

学位論文題名

Investigation on the transport mechanism of ceftibuten, a dianionic beta-lactam model for the peptide-related compounds, across brush-border membranes from intestinal and renal epithelia

(ペプチド様ジアニオン型抗生物質セフチブテンの
小腸および腎上皮細胞刷子縁膜透過機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

小腸や腎尿細管の上皮細胞には種々の生体成分の輸送系が存在するが、ペプチド輸送系は、ジ-、トリ-ペプチドだけではなく一部のセフェム系抗生物質やACE阻害薬、renin阻害薬もその基質となり得るなど、薬物の輸送経路としても注目されている。これらのペプチド輸送系は、生理学的にはタンパク性の栄養分や窒素源バランスの維持に重要な働きをする一方で、薬学的観点から見るとこの比較的広い基質特異性は、薬物のバイオアベイラビリティを向上させる合理的なdrug designに貢献する側面を有する。最近、小腸や腎よりジペプチド輸送担体の推定遺伝子がクローニングされ、遺伝子発現を用いた輸送機能の解析が進められているが、小腸および腎上皮細胞の刷子縁膜(BBM)上に実際に存在する輸送タンパクの本来の特性や薬物認識性について明らかにした報告は極めて少ない。以上のことから、今回、この輸送系の機能を分子レベルで明らかにするために、モデル化合物としてジアニオン型経口セフェム、セフチブテンを選び、その腎尿細管および小腸上皮BBM輸送機構について種々検討した。セフチブテンは、小ペプチド輸送系の基質となることが報告されており、消化管内での安定性且つ定量感度に優れた薬物である。

(I) 腎および小腸BBM小胞を用いた研究

輸送機構の研究には、単離した膜vesicleを用いた手法が細胞内成分の影響を受けないという点で利点がある。従って、今回の実験では両方の臓器より調製したBBM小胞への基質の輸送特性を解析し

た。小腸・腎両臓器のBBM小胞へのセフチブテンのuptakeは内向きのH⁺勾配によって促進され、FCCPの添加によって大きく減少した。一方、種々のペプチド、およびその構造類似体による輸送阻害効果は、腎BBM小胞においては全ての化合物で認められたが、小腸の場合には β -AspGly、 γ -GluHis、およびcarnosineでは阻害を受けず、セフチブテンとジペプチドの輸送系は全く同じではないことが示唆された。そこで、これらの阻害機構の違いを明らかにするために、Eadie-Hofstee plot 解析を行った結果、セフチブテンの輸送系は腎において親和性とcapacityがそれぞれ異なった二つの輸送系の和として表されたが、小腸では特異的な輸送部分は単一の成分であることが認められた。また、腎BBMVにおいて拮抗型阻害を示したAlaProを用いて、低濃度領域と高濃度領域での阻害効果をDixon plotにより解析したところ、低濃度では混合型、高濃度では拮抗型の阻害を示すことが明らかとなった。一方、カチオン型ペプチドであるcarnosineは、低濃度領域、すなわち高アフィニティ輸送システムのみの特異的な拮抗型阻害剤であることが示された。近年、ウサギ・ラットの小腸、腎等から小ペプチド輸送体と推定される機能タンパクのcDNAが見つかり、腎と小腸には共通のペプチド輸送担体の存在が議論されている。しかしながら、今回明らかになった実験結果より、腎・小腸BBMにおいてペプチドモデルであるセフチブテンの輸送系には明らかな違いのあることが認められ、この違いは腎に存在する高affinity輸送系が関与しているものと思われる。

(Ⅱ) 輸送タンパク-人工膜再構成系の確立

ペプチド輸送系を分子レベルで理解する上で、確実なgoalとなるものは輸送タンパクの単離精製と同定だが、精製の行程に左右されない輸送活性の定量方法が大きな問題となる。そこで、本研究では腎BBMを出発材料としてセフチブテンの輸送活性の可溶化とリボソームへの再構成について最適条件を探索した。膜タンパクはオクチルグルコシドを用いて可溶化した。オクチルグルコシド濃度50-75mMでセフチブテンのuptakeは最大値を示したため、この後の検討は60mMオクチルグルコシドを用いて可溶化を行った。可溶化した膜タンパクはPEG8000を加えタンパクを遠心分離し界面活性剤を除去した。得られた沈殿をリボソームに再構成し、セフチブテンの輸送活性を測定した。リボソームの組成を種々変えた時、リボソームに取り込まれた輸送活性は、asolectin、cholesterol、phosphatidyl serineの比率が60:30:10の時、最も高い活性を示すことが認められた。得られた輸送タンパク-リボソーム再構成について種々検討した。ジペプチド等による阻害効果を調べた結果、

腎BBM小胞の場合と同様に、セフチブテンの輸送は、用いた全ての阻害を受けた。また、 H^+ 勾配を消失させるFCCPはuptakeを有意に阻害し、この輸送システム再構成系は、 H^+ 共輸送であることが明らかとなった。

(Ⅲ) ペプチド関連化合物の輸送担体の単離精製

タンパク・リボソーム再構築系を輸送活性測定の指標として輸送担体の精製を試みた。可溶化タンパク試料を炭素原子6個のスパーサーの先端に位置するN-ヒドロキシスクシンイミドにセフチブテンを固定化したアフィニティカラムにかけ、開始bufferで平衡化した後、NaClを用いてイオン強度を上げ、目的のタンパクを溶出させた。セフチブテンの輸送活性は3.5M・NaClで溶出した。得られたタンパクをリボソームに再構成した結果、セフチブテンの輸送活性は保持されており、この画分が活性の本体であることが認められた。さらに、この活性画分をSDS/PAGEにより分離したところ、分子量130KDa、110KDa、45KDaの3つのバンドが検出されたが、リボソームに組み込んだサンプルを用いて、同様に電気泳動を行った結果、45KDaのバンドは消失し、前2つのタンパクのみがリボソームに組み込まれることが明らかとなった。このことより、45KDaのタンパクは、可溶化の段階では輸送システムの一部として存在するが、輸送活性や基質の認識性には直接関与していないものと思われる。

結 論

1. ジアニオン型セフェム系抗生物質セフチブテンの膜透過は腎においては2つの輸送系を介して行われるが、小腸では単一の系に認識されることが見いだされた。
2. ジペプチドによる阻害実験より、小腸と腎では異なった基質認識性を示すこと、この理由として腎に存在する高アフィニティ輸送システムが大きく関与することが推定された。
3. 簡便且つ有用な、腎BBM輸送担体の可溶化・再構成系を確立した。さらに、この手法を利用し、アフィニティクロマトグラフィによる輸送タンパクの精製が可能であり、得られたタンパク画分は輸送活性を有していることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 栗 原 堅 三
副 査 教 授 加 茂 直 樹
副 査 教 授 宮 崎 勝 巳
副 査 講 師 宮 内 正 二

学 位 論 文 題 名

Investigation on the transport mechanism of ceftibuten, a dianionic beta-lactam model for the peptide-related compounds, across brush-border membranes from intestinal and renal epithelia

(ペプチド様ジアニオン型抗生物質セフチブテンの
小腸および腎上皮細胞刷子縁膜透過機構に関する研究)

小腸や腎尿細管の上皮細胞に存在するペプチド輸送系は、生理学的にはタンパク性の栄養分や窒素源バランスの維持に重要な働きを担っているが、一方で、一部のセフェム系抗生物質やACE阻害薬、renin阻害薬もその基質となり得るなど、薬物の輸送経路としても注目されており、その比較的広い基質特異性から薬物のbio-availabilityを向上させる合理的なdrug designに貢献する側面を有する。しかしながら、上皮細胞刷子縁膜(BBM)上に実際に存在する輸送タンパクの本来の特性や薬物認識性について明らかにした報告は極めて少ない。以上のことから、申請者はこの輸送系の機能を分子レベルで明らかにするために、小ペプチド輸送系の基質モデルであるジアニオン型経口セフェム、セフチブテンを選び、その腎尿細管および小腸上皮細胞輸送機構について種々検討し、三編にわたり論述している。

輸送機構の研究には、単離した膜vesicleを用いた手法が細胞内成分の影響を受けないという点に着目し、両方の臓器より調製したBBM小胞への基質の輸送特性を解析した。小腸・腎両臓器のBBM小胞へのセフチブテンのuptakeは内向きの H^+ 勾配によって促進され、FCCPの添加によって大きく減少した。一方、種々のペプチド、およびその構造類似体による輸送阻害効果は、腎BBM小胞に

においては全ての化合物で認められたが、小腸の場合には β -AspGly、 γ -GluHis、およびcarnosineでは阻害を受けず、セフチブテンとジペプチドの輸送系は全く同じではないことが示唆された。そこで、これらの阻害機構の違いを明らかにするために、Eadie-Hofstee plot 解析を行った結果、セフチブテンの輸送系は腎において親和性とcapacityがそれぞれ異なった二つの輸送系の和として表されたが、小腸では特異的な輸送部分は単一の成分であることが認められた。近年、ウサギ・ラットの小腸、腎等から小ペプチド輸送体と推定される機能タンパクの推定遺伝子がクローニングされ、腎と小腸に共通のペプチド輸送担体が存在することも議論されている。しかしながら、今回明らかになった実験結果より、腎・小腸BBMにおいてペプチドモデルであるセフチブテンの輸送系には明らかな違いのあることが認められ、この違いは腎に存在する高affinity輸送系が関与しているものと思われる。

ペプチド輸送系を分子レベルで理解する上で、確実なgoalとなるものは輸送タンパクの単離精製と同定であるが、精製の行程に左右されない輸送活性の定量方法が大きな問題となる。これらの問題を解決するために、申請者は腎BBMを出発材料としてセフチブテンの輸送活性の可溶化とリボソームへの再構成について最適条件を探索した。膜タンパクをオクチルグルコシドで可溶化した後PEG 8000を加えタンパクを遠心分離し界面活性剤を除去した。得られた沈殿をリボソームに再構成し、セフチブテンの輸送活性について種々検討した。その結果、腎BBM小胞の場合と同様にセフチブテンの輸送は、用いた全ての化合物で阻害を受けた。また、 H^+ 勾配を消失させるFCCPはuptakeを有意に阻害し、この輸送システム再構成系は H^+ 共輸送であることが明らかとなった。そこで、この輸送活性を指標として輸送タンパクの精製をセフチブテンを固定化したアフィニティカラムを用いて行った。セフチブテンの輸送活性は高濃度のNaCl溶液で溶出され、得られたタンパクをリボソームに再構成した結果、セフチブテンの輸送活性は保持されており、この画分が活性の本体であることが認められた。さらに、この活性画分をSDS/PAGEにより分離したところ、分子量130KDa、110KDa、45KDaの3つのバンドが検出されたが、リボソームに組み込んだサンプルを用いて、同様に電気泳動を行った結果、45KDaのバンドは消失し、前2つのタンパクのみがリボソームに組み込まれることが明らかとなった。このことより、45KDaのタンパクは、可溶化の段階では輸送システムの一部として存在するが、輸送活性や基質の認識性には直接関与していないものと思われる。これらの検討結果は、同一の機構として捉えられていた腎と小腸上皮細胞膜のペプチド輸送系に臓器特殊性のあることを明らかにし、且つ輸送担体機能の再構築化によりタンパク-薬物間の分子認識性を解明しようとしたものであり、薬物の体内動態の解析や細胞膜の物質輸送機

構を明らかにするうえで有用な基礎知見となり得る。

以上のことから本学位論文は、ペプチド輸送担体による薬物の細胞膜透過機構を明らかにするとともに経口製剤開発のための重要な知見を与えるものであり、博士（薬学）の学位を受けるに充分値すると認めた。