

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 内容の要約. 18.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 伊関 峰生 / 東邦大学大学院薬学研究科学位規程第12第2項により要約公開
著者版フラグ	ETD
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/TD28193519

東邦大学審査学位論文（博士）要約

博士学位論文 要約

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 東邦大学大学院 薬学研究科

氏名 大森明子

第1章 序論

生体の恒常性維持に必須な栄養素の輸送担体は、小腸、肝臓、腎臓、血液脳関門、血液脳脊髄関門など広範な組織に発現している。小腸管腔側にはプロトンの電気化学ポテンシャル勾配を利用して様々な栄養物質の取り込みを担う輸送担体が存在し、これらの輸送担体は大きなプロトン駆動性ファミリーを構築している[1]。

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1つである[2]。その中でも、プロトン依存性オリゴペプチド輸送担体 (POT) はジペプチド、トリペプチドをプロトンの内向き電気化学ポテンシャルを駆動力として細胞内へ濃縮的に輸送し、生体内の窒素源維持に寄与することが知られている[2]。生体の小腸や腎臓、胆管の上皮細胞刷子縁膜に局在するオリゴペプチド輸送担体 PEPT1 (SLC15A1) は、本来の基質であるジ・トリペプチドに加えてペプチド類似構造を持つ薬物を輸送することが報告されており、抗ウイルス薬のバラシクロビルやバルガンシクロビルといった栄養物質と薬物の結合体を基質として認識できる寛容さを有する。このため PEPT1 はドラッグデリバリーシステムへの応用が期待されているが、基質認識・輸送機構の詳細が明らかとなっておらず開発にはさらなる研究が必要である。

POT は構造的に major facilitator superfamily に属し、2つの6ヘリックスバンドルからなる12回膜貫通ドメインを基本構造とする[3]。POT の輸送機構は alternating-access mechanism が考えられており[4]、その基質輸送サイクルは (1) 基質認識 → (2) 基質の分子内移動 → (3) 基質の放出 → (4) 基質輸送を伴わない輸送担体の再配向の4つの過

程からなると速度論的解析から推察されている。輸送サイクルをより詳細に解析することにより、基質輸送分子機構、駆動力となるプロトンの電気化学ポテンシャルの関与などが明らかになると考えられる[5]。また、PEPT1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[6, 7]。

そこで、本研究において、この基質輸送サイクルに重要な因子、pH依存性の輸送活性調節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。本研究では、まず、ヒトオリゴペプチド輸送担体(hPEPT1)の動物細胞発現系を用いた基質 efflux 輸送測定から、その輸送活性調節機構を明らかにした[8]。続いて、hPEPT1が属するPOTファミリーにおいて、hPEPT1との類似点が多く、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、YdgRをモデル輸送担体として用い[9, 10]、等温滴定量熱量測定(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。

第2章 実験材料および方法

2.1 CHO/hPEPT1を用いた基質輸送実験

hPEPT1安定大量発現CHO細胞(CHO/hPEPT1)を用いて、典型的な基質である、非代謝性ジペプチドGly-Sarのefflux過程のpH依存性の速度論的解析を行った[8]。

2.2 等温滴定量熱量計(ITC)を用いたジペプチドとYdgRタンパク質との結合実験および計算化学的手法によるYdgRにおける基質分子と水分子の配置予測

大腸菌を用いた、YdgRの大量発現系(pETシステムを利用した発現系)を構築し、精製YdgRタンパク質を得た。等温滴定量熱量計(ITC)を用いて、pH6、25°Cにおける基質との結合に伴う熱量変化を測定し、エンタルピー変化(ΔH)および結合定数(K_d)を算出した。

さらに、YdgR の結晶構造を用い、ドッキングシミュレーションによる基質結合部位の予測、統計力学的手法による 3D-RISM 理論に基づいた基質結合部位の水分子の配置予測を行った。

第 3 章 結果および考察

3.1 CHO/hPEPT1 を用いた pH 依存性輸送活性調節因子の解明

Gly-Sar の CHO/hPEPT1 からの efflux 過程は、hPEPT1 を介した輸送であり、hPEPT1 は細胞内から細胞外へ基質を放出 (efflux) することも可能な bi-directional な輸送担体であることが示された。また、CHO/hPEPT1 細胞からの efflux 輸送活性は細胞外 pH 依存性を示し、Henderson-Hasselbalch タイプの式 ($pK_a \sim 6.0$)により記述され、hPEPT1 に存在するアミノ酸残基のプロトンの解離・非解離により調節されていることが示唆された。更に、ヒスチジン修飾試薬 diethyl pyrocarbonate を用いた化学修飾によって、細胞外に位置するヒスチジン残基が深く関与することが示唆された。これにより、ある 1 つのヒスチジン残基は輸送サイクルの活性化状態と不活性化状態を決める pH sensor として機能していることが推察された[8]。

3.2 YdgR タンパク質の基質認識機構の熱力学的解明

ITC を用いて様々なジペプチドと YdgR との結合に伴う熱量を測定し、熱力学的な結合解析を行った。結果、YdgR とジペプチドとの結合熱量変化は吸熱変化であり、その結合反応はエントロピー駆動型であることが明らかとなった。ギブズ自由エネルギー変化 (ΔG) は ΔH の値によらず一定であったが、 ΔH とエントロピー変化 (ΔS) との間には正の相関がみられた。これらの熱力学的パラメータ間でみられた相関より、ジペプチド結合に伴う正のエントロピー変化は、YdgR への基質結合の際の基質結合部位に存在する水と水の放出が大きく寄与すると推察された。更に、他の研究グループから報告されている YdgR の結晶構造を用い、基質結合型構造と基質結合部位の水分子の配置予測、ジペプチドと YdgR とのドッキングシミュレーションを行った結果、基質結合に伴って

排除される水分子が存在することが示唆され、YdgR における水分子の移動が、オリゴペプチドの基質結合の駆動力に関与する可能性が推察された。更に、推定された基質結合部位の水分子の配置により、水分子が YdgR の基質認識の多様性に関与する可能性も示唆された。これらのことから基質結合部位に存在する水和水は、YdgR の多彩な基質認識を可能にする物理化学的因子であることが示唆された。

第4章 総括

本研究では、POT ファミリーに属する輸送担体の基質輸送機構と基質認識機構の両者において重要な因子を同定した。

hPEPT1 を介した基質輸送活性は、細胞外 pH に大きく依存していることが明らかとなった。細胞内から細胞外への基質の efflux 過程の速度論的解析により、ある細胞外アミノ酸残基（輸送活性中心の His57 と推定）のイミダゾール基の解離状態によって制御されることが示唆された。

続いて、POT ファミリーに属する大腸菌由来の YdgR タンパク質の基質結合に伴う熱量変化を解析することにより、基質結合の駆動力として、結合部位に水和した水分子の挙動が深く関与すること、また、POT 輸送担体の多様な基質認識機構に基質結合部位における水和水が関与することが明らかになった。

参考文献

1. Thwaites, D. T. and Anderson, C. M. H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp Physiol.*, **92**, 603-19 (2007).
2. Daniel, H., Spanier, B., Kottra, G. and Weitz, D. From bacteria to man: archaic proton-dependent peptide transporters at work. *Physiology (Bethesda)*, **21**, 93-102 (2006).
3. Yan, N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem Sci.*, **38**, 151-9 (2013).
4. Newstead, S. Molecular insights into proton coupled peptide transport in the PTR family of oligopeptide transporters. *Biochim Biophys Acta.*, **1850**, 488-99 (2015).
5. Parker, J. L., Li, C., Brinth, A., Wang, Z., Vogeley, L., Solcan, N. Ledderboge-Vucinic, G., Swanson, J. M. J., Caffrey, M., Voth, G. A. and Newstead, S. Proton movement and coupling in the POT family of peptide transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **114**, 13182-13187 (2017).

6. Colas, C., Masuda, M., Sugio, K., Miyauchi, S., Hu, Y., Smith, D. E. and Schlessinger, A. Chemical Modulation of the Human Oligopeptide Transporter 1, hPepT1. *Mol Pharm.*, **14**, 4685-4693 (2017).
7. Minhas, G. S. and Newstead, S. Structural basis for prodrug recognition by the SLC15 family of proton-coupled peptide transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **116**, 804-809 (2019).
8. Omori, A., Fujisawa, Y., Sasaki, S., Shimono, K., Kikukawa, T. and Miyauchi, S. Protonation State of a Histidine Residue in Human Oligopeptide Transporter 1 (hPEPT1) Regulates hPEPT1-Mediated Efflux Activity. *Biol Pharm Bull.*, **44**, 678-685 (2021).
9. Weitz, D., Harder, D., Casagrande, F., Fotiadis, D., Obrdlik, P., Kelety, B. and Daniel, H. Functional and structural characterization of a prokaryotic peptide transporter with features similar to mammalian PEPT1. *J Biol Chem.*, **282**, 2832-9 (2007).
10. Ural-Blimke, Y., Flayhan, A., Strauss, J., Rantos, V., Bartels, K., Nielsen, R., Pardon, E., Steyaert, J., Kosinski, J., Quistgaard, E. M. and Low, C. Structure of Prototypic Peptide Transporter DtpA from *E. coli* in Complex with Valganciclovir Provides Insights into Drug Binding of Human PepT1. *J Am Chem Soc.*, **141**, 2404-2412 (2019).