

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460044

研究課題名(和文)トランスポーターの基質輸送サイクルを決定する分子弁の同定と機能解析

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular valve in the transporter to determine the direction of the transporter cycle

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トランスポーターの基質輸送サイクルを決定する分子弁の同定とその輸送分子機構を明らかにすることを目的として、様々な起電性輸送担体をモデル輸送担体として用い、以下に示す研究成果を得た。

- (1) ヒトH⁺/オリゴペプチド共輸送担体 (hPEPT1)の基質輸送の方向性を決定する分子弁の実体を明らかにした。
- (2) Na⁺/モノカルボン酸共輸送担体 (hSMCT1) の方向性を決定する分子弁の存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate how the molecular valve can determine the direction of the transporter cycle in the transporter accompanying ion movement, we precisely determined the transports of human oligopeptide transporter (hPEPT1) and human Na⁺/monocarboxylate co-transporter (hSMCT1).

- (1) We demonstrated using a chemical modification reagent for hydroxyl group, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) that the hydroxyl group of Ser302 weakly forms the hydrogen-bonding with the imidazole of His57, which might keep the uptake activity optimum in the range of physiological intestinal pH.
- (2) We elucidated with quantitative activity-structure relationship (QASR) that the molecular valve hSMCT1 might also determine the transport-direction of coupling Na⁺ ion and substrate.

研究分野：物理系薬学

キーワード：トランスポーター 分子弁 水素結合ネットワーク 輸送サイクル 基質認識機構 モジュレーター

1. 研究開始当初の背景

右図はトランスポーターの基質輸送において広く受け入れられている基質輸送サイクルモデルの一つである。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。基質輸送の素過程は、**1** (基質取り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** (タンパク質内基質移動) + **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。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、基質が結合したり、解離したりする際の基質を包み込む結合ポケット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。

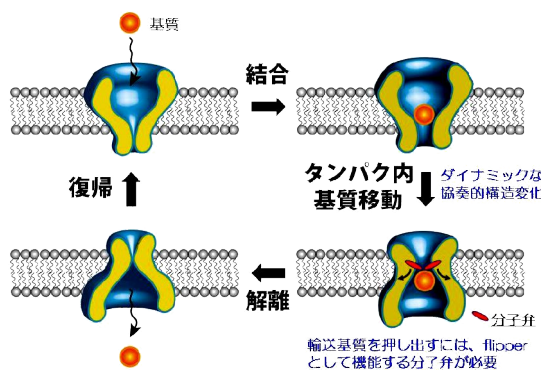


図1: トランスポーターの基質輸送サイクル

基質のタンパク質内移動とは、取り込み側ポケットから放出側ポケットへ基質を移動させることであるが、それはどのような分子的機構か? 能動輸送の場合は、駆動力がどのように輸送エネルギーに変換されるか? 更には、どうして基質移動において無駄のない協奏的なコンフォメーションが起こるか、即ち、何が輸送方向を決定するか? 等、輸送の本質は未だ解明されていない。これまで、申請者はトランスポーターの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 (HR) をモデルタンパクとして使い、研究を行ってきた。HR は、レチナールを発色団とする膜タンパク質であり、光エネルギーを用いて Cl⁻ を細胞の外から内へ輸送する。HR 分子内には、基質である Cl⁻ の逆流を抑える機能を担っているアミノ酸残基 Ser130 が存在することを明らかにした。更に、このアミノ酸残基は、逆流を抑えるだけでなく、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を果たしていること、この光エネルギーを利用して細胞外から細胞内へと Cl⁻ 移動させる、はじき出し器 (flipper) の役割を果たしていることを明らかにした。更に、興味ある知見として、この分子弁と相互作用し、その方向性を失活させるモジュレーターを添加することにより、光照射によりアニオンが細胞内から細胞外へと逆向き輸送されることを見出した。トランスポーターに存在する分子弁は、基質輸送サイクルを制御する最も重要な部品の

一つであり、トランスポーターに普遍的に存在するのでは? という作業仮説が提唱された。

2. 研究の目的

本研究では、分子弁が存在すると推察されているヒト H⁺/オリゴペプチド輸送担体 (hPEPT1) を用いて、基質輸送サイクルの方向を決定する分子弁の同定およびその分子機構の解明を行う。更に、これにより得られたメカニズムを他の起電性輸送担体 (Na⁺/胆汁酸共輸送担体 (hNTCP)、Na⁺/モノカルボン酸共輸送担体 (hSMCT1)) の輸送分子機構解明に応用し、トランスポーター研究を新展開させる。具体的には以下に示す。

hPEPT1 は、第二膜貫通領域 (TDM2) に存在する、輸送活性中心である His57 のプロトン化により活性調節されている。その調節は、His の近傍に位置する Ser302 との水素結合により大きく左右される。His57-Ser302 間の水素結合が基質輸送の分子弁となり得るか、基質輸送における役割を解明する。

脂溶性基質 (脂溶性ジペプチド) の結合により、hPEPT1 の分子弁が機能低下を起こし、hPEPT1 はチャネルとして振る舞う。この脂溶性ジペプチド誘導体の光ラベル化プローブを用いて、hPEPT1 における逆流を防ぐ分子弁と相互作用するアミノ酸残基の同定を行う。また、Ser302 との関係及びその分子機構の解明を行う。

アフリカツメガエル卵母細胞発現系および動物細胞を用いて輸送活性に関する QASR を行い、hNTCP および hSMCT1 における分子弁の同定と輸送活性を調節するモジュレーターの探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 種々の起電性輸送担体 hPEPT1, hSMCT1, hNTCP 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。
 (2) hPEPT1 大量発現細胞を用いて、典型的な基質 Gly-Sar (放射性同位体標識化合物) の取り込み活性を測定した。アミノ酸修飾薬を用いて、Gly-Sar の取り込み活性変動を見積もった。
 (3) hPEPT1 大量発現 HeLa 細胞から膜ベシクルを調製し、等温滴定量熱計 (ITC) を用いて、hPEPT1 構造変化に伴う熱の出入りを測定した。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル卵母細胞に機能発現させた起電性輸送担体 (Na⁺/胆汁酸共輸送担体 (hNTCP), hSMCT1 など) の輸送分子機構を 1 msec オーダーの時間分解能で解析し、輸送サイクルを決定する分子弁を明らかにした (業績)。microbial rhodopsin (BR) の1種である光駆動性プロトンポンプの分子弁に関する検討を行った (業績)。活性中心のレチナ

ールの近傍の変異体を作成し、分子弁の機能的役割を検討した。BR に存在するレチナルのシッフ塩基は輸送担体における分子弁として働き、光エネルギーをプロトン輸送の駆動力に変換、移動に重要な役割を果たすと考えられている。そのレチナルに分子内運動の制限をかけた変異体では、光駆動性プロトンポンプから光駆動性プロトンチャンネルへと機能変換していた。この結果は、分子弁の機能的役割は、基質の移動、駆動エネルギーの伝達をすること証明した実験結果である。

(2) ヒト H⁺/オリゴペプチド共輸送担体 (hPEPT1) における、第二膜貫通領域 (TDM2) に存在する輸送活性中心 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。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。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。更に、Ser 修飾試薬 phenylmethyl- sulfonyl fluoride (PMSF) による Ser 残基修飾は、hPEPT1 の基質輸送活性の中心となる His57 のイミダゾール基の解離・非解離の状態、Ser302 の水酸基との間に水素結合が弱いながらも存在することが明らかにされた。更に、この分子弁がどの様に機能しているかを熱力学的に検討することを目的として、hPEPT1 大量発現細胞 HeLa 細胞から膜ベシクルの調製を行い更なる検討を行った。しかしながら、等温滴定型熱量計を用いて熱力学的に検討をおこなったが、信頼性のある熱量変化を測定することができなかった。そこで、多量にサンプルを得ることができるブタ腎臓を用いて尿細管ベシクルを調製し、hPEPT1 と基質との相互作用、水素イオンとの相互作用を検討できる系を確立した。現在、基質および水素イオン結合による構造変化に伴う熱の出入りを検討中である。

(3) Na⁺/モノカルボン酸共輸送担体 (hSMCT1) の輸送分子機構解明を目的として、様々な基質の基質輸送—構造活性相関 (QSAR) を行った。その結果、hSMCT1 はモノカルボン酸のみならず、アミノ基等を有する双性イオン化合物、即ち、バルキーな構造を有するアミノ酸誘導体も認識し輸送する能力を有していることを明らかにした。これらアミノ酸誘導体は、L-system によって認識されるアミノ酸に属する。典型的な基質、モノカルボン酸化合物と同様、Na⁺:基質 = 1:2 の化学量論比で輸送することが明らかとなった。更に、速度論的解析により、そのアミノ酸誘導体は、駆動力である Na⁺

結合部位近傍に結合することも明らかとなった。一方、あるアミノ酸誘導体は、駆動力である Na⁺ 結合部位近傍に結合し、分子弁に対して機能不全を引き起こし、チャンネル様の基質誘起電流を引き起こすことが明らかにされた。これは、基質認識部位に分子弁が存在し基質輸送を制御していることを示唆したものである。

そこで、バクテリアにおける類似輸送担体の結晶構造に基づいて、基質および Na⁺ 結合部位のホモロジーモデリングを行った。これにより得られた構造モデルを用いて、様々な基質、モノカルボン酸からアミノ酸誘導体に関するドッキングシミュレーションを行い、基質認識部位が明らかとなった。この基質認識部位は、これまでに明らかにされた速度論的性質を十分説明できるものであり、基質輸送を制御する分子弁の存在も示唆された。(現在投稿準備中)

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 9 件)

Tsukamoto, T., Mizutani, K., Hasegawa, T., Takahashi, M., Honda, N., Hashimoto, N., Shimono, K., Yamashita, K., Yamamoto, M., Miyauchi, S., Takagi, S., Hayashi, S., Murata, T., and Sudo, Y. X-ray Crystallographic Structure of Thermophilic Rhodopsin: IMPLICATIONS FOR HIGH THERMAL STABILITY AND OPTOGENETIC FUNCTION. *J Biol Chem* 291: 12223-12232 (2016).

doi: 10.1074/jbc.M116.719815. (査読有り)

Hasemi, T., Kikukawa, T., Kamo, N., and Demura, M. Characterization of a Cyanobacterial Chloride-pumping Rhodopsin and Its Conversion into a Proton Pump. *J Biol Chem* 291: 355-362 (2016). doi: 10.1074/jbc.M115.688614. (査読有り)

Tamogami J, Sato, K, Kurokawa S, Yamada, T, Nara, T, Demura M, Miyauchi S, Kikukawa T, Muneyuki E and Kamo, N. Formation of M-Like Intermediates in Proteorhodopsin in Alkali Solutions (pH \geq approximately 8.5) Where the Proton Release Occurs First in Contrast to the Sequence at Lower pH. *Biochemistry* 55: 1036-1048 (2016). doi: 10.1021/acs.biochem.5b01196. (査読有り)

Inoue, K., Tsukamoto, T., Shimono, K., Suzuki, Y., Miyauchi, S., Hayashi, S., Kandori, H., and Sudo, Y. Converting a light-driven proton pump into a light-gated proton channel. doi: 10.1021/ja511788f. *J Am Chem Soc* 137: 3291-3299 (2015). (査読有り)

Furuse, M., Tamogami, J., Hosaka, T., Kikukawa, T., Shinya, N., Hato, M., Ohsawa, N., Kim, S. Y., Jung, K. H., Demura, M., Miyauchi,

S., Kamo, N., Shimono, K., Kimura-Someya, T., Yokoyama, S., and Shirouzu, M. Structural basis for the slow photocycle and late proton release in Acetabularia rhodopsin I from the marine plant Acetabularia acetabulum. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71: 2203-2216 (2015). doi: 10.1107/S1399004715015722. (査読有り)

Kikukawa, T., Kusakabe, C., Kokubo, A., Tsukamoto, T., Kamiya, M., Aizawa, T., Ihara, K., Kamo, N., and Demura, M. Probing the Cl⁻-pumping photocycle of pharaonis halorhodopsin: Examinations with bacterioruberin, an intrinsic dye, and membrane potential-induced modulation of the photocycle. *Biochim Biophys Acta* 1847: 748-758 (2015). doi: 10.1016/j.bbabi.2015.05.002. (査読有り)

Masuda M., Ichikawa Y., Shimono K., Shimizu M., Tanaka Y., Nara T., Miyauchi S. Electrophysiological characterization of human Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (hNTCP) heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Arch Biochem Biophys* 562: 115-121 (2014). doi: 10.1016/j.abb.2014.08.010. (査読有り)

Sato, K., Chino, D., Sugimoto, T., Kanai, K., Obara, K., Miyauchi, S., and Tanaka, Y. Pharmacological Characteristics of the Inhibitory Effects of Docosahexaenoic Acid on Vascular Contractions Studied in Rat Mesenteric Artery. *Pharmacology* 93: 229-243 (2014). doi: 10.1159/000360543. (査読有り)

Sato, K., Chino, D., Nishioka, N., Kanai, K., Aoki, M., Obara, K., Miyauchi, S., and Tanaka, Y. Pharmacological evidence showing significant roles for potassium channels and CYP epoxygenase metabolites in the relaxant effects of docosahexaenoic acid on the rat aorta contracted with U46619. *Biol Pharm Bull* 37: 394-403 (2014). doi: 10.1248/bpb.b13-00746(査読有り)

[学会発表] (計 25 件)

Seiji Miyauchi. (invited lecture) Effect of albumin on the hepatic uptake/pharmacokinetics of highly bound drug. THE 9th SUGIYAMA LABORATORY (RIKEN) OPEN SYMPOSIUM. 2017, February 24. RIKEN Yokohama Main Building Hall (Yokohama, Kanagawa)

下野和実、松田佳祐、鈴木翔子、矢嶋 香歩、山本 祥世、染谷 友美、白水美香子、横山茂之、宮内正二 . 多剤輸送担体 EmrE の基質結合エントロピー利得に対する水分子の寄与 . 第54回日本生物物理学会年会 . 2016年11月27日 . つくば国際会議場 (茨城県、つくば市)

塚本卓、水谷健二、長谷川太祐、高橋め

ぐみ、本田尚也、橋本直記、下野和実、宮内正二、高木新、林重彦、村田武士、須藤雄気 . サーマオフィリックロドプシンの耐熱性・高光遺伝学活性の構造基盤 . エントロピー利得に対する水分子の寄与 . 第 54 回日本生物物理学会年会 . 2016 年 11 月 26 日 . つくば国際会議場 (茨城県、つくば市)

田母神淳、菊川峰志、大川啓介、大沢登、伊達公平、奈良敏文、出村誠、染谷友美、白水美香子、横山茂之、宮内正二、下野和実、加茂 直樹 . アセタブラリアロドプシン II のプロトン移動における D92 および C218 残基間の相互作用の役割 . 2016 年 11 月 25 日 . つくば国際会議場 (茨城県、つくば市)

下野和実、大森明子、宮内正二 . 熱力学的測定によるオリゴペプチド輸送担体 (YdgR) の基質認識 における多選択機構の解析 . 第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム . 2016 年 11 月 17 日 . 名古屋市立大学大学院薬学研究科・図書館棟 (愛知県、名古屋市)

Seiji Miyauchi, Kazuaki Sugio, Masayuki Masuda, Kazumi Shimono, and Vadivel Ganapathy. Na⁺-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (SLC5A8) has versatile ability to transport cyclic amino acid derivatives in the form of zwitterions. 2016 American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition. 2016, November 15. Colorado Convention Center (Denver, CO (USA))

大森明子、下野和実、宮内正二 . 大腸菌 H⁺/オリゴペプチド共輸送担体 (YdgR) における多選択的基質認識機構の熱力学的解析 . 第 11 回トランスポーター研究会年会 . 2016 年 7 月 2 日 . 京都大学 宇治キャンパスきはだホール (京都府、宇治市)

ヒト Na⁺ /モノカルボン酸共輸送担体 (SMCT1) の多彩な基質輸送能力 . 杉尾和昭、猪田大誠、鴛田翔平、増田雅行、下野和実、宮内正二 . 第 11 回トランスポーター研究会年会 . 2016 年 7 月 2 日 . 京都大学 宇治キャンパスきはだホール (京都府、宇治市)

花島絵里加、増田雅行、下野和実、杉山雄一、宮内正二 . 血清アルブミン肝取り込み促進機構モデルの構築 . 日本薬剤学会第 31 年会 . 2016 年 5 月 19 日 . 長良川国際会議場 (岐阜県、岐阜市)

小林朱音、國貞直人、下野和実、宮内正二 . ヒト肝癌由来 HepG2 細胞における Na⁺/オリゴペプチド共輸送担体の機能解析 . 日本薬剤学会第 31 年会 . 2016 年 5 月 19 日 . 長良川国際会議場 (岐阜県、岐阜市)

杉尾和昭、猪田大誠、増田雅行、下野和実、真坂互、宮内正二 . Na⁺/モノカルボン酸共輸送担体 (SMCT1) の多彩な基質輸送能力 . 日本薬剤学会第31年会 . 2016年5月19日 . 長良川国際会議場 (岐阜県、岐阜市)

Seiji Miyauchi. (invited lecture) Can "free drug theory" feasibly evaluate the hepatic uptake

clearance of a drug with highly protein binding?
THE 8th SUGIYAMA LABORATORY (RIKEN)
OPEN SYMPOSIUM. 2016, February 16. RIKEN
Yokohama Main Building Hall (Yokohama,
Kanagawa)

杉尾和昭、猪田大誠、鴛田翔平、増田雅行、下野和実、宮内正二 . Na⁺モノカルボン酸輸送担体(SMCT)の有する多様な基質認識能力 . 第37回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム . 2015年11月20日 . 熊本大学薬学部・研究総合棟 (熊本県、熊本市)

Seiji Miyauchi, Masayuki Masuda, Yuudai Tanaka, Shouko Iwakado, Kazumi Shimono, SooJin Kim and Yuichi Sugiyama. A novel hepatic transport model considering a significant ligand-transporter binding leading to a change in unbound fraction in the medium, which can feasibly explain the “albumin-mediated hepatic uptake” phenomenon. 2015年11月14日 . 日本薬物動態学会第30回年会 . タワーホール船堀 (東京、江戸川区)

Masayuki Masuda, Kazuaki Sugio, Kazumi Shimono, Seiji Miyauchi. Involvement of human Na⁺/taurocholate (TCA) cotransporting polypeptide (hNTCP) in the hepatic uptake of various statins. 2015 American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition. 2015, October 28. Orange County Convention Center (Orlando, FLA (USA))

増田雅行、田中裕大、岩角祥子、下野和実、真坂互、宮内正二 . 血清アルブミンの有機アニオンの肝取り込みに及ぼす影響 . 日本薬学会第30回年会 . 2015年、5月21日 . 長崎ブリックホール (長崎県、長崎市)

杉尾和昭、猪田大誠、増田雅行、下野和実、真坂互、宮内正二 . Na⁺/モノカルボン酸輸送担体におけるブロードな基質認識機構の解明 . 日本薬学会第30回年会 . 2015年、5月21日 . 長崎ブリックホール (長崎県、長崎市)

下野和実、丸山晴美、小原利恵、石島卓真、北島貴大、田母神淳、奈良敏文、紙谷浩之、宮内正二 . 2-水酸化デオキシアデノシンの濃縮型核酸輸送担体を介した取り込み輸送 . 日本薬学会第135回年会 . 2015年3月26日 . 神戸サンボホール (兵庫県、神戸市)

猪田大誠、鴛田翔平、増田雅行、杉尾和昭、清水真紀、奈良敏文、下野和実、宮内正二 . Na⁺/モノカルボン酸共輸送担体(SMCT)におけるブロードな基質認識機構の解明 . 日本薬学会第135回年会 . 2015年3月26日 . 神戸サンボホール (兵庫県、神戸市)

宮内正二 . (招待講演) 電気生理学的手法を用いた起電性薬物輸送担体の基質認識機構の解明 . 第5回杉山特別研究室 (理研) 公開シンポジウム . 2015年2月10日 . 理化学研究所横浜事業交流棟ホール (神奈川県、横浜市)

⑭ 田中裕大、増田雅行、岩角祥子、下野和実、奈良敏文、宮内正二 . 血清アルブミンに

よる蛍光試薬 ANS の肝取り込みの促進効果 . 第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム . 2014年11月20日 . 徳島大学藤井節郎記念ホール・大塚講堂 (徳島県、徳島市)

⑫ Seiji Miyauchi, Hiroki Ohno, Masayuki Masuda, Toshifumi Nara, Kazumi Shimono. Involvement of a new pH-dependent transporter in the uptake of 2, 4-dichloro phenoxyacetate (2,4-D) by primary cultured rat hepatocytes. 2014 American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition. 2014, November 7. San Diego Convention Center (San Diego, CA (USA))

⑬ Seiji Miyauchi, Yuudai Tanaka, Masayuki Masuda, Toshifumi Nara, Kazumi Shimono. Albumin mediated uptake of 1-anilino 8-naphthalene sulfonate (ANS) by primary cultured rat hepatocytes. 29th Japanese/19th International Society for the Study of Xenobiotics Joint Meeting. 2014, October 22. San Francisco Union Square Hilton (San Francisco, CA (USA))

⑭ 田中裕大、下野和実、宮内正二 . 血清アルブミンの蛍光試薬 ANS の肝取り込み及ぼす影響 . 日本薬学会第29回年会 . 2014年5月23日 . 大宮ソニックシティビル (埼玉県、さいたま市)

⑮ 宮内正二、大野裕樹、下野和実 . 2,4-dichloro phenoxyacetate (2,4-D) の肝取り込み機構の解明 . 日本薬学会第29回年会 . 2014年5月23日 . 大宮ソニックシティビル (埼玉県、さいたま市)

〔図書〕(計 0件)

〔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〕
ホームページ等
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・先端生命科学研究院・講師

研究者番号：20281842

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()