

氏名	あさ か じゅん いち 朝 賀 純 一
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 626 号
学位授与の日付	平 成 19 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 医 療 薬 学 専 攻
学位論文題目	腎尿管刷子縁膜及び側底膜に発現する有機カチオントランスポータの 輸送機能・発現調節に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 乾 賢 一 教 授 橋 田 充 教 授 高 倉 喜 信

論 文 内 容 の 要 旨

腎尿管上皮細胞には異物や老廃物を効率的に排除する輸送系が存在している。カチオン性物質は、側底膜に局在する膜電位依存性のトランスポータにより血中から細胞内に取り込まれ、刷子縁膜に局在する H^+ とのアンチポータを介して管腔中に排出される。著者の所属する研究室では、膜電位依存性のラット有機カチオントランスポータ 2 (rOCT2) をクローニングし、ラット及びヒト OCT ファミリーの構造・機能及び発現制御について研究を進めてきた。これまでに、腎臓における rOCT2 の発現には性差が存在し、雄性ホルモンのテストステロンが発現量を制御していることが見いだされてきたが、その分子機構は不明であった。一方、 H^+ /有機カチオンアンチポータについては、*in vitro* 薬物輸送研究によって機能特性が明らかにされてきたが、その分子実体は長らく不明であった。そこで著者は、OCT ファミリーの転写制御機構の解明と、ラット H^+ /有機カチオンアンチポータの cDNA クローニングを行い、以下の新知見を得た。

I. 有機カチオントランスポータ OCT の発現制御機構

rOCT1-3 のプロモーター領域をクローニングし、ブタ腎由来尿管上皮細胞 LLC-PK₁ を用いたレポーターアッセイにより転写活性を測定した。rOCT2 プロモーター活性はアンドロゲン受容体存在下、テストステロンによって促進されたが、rOCT1 及び rOCT3 の転写活性はテストステロンの影響を受けなかった。rOCT2 プロモーター領域に存在する推定アンドロゲン受容体応答配列 (ARE) の mutation analysis 及びプロモーターの deletion analysis から、-2,975位と-1,340位に存在する ARE が rOCT2 の転写調節に重要な役割を果たしていることが示された。

ヒト (h) OCT2 の発現制御を調べるため、hOCT2 プロモーターを単離し、基礎転写に必要なシスエレメント及びトランス因子の同定を試みた。プロモーターの deletion analysis から、-91位から-58位の領域に基礎転写に必要なシスエレメントの存在が示唆された。ゲルシフトアッセイの結果、この領域に存在する E-box に普遍的転写因子 upstream stimulatory factor-1 (USF-1) が結合することが判明した。さらに、E-box への変異による転写活性の低下並びに USF-1 の過剰発現による転写活性の上昇が認められた。以上の検討から USF-1 が E-box を介して hOCT2 の基礎転写を制御していることが明らかとなった。

II. ラット H^+ /有機カチオンアンチポータ rMATE1 のクローニング及び輸送機能解析

大腸菌の薬物排泄トランスポータ MATE (multidrug and toxin extrusion) のヒトのホモログである hMATE1 は、 H^+ /有機カチオンアンチポータとして機能することが示唆されている。そこで、hMATE1 の塩基配列を基に、ラット腎から rMATE1 cDNA を単離した。rMATE1 は566個のアミノ酸から構成され、12回膜貫通型タンパクであることが推察された。rMATE1 mRNA は腎臓に高発現しており、腎最小機能単位であるネフロン内では、近位尿管及び近位直尿管に局限していた。rMATE1 の一過性発現細胞によるカチオン性化合物テトラエチルアンモニウム (TEA) の取り込みは、基質濃度上昇に伴って飽和性を示し、 K_m 値は570 μM と算出された。また、TEA 取り込みは細胞外 pH の上昇に伴い増加する pH 依存性を示し、塩化アンモニウム前処理による細胞内酸性化によって顕著に増加した。さらに、rMATE1 はカチオ

ン性化合物であるシメチジン、メトホルミン、N¹-メチルニコチンアミド及び両性イオン化合物のセファレキシンを輸送した。以上の結果から、rMATE1は逆向きのH⁺勾配を駆動力とするH⁺/有機カチオンアンチポータであることが示された。

ラット腎刷子縁膜小胞を用いた解析よりH⁺/有機カチオンアンチポータタンパクに存在するシステイン及びヒスチジン残基が輸送機能に重要であることが示唆されていた。そこで、MATEの輸送機構を解明するため、種間で保存されているrMATE1のシステイン残基12個及びのヒスチジン残基7個について変異体を作製し、機能特性を調べた。その結果、Cys-62, Cys-126及びHis-385の変異体でTEAの輸送活性が低下したが、細胞膜への発現及び局在に変化は認められなかった。また、hMATE1及びhMATE2-Kに対応するこれらのアミノ酸残基を変異させても輸送活性の低下が認められた。さらに、SH基修飾剤の*p*-chloromercuribenzenesulfonate (PCMBs)及びヒスチジン残基修飾剤のdiethylpyrocarbonateの前処理により、rMATE1のTEA取り込み活性が低下し、PCMBs前処理によるTEA取り込み活性の低下は、rMATE1の基質存在下で防御された。以上の検討より、rMATE1の基質認識にはシステイン残基、輸送能にはヒスチジン残基が重要であり、Cys-62, Cys-126及びHis-385に対応するアミノ酸残基はMATEファミリーの輸送活性に必須であることが判明した。

以上、著者はrOCT2のAREを介したテストステロンによる転写促進及びhOCT2のE-boxを介したUSF-1による基礎転写機構を解明した。また、rMATE1のクローニングを行い、発現分布・輸送機能特性及びアミノ酸残基の輸送機能への役割を明らかにした。本研究成果は、尿細管分泌制御機構の分子的解明に寄与するものであり、カチオン性薬物の腎毒性や薬物相互作用を評価・予測する上で有用な情報になると考える。

論文審査の結果の要旨

カチオン性薬物の腎排泄は、側底膜に局在する膜電位依存性のトランスポータによって血中から細胞内に取り込まれ、刷子縁膜に局在するH⁺とのアンチポータを介して管腔中に排出される。膜電位依存性の有機カチオントランスポータ2(OCT2)の構造・機能・発現に関する情報は集積してきたが、転写制御機構についてはほとんど情報がなかった。一方、H⁺/有機カチオンアンチポータの分子実体は長年不明であり、分子同定に基づく機能解析が待ち望まれていた。そこで申請者は、OCTファミリーの転写制御機構の解明と、ラットH⁺/有機カチオンアンチポータのcDNAクローニングを試み、以下の新知見を得た。

rOCT2の腎における発現には性差が認められ、その発現にはテストステロンの関与していることが報告されている。そこで、その分子的メカニズムを解明するためrOCT1-3のプロモーター解析を行った。その結果、rOCT2プロモーター活性はアンドロゲン受容体存在下、テストステロンによって促進されたが、rOCT1及びrOCT3の転写活性はテストステロンの影響を受けなかった。mutation analysis及びプロモーターのdeletion analysisから、-2,975位と-1,340位に存在するアンドロゲン応答配列がrOCT2の転写調節に重要な役割を果たしていることが示された。さらにヒト(h)OCT2の発現制御機構の解明へと研究を展開した。deletion analysisの結果、-91位から-58位の領域に基礎転写に重要なシスエレメントの存在が示唆された。ゲルシフトアッセイによって、この領域に存在するE-boxに普遍的転写因子upstream stimulatory factor-1(USF-1)が結合することが判明した。さらに、E-boxへの変異による転写活性の低下並びにUSF-1の過剰発現による転写活性の上昇が認められた。以上の検討からUSF-1がE-boxを介してhOCT2の基礎転写を制御していることが明らかとなった。

大腸菌の薬物排泄トランスポータMATE(multidrug and toxin extrusion)のヒトのホモログであるhMATE1は、H⁺/有機カチオンアンチポータとして機能することが示唆されている。そこで、hMATE1の塩基配列を基に、ラット腎からrMATE1 cDNAを単離した。rMATE1 mRNAは腎臓に高発現していた。典型的有機カチオンテトラエチルアンモニウム(TEA)のrMATE1を介した取り込みは、細胞外pHの上昇に伴い増加するpH依存性を示し、塩化アンモニウム前処理による細胞内酸性化によって顕著に増加した。さらに、rMATE1はカチオン性化合物であるシメチジン、メトホルミン、N¹-メチルニコチンアミド及び両性イオン化合物のセファレキシンを輸送した。次に、MATEを介したカチオン性化合物の輸送機構を解明するため、これまで腎刷子縁膜小胞を用いた解析より機能的な重要性が示唆されていた、システイン並びにヒスチジン残基に着目し検討を加えた。その結果、種間で保存されているCys-62, Cys-126及びHis-385の変異体で

rMATE1 による TEA の輸送活性が低下したが、細胞膜への発現及び局在に変化は認められなかった。また、同様の結果が、hMATE1 や hMATE2-K でも認められた。さらに SH 基修飾剤の *p*-chloromercuribenzenesulfonate (PCMBS) の前処理により、rMATE1 の TEA 取り込み活性が低下し、その阻害効果は rMATE1 の基質存在下で防御された。従って、rMATE1 の基質認識にはシステイン残基、輸送能にはヒスチジン残基が重要であり、Cys-62, Cys-126 及び His-385 に対応するアミノ酸残基が MATE ファミリーの輸送活性に必須であることが判明した。

以上の研究は、OCT2 の転写制御機構並びに MATE の分子同定とそれに基づく構造機能解析を初めて明らかにしたものであり、カチオン性薬物の尿細管分泌機構の解明において、極めて重要な知見を含んでいる。これらの研究成果は、カチオン性薬物の腎毒性や薬物相互作用を評価・予測する上でも有用な情報を提供し、薬物動態学の発展に寄与するところが多い。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19年2月21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。