

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16456

研究課題名（和文）薬物トランスポーターTETTRANの基質認識・輸送特性の解明

研究課題名（英文）The ligand recognition and transport mechanism of drug transporter TETTRAN

研究代表者

川崎 達也（Kawasaki, Tatsuya）

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：70722073

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）：インドメタシン輸送以外の機能未知のトランスポーターTETTRANについて、HEK293安定発現株を用いて基質・阻害剤探索を行い、カチオン性蛍光色素のrhodamine123が基質であることを見出した。Rhodamine123は、時間、濃度、およびpH依存的に輸送された。また、IC50が μM orderの阻害剤として、clonidine, decynium 22, diphenhydramine, YM-155, MPP+, pyrilamineを同定した。Competitive counter flow法を用いてdecynium 22は基質であることを推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトTETTRANは、腎臓に発現し抗炎症薬のインドメタシンを輸送すること、また、細胞に発現させるとインドメタシン耐性をもたらすことから、薬物や毒物の尿中排泄に寄与することが推測されていた。しかし、TETTRANによって輸送される薬物や輸送を阻害する薬物に関する情報がなく、TETTRANの機能は未知のままであった。本研究では、放射性標識などを必要とせず、定量が容易な蛍光基質を見出した。また、従来考えられていたアニオンではなく、種々カチオンが阻害剤となることを見出した。以上の知見は、TETTRANの機能を解析する上で有用な知見になりうるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Tetracycline transporter-like protein (TETTRAN) was expressed at luminal membranes of proximal tubules and transport indomethacin. However, little is known about its ligands and function. In this study, the ligand-recognition of TETTRAN was investigated using HEK293 cells stable cell line. The cationic fluorescent dye rhodamine123 was found to be a substrate. The rhodamine was transported in a time-, concentration, and pH-dependent manner. Clonidine, decynium 22, diphenhydramine, YM-155, MPP+, and pyrilamine are identified as inhibitors with IC50s on the order of micro M. Competitive counterflow assays suggested that decynium 22 is the substrate.

研究分野：生化学

キーワード：トランスポーター TETTRAN MFSD10

1. 研究開始当初の背景

Tetracycline transporter-like protein (TETTRAN) は、2007 年に酵母とヒトから見いだされた SLC 型トランスポーターの一種である (Mima S *et al. FEBS Lett.* **581**: 1457-63, 2007)。植物界には存在しないが、細菌、真菌、動物に広く存在する普遍的なトランスポーターである。ヒト TETTRAN は腎臓においては尿細管上皮刷子縁膜(管腔側)に局在し、抗炎症薬インドメタシンを輸送し、この輸送はジクロフェナク、メフェナク酸、エトドラクによって阻害される (Ushijima H *et al. Biochem Biophys Res Commn.* **374**: 325-330, 2008)。そのため、TETTRAN はアニオン性化合物の尿中排泄に関与することが示唆されていた。また、酵母における TETTRAN ホモログ Tpo1 はカチオン性化合物であるポリアミンを輸送することが報告されていた (Uemura T *et al. J. Biol. Chem.* **280**: 9646-9652, 2005)。しかし、それ以外の基質・阻害剤や機能については未知のままであった。

2. 研究の目的

本研究では TETTRAN の基質認識と輸送機構の解明を目的に、蛍光基質、阻害剤、competitive counter flow 法を用いた基質の探索を行った。

3. 研究の方法

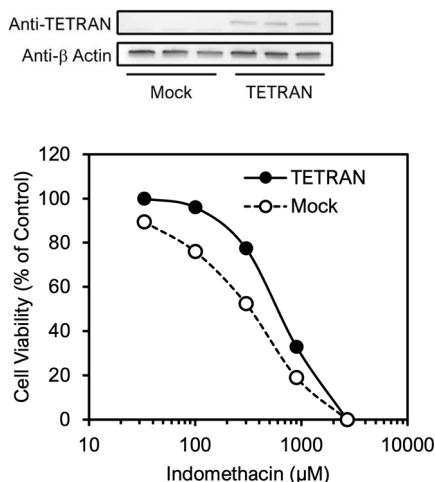
1) HEK293 細胞安定発現株を構築し、WST-8 細胞数 assay によって、毒性試験を行った。また、種々蛍光色素の取り込みを蛍光測定によって定量した。阻害剤を探索し、Competitive counter flow (CCF) 法による基質推定を行った。

2) 再構成による取り込み試験を目指して、タンパク質可溶化タグ付与 TETTRAN を大腸菌 C43 セルに過剰発現させ、膜分画し、ウェスタンブロット法で目的タンパク質の発現有無を確認した。

4. 研究成果

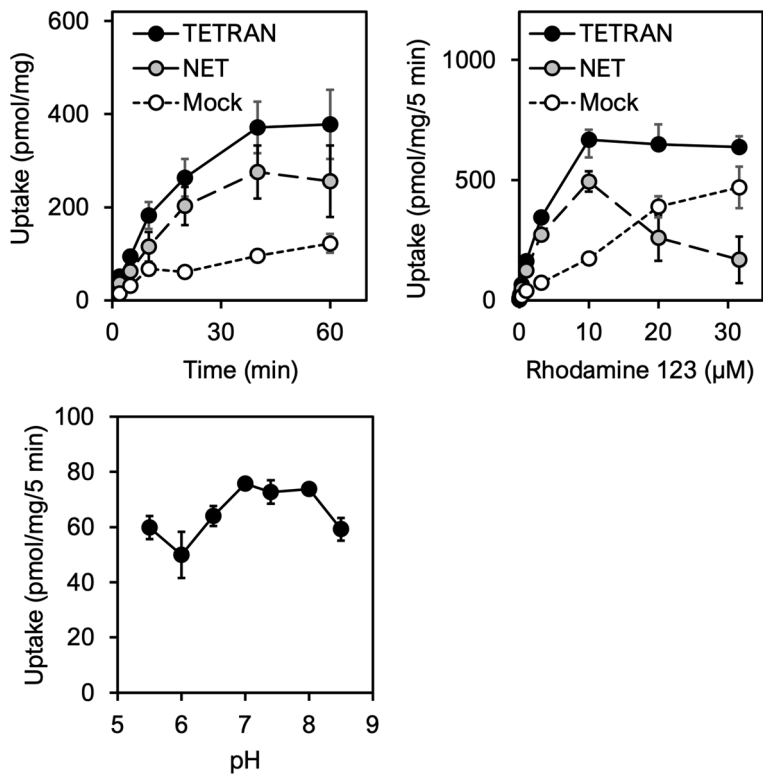
1) 安定発現株の構築およびインドメタシン耐性の確認

G418を用いて選択培養し、TETTRAN 安定発現株を樹立した。TETTRAN 抗体 (Invitrogen PA5-116158) および抗 beta-actin 抗体を用いたウェスタンブロットにより TETTRAN の過剰発現を確認した。また、細胞毒性試験によって、インドメタシン耐性を持つことを確認した。



2) 蛍光基質の同定

検討したカチオン性蛍光色素のうち, rhodamine 123 のみが Mock 細胞に対して, TETRAN 安定発現株に蓄積した。細胞内蓄積は経時的かつ濃度依存的であった。Rhodamine 123 の Mock 細胞への取り込みは濃度依存的にほぼ線形に上昇した。一方, TETRAN 発現細胞への取り込み速度は Mock 細胞のそれよりも高く, rhodamine123 濃度が 10 μM まで上昇し plateau に達した。TETRAN-specific な輸送は, 10 μM が極大となった。TETRAN を介した細胞内取り込みは, pH7-8 を極大とする pH 依存性を示した。以降の検討は, pH7.4 で 0.5 μM rhodamine 123 を 5 分間輸送させて実施した。



3) 阻害剤探索

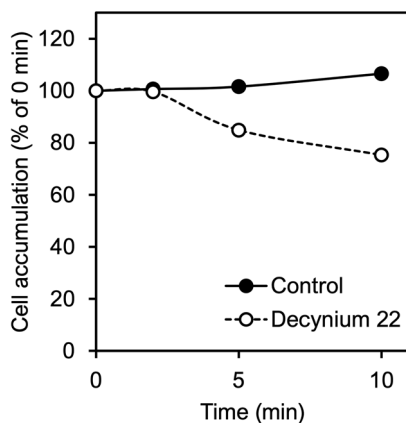
Estrone-3-sulfate, *p*-aminohippuric acid, probenecid などアニオン性薬物は rhodamine 123 輸送を阻害しなかった。一方, 種々カチオン性薬物は阻害剤となり, IC_{50} が μM order の阻害剤として, decynium 22, MPP^+ , diphenhydramine, YM-155, clonidine, nobiletin, imperatorin, pyrilamine, talinolol, tramadol, cimetidine, verapamil, memantine, TEA を同定した。TETRAN 酵母ホモログ TpoI の基質である polyamine 類 (spermine, spermidine, agmatine, putrescine) は rhodamine 123 輸送を阻害しなかった。

Compound	IC_{50} (μM)
Decynium22	0.067 \pm 0.007
MPP^+	0.493 \pm 0.155
Diphenhydramine	0.890 \pm 0.159
YM-155	0.910 \pm 0.047
Clonidine	1.19 \pm 0.16
Nobiletin	1.41 \pm 0.43
Imperatorin	1.73 \pm 0.29
Pyrilamine	2.11 \pm 0.32

Talinolol	7.79±3.57
Tramadol	13.4±2.4
Cimetidine	14.0±1.4
Verapamil	14.2±2.6
Memantin	15.0±4.6
TEA	18.2±8.0

4) CCF 法を用いた基質の確認

Schäfer らの報告 (Schäfer A *et al*, *Mol Pharm* **15**: 5501-5513 2018) を参考に, CCF 法による基質の間接推定を試みた。Rhodamine 輸送が plateau に到達後, 細胞外液を rhodamine および阻害剤を含む液に交換した際の平衡移動から阻害剤のうち, decynium 22, diphenhydramine, YM-155, MPP⁺, pyrilamine が基質であることが示唆された。



- 5) Leviatan らの報告 (Leviatan S, *et al. J. Biol. Chem*, **285**: 23548-23556. 2010) を参考に大腸菌過剰発現・精製系の構築を目指し, N-, C-末端タグの組み合わせ, IPTG 濃度, 温度等の誘導条件を検討したが, 膜画分を分画した時点でタンパク質の切断が生じており, 全長を発現させることはできなかった。

以上得られた成果を元に, 現在論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------