

博士論文

肝臓における Na^+ 依存性クエン酸トランスポーター
(SLC13A5/NaCT) の病態生理的役割
(Pathophysiological roles of Na^+ -coupled citrate
transporter (SLC13A5/NaCT) in liver)

2020年9月

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

後藤 真耶

立命館大学審査博士論文

肝臓における Na^+ 依存性クエン酸トランスポーター
(SLC13A5/NaCT) の病態生理的役割
(Pathophysiological roles of Na^+ -coupled citrate
transporter (SLC13A5/NaCT) in liver)

2020 年 9 月

September 2020

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

Doctoral Program in Pharmacy

Graduate School of Pharmacy

Ritsumeikan University

後藤 真耶

GOTO Maya

研究指導教員：藤田 卓也 教授

Supervisor : Professor FUJITA Takuya

目次

| | |
|--|----|
| 略語一覧 | |
| 総論の部 | 1 |
| 緒言 | 1 |
| 第 1 章 1 型糖尿病モデルマウスの肝臓における Na ⁺ 依存性クエン酸トランスポーター (NaCT) の発現、および機能的特徴に関する検討 | 4 |
| 1-1 1 型糖尿病モデルマウスの肝臓における NaCT の発現解析 | 6 |
| 1-2 1 型糖尿病モデルマウスの肝臓における Na ⁺ 依存的なクエン酸の輸送特性 | 7 |
| 1-3 1 型糖尿病モデルマウスの肝細胞における脂質蓄積の解析 | 7 |
| 1-4 1 型糖尿病モデルマウスにおける血漿中の脂質量の解析 | 9 |
| 考察 | 9 |
| 第 2 章 Protein kinase C (PKC) の Na ⁺ 依存性クエン酸トランスポーター (NaCT) を介したクエン酸輸送に対する影響に関する検討 | 12 |
| 2-1 HepG2 細胞における SLC 13A family トランスポーターの発現解析 | 14 |
| 2-2 HepG2 細胞におけるクエン酸の輸送特性 | 14 |
| 2-3 HepG2 細胞における Na ⁺ 依存的なクエン酸の輸送への PKC 活性化の影響 | 16 |
| 2-4 HepG2 細胞における Na ⁺ 依存的なクエン酸の輸送への PKC 活性化阻害の影響 | 17 |
| 2-5 HepG2 細胞における Na ⁺ 依存的なクエン酸の輸送の速度論的パラメーターに対する PMA の影響 | 18 |
| 考察 | 18 |
| 結論 | 22 |
| 業績 | 24 |
| 謝辞 | 25 |
| 実験の部 | 26 |
| 引用文献 | 32 |

略語一覽

| | |
|-----------|---|
| ACC | acetyl-CoA carboxylase |
| ADP | adenosine diphosphate |
| ATP | adenosine triphosphate |
| cAMP | cyclic adenosine monophosphate |
| CPT-1 | carnitine palmitoyltransferase 1 |
| CREB | cAMP response element binding protein |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| FBS | fetal bovine serum |
| F1,6BPase | fructose 1,6 bisphosphatase |
| F1,6P | fructose-1,6-biphosphate |
| F6P | fructose-6-phosphate |
| GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| HepG2 | human hepatoma cell line |
| HEPES | 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid |
| HRPE | human retinal pigment epithelial |
| LPL | lipoprotein lipase |
| NAA | <i>N</i> -acetyl-L-aspartate |
| NaCs | Na ⁺ - coupled carboxylate transporters |
| NaCT | Na ⁺ -coupled citrate transporter |
| NaDC | Na ⁺ -coupled dicarboxylate transporter |
| NAFLD | nonalcoholic fatty liver disease |
| NADPH | nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| NASH | nonalcoholic steatohepatitis |
| NEFA | nonesterified fatty acid |
| NMDG | <i>N</i> -methyl-D-glucamine |
| PEP | phosphoenolpyruvate |
| PFK1 | phosphofructokinase 1 |
| PK | pyruvate kinase |
| PKA | protein kinase A |
| PKC | protein kinase C |
| PMA | phorbol 12-myristate 13-acetate |

| | |
|----------|---|
| PVDF | polyvinylidene difluoride |
| RT-PCR | reverse transcription polymerase chain reaction |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| SLC | solute carrier |
| STZ | streptozotocin |
| TBS-T | Tween tris buffered saline |
| TCA | tricarboxylic acid |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| VLDL | very-low-density lipoprotein |

総論の部

緒言

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) は、過度の飲酒習慣が無いにもかかわらずアルコール性脂肪性肝疾患と同様に肝細胞内への異所性の脂肪蓄積が認められる肝疾患である¹⁻³。現在、成人の約 25% が NAFLD に罹患しており、その罹患者数は世界全体で増加の一途を辿っている¹⁻³。この NAFLD 患者の約 25% が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を発症し、さらにそこにインスリン抵抗性や酸化ストレスなどの刺激が加わることで NASH 患者の約 20% が肝硬変に発展することが明らかとなっている¹⁻³。そのため、NAFLD は世界的に重大な健康問題となっているが、肝細胞への脂質蓄積機構が十分に明らかになっていないことから、有効な治療方法は未だ確立されていない。一般に、NAFLD などの肝臓における脂質蓄積は、エネルギー産生や脂質合成の亢進と脂肪酸の β 酸化の抑制によって起こることが推察されており、これらの代謝経路において中心的な役割を果たしているのがクエン酸である⁴⁻⁷。

クエン酸は、tricarboxylic acid (TCA) 回路中間体の一つで、エネルギー産生、や脂質合成、糖代謝など幅広い代謝経路の基質や制御因子となることから、生命維持において中心的な役割を果たしている⁸⁻¹⁰。クエン酸は、細胞質において、脂質合成の基質となるだけでなく、脂質合成に関与する酵素の活性化を介して脂質の *de novo* 合成を促進する⁸⁻¹⁰。その一方で、脂肪酸の β 酸化はクエン酸によって間接的に抑制される^{8,11}。また、クエン酸は、解糖系の抑制、および糖新生の促進にも関与することが明らかとなっている^{8,12} (Fig. 1)。このように、クエン酸は様々な代謝経路に関与しており、ヒトでは血漿中のクエン酸の約 85% が肝臓で消費される⁷ことから、クエン酸は特に肝臓における種々の代謝反応において重要な役割を果たしている。

これら様々な代謝反応で利用されるクエン酸は、ミトコンドリアの TCA 回路で生成されるものだけでなく、細胞外からも取り込まれる^{13,14}。クエン酸は、血漿中に高濃度 (~135 μ M) で存在している^{15,16} が、細胞膜は透過できないことから、細胞内へのクエン酸の取り込みには輸送系が関与している。現在までに、クエン酸などの TCA 回路中間体を細胞内に輸送する輸送系はほとんどの生物で確認されており、哺乳類では 3 つの異なる Na^+ 共役カルボン酸トランスポーター (Na^+ -coupled carboxylate transporters : NaCs)、NaC1/NaDC1、NaC2/NaCT、NaC3/NaDC3 が同定されている¹⁷⁻²³ (Table 1)。これらのトランスポーターは、solute carrier gene superfamily 13 (SLC13 family) に属している。NaDC1 (SLC13A2) は、ヒトにおいて主に腎臓や小腸に発現しているコハク酸や α -ケトグルタル酸などのジカルボン酸に対して低親和性のトランスポーターで、トリカルボン酸のクエン酸も低親和性であるが輸送することが明らかとなっている^{20,24,25}。NaDC3 (SLC13A3) は、ヒトでは脳、腎臓、肝臓、膵臓、胎盤など広範囲に発現しており、コハク酸などのジカルボン酸に対して高親和性を示すトランスポーターで、クエン酸などのトリカルボン酸も

Table 1 Na⁺-coupled carboxylate transporters (NaCs)

| 遺伝子名 | 新名称 | 別名 | 主要基質 | 組織分布 | ヒト遺伝子座 | NCBI Accession ID |
|----------------|------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| <i>SLC13A2</i> | NaC1 | NaDC1 SDCT1 NaDC2 | コハク酸 クエン酸 α -ケトグルタル酸 | 腎／尿細管上皮刷子縁膜 腸／上皮刷子縁膜 | 17p13.2 | NM_003984 |
| <i>SLC13A3</i> | NaC3 | NaDC3 SDCT2 | コハク酸 クエン酸 α -ケトグルタル酸 | 腎臓／尿細管上皮側底膜、肝臓、脳、胎盤 | 20q12-q13.1 | NM_022829 |
| <i>SLC13A5</i> | NaC2 | NaCT | クエン酸 コハク酸 | 肝臓、脳、 精巣 | 12p12-3 | NM_177550 |

輸送するが、その親和性は比較的低い^{20,26,27}。一方、NaCT (SLC13A5) は、SLC13 family の中で最も新しく同定されたメンバーで、肝臓や脳、精巣に発現が認められており、ヒトでは特にクエン酸に対して高親和性を示す^{16,19,20,28}。また、NaCT は肝臓において高発現していることから、NaCT は肝臓のクエン酸代謝において重要な役割を果たしていることが推察されている。2000年、キロシヨウジョウバエにおいて、NaCT の相同体である Na⁺ 非依存性クエン酸トランスポーター INDY (I'm not dead yet) に関して、その発現量が減少した突然変異体では細胞内脂質蓄積量の低下、および寿命の延長が認められたことから、*Indy* は寿命関連遺伝子の一つとみなされている^{4,5,29-32}。このことから、ヒトにおいて、NaCT が肝細胞内の脂質蓄積を伴う NAFLD の発症・進行に関与しているのではないかと注目を集めている。

現在までに、NAFLD の患者では、血漿中クエン酸濃度が健常者 (52–106 μ M) よりも上昇しており (101–210 μ M)^{8,33}、その肝臓においては、NaCT の mRNA 発現量が上昇することが報告されている³⁴。これより、NAFLD の発症には、NaCT の発現上昇、およびそれに伴う細胞内クエン酸濃度の上昇が密接に関係していることが推察される。さらに、2型糖尿病モデルラットの肝臓において、グルカゴン依存的な protein kinase A (PKA) の活性化により cAMP 応答配列結合タンパク (CREB) を介して NaCT の発現が誘導され、肝細胞内の脂質蓄積量が増大することが報告された³⁵。2型糖尿病は、NAFLD を高確率で併発することが明らかになっており^{1,36-38}、NaCT が2型糖尿病において NAFLD の発症・進行に関与している可能性が示された。一方、1型糖尿病においても高い NAFLD 有病率を示すことが報告されている³⁸⁻⁴⁰が、その詳細な脂質蓄積機構、および NaCT との関連性については明らかになっていない。

そこで本検討では、1型糖尿病における脂質蓄積機構と NaCT との関連性を明らかにするために、まず streptozotocin (STZ) により1型糖尿病を誘発させたモデルマウスを用いて、肝臓における NaCT の発現量やクエン酸輸送、血漿中の各脂質量について、正常マウスとの比較検討を行った。また、糖尿病のような高血糖状態において、protein kinase C (PKC) が活性化されることが明らかとなっている^{41,42}。NaCT には、4つの PKC リン酸化部位が存在することが推定されており、

第 1 章 1 型糖尿病モデルマウスの肝臓における Na⁺ 依存性クエン酸トランスポーター (NaCT) の発現、および機能的特徴に関する検討

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) は、肥満や糖尿病に併発することが多く、実際、2 型糖尿病患者の NAFLD 有病率は約 70% と高いことから、2 型糖尿病は NAFLD の独立したリスク因子とみなされている³⁸。近年、2 型糖尿病モデルラットの肝臓において、NaCT の発現上昇、および細胞内脂質蓄積量の増大を引き起こすことが明らかとなり³⁵、NaCT は 2 型糖尿病およびそれに伴う脂質蓄積にも関与していることが示唆された。一方、1 型糖尿病について、約 50% の患者が NAFLD を発症していることが報告されている³⁸。1 型糖尿病における NAFLD の有病率は 2 型糖尿病の有病率よりも低い、1 型糖尿病も十分に NAFLD のリスク因子となり得ることが推察される。しかしながら、1 型糖尿病における肝臓の脂質蓄積機構や NaCT との関連性については未だ明らかになっていない。

NaCT は、TCA 回路中間体の中でもクエン酸に特に高親和性を示し、細胞内へのクエン酸の取り込みにおいて中心的な役割を果たしている。クエン酸は、細胞質において、acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) とオキサロ酢酸に切断され、acetyl-CoA は脂肪酸とコレステロールの合成の基質に、オキサロ酢酸はリンゴ酸、ピルビン酸への変換を経て、脂質合成に必要な nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) と H⁺ になる⁸⁻¹⁰。また、クエン酸は脂質合成の起点となる acetyl-CoA から malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA) への合成を触媒する acetyl-CoA carboxylase (ACC) を活性化することで、脂質の *de novo* 合成を促進する (Fig. 1)⁸。さらに、脂質合成の過程でクエン酸を起点として生成される malonyl-CoA は、脂肪酸をミトコンドリア内へ輸送する carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1) を阻害することから、クエン酸は間接的に脂肪酸の β 酸化を抑制することも明らかとなっている (Fig. 1)^{8,11}。このように、クエン酸は脂肪合成の促進、脂肪酸 β 酸化を抑制することで、細胞内の脂質蓄積を増大させる。一方、クエン酸は、脂質代謝だけでなく、糖代謝にも関与している。解糖系のグルコースからピルビン酸を生成する過程において、クエン酸は、fructose-6-phosphate (F6P) から fructose-1,6-biphosphate (F1,6P) へのリン酸化に必要な phosphofructokinase 1 (PFK1) を抑制し、F1,6P から F6P へ脱リン酸化を行う fructose 1,6 bisphosphatase (F1,6BPase) を活性化することで、F1,6P の量を低下させる^{8,12}。F1,6P は、解糖系の最終段階である phosphoenolpyruvate (PEP) から adenosine diphosphate (ADP) へのリン酸基転移反応を触媒する pyruvate kinase (PK) の最も重要なアロステリック活性化因子であり、クエン酸は、この F1,6P の生成を抑制することで PK を間接的に阻害し、解糖系を抑制して糖新生を促進する^{8,12}。このように、クエン酸は、糖新生や脂肪合成の促進、脂肪酸の β 酸化の抑制に関与することから、細胞内へのクエン酸の輸送を担う NaCT は、糖尿病と NAFLD に対する新規治療ターゲットとして注目を集めている。

本章では、streptozotocin (STZ) により 1 型糖尿病を再現したモデルマウスを用いて、1 型糖尿病における NaCT の発現解析やクエン酸の輸送活性、肝細胞、および血漿中の脂質量の変動につ

いて検討し、NaCT と 1 型糖尿病、脂質蓄積との関連性について明らかにすることを試みた。

1-1 1型糖尿病モデルマウスの肝臓における NaCT の発現解析

最初に、STZ 誘発性 1 型糖尿病モデルマウスの肝臓における NaCT、および NaDC3 の発現について Real-time RT-PCR、Western blotting により解析を行った。STZ 投与後、NaCT mRNA 発現量は次第に低下し、8 週目の NaCT mRNA 量は 0 週目の mRNA 量の 5 分の 1 まで低下した (Fig. 2A)。また、Western blotting による解析より、STZ 処理マウスにおいて、mRNA 発現量と同様に NaCT のタンパク量は、時間依存的に減少する傾向が見られた (Fig. 3)。一方、NaCT と同様に solute carrier gene superfamily 13A (SLC13A family) に属する NaDC3 mRNA 発現量は、STZ 投与後 2 週目から次第に増加し、その増加傾向は 8 週目まで続いた (Fig. 2B)。

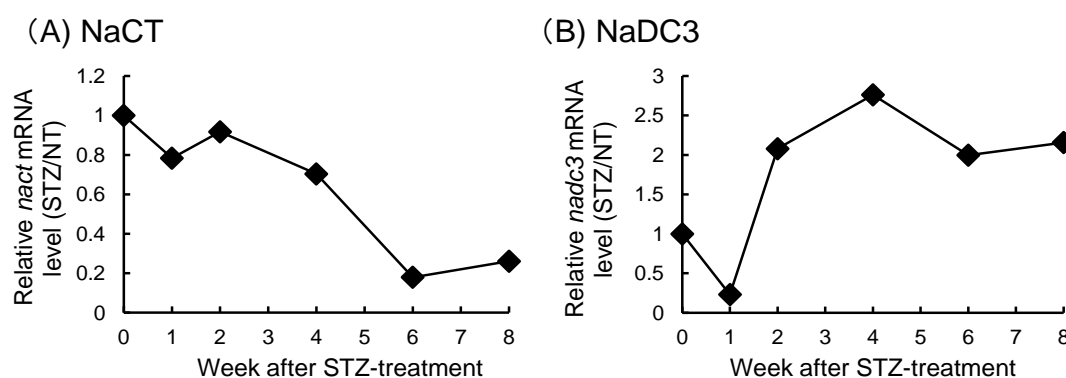


Figure 2 mRNA expression of NaCT (A) and NaDC3 (B) in liver of type 1 diabetic model mice. Total RNA was isolated from liver of non-treated (NT) mice and STZ-treated mice at 0, 1, 2, 4, 6, and 8 weeks after STZ treatment. Real-time RT-PCR was performed using specific primers for NaCT, NaDC3 and GAPDH. Data were normalized to GAPDH. The relative mRNA expression level was presented as a ratio of STZ-treated to NT mice (STZ/NT). (n=1)

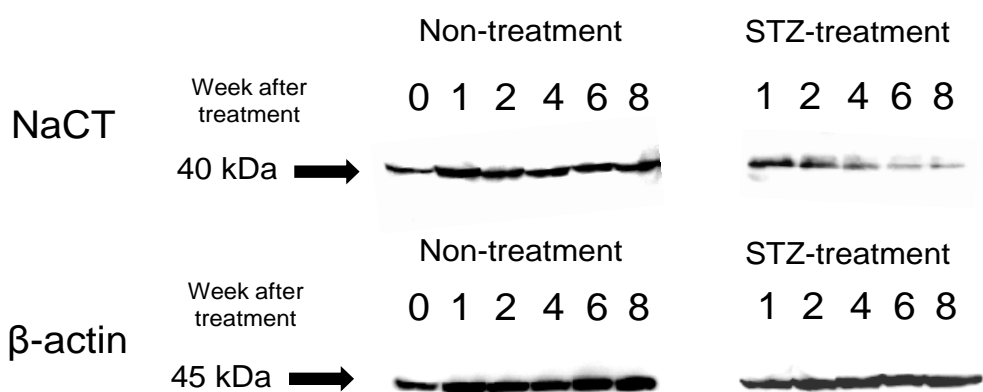


Figure 3 Protein expression of NaCT in liver of type 1 diabetic model mice. Protein was isolated from liver of NT mice and STZ-treated mice at 0, 1, 2, 4, 6, and 8 weeks after STZ treatment. NaCT and β-actin protein expression was detected by Western blot analysis.

1-2 1型糖尿病モデルマウスの肝臓における Na⁺ 依存的なクエン酸の輸送特性

次に、STZ 処理マウス、および未処理マウスから単離した肝細胞におけるクエン酸の輸送活性について、¹⁴C]citrate を用いて評価を行った。肝細胞における NaCT を介したクエン酸の取り込みは、Na⁺ 勾配によって駆動する内向きの起電性の輸送であることから、本検討では Na⁺ 存在下での¹⁴C]citrate の取り込みから Na⁺ 非存在下での取り込みを差し引くことで、Na⁺ 依存的なクエン酸の取り込みを算出した。また、予備検討において、¹⁴C]citrate の細胞内への取り込みは、15分まで直線性を示したことから、以降の取り込み実験では ¹⁴C]citrate 存在下での肝細胞の培養時間を15分とした。

マウス肝細胞における Na⁺ 依存的なクエン酸の取り込みは、STZ を投与してから0週目とほぼ同程度の輸送活性を示し、検討期間中に STZ 処理マウスと未処理マウスとの間に有意な差は見られなかった (Fig. 4)。

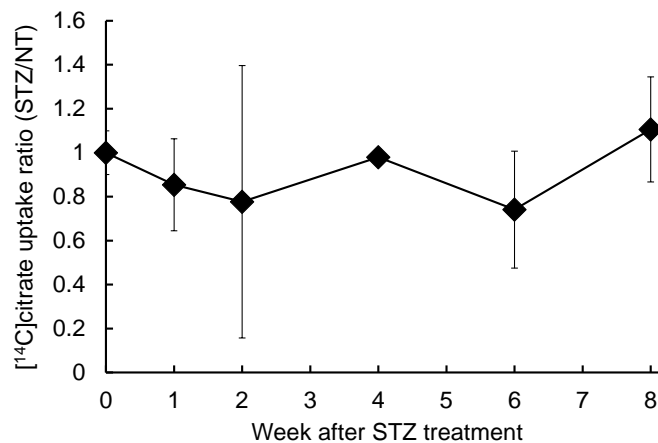


Figure 4 Na⁺-dependent uptake of citrate in hepatocytes of type 1 diabetic model mice. Mouse primary hepatocyte were isolated from NT mice and STZ-treated mice at 0, 1, 2, 4, 6, and 8 weeks after STZ treatment. The cells were incubated in transport buffer containing [¹⁴C]citrate (0.43 μmol/L) with shaking for 15 min at 37°C. Na⁺-dependent uptake was obtained by subtracting citrate uptake amount in the absence of Na⁺ from that in the presence of Na⁺. Each value represents the mean ± SD (n = 3). The relative [¹⁴C]citrate uptake ratio was presented as a ratio of STZ-treated to NT mice (STZ/NT).

1-3 1型糖尿病モデルマウスの肝細胞における脂質蓄積の解析

1型糖尿病モデルマウスの肝細胞における脂質蓄積量について、Oil Red O 染色により細胞内の脂肪滴を染色することで検討を行った。その結果、肝細胞内へのクエン酸取り込みと同様に、検討を行った期間では、STZ 処理マウスと未処理マウスの肝細胞における脂質蓄積量に大きな差は見られなかった (Fig. 5)。

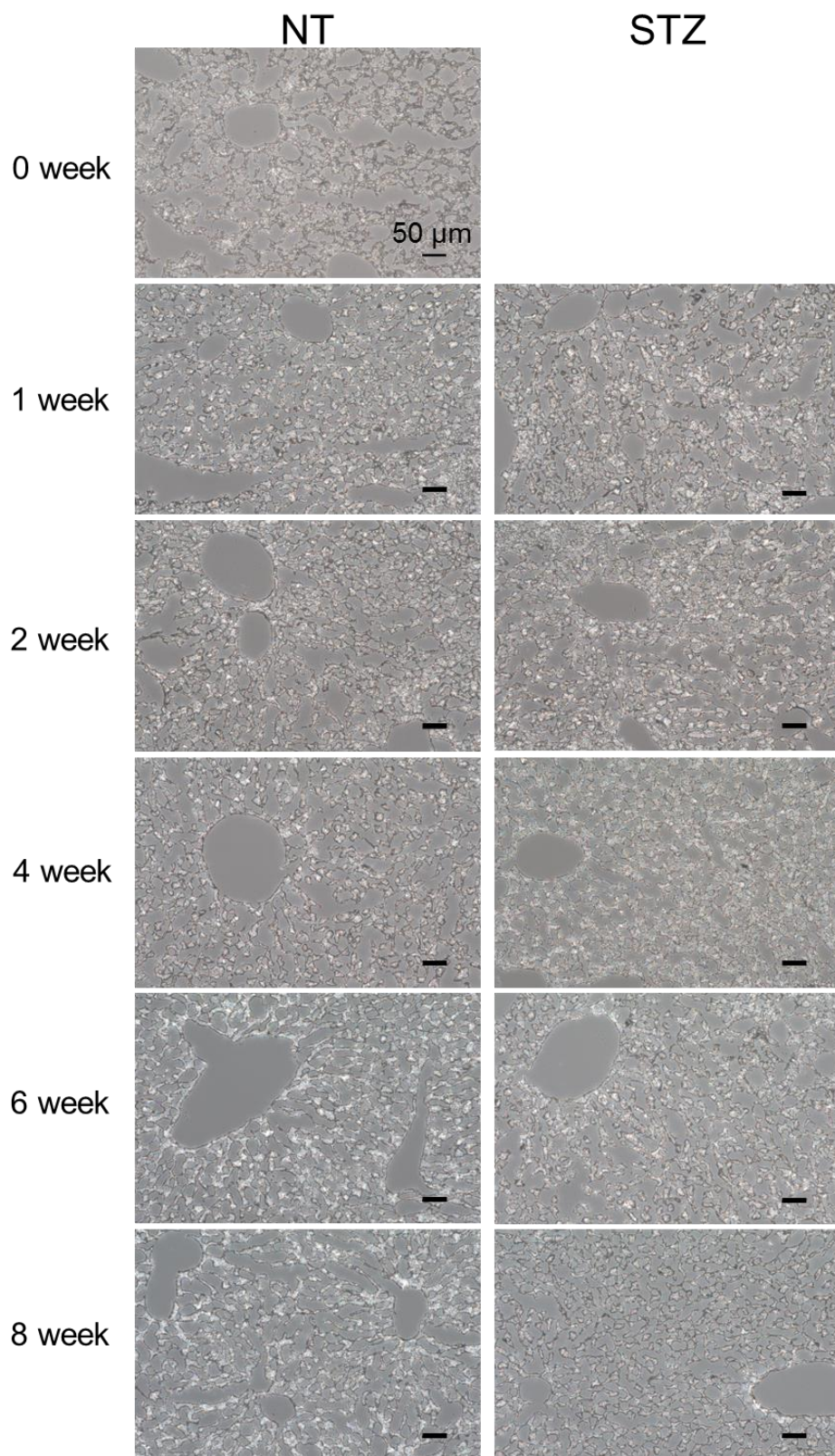


Figure 5 Hepatic lipid accumulation of STZ- and NT- mouse was evaluated by Oil red O stains. Original magnification, $\times 200$. Black scales indicate 50 μm .

1-4 1型糖尿病モデルマウスにおける血漿中の脂質量の解析

1型糖尿病モデルマウスにおける血漿中の脂質量について評価するために、STZ 処理マウス、および未処理マウスの血漿中トリグリセリド、コレステロール、遊離脂肪酸 (nonesterified fatty acid: NEFA) 量の測定を行った。その結果、STZ 処理マウスにおける血漿中トリグリセリド、コレステロール、NEFA 量は、未処理マウスと比較して有意に高かった (Table 2)。特に、トリグリセリドの上昇は著しく、週齢依存的な上昇の影響を除いても、STZ 処理マウスの血漿中のトリグリセリドは未処理マウスの 2-3 倍高かった。一方、STZ 処理マウスにおける血漿中のコレステロールおよび NEFA 量は、トリグリセリドほど上昇しなかったが、STZ 投与後 8 週目のコレステロール、NEFA は、それぞれ同週の未処理マウスの 1.8 倍、1.7 倍高かった。

Table 2 Plasma biochemical parameters in STZ-treated mice

| | | week | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----|----------------|----|--------------------|----|--------------------|----|-----------------|----|-----------------|----|------------------|----|
| | | 0 | | 1 | | 2 | | 4 | | 6 | | 8 | |
| | | AVE | SD | AVE | SD | AVE | SD | AVE | SD | AVE | SD | AVE | SD |
| Body weight (g) | NT | 19.04 ± 0.72 | | 19.72 ± 0.59 | | 20.83 ± 0.73 | | 21.73 ± 0.98 | | 23.48 ± 1.35 | | 24.58 ± 1.11 | |
| | STZ | 19.90 ± 0.88 * | | 19.04 ± 0.94 ** | | 18.84 ± 0.85 ** | | 18.92 ± 0.92 ** | | 20.43 ± 1.21 * | | 22.36 ± 1.19 * | |
| Glucose level (mg/dL) | NT | 171.80 ± 16.87 | | 155.41 ± 25.32 | | 169.42 ± 44.72 | | 158.62 ± 33.35 | | 151.62 ± 0.63 | | 151.13 ± 10.32 | |
| | STZ | 145.73 ± 34.49 | | 329.63 ± 100.40 ** | | 471.45 ± 103.10 ** | | 476.70 ± 100.55 | | 521.26 ± 288.45 | | 439.85 ± 57.64 * | |
| Triglyceride (mg/dL) | NT | 33.13 ± 10.12 | | 29.85 ± 19.07 | | 59.23 ± 30.80 | | 44.15 ± 31.19 | | 60.82 ± 40.97 | | 94.38 ± 33.19 | |
| | STZ | 21.06 ± 8.12 * | | 71.34 ± 52.39 * | | 172.69 ± 157.65 | | 47.81 ± 31.80 | | 112.25 ± 126.26 | | 181.61 ± 181.73 | |
| Cholesterol (mg/dL) | NT | 98.86 ± 10.56 | | 93.55 ± 7.85 | | 92.59 ± 11.97 | | 68.16 ± 14.98 | | 59.18 ± 15.72 | | 65.62 ± 5.15 | |
| | STZ | 98.67 ± 27.77 | | 77.56 ± 31.22 * | | 119.67 ± 27.04 | | 97.40 ± 37.91 * | | 87.16 ± 25.13 | | 116.65 ± 59.18 | |
| NEFA (mEq/L) | NT | 0.50 ± 0.16 | | 0.53 ± 0.17 | | 0.52 ± 0.17 | | 0.43 ± 0.20 | | 0.58 ± 0.16 | | 0.46 ± 0.20 | |
| | STZ | 0.61 ± 0.29 | | 0.90 ± 0.42 ** | | 1.18 ± 0.60 ** | | 0.76 ± 0.21 * | | 1.00 ± 0.35 | | 0.76 ± 0.37 | |

Each value represents the mean ± SD (n = 10).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared with the corresponding NT mice.

考 察

本研究では、STZ により膵 β 細胞を選択的に破壊し、実験的にインスリン分泌不全を引き起こした 1型糖尿病モデルマウスを用いて、肝臓における NaCT 発現量や輸送活性、肝細胞、および血漿中の脂質量の変動について検討を行い、NaCT と 1型糖尿病、脂質蓄積の関係性の解明を試みた。

初めに、1型糖尿病モデルマウスの肝臓における NaCT の発現変動について検討を行ったところ、マウス肝臓における NaCT の発現量は、STZ を投与してから mRNA、およびタンパクレベルで経時的に減少することが明らかとなった (Figs. 2A and 3)。これは、2型糖尿病モデルラットにおいて肝 NaCT の発現量の増加が認められたという Neuschäfer-Rube らの報告³⁵とは異なる結

果となった。このような相違が生じた要因として、1型糖尿病と2型糖尿病とのグルカゴンの分泌調節機構の違いが考えられる。Neuschäfer-Rube らによる報告では、2型糖尿病モデルラットにおける肝 NaCT は、グルカゴンを介して活性化された cAMP 応答配列結合タンパク (CREB) によって NaCT の転写活性化が引き起こされ、その発現が誘導されたことを示している³⁵。2型糖尿病患者では、血漿中のグルカゴン濃度が1日中高い値を示すことが明らかとなっている^{44,45}。ことから、グルカゴンによる NaCT の発現誘導が起こり、これが肝臓における脂質蓄積に寄与する可能性がある。一方、1型糖尿病では、膵 α 細胞の機能障害を伴うことがあり⁴⁶、グルカゴンの分泌特性は2型糖尿病と異なることが推察される。1型糖尿病における血漿中グルカゴン濃度は、血漿中に存在する NEFA の上昇によって抑制されることが明らかとなっており、その抑制レベルは健常人と同程度であることが報告されている⁴⁷。さらに、1型糖尿病では、低血糖にตอบสนองしたグルカゴンの分泌の増加は見られないことも明らかとなっている^{44,48}。このような1型糖尿病特異的な状態が、本検討で見られた肝 NaCT の発現低下に繋がった可能性が考えられる。しかしながら、1型糖尿病、および2型糖尿病モデル動物における血漿中グルカゴン濃度について、ヒトと同様の現象が起こっているのかは不明である。また、NaCT の発現上昇機構に関しては種々の研究から解明されているが、発現低下機構については明らかになっていない¹⁸。そのため、本検討で見られた1型糖尿病モデルマウスにおける肝 NaCT の発現低下機構に関して、グルカゴン分泌特性、およびグルカゴンによる発現制御機構との関連性を解明していくために、さらなる研究が必要であると考えられる。

次に、1型糖尿病モデルマウスの肝細胞におけるクエン酸の輸送活性について検討を行った。その結果、STZ 処理マウスでは NaCT の発現量が低下しているにもかかわらず、STZ 処理マウスから単離した肝細胞におけるクエン酸の取り込み量は未処理マウスの取り込み量とほとんど変わらなかった (Fig. 4)。これには、同じ SLC family に属する NaDC3 が関与しているのではないかと考えられたため、STZ 処理マウスの肝臓における NaDC3 mRNA の発現量について評価したところ、NaDC3 は NaCT とは反対に増加する傾向が見られた (Fig. 2B)。このとき、未処理マウスの NaDC3 mRNA 量は1週目に著しく上昇したことから、NaDC3 mRNA の相対量 (STZ/NT) の低下が認められた。本検討では $n=1$ で行っているため、この詳細についてはさらに個体数を増やして検討を行う必要がある。その一方で、2週目以降は NaDC3 mRNA の発現量は次第に増加する傾向が認められたことから、STZ 処理マウスにおいて NaDC3 の発現量は上昇することが示唆された。ヒトの NaDC3 は、コハク酸やリンゴ酸、フマル酸などのジカルボン酸に対して高親和性を示し、生理的条件下 (pH 7.5) ではクエン酸 ($K_m=220 \mu\text{M}$) よりもコハク酸 ($K_m=15-20 \mu\text{M}$) を優先的に輸送する^{18,20}。一方、NaCT は、ヒトにおいてクエン酸に対して高親和性 ($K_m=600 \mu\text{M}$) を示す^{16,18} が、マウスやラットなどの齧歯類ではクエン酸に対して NaDC3 も NaCT ($K_m=38 \pm 5 \mu\text{M}$) と同程度の親和性を示すことが明らかとなっている^{7,21,28}。そのため、1型糖尿病モデルマウスでは、NaCT の発現低下に伴ったクエン酸の取り込み低下を補うために、代償的な NaDC3 の発現誘導が起こったと考えられる。このことから、NaDC3 は、1型糖尿病モデルマウスの肝臓におい

て、クエン酸の輸送に関与していることが推察される。

次に、1 型糖尿病モデルマウスの肝細胞における脂質蓄積の変動について評価するために Oil Red O 染色を行った。その結果、本検討を行った期間では、STZ 処理マウス、および未処理マウスの肝細胞における脂質蓄積に大きな差は見られず (Fig. 5)、クエン酸の取り込み実験と同様の結果となった。STZ 処理マウスでは、代償的に NaDC3 の発現量が上昇しており、NaDC3 はクエン酸以外にもコハク酸などの TCA 回路中間体にも高親和性を示して肝細胞内へ輸送する^{18,20}。細胞内の種々の生体物質の合成にはミトコンドリア内で生成されたクエン酸も寄与している⁷ため、NaDC3 を介して細胞内に取り込まれた TCA 回路中間体によりミトコンドリアでのクエン酸の生成や肝細胞における脂質合成が促進する可能性が考えられる。しかしながら、本検討では、NaDC3 の発現上昇は、肝細胞における脂質蓄積量にはほとんど影響を与えないことが示唆された。1 型糖尿病モデルマウスの肝臓における脂質蓄積と NaDC3 との関連性については、本検討に加えて、NaDC3 のタンパクレベルでの発現量の評価や NaDC3 の基質であるコハク酸などの TCA 回路中間体の取り込みについてさらに検討を行う必要がある。

一方、1 型糖尿病モデルマウスにおける血漿中の脂質量についても評価を行ったところ、STZ 処理マウスにおける血漿中のトリグリセリド、コレステロール、および NEFA 量は、未処理マウスよりも上昇する傾向が見られた (Table 2)。1 型糖尿病のようにインスリンの欠乏状態が続くと、脂肪組織の分解が亢進し、血中の NEFA 量が上昇する⁴⁹。これにより、肝臓における脂質合成が亢進し、超低比重リポタンパク (very-low-density lipoprotein : VLDL) の産生が増加すると考えられている^{49,50}。さらに、インスリン欠乏状態では、末梢組織において VLDL の処理を行うリポタンパクリパーゼ (lipoprotein lipase : LPL) の活性が低下するため VLDL の除去が遅れ、血中のトリグリセリドやコレステロールが上昇することが示唆されている^{49,50}。本検討では血中の VLDL 量や LPL 活性について検討を行っていないため、血漿中の脂質量の上昇と VLDL や LPL との関連性についてはさらに検討を行う必要がある。しかしながら、STZ 処理マウスでは膵β細胞の破壊によりインスリンが欠乏している状態であることから、血漿中の脂質量の上昇は、脂肪組織の分解によるものである可能性が高いと考えられる。

以上、本章より、1 型糖尿病モデルマウスにおいて、NaCT の発現は低下し、NaDC3 の発現は上昇することが明らかとなった。これにより、肝細胞におけるクエン酸の取り込み、および脂質蓄積量は変化しなかったが、その一方で血漿中の脂質量は上昇する傾向が認められた。NaCT の発現量が低下したことから、1 型糖尿病モデルマウスでは 2 型糖尿病とは異なる何らかの発現制御因子により発現が抑制されたことが推察される。次章では、糖尿病と密接に関係しており、トランスポーターの機能制御に関与している protein kinase C に着目し、NaCT との関連性について明らかにすることを試みた。

第2章 Protein kinase C (PKC) の Na⁺依存性クエン酸トランスポーター (NaCT) を介したクエン酸輸送に対する影響に関する検討

Protein kinase C (PKC) は、様々な細胞の機能制御に重要な役割を果たしており、protein kinase A (PKA) とともに糖尿病や肥満と密接に関与していることが示唆されている⁵¹。PKC は、血漿中の遊離脂肪酸や血糖値の上昇により肝細胞内に増加した diacylglycerol (DG) によって活性化され^{41,42,52}、グルコースや脂質の合成を促進することが明らかになっている^{51,53,54}。近年、2型糖尿病と密接に関係している肥満や非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) において、白色脂肪細胞から遊離した脂肪酸 (nonesterified fatty acid : NEFA) が肝細胞内の脂肪合成を促進し、その過程で生成される DG により PKC が活性化され、インスリン受容体の活性が抑制されることが明らかになっている⁵⁵⁻⁵⁸。一方、1型糖尿病においても、インスリンの欠乏状態が続くことで血中の NEFA 量が上昇することが報告されており⁴⁹、前章の1型糖尿病モデルマウスを用いた検討においても血中の NEFA 量が上昇する傾向が認められた。このことから、2型糖尿病と同様に1型糖尿病の肝臓においても PKC が活性化していることが推察されるが、PKC が Na⁺ 依存性クエン酸トランスポーター (NaCT) に与える影響については明らかになっていない。

PKC は、様々な細胞機能制御に関与するタンパク質で、基質とするタンパク質の直接的なリン酸化、あるいは細胞内への輸送・分解を間接的に調節することで、受容体やトランスポーター、チャンネル等の機能を制御している。今日までに、肝細胞に発現している一部の solute carrier (SLC) family トランスポーターが PKC によって機能調節を受けることは、様々な研究から明らかになっている^{59,60}。ヒト肝細胞において、SLC family に属する有機アニオン輸送ポリペプチド 1B3 (organic anion transporting polypeptide 1B3 : OATP1B3) の輸送活性が、PKC によるリン酸化を受けて低下することが Powell らによって報告されている⁶¹。また、PKC の活性化により、細胞膜上に発現している OATP2B1 や胆汁酸トランスポーター (sodium taurocholate cotransporting polypeptide : NTCP) が、エンドサイトーシスにより細胞質内に取り込まれることで、トランスポーターの輸送活性が低下することが報告されている^{62,63}。さらに、Mayati らは、ヒト肝腫瘍由来細胞 HepaRG 細胞とヒト肝初代培養細胞において、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、および有機カチオントランスポーター1 (organic cation transporter 1 : OCT1) の発現が、PKC の活性化によって著しく低下することを報告している⁵⁹。また、SLC family トランスポーターの Na⁺-coupled carboxylate transporters (NaCs) に属する NaDC1 や NaDC3 についても、PKC を活性化させることで、輸送活性、および細胞膜表面上の発現が低下することが明らかになっている^{13,64}。

一方、NaCT は、1つの PKA リン酸化部位と4つの PKC リン酸化部位の存在が推定されることから (Fig. 6)、PKA よりも PKC による発現・機能調節を強く受ける可能性が高いことが推察される。しかしながら、ヒト肝臓における NaCT の発現、および輸送活性への PKC 活性化の影響に関しては未だ明らかとなっていない。そこで、本検討では、ヒト正常肝細胞と同様に SLC 13A family トランスポーターの発現が認められているヒト肝がん由来細胞 HepG2 細胞を用いて、

PKC 活性化時の NaCT の輸送活性の変動について検討を行い、PKC の活性化が NaCT を介したクエン酸輸送に与える影響を明らかにすることを試みた。

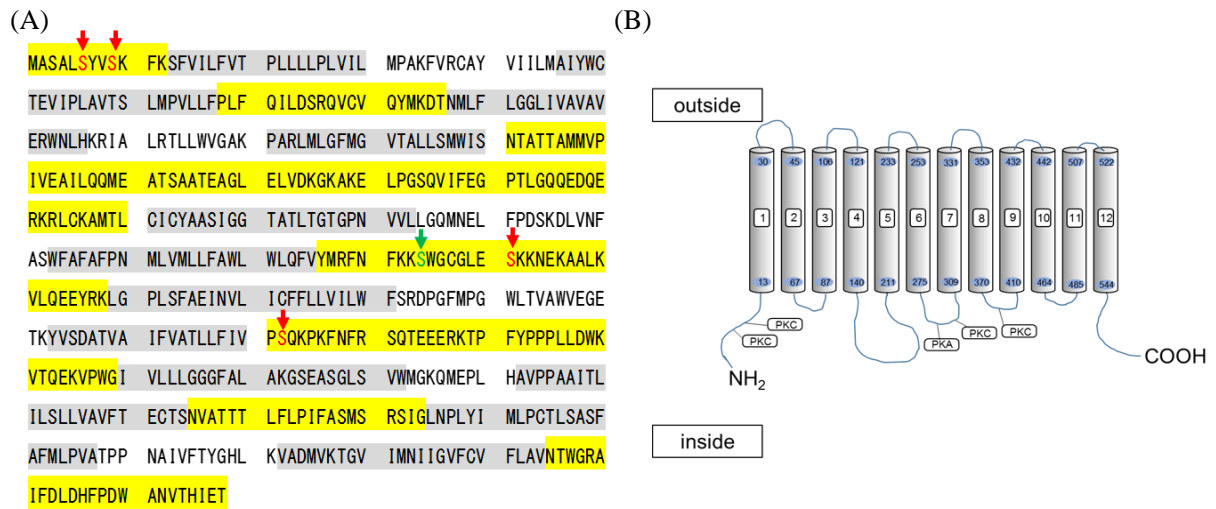


Figure 6 (A) Deduced amino acid sequence of NaCT. Gray shadows represent hypothetical membrane-spanning regions. Yellow shaded areas indicate putative cytoplasmic regions. Protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) site are represented by green and red letter, respectively. (B) Membrane spanning regions (gray shadows) were predicted using TMHMM Server ver. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) and by analysis using NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/service/NetPhos/>) for PKA and PKC site.

2-1 HepG2 細胞における SLC 13A family トランスポーターの発現解析

まず、ヒトの肝臓で発現が確認されている NaCT と NaDC3 の HepG2 細胞における発現について、RT-PCR により確認を行った。HepG2 細胞より抽出した total RNA に対し、NaCT および NaDC3 に特異的なプライマーを用いて RT-PCR 解析を行ったところ、NaCT および NaDC3 のいずれも HepG2 細胞で発現していることが確認された (Fig. 7)。

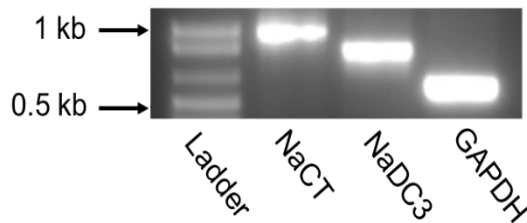


Figure 7 mRNA expression of NaCT and NaDC3 in HepG2 cells. Total RNA isolated from HepG2 cells was subjected to RT-PCR using specific primers for NaCT, NaDC3, and GAPDH. The expected size for NaCT, NaDC3, and GAPDH are 912bp, 793bp, and 576 bp, respectively.

2-2 HepG2 細胞におけるクエン酸の輸送特性

次に、HepG2 細胞における $[^{14}\text{C}]$ citrate の細胞内への取り込みの Na^+ 依存性を評価した。この結果、 $[^{14}\text{C}]$ citrate の細胞内への取り込みは、30 分まで直線性を示した (Fig. 8A) ため、以降の $[^{14}\text{C}]$ citrate の取り込み実験ではインキュベーション時間を 30 分とした。このとき、 $[^{14}\text{C}]$ citrate の取り込みは、 Na^+ 存在下の方が Na^+ 非存在下 (NMDG 存在下) よりも有意に高かった (Fig. 8A) ことから、HepG2 細胞におけるクエン酸の輸送は、 Na^+ 依存的事であることが示された。また、HepG2 細胞におけるクエン酸輸送の濃度依存性について検討を行ったところ、 Na^+ 依存的な $[^{14}\text{C}]$ citrate の取り込みは飽和性を示した (Fig. 8B)。得られたデータから Michaelis–Menten 式、および Eadie-Hofstee 式を用いて、速度論的パラメーターを非線形回帰により算出したところ、 $K_m = 5.12 \pm 0.72 \text{ mM}$ 、 $V_{\max} = 106 \pm 4.91 \text{ nmol/mg protein/30 min}$ となった。さらに、Eadie-Hofstee plot (Fig. 8B, inset) は直線性を示したことから、HepG2 細胞において、クエン酸は単一の輸送系を介して輸送されることが示唆された。

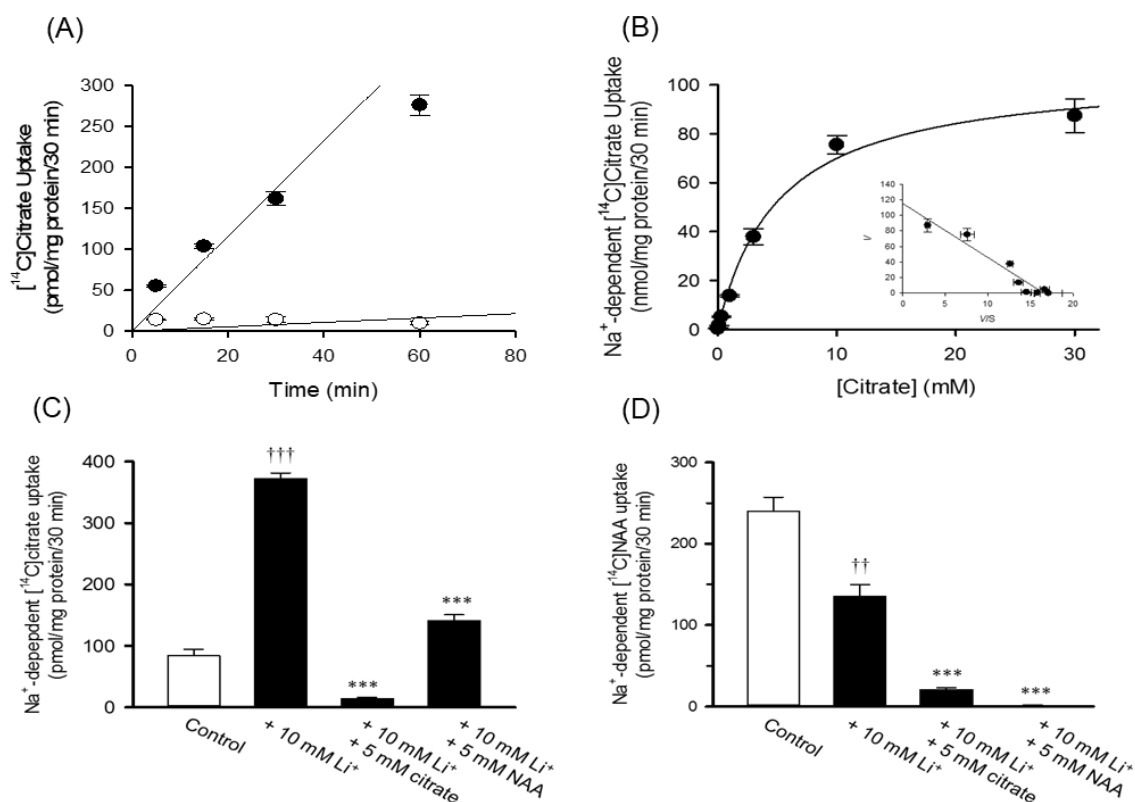


Figure 8 Transport characteristics of citrate in HepG2 cells. (A) Time course of citrate transport in HepG2 cells. $[^{14}\text{C}]$ citrate uptake (4 μM) was measured over 60 min at 37°C in the presence (●) or absence (○) of Na⁺. (B) Saturation kinetics of Na⁺-dependent citrate uptake in HepG2 cells. Uptake of $[^{14}\text{C}]$ citrate was measured in HepG2 cells during a 30-min incubation in NaCl- or NMDG chloride-containing transport buffer at pH 7.4 over a concentration range of 0.01-30 mM. Na⁺-dependent uptake was obtained by subtracting uptake in the absence of Na⁺ from that in the presence of Na⁺. *Inset*: Eadie-Hofstee plot. (C & D) Effect of Li⁺ on Na⁺-dependent citrate (C) and *N*-acetyl-L-aspartate (NAA) (D) transport in HepG2 cells. $[^{14}\text{C}]$ citrate (4 μM) and $[^{14}\text{C}]$ NAA (10 μM) uptake was measured for 30 min at 37°C in the presence or absence of 10 mM Li⁺ and a fixed concentration of Na⁺ (140 mM) in the transport buffer. The osmolarity of the transport buffer was kept by replacing LiCl with equimolar of mannitol. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$). †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ compared with control; *** $p < 0.001$, compared with Li⁺-stimulated uptake.

HepG2 細胞には NaCT と NaDC3 の2つの輸送系が存在していることから、HepG2 細胞におけるクエン酸輸送がどちらのトランスポーターによるものかは不明である。そこで、まず、Li⁺ 存在下におけるクエン酸の取り込みについて検討を行った。Li⁺ は、ヒト NaCT では輸送能を顕著に増強させることが報告されている。HepG2 細胞における Na⁺ 依存的なクエン酸の取り込みは、10 mM Li⁺ の存在により有意に上昇する傾向が認められた (Fig. 8C)。次に、Li⁺ 存在下における NaDC3 の選択的基質である *N*-acetyl-L-aspartate (NAA)^{27,65} の、Na⁺ 依存的な NAA の取り込みは 10 mM Li⁺ 存在下で顕著に減少した (Fig. 8D)。このことから、HepG2 細胞における Na⁺ 依存的なクエン酸の取り込みは、主に NaCT を介して行われていることが示唆された。

2-3 HepG2 細胞における Na⁺ 依存的なクエン酸の輸送への PKC 活性化の影響

PKC の活性化が HepG2 細胞におけるクエン酸取り込みに与える影響について評価するため、PKC の活性化剤である Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を用いて、PMA が HepG2 細胞におけるクエン酸輸送に与える影響について検討を行った。HepG2 細胞を 100 nM PMA で前処理を行った後、¹⁴C]citrate の取り込みの経時的な変化について評価を行った。その結果、PMA で 1 時間以上プレインキュベーションすることで、HepG2 細胞における ¹⁴C]citrate の取り込みは著しく低下した (Fig. 9A)。また、¹⁴C]citrate の取り込みは PMA の濃度依存的に減少した (Fig. 9B)。このとき、Na⁺ 依存的な ¹⁴C]citrate の取り込みを 50% 阻害する PMA 濃度 (IC₅₀) および Hill 係数は、それぞれ 35.3 ± 25.6 nM、0.80 ± 0.43 であった。

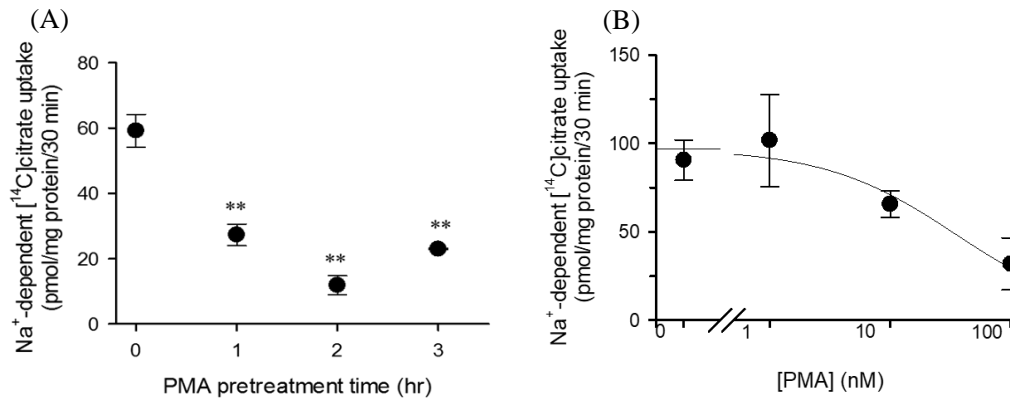


Figure 9 Effect of PMA on Na⁺-dependent uptake of citrate in HepG2 cells. HepG2 cells were preincubated with or without 100 nM PMA for 1-3 h at 37°C (A) or pre-incubated over a concentration range of 1-100 nM PMA for 3 h at 37°C (B). Then, the cells were incubated with [¹⁴C]citrate (8.6 μM) for 30 min at 37°C. Na⁺-dependent uptake was obtained by subtracting uptake in the absence of Na⁺ from that in the presence of Na⁺. Each value represents the mean ± SD (n = 3). **p < 0.01, compared with non-treated group.

2-4 HepG2 細胞における Na⁺ 依存的なクエン酸の輸送への PKC 活性化阻害の影響

PMA による Na⁺ 依存的なクエン酸の取り込み阻害が PKC の活性化によるものであるかを確認するために、PKC 阻害剤 Gö 6983 の影響について検討を行った。HepG2 細胞を 0.01-1 μM の Gö 6983 存在下で 90 分間プレインキュベーションしてから [¹⁴C]citrate の取り込み実験を行ったところ、PMA によって阻害された Na⁺ 依存的なクエン酸の取り込みは、Gö 6983 の濃度依存的に回復する傾向が見られた (Fig. 10)。以上の結果から、PKC の活性化により HepG2 細胞における NaCT を介した Na⁺ 依存的なクエン酸の輸送は阻害されることが明らかとなった。

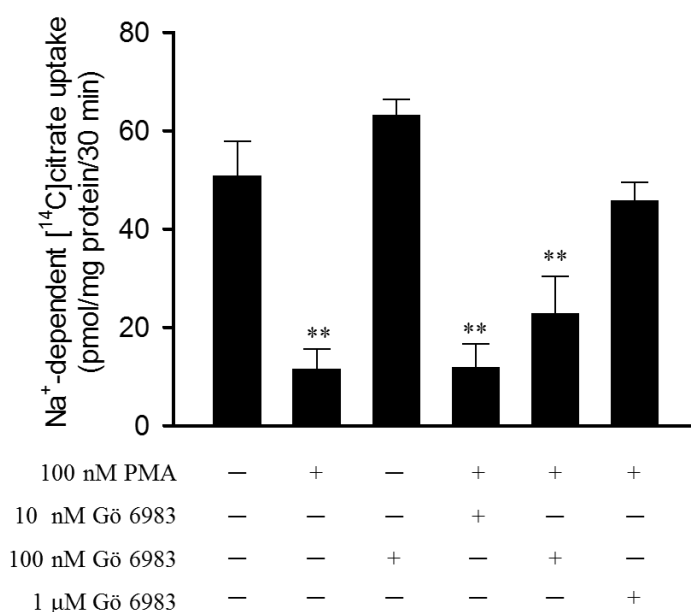


Figure 10 Effect of Gö 6983 on PMA-mediated regulation of Na⁺-dependent uptake of citrate in HepG2 cells. The cells were treated with or without Gö 6983 (0.01 – 1 μM) for 30 min in culture medium prior to the PMA treatment (100 nM). Then, uptake of [¹⁴C]citrate (8.6 μM) was measured during a 30-min incubation in NaCl- or NMDG chloride-containing transport buffer at pH 7.4. Na⁺-dependent uptake was obtained by subtracting uptake in the absence of Na⁺ from that in the presence of Na⁺. Each value represents the mean ± SD (n = 3). ***p* < 0.01, compared with control.

2-5 HepG2 細胞における Na^+ 依存的なクエン酸の輸送の速度論的パラメーターに対する PMA の影響

次に、PKC 活性化時における NaCT を介した Na^+ 依存的なクエン酸輸送の速度論的パラメーターの解析を行った。その結果、PMA 未処理時における Na^+ 依存的なクエン酸の取り込みの K_m は $5.4 \pm 0.6 \text{ mM}$ 、 V_{\max} は $69.2 \pm 2.3 \text{ nmol/mg protein/30 min}$ であったのに対し、PMA 処理時では $K_m = 8.6 \pm 2.1 \text{ mM}$ 、 $V_{\max} = 44.7 \pm 4.0 \text{ nmol/mg protein/30 min}$ となった (Fig. 11)。PMA 処理時では未処理時と比較して K_m はほとんど変化しなかったが、 V_{\max} は約 35% 低下した。

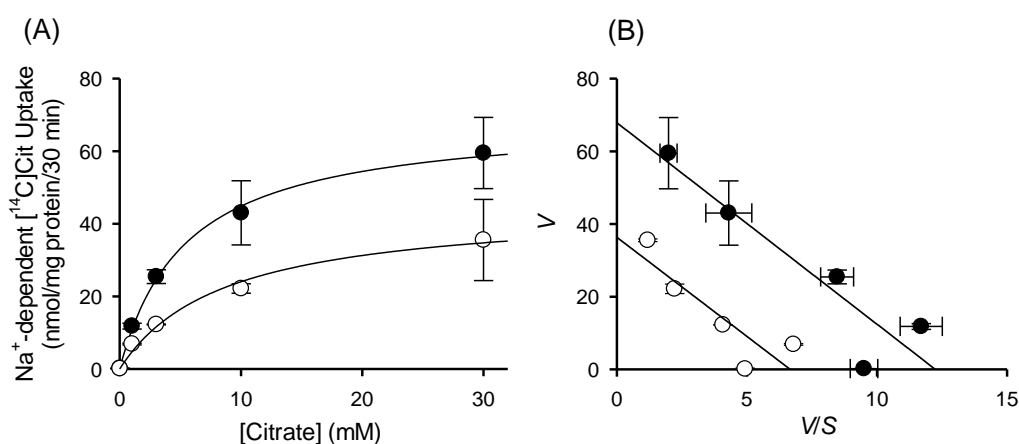


Figure 11 Effect of PMA on saturation kinetics of Na^+ -dependent uptake of citrate in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with (○) or without (●) 100 nM PMA for 3 h in culture medium. After the treatment, saturation kinetic study carried out in control and in PMA-treated cells, as described in Fig. 9 (B). Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$).

考 察

今日までの種々の研究から、肝臓に発現している OATP1B3 などの一部の SLC family トランスポーターは、PKC 活性化の影響を受けることが明らかにされている。そこで、本研究では、SLC family トランスポーターに属する NaCT を介したクエン酸輸送への PKC の影響について、HepG2 細胞を用いて検討を行った。

本検討から、HepG2 細胞におけるクエン酸の取り込みは、 Na^+ 依存的で、飽和性を示した。さらに Eadie-Hofstee plot は直線性を示した (Figs. 8A and B) ことから、見かけ上単一の輸送系によって行われていることが明らかとなった。一方、現在までに、HepG2 細胞に NaCT、および NaDC3 が mRNA レベル、タンパクレベルで発現していることは報告されており、これらのトランスポーターの輸送実験に HepG2 細胞が多用されている^{43,66-68}。このことから、本検討では、HepG2 細胞における NaCT、および NaDC3 の発現について、mRNA レベルでの評価しか行っていないが、いずれも発現していることが認められた (Fig. 7)。NaCT、および NaDC3 は、ともにクエン酸を輸

送することから、本検討で見られた Na^+ 依存的なクエン酸の取り込みが、どちらのトランスポーターによるものかは不明である。NaCT と NaDC3 は、ともに Na^+ -coupled carboxylate transporters (NaCs) に属しており、内向きの起電性輸送プロセスを示すなど、構造的、機能的に類似する点は多く見られるが、基質特異性、および基質親和性において明確な違いが存在する^{20,21}。その一つに、 Li^+ 存在下における輸送特性の違いがある。ヒトにおいて、NaCT は、4つの Na^+ 結合部位のうち2つの結合部位が Li^+ によって占有されることで、基質の取り込みが促進される^{20,21,26,43,66}。一方、ヒト NaDC3 では、 Li^+ が NaDC3 の3つの Na^+ 結合部位のうち1つと Na^+ より高親和性に結合することで、輸送活性は低下することが明らかになっている^{20,21,26,69,70}。本検討では、この Li^+ に対する感受性の違いを利用して、HepG2 細胞において、クエン酸の輸送が主にどちらのトランスポーターによって行われているのかについて評価を行った。HepG2 細胞における NAA の取り込みは、 Li^+ 存在下において阻害され、これは放射標識されていないクエン酸を加えた場合よりも NAA を加えた際に強く阻害された (Fig. 8D) ため、クエン酸よりも NAA に対して高親和性を示すトランスポーター、NaDC3 によって NAA の輸送が行われていることが示唆された。一方、HepG2 細胞における Li^+ 存在下でのクエン酸の取り込みは亢進し、これは放射標識されていないクエン酸を加えることで強く阻害されたが、NAA を加えた場合はクエン酸ほど強く阻害されなかった (Fig. 8C)。このことから、HepG2 細胞におけるクエン酸の輸送は、NAA よりもクエン酸に対して高親和性を示す NaCT によって主に行われていると推察される。また、NaDC3 はクエン酸を含めて NaCT よりも幅広い基質特異性を持つが、生理的条件 (pH 7.4) 下では一般に、2価アニオンのジ・トリカルボン酸を Na^+ : 基質 = 3 : 1 の化学量論比で輸送することが明らかとなっている^{20,69}。NaDC3 の基質の一つであるコハク酸は、生理的 pH (pH 7.4) においてほとんどが2価のアニオンとして存在するが、クエン酸は90%以上が3価のアニオンとして存在してい

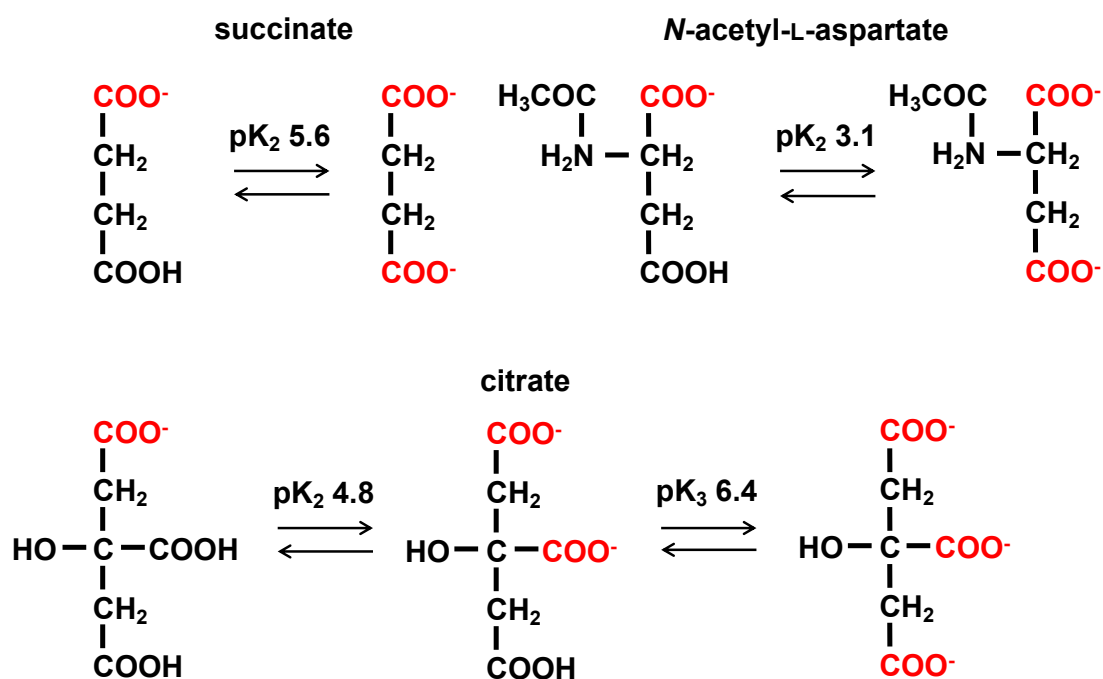


Figure 12 Ionic form and pKa of succinate, N-acetyl-L-aspartate and citrate.

る (Fig. 12) ことから、生理的条件下ではクエン酸よりもコハク酸を主に輸送することが推察される。一方、NaCT は TCA 回路中間体の中でもクエン酸に特に高い親和性を示し、その状態が 2 価であるか 3 価であるかに関係なく、 Na^+ : 基質 = 4:1 の化学量論比で輸送する^{16,19,20,28}。これらのことは、今回検討を行った生理的条件下 (pH 7.4) 下では、HepG2 細胞における Na^+ 依存的なクエン酸輸送は主に NaCT を介して行われていることを支持している。

また、本検討より決定した HepG2 細胞におけるクエン酸輸送の K_m 値は、ヒト NaCT (hNaCT) を発現させたヒト網膜上皮細胞 HRPE 細胞 (hNaCT/HRPE 細胞) における K_m 値より高かった ($5.12 \pm 0.72 \text{ mM}$ vs $604 \pm 73 \text{ }\mu\text{M}$)¹⁶ が、Gopal らによって報告された HepG2 細胞における NaCT の K_m 値 ($5.1 \pm 0.5 \text{ mM}$)⁴³ とはよく一致した。この hNaCT/HRPE 細胞と HepG2 細胞における NaCT の K_m 値に大きな差がある理由は不明であるが、Ganapathy らのグループは翻訳後修飾が重要な役割を果たしているとして推察している⁴³。哺乳類の細胞にトランスポーターを発現させた発現系では、遺伝子導入後 12-15 時間以内に輸送活性を測定することが一般的であるが、この条件ではトランスポータータンパクの翻訳後修飾が十分に行われていない可能性がある。一方で、HepG2 細胞には NaCT が恒常的に発現していることから、十分に翻訳後修飾が行われた状態のトランスポータータンパクが機能していると考えられる⁴³。

次に、HepG2 細胞における Na^+ 依存的なクエン酸輸送に対する PKC の影響について、PKC 活性化剤である PMA、および PKC 阻害剤である Gö 6983 を用いて検討を行った。PMA で細胞を予め処理することで、HepG2 細胞におけるクエン酸の取り込みは、PMA 濃度依存的、時間依存的に著しく低下した (Fig. 9)。また、この PMA によるクエン酸輸送活性の低下は、Gö 6983 によって PKC の活性化を阻害することで回復した (Fig. 10)。これらの結果から、PKC は HepG2 細胞における NaCT を介したクエン酸輸送を制御していることが示唆された。PKC は、構造や生理活性などによって在来型 (α , β I, β II, γ)、新型 (δ , ϵ , θ , η)、非典型 (ζ , $M\zeta$, ι/λ) の 3 種類のサブファミリーに分けられ、ヒト肝細胞には、在来型 (α)、新型 (δ , ϵ , η)、非典型 (ζ , ι/λ) のアイソフォームがそれぞれ発現している⁵⁹。Gö 6983 は、ほぼ全ての PKC アイソフォーム (PKC- α , β , γ , δ , ζ , μ) に対して阻害効果を示すが、PMA は在来型および新型 PKC は活性化するが、非典型 PKC は活性化しない。さらに、PMA は PKC アイソフォームの中で、PKC- α や PKC- δ と比較して PKC- η をより活性化しやすいことが明らかになっている⁷¹。そのため、今回の検討で見られた PMA による NaCT を介したクエン酸の輸送活性の低下には、在来型や新型 PKCs、特に PKC- η の活性化が密接に関係していることが推察できる。

さらに、本検討で算出した各速度論的パラメーターから、PKC の活性化による HepG2 細胞におけるクエン酸輸送活性の低下は、 V_{\max} の低下に起因することが明らかとなった (Fig. 11)。現在までに、NaCs について、本研究と同様に PKC を介した輸送活性の低下がみられたという報告がされている。その一つとして、Pajor らは、NaDC1 を介したコハク酸の輸送が PMA によって阻害されることを示している⁶⁴。このとき、NaDC1 に存在する 2 つの PKC リン酸化部位を変化させても輸送活性は変化しなかったが、細胞膜上の NaDC1 の発現は PMA 濃度依存的に低下した

ことから、輸送活性の低下にはトランスポーターのエンドサイトーシスが深く関与していることを示唆している⁶⁴。また、HepG2 細胞における NaDC3 を介したコハク酸の輸送についても NaDC1 と同様に、PKC の活性化によってエンドサイトーシスが増加し、細胞膜上の NaDC3 の発現が低下することが報告されている¹³。このような PKC 誘発性のトランスポーターの細胞内移行には、クラスリン依存性のエンドサイトーシスが関与しており、取り込まれたトランスポーターはリソソームにより分解されることが推察されている^{62,72}。これらの報告より、本検討でみられた PKC 活性化による NaCT を介したクエン酸輸送における V_{max} の低下は、エンドサイトーシスにより細胞膜表面上の NaCT が取り込まれ、その後リソソームにより分解されることで膜表面の NaCT 発現量が減少したことによるものであると推察できる。その一方で、PKC が NaCT の輸送活性を阻害した可能性も考えられる。NaCT と同様に SLC family トランスポーターに属する OATP に関して、PKC による直接的なトランスポーターのリン酸化、あるいは PKC がその他の機構に作用することで、トランスポーターの輸送活性を阻害することが報告されている^{61,73}。そのため、NaCT についても OATP と同様の機構により輸送活性が低下した可能性も考えられるが、この詳細について明らかにするためには、site-directed mutagenesis による推定リン酸化部位を除去した NaCT での PKC 活性化時の機能評価など、さらなる検討が必要である。

以上より、本研究から、HepG2 細胞における Na^+ 依存的なクエン酸輸送は、主に NaCT を介して行われており、さらに、それは PKC の制御を受けていることが明らかになった。また、NaCT によるクエン酸輸送は、PKC の活性化によって V_{max} が低下し、輸送活性が低下することが明らかとなった。

結 論

本研究から、肝臓における Na^+ 依存性クエン酸トランスポーター NaCT の役割について、モデルマウスを用いた 1 型糖尿病と NaCT の関連性についての検討、および PKC による NaCT の輸送活性への影響に関する検討を通して、以下の知見が得られた。

1. 1 型糖尿病モデルマウスの肝臓における Na^+ 依存性クエン酸トランスポーター (NaCT) の発現、および機能的特徴に関する検討

STZ により実験的に 1 型糖尿病を再現したモデルマウスを用いて、1 型糖尿病における肝 NaCT の発現量や輸送活性の変動、肝細胞、および血漿中の脂質量について検討を行った。その結果、1 型糖尿病モデルマウスでは、2 型糖尿病モデルラットの報告とは異なり NaCT の発現量は次第に減少することが明らかとなった。しかしながら、STZ 処理マウスにおけるクエン酸の取り込み量は、未処理マウスと大きな差は見られなかった。一方、NaCT と同じ SLC family トランスポーターに属する NaDC3 の発現は、増加する傾向が認められた。このことから、1 型糖尿病モデルマウスでは、発現が低下する NaCT の代わりに発現が増加した NaDC3 により、肝細胞へのクエン酸の取り込みが維持されていることが示唆された。また、STZ 処理マウスでは、肝細胞における脂質蓄積量は変化しなかったが、血漿中のトリグリセリド、コレステロール、および NEFA 量が、未処理マウスよりも高い値を示した。これらの結果より、1 型糖尿病モデルマウスでは、NaCT の発現量は低下し、肝細胞内へのクエン酸の輸送は代償的に発現が上昇した NaDC3 によって行われている可能性が示唆された。

2. Protein kinase C (PKC) の Na^+ 依存性クエン酸トランスポーター (NaCT) を介したクエン酸輸送に対する影響に関する検討

NaCT を介したクエン酸輸送への PKC の影響を明らかにするために、ヒト肝細胞と同様に NaCs の発現が認められる HepG2 細胞を用いて、PKC 活性化時の NaCT の輸送活性の変動について評価検討を行った。HepG2 細胞におけるクエン酸の輸送は、 Na^+ 依存性かつ飽和性が認められ、見かけ上単一の輸送系を介して行われていることが明らかとなった。HepG2 細胞には、クエン酸の輸送体として NaCT と NaDC3 の 2 つのトランスポーターが存在するが、HepG2 細胞における Na^+ 依存的なクエン酸の取り込みは、 Li^+ 存在下で促進したことから、主に NaCT を介して行われていることが示された。HepG2 細胞における NaCT を介したクエン酸の取り込みは、PMA により PKC を活性化することで低下した。このとき、クエン酸輸送において、 K_m 値は変化しなかったが、 V_{\max} は低下した。一方、この PKC 活性化によるクエン酸の取り込みの低下は、Gö 6983 を用いて PKC の活性化を阻害することで回復した。このことから、HepG2 細胞におけるクエン酸の輸送は、主に NaCT を介して行われており、PKC により制御されていることが明らかとなった。

以上、著者はモデルマウスを用いた検討から、NaCT は1型糖尿病において発現が低下し、肝臓への脂質蓄積には寄与していないことを明らかにした。また、HepG2細胞におけるNa⁺依存的なクエン酸の輸送が主にNaCTを介して行われており、PKCの制御を受けていることを明らかにした。

このことから、本検討で得られた知見は、肝臓におけるNaCTの発現制御機構、および輸送活性調節機構、生理的役割の解明に貢献し、糖尿病に付随する代謝性疾患の新規治療戦略の構築に有益なものであると考えられる。

業 績

本研究は、以下の2報の学術論文に報告した。

1. **Maya Goto**, Yusuke Kono, Ayako Yuki, Haruka Nishimura, Mizuki Ikawa, Kanta Ohno, and Takuya Fujita. Protein kinase C regulates the citrate transport via Na⁺-coupled citrate transporter NaCT in HepG2 cells. *BPB Report 2*, 134-140 (2019).
2. **Maya Goto**, Yusuke Kono, Kanta Ohno, and Takuya Fujita. Hepatic expression of the Na⁺-coupled citrate transporter (NaCT/Slc13a5) and cellular uptake of citrate in a mouse model of type 1 diabetes induced by streptozotocin. *BPB Report 3*, 97-101 (2020).

謝 辞

本研究を実施するにあたり、終始御懇篤なる御指導とご鞭撻を賜りました、立命館大学薬学部分子薬物動態学研究室 藤田卓也教授に深甚なる謝意を表します。更に、種々の有益な御助言、御指導を賜りました、立命館大学グローバル・イノベーション研究機構 河野裕允准教授、立命館大学薬学部分子薬物動態学研究室 根来亮介助教に謹んで深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、実験に御協力戴いた結城綾子学士、西村春香学士、井川瑞貴学士、大野寛太学士、また、研究室生活を共にし、終始温かいご支援を戴きました立命館大学薬学部分子薬物動態学研究室の皆様をはじめとする多くの方々に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究の実施にあたり終始便宜を図って戴いた多くの方々、また、研究に専念するにあたり終始温かいサポートを戴いた父、母に心から感謝の意を捧げます。

実験の部

第1章 実験の部

実験材料

[¹⁴C]citrate (specific activity: 116.4 mCi/mmol) は、PerkinElmer (Boston, MA, USA) より購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、antibiotic/antimycotic solution for tissue culture、Sepasol-RNA I Super G は、ナカライテスク (京都) より、Fetal bovine serum (FBS) は、Life Technologies (Carsbad, CA, USA) より購入した。ReverTra Ace は、TOYOBO Co., Ltd. (大阪) より購入した。

実験方法

1) 実験動物

6週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本エスエルシー、静岡) を用い、未処理マウスと1型糖尿病マウス (STZ-treated) の2群に分けた (n=20 in each group)。1型糖尿病モデルマウスは、生理食塩水 (pH 7.0) に溶解した streptozotocin (STZ: フジフィルム和光純薬、大阪) をマウス腹腔内に 200 mg/kg で単回投与することにより作成した⁷⁴。一方、未処理マウスでは、STZ の代わりに生理食塩水を腹腔内に単回投与した。また、STZ 投与後4日目に血糖値を測定し、その時の空腹時血糖値が 400 mg/dL となったマウスを1型糖尿病モデルマウスと判定し、以降の検討に用いた。

2) Real-time reverse transcription (RT)-PCR 解析

未処理マウス、および STZ 処理マウスの肝臓から Sepazol RNA I (ナカライテスク、京都) を用いて、定法に従い total RNA を抽出した。抽出した total RNA 2 µg に対し、逆転写酵素 ReverTra Ace (TOYOBO、大阪) および oligo(dT)₂₀ プライマーを用いて逆転写を行い、1st strand cDNA を得た。得られた cDNA 2 µg について、mouse NaCT (mNaCT)、mouse NaDC3 (mNaDC3)、GAPDH に特異的なプライマーセット (Table 3) および PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、Applied Biosystems StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により Real-time RT-PCR を行った。95 °C、10 min、95 °C、15 sec、60 °C、60 sec の増幅反応を 45 サイクル繰り返し、60 °C、60 sec の最終増幅を1回行った。目的遺伝子の mRNA 量は、GAPDH の mRNA 量で標準化した。各々の mRNA の相対量を STZ 処理マウスでの mRNA 量と未処理マウスでの mRNA 量の比率 (STZ/ non-treated (NT)) で表した。

Table 3 Primer sequences used in Real-time RT-PCR reaction

| cDNA | Primer sequence (5' – to - 3') | PCR Product size (bp) | Accession No. |
|---------------|--|-----------------------|----------------|
| mNaDC3 | forward primer: 5'- CTTCCTCGACACCAACTTCC -3' reverse primer: 5'- CTTGTTCTGCACGTTTGCCA -3' | 800 | NM_054055 |
| mNaCT | forward primer: 5'- GTCAGTCTCCCTTTCACGCG -3' reverse primer: 5'- CTCCACAGCTGTATTGGCGG -3' | 521 | NM_001004148.4 |
| GAPDH | forward primer: 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' reverse primer: 5'-CCTGGTTCACCACCTTCTTG-3' | 576 | X02231 |

3) Western blotting

マウスから肝臓を切り出し、RIPA buffer (0.1% TritonX-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl) を加え、ポリトロンホモジナイザーで氷冷しながら破碎し、タンパクを回収した。回収したタンパクを BCA protein assay kit (ナカライテスク) を用いて、定量した。サンプル (20 µg protein) を 2×SDS sample buffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue; pH 6.8) で可溶化し、100 °C で 5 分間熱変性処理した。その後、10% SDS PAGE で分離後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜を 5% スキムミルク、1% BSA を含有 Tween tris buffered saline (TBS-T) buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.2% tween-20; pH7.5) を用いて、室温で 2 時間ブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、一次抗体 anti-NaCT antibody (1:250) (#PA5-60679, SIGMA-Aldrich)、anti-β-actin (1:1,000) (#4967, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) をそれぞれ 4 °C で一晩反応させた。一次抗体を反応させた PVDF 膜を TBS-T buffer で洗浄し、二次抗体 anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (1:1,000; cat. no. 7074; Cell Signaling Technology, Inc) を室温で 1 時間処理した。その後、再び TBS-T buffer にて洗浄し、ImmunoStar LD (フジフィルム和光純薬) を用いて化学発光させ、Gel Doc XR+ Gel Documentation System (BioRad) にて可視化した。

4) 取り込み実験

マウスの肝臓を 0.5 mg/mL collagenase solution (collagenase 0.25mg in 50mL enzyme buffer solution) で灌流を行い、初代肝培養細胞を単離した。単離した初代肝培養細胞を 1×10⁵ cells/mL となるように、Na⁺-containing transport buffer (25 mM HEPES/Tris (pH 7.4), 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 5 mM glucose) に懸濁させた。一方、Na⁺ 非存在下でのクエン酸輸送については、NaCl を等濃度の *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) chloride に置換した transport buffer

(Na⁺-free transport buffer) を用いた。細胞懸濁液 1 mL に [¹⁴C]citrate (specific activity: 116.4 mCi/mmol) 含有 transport buffer (0.43 μM) 1 mL を加え、37 °C で浸透させながら 15 分間培養した。15 分後、混合液を Whatman® glass microfiber filter (GF/F) (Buckinghamshire, UK) を用いて吸引濾過し、氷冷した transport buffer 1 mL で 2 回洗浄した。その後、filter を測定用のバイアルに移し、5 mL のクリアゾル I を加えて、液体シンチレーションカウンター (Model LSC6000, Beckmann) にて放射活性の測定を行った。Na⁺ 依存的な [¹⁴C]citrate の取り込み量については、Na⁺-containing transport buffer における細胞内への取り込み量から Na⁺-free transport buffer での取り込み量を差し引くことで算出した。また、相対的な [¹⁴C]citrate 取り込み量については、STZ 処理マウスにおける Na⁺ 依存的な [¹⁴C]citrate の取り込み量と未処理マウスにおける取り込み量の比率 (STZ/NT) で表した。

5) Oil Red O 染色

肝細胞における脂質蓄積を評価するために、STZ 処理後 1、2、4、6、および 8 週目に Oil Red O 染色を行った。STZ 処理マウス、未処理マウスから採取した肝臓を 4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) で固定し、Tissue-Tek O.C.T. Compound (サクラファインテックジャパン、東京) で包埋し、-80 °C で凍結させて組織切片を作製した。一方、Oil red O 保存液はイソプロパノール 100 mL に、Oil Red O (フジフィルム和光純薬) を 0.3 g 加え、作製した。その保存液を保存液 : イオン交換水 = 6 : 4 となるように混合し、30 分攪拌した後、混合液を 0.45 μm フィルター (アドバンテック東洋、東京) で濾過して染色液を作製した。肝臓の組織切片を Oil Red O 染色液を用いて、染色した。

6) 血液中の生化学データの測定

STZ 投与後 0、1、2、4、6、8 週目に、STZ 処理マウス、および未処理マウスから血液を採取した。血液を 3,000 × g、4 °C で 15 分間遠心分離し、血漿を回収した。回収した血漿サンプルの血漿中グルコース、トリグリセリド、コレステロール、および遊離脂肪酸 (nonesterified fatty acid: NEFA) について、それぞれ LabAssay Glucose、LabAssay Triglyceride、LabAssay Cholesterol、LabAssay NEFA (フジフィルム和光純薬) を用いて、定法に従い測定を行った。

7) 統計学的解析

それぞれのデータは、平均 ± 標準偏差 (SD) で示した。統計学的有意差は、ANOVA を用いて評価を行った。2 群間の比較は Student's *t* test を、対照群と他群間の多重比較には Dunnett's test を用いて検定を行った。

第 2 章 実験の部

実験材料

[¹⁴C]citrate (specific activity: 116.4 mCi/mmol) は、PerkinElmer (Boston, MA, USA) より購入した。
[¹⁴C]N-acetyl-L-aspartate (NAA) (specific activity, 55 mCi/mmol) は、American Radiolabeled Chemicals (St Louis, MO, USA) より購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、antibiotic/antimycotic solution for tissue culture、Sepasol-RNA I Super G は、ナカライテスク (京都) より、Fetal bovine serum (FBS) は、Life Technologies (Carsbad, CA, USA) より購入した。T-75 フラスコ、および 24-well cell culture plate は Corning (Corning, NY, USA) より購入した。ReverTra Ace は、TOYOBO Co., Ltd. (大阪) より購入した。Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より、Gö 6983 は、Abcam (Cambridge, UK) よりそれぞれ購入した。その他の試薬については、全て市販の特級試薬を用いた。

実験方法

1) 細胞培養

ヒト肝癌由来細胞 HepG2 細胞は、DS Pharm Biomedical Co., Ltd (大阪) より購入した。HepG2 細胞を T-75 フラスコに播種し、37 °C、5% CO₂/95% O₂ 条件下、10% FBS、および 1% antibiotic/antimycotic solution for tissue culture を添加した DMEM 中で培養した。

2) Reverse transcription (RT)-PCR 解析

T-75 フラスコに培養していた HepG2 細胞から Sepazol RNA I (ナカライテスク) を用いて定法に従い、total RNA を抽出した。抽出した total RNA 1 µg に対し、逆転写酵素 ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写を行い、1st-strand cDNA を得た。得られた cDNA 5 µg を用いて、human NaCT (hNaCT)、 human NaDC3 (hNaDC3)、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に特異的なプライマー (Table 4) を用いて、PCR を行った。PCR は、70 °C、10 min の熱変性後、95 °C、120 sec、58 °C、45 sec、74 °C、90 sec の増幅反応を 30 サイクル繰り返し、72 °C、7min の最終増幅を 1 回行った。PCR 産物は、1×TAE buffer を用いて調整した 1% アガロースゲルに添加し、100V、30 分間電気泳動を行うことで分離した。得られたバンドは、GelRed Nucleic Acid Gel Stain (フジフィルム和光純薬、大阪) を用いて UV 照射することで検出し、Gel Doc XR+ Gel Documentation System により可視化した。各プライマーの塩基配列は、Table 4 に示した。

Table 4 Primer sequences used in RT-PCR reaction

| cDNA | Primer sequence (5' – to - 3') | PCR Product size (bp) | Accession No. |
|---------------|--|-----------------------|---------------|
| hNaDC3 | forward primer: 5'-ATCGTCGGAACATCTGGAAG-3' reverse primer: 5'GGCAGGAAGATGATGATGGT-3' | 793 | NM_001193342 |
| hNaCT | forward primer: 5'-CGGGCTAGAGAGCAAGAAAA-3' reverse primer: 5'-GGTCATTTTGGGGTGTGAAC-3' | 912 | AY151833 |
| GAPDH | forward primer: 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' reverse primer: 5'-CCTGGTTCACCACCTTCTTG-3' | 576 | X02231 |

3) 取り込み実験

HepG2 細胞は、24-well cell culture plate に 1.0×10^5 cells/well で播種し、6 日後に取り込み実験に供した。HepG2 細胞の culture medium を吸引除去した後、transfer buffer で細胞を洗浄した。Na⁺ 存在下での輸送には、25 mM HEPES/Tris (pH 7.4)、140 mM NaCl、5.4 mM KCl、1.8 mM CaCl₂、0.8 mM MgSO₄ および 5 mM glucose から成る transport buffer (Na⁺-containing transport buffer) を用い、Na⁺ 非存在下での輸送には、NaCl を等濃度の *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) chloride に置換した transport buffer (Na⁺-free transport buffer) を用いた。Na⁺ 依存的な取り込み量は、Na⁺ 存在下における細胞内への取り込み量から Na⁺ 非存在下での取り込み量を差し引くことで算出した。また、Na⁺ 依存的な輸送への Li⁺ の影響についての検討には、10 mM LiCl を添加した Na⁺-containing transport buffer を用いた。このとき、コントロールとして、transport buffer の浸透圧を維持するために 10 mM LiCl を等濃度のマンニトールで置換した Na⁺-free transport buffer を用いた。

HepG2 細胞を 37 °C 条件下、[¹⁴C]citrate (4 μM) あるいは [¹⁴C] NAA (10 μM) を含む transport buffer で一定時間培養した後、これらの transport buffer を吸引除去し、氷冷した 1mL transport buffer で 2 回洗浄することで取り込み反応を停止させた。1% SDS/0.2 M NaOH 500 μL で細胞を可溶化した後、そのうちの 450 μL を測定用のバイアルに移し、クリアゾル I (ナカライテスク) 5 mL を加えて液体シンチレーションカウンター (Model LSC6000) にて放射活性の測定を行った。残りの 50 μL についてはタンパク定量を行い、得られた放射活性の測定値を定量したタンパク量で補正した。

PKC の Na⁺ 依存的なクエン酸輸送への影響については、HepG2 細胞を PKC 活性化剤である PMA (1-100 nM) を添加した serum free-DMEM で予め 3 時間培養してから、取り込み実験を行った。一方、PKC の阻害効果についての評価検討については、PKC アンタゴニストの Gö 6983 (0.01-1 μM) を添加した serum free-DMEM で HepG2 細胞を予め 90 分間培養し、その後取り込み実験に供した。

4) 統計学的解析

各取り込み実験により得られたデータは、下記に示す計算式を基に Sigma plot version 13 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) を用いて算出した。

Na⁺ 依存的なクエン酸輸送の saturation kinetics については、以下の Michaelis–Menten 式に適合させた。

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

ここで、 V_{\max} はクエン酸の最大取り込み速度、 K_m は Michaelis 定数、 S はクエン酸濃度を示す。式 (1) を変形し、Eadie-Hofstee 式にもあてはめ同様の計算を行った。

Eadie-Hofstee 式:

$$v' = V_{\max} - K_m \frac{v'}{[S]} \quad (2)$$

それぞれのデータは、平均 ± 標準偏差 (SD) で示した。統計学的有意差は、ANOVA を用いて評価を行った。2 群間の比較は Student's *t* test を、対照群と他群間の多重比較には Dunnett's test を用いて検定を行った。

引用文献

1. Lee Y., Cho Y., Lee B., Park C., Lee D. H., Cha B., Rhee E. Nonalcoholic fatty liver disease in diabetes. part I: epidemiology and diagnosis. *Diabetes Metab J.* **43**, 31–45 (2019).
2. Kumar R., Priyadarshi R. N., Anand U. Non-alcoholic fatty liver disease : growing burden, adverse outcomes and associations. *J Clin Transl Hepatol.* **8**, 76–86 (2020).
3. Zobair M Y., Aaron B K., Dinan A., Yousef F., Linda H., Mark W. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* **64**, 73–84 (2016).
4. Willmes D. M., Kurzbach A., Henke C., Schumann T., Zahn G., Heifetz A., Jordan J., Helfand S. L., Birkenfeld A. L. The longevity gene INDY (I'm Not Dead Yet) in metabolic control : potential as pharmacological target. *Pharmacol. Ther.* **185**, 1–11 (2018).
5. Rogers R. P., Rogina B. The role of INDY in metabolism, health and longevity. *Front Genet.* **6**, 1–5 (2015).
6. Willmes D. M., Birkenfeld A. L. The role of INDY in metabolic regulation. *Comput Struct Biotechnol J.* **6**, 1–8 (2013).
7. Li Z., Erion D., Maurer T. Model-based assessment of plasma citrate flux into the liver : implications for NaCT as a therapeutic target. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* **5**, 132–139 (2016).
8. Iacobazzi V., Infantino V. Citrate – new functions for an old metabolite. *Biol Chem.* **395**, 387–399 (2014).
9. Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys.* **68**, 475–478 (2014).
10. Williams N. C., Neill L. A. J. O., Munder M., Gutenberg-universität J. A role for the Krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation. *Front Immunol.* **9**, 1–11 (2018).
11. Paumen M. B., Ishida Y., Muramatsu M., Yamamoto M., Honjo T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 3324–3329 (1997).
12. Yalcin A., Telang S., Clem B., Chesney J. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp. Mol. Pathol.* **86**, 174–179 (2009).
13. Srisawang P., Chatsudthipong A., Chatsudthipong V. Modulation of succinate transport in Hep G2 cell line by PKC. *Biochim Biophys Acta.* **1768**, 1378–1388 (2007).
14. Sun J., Aluvila S., Kotaria R., Mayor J. A., Walters D. E., Kaplan R. S. Mitochondrial and plasma membrane citrate transporters: discovery of selective inhibitors and application to structure/function analysis. *Mol Cell Pharmacol.* **2**, 101–110 (2010).
15. Krebs H. A. Chemical composition of blood plasma and serum. *Annu. Rev. Biochem.* **19**, 409–430 (1950).
16. Inoue K., Zhuang L., Ganapathy V. Human Na⁺-coupled citrate transporter: primary structure, genomic organization, and transport function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**, 465–471 (2002).
17. Pajor A. M. Sodium- coupled transporters for Krebs cycle intermediates. *Annu Rev Physiol.* **61**, 663–682 (1999).
18. Pajor A. M. Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family. *Pflugers Arch.* **466**, 119–130 (2014).
19. Inoue K., Zhuang L., Maddox D. M., Smith S. B., Ganapathy V. Structure, function, and expression pattern of a novel sodium- coupled citrate transporter (NaCT) cloned from mammalian brain. *J Biol Chem.* **277**, 39469–39476 (2002).
20. Bergeron M. J., Cléménçon B., Hediger M. A., Markovich D. SLC13 family of Na⁺-coupled di- and tri-carboxylate/sulfate transporters. *Mol. Aspects Med.* **34**, 299–312 (2013).
21. Pajor A. M. Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch.* **451**, 597–605 (2006).
22. Markovich D., Murer H. The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch.* **447**, 594–602 (2004).
23. Willmes D. M., Kurzbach A., Henke C., Schumann T., Zahn G., Heifetz A., Jordan J., Helfand S. L., Birkenfeld A. L. The longevity gene INDY (I'm Not Dead Yet) in metabolic control: potential as pharmacological target. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 185 1–11 (2018).
24. Chen X., Shayakul C., Berger U. V., Tian W., Hediger M. A. Characterization of a rat Na⁺-dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem.* **273**, 20972–20981 (1998).

25. Pajor A. M. Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human. *Am J Physiol.* **270**, F642–F648 (1996).
26. Wang H., Fei Y., Kekuda R., Yang-Feng T. L., Devoe L. D., Leibach F. H., Prasad P. D., Ganapathy V. Structure, function, and genomic organization of human Na⁺-dependent high-affinity dicarboxylate transporter. *Am J Physiol Cell Physiol.* **278**, C1019–C1030 (2000).
27. Huang W., Wang H., Kekuda R., Fei Y., Friedrich A., Wang J., Conway S. J., Cameron R. S., Leibach F. H., Ganapathy V. Transport of N-acetylaspartate by the Na⁺-dependent high-affinity dicarboxylate transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the transporter in the brain. *J Pharmacol Exp Ther.* **295**, 392–403 (2000).
28. Inoue K., Fei Y., Zhuang L., Gopal E., Miyauchi S., Ganapathy V. Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biochem J.* **378**, 949–957 (2004).
29. Rogina B., Reenan R. A., Nilsen S. P., Helfand S. L. Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science.* **290**, 2137–2140 (2000).
30. Knauf F., Mohebbi N., Teichert C., Herold D., Rogina B., Helfand S., Gollasch M., Luft F. C., Aronson P. S. The life-extending gene *Indy* encodes an exchanger for Krebs-cycle intermediates. *Biochem J.* **397**, 25–29 (2006).
31. Inoue K., Fei Y.-J., Huang W., Zhuang L., Chen Z., Ganapathy V. Functional identity of *Drosophila melanogaster* *Indy* as a cation-independent, electroneutral transporter for tricarboxylic acid-cycle intermediates. *Biochem J.* **367**, 313–319 (2002).
32. Rogina B. *INDY* - a new link to metabolic regulation in animals and humans. *Front Genet.* **8**, 1–7 (2017).
33. Van De Wier B., Balk J. M., Haenen G. R. M. M., Giamouridis D., Bakker J. A., Bast B. C., Hartog G. J. M. den H., Koek G. H., Bast A. Elevated citrate levels in non-alcoholic fatty liver disease: The potential of citrate to promote radical production. *FEBS Lett.* **587**, 2461–2466 (2013).
34. Loeffelholz C. Von, Lieske S., Neusch F., Willmes D. M., Raschzok N., Sauer I. M., Wunderlich F. T., Helfand S. L., Bernier M., Cabo R. De, Shulman G. I. The human longevity gene homolog *INDY* and interleukin-6 interact in hepatic lipid metabolism. *Hepatology.* **66**, 616–630 (2017).
35. Neuschäfer-rube F., Lieske S., Kuna M., Henkel J., Perry R. J., Erion D. M., Pesta D., Willmes D. M., Brachs S., Loeffelholz C. Von, Tolkachov A., Schupp M. The mammalian *INDY* homolog is induced by CREB in a rat model of type 2 diabetes. *Diabetes.* **63**, 1048–1057 (2014).
36. Hu M., Phan F., Bourron O., Foufelle F. Steatosis and NASH in type 2 diabetes. *Biochimie.* **143**, 37–41 (2017).
37. Williams K. H., Shackel N. A., Gorrell M. D., Mclennan S. V., Twigg S. M. Diabetes and nonalcoholic fatty liver disease: a pathogenic duo. *Endocr Rev.* **34**, 84–129 (2013).
38. Cusi K., Sanyal A. J., Zhang S., Hartman M. L., Bue-Valleskey J. M., Hoogwerf B. J., Haupt A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) prevalence and its metabolic associations in patients with type 1 diabetes and type 2 diabetes. *Diabetes, Obes. Metab.* **19**, 1630–1634 (2017).
39. Svīklāne L., Olmane E., Dzērve Z., Kupčs K., Pīrāgs V., Sokolovska J. Fatty liver index and hepatic steatosis index for prediction of non-alcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes. *J Gastroenterol Hepatol.* **33**, 270–276 (2018).
40. Regnell S. E., Lernmark Å. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud.* **8**, 454–467 (2011).
41. Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv. Cardiol.* **45**, 1–16 (2008).
42. Koya D., King G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* **47**, 859–866 (1998).
43. Gopal E., Miyauchi S., Martin P. M., Ananth S., Srinivas S. R., Smith S. B., Prasad P. D., Ganapathy V. Expression and functional features of NaCT, a sodium-coupled citrate transporter, in human and rat livers and cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **292**, G402–G408 (2007).
44. Adeva-Andany M. M., Funcasta-Calderón R., Fernández-Fernández C., Castro-Quintela E., Carneiro-Freire N. Metabolic effects of glucagon in humans. *J. Clin. Transl. Endocrinol.* **15**, 45–53 (2019).
45. Girard J. Glucagon, a key factor in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochimie* **143**, 33–36 (2017).
46. Yosten G. L. C. Alpha cell dysfunction in type 1 diabetes. *Peptides* **100**, 54–60 (2018).
47. Gerich J. E., Langlois M., Noacco C., Lorenzi M., Karam J. H., Forsham P. H., Gusrafson G. Comparison of the suppressive effects of elevated plasma glucose and free fatty acid levels on glucagon secretion in normal and insulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Invest.* **58**, 320–325 (1976).
48. Niyaz R. G., Szoke E., Zarmen I., Tamar S., Philip E. C., John E. G., Christian M. Role of the decrement in inraislelet insulin for the glucagon response to hypoglycemia in humans. *Diabetes Care* **28**, 1124–1131

- (2005).
49. Howard B. V. Lipoprotein metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Lipid Res.* **28**, 613–628 (1987).
 50. Vergès B. Lipid disorders in type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* **35**, 353–360 (2009).
 51. Arencibia J. M., Pastor-flores D., Bauer A. F., Schulze J. O., Biondi R. M. AGC protein kinases : from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim Biophys Acta.* **1834**, 1302–1321 (2013).
 52. Sinton M. C., Hay D. C., Drake A. J. Metabolic control of gene transcription in non-alcoholic fatty liver disease : the role of the epigenome. *Clin Epigenetics.* **11**, 1–12 (2019).
 53. Schwartz P. A., Murray B. W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg. Chem.* **39**, 192–210 (2011).
 54. Hribal M. L., D'Alfonso R., Giovannone B., Lauro D., Liu Y. Y., Borboni P., Federici M., Lauro R., Sesti G. The sulfonylurea glimepiride regulates intracellular routing of the insulin-receptor complexes through their interaction with specific protein kinase C isoforms. *Mol. Pharmacol.* **59**, 322–330 (2001).
 55. Birkenfeld A. L., Shulman G. I. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology.* **59**, 713–723 (2014).
 56. Greene M. W., Burrington C. M., Lynch D. T., Davenport S. K., Johnson A. K., Horsman M. J., Chowdhry S., Zhang J., Sparks J. D., Tirrell P. C. Lipid metabolism, oxidative stress and cell death are regulated by PKC delta in a dietary model of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One.* **9**, e85848 (2014).
 57. Geraldes P., King G. L. Activation of protein kinase C isoforms & its impact on diabetic complications. *Circ Res.* **106**, 1319–1331 (2011).
 58. Samuel V. T., Shulman G. I. Nonalcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases. *Cell Metab.* **27**, 22–41 (2018).
 59. Mayati A., Le Vee M., Moreau A., Jouan E., Bucher S., Stieger B., Denizot C., Parmentier Y., Fardel O. Protein kinase C-dependent regulation of human hepatic drug transporter expression. *Biochem Pharmacol.* **98**, 703–717 (2015).
 60. Mayati A., Le M., Stieger B., Denizot C., Parmentier Y., Fardel O. Protein kinases C-mediated regulations of drug transporter activity, localization and expression. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–22 (2017).
 61. Powell J., Farasyn T., Köck K., Meng X., Pahwa S., Brouwer K. L. R., Yue W. Novel mechanism of impaired function of organic anion-transporting polypeptide 1B3 in human hepatocytes : post-translational regulation of OATP1B3 by protein kinase C activation. *Drug Metab Dispos.* **42**, 1964–1970 (2014).
 62. Köck K., Kathleen A., Giese B., Fraunholz M., May K., Siegmund W., Hammer E., Völker U., Jedlitschky G., Kroemer H. K., Grube M. Rapid modulation of the organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1, SLCO2B1) function by protein kinase C-mediated internalization. *J Biol Chem.* **285**, 11336–11347 (2010).
 63. Stross C., Helmer A., Weissenberger K., Görg B., Keitel V., Häussinger D., Kubitz R. Protein kinase C induces endocytosis of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **299**, G320–G328 (2010).
 64. Pajor A. M., Sun N. Protein kinase C-mediated regulation of the renal Na⁺/dicarboxylate cotransporter, NaDC-1. *Biochim Biophys Acta.* **1420**, 223–230 (1999).
 65. Yodoya E., Wada M., Shimada A., Katsukawa H., Okada N., Yamamoto A., Ganapathy V., Fujita T. Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. *J Neurochem.* **97**, 162–173 (2006).
 66. Inoue K., Zhuang L., Maddox D. M., Smith S. B., Ganapathy V. Human sodium-coupled citrate transporter , the orthologue of Drosophila Indy , as a novel target for lithium action. *Biochem J.* **374**, 21–26 (2003).
 67. Kopel J., Higuchi K., Ristic B., Sato T., Ramachandran S., Ganapathy V. The hepatic plasma membrane citrate transporter NaCT (SLC13A5) as a molecular target for metformin. *Sci. Rep.* **10**, 8536 (2020).
 68. Li Z., Li D., Choi E. Y., Lapidus R., Zhang L., Huang S. M., Shapiro P., Wang H. Silencing of solute carrier family 13 member 5 disrupts energy homeostasis and inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **292**, 13890–13901 (2017).
 69. Chen X., Tsukaguchi H., Chen X., Berger U. V., Hediger M. A. Molecular and functional analysis of SDCT2 , a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *J Clin Invest.* **103**, 1159–1168 (1999).
 70. Pajor A. M. Molecular properties of sodium/dicarboxylate cotransporters. *J. Membr. Biol.* **175**, 1–8 (2000).
 71. Saraiva L., Fresco P., Pinto E., Gonçalves J. Characterization of phorbol esters activity on individual mammalian protein kinase C isoforms, using the yeast phenotypic assay. *Eur. J. Pharmacol.* **491**, 101–

- 110 (2004).
72. Zhou F., Lee A. C., Krafczyk K., Zhu L., Murray M. Protein kinase C regulates the internalization and function of the human organic anion transporting polypeptide 1A2. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1380–1388 (2011).
 73. Soodvilai S., Chatsudhipong V., Evans K. K., Wright S. H., Dantzler W. H. Acute regulation of OAT3-mediated estrone sulfate transport in isolated rabbit renal proximal tubules. *Am J Physiol Ren. Physiol.* **287**, F1021–F1029 (2004).
 74. Deeds M., Anderson J., Armstrong A., Gastineau D., Hiddinga H., Jahangir A., Eberhardt N., Kudva Y. Single dose streptozotocin induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim.* **45**, 131–140 (2011).