

氏名	寺田智祐
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第427号
学位授与の日付	平成11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	ペプチドトランスポータ PEPT1 及び PEPT2 の構造・機能に関する研究 (主査)
論文調査委員	教授 乾 賢一 教授 橋田 充 教授 高倉喜信

### 論文内容の要旨

薬物の消化管吸収は、経口投与された薬物のバイオアベイラビリティを規定する重要な過程の一つである。一般に薬物の吸収速度は、薬物固有のイオン化の程度や脂溶性といった物理化学的性質に大きく支配されているが、経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質のように低脂溶性であり、かつ生理的pHでイオン化しているにも関わらず良好な吸収性を示す薬物も存在する。これまで、著者らの研究室では、小腸並びに腎尿細管刷子縁膜小胞を用いた薬物輸送研究によって、経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質などペプチド類似薬物の吸収が、ジ・トリペプチドを生理的基質とするペプチドトランスポータによって媒介されることを明らかにしてきた。1994年、Feiらは発現クローニングの手法を用いて、ウサギ小腸よりペプチドトランスポータ(PEPT1)のcDNAを単離し、一次構造等を明らかにした。そこで著者は、小腸及び腎尿細管におけるペプチドトランスポータを介した薬物輸送の分子的解析を目的として、ラットペプチドトランスポータの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PEPT1及びPEPT2のcDNAクローニング

ウサギPEPT1のアミノ酸配列を参考にdegenerate primerを合成し、ラット腎mRNAを鋳型としてRT-PCRを行ったところ、2種類のPCR産物が得られた。これらのPCR産物をそれぞれプローブとして腎cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、ラットPEPT1及びPEPT2 cDNAの単離に成功した。ラットPEPT1及びPEPT2は、それぞれ710個並びに729個のアミノ酸から成る推定12回膜貫通型タンパクであり、互いに約50%のアミノ酸ホモロジーを有していた。PEPT1は小腸上皮細胞の刷子縁膜に局在し、腎にも発現が観察された。一方、PEPT2は腎、特に髄質部に多く発現し、わずかに脳、肺、脾臓においても発現が認められた。卵母細胞発現系を用いた機能解析により、両トランスポータは、 $H^+$ 勾配依存的にペプチド類似薬物を輸送することが判明した。

#### II. PEPT1及びPEPT2の機能に関する比較解析

PEPT1並びにPEPT2の機能特性を比較解析するため、両トランスポータの安定発現上皮細胞を新たに確立した。両トランスフェクタントを用いて、加水分解抵抗性ジペプチド、glycylsarcosine (Gly-Sar)の濃度依存性を測定した。その結果、Gly-Sar取り込みは高濃度において飽和性が認められ、見かけの $K_m$ 値は1.1mM (PEPT1)並びに0.1mM (PEPT2)と算出された。さらに種々ジペプチドのGly-Sar取り込みに対する阻害曲線を基に $K_i$ 値を算出したところ、検討した全てのジペプチドにおいてPEPT2が高親和性であった。従って、PEPT1が低親和性型、またPEPT2が高親和性型ペプチドトランスポータであることが判明した。この結果は、親和性の異なるペプチドトランスポータが、異なる腎内分布を示すことによって、効率的な小分子ペプチドの再吸収を営んでいることを示唆するものである。同様に、種々経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質の両トランスポータに対する親和性を比較したところ、PEPT2は $\alpha$ -アミノ基を有するアミノ $\beta$ -ラクタム抗生物質

(両性イオン型)に、またPEPT 1はceftibutenやcefixime等、 $\alpha$ -アミノ基を持たない $\beta$ -ラクタム抗生物質(アニオン型)に対して高い親和性を有することがわかった。従って、PEPT 1とPEPT 2は互いに異なる薬物認識能を有していることが判明した。

### III. PEPT 1及びPEPT 2の構造・機能相関解析

これまで刷子縁膜小胞を用いた輸送実験により、ペプチドトランスポータタンパクに存在するhistidine残基が、輸送機能に必須であることが報告されてきた。そこで、PEPT 1並びにPEPT 2に及ぼす、histidine修飾剤diethylpyrocarbonate (DEPC)の影響について調べた。その結果、DEPC処理によって、両トランスポータを介したGly-Sar取り込みは顕著に阻害された。またDEPC処理に及ぼす様々な基質の防御実験によって、DEPC感受性histidine残基は、基質の $\alpha$ -アミノ基の認識部位として関与していることが判明した。そこでこれらのhistidine残基の同定を試みるため、PEPT 1の第2及び第4番目の推定膜貫通領域に存在する保存性histidine残基(His<sup>57</sup>並びにHis<sup>121</sup>)の変異トランスポータを作成し、機能解析を行った。その結果、変異トランスポータの細胞膜発現に異常は認められなかったものの、Gly-Sar輸送活性はほぼ完全に消失した。これらの結果は、His<sup>57</sup>並びにHis<sup>121</sup>が、基質の $\alpha$ -アミノ基の認識部位並びに駆動力であるH<sup>+</sup>の結合部位として機能している可能性を示唆するものである。さらにPEPT 1、PEPT 2間でキメラトランスポータを構築し輸送特性を調べたところ、膜貫通領域1-6の間に基質認識領域の存在することが判明した。この結果は、前述のhistidine残基の機能的な重要性和よく対応していた。また、キメラペプチドトランスポータを用いた解析より、PEPT 2の高親和性を規定するアミノ酸領域が、PEPT 2のC末端側にも存在する可能性が示唆された。

以上、著者は2種のラットペプチドトランスポータPEPT 1並びにPEPT 2のcDNAクローニングに成功し、両トランスポータの薬物認識特性や輸送機構についてタンパク分子レベルで明らかにすることができた。これらの研究成果は、ペプチド類似薬物の体内動態制御過程の分子的解明のみならず、ペプチドトランスポータを標的とする、医薬品分子設計や製剤開発など臨床応用面に対しても、有用な基礎的情報を提供し得るものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

ペプチドトランスポータは小腸上皮細胞の刷子縁膜に発現し、タンパク質消化産物である小分子ペプチドの能動的吸収を媒介することによって、アミノ酸トランスポータと共にタンパク質の吸収に重要な役割を担っている。ペプチドトランスポータは小分子ペプチド以外に経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質等のペプチド類似薬物の吸収にも関与することが示唆されている。一方、腎尿細管にも特性の異なるペプチドトランスポータが発現し、ペプチド類似薬物の腎動態制御に関わっている可能性が示唆されていた。1994年、家兎小腸よりペプチドトランスポータ(PEPT 1)のcDNAが単離され一次構造が解明された。しかし、ペプチドトランスポータのペプチド類似薬物に対する認識性、多様性、輸送機序に関しては不明点が多く残されていた。本論文は、ラットに発現する2種のペプチドトランスポータのcDNAを単離し、両者の構造・臓器分布並びに輸送特性について比較精査すると共に、構造・機能相関に関する分子的解析を行ったものであり、得られた成果は以下の通りである。

家兎PEPT 1のアミノ酸配列を参考にPCRクローニング法によって、ラット腎cDNAライブラリより2種のペプチドトランスポータPEPT 1及びPEPT 2のcDNA単離に成功した。シーケンス解析によって両トランスポータは互いに約50%のアミノ酸相同性を示し、いずれも推定12回膜貫通型タンパクであることを明らかにした。ウエスタンブロット解析により、PEPT 1は主として小腸刷子縁膜に発現し、一部腎尿細管刷子縁膜にも発現すること、一方PEPT 2は腎尿細管刷子縁膜に主として発現することを見出した。卵母細胞発現系を用いた解析によって、両トランスポータはいずれもH<sup>+</sup>勾配依存的にジペプチドやペプチド類似薬物を輸送することを実証した。

PEPT 1及びPEPT 2の安定発現上皮細胞を確立し、両トランスポータの機能特性を比較検討した結果、PEPT 1は低親和性型、PEPT 2は高親和性型ペプチドトランスポータであることを見出した。さらに経口用 $\beta$ -ラクタム抗生物質に対する両トランスポータの親和性を比較した結果、PEPT 2はアミノ $\beta$ -ラクタム抗生物質に対して高い親和性を示すこと、

一方PEPT 1は $\alpha$ -アミノ基を持たない $\beta$ -ラクタム抗生物質に対して高い親和性を有することを明らかにした。

ペプチドトランスポータの基質認識に関する分子機序を解明するために、histidine修飾剤DEPCを用いてPEPT 1及びPEPT 2の輸送機能に及ぼす影響を調べた。その結果、DEPC感受性histidine残基は基質の $\alpha$ -アミノ基の認識部位として機能していることを証明した。さらに、PEPT 1の部位選択的変異トランスポータを作成し機能解析を行った結果、57及び121番目のhistidine残基が $\alpha$ -アミノ基の認識部位並びに $H^+$ 結合部位として機能していることを実証した。またPEPT 1とPEPT 2間でキメラ体を構築し輸送特性を精査した結果、膜貫通領域1-6の間に基質認識領域の存在すること、PEPT 2の高親和性を規定するアミノ酸領域がC-末端側にも存在する可能性を見出した。

以上の研究は、ペプチド類似薬物の体内動態制御過程の分子的解明と共に、ペプチドトランスポータを分子標的とする創薬・製剤開発など臨床応用面にも有用な基礎情報を提供し得るものであり、医療薬剤学の発展に貢献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11年2月18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。