

平成23年 5月 13日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590059

研究課題名（和文）哺乳動物における新規薬物排出輸送体MATEの構造と機能及び相互作用

研究課題名（英文）The structure and function of new drug excreting transporter “MATE” in mammal.

研究代表者

大塚 正人 (OOTSUKA MASATO)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：30243489

研究成果の概要（和文）：

肝臓及び腎臓における薬物排出を司る transepithelial 輸送に関与するトランスポーター分子は数種類存在している。これらのトランスポーター分子群は協奏的に機能して薬物排出機能を発揮していると考えられている。このことから、腎臓の糸球体における薬物の排出は厳密に制御された機構により調節されていると予想される。すなわち MATE が何らかの活性調節を受けている可能性が示唆された。また、MATE の C 末端付近には比較的長大な可溶性の部分が存在している。この仮定に基づき MATE の親水性領域等に相互作用する制御分子を探索した。その結果数種の機能性タンパク質が同定出来た。

研究成果の概要（英文）：

There are so many transporters in kidney and these transporters are concerned about transepithelial transport. These transporters don't work alone but may be working together. From this idea, drug excretion is precisely controlled and these should be well organized mechanism. MATE transporter is also controlled with these mechanism. In MATE transporter, there is long tail in C-terminus region, so, in this region should have some function for regulation. From this hypothesis, several functional proteins are identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生化学 薬物排出 輸送体 有機カチオン 薬物副作用軽減

1. 研究開始当初の背景

腎臓や肝臓の細胞膜上に発現するトランスポーター群は、その多様な分子認識・輸送機構と発現分布によって代謝物や薬物の排泄過程に対して重要な役割を担っている。この排出は上皮細胞の basolateral 側と apical 側の 2 つの細胞膜を介した transepithelial 輸送であり、複数のトランスポーターが関与している。血液中の有機カチオン性代謝老廃物は OCT (organic cation transporter) により basolateral 側から取り込まれ、比較的高分子の化合物は apical 側に存在する MDR (multidrug resistance factor) によって排泄されている。しかし、低分子の有機カチオンは H^+ との交換輸送で排泄されることは知られていたが、いまだにその実体は解明されていなかった)。細菌の MATE (multidrug and toxin extrusion) はもともと最近になって同定された多剤排出トランスポーターであり、動物・植物にも類似の蛋白質が存在していることがデータベース解析により示唆されていた。しかしその機能は全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

私は、MATE ファミリーの輸送体の哺乳類における orthologue が OC の最終段階の排出を担っていると推定した。私は、このヒト及びマウスの MATE orthologue 2 種をそれぞれ同定し、MATE1 及び、MATE2 と名付けた。そしてそれらが肝臓及び腎臓において排泄の最終段階を担う OC/ H^+ トランスポーターの分子実体そのものであることを証明した (Otsuka M, et. al.: A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic

cation Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2005.)。私が明らかにした MATE タンパク分子群は、肝臓・腎臓以外にも性ホルモン等の分泌臓器に発現しており、生体内において多様で重要な役割を果たしていると考えられる。MATE トランスポーターの機能についての研究は生体内における有機薬物輸送・排泄の全貌解明のみならず、脂溶性ホルモン分泌機構なども含めた有機薬物の輸送メカニズムの全貌解明に直結していると思われる。本研究において私は、1. MATE1 及び MATE2 の構造と機能の決定及びその輸送メカニズムを解明する。これまでのデータベース解析により、哺乳類における MATE orthologue は MATE1, 2 以外にさらにもう 1 種類存在していることが示唆されている。申請者は既にその遺伝子断片をヒト組織より単離している。そこで、2. 第 3 の MATE orthologue となる MATE3 の cDNA 全長クローニングを行い、機能を解析する。また、肝臓及び腎臓における薬物排出を司る transepithelial 輸送に関与するトランスポーター分子は数種類存在しているので、これらのトランスポーター分子群は協奏的に機能して薬物排出機能を発揮していると考えられる。このことから、腎臓の糸球体における薬物の排出は厳密に制御された機構により調節されていると予想される。すなわち MATE が何らかの活性調節を受けている可能性が示唆される。また、MATE の C 末端付近には比較的長大な可溶性の部分が存在している。この仮定に基づき 3. MATE の親水性領域等に相互作用する制御分子を探索する。

②この研究を遂行することにより、今まで全く実体が解明されていなかった排泄の最終段階を担う MATE トランスポーター群の

構造と機能の全体像を明らかにすることが出来る。MATE を介した薬物輸送機構の制御機構が解明出来れば、薬物の腎毒性の分子機構の解明や薬物の薬効を最大限に発揮させ、毒性を最小限にするような理想的な薬剤投与のコントロールが可能となる。哺乳動物の MATE ホモログ cDNA を網羅的にクローニングすることにより、MATE による代謝物輸送の全体像を明らかにすることが出来る。予備的な実験結果より、MATE は疎水性ホルモンの分泌組織に多く発現していた。MATE タンパク質は肝臓や腎臓での薬物排出のみならず、脂溶性ホルモンをはじめとする生体内の機能有機分子の輸送・分泌・再吸収等に直接関わる非常に重要な分子であると考えられる。これまで微生物において多剤薬物輸送体として認識されていた MATE トランスポーターファミリーの分子群が実は、哺乳動物においては薬物排泄の最終段階を担う OC/H^+ トランスポーターであるという申請者の発見は、他の追随を許さない独創性があるものと自負している。

3. 研究の方法

(1) MATE1 分子の構造と機能の解明

我々の研究グループにより哺乳動物における MATE 輸送体は様々な種で確認されており、左図に示すように主に 3 つのタイプに分類されることが明らかになった。ハイドロパシー解析によると、それらは共通して、1 2 回膜貫通型の膜タンパク質であり、膜貫通領域にはいくつかの極性アミノ酸残基が存在している。当研究室は現在までに MATE のプロトタイプの *Vibrio Parahaemolyticus* 由来の NorM に関して機能性アミノ酸残基を同定している (*J Bacteriol*, 2005)。NorM の薬物輸送に関与する機能性アミノ酸残基は、膜貫通領域に存在している酸性アミノ酸残基であった。バ

クテリア由来の MATE トランスポーターの NorM は、ヒト MATE1 とタンパク質レベルで 23.6 % の相同性しかないが、これらの酸性アミノ酸残基のうちの 2 つはヒト及びマウスの MATE1 及び MATE2 で保存されていた。以上のことから、哺乳類の MATE においてもこれらの酸性アミノ酸残基を含む極性アミノ酸残基が、MATE の基質認識機構や、プロトンとの交換輸送機構に直接関係していることが予想される。これらの予想を基に MATE1 の点変異体を複数作製する (図 2 に示す極性残基部分: E278A, E319A, H386A, E389A 等)。そして、TEA (テトラエチルアンモニウム) の取り込み活性に与える影響を RI トレーサー実験により調べる。この結果より機能性アミノ酸残基を決定する。また、MATE1 変異体の基質特異性や、輸送活性に及ぼす pH の影響に対する変化についても詳細に解析を行うことによって、 OC/H^+ 交換輸送における基質認識機構や、プロトンとの交換輸送機構を解明する。実際に既に私はヒト MATE1 の膜貫通領域にある極性アミノ酸のうち、E273Q の点変異体を作成し HEK293 細胞に発現させたところ (図 5 A)、TEA の輸送活性は完全に消失した (図 5 B) (*PNAS* 2005,)。他の膜貫通領域にある極性アミノ酸について同様の実験を行い、MATE1 の構造と機能解明の手がかりを得る。また、MATE1 の機能と構造を理解する上でその分子単体に注目し、大量発現・精製及びそのリポソームへの再構成系を確立する。大量発現系は、昆虫細胞を用いた発現系を用いる。申請者の研究室ではすでに、哺乳類の小胞型グルタミン酸トランスポーターについて、昆虫細胞を用いた発現系を用い大量発現に成功している。さらに、MATE1 の機能と構造を理解する上でその分子単体に

注目し、大量発現・精製及びそのリポソームへの再構成系を確立する。申請者の研究室ではすでに、哺乳類の小胞型グルタミン酸トランスポーターについて、昆虫細胞を用いた発現系を用い大量発現に成功している。また、大量発現したタンパク質を精製・リポソームに再構成し、活性の測定を行う系を既に構築済みである。こうした技術を MATE タンパク質の機能解析に応用する。輸送測定で基質と H⁺の化学平衡を測定する。また、化学修飾等を行う。リン酸化等での輸送の制御を調べる。

(2) MATE の脂溶性ホルモン輸送の生理的意義の解明

これまでの申請者の研究により、マウスにおいて MATE ホモログの一つである、mMATE1 は肝臓・腎臓・心臓に発現していた。一方、mMATE2 は精巣のみに特異的に発現していることを明らかにした。これらの知見は、MATE タンパク質が肝臓や腎臓での薬物排出のみならず、脂溶性ホルモンをはじめとする生体内の機能有機分子の輸送・分泌・再吸収等に直接関わる非常に重要な分子であるということを示唆している。これまで、脂溶性ホルモン等は容易に細胞膜を通過し、その分泌は拡散によって行われていると見なされている。しかしながら非常に低濃度で作用するホルモン等の分子が何の制御も受けずに拡散によって分泌されているということは信じがたい。現在までの申請者の研究では、mMATE2 における TEA の輸送活性は、テストステロンにより阻害されることが分かっている。従って mMATE2 が性ホルモンのような脂溶性ホルモンの輸送・分泌に関与している可能性が高い。この可能性を追求した。

我々は MATE1 が腎臓における major protein であり、OC の排出の最終段階を担

っていることを明らかにした。この部位では他の有機イオン性化合物輸送体が協奏的に有機カチオン排泄に関わっている。このことから、腎臓における薬物の排出は厳密に制御された機構により調節されており、MATE1 が何らかの活性調節を受けている可能性が示唆される。この仮定に基づき MATE1 の親水性領域等に相互作用する制御分子を探索する。最近我々は、hMATE1 のカウンターパートと考えられる C 末端領域に非常に長い可溶性部分を有する mMATE1 B を発見した (Arch. Biochem. Biophys. in press.)。この C 末端領域に焦点を当てて MATE1 と相互作用するタンパク質を免疫沈降により調製、マスマスペクトロメトリーによりプロテオーム解析し、その分子実体を同定する。また、two-hybrid 法を利用した解析も行った。

(3) 第3の MATE の cDNA のクローニングとその機能と生理的意義の解明

申請者は、MATE1 及び MATE2 の cDNA クローニングとそれらの機能解析を行い、これらがプロトン共役性の OC 輸送体であると証明したが、これまでのデータベース解析により、哺乳類における MATE ホモログはさらにもう 1 種類存在していることが分かった。その第3の MATE ホモログのアミノ酸配列は、MATE1 及び MATE2 とそれぞれ 78.3% 及び 69.8% の相同性がある。申請者は既にその cDNA の一部断片をヒト組織より単離している。そこで、第3の MATE ホモログとなる MATE3 の cDNA 全長クローニングを行い、動物細胞発現系において機能を解析する。また、得られた cDNA より、MATE3 の部分ペプチドを大量発現・精製する。それを抗原として MATE3 特異的な抗体を作成し、MATE3 の発現部位を特定し、MATE1-3 のトランスポーター分子群がそれ

ぞれの組織でどのような特有の機能を果たしているのかその全貌解明を目指す。

4. 研究成果

ここ10年で、肝臓及び腎臓において排泄に関与するトランスポーターの大部分の分子実体は同定されてきた。しかし、排泄の最終段階を担うOC /H⁺ トランスポーターに関しては、いまだにその実体は解明されていなかった。哺乳動物におけるMATEファミリー輸送体の研究・報告は皆無であり、申請者の報告が最初である。(PNAS 2005.) 我々の研究によりMATEを通じて生体における薬物排出の全貌を知ることが出来るようになった。さらに、脂溶性ホルモンをはじめとする生体内の機能有機分子の輸送・分泌・再吸収等の研究の幕が開けたといえる。

申請者はこれまでにバクテリアのMATEファミリーの輸送体のプロトタイプである *Vibrio Parahaemolyticus* 由来の NorM に関して機能性アミノ酸残基を同定している (**Otsuka M, et al.**: Identification of essential amino acid residues of the NorM Na⁺/multidrug antiporter in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*, 187, 1552-1558. 2005)。それらのアミノ酸残基はいずれも NorM の膜貫通領域に存在する酸性アミノ酸残基であった。NorM におけるこれらの酸性アミノ酸残基は哺乳動物の MATE においても大部分が保存されており、哺乳動物における MATE ファミリー分子の機能と構造を理解する上でこの成果は有用な情報になる。実際に既にヒト MATE1 蛋白質の機能アミノ酸残基の一つを同定している。また、最終目的であった、MATE の親水性領域等に相互作用する制御分子を探索した。その結果数種の機能性タンパク質が同定出来た。

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 2 件)

1. **Otsuka M**, Komatsu T, Hiasa M, Kanamoto T, Matsumoto T, Moriyama Y and Omote H. Characterization of the human MATE2 proton-coupled polyspecific organic cation exporter. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Jun;43(6):913-8. Epub 2011 Mar 17.

2. Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, **Otsuka M**, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Vol.105, No. 15 pp. 5683-5686. National Academy of Sciences

[学会発表] (計 4 件)

1. 小田和昌、**大塚正人** ヒト MATE 型のトランスポートソーム解析 日本薬学会 (岡山) 平成 22 年 3 月

2. **大塚正人**、松本拓也、日浅未来、表 弘志、森山芳則 Molecular characterization of the human MATE2 polyspecific H⁺/organic cation exporter. 第 81 回日本生化学会大会, 第 31 回日本分子生物学会年会, BMB2008 (神戸) 平成 20 年 12 月

3. 澤田啓介、越後典子、樹下成信、宮地孝明、日浅未来、**大塚正人**、表 弘志、森山芳則 小胞型 ATP トランスポーターの同定と機能解析 第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 第 21 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 平成 20 年 8 月

4. 居原田真史、樹下成信、日浅未来、**大塚正人**、表弘志、森山芳則 小胞型グルタミン酸トランスポーター 1 (VGLUT1) 及び VGLUT1R の機能解析 日本薬学会第 128 年会 (横浜) 平成 20 年 3 月

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/grcweb/otsuka/otsuka.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 正人 (OTSUKA MASATO)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号 : 30243489

