

博士論文

薬物トランスポーターヒト MATE1 の
機能と分子機構に関する研究

平成 28 年 9 月

川崎 達也

岡山大学大学院
医歯薬学総合研究科

目次

緒言.....	1
第 I 章 ヒト MATE1 の基質認識性の解析.....	14
I-1 ヒト MATE1 輸送活性評価系の構築.....	14
I-2 天然物が TEA 輸送に及ぼす影響.....	18
I-3 ヒト MATE1 の新規基質の探索.....	23
I-4 考察.....	31
第 II 章 ヒト MATE1 精製タンパク質を用いた分子機構の解析.....	34
II-1 H ⁺ が TEA の輸送に及ぼす影響.....	34
II-2 酸性残基の解離状態が TEA の結合に及ぼす影響.....	37
II-3 ナノディスク再構成系を用いた結合の検討.....	39
II-4 考察.....	44
第 III 章 MATE 特異的阻害剤ピリメタミンの作用機序の解析.....	46
III-1 ピリメタミンがヒト MATE1 に及ぼす影響.....	46
III-2 考察.....	51
総合考察.....	54
結言.....	59
実験方法.....	60
1. 材料.....	60
2. HEK293 細胞を用いた輸送の測定.....	60
3. 精製・再構成系を用いた輸送の測定.....	63
4. 精製タンパク質を用いた結合の測定.....	65
5. データ解析.....	67
論文目録.....	68
引用文献.....	69
略語表.....	75
謝辞.....	77

緒言

1. 有機カチオンの排泄と薬物トランスポーター-MATE

腎臓および肝臓は、内因性老廃物および外因性異物を排泄することで生体内恒常性の維持に関わる。この排泄機能には種々の薬物トランスポーターが関与する。腎臓におけるカチオン性薬物の排泄過程では、まず血中の有機カチオンが尿細管上皮細胞の基底膜側に発現している OCT2/*SLC22A2* によって細胞内にとりこまれる。その後刷子縁膜側に発現している P-gp/*MDR1* や有機カチオン/ H^+ 交換輸送系によって尿中へと排出される (Inui *et al.*, 2000; Koepsell, 1998; Koepsell *et al.*, 2007; Oude Elferink *et al.*, 1995; Pritchard and Miller, 1993; Ullrich, 1994)。この、刷子縁膜側に存在している有機カチオン/ H^+ 交換輸送系の分子実体は長らく不明のままであった。2005 年、当研究室の Otsuka らは細菌の有機カチオン交換輸送体である NorM に着目し、その配列を元にヒトゲノムデータベースを検索することで、有機カチオン/ H^+ 交換輸送系の分子実体として、ヒトの MATE (Multidrug And Toxin Extrusion) 型トランスポーター、MATE1/*SLC47A1* および MATE2/*SLC47A2* を同定した (Otsuka *et al.*, 2005a)。

ヒト MATE は、尿細管上皮細胞および肝細胞の apical 膜に発現し、 H^+ と有機カチオンを交換輸送することで、薬物を尿および胆汁中に排泄する (図 A-1)。このためヒト MATE は種々の有機カチオン性薬物排泄の最終段階を担うトランスポーターと考えられている。MATE は構造、電荷、作用機序の異なる多彩な化合物を輸送する多剤排泄トランスポーターである (図 A-2)。カチオン性薬物の動態を調べる上でモデル化合物としてよく用いられてきた TEA (Tetraethylammonium) および MPP (1-methyl-4-phenylpyridinium) や、臨床上用いられるカチオン性薬物のシメチジン、メトホルミン、およびプロカインアミドなど、分子量 100-1000 程度の比較的低分子のカチオン系薬物を好む (Omote *et al.*, 2006; Tanihara *et al.*, 2007)。一方でカチオンに限らず、エストロン-3 硫酸やアシクロビルなどのアニオン性薬物およびセファレキシンやセフラジンなどの両親媒性薬物も輸送する (Tanihara *et al.*, 2007)。このようにヒト MATE は多彩な化合物を輸送するが、その中には臨床上重要な薬物が数多く含まれる。

ヒト MATE が薬物の動態に関与する例としてメトホルミンがよく知られている。メトホルミンは、MATE 阻害剤やヒト MATE1 の SNP によって、その動態・薬効が変化する。例えば、抗マラリア薬のピリメタミンは、MATE の特異的かつ強力な阻害剤でもあり、メトホルミンのクリアランスを低下させ、AUC および最高血中濃度を上昇させる (Kusuhara *et al.*, 2011)。同様に、胃酸抑制薬シメチジンや抗生物質トリメトプリムは、メトホルミンクリアランスを低下させ、AUC を上昇させる (Müller *et al.*, 2015; Somogyi *et al.*, 1987)。ピリメタミン、シメチジン、およびトリメトプリムは OCT も阻害するが、メトホルミンとの相互作用の作用点は臨床用量、血中濃度、および阻害定数から MATE と考えられている (Kusuhara *et al.*, 2011; Matsushima *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2015; Tsuda *et al.*, 2009)。また、SNP の一つ

rs2289669G>A ではメトホルミンによるヘモグロビンA1Cの減少が大きくなる (Becker *et al.*, 2009)。

ノックアウトマウスを用いた検討からも、MATE が薬物動態に影響を与えることが示されている。マウス MATE1 を含む遺伝子領域を欠損した del(11)17/+マウス (Bi *et al.*, 2002)では、MATE1 の発現が低下し TEA の腎蓄積が生じる (Hiasa, 2010)。MATE1 ノックアウトマウスでは、禁煙補助薬バレニクリンの腎クリアランス・尿中排泄量が低下し、血中濃度が上昇する (Kajiwara *et al.*, 2012)。さらに、マウスにピリメタミンやシメチジンを投与すると、TEA、利尿薬のアミロライド、抗生物質のセファレキシン、腫瘍診断薬のメタヨードベンジルグアニジン、胃酸抑制薬のラニチジン、および抗精神病薬のスルピリドの腎臓-血漿中濃度比が増加する (Ito, 2013)。

このように、MATE は薬物動態・薬効に影響するため薬物相互作用の標的として臨床・創薬上重要なトランスポーターであることが認識されるようになってきた。その結果、薬物動態研究者等により構成される国際トランスポーターコンソーシアムは数年前に MATE を薬物動態上重要なトランスポーターであると認定した (International Transporter Consortium, 2010)。この提言をもとに、MATE は日本厚生労働省の「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン(最終案)」, 米国FDAの "Guidance for Industry Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations", 欧州 EMA の"Guideline on the Investigation of Drug Interactions" に考慮すべき対象として記載されている (European Medicines Agency, 2012; Food and Drug Administration, 2012; Maeda *et al.*, 2014)。

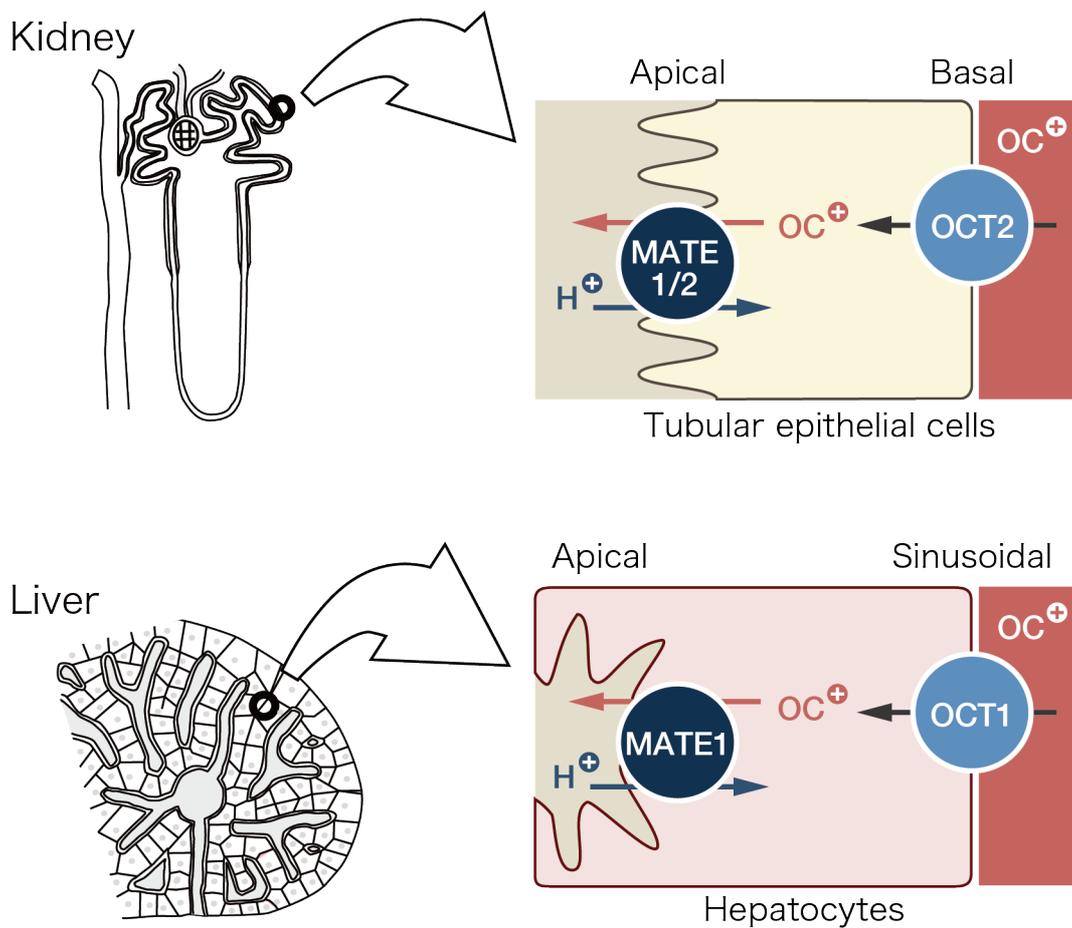


図 A-1. 薬物排出のアンカートランスポーターMATE

ヒト MATE は腎臓の刷子縁膜および肝臓の微小胆管膜に高発現し，有機カチオンと H^+ を交換輸送することで，有機カチオンを尿中・胆汁中に排泄する。(Otsuka *et al.*, 2005a) より改変した。

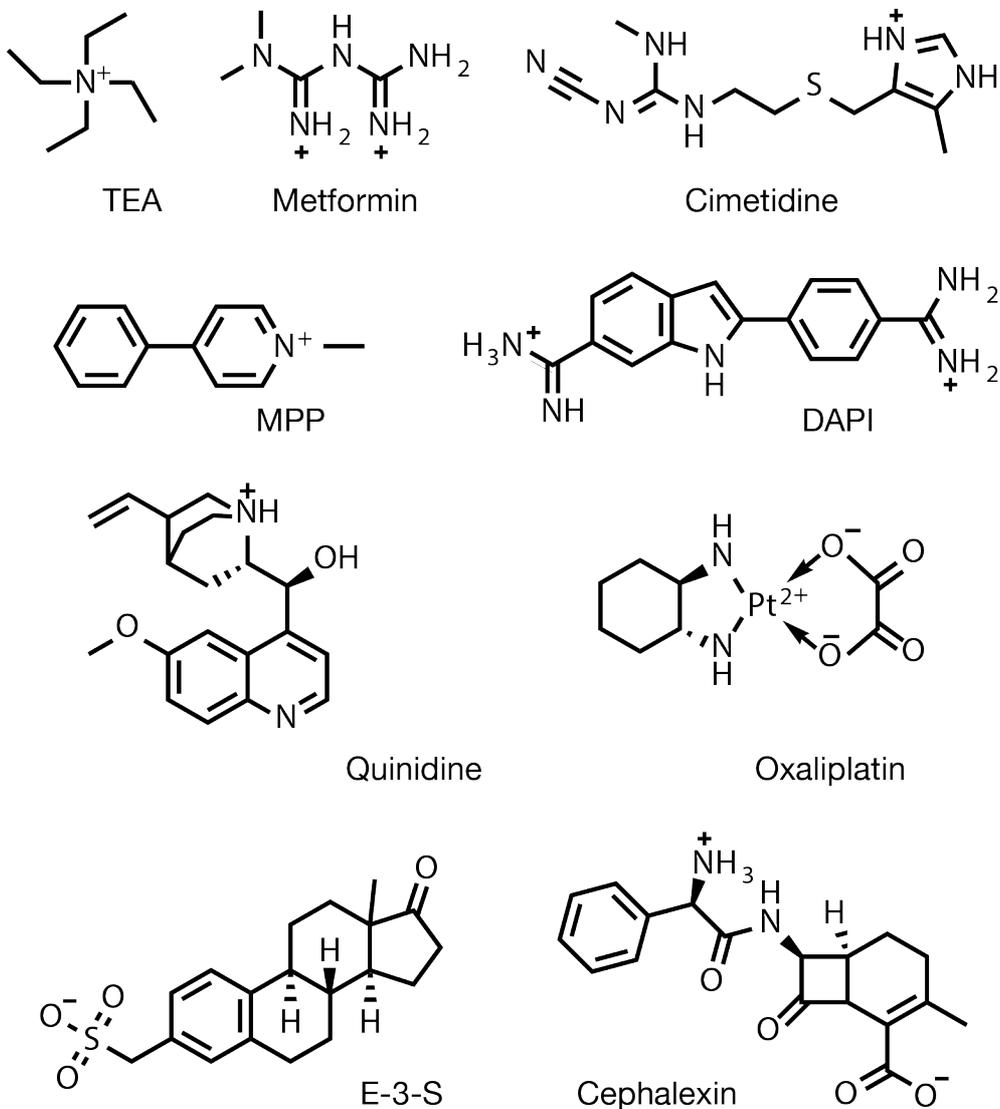


図 A-2. 代表的な MATE 基質

MATE は比較的低分子の多彩な有機カチオンを好むが、一部の双性イオンおよび有機アニオン種も基質とする (Omote *et al.*, 2006; Tanihara *et al.*, 2007; Yasujima *et al.*, 2010)。TEA: Tetraethylammonium, MPP: 1-methyl-4-phenylpyridinium, DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole, E-3-S: Estrone 3-sulfate

2. ヒト MATE1 の局在と機能

MATE 型トランスポーターは原核生物から高等真核生物に至るまで、生物種を問わず普遍的に存在することから (図 A-3), 生物の生存に必須な役割を担う重要なトランスポーターであると考えられている (Omote *et al.*, 2006)。哺乳類の MATE 型トランスポーターは、その相同性から 3 種のサブグループに分類できる (図 A-4)。クラス I は、全身、特に肝臓および腎臓に発現する。クラス II は、げっ歯類以外の哺乳類に存在し、腎臓特異的であり尿細管刷子縁膜に局在する。クラス III は、チンパンジー、ラット、およびマウスなどに存在し、精巣ライディッヒ細胞および副腎皮質特異的に局在する。ヒト MATE1 はクラス I に、ヒト MATE2 はクラス II に属する。クラス I MATE は全身の様々な組織で発現が認められる。例えば、骨髄、筋肉、グリア、Ito 細胞やランゲルハンス氏島 α 細胞に発現していることが報告されている (Hiasa *et al.*, 2006; Otsuka *et al.*, 2005a)。これらの細胞では上皮細胞特有の極性がなく、細胞膜を隔てた pH 勾配も存在しないため、腎臓・肝臓における薬物排泄以外に未知の機能・生理的意義があるものと推察される。言い換えると、何らかの内因性基質の体内動態に関与している可能性が高い。しかし、これまでの基質認識性の検討は薬物が中心であり、発現部位に対応する内因性基質はよくわかっていない。げっ歯類 MATE を用いた内因性基質の解析が進んでいるものの、ヒトとげっ歯類では発現する MATE のクラス・局在が異なる。そのため、ヒト MATE1 の生理的意義を考えるためには、ヒト MATE1 の内因性化合物の認識性を検討する必要があると考えられる。局在と対応する内因性基質を明らかにすることで、*in vivo* への解析へ橋渡しができ生理的意義の解明に近づくものと思われる。

また、MATE 型トランスポーターは薬物トランスポーターの中では最も遅くに同定されたこともあり、基質認識性の検討は他の薬物トランスポーターと比較するとまだまだ解析が遅れている。さらに、薬物トランスポーターの ligand 情報をデータベース化して構造活性相関を解析し、薬物相互作用の予測モデルを構築する計算機科学の試みも進展中である。MATE は多基質認識性を持つため複数の認識パターンを持つことが予想され、正確な相互作用予測にはより多様な母核構造を持つ化合物の知見が求められる。このような観点からも、ヒト MATE の基質認識に関する知見は有益である。

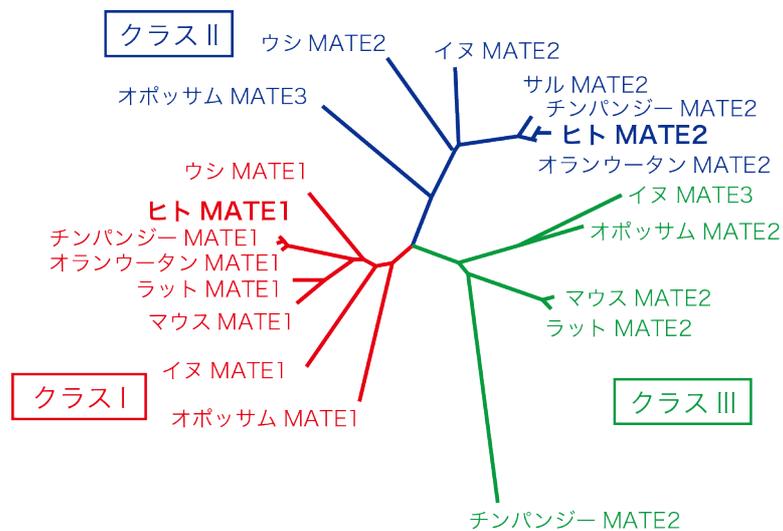


図 A-4. 哺乳類の MATE をコードする遺伝子の系統樹

哺乳類 MATE は遺伝的に 3 種のサブグループに分類できる。塩基配列を元に Clustal W を用いて無根系統樹を描いた。図の枝の長さは NJ 法で求めた遺伝距離を表す。(Omote *et al.*, 2006)より改変した。

3. MATE 型トランスポーターの輸送機構

MATE の広い基質認識性は、内因性老廃物や生体外異物を排泄する上で都合の良い性質である。MATE がどのようにして作用機序や構造、電荷の異なる多彩な薬物を認識し輸送するのかを明らかにすることは、多基質認識の分子基盤の理解につながり、薬物動態の改善や毒性の軽減などへの応用が期待される。

MATE がカチオンを好むことと、腎臓の刷子縁膜小胞をカルボキシ基の化学修飾剤 DCCD (dicyclohexylcarbodiimido) で前処理すると TEA 輸送が阻害されることから (Kim *et al.*, 1993), MATE の機能には酸性残基の関与が示唆されていた。そこで、MATE の構造を見てみると大半の MATE は推定 12 回膜貫通構造をとる (図 A-5)。ヒト MATE の推定膜貫通領域には、4 つの酸性残基 (Glu273, Glu278, Glu300, および Glu389) が存在する (図 A-6)。これら酸性残基は、真核生物間では保存性が高い。その中でも Glu273 残基は真核生物由来の MATE において、唯一完全に保存されており、重要な機能を担うことが予測される。実際、変異体を用いた速度論的な解析から、Glu273, Glu278, Glu300 および Glu389 は基質特異性に関与することが明らかにされている (Matsumoto *et al.*, 2008)。

以上の知見を元に MATE の有機カチオン輸送モデルを考えた (図 A-7)。保存された酸性残基のカルボキシ基上で有機カチオンと H^+ が交換され、構造変化が生じ、輸送サイクルが回転する。このモデルでは、 ΔpH は駆動力となり、 pH は酸性残基の解離状態に影響することで輸送活性を変化させる。しかし、1) 従来の測定系では ΔpH と pH の影響を区別できない、2) 直接 H^+ の輸送を検出する系がない、および 3) 結合を測定する系がないことからこのモデルの直接的な実証はできていなかった。

また、細菌 MATE は多剤耐性をもたらす一因となっており、MATE 阻害剤は耐性克服の切り札となりえる。しかし、既知の MATE 阻害剤は細菌・ヒト MATE 選択性がない。そのため、細菌 MATE 選択的な阻害剤の開発が求められている。

原核生物 MATE については、生化学・構造生物学的検討がなされている。*Vibrio parahaemolyticus* の MATE 型トランスポーター NorM について、変異導入による機能の変化が検討され (Otsuka *et al.*, 2005b), 複数の原核生物の MATE について結晶構造が既に明らかにされている (He *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2013; Radchenko *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2013)。以上の報告から、原核生物の MATE については薬物および対向イオンの結合・輸送に関与するアミノ酸残基が複数同定されている。これらのアミノ酸残基は、生物種によって保存性が異なることから、原核生物 MATE と真核生物 MATE は異なるアミノ酸残基を利用して基質認識・輸送を行うことが示唆されており、両者の基質認識・輸送の分子機構には種差があるものと考えられる。

以上のことから、ヒトの MATE 型トランスポーターの分子機構を解明し、ヒト MATE と細菌 MATE との分子機構の違いを明らかにすることが重要である。

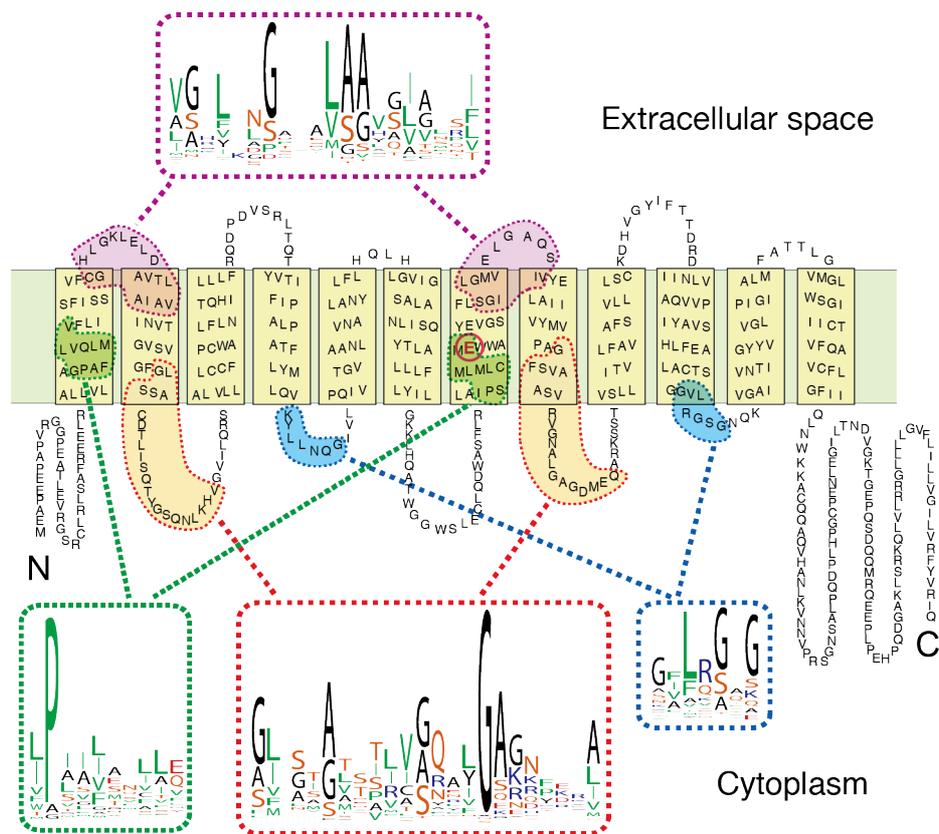
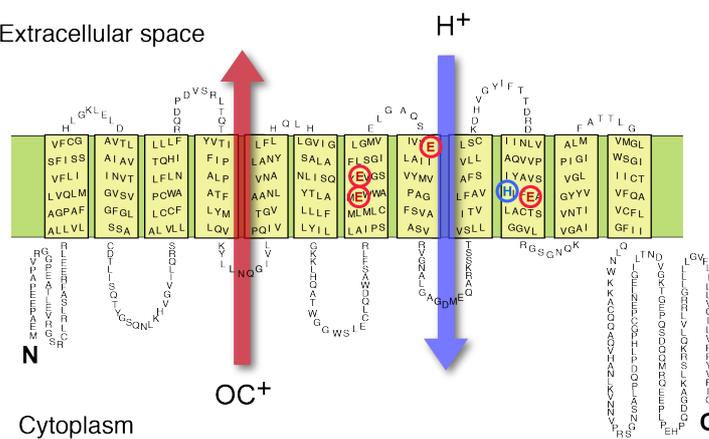


図 A-5. MATE の二次元構造と 4 つの保存領域

MATE は推定 12 回膜貫通構造をとる。保存された 4 領域の存在から、6 回膜貫通構造の 2 回繰り返し構造と推察される。(Omote *et al.*, 2006) より引用した。

Extracellular space



Cytoplasm

TMD7	
Glu273 Glu278	
Human MATE1	LAIP SMLMLCMBWYAVVGSF LSGI LGMV
Mouse MATE1	LAIP SMLMLCIBWYAVVGSF LSGI LGMV
Human MATE2	LAVP SMLMCIQWYAVVGSF LMG LLSVV
Mouse MATE2	LAIP SPMFVCIQWYAVVIGTFLAGLVNVT
Chicken	LAIP SMLMCCIQWYAVVIGSFLICGLLSVV
Zebrafish	LAIP STLMLCFQWYAVVIGGFLAGMLGEV
Arabidopsis	LSAGSAVMICLQWYAVVIGGFLAGLVNVT
Arabidopsis	YGIPSAAMICLQWYAVVIGLILLCGLLNP
	* * * * *

TMD8	
Glu300	
Human MATE1	IVYGLAIIVYMPAGFSVAASV
Mouse MATE1	ITYGLAIIVYMPIPGFSVAANV
Human MATE2	VIVGLAVTYMIPLGLSIGVCV
Mouse MATE2	VIVGLASVAYMVPFGVVAASV
Chicken	VIVGLSVVAFMPLIGLCTAASV
Zebrafish	VLLIGSIAYMPLGVAHAACV
Arabidopsis	ICMSISALSFMVSVCFNAASV
Arabidopsis	ICLTLETLHYVIVSAGVAAAVST
	*

TMD10	
His386 Glu389	
Human MATE1	IINLVAQVVPYIYAVSLFLDALACTSGGVL
Mouse MATE1	IIVALVAQVVPYIYAVSLFLDALACTCGGVL
Human MATE2	VIALVQVLPYIYAVSLFLDAICCVYGGVL
Mouse MATE2	IISLVSQVMPYIYAVSLFLDALACTCGGVL
Chicken	IIDLVAQVMPYIYAVSLFLDALACTCGGVL
Zebrafish	IVAVSQNLTLYVYIYAVSLFLDALVVCVSGVL
Arabidopsis	VAKAVSCLCPFLAITILNGIQPVLGVA
Arabidopsis	VLDYVADLTPLLCLSFILGFTAVLNGVA
	* * * * *

図 A-6. 膜貫通領域の荷電性保存残基

ヒト MATE1 の膜貫通領域 (TM) には 4 つの酸性保存残基と 1 つの保存ヒスチジン残基が存在する。このうち、TM7 に位置する Glu273 は真核生物中に完全に保存されている。

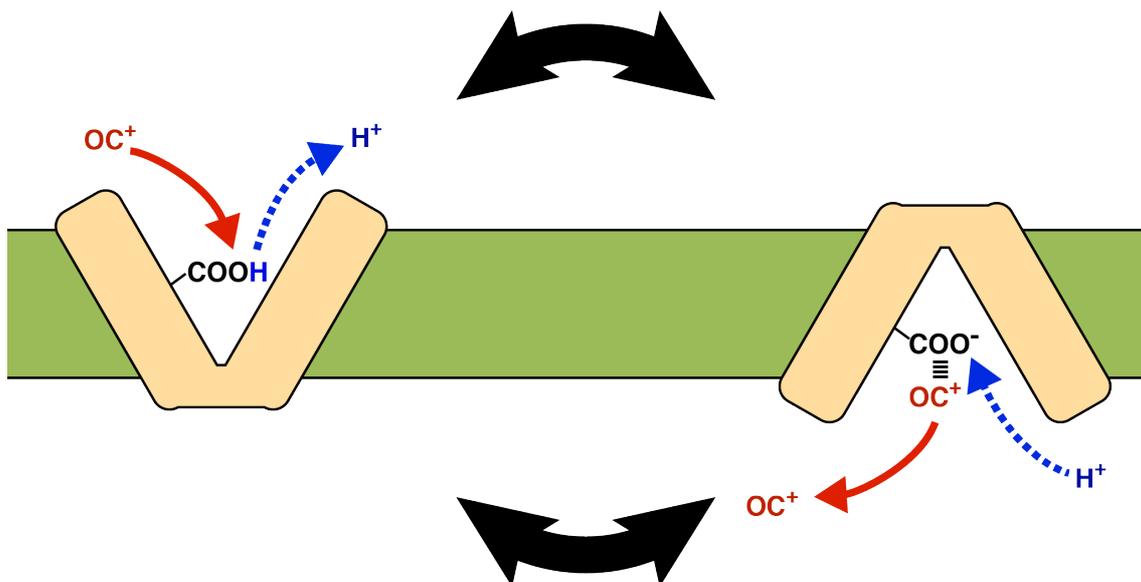


図 A-7. MATE の有機カチオン輸送の予想モデル

ヒト MATE1 の保存された酸性残基上で有機カチオンと H^+ が交換され、その後構造変化が生じ輸送サイクルが回転する。

4. MATE 特異的阻害剤ピリメタミン

ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤で抗マラリア薬として用いられるピリメタミンは、強力かつ特異的な MATE 阻害剤である (Ito *et al.*, 2010)。この阻害剤は当研究室で発見され、東京大学薬学部杉山研究室との共同研究により薬物動態における重要性が明らかにされた。ピリメタミンは *in vitro* で MATE の基質であるメトホルミンを競合的に阻害し、健常者を対象とするマイクロドーズ試験においてメトホルミンの動態を変化させた (Kusuhara *et al.*, 2011)。これらのことから、ピリメタミンは *in vitro*, *in vivo* いずれにおいても MATE 研究のツールとして有用である。しかし、ピリメタミンの MATE に対する阻害機序についてはよくわかっていなかった。

MATE と他の薬物トランスポーターの基質認識性を比較すると、MATE-OCT 間、および MATE1-MATE2K 間の基質認識がオーバーラップしている。ここで、ヒト MATE1 選択的な阻害剤が手に入れば、ケミカルノックダウンによる生理的意義の検討が可能となり、また、精製タンパク質の結晶化の促進剤として用いることで結晶構造解析が進展し、結合ポケット・ligand の結合様式に関する情報が得られるなど、MATE の機能と構造、分子機構に関する研究が進展するものと期待される。ヒト MATE1 選択的阻害剤を合理的に設計する上で、既知の阻害剤で最も選択性・阻害活性が強いピリメタミンの作用機序に関する知見が求められている。

5. 本研究の目的と要旨

以上の背景から、MATE 研究上の課題は以下のように整理できる。

第一に、MATE は薬物動態上重要であるが、比較的遅くに同定されたため基質認識性の検討が不十分である。さらに、薬物動態以外の機能を持つものと考えられるが、局在面のヒントはあるもののそれに対応した内因性化合物の認識に関する知見がない。

第二に、輸送機構を解析する中で、酸性残基上で有機カチオンと H^+ が交換される輸送モデルを考え、酸性残基が基質特異性に関与することまで明らかになっていた。しかし、pH と ΔpH を区別できる系、 H^+ 輸送測定系、および基質結合の測定系がなかったためモデルは実証されていない。

第三に、MATE の研究によく用いられている特異的阻害剤があるものの、その阻害機序が明らかになっていない。

そこで本研究では、下記 3 項目を実施し「ヒト」MATE1 タンパク質の基質認識と分子機構を解析した。

1. 未知の基質認識性を明らかにするために、発現部位に基づく内因性基質の予想や動態学上重要な化合物を踏まえて、従来より広汎な化合物について基質認識を検討した。典型的な基質である TEA 輸送の阻害と、標識化合物を用いた輸送の直接測定から、新規阻害剤・基質を探索し MATE の ligand を明らかにするとともに、その結合様式・動態学上の意義などをまとめた。
2. 有機カチオン輸送の予測モデルに基づき、精製タンパク質を用いた解析によって、pH が輸送と基質結合に及ぼす影響、およびカチオン性薬物の輸送における酸性残基の重要性を明らかにした。
3. MATE の特異的阻害剤であるピリメタミンの阻害機序を解析し、ピリメタミンが MATE 輸送サイクルのどの過程を阻害するかを明らかにした。また、MATE の ligand 結合部位に関する知見を得た。

これらの結果と考察を以下三章にわたって詳述する。

第 I 章 ヒト MATE1 の基質認識性の解析

I-1 ヒト MATE1 輸送活性評価系の構築

1a HEK293 細胞安定発現系

ヒト MATE1 の輸送活性を測定するために、これまでポリペクション法により MATE1 を HEK293 細胞に一過性に発現させる系が用いられてきた (Otsuka *et al.*, 2005a; Matsumoto *et al.*, 2008)。しかし、この方法では MATE1 の発現量を一定に制御することが難しく実験間の誤差が大きくなる問題があった。そこで、本研究を開始するにあたり、HEK293 細胞ヒト MATE1 安定発現株を作製した。ヒト MATE1 の発現を確認するために、HEK293 細胞膜画分を調製し、ウェスタンブロットにより解析した。コントロール株では、ヒト MATE1 のシグナルは検出されなかったが、安定発現株では、62 kDa の位置にヒト MATE1 のバンドが確認された (図 I-1A)。続いて、代表的なヒト MATE1 基質である TEA を用い、輸送活性を測定した。細胞外を pH 8.0 にすることで細胞内酸性の pH 勾配を負荷した際、ヒト MATE1 安定発現株では、反応開始後 30 分まで、経時的な TEA の取り込みが確認された (図 I-1B)。一方、コントロール株においては TEA の取り込みはみられず、バックグラウンドと同程度であった。以上の結果より、ヒト MATE1 の輸送活性の測定系を構築できたものと結論し、以下の実験に用いた。

以下、本章では HEK293 細胞安定発現系および精製・再構成系の二手法を用いて、*in vitro* レベルで細胞内・小胞内への取り込みを評価し、輸送されたものを基質と判断した。

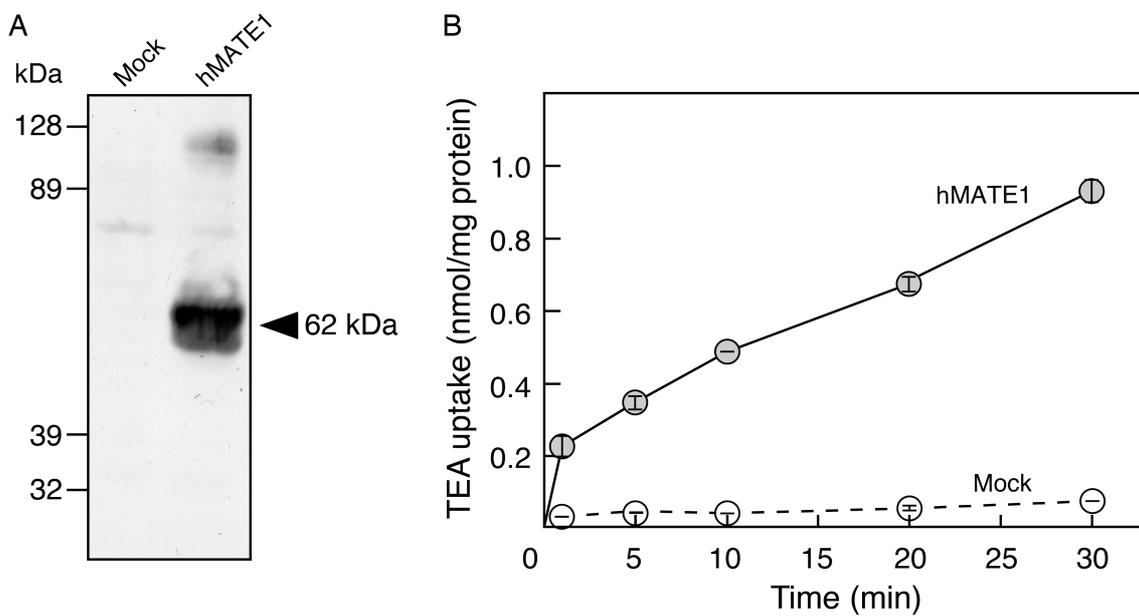


図 I-1. HEK293 細胞を用いた輸送活性測定系

A) 細胞膜発現の確認: HEK293 細胞の膜画分を調製し, 試料 30 μg を 11% SDS-PAGE にか
 け, 抗ヒト MATE1 抗体を用いてウェスタンブロットした。 B) TEA 輸送試験: pH8.0 で 50
 μM ^{14}C -TEA を HEK293 細胞に加え, 細胞内に蓄積した TEA (nmol/mg protein) を測定した。
 各点の値は, Mean \pm SE ($n = 3$) である。

1b TEA 阻害活性スクリーニング

カチオン性薬物の基質認識性はMATE同定以降、よく検討されている。そこで本項では、カチオン性薬物のみならず、内因性化合物を含む様々な電荷の化合物について、HEK293細胞の系を用いてTEA輸送の阻害を試験した(表1-1)。各化合物のストックをTransport Mediumで希釈し、終DMSO濃度が<0.5%となるように溶解度に応じて測定濃度を設定した。

内因性化合物について、ビタミンB₁のチアミン(1 mM)およびビタミンEのトコフェロール(1 mM)が有意に阻害した。ポルフィリン合成経路の最初の生成物5-アミノレブリン酸、補酵素CoAおよびNAD、ビタミンB₂リボフラビン、ならびに尿素回路の最終生成物尿素は、1 mMにおいても有意な阻害は見られなかった。

生体内アミンで、アミノ基を1つ持つセロトニン(100 μM)、およびチラミン(1 mM)はMATEを有意に阻害した。また、4つのアミノ基を持ち、pH8.0ではアミノ基を3つ持つスペルミン(100 μM)もMATEを強く阻害した。

脳神経系に作用するカチオン性化合物、小胞型モノアミントランスポーターVMATの阻害薬レゼルピン(100 μM)、ドパミンD1およびD2受容体遮断薬のトリフルオペラジン(10 μM)、D2受容体遮断薬のドロペリドール(1 μM)、ならびにセロトニントランスポーターSERTおよびノルエピネフrintランスポーターNET阻害薬のイミプラミン(10 μM)が有意に阻害した。カチオン性の外因性異物であるアルカロイドのパパベリン(10 μM)とニコチン(100 μM)も有意に阻害した。

中性またはアニオン性の外因性異物である、女性ホルモン様作用を示す内分泌攪乱物質ビスフェノールA(10 μM)および合成女性ホルモンジェチルステルベステロール(100 μM)は有意な阻害を示さなかった。中性またはアニオンとして存在する、大環状構造を持つマクロライド系化合物のバフィロマイシン(1 μM)およびコンカナマイシン(1 μM)が強く阻害した。食餌性に摂取する機会が多い、フラボノイドのケルセチン(100 μM)、フラボノイド配糖体ルチン(100 μM)およびヘスペリジン(100 μM)も有意に阻害した。

表1-1. 種々の化合物が TEA 輸送に及ぼす影響

Compound —	Conc. μM	Uptake		
		%	±	SD
None (control)	—	100	±	1.9
Serotonin	100	84	±	8.0 *
Spermine	100	25	±	3.6 *
Tyramine	1000	46	±	5.1 *
Reserpine	100	14	±	0.3 *
Trifluoperazine	10	28	±	4.7 *
Doroperidol	1	74	±	14.7 *
Imipramine	10	75	±	11.9 *
Bisphenol A	10	114	±	2.1
Diethylstilbesterol	100	95	±	7.8
Amantadine	100	75	±	9.8 *
Neostigmine	1000	29	±	5.0 *
Propranolol	100	30	±	3.9 *
Papaverine	10	27	±	2.7 *
Nicotin	100	70	±	5.0 *
Bafilomycin A ₁	0.1	32	±	4.1 *
	0.5	29	±	3.0 *
	1	25	±	4.4 *
Concanamycin	1	47	±	8.6 *
Quercetin	100	33	±	1.4 *
Rutin	100	72	±	3.6 *
Hesperidine	100	53	±	19.6 *
Thiamine	100	56	±	7.0 *
	1000	31	±	3.9 *
α-Tocopherol	100	79	±	9.6 *
5-Aminolevulinic acid	1000	107	±	12.1
CoA	1000	104	±	12.7
NAD	1000	95	±	1.9
Riboflavin	1000	102	±	5.9
Urea	5000	122	±	15.7

種々の化合物について、HEK293 細胞を用い、ヒト MATE1 阻害効果を試験した。50 μM ¹⁴C-TEA を HEK293 細胞に加え pH8.0, 37°C で 10 分間インキュベートした。コントロール活性（試験化合物非存在下の TEA 輸送活性）は、0.10 ± 0.02 (nmol/mg/min; Means ± SD, n = 3) であった。Dunnett の検定において $p < 0.05$ となる群に * を付した。

I-2 天然物が TEA 輸送に及ぼす影響

2a フラボノイド類は MATE を阻害する

前節で、ルチンやヘスペリジンなどのフラボノイド配糖体が MATE1 を阻害した。これら化合物は、一般に中性またはアニオンとして存在し、既知の MATE1 のカチオン性基質とは電荷が異なる。また、治療上用いられる薬物ではないが、日常的に食餌由来で摂取する機会がある外因性異物である。さらに、類似構造の化合物が入手しやすい。以上の点から、これら化合物について詳しく解析することで、MATE を介した薬物相互作用を起こす可能性、阻害剤の構造活性相関、および MATE とリガンドの相互作用部位の類推に繋がる知見が得られるものと期待される。そこで、フラボノイド配糖体のアグリコンであるフラボノールを始め、カテキン、クマリン類について阻害活性を検討した (表 I-2)。

フラボノール類のケルセチン、ケンフェロール、およびイソラムネチンはヒト MATE1 をよく阻害した (図 I-2, 表 I-3)。阻害曲線をシグモイド曲線に当てはめ IC₅₀ 値を算出した場合、当てはめの悪いものが数化合物認められた。これら化合物についても極端に外れた値を算出していないことを確認するために、古典的な方法を用いて IC₅₀ 値を計算し、値を比較した (実験方法参照)。両方法から求めた IC₅₀ 値はほぼ一致していた (表 I-3)。得られた IC₅₀ 値を基準に構造と阻害を比較すると、フラボノール類について、3, 5, 7, 4'位のヒドロキシ基と 3'位のメトキシ基が阻害に重要であることが示唆された。緑茶に含まれるカテキンの中では、EGCG が阻害したが、非没食子酸エステル型のエピカテキンおよびカテキンは阻害しなかった。フラノクマリン類は、構造・活性間に有意な関係はみられず、ヒト MATE1 を阻害した。

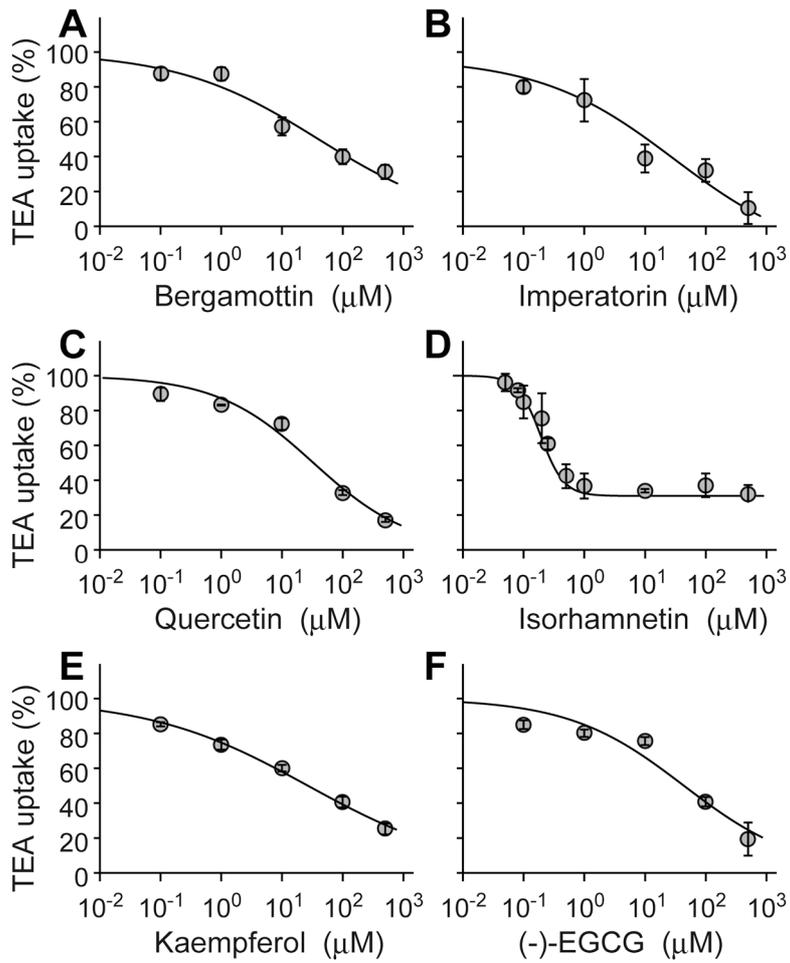


図 I-2. 種々の中性天然物が TEA 輸送に及ぼす影響
 実験条件は表 I-1 と同じである。

表 I-2. 試験した天然物の構造

Flavonols	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Isorhamnetin	-OH	-OH	-H	-OCH ₃	-OH	-H	-OH
Kaempferol	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH
Quercetin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Kaempferide	-OH	-OH	-H	-H	-OCH ₃	-H	-OH
Galangin	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	-OH
Morin	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-OH
Rhamnetin	-OH	-OCH ₃	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Tamarixetin	-OH	-OH	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-OH
Geraldol	-H	-OH	-H	-OCH ₃	-OH	-H	-OH
Quercetin-3, 7, 3', 4' -tetramethyl ether	-OH	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃
Ombuin	-OH	-OCH ₃	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-OH
Myricetin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH

Catechins	R1	R2	R3
(-)-EGCG	-OH		-H
(-)-Epicatechin	-H	-OH	-H
(+)-Catechin	-H	-H	-OH

Coumarins	R1	R2
Dicoumarol		
3-Hydroxycoumarin		

Furanocoumarins	R1	R2
Imperatorin	-H	
Psoralen	-H	-H
Xanthotoxin	-H	-OCH ₃
Bergamottin		
Xanthoxol	-H	-OH
Bergapten	-OCH ₃	-H

表 I-3. 天然物が TEA 輸送に及ぼす影響

Compounds	Sigmoidal fitting (*)				Logarithmic fitting				
	α	β	γ	IC ₅₀ (μ M)	a	b	IC ₅₀ (μ M)		
<i>Flavonoids</i>									
Isorhamnetin	2.1	1.6	1.8	0.34 ±0.11	-48.2	31.2	0.41 ±0.05		
Kaempferol	2.0	0.8	1.2	26.7 ±2.66	-18.0	75.5	26.2 ±0.9		
Quercetin	2.1	1.3	0.1	32.8 ±0.93	-26.0	88.4	29.8 ±0.8		
Kaempferide	23.5	1.0	21.3	176 ±17.5	-19.8	94.4	174 ±0.8		
Galangin	29.2	1.7	15.3	232 ±14.7	-25.9	111	232 ±0.9		
Morin	45.9	2.1	19.7	445 ±25.7	-28.8	129	564 ±0.7		
Rhamnetin				>500			>500		
Tamaricetin				>500			>500		
Geraldol				>500			>500		
QTME				>500			>500		
Ombuin				>500			>500		
Myricetin				>500			>500		
<i>Catechins</i>									
(-)-EGCg	1.9	1.1	0.1	43.8 ±7.1	-33.2	108	57.2 ±0.9		
(-)-Epicatechin				>500			>500		
(+)-Catechin				n.d.			n.d.		
<i>Coumarins</i>									
Dicoumarol				n.d.			n.d.		
3-Hydroxycoumarin	1.6	0.7	0.5	72.9 ±10.1	-16.3	80.3	73.6 ±0.7		
<i>Furanocoumarins</i>									
Imperatorin	1.3	0.9	0.7	6.0 ±2.3	-17.7	64.7	6.7 ±0.9		
Psoralen	1.4	0.7	0.7	16.2 ±10.5	-16.0	73.6	29.9 ±0.6		
Xanthotoxin	1.3	0.6	0.7	35.7 ±2.1	-12.4	68.7	32.4 ±0.7		
Bergamottin	2.2	0.9	1.0	39.8 ±2.3	-23.8	85.4	30.6 ±0.8		
Xanthotoxol	1.5	0.5	0.6	193 ±20.3	-8.4	72.8	540 ±0.7		
Bergapten				n.d.			n.d.		

実験条件は表 I-1 と同じである。阻害曲線を二種の回帰式に当てはめ、IC₅₀ 値を算出した。詳細は、実験方法に記述した。Sigmoidal fitting では阻害曲線に当てはまりの悪い化合物があったが、Logarithmic fitting とほぼ同じ IC₅₀ 値が得られている。500 μ M で 50% 阻害に至らなかった化合物には >500 μ M, 溶解する濃度域で 50% 阻害に至らなかった化合物には *n.d.* (not detected) と表記した。(*) Kawasaki, T., Ito, H., Omote, H. (2014) *Biol Pharm Bull.* **37**: 292-297. に報告したものと同一値である。QTME: Quercetin-3, 7, 3', 4'-tetramethyl ether

2b 天然物阻害剤の阻害様式の検討

前項で見出された天然物阻害剤のうち、薬物相互作用を起こすことがよく知られているフラノクマリン類のベルガモチン、および試験化合物中最小の IC_{50} 値を示したイソラムネチンについて、その阻害活性を速度論的に解析した。両化合物は競合的に TEA 輸送を阻害し、その K_i 値はそれぞれ 98.7、および $0.32 \mu\text{M}$ であった (図 I-3)。これら二化合物は競合阻害であることから TEA と結合部位を共有する、または TEA と異なる部位に結合するが TEA の結合を障害することが示唆された。

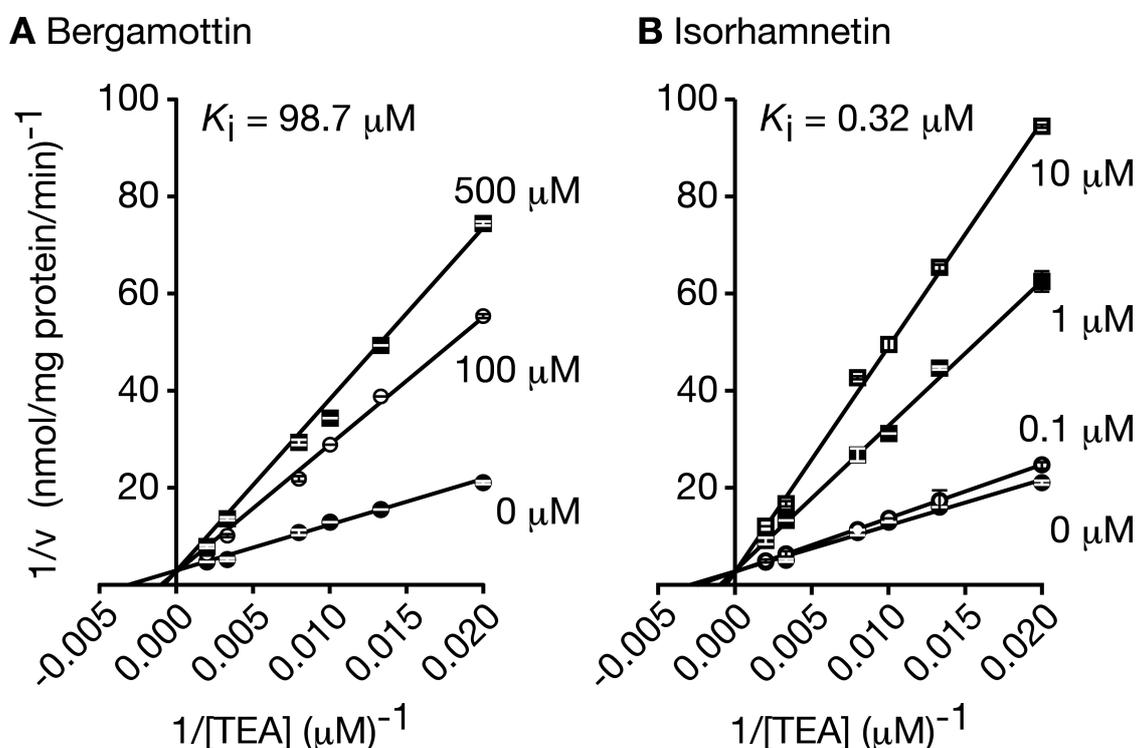


図 I-3. ベルガモチンおよびイソラムネチンの阻害様式の検討

TEA 輸送に及ぼす阻害効果を速度論的に解析した。バックグラウンドとして Mock の値を差し引いた。各点の値は、 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ($n = 4$) である。A) ベルガモチン (0, 100, および $500 \mu\text{M}$)
B) イソラムネチン (0, 0.1, 1 および $10 \mu\text{M}$) 存在下で TEA の輸送を測定した。

1-3 ヒト MATE1 の新規基質の探索

3a セロトニン, スペルミン, およびスペルミジンは, ヒト MATE1 の基質である

I-1c の検討において, セロトニンはヒト MATE1 を阻害した (表 I-1)。セロトニンは, 消化管粘膜, 血小板, および中枢神経系に局在し, 腸管蠕動運動, 血管収縮, 血小板凝縮, および神経伝達などに関与する (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008)。

また, ヒト MATE1 について免疫組織化学的な解析から神経系 (大脳皮質, 海馬, 側脳室, および小脳), および, 消化管系 (胃, 十二指腸, 小腸, 結腸) にも局在が認められている (THE HUMAN PROTEIN ATLAS; Pontén *et al.*, 2008)。このように, ヒト MATE1 とセロトニンの局在は, 一部オーバーラップしている。

以上のことから, ヒト MATE1 新規基質の候補としてセロトニンに着目した。セロトニンは TEA 輸送に対し弱いながらも阻害傾向を示した (図 I-4B)。そこで, 精製・再構成系を用いて放射標識セロトニンの輸送を試験した。コントロールリポソームと比較してヒト MATE1 再構成リポソームでは有意に, 経時的なセロトニン取り込みが見られた (図 I-4C)。このセロトニン輸送に対し, 種々のモノアミンの影響を検討した。モノアミン類 (100 μ M) は弱いながらもセロトニン (50 μ M) 輸送を阻害した (図 I-4D)。これらモノアミン類のうち 1 mM チラミンは TEA 輸送を阻害した (表 I-1)。以上のことから, チラミンは低親和性の MATE 基質であることが示唆された。

セロトニンがヒト MATE1 に輸送されたため, その代謝産物のメラトニンおよび 6-ヒドロキシメラトニンに着目した。両化合物は TEA 輸送を阻害した (図 I-5)。100 μ M における阻害を比較すると, 阻害の強さはメラトニン > 6-ヒドロキシメラトニン > セロトニンであった。さらに, セロトニンとは電荷が異なる生体内アミンのポリアミンに着目した。ポリアミンもまた TEA 輸送を阻害し, ポリアミン 4 種の中では 4 つのアミノ基を持つスペルミンが強い阻害を示した (図 I-6)。また, 放射標識スペルミンおよびスペルミジンは MATE1 によって輸送され, 基質となることが明らかとなった。

3b スペルミジン輸送の特徴

ポリアミンのうち, 3 つのアミノ基を持つスペルミジンの輸送について HEK293 細胞安定発現系を用いてその性質を解析した。ポリアミンは一般に OCT の基質となる (Busch *et al.*, 1996; Gründemann *et al.*, 2003; Winter *et al.*, 2011)。OCT は膜電位依存性の輸送体である。そこで, OCT によるポリアミン輸送を最小限に抑え MATE の機能を評価しやすくするために, 高カリウム刺激によって HEK293 細胞を脱分極させ OCT の阻害を試みた。細胞内取り込みバッファー中の Na^+ を K^+ に置換すると, Mock 細胞へのスペルミジン蓄積が減少し, MATE を介したスペルミジン蓄積は上昇した (図 I-7A)。そこで, カリウムバッファーを用いて時間依存性を検討した。スペルミジンの細胞内蓄積は 30 分まで経時的に上昇した (図

I-7B)。輸送時間を5分間とし濃度依存性を評価したところ、 $V_{\max} = 6.86 \pm 0.72$ nmol/mg/min, $K_m = 13.5 \pm 1.3$ mMであった(図I-7C)。また、細胞外pHを変化させると、スペルミジン蓄積はpH6.7および7.4で同程度であり、pH8.0で増加が見られた(図I-7D)。

続いて、種々のMATE基質・阻害剤がスペルミジン輸送に及ぼす影響を検討した(図I-8)。1 mM TEA, MPP, シメチジン, およびスペルミンは阻害を示したが、パラコートおよびメトホルミンは有意な阻害を示さなかった。また、1 μ M ピリメタミンによる阻害は約20%であり、TEAに対する阻害と比較して弱いものであった。ただし、スペルミジン輸送はより高濃度 (>1 μ M) のピリメタミンによって強く阻害される可能性がある。また、MATEの多基質認識性を考慮すると、スペルミジンとピリメタミンの結合部位が異なり、ピリメタミンの結合はスペルミジンの輸送に影響を及ぼさない可能性がある。以上の可能性から、スペルミジン輸送のピリメタミン感受性の判断には、阻害の濃度依存性・速度論的解析が必要である。

3c. 生体外毒物ニコチンは、ヒトMATE1に輸送される

アルカロイドはカチオン性化合物であり、MATEの基質候補である。実際、ニコチンおよびパパベリンはTEA輸送を阻害した。そこで、習慣的に吸入する機会の多いニコチンに着目した。ニコチンは濃度依存的にTEA輸送を阻害した(図I-9A)。また、放射標識ニコチンを用いて輸送活性を測定したところ、ニコチンはヒトMATE1によって輸送され、基質であることが明らかとなった(図I-9B)。

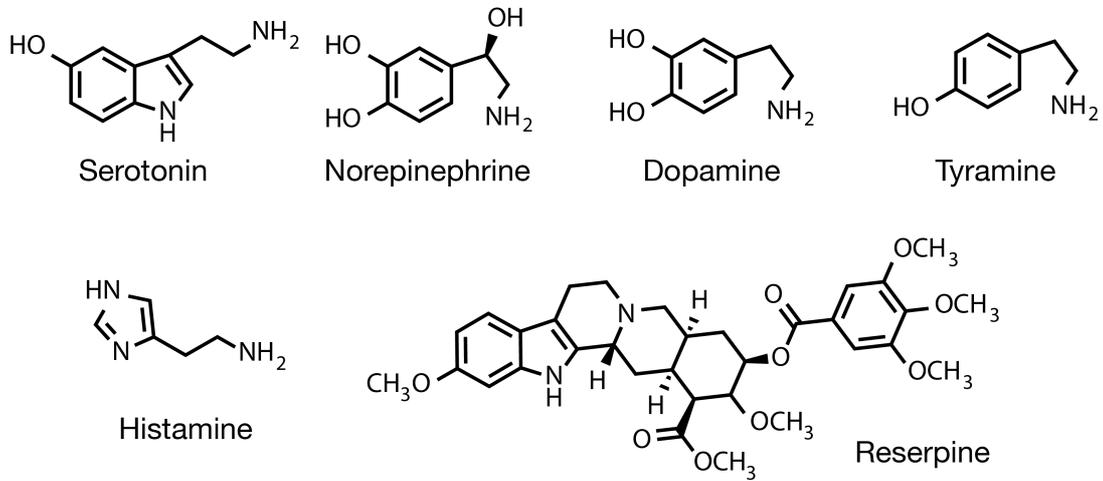
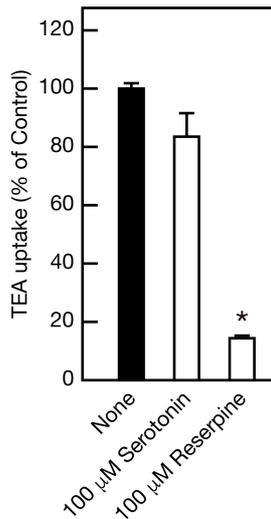
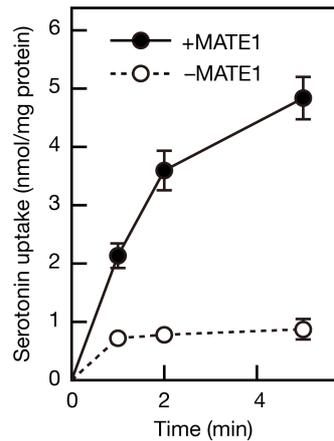
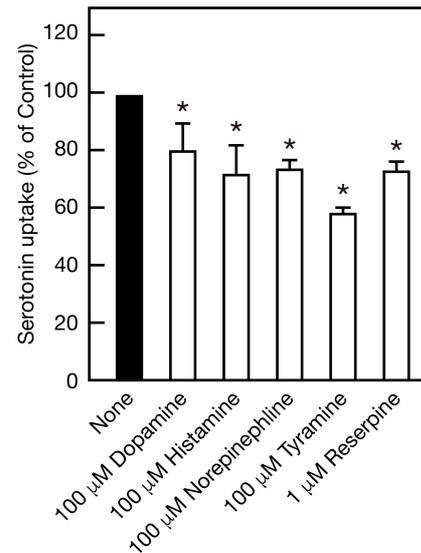
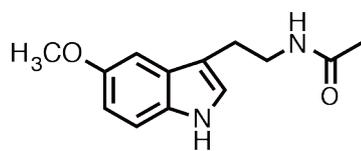
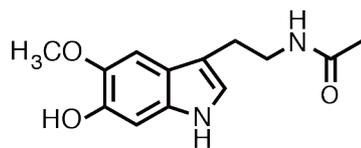
A**B****C****D**

図 I-4. ヒト MATE1 輸送機能とセロトニン

A) 試験化合物の構造 B) TEA 輸送の *cis* 阻害: pH8.0 で, 50 μ M 14 C-TEA および試験化合物を HEK293 細胞に加え 37°C で 10 分インキュベートした。バックグラウンドとして Mock の値を差し引いた。C) セロトニンの輸送: 再構成系を用いてリポソーム内 pH6.7, リポソーム外 pH8.0 とし, 50 μ M セロトニンを輸送させた。D) C と同様に, 試験化合物存在下 50 μ M セロトニンを 2 分輸送させた。バックグラウンドとして空のリポソームの値を差し引いた。各点の値は, Mean \pm SD ($n = 3$)である。Dunnett の検定において $p < 0.05$ となる群に*を付した。

A

Melatonin



6-Hydroxymelatonin

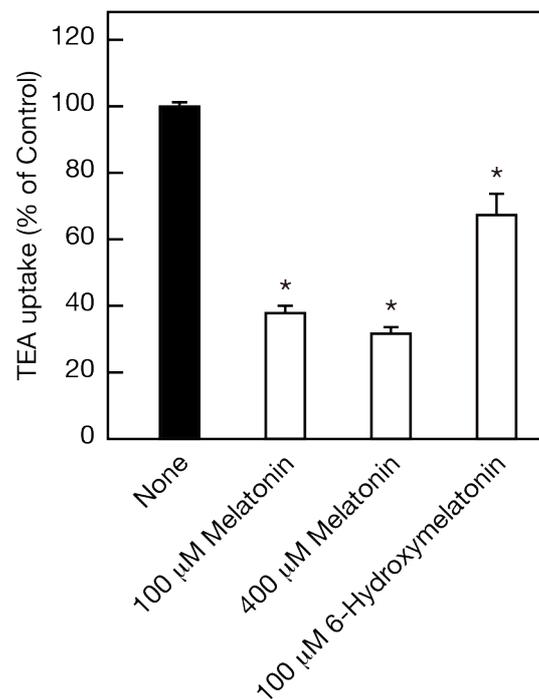
B

図 I-5. ヒト MATE1 輸送機能とメラトニン

A) 試験化合物の構造 B) TEA 輸送の *cis* 阻害: pH8.0 で, 50 μ M 14 C-TEA および試験化合物を HEK293 細胞に加え 37°C で 10 分インキュベートした。バックグラウンドとして Mock の値を差し引いた。各点の値は, Mean \pm SD ($n = 3$) である。Dunnett の検定において $p < 0.05$ となる群に*を付した。

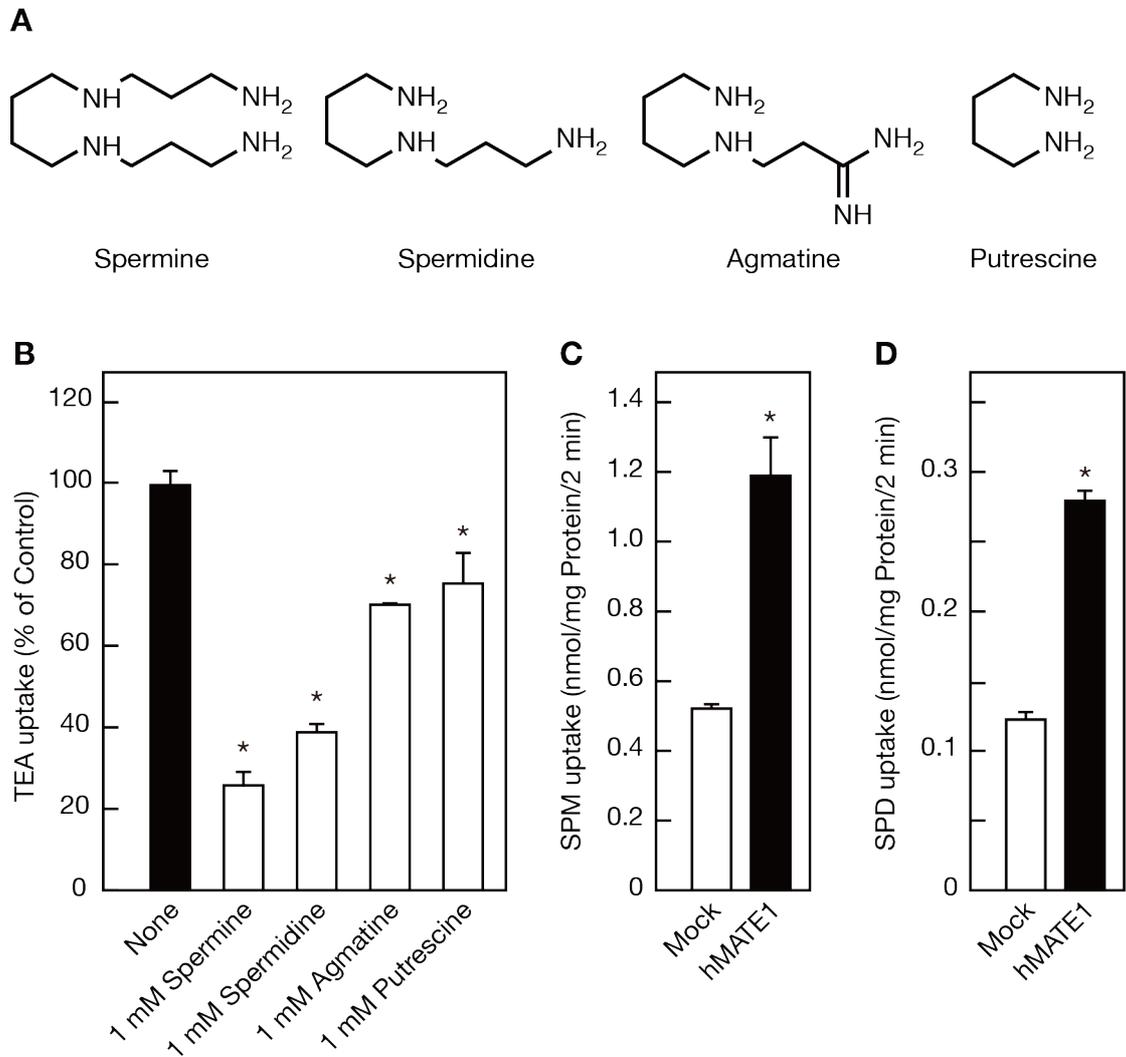


図 I-6. ヒト MATE1 輸送機能とポリアミン

A) 試験化合物の構造, B) TEA 輸送の *cis* 阻害: pH8.0 で, 50 μM ^{14}C -TEA および試験化合物を HEK293 細胞に加え 37°C で 10 分インキュベートした。バックグラウンドとして Mock の値を差し引いた。Dunnett の検定において $p < 0.05$ となる群に*を付した。C) スペルミン (SPM) の輸送: pH8.0 で, 50 μM ^3H -SPM を HEK293 細胞に加え 37°C で 2 分間インキュベートした。 t 検定において $p < 0.05$ となる群に*を付した。各点の値は, Mean \pm SD ($n = 3$) である。

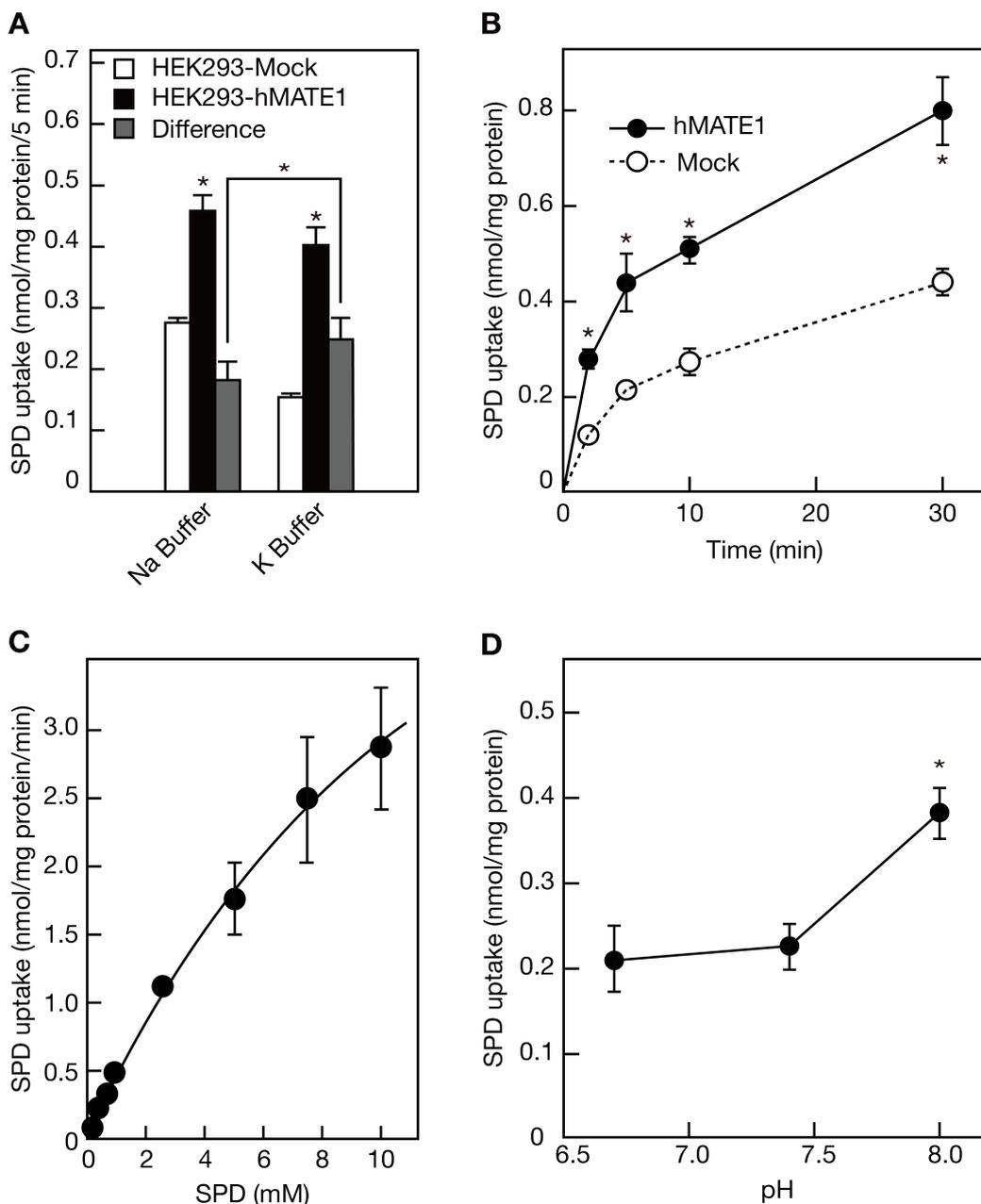


図1-7. スペルミジン輸送の特性解析

A) 高K刺激の影響: TEA輸送試験に用いたbuffer中の K^+ を全て Na^+ に置換したNa Buffer, その逆のK Bufferを用いた。B) 時間依存性 C) 濃度依存性 D) 細胞外pHの影響

特に表記のない場合, HEK293細胞安定発現系を用いてpH7.4のK buffer中, $50 \mu M$ 3H -SPDを $37^\circ C$ で5分輸送させた。CおよびDはバックグラウンドとしてMockの値を差し引いた。各点の値は, Mean \pm SD ($n=3$)である。AはHEK293-MockとHEK293-MATE1およびDifference同士を, BはHEK293-MockとHEK293-MATE1を, DはpH7.4を対照群としてDunnettの検定を行い $p < 0.05$ となる群に*を付した。

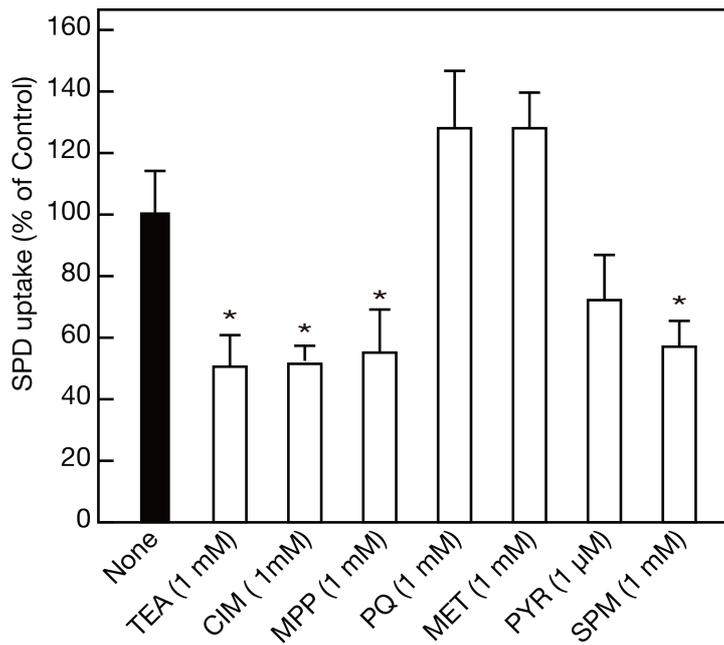


図 I-8. スペルミジン輸送の阻害剤感受性

HEK293 細胞安定発現系を用いて pH7.4 の K buffer 中、 $50 \mu\text{M}$ ^3H -SPD を 37°C で 5 分輸送させた。バックグラウンドとして Mock の値を差し引いた。各点の値は、 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ($n = 3$) である。None を対照群として Dunnett の検定を行い $p < 0.05$ となる群に * を付した。

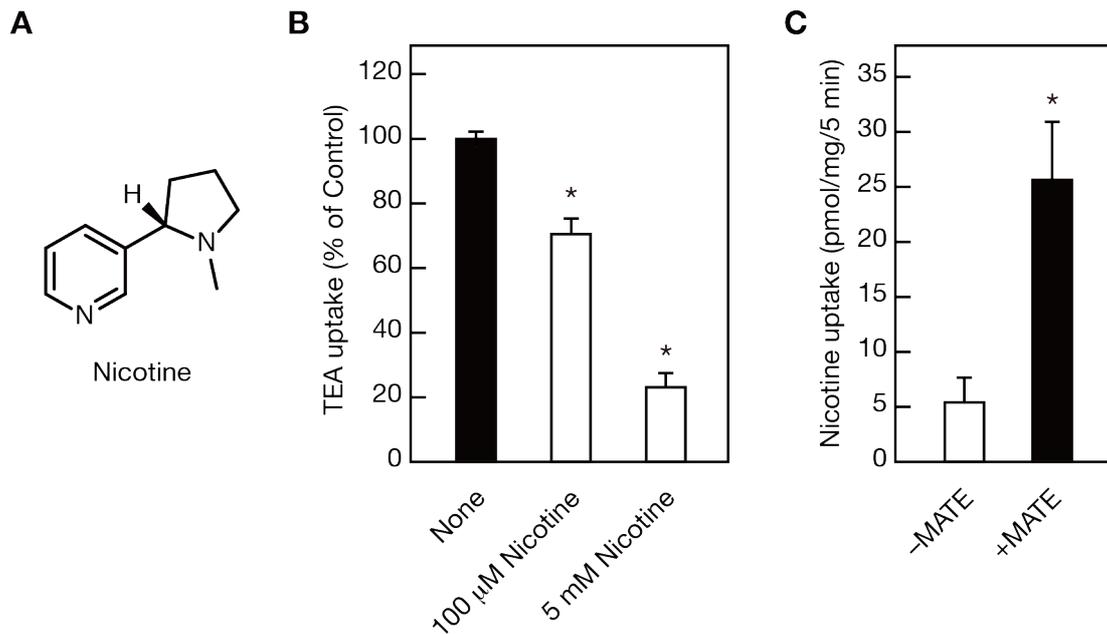


図 I-9. ヒト MATE1 輸送機能とニコチン

A) ニコチンの構造 B) TEA 輸送の *cis* 阻害: pH 8.0 で, 50 μ M 14 C-TEA および試験化合物を HEK293 細胞に加え 37°C で 10 分インキュベートした。バックグラウンドとして Mock の値を差し引いた。Dunnett の検定において $p < 0.05$ となる群に*を付した。C) ニコチンの輸送: 再構成系を用いてリポソーム内 pH6.7, リポソーム外 pH8.0 とし, 100 nM 3 H-Nicotine を 30°C で 5 分間反応させた。t 検定において $p < 0.05$ となる群に*を付した。各点の値は Mean \pm SD である。

I-4 考察

4a 基質認識性と生理的意義

ヒト MATE1 の基質認識性を放射標識化合物を用いて検討し、セロトニン、スベルミン、スベルミジン、およびニコチンが基質となることを明らかにした。また、直接輸送は測定していないがビタミン B₁ および E はヒト MATE1 を阻害した。このうち、ビタミン E は疎水性が高く既知のヒト MATE 基質を元に考えると MATE の基質とは考えにくい。しかし、げっ歯類の MATE2 は局在と阻害の検討から疎水性ステロイドホルモンの体内動態に関与することが推察されている (Hiasa *et al.*, 2006)。ヒト MATE2 は腎特異的に発現するが、げっ歯類 MATE2 は精巣特異的に発現する。このように、局在と機能に種差があるため、ヒト MATE1 がげっ歯類 MATE2 の持つ疎水性化合物輸送の機能を担う可能性がある。

実際に、これら内因性化合物の体内動態に関与するか、また関与する場合他のトランスポーターの発現がある中で寄与はどの程度かについては、ノックアウト動物やピリメタミンを用いたケミカルノックアウトによるさらなる解析が必要である。

4b セロトニン輸送と生理的意義

セロトニン (50 μM) をヒト MATE1 再構成リポソーム中へ取り込ませたとき、取り込みは TEA・パラコートの取り込みの約 1/20 と小さい (Sertoinin 2.8 nmol/mg/2 min, 図 I-4C; TEA 55 nmol/mg/2 min, Matsumoto, 2009)。また、100 μM セロトニンで 50 μM TEA の輸送は 10% 程度しか阻害されない (図 I-4B)。以上のことから、セロトニンの K_m 値は TEA のそれの $\sim 200 \mu\text{M}$ よりも大きい値を取ることが予想される。

血漿セロトニン濃度は臨床検査に用いられており、標準値は 0.1-数 μM order である。この濃度は推定 K_m 値から 2-3 桁小さく、セロトニン動態への寄与は大きくないものと予想される。

生体内のセロトニンの 90% は腸クロム細胞内に、2% は中枢神経系に存在する (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008)。腸クロム細胞ではクロム親和性顆粒中に $\sim 100 \text{ mM}$ order で濃縮されている。この顆粒が開口放出されることは知られているが、放出後、間隙中のセロトニンの最大濃度はよくわかっておらず、 K_m 値近くまで上昇する場合 MATE がその動態に関与する可能性はある。その判断には、間隙中のセロトニン濃度、ヒト MATE1 によるセロトニン輸送の速度論、およびヒト MATE1 の局在・発現量について解析する必要がある。

セロトニン神経伝達を行うプレシナプスの細胞膜上には、セロトニントランスポーターの SERT/SLC6A4 が局在している (Ramamoorthy *et al.*, 1993)。SERT のセロトニン K_m 値は $\sim 0.5 \mu\text{M}$ と高親和性である (Ramamoorthy *et al.*, 1993)。SERT と MATE1 の K_m 値は二桁以上の差があるため、中枢神経系の細胞膜上における高親和性の取り込みは SERT が支配している

ものと考えられる。

セロトニンのは大半は、モノアミンオキシゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼによる代謝を経て、5-ヒドロキシインドール酢酸 (5HIAA) となる (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008)。5HIAA の 90% は尿中に排泄される。5HIAA は両性化合物でありセロトニンと同じアミン部分を持つ。そのため、5HIAA の尿中排泄にヒト MATE が関与する可能性があり、検証する必要がある。

以上のことから、ヒト MATE1 は高濃度のセロトニンを輸送することはできるが、生体内でその動態に関与しているかは、輸送の速度論的解析、局在・発現量の解析、ノックアウトによる動態の変化の検討を含むさらなる検討が必要である。

4c ポリアミン輸送と生理的意義

生体内に存在する主要なポリアミンは、スペルミン、スペルミジン、アグマチン、およびプトレシンの 4 種類である。このうち、アグマチンは、MATE1 の基質であることが報告されている (Winter *et al.*, 2011)。しかし、これらのポリアミンの中でも最も主要で多様な生理機能を持つスペルミンとスペルミジンが MATE1 の基質であるかは不明であった。ここに、スペルミンおよびスペルミジンも MATE1 の基質であることを明らかにした。ポリアミンは細胞の増殖や分化など多彩な生理活性を持つことが知られている (Casero and Marton, 2007; Ogden and Traynelis, 2011; Williams, 1997)。ポリアミンはオルニチンデカルボキシラーゼによって細胞内で合成されると同時に、細胞外からも積極的に取り込まれる (Kakinuma *et al.*, 1988)。OCT は膜電位を駆動力とするトランスポーターで多価カチオンであるスペルミジンを細胞内に取り込む。その K_m は 1 mM 程度と報告されている (Sala-Rabanal *et al.*, 2013)。一方、MATE1 のスペルミジンに対する K_m は本研究から 13.5 mM であった。血中ポリアミン濃度が 5-10 μM であること (Soda *et al.*, 2009)、細胞内濃度が数-数 10 mM であること、 H^+ との対向輸送であることを考えると、ヒト MATE1 はポリアミンを細胞内から血液方向へ排出する方向に働いているものと推察される。しかし、ポリアミンホメオスタシスにおける MATE1 の寄与は現在のところ不明であり、今後の *in vivo* レベルでの検討が待たれる。

4d 阻害剤認識性とリガンド結合部位

MATE の基質・阻害剤には、電荷および構造の異なる様々な化合物が含まれる。MATE は、その中でも分子量 100-1000 の低分子のカチオンを好むことが知られていた。本章の検討から、新たに中性分子またはアニオンとして存在する化合物群、特にフラボノイドなどがヒト MATE1 を阻害することを見出した。その中でもイソラムネチンとベルガモチンは異なる骨格を持つにも関わらず、両者は競合的にヒト MATE1 による TEA 輸送を阻害した。このことから、これら 2 化合物は、TEA と同一の基質結合部位に結合する、または TEA

の結合を妨げる位置に結合することが示唆された。

試験したフラボノイドの阻害効果はヒドロキシ基およびメトキシ基の位置に強く依存した。例えば、イソラムネチンとゲラルドールは5-ヒドロキシ基のみが異なるが、ゲラルドールは阻害を全く示さず、5-ヒドロキシ基がMATE1の阻害に重要であることが示唆された。イソラムネチン、ケンペロール、ケルセチンは3'位の官能基のみが異なる。イソラムネチンはメトキシ基をもち、およそ100倍IC₅₀値が小さい。ケルセチンとラムネチンを比較すると7位のみが異なる。ケルセチンはヒドロキシ基を、ラムネチンはメトキシ基を持ち、10倍活性が変化する。ケルセチンとタマリキセチンの比較から4ヒドロキシ基の重要性が示唆される。以上の結果から、5,7,4'位のヒドロキシ基および3'位のメトキシ基がMATE1の阻害に重要であることが示唆された。興味深いことにイソラムネチンは3,5,7,4'位にヒドロキシ基を、3'位にメトキシ基を持ち、阻害に重要な条件をすべて満たしている。

4e 新規天然物阻害剤と薬物動態学的意義

本章で試験した化合物の中では、イソラムネチンが最も強い阻害剤であった。イソラムネチンはイチヨウの主要なフラボノイドである (Oh and Chung, 2004)。また、ケルセチンの代謝産物としてもよく知られている (Bieger *et al.*, 2008; Gugler *et al.*, 1975)。ケルセチンに富んだ食事を摂った後の血漿中のイソラムネチン濃度は約0.36 μMに達する (Pascual-Teresa *et al.*, 2004)。この値はイソラムネチンのIC₅₀値およびK_i値に匹敵し、イチヨウ葉サプリメントやケルセチンの豊富な食事を摂った際は注意を払う必要がある (Weinmann *et al.*, 2010)。

ベルガモチンはグループフルーツジュースの成分であり、薬物代謝酵素CYPを阻害することで食品・薬物相互作用を起こすことがよく知られている (Ameer and Weintraub, 1997; Dresser *et al.*, 2000; Goosen *et al.*, 2004; Takanaga *et al.*, 2000)。グレープフルーツジュースを飲用後の血漿中ベルガモチン濃度は2-10 nMであり、この濃度は実験から得られたK_i値より極めて小さい (Goosen *et al.*, 2004)。よって、食品中のベルガモチンはMATE1を介したカチオン性薬物の動態に影響しないことが示唆された。

以上、本章ではヒトMATE1の基質認識性を拡張し、内因性の新規基質を見出した。また、フラボノイド骨格を持つ新規阻害剤を見出し、簡単な構造活性相関を明らかにした。

第 II 章 ヒト MATE1 精製タンパク質を用いた分子機構の解析

II-1 H⁺が TEA の輸送に及ぼす影響

1a pH および Δ pH が TEA 輸送に及ぼす影響

初めに、小胞内外の組成を自在に変えられる精製・再構成系 (実験方法参照) を用いて、TEA 輸送に及ぼす pH および Δ pH の影響を区別して再解析した。 Δ pH が無い条件において、TEA 輸送は pH 依存性を示すことから (Matsumoto, 2009)、輸送機能には解離性アミノ酸残基の関与が示唆されていた。(図 II-1A)。そこで、小胞内または小胞外の pH を固定し pH 勾配を形成させると、TEA 輸送活性は pH 勾配形成に伴って上昇した (図 II-1B, C)。この活性は Δ pH 非存在下よりも大きい値を示し、 Δ pH を駆動力とする能動輸送であると推察される。即ち、H⁺対向輸送が生じていることが示唆された。

小胞の外側の pH を変化させた場合には pH 8.0 で最大となり、pH 8.5 では、 Δ pH が増大しているにも関わらず活性は増大しなかった (図 II-1B)。同様に、小胞内の pH を変化させた場合は pH 7.0 で最大活性となり、pH 6.0 では Δ pH が増大しているにも関わらず活性は低下した (図 II-1C)。このことは、TEA 輸送活性が Δ pH だけでなく MATE1 自体の pH 依存性の影響を受けていることを示している。

1b H⁺輸送の直接検出

腎刷子縁膜小胞を用いた OC⁺/H⁺交換輸送系の検討や細胞を用いた MATE の検討において、MATE の輸送活性は Δ pH によって上昇する。前項で示したように、夾雑因子の存在しない再構成系においても同様に、輸送活性は Δ pH によって上昇した。以上のことから、MATE は H⁺の交換輸送体であることが強く示唆された。そこで、基質輸送に伴う H⁺対向輸送を実証するため、pH 感受性色素を封入したリポソームを作製した。OC⁺/H⁺交換輸送系の H⁺輸送能は古典的には pH 感受性色素のアクリジンオレンジを用いて試験されてきた (Hsyu and Giacomini 1987; Sokol *et al.*, 1988)。しかし、アクリジンオレンジはイヌ MATE の基質となるため (Sokol *et al.*, 1988; Sokol *et al.*, 1990)、ヒト MATE に対しても基質または阻害剤となる可能性があり、H⁺輸送の指示薬としては不適當であることが予測される。そこで本研究では、Tanaka らの古細菌スフェロプラストを用いた PfMATE の機能の解析 (Tanaka *et al.*, 2013) を参考にアニオン性の pH 感受性色素である BCECF (2',7'-Bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein) を用いることにした (図 II-2A)。BCECF 封入 MATE リポソームに TEA を添加すると蛍光強度の増大がみられ、小胞内のアルカリ化が検出された (図 II-2B)。即ち、TEA 輸送と共役した H⁺の対向輸送が直接検出された。この H⁺輸送はピリメタミンによって完全に消失した (図 II-2C)。

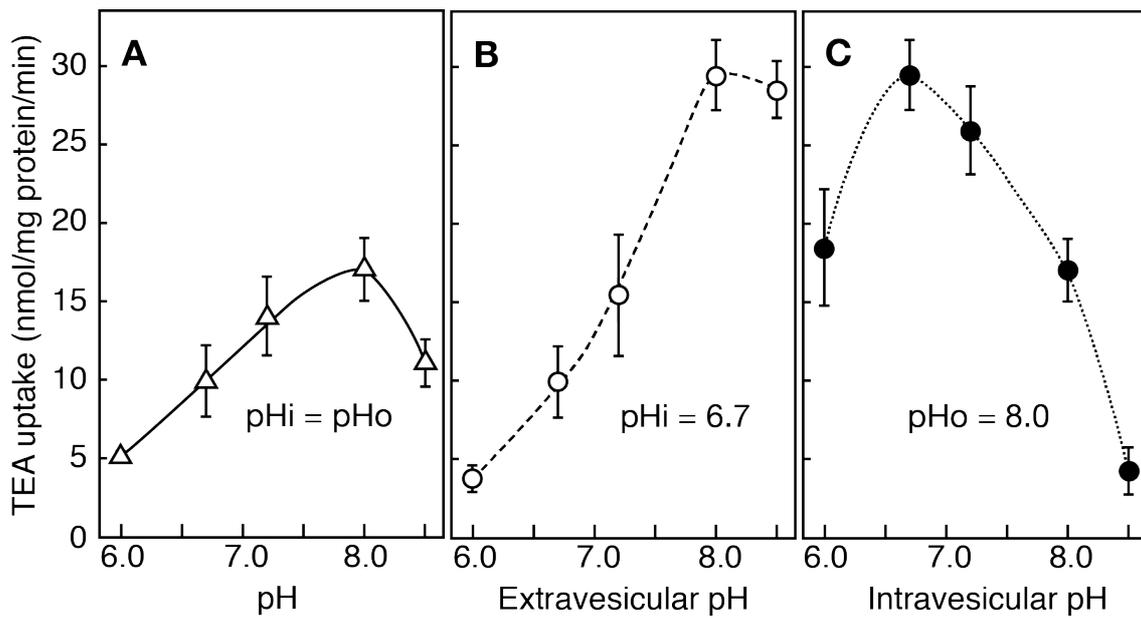


図 II-1. H^+ が TEA 輸送に及ぼす影響

種々の pH 下, 再構成ヒト MATE1 に 1 分間 TEA を輸送させた。A) $pH_i = pH_o$ (Matsumoto, 2009)より引用, B) $pH_i = 6.7$, C) $pH_o = 8.0$ (pH_i : リポソーム内 pH, pH_o : リポソーム外 pH) バックグラウンドとして空のリポソームの値を差し引いた。各点の値は, Mean \pm SE ($n = 3$) である。

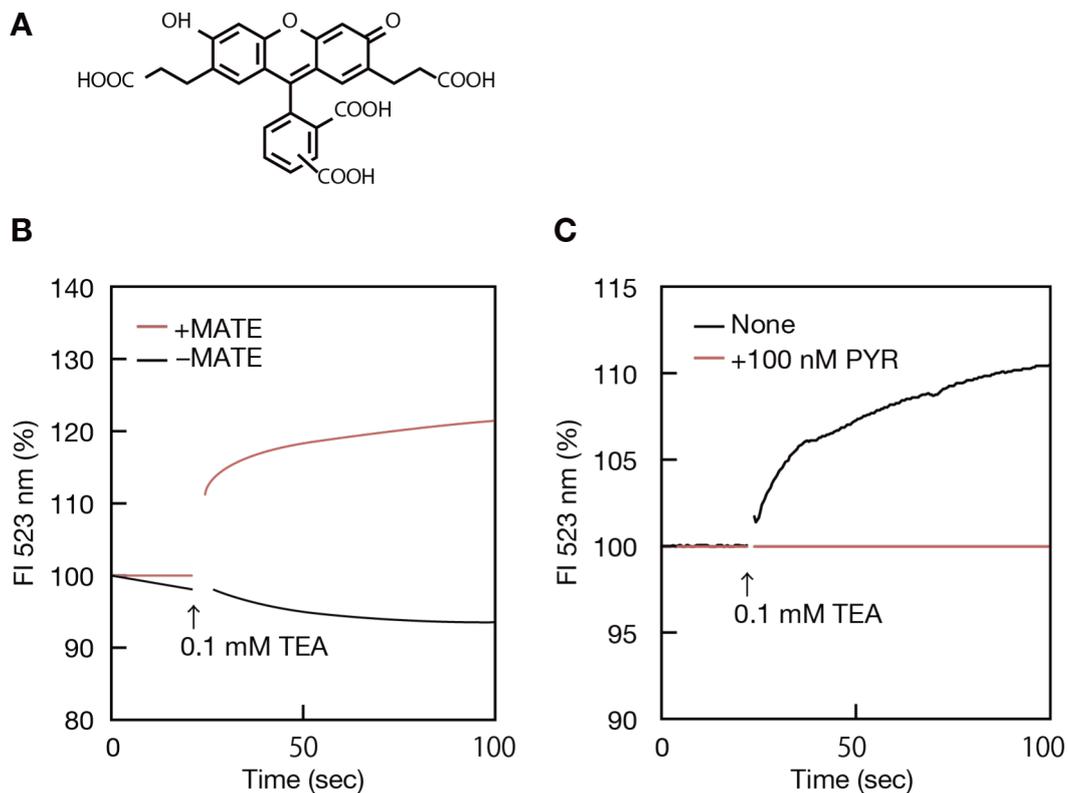


図 II-2. ヒト MATE1 の TEA と共役した H⁺の輸送。

BCECF 封入リポソームを用いて、H⁺輸送を試験した。透析法によりヒト MATE1 を再構成した。5 mM BCECF を封入しリポソーム内 pH を 6.0 とした。リポソーム外 pH を 8.0 とし 23°C 下、励起波長 485 nm/蛍光波長 523 nm の蛍光を測定した。A) BCECF の構造 B) TEA 依存的な蛍光変化 C) ピリメタミンによる H⁺輸送の阻害

II-2 酸性残基の解離状態が TEA の結合に及ぼす影響

前節では、MATE が ΔpH を駆動力とする H^+ 対向輸送体であることを示した。一方、 ΔpH 非存在下においても MATE は pH 依存性を示す。緒言で述べたように、カチオン性基質を好んで輸送することや、DCCD 感受性および変異体を用いた解析などから、MATE が機能する上で酸性残基が何らかの役割を持つことが示唆され、実際に基質特異性に関与することが示されていた (Matsumoto *et al.*, 2008)。そのため、 ΔpH 非存在下で見られた pH 依存性は酸性残基の解離状態により結合過程が影響を受けたものと仮説を立てた。その実証のために、基質の結合の解析を試みた。ここで、精製 MATE1 タンパク質は再構成するまで不安定である。しかし、従来トランスポーターの精製タンパク質の機能測定に用いられてきた再構成法では、小胞構造を持つリポソームが形成される。小胞膜を介して内側と外側の空間が存在するため輸送が生じ、結合の測定には不適である。そのため、精製タンパク質を lipid-detergent micelle 化し、高濃度で比較的安定な状態にして結合を試験した。

まず、酸性残基が基質の結合に関与することを示すために、カルボキシ基修飾試薬である EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide) を用いた。ヒト MATE1 タンパク質を EDC で前処理すると結合は著明に減少し、酸性残基の関与が強く示唆された (図 II-3)。そこで、酸性残基の解離状態を変化させると考えられる pH の影響を検討した。TEA 結合は酸性側 (pH 6.7) で低く、アルカリ側 (pH 8.0) で上昇する pH 依存性を示した (図 II-3)。そのプロファイルは ΔpH 非存在下で生じる受動輸送の pH 依存性に類似しており、pH 8.0 に極大を持ち、pH 8.5 では低下していた (図 II-3)。

次に、保存性から最も重要と考えられる必須残基 Glu273 が結合に果たす役割を、E273Q 変異体を用いて解析した。TEA 結合量は野生型にくらべて著しく低く、pH 7.4 では野生型の 10%程度であった。このことは Glu273 が基質結合に重要な役割を持っていることを示している。また、E273Q 変異体の TEA 結合は全ての pH で著明に減少したが、その pH 依存性は野生型に似た傾向を示した。以上のことから、TEA の結合には Glu273 残基を筆頭に、複数のグルタミン酸残基が関与することが示唆された。

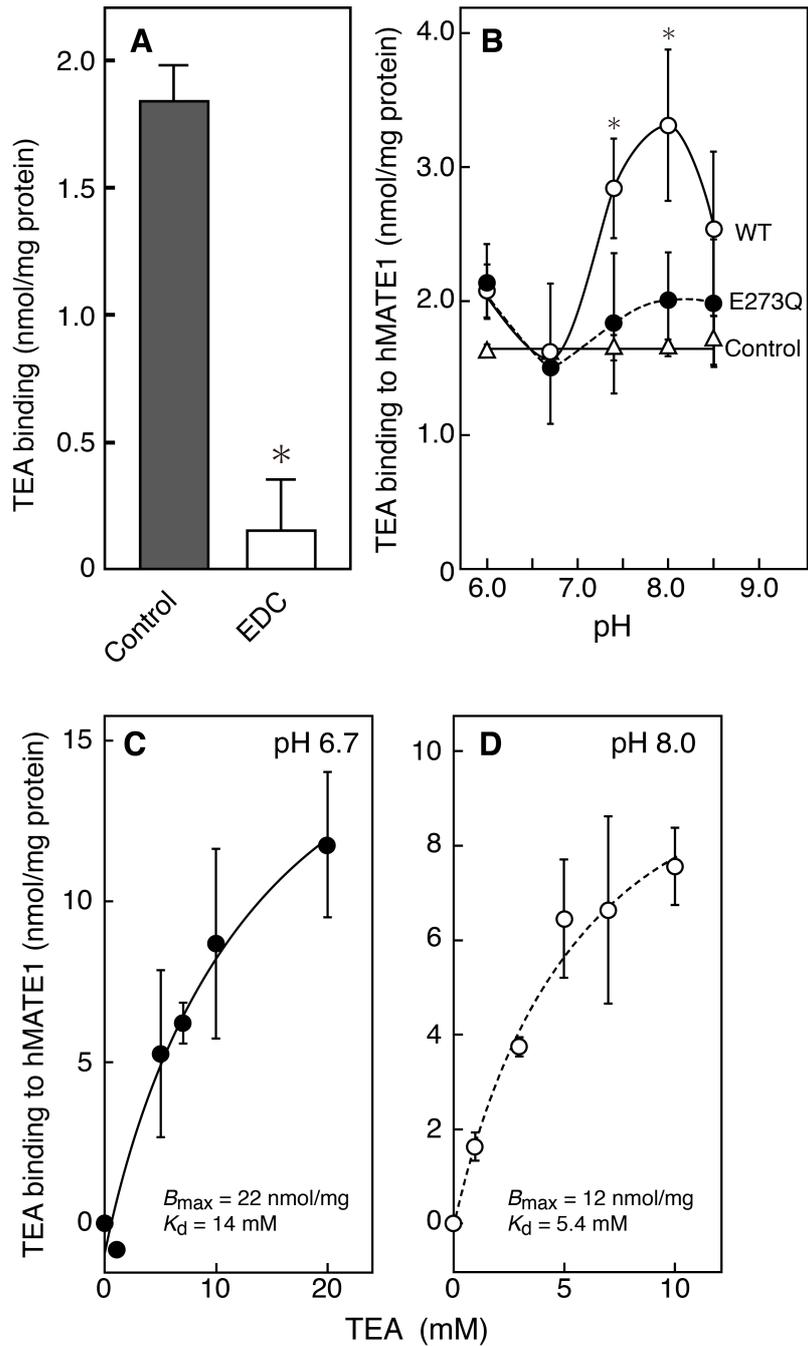


図 II-3. Lipid-detergent Micelle 中の MATE に対する TEA 結合の解析

0.5 mg/mL L- α -Phosphatidylcholine, 0.1% DDTM (*n*-dodecyl- β -D-thiomaltopyranoside), \pm hMATE1 micelle に 1 mM TEA を加え, 氷上 30 分間反応させた。ろ過によって遊離 TEA を除去し結合量を測定した。A) EDC 前処理の影響: EDC (100 μ M) でヒト MATE1 を前処理した。B) 結合の pH 依存性 C) pH6.7 における TEA 結合の濃度依存性: 1, 5, 7, 10, 20 mM TEA を反応させた。D) pH8.0 における TEA 結合の濃度依存性: 1, 3, 5, 7, 10 mM TEA を反応させた。C および D は, Control Micelle の値を差し引いた。各点の値は, Mean \pm SE ($n = 3$) である。

II-3 ナノディスク再構成系を用いた結合の検討

前節では、lipid-detergent micelle を用いた系で TEA の結合を解析した。本節では、より生理的環境に近い脂質二重層中のトランスポータータンパク質に対する基質の結合を測定することを目的として、ナノディスク再構成系に着目した。ナノディスクは、ナノサイズの円盤状脂質二重層で膜タンパク質を安定に保持できる (図 II-4)。ナノディスクは円盤状であり、球状のリポソームとは異なり、内外のコンパートメントが存在しない。そのため、ろ過と組み合わせることで基質の輸送ではなく結合のみを測定することができる。今日では、ナノディスクを用いて種々の膜タンパク質の機能が解析されているが、膜骨格タンパク質には様々な長さのものが用いられている (Bayburt *et al.*, 2002; Denisv *et al.*, 2004)。本研究ではヒト MATE1 ナノディスクを再構成するに当たり、膜骨格タンパク質としてよく用いられている MSP1E3D1 を用いた。

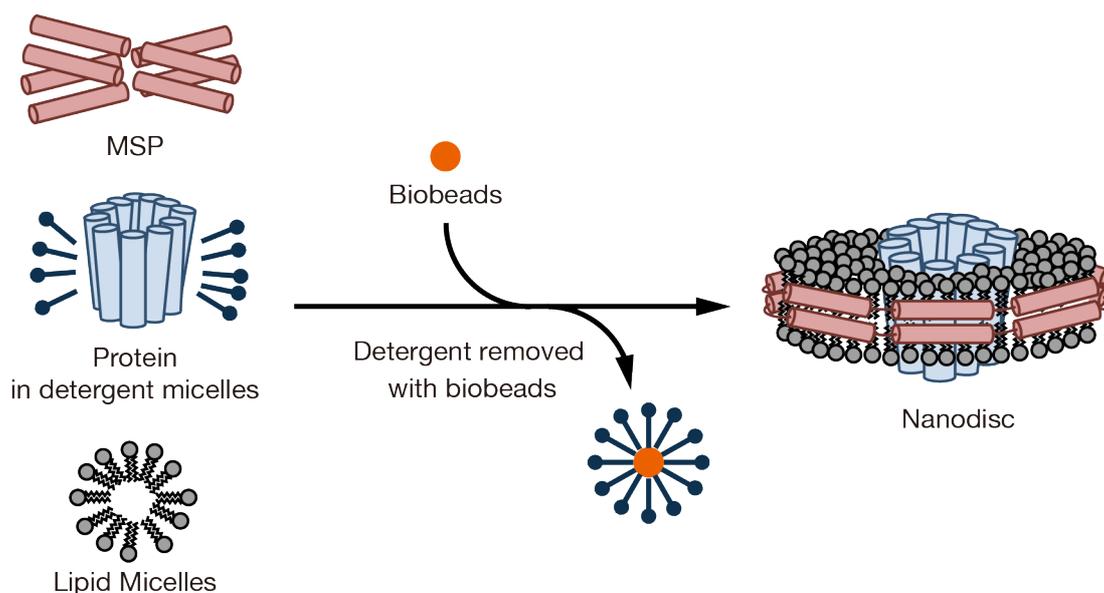


図 II-4. ナノディスクの構築

界面活性剤存在下、MSP、タンパク質、および脂質を混合し、biobeads などを用いて界面活性剤を除去するとナノディスクが自発的に構築される。ナノディスクは、MSPに取り囲まれた脂質二重層からなるナノサイズの円盤状構造体であり、任意の疎水性タンパク質を再構成することができる。

3a MSP1E3D1 の精製

大腸菌発現系を用いて、N末に His タグを融合させた MSP1E3D1 タンパク質を精製した。IPTG 誘導により大腸菌膜上に発現が確認された (図 II-5)。Ni-NTA アフィニティーカラム処理によって MSP1E3D1 を精製することができた。

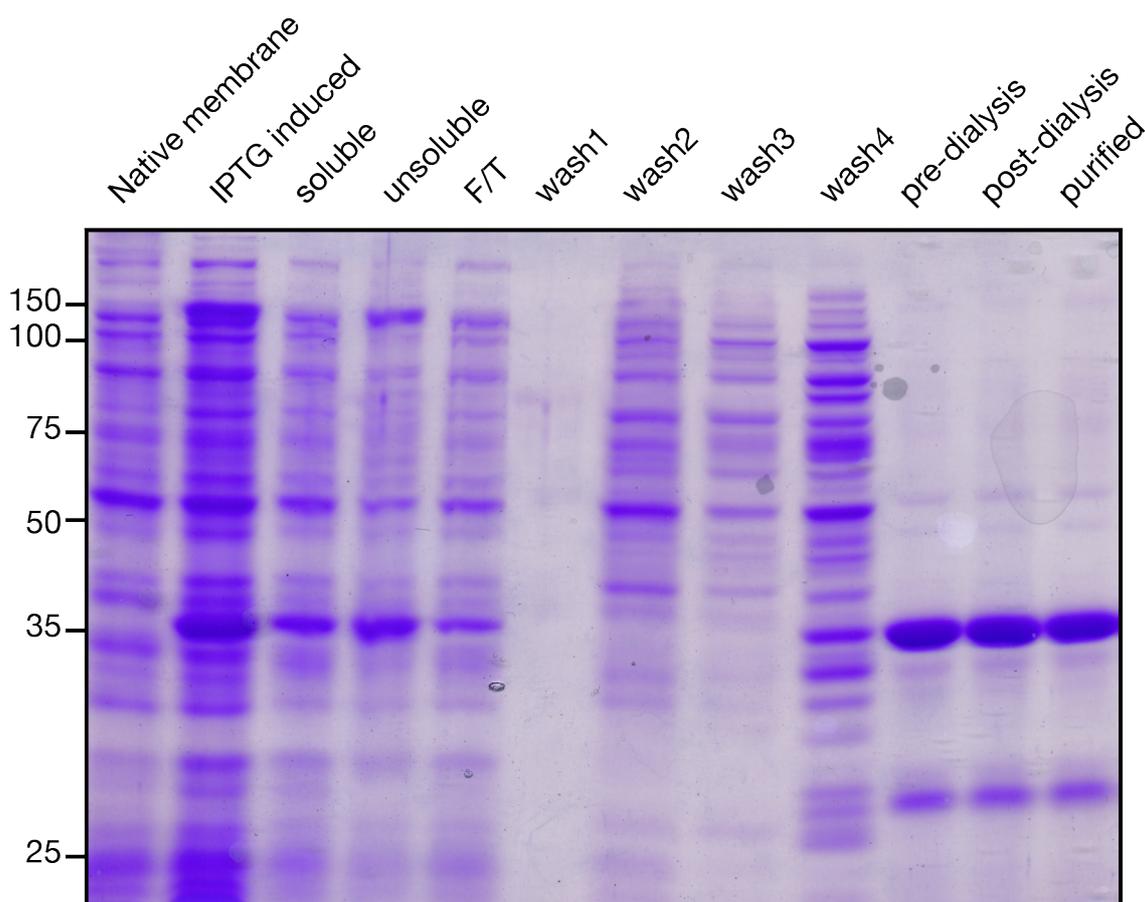


図 II-5. MSP1E3D1 の精製

MSP1E3D1 を大腸菌発現系を用いて精製した。精製各過程のサンプル 5 μ g を 11% SDS-PAGE にかき、CBB 染色した。

3b ナノディスク調製条件の検討

凍結融解希釈法によって精製されるリポソームはサイズが不均一な粒子集団であり、比較的高密度のものが多いため、遠心によって沈澱する。一方、ナノディスクは比較的低密度の均一粒子となる。このため、リポソームとナノディスクは超遠心処理後、上清/沈澱いずれに移行するかによって判別できる。そこで、種々の比率で再構成し遠心分画後、抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロット法により形成された構造を調べ、ナノディスク調製条件を検討した。

MATE: Lipid = 1: 500 (モル比) 条件下、ヒト MATE1 は沈澱に多く、主にリポソームとして存在していた (図 II-6)。MSP 比が増すにつれて、ヒト MATE1 バンドの上清移行が確認され、再構成される構造体がりポソームからナノディスクに変化した。MSP1E3D1 は条件によらず上清に存在した。続いて、MATE: MSP = 1: 5 に固定して Lipid 比を変化させた。Lipid 比によらずヒト MATE1 は上清に分布しナノディスクに形成が確認された。

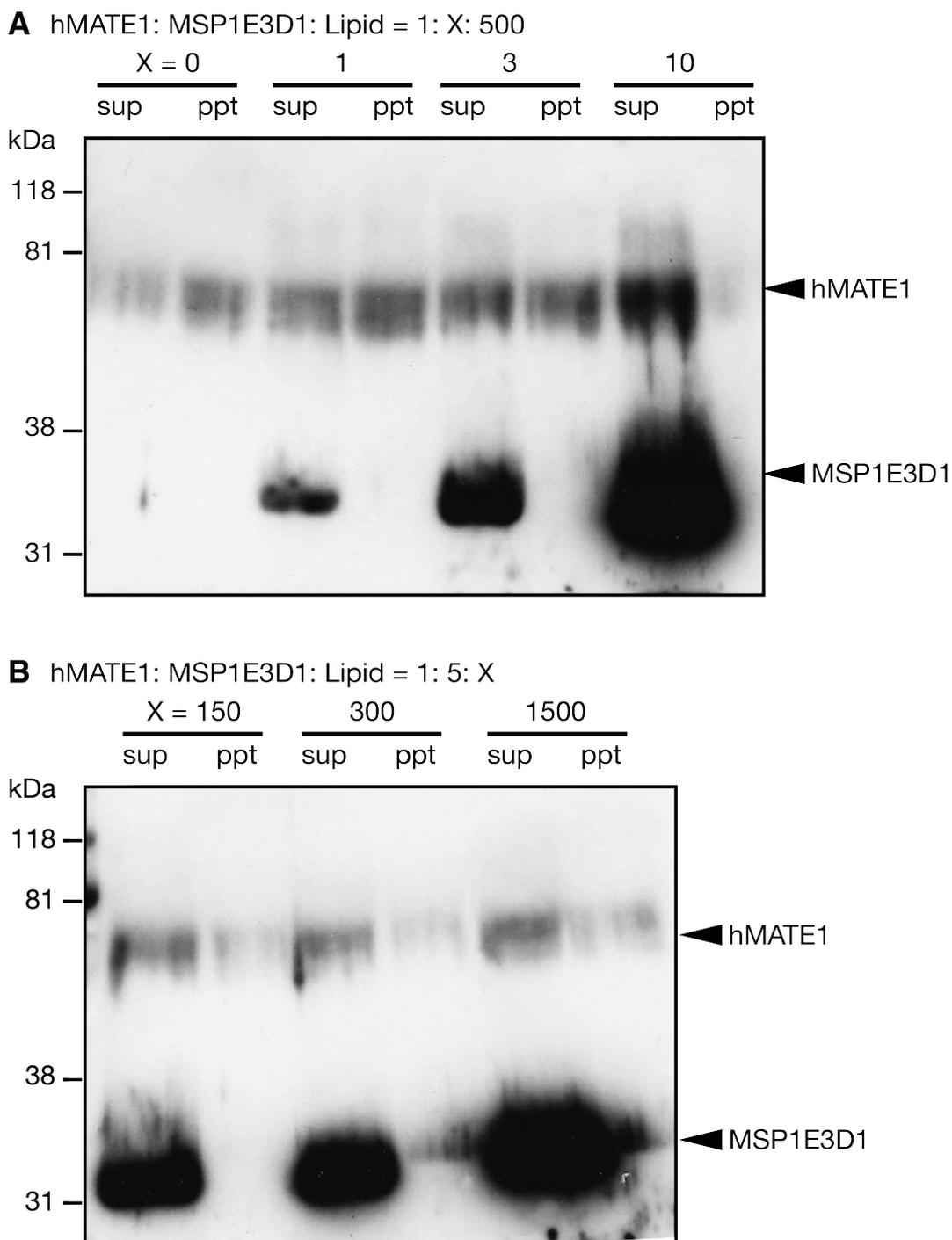


図 II-6. ナノディスク再構成条件の検討

ヒト MATE1, MSP1E3D1, Lipid の比を変化させタンパク質を脂質中に再構成させた。抗 His タグ抗体を用いてウェスタンブロットを行い、形成された構造体を解析した。A) MSP titration: ヒト MATE1: MSP1E3D1: Lipid = 1: X: 500 (モル比), B) Lipid titration: ヒト MATE1: MSP1E3D1: Lipid = 1: 5: X (モル比), 推定バンド位置 (ヒト MATE1 62 kDa, MSP1E3D1 32 kDa) を ◀ で示した。

3c Glu273 残基カルボキシル基の基質結合に及ぼす影響

前項で構築したナノディスク再構成系を用いて、基質結合における Glu273 残基カルボキシル基の関与を検討した。前節の検討から MATE に対する TEA の結合親和性は低いいため、系中の MATE タンパク質が少ない条件では結合が測定しにくい。そこで、TEA と比較して高親和性の基質であるシメチジンを用いて結合を測定した (TEA K_m 220 μ M, Otsuka *et al.*, 2005; シメチジン K_m 8 μ M, Ohta *et al.*, 2009)。野生型と E273Q 変異型 MATE はいずれも同程度ナノディスクに再構成された (図 II-7A)。野生型 MATE 再構成ディスクは、空のディスクに対し有意にシメチジンを結合した。この結合は、E273Q 変異によって完全に消失した (図 II-7B)。

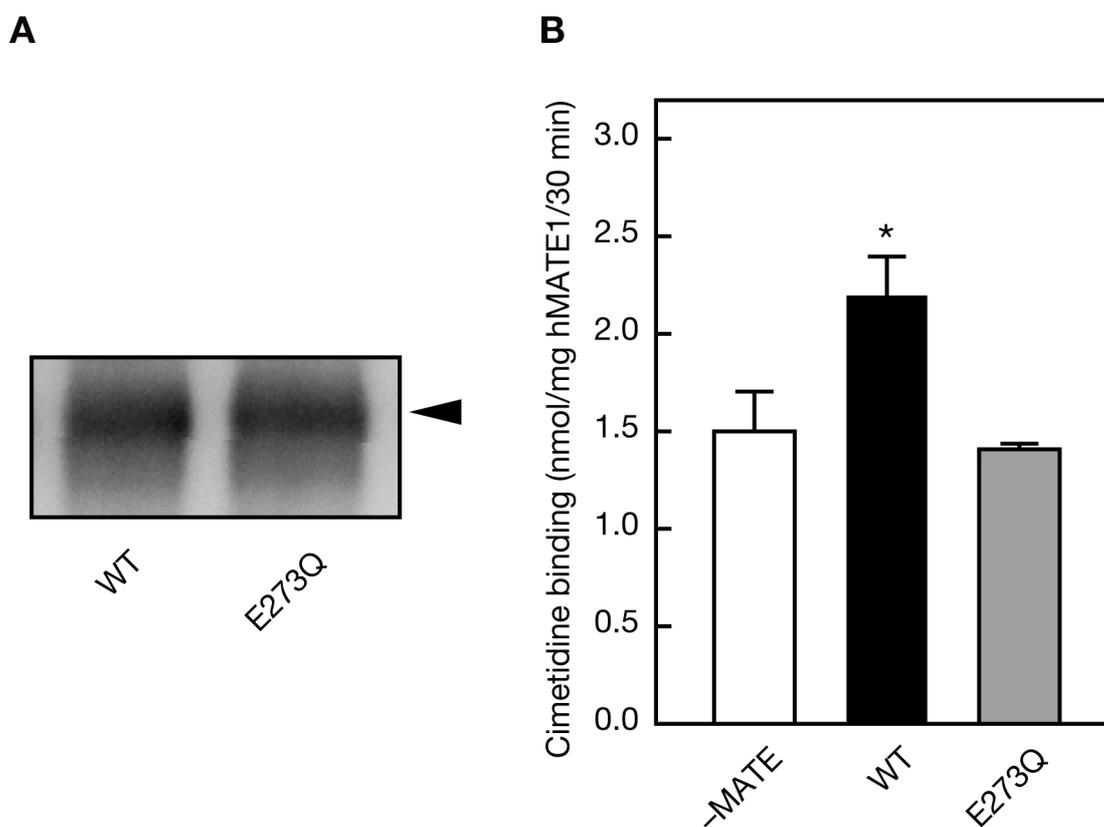


図 II-7. E273Q 変異のシメチジン結合に及ぼす影響

ヒト MATE1: MSP1E3D1: Lipid = 1: 10: 500 としてナノディスクを構築し、シメチジン結合を試験した。A) ウェスタンブロット法による再構成の確認。ナノディスク画分 2 μ g を SDS-PAGE にかけて、抗 MATE1 抗体で検出した。MATE バンドを ◀ で示した。B) シメチジンの結合。100 μ M 3 H-シメチジンを pH7.5, 25°C, 30 分反応させた。ゲルろ過し、ナノディスク結合シメチジン (nmol/mg MATE/30 min) を測定した。各点の値は、Mean \pm SE ($n = 3$) である。-MATE を対照群とした Dunnett の検定において $p < 0.05$ となる群に * を付した。

II-4 考察

4a H⁺輸送の実証とその応用

従来の細胞・小胞を用いた検討では細胞内 pH を正確にコントロールできないために pH と Δ pH の影響を区別できなかった。本章ではこの問題を、小胞内外の組成を完全にコントロールできる精製・再構成系を用いることで解決した。まず、輸送は pH の影響を受けるのみならず、 Δ pH によって駆動されることを明らかにした。続いて、BCECF 封入りポソームを用い TEA の小胞内取り込みと共役して H⁺ の流出が生じることを観察することで、MATE が実際に H⁺ を輸送していることを実証した。カチオン性基質が輸送されるときは常に H⁺ も対向輸送されるものと考えられることから BCECF 封入再構成系は、標識基質を用いることなくリアルタイムに MATE の輸送機能を測定することができるため、今後の機能解析に応用が期待される。

4b 基質結合の pH 依存性とグルタミン酸残基の役割

従来、ヒト MATE1 精製タンパク質は再構成するまで不安定であり、また TEA は低親和性であるために結合の測定は困難であった。本研究では、高濃度のタンパク質に脂質を添加することで安定性を高め、バックグラウンドの低減、S/N 比を改善し、ヒト MATE1 への TEA の結合を初めて測定した。

TEA の結合は、EDC 前処理や E273Q 変異によって著しく低下しており、Glu273 残基のカルボキシル基が TEA の結合に重要な役割を果たしていることが明らかになった。先に述べたように MATE1 の TEA に対する K_m は酸性 pH によって上昇し、見かけの親和性が低下する (Matsumoto, 2009)。これは実際の TEA の MATE への結合とよく一致する。また、これまでの *Matsumoto* らによる変異導入解析と本研究から、Glu273, Glu278, Glu300, および Glu389 の 4 つの保存性残基が基質認識に関わっており、これら 4 残基に変異を導入すると TEA 輸送の pH 依存性が変化することが明らかになっている (Matsumoto *et al.*, 2008)。本研究の pH 依存的な TEA 結合はこれらの変異導入の結果を支持している。以上の結果はこれらのグルタミン酸残基の解離状態が TEA 等のカチオン性基質の結合に重要な鍵を握っており、グルタミン酸残基とカチオン基質が静電的相互作用によって相互作用していることを示唆している。

また、Glu273 残基は真核生物 MATE 中唯一完全に保存されており、変異導入によって構造の異なる複数の 1 価カチオンの輸送が消失すること (Otsuka *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2008) から基質の種類に依らず輸送に必須な残基である。そのため、H⁺ 結合部位としての役割があるものと考えられている。しかし、カルボキシル基を失った E273Q 変異では輸送活性が消失するために機能の解析が難しく、基質の結合に関与するか、よくわかっていなかった。本章では輸送ではなく結合を測定することで、少なくとも TEA およびシメチジン

の結合に重要な役割を果たしていることを明らかにした。以上のことから、ヒト MATE1 の Glu273 残基は H^+ および基質の結合に関与しているものと推察される。

さらに、TEA の結合は pH に強く依存しており、 $pH > 6.7$ を除く pH 域で受動輸送と同様のベル型曲線を示した。この曲線のうち、 $pH 6.7-8.0$ の間で生じる TEA の結合および輸送の上昇は、基質結合に関与するカルボキシル基の解離状態を反映しており、 pK_a はこの pH 領域にあるものと推定される。

高 pH 領域 ($pH > 8.0$) では、結合に関与するカルボキシル基は解離することで、有機カチオンとの静電的相互作用は強くなり、結合は増加するものと考えられる。しかし、実際には結合・受動輸送ともに減少している。そのため、解離性残基の解離状態や水素結合の変化などが生じること、この変化による影響は結合に関与するカルボキシル基の解離によるものよりも強いことが示唆された。

低 pH 領域 ($pH < 6.7$) では、カルボキシル基は分子型となり有機カチオンとの静電的相互作用は減少するため、結合は減少すると予想される。しかし、実際には結合は上昇している。また、 ΔpH の有無を問わずこの pH 領域で輸送が低下することから、酸性 pH は MATE の輸送を阻害する。以上のことから、結合に関与するカルボキシル基の分子型化のみならず、解離性残基の解離状態や水素結合の変化が生じ、その結果結合が上昇していることが示唆された。

このように、極端な pH ($pH < 6.7$, $pH > 8.0$) では TEA 結合に関与するカルボキシル基の解離平衡以外にもヒト MATE1 分子内に変化が生じており、輸送が低下することが示唆された。

以上、本章では精製タンパク質を用いた手法により初めてヒト MATE1 が pH 勾配を駆動力とする H^+ 対向輸送体であることを実証した。また、初めて基質結合過程の性質を解析し、酸性残基が結合に関与することと、pH が結合親和性を変化させることを明らかにした。さらに、真核生物中完全に保存された Glu273 残基が基質である TEA およびシメチジンの結合に深く関与していることを示した。以上の結果は、緒言で触れた輸送モデルを矛盾すること無く説明することができる。

第 III 章 MATE 特異的阻害剤ピリメタミンの作用機序の解析

III-1. ピリメタミンがヒト MATE1 に及ぼす影響

初めに、HEK293 細胞系および再構成系を用いて阻害の濃度依存性を検討した。阻害曲線は、細胞を用いた系より再構成系において高濃度側に shift した (図 III-1)。この差は試験系間の MATE 量差を反映している可能性が高く、系中の MATE 量を厳密にコントロールできる精製系について系中ヒト MATE1 タンパク質が 100 nM であることを考慮すると、ピリメタミンは MATE とほぼ 1:1 で反応することが示唆された。TEA 輸送の阻害は非競合的であり、阻害定数は 14.3 nM であった。そこで、Lipid-detergent micelle の系を用いてピリメタミンが TEA の結合に及ぼす影響を検討した。TEA を 1 mM とし、50 μ M のピリメタミンを反応させた。pH8.0 における TEA の K_d は \sim 5 mM (図 II-3D)、ピリメタミンの K_i は \sim 14 nM (図 III-1) であることから、この実験条件では、ピリメタミンが TEA の結合を阻害する場合、有意な結合量の低下がみられるものと予想される。実際には、TEA の結合量はピリメタミンによって有意な変化は認められず、ピリメタミンは TEA の結合過程に影響しないことが示唆された (図 III-2)。

次に、HEK293 細胞を用いて排出に対する阻害活性を検討した。TEA を細胞内に取り込ませ、細胞外 pH を 6-8 に変化させると、形成された H^+ 勾配に応じて TEA が排出された。最も強い排出の見られた細胞外 pH6.0 の条件下、TEA の排出は基質 TEA または MPP の存在によって阻害されず、ピリメタミン存在によって完全に阻害された (図 III-3)。この結果は前章の結合試験と同様に、基質の結合が酸性 pH で低下することを支持している。一方、ピリメタミンは極めて高親和性であり pH6.0 においてもヒト MATE1 に結合して阻害することが示唆された。

最後に交換反応の阻害を検討した。MATE の蛍光基質である DAPI を細胞内に取り込ませ、細胞外 Buffer を交換し TEA を添加すると、細胞外 TEA と細胞内 DAPI が交換される。交換反応では H^+ 輸送を伴わない部分反応が起きる。すなわち、MATE は TEA を細胞内へ遊離した後、DAPI を結合しもとの構造に戻り、DAPI を細胞外へ遊離する。交換輸送を測定する上で、経時的な DAPI 輸送と DAPI 輸送のピリメタミン阻害を確認した (図 III-5A, B)。細胞外 TEA 存在および非存在条件を比較すると、TEA 存在によって細胞内 DAPI 蛍光が減少し、DAPI-TEA 交換が確認された。この交換はピリメタミン存在によって阻害を受けた (図 III-5C)。以上のことから、ピリメタミンは交換反応、すなわち基質の輸送過程そのものを阻害することが明らかとなった。

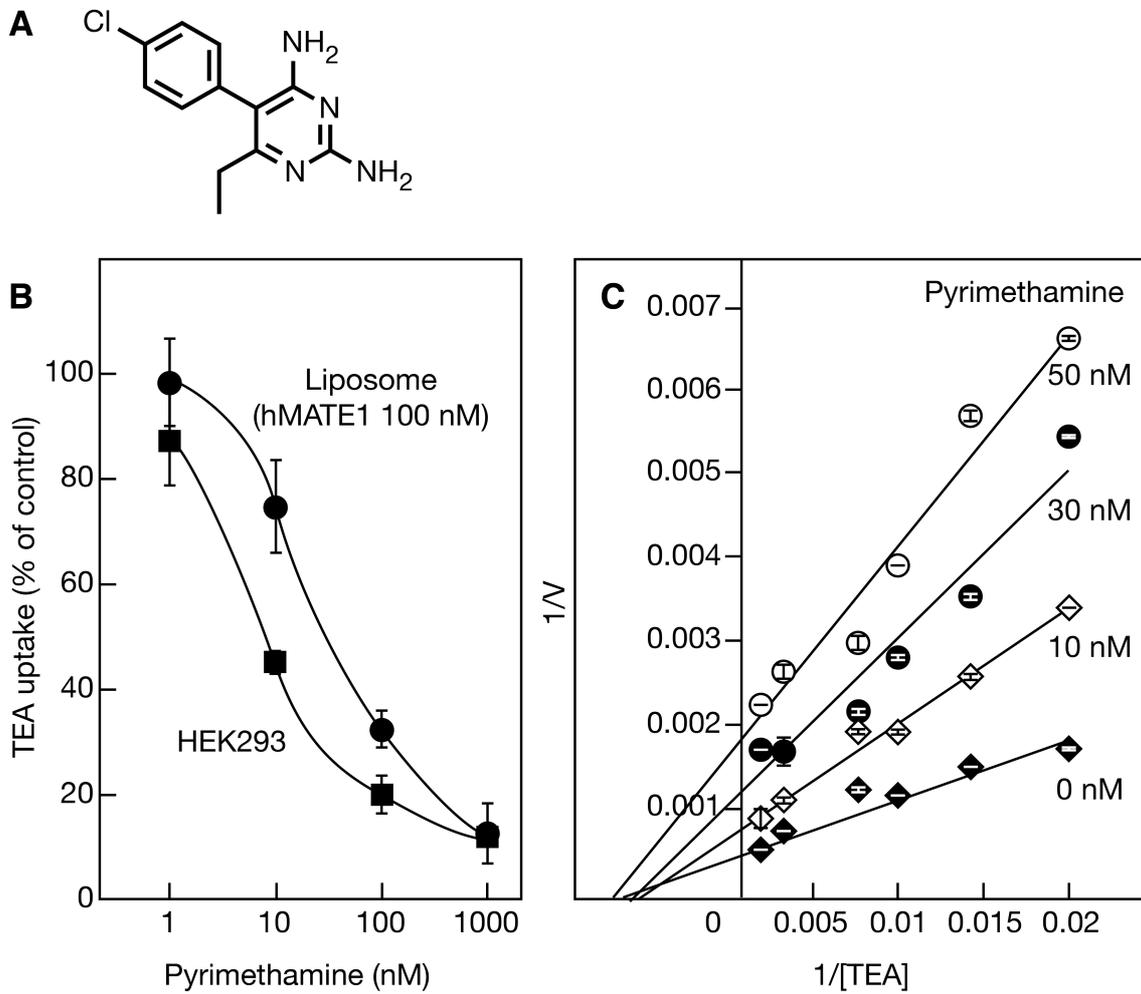


図 III-1. TEA 輸送に及ぼすピリメタミンの影響

HEK293 細胞および再構成法を用いてピリメタミン阻害の濃度依存性を検討した。バックグラウンドとして Mock 細胞または空リポソームへの取り込みを差し引いた。各点の値は、Mean±SE ($n = 3-6$) である。A) ピリメタミンの構造 B) 濃度依存性 C) HEK293 細胞系を用いた速度論的解析

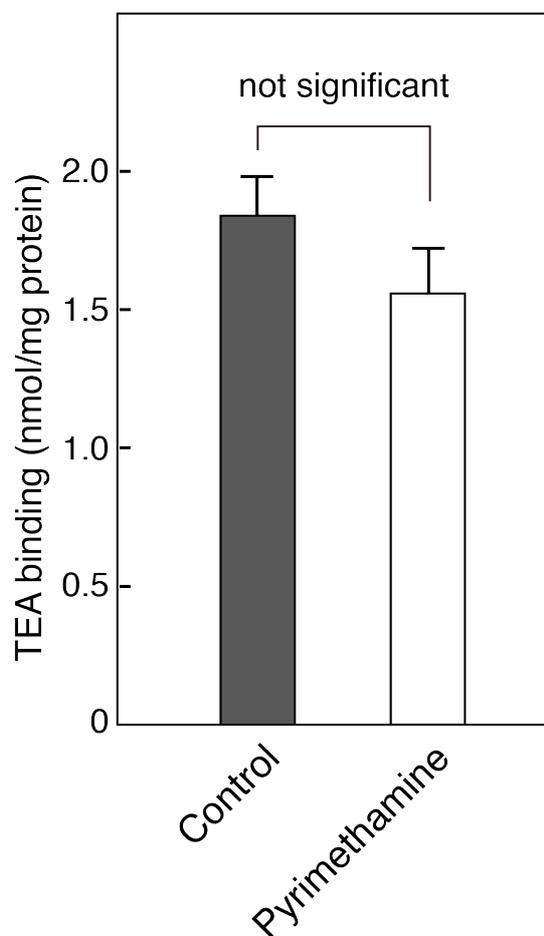


図 III-2. TEA 結合に及ぼすピリメタミンの影響

Lipid-detergent micelle 化した精製ヒト MATE1 タンパク質を用い, 50 μ M ピリメタミンが pH8.0 における TEA の結合に及ぼす影響を測定した。実験条件は図 II-3 と同じである。ヒト MATE1 micelle に対して, 1 mM TEA, \pm 50 μ M ピリメタミンを pH8.0, 氷上で 30 分間反応させた。バックグラウンドとして Control Micelle の値を差し引いた。各点の値は, Mean \pm SE ($n=3$) である。 t 検定において $p=0.27$ であり, 有意な差はないものと判断した。

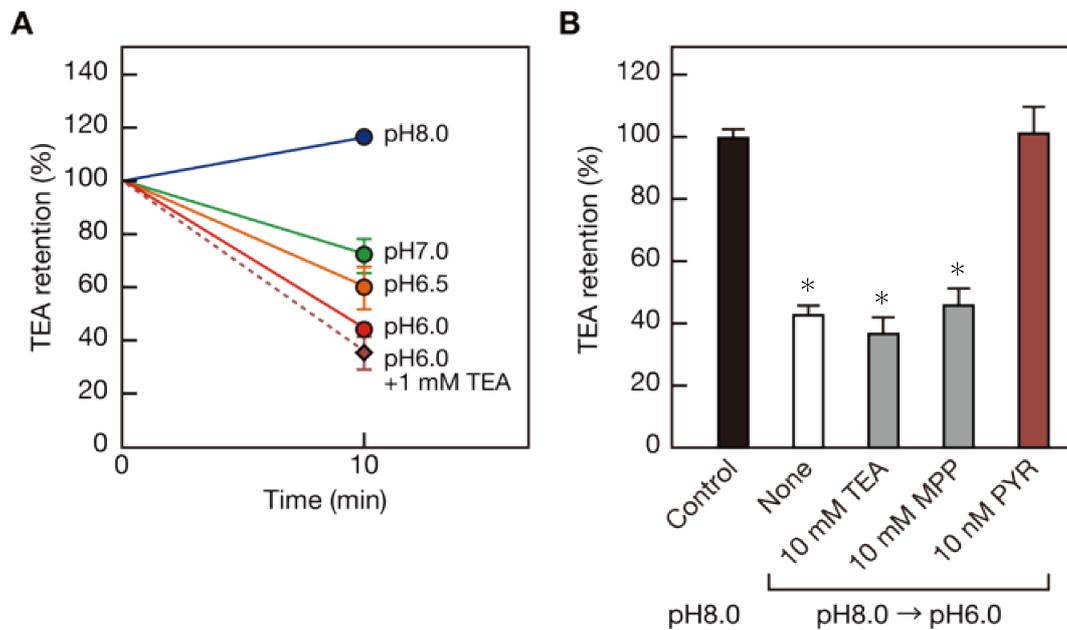


図 III-3. TEA 排出に及ぼす基質およびピリメタミンの影響

HEK293 細胞に pH8.0 下 10 分間 TEA を取り込ませ、medium 交換し 10 分間 TEA を排出させた。バックグラウンドとして Mock の値を差し引いた。各点の値は、Mean±SE ($n = 3-6$) である。A) pH 依存的な TEA の排出 B) 排出に及ぼす基質およびピリメタミンの影響

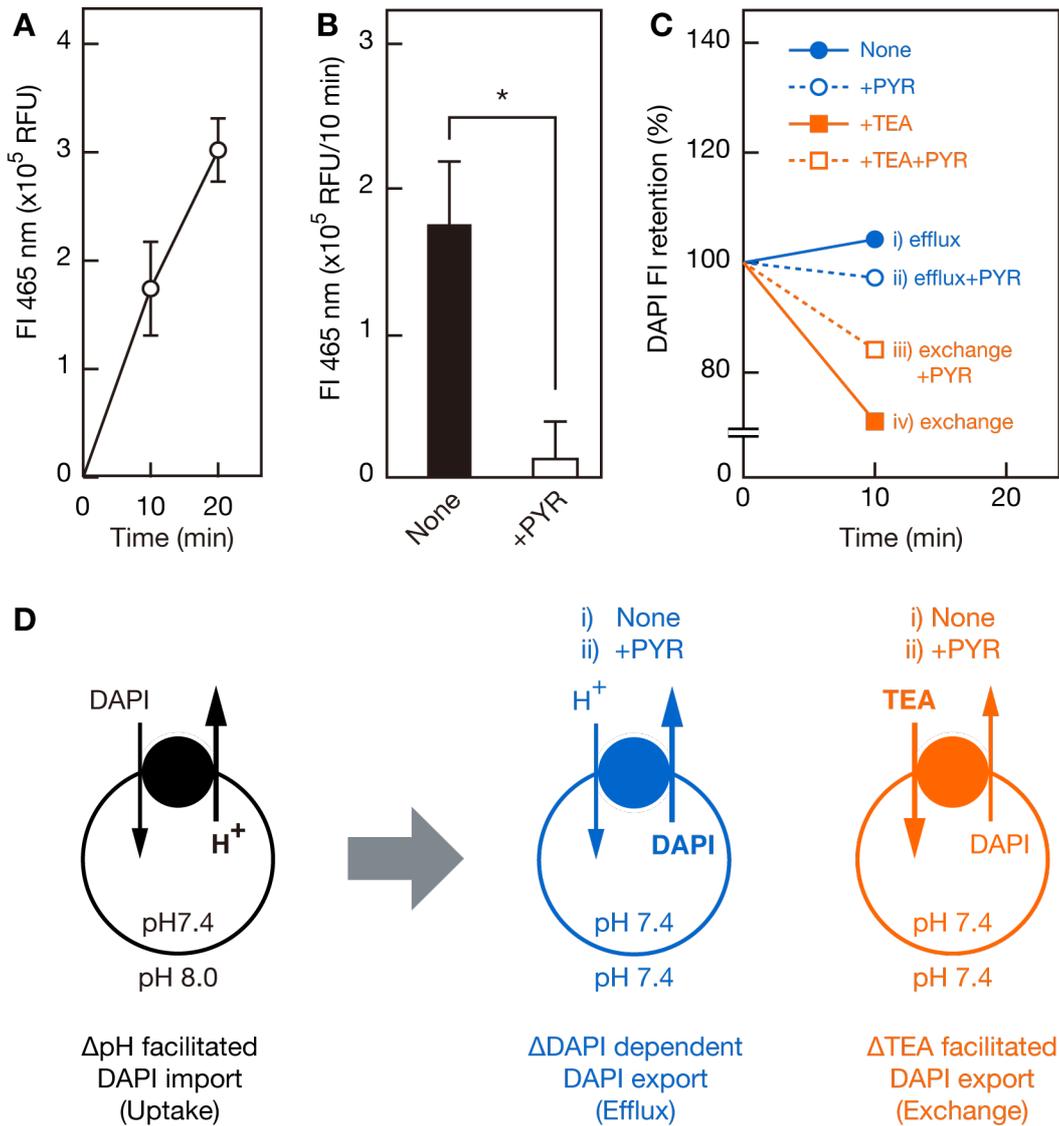


図 III-4. 交換輸送に及ぼすピリメタミンの影響

HEK293細胞を用いて、DAPI-TEA交換反応に及ぼすピリメタミンの影響を検討した。HEK293細胞に0.1 mM DAPIをpH7.4, 37°Cで10分取り込ませた。10分後DAPIを含まないmediumに交換し更に37°Cで10分輸送させた。Mediumを除去し、励起波長360 nm/蛍光波長465 nmで蛍光を測定した。バックグラウンドとしてMockの値を差し引いた。各点の値は、Mean \pm SE ($n=3-6$)である。A) 経時的なDAPI取り込み B) ピリメタミンによるDAPI輸送の阻害 C) TEA排出/交換輸送に及ぼすピリメタミンの影響 D) Cの実験の概略図 いずれの実験もピリメタミンは10 nMである。

III-2 考察

2a ピリメタミンは MATE の構造変化を阻害する

一般に、塩化アンモニウム、クロロキン、およびメチルアミンなどの弱塩基アミンの分子型は膜を透過できる。これら化合物は、酸性コンパートメントに到達するとプロトン化され膜透過性が低下する (De Duve *et al.*, 1974)。そのため、内側酸性の小胞に対して、 ΔpH を崩す試薬である。ピリメタミンは pK_a が 7.19 の弱塩基アミンであり (Stevens *et al.*, 1987)、同様に ΔpH を消失させ得る。しかし、II章の検討で示したように、 ΔpH が消失した場合でも受動輸送が生じるため、輸送活性は完全には消失しない。一方、ピリメタミンによって輸送は完全に消失し、バックグラウンドレベルとなっている。また、ピリメタミンは外側酸性の細胞に対して TEA の排出輸送を阻害し (図 III-3)、 ΔpH 非存在下でも DAPI 輸送を阻害する (図 III-4)。以上のことから、ピリメタミンの阻害効果は、駆動力消失ではなく MATE との直接相互作用によるものと示唆された。

ピリメタミンは MATE の Turn Over (回転) を伴う輸送だけでなく、部分反応である交換輸送をも阻害した。ピリメタミンは TEA 輸送に対して非競合的に阻害し、TEA 結合を阻害しないことから TEA 結合過程は作用部位でない。よって、ピリメタミンは translocation 中に生じる MATE-基質複合体の内から外向きへの構造変化過程を阻害する (図 III-5)。また、現時点では明確な実験的証拠はないものの、不競合阻害ではないことからピリメタミンは relocation 中に生じる MATE- H^+ 複合体の外から内向きへの構造変化過程も阻害するものと予想される。

さらに、ピリメタミンは、pH6.0 および 8.0 のいずれの pH でも基質 TEA の輸送を阻害する。また、 H^+ 対向輸送も阻害する (図 II-2)。ヒト MATE1 とほぼ 1:1 に結合して阻害し、阻害定数 K_i が 14.3 nM と高い親和性を示す。

以上の結果はピリメタミンが MATE の構造変化を止める強力な阻害剤として有用であることを示している。今後はピリメタミンを用いた *in vivo* 体内動態解析のみならず、MATE 型トランスポーターの分子機構および構造解析への応用が期待される。

2b ピリメタミンは MATE の基質結合部位の解析に有用である

一般的に、酵素は基質認識性が狭く特異性が高い。一方で、薬物トランスポーターは広い基質認識性を持つ。この広い認識性は、複数の残基を使い分け、異なる結合様式で基質を認識することで獲得していることが知られている (Chufan *et al.*, 2013; Murakami *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2012; Shirasaka *et al.*, 2012)。ヒト MATE についても、変異体を用いた生化学的な解析から、基質によって認識に関与する残基が異なることが示されていた (Matsumoto *et al.*, 2008)。基質結合部位についてさらに詳細な解析をする上で、結合部位・様式の異なるリガンドが求められていた。

ピリメタミンはMATEによるメトホルミン輸送を競合的に阻害することが知られていた (Kusuhara *et al.* 2011)。一方で、TEA に対しては非競合的な阻害を示した。一般に、非競合的な阻害が生じる場合、基質と阻害剤は異なる結合部位に結合し、一方の結合はもう一方の結合に影響を与えないものと考えられる (Strelow *et al.*, 2012)。実際に、未飽和量の TEA に対し過剰量のピリメタミンを反応させた場合でも、TEA の結合は減少しなかった。以上のことから、ピリメタミンと TEA の結合部位は異なることが示唆された。今後、以上の知見を元に種々の残基に対して変異を導入し、TEA およびメトホルミンの結合・輸送に及ぼす種々の化合物の影響を検討することで、結合ポケットを形成する残基や、その性質・役割の解明に近づくものと期待される。

また、結合部位・様式を可視化するには、ヒト MATE の結晶構造解析を待たねばならない。多くの膜タンパク質で、結晶構造解析をする上で大量のタンパク質を精製する過程がボトルネックとなっている。本研究で用いた昆虫細胞発現系では、1650 cm² culture から mg order の精製 MATE1 タンパク質が得られる。また当研究室では、可溶化タグを付けることで大腸菌に膜タンパク質を過剰発現させ、Fos-Choline 系界面活性剤で可溶化し、1 L culture から数 10 mg order の精製タンパク質が得られる大腸菌発現系を開発しており、多数の SLC 型トランスポーターの精製・再構成に成功している (Leviatan *et al.*, 2010)。これら技術を応用することで、ヒト MATE の結晶構造が解かれるようになるものと期待される。

以上、本章では MATE 特異的阻害剤ピリメタミンの阻害機序について当研究室および本研究で構築した種々の系を用いて検討し、ピリメタミンが MATE の構造変化過程を阻害することを初めて明らかにした。また、基質結合部位に関する知見を得た。

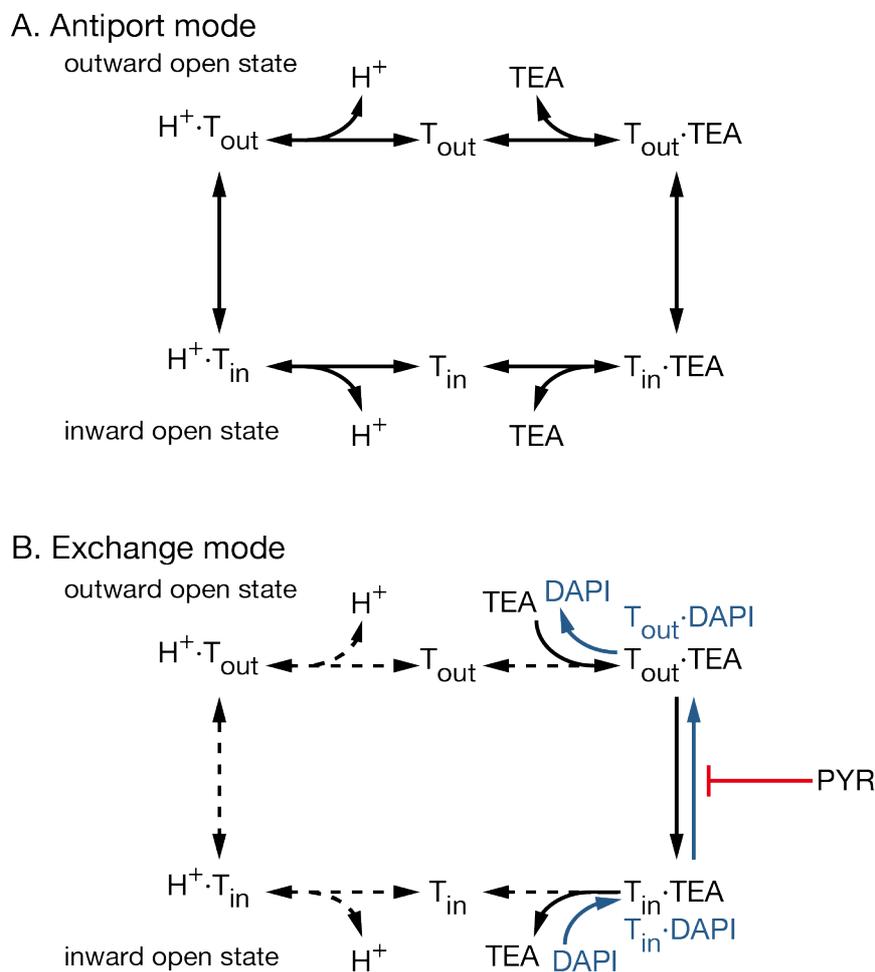


図 III-5. MATE による H^+ /TEA 交換輸送と、ピリメタミンの阻害過程の関係

- A) MATE は TEA と H^+ を交換輸送する。PYR は TEA を非競合的に阻害するため基質結合過程は阻害しない。
- B) pH 勾配が存在せず、かつ細胞内外共に基質が存在するとき、MATE による交換輸送が生じる。この交換輸送には、 H^+ の輸送が生じる半経路は関与せず、基質の輸送が生じる半経路のみが回転する。PYR は TEA-DAPI 交換輸送を阻害するため、少なくとも MATE-TEA 複合体の構造変化を阻害する。

T_{out} : 細胞外開口構造にある MATE タンパク質, T_{in} : 細胞内開口構造にある MATE タンパク質, PYR: ピリメタミン

総合考察

1. H⁺共役の意義, 駆動力と輸送の方向

MATE は, ΔpH によって能動輸送が生じるため H⁺交換輸送体であると考えられてきた。しかし, 従来の機能解析法では細胞や生体膜小胞を用いており, MATE 以外の H⁺輸送体も系に存在していた。そのため, H⁺と共役している他の輸送体の影響を分離できず, H⁺の輸送を示す決定的な証拠がなかった。II 章では他の因子の影響がなく, pH と ΔpH の影響を明確に区別できる精製・再構成系を用い, 基質 TEA と共役して H⁺の輸送が生じること, および ΔpH は駆動力となることを実証した。

しかし, ヒト MATE1 の発現部位では通常 pH 勾配が存在しない。そのため, 生理的にはヒト MATE1 は促進拡散輸送体として基質濃度勾配に応じて双方向性に機能しているものと考えられる。ここで, 薬物排泄トランスポーターであることを考えると排出すべき異物・毒物を再取り込みしかねない双方向性は欠点である。この欠点は, 薬物排泄の場である腎臓・肝臓に OCT が共局在することで克服されている。

薬物排泄の場である腎臓および肝臓では, 基底膜側の OCT と刷子縁膜/微小胆管膜側の MATE によって有機カチオンが胆汁中・尿中に排泄されている。OCT は細胞内負の膜電位を駆動力とし, 細胞内に有機カチオンを取り込ことから, 式 S-1 が成立する。

$$\Delta G = \alpha z F \Delta \Psi - RT \ln([\text{OC}^+]_{\text{in}}/[\text{OC}^+]_{\text{out}}) \quad \text{式 S-1}$$

ここで, ΔG は自由エネルギー変化, α は輸送されるカチオンの価数, z は輸送されるカチオンの个数, R は気体定数, T は系の絶対温度, F はファラデー定数, $\Delta\Psi$ は膜電位である。平衡状態では, $\Delta G = 0$ となり, 式 S-2 が成立する。

$$\alpha z F \Delta \Psi = RT \ln([\text{OC}^+]_{\text{in}}/[\text{OC}^+]_{\text{out}}) \quad \text{式 S-2}$$

膜電位 -70 mV を式 S-2 に代入すると, OCT が形成できる有機カチオン勾配は約 15 倍である (式 S-3)。

$$[\text{OC}^+]_{\text{in}}/[\text{OC}^+]_{\text{out}} = \sim 15 \quad \text{式 S-3}$$

一方 MATE1 は, 電気的中性に H⁺/1 価有機カチオンを交換輸送することから式 S-4 が成立する。

$$RT \ln([\text{OC}^+]_{\text{in}}/[\text{OC}^+]_{\text{out}}) = +F \Delta \Psi - F \Delta \Psi + RT \ln([\text{H}^+]_{\text{in}}/[\text{H}^+]_{\text{out}}) \quad \text{式 S-4}$$

腎刷子縁膜には, Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE3 が局在し pH 勾配が生じる。この pH 勾配は約 0.5 であり式 S-4 に代入すると, pH 勾配を利用してヒト MATE1 が形成できる有機カチオン勾配は約 3 倍である (式 S-5)。

$$[OC^+]_{out}/[OC^+]_{in} = \sim 3$$

式 S-5

濃縮力が約 3 と、OCT に比べて小さいことから、pH 勾配ではなく OCT が形成する有機カチオン勾配に従って MATE1 は細胞外排出方向のみに機能するものと考えられる。このように OCT と MATE が共局在することで、薬物排泄器官では一方向性の有機カチオン輸送が成立している。その他の全身の組織では、MATE は基質濃度勾配に応じて双方向性の輸送を行い、基質の平衡維持に寄与しているものと推測される (図 S-1)。

H⁺対向輸送を共役させることの意義は駆動力としてよりもむしろ、有機カチオンを排泄する上で障壁となる細胞内負の膜電位に対し電荷の移動を打ち消し、両方向性に機能できることにあると推察される。

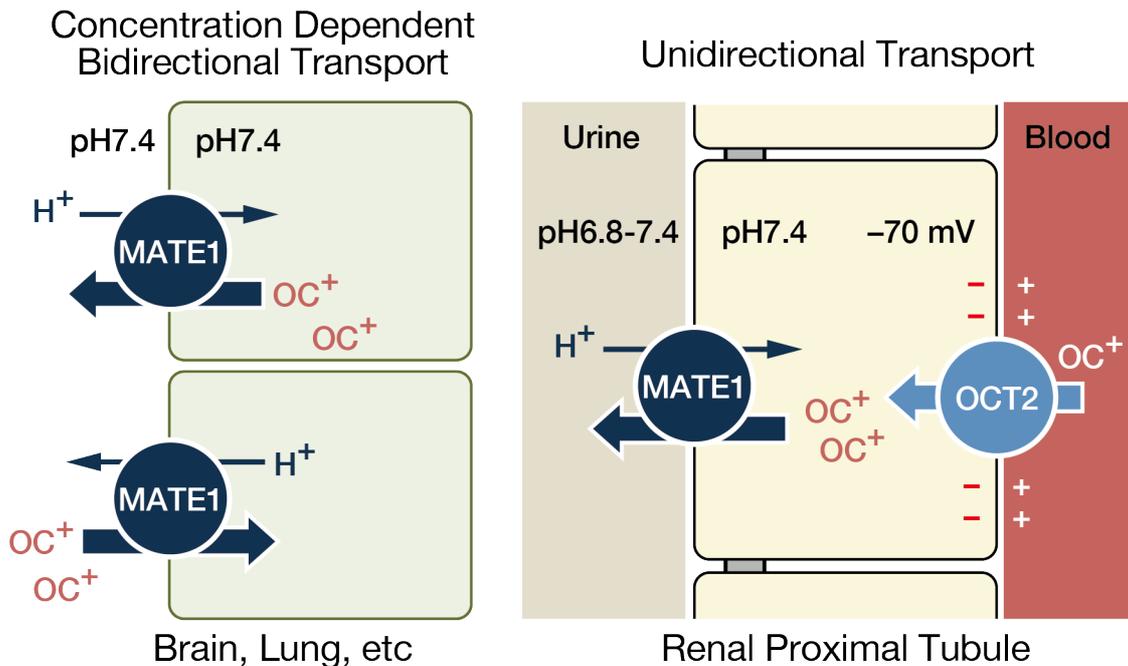


図 S-1. ヒト MATE1 は H⁺を対向輸送することで、電荷の移動を打ち消し双方向性に機能する

MATE は、基質濃度勾配に応じて有機カチオンと H⁺を 1:1 で交換輸送する。肝臓・腎臓では OCT によって基質が濃縮されるため、MATE は胆汁・尿中へ一方向性に輸送を行う。

2. 有機カチオンの輸送モデルの検証

ヒト MATE1 は、 ΔpH によって駆動される一方で、 ΔpH が存在しない条件でも受動輸送が見られた。またこの受動輸送は、pH 依存性を示した。酸性残基が基質特異性に関与すること (Matsumoto *et al.*, 2008) は明らかとなっていたが、実際に結合に関与するかはわかっていなかった。また、pH は酸性残基の解離状態を変化させることで結合・輸送過程に影響するものと予想されていた。

酸性残基の中でも Glu273 は唯一真核生物中に完全に保存されており、E273Q 変異体は 1 価カチオンの輸送が完全に消失すること (Otsuka *et al.*, 2005a) から、 H^+ の輸送を担うものと推定されていた。しかし、変異によって輸送が完全に消失することからそれ以上の解析ができず、その役割はよくわかっていなかった。

第 II 章では初めて結合を実測することで、基質結合に酸性残基が関与すること、Glu273 残基が TEA およびシメチジンの基質結合に関わっていることを明らかにした。

以上のことから、MATE1 は保存された 4 グルタミン酸残基のカルボキシル基上でカチオン性基質と H^+ を認識し、 OC^+/H^+ 対向輸送を行うモデル (図 S-2) が正しいことを示している。また、第 III 章の検討から、ピリメタミンはこの輸送サイクルの内、少なくとも MATE-基質複合体に生じる構造変化を阻害することが明らかとなった。

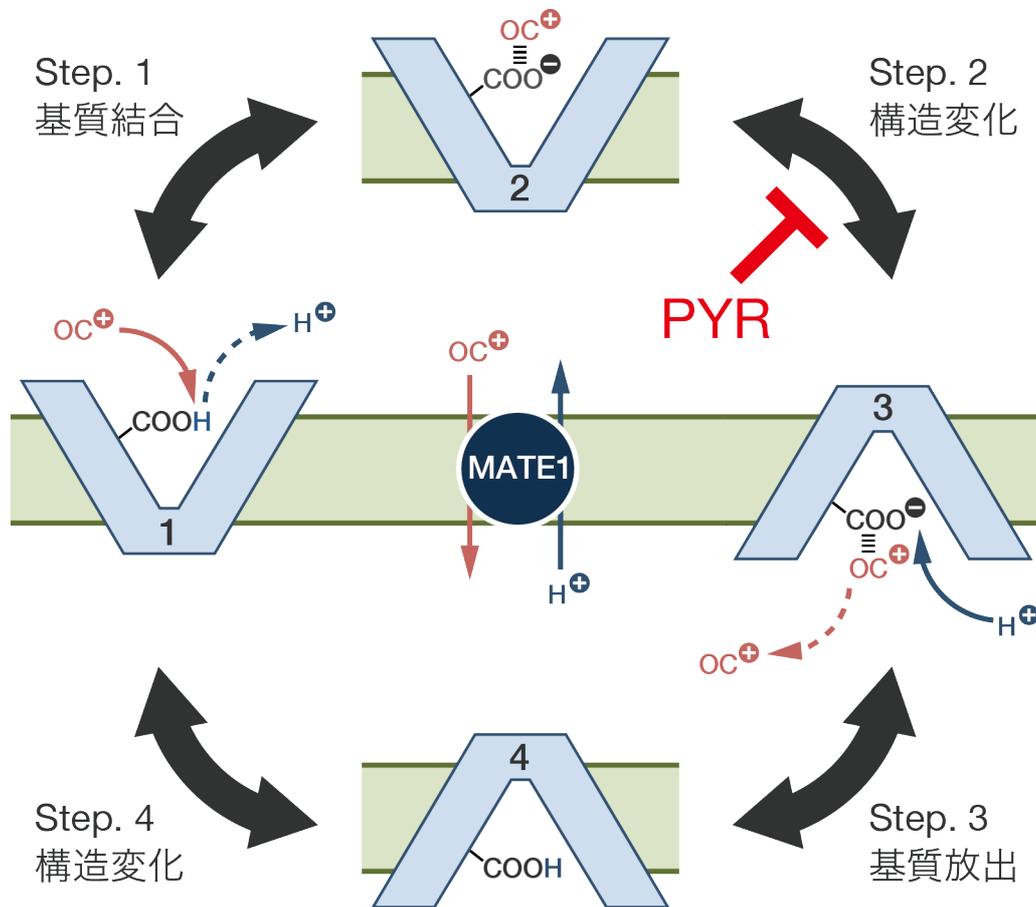


図 S-2. ヒト MATE1 は保存された Glu 残基のカルボキシ基上で有機カチオンと H⁺ を交換し、対向輸送する

ヒト MATE1 は下記 4 step によって、Glu273 を中心に保存された 4 つの Glu 残基のカルボキシル基上で、有機カチオンと H⁺ を対向輸送する。1) Step 1: 細胞内に開口した MATE のカルボキシル基に対し、有機カチオンの結合と H⁺ の解離が生じる。2) Step 2: MATE に構造変化が生じ、細胞内に開口した形から細胞外に開口した形へ変化する。3) Step 3: カルボキシル基に対し、有機カチオンの解離と H⁺ の結合が生じる。4) Step 4: MATE に構造変化が生じ、細胞外に開口した形から細胞内に開口した形へ変化する。ピリメタミンは、Step 2 の構造変化過程を阻害する。

3. 分子機構解析の展望

本研究で見出された結合・pH 依存性などの諸性質は、有機カチオン輸送モデルを矛盾すること無く説明でき、分子機構の解析は基質認識に関与する全ての残基とその役割を決定する段階に進んだ。

結晶構造解析の進展から細菌・古細菌 MATE では基質結合に関与する非極性残基が明らかにされつつある (Radchenko *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2013)。残基の保存性には種差があることからヒトでは別の残基を利用していると考えられるが、原核生物と同様に非極性残基も基質認識に関与しているものと思われる。今後は、非極性残基についても変異導入法によって検討することで多基質認識の分子基盤が明らかにされるものと期待される。

一方で、MATE はエストロン-3-硫酸やアシクロビルなどのアニオン性化合物も輸送する (Tanihara *et al.*, 2007)。さらに、マウス MATE は疎水性ホルモンなど中性の化合物の動態に関与することが示唆されており (Hiasa *et al.*, 2006)、ヒト MATE1 は疎水性の高い中性化合物トコフェロールを認識することから、一部の中性化合物も輸送する可能性がある。ここで、有機カチオン輸送モデルを元に考えると、アニオン性および中性化合物が酸性残基の負電荷に認識されるとは考えにくく、そもそも有機アニオン輸送を速度論的に解析した事例はなく、 H^+ を対向輸送しているかさえ明らかでない。

今後、中性およびアニオン性化合物の結合・輸送を解析する上で、本研究で構築した精製タンパク質を用いた系が有効であり、電荷の異なる薬物の輸送の諸性質が明らかになるものと期待される。

結言

本研究では、HEK293 細胞発現系および精製・再構成系を用いてヒト MATE1 の基質認識と分子機構を検討し、以下の主要な結論を得た。

1. 内因性化合物であるアミン類 (セロトニン, スペルミン, スペルミジン) がヒト MATE1 の基質であることを明らかにした。
2. ケルセチン誘導体などの新規ヒト MATE1 阻害剤を見出した。その中でもイソラムネチンは、血中濃度と阻害強度を考慮すると MATE を介した相互作用を起こす可能性があるため、注意が必要である。
3. 速度論的解析から、ベルガモチンおよびイソラムネチンは競合的に、ピリメタミンは非競合的に TEA 輸送を阻害することを明らかにした。
4. カチオン性化合物の輸送モデルに対して、 H^+ 輸送と結合の面から検証し、 ΔpH が駆動力となること、 pH が結合親和性を変化させること、酸性残基が基質結合を担うことを示した。以上の結果は、輸送モデルを矛盾することなく説明できる。
5. 真核生物 MATE に唯一完全に保存されている Glu273 残基は H^+ の結合など必須の役割を持っていることが示唆されていたが、変異導入によって活性が消失することから解析が困難であった。これに対して結合を測定することで、基質 TEA およびシメチジンの結合部位であることを明らかにした。
6. ヒト MATE1 は腎臓・肝臓では局所酸性と OCT による基質濃縮を利用して排泄方向に、その他の組織では基質濃度勾配と電荷に応じて双方向性に機能する。 H^+ 対向輸送の共役の意義は電荷の移動を打ち消すことで双方向性に輸送できることにあるものと推定される。

MATE 研究の進展の観点からは、以下の成果があげられる。

1. ヒト MATE1 の排泄以外の生理的意義を明らかにする上で、局在と対応する内因性基質が輸送されることを *in vitro* で示し、*in vivo* での検討へ足がかりを作った。
2. カチオン性化合物の輸送モデルを検証する中で、今後の機能解析にも有用な H^+ 輸送測定系、結合測定系を構築した。
3. 特異的阻害剤ピリメタミンの阻害機序を示し、機能解析を元に分子基盤を調べる手がかりを得た。

以上の成果は今後、MATE 型トランスポーターの機能および分子機構の解明を進める上で有益な基礎的知見となり得るものと考えられる。

実験方法

1. 材料

1.1 放射性基質

[1-¹⁴C]-TEA (129.5 MBq/mmol) および L-[N-methyl-³H]-Nicotine (2.22 TBq/mmol) は, Perkin Elmer Life & Analytical Sciences から購入した。[terminal methylene-³H]-Spermine (1.85 TBq/mmol), [terminal methylene-³H]-Spermidine (1.85 TBq/mmol), [methyl-¹⁴C]-Paraquat dichloride hydrate (1.18 GBq/mmol), [N-methyl-³H]-Cimetidine (2.96 TBq/mmol) は, 室町薬品株式会社から購入した。

1.2 化合物

(+)-カテキンおよび(-)-エピカテキン (Assay HPLC >99%) は Sigma-Aldrich Inc. から購入した。(-)-EGCG (epigallocatechin gallate) は, *Camellia japonica* 葉から単離したものをを用いた (HPLC >99%) (Hatano *et al.*, 2003)。その他のクマリンおよびフラボノール (Assay HPLC \geq 99%) は, Extrasynthese から購入した。BCECF は, 同仁堂から購入した。化合物ストック溶液は, 超純水, エタノール, または DMSO を用いて調製し-20°C で保存した。

1.3 プラスミド

MATE1 発現プラスミド pcDNA3.1-hMATE1, pDEST10-hMATE1 は当研究室が調製したものをを用いた (Matsumoto, 2009; Otsuka *et al.*, 2005a)。MSP1E3D1 発現プラスミド pMSP1E3D1 (Denisov *et al.*, 2004) は Addgene から購入した。

2. HEK293 細胞を用いた輸送の測定

2.1 HEK293 細胞の培養

HEK293 細胞は, DMEM 培地 [DMEM (Invitrogen), 55 mg/L ピルビン酸ナトリウム (Sigma), 0.1 mg/mL ストレプトマイシン (Sigma), 100U/mL ペニシリン G (Sigma), 0.25 mg/L ファンギゾン (Invitrogen), 3.7 mg/mL 炭酸水素ナトリウム, 10% FBS (Funakoshi)] を用い 37°C, 5% CO₂ 存在下で接着培養した。継代 30 回未満の細胞を実験に用いた。

2.2 HEK293-hMATE1 安定発現株の構築

HEK293 細胞を播種 (1.5×10^6 cells/dish) し 37°C で培養した。24 hr 後, 形質導入用培地 [DMEM 培地 (INVITROGEN), 55 mg/L ピルビン酸ナトリウム (SIGMA), 3.7 mg/mL 炭酸水素ナトリウム] に培地を置換した。発現ベクター-pcDNA3.1-hMATE1 プラスミドをリポフェクション法によって細胞に導入した (Otsuka *et al.*, 2005a)。TransIT-LT1 Transfection Reagent

(MIRUS) および形質導入用培地混液を室温で 20 分間インキュベートし、適量の pcDNA3.1-hMATE1 プラスミドを加え、さらに 20 分間インキュベートした。この溶液を培養ディッシュに 0.5 mL 添加した。48 時間後、DMEM 培地に培地を交換した。さらに 24 時間後、800 mg/L の G418 (SIGMA) を添加した培地に交換した。2 週間後、コロニーを分取しヒト MATE1 安定発現株とした。安定発現株は、400 mg/L の G418 を添加した DMEM 培地中、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

2.3 ヒト MATE1 の細胞膜における発現の確認

一過性発現系 (Otsuka *et al.*, 2005a) と同様に HEK293 安定発現株の細胞膜を分画し、ウェスタンブロット法により hMATE1 の発現を確認した。HEK293 細胞を密度 1.0×10^6 cells/dish で、10 cm ディッシュ 2 枚に播種した。播種 72 時間後、セルスクレーパーを用いて細胞懸濁液を得、700 ×g、6 min、4°C で遠心した。沈澱を、PBS(-) 5 mL で再懸濁し、700 ×g、6 min、4°C で遠心した。沈澱を 2 mL の SME Buffer [0.3 M スクロース、10 mM Mops-NaOH、pH 7.5、10 mM EDTA-NaOH、pH 7.5] で懸濁した。得られた懸濁液を 480 ×g、10 min、4°C で遠心した。上清を回収し、160,000 ×g、65 min、4°C で遠心した。沈澱を 100 mL の SME Buffer で懸濁し、膜画分とした。膜画分に Laemmli Sample Buffer [終濃度 2%(w/v) SDS、10% グリセロール、0.06% EDTA、1.2% Tris/HCl、pH 6.8、2%メルカプトエタノール、0.4 mg ブロモフェノールブルー] を加えて室温で 15 分静置し電気泳動の標品とした。10 mg の標品を 10% のアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。泳動後のゲルをトランスファーバッファ中でニトロセルロース膜へ 300 mA、2 hr 転写した。この膜を Blocking Buffer [140 mM NaCl、100 mM Tris、5 mM EDTA、pH 7.4、0.5% BSA] 中で 3 時間振盪した。当研究室が調製したヒト MATE1 C 末抗体を一次抗体として用いた (Otsuka *et al.*, 2005a)。一次抗体を Blocking Buffer で 1,000 倍希釈し、この抗体希釈液中でニトロセルロース膜を室温下 2 時間振盪した。その後、ニトロセルロース膜を Wash Buffer [140 mM NaCl、100 mM Tris、5 mM EDTA、pH 7.4、0.1%(v/v) Tween 20] を用いて室温下で 15 分、2 回振盪洗浄した。二次抗体 (ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体; MP Biomedicals, LLC) を Wash Buffer で 2,000 倍希釈し、この抗体希釈液中でニトロセルロース膜を室温下 30 分振盪標識した。その後、Wash Buffer を適宜交換しながら室温下で 3 時間ニトロセルロース膜を振盪洗浄した。ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare) を用い抗体シグナルを検出した。

2.4 標識基質の取り込みの測定

TEA 輸送活性は細胞内側が酸性になる pH 勾配下で測定した。一過性発現系を用いた実験は Otsuka らの方法と同様に行った (Otsuka *et al.*, 2005a)。安定発現系を用いた実験では HEK293 細胞を 24 穴プレートに 1.0×10^5 cells/well 播種した。播種 48 時間後、培地を除き 0.8

mLのWash Buffer [125 mM 塩化ナトリウム, 4.8 mM 塩化カリウム, 1.2 mM 塩化カルシウム, 1.2 mM リン酸二水素カリウム, 1.2 mM 硫酸マグネシウム, 25 mM tricine-NaOH, pH8.0, 5.6 mM D-グルコース] で洗浄した。Bufferを除き, 0.8 mL のWash Bufferを加えて37°C, 5 min インキュベートした。Bufferを除き, 0.2 mL のTransport Medium [125 mM 塩化ナトリウム, 4.8 mM 塩化カリウム, 1.2 mM 塩化カルシウム, 1.2 mM リン酸二水素ナトリウム, 1.2 mM 硫酸マグネシウム, 25 mM tricine-NaOH, pH 8.0, 5.6 mM D-グルコース, 50 μ M [1-¹⁴C]-TEA] を加え, 37°Cで所定の時間インキュベートした。培地を除き0.8 mL のWash Bufferで2回洗浄した。培地を除いた後, 0.2 mLの0.5 N 水酸化ナトリウムで2回細胞を溶解し, クリアゾール I (Nacalai Tesque) 3 mLに加えた。その後, 液体シンチレーションカウンター Tri-Carb 2800TRs (PerkinElmer) を用いて放射能を測定した。Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いてタンパク質定量し, 比活性を算出した。標準タンパク質はBSA (Sigma, Cohn fraction V) を用いた。

脂溶性の高い化合物が輸送に及ぼす影響を測定する際は, 試験化合物をDMSOに溶解させたストック溶液を元に, DMSOの終濃度が0.5%以下となるようTransport Mediumを用いて段階希釈した。Transport Mediumを遠心した際に沈殿が見られる場合は, 溶解しないものとして測定点から除外した。

細胞からのTEA排出は, 細胞外酸性のpH勾配下で測定した。上述の通りHEK293細胞にTEAを取り込ませた後に, Efflux Buffer [125 mM 塩化ナトリウム, 4.8 mM 塩化カリウム, 1.2 mM 塩化カルシウム, 1.2 mM リン酸二水素ナトリウム, 1.2 mM 硫酸マグネシウム, 25 mM MES-NaOH, pH 6.0, 5.6 mM D-グルコース] に置換した。培地を除き0.8 mLの氷冷Efflux Bufferで2回洗浄後, 取り込み試験と同様に細胞内に残存する放射能を測定した。

Mock, MATE発現株両方について, 全ての実験を行い, Mock細胞への取り込みをバックグラウンドとして差し引き, 正味のhMATE1輸送活性とした。

3. 精製・再構成系を用いた輸送の測定

精製・再構成系の概略を図 M-1 に示した。精製・再構成系は、系中の組成を自在にコントロールできるため、細胞を用いた系と比べて、他のタンパク質などの影響を除外でき、また高い比活性が得られることから、鋭敏に輸送を検出できる。

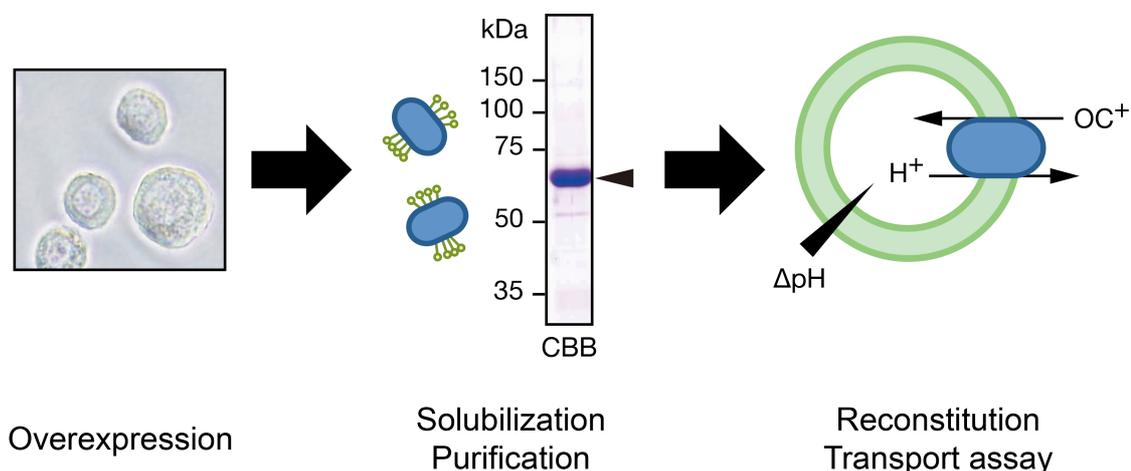


図 M-1. 精製・再構成による輸送活性測定系

目的タンパク質を昆虫細胞に過剰発現させ、膜を分画し界面活性剤を用いて可溶化する。可溶性画分を Ni-NTA カラムを用いて精製すると CBB 染色で単一バンドの純度の精製ヒト MATE1 タンパク質が得られる。精製ヒト MATE1 をリポソームに再構成し、標識基質を輸送させる。遊離基質をゲル濾過により除去し、リポソームに取り込まれた基質を定量する。

3.1 High Five 細胞の培養

High Five 細胞 (BTI-TN-5B1-4) は、Express Five SFM 培地 [Express Five SFM (GIBCO), 18 mM L-Glutamine, 10 mg/L Gentamicin] を用いて、27°C で培養した。継代 30 回未満の細胞を実験に用いた。

3.2 ヒト MATE1 タンパク質の精製

組み換えウイルスは、Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いて作成した (Ciccarone *et al.*, 1998)。昆虫細胞発現ベクターの pDEST10-hMATE1 を大腸菌 DH10Bac 株に形質転換し、N 末 6xHis 融合 hMATE1 bacmid を調製した。Bacmid をリポトランスフェクション法により昆虫細胞 Sf9 細胞に形質導入し、hMATE1 組み換えバキュロウイルスを作成した (Matsumoto, 2009)。High Five 細胞を播種 (7.5×10^6 cells/4 mL medium/55 cm² dish, 32 dishes) し、hMATE1 組換えバキュロウイルスを感染 (M.O.I = 1) させ、27°C で 48 hr 培養した。セルスクレーパーを用いて細胞を回収し、700 x g, 10 min, 4°C で遠心し、上清を除い

た。得られた細胞ペレットは 40 mL の Disruption buffer [20 mM Tris/HCl, pH8.0, 100 mM 酢酸ナトリウム, 10% グリセロール, 1 mM DTT, 10 mg/L ロイペプチン, 10 mg/L ペプスタチン A, 0.1 mM PMSF] を用いて懸濁し, 700 x g, 10 min, 4°C で遠心後上清を除いた。再度 20 mL の Disruption Buffer を用いて細胞を懸濁した。細胞懸濁液を, 超音波処理 (TOMY TIP Sonicator UD-200, Output Level 4) し 480 x g, 10 min, 4°C で遠心した。上清を回収し, 160,000 x g, 1 hr, 4°C で遠心した。得られた沈澱は, solubilization buffer [10 mM Mops/Tris, pH7.0, 2%(w/v) オクチルグルコシド, 10% グリセロール, 10 mg/L ロイペプチン, 10 mg/L ペプスタチン A] を用いて再懸濁し膜画分とした。

膜画分を 260,000 x g, 30 min, 4°C で遠心し, 得られた上清を可溶性画分とした。可溶性画分を 1 mL bed volume の Ni-NTA super flow resin (QIAGEN) に添加して, 4 hr, 4°C で振盪攪拌した。Resin は, 10 mL の Wash Buffer I [20 mM Mops/Tris, pH7.0, 1% オクチルグルコシド, 20% グリセロール, 5 mM イミダゾール], 5 mL の Wash Buffer II [Wash Buffer I +500 mM 塩化ナトリウム], および 10 mL の Wash Buffer I を用いて順次洗浄した。Resin に吸着したタンパク質を 3 mL の Elution Buffer [20 mM Mops/Tris, pH7.0, 1% オクチルグルコシド, 20% グリセロール, 80 mM イミダゾール] で溶出した。溶出画分に, 1 mM の DTT を加えて精製画分とした。精製画分は小分けにして用時まで-80°C で保存した。

精製タンパク質は界面活性剤を含むため, Schaffner & Weißmann 法によって定量した (Schaffner and Weissmann, 1973)。300 µL の希釈サンプルに, 30 µL の A solution [1 M Tris/HCl, pH7.5, 1% SDS] を添加した。これに 100 µL の 50% TCA を加えて室温下 20 min 反応させた。反応液を孔径 0.45 µm のニトロセルロース膜 (ADVANTEC) に吸引濾過した。ニトロセルロース膜を, 5% TCA で洗浄し, Staining solution [0.2 g Amido schwarz 10B, 90 mL メタノール, 20 mL 酢酸] を用いて染色した。Destaining solution [メタノール:水:酢酸 = 90:8:2] を用いて脱色し, スポットを 3 mL の Eluting solution [50%(v/v) エタノール, 25 mM NaOH, 50 mM EDTA] を用いて溶出した。溶出液の 630 nm の吸光度を測定した。標準タンパク質は BSA (Sigma, Cohn fraction V) を用いた。

3.3 リポソーム再構成及び輸送活性測定

凍結融解希釈法によって精製 hMATE1 をリポソーム中に再構成した。バス式ソニケーター (G112SP1T; Laboratory Supplies) を用い, ホスファチジルコリン懸濁液 [20 mM Mops/Tris, pH7.0, 1 mM DTT, 10 mg/mL L- α -Phosphatidylcholine (Sigma type IIS)] を超音波処理した。得られた白色懸濁液をリポソームとした。分注して用時まで-80°C 保存した。

30 µg の精製 hMATE1 に 500 µg のリポソームを加えて, -80°C 下で 15 分静置し, 凍結させた。その後, 迅速に解凍し, Dilution buffer [20 mM Mops-NaOH, pH6.7, 100 mM 酢酸カリウム, 5 mM 塩化マグネシウム] を用いて 20 倍希釈し, 200,000 x g, 1 hr, 4°C で遠心した。沈

澱画分を 200 μ L の Dilution Buffer で再懸濁し再構成プロテオリポソームを得た。

放射標識基質を用いてリポソーム中への基質取り込みを試験した。Reaction Mixture [20 mM Tricin-NaOH, pH8.0, 100 mM 酢酸カリウム, 4 mM 塩化カリウム, 50 μ M [1- 14 C]-TEA (3.7G Bq/mmol; PerkinElmer Life Science)] に再構成リポソームを添加し, 30°C で反応させた。指定時間経過後, sephadex G-50 Fine スピンカラムにアプライし, 500 x g, 2 min, 4°C で遠心した。濾液全量に 3 mL の Clear-sol I (Nacalai Tesque) を加えて, 液体シンチレーションカウンター Tri-Carb 2800TRs (PerkinElmer) で放射活性を測定した。

pH titration 試験では, 緩衝剤として MES-NaOH (pH6.0-6.5), MOPS-NaOH (pH7.0-7.5), tricin-NaOH (pH8.0-8.5) を用いた。

3.4 H⁺輸送活性測定

H⁺輸送は, pH 感受性色素 BCECF を用いて測定した。45 μ g の精製 hMATE1 に 750 μ g のリポソームと終濃度 5 mM の BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, Life technology) を混合し, Wako Dialysis Membrane, Size 20 (Wako) に封入した。100 mL の Dilution buffer [20 mM Mops-NaOH, pH6.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂] を用いて 4°C で 3 hr, 2 回透析した。これに 3 mL の Dilution Buffer を加えて, 70,000 x g, 30 min, 4°C で遠心した。沈澱を 200 μ L の Dilution Buffer で再懸濁し, 再構成プロテオリポソームを得た。

495 μ L の Reaction mixture [20 mM Mops-NaOH, pH8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂] に 5 μ L のリポソームを加えて, 23°C でインキュベートした。分光蛍光光度計 F-2500 (Hitachi) を用いて, 励起波長 485 nm, 蛍光波長 523 nm で BCECF の蛍光を測定した。

4. 精製タンパク質を用いた結合の測定

4.1 Lipid-detergent Micelle を用いた TEA 結合の測定

精製 hMATE1 タンパク質を MGD Buffer [5 mM Mops-NaOH, pH7.4, 20% Glycerol, 0.1% DDTM] 中限外ろ過し, buffer 交換をかけながら濃縮した。0.5 mg/mL L- α -Phosphatidylcholine (Sigma type IIS) を添加し, 終濃度 1 mM の 14 C 標識した TEA を加え 30 min, 氷上で反応させた。反応液 20 μ L をニトロセルロースフィルター上にろ過し, DDTM を含まない MGD Buffer 4 mL で 2 回 wash した。フィルターを 3 mL の Clear-sol I (Nacalai Tesque) に浸し, 放射活性を液体シンチレーションカウンター Tri-Carb 2800TRs (PerkinElmer) により測定した。

4.2 アポリポタンパク質 MSP1E3D の精製

Bayburt らの方法に従って, MSP1E3D を精製した (Bayburt *et al.*, 2002)。50 mL の LB 培地 [1% Bacto tryptone, 0.5% Yast extract, 0.5% 塩化ナトリウム, 30 mg/L カナマイシン] 中で

MSP1E3D1 発現プラスミド (pMSP1E3D) を保持した大腸菌 C43 株を終夜培養した。1 L の TB 培地 [1.2% Bacto tryptone, 2.4% Yeast extract, 50% グリセロール, 17 mM リン酸二水素カリウム, 72 mM リン酸水素二カリウム, 30 mg/L カナマイシン] に植え継ぎ, OD₆₀₀ = 0.6 まで 37°C 振盪培養した。これに, 終濃度 1 mM の IPTG を添加し 37°C, 4 hr 振盪培養した。培養液を 700 x g, 10 min, 4°C で遠心し, 沈澱を 50 mL の Buffer A-1 [50 mM Tris/HCl, pH7.4, 1 mM PMSF] に懸濁した。細胞懸濁液を 700 x g, 10 min, 4°C で遠心し, 沈澱を 40 mL の Buffer A-2 [50 mM Tris/HCl, pH7.4, 1%(v/v) Triton X-100] に懸濁した。細胞懸濁液を超音波処理 (TOMY UD200 tip sonifier, 8 min) した。これを, 30,000 x g, 30 min, 4°C で遠心し, 上清を回収した。Buffer B [40 mM Tris/HCl, pH8.0, 300 mM 塩化ナトリウム, 1%(v/v) TX-100, 1 mM PMSF] で平衡化した bed volume 5 mL の Ni-NTA resin を上清に加えて, 1 hr 振盪した。Ni-NTA resin を 20 mL の Buffer B [40 mM Tris/HCl, pH8.0, 300 mM 塩化ナトリウム, 1%(v/v) TX-100, 1 mM PMSF] , 20 mL の Buffer C [40 mM Tris/HCl, pH8.0, 300 mM 塩化ナトリウム, 50 mM コール酸ナトリウム, 1 mM PMSF], 20 mL の Buffer D [40 mM Tris/HCl, pH8.0, 300 mM 塩化ナトリウム], 20 mL の Buffer E [40 mM Tris/HCl, pH8.0, 300 mM 塩化ナトリウム, 70 mM イミダゾール/HCl, pH 8.0] で順次洗浄した。その後, 20 mL の Buffer F [40 mM Tris/HCl, pH8.0, 300 mM 塩化ナトリウム, 300 mM イミダゾール/HCl, pH 8.0] でタンパク質を溶出し, 1.1 mL ずつ分画した。Bio-Rad Protein Assay Kit を用いて定量したタンパク質を含む画分をまとめ, 100 mL の Dialysis Buffer [10 mM Tris/HCl, pH7.4, 100 mM 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA-2Na/NaOH, pH 7.4, 4°C] 中で終夜透析した。シリンジフィルター (Millipore Millex-GV, 0.22 µm; Millipore) を用いて濾過し, 濾液を精製 MSP1E3D1 とした。得られた精製 MSP1E3D1 は, 小分けにして用時まで -80°C で保存した。

4.3 ナノディスク再構成及びシメチジン結合の測定

Nasr らの方法を参考にナノディスクを再構成し, 結合を試験した (Nasr and Singh, 2014)。500 µL の Reaction mixture [20 mM Mops-NaOH, pH7.5, 140 mM 塩化ナトリウム, 1% オクタグルコシド, 1 µM hMATE1, 10 µM MSP1E3D, 0.486 mg/mL L-α-Phosphatidylcholine (Sigma type IIS)] を 100 mg の Bio Beads SM-2 に加え, 1 hr, 4°C で振盪した。1,500 x g, 2 min, 4°C で遠心し, 上清を回収した。これを 20 mM Mops-NaOH, pH7.5, 140 mM 塩化ナトリウム溶液で平衡化した Sephadex G-50 Fine スピнкаラムにアプライし, 500 x g, 2 min, 4°C で遠心した。濾液をナノディスクとした。

108 µL のナノディスク溶液に終濃度 100 µM の放射標識したシメチジンを加え 30 min, 25°C で反応させた。100 µL の反応液を Sephadex G-50 Fine スピнкаラムにアプライし, 500 x g, 2 min, 4°C で遠心した。濾液全量に 3 mL の Clear-sol I (Nacalai Tesque) を加え, 放射活性を液体シンチレーションカウンター Tri-Carb 2800TRs (PerkinElmer) により測定した。

5. データ解析

5.1 非線形回帰による種々のパラメータの算出

阻害の阻害剤濃度依存性, 輸送の速度論的解析, および結合の基質濃度依存性は, Sigmaplot 12.3 (HULINKS) を用いた当てはめ計算により非線形回帰し, 各種パラメータを得た。

50%阻害濃度 IC_{50} は, 対数濃度-輸送活性 Plot を用いて以下の二方法で求めた。

- 1) 全ての測定点を用いてシグモイド曲線, 式 M-1 に当てはめた (Lyles *et al.*, 2008; Kawasaki *et al.*, 2014)。 IC_{50} 値は式 M-2 から得た。

$$v = 1 / (1 + e^{(\alpha - \beta(\log[I] + \gamma)})} \quad \text{式 M-1}$$

$$IC_{50} = 10^{(\alpha/\beta - \gamma)} \quad \text{式 M-2}$$

ただし, v は取り込み速度 (% of Control), $[I]$ は阻害剤の濃度, α , β , および γ は回帰曲線のパラメータである。

- 2) 50%阻害を挟む測定点 3-4 点を用いて, 対数関数, 式 M-3 に当てはめた。 IC_{50} 値は式 M-4 から得た。

$$v = a * \log [I] + b \quad \text{式 M-3}$$

$$IC_{50} = 10^{(50-b)/a} \quad \text{式 M-4}$$

ただし, a および b は回帰曲線のパラメータである。

ミカエリス定数 K_m は式 M-5, 解離定数 K_i は競合阻害の場合式 M-6, 非競合阻害の場合式 M-7 に対する当てはめ計算から算出した。

$$v = V_{\max} * S / (K_m + S) \quad \text{式 M-5}$$

$$v = V_{\max} / \{1 + (K_m / S) * (1 + I / K_i)\} \quad \text{式 M-6}$$

$$v = V_{\max} / \{(1 + I / K_i) * (1 + K_m / S)\} \quad \text{式 M-7}$$

ただし, V_{\max} は最大速度, S は基質濃度である。

5.2 統計処理

Sigmaplot 12.3 (HULINKS) を用いて, 2 群の比較は t 検定, 全群の多重比較は Tukey 法, 対照群の存在する多重比較は Dunnett 法によって検定し, 危険率 p 値が 5% 未満のときを統計学的に有意と判定した。

論文目録

本研究の内容は以下の論文に発表した。

1. Kawasaki, Tatsuya, Ito, Hideyuki., and Omote, Hiroshi. (2014) Components of Foods Inhibit a Drug Exporter, Human Multidrug and Toxin Extrusion Transporter 1. *Biol Pharm Bull.* **37**, 292-297.
2. Kawasaki, Tatsuya, Matsumoto, Takuya., Kawakami, Mamiyo., Iwai, Yuma., Juge, Narinobu., Moriyama, Yoshinori., and Omote, Hiroshi. (2016) Conserved glutamate residue of human MATE1 is essential for substrate binding and transport. *Submitted*.

その他の論文

1. Miyaji T, Kawasaki T, Togawa N, Omote H, Moriyama Y. (2013) Type 1 Sodium-Dependent Phosphate Transporter acts as a Membrane Potential-Driven Urate Exporter. *Curr Mol Pharmacol.* **6**: 88-94.
2. Uwai Y, Kawasaki T, Nabekura T. (2013) Caffeic acid inhibits organic anion transporters OAT1 and OAT3 in rat kidney. *Drug Metabol Drug Interact.* **28**: 247-250.
3. Uwai Y, Nakashima Y, Honjo E, Kawasaki T, Nabekura T. (2014) Diuresis by intravenous administration of xanthurenic acid in rats, and inhibition by probenecid. *Biomed Res.* **35**: 223-226.
4. Uwai Y, Arima R, Takatsu C, Furuta R, Kawasaki T, Nabekura T. (2014) Sodium-phosphate cotransporter mediates reabsorption of lithium in rat kidney. *Pharmacol Res.* **87**: 94-98.
5. Nabekura T, Hiroi T, Kawasaki T, Uwai Y. (2015) Effects of natural nuclear factor-kappa B inhibitors on anticancer drug efflux transporter human P-glycoprotein. *Biomed Pharmacother.* **70**: 140-145.
6. Uwai Y, Kawasaki T, Nabekura T. (2015) Minor contribution of biliary excretion in lithium elimination in rats. *Drug Metabol Personal Ther.* **30**: 65-67.
7. Uwai Y, Tsuge M, Tokai Y, Kawasaki T, Nabekura T. (2015) Lithium Interferes with the Urinary Excretion of Phenolsulfonphthalein in Rats: Involvement of a Reduced Content of α -Ketoglutarate, the Driving Force for Organic Anion Transporters OAT1 and OAT3, in the Kidney Cortex. *Pharmacology.* **96**: 278-283.
8. Nabekura T, Kawasaki T, Kamiya Y, Uwai Y. (2015) Effects of antiviral drugs on organic anion transport in human placental BeWo cells. *Antimicrob Agents Chemother.* **59**: 7666-7670.
9. Uwai Y, Kawasaki T, Nabekura T. (2016) Foscarnet, an inhibitor of the sodium-phosphate cotransporter NaPi-IIa, inhibits phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β by lithium in the rat kidney cortex. *Drug Metab Pharmacokinet.* **31**: 256-259.

引用文献

- Ameer, B., Weintraub, R., 1997. Drug interactions with grapefruit juice. *Clin. Pharmacokinet.* 33, 103–121.
- Bayburt, T.H., Grinkova, Y. V., Sligar, S.G., 2002. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett.* 2, 853–856.
- Becker, M.L., Visser, L.E., Schaik, R.H.N. Van, Hofman, A., 2009. Genetic variation in the multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein influences the glucose-lowering effect of metformin in patients with diabetes: a preliminary study. *Diabetes.* 58, 745–749.
- Bi, W., Yan, J., Stankiewicz, P., Park, S.S., Walz, K., Boerkoel, C.F., Potocki, L., Shaffer, L.G., Devriendt, K., Nowaczyk, M.J., Inoue, K., Lupski, J.R., 2002. Genes in a refined Smith-Magenis syndrome critical deletion interval on chromosome 17p11.2 and the syntenic region of the mouse. *Genome Res.* 12, 713–728.
- Bieger, J., Cermak, R., Blank, R., de Boer, V.C., Hollman, P.C., Kamphues, J., Wolffram, S., 2008. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J. Nutr.* 138, 1417–1420.
- Busch, A.E., Quester, S., Jochen, C., Waldegger, S., Arndt, P., Lang, F., Koepsell, H., Ulzheimer, J.C., Gorboulev, V., 1996. Electrogenic Properties and Substrate Specificity of the Polyspecific Rat Cation Transporter rOCT1. *J. Biol. Chem.* 271, 32599–32604.
- Casero, R.A., Marton, L.J., 2007. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 373–390.
- Chufan, E.E., Kapoor, K., Sim, H.M., Singh, S., Talele, T.T., Durell, S.R., Ambudkar, S.V., 2013. Multiple Transport-Active Binding Sites Are Available for a Single Substrate on Human P-Glycoprotein (ABCB1). *PLoS One.* 8, e82463.
- Ciccarone, V.C., Polayes, D.A., Luckow, V.A., 1998. Generation of Recombinant Baculovirus DNA in *E. coli* Using a Baculovirus Shuttle Vector. In: *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases.* pp. 213–236.
- De Duve, C., De Barse, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., Van Hoof, F., 1974. Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.* 23, 2495–2531.
- Denisov, I.G., Grinkova, Y.V., Lazarides, A.A., Sligar, S.G., 2004. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3477–3487.
- Dresser, G.K., Bailey, D.G., Carruthers, S.G., 2000. Grapefruit juice-felodipine interaction in the elderly. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 28–34.
- European Medicines Agency, 2012. Guideline on the investigation of drug interactions.

- Food and Drug Administration, 2012. Guidance for Industry Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations.
- Goosen TC, Cillié D, Bailey DG, Yu C, He K, Hollenberg PF, Woster PM, Cohen L, Williams JA, Rheeders M, D.H., 2004. Bergamottin contribution to the grapefruit juice-felodipine interaction and disposition in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 76, 607–617.
- Gründemann, D., Hahne, C., Berkels, R., Schömig, E., 2003. Agmatine is efficiently transported by non-neuronal monoamine transporters extraneuronal monoamine transporter (EMT) and organic cation transporter 2 (OCT2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 810–817.
- Gugler, R., Leschik, M., Dengler, H.J., 1975. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 9, 229–234.
- Hatano, T., Kusuda, M., Hori, M., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T., 2003. Theasinensin A, a Tea Polyphenol Formed from (–)-Epigallocatechin Gallate, Suppresses Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta Med.* 69, 984–989.
- He, X., Szewczyk, P., Karyakin, A., Evin, M., Hong, W.X., Zhang, Q., Chang, G., 2010. Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature*, 467, 991–994.
- Hiasa, M., 2010. ほ乳類のMATE型トランスポーター及び小胞型ヌクレオチドトランスポーターの局在と生理的意義に関する研究. 岡山大学大学院 博士論文
- Hiasa, M., Matsumoto, T., Komatsu, T., Moriyama, Y., 2006. Wide variety of locations for rodent MATE1, a transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C678–C686.
- Hsyu, P.H., Giacomini, K.M., 1987. The pH gradient-dependent transport of organic cations in the renal brush border membrane. Studies with acridine orange. *J. Biol. Chem.* 262, 3964–3968.
- International Transporter Consortium, 2010. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 9, 215–236.
- Inui, K., Masuda, S., Saito, H., 2000. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int.* 58, 944–958.
- Ito, S., 2013. MATE阻害剤pyrimethamineを用いた腎臓におけるカチオン性薬物排出輸送機構の定量的解析. 東京大学大学院 博士論文.
- Ito, S., Kusuhara, H., Kuroiwa, Y., Wu, C., Moriyama, Y., Inoue, K., Kondo, T., Yuasa, H., Nakayama, H., Horita, S., Sugiyama, Y., 2010. Potent and specific inhibition of mMate1-mediated efflux of type I organic cations in the liver and kidney by pyrimethamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 333, 341–350.
- Kajiwara, M., Masuda, S., Watanabe, S., Terada, T., Katsura, T., Inui, K., 2012. Renal Tubular Secretion of Varenicline by Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Transporters. *Drug Metab*

- Pharmacokinet.* 27, 563–569.
- Kakinuma, Y., Hoshino, K., Igarashi, K., 1988. Characterization of the inducible polyamine transporter in bovine lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* 176, 409–414.
- Kim, Y.K., Kim, T.I., Jung, D.K., Jung, J.S., Lee, S.H., 1993. Inhibition of H⁺/organic cation antiport by carboxyl reagents in rabbit renal brush-border membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266, 500–505.
- Koepsell, H., 1998. Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 243–266.
- Koepsell, H., Lips, K., Volk, C., 2007. Polyspecific organic cation transporters: Structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.* 24, 1227–1251.
- Kusuhara, H., Ito, S., Kumagai, Y., Jiang, M., Shiroshita, T., Moriyama, Y., Inoue, K., Yuasa, H., Sugiyama, Y., 2011. Effects of a MATE protein inhibitor, pyrimethamine, on the renal elimination of metformin at oral microdose and at therapeutic dose in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 89, 837–844.
- Leviatan, S., Sawada, K., Moriyama, Y., Nelson, N., 2010. Combinatorial method for overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 285, 23548–23556.
- Lu, M., Symersky, J., Radchenko, M., Koide, A., Guo, Y., Nie, R., Koide, S., 2013. Structures of a Na⁺-coupled, substrate-bound MATE multidrug transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2099–2104.
- Lyles, R.H., Poindexter, C., Evans, A., Brown, M., Cooper, C.R., 2008. Nonlinear model-based estimates of IC₅₀ for studies involving continuous therapeutic dose–response data. *Contemp. Clin. Trials.* 29, 878–886.
- Maeda, K., Hisaka, A., Saito, Y., Nagai, N., Kume, T., 2014. 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（最終案）について. *薬剤学* 74, 406–413.
- Matsumoto, T., 2009. ヒトMATE型輸送体の基質認識及び輸送メカニズムに関する研究. 岡山大学大学院 博士論文.
- Matsumoto, T., Kanamoto, T., Otsuka, M., Omote, H., Moriyama, Y., 2008. Role of glutamate residues in substrate recognition by human MATE1 polyspecific H⁺/organic cation exporter. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, C1074–C1078.
- Matsushima, S., Maeda, K., Inoue, K., Ohta, K.Y., Yuasa, H., Kondo, T., Nakayama, H., Horita, S., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., 2009. The inhibition of human multidrug and toxin extrusion 1 is involved in the drug-drug interaction caused by cimetidine. *Drug Metab. Dispos.* 37, 555–559.
- Mohammad-Zadeh, L.F., Moses, L., Gwaltney-Brant, S.M., 2008. Serotonin: a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 31, 187–199.

- Müller, F., Pontones, C.A., Renner, B., Mieth, M., Hoier, E., Auge, D., Maas, R., Zolk, O., Fromm, M.F., 2015. N1-methylnicotinamide as an endogenous probe for drug interactions by renal cation transporters: studies on the metformin–trimethoprim interaction. *Eur J Clin Pharmacol.* 71, 85–94.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., Yamaguchi, A., 2006. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*, 443, 173–179.
- Nasr, M.L., Singh, S.K., 2014. Radioligand Binding to Nanodisc-Reconstituted Membrane Transporters Assessed by the Scintillation Proximity Assay. *Biochemistry*, 53, 4–6.
- Ogden, K.K., Traynelis, S.F., 2011. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 726–733.
- Oh, S.M., Chung, K.H., 2004. Antiestrogenic activities of Ginkgo biloba extracts. *Life Sci.* 74, 1325–1335.
- Ohta, K.Y., Inoue, K., Yasujima, T., Ishimaru, M., Yuasa, H., 2009. Functional characteristics of two human MATE transporters: Kinetics of cimetidine transport and profiles of inhibition by various compounds. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 12, 388–396.
- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., Moriyama, Y., 2006. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 587–593.
- Otsuka, M., Matsumoto, T., Morimoto, R., Arioka, S., Omote, H., Moriyama, Y., 2005a. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci. U. S. A.* 102, 17923–17928.
- Otsuka, M., Yasuda, M., Morita, Y., Otsuka, C., Tsuchiya, T., Omote, H., Moriyama, Y., 2005b. Identification of essential amino acid residues of the NorM Na⁺/multidrug antiporter in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 187, 1552–1558.
- Oude Elferink, R.P., Meijer, D.K., Kuipers, F., Jansen, P.L., Groen, A.K., Groothuis, G.M., 1995. Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. *Biochim Biophys Acta.* 1241, 215–268.
- Pascual-Teresa, S., Johnston, K.L., Dupont, M.S., O’Leary, K.A., Needs, P.W., Morgan, L.M., Clifford, M.N., Bao, Y.P., Williamson, G., 2004. Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes ex vivo but not in vivo. *J. Nutr.* 134, 552–557.
- Pontén, F., Jirström, K., Uhlen, M., 2008. The Human Protein Atlas –a tool for pathology. *J. Pathol.* 216, 387–393.
- Pritchard, J.B., Miller, D.S., 1993. Mechanisms Mediating Renal Secretion of Organic-Anions and Cations. *Physiol. Rev.* 73, 765–796.

- Radchenko, M., Symersky, J., Nie, R., Lu, M., 2015. Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. *Nat. Commun.* 6, 7995.
- Ramamoorthy, S., Bauman, A.L., Moore, K.R., Han, H., Yang-Feng, T., Chang, A.S., Ganapathy, V., Blakely, R.D., 1993. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2542–2546.
- Roth, M., Obaidat, A., Hagenbuch, B., 2012. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1260–1287.
- Sala-Rabanal, M., Li, D.C., Dake, G.R., Kurata, H.T., Inyushin, M., Skatchkov, S.N., Nichols, C.G., 2013. Polyamine transport by the polyspecific organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3. *Mol. Pharm.* 10, 1450–1458.
- Schaffner, W., Weissmann, C., 1973. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* 56, 502–514.
- Shirasaka, Y., Mori, T., Shichiri, M., Nakanishi, T., Tamai, I., 2012. Functional Pleiotropy of Organic Anion Transporting Polypeptide OATP2B1 Due to Multiple Binding Sites. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 27, 360–364.
- Soda, K., Kano, Y., Sakuragi, M., Takao, K., Lefor, A., Konishi, F., 2009. Long-term oral polyamine intake increases blood polyamine concentrations. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 55, 361–366.
- Sokol, P., Holohan, P., Ross, C., 1990. Acridine orange transport in canine renal brush-border membrane vesicles. *Biochem. Pharmacol.* 40, 8523–8526.
- Sokol, P.P., Holohan, P.D., Grass, S.M., Ross, C.R., 1988. Proton-coupled organic cation transport in renal brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 940, 209–218.
- Somogyi, A., Stockley, C., Keal, J., Rolan, P., Bochner, F., 1987. Reduction of metformin renal tubular secretion by cimetidine in man. *Br. J. clin. Pharmacol.* 23, 545–551.
- Stevens, M.F., Griffin, R.J., Wong, S.K., 1987. The aromatic azido group in anti-cancer drug design: application in the development of novel lipophilic dihydrofolate reductase inhibitors. *Anticancer. Drug Des.* 2, 311–318.
- Strelow, J., Dewe, W., Iversen, P.W., Brooks, H.B., Radding, J.A., McGee, J., Weidner, J., 2012. Mechanism of Action Assays for Enzymes, Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Takanaga, H., Ohnishi, A., Murakami, H., Matsuo, H., Higuchi, S., Urae, A., Irie, S., Furuie, H., Matsukuma, K., Kimura, M., Kawano, K., Orii, Y., Tanaka, T., Sawada, Y., 2000. Relationship between time of intake of grapefruit juice and its effect on pharmacokinetics and pharmacodynamics of felodipine in healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 201–214.

- Tanaka, Y., Hipolito, C.J., Maturana, A.D., Ito, K., Kuroda, T., Higuchi, T., Katoh, T., Kato, H.E., Hattori, M., Kumazaki, K., Tsukazaki, T., Ishitani, R., Suga, H., Nureki, O., 2013. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature*, 496, 247–251.
- Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O., Inui, K., 2007. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H⁺-organic cation antiporters. *Biochem. Pharmacol.* 74, 359–371.
- Tsuda, M., Terada, T., Mizuno, T., Katsura, T., Shimakura, J., Inui, K., 2009. Targeted disruption of the multidrug and toxin extrusion 1 (mate1) gene in mice reduces renal secretion of metformin. *Mol. Pharmacol.* 75, 1280–1286.
- Ullrich, K., 1994. Specificity of transporters for “organic anions” and “organic cations” in the kidney. *Biochim Biophys Acta.* 1197, 45–62.
- Weinmann, S., Roll, S., Schwarzbach, C., Vauth, C., Willich, S.N., 2010. Effects of Ginkgo biloba in dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr.* 10, 14.
- Williams, K., 1997. Modulation and Block of Ion Channels: A New Biology of Polyamines. *Cell. Signal.* 9, 1–13.
- Winter, T.N., Elmquist, W.F., Fairbanks, C.A., 2011. OCT2 and MATE1 provide bidirectional agmatine transport. *Mol. Pharm.* 8, 133–142.
- Yasujima, T., Ohta, K., Inoue, K., Ishimaru, M., Yuasa, H., 2010. Evaluation of 4', 6- diamidino- 2- phenylindole as a fluorescent probe substrate for rapid assays of the functionality of human multidrug and toxin extrusion proteins. *Drug Metab. Dispos.* 38, 715–721.

略語表

5HIAA	5-Hydroxyindole acetic acid
AUC	Area Under the blood Concentration-time curve
BCECF	2',7'-Bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimido
DDTM	<i>n</i> -dodecyl- β -D-thiomaltopyranoside
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E-3-S	Estrone 3-sulfate
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide
EGCG	(-)-Epigallocatechin gallate
EMA	European Medicines Agency
FDA	(U.S.) Food and Drug Administration
G418	Geneticin
HEK293	Human embryonic kidney 293
hMATE	human MATE
MATE	Multidrug and toxin extrusion
MDR	Multidrug Resistance
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MSP	Membrane Scaffold Protein
NET	Norepinephrine Transporter
<i>n.d.</i>	Not detected
OC ⁺	Organic Cation
OCT	Organic Cation Transporter
PAH	<i>p</i> -Aminohippurate
P-gp	P-glycoprotein
PYR	Pyrimethamine
SD	Standard deviation
SE	Standard error
SERT	Serotonin Transporter
SLC	Solute carrier
SME	Sucrose Mops EDTA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPD	Spermidine

略語表 (続き)

SPM	Spermine
TEA	Tetraethylammonium
TM	Transmembrane (Helices)
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
VMAT	Vesicular Monoamine Transporter

謝 辞

本研究は、岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 生体膜機能生化学研究室にて行ったものである。

本研究遂行および本稿上梓にあたり、御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました当生体膜機能生化学研究室 森山芳則教授に深甚なる感謝の意を表し厚く御礼申し上げます。

本研究遂行および本稿上梓にあたり、終始有益な御指導、御教授を賜りました当生体膜機能生化学研究室 表弘志准教授に謹んで感謝の意を表し厚く御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、天然物化合物を提供して頂き、また有益な助言を賜りました岡山県立大学 伊東秀之教授に深く感謝いたします。

社会人博士課程大学院生としての岡山大学における研究活動に、深いご理解と協力を賜りました現職上司 愛知学院大学 鍋倉智裕教授、同 上井優一講師に深く感謝いたします。

本稿執筆にあたり、有益な助言を賜りました主査 構造生物薬学研究室 山下敦子教授、副査 環境生物薬学研究室 三好伸一教授、臨床薬物動態学研究室 合葉哲也准教授に深謝いたします。

種々の有益な御指導、ご教授を賜りました本学自然生命科学研究支援センター ゲノム・プロテオーム解析部門 宮地孝明准教授、同 樹下成信助教、生体膜機能生化学研究室 日浅未来助教に厚く御礼申し上げます。

ともに実験を進めご協力を頂きました、加藤百合特任助教、岩井佑磨学士、松尾俊佑修士、竹内智也修士、河上麻美代修士をはじめ、御協力を賜りました研究室員一同に謹んで御礼申し上げます。

最後に、不自由無い研究生生活を支えて下さった家族に感謝いたします。

平成 28 年 9 月 川崎 達也