

平成22年 4月20日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590142
 研究課題名（和文） 薬物トランスポータの膜局在決定因子の同定と極性輸送機構の解明
 研究課題名（英文） Identification of essential determinants for membrane localization of drug transporters and elucidation of their polarized transport mechanisms
 研究代表者
 桂 敏也 (KATSURA TOSHIYA)
 京都大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：10283615

研究成果の概要：腎臓の近位尿細管に局在する薬物の運び屋タンパク質（トランスポータ）がどのように細胞膜に運ばれ機能するか、またその発現量がどのように規定されているか等を明らかにすることを目的として検討を行い、腎臓における薬物輸送を再現するモデル細胞の構築に成功し、また薬物トランスポータの発現量を規定する因子を同定することができた。さらに、トランスポータを全く発現しないマウスを作製し、その役割を明確にした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：薬物動態学、医療薬剤学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学・

キーワード：極性上皮細胞、薬物トランスポータ、膜輸送、薬物動態

1. 研究開始当初の背景

小腸や腎臓などの上皮細胞では、血管側側底膜と管腔側刷子縁膜に機能特性の異なる薬物トランスポータが局在し、薬物の臓器移行性や薬物輸送の方向性（吸収・分泌）の決定に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。このような薬物輸送を担う薬物トランスポータ群に関する研究は、分子生物学的手法の導入によってこの15年間に急速に進展し、その構造、機能や臓器分布、細胞膜局在が明らかにされてきている。しかし、上皮細胞における薬物トランスポータの細胞膜局在を決定する分子機

構については未だ不明な点が多い。また、薬物体内動態に個体内・個体間変動が存在することが知られているが、その要因は薬物トランスポータや薬物代謝酵素の遺伝子多型のみで説明できるものではなく、何らかの制御因子も考慮に入れる必要があるものと考えられる。さらに、薬物トランスポータの機能解析に上皮細胞や線維芽細胞発現系が用いられているが、多くの場合はその細胞膜局在に注意が払われておらず、膜局在を規定する因子を考慮した解析はなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では有機カチオントランスポータ (MATE1, MATE2-K, OCT2) をモデル蛋白質として選び、その細胞内輸送経路を明らかにするとともに、それぞれの膜局在を規定する因子 (薬物トランスポータ結合蛋白質) を探索、同定することを試みる。さらに、得られた因子の変異や発現量変動がトランスポータの極性輸送に及ぼす影響について精査し、個体での薬物体内動態変動に関する基礎的情報を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MATE (頂側膜型有機カチオントランスポータ) および OCT2 (側底膜型有機カチオントランスポータ) を有機カチオン輸送活性を有しない極性培養腎上皮細胞 MDCK に安定発現させる。それぞれを単独で発現させた細胞における膜局在を確認した後、両者を共発現する安定発現細胞を構築する。得られた細胞を用いてカチオン性薬物の経細胞輸送について検討を行い、分泌方向に相当する方向選択的な輸送が再構成されていることを示し、近位尿細管モデル細胞としての妥当性を確認する。

(2) MATE および OCT2 の N 末端および C 末端側の欠失変異体を作製し、細胞膜局在に必須となる領域を同定する。膜局在に必須と考えられる領域とグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質を作成する。得られた融合蛋白質を用いて、MDCK 細胞ならびに腎臓、小腸等の上皮組織由来の試料を用いてプルダウンアッセイを行い、上皮細胞における薬物トランスポータ結合蛋白質を同定する。その部分アミノ酸配列を解析し、得られた情報を基に薬物トランスポータ結合蛋白質の cDNA クローニングを行う。

(3) MATE および OCT2 のプロモーター領域を単離し、欠失変異体を作製する。ルシフェラーゼアッセイにより発現に必須な領域を決定し、その領域に結合する転写因子を同定する。

(4) MATE1 ノックアウトマウスを作製し、カチオン性薬物の体内動態、尿細管分泌における MATE1 の役割を明確にする。

4. 研究成果

(1) MDCK 細胞に hOCT1 または hOCT2 と hMATE1 を共発現させたところ、近位尿細管と同様に OCT は側底膜、MATE1 は頂側膜に局在することが確認された。この細胞を用いて、有機カチオン tetraethylammonium (TEA) の経細胞輸送につ

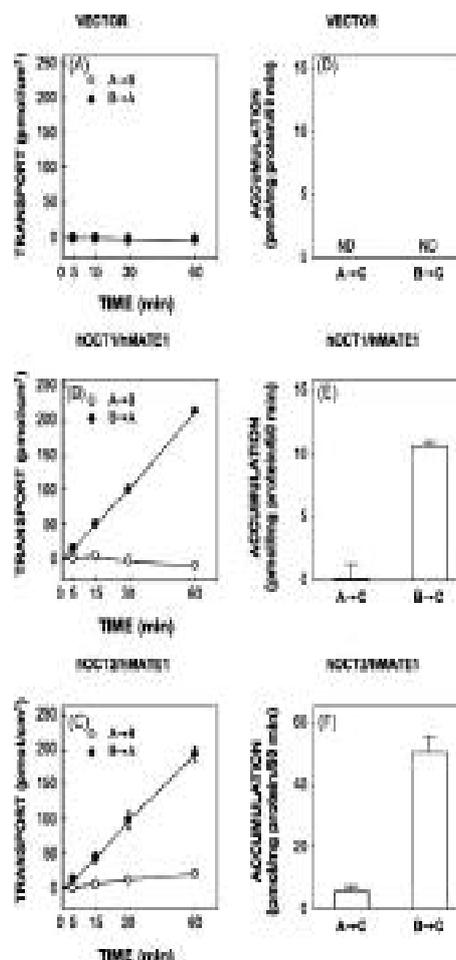


図1 hOCT/hMATE1 共発現 MDCK 細胞における TEA の経細胞輸送

いて検討したところ、側底膜側から頂側膜側への分泌方向に対応する方向選択的な TEA 輸送が認められた (図 1)。この細胞は尿細管分泌を受けるカチオン性薬物のスクリーニングや薬物相互作用の予測に有用なツールになるものであり、実際にこれまで詳細な尿細管分泌機序が不明であったキニジンが hOCT2/hMATE1 を介して分泌されることを実証できた。また、臨床報告されているシメチジンとメトホルミンの薬物相互作用は、側底膜側の hOCT2 ではなく管腔側の hMATE1 を介して生じていることを明らかにすることができた。

(2) MATE1 の N 末端または C 末端側に green fluorescent protein または V5 を tag として付加したコンストラクトを作成し、MDCK 細胞に安定発現させたところ、N 末端に tag を付加した場合には頂側膜に発現するのに対し、C 末端に tag を付加したものではほとんど発現が認められないことが明らかになった。従って、MATE1 の C 末端側の領域がその頂側膜への発現に重要であることが示唆された。そこで、MATE1 の C 末端側の欠失

変異体を構築し、細胞に発現させて局在を観察した結果、MATE1 の細胞膜局在に重要と考えられる C 末端側領域を決定することができた。

この結果を基に、MATE1 の C 末端領域と GST との融合タンパク質を作製し、プルダウンアッセイにより MATE1 に対する結合蛋白質の同定を試みたが、明確な結合蛋白質は同定できなかった。そこで、以下の検討では MATE1 の機能特性や薬物動態学的役割について詳細に解析するとともに、有機カチオントランスポータの発現制御機構について検討を進めた。

(3) 有機カチオントランスポータのプロモーター解析を行った結果、OCT1 の基礎転写には USF1, USF2, OCT2 には USF1, MATE1 では Sp1 が関与していることが明らかになった。また、これらのプロモーター領域における遺伝子多型を見だし、ヒトにおける発現の個体間変動に関わっている可能性を示した。さらに、OCT2 の腎臓特異的発現には DNA のメチル化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの知見は、薬物トランスポータの発現の個体間変動、ひいては薬物動態の個体差を解明する上で有用なものであると考える。

(4) Mate1 ノックアウトマウスを作製し、Mate1 が完全に欠損していることを確認した。このマウスは正常に発達し、見かけの表現型は野生型マウスと変わらず大きな異常は認められなかった。このマウスにメトホルミンを静注したところ、メトホルミンの血中濃度は顕著に上昇し、明確な排泄遅延が認められた(図 2)。この時メトホルミンの尿中排泄は著しく減少しており、分泌クリアランスの低下に起因するものであることが判明した。この後、このマウスを用いることで、カチオン性薬物の尿中排泄における MATE1 の寄与が明確にできるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Tsuda M, Terada T, Mizuno T, Katsura T, Shimakura J, Inui K. Targeted disruption of the multidrug and toxin extrusion 1 (mate1) gene in mice reduces renal secretion of metformin. *Mol. Pharmacol.*, 75: 1280-1286 (2009) 査読有

Tsuda M, Terada T, Ueba M, Sato T, Masuda S, Katsura T, Inui K. Involvement of human multidrug and toxin extrusion 1 in the drug

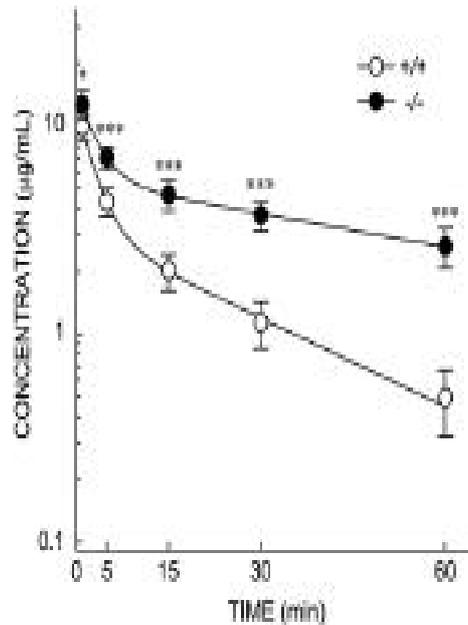


図 2 Mate1 ノックアウトマウスにおけるメトホルミン静注後の血中濃度推移

interaction between cimetidine and metformin in renal epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 329: 185-191 (2009) 査読有

Kajiwara M, Terada T, Ogasawara K, Iwano J, Katsura T, Fukatsu A, Doi T, Inui K. Identification of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) variants with complete loss of transport activity. *J. Hum. Genet.*, 54: 40-46 (2009) 査読有

Kajiwara M, Terada T, Asaka J, Aoki M, Katsura T, Ikai I, Inui K. Regulation of basal core promoter activity of human organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1). *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 295: G1211-G1216 (2008) 査読有

Sato T, Masuda S, Yonezawa A, Tanihara Y, Katsura T, Inui K. Transcellular transport of organic cations in double-transfected MDCK cells expressing human organic cation transporters hOCT1/hMATE1 and hOCT2/hMATE1. *Biochem. Pharmacol.*, 76: 894-903 (2008) 査読有

Aoki M, Terada T, Kajiwara M, Ogasawara K, Ikai I, Ogawa O, Katsura T, Inui K. Kidney-specific expression of human organic cation transporter 2 (OCT2/SLC22A2) is regulated by DNA methylation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 295: F165-F170 (2008) 査読有

Ogasawara K, Terada T, Motohashi H, Asaka J, Aoki M, Katsura T, Kamba T, Ogawa O, Inui K. Analysis of regulatory

polymorphisms in organic ion transporter genes (SLC22A) in the kidney. *J. Hum. Genet.*, 53: 607-614 (2008) 査読有

Kajiwara M, Terada T, Asaka J, Ogasawara K, Katsura T, Ogawa O, Fukatsu A, Doi T, Inui K. Critical roles of Sp1 in gene expression of human and rat H⁺/organic cation antiporter MATE1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 293: F1564-F1570 (2007) 査読有

Yokoo S, Yonezawa A, Masuda S, Fukatsu A, Katsura T, Inui K. Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 74: 477-487 (2007) 査読有

Tanihara Y, Masuda S, Sato T, Katsura T, Ogawa O, Inui K. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusion/H⁺-organic cation antiporters. *Biochem. Pharmacol.*, 74: 359-371 (2007) 査読有

Asaka J, Terada T, Tsuda M, Katsura T, Inui K. Identification of essential histidine and cysteine residues of the H⁺/organic cation antiporter multidrug and toxin extrusion (MATE). *Mol. Pharmacol.*, 71: 1487-1493 (2007) 査読有

Asaka J, Terada T, Ogasawara K, Katsura T, Inui K. Characterization of the basal promoter element of human organic cation transporter 2 gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 321: 684-689 (2007) 査読有

Nishihara K, Masuda S, Ji L, Katsura T, Inui K. Pharmacokinetic significance of luminal multidrug and toxin extrusion 1 in chronic renal failure rats. *Biochem. Pharmacol.*, 73: 1482-1490 (2007) 査読有

[学会発表](計11件)

Tsuda M et al., Comparison of functional characteristics of H⁺/organic cation antiporters MATE1 and MATE2-K. 2008 American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition, Nov. 18, 2008, Atlanta, USA.

Ogasawara K et al., Regulation of kidney-specific expression of human organic cation transporter 2 (OCT2/SLC22A2) by DNA methylation. 2008 American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition, Nov. 18, 2008, Atlanta, USA.

岩野淳子ら、ヒト MATE1 の機能的発現における翻訳後プロセッシングの重要性、第23回日本薬物動態学会年会、平成20年10月31日、熊本市。

Kajiwara M et al., Promoter analyses of

human and rat H⁺/organic cation antiporter (MATE1). 8th International Society for the Study Xenobiotics International Meeting, Oct. 10, 2007, Sendai, Japan.

Nishihara K et al., Expressional and functional changes in rat H⁺/organic cation antiporter MATE1 in chronic renal failure. Biomedical Transporters 2007, Aug. 13, 2007, Bern, Switzerland.

Tanihara Y et al., Structural characteristics and substrate specificity of hMATE2-K. Biomedical Transporters 2007, Aug. 13, 2007, Bern, Switzerland.

Yokoo S et al., OCT and Mate families are key transporters in platinum agents-induced nephrotoxicity. 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery, June 21, 2007, Kanazawa, Japan.

Katsura T et al., Drug-drug interaction and its importance for the safe and effective pharmacotherapy. 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery, June 20, 2007, Kanazawa, Japan.

佐藤朋子ら、hOCT/hMATE ダブルトランスフェクタントの構築と経細胞輸送解析、日本薬剤学会第22年会、平成19年5月22日、さいたま市。

Terada T et al., Functional roles of cysteine and histidine residues in rat H⁺/organic cation antiporter MATE1. Pharmaceutical Sciences World Congress 2007, Apr. 25, 2007, Amsterdam, Netherlands.

Tsuda M et al., Identification of a driving force of H⁺/organic cation antiporter rat and human MATE1 using plasma membrane vesicles. Pharmaceutical Sciences World Congress 2007, Apr. 25, 2007, Amsterdam, Netherlands.

6. 研究組織

(1)研究代表者

桂 敏也 (KATSURA TOSHIYA)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10283615

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし