

コラーゲン合成に必須なビタミン C 輸送メカニズムの解明

岡山大学学術研究院医歯薬学域

日浅 未来

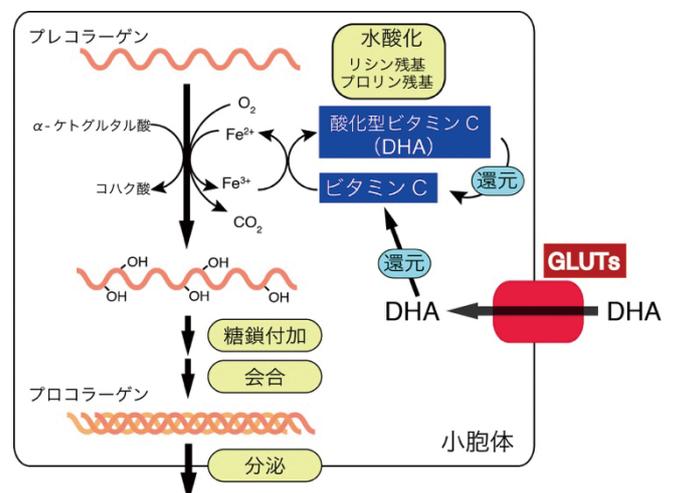
Collagen is abundant in skin and blood vessel walls and provides mechanical strength and flexibility to tissues and organs. Collagen is a protein synthesized by mesenchymal cells; it is synthesized intracellularly as procollagen, which is secreted extracellular space and then polymerized. In procollagen biosynthesis, proline is hydroxylated in the endoplasmic reticulum by proline hydroxylase, an enzyme that requires ascorbic acid, so-called vitamin C, as a coenzyme, to convert it to hydroxyproline. Hydroxyproline contributes to the stability of the triple helix structure, and a deficiency of vitamin C or proline hydroxylase results in immature collagen. Vitamin C is essential for collagen synthesis and maturation, but the mechanism by which vitamin C is transported to the endoplasmic reticulum, the site of proline hydroxylation, is not clear. In this study, we focused on glucose transporters (GLUTs) belonging to the SLC2A family as transporters that accumulate vitamin C in the endoplasmic reticulum. There are 13 subtypes of GLUTs, which are classified into Classes I-III based on amino acid sequence homology. GLUTs belonging to Class III have not been well studied, but they are intracellular membrane-localized transporters that recognize DHA, an oxidized form of vitamin C, as a substrate. The aim of this study is to demonstrate that GLUTs function as vesicular DHA transporters and to elucidate their physiological actions. We investigated GLUTs that are mainly expressed in collagen-secreting vascular smooth muscle cells and found that GLUT8, 10, and 12 are expressed in vascular smooth muscle cells (VSMCs). The fact that GLUT10 and 12 are well expressed in the endoplasmic reticulum and the low expression of GLUT12 suggests that GLUT10 is the GLUT that can function in the ER in VSMCs. To elucidate the physiological functions of GLUT10 as a vesicular DHA transporter, we plan to examine DHA transport activity and quantification of collagen and hydroxyproline in GLUT10 knockdown cells.

1. 緒言

コラーゲンは、皮膚や腱、軟骨、骨、血管壁に多く存在し、組織や器官に機械的な強さや柔軟性を賦与する。コラーゲンは間葉性細胞が合成するタンパク質であり、細胞内でプロコラーゲンとして合成され、細胞外に分泌された後に重合化して線維が形成される。細胞内のプロコラーゲン合成過程において、小胞体でペプチド鎖中の Y 位のプロリンがプロリンヒドロキシラーゼの作用により水酸化され、ヒドロキシプロリンへと変換される。この酵素は補酵素としてアスコルビン酸、いわゆるビタミン C を必要とする。このヒドロキシプロリンはコラーゲンを特徴づけるトリプルヘリックス構造の安定性に寄与しており、ビタミン C の不足やプロリンヒドロキシラーゼが欠損するとコラーゲンが成熟できない。実際に個体レベルでビタミン C が不足するとコラーゲン形成が障害され、血管壁の損傷や出血を伴う壊血病や骨形成異常を示す。以上のようにコラーゲン合成・成熟にはビタミン C が必須であるが、プロリン水酸化の場である小胞体へとビタミン C を供給するメカニズムは明らかになっていない。本研究では、小胞体内にビタミン

C を蓄積するトランスポーター（輸送体）として、SLC2A ファミリーに属するグルコーストランスポーター（GLUT）に注目した。

GLUT は細胞膜に局在し、細胞内にグルコースを供給することで生体恒常性の維持に関与している。GLUT には 13 種のサブタイプが存在し、アミノ酸配列の相同性からクラス I ~ III に分けられる¹⁾。クラス I には、GLUT 1, 2, 3, 4 が属している。GLUT 1 をはじめとして、現在最も研究が進んでおり、その生理学的役割も確認されている。GLUT 1 は脳血液関門のグルコース輸送を担っており、遺伝的欠損によって小児性のてんかんや発達遅延が発症することがわかっている²⁾。また、GLUT 2 は SGLT 2 と共役し、



Transport mechanism of vitamin C essential for collagen synthesis

Miki Hiasa

Okayama University, Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

腎臓の近位尿細管においてグルコースの再吸収に関与している。そのため、GLUT2の欠損はグリコーゲン貯留や高血糖からなる肝腫大を引き起こすファンコニー・ビッケル症候群を発症することが知られている³⁾。クラスIIには、GLUT5, 7, 9, 11が属しており、フルクトース輸送能をもつという特徴がある⁴⁾。さらにGLUT9は腎臓や肝臓で尿酸を輸送するため、遺伝的欠損によって、腎性低尿酸血症の原因になることが報告されている^{5, 6)}。一方で、クラスIIIには、GLUT6, 8, 10, 12, 13が属しており、他のクラスと比較すると研究が進んでいない。また、このクラスは細胞内膜への局在モチーフをもつため、細胞膜上でなく細胞内に局在するという特徴をもっている^{7, 8)}。クラスIIIに属するGLUTのうち、GLUT8は、酸化型ビタミンCであるデヒドロアスコルビン酸(DHA)を輸送することが強く示唆されている⁹⁾。また遺伝子レベルで精巣、脳、副腎、肝臓、脾臓、肺に発現することが示されている¹⁰⁾。GLUT12は、心臓や骨格筋などの組織に発現し、GLUT4同様にインスリン感受性が示唆されている¹¹⁾。さらに当研究室での解析により、DHAを基質とすることが示唆されている¹²⁾。しかし、組織での詳細な局在や機能は不明である。GLUT10は、GLUT8と同じようにグルコース以外にもDHAを輸送することが報告されている¹³⁾。さらに、動脈の蛇行や拡張、狭窄を引き起こす動脈蛇行障害(Arterial Tortuosity Syndrome, ATS)の原因遺伝子であることが判明している⁸⁾。しかしGLUT10ミスセンス変異マウスを用いた実験では、動脈系の異常が見られない報告もあり^{14, 15)}、GLUT10欠損によってどのようにATSが引き起こされるか不明である。また、GLUT10が発現する細胞や細胞内の局在についても線維芽細胞や血管平滑筋細胞、小胞体やミトコンドリアなどが報告されており、はっきりしない^{13, 16)}。

以上のように、クラスIIIに属するGLUTsについては機能や局在がよくわかっていないが、細胞内膜局在型のトランスポーターであり、基質として酸化型ビタミンCであるDHAを認識している。クラスIIIに属するGLUTsがコラーゲン産生細胞の小胞体に局在し、DHAを小胞体内へ輸送・蓄積する働きを担っているのではないかと考えられる。本研究はGLUTsが小胞型DHAトランスポーターとして機能することを証明し、その生理作用を明らかにすることを目的としている。クラスIII型GLUTsのうち、GLUT13(HMIT)は主に脳の神経に発現し、プロトン駆動力としてミオイノシトールを輸送することが知られており^{17, 18)}、グルコースの輸送には関与していないとされている。加えてGLUT6はリソソームに存在していることがわかっているため¹⁾、GLUT6, 13は除外し、残りのGLUT8, 10, 12について検証を行った。コラーゲン産生細胞である、血管平滑筋細胞(VSMC)を用いて実験を行った。

2. 方法

2.1. マウス血管平滑筋細胞(VSMC)初代培養

安楽死させたC57BL/6マウスより大動脈を摘出し、PBSで血液を洗浄した。その後、10% FBSを含むDMEM培地中で中膜を採取した。採取した中膜を1mm²程度にカットし、コラゲナーゼ溶液(3.0mg/mLコラゲナーゼタイプIIを添加したDMEM培地)に回収し、37℃、5% CO₂存在下で6時間保温した。DMEM培地で洗浄し、1250rpm、室温で5分間遠心した。得られた沈殿物をDMEM培地で洗浄し、さらに1250rpm、室温で5分間遠心した。沈殿物をDMEM培地で懸濁し、37℃、5% CO₂存在下で5日間培養した。継代し、血管平滑筋細胞を得た。

2.2. 免疫組織化学

ポリ-L-リジンでコートしたカバーガラス上で培養した血管平滑筋細胞をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで室温にて30分間固定した。PBSで洗浄した後、0.2%サポニン、2%ヤギ血清、1%BSAを含むPBSで室温、15分間反応させた。0.5%BSAを含むPBSで希釈した一次抗体を室温で1時間反応させ、PBSで洗浄後、0.5%BSAを含むPBSで希釈した二次抗体を室温で1時間反応させた。切片を封入後、生物用共焦点レーザー走査型顕微鏡FV1200-IX83(OLYMPUS)で観察した。

2.3. ビタミンC処理によるコラーゲン量変化の定量

VSMCを、FBSを含まない培地へ培地交換した。100µg/mL L-アスコルビン酸2-リン酸セスキマグネシウムを添加し、5日間培養した。ピクロシリウスレッド染色液1mLに培養上清を100µL添加し、ローテーターで30分間攪拌した。12,000rpm、10分間遠心後、沈殿物を0.5M水酸化ナトリウムにて溶解し、吸光度(540nm)測定した。検量線を用いて吸光度からコラーゲンを定量した。

3. 結果

3.1. マウス血管平滑筋細胞(VSMC)の単離とGLUTsの発現

大動脈の中膜には、血管平滑筋細胞(VSMC)が多く存在している。マウス大動脈の中膜からコラゲナーゼによりVSMCを単離した。VSMCのマーカーである抗α-SMA抗体を用いた免疫染色によりVSMCが単離できたことを確認した。RT-PCR法を用いて単離VSMCにおけるGLUT8, 10, 12の発現を確認した。GLUT12のmRNA発現はGLUT10, 12と比較して少ないことが示唆された。

3. 2. マウスVSMCオルガネラにおけるGLUTsの局在

次いで、間接蛍光抗体法を用いて免疫染色を行った。その結果、GLUT8, 10, 12はVSMCに発現することが示されたが、GLUT12のシグナルは弱かった。クラスⅢのGLUTsについて、その局在が細胞種で小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア等異なることが報告されているため、VSMCでのGLUT8, 10, 12の局在を確認した。GLUT8, 10, 12特異的抗体と小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリアのマーカであるPDI, GM130, COX IVを用いて二重染色を行った(図2)。得られた画像から、ピアソンの相関係

数を算出した(図3)。その結果、GLUT8は、PDI, GM130, COX IVのいずれにおいてもほとんど共局在しておらず、ピアソンの相関係数は、COX IV : 0.22, GM130 : 0.25, PDI : 0.07であった。GLUT10は、PDIと多く共局在しており、COX IVともわずかに共局在していたがGM130とはほとんど共局在していなかった。ピアソンの相関係数は、COX IV : 0.29, GM130 : 0.16, PDI : 0.56であった。GLUT12は、PDIと多く共局在していた。Cox IVも部分的に共局在が観察されたが、GM130とはほとんど共局在していなかった。ピアソンの相関係数はCOX IV : 0.42, GM130 : 0.05, PDI : 0.61であった。

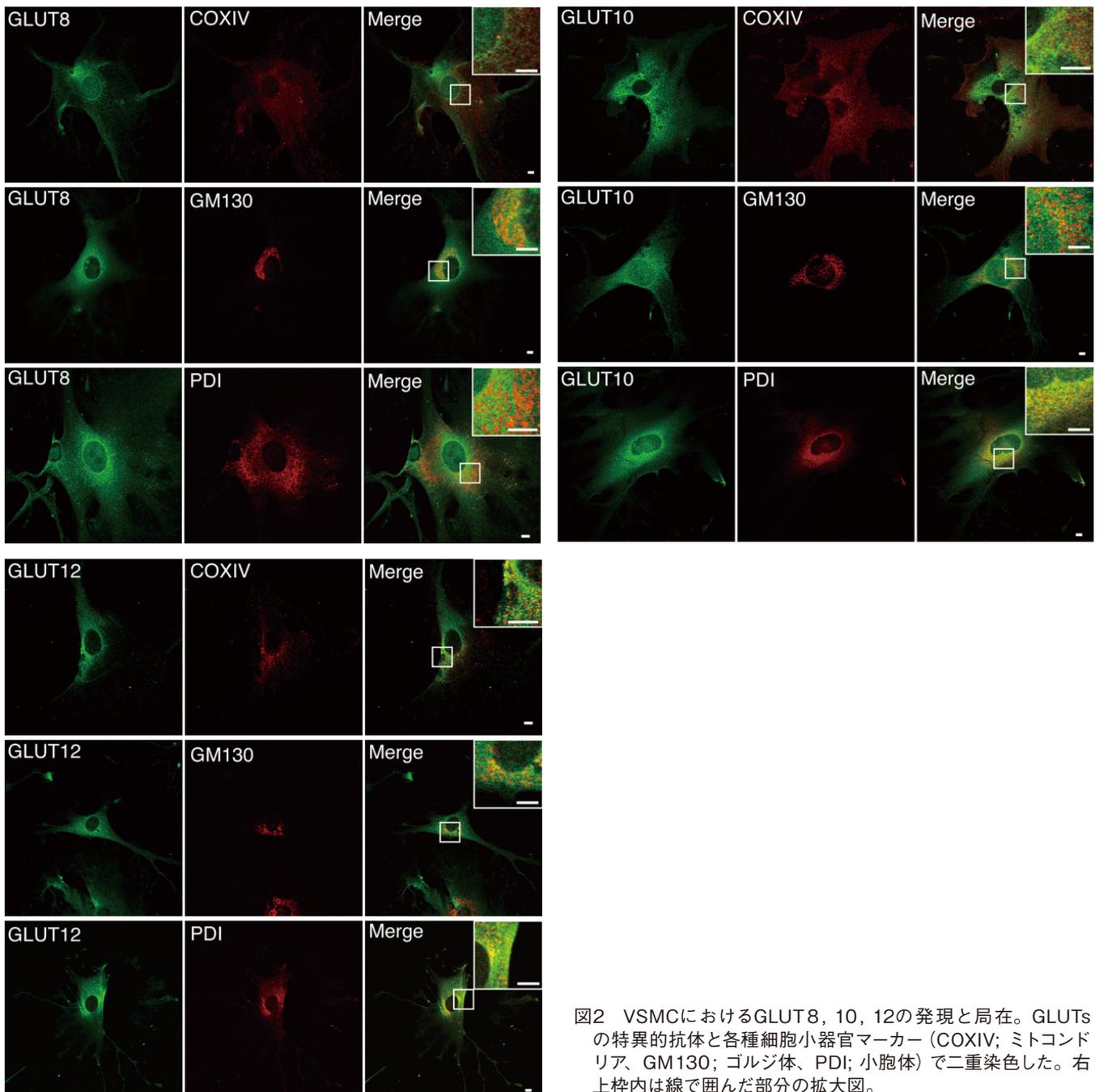


図2 VSMCにおけるGLUT8, 10, 12の発現と局在。GLUTsの特異的抗体と各種細胞小器官マーカー(COXIV; ミトコンドリア, GM130; ゴルジ体, PDI; 小胞体)で二重染色した。右上枠内は線で囲んだ部分の拡大図。

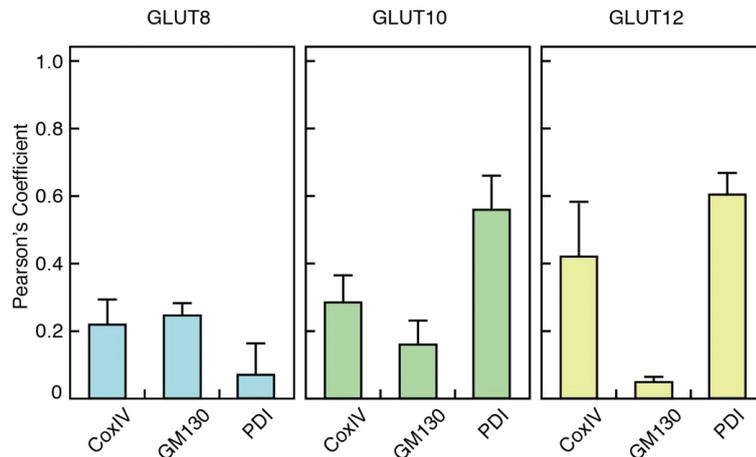


図3 VSMCをGLUT8, 10, 12特異的抗体と各種細胞小器官マーカー (COXIV; ミトコンドリア, GM130; ゴルジ体, PDI; 小胞体) で二重染色した写真から、Image Jを用いてピアソンの相関係数を算出し、グラフとして表示した。

3. 3. マウスVSMCのコラーゲン産生能の検討

VSMCにおけるコラーゲン産生能の変化について検討した。アスコルビン酸で5日間処理したVSMCでは、アスコルビン酸処理していない細胞に比べて培地中のコラーゲン量が増加していた。細胞内のコラーゲン量についても検討したところ、増加を確認した。ヒドロキシプロリン量やエラスチン量についても検討中である。

4. 考 察

本研究より、コラーゲン産生細胞であるVSMCにおいてGLUT8, 10, 12が発現していることが示された。GLUT8はVSMCにおいて、ゴルジ体、粗面小胞体、ミトコンドリアのいずれにおいてもほとんど局在していなかった。GLUT8は後期エンドソーム/リソソーム局在化モチーフを持ち、精巣の精母細胞、精子細胞においてリソソームに局在することが報告されている¹⁹⁾。VSMCにおいてもリソソームに局在する可能性が考えられる。GLUT12についても、VSMCではRT-PCR法、間接蛍光抗体法ともにシグナルは弱く発現量は少ないと考えられる。VSMCは動脈の中膜にて弾性線維の間に層状に存在し、血管の収縮・弛緩を担う細胞である。また、 α -アクチンを発現しており血管収縮としての機能をもつ収縮型(分化型)と、動脈硬化発症の引き金となる内膜肥厚を形成する合成型(増殖型)の2つの表現型をもつという特徴がある。GLUT12は合成型VSMCでは収縮型VSMCと比較して3倍近く発現量が多いことが報告されている²⁰⁾。病態や血管壁の状態によってはGLUT12が機能することが示唆される。GLUT10はVSMCにおいて発現し、小胞体とわずかにミトコンドリアに局在するが、ゴルジ体ではほとんど局在していなかった。一方で、VSMCにおいてGLUT10はミトコンドリアに局在し、過酸化水素処理による酸化ストレス

条件下や加齢条件下ではミトコンドリアに局在するGLUT10が増えることが報告されている²⁰⁾。このことから、GLUT10はDHAをミトコンドリア内に輸送することで、活性酸素に対して抗酸化作用を有するアスコルビン酸の量を増やすことが示唆されてきた。本研究では、GLUT10はミトコンドリアにわずかに局在していたが、本来は小胞体に局在するものと考えられる。

GLUT10, 12が小胞体によく発現すること、またGLUT12の発現が少ないことから、VSMCにおいて小胞体で機能するGLUTはGLUT10であることが示唆された。GLUT10はVSMC以外にも、ヒト線維芽細胞において小胞体に局在することが報告されている²¹⁾。ATSでは、血管系の症状以外にも皮膚や結合組織の弛緩が確認されている⁸⁾。以上のことから、GLUT10が普遍的に、VSMCや線維芽細胞の小胞体においてコラーゲン合成に関連していることが示唆される。しかし、実際にGLUT10のDHA輸送とヒドロキシプロリン量及びコラーゲン量について直接的に示したものはない。現在、GLUT10をノックダウンした細胞株においてDHA輸送能、コラーゲン及びヒドロキシプロリンの定量を検討している。

5. 総 括

線維芽細胞や血管平滑筋細胞が合成するコラーゲンは、皮膚や結合組織の弾性を保ち、人々の健康に寄与する重要なタンパク質である。コラーゲンやビタミンCが健康に重要な役割をもつということは周知の事実であり、ビタミンCがコラーゲン合成に寄与するメカニズムについても広く知られている。しかし一方で、摂取したビタミンCがコラーゲン合成の場へどのように運ばれるか、についてはまだ不明な点が多い。本研究は、コラーゲン合成に必須であるビタミンCを産生細胞の小胞体という、まさに合成の場へ

どのように輸送しているか、トランスポーターの観点から解明を目指すものである。本研究より、GLUT10がVSMCや線維芽細胞の小胞体においてコラーゲン合成に関連しているのではないかと示唆された。血管壁だけでなく、皮膚やその他結合組織でも同様にGLUT10がコラーゲン合成に関与すると考えられる。本研究がコスメトロジー分野において貢献できる可能性は極めて高いと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- Augustin, R. (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB life*, 62 (5), 315-333.
- Klepper, J. Glucose transporter deficiency syndrome (GLUT1DS) and the ketogenic diet. *Epilepsia*, 49, 46-49 (2008).
- Sharari, S., Abou-Alloul, M., Hussain, K., & Ahmad Khan, F. Fanconi-bickel syndrome: A review of the mechanisms that lead to dysglycaemia. *Int J Mol Sci*. 21 (17), 6286 (2020).
- Manolescu, A. R., Witkowska, K., Kinnaird, A., Cessford, T., & Cheeseman, C. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology*, 22 (4), 234-240 (2007).
- Bibert, S., Hess, S. K., Firsov, D., Thorens, B., Geering, K., Horisberger, J. D., & Bonny, O. Mouse GLUT9: evidences for a urate uniporter. *Am J Renal Physiol*. 297, F612-619 (2009).
- Dinour, D. *et al.* Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypouricemia. *J Am Soc Nephrol*. 21 (1), 64-72 (2010).
- Mueckler, M., & Thorens, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*. 34 (2-3), 121-138 (2013).
- Coucke, P. J. *et al.* Mutations in the facilitative glucose transporter GLUT10 alter angiogenesis and cause arterial tortuosity syndrome. *Nat Genet*. 38 (4) 452-457 (2006).
- Corpe, C. P., Eck, P., Wang, J., Al-Hasani, H., & Levine, M. Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. *J Biol Chem*. 288(13) 9092-9101 (2013).
- Ibberson, M., Uldry, M., & Thorens, B. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem*. 275 (7) 4607-4612 (2000).
- Stuart, C. A., Howell, M. E., Zhang, Y., & Yin, D. Insulin-stimulated translocation of glucose transporter (GLUT) 12 parallels that of GLUT4 in normal muscle. *J Clin Endocrinol Metab*. 94 (9) 3535-3542 (2009).
- Matsuo, S., Hiasa, M., & Omote, H. Functional characterization and tissue localization of the facilitative glucose transporter GLUT12. *J Biochem*. 168 (6) 611-620 (2020).
- Lee, Y. C., Huang, H. Y., Chang, C. J., Cheng, C. H., & Chen, Y. T. 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 (2010).
- Callewaert, B. L. *et al.* Absence of arterial phenotype in mice with homozygous slc2A10 missense substitutions. *Genesis*. 46 (8) 385-389 (2008).
- Cheng, C. H. *et al.* Mutations in the SLC2A10 gene cause arterial abnormalities in mice. *Cardiovasc Res*. 81 (2) 381-388 (2009).
- Gamberucci, A. *et al.* GLUT10—lacking in arterial tortuosity syndrome—is localized to the endoplasmic reticulum of human fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 18 (8) 1820 (2017).
- Uldry, M. *et al.* Identification of mammalian H⁺-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J*. 20 (16) 4467-4477 (2001).
- Di Daniel, E. *et al.* Evaluation of expression and function of the H⁺/myo-inositol transporter HMIT. *BMC Cell Biol*. 10 (1) 1-12 (2009)
- Diril, M. K. *et al.* Lysosomal localization of GLUT8 in the testis—the EXXXLL motif of GLUT8 is sufficient for its intracellular sorting via AP1-and AP2-mediated interaction. *FEBS J*. 276 (14) 3729-3743 (2009).
- Syu, Y. W., Lai, H. W., Jiang, C. L., Tsai, H. Y., Lin, C. C., & Lee, Y. C. GLUT10 maintains the integrity of major arteries through regulation of redox homeostasis and mitochondrial function. *Hum Mol Genet*. 27 (2) 307-321 (2018).
- Gamberucci, A. *et al.* GLUT10—lacking in arterial tortuosity syndrome—is localized to the endoplasmic reticulum of human fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 18 (8) 1820 (2017).

