

ナトリウム依存性糖輸送体の細胞内分布調節機構の解明と 細胞障害からの回復における役割

五十里 彰

Regulatory Mechanisms of Intracellular Distribution of Na⁺-dependent Glucose Transporter and the Role in Recovery from Cellular Injury

Akira IKARI

Department of Environmental Biochemistry and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences,
University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan

(Received September 7, 2004)

Exposure of cells or organs to sublethal stress induces the expression of some heat-shock proteins (Hsp), including Hsp70. In porcine renal LLC-PK₁ cells, heat stress (HS) elevates Hsp70 expression and Na⁺-dependent glucose transport. We examined whether Na⁺-dependent glucose transporter (SGLT1) interacts with Hsp70 to elevate SGLT1 activity and whether SGLT1 activation is involved in the recovery from HS injury. HS (42°C for 3 h) elevated SGLT1 activity and expression of SGLT1 in the apical membrane fraction. HS increased the maximal transport rate (V_{max}), but did not affect the apparent affinity constant (K_m) for glucose. The HS-induced SGLT1 activation was inhibited by anti-transforming growth factor (TGF)- β 1 antibody. Furthermore, transfection of anti-Hsp70 antibody into the cells inhibited SGLT1 activation. These results suggest that HS induces TGF- β 1 secretion, and then Hsp70 forms a complex with SGLT1 and increases the distribution of SGLT1 in the apical membrane. Next, we examined the effect of HS on plasma membrane integrity. Accumulation of calcein, a membrane-impermeable fluorescent dye, was decreased by HS and then returned to basal level. This recovery was inhibited by phloridzin, a selective SGLT inhibitor, and nonmetabolizable glucose analogues. Anti-TGF- β 1 antibody also inhibited the recovery of calcein accumulation. Taken together, the present results show that HS elevates SGLT1 activity mediated *via* the TGF- β 1 signaling pathway and that the increase in glucose uptake is necessary to repair plasma membrane injury.

Key words—Na⁺-dependent glucose transporter; heat-shock protein 70; cellular injury; transforming growth factor- β 1; stress

1. はじめに

三大栄養素の糖質は、生体活動のエネルギーとして重要な物質であり、特にグルコースは各臓器で吸収、貯蔵、代謝、及び排泄されることにより生体内での恒常性が保たれている。このグルコースの吸収及び再吸収には、小腸と腎臓の上皮細胞の管腔膜に発現するナトリウム依存性糖輸送体 (Na⁺-dependent glucose transporter: SGLT) が関与している。SGLT は基質に対する親和性や遺伝子配列の違いから、SGLT1, SGLT2, SGLT3, rNaGLT1 の4種類に

分類されている。^{1,2)}

1991年にWrightらのグループ³⁾が家族性グルコース・ガラクトース吸収不全症の原因遺伝子として変異型SGLT1を特定し、その後小腸のSGLT1の機能解析がアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いて進められた。そして細胞内cAMP濃度上昇によりSGLT1活性が上昇すること、それにはSGLT1を含む輸送小胞の細胞質領域から管腔膜への移行が関与することが明らかにされた。腎臓におけるグルコース再吸収の大部分はSGLT2を介して行われると示唆されているが、SGLT2のグルコース輸送活性が非常に小さく現時点では実験系の確立が困難である。そのため腎臓ではSGLT1に関する研究が中心に進められ、小腸のSGLT1と同様にcAMPによって調節されることが報告されてい

静岡県立大学薬学部産業衛生学教室 (〒422-8526 静岡市谷田 52-1)

e-mail: ikari@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、平成16年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

る。また、SGLT3は輸送体ではなくグルコースセンサーとして働くことが分かってきている。⁴⁾

ストレス、若しくは障害によって誘起される細胞機能の保護と亢進は、熱ショックタンパク質 (heat shock protein: Hsp) の発現量増加と関連しており、特にその中でも Hsp70 がよく知られている。Hsp70 は変性タンパク質の凝集や折り畳み異常の発生を防いでいるが、それ以外にも新規に合成されたタンパク質の折り畳み促進、各オルガネラへの適切な輸送など重要な役割を果たしている。⁵⁾ 原形質膜に発現する膜タンパク質に着目すると、Hsp70 は Na⁺/H⁺ 交換輸送体、Na⁺/K⁺-ATPase などと会合することが報告されている。^{6,7)} 腎臓においては、Hsp70 はすべての尿細管上皮細胞にユビキタスに存在するタンパク質であり、腎虚血からの細胞機能の回復時に働くことが知られている。これまでに LLC-PK₁ 細胞への高温ストレス負荷が Hsp70 の発現量を上昇し、さらに SGLT1 のグルコース輸送活性を上昇すると報告されている。⁸⁾ 本総説では、高温ストレス負荷による SGLT1 の活性化機構とともに、ストレス細胞障害からの回復における SGLT1 の関与について概説する。

2. 高温ストレスによる SGLT1 の活性化

ブタの腎近位尿細管由来の LLC-PK₁ 細胞を、SGLT1 の発現とグルコース輸送活性を検討するために用いた。この細胞では、コンフルエントに達したのち SGLT1 によるグルコース輸送活性が観察される。⁹⁾ ウェスタンブロット法で SGLT1 と Hsp70 の発現を確認したところ、Hsp70 はコンフルエント及びサブコンフルエントの状態が発現していたが、SGLT1 はサブコンフルエントの状態では発現していなかった (Fig. 1(A))。SGLT1 のグルコース輸送機能を調べるために、SGLT の特異的基質である [¹⁴C]- α -methyl glucopyranoside の細胞内への取り込みを測定した。その結果 SGLT1 を介したグルコース輸送活性はコンフルエント状態の細胞でのみ観察された (Fig. 1(B))。

次に、コンフルエント状態の細胞に高温 (42°C, 3時間) を負荷し、その後通常の 37°C (回復) に戻したところ、SGLT1 のグルコース輸送活性が時間依存的に増加した (Fig. 2(A))。高温処理前の細胞と回復 12 時間後の細胞を用いてカイネティクス解析を行ったところ、グルコースに対する親和性は

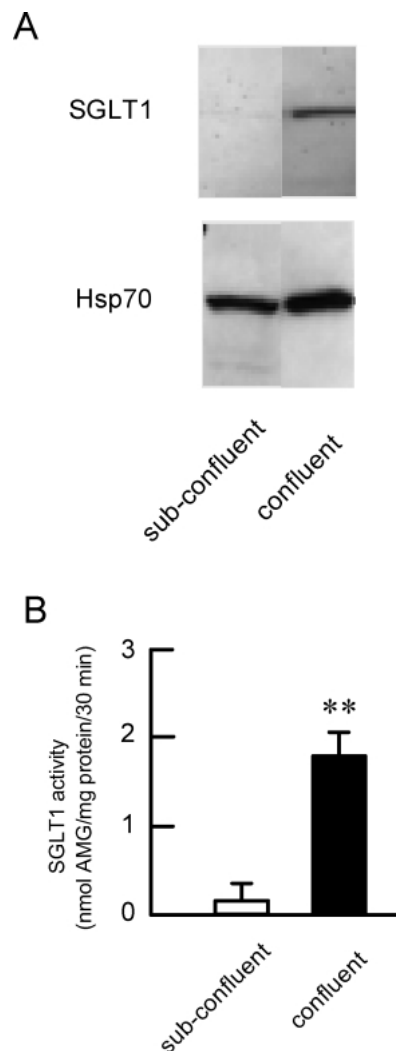


Fig. 1. Expression and Transport Activity of SGLT1 in Sub-confluence and Confluence LLC-PK₁ Cells

(A) The membrane fractions were prepared from sub-confluence and confluence cells. Samples were run on SDS-PAGE gels and immunoblotted with an anti-SGLT1 antibody (SGLT1) or an anti-Hsp70 antibody (Hsp70). (B) SGLT1 activity was determined by [¹⁴C]- α -methyl glucopyranoside ([¹⁴C]-AMG) uptake carried out at 37°C for 30 min in sub-confluence (open column) and confluence cells (closed column). **: significantly different from the sub-confluent condition ($p < 0.01$).

0.31 と 0.35 mM で有意に変化しなかったが、最大輸送活性が 2.4 から 5.9 nmol/mg protein/30 min に増加した (Fig. 2(B))。ウェスタンブロット法により全細胞膜画分と管腔膜画分における SGLT1 の発現量を調べたところ、全細胞膜画分ではほとんど変化がみられなかったが、回復 12 時間後の管腔膜画分では高温処理前の約 1.5 倍に増加した。以上のことから、高温ストレスにより管腔膜における SGLT1 の分布量が増加したために SGLT1 活性が増加したと考えられた。

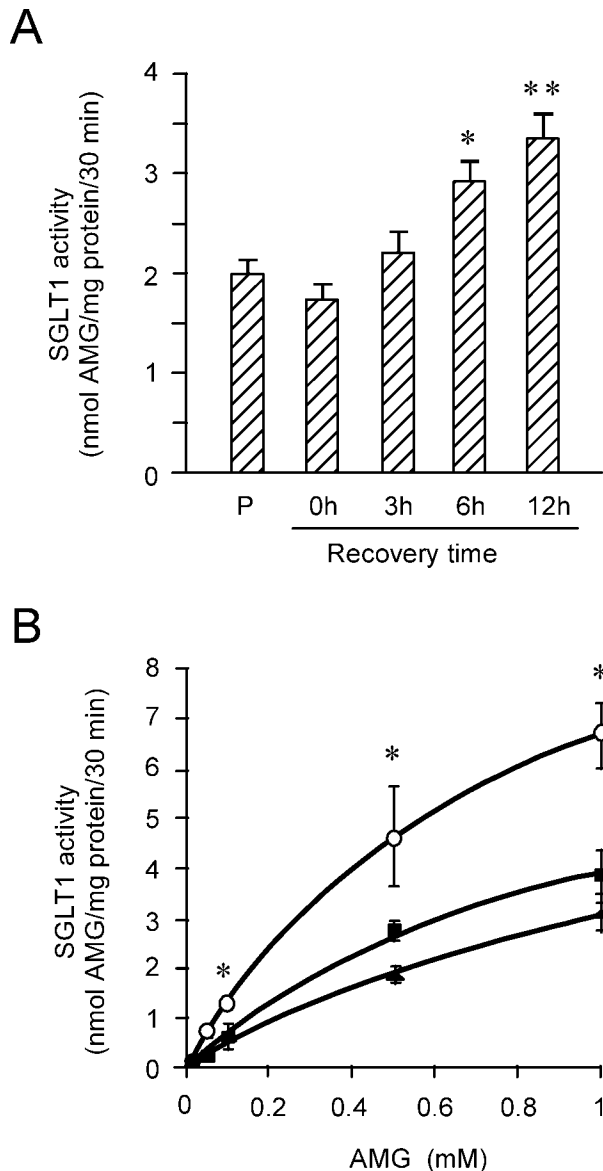


Fig. 2. Effects of Heat Stress (HS) on SGLT1 Activity in LLC-PK₁ Cells

(A) LLC-PK₁ cells were exposed to normal temperature (P) or HS followed by recovery for 0, 3, 6 and 12 h. SGLT1 activity was determined by [¹⁴C]-AMG uptake carried out at 37°C for 30 min. All data were subtracted by a non-specific [¹⁴C]-AMG transport in the presence of 0.5 mM phloridzin. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs normal temperature. (B) SGLT1 activity was determined in the cells of pre-heat (■) and HS followed by recovery for 0 h (▲) and 12 h (○). Unlabeled AMG concentrations were varied from 0.01 to 1 mM. * $p < 0.05$ vs pre-heat cells.

3. SGLT1の活性化におけるHsp70の関与

ストレスは様々なサイトカインやホルモンの産生を誘導する。そこで組織障害の修復に関わる transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) が、高温ストレスによる SGLT1 の活性化に関与するのかを調べた。抗 TGF- β 1 抗体を培養上清に添加しておく、高温ストレスによる SGLT1 の活性化は阻害され

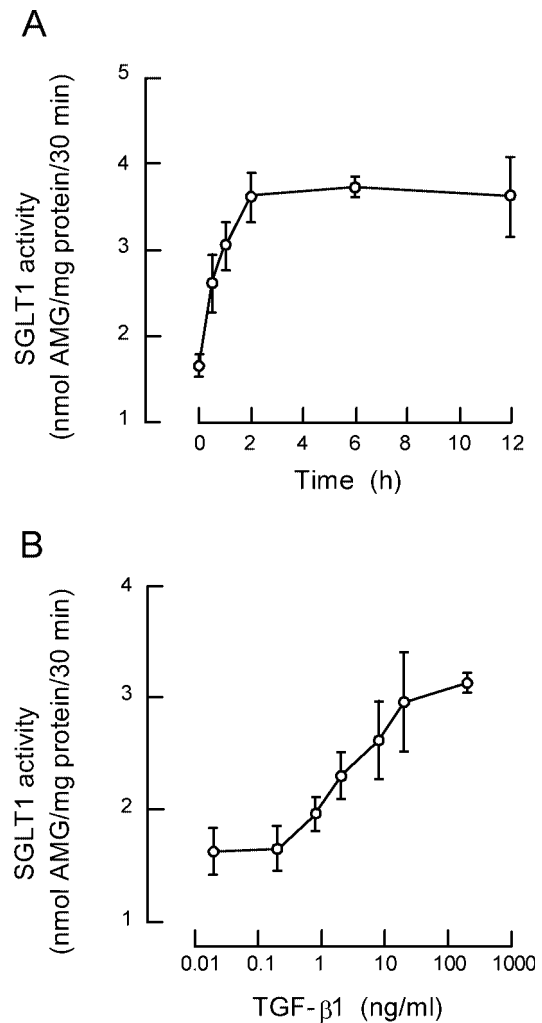


Fig. 3. Increase of SGLT1 Activity by TGF- β 1

(A) LLC-PK₁ cells were incubated with 2 ng/ml TGF- β 1 for indicated time, then SGLT1 activity was determined. (B) The cells were incubated with TGF- β 1 at indicated concentration for 2 h, then SGLT1 activity was determined.

た。このことから、高温ストレスは TGF- β 1 の分泌を促進し、SGLT1 活性を増加させると示唆された。そこで高温ストレスの代わりに TGF- β 1 の作用を検討した。TGF- β 1 は時間依存的に SGLT1 活性を増加し、処理後 2 時間で最大効果が観察された (Fig. 3 (A))。また、TGF- β 1 は濃度依存的に SGLT1 活性を増加し、その EC₅₀ は約 2 ng/ml であった (Fig. 3 (B))。次に、蛍光免疫染色により SGLT1 の細胞内分布を調べた。SGLT1 と管腔膜のマーカータンパク質としてアミノペプチダーゼ N を二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて xz 切片における分布を観察した。無処理の細胞では SGLT1 が管腔膜と細胞質に分布していたが、TGF-

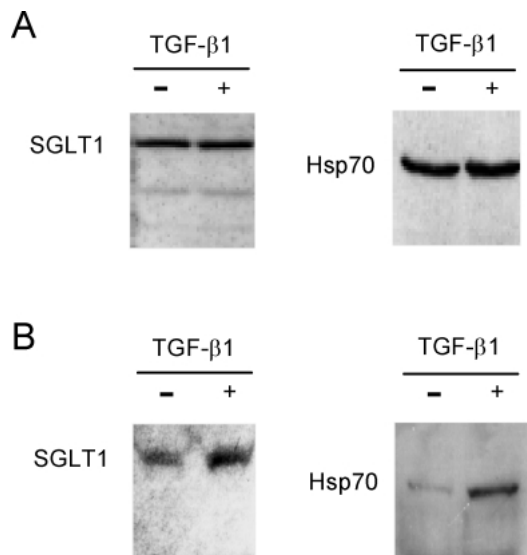


Fig. 4. Increase of Interaction between SGLT1 and Hsp70 by TGF- β 1

(A) The membrane fractions were prepared from control (-) and 2 ng/ml TGF- β 1-treated (+) cells. Samples were run on SDS-PAGE gels and immunoblotted with an anti-SGLT1 (SGLT1) or an anti-Hsp70 antibody (Hsp70). (B) The membrane fractions prepared from control (-) and TGF- β 1-treated (+) cells were immunoprecipitated with an anti-Hsp70 (left) or an anti-SGLT1 antibody (right), then immunoblotted with an anti-SGLT1 or an anti-Hsp70 antibody, respectively.

β 1 処理により大部分が管腔膜の近傍に移行した。

Hsp70 の発現量と SGLT1 活性に相関がみられたので、両者の会合について検討した。全細胞膜画分における SGLT1 と Hsp70 の発現量は TGF- β 1 処理により変化しなかったが、抗 SGLT1 抗体で免疫沈降を行い、抗 Hsp70 抗体で検出したところ、TGF- β 1 処理により両者の会合量が増加することが明らかになった (Fig. 4)。抗 Hsp70 抗体で免疫沈降した場合にも SGLT1 との会合量の増加が確認された。そこで Hsp70 の会合が SGLT1 活性に影響を与えているのかを調べるために、細胞内へのペプチド導入試薬 chariot を用いて抗 Hsp70 抗体を LLC-PK₁ 細胞に導入した。コントロールの抗ウサギ IgG 抗体を導入した細胞では TGF- β 1 の作用に変化はみられなかったが、抗 Hsp70 抗体を導入した細胞では TGF- β 1 による SGLT1 の活性化が有意に阻害された。また、抗 Hsp70 抗体の導入により基礎レベルの SGLT1 活性も低下したことから、生理的条件下でも SGLT1 の分布は Hsp70 により調節を受けていると考えられる。以上のことから、高温ストレスや TGF- β 1 は SGLT1 と Hsp70 の会合量の増加、管腔膜における SGLT1 の分布量の増加を介

してグルコースの取り込みを増加すると示唆された。

Hsp70 とその関連タンパク質は、リガンドとなるタンパク質の疎水性の高い領域と ATP 依存的に会合することが報告されている。そこで Hsp70 と SGLT1 の会合を *in vitro* において検討した。LLC-PK₁ 細胞の全細胞膜画分を 5 mM ATP / 10 mM MgCl₂ 存在下でインキュベートし、Hsp70 とリガンドタンパク質の解離を行った。その後ヘキサナーゼ及びグルコース添加によって ATP を枯渇させることにより、Hsp70 とリガンドタンパク質の再会合を促した。最後に抗 SGLT1 抗体を用いて免疫沈降したのち、SGLT1 と会合する Hsp70 をウエスタンブロッティングによって検出した。ATP の添加により SGLT1 と Hsp70 は解離し、ATP を枯渇させると両者の再会合が促された。この再会合は、抗 Hsp70 抗体を再会合前にあらかじめ添加することで阻害されたが、抗ウサギ IgG 抗体で阻害されなかった。一方、抗 Hsp70 抗体を添加しなかったサンプルではバンドが確認されなかったことから、Hsp70 の非特異的な吸着はないことが確認された。以上のことから、SGLT1 と Hsp70 の会合と解離は ATP に依存的に調節されていると示唆される。

4. 高温ストレス細胞障害からの回復における SGLT1 の関与

高温処理などによる細胞障害や、その後の回復メカニズムについては、いまだ不明な点が多い。乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の漏出から細胞障害の定量化を試みたが、高温処理により LDH の漏出量はほとんど変化しなかった (Fig. 5(A))。本実験における高温ストレス負荷は、致命的な細胞障害を引き起こさないと考えられた。LDH は分子量が 35000 のサブユニット 4 つからなるオリゴマー酵素なので、サイズの小さな蛍光色素 calcein (分子量 408) の蓄積を測定することにより細胞障害を評価した。Calcein/AM は蛍光を持たない膜透過性のアナログで、細胞内のエステラーゼにより加水分解されて蛍光を有するようになる。高温処理直後には calcein の蓄積に変化はなかったが、回復 1.5 時間後に蓄積量が減少し 12 時間後には元のレベルに戻った。この calcein 蓄積の回復は、SGLT の阻害剤である phloridzin で有意に阻害された (Fig. 5(B))。また、培養液中のグルコースを非代謝型グルコース

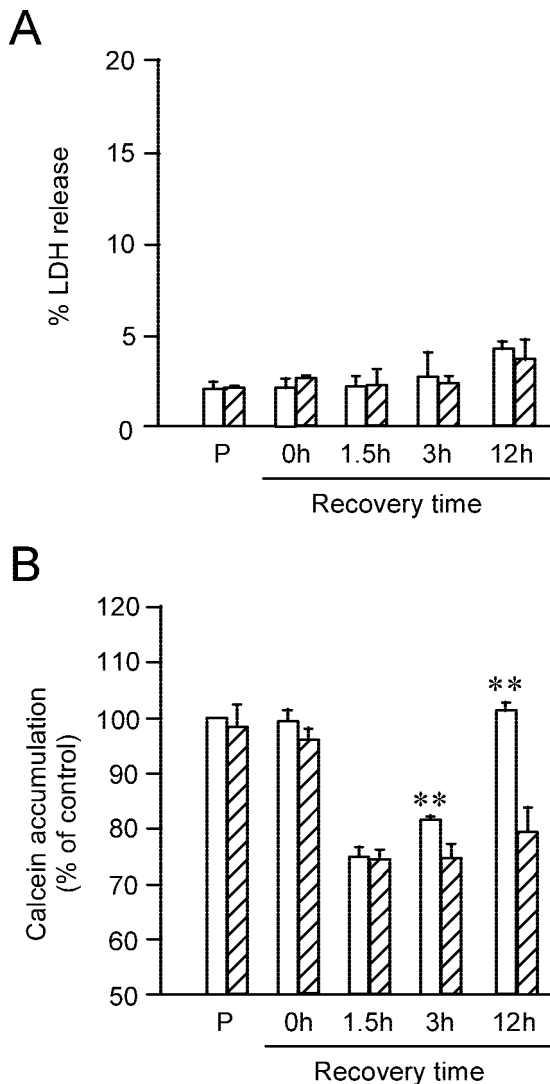


Fig. 5. Recovery of Calcein Accumulation from HS Injury

(A) The cells were exposed to normal temperature (P) or HS followed by recovery for 0, 1.5, 3, and 12 h in the presence (hatched column) and absence (open column) of 0.5 mM phloridzin. LDH released into the extracellular solution was represented as a percentage of total LDH activity. (B) The cells were exposed to HS followed by recovery for 0, 1.5, 3 and 12 h in the presence (hatched column) and absence (open column) of 0.5 mM phloridzin. Then the cells were incubated with calcein-AM at 37°C for 20 min. After removing extracellular calcein, the cells were solubilized by 2% Triton X-100. The aliquot was collected and calcein accumulation was normalized to a reference sample of normal temperature (P). ** $p < 0.01$ vs 1.5 h.

類似体に置換又は抗 TGF- β 1 抗体を添加した場合、phloridzin と同様に calcein 蓄積の回復が阻害された。以上のことから、高温処理により原形質膜に calcein が透過できるサイズの間隙ができ、その修復に SGLT1 を介したグルコースの取り込みが必要であると示唆された。

5. おわりに

本総説では、腎臓におけるグルコース再吸収を担う SGLT1 の調節機構に関して、Hsp70 という会合

タンパク質による新規の調節機構を紹介した。¹⁰⁾ これまで Hsp との会合によりイオン輸送体の分布や機能が調節されるという報告はなく、筆者らの知見は SGLT1 の会合タンパク質を明らかにしただけでなく、Hsp70 の新しい作用も提示した。また、SGLT1 は腎臓におけるグルコース再吸収を担うだけでなく、ストレスによる細胞障害の修復に関与することが示唆された。¹¹⁾ 腎尿細管の炎症や虚血による腎機能の低下は、糖尿病や高血圧など多くの病態を悪化させるが、Hsp70 による SGLT1 のグルコース取り込みの調節は生体に備わった防御機構の 1 つなのかもしれない。現在、SGLT 阻害剤が新しい作用機序の糖尿病治療薬として臨床試験段階にある。腎臓の病態生理にどのように SGLT1 が関与するのか、SGLT1 の阻害が腎障害の悪化を引き起こさないのかなどを検討していく必要があるだろう。

謝辞 本研究は、静岡県立大学薬学部産業衛生学教室において行われたものであり、ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました祐田泰延名誉教授に深甚なる謝意を表します。また、貴重なご助言やご指導を頂きました高木邦明助教授、原田均講師を始め、その遂行に多大なご協力を頂いた河野和也博士、中野美佳修士並びに産業衛生学教室の皆様へ深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Wright E. M., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **280**, F10-F18 (2001).
- 2) Horiba N., Masuda S., Takeuchi A., Takeuchi D., Okuda M., Inui K., *J. Biol. Chem.*, **278**, 14669-14676 (2003).
- 3) Turk E., Zabel B., Mundlos S., Dyer J., Wright E. M., *Nature*, **350**, 354-356 (1991).
- 4) Diez-Sampedro A., Hirayama B. A., Osswald C., Gorboulev V., Baumgarten K., Volk C., Wright E. M., Koepsell H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 11753-11758 (2003).
- 5) Beck F. X., Neuhofer W., Müller E., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **279**, F203-F215 (2000).
- 6) Silva N. L., Haworth R. S., Singh D., Fliegel L., *Biochemistry*, **34**, 10412-10420 (1995).
- 7) Bidmon B., Endemann M., Müller T., Arbeiter K., Herkner K., Aufricht C., *Kidney Int.*,

-
- 58**, 2400–2407 (2000).
- 8) Sussman C. R., Renfro J. L., *Am. J. Physiol.*, **273**, F530–F537 (1997).
- 9) Mullin J. M., Weibel J., Diamond L., Klein-zeller A., *J. Cell Physiol.*, **104**, 375–389 (1980).
- 10) Ikari A., Nakano M., Kawano K., Suketa Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 33338–33343 (2002).
- 11) Ikari A., Nakano M., Ishibashi M., Kawano K., Suketa Y., Harada H., Takagi K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1643**, 47–53 (2003).