

学位論文題名

ヒトオリゴペプチドトランスポーター(hPEPT1)

基質輸送サイクルにおける His57の重要性

学位論文内容の要旨

【序論】

ヒトオリゴペプチドトランスポーター(hPEPT1)は小腸上皮細胞刷子縁膜に存在し、蛋白質の消化によって生じるジ・トリペプチドを H^+ との共輸送により細胞内に取込む栄養物質輸送体である。hPEPT1は、本来の基質に加えて β ラクタム系抗生物質などのペプチド類似薬物をも基質とすることから、薬物動態を考える上で重要な輸送体のひとつに挙げられている。このようなhPEPT1の有する幅広い基質認識能力は、能動輸送系を利用したドラッグデリバリーシステム(DDS)を開発する上で非常に有用性が高い。しかし現時点ではhPEPT1の基質認識・輸送機構は解明されていない部分も多く、より効率的なDDSへの応用にはさらなる研究が必要である。

本研究では、hPEPT1の輸送機構の解明を目的として輸送サイクルに注目し、そのメカニズムの解析を行った。駆動力の向きと基質の濃度勾配によって規定されるhPEPT1輸送サイクルのuptake・effluxという双方向の輸送の細胞外pH依存性の解析から、ひとつのHis残基の解離状態に依存して輸送が制御されるという結論に至ったのでここに報告する。

【結果及び考察】

1. hPEPT1による双方向性基質輸送

hPEPT1による基質のuptakeは H^+ との共輸送である。このuptake時の H^+ の流入を電流として測定することでhPEPT1の基質輸送を測定することができる。これには、従来*Xenopus* oocyteを用いたTwo-electrode voltage clamp (TEVC)法が用いられてきたが、本研究では新たにhPEPT1安定発現HeLa細胞を用いたwhole-cell patch clamp (WPC)法による測定系を確立し、Gly-Sar輸送電流を測定した。WPC法ではGly-Sarのuptakeの後、細胞内に濃縮されたGly-Sarのeffluxが外向き電流として測定された。これによってuptakeとeffluxがいずれも H^+ 共輸送であることが確認された。これはhPEPT1による基質輸送が双方向性であり、輸送方向は基質および H^+ の電気化学ポテンシャルによって規定されることを示している。

2. uptakeの細胞外pH依存性とそれに関与するアミノ酸残基

hPEPT1は細胞内外の H^+ 濃度勾配を駆動力としているため、駆動力は細胞外pHの酸性化に伴って増大しuptake活性も増加すると考えられる。しかし、hPEPT1安定発現CHO細胞におけるGly-SarのuptakeのpH-profileはベル型を示す。酸性条件でuptakeが減少するメカニズムとしては、あるアミノ酸残基側鎖の解離状態の変化によって

hPEPT1の輸送を制御する機構が考えられる。そこで、細胞内外の膜電位差 ($\Delta\psi$) を保持しつつpH勾配 (ΔpH) を消去した系、すなわち駆動力が一定となる条件下におけるGly-Sarのuptake活性を測定した。この活性の細胞外pH依存性はHenderson-Hasselbalchの式によくfitし、 $\text{pK}_a=6.7$ と求められた。hPEPT1による基質輸送活性はHis修飾試薬DEPCで処理することにより強く減弱されることが報告されていること、およびこの pK_a 値から輸送制御に関わるアミノ酸残基はHisであると推察された。

3. effluxにおけるHis残基の重要性

uptakeと同様にeffluxについても細胞外pH依存性を検討したところ、pH 7以下で輸送活性は徐々に減少しpH 4で停止することが明らかになった。この時のefflux速度と細胞外pHの関係はHenderson-Hasselbalchの式によくfitし $\text{pK}_a=5.8$ と求められた。この関係は ΔpH 非存在下、または $\Delta\psi$ 、 ΔpH 非存在下でも不変であることから、effluxはGly-Sar濃度勾配に従って発生し、あるアミノ酸残基側鎖の解離状態の変化によって制御されていると推察された。 pK_a の値がHisに近いこと及びeffluxがDEPC処理によって停止することから、effluxにおいてもHis残基の重要性が確認された。

4. 基質輸送が細胞外pH依存的に制御されるメカニズム

以上の結果から細胞外pH依存的輸送にhPEPT1細胞外側に位置するあるHis残基が関わっていることが示唆された。そのメカニズムを明らかにするため ΔpH 非存在下における各細胞外pHでのGly-Sarのuptakeの速度パラメータを求めたところpHによって変化するのは V_{max} であり、 K_m は一定であった。 V_{max} の変化とは、言い換えれば総hPEPT1数に対する輸送可能な状態のhPEPT1の割合の変化である。細胞外pH酸性化によって停止状態のhPEPT1の割合が増加するということは、あるHis残基がプロトン化することでhPEPT1による輸送を停止しているのだと考えられる。

5. hPEPT1の輸送を制御するHis残基の特定

hPEPT1はHisを10残基有する。輸送を制御するHis残基を特定するため、各Hisの変異体を作成し、その輸送特性をwild-typeと比較した。輸送特性としてはpH-profileに加えて、 Ni^{2+} との相互作用を測定した。これは H^+ および Zn^{2+} による阻害が報告されているグリシントランスポーターGlyT1bでの知見を参考にしたものである。Hisの特定は変異体作製と輸送特性の測定の容易さから*Xenopus* oocyte発現系におけるTEVC法による測定によって行った。

細胞外ループに位置するHis残基の各Ala変異体と、その全てをAlaにした5重変異体His^{EL}-less、細胞内ループに位置するHis残基を全てAlaにした3重変異体His^{IL}-lessの輸送特性はいずれもwild-typeと一致した。よってこれらのHis残基は目的とする残基ではないことが確認された。残るH57とH121は、これまで基質・ H^+ の結合部位として考えられている残基である。いずれもAla変異体で輸送活性がみられなかったがH121Nで輸送活性が認められ、その特性に変化がなかったためpH依存性への関与が否定された。従って目的のHis残基がH57であることが明らかになった。

【まとめ】

hPEPT1の基質輸送は双方向性であり、酸性条件下においてプロトン化したH57が H^+ をリリースできない状態になることによって輸送サイクルから逸脱し停止することが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主査	助教授	宮内正二
副査	教授	加茂直樹
副査	教授	井関健
副査	助教授	菅原満

学位論文題名

ヒトオリゴペプチドトランスポーター (hPEPT1)

基質輸送サイクルにおける His57 の重要性

ヒトオリゴペプチドトランスポーター (hPEPT1) は小腸上皮細胞刷子縁膜に存在し、蛋白質の消化によって生じるジ・トリペプチドを H^+ との共輸送により細胞内に取込む栄養物質輸送体である。hPEPT1 は、本来の基質に加えて β ラクタム系抗生物質などのペプチド類似薬物をも基質とすることから、薬物動態を考える上で重要な輸送体のひとつに挙げられている。更に、hPEPT1 が幅広い基質認識及び能動輸能力を有することから、hPEPT1 は輸送担体を利用したドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用が期待されている輸送担体の一つである。しかし現時点では hPEPT1 の基質認識・輸送機構は解明されていない部分も多く、より効率的な DDS への応用にはさらなる研究が必要である。

藤澤氏の学位論文は、様々な電気生理学的手法を用いて、臨床上および創薬上でも重要な hPEPT1 の輸送機構の解明を行ったものである。特に、輸送担体の種々の輸送過程 (輸送サイクル) の詳細な解析を行い、輸送に関わる最も重要なアミノ酸残基 His57 の基質輸送における機能的役割を明らかにした。この知見は、輸送機構解明の新たな切り口をもたらす発展的な研究の一つである。

藤澤氏の研究の内容は、大きく三つからなる: (1) 輸送機構を明にするために必須な CHO 及び HeLa 細胞における hPEPT1 大量発現系の構築とそれを用いた速度論的解析, (2) ホールセル・パッチクランプ法による一細胞における輸送活性測定法の確立と詳細な輸送サイクルの解明, (3) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的手法による、重要なアミノ酸残基の同定である。(1)(2) 項目において、hPEPT1 には二つの状態、即ち、輸送担体には、基質輸送に関与することができる active state と基質輸送に関与することができない inactive state 存在し、この状

態がpHにより変動することを明らかにした。更に、(3)項目において、卵母細胞発現系を用いて、このpHによる輸送活性の制御に関わっているアミノ酸残基はHis57であることを同定した。

これまで、このHis57は、基質の輸送過程において重要であるという報告が他の研究グループからの報告があるが、どの様に輸送過程に関与するかについては全く明らかにされていなかった。今回、藤澤氏は、このHis57が細胞外pHを感知し、active stateとinactive stateを調節していることを明らかにした。

副査の加茂教授、井関教授、菅原助教授の3先生方に、論文審査を行って頂いた。どの先生方からも、内容的には学位論文に充分値する内容であるというコメントを頂いた。一部の先生から、誤字、不明瞭な点のご指摘を頂いたが、すべて訂正し、ご了解頂いた。特に、審査会を設けることはしなかった。

この博士論文に関する一部の内容は、既に原著論文2報として発表されている。また、現在、投稿直前のものが1報、投稿作成準備段階が1報ある。十分に博士論文に値する内容である。

審査委員会は、藤澤氏の提出論文を学位論文に値すると評定した。