HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	モノカルボン酸輸送担体の分子機能に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	佐々木, 将太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第12282号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62167
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shotaro_Sasaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（臨床薬学）　氏　名　　佐 々 木　　将 太 郎

学 位 論 文 題 名

モノカルボン酸輸送担体の分子機能に関する研究

当研究室ではこれまで、恒常性の維持に関わる能動輸送系に関心を寄せ、モノカルボン酸輸送担体 (MCT) に注目し、研究を進めてきた。MCT は現在、がん治療のターゲットとしての応用や認知症との関連について精力的な解析がなされており、今日の医療現場で使用されているエゼチミブやカナグリフロジンといった輸送担体を標的とした医薬品に続く、新たな標的分子として期待されている。MCT に関する情報の蓄積は近年加速度的に進んでいるものの、分子レベルにおける MCT の機能、特に isoform 間の機能の同異や基質輸送機構に関する情報の蓄積は不充分であり、MCT 生理機能を利用した医薬品開発には更なる研究が必要である。

MCT が認知機能に関与していることから、本研究では、近年その生理的役割が注目されているグリア細胞における MCT の基質分子の同定、輸送機構の解明、各 isoform の寄与を明らかにすることを目的とした。測定系にはヒト由来培養細胞及び異種発現系を用いた。筆者はまず、*Xenopus laevis* oocyte 発現系を用いて hMCT4 の構造・機能に関する分子的解析を行った。さらに、hMCT1 の新規基質分子を同定し、輸送特性について精査した。

1. hMCT4 の基質輸送機構の解析

hMCT4 は 465 アミノ酸からなる膜蛋白質であり、12 回膜貫通型蛋白質であると推定されている。本研究では、*Xenopus laevis* oocyte 発現に適した cRNA を合成できる pGH19 vector に hMCT4 の ORF を組み込み、pGH19/hMCT4 を構築した。

まず、cRNA をインジェクションした oocyte に hMCT4 が発現し、正常に機能していることを検証した。hMCT4 cRNA をインジェクションした oocyte の乳酸取り込み量は、H_2O をインジェクションした oocyte に比べ、顕著に高く、正常な機能を保持していることが明らかとなった。

次に、hMCT4 の基質輸送機構について検証するため、乳酸輸送活性に対する各種修飾試薬の影響を評価したところ、His 及び Arg が機能性残基であることが示唆された。更に、修飾時乳酸共存条件下や細胞外 pH 依存性の解析により、Arg 残基は乳酸認識部位として、His 残基は細胞外 pH センサーとして働いていることが示唆された。

続いて、Site-Directed Mutagenesis により変異体を作製し、乳酸認識及び細胞外 pH 依存性に関わっているアミノ酸残基の特定を試みた。hMCT4 は複数の Arg・His 残基を有しているものの、アミノ酸修飾試薬の効果から、乳酸認識部位として機能している Arg 残基候補としては 2 残基、細胞外 pH センサーとして機能している His 残基候補としては 1 残基が推定された。そこで本検討では、hMCT4 R198Q, R278Q, R278K, H382A 変異体を作製し、乳酸輸送活性を測定することにより、各々のアミノ酸残基の役割を検証した。なお、比較対象として hMCT4 WT の乳酸輸送活

性も併せて評価した。検証の結果、hMCT4 R198Q は hMCT4 WT と同様の乳酸輸送能を示したものの、hMCT4 R278Q 及び hMCT4 R278K の輸送活性は完全に消失していた。このことから、Arg278 は、hMCT4 の輸送機構において、乳酸の認識部位として機能することが示された。また、hMCT4 H382A は hMCT4 WT に比べ、輸送活性は減少していたものの、完全には消失していなかった。一方で、hMCT4 H382A の輸送活性には細胞外 pH 依存性が認められなかった。以上のことから、His382 は、hMCT4 の輸送機構において、細胞外 pH センサーとして機能することが示唆された。

2. hMCT1 の新規基質分子の同定と輸送特性

グリア細胞の多くを占めるアストロサイトにおいて、乳酸の膜透過を担っている輸送担体は MCT4 であると考えられている。従って、同じくアストロサイトに発現している MCT1 は、乳酸輸送とは異なる役割を担っていると推察される。本検討では、先の検証と同様に、pGH19/hMCT1 を構築し、*Xenopus laevis* oocyte 発現系を用いて、hMCT1 の新規基質分子の同定を試みた。

その結果、認知機能との関連が報告されている生体内物質の内、プロチレリンをはじめとする種々のペプチドの代謝産物である 5－オキソプロリンが、hMCT1 の良好なプローブ基質であることが示唆された。次に、輸送特性の解析により、hMCT1 は内向きプロトン勾配を駆動力として利用する二次性能動輸送担体であることが確認された。加えて、hMCT1 の 5－オキソプロリン輸送活性は膜電位の影響を受けず、H^+ と 5－オキソプロリンを化学量論比 1 ： 1 で細胞内に共輸送する electroneutral な輸送担体であることが示された。

以上の結果から、hMCT1 はアミノ酸の一種である 5－オキソプロリンを基質として認識していることが明らかとなった。しかしながら、生理的環境下では、5－オキソプロリンの細胞膜透過に対して、アミノ酸輸送担体が関与している可能性がある。hMCT1 による 5－オキソプロリン輸送の意義を考察する上で、細胞レベルにおける hMCT1 の寄与を明らかにする必要があると考えられる。

そこで、細胞レベルにおいても 5－オキソプロリンが hMCT1 を介して細胞内に取り込まれているのか否かを、T98G 細胞を用いて検証した。その結果、5－オキソプロリンは Na^+ 非依存的な H^+ 共輸送担体のみを介して細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。この輸送特性は hMCT1 と一致していた。一方、hMCT1 と同様にアストロサイトに発現している hMCT4 については、*Xenopus laevis* oocyte 発現系を用いて解析を試みたものの、5－オキソプロリン輸送活性は認められなかった。以上のことから、5－オキソプロリンの膜透過において、hMCT1 が主要な役割を担っていることが立証された。

本研究の遂行により、*Xenopus laevis* oocyte を用いた実験系を構築し、MCT の機能を分子レベルで検証することに成功した。また、グリア細胞に発現している hMCT1・hMCT4 の機能的同異を明らかにした。本研究の成果から、アミノ酸の一種である 5－オキソプロリンを hMCT1 の新規基質分子として同定した。