取り込み時の温度を通常 37 度から 4 度に低下させることにより、glycerol 取り込みが著しく抑制された。チャネル型輸送は一般に温度の影響を受け難いとされており、このような顕著な温度依存性は、キャリア型輸送に特徴的な性質である。一方で、上述のように二次性能動輸送の代表的な駆動力として知られる Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>といったイオン類の関与がみられないことから、AQP7 による glycerol 輸送は生体エネルギーの関与のない促進拡散型メカニズムによるものと考えられる。

## 3. AQP7 による glycerol 輸送に対する各種阻害剤の影響

AQP7 の基質認識特性を明らかにすべく、glycerol 類似化合物及びアルコール類による阻害効果を調べた。glycerol のアセチルエステルである monoacetin 及びブチルエステルである monobutylin, また、glycerol エーテルである diglycerol により、取り込みの著しい阻害が観察された。さらに、分子内に glycerol 様構造を有する chloramphenicol についても、取り込みの阻害が観察された。

一方、アルコール類については、1,2-propanediol による著しい阻害効果が認められた (Fig. 3)。興味深いことに、S 体においてのみ阻害効果を示し、R 体においては有意な阻害効果は確認されなかった。これらの特異的な取り込み阻害剤の存在及び立体特異的な認識特性は、AQP7 による glycerol 輸送がキャリア型輸送特性を持つことを支持するものである。また、前述の monoacetin や monobutylin も 1,2-propanediol と同様の 1,2-diol 構造を有することと併せ、AQP7 による認識において 1,2-diol 構造が重要である可能性が考えられる。

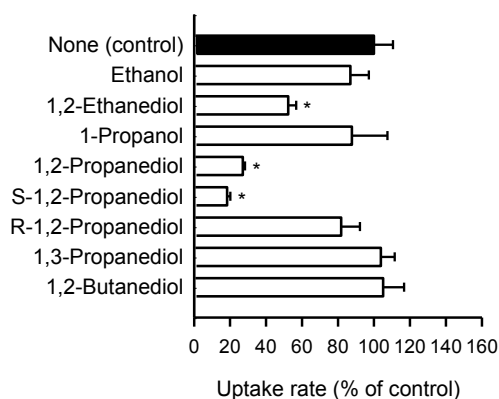


Fig. 3. Effect of various alcohols on glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells

The specific uptake of [<sup>3</sup>H]glycerol (0.05 μM) was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of an alcohol (10 mM) or in its absence. The control value was 0.55 pmol/min/mg protein. Data are presented as means ± SE (n = 3). \* p < 0.05 compared with the control.

## 4. AQP7 による glycerol 輸送に対する glycerol 誘導体の阻害様式の評価

AQP7 による glycerol 輸送に対して、glycerol のエステル誘導体等が強い阻害効果を示し、また、認識要件としての 1,2-diol 構造の関与が示唆されたことを踏まえ、一連の glycerol 誘導体の阻害効果に関してさらに詳細な検討を加えることにした。まず、前項で用いた各種 glycerol 誘導体に加え、幾つかの glycerol エステルを阻害剤として用い、取り込

み試験液中の阻害剤濃度を変化させることによって低濃度 (0.05  $\mu\text{M}$ ) での glycerol の取り込みクリアランスへの影響を調べた。その結果, glycerol のモノ及びジアシルエステルである monoacetin, diacetin, monobutyryn 及び diglycerol は, 高濃度域 (1 - 10 mM) においてほぼ完全に glycerol 取り込みを阻害したが, 一方, トリアシルエステルである triacetin 及び tributyrin の阻害効果はごく弱かった (Fig. 4)。

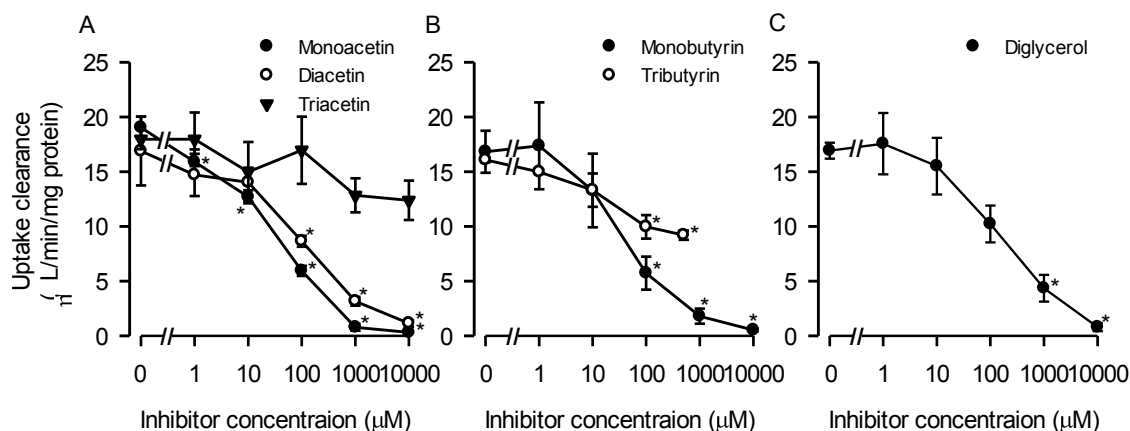


Fig. 4. Effect of various glycerol derivatives on glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells

The specific uptake of [ $^3\text{H}$ ]glycerol (0.05  $\mu\text{M}$ ) was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of a glycerol derivative or in its absence. Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). \*  $p < 0.05$  compared with the control.

次に, 強い取り込み阻害効果を示した 4 種の glycerol 誘導体について, その存在または非存在下で, 輸送基質である glycerol 濃度を変化させ, その阻害様式について調べた。その結果, 今回用いた全ての glycerol 誘導体において競合的な阻害様式が示唆された。したがって, これらの glycerol 誘導体は glycerol と競合する基質として AQP7 に認識されている可能性が高いと考えられる。阻害定数は monoacetin = monobutyryn < diacetin であった (Table 1)。glycerol 輸送のミカエリス定数 (11.9  $\mu\text{M}$ ) が, monoacetin や monobutyryn の阻害定数よりも小さく, トリアシルエステルが阻害効果をほとんど示さなかったことから, AQP7 への親和性は, glycerol > monoacetin = monobutyryn > diacetin > triacetin, tributyrin の順であり, glycerol 骨格の有するヒドロキシル基の数に大きく依存していることが示唆された。なお, diglycerol の阻害定数 (親和性) は, diacetin のものと同程度であった。

Table 1. Inhibition constants ( $K_i$ ) for the inhibition of glycerol uptake by AQP7 stably expressed in MDCKII cells

Inhibitor	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
Monoacetin	134 $\pm$ 17
Monobutyryn	80 $\pm$ 18
Diacetin	420 $\pm$ 111
Diglycerol	312 $\pm$ 69

Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). \*  $p < 0.05$ .

### 【結論】

AQP7 を介した glycerol 輸送は, 温度依存性かつ飽和性という特徴から, キャリア型メカニズムによるものであることが示唆された。また, 部分的なチャネル型メカニズムによる輸送の関与もないことが示唆された。さらに, 二次性能動輸送の駆動力となる典型的なイオンである  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  の影響を受けないことから, AQP7 は促進拡散型 glycerol キャリアとしての輸送特性をもつことが強く示唆された。

alcohol 類及び glycerol 誘導体による阻害効果の検討からは, AQP7 における基質認識性はかなり厳密ではあるものの, glycerol のみでなく, その構造類似体等を認識し, 輸送する可能性も示唆された。さらに, 認識性は glycerol 骨格の有するヒドロキシル基の数に大きく依存しており, 置換基の付加によりヒドロキシル基が減ると親和性が低下することが示唆された。

本研究により得られた知見が、今後、glycerol 類似の薬物等の体内動態における AQP7 の役割を探るうえで、また、AQP7 のドラッグデリバリーへの利用の可能性等を探るうえで役立つことを期待したい。また、脂肪細胞からの glycerol 放出メカニズムをはじめとする glycerol 動態における AQP7 の生理的役割の理解の進展に役立つことも期待されることである。

(基礎となる報文)

1. T. Katano, Y. Ito, K. Ohta, T. Yasujima, K. Inoue and H. Yuasa  
Functional Characteristics of Aquaporin 7 as a Facilitative Glycerol Carrier  
*Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press  
DOI; 10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-121
2. T. Katano, Y. Ito, K. Ohta, T. Yasujima, K. Inoue and H. Yuasa  
Competitive Inhibition of AQP7-Mediated Glycerol Transport by Glycerol Derivatives  
*Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press  
DOI; 10.2133/dmpk.DMPK-13-NT-139

(参考論文)

1. Y. Ohgusu, K. Ohta, M. Ishii, T. Katano, K. Urano, J. Watanabe, K. Inoue and H. Yuasa  
Functional Characterization of Human Aquaporin 9 as a Facilitative Glycerol Carrier  
*Drug Metab. Pharmacokinet.*, 23, 279-284 (2008).
2. M. Ishii, K. Ohta, T. Katano, K. Urano, J. Watanabe, A. Miyamoto, K. Inoue and H. Yuasa  
Dual Functional Characteristic of Human Aquaporin 10 for Solute Transport  
*Cell Physiol. Biochem.*, 27, 749-756 (2011).

### 論文審査の結果の要旨

aquaglyceroporin 類は水/glycerol チャネルとされてきたが、glycerol 輸送に関しては、非飽和性を特徴とするチャネル様機構ではなく、飽和性を特徴とするキャリア様機構が共通する主要な機能特性として見出されつつある。これは、AQP9 及び AQP10 の機能解析から浮かび上がってきたものであるが、他の aquaglyceroporin 類 (AQP3 及び AQP7) に関しても同様な glycerol 輸送機能特性が予想されることであり、glycerol 類似の薬物等の輸送への関与の可能性と併せて、薬物動態学的にも興味深い。本研究は、このような背景の下に、AQP7 の glycerol 輸送機能特性の解明に取り組み、薬物動態への関与及び生理的役割を探っていくための手掛かりとすることを旨としたものである。

ヒト AQP7 を導入・発現させた MDCKII 細胞を用いた各種試験により、AQP7 を介した glycerol 輸送は、温度依存性かつ飽和性という特徴から、キャリア様機構によるものであることが示唆された。また、部分的なチャネル様機構の関与もないことが示唆された。さらに、2 次性能動輸送の駆動力となる典型的なイオン類である Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>の影響を受けないことから、AQP7 は促進拡散型 glycerol キャリアとしての輸送機能特性を持つことが強く示唆された。

alcohol 類及び glycerol 誘導体による阻害効果の検討からは、AQP7 における基質認識性はかなり厳密ではあるが、glycerol の構造類似体等を認識し、輸送する可能性も示唆された。また、一連の glycerol 誘導体による競合阻害を検証することができた。さらに、AQP7 による認識性は glycerol 骨格の有するヒドロキシル基の数に大きく依存しており、置換基の付加によるヒドロキシル基数の減少に伴い、親和性が低下することが示唆された。

以上のように、促進拡散型 glycerol キャリアとしての AQP7 の機能の新たな面を見出すことができた。また、基質認識特性の把握を進展させることができた。これらは、glycerol 動態における AQP7 の生理的役割の理解の進展を図ることに加え、glycerol 類似の薬物等の体内動態における AQP7 の役割を探り、また AQP7 のドラッグデリバリーへの利用の可能性等を探るための基盤となる価値ある成果である。論文での表現もほぼ妥当であり、博士論文として合格であると判定する。