

Molecular Identification and Functional Characterization of Multifunctional Transpoters

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16269

氏名	内野裕史
生年月日	
本籍	静岡県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第330号
学位授与の日付	平成12年3月22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	Molecular Identification and Functional Characterization of Multifunctional Transporters (多機能性を持つトランスポーターの分子論的解明と機能解析)
論文審査委員(主査)	辻 彰(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	大熊 勝治(研究科・教授) 米田 幸雄(薬学部・教授) 玉井 郁巳(研究科・助教授) 宮本 謙一(医病院・教授)

学位論文要旨

Transporters often play an important role in the intestinal absorption, tissue distribution, elimination and reabsorption of nutrients. A lot of transporters are identified on molecular level in the last decade. The purpose of this study was to reveal the nature of multifunctional transporters using molecular cloning and functional characterization. I identified a novel cDNA that encodes the amino acid transporter LAT1. LAT1 transports bulky and branched amino acids and drugs. Interestingly, the transporter requires the helper factor 4F2hc for full expression. Mouse and human Na⁺/Pi cotransporter Npt1, which was identified as inorganic phosphate transporter at renal epithelial brush-border membrane, mediated the transport of organic anions such as β-lactam antibiotics and *p*-aminohippurate. BNP1, which transports inorganic phosphate in glutaminergic neurons in brain, was proved to transport excitatory amino acids such as glutamic acid and aspartic acid. The findings of functional characterization of these transporters (NPT1 and BNP1) supported the idea that these transporters have two independent functions. In conclusion, present results facilitate understanding of transporter nature in molecular level.

トランスポーターは本来糖やアミノ酸などの栄養物質とその代謝産物を効率よく細胞内外へと輸送することで、生命維持に重要な役割を果たしている。これらトランスポーターがその栄養物質と構造が類似した薬物も輸送し、薬物の体内動態に寄与することが知られている。近年、トランスポーターの分子実体は解明されつつあり、各臓器レベルでの輸

送を説明するような発見が数多くなされている。しかし、これまでに発見されたトランスポーターはそのクローニング方法から、単一の分子の発現によりその機能が発揮され輸送活性を示すものばかりで、遺伝子発現のために何らかの補助因子が必要になるような例はこれまで見つかっていない。また、既に機能が見い出されているトランスポーターであっても、他に生理学的な役割を担っている可能性がある。このように新しい遺伝子の分子クローニングやトランスポーターの多機能性に関して詳細に検討が進めば、生理学的あるいは薬効動態学的にも重要な知見を得られる。

そこで本研究では、アミノ酸トランスポーター並びにリン酸トランスポーターを研究対象とし、その遺伝子クローニング、組織分布および輸送機能の解析を行うことにより、トランスポーターの機能発現機構や多機能性などについて考察をし、トランスポーターの分子レベルでの理解を深めることにした。

1. アミノ酸輸送系 L の遺伝子クローニング

生体の栄養源として重要な物質にアミノ酸がある。これまでアミノ酸輸送についてはその生体内での重要性にも関わらず、分子レベルでの実体はあまり明らかにされていない。アミノ酸輸送系は組織や細胞系を用いて分類され、多種の輸送系が存在することが示唆されている。そのひとつに輸送系 L がある。輸送系 L は leucine、phenylalanine のような側鎖の大きなアミノ酸を輸送する。本輸送系は母体から胎児へ栄養物質としてのアミノ酸を運ぶ胎盤での輸送や、神経伝達物質の前駆物質を運ぶ血液脳関門での輸送など生体内で重要な役割を持つ。さらに本輸送系は広い基質認識特異性をもつため、構造が類似したいくつかの薬物を輸送することから薬物治療学上の重要性も指摘されている。このような重要性をもつ輸送系 L は世界中から注目され、その分子の実体の解明が待たれていた。本研究では輸送系 L の分子的な実体を解明するため、本トランスポーター遺伝子の単離を試みた。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現クローニングを試みた結果、輸送系 L として機能するタンパク質(LAT1)の cDNA を単離することに世界で初めて成功した。LAT1 の組織分布は胎盤、脳、脾臓などに多く分布し、大腸や精巣でも検出された。また、この LAT1 は単独では機能的な発現をせず、輸送機能発現には補助因子として 4F2 heavy chain (4F2hc)が必要であることを示した。発現に補助因子を必要とするトランスポーター同定研究は初めての例である。今回単離した LAT1 により leucine や phenylalanine などのアミノ酸の他に甲状腺ホルモンである triiodothyronine や L-dopa、gabapentin などのアミノ酸類似薬物を輸送することを示すことができた。さらに LAT1 の代表的な基質の一つである phenylalanine とその誘導体を用い、輸送活性を指標にして LAT1 の基質選択性を解析した結果、基質となる必要条件として α -アミノ基、 α -カルボキシル基、さらにアミノ酸側鎖の脂溶性が重要であることが示された。上記の知見は輸送系 L を利用したドラッグデリバリー法の確立に有用であ

る。

以上の結果より、アミノ酸輸送系Lの分子の実体を初めて明らかにし、4F2hc が LAT1 の機能発現に関わるを初めて明らかにした。

2. リン酸トランスポーター Npt1 の有機アニオン輸送と薬物の腎排泄

当研究室では、これまでに遊離肝細胞あるいは腎近位尿細管上皮細胞刷子縁膜小胞などを用いたβ-ラクタム抗生物質の肝・腎移行研究成果から、肝実質細胞の血管側膜上および腎近位尿細管の管腔側における担体輸送系の関与を示唆してきた。本輸送系は、β-ラクタム抗生物質などのアニオン性薬物の腎排泄機構を理解する上で重要であるが、未だその実体は明らかではなかった。

本研究では、最近、有機アニオン輸送活性を有することが確認された腎臓型 Type I リン酸トランスポーター、ウサギ NaPi-1 に着目し、そのホモログであるマウス Npt1 およびヒト NPT1 を腎臓よりクローニングし、腎臓におけるβ-ラクタム抗生物質をはじめとするさまざまな有機アニオン性化合物の輸送特性を検討し、それらの腎排泄機構を検証した。

マウス Npt1 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、腎臓で比較的代謝を受けず、尿中排泄率の高いβ-ラクタム抗生物質 faropenem の輸送について検討を行った。 [¹⁴C]Faropenem 輸送の検討結果より、その取り込みは飽和性を示し、Km 値として 0.80 mM が得られた。Npt1 による [¹⁴C]faropenem 輸送は、細胞外緩衝液中の塩素イオンにより阻害を受け、その IC₅₀ 値は約 25mM であった。

またマウス Npt1 による [¹⁴C]faropenem 輸送活性は他のβ-ラクタム抗生物質および probenecid など有機アニオン性化合物により有意に阻害を受けた。Npt1 による種々の有機アニオン性化合物の輸送を検討した結果、 [¹⁴C]benzylpenicillin, [¹⁴C]foscamet などいくつかの有機アニオン性薬物の取り込みを促進した。Npt1 を介した faropenem の輸送は細胞への取り込み方向以外にも、細胞からの排出方向にも有意に観察された。これまでに免疫組織学的な検討結果より Npt1 は腎尿細管刷子縁膜側に局在することがわかっており、以上の結果から、Npt1 によるβ-ラクタム抗生物質の輸送は腎において近位尿細管細胞から尿細管管腔内への分泌に寄与していることが強く推察された。

一方、マウス Npt1 及びヒト NPT1 を介した有機アニオン輸送系について検討をするため、代表的な有機アニオン性化合物、パラアミノ馬尿酸 (PAH) の輸送解析を行った。その結果、マウス Npt1 及びヒト NPT1 は放射線標識した [³H]PAH を効率よく輸送し、その Km 値はそれぞれ 5.4、2.3 mM であった。ヒト NPT1 はマウス Npt1 と同様に基質輸送には塩素イオンによる感受性があり、塩素イオンが低濃度の時その輸送は促進された。

また [³H]PAH の輸送はβ-ラクタム以外にも有機アニオン性化合物である indomethacin などにより強い阻害が観察された。また、ヒト NPT1 による種々の化合物に輸送について

検討したところ、 β ラクタム抗生物質以外にも尿酸やエストラジオールのグルクロン酸抱合体などがヒト NPT1 の基質として受け入れることがわかった。腎近位尿細管管腔側での有機アニオン輸送はこれまでに組織レベルや膜レベルで検討がされており、NPT1 を介した膜輸送は K_m 値や塩素イオン感受性などの点でこれまで報告されてきた輸送系と類似していた。

以上の解析を通して、これまでリン酸トランスポーターとして同定されてきた NPT1 がそのリン酸輸送機構とは別に新たに有機アニオン輸送系として働きうることを示した。さらにその機構もリン酸輸送系とは異なる経路で行われていることが示唆された。このような例は今まで発見されておらず、新しい概念を提唱するものである。

3. BNP1 を介したグルタミン酸輸送解析

グルタミン酸は栄養物質としてだけでなく神経細胞においては神経伝達物質としての役割を果たす。神経終末ではグルタミン酸はシナプス顆粒に蓄えられ、刺激によりエキソサイトーシスにより細胞外へと放出される。放出されたグルタミン酸はシナプス後膜に存在するグルタミン酸レセプターに結合しシグナルを伝達したあと、速やかにグルタミン酸トランスポーターにより細胞間液中から排除される。このグルタミン酸によるシナプス伝達過程の中で未だに解明されていないのが、シナプス小胞へのグルタミン酸蓄積に働くトランスポーターの分子の実体である。

今回、注目した分子は有機アニオン性化合物の輸送を介在するトランスポーター NPT1 と約 30% の相同性を有する BNP1 である。1994 年に BNP1 はリン酸トランスポーターとして同定された。BNP1 は脳に特異的に発現し、中でもグルタミン酸作動性ニューロンに多く存在することがわかっている。免疫組織学的な手法による解明から、神経終末のシナプス顆粒に存在しすることが明らかになっている。このような限られた場所のみ存在する BNP1 がリン酸の細胞内への取り込み過程に寄与することは考えにくい。そこで本研究では輸送機能としてさらにほかの基質を輸送するのではないかと考え、シナプス小胞に蓄えられるグルタミン酸が BNP1 の基質となりうるのか調べることにした。

ラット脳より RT-PCR 法により単離した BNP1 全長を HEK293 細胞を用いた遺伝子発現系で発現させ、細胞への取り込み活性を検討した。BNP1 を介した無機リン酸 $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ の取り込みは時間依存的に観察され、かつ、 ^3H グルタミン酸の取り込みも観察された。 ^3H グルタミン酸の取り込みは時間依存的かつ濃度依存的に観察され、その親和性を示す K_m 値は 2.0 mM であった。興味深いことにグルタミン酸輸送はナトリウムイオンや塩素イオンに感受性を示した。ナトリウムイオン非存在下ではその取り込みは約 20% にまで下がるが、生理的な細胞内ナトリウムイオン濃度は約 15 mM と考えられ、BNP1 は生理的な条件下では約 50% の取り込み速度を維持していることが推察された。

BNP1 の基質選択性を明らかにするため、 $[^3\text{H}]$ グルタミン酸取り込みに対し様々な化合物による阻害実験を行った。その結果、L-グルタミン酸、L-及び D-アスパラギン酸により強い阻害効果が観察された。また、過剰量の非標識体無機リン酸やリン酸トランスポーターの阻害剤は $[^3\text{H}]$ グルタミン酸の取り込みに阻害効果を持たないことから、その輸送機構が異なることが推察された。さらに、阻害効果の強かったアミノ酸 (glutamic acid, aspartic acid) の放射標識体を BNP1 は基質として受け入れることがわかった。これらはいずれもグルタミン酸レセプターのアゴニストとして知られ、この BNP1 は神経伝達に関わることがうかがわれた。

以上の結果より、リン酸トランスポーターとして同定されていた BNP1 はグルタミン酸を含む酸性アミノ酸を輸送するという多機能性を有することが初めて明らかになった。本トランスポーターの神経伝達への関わりは直接的に実証できていないが、組織分布やグルタミン酸輸送機能などの情報から考えて、この BNP1 のグルタミン酸輸送機能の解明はグルタミン酸の脳内での働きとその制御を考える上で重要な知見を与えるものと思われる。

結論

本研究では、まず、アミノ酸輸送系 L のトランスポーター LAT1 の遺伝子クローニングを世界で初めて成功した。このトランスポーターはそれ自身では機能発現せず、補助タンパクである 4F2hc との共発現で初めて機能が発揮されることが示された。このようなトランスポーターはこれまで見つかっておらず、初めて明らかにされたタイプである。この発見をきっかけに、この遺伝子の相同性をもとに世界中でアミノ酸トランスポーターの遺伝子クローニングが進み、1999 年 12 月の時点で 4F2hc と共役するトランスポーターは少なくとも 6 種類見出されている。LAT1 の発見は幅広いアミノ酸トランスポーターの分子論的な解明に寄与した。

さらに、これまでに発見・同定されてきたトランスポーターである NPT1 や BNP1 は腎臓あるいは脳に特異的に発現し、無機リン酸を輸送することが明らかになっていた。NPT1 については腎臓で β ラクタム抗生物質を含む有機アニオン性化合物の排泄機構に働く可能性を示し、また BNP1 に関しては脳神経においてグルタミン酸輸送に関わる可能性を示した。以上の結果からトランスポーター NPT1 及び BNP1 がリン酸輸送以外に第 2 の機能があることを提唱した。このように 1 つのトランスポーターが 2 つの異なる機能を持つ例はこれまで報告されていない。

本研究の成果はこれまでの概念を変え、トランスポーターの分子レベルでの実体解明と機能の理解に結びつくものとする。

学位論文審査結果の要旨

当該論文に対する個別審査後、平成12年2月1日の口頭発表における質疑応答の結果を踏まえ、協議の結果、次の通り判定した。

近年、糖やアミノ酸など栄養物や生体外異物としての薬物を細胞の内外に輸送するトランスポーター群がクローニングされ、それらの分子の実体と生理的役割が解明されつつある。しかし、トランスポーター遺伝子発現において補助因子が必要であるかどうか、一つのトランスポーターが複数の異なる輸送機能を有しているかどうか、については不明な点が多い。そこで本研究では、アミノ酸トランスポーター及びリン酸トランスポーターを対象として、その遺伝子クローニング、組織分布および輸送機能の解析を行うことにより、トランスポーターの機能発現機構と多機能性について、以下に示す新規な知見を得た。

- ① 比較的分子量の大きな中性アミノ酸を認識・輸送するトランスポーターの分子の実体が不明であったが、ラットC6グリオーマ細胞より輸送系Lとして機能するタンパク質(LAT1)のcDNAを単離することに世界で初めて成功した。また、LAT1が中性アミノ酸やアミノ酸様薬物の輸送機能発現において補助因子4F2hcが必要であることを初めて明らかにした。
- ② リン酸トランスポーターNPT1はナトリウム依存的にリン酸を輸送すると同時に、マウス及びヒトNPT1はパラアミノ馬尿酸や β -ラクタム抗生物質のファロペネムなど有機アニオンをナトリウム非依存的に輸送することを実証した。同じくラット脳より単離したリン酸トランスポーターBNP1は、リン酸の他に、グルタミン酸を含む酸性アミノ酸をナトリウム及びクロライド依存的に輸送することを明らかにした。以上の結果より、単一のトランスポーターが複数の基質を異なる機構で輸送することが実証された。

以上の研究成果は、トランスポーターの分子の実体及び生体内での薬物輸送との関わりを明らかにする上で重要な知見を与えるものであり、博士(薬学)論文に値すると認める。