

氏 名	浦 上 裕 美 子
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 443 号
学位授与の日付	平成 12 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	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	腎尿細管有機カチオントランスポータの構造・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 高倉喜信

論 文 内 容 の 要 旨

腎尿細管上皮細胞に発現する有機カチオントランスポータは、カチオン性の薬物や代謝物及び不要老廃物の尿中排泄を媒介し、生体における重要な解毒システムとして機能している。これまで著者らの研究室では、単離膜小胞系並びに培養細胞系を用いた薬物輸送研究から、側底膜に局在する膜電位依存性の有機カチオントランスポータ及び刷子縁膜に局在する H^+ /有機カチオンアンチポータが、カチオン性薬物の尿細管分泌に深く関与していることを示唆してきた。さらに、これら機能面を中心とした研究から、有機カチオントランスポータが複数種存在することも想定された。1994年に Koepsell らによって側底膜型と推定されるラット有機カチオントランスポータ rOCT 1 がクローニングされた。これらの背景より、著者はカチオン性薬物の尿細管分泌に関わるトランスポータ群の機能特性を分子レベルで解明することを目的とし、ラット有機カチオントランスポータの cDNA クローニングと、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. ラット有機カチオントランスポータ rOCT 2 の cDNA クローニング

rOCT 1 のアミノ酸配列を参考に degenerate primer を合成し、ラット腎 mRNA を鋳型として得られた PCR 産物をプローブとして腎 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、rOCT 1 と 67% のアミノ酸相同性を示す有機カチオントランスポータ、rOCT 2 cDNA のクローニングに成功した。rOCT 2 は 593 個のアミノ酸からなる 12 回膜貫通型糖タンパクであり、rOCT 2 mRNA は腎に強く発現すること、その腎内分布は髄質部において多いことがわかった。さらに rOCT 2 合成 RNA を注入した卵母細胞を用いて機能解析を行った結果、有機カチオントランスポータの典型的基質であるテトラエチルアンモニウム (TEA) の取り込み上昇が認められた。rOCT 2 を介した TEA 取り込みは膜電位減少に伴って抑制されること、さらにその取り込みは細胞外 pH 変化の影響を受けないことから、OCT 2 は H^+ /有機カチオンアンチポータとは異なることが明らかとなった。また、rOCT 2 による TEA 取り込みは、カチオン性薬物であるシメチジン、プロカインアミド、キニジンによって阻害されることから、rOCT 2 はカチオン性薬物の腎移行に関わる膜電位依存性有機カチオントランスポータであることが示唆された。

II. rOCT 1 及び rOCT 2 の基質認識特性に関する比較解析

rOCT 1 及び rOCT 2 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構築した。両トランスポータによる TEA の細胞内蓄積量は、側底膜側に添加した場合にのみ顕著な上昇が認められた。TEA 取り込みの濃度依存性を測定したところ、高濃度において飽和性が認められ、見かけの K_m 値は $38 \mu M$ (rOCT 1), $45 \mu M$ (rOCT 2) であった。種々カチオン性化合物の TEA 取り込みに対する共存阻害効果について検討したところ、モノアミン類、内因性カチオン及び抗不整脈剤等のカチオン性薬物で取り込み阻害効果が認められた。阻害曲線を基に K_i 値を算出し、rOCT 1 と rOCT 2 で比較したところ、多くのカチオン性化合物でほぼ類似の親和性を示したが、1-メチル-4-フェニルピリジニウム (MPP) やプロカインアミドなど一部の薬物では異なることがわかった。さらに、カチオン性化合物の輸送実験を行った結果、rOCT 1 及び rOCT 2 は TEA 以外に MPP, グアニジン並びにシメチジンを輸送することが判明した。以上の結果から、

rOCT 1 並びに rOCT 2 は尿細管分泌に関わる側底膜型有機カチオントランスポータであること、さらに両トランスポータは multispecific な基質認識特性を有することが示唆された。

III. rOCT の発現調節に関する比較解析

雌雄ラット腎切片への TEA の取り込みは、雄性ラットで有意に高く性差が認められた。そこで雌雄ラット腎における有機カチオントランスポータ (rOCT1, rOCT2, rOCT 3) の発現性差に関する比較解析を行った。腎における rOCT1, rOCT2, rOCT 3 mRNA の発現量は、rOCT 2 にのみ性差が認められ、雄性ラットでその発現は亢進していた。また、タンパクレベルでも rOCT 2 発現に性差が観察された。著者らは rOCT 2 発現の性差が性ホルモンの血中レベルと関連性があることを想定し、雄及び雌ラットにテストステロン又はエストラジオールを投与し、rOCT 1 及び rOCT 2 mRNA の発現変動について調べた。その結果、rOCT 2 mRNA の発現量は、テストステロン投与ラットにおいて亢進し、エストラジオール投与ラットにおいて減少傾向が認められた。さらに、性ホルモン投与ラットから単離した腎切片への TEA 取り込みは、テストステロン投与によって顕著に増加し、エストラジオール投与によって減少した。以上の結果から、有機カチオン輸送活性の性差及びホルモン処理による変動は、rOCT 2 の発現調節と対応することが判明し、rOCT 2 がカチオン性化合物の腎移行を媒介する誘導型有機カチオントランスポータであることが示唆された。

以上、著者は腎尿細管に発現する新規有機カチオントランスポータ rOCT 2 の cDNA クローニングに成功し、基質認識特性や発現調節機構について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、有機カチオントランスポータの薬物動態学的並びに生理学的役割の解明やトランスポータの介在する薬物間相互作用の解析に新たな情報を提供するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

腎尿細管上皮細胞に発現する有機カチオントランスポータは、カチオン性の薬物や異物の尿中排泄を媒介することにより、生体における解毒システムのひとつとして重要な役割を担っている。従来の単離膜小胞系や培養細胞系を用いた薬物輸送研究から、血液中のカチオン性薬物は尿細管側底膜に局在する膜電位依存性の有機カチオントランスポータを介して細胞内に蓄積された後、管腔側刷子縁膜の H^+ /有機カチオンアンチポータを介して管腔中へ排出されることが提唱されてきた。1994 年、ラット腎より有機カチオントランスポータ rOCT 1 の遺伝子同定が報告されたことを背景とし、本論文はカチオン性薬物の尿細管分泌に関わる新規の有機カチオントランスポータの遺伝子クローニングとそれに基づく構造・機能特性並びに組織分布について、分子レベルで初めて明らかにしたものである。

PCR 法と相同スクリーニングを応用して、rOCT 1 と 67% のアミノ酸相同性を示す新規トランスポータ rOCT 2 の遺伝子単離に成功した。rOCT 2 は全長 593 個のアミノ酸からなる推定 12 回膜貫通型糖タンパクであり、ノザンプロット解析から rOCT 2 mRNA は腎臓に最も強く発現することを明らかにした。さらに、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた機能解析によって、rOCT 2 が有機カチオンであるテトラエチルアンモニウム (TEA) の輸送活性を有することを確認した。これらの結果から、rOCT 2 が腎特異的に発現する新規の有機カチオントランスポータであることを実証した。

rOCT 1 及び rOCT 2 の細胞膜局在性と機能特性の比較解析を目的とし、遺伝子導入法を用いて各トランスポータの安定発現細胞系の作成に成功した。多孔性フィルター上に培養した rOCT 1 または rOCT 2 発現細胞を用いて TEA 取り込みの方向性について調べ、両トランスポータが側底膜に発現していることを明らかにした。さらに種々の薬物を用いて、rOCT 1 または rOCT 2 を介した TEA 輸送に及ぼす阻害効果を比較検討し、多くのカチオン性薬物が類似した阻害を示すこと、神経毒 MPP やプロカインアミドなど一部の薬物では異なる阻害効果 (基質親和性) を有することを示した。また rOCT 1 及び rOCT 2 が、MPP、シメチジン、グアニジンなど種々の有機カチオン類の輸送能を有することを明らかにし、rOCT 1 と rOCT 2 は、いずれも構造的に多様なカチオン性薬物の細胞内取り込みを媒介する側底膜型トランスポータであることを機能的に実証した。

ラット腎切片への TEA 取り込み活性に性差が存在することを見出し、この性差が rOCT 2 の mRNA 並びにタンパクの発現量の性差に基づくことを明らかにした。さらに、rOCT 2 の尿細管発現レベルがテストステロン投与により亢進し、一方エストラジオール投与によって減少することを突き止め、rOCT 2 が性ホルモンによって制御されている誘導型の薬物トランスポータであることを初めて明らかにした。

以上の研究は、カチオン性薬物の腎排泄機序の分子的解明と共に、有機カチオントランスポータの薬物動態学的並びに生理学的役割の解明に有用な情報を提供するものであり、トランスポータ介在性の薬物間相互作用の解析や予測・評価法の基盤開発にも貢献するものと考ええる。

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12年3月2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。