

氏 名	ます だ さと ひろ 増 田 智 先
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 413 号
学位授与の日付	平成 10 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬品作用制御システム専攻
学位論文題目	腎局在性有機アニオントランスポータ OAT-K1 及び OAT-K2 の構造 ・機能に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教授 乾 賢 一 教授 橋田 充 教授 川 寄 敏 祐
--------	--------------------------------------

論 文 内 容 の 要 旨

生体に投与された薬物は、吸収・分布・代謝・排泄といった諸過程を経て最終的に体外へ排泄される。特に肝臓と腎臓は、異物処理を担う主要臓器として解毒における中心的な役割を果たしている。近年、肝臓に発現している有機アニオントランスポータの cDNA が次々とクローニングされ、アニオン性薬物の肝胆系移行に関する分子的解明が進展しつつある。一方腎尿細管上皮細胞には、アニオン性薬物の腎指向性を制御する有機アニオントランスポータが複数種存在しており、薬物や生体異物の解毒機構として機能していることが示唆されてきたが、トランスポータ自身を単一分子レベルで把握、解析した報告は皆無に等しい。そこで著者は、ラット肝由来 Na^+ 非依存性有機アニオントランスポータ *oatp* (organic anion transporting polypeptide) の類縁遺伝子が腎にも発現していることに着目し、polymerase chain reaction (PCR) 法を応用して、腎特異的な有機アニオントランスポータの cDNA クローニングを試み、それに基づく構造・臓器分布・機能特性について系統的な解析を行い以下の新知見を得た。

I. ラット腎局在性有機アニオントランスポータ OAT-K1 の cDNA クローニングと構造・組織分布・細胞膜発現

肝 *oatp* のアミノ酸配列を参考にして degenerate プライマーを合成し、ラット腎ポリ(A)⁺RNA を用いて逆転写 PCR を行った。*oatp* と相同性を示した PCR 断片を用いて、ラット腎 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、翻訳領域には *oatp* と 72% の相同性を示す新規有機アニオントランスポータ OAT-K1 をコードする完全長 cDNA が単離された。ノーザンブロットイング及び単離ネフロン分節を用いた PCR 解析によって、OAT-K1 mRNA は腎のみに発現しており、特に尿細管分節の近位直尿細管に強く発現していた。また、特異抗体を作成してウエスタンブロットイングを行ったところ、OAT-K1 タンパクは mRNA と同様腎のみに発現すること、管腔側刷子縁膜に局在することが示された。

II. OAT-K1 の機能

先ず卵母細胞発現系を用い、OAT-K1 の薬物輸送活性について評価した。*in vitro* 合成 OAT-K1 mRNA を卵母細胞に注入し、種々のアニオン性薬物を用いて輸送実験を行ったところ、メトトレキセート (MTX)、葉酸の顕著な取り込み上昇が認められた。さらに OAT-K1 発現卵母細胞において、速やかな MTX 排出活性が観察された。次にブタ腎由来培養細胞 LLC-PK₁ を用い構築した OAT-K1 安定発現系は、卵母細胞発現系と同様に MTX を特異的に輸送すること、この輸送は細胞外 Na^+ 、 Cl^- に非依存性であることが示された。また機能解析の結果から、OAT-K1 は LLC-PK₁ 細胞の側底膜に発現することが示唆された。さらに特異抗体を用いた解析より、OAT-K1 は、その推定分子量に対応する約 70kDa のタンパクとして発現することが確認された。一方、イヌ腎由来上皮細胞 MDCK を用いて OAT-K1 発現細胞を作成したところ、OAT-K1 は約 50kDa の小分子型として発現していること、機能解析より頂側膜 (刷子縁膜に相当) 側に発現することが示された。これらの結果から OAT-K1 は、LLC-PK₁ 細胞には存在しないがラット腎及び MDCK 細胞に備わる翻訳

後修飾機構によって小分子化された後、頂側膜側に発現することが推察された。

また、MTX療法における相互作用として、非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）を併用した場合血中MTX濃度が上昇し、重篤な副作用の発現した症例が報告されている。そこでOAT-K1を介したMTX輸送に対するNSAIDの影響について、薬物相互作用の機構解明の観点から検討したところ、OAT-K1を介したMTX輸送に対してNSAIDは強い拮抗阻害を示した。

以上、OAT-K1はMTXを認識するトランスポーターであること、取り込み並びに排出という両方向性の輸送能を有することが明らかとなった。またOAT-K1の膜局在化機構には、翻訳後に小分子化修飾過程が介在すること、さらにOAT-K1は、MTXとNSAIDとの相互作用発現部位の一つとして関与することが示唆された。

Ⅲ. 広範な基質認識を示す腎局在性有機アニオントランスポーター OAT-K2 の cDNA クローニングと構造・組織分布及び機能解析

腎には、OAT-K1の類縁タンパクを含む未知の有機アニオントランスポーター群が発現しており、広範なアニオン性薬物の腎移行並びに尿管分泌のネットワークを形成していると考えられる。I.と同様にしてラット腎 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、得られた cDNA の翻訳領域には OAT-K1 と 91%、oatp と 65% の相同性を示すタンパク OAT-K2 がコードされていた。OAT-K2 mRNA は、OAT-K1 と同様腎のみに検出された。卵母細胞及び安定発現細胞 MDCK-OAT-K2 を用いて機能解析したところ、OAT-K2 はタウロコール酸、MTX 及びプロスタグランジン E₂ など広範な基質認識特性を有する Na⁺ 非依存性の有機アニオントランスポーターであることが示唆された。また OAT-K2 によるタウロコール酸取り込みは、多様な構造のアニオン性薬物や種々の胆汁酸誘導体、ステロイドホルモン、強心配糖体の共存によって強く阻害された。

以上、著者は 2 種の腎局在性有機アニオントランスポーター OAT-K1 及び OAT-K2 の cDNA クローニングに初めて成功し、各々の生理的並びに薬物動態的役割について新知見を得た。本研究成果は、腎特有の有機アニオン輸送ネットワークを理解するための重要な基礎的知見であると共に、薬物の有効性・安全性の確保を目的とした合理的な投与設計構築にも有用な情報になると考える。

論文審査の結果の要旨

腎臓は異物処理を担う主要臓器であり、尿管において多くの有機イオンが尿中に分泌される。尿管上皮細胞には、有機アニオントランスポーターが複数存在しており、薬物や生体異物の分泌に関与していることが示唆されてきたが、トランスポーターの実体についてはほとんど明らかにされていない。申請者は、ラット肝由来 Na⁺ 非依存性有機アニオントランスポーター oatp (organic anion transporting polypeptide) の類縁遺伝子が腎にも発現していることに着目し、PCR 法を応用して、腎特異的な有機アニオントランスポーターの cDNA クローニングに成功し、それに基づく構造・機能特性について以下の新知見を得た。

oatp と相同性を示した PCR 断片を用いて、ラット腎 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、翻訳領域には oatp と 72% の相同性を示す新規有機アニオントランスポーター OAT-K1 をコードする完全長 cDNA が単離された。ノーザンブロットング及び単離ネフロン分節を用いた PCR 解析によって、OAT-K1 mRNA は腎のみに、特に近位直尿管に強く発現しており、またウエスタンブロットングによって管腔側刷子縁膜に局在することが示された。

In vitro 合成 OAT-K1 mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、種々のアニオン性薬物を用いて輸送実験を行ったところ、メトトレキセート (MTX)、葉酸の顕著な取り込み上昇が認められた。ブタ腎由来上皮細胞 LLC-PK₁ 並びにイヌ腎由来上皮細胞 MDCK を用い構築した OAT-K1 安定発現系は、卵母細胞発現系と同様に MTX を特異的に輸送すること、この輸送は細胞外 Na⁺、Cl⁻ に非依存性であることが示された。機能解析の結果から、OAT-K1 は MTX を認識するトランスポーターであること、取り込み並びに排出という両方向性の輸送能を有することが示された。

腎には、OAT-K1 の類縁タンパクを含む未知の有機アニオントランスポーター群が発現しており、広範なアニオン性薬物

の尿細管分泌に関与していると推察されるため、更にラット腎 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、翻訳領域には OAT-K1 と 91%、*oatp* と 65% の相同性を示す OAT-K2 を単離することができた。OAT-K2 mRNA は、OAT-K1 と同様腎のみに検出された。卵母細胞及び安定発現細胞 MDCK-OAT-K2 を用いて機能解析した結果、OAT-K2 はタウロコール酸、MTX 及びプロスタグランジン E₂ など広範な基質認識特性を有する有機アニオントランスポーターであることが明らかとなった。

以上、本研究は 2 種の腎局在性有機アニオントランスポーター OAT-K1 及び OAT-K2 の cDNA クローニングに初めて成功し、各々の生理的並びに薬物動態的役割を明らかにしたものであり、尿細管における薬物分泌の分子機構解明に貢献するところ大であり、医療薬剤学の発展に寄与するものと考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成10年2月19日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。