

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860114

研究課題名(和文)腎MATEトランスポーターによるドパミン輸送と体液量調節との関連解明

研究課題名(英文)Critical role of MATE in renal dopamine secretion into tubular lumen

## 研究代表者

梶原 望渡(KAJIWARA, MOTO)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70645506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：塩分負荷におけるNa排泄の50%以上が腎臓の近位尿細管で合成されたドパミンに由来すると言われているが、作用部位である管腔への分泌機構は不明であった。本研究では、Multidrug and toxin extrusion (MATE)を管腔へのドパミン分泌機構候補として着目し、輸送実験やvolume expansion実験を行った。MATEを介したドパミン輸送はMichaelis-Menten型の飽和曲線を示し、Mate1ノックアウトマウスの尿中ドパミン量、Na量が野生型マウスと比較して低下したことから、MATEが尿細管管腔中へのドパミン分泌を媒介しNa利尿を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The intrarenal dopaminergic system is likely responsible for regulating over 50% of net renal salt and water excretion when salt intake increases. Although dopamine synthesis is localized at proximal tubular cells, the molecular mechanism underlying dopamine secretion into urine remains unknown. We analyzed transport properties of dopamine by human and mouse multidrug and toxin extrusion (MATE) and measured urinary dopamine and sodium in wild-type and Mate1 null mice. Dopamine uptake by MATE exhibits saturable kinetics. The amount of urinary dopamine and sodium was decreased in Mate1 null mice. In conclusion, MATE plays a critical role in dopamine secretion into tubular lumen and promotes natriuresis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：トランスポーター ナトリウム MATE ドパミン 利尿 腎臓

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体に投与された薬物の多くは肝臓や腎臓に移行した後、未変化体あるいは代謝物として胆汁中または尿中へと排泄される。このような経細胞輸送過程には、様々な特性を有する薬物トランスポーターとよばれる膜タンパク質が関わっている。腎臓におけるカチオン性薬物の局所動態は、血管側膜に発現する膜電位依存性有機カチオントランスポータ (OCT/SLC22A ファミリー) と、管腔側膜に発現する H<sup>+</sup>/有機カチオンアンチポーター、Multidrug and toxin extrusion (MATE/SLC47A ファミリー) によって制御されている。1994 年にラット organic cation transporter 1 (Oct1/Slc22a1) の cDNA がクローニングされて以来、膜電位依存性有機カチオントランスポータに関する研究が多方面にわたり進められてきたが H<sup>+</sup>/有機カチオンアンチポーターの分子実体は長らく不明であった。

MATE は 2005 年にクローニングされた H<sup>+</sup>/有機カチオンアンチポーターである。MATE の輸送機能、駆動力、組織分布に関する研究が展開された結果、MATE がメトホルミンをはじめとする多くのカチオン性薬物の体外への排泄に重要な役割を担うことが明らかにされた。一方、MATE が最も強く発現する腎臓は、異物解毒という機能に加えて体液の恒常性の維持を司っているが、腎の体液の恒常性維持という生理的役割に対する MATE の関与については未解明であった。

(2) ドパミンは Na 利尿に関与しており、高塩分食摂取時の Na 排泄の 50% が近位尿細管で合成されたドパミンに由来すると言われている。近位尿細管で合成されたドパミンは、管腔へと分泌され、各ネフロンに発現しているドパミン受容体に作用し、Na 利尿を制御する。しかし、近位尿細管管腔中へのドパミン分泌を媒介するトランスポーターは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、腎 MATE1 の新しい生理機能として、腎組織内で生合成されたドパミンによる Na 利尿制御因子としての役割解明を目指す。

3. 研究の方法

過剰発現系細胞を用いて、ヒト MATE1、MATE2-K 及びマウス MATE1 のドパミン輸送機能特性を解析する。また、阻害剤や Mate1 ノックアウトマウスを用いて volume expansion 実験(生理食塩水の多量静脈内投与による一過性の体液量負荷実験)を行うことで、尿中ドパミン分泌や Na 利尿における MATE の役割について明らかにする。

4. 研究成果

ヒト MATE1、MATE2-K 及びマウス MATE1 を一過性に発現させた HEK293 細胞を用いて輸送実験を行ったところ、<sup>3</sup>Hドパミン取り込みは基質濃度上昇に伴って飽和性を示し、ドパミンがヒトおよび、マウス MATE の基質となることが明らかとなった。

Michaelis-Menten 式を用いて算出した輸送活性のパラメーターの値 (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>) (表 1) より、ドパミンの輸送活性はマウス MATE1 で最も高いことがわかり、ヒト MATE1 およびヒト MATE2-K の輸送活性には差がないことが明らかとなった。腎臓の近位尿細管におけるヒト MATE1、MATE2-K の mRNA 発現量はほぼ同じであると報告されていることも考慮すると、管腔中へのドパミン分泌における MATE1 と MATE2-K の寄与は同程度であると考えられる。

表 1. Michaelis-Menten 式を用いて算出した輸送パラメーターの値

	hMATE1	hMATE2-K	mMATE1
K <sub>m</sub>	0.56 ± 0.18*	2.48 ± 0.65 <sup>‡</sup>	0.53 ± 0.08
V <sub>max</sub>	3.71 ± 0.15*	7.69 ± 1.12	8.73 ± 0.08 <sup>††</sup>
V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>	7.70 ± 1.67	3.44 ± 0.78 <sup>‡‡</sup>	17.20 ± 2.72 <sup>†</sup>

K<sub>m</sub> (mM)

V<sub>max</sub> (nmol · mg protein<sup>-1</sup> · 1 min<sup>-1</sup>)

V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> (μL · mg protein<sup>-1</sup> · 1 min<sup>-1</sup>)

\*P < 0.05, hMATE1 vs. hMATE2-K

<sup>‡</sup>P < 0.05, <sup>‡‡</sup>P < 0.01, hMATE2-K vs. mMATE1

<sup>†</sup>P < 0.05, <sup>††</sup>P < 0.01, hMATE1 vs. mMATE1

いずれも対応のない t 検定

また、腎臓中のドパミン合成刺激を目的に静脈内に infusion pump を用いて生理食塩液を持続投与し、マウスに水分負荷処置を行った。その結果、尿中  $\text{Na}^+$  排泄量は野生型マウスにおいて対照群の 12.3 倍に増大したが、*Mate1* ノックアウトマウスでは 1.5 倍に留まった。さらに、別の個体において、野生型マウスではドパミンの尿中排泄が認められるものの、*Mate1* ノックアウトマウスでは殆ど観察されず、腎臓中のドパミン量の増大が認められた。このことから、MATE トランスポーターが腎臓で合成されたドパミンを尿細管管腔へ分泌することがマウス *in vivo* で示された。

続いて、MATE 阻害薬を投与した後に、生理食塩液を持続投与し、マウスに水分負荷処置を行った。野生型マウスの  $\text{Na}^+$  排泄量は *Mate1* ノックアウトマウスと同程度であった。

以上の結果より、MATE は腎ドパミントランスポーターとして尿細管管腔中へのドパミン供給を媒介し  $\text{Na}^+$  利尿を促進することが明らかとなった (図 1)。

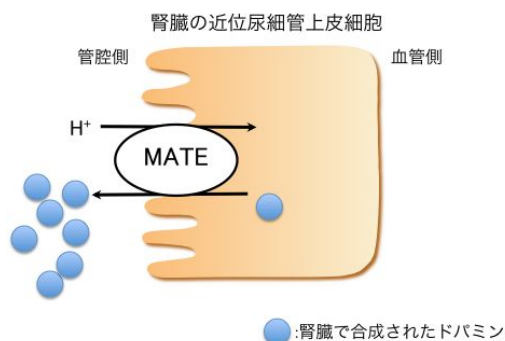


図 1. 腎臓の近位尿細管細胞におけるドパミンの局所動態

## 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 4 件)

(査読有)

Nakagawa S, Nishihara K, Miyata H, Shinke H, Tomita E, Kajiwara M, Matsubara T, Iehara N, Igarashi Y, Yamada H, Fukatsu A, Yanagita M, Matsubara K, Masuda S.

Molecular Markers of Tubulointerstitial Fibrosis and Tubular Cell Damage in Patients with Chronic Kidney Disease.

PLoS One, 10: e0136994. doi: 10.1371/journal.pone.0136994. 2015

(査読無)

梶原望渡, 松原和夫, 増田智先  
腎臓のトランスポーターの重要性  
くすりと糖尿病学会誌, 3(1), 32-35, 2014

米澤 淳, 梶原 望渡, 南 いく子, 大村 友博, 中川 俊作, 松原 和夫  
治験薬 GMP 基準の院内製剤製造によるトランスレーショナルリサーチへの貢献  
YAKUGAKU ZASSHI, 135(8), 943-947, 2015

梶原望渡, 増田智先  
腎臓のトランスポーターと化学療法剤  
化学療法の領域, 31(3), 394-398, 2015

〔学会発表〕(計 6 件)

梶原望渡, 増田智先, 伴毅, 松原和夫  
MATE トランスポーターはドパミン尿細管分泌による  $\text{Na}^+$  利尿の制御を担う  
第 4 回 Frot-J 学術集会 2013 年 8 月 24 日、経団連会館 (東京)

Moto Kajiwara, Tsuyoshi Ban, Kazuo Matsubara, Satohiro Masuda  
Role of tubular luminal  $\text{H}^+$ /organic cation antiporter, MATE, in natriuresis as a dopamine transporter  
KIDNEY WEEK 2013, Nov 7, 2013, Atlanta (USA)

梶原望渡, 松原和夫, 増田智先  
医薬品の適正使用に必要な最近の薬物動態学～腎臓のトランスポーターの重要性について～[招聘講演]  
第 2 回日本くすりと糖尿病学会学術集会 2013 年 11 月 23 日、星薬科大学 (東京)

Moto Kajiwara, Tsuyoshi Ban, Yuki Hanada, Kazuo Matsubara, Satohiro Masuda  
Multidrug and toxin extrusion transporters play a key role in natriuresis as a dopamine transporter  
Experimental Biology 2015, Mar 31, 2015, Boston (USA)

梶原望渡, 伴毅, 花田有希, 松原和夫, 増田智先  
MATE を介するドパミンの尿細管分泌は  $\text{Na}^+$  利尿を促進する  
第 58 回日本腎臓学会学術総会 2015 年 6 月 6 日、名古屋国際会議場 (名古屋)

Moto Kajiwara, Satohiro Masuda  
Critical role of renal H<sup>+</sup>/organic cation  
antiporter (multidrug and toxin extrusion) in  
natriuresis as a dopamine transportere  
BioMedical Transporters 2015, Aug 10, 2015,  
Lugano (Switzerland)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

梶原 望渡 (KAJIWARA MOTO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70645506

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし