薬 剤 学, **67** (1), 27–31 (2007)

≪若手研究者紹介≫

トランスポーター・アダプターを介した栄養物・薬物の生体膜透過

加 藤 将 夫 Yukio Kato
金沢大学・大学院自然科学研究科（薬学系）

1. は じ め に

小腸や腎臓等の上皮細胞は，生体にとって異物の侵入を絶えず排除しながら生命機能の維持に必要な栄養物を取り込むことで，生体のホメオスタシスを維持している．近年この生命維持のメカニズムが細胞膜に存在するタンパク質（トランスポーター）による生体膜透過であることが示されつつある．すなわち，生体にとって異物となる分子を細胞外へ排出するトランスポーター群と，栄養物を認識して細胞内に取り込むトランスポーター群が，それぞれの役割を担い生命秩序を維持するとの考え方である．著者らは，このようなトランスポーターによる分子認識を利用した医薬品開発の効率化，適正使用，ドラッグデリバリー等への応用を最終目的として研究を展開するとともに，これらトランスポーター群を統括すると考えられる細胞内タンパク質（アダプター）の役割にも焦点を当てている．本稿では，著者らが現在取り組んでいる研究とその展開について，紹介させていただく．

著者紹介：平成 2 年 3 月東京大学薬学部薬学科卒，平成 5 年 7 月東京大学大学院薬学系研究科（博士課程）中退，同年 8 月東京大学薬学部助手，平成 13 年 4 月米国 NIH へ留学，平成 14 年 6 月金沢大学薬学部助教授，平成 16 年 4 月組織改編後現在に至る．第 1 回万有薬剤学奨励賞（平成 12 年），ISSX New Investigator Award in Asia-Pacific region（平成 18 年），日本薬物動態学会奨励賞（平成 18 年）．研究のモットー：特徴ある研究．趣味：万歩計をつけた散歩．

2. トランスポーターとアダプターによる薬の生体膜透過

2.1 トランスポーターとアダプター

トランスポーターは細胞膜を何回も貫通する膜に埋め込まれたタンパク質である．現在知られているトランスポーターは，主に大きく分けると ATP の加水分解エネルギーを利用して物質を細胞外へ排出する ABC（ATP binding cassette）superfamily とさまざまなイオンの電気化学的ポテンシャル（細胞内外の濃度勾配）を利用して物質を細胞内に取り込んだり細胞外に排出する SLC（solute carrier）superfamily に大別される．

著者のアダプター研究のきっかけは，細胞膜のダイナミックなターンオーバーとトランスポーターとの関係からである．細胞膜表面には，種々の高分子タンパク質や低分子ビタミン等（リガンド）を細胞内に取り込み，分解するためのレセプターが多数存在し，それらはリガンドと結合することが引き金となって細胞内にエンドサイトーシスされる．著者は，平成元年から東京大学の杉山雄一教授のもと，種々の生理活性タンパク質の受容体介在性エンドサイトーシスの速度論解析に携わり，エンドサイトーシスが肝細胞増殖因子，エリスロポエチン等の全身からの消失機構として重要であることを示してきた．著者らの解析では，例えば肝実質細胞の場合，受容体を持つリガンドを 1 時間もインキュベーションすると，定常状態下で細胞容積の数十倍から数百倍もの高濃度が細胞内にエンドサイトーシスされ，それらは順次リソゾームで分解される．一方で，受

容体は数十分から数時間の速さで細胞表面に帰還し次のリガンドとの結合に預かる．レセプターを持たない高分子（イヌリンやアルブミン）でも，1時間に数倍の濃度が細胞内に入ることを考えると，細胞膜やそこに存在するタンパク質は，かなりのスピードで細胞の中と表面とを行き来するものと考えられた．一方で著者らは平成5年より現在に至るまで，トランスポーターによる異物分子の排除と栄養物質の吸収に関する研究に携わってきたが，トランスポーターがこれら生命機能の維持に働くためには，おそらく安定に細胞膜表面で機能しつづける必要がある．従ってトランスポーターを細胞表面に留めておく何らかの足場となるタンパク質群が存在するかもしれない．

トランスポーターの中には，そのアミノ酸配列上のC末端にPDZモチーフと呼ばれる決まった配列(-S/T-X-Φ：Xは任意のΦは脂溶性アミノ酸)を持つものが存在する(PDZとはPSD-95，Dlg，ZO-1と呼ばれる3つのタンパク質が共通して保有する約80個のアミノ酸からなる構造ユニットのことで，その構造ユニットが結合する可能性のあるアミノ酸配列をPDZモチーフと呼ぶ)．またそのモチーフを持つものは多くが腎臓や小腸の刷子縁膜に局在する[1]．著者は，平成14年から金沢大学の辻彰教授のもと，トランスポーターに直接結合するタンパク質に着目した研究を展開し，yeast two-hybridと呼ばれる手法を用い，SLC superfamilyに属するトランスポーターのC末端と，PDZドメインを有する細胞内タンパク質（PDZタンパク質）との特異的な結合を見出した[2]．著者の所属グループや他の研究グループによる解析から，現在までにPDZタンパク質であるPDZK1およびNHERF1が，Na^+/urate transporter（URAT）1，Organic cation/carnitine transporter（OCTN）1およびOCTN2，organic anion transporter（OAT）4，oligopeptide transporter（PEPT）2などのトランスポーターと腎近位尿細管刷子縁膜にて共局在することが示唆されている（図1）[3～6]．これらPDZタンパク質自身も刷子縁膜付近に局在し，トランスポーターの裏打ちタンパク質(アダプター)として何らかの役割を果たすことが推測される（図1）．

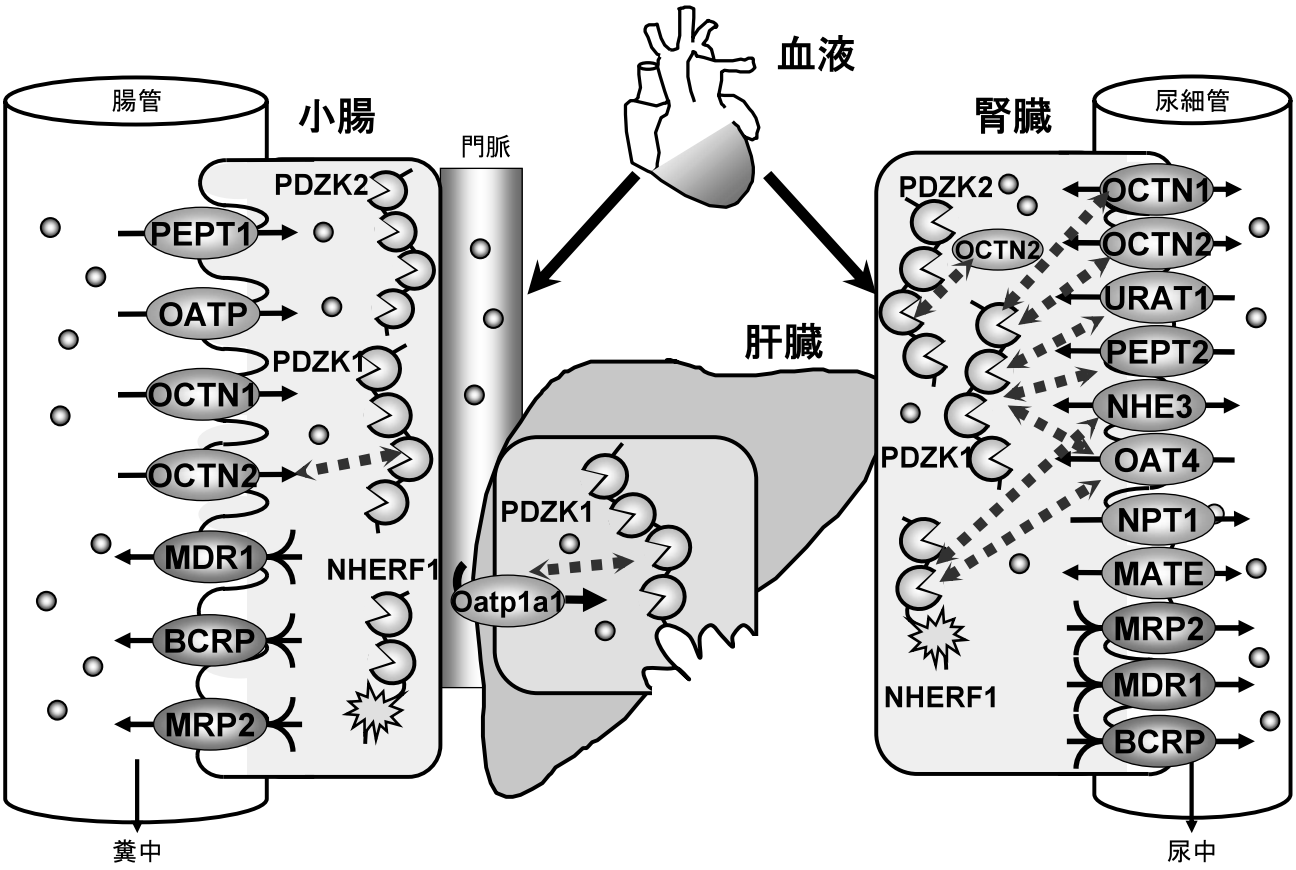

図1　肝臓，腎臓，小腸におけるトランスポーターとアダプターの相互作用
これまでに細胞膜での共局在，機能または発現制御の知られている組み合わせを示した．

2.2 アダプターによる制御とネットワークの形成

OCTNは，著者の所属する金沢大学辻研究室で見出されたトランスポーターであり，OCTN1やOCTN2はビタミン様物質であるcarnitineや種々の有機カチオン性薬物を輸送する．OCTN1の遺伝子変異はクローン病やリューマチと関連する一方，OCTN2の欠損は全身性カルニチン欠乏症を引き起こす．著者らはOCTN2が消化管刷子縁膜に局在し，carnitineの管腔から上皮細胞内への取り込みに働くことを*octn2*遺伝子欠損マウスであるjvsを用い証明した[7]．同じjvsマウスに有機カチオンのモデル化合物であるtetraethylammonium（TEA）を静注すると，正常マウスに比べ尿中排泄の遅延と腎臓/血漿中濃度比の上昇が認められることから，OCTN2はcarnitineの再吸収とTEAの排出の両方向の輸送を担うトランスポーターと考えられる．

電子顕微鏡で観察するとOCTN2とそのアダプターであるPDZK1は吸収上皮細胞の微絨毛とその直下にほぼ同じ分布像として得られる[7]．また小腸を可溶化してPDZK1抗体で免疫沈降すると，PDZK1とともにOCTN2が検出される[7]ことから両者は微絨毛で結合して存在することが示された．これら2つのタンパク質が共存する生理的な意味を探る目的で，培養細胞にOCTN2とPDZK1の両方の遺伝子を導入すると，OCTN2単独に比べ，carnitine取り込みのV_{max}が約6倍上昇する一方K_mには変化が見られなかった．同様なV_{max}のみの上昇は，OCTN1, URAT1, OCTN2, OAT4, PEPT2など，PDZK1と結合する他のトランスポーターでも共通して認められることから，PDZK1は単にトランスポーターと結合するだけでなく，その輸送機能または発現量に何らかの影響を与えている可能性がある[3～6,8]．このようにトランスポーターによる物質の生体膜透過は，トランスポーター自身だけでなく，それと直接結合するアダプターによっても影響を受けることがわかる．

PDZK1遺伝子ノックアウトマウスでは，肝細胞血液側膜上でのorganic anion transporting polypeptide（Oatp）1a1の発現量の低下と，細胞内への蓄積が報告されており，PDZK1がトランスポーターの細胞表面での局在を左右することが実証された[9]．PDZK1は腎臓や小腸では刷子縁膜に局在する一方，肝臓では血液側に局在する．PDZK1と結合するOatp1a1やOCTN2も同様に肝臓と腎臓とで局在が逆である．Oatp1a1は腎臓の刷子縁膜で有機アニオンの再吸収に働くと考えられており，ラットでは発現の性差から有機アニオン性薬物の尿中排泄に性差が認められる（発現の高いオスでの腎排泄が低い）[10,11]．これらの知見はPDZK1が上皮細胞におけるトランスポーターの局在（basolateralかapicalか？）を決める因子として働く可能性を示唆し，今後その働きがさらに明らかにされるものと期待される．

3. 薬の生体膜透過評価系への応用

PDZK1やNHERF1は分子内に4ないし2つのPDZドメインを持ち，それぞれのドメインが独立してトランスポーターのC末端と結合することができる．またPDZK1とNHERF1は相互に結合し，NHERF1は自身でもhomodimerを形成する．従って，腎や小腸の刷子縁膜では，トランスポーターどうしがこれらアダプターを介してつながれた巨大なネットワークを形成している可能性がある．このことは，トランスポーターとその輸送駆動力を供給する膜タンパク質が近接して働く点で生体にとって有利かもしれない．PEPTは細胞の内向きのH^+濃度勾配を利用してペプチドを取り込むが，一方で内向きのNa^+の勾配を利用してH^+を細胞外に排出するのがNa^+/H^+ exchanger（NHE）3であり，ともにPDZタンパク質と結合する．すなわちPEPTとNHE3とが協調して効率よくペプチドを吸収するメカニズム（機能的カップリング）が考えられる．このことは腎の近位尿細管刷子縁膜においては，糸球体ろ過を受けた糖，ペプチド，ビタミンなどの栄養物を尿細管の流れの中から取りこぼしのないように再吸収する上で有利であろう．一方小腸の刷子縁膜においては，栄養物を大量に取り込む目的で比較的低親和性のトランスポーターが機能すると考えられ，これらによる輸送クリアランス（V_{max}/K_m）を確保するためにアダプターによるV_{max}の上昇が必要なのかもしれない．

このような生体の持つ巧妙な生体膜透過機構を医薬品開発や適正使用に応用できないだろうか．これまで薬物トランスポーター研究においては，その機能解析にさまざまな種類の培養細胞やアフリカツメ

ガエル卵母細胞などの遺伝子発現系が用いられてきた．これらは操作が簡便で遺伝子発現効率が高く，機能解析をする上では極めて有用である一方，これまでのトランスポーター発現系は，生体内において起こるアダプター分子群等による機能調節についてほとんど考慮されてこなかった．すなわちトランスポーター遺伝子を導入した時点で輸送機能が見えれば，それをトランスポーターの持つ固有の活性として評価してきた．一方で論文上では報告されないものの，トランスポーターによっては，ある細胞では遺伝子導入しても機能の見えづらい例もある．

著者らはこのような細胞内でのタンパク質間ネットワークを考慮に入れたトランスポーター遺伝子発現系が，薬物の生体膜透過，ひいては体内動態評価のいくつかの局面で，有益なツールになると考え，研究を展開している．一つには，トランスポーターとアダプターとの共存によって前述のように輸送機能が上昇し定量がしやすくなるとともに，細胞膜に高い発現量が維持されるため，感度の高い測定系となる可能性がある．また，より根本的な課題として，アダプターが共存した時のトランスポーターの持つ基質認識性は，共存しない時と同じか，という点も，今後明らかにしていく必要があると考えている．輸送活性の絶対量だけでなく，輸送の質，すなわち基質間の認識の違いがアダプターによって変化するかどうかは，薬のように無数の幅広い構造を有する異物を扱う薬剤学研究において検討する必要がある．実際，PDZK1 は OCTN2 による carnitine 輸送を大きく促進する一方，TEA や他のいくつかの有機カチオン輸送にはあまり影響しない．このことはアダプターが栄養物を取り込む輸送機能だけを促進すると考えれば，ホメオスタシス維持に有利に働く現象と捉えることもできる．筆者らは OCTN2 による carnitine 輸送の PDZK1 による上昇も，PEPT と NHE とで見られるような，前述の機能的カップリングではないかと考えている．従って，生体膜透過の際に機能的カップリングが起こる薬物と起こらない薬物とがあり，そのことが膜透過の効率を決めることも考えられ，さらに検討が必要である．

また，トランスポーターが腎臓や小腸でアダプターと結合していることを考えると，両者を共発現させた系は生体により近い系と捉えることもできる．PDZ タンパク質は，ezrin-radixin-moesin と呼ばれる細胞内タンパク質を介してアクチンと結合する．著者らが見出した小腸微絨毛直下での OCTN2 と PDZK1 の共局在する場所は，ちょうどアクチン繊維の局在部位に近いことから，両者が細胞表面だけではなく，細胞内にも一部共局在することを示唆する．同様に PDZK1 と同一 family である PDZK2 は，*in vitro* 培養細胞系では OCTN2 の細胞膜表面での発現量を上げ V_{max} を上昇させるが，*in vivo* では近位尿細管の刷子縁膜直下（subapical）で OCTN2 と共局在する[12]．すなわち，OCTN2 の一部は細胞の内部にも存在し，そこで PDZK2 が OCTN2 の安定化に働くという仮説が成り立つ．このような細胞内タンパク質を導入した言わば‘ヒト疑似細胞’は，腎臓，小腸，肝臓などにより近い生理的な実験系として，薬の生体膜透過やその相互作用の評価において有用かもしれない．

4. おわりに

以上，トランスポーター・アダプターによる生体膜透過について，著者らの最近の業績を中心に紹介した．アダプター研究は，トランスポーターの輸送機能や局在を決める分子メカニズムといった基礎研究の側面とともに，生体膜透過の精密な評価のために必要な，より生体に近い実験系の構築にも発展すると考えている．特に欧米の製薬企業等では，大量の新規化合物群を合成しスクリーニングによって絞り込む創薬の方向性が打ち出されて久しいが，一方で生体の持つ巧妙な分子機構を利用した緻密かつ正確なスクリーニング戦略が打ち出せれば，医薬品開発の効率化やコスト削減，医薬品の適正使用にも役立つものと考え，現在も研究を続けている．

引用文献

1) F.G. Russel, R. Masereeuw, R.A. van Aubel, Molecular aspects of renal anionic drug transport, *Annu. Rev. Physiol*., **64**, 563–594 (2002).
2) Y. Kato, K. Yoshida, C. Watanabe, Y. Sai, A. Tsuji, Screening of the interaction between xenobiotic transporters and PDZ proteins, *Pharm. Res*., **21** (10), 1886–1894 (2004).
3) S.M. Gisler, S. Pribanic, D. Bacic, P. Forrer, A. Gantenbein, L.A. Sabourin, A. Tsuji, Z.S. Zhao, E. Manser, J. Biber, H. Murer, PDZK1: I. A major scaffolder in brush borders of proximal tubular cells, *Kidney Int*., **64** (5), 1733–1745 (2003).
4) N. Anzai, H. Miyazaki, R. Noshiro, S. Khamdang, A. Chairoungdua, H.J. Shin, A. Enomoto,

S. Sakamoto, T. Hirata, K. Tomita, Y. Kanai, H. Endou, The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 regulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C terminus, *J. Biol. Chem*., **279** (44), 45942–45950 (2004).
5) Y. Kato, Y. Sai, K. Yoshida, C. Watanabe, T. Hirata, A. Tsuji, PDZK1 directly regulates the function of organic cation/carnitine transporter OCTN2, *Mol. Pharmacol*., **67** (3), 734–743 (2005).
6) H. Miyazaki, N. Anzai, S. Ekaratanawong, T. Sakata, H.J. Shin, P. Jutabha, T. Hirata, X. He, H. Nonoguchi, K. Tomita, Y. Kanai, H. Endou, Modulation of renal apical organic anion transporter 4 function by two PDZ domain-containing proteins, *J. Am. Soc. Nephrol*., **16** (12), 3498–3506 (2005).
7) Y. Kato, M. Sugiura, T. Sugiura, T. Wakayama, Y. Kubo, D. Kobayashi, Y. Sai, I. Tamai, S. Iseki, A. Tsuji, Organic cation/carnitine transporter OCTN2 (Slc22 a5) is responsible for carnitine transport across apical membranes of small intestinal epithelial cells in mouse, *Mol. Pharmacol*., **70** (3), 829–837 (2006).
8) T. Sugiura, Y. Kato, Y. Kubo, A. Tsuji, Mutation in an adaptor protein PDZK1 affects transport activity of organic cation transporter OCTNs and oligopeptide transporter PEPT2, *Drug Metab. Pharmacokin*., **21** (5), 375–383 (2006).
9) P. Wang, J.J. Wang, Y. Xiao, J.W. Murray, P.M. Novikoff, R.H. Angeletti, G.A. Orr, D. Lan, D.L. Silver, A.W. Wolkoff, Interaction with PDZK1 is required for expression of organic anion transporting protein 1 A1 on the hepatocyte surface, *J. Biol. Chem*., **280** (34), 30143–30149 (2005).
10) Y. Kato, K. Kuge, H. Kusuhara, P.J. Meier, Y. Sugiyama, Gender difference in the urinary excretion of organic anions in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther*., **302** (2), 483–489 (2002).
11) Y. Gotoh, Y. Kato, B. Stieger, P.J. Meier, Y. Sugiyama, Gender difference in the Oatp1-mediated tubular reabsorption of estradiol 17 beta-D-glucuronide in rats, *Am. J. Physiol*., **282** (6), E1245–E1254 (2002).
12) C. Watanabe, Y. Kato, T. Sugiura, Y. Kubo, T. Wakayama, S. Iseki, A. Tsuji, PDZ adaptor protein PDZK2 stimulates transport activity of organic cation/carnitine transporter OCTN2 by modulating cell-surface expression, *Drug Metab. Dispos*., **34** (11), 1927–1934 (2006).