

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	pH 依存性オリゴペプチド輸送担体の基質輸送サイクルに重要な因子の同定
作成者（著者）	大森, 明子
公開者	東邦大学
発行日	2021.03.17
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨. 7.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 伊関 峰生 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲1009号
学位記番号	甲第131号
学位授与年月日	2021.03.17
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28181796

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

pH 依存性オリゴペプチド輸送担体の基質輸送サイクルに重要な因子の同定

所属 医薬品評価学

氏名 大森明子

【序論】

栄養物質のプロトン依存性輸送機構は、バクテリアから動物細胞に至るまで広く存在し、進化の過程で保存されている重要な輸送機構の一つである。中でも、ヒトオリゴペプチド輸送担体である hPEPT1 は、ジペプチド・トリペプチドといった本来の基質に加え、多様な薬物を輸送することが知られており、ペプチド類似構造を持つ β -ラクタム系抗生物質、ACE 阻害剤などの一部や、抗癌剤ベスタチンのほか、ペプチド構造を有さないバラシクロビルのような薬物をも基質とすることが報告されている。このように hPEPT1 は幅広い基質認識能力を持つということから、新規薬物の輸送経路として期待され、分子生物学的にあるいは速度論的に様々な解析が行われてきた。しかしながら hPEPT1 に輸送される基質は、電荷・官能基・疎水性・分子の大きさなどといった特性が多岐に渡り、hPEPT1 の基質認識機構についての結論は出ていない。

hPEPT1 における基質輸送サイクルは、基質認識→基質の分子内移動→放出→再配向の過程からなることが明らかになっている。当研究室のこれまでの研究より、

hPEPT1 にはある 1 つのヒスチジン残基側鎖の解離状態の変化によって決まる 2 つの状態が存在することが考えられる。この 2 つの状態とは、基質輸送サイクルが進行して基質輸送が起こる状態 (active form) と、輸送サイクルから逸脱した基質輸送の停止した状態 (inactive form) であり、細胞外 pH に依存して

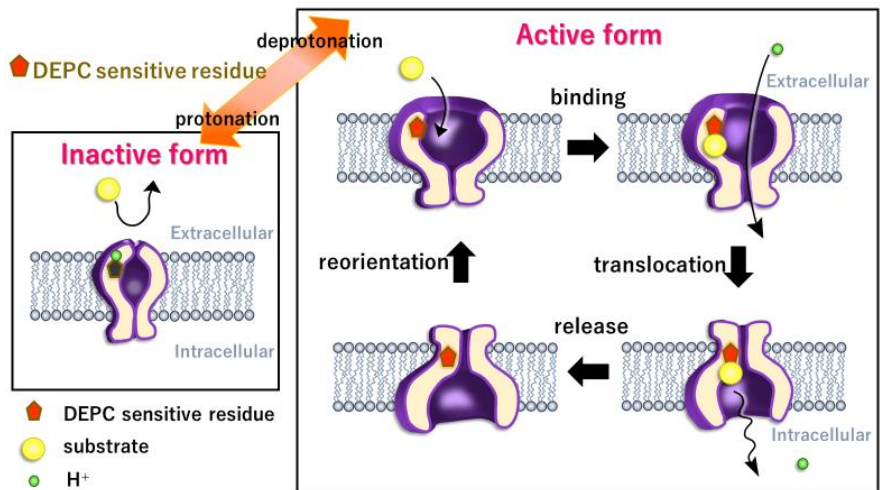


図 1 hPEPT1 による細胞外 pH 依存的な基質輸送メカニズム

輸送活性を大きく変化させる機構がある 1 つのヒスチジン残基側鎖の解離状態の変化によるものであることが推察された (図 1)。Diethyl pyrocarbonate (DEPC) を用いた hPEPT1 の有するヒスチジン残基の化学修飾により、輸送制御に関与するヒスチジン残基は基質認識部位近傍に位置することが示唆された。このヒスチジン残基はプロトン化による輸送サイクルからの逸脱、即ち不活性化により pH 依存性を引き起こしている機構が考えられるが推測の域を脱しない。このヒスチジン残基は基質認識部位の近傍に位置しているのにも関わらず、基質認識には関与していないことも示唆されている。また、hPEPT1 の基質認識性については多彩な基質の認識機構を有していることは明らかになっているが、この物理化学的な因子に関しては不明な点が数多く残されている。物理化学的測定には大量の試料が必要なことと、分子レベルでの基質認識機構解明には結晶構造が必須であるため、hPEPT1 を用いた物理化学的因子の解明が極めて難しい領域となっている。

そこで、本研究において、この基質輸送サイクルにおける重要な因子、pH 依存的活性化因子と基質認識における重要な物理化学的因子について検討をおこなった。第一に、動物細胞 hPEPT1 発現系を用いた基質 efflux 輸送測定から、その活性化機構について明らかにした。続いて、hPEPT1 が属する pH 依存性オリゴペプチド輸送担体ファミリーにおいて、hPEPT1 と類似点が高く、結晶構造が明らかとなっている大腸菌由来のオリゴペプチド輸送担体である YdgR をモデル輸送担体として用い、等温滴定型熱量測定 (ITC) とコンピューターシミュレーションにより基質認識に関わる物理化学的因子を明らかにした。

【結果および考察】

1 CHO/hPEPT1 を用いた pH 依存的活性化機構の解明¹⁾

CHO/hPEPT1 における³H]-Gly-Sar の uptake rate の細胞外 pH 依存性は pH 5.5 を最大とするベル型を示すが、駆動力が一定となる条件下ではアルカリ性側で最大となり、酸性側にシフトするにしたがって activity の減少する曲線型となる。このように hPEPT1 の Gly-Sar uptake は酸性条件下では減少することが明らかとなっており、駆動力の変化に加え、hPEPT1 の有するある 1 つのヒスチジン残基側鎖の解離状態の変化によって hPEPT1 の状態が制御されることが考えられている (図 1)。hPEPT1 における、この制御機構をより明確にするため、uptake と同様に、efflux の細胞外 pH 依存性について検討を行った。

1.1 hPEPT1 を介した efflux 輸送

CHO/hPEPT1 における基質の efflux が hPEPT1 を介したものであることを確認するため、efflux の速度論的解析および *trans*-stimulation 効果について検討した。³H]-Gly-Sar の CHO/hPEPT1 からの efflux を測定したところ、細胞内残存量の経時変化は one-exponential でよく記述される結果となった。また、hPEPT1 の基質である Gly-Sar、cephradine、cephalexin、Val-OMe では *trans*-stimulation 効果が観察されたことから、efflux が hPEPT1 を介した輸送過程であること、hPEPT1 が bi-directional な輸送担体であることが示された。

1.2 Efflux 輸送の pH 依存性と pH 6 付近に pKa を持つアミノ酸残基の関与

CHO/hPEPT1 における Gly-Sar の efflux rate の細胞外 pH 依存性を検討した。pH profile は細胞外 pH の低下に伴い、efflux は減少した (図 2A、B)。この efflux rate と細胞外 pH の関係は Henderson-Hasselbalch の式によくフィットし、pKa は約 5.7 と算出された。このことより、efflux 輸送は pKa 6 付近に解離基を持つアミノ酸残基により制御されていることが推察された。一方、この関係は nigericin、monensin を添加することにより細胞内外の pH 勾配を消去した条件下、または protonophore である CCCP を添加することにより細胞内外の pH 勾配に加え膜電位も消去した条件下においても同様の様子を示したことから (図 2C)、hPEPT1 における基質の efflux 方向の輸送は、基質の化学ポテンシャルのみに依存する促進拡散であり、efflux 方向での駆動力 (H⁺電気化学ポテンシャル) と基質輸送のカップリングが uptake とは異なることが明らかとなった。更に、この pH 依存性を制御するアミノ酸残基は、uptake と同様にヒスチジン修飾試薬 DEPC 感受性であり、細胞外側の基質認識部位近傍に位置するヒスチジン残基であることが示唆された。hPEPT1 の細胞外側に位置するヒスチジン残基の中で、His57 はプロトンの結合・解離に関与するアミノ酸残基、His121 は基質認識に関与するアミノ酸残基であることがそれぞれ明らかとなっている。Efflux における基質認識部位は細胞内側にあることから、活性調節を行っている細胞外側に存在するヒスチジン残基は基質認識に関与するとは考え難い。これより、このヒス

チジン残基は His57 であることが予想され、uptake と efflux の両者において His57 残基側鎖の解離状態に依存した輸送サイクルからの逸脱という機構が存在することが推察される。

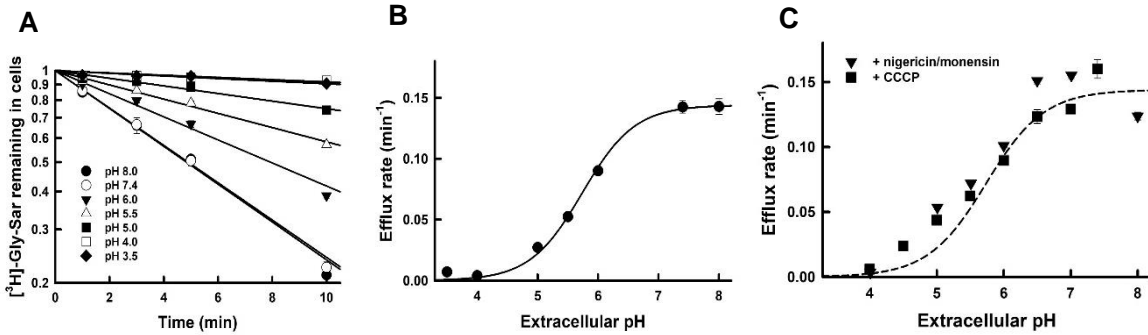


図 2 hPEPT1 を介した Gly-Sar efflux rate の細胞外 pH 依存性

CHO/hPEPT1 に pre-load した³H]-Gly-Sar の細胞内残存量の経時変化を測定した (A)。この時の efflux rate を細胞外 pH に対してプロットした結果が (B) である。(C) は 10 μM nigericin/monensin 添加時及び 40 μM CCCP 添加時の efflux rate を細胞外 pH に対してプロットした。

2 YdgR タンパク質の基質認識機構の熱力学的解明²⁾

hPEPT1 における基質認識機構の解明を目的として、hPEPT1 モデル輸送担体である YdgR とジペプチドとの結合反応における熱力学的パラメータの算出および YdgR の結晶構造を用いたドッキングシミュレーションを行った。それにより基質認識の多様性メカニズムの一つとして基質結合における水和水のダイナミックな変化が明らかになった。

2.1 等温滴定型熱量計 (ITC) を用いた基質ジペプチド Val-Ala と YdgR との結合に伴う熱量変化の測定

pET システム (Novagen) を用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株に YdgR タンパク質を大量発現させた (~2 mg/L 培養液)。細胞膜画分を n-dodecyl-β-D-maltopyranoside で可溶化後、Ni アフィニティーカラムにより YdgR を精製し、等温滴定型熱量計 (ITC (MicroCal)) によりジペプチド結合に伴う熱量変化を測定した。図 3 に示すように、Val-Ala と YdgR との結合に伴う熱量変化は吸熱変化を示した。この基質結合に伴う結合熱量変化を one-site binding model にて解析を行い、結合定数 (K)、エンタルピー変化 (ΔH)、エントロピー変化 (ΔS) を算出した結果、 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ であったことからエントロピー駆動型の結合反応であることが示された。基質特異性の高い輸送担体における基質結合は主に水素結合やイオン結合が関与し、その結合熱量変化は発熱変化であることから、この点が YdgR の基質認識における多様性の機構の一つではないかと推察された。

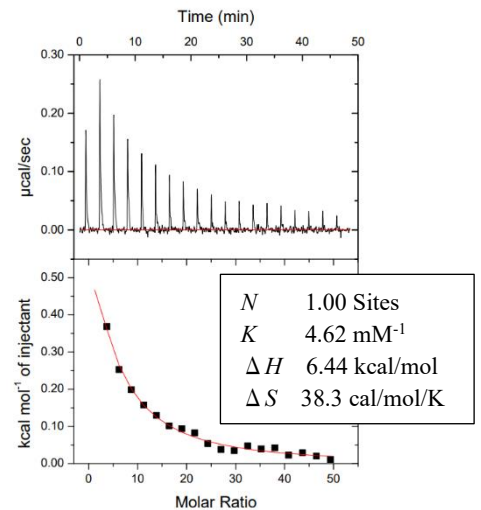


図 3 YdgR への Val-Ala 結合に伴う熱量変化と熱力学的パラメータ

2.2 基質結合に伴う YdgR の熱力学的変化

基質多様性の熱力学的機構を解明するために、様々な Val-Xxx、Xxx-Val ジペプチド (Xxx は Ala、Ser、Phe、Tyr、Val を示す) を用いて、YdgR との結合に伴う熱量変化を測定した。その結果、Phe-Val を除き、すべてのジペプチドが吸熱反応を示した。そのペプチドの配列の違いにより熱量変化の大きさは異なる

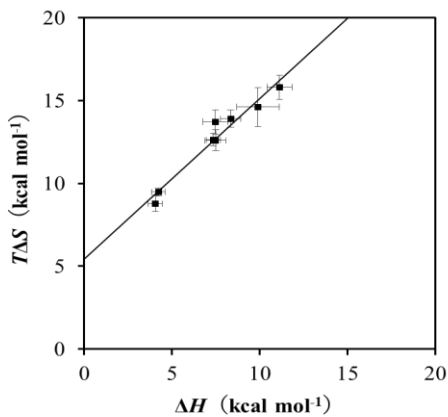


図 4 YdgR と Val-Xxx 及び Xxx-Val ジペプチドとの結合反応における ΔH と ΔS の相関

が、 ΔH 、 ΔS は共に正の値を示した。このことから、YdgR とジペプチドとの結合反応は、エントロピー駆動型の結合反応であることが考えられ、主に水和水の放出を伴う疎水性相互作用によって駆動することが推察された。また、 ΔH と ΔS との間には強い正の相関が見られ (図 4)、y 切片が示す脱溶媒和エントロピーは 5.44 kcal/mol と算出された。これらジペプチドの結合ギブズエネルギー変化 (ΔG) が $-4.7 \sim -6.3$ kcal/mol であることから、YdgR とジペプチドとの結合は大部分が脱溶媒和によるものであることが分かった。すなわち、この基質結合に伴う大きな正のエントロピーは、YdgR への基質結合の際の基質結合部位に存在する水和水の放出が大きく寄与すると考えられる。

2.3 YdgR の基質認識ポケットに存在する水和水の基質認識機構への関与

エントロピー駆動型基質認識における水和水の役割を解明するために、我々は YdgR の結晶構造を用いて基質結合型構造と基質結合部位における水分子配置をコンピューターシミュレーション (AutoDock4 and MOE (MOLSI)) により予測した。その結果、基質結合に伴い排除される水分子の存在、また、基質が多岐にわたる部位に結合する可能性があることが示唆された。基質結合部位に存在する水和水は、基質結合部位に柔軟性をもたらし、YdgR に多彩な基質を認識する能力を与えるアダプターとしての重要な役目を担い、また、排除される水分子は基質結合の駆動力として働いていることが推察される。

【結論と今後の展開】

輸送サイクルにおける重要な因子、pH 依存的活性化因子と基質認識における重要な物理化学的因子について検討を行った結果、以下のことが明らかとなった。

- hPEPT1 を介した基質の efflux は基質の化学ポテンシャルに従う促進拡散であり、その輸送活性は uptake と同様に細胞外 pH に依存した His57 残基側鎖の解離状態の変化によって制御されることが示唆された。この制御機構は輸送体の再配向速度に影響を及ぼしていることが推測されるが、今後周辺残基との相互作用の変化も含めその詳細を検討していく。
- 基質結合部位に水和した水分子の挙動が YdgR の基質認識に重要であり、特に基質結合の際の水分子の排除が多彩な基質の認識機構を持つ要因となっている可能性が考えられる。今後は pH を変化させた場合においても同様の検証を行っていく。

【対象論文】

- 1) Omori, A., Fujisawa, Y. Sasaki, S. Shimono, K., Kikukawa, T., Miyauchi, S. Protonation state of a histidine residue in human oligopeptide transporter 1 (hPEPT1) regulates hPEPT1-mediated efflux activity (submitted)
- 2) Omori, A., Fujisawa, Y. Sasaki, S. Kikukawa, T., Shimono, K., Miyauchi, S. The release of hydrated water from the substrate binding pocket might be involved in the versatile substrate recognitions by prokaryotic H⁺/oligopeptide co-transporter, YdgR. (in preparation)

学位論文審査報告書

報告書記載： 2021年 2月 15日

学位申請者名	大森 明子
論文題目	pH依存性オリゴペプチド輸送単体の基質輸送サイクルに重要な因子の同定
審査委員名	主査 伊関 峰生 副査 高橋 良哉 副査 田中 光
<p>学位論文の審査結果の要旨：</p> <p>ヒトオリゴペプチド輸送担体（hPEPT1）は小腸や腎臓、胆管の上皮細胞に発現し、タンパク質の消化によって生じるジペプチド等に加えて、βラクタム系抗生物質やベスタチン等の様々な薬物を輸送することが知られている。この多彩な基質認識と輸送のメカニズムについては未知の部分が多い。申請者は、本論文前半においてhPEPT1を大量発現する樹立細胞株を用いて基質の外向き輸送（efflux）のpH依存性を詳細に検討し、それがHenderson-Hasselbalchの式に適合すること、またそれはイオノフォアや脱共役剤の存在下でも変化しないこと、また基質による<i>trans</i>-stimulationがみとめられることから、effluxはhPEPT1による基質の化学ポテンシャルのみに依存した促進拡散であることを明らかにした。さらに、ジエチルピロカーボネートでヒスチジン残基を修飾することでeffluxが減弱し、その効果は基質共存下では見られないことから、特定のヒスチジン残基の解離状態の変化が輸送活性の調節に関与していることを明らかにした。論文後半においては、hPEPT1のモデル輸送担体として大腸菌YdgRについて基質との相互作用に伴う熱量変化を等温滴定熱量測定により検討し、これが吸熱過程であること、エンタルピー変化とエントロピー変化が共に正の値を示すことからエントロピー駆動の反応であることを明らかにした。さらに、脱溶媒和エントロピーが結合のギブズエネルギー変化に相当することから、水和した水分子の挙動の重要性が示唆され、ドッキングシミュレーションと水分子の確率密度分布計算により、基質結合の際の水分子の排除が多彩な基質認識の要因となっている可能性が高いことを示した。</p> <p>以上、本論文はオリゴペプチド輸送担体による基質の認識・輸送機構に関して多くの新知見をもたらすもので、学術的意義は極めて高い。また、研究の妥当性、倫理的配慮、論文の体系についても審査基準を満たすものである。審査委員による論文審査においては、申請者は自身の研究の意義・内容を丁寧に説明するとともに、各審査委員からの質問・指摘に対しても適確かつ真摯に対応していた。課程修了後も研究を継続する意向を示しており、薬学研究者としての向上心も十分と評価される。本論文に含まれる研究成果は2報の原著論文にまとめられ、うち1報は既に英文学術誌に受理されている。これらにより、本論文は申請者大森明子氏が博士（薬学）の学位を授与されるに値するものであると判断する。</p>	