

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590062

研究課題名(和文)イオン輸送を伴うトランスポーターの輸送分子機構の解明

研究課題名(英文)Characterization of molecular mechanism of electrogenic transporters accompanying ion movement

研究代表者

宮内 正二(MIYAUCHI, Seiji)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：30202352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イオン輸送を伴う起電性輸送担体の分子機構の解明を目的として研究を行い、以下の結果を得た。

(1) 光駆動性クロライドポンプにおけるCl⁻の細胞外から細胞内へのタンパク内移動には、Ser130とレチナルシッフ塩基に形成される水素結合が分子弁の役割を果たし、細胞質側から細胞外側に逆流が起こらないよう機能していた。

(2) H⁺/オリゴペプチド共輸送担体における、第二膜貫通領域に存在する輸送活性中心His57と水素結合ネットワークを介して相互作用し、輸送活性調節に関与するアミノ酸残基Ser302を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular mechanism of the electrogenic transporter accompanying ion movement, we precisely determined the transport of halorhodopsin, a light-driven Cl⁻ pump (pHR) and human oligopeptide transporter (hPEPT1).

(1) The crystal structure (PDB:3QBG) of pHR clearly shows that the amino acid residue, Ser 130 is located in the vicinity of the protonated Schiff base and forms the hydrogen bond to the Schiff base. Based on the Cl⁻ transport activities of mutant Ser130, it has turned out that Ser130 coordinates with PBS and functions as a molecular valve to hinder the internal leak, backflux of Cl⁻ during anion-transport cycle.

(2) We demonstrated that mutation of Ser302 located in the vicinity of His57 in PEPT1 caused the alkaline shift of the optimum pH in the transport activity. This shift demonstrates that the hydroxyl group of Ser302 forms the hydrogen-bonding with the imidazole of His57, which might keep the uptake activity optimum in the range of physiological intestinal pH.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：トランスポーター 分子弁 オリゴペプチドトランスポーター 光駆動性イオンポンプ 水素結合ネットワーク pKaシフト 輸送サイクル

1. 研究開始当初の背景

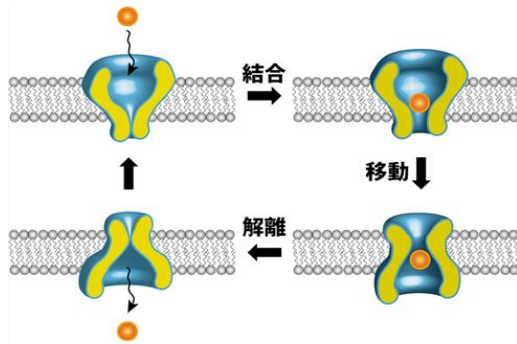


図1: トランスポーターの輸送機構の本質

申請者のトランスポーターに対する基本的考えは、上図に要約される。トランスポーターはダイナミックな構造変化を引き起こしながら、基質輸送を行うと考えられている。その輸送過程は、1 (基質取込み側の基質ポケットへの結合、基質との親和力は強い) + 2 (分子内移動) + 3 (基質放出側のポケットからの解離、解離時には基質との親和力は弱い) の3つの要素から成り立っている。基質が結合したり、解離したりする際の基質を包み込むポケットがどうなっているか? 分子内移動とは基質を取り込み側ポケットから放出側ポケットへ移動させる事であるが、それはどのような分子的機構か? 能動輸送の場合は、基質との親和力の変化はどうしておこるのか? 等を理解する事が輸送担体の輸送機構を知ることであると考えている。近年、幾つかのトランスポーターについてX線結晶構造が報告され、トランスポーターの輸送分子機構は明らかにされつつある。しかしながら、ダイナミックな構造変化を引き起こすと考えられているトランスポーターの輸送分子機構の全容解明には至っていない。これまで、申請者はトランスポーター輸送分子機構の解明を目指して、Microbial rhodopsin の1種である光駆動性クロライドポンプ、ハロロドプシン (pHR) をモデルタンパクとして用い、研究を行ってきた。pHRは、レチナルを発色団とする膜タンパクであり、光でCl⁻を細胞の外から内へ輸送する。この膜タンパクは研究上他のトランスポーターにはない利点を持っている。それらは、1) タンパク質の構造変化が可視吸収の時間変化として追えること、2) X線構造解析がされていること、3) 我々の研究室にて大量発現系が構築されている事、4) 変異タンパクの作成が出来ること、更に、5) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学的手法による高感度、高時間分解能でのイオン輸送測定法が確立していることである。

このモデルトランスポーターを用いて、以下に示すトランスポーターにおける基質輸送の本質について明らかにすることができた。基質を輸送する際に、逆流を防ぐための分子弁として機能するアミノ酸残基の存在、光エネルギーを基質輸送の駆動力へ変換する装置の存在、基質を結合解離に必須なアミノ酸残基の存在を示唆

する結果が得られている。これらアミノ酸残基がどのような分子機構を用いて、その機能的役割を果たしているか明らかにすることは、トランスポーターにおける輸送分子機構の本質を解明する一助になると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、トランスポーターの輸送機構の本質、(1) 基質結合、(2) タンパク質内移動、(3) 膜の反対側での解離の輸送分子メカニズム (図1参照) を明らかにすることである。先ず、物理化学的測定に適したモデルトとしてのトランスポーター、光駆動性クロライドポンプ (ハロロドプシン (pHR)) を用いて、Cl⁻輸送に關与するアミノ酸残基とその役割を明らかにする。更に、解明された作動メカニズムを参考に、H⁺濃度勾配を利用してジペプチドから医薬品まで能動輸送するヒトH⁺/オリゴペプチド輸送担体 (hPEPT1) の輸送分子機構の解明へと新展開させる。

計画している具体的研究項目は、pHRにおけるCl⁻逆流防止の分子弁の作動メカニズムの解明、Cl⁻輸送に伴ったpHRにおけるシッフ塩基のpK_a低下における分子機構とCl⁻輸送の駆動力への転換機構の解明、hPEPT1における逆流防止の分子弁の同定、hPEPT1の輸送活性を調節する機構とその意義の解明の5項目である。

3. 研究の方法

(1) pHRをアフリカツメガエル卵母細胞膜に発現させ、電気生理学的手法により光照射によるCl⁻輸送を外向き誘起電流として測定した。

(2) hPEPT1をアフリカツメガエル卵母細胞膜に発現させ、電気生理学的手法により、典型的な基質Gly-Sar輸送に伴う内向き誘起電流を測定し、輸送活性を見積もった。

(3) hPEPT1大量発現細胞を用いて、アミノ酸修飾薬を用いて、典型的な基質Gly-Sarの取り込み活性を測定した。

4. 研究成果

(1) pHRにおける細胞内でのCl⁻の逆流防止弁の存在とその分子機構

X線結晶構造から予測される通過ルートに基づいて作成した各変異体の「輸送能力」を測定した。光照射によるCl⁻輸送は、外向き光誘起電流として見積もった。細胞内領域における変異体はほとんど、活性に影響を及ぼさなかった。一方、Cl⁻輸送を顕著に変化させる変異体は、細胞外領域、特に、基質結合ポケットの変異体であり、基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基が輸送において重要であることが示された。その中でもSer130におけるS130T変異体は、外向き光誘起電流を発生させる能力があるが、光を照射時、負の膜電位をかけるとCl⁻が逆流する変異体、即ち、ポンプとしての機能が崩壊している変異体であった。言い換えれば、この結果は、Ser130が負の膜電位によるCl⁻の逆流を防ぐ分子弁として働いていることを示唆したものである。実際、

Ser130 はシッフ塩基近傍に位置し、シッフ塩基と水素結合を形成している。この水素結合が Cl⁻ の分子弁の実体であると考えられている。更に、Cl⁻ 輸送時において、シッフ塩基の pK_a が低下することが明らかにされ、基質結合ポケットを構成する Asp252 が、シッフ塩基の pK_a の低下に大きく寄与していた。これらより、Asp252 は、逆流を抑える分子弁として機能している Ser130 と協奏し、光エネルギーを Cl⁻ の駆動エネルギーへと変換させる重要な役割、即ち、細胞外から細胞内へと Cl⁻ を移動させる、はじき出し器 (flipper) の役割を果たしていると推察された。現在、このモデルが正しいか分子理化学モデルにより検証中である。

(2) hPEPT1 における分子弁の存在とその分子機構

hPEPT1 は細胞の外側から内側への H⁺ の電気化学ポテンシャル差を駆動力として基質を能動的に輸送する。一方、この輸送活性は細胞外 H⁺ 濃度によって活性調節を受けるといった性質を有している。我々は、この両者に関わる必須アミノ酸残基が His57 であること、基質輸送の活性中心であることを明らかにした (*Biol Pharm Bull*, 29: 997-1005, 2006)。近年、hPEPT1 類似のオリゴペプチド輸送担体 PEPT_{so} の結晶構造 (PDB: 2XUT) が明らかにされた。この結晶構造に基づき、PEPT のホモロジーモデリングを行った。基質のタンパク質内移動に重要である分子弁は、輸送活性に必須なアミノ酸残基 His57 の近傍にあるという作業仮説に基づき、His57 近傍の解析を行った (図 2)。結果、His57 と水素結合が可能な距離にアミノ酸残基 Ser302 および Asn620 が存在し、His57 と Ser302 との間の水素結合により、基質輸送に関わる分子弁を形成する可能性を見出した。そこで、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、Ser302 の変異体の取り込み活性の pH 依存性を検討した (図 3)。これまでの研究により、His57 残基の pK_a は輸送活性の pH 依存性の至適 pH を示すことが明らかとなっている。変異体においては、この至適 pH がアルカリ側にシフト、即ち、His57 の pK_a が大きく増大しており、Ser302 は His57 との水素結合を形成し、細胞内外を分ける分子弁として働いていることが示唆された。

(3) Ser 残基修飾薬の hPEPT1 の輸送活性の pH 依存性に及ぼす影響

hPEPT1 大量発現細胞 HeLa 細胞を用いて、Ser 残基修飾薬 PMSF の pH 依存性輸送活性への影響を検討した。典型的な基質 Gly-Sar の取り込み活性は、この Ser 残基修飾薬により、余り影響を受けなかった。このことは、His57 と Ser02 との間の水素結合は、化学修飾薬による修飾を受けるほど Ser 残基を活性化されていないことが明

らかとなった。即ち、His57 は通常は、Ser302 との間に弱い水素結合を形成している。輸送に際しては、His57 は別のアミノ酸残基と新たな水素結合を形成し、基質輸送を行っているのでは推察された。この作業仮説に基づいて、現在、新たな水素結合形成するアミノ酸残基を検討中である。

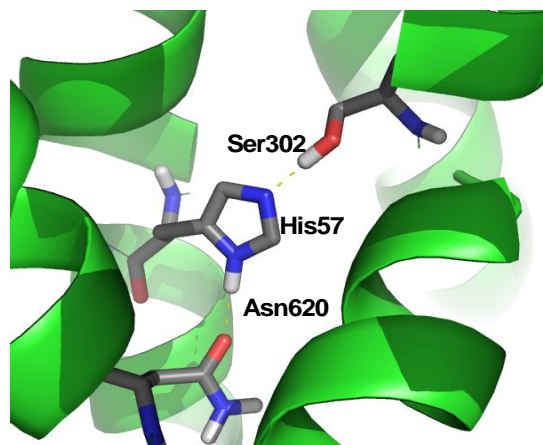


図 2 PEPT_{so} の結晶構造に基づいて得られた PEPT の活性中心 His57 近傍

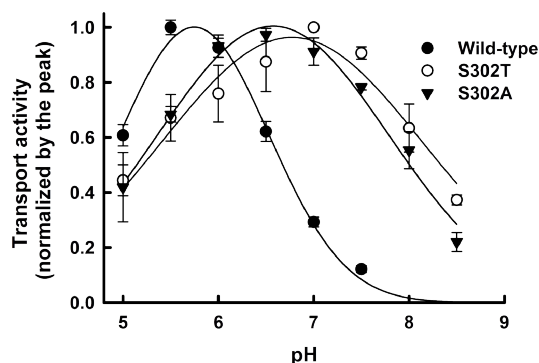


図 3 Ser302 の変異による His57 の pK_a のアルカリ側へのシフト

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 10 件)

Hayashi, S., Tamogami, J., Kikukawa, T., Okamoto, H., Shimono, K., Miyauchi, S., Demura, M., Nara, T., and Kamo, N. Thermodynamic parameters of anion binding to halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis* by isothermal titration calorimetry, *Biophys Chem* 172: 61-67 (2013). (査読有り)

Osanai H., Ikehara T., Miyauchi S., Shimono K., Tamogami J., Nara T., Kamo N. A study of the interaction of drugs with liposomes with isothermal titration calorimetry, *J Biophys Chem*

4: 11-21 (2013) DOI:10.4236(査読有り)

Tsukamoto, T., **Kikukawa, T.**, Kurata, T., Jung, K. H., Kamo, N., and Demura, M. Salt bridge in the conserved His-Asp cluster in Gloeobacter rhodopsin contributes to trimer formation, *FEBS Lett*, 587: 322-327 (2013). (査読有り)

Tamogami, J., **Kikukawa, T.**, Nara, T., Shimono, K., Demura, M., and Kamo, N. Photoinduced proton release in proteorhodopsin at low pH: the possibility of a decrease in the pK(a) of Asp227, *Biochemistry* 51: 9290-9301 (2012). (査読有り)

Reissig, L., Iwata, T., **Kikukawa, T.**, Demura, M., Kamo, N., Kandori, H., and Sudo, Y. Influence of halide binding on the hydrogen bonding network in the active site of Salinibacter sensory rhodopsin I, *Biochemistry* 51: 8802-8813 (2012). (査読有り)

Tsukamoto, T., Sasaki, T., Fujimoto, K. J., **Kikukawa, T.**, Kamiya, M., Aizawa, T., Kawano, K., Kamo, N., and Demura, M. (2012) Homotrimer formation and dissociation of *pharaonis* halorhodopsin in detergent system, *Biophys J* 102: 2906-2915. (査読有り)

Yamashita, Y., **Kikukawa, T.**, Tsukamoto, T., Kamiya, M., Aizawa, T., Kawano, K., **Miyauchi, S.**, Kamo, N., and Demura, M. Expression of salinarum halorhodopsin in Escherichia coli cells: solubilization in the presence of retinal yields the natural state, *Biochim Biophys Acta* 1808: 2905-2912 (2011). (査読有り)

Wada, T., Shimono, K., **Kikukawa, T.**, Hato, M., Shinya, N., Kim, S. Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Tamogami, J., **Miyauchi, S.**, Jung, K. H., Kamo, N., and Yokoyama, S. Crystal structure of the eukaryotic light-driven proton-pumping rhodopsin, Acetabularia rhodopsin II, from marine alga, *J Mol Biol* 411: 986-998 (2011). (査読有り)

Kikukawa, T., Shimono, K., Tamogami, J., **Miyauchi, S.**, Kim, S. Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Jung, K. H., Yokoyama, S., and Kamo, N. Photochemistry of Acetabularia rhodopsin II from a marine plant, *Acetabularia acetabulum*, *Biochemistry* 50: 8888-8898 (2011). (査読有り)

Tateishi, Y., Abe, T., Tamogami, J., Nakao, Y., **Kikukawa, T.**, Kamo, N., and Unno, M. Spectroscopic evidence for the formation of an N intermediate during the photocycle of sensory rhodopsin II (phoborhodopsin) from *Natronobacterium pharaonis*, *Biochemistry* 50: 2135-2143 (2011). (査読有り)

[学会発表](計 10件)

増田雅行, 下野和実, 真坂 互, 宮内正二「アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いたヒト・ナトリウム依存性胆汁酸輸送担体(hNTCP)の機能解析」第134年会日本薬学会 2014年03月30日熊本市総合体育館, 熊本

Miyauchi Seiji. (Invited lecture) “The protonation state of a crucial residue, His57 in human oligopeptide transporter (hPEPT1) regulates the transport activity?” *The Asian Federation for Pharmaceutical Sciences (AFPS) 2013* November, 22 (2013) (Ramada Plaza, Jeju, South Korea)

Miyauchi Seiji. Shimono Kazumi, Nara Toshifumi. “Ser302 in Human Oligopeptide Transporter (hPEPT1) Regulates the Uptake Activity through a Hydrogen-bonding Interaction with the Crucial Residue, His57” 2013 American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition, November 13 (2013) (Gonzalez Convention Center, San Antonio, USA)

Miyauchi Seiji. (Invited lecture) “Na⁺ dependent opioid peptide transporter as a molecular target for drug development” *The First International Conference of Sugiyama Laboratory: Drug Discovery, Development and Optimization of ADME Properties*. September, 26 (2013) (Hibiya Convention Hall, Tokyo, Japan)

下野和実, 水谷賢人, 横山茂之, 宮内正二. 「無細胞タンパク質合成系を利用したヒト銅トランスポーター(hCtrl)の大量合成」第7回トランスポーター研究会 2012年06月09日 京都大学農学部(京都府)

米田真一郎, 宮内正二, 佐々木将太郎, 加茂直樹, 下野和実 「ヒトオリゴペプチド輸送担体(hPEPT1)の活性中心である His57 と Ser302 の相互作用」日本薬学会, 第27年会 2012年05月24日 神戸国際会議場(兵庫県)

Miyauchi, Seiji. (Invited lecture) “Human sodium-coupled monocarboxylate transporter (SMCT): Its physiological functions” 28th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences 2012, January 20 (Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand)

宮内正二, 米田真一郎, 佐々木将太郎, 下野和実 「H⁺/オリゴペプチド共輸送担体(hPEPT1)の活性中心His57近傍における水素結合とその役割」第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2011年11月25日 岡山大学創立五十周年記念館(岡山大学津島キャンパス, 岡山市)

Miyauchi Seiji, Shimono Kazumi, Nara Toshifumi, Kamo Naoki. "Characterization of human Na⁺/taurocholate (TCA) cotransporting polypeptide (hNTCP) with an electrophysiological technique", American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting 2011 October 25 Walter E. Washington Convention Center (Washington DC)

佐々木将太郎, 下野和実, 藤澤祐紀, 奈良敏文, 加茂直樹, **宮内正二**. 「H⁺/オリゴペプチド共輸送担体(hPEPT1)におけるHis57-Ser302水素結合による活性調節」第6回トランスポーター研究会年会 2011年6月11日東北大学 片平さくらホール(仙台)

〔図書〕(計 2件)

宮内正二「薬剤学実験法マニュアルII」日本薬剤学会出版委員会編, 第3章(薬物吸収)1節(経口投与)3項「In vivo 実験」(南江堂, 東京) pp55-62, 2014年4月

宮内正二「パートナー薬剤学」寺田勝英, 伊藤智夫編, 第4章5節「薬物の排泄」(南江堂, 東京) pp194-217, 2012年4月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 正二 (MIYAUCHI, Seiji)
東邦大学・薬学部・教授
研究者番号: 30202352

(2) 研究分担者

菊川 峰志 (KIKUKAWA, Takashi)
北海道大学・生端生命科学研究所(研究院)・講師
研究者番号: 20281842