

アダプタータンパク質 (PDZK1, Rab8) による消化管トランスポーターの機能・発現制御と薬物動態への影響

著者	杉浦 智子
著者別名	Sugiura, Tomoko
雑誌名	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査結果の要旨 / 金沢大学大学院自然科学研究科
巻	平成21年6月
ページ	373-378
発行年	2009-06-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/26963

氏名	杉浦 智子
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第1108号
学位授与の日付	平成21年3月23日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	アダプタータンパク質 (PDZK1, Rab8) による消化管トランスポーターの機能・発現制御と薬物動態への影響
論文審査委員 (主査)	加藤 将夫 (医薬保健研究域・教授)
論文審査委員 (副査)	玉井 郁巳 (医薬保健研究域・教授), 中西 義信 (医薬保健研究域・教授), 横井 毅 (医薬保健研究域・教授), 米田 幸雄 (医薬保健研究域・教授)

Gastrointestinal absorption of certain therapeutic agents is thought to be mediated by solute carrier (SLC) transporters, though minimal *in vivo* evidence has been reported. In this study, I demonstrate key roles of PDZ domain-containing protein, PDZK1, and a small GTP-binding protein, Rab8, as regulatory mechanisms of intestinal influx transporters by using *pdzkl* gene knockout (*pdzkl*^{-/-}) and *rab8* gene knockout (*rab8*^{-/-}) mice. Gastrointestinal absorption of cephalexin, a substrate of oligopeptide transporter PEPT1, after oral administration was delayed in *pdzkl*^{-/-} mice compared with wild-type mice. Absorption of carnitine, a substrate of carnitine/organic cation transporter OCTN2 was also decreased in *pdzkl*^{-/-} mice. Uptake of estrone sulfate, a substrate of organic anion transporting polypeptide OATP1A, from apical side was decreased in *pdzkl*^{-/-} mice. Immunohistochemical analysis revealed the localization of PEPT1, OCTN2 and OATP1A at apical membranes of small intestinal epithelial cells in wild-type mice, whereas such apical localization was reduced in *pdzkl*^{-/-} mice, with a concomitant decrease in their protein levels assessed by Western blotting in intestinal brush-border membranes. Similarly, PEPT1 and SGLT1 (sodium/glucose cotransporter) were mislocalized in *rab8*^{-/-} mice. Gastrointestinal absorption of their substrates (cefixime and α -methyl-d-glycopyranoside) was reduced in *rab8*^{-/-} mice. The present findings suggested that PDZK1 and Rab8 play fundamental roles in localization and/or intracellular sorting of influx transporters in mouse small intestine, thereby affecting intestinal absorption of their substrate drugs.

序論

消化管上皮細胞における薬物の生体膜透過は、医薬品の生物学的利用率 (bioavailability)、ひいては効果や副作用を決定する主な要因の一つである。近年の研究により、薬物を広範囲に認識して輸送するトランスポーター群が小腸上皮細胞に発現し、薬物の生体膜透過の一端を担っていると考えられている。

分子生物学的研究の進歩により、これらトランスポーターの輸送特性、細胞内局在などが明らかになる一方で、消化管トランスポーターの生理学的・薬物動態学的役割が *in vivo* で解明されている例は未だ少なく、遺伝子発現系でのデータと消化管でのトランスポーターの発現に基づく仮説が多い。特に、薬物の上皮細胞への取り込みに関与するトランスポーターについては *in vivo* での報告がほとんどない。これまで当研究室では、トランスポーターの局在および機能調節因子の候補として分子内に PDZ domain を持つタンパク質 (PDZ タンパク質) に注目し、腎臓や小腸の刷子縁膜に発現する薬物トランスポーター群と特異的に相互作用すること、および複数の取り込みトランスポーター (カルニチン/有機カチオントランスポーター-OCTN2, ペプチドトランスポーター-PEPT2) の基質輸送能を促進することを報告した。

同様に、トランスポーターの細胞内小胞輸送に関与するタンパク質として低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab ファミリーが知られており、中でも Rab8 は trans-Golgi network から細胞膜への小胞輸送に関与することが報告されている。*rab8* 遺伝子を欠損した生後3週齢のマウスの小腸上皮細胞において、PEPT1 および SGLT1 の刷子縁膜から細胞内への内在化が起こり、Rab8 がこれら刷子縁膜トランスポーター (PEPT1, SGLT1) の局在を支配することが *in vivo* で示された。また、*rab8*^{-/-} マウスではそれぞれのトランスポーターの基質である glycy sarcosine (GlySar) と α -methyl-d-glycopyranoside (α -MDG) の小腸取り込みが細胞間隙マーカーである mannitol と同程度まで低下した。*rab8*^{-/-} マウスは離乳期を過ぎた3週齢以降に致死であり、*rab8* 欠損に伴う PEPT1 および SGLT1 等の mislocalization によるこれらトランスポーターを介した栄養物の吸収不全が、その主な要因であると考えられる。一方、ヒト栄養吸収障害性疾患においても Rab8 の発現が低下している。

そこで本研究では、複数のトランスポーターの機能・発現制御に働くと考えられるアダプター分子 PDZK1 および細胞内局在制御分子 Rab8 の薬物動態学的役割を解明するとともに、これらアダプター分子によって制御されるトランスポーターによる薬物の消化管吸収を *in vivo* で実証することを試みた。

PDZK1 の消化管吸収トランスポーター機能調節による薬物動態への影響

PEPT1 は様々な薬物の消化管吸収に関与すると考えられており、特に β ラクタム抗生物質の一つである cefadroxil の消化管吸収と小腸における PEPT1 の発現量とが相関することから、少なくとも数種の β ラクタム抗生物質は小腸刷子縁膜に発現する PEPT1 を介して吸収されることが考えられてきた。しかしながら、*in vivo* における PEPT1 の発現・機能制御に関する報告は乏しい。そこで、複数のトランスポーターの機能・発現制御に働く PDZK1 に着目し、*pdzk1* 遺伝子欠損

(*pdzkl*^{-/-}) マウスを用いた薬物の体内動態解析を行った。*pdzkl*^{-/-}マウスおよび野生型マウスに PEPT1 の基質である cephalexin を静脈内または経口投与し、血漿中濃度推移を比較した。静脈内投与後の血漿中濃度推移は両マウスではほぼ同様であったのに対し、経口投与後の血漿中濃度は *pdzkl*^{-/-}マウスにおいて野生型マウスよりも有意に低い値を示した。Cephalexin を含むβラクタム抗生物質が PEPT1 の基質であることを考慮すると、以上の結果は PDZK1 が PEPT1 の機能制御機構として働く結果である可能性が考えられたため、小腸管腔側からの膜透過過程を検討する目的で、単離小腸組織を用いた反転腸管法により、PEPT1 の典型的基質である [³H]glycylsarcosine (GlySar) の取り込みを検討した。*pdzkl*^{-/-}マウスにおける小腸管腔側から組織内への [³H]GlySar の取り込みは野生型マウスと比較して有意に低く、PEPT1 を介した刷子縁膜からの膜透過過程の低下が cephalexin 経口投与後の消化管吸収低下の要因であると考えられた。また、小腸組織を用いた免疫組織染色法により、PEPT1 の発現・局在を比較したところ、*pdzkl*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べ、小腸刷子縁膜微絨毛における PEPT1 のシグナルが顕著に弱く、細胞内の小胞部分に PEPT1 の弱いシグナルが観察された。したがって、土台タンパク質である PDZK1 の欠損により、PEPT1 が小腸刷子縁膜表面で安定に発現できなくなり、細胞内小胞へと移行した可能性がある。したがって、マウス小腸組織において PDZK1 が PEPT1 の局在を制御し、PEPT1 の基質の消化管吸収に関与することが示唆された。PEPT1 は H⁺を駆動力とするトランスポーターであるが、その駆動力の供給には小腸刷子縁膜に発現する NHE (sodium/proton exchanger) 3 が少なくとも一部関与すると考えられており、NHE3 が PDZK1 による制御を受けること、NHE3 が PEPT1 による輸送機能に影響することが示唆されている。このようなトランスポーター間の機能的相互作用の繋ぎ役として、PDZ タンパク質が関与する可能性もある。

一方、当研究室ではこれまで HEK293 細胞共発現系を用いた検討により、PDZK1 が OCTN2 と相互作用し、OCTN2 を介した [³H]carnitine 輸送能を 6 倍上昇させることを *in vitro* で示してきた。そこで、本研究では *in vivo* 生体組織内における PDZK1 と OCTN2 の相互作用を、マウス小腸粘膜を用いた免疫沈降法により明らかにした。また、*pdzkl*^{-/-}マウスおよび野生型マウスを用いて [³H]carnitine の体内動態解析を行ったところ、静脈内投与後の血中濃度推移には両マウス間に有意な差はなかったが、経口投与後の血中濃度推移は *pdzkl*^{-/-}マウスで有意に低下した。Carnitine は生体内で代謝され acylcarnitine 等に変換されることから、代謝の要因を排除するために [³H]carnitine 経口投与後 30 分での消化管腔内の残存量を測定した。消化管残存量から求めた [³H]carnitine の消化管吸収率は、野生型マウスが 57.4 ± 8.4% であるのに対し、*pdzkl*^{-/-}マウスでは 35.1 ± 6.8% と有意に低い値を示した。この消化管吸収率の低下の要因として、小腸組織における

膜透過性が低下した可能性がある。そこで、反転腸管を用い $[^3\text{H}]$ carnitine の管腔側からの取り込みを測定したところ、*pdzkl^{-/-}*マウスの小腸上部および中部において、野生型マウスに比べ取り込みが低かった。以前の、OCTN2 機能欠損マウスである *jvs* マウスを用いた検討により、carnitine のマウス小腸管腔側からの取り込みは主に OCTN2 を介することが示されていることから、免疫組織染色法により *pdzkl^{-/-}*および野生型マウスの小腸組織における OCTN2 の発現・局在解析を行った。*pdzkl^{-/-}*マウスでは PEPT1 と同様に小腸刷子縁膜上の OCTN2 の染色シグナルが顕著に弱く、小腸刷子縁膜小胞を用いた Western blotting においても OCTN2 のタンパク発現量が *pdzkl^{-/-}*マウスで減少していた。以上より、*pdzkl^{-/-}*マウスでは小腸吸収上皮細胞刷子縁膜での OCTN2 の発現が顕著に減少していることが示され、PDZK1 の欠損は小腸における OCTN2 の発現量低下を引き起こし、このことが基質である carnitine の消化管吸収低下の要因であると推察された。

さらに、yeast two-hybrid 法により PDZK1 と相互作用することを示してきた OATP1A に関しても同様に、マウス小腸組織を用いた免疫沈降法により PDZK1 と OATP1A が小腸組織で相互作用することを明らかとした。免疫組織染色を行ったところ、*pdzkl^{-/-}*マウスにおいて小腸刷子縁膜上での OATP1A の発現シグナルが顕著に弱く、小腸刷子縁膜小胞を用いた Western blotting においても OATP1A のタンパク発現量が *pdzkl^{-/-}*マウスで減少していた。また、Ussing-type Chamber 法において、OATP1A の基質である $[^3\text{H}]$ estrone sulfate の小腸上部における管腔側からの取り込みは、野生型マウスに比べ、*pdzkl^{-/-}*マウスで有意に低い値を示した。したがって、PDZK1 はマウス小腸刷子縁膜において PEPT1 や OCTN2 だけでなく OATP1A の発現も制御しており、OATP1A の基質となる薬物の消化管吸収にも関与する可能性がある。

以上より、少なくとも数種類の薬物群の消化管吸収が、アダプター分子 PDZK1 によって制御されたトランスポーターによって支配されることが示された。

Rab8 の消化管吸収トランスポーター局在制御による薬物動態への影響

小腸に発現するトランスポーター群は薬物の吸収に働くだけでなく、生理的な役割として食物由来の栄養物の吸収を担う。摂取された種々の栄養物は小腸管腔内で各種酵素によりジ・トリペプチドにまで加水分解され、PEPT1 を介して吸収される。糖においても小腸に発現するグルコーストランスポーター SGLT1 などを介して上皮細胞内へ取り込まれることが知られている。そこで、これらトランスポーターの小腸刷子縁膜上での局在制御に関与する Rab8 の遺伝子欠損マウス(*rab8^{-/-}*)を一つのツールとして用いることにより、これらトランスポーターの消化管吸収に対する役割を *in vivo* で実証することを試みた。*rab8^{-/-}*マウスで

は PEPT1 や SGLT1 の小腸吸収上皮細胞刷子縁膜での発現が大きく低下し、細胞内に局在することが示されている。本研究では、これらトランスポーターの基質である cefixime および α -methyl-d-glycopyranoside (α -MDG) を経口投与し、投与後の血漿中濃度が野生型マウスに比べ、*rab8*^{-/-} マウスで有意に低いことを明らかとした。小腸単離組織を用いた反転腸管法において、*rab8*^{-/-} マウスにおける cefixime の小腸管腔側から組織内への取り込みは、細胞間隙マーカである mannitol とほぼ同等であり、野生型マウスで観察された飽和性の取り込みも *rab8*^{-/-} マウスでは観察されなかった。また PEPT1 は H⁺ を駆動力とすることから、cefixime の小腸組織への取り込みに対する pH 依存性を検討した。野生型マウスでは管腔側が酸性環境のときに高い取り込みを示した一方で、*rab8*^{-/-} マウスでは検討したすべての pH で mannitol とほぼ同等の値であった。したがって、*rab8*^{-/-} マウスにおいては、PEPT1 の mislocalization により、小腸刷子縁膜における PEPT1 を介した cefixime の膜透過性が低下し、cefixime 経口投与後の消化管吸収性が低下すると考えられる。以上より、Rab8 は少なくとも 2 種類のトランスポーター (PEPT1, SGLT1) の小腸吸収上皮細胞における細胞内局在を制御することにより、これらトランスポーターの基質の消化管吸収に関与することを *in vivo* で明らかとした。

結論

本研究では、*pdzkl*^{-/-} マウスにおいて PDZK1 と相互作用する複数のトランスポーター (PEPT1, OCTN2, OATP1A) の小腸における発現が低下し、これらトランスポーターの基質の消化管吸収を低下させること、および *rab8*^{-/-} マウスにおいても PEPT1 および SGLT1 の mislocalization による基質の消化管吸収の低下が明らかとなった。これまで、PEPT1 が β -ラクタム抗生物質の他に、ACE 阻害剤、抗癌剤のベスタチンなどの様々な薬物の消化管吸収に関与する重要なトランスポーターであることが示唆されている一方で、小腸に発現する PEPT1 がこれら薬物の吸収に関与することを *in vivo* で立証した例は乏しい。本研究では、*pdzkl*^{-/-} マウスや *rab8*^{-/-} マウスを用いることにより、これらのトランスポーターが栄養物・薬物の消化管吸収に関与することを *in vivo* で示唆することができ、これらマウスを用いたさらなる薬物動態解析によって、未同定の吸収トランスポーターの解明にもつながるかもしれない。

本研究結果より、細胞膜に発現する複数のトランスポーターが、他のタンパク質と物理的および機能的に相互作用することで、複合体を形成し、細胞膜表面での安定した発現や、効率の良い輸送が行われるよう、複雑な細胞内ネットワークを形成していることが推測される。このような分子複合体の存在や機能の探究は、これまで機能分子であるトランスポーター単独では説明できなかつ

た輸送メカニズムの解明につながり、特に、細胞膜近傍でのタンパク質間相互作用は、輸送活性制御、多量体形成、代謝や細胞内情報伝達との連関、トラフィッキングやターゲティング、細胞内輸送などの点で新しい知見を得ることにつながるものと思われる。

学位論文審査結果の要旨

トランスポーターは薬物の吸収、分布、排泄等に重要な役割を果たすタンパク質であるが、それらと直接結合する制御因子は不明であった。本研究は、薬物動態に関わる SLC (solute carrier) トランスポーターと直接結合することが金沢大学で見いだされた膜裏打ちタンパク質 PDZK1 の、消化管吸収トランスポーター制御因子としての役割を、以下の2つの知見から実証した。(i) PDZK1 が3種類の吸収トランスポーター PEPT2、OCTN1、OCTN2 と相互作用し、それらの輸送活性を増大させる働きを持つとともに、PDZK1 の変異がトランスポーターの機能や局在に影響を及ぼすこと、(ii) PDZK1 が小腸組織において複数の吸収トランスポーター (PEPT1、OCTN2、OATP1A) と結合するとともに、PDZK1 の遺伝子欠損マウスにおいてこれらトランスポーターの刷子縁膜からの消失と典型的基質の消化管吸収ないし刷子縁膜からの取り込みが低下すること。また本研究は、吸収トランスポーター (PEPT1、SGLT1) の刷子縁膜へのソート機構である低分子GTP結合タンパク質 Rab8 の役割にも着目し、(iii) Rab8 の遺伝子欠損マウスにおいて、これらトランスポーターの基質であるβラクタム抗生物質 cefixime と α-methyl-D-glucose の消化管吸収が低下することを見いだした。本研究は複数の消化管吸収トランスポーターと相互作用するアダプタータンパク質群の生体内での制御因子としての役割を *in vivo* で実証した点で、新規性の高い研究であるとともに、創薬ならびに薬物治療における消化管吸収を考える上での有益な知見をもたらすと考えられる。以上により、審査委員会は本論文が博士(薬学)に値すると判定した。