



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Human monocarboxylate transporter 1, 4 (hMCT1, 4) の基質選択性の違いを決定する分子メカニズムに関する研究
Author(s)	二木, 悠哉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13970号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13970
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77835
Type	doctoral thesis
File Information	Yuya_FUTAGI.pdf



博士学位論文

**Human monocarboxylate transporter 1, 4 (hMCT1, 4) の
基質選択性の違いを決定する分子メカニズムに関する研究**

**Molecular determinants of substrate selectivity in human
monocarboxylate transporters 1 (hMCT1) and 4 (hMCT4)**

二木 悠哉

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

臨床薬剤学研究室

2020 年 3 月

目次

目次	1
略語／略号表	4
序文	5
第 1 章 hMCT1, 4 の基質選択性に関わるリガンド構造の同定	7
1.1 緒言	7
1.2 実験材料および方法	8
1.2.1 実験動物	8
1.2.2 試薬	8
1.2.3 プラスミド	8
1.2.4 大腸菌の培養とプラスミド抽出	9
1.2.5 cRNA の調製	9
1.2.6 アフリカツメガエル卵母細胞 (oocytes) の調製	9
1.2.7 Oocytes への遺伝子導入	10
1.2.8 基質輸送実験	10
1.2.9 数値解析	10
1.3 結果	12
1.3.1 単純な構造のモノカルボン酸およびその生物学的等価体が hMCT1, 4 介在性 L-乳酸輸送に与える影響	12
1.3.2 モノカルボン酸構造を有する医薬品が hMCT1, 4 介在性 L-乳酸輸送に与える 影響	15
1.3.3 Repaglinide および bindarit の hMCT1, 4 阻害特性	17
1.4 考察	18
第 2 章 hMCT1, 4 の基質選択性に関わるアミノ酸残基の同定	20
2.1 緒言	20
2.2 実験材料および方法	22
2.2.1 実験動物	22
2.2.2 試薬	22
2.2.3 プラスミド	22

2.2.4	部位特異的変異導入	22
2.2.5	大腸菌の培養とプラスミド抽出.....	25
2.2.6	cRNA の調製	25
2.2.7	アフリカツメガエル卵母細胞 (oocytes) の調製.....	25
2.2.8	Oocytes への遺伝子導入	25
2.2.9	免疫組織化学染色	25
2.2.10	基質輸送実験	25
2.2.11	シーケンスアラインメント.....	25
2.2.12	ホモロジーモデリングとドメイン解析.....	26
2.2.13	ドッキングシミュレーション.....	27
2.2.14	数値解析	28
2.3	結果	29
2.3.1	hMCT1, 4 のホモロジーモデリングおよび基質輸送経路の推定	29
2.3.2	hMCT1, 4 単一変異体の基質輸送能.....	32
2.3.3	hMCT1, 4 多重変異体の基質輸送能.....	36
2.3.4	hMCT1, 4 変異体を介した L-乳酸輸送の速度論解析	38
2.3.5	hMCT1 の 69 番目および 367 番目のアミノ酸残基が基質選択に果たす役割	41
2.3.6	hMCT1 変異体リガンドの構造親和性相関	44
2.4	考察	46
第 3 章	hMCT2 の基質認識性の解析.....	49
3.1	緒言	49
3.2	実験材料および方法	50
3.2.1	実験動物	50
3.2.2	試薬	50
3.2.3	プラスミド	50
3.2.4	大腸菌の培養とプラスミド抽出.....	50
3.2.5	cRNA の調製	51
3.2.6	アフリカツメガエル卵母細胞 (oocytes) の調製.....	51
3.2.7	Oocytes への遺伝子導入	51
3.2.8	基質輸送実験	51
3.2.9	シーケンスアラインメント、分子系統樹の作製.....	51
3.2.10	ホモロジーモデリング.....	51

3.2.11 数値解析.....	52
3.3 結果.....	53
3.3.1 hMCT2 のホモロジーモデリング.....	53
3.3.2 hMCT2 の基質認識性.....	56
3.4 考察.....	57
総括.....	59
論文目録.....	60
引用文献.....	62
謝辞.....	72

略語／略号表

SSRI	selective serotonin reuptake inhibitors
SGLT2	sodium glucose cotransporter 2
hMCTs	human monocarboxylate transporters
CHC	α -cyano-4-hydroxycinnamate
DIDS	4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonate
TM6/7loop	第 3 細胞内ループ
L-OPro	L-5-oxoproline
SLC	solute carrier
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
K_i	阻害定数
S.E.	standard error
CPC	cyclopentanecarboxylate
D-THFC	(S)-tetrahydrofuran-2-carboxylate
L-THFC	(R)-tetrahydrofuran-2-carboxylate
OCPC	3-oxocyclopentanecarboxylate
D-OTHFC	(R)-5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylate
L-OTHFC	(S)-5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylate
3-PC	3-pyrrolicarboxylate
5-ETZ	5-ethyltetrazole
BIC	1-benzyl-1H-indazole-3-carboxylic acid
HOCPA	3-hydroxycyclopent-1-enecarboxylic acid
pK_a	酸解離定数
TM	transmembrane domain
MCP1	monocyte chemoattractant protein 1
MFS	major facilitator superfamily
TM4/5loop	第 2 細胞内ループ
HMM	hidden Markov model
CL	初期取り込みクリアランス
$V_{\max}$	最大輸送速度
K_m	ミカエリス定数
k_{cat}	輸送サイクル
WT	wild type
L-OCPC	(R)-3-oxocyclopentanecarboxylate

序文

細胞膜は細胞内部と外部環境とを隔てるオルガネラであり、グリセロリン脂質を主成分とするリン脂質二重膜からなる。細胞を取り巻く外部環境は、特殊な例を除いて親水性の液体によって占められており、細胞内外を隔てる障壁として両親媒性のリン脂質が選択されたのは細胞にとって合理的な選択であったといえる。仮に、個々の細胞が細胞膜によって外部環境から完全に隔絶されていた場合、初めに内包された物質を使い果たした時点でエネルギー代謝をはじめとする生化学反応は停止してしまうことになる。しかしながら、細胞膜は自己と非自己とを区別しつつも外部環境から栄養素を取り入れ、老廃物を排出する機能を有しており、そのような生命システムの破綻を未然に防いでいる。

細胞膜を介した外部環境からの物質の取り込みは膜輸送を担うタンパク質であるトランスポーターを介する担体介在型輸送と、これを介さない担体非介在性輸送に分類することができる。担体非介在性輸送には、酸素や二酸化炭素、炭化水素等の電荷を持たない低分子が化学ポテンシャルにしたがって細胞膜を通過する単純拡散と、細胞膜の形態変化を伴いながらタンパク質や多糖類などの高分子を取り込む膜動輸送がある。しかしながら、これらの担体非介在性輸送では生命システムの維持に必須な糖やアミノ酸等の極性分子を効率よく細胞内へ取り込むことは困難である。その一方で、担体介在型輸送は遥かに高い基質特異性を示す輸送形態であり、たとえ極性の高い分子であったとしても細胞膜を貫通したトランスポーター内部を通過することによって容易に細胞内部へと到達することが可能となる。

このように、細胞は生命活動に必須な化合物を効率良く細胞内へと取り入れ、不要な化合物を積極的に排泄するため、種々のトランスポーターを細胞膜上へ発現させている。トランスポーターによる基質輸送は個々の細胞だけでなく、細胞間での栄養物質の授受にも大きく寄与しており、生体内を循環する物質の動態を規定する重要な因子となっている。そのため、トランスポーターを標的とした医薬品がこれまでに数多く上市されており、抗うつ薬の Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) や糖尿病治療薬の Sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬はその代表的な例である [1-3]。さらに近年は、抗がん剤の標的分子としてもトランスポーターが注目されており、その例として human monocarboxylate transporter 1, 4 (hMCT1, 4/SLC16A1, 3) が挙げられる。

hMCT ファミリーには 14 種のアイソフォームが属しており、いずれも推定 12 回膜貫通型の膜タンパク質である [4]。その中でも hMCT1-4 の一群は L-乳酸やピルビン酸といった低分子モノカルボン酸を pH 依存的に輸送することが知られ、エネルギー代謝の盛んな脳や肝臓、筋肉等の組織において効率的な輸送を担っている [5-8]。また、がん細胞に発現する hMCT1, 4 はがん細胞内の pH 制御や、エネルギー代謝産物であると共にエネルギー源としての役割も有する L-乳酸のがん細胞間での授受に関与し、がんの進行・転移に寄与している [9-11]。さらに、hMCT1, 4 の発現が種々のがんの予後不良因子となることも明らかとな

っている [12–21]。したがって、hMCT1, 4 の阻害剤は、抗がん剤としての機能を有する可能性がある。MCT1, 4 を介した L-乳酸排泄阻害に基づく抗がん剤の創製研究は、MCT1, 4 の薬理学的阻害ならびに遺伝子ノックダウンによって遂行されてきた。MCT1, 4 研究の黎明期に報告された、 α -cyano-4-hydroxycinnamate (CHC) や 4,4'-diisothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonate (DIDS) 等の低分子化合物は MCT1, 4 阻害剤としての機能を有している [22–24]。特に、CHC は *in vivo* における毒性の低い阻害剤として複数の研究グループによって使用された実績があり、MCTs 阻害に基づく有望な抗がん剤となり得ることが示されていた [11, 25]。しかしながら、これらの第 1 世代 MCT1, 4 阻害剤はその標的特異性が低く、*in vivo* 実験で得られたデータが MCT1, 4 を阻害した結果を反映しているかについては議論の余地があった。最近、アストラゼネカは新しいクラスの極めて標的特異的かつ強力な MCT1/2 阻害剤 AR-C155858 ($K_i < 30$ nM) を創製した [26]。AR-C155858 は H-Ras 遺伝子導入線維芽細胞株 (CCL39) に対し著しい増殖阻害作用を示したほか [27]、バーキットリンパ腫細胞株ならびに乳がん細胞株において、細胞内 L-乳酸の蓄積に伴い細胞増殖、解糖系代謝およびグルタチオン合成を抑制した [28]。同じく、第 2 世代 MCT1, 2 阻害剤である AZD3965 ($K_i < 20$ nM [29]) についても、小細胞肺癌細胞株 [30]、バーキットリンパ腫細胞株 [29, 31] および慢性大細胞型 B 細胞リンパ腫細胞株 [29, 31, 32] に対する増殖抑制作用が報告されている。AZD3965 については、固形腫瘍、バーキットリンパ腫および慢性大細胞型 B 細胞リンパ腫の患者を対象とする第 I 相試験も進行中である (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01791595)。

前述の通り hMCT1, 2 選択的な阻害剤が次々と創製されてきた一方で、hMCT4 選択的な阻害剤は今日に至るまで同定されていなかった。hMCT4 選択的な阻害剤の創製を困難にしている要因のひとつとして、hMCT4 の基質に対する親和性の低さが挙げられる [23, 24]。さらに、hMCT4 選択的な基質も未だ見出されていない。その一方で hMCT1 は hMCT4 と比較して高親和性かつブロードな基質選択性を示し、特に、L-5-oxoproline (L-OPro) が hMCT1 選択的に輸送されることを筆者らの先行研究において明らかとしている [33]。筆者はこの hMCT1, 4 の基質親和性・選択性の違いを決定する部位の同定を行うため、hMCT1, 4 の構造と機能に関する検証を行ってきた。特に、第 3 細胞内ループ (TM6/7loop) が hMCT1, 4 の親和性を調節する部位として機能することを見出している [34]。その一方で、TM6/7loop は基質選択性には関与しなかったため、他の部位が hMCT1, 4 の基質選択性を決定づけているものと考えられていた。そこで本研究では hMCT1, 4 の基質選択性の違いを決定する分子メカニズムを解明することを目的とした。

第 1 章 hMCT1, 4 の基質選択性に関わるリガンド構造の同定

1.1 緒言

hMCTs は溶質輸送担体ファミリー16A (solute carrier family 16A; SLC16A) に属する膜タンパク質であり、生体膜を隔てた種々のモノカルボン酸輸送に関わっている [35]。hMCTs のうち、hMCT1 および hMCT4 は腫瘍組織に高発現し、エネルギー代謝産物である L-乳酸やピルビン酸の輸送を介在する [11, 36–38]。近年の研究により、腫瘍組織の微小環境における酸素分圧が正常組織よりも低いことが明らかとなってきた [39]。低酸素環境に順応するため、腫瘍組織では種々のタンパク質の発現が誘導される。たとえば、低酸素誘導因子 1 (hypoxia-inducible factor 1) は種々の解糖系酵素の発現を誘導することで、グルコース由来のアセチル CoA がクエン酸回路へ流入するのを抑制する一方、ピルビン酸由来の L-乳酸の産生を促進する。さらに、解糖系の亢進はがん細胞において hMCT4 の発現を誘導する [40, 41]。hMCT4 はがん細胞内の pH 制御に働くほか、エネルギー代謝産物であると共にエネルギー源としての役割も有する L-乳酸のがん細胞間での授受に関与し、がんの進行および転移に寄与している [9, 10]。したがって、hMCT4 の阻害剤は抗がん剤としての機能を有すると考えられる。

これまでの研究で、CHC や DIDS が哺乳類 MCT1, 4 の非選択的な阻害剤として用いられてきた [22–24]。最近 Nancolas らによって報告された抗悪性腫瘍薬である lonidamine は CHC や DIDS と比較して強力な MCTs 阻害効果を有している ($K_{0.5} \approx 40 \mu\text{M}$) もの、その効果は CHC や DIDS と同じくアイソフォーム非選択的であった [42]。したがって、これらの化合物群は生細胞における hMCT1, 4 の機能を区別するための薬理学的ツールとして適していない。また、序文で述べた AR-C155858 や AZD3965 といった化合物のほか、プテリジン誘導体やクマリン誘導体が哺乳類 MCT1 選択的阻害剤として創製されているものの [43, 44]、今日に至るまで hMCT4 選択的な阻害剤は同定されていなかった。

そこで本章では、hMCT1, 4 とその基質類縁体との構造活性相関を明らかにし、強力な hMCT4 選択的非競合阻害剤である bindarit (2-[(1-benzyl-1H-indazol-3-yl)methoxy]-2-methylpropionic acid) を同定した。

1.2 実験材料および方法

1.2.1 実験動物

雌性アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*; 体長 10 cm 以上) はホクドー (札幌、北海道、日本) から購入した。アフリカツメガエルは水温 18 °C の水槽内で飼育し、明暗サイクルは 12 時間 (午前 8:00 点灯、午後 8:00 消灯) に設定した。週に一度、固形試料 (ホクドー、札幌、北海道、日本) を与え自由摂食させた。すべての実験は、北海道大学の定める「動物実験に関する規程」および関係法を遵守して行った。

1.2.2 試薬

Sodium L-[¹⁴C]lactate は PerkinElmer (Waltham, MA, USA) から購入した。Propionic acid, L-alanine, benzoic acid, tetrahydrofuran-2,4-dione (tetronic acid) は富士フイルム和光純薬 (大阪、日本) から購入した。Sodium D-lactate, sodium L-lactate, sodium pyruvate, sodium oxamate, bezafibrate は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。L-Proline は Peptide Institute (大阪、日本) から購入した。5-Ethyl-1H-1,2,3,4-tetrazole は Chem-Impex International (Wood Dale, IL, USA) から購入した。Nateglinide はナカライテスク (京都、日本) から購入した。Mitiglinide calcium は LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA) から購入した。1-Benzyl-1H-indazole-3-carboxylic acid は Fluorochem (Hadfield, Derbyshire, UK) から購入した。Bindarit は Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。オリゴ DNA は Eurofins Genomics (東京、日本) に合成と精製を依頼した。その他の被験化合物は東京化成工業 (東京、日本) から購入した。その他の試薬は特に断らない限り特級もしくは生化学用、分子生物学用のものを用いた。

1.2.3 プラスミド

hMCT1 発現プラスミド (pGH19-hMCT1) については、まず、ダナフォーム (横浜、神奈川県、日本) から購入した hMCT1 cDNA の組み込まれたプラスミド (pBluescriptR-hMCT1, Clone ID: 4811581) より hMCT1 に相当するおよそ 1.5 kb の断片を、BamHI, XbaI サイトが付加されたプライマー (**Table 1-1**) を用いて PCR 法により増幅した。このとき DNA ポリメラーゼとして PfuUltra High-fidelity DNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使い、PCR の条件は付属のプロトコルにしたがって行った。得られた PCR 産物を BamHI, XbaI で処理し、アガロースゲル電気泳動で分離したのち、hMCT1 cDNA 断片の含まれるバンドを切り出した。切り出したゲルから cDNA 断片を FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス、東京、日本) を用いて抽出、精製したあと、Yale 大学 Peter S. Aronson 博

士より供与されたアフリカツメガエル卵母細胞発現ベクター (pGH19 ベクター) に組み込んだ。組み込んだ配列が、過去に報告されている hMCT1 の塩基配列 (GenBank accession number: BC026317) と一致することをシーケンスプライマー (Table 1-1) を用いてシーケンス解析により確認した。なお、シーケンス解析は、北海道システム・サイエンス (札幌、北海道、日本) に依頼した。また、hMCT4 発現プラスミドについては過去に同様の手順で作製したものを利用した [24]。

Table 1-1. Sequences of used primers.

Primer	Sequence (5'-3')	Purpose
Forward: hMCT1-BamHI	AAATAGATGTGGATCCATGCCACCAGCAGTTG	Gene cloning
Reverse: hMCT1-XbaI	GAAGTCGGGGTCTAGATCAGACTGGACTTTC	Gene cloning
MCT1-S1	ATTCCATGCCACCACCAG	DNA sequencing
MCT1-S2	CAACCAAGGCAGGGAAAG	DNA sequencing
MCT1-S3	GGTGGCTCAGCTCCGTATT	DNA sequencing
MCT1-S4	GTTGAAGGCAAGCCCAAG	DNA sequencing

1.2.4 大腸菌の培養とプラスミド抽出

hMCTs 発現プラスミドの作製に使用した大腸菌 DH5 α 株は、LB 培地を用い 37 °C で振盪培養した。また、選択圧としてアンピシリンを終濃度 100 μ g/mL で使用した。大腸菌からのプラスミド抽出には High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用い、付属のプロトコルにしたがって行った。

1.2.5 cRNA の調製

hMCTs 発現プラスミドを XhoI により処理することでリニアライズし、エタノールにより精製したものをテンプレートとして cRNA を作製した。cRNA の作製は AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker Kit (CELLSCRIPT, Madison, WI, USA) を用い、付属のプロトコルにしたがって行った。作製した cRNA はイソプロパノールにより精製した後 H₂O に溶解し、-80 °C で保存した。

1.2.6 アフリカツメガエル卵母細胞 (oocytes) の調製

アフリカツメガエルを麻酔液 (0.1% ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, 0.3% KHCO₃) に浸し 30 min 程度静置した。麻酔の導入を確認したのち、腹部を 1 cm 程度切開し適量の卵巣を摘出した。卵巣は Barth's buffer (88 mM NaCl, 2.4 mM NaHCO₃, 1 mM KCl, 0.41 mM CaCl₂, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.82 mM MgSO₄, 10 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesul-

fonic acid [HEPES], gentamycin sulfate 50 mg/L, pH 7.5)を浸したシャーレに移し、適当な大きさに細切した。得られた oocytes は OR2 buffer (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5) で洗浄したのち、1 mg/mL コラゲナーゼ OR2 buffer 溶液中、17 °C で 30 min 処理した。Stage V–VI の oocytes を選別したのち、その濾胞細胞を defolliculation buffer (110 mM NaCl, 1 mM EDTA·2Na, 10 mM HEPES, pH 7.6) 中で除去し、Barth's buffer 中 17 °C の条件下、一晚インキュベートした。

1.2.7 Oocytes への遺伝子導入

Oocyte 調製の翌日、65 °C で 5 min 熱変性させた cRNA を氷上で急冷し遺伝子導入に供した。Positive displacement digital microdispenser (10 µl; Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) にプーラー (PC-10; ナリシゲ、東京、日本) で先端を引き伸ばし細くしたガラス管 (10 µl; Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) を装着し、マイクロマニピュレーター (MN-153; ナリシゲ、東京、日本) に取り付けた。メッシュを敷いたシャーレに Barth's buffer を満たし、cRNA を 50 nL ずつ oocytes に注入した。得られた oocytes を Barth's buffer 中 17 °C において、3–4 日インキュベートしたのち、実験に供した。

1.2.8 基質輸送実験

Oocytes は hMCTs cRNA のインジェクション後 3 日経過したものを用いた。24 well plate (Corning, Corning, NY, USA) に 3–5 oocytes/well となるように oocytes を用意し、Barth's buffer を除去後、pH 7.4 Standard buffer (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES) で 1 回洗浄した。Standard buffer を除去後、基質を一定量添加した pH 5.5 Standard buffer (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid [MES]) を各ウェルに 250 µL ずつ加え 25 °C でインキュベートした。一定時間経過後、基質溶液を除去し、氷冷した pH 7.4 Standard buffer で 5 回洗浄し、oocytes をシンチレーションバイアルに取り分けた。続いて、細胞溶解液 (10% sodium dodecyl sulfate) を 250 µL 加え oocytes を可溶化した。その後、各バイアルに液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を 3 mL 加え、液体シンチレーションカウンター LS6500 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) もしくは LSC-5100 (日立製作所、東京、日本) で各サンプルの放射活性を測定し、基質の細胞内取り込み量を算出した。

1.2.9 数値解析

分子化合物の pK_a 予測には MarvinSketch 17.24.0 (ChemAxon, Budapest, Hungary) の Calculator Pugins を用いた。速度論解析には SigmaPlot 13 (Systat Software, San Jose, CA, USA)

を用いた。阻害定数 (K_i) は、基質輸送の測定データを以下に示す関数に非線形カーブフィッティングすることによって算出した。

$$R = \frac{\text{Max} \times K_i}{K_i + [I]}$$

[R: 基質輸送活性比 (阻害剤あり／なし), Max: 最大基質輸送活性, [I]: 阻害剤濃度]

統計解析には SigmaPlot 14 (Systat Software, San Jose, CA, USA) を用いた。2 群間における有意差の検定には unpaired t-test を用い、多群間における有意差の検定には分散分析を行った上で Holm–Sidak 法を用いた。いずれの場合も $p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した。実験結果は、全て平均 $\pm$ 標準誤差 (standard error [S.E.])で示した。

1.3 結果

1.3.1 単純な構造のモノカルボン酸およびその生物学的等価体が hMCT1, 4 介在性 L-乳酸輸送に与える影響

hMCT4 に対して選択的な阻害効果を有する化合物を探索するため、比較的単純な構造を有する種々のモノカルボン酸およびその生物学的等価体の hMCT1, 4 介在性 L-乳酸輸送に対する阻害効果について検証した (Fig. 1-1a-f)。

hMCT1, 4 の典型的な基質である L-乳酸はプロピオン酸をその母核構造として含み、なおかつ α 位にヒドロキシ基を有する化合物である。そこでまず、異なる α 位官能基を有するプロピオン酸誘導体の hMCT1, 4 に対する阻害効果について検証を行った (Fig. 1-1a)。プロピオン酸、イソ酪酸および L-乳酸は hMCT1, 4 両方の輸送活性を強力に阻害したので、これらの化合物の分子サイズが hMCT1, 4 の基質輸送経路において許容されることが示唆された。その一方で、D-アラニンおよび L-アラニンは hMCT1, 4 に対する阻害能を有していなかったことから、 α 位にカチオン性の官能基を有する化合物は hMCT1, 4 によって認識されないことが示唆された。また、D-乳酸の hMCT4 に対する阻害効果は hMCT1 と比較して顕著に減弱した。イソ酪酸が hMCT4 によって認識されていたことを考慮すると、D-乳酸の hMCT4 による認識性の低下は、少なくともヒドロキシ基のかさ高さに起因するものではないと考えられる。

Fig. 1-1a で用いたプロピオン酸誘導体はその立体構造の自由度が高いため、それらの構造を基に hMCT1, 4 との相互作用に必要な分子配座を推定するのは困難である。そこで、剛直な骨格を有する cyclopentanecarboxylate (CPC) とその生物学的等価体を用いて hMCT1, 4 に対する阻害効果を検証した (Fig. 1-1b)。その結果、CPC は hMCT1, 4 両方の輸送活性を強力に阻害したため、この化合物の分子サイズが hMCT1, 4 の基質輸送経路において許容されることが示唆された。その一方で、D-プロリンおよび L-プロリンの hMCT1, 4 に対する阻害効果は認められなかった。この結果は、D-アラニンや L-アラニンを用いた阻害実験で得られた結果と同様であり (Fig. 1-1a)、 α 位官能基のカチオン性の有無が hMCT1, 4 によるリガンド認識に重要な役割を果たすことが示された。さらに、(S)-tetrahydrofuran-2-carboxylate (D-THFC) および (R)-tetrahydrofuran-2-carboxylate (L-THFC) の hMCT4 に対する阻害効果は hMCT1 と比較して減弱した。この結果と、D-乳酸の hMCT4 阻害効果が hMCT1 と比して弱かった事実とを併せて考えると (Fig. 1-1a)、hMCT4 のリガンド認識には、リガンド分子の β 位酸素原子の非共有電子対の配向もしくは β 位酸素原子に結合した δ^+ 性水素原子の配向が重要であることが示唆された。

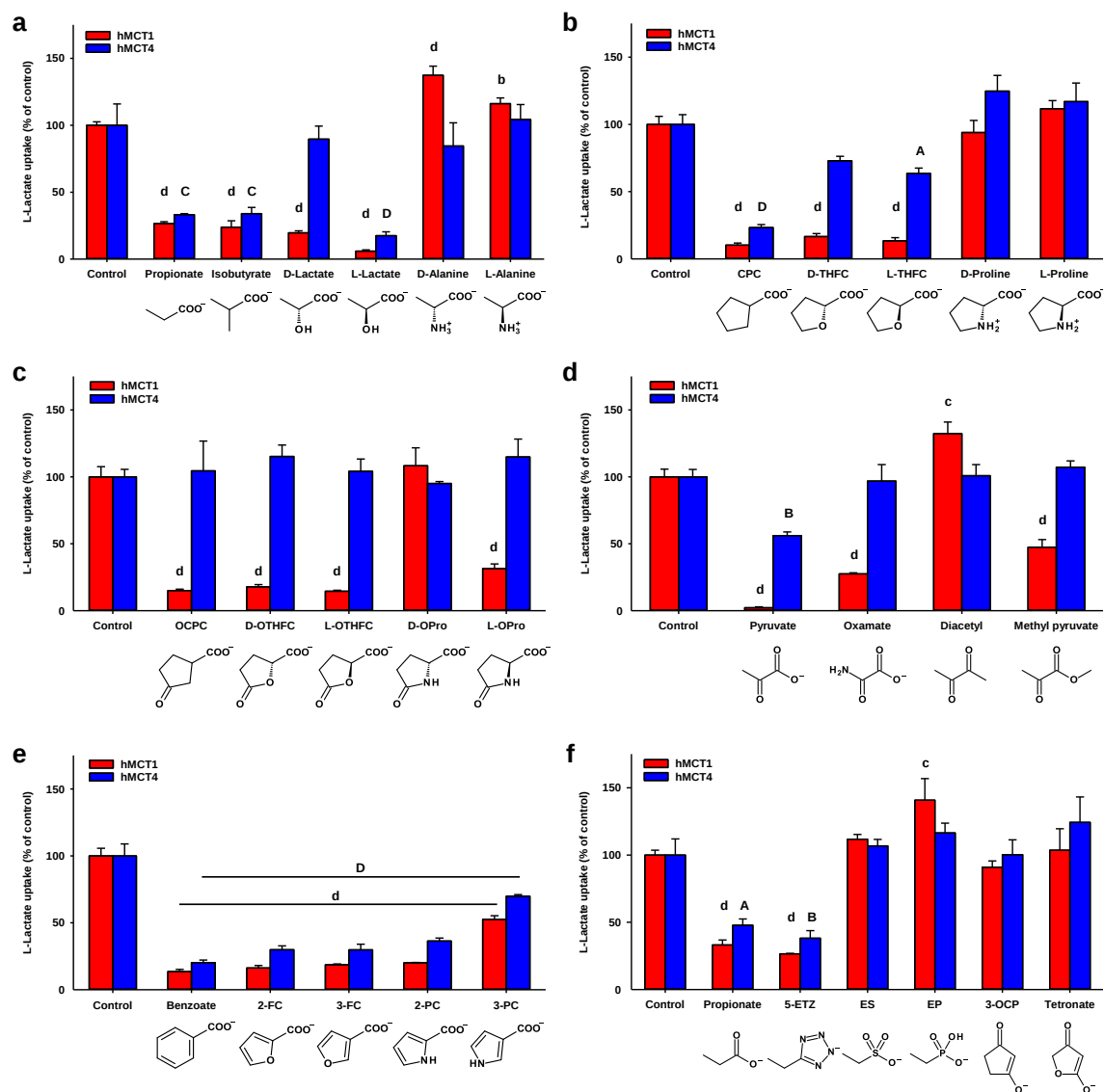


Fig. 1-1. Effects of simple monocarboxylates and their bioisosteres on L-lactate uptake via hMCT1 and hMCT4.

The uptake of L-[14 C]lactate was measured in the presence of the following compounds (10 mM): L-lactate bioisosteres (a), rigid L-lactate bioisosteres (b), L-OPro bioisosteres (c), pyruvate bioisosteres (d), aromatic carboxylates (e), and propionate bioisosteres (f). Oocytes were incubated for 10 min at 25 °C in a standard buffer of pH 5.5, containing 1 μ M L-[14 C]lactate with monocarboxylates and their bioisostere compounds. Transporter-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in water-injected oocytes from the uptake in cRNA-injected oocytes. b, $p < 0.01$; c, $p < 0.005$; d, $p < 0.001$ versus hMCT1, and A, $p < 0.05$; B, $p < 0.01$; C, $p < 0.005$; D, $p < 0.001$ versus hMCT4. Values represent the means $\pm$ S.E. from 3 to 9 independent experiments, each performed in 3–5 replicates. CPC, cyclopentanecarboxylate; THFC, tetrahydrofuran-2-carboxylate; OCPC, 3-oxocyclopentanecarboxylate; OTHFC, 5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylate; OPro, 5-oxoproline; FC, furancarboxylate; PC, pyrrolicarboxylate; 5-ETZ, 5-Ethyl-1H-1,2,3,4-tetrazolidine; ES, ethanesulfonate; EP, ethylphosphonate; 3-OCP, 3-oxo-1-cyclopenten-1-olate.

Fig. 1-1b に示すように、L-プロリンは hMCT1, 4 を介した L-乳酸輸送を全く阻害しなかった。その一方で、L-プロリンの 5 位にカルボニル基を有する L-OPro は、hMCT1 の選択的な輸送基質であることが明らかとされている [33]。このカルボニル基が hMCT1, 4 のリガンド認識に与える影響について検証するため、L-OPro を含む 3-oxocyclopentanecarboxylate (OCPC) 生物学的等価体の hMCT1, 4 介在性 L-乳酸輸送に対する阻害効果を評価した (**Fig. 1-1c**)。その結果、OCPC, (R)-5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylate (D-OTHFC), (S)-5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylate (L-OTHFC) および L-OPro は hMCT1 の L-乳酸輸送活性を低下させたため、これらの化合物の分子サイズが hMCT1 の基質輸送経路において許容されることが示唆された。その一方で、D-OPro は hMCT1 の活性を低下させなかったことから、D-OPro に含まれる $-\text{NH}-$ 構造は hMCT1 との相互作用を著しく弱めることが示唆された。また、hMCT4 については CPC による阻害効果が認められていたものの (**Fig. 1-1b**)、CPC の γ 位にカルボニル基を導入した OCPC とその生物学的等価体は全く認識されないことが明らかとなった。したがって、これらの化合物の分子サイズが hMCT4 の基質輸送経路において許容されていないことが示された。

これまでの検証により、L-OPro が hMCT1 選択的に認識される分子構造上の理由として、L-OPro が L 体であることと、 γ 位へのカルボニル基の導入による hMCT4 への認識性の低下ならびに α 位官能基のカチオン性の低下の 3 点が明らかとなった。しかしながら、 α 位官能基の置換では hMCT4 選択的な阻害効果を示す骨格を見出すことができなかった。そこで、次なる検証として、モノカルボン酸の母核構造もしくはカルボキシ基の構造を置換した化合物の hMCT1, 4 介在性 L-乳酸輸送に対する阻害効果について検証を行った。

hMCT1, 4 に対して阻害効果を示したプロピオン酸の α 位にカルボニル基を導入した構造を有するピルビン酸は hMCT1 の選択的基質であることが示されている [23, 45]。そこでピルビン酸とその生物学的等価体の hMCT1, 4 認識性を検証した (**Fig. 1-1d**)。ピルビン酸は hMCT1, 4 両方の輸送活性を低下させた一方で、オキサミン酸およびメチルピルビン酸は hMCT1 選択的な阻害効果を示した。さらに、ジアセチルは hMCT1, 4 のいずれも阻害しなかった。これらの結果から、hMCT1, 4 のリガンド認識にはカルボキシ基の 2 つのアニオン性酸素原子の適切な配置と、母核構造のメチル基の疎水性もしくは水素原子の配向が重要であることが明らかとなった。

母核構造の違いが hMCT1, 4 に対する阻害効果へ与える影響についてさらなる評価を行うため、種々の芳香族カルボン酸に対する hMCT1, 4 の認識性を検証した (**Fig. 1-1e**)。全ての芳香族カルボン酸で hMCT1, 4 に対する阻害効果が認められたことから、安息香酸 (rat MCT1 の基質となることが報告されている [46]) の分子サイズまでは hMCT1, 4 の基質輸送経路において許容されることが示唆された。また、3-pyrrolicarboxylate (3-PC) の hMCT1, 4 に対する阻害効果は他の芳香族カルボン酸と比較して弱かったため、3 位の δ^+ 性水素原子の存在が hMCT1, 4 と 3-PC との相互作用を減弱させることが示唆された。

カルボン酸の生物学的等価体への置換が hMCT1, 4 認識性へ与える影響についてさらなる評価を行うため、種々のプロピオン酸の生物学的等価体の hMCT1, 4 介在性 L-乳酸輸送に対する阻害効果について検証した (Fig. 1-1f)。さきのピルビン酸の生物学的等価体を用いた検証で (Fig. 1-1d)、カルボキシ基が負電荷を帯びていると hMCT1, 4 に対する阻害効果が増強したことから、本研究での基質輸送実験に用いる細胞外液 (Standard buffer) の pH を 5.5 に設定していることを踏まえ、 $pK_a \leq 5.5$ のプロピオン酸の生物学的等価体を選定し阻害実験に供した [47–50]。その結果、5-ethyltetrazole (5-ETZ) はプロピオン酸と同程度の hMCT1, 4 に対する阻害効果を示した一方で、その他の生物学的等価体は阻害効果を示さなかった (Fig. 1-1f)。このことから、hMCT1, 4 阻害剤の探索および最適化にカルボキシ基のテトラゾールでの置換が有効な手段となる可能性がある。

1.3.2 モノカルボン酸構造を有する医薬品が hMCT1, 4 介在性 L-乳酸輸送に与える影響

これまでの検証で、種々のモノカルボン酸に対する α 位官能基、カルボキシ基、母核構造の置換により hMCT1, 4 の両方に阻害効果を示す有用な骨格を多数見出した。しかしながら、hMCT4 選択的な阻害効果を示す骨格は見出されなかった。hMCT4 に対して選択的な阻害活性を有する化合物を探索するにあたり、さきの検証で見出された有用な骨格を有する既存の医薬品を用いることとした。なぜなら医薬品はプレビレッジ構造と呼ばれる、1 つ以上の標的分子に対して高い親和性を示す特徴的な構造を有していることが多いためである [51, 52]。

まず、糖尿病治療薬のひとつであるグリニド薬に着目し、hMCT1, 4 に対する阻害効果を検証した (Fig. 1-2a)。安息香酸誘導体である repaglinide は hMCT1, 4 両方の輸送活性を低下させた一方で、プロピオン酸誘導体である nateglinide は hMCT4 選択的な阻害効果を示した。また、同じくプロピオン酸誘導体である mitiglinide は hMCT1, 4 のいずれも阻害しなかった。次に、イソ酪酸骨格を有する脂質降下薬の一群であるフィブレートに着目し、hMCT1, 4 に対する阻害効果を検証した (Fig. 1-2b)。Clofibrate anion (clofibrate の活性代謝物) は hMCT1, 4 に対して阻害効果を示さなかったのに対し、bezafibrate, fenofibrate anion (fenofibrate の活性代謝物) および clinofibrate は hMCT4 選択的な阻害効果を示した。これらの結果から、イソ酪酸と 2 つの芳香環が適当な長さのリンカーで連結した構造が hMCT4 選択的な阻害効果の発現に重要であることが示された。また、clinofibrate の hMCT4 に対する阻害強度は bezafibrate ならびに fenofibrate anion と同様であったが、hMCT1 に対する阻害強度は両化合物よりもわずかに増大した。このことから、clinofibrate の有するジカルボン酸構造もしくは 2-メチル酪酸構造が hMCT1 への認識性を増大させたと考えられた。

ベンジルインダゾール骨格を有する lonidamine は rat MCT1, 4 に対して強力かつ非選択的な阻害効果を示すことが報告されている ($K_{0.5} \approx 40 \mu\text{M}$) [42]。より強力な hMCT4 選択的阻害剤を探索するため、種々のベンジルインダゾール誘導体の hMCT1, 4 に対する阻害効果に

ついて検証した (Fig. 1-2c)。Lonidamine の脱塩素体である 1-benzyl-1H-indazole-3-carboxylic acid (BIC) の hMCT1, 4 に対する阻害効果はほとんど認められなかった。Lonidamine と BIC の構造の比較から、BIC が有するベンジル基の *o*, *p* 位への塩素原子の導入が hMCT1, 4 に対する阻害効果を増強させる可能性が示された。ベンジルインダゾール骨格とカルボキシ基の間に 2 原子分のリンカーをもつ bendazac は、BIC と同様に hMCT1, 4 に対する阻害効果をほとんど示さなかった。フィブラートをを用いた hMCT1, 4 に対する阻害効果の検証結果から (Fig. 1-2b)、阻害剤の構造のイソ酪酸部位と 2 つの芳香環が hMCT4 選択的な阻害作用に重要な役割を果たすことが示されていた。そこで、ベンジルインダゾール骨格とイソ酪酸が 2 原子分のリンカーで連結した構造を有する bindarit の hMCT1, 4 に対する阻害効果を検証したところ、フィブラートや他のベンジルインダゾール誘導体よりも hMCT4 選択的かつ強力な阻害効果を示すことが明らかとなった (Fig. 1-2c)。

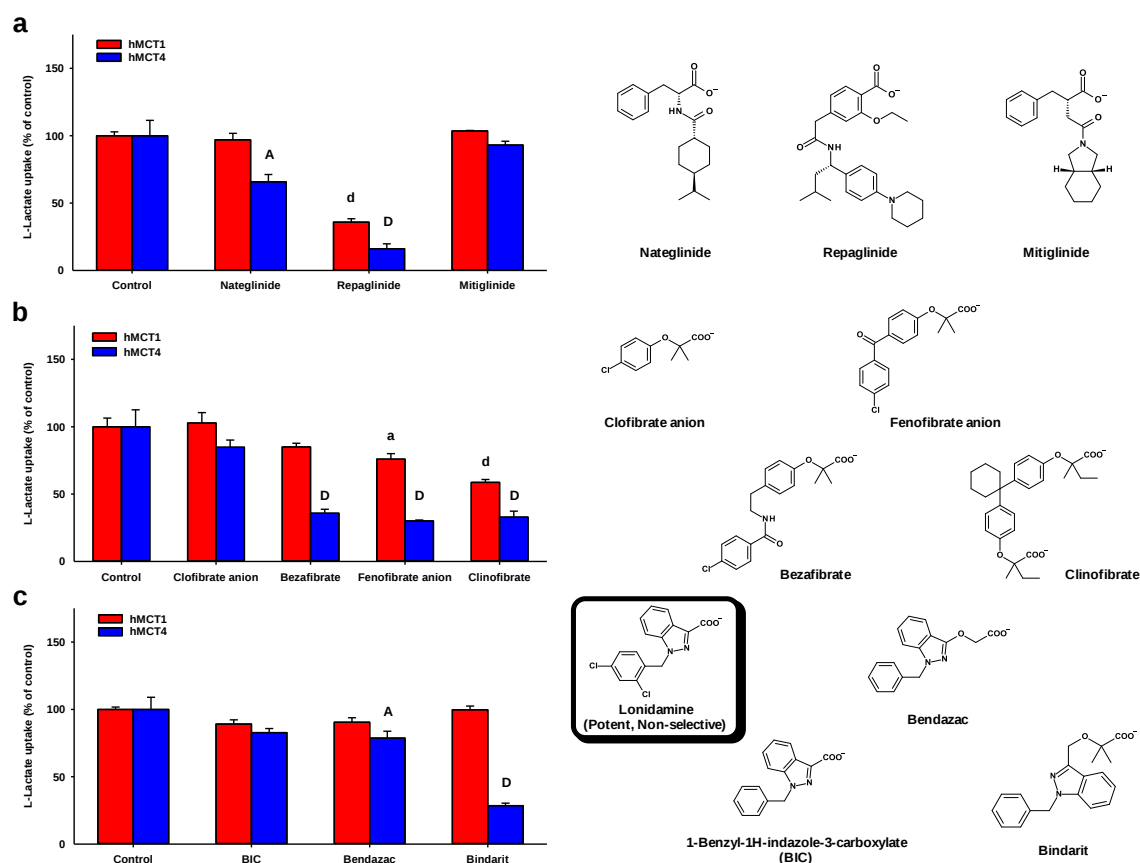


Fig. 1-2. Effects of monocarboxylate drugs on L-lactate uptake via hMCT1 and hMCT4. *cis*-Inhibition assays were performed using 100 μ M glinides (a), 500 μ M fibrates (b) and 100 μ M 1-benzyl-1H-indazole derivatives (c), as described in Fig. 1-1. Transporter-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in water-injected oocytes from the uptake in cRNA-injected oocytes. a, $p < 0.05$; d, $p < 0.001$ versus hMCT1, and A, $p < 0.05$; D, $p < 0.001$ versus hMCT4. Values represent the means $\pm$ S.E. from 3 independent experiments, each performed in 3–5 replicates. BIC, 1-benzyl-1H-indazole-3-carboxylate.

1.3.3 Repaglinide および bindarit の hMCT1, 4 阻害特性

Repaglinide および bindarit の hMCT1, 4 阻害特性を明らかにするため、両阻害剤の hMCT1, 4 に対する阻害効果の濃度依存性 (repaglinide, 0–300 μM ; bindarit, 0–500 μM) を評価した (Fig. 1-3a, b)。その結果、repaglinide は用量依存的に hMCT1, 4 を介した L-乳酸輸送を阻害し、その K_i 値はそれぞれ 35.3 ± 5.3 (μM), 23.2 ± 7.6 (μM) と算出された (Fig. 1-3a)。このことから、repaglinide は非選択的な hMCT1, 4 阻害剤であることが明らかとなった。Bindarit は repaglinide と同様に用量依存的に hMCT1, 4 を阻害したものの、hMCT4 に対してより選択的な阻害効果を示した (Fig. 1-3b)。Bindarit の hMCT4 を介した L-乳酸輸送に対する K_i 値は 30.2 ± 1.4 (μM) と算出された。これは hMCT4 の L-乳酸に対する K_m 値 (2.8–3.4 mM; [24, 34]) のおよそ 1/100 の濃度に匹敵する。その一方で、hMCT1 介在性 L-乳酸輸送は 500 μM bindarit 存在下においても 50% 以上残存した。これらのことから、bindarit は hMCT1 よりも hMCT4 に対して 15 倍以上選択的な阻害剤であることが示された。

hMCT4 選択的な阻害効果を示した bindarit の阻害様式を検証するため、速度論解析を行った (Fig. 1-3c, d)。hMCT4 を介した L-乳酸輸送の見かけの $V_{\max}$ 値は bindarit の存在下、顕著に減少した一方で (388.7 ± 34.2 [pmol/min/oocyte] から 80.4 ± 26.2 [pmol/min/oocyte], $p = 0.002$)、見かけの K_m 値に変動は認められなかった (4.5 ± 0.8 [mM] から 2.7 ± 1.3 [mM], $p > 0.05$)。これらのことから、bindarit は hMCT4 選択的な非競合阻害剤であることが明らかとなった。

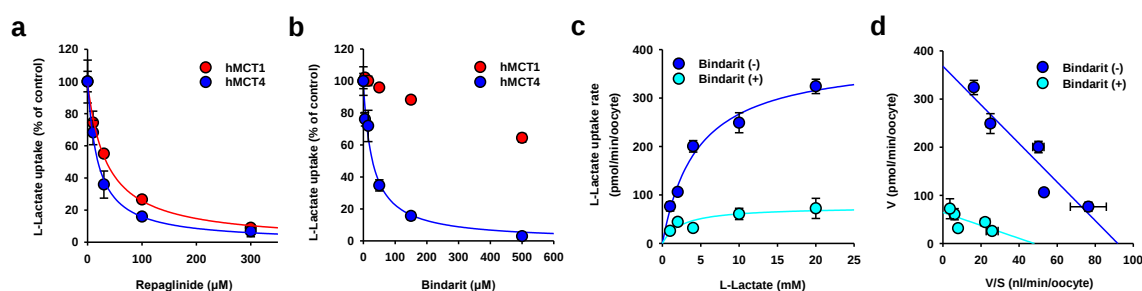


Fig. 1-3. Inhibitory property of repaglinide and bindarit on L-lactate uptake via hMCT1 and hMCT4. (a, b) The uptake of L-[^{14}C]lactate was monitored for 10 min at 25 $^{\circ}\text{C}$ in the presence of increasing doses of repaglinide (0–300 μM ; a) and bindarit (0–500 μM ; b). The K_i value was determined using non linear fitting of the equation $R = \text{Max} \times K_i / (K_i + [I])$, where R is the fractional transport activity, Max is the maximum transport activity, and [I] is the concentration of bindarit. (c, d) The kinetics of L-[^{14}C]lactate uptake in the absence and presence of bindarit (30 μM) were monitored for 10 min at 25 $^{\circ}\text{C}$. Data are presented in Michaelis–Menten plot (c) and Eadie–Hofstee plot (d). The apparent K_m and apparent $V_{\max}$ values were determined using non linear fitting of the Michaelis–Menten equation. Transporter-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in water-injected oocytes from the uptake in cRNA-injected oocytes. Values represent the means $\pm$ S.E. from 3 independent experiments, each performed in 3–5 replicates.

1.4 考察

本研究の対象である hMCT1, 4 は正常組織だけでなくがん細胞にも発現し、がんの進行・転移に寄与している [10]。したがって、hMCT1, 4 の阻害剤は抗がん剤としての機能を有すると考えられる。古典的な MCT の阻害剤としては CHC や DIDS 等が知られているが [22–24]、これらの化合物はアイソフォーム非選択的であるためオフターゲット効果が懸念される。そこで、これまでにいくつかの哺乳類 MCT1 選択的阻害剤が創製されてきた [43, 44]。しかしながら、今日に至るまで MCT4 選択的な阻害剤は創製されていない。これらの背景の下、hMCT1, 4 は未だその結晶構造が解かれていないことから、リガンドベースでの構造活性相関解析が hMCT1, 4 選択的阻害剤の創製に有効な手段となると考え、種々検証を行った。

構造活性相関解析では、hMCT1, 4 の基質である L-乳酸やピルビン酸の類縁体を利用した。過去の報告では、いくつかのヒドロキシ短鎖脂肪酸 (*e.g.* 3-hydroxybutyrate) ならびにオキシ短鎖脂肪酸 (*e.g.* acetoacetate) が MCT1, 4 によって認識されることが示されている [23, 53–55]。さらに最近、上記の短鎖脂肪酸誘導体と比して剛直な骨格を有する L-OPro や 3-hydroxycyclopent-1-enecarboxylic acid (HOCPCA; γ -ヒドロキシ酪酸アナログ) が MCT1 の選択的基質であることが示された [33, 56]。本研究では、フレキシブルな母核構造を有するモノカルボン酸に加え、剛直な骨格を有するモノカルボン酸も利用し、それらの構造を元に hMCT1, 4 との相互作用に必要な分子配座を推定した。その結果として、L-OPro が hMCT1 選択的に認識される分子構造上の要因として、以下の 3 点が明らかとなった：(1) L 体である、(2) γ 位カルボニル基の導入による hMCT4 への認識性の低下、(3) γ 位カルボニル基の導入による α 位官能基のカチオン性の低下。

これまでに報告されている hMCT1, 4 の基質は例外なくモノカルボン酸構造を有しており、その阻害剤の構造にもカルボキシ基が含まれる場合が多い。一般的に、リガンドに含まれるカルボキシ基はファーマコフォアの重要な構成要素のひとつではあるが、同時に代謝不安定性、毒性ならびに低膜透過性を発現する要因ともなり得る。カルボキシ基の物理化学的特性を保持しながら前述の欠点を回避する目的で、これまでに種々のカルボン酸生物学的等価体が提案されている [47]。本研究では、いくつかのカルボン酸生物学的等価体を利用して hMCT1, 4 のリガンド認識性の検証を行い、カルボン酸構造に加えてエステル構造 (hMCT1) ならびにテトラゾール構造 (hMCT1, 4) が認識されることを新しく見出している。特に、テトラゾールはカルボン酸の生物学的等価体としてよく知られており、カルボキシ基と類似した平面性と酸性度 ($pK_a \approx 4.5\text{--}4.9$) を有している。また、テトラゾールはカルボキシ基と同様に Arg 残基の部分構造であるアミジン ($-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$) との相互作用が可能である [57, 58]。哺乳類 MCT1, 4 の第 8 膜貫通領域 (transmembrane domain 8; TM8) には基質との相互作用に重要な Arg 残基が存在するため [24, 59, 60]、5-ETZ およびプロピオン酸はこの TM8 Arg 残基と相互作用している可能性がある。その他のカルボン酸生物学的等価体は hMCT1, 4 に対して阻害効果を示さなかったため、アミジンと相互作用可能な平面構造を

有するカルボン酸もしくはテトラゾール構造が hMCT1, 4 のリガンド認識に重要であることが示唆された。

本研究で同定した hMCT4 選択的阻害剤である bindarit は、monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1/CCL2) をはじめとする CC ケモカインの産生抑制作用を有するベンジルインダゾール誘導体である [61]。これまでに、メラノーマ、前立腺がんおよび乳がんモデルマウスを利用した研究で、bindarit の腫瘍形成もしくは転移に対する抑制効果が認められている [62, 63]。Bindarit はその構造中に *gem*-ジメチル構造およびインダゾール環を有しているのが特徴である。*gem*-ジメチル構造は電氣的に中性かつ非極性の小さな部分構造ではあるものの、リガンドの回転障壁、立体配座および標的タンパク質との相互作用に大きな影響を与えることが明らかとなっている [64]。本研究の結果によれば、*gem*-ジメチル構造を有さないベンジルインダゾール誘導体である BIC や bendazac は hMCT4 に対してほとんど阻害効果を示さなかったのに対し、*gem*-ジメチル構造を有する bindarit は hMCT4 に対して極めて強力な阻害効果を示した。このことは *gem*-ジメチル構造が hMCT4 との相互作用に対して極めて有利に働いていることを示している。また、インダゾール環は制吐薬として使用される granisetron や indisetron ならびに抗炎症薬として使用される bendazac や benzydamine の基本骨格であり、薬理的に重要なビルディングブロックのひとつである [65]。特に、インダゾール環に存在する 2 つの窒素原子はそれぞれ高い選択性で官能基化できるため、置換基の種類および長さを調節することで膨大な種類のインダゾール誘導体を設計することが可能である。したがって、bindarit に含まれるファーマコフォア間の距離を調節した化合物の創製も今後期待される。

結論として、本研究の遂行により hMCT4 に対して選択的かつ強力な阻害作用を有する化合物 bindarit を初めて同定した。本阻害剤は hMCT4 の生体内での役割を検証するための薬理的ツールとして利用可能であると考ええる。

第2章 hMCT1, 4の基質選択性に関わるアミノ酸残基の同定

2.1 緒言

hMCTs は major facilitator superfamily (MFS) に属する輸送タンパク質であり、さまざまな組織においてモノカルボン酸化合物の吸収、分布に関わっている [4]。hMCTs のうち、hMCT1 と hMCT4 は正常細胞およびがん細胞に発現し、L-乳酸を共通の基質として pH 依存的に輸送する [4, 8, 10, 24, 34]。hMCT1, 4 の生理学的な役割を明らかにするため、これまでにそれぞれのトランスポーターに対する選択的な基質および阻害剤が開発されてきた。たとえば、ヒトもしくは齧歯類 MCT1 の選択的阻害剤として、いくつかのモノカルボン酸誘導体が創製されている [26, 29, 43, 44, 66]。さらに筆者らは最近、L-OPro が hMCT1 の選択的な基質であることを実証している [33]。L-OPro はグルタチオンサイクルの中間代謝物である。このサイクルにおいて形成されたグルタチオンは γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼによって分解され、その結果として L-OPro とシステイニルグリシンが生成される [67]。最近の研究で、L-OPro のグルタミン酸類似体もしくは貯蔵体としての役割や、浸透圧保護剤としての役割が議論されている [68]。さらに先行研究において、L-OPro の血清中濃度がいくつかの疾患のバイオマーカーとなり得ることも示されている [69–71]。Thiesen らは最近、 γ -ヒドロキシ酪酸アナログである HOCPCA が rat MCT1, 2 の選択的基質であることを実証した [56]。また筆者らは、bindarit が hMCT4 選択的な非競合阻害剤であることを最近見出しているものの [72]、hMCT4 選択的な基質は未だ同定されていない。これらの知見から、hMCT1 と hMCT4 の間にはその基質選択性の違いを決定する何らかの分子メカニズムが存在することが予測される。

筆者らは以前の研究で、hMCT1, 4 の TM6/7loop が基質に対する親和性を調節することを示した [34]。しかしながら、基質に対する選択性は TM6/7loop 以外の領域によって決定されることが示唆されていた。MCT1, 4 の基質選択性に関する先行研究としては、rat MCT1 第2細胞内ループ (TM4/5loop) 中の K142 および R143 残基が基質の立体選択性に関与することを報告したものがあある [73]。さらに、MCT1, 4 の基質選択性は TM10 に存在する特定の残基によっても影響を受けることが知られており、たとえば齧歯類 MCT1 への F360C 変異導入によってメバロン酸輸送が認められるようになることが報告されている [22, 59]。一般的に、基質選択性に関与する残基を同定する上で最も効果的な方法は、注目するトランスポーターとその基質の共結晶構造を決定することである [74–80]。しかしながら、hMCT1, 4 の3次元構造は今日に至るまで解かれていない。このような場合、ホモロジーモデリング法を用いた標的タンパク質の3次元構造予測が有用である。Nancolas らは最近、rat MCT1, 2 選択的な阻害剤である AR-C155858 の rat MCT1 への結合部位を同定するため、rat MCT1 のホモロジーモデルを構築した [81]。さらに、rat MCT1 を介した基質輸送に必須な TM8 の R306 残基周辺に存在する残基が、rat MCT1, 4 間で常に保存されているとは限らないことも

示した。また、同じく hMCT ファミリーに属する hMCT8, 10 の基質選択性は、基質輸送経路に存在する 2 つから 3 つのアミノ酸残基の違いによって決定づけられるということがホモロジーモデルを用いた検証で明らかになっている [82]。その他にも、ホモロジーモデリング法を用いてトランスポーターの基質選択性の違いを明らかにした報告が多数存在する [83–86]。筆者はこれらの報告に基づき、hMCT1, 4 の基質選択性はそれらの基質輸送経路を形成するアミノ酸残基によって決定されると推測した。

そこで本章では、hMCT1, 4 の基質選択性に関わるアミノ酸残基を明らかとするため、hMCT1 と hMCT4 の 3 次元ホモロジーモデルを利用し種々検証を行った。

2.2 実験材料および方法

2.2.1 実験動物

第1章 (1.2.1) と同様の方法で入手し飼育した。

2.2.2 試薬

Sodium L- ^{14}C lactate は PerkinElmer (Waltham, MA, USA) から購入した。L-5- ^3H Oxoproline (^3H pyroglutamic acid) は Moravek (Brea, CA, USA) から購入した。Sodium L-lactate は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。Cyclopentanecarboxylic acid および L-OPro (L-pyroglutamic acid) は 東京化成工業 (東京、日本) から購入した。(R)-3-Oxocyclopentanecarboxylic acid は AstaTech (Bristol, PA, USA) から購入した。オリゴDNA は Eurofins Genomics (東京、日本) に合成と精製を依頼した。その他の試薬は特に断らない限り特級もしくは生化学用、分子生物学用のものを用いた。

2.2.3 プラスミド

第1章 (1.2.3) で作製したプラスミド (pGH19-hMCT1 および pGH19-hMCT4) を使用した。

2.2.4 部位特異的変異導入

hMCT1, 4 変異体は QuikChange site-directed mutagenesis のプロトコル (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) にしたがって作製した。部位特異的変異導入で使用したプライマーの配列は **Table 2-1** に示した。導入した変異はシーケンスプライマー (**Table 1-1, 2-2**) を用いてシーケンス解析により確認した。なお、シーケンス解析は、北海道システム・サイエンス (札幌、北海道、日本) に依頼した。

Table 2-1. Sequences of used primers (site-directed mutagenesis).

Mutation	Primer sequences (5'–3')	
	Forward	Reverse
hMCT1-R313Q	GGTAGCCCAACCATCTATGGGACTTG	GATGGTTGGGCTACCATGTCAAC
hMCT1-I40V	CAAATCAGTTACTGTCTTCTTCAAAG	CAGTAAGTATTTGGGAAATGC
hMCT1-T41S	CAAATCAATTTCTGTCTTCTTCAAAGAG	GAAGACAGAAATTGATTTGGGAAATG
hMCT1-M65L	CTCCATACTGTTGGCTGTCATG	CCAACAGTATGGAGGATATCCATG
hMCT1-M69L	GCTGTCCTGTATGGTGGAGGTC	CCATACAGGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-S76C	GTCCTATCTGCAGTATCCTGGTG	GATACTGCAGATAGGACCTCCACC
hMCT1-L128F	CTTCAACTTCAATCCAGCTCTGACC	CTGGATTGAAGTTGAAGGCAAGC
hMCT1-N129Q	CAACTTGCAGCCAGCTCTGACCATG	GAGCTGGCTGCAAGTTGAAGGCAAG

Mutation	Primer sequences (5'–3')	
	Forward	Reverse
hMCT1-T133I	GCTCTGATCATGATTGGCAAGTATTC	CAATCATGATCAGAGCTGGATTCAAG
hMCT1-G136N	CCATGATTAACAAGTATTTCTACAAGAG	GAAATACTTGTTAATCATGGTCAGAGC
hMCT1-M151A	CTGGCCGCGGCAGGCAGCCCTG	CCTGCCGCGGCCAGTCCGTTGG
hMCT1-F274V	GATCATGGTTTTTGGACTCTTTGCAC	CCAAAAACCATGATCACATTTCAG
hMCT1-L281P	GCACCTCCGGTGTTCCTTAGTAG	ACACCGGAGGTGCAAAGAGTC
hMCT1-S285V	GTTTCTTGTTAGTTATGGGAAGAGTC	CATAACTAACAAGAAACACCAAAGGTG
hMCT1-S298A	GAGAAGGCTGCCTTCCTTCTTTC	GAAGGCAGCCTTCTCACTAGAATAATG
hMCT1-A306G	CATTCTGGGTTTTGTTGACATGGTAG	CAACAAAACCCAGAATGGAAAGAAG
hMCT1-F367Y	TGCCTACGGGTGGCTCAGCTC	CACCCGTAGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-S371G	GTGGCTCGGCTCCGTATTGTTTG	GGAGCCGAGCCACCCGAAGG
hMCT1-V391I	CAGCGCTATCGGATTGGTGACCATTG	CCAATCCGATAGCGCTGGAGAACCTC
hMCT1-T395L	GATTGGTGCTCATTGTGGAATGCTG	CACAATGAGCACCAATCCACAGC
hMCT1-C399A	GTGGAAGCCTGTCCTGTCCTCCTG	GGACAGGCTTCCACAATGGTCAC
hMCT4-V42I	CAAGGCCATCAGTGCTTCTTCAAG	CACTGATGGCCTTGGGGAAGG
hMCT4-S43T	GCCGTCACTGTCTTCTTCAAGGAG	GAAGACAGTGACGGCCTTGGGGAAG
hMCT4-L67M	CTCCATCATGCTGGCCATGCTCTAC	CCAGCATGATGGAGGAGATCCAG
hMCT4-L71M	GCCATGATGTACGGGACAGGTCCGC	CCCGTACATCATGGCCAGCAGGATG
hMCT4-C78S	CCGCTCAGCAGTGTGTGCGTGAAC	CACACTGCTGAGCGGACCTGTCCC
hMCT4-F130L	CTCAACCTCCAGCCCTCGCTCATC	GGCTGGAGGTTGAGTGCCAAACC
hMCT4-Q131N	CAACTTCAACCCCTCGCTCATCATG	CGAGGGGTTGAAGTTGAGTGCCAAAC
hMCT4-I135T	CTCGCTCACCATGCTGAACCGCTAC	CAGCATGGTGAGCGAGGGCTGG
hMCT4-N138G	CATGCTGGGCCGCTACTTCAGCAAG	GTAGCGGCCAGCATGATGAGCG
hMCT4-A153M	CTGGCGATGGCAGGTAGCCCTGTC	CTACCTGCCATCGCCAGCCCCTTGG
hMCT4-V239F	GTCATGTTCTGGGGCTCTTCGTCC	CCCCAGGAACATGACCGAGGCGGC
hMCT4-P246L	CCGCTCGTGTTCTGTGGTGAG	ACACGAGCGGGACGAAGAGC
hMCT4-V250S	GTTCTGTGTCGAGCTACGCCAAGGAC	GTAGCTCGACACGAACACGGGCGG
hMCT4-A263S	CACCAAGTCCGCCTTCCTGCTCAC	GGCGGACTTGGTGTCGGGCACG
hMCT4-G271A	CATCCTGGCCTTCATTGACATCTTC	CAATGAAGGCCAGGATGGTGAGCAG
hMCT4-Y332F	CTCCTTCGGCATGGTGGGGG	CATGCCGAAGGAGATGCCAAAGAAG
hMCT4-G336S	CATGGTGTCGGCCCTGCAGTTCGAG	CAGGGCCGACACCATGCCGTAGGAG
hMCT4-I356V	CAGTGCCGTTGGCCTGGTGCTG	CAGGCCAACGGCACTGGAGAACTTG
hMCT4-L360T	CTGGTGACGCTGATGGAGGCGG	CATCAGCGTCACCAGGCCAATGGCAC
hMCT4-A364C	GATGGAGTGCCTGGCCGTGCTCG	GGCCACGCACTCCATCAGCAGCACC
hMCT1-multiple-G136N	Identical to hMCT1-G136N sequence	Identical to hMCT1-G136N sequence
hMCT1-multiple-T133I	GCTCTGATCATGATTAACAAGTATTC	TAATCATGATCAGAGCTGGATTCAAG
hMCT1-multiple-V391I	Identical to hMCT1-V391I sequence	Identical to hMCT1-V391I sequence
hMCT1-multiple-N129Q	CAACTTGACGCCAGCTCTGATCATG	Identical to hMCT1-N129Q sequence
hMCT1-multiple-L128F	CTTCAACTTCCAGCCAGCTCTGATC	CTGGCTGGAAGTTGAAGGCAAGC
hMCT1-multiple-S76C	Identical to hMCT1-S76C sequence	Identical to hMCT1-S76C sequence
hMCT1-multiple-T395L	Identical to hMCT1-T395L sequence	CACAATGAGCACCAATCCGATAGC
hMCT1-multiple-M151A	Identical to hMCT1-M151A sequence	Identical to hMCT1-M151A sequence
hMCT1-multiple-S371G	Identical to hMCT1-S371G sequence	GGAGCCGAGCCACCCGTAGG
hMCT1-multiple-C399A	Identical to hMCT1-C399A sequence	GGACAGGCTTCCACAATGAGCAC
hMCT1-multiple-M65L	CTCCATACTGTTGGCTGTCCTG	Identical to hMCT1-M65L sequence
hMCT1-multiple-F274V	Identical to hMCT1-F274V sequence	Identical to hMCT1-F274V sequence
hMCT1-multiple-A306G	Identical to hMCT1-A306G sequence	Identical to hMCT1-A306G sequence
hMCT1-multiple-I40V	Identical to hMCT1-I40V sequence	Identical to hMCT1-I40V sequence
hMCT1-multiple-T41S	CAAATCAGTTTCTGTCTTCTTCAAAGAG	GAAGACAGAACTGATTTGGGAAATG
hMCT1-multiple-S298A	Identical to hMCT1-S298A sequence	Identical to hMCT1-S298A sequence
hMCT1-multiple-S285V	Identical to hMCT1-S285V sequence	Identical to hMCT1-S285V sequence
hMCT4-multiple-N138G	Identical to hMCT4-N138G sequence	Identical to hMCT4-N138G sequence
hMCT4-multiple-I135T	CTCGCTCACCATGCTGGGCCGCTAC	Identical to hMCT4-I135T sequence

Mutation	Primer sequences (5'–3')	
	Forward	Reverse
hMCT4-multiple-I356V	Identical to hMCT4-I356V sequence	Identical to hMCT4-I356V sequence
hMCT4-multiple-C78S	Identical to hMCT4-C78S sequence	Identical to hMCT4-C78S sequence
hMCT4-multiple-A153M	Identical to hMCT4-A153M sequence	Identical to hMCT4-A153M sequence
hMCT4-multiple-L67M	CTCCATCATGCTGGCCATGATGTAC	Identical to hMCT4-L67M sequence
hMCT4-multiple-V42I	Identical to hMCT4-V42I sequence	Identical to hMCT4-V42I sequence
hMCT4-multiple-S43T	GCCATCACTGTCTTCTTCAAGGAG	GAAGACAGTGATGGCCTTGGGGAAG
hMCT4-multiple-A263S	Identical to hMCT4-A263S sequence	Identical to hMCT4-A263S sequence
hMCT1-M69A	GCTGTGCGGTATGGTGGAGGTC	CCATACGCGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69C	GCTGTCTGCTATGGTGGAGGTC	CCATAGCAGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69D	GCTGTGCGACTATGGTGGAGGTC	CCATAGTCGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69E	GCTGTGCGAGTATGGTGGAGGTC	CCATACTCGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69F	GCTGTCTTCTATGGTGGAGGTC	CCATAGAAGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69G	GCTGTGCGGTATGGTGGAGGTC	CCATACCCGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69H	GCTGTCCACTATGGTGGAGGTC	CCATAGTGGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69I	GCTGTCATCTATGGTGGAGGTC	CCATAGATGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69K	GCTGTCAAGTATGGTGGAGGTC	CCATACTTGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69N	GCTGTCAACTATGGTGGAGGTC	CCATAGTTGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69P	GCTGTCCCGTATGGTGGAGGTC	CCATACGGGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69Q	GCTGTCCAGTATGGTGGAGGTC	CCATACTGGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69R	GCTGTCAGGTATGGTGGAGGTC	CCATACCTGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69S	GCTGTCAGCTATGGTGGAGGTC	CCATAGCTGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69T	GCTGTCACGTATGGTGGAGGTC	CCATACGTGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69V	GCTGTGCGTGTATGGTGGAGGTC	CCATACACGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69W	GCTGTCTGGTATGGTGGAGGTC	CCATACCAGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-M69Y	GCTGTCTACTATGGTGGAGGTC	CCATAGTAGACAGCCAACATTATGG
hMCT1-F367A	TTGCCGCGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGCGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367C	TTGCCTGCGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGCAGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367D	TTGCCGACGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGTCGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367E	TTGCCGAGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCCTCGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367G	TTGCCGCGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGCGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367H	TTGCCACGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGTGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367I	TTGCCATCGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGATGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367K	TTGCCAAGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCCTTGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367L	TTGCCCTCGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGAGGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367M	TTGCCATGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCCATGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367N	TTGCCAACGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGTGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367P	TTGCCCCGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGGGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367Q	TTGCCACGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCCTGGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367R	TTGCCGCGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGCGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367S	TTGCCTCCGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGAGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367T	TTGCCACGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGTGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367V	TTGCCGTCGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCGACGGCAAATCCAAAGAATC
hMCT1-F367W	TTGCCTGGGGTGGCTCAGCTC	CCACCCCGAGGCAAATCCAAAGAATC

Table 2-2. Sequences of used primers (DNA sequencing).

Primer	Sequence (5'–3')
MCT4-S1	GAGTTTGGGATCGGCTACAG
MCT4-S2	CTGCTAGACCTGAGCGTCTT
MCT4-S3	GTGGGCACCCACAAGTTCTC
MCT4-S4	TGGAAGTTGAGTGCCAAACC

2.2.5 大腸菌の培養とプラスミド抽出

第 1 章 (1.2.4) と同様の方法で行った。

2.2.6 cRNA の調製

第 1 章 (1.2.5) と同様の方法で行った。

2.2.7 アフリカツメガエル卵母細胞 (oocytes) の調製

第 1 章 (1.2.6) と同様の方法で行った。

2.2.8 Oocytes への遺伝子導入

第 1 章 (1.2.7) と同様の方法で行った。

2.2.9 免疫組織化学染色

Oocytes は hMCTs cRNA のインジェクション後 4 日経過したものを用いた。10%中性緩衝ホルマリン液に浸した hMCTs 発現 oocytes をパラフィンに埋め込み、マウス抗 MCT1 抗体 (sc-365501; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; TM6/7loop を認識) もしくはウサギ抗 MCT4 抗体 (22787-1-AP; Proteintech Group, Rosemont, IL, USA; C 末端細胞質領域を認識) を用いて染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV10i (オリンパス、東京、日本) で撮影した。なお、oocytes のパラフィンへの埋め込みから染色までは札幌総合病理研究所 (札幌、北海道、日本) に依頼した。

2.2.10 基質輸送実験

第 1 章 (1.2.8) と同様の方法で行った。

2.2.11 シーケンスアラインメント

脊椎動物 MCT1 (human, NP_001159968; rat, NP_036848; chicken, NP_001006323; green anole, XP_003220493; western clawed frog, NP_001015931; zebrafish, NP_001243569 [MCT1a] and NP_956379 [MCT1b]) および MCT4 (human, NP_001035887; rat, NP_110461; chicken, NP_989994; green anole, XP_008102768; western clawed frog, NP_001007912; zebrafish,

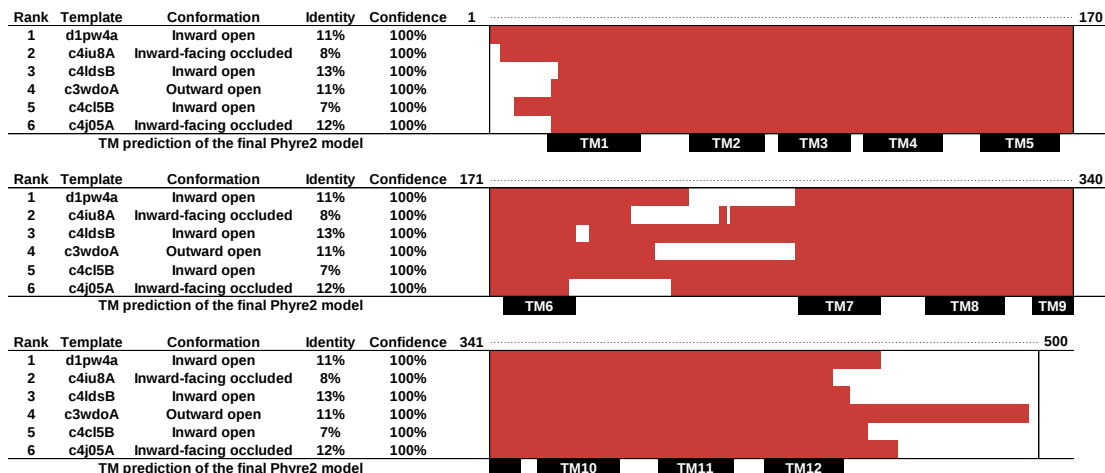
NP_997873) のアミノ酸配列のアラインメントには Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) を既定のパラメーターで利用した [87]。アラインメント後の図は GeneDoc を用いて作製した [88]。

2.2.12 ホモロジーモデリングとドメイン解析

hMCT1, 4 の 3 次元ホモロジーモデルは、Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) [89] の “intensive mode” を用いて構築した。ホモロジーモデル構築に関する詳細は既報で述べられている [89]。簡単に記すと、まず目的のタンパク質のアミノ酸配列が HHblits 法 [90] で照合され、多重シーケンスアラインメントが生成される。これを用いてタンパク質の 2 次構造を PSI-BLAST-based secondary structure prediction 法 [91] により予測する。これらのアラインメントおよび構造予測の結果を組み合わせ、hidden Markov model (HMM) クエリとし、3 次元構造が既知のタンパク質の HMMs を含むデータベースと照合する (HHsearch) [92]。HHsearch で上位となったアラインメントを用いてバックボーンのみモデルが構築される。アミノ酸の挿入および欠失は、3 次元構造既知のタンパク質由来の 2-15 アミノ酸長の断片を集めたライブラリーを用いて取り扱われる。多重テンプレートモデリングは Poing 法 [93] を用いて行われる。最後に、アミノ酸側鎖をバックボーンに対して R3 プロトコル [94] を利用して付与し最終的な Phyre2 モデルが構築される。

本研究ではこのモデリング過程において、6 種類のトランスポーター (MFS トランスポーター) を confidence levels, percentage identity および alignment coverage に基づいて選定しテンプレートとして利用した (Fig. 2-1)。テンプレートは hMCT1 ホモロジーモデルについては 1PW4 (inward open) [95], 4IU8 (inward-facing occluded) [79], 4LDS (inward open) [96], 3WDO (outward open) [97], 4CL5 (inward open) [76] および 4J05 (inward-facing occluded) [78] を用い、hMCT4 ホモロジーモデルについては 1PW4 (inward open) [95], 3WDO (outward open) [97], 4IU8 (inward-facing occluded) [79], 4CL5 (inward open) [76], 4ZP0 (inward open) [75] および 4J05 (inward-facing occluded) [78] を用いた。Phyre2 ホモロジーモデルのエネルギー最小化は 3Drefine (<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/>) を用いて行った [98]。Ramachandran プロット解析は RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) を用いて行った [99]。MFS トランスポーターの基質輸送経路 (PSSM-ID: 119392) の推定には Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) [100] および CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) [101] を用いた。hMCT1, 4 の 3 次元構造アラインメントには Matt を用いた [102]。ホモロジーモデルの描画および解析には PyMOL 2.1.0 (Schrödinger, New York, NY, USA) を用いた。

a



b

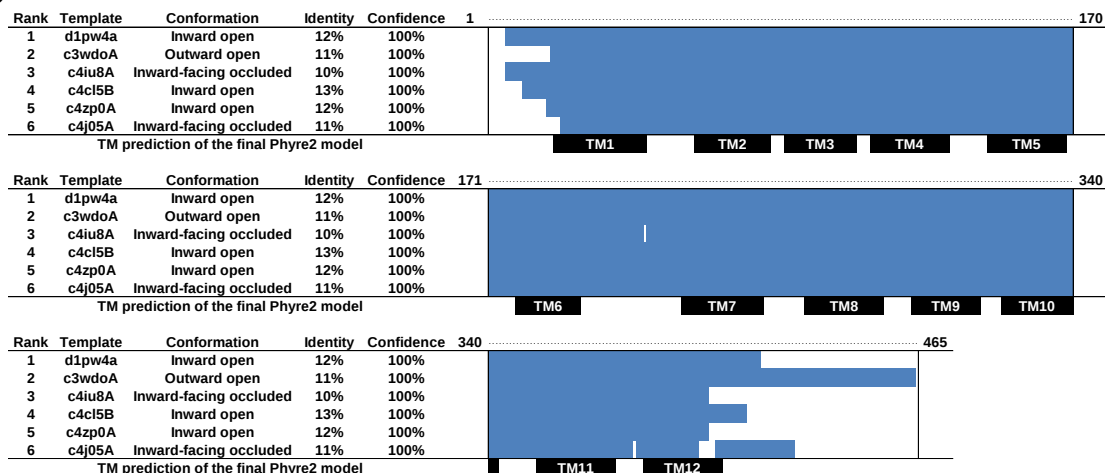


Fig. 2-1. Multiple template information on the homology modeling of hMCT1 and hMCT4. Six templates (MFS transporters) were selected to model each protein, based on heuristics to maximize confidence levels, percentage identity, and alignment coverage. The colored regions indicate which structural templates were used for which regions of the sequence of hMCT1 (a) and hMCT4 (b).

2.2.13 ドッキングシミュレーション

L-乳酸および L-OPro の 3 次元構造は PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) [103] から取得した (PubChem CIDs 107689 [L-乳酸] および 7405 [L-OPro])。それぞれのリガンドのエネルギー最小化は UCSF Chimera 1.13.1 [104] を **Table 2-3** に示すパラメーターを使用して行った。さらに、UCSF Chimera の Dock Prep 機能を既定のパラメーターのもとで利用し、エネルギー最小化後のリガンドおよび hMCT1 ホモロジーモデルに対して水素原子および電荷の付与を行った [105, 106]。ドッキングシミュレーションには AutoDock Vina を用いた

[107]。Grid box パラメーターはその中心を (X = 34, Y = 17, Z = -35) に、大きさを (X = 29, Y = 13, Z = 18) に設定した。これは hMCT1 の M69, R313 および F367 残基を十分含む大きさである。その他のパラメーターは全て規定の値を使用した。全てのリガンドを hMCT1 ホモロジーモデルに対して個別にドッキングしたのち、それぞれの結合自由エネルギー値の上位 9 コンフォメーションを選択した。

Table 2-3. The parameters used for energy minimization of the ligands.

Parameter	Value
Steepest descent steps	1000
Steepest descent step size	0.02 Å
Conjugate gradient steps	1000
Conjugate gradient step size	0.02 Å

2.2.14 数値解析

低分子化合物の pK_a 予測、 K_i 値の算出および統計解析は第 1 章 (1.2.9) と同様の方法で行った。ただし、 pK_a 値の予測には MarvinSketch 19.2.0 を用い、 K_i 値の算出および統計解析には SigmaPlot 14 を用いた。

L-乳酸および L-OPro の初期取り込みクリアランス ($CL = V_{max}/K_m$) は基質の初期取り込み速度を基質濃度で除して算出した。なお、基質濃度はその hMCT1 に対する K_m 値よりも十分低く設定した [24, 33, 108]。一般に、阻害剤が基質と同様のメカニズムで輸送される場合 $K_i = K_m$ となるため [109]、以下の式を用いてトランスポーターの輸送サイクル (k_{cat}) 比を見積もった。

$$\frac{k_{cat,L-OPro}}{k_{cat,L-Lactate}} = \frac{CL_{L-OPro}}{CL_{L-Lactate}} \times \frac{K_{i,L-OPro}}{K_{i,L-Lactate}}$$

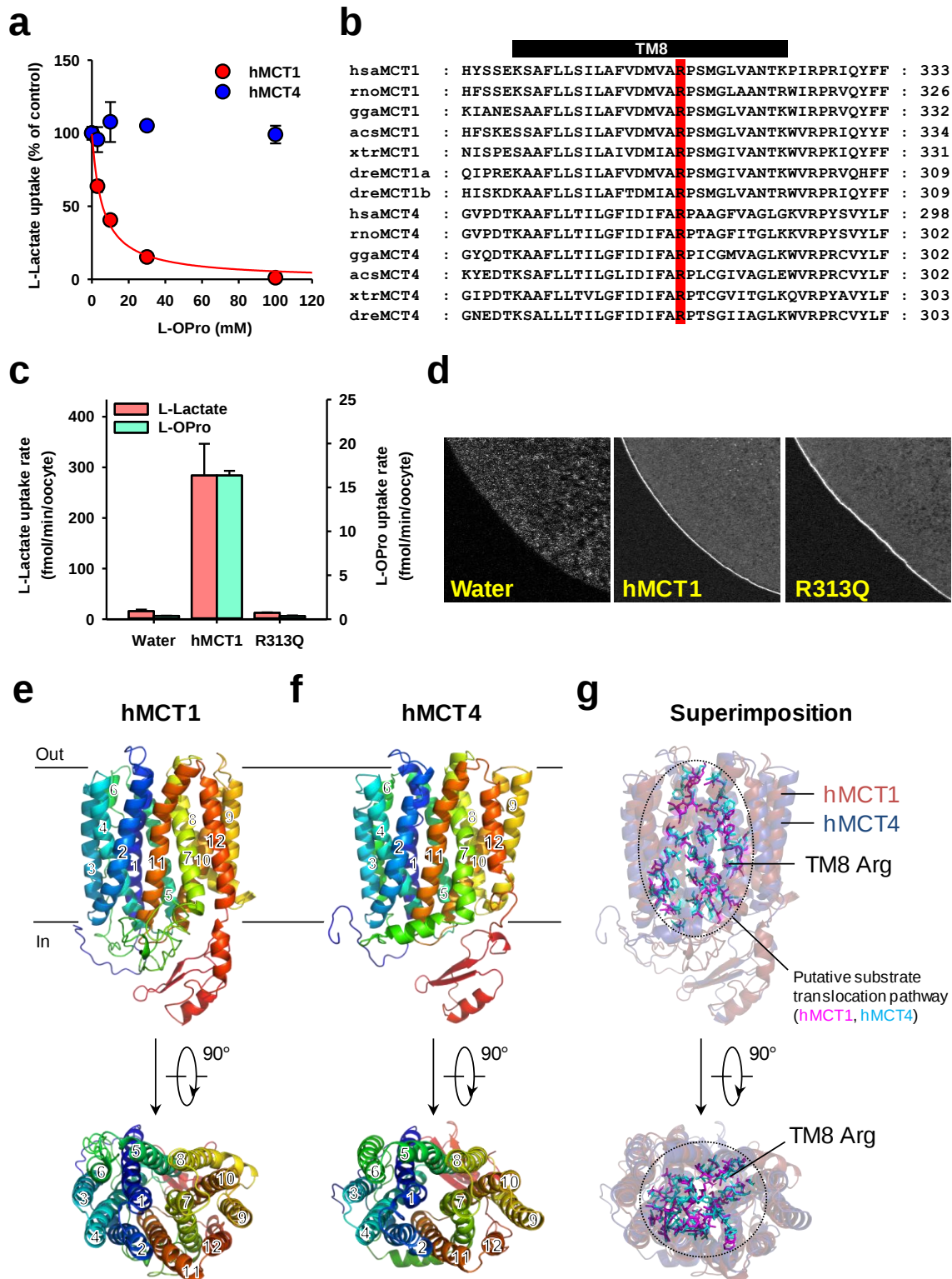
[CL: 初期取り込みクリアランス, K_i : 阻害定数]

2.3 結果

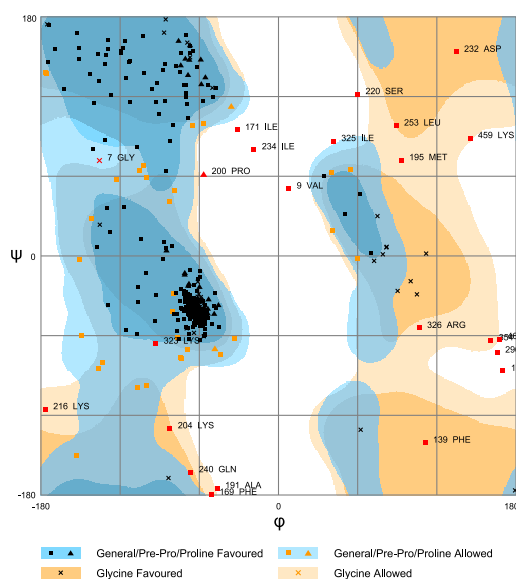
2.3.1 hMCT1, 4 のホモロジーモデリングおよび基質輸送経路の推定

筆者らはこれまでの研究で、hMCT1 選択的な基質である L-OPro (10 mM) が hMCT1 に対して阻害作用を有する一方、hMCT4 に対しては阻害作用を有さないことを明らかにしている [33, 72]。L-OPro の hMCT1, 4 に対する阻害特性を調べるため、L-OPro (0–100 mM) を用いた用量反応実験を行った (Fig. 2-2a)。その結果、L-OPro は hMCT1 を用量依存的に阻害し、その K_i 値は 5.9 ± 0.7 mM と算出された。その一方で、hMCT4 は検証に用いた最大の濃度 (100 mM) においても阻害効果が認められなかった。これらの結果は、L-OPro が hMCT1 によって選択的に認識されることを示している。これまでに、rat MCT1、hMCT4、および hMCT8 の TM8 には、基質輸送に必須な Arg 残基が存在することが明らかとなっている [24, 59, 110]。しかしながら、hMCT1 におけるこの Arg 残基 (R313) の役割については未だ報告がない。脊椎動物 MCT1, 4 のシーケンスアラインメントにより、この Arg 残基が hMCT1 においても保存されていることが明らかとなった (Fig. 2-2b)。そこで、hMCT1-R313Q 変異体を作製しその基質輸送活性を評価したところ、変異体の活性は hMCT1-wild type (WT) と比較して顕著に低下した (Fig. 2-2c)。その一方で、細胞膜への発現量にはほとんど影響がなかった (Fig. 2-2d)。この結果から、rat MCT1 や hMCT4, hMCT8 だけでなく、hMCT1 においても TM8 に存在する Arg 残基が基質輸送に必須であることが示された。

> **Fig. 2-2. The conserved TM8 Arg residue is required for L-lactate and L-OPro transport by hMCT1.** **a** The uptake of L-[14 C]lactate (1 μ M) was monitored in the presence of increasing doses of L-OPro (0–100 mM). Oocytes were incubated for 10 min at 25 °C. The K_i value was determined using non-linear fitting, as described in the “Materials and methods” section. Transporter-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in water-injected oocytes from the uptake in cRNA-injected oocytes. Values represent the means $\pm$ S.E. from 3 independent experiments using a single batch of oocytes, each performed with 3–5 replicates. **b** Multiple protein sequence alignments were performed between vertebrate MCT1 and MCT4 (hsa, human; rno, rat; gga, chicken; acs, green anole; xtr, western clawed frog; dre, zebrafish). The alignments were generated using Clustal Omega, under default parameters and were visualized using GeneDoc. The conserved TM8 Arg residues of vertebrate MCT1 and MCT4 are marked in red. **c** L-[14 C]Lactate (1 μ M) and L-[3 H]OPro (0.2 μ M) uptake via hMCT1-WT and -R313Q compared to controls (water-injected oocytes). Oocytes were incubated for 10 min (L-[14 C]Lactate) or 15 min (L-[3 H]OPro) at 25 °C. Values represent the means $\pm$ S.E. from 3 independent experiments using a single batch of oocytes, each performed with 3–5 replicates. **d** Localization of hMCT1-WT and -R313Q in the oocyte membrane. Oocytes were treated with antibodies against hMCT1. **e, f** 3D structure models of hMCT1 (**e**) and hMCT4 (**f**) were generated by the homology modeling technique, and the TMs are numbered. Six templates were selected to model each protein: PDB accession numbers 1PW4, 4IU8, 4LDS, 3WDO, 4CL5, and 4J05 for the hMCT1 model and 1PW4, 3WDO, 4IU8, 4CL5, 4ZP0, and 4J05 for the hMCT4 model. **g** Homology model of hMCT1 superimposed upon the model of hMCT4. The putative substrate translocation pathways of the transporters are shown as sticks.



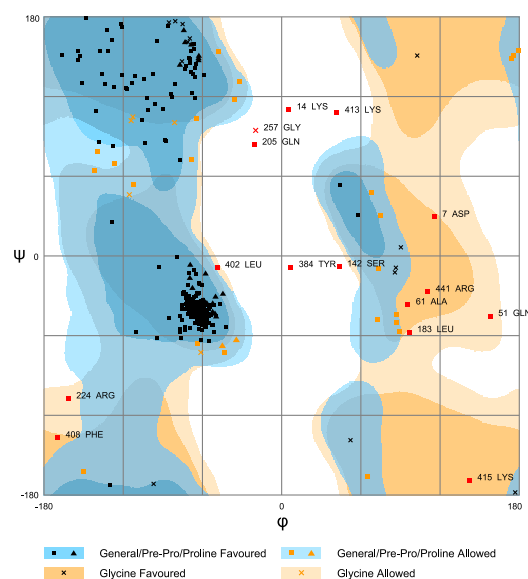
a



Number of residues in favoured region (~98,0% expected) : 443 (89,0%)
 Number of residues in allowed region (~2,0% expected) : 32 (6,4%)
 Number of residues in outlier region : 23 (4,6%)

RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www.crysol.jussieu.fr/~lovel/rampage/>
 Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.L.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002)
 Structure validation by C α geometry, ϕ/ψ and C β deviation, Proteins: Structure, Function & Genetics, 50: 437-450

b



Number of residues in favoured region (~98,0% expected) : 418 (90,3%)
 Number of residues in allowed region (~2,0% expected) : 30 (6,5%)
 Number of residues in outlier region : 15 (3,2%)

RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www.crysol.jussieu.fr/~lovel/rampage/>
 Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.L.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002)
 Structure validation by C α geometry, ϕ/ψ and C β deviation, Proteins: Structure, Function & Genetics, 50: 437-450

Fig. 2-3. Structural parameters for hMCT1 and hMCT4. Ramachandran plot analysis using RAMPAGE was performed to predict the stereochemical quality of the homology models of hMCT1 (a) and hMCT4 (b).

観察された hMCT1, 4 間の基質選択性の違いを説明するために、ホモロジーモデリング法およびドメイン解析を用いて hMCT1, 4 の基質輸送経路の差異に着目することとした。Quistgaard らによれば、MFS トランスポーターは全て共通の折り畳み構造を有することが明らかとなっている [111]。hMCTs は MFS に属しているため、hMCT1, 4 は 3 次元構造既知の MFS トランスポーターと同様の折り畳み構造を形成していると予想される [112]。そこで筆者は、Phyre2 を利用して hMCT1, 4 の 3 次元ホモロジーモデルを構築し [89]、さらに 3Drefine を用いて得られたモデルのエネルギー最小化を行った (Fig. 2-2e, f) [98]。hMCT1 ホモロジーモデルの TM6 は完全な α ヘリックスとしてモデル化されなかったものの、これらのホモロジーモデルは MFS トランスポーターに特徴的な 12 本の膜貫通ヘリックスを有していた [112]。hMCT1, 4 ホモロジーモデルの立体化学的な妥当性を評価するため、RAMPAGE を利用し Ramachandran プロット解析を行った (Fig. 2-3) [99]。その結果、hMCT1, 4 ホモロジーモデル上のほとんどの残基が立体的に許容されていることが明らかとなったため (hMCT1, 95%; hMCT4, 97%)、得られたモデルは以後の構造生物学的解析に利用可能であることが示された。さらに筆者は、Conserved Domain Database の情報に基づいて、それぞれ 51 アミノ酸残基からなる hMCT1, 4 の基質輸送経路を推定した (Fig. 2-2g) [100, 101]。なお、基質輸送経路を形成する残基は、さきの Ramachandran プロット解析において全て favored region 内に示されていた (Fig. 2-3)。

2.3.2 hMCT1, 4 単一変異体の基質輸送能

hMCT1, 4 の基質特異性に関与するアミノ酸残基を同定するために、筆者は推定基質輸送経路を構成する hMCT1, 4 間で保存されていない残基に着目した。その結果、**Fig. 2-4** および **Table 2-4** に示すように、hMCT1, 4 に対してそれぞれ 20 個の残基が抽出された。

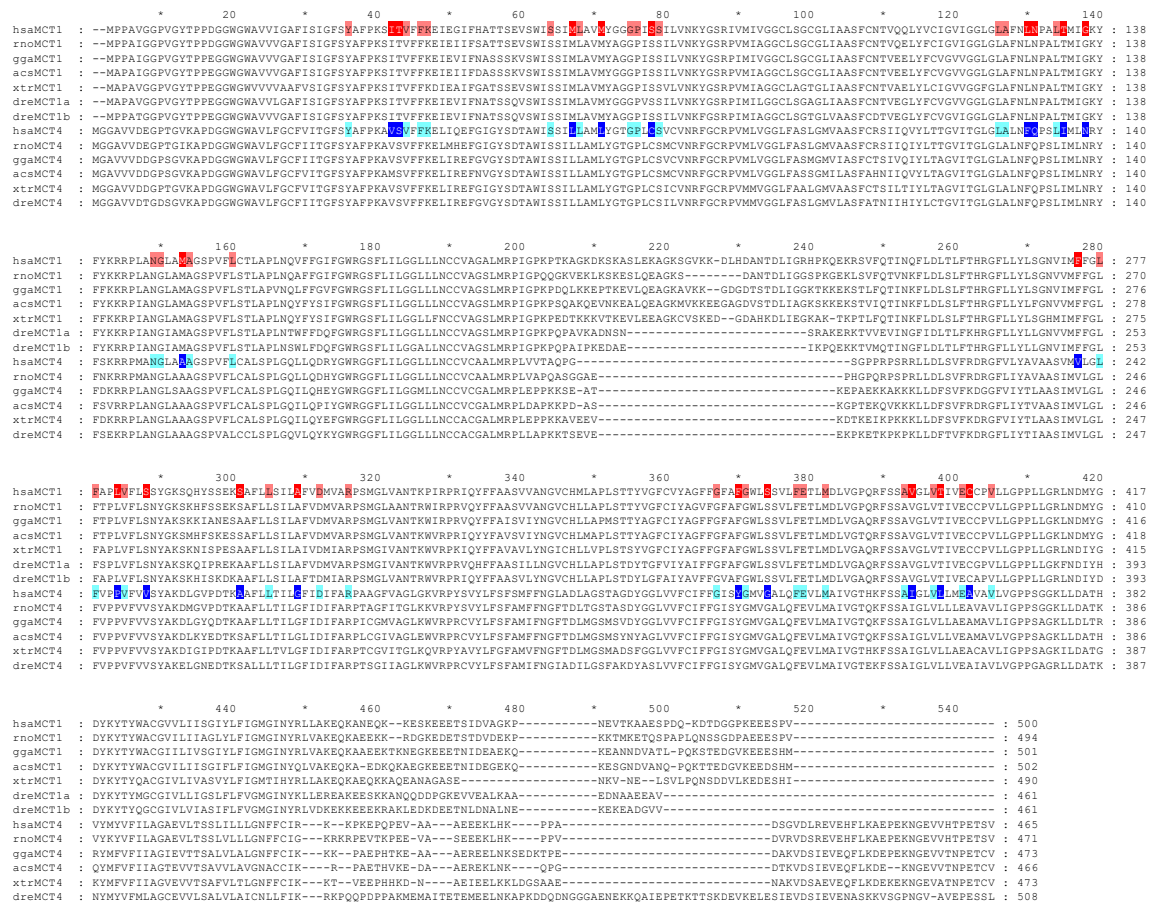


Fig. 2-4. Protein sequence alignment of vertebrate MCT1 and MCT4. Multiple protein sequence alignments were performed between vertebrate MCT1 and MCT4 (hsa, human; rno, rat; gga, chicken; acs, green anole; xtr, western clawed frog; dre, zebrafish). Alignments were generated using Clustal Omega, under default parameters, and were visualized using GeneDoc. The putative substrate translocation pathways of hMCT1 and hMCT4 are marked in colors: *pink*, conserved residues (hMCT1); *red*, non-conserved residues (hMCT1); *cyan*, conserved residues (hMCT4); *blue*, non-conserved residues (hMCT4).

Table 2-4. Amino acid residues associated with putative substrate translocation pathways.

hMCT1	TM	hMCT4	hMCT1	TM	hMCT4
Ile40	1	Val42	Phe274	7	Val239
Thr41	1	Ser43	Leu281	7	Pro246
Met65	2	Leu67	Ser285	7	Val250
Met69	2	Leu71	Ser298	8	Ala263
Ser76	2	Cys78	Ala306	8	Gly271
Leu128	4	Phe130	Phe367	10	Tyr332
Asn129	4	Gln131	Ser371	10	Gly336
Thr133	4	Ile135	Val391	11	Ile356
Gly136	4	Asn138	Thr395	11	Leu360
Met151	5	Ala153	Cys399	11	Ala364

The Conserved Domain Database was searched for putative substrate translocation pathways in hMCT1 and hMCT4, using CD-search. Alignments were generated using Clustal Omega, under default parameters. TM, transmembrane domain

そこで、hMCT1, 4 間で保存されていない残基を置換した変異体を作製し、その基質選択性の変動するか検証した。まず、L-乳酸および L-OPro を用いて hMCT1 変異体の輸送活性を評価した (**Fig. 2-5a**)。L-乳酸輸送活性は F274V, L281P および F367Y 変異体において有意に低下した一方、L-OPro 輸送活性は M69L, L281P, F367Y および T395L 変異体において有意に低下した。また、免疫組織化学染色により hMCT1 変異体の細胞膜への局在も確認した (**Fig. 2-6a**)。L281P 変異体については膜発現の低下が認められたものの、その他全ての hMCT1 変異体は細胞膜において正常に発現することが確認された。これらの結果から、M69, F274, F367 および T395 残基が基質のトランスロケーションに関与しているか、変異させた後の残基がこの過程を妨げることが示唆された。その一方で、L281 残基は hMCT1 の細胞膜への正常なトラフィックに関与する可能性が示された。基質選択性の変動を解析するために、L-OPro と L-乳酸の初期取り込みクリアランス比 ($CL_{L-OPro}/CL_{L-Lactate}$) を算出した (**Fig. 2-5b**)。取り込みクリアランス比は M69L および F367Y 変異体において著しく減少したため、M69 および F367 残基が基質選択性において重要な役割を果たすことが示された。次に、さきの hMCT1 変異体に対応する hMCT4 変異体の基質輸送活性を調べた (**Fig. 2-5c**)。hMCT4 変異体の L-乳酸輸送活性は、L67M, F130L, Q131N, V239F, P246L, V250S, G271A, G336S, L360T および A364C 変異体において有意に減少した。その一方で、hMCT1-M69L, -F367Y 変異体に対応する hMCT4-L71M, -Y332F 変異体をはじめ、全ての hMCT4 変異体において L-OPro 輸送活性は検出されなかった。また、P246L 変異体を除く全ての hMCT4 変異体において正常な細胞膜への局在が観察された (**Fig. 2-6b**)。これらの結果から、hMCT4 の P246 残基 (hMCT1 では L281 残基に相当) が、細胞膜への適切なタンパク質トラフィックに重要であることが示唆された。

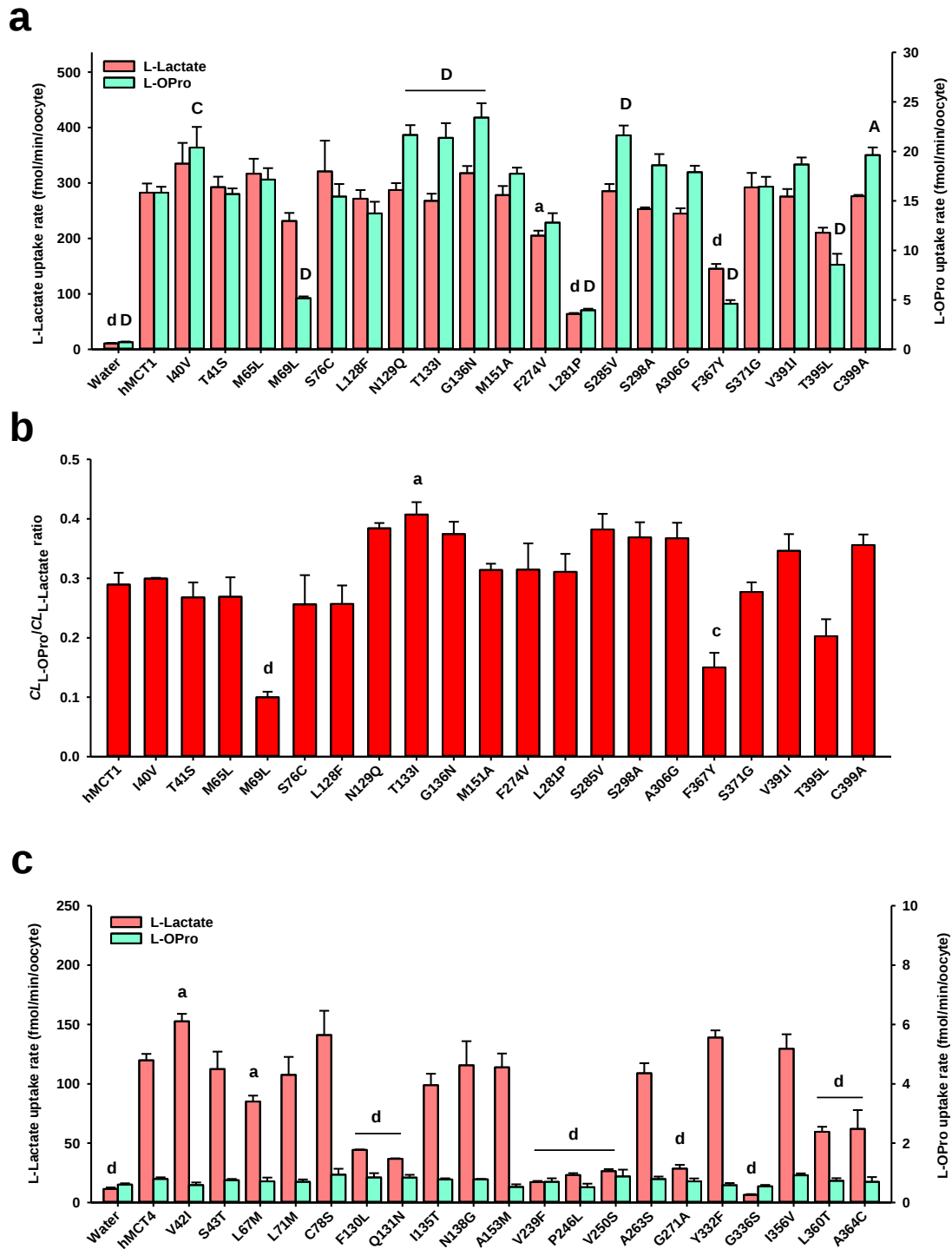


Fig. 2-5. M69 and F367 are key molecular determinants of substrate specificity in hMCT1. **a** L- 14 C]Lactate (1 μ M) and L- 3 H]OPro (0.2 μ M) uptake by the substitution mutants of hMCT1. Oocytes were incubated for 10 min (L- 14 C]Lactate) or 15 min (L- 3 H]OPro) at 25 $^{\circ}$ C. ^a, $p < 0.05$; ^d, $p < 0.001$ versus WT (L-lactate), and ^A, $p < 0.05$; ^C, $p < 0.005$; ^D, $p < 0.001$ versus WT (L-OPro). **b** Normalized L-OPro initial uptake clearance ($CL_{L-OPro}/CL_{L-Lactate}$) for the substitution mutants of hMCT1. Transporter-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in water-injected oocytes from the uptake in cRNA-injected oocytes. ^a, $p < 0.05$; ^c, $p < 0.005$; ^d, $p < 0.001$ versus WT. **c** L- 14 C]Lactate (1 μ M) and L- 3 H]OPro (0.2 μ M) uptake by the substitution mutants of hMCT4. Oocytes were incubated for 10 min (L- 14 C]Lactate) or 15 min (L- 3 H]OPro) at 25 $^{\circ}$ C. ^a, $p < 0.05$; ^d, $p < 0.001$ versus WT (L-lactate). Values represent the means $\pm$ S.E. from 3–12 independent experiments using different batches of oocytes, each performed with 3–5 replicates.

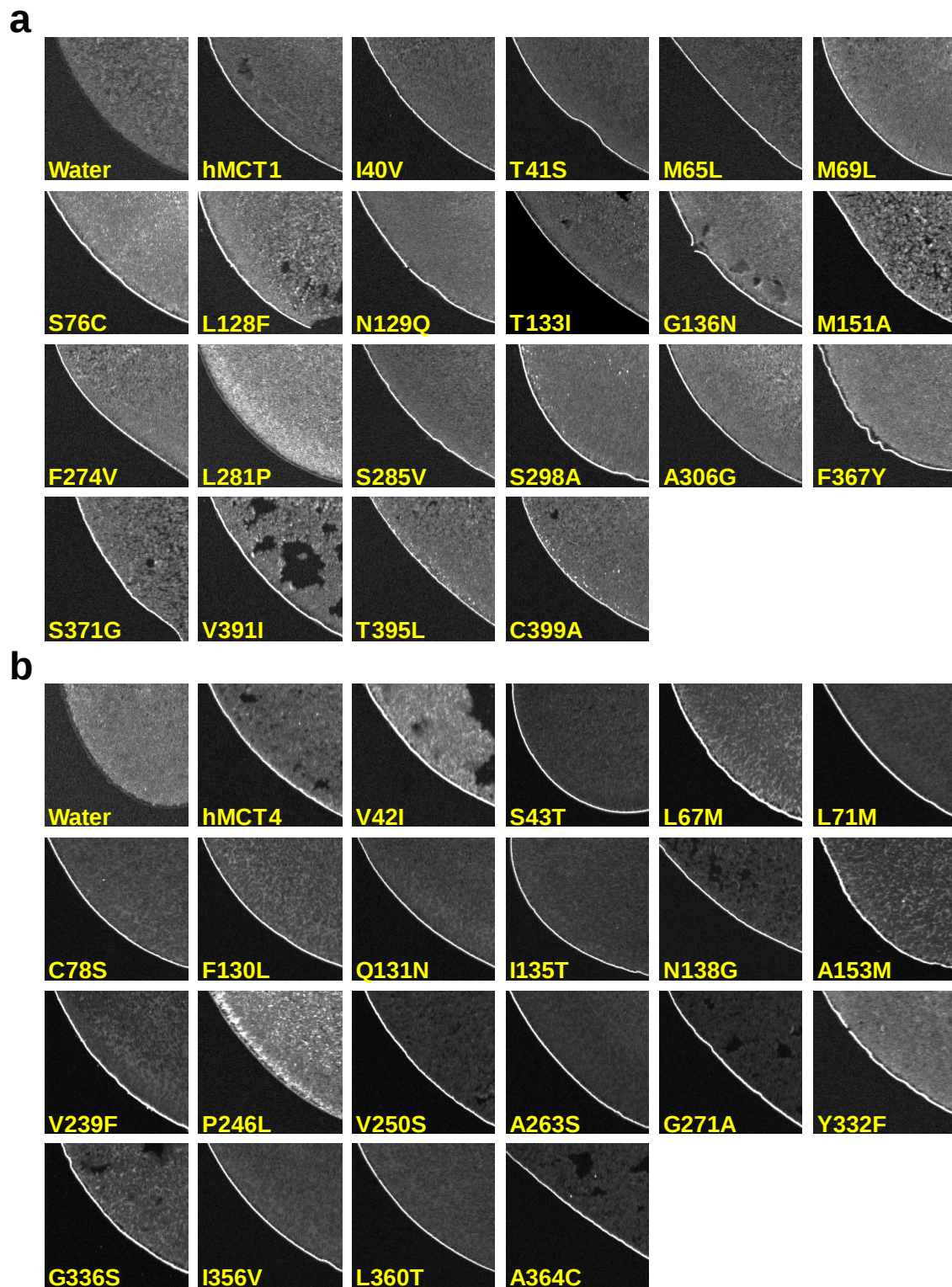


Fig. 2-6. Membrane localization of hMCT1 and hMCT4 single mutants. Localization of the substitution mutants of hMCT1 (**a**) and hMCT4 (**b**) in the oocyte membrane. Oocytes were treated with antibodies against hMCT1 and hMCT4.

2.3.3 hMCT1, 4 多重変異体の基質輸送能

単一変異導入の結果に基づき、筆者は hMCT1 の多重変異体 (double, M69L/F367Y; novemdecuple, I40V/T41S/M65L/M69L/S76C/L128F/N129Q/T133I/G136N/M151A/F274V/S285V/S298A/A306G/F367Y/S371G/V391I/T395L/C399A) および hMCT4 の多重変異体 (double, L71M/Y332F; undecuple, V42I/S43T/L67M/L71M/C78S/I135T/N138G/A153M/A263S/Y332F/I356V) を構築し、その L-乳酸および L-OPro 輸送活性を評価した (Fig. 2-7a)。なお、多重変異導入については、単一変異導入実験にてその L-乳酸輸送活性が大きく低下 ($p < 0.001$) しなかった変異箇所を選択した (ただし、基質選択性に関わっていた hMCT1-F367Y については例外とした)。hMCT1-M69L/F367Y の L-乳酸輸送活性は hMCT1-WT と比較しておよそ 50% 残存していたのに対し、L-OPro 輸送活性はほぼ完全に消失した。その一方で、対応する hMCT4 二重変異体 (hMCT4-L71M/Y332F) は、hMCT4-WT とほぼ同程度の L-乳酸輸送活性を示したが、L-OPro 輸送活性は示さなかった。これらの結果は、さきの単一変異導入の結果と一致している (Fig. 2-5a, c)。さらに、hMCT1 の novemdecuple 変異体および hMCT4 の undecuple 変異体は基質輸送活性を全く示さなかった (Fig. 2-7a)。

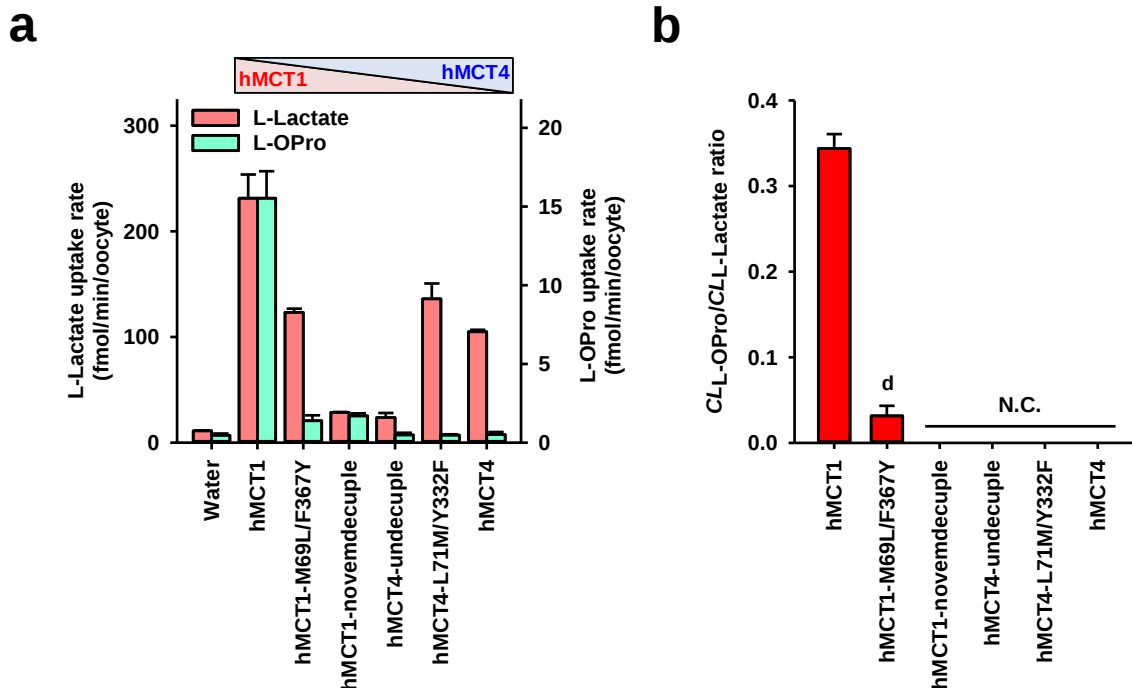
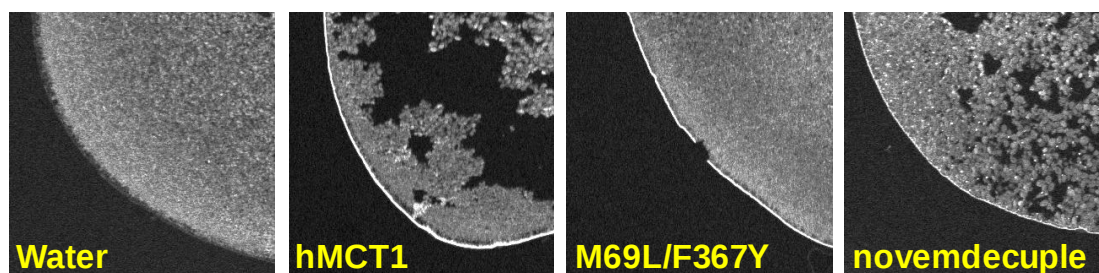


Fig. 2-7. Substrate transport by the multiple mutants of hMCT1 and hMCT4. **a** L - $[^{14}C]$ Lactate (1 μ M) and L - $[^3H]$ OPro (0.2 μ M) uptake by the multiple mutants of hMCT1 and hMCT4. Oocytes were incubated for 10 min (L - $[^{14}C]$ Lactate) or 15 min (L - $[^3H]$ OPro) at 25 °C. **b** Normalized L -OPro initial uptake clearance ($CL_{L-OPro}/CL_{L-Lactate}$) of the multiple mutants of hMCT1 and hMCT4. Transporter-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in water-injected oocytes from the uptake in cRNA-injected oocytes. N.C., not calculated; ^d, $p < 0.001$ versus hMCT1-WT. Values represent the means $\pm$ S.E. from 3–6 independent experiments using different batches of oocytes, each performed with 3–5 replicates.

そこで、作製した多重変異体の細胞膜上への発現を評価した (Fig. 2-8)。hMCT1 の novemdecuple 変異体はその膜発現が減弱していたものの、その他の多重変異体については適切な細胞膜への局在が観察された。これらの結果と、多重変異体に導入された変異のうち、hMCT1-M69L, -F367Y 以外の単一変異導入は基質輸送活性にほとんど影響を与えなかった結果とを併せて考えると (Fig. 2-5a, c)、本検証で多重変異が導入された部位の元の残基が協調的に働くことで、hMCT1, 4 を介した基質輸送を調節することが示された。同様に、単一変異導入では膜発現が変動しなかった変異を全て導入した hMCT1 多重変異体においてその膜発現に変動が認められたことから (Fig. 2-6, 2-8)、多重変異が導入された部位の元の残基が協調的に働くことで、hMCT1 の細胞膜への発現が調節されることが示された。次に、基質選択性の変動を検証するため、 $CL_{L-OPro}/CL_{L-Lactate}$ 値を算出した (Fig. 2-7b)。取り込みクリアランス比は hMCT1-M69L/F367Y において顕著に低下し、単一変異導入で得られていたデータとの整合性が得られた (Fig. 2-5b)。

a



b

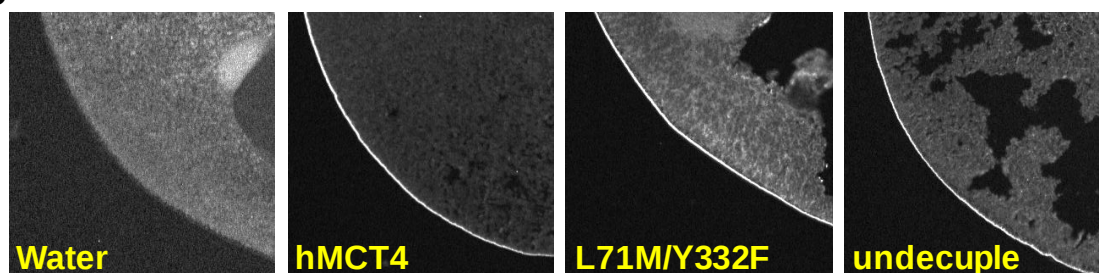


Fig. 2-8. Membrane localization of hMCT1 and hMCT4 multiple mutants. Localization of the substitution mutants of hMCT1 (a) and hMCT4 (b) in the oocyte membrane. Oocytes were treated with antibodies against hMCT1 and hMCT4.

2.3.4 hMCT1, 4 変異体を介した L-乳酸輸送の速度論解析

これまでの検証で、hMCT1 に存在する基質選択性に関わる M69 および F367 残基 (hMCT4 での L71 および Y332 残基に相当) を同定した。これらの残基と hMCT1, 4 の輸送機能との関連について更なる知見を得るため、hMCT1, 4 への変異導入がその阻害特性に与える影響について検証した。まず、hMCT1-M69L, -F367Y, -M69L/F367Y を介した L-[¹⁴C]乳酸輸送に対する L-乳酸および L-OPro の阻害能を評価した (Fig. 2-9a-c)。その結果、M69L 変異体の L-乳酸および L-OPro に対する K_i 値は hMCT1-WT と比して 2 倍に増大し、また F367Y 変異体に関しては L-乳酸については 2 倍、L-OPro については 4 倍の K_i 値増大を認めた (Table 2-5)。さらに、M69L/F367Y 変異体の L-乳酸および L-OPro に対する K_i 値は、それぞれ 6 倍および 13 倍に増大した (Table 2-5, 2-6)。これらの結果から、hMCT1 の M69 および F367 残基は基質への親和性を調節する残基として機能することが示された。また、基質選択性の変動の指標として阻害定数比 ($K_{i, \text{L-OPro}}/K_{i, \text{L-Lactate}}$) および輸送サイクル比 ($k_{\text{cat, L-OPro}}/k_{\text{cat, L-Lactate}}$) を算出した。両指標は K_i 値または k_{cat} 値の比であるため統計学的な比較を行うことはできないが、F367Y 変異体の阻害定数比は hMCT1-WT と比較して増大し、M69L 変異体の輸送サイクル比は hMCT1-WT と比較して低下した (Table 2-5)。

Table 2-5. Inhibition kinetics of L-[¹⁴C]lactate uptake by hMCT1 and hMCT4 mutants.

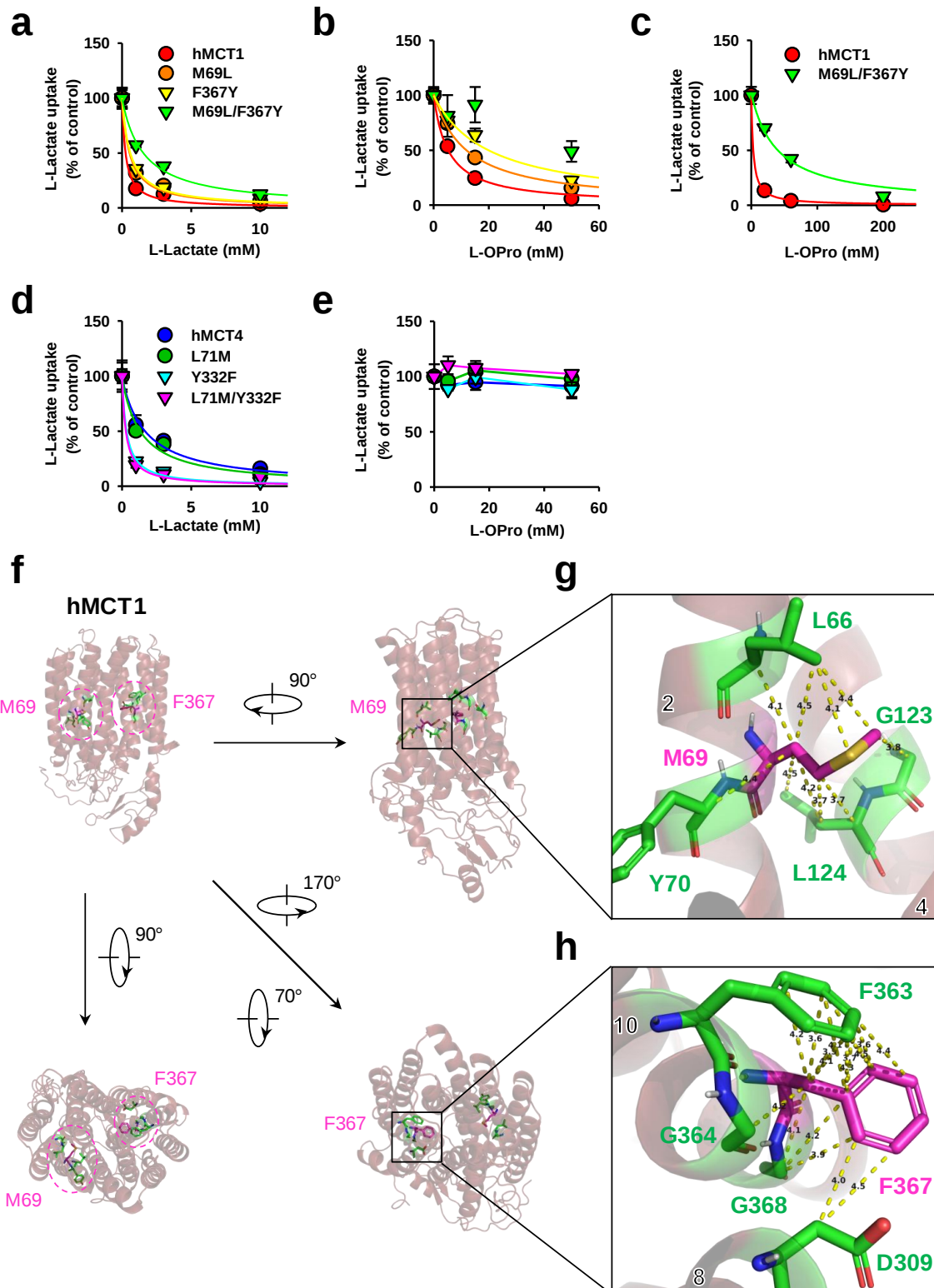
	$K_{i, \text{L-Lactate}}$ mM	$K_{i, \text{L-OPro}}$ mM	$CL_{\text{L-OPro}}/CL_{\text{L-Lactate}}$	$K_{i, \text{L-OPro}}/K_{i, \text{L-Lactate}}$	$k_{\text{cat, L-OPro}}/k_{\text{cat, L-Lactate}}$
hMCT1	0.26 ± 0.03	5.3 ± 0.6	(0.29 ± 0.02)	21	6.0
M69L	0.54 ± 0.03	11.7 ± 1.3 ^b	(0.10 ± 0.01)	22	2.1
F367Y	0.60 ± 0.05	20.2 ± 1.4 ^d	(0.15 ± 0.02)	34	5.0
M69L/F367Y	1.6 ± 0.3 ^d	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
hMCT4	1.9 ± 0.4	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
L71M	1.4 ± 0.2	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Y332F	0.33 ± 0.04 ^c	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
L71M/Y332F	0.27 ± 0.03 ^c	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.

The K_i values for each of the shown inhibitors were obtained from data presented in Fig. 2-9a, b, and d and the $CL_{\text{L-OPro}}/CL_{\text{L-Lactate}}$ values were taken from data presented in Fig. 2-5b. The $K_{i, \text{L-OPro}}/K_{i, \text{L-Lactate}}$ and $k_{\text{cat, L-OPro}}/k_{\text{cat, L-Lactate}}$ values were then calculated. Kinetic data were analyzed, as described in the "Materials and methods" section. The presented K_i parameters represent the means ± S.E. from 3 independent experiments. N.C., not calculated; ^b, $p < 0.01$; ^c, $p < 0.005$; ^d, $p < 0.001$ versus WT.

Table 2-6. Inhibition kinetics of L-[¹⁴C]lactate uptake by hMCT1-M69L/F367Y.

	$K_{i, \text{L-Lactate}}$ mM	$K_{i, \text{L-OPro}}$ mM	$CL_{\text{L-OPro}}/CL_{\text{L-Lactate}}$	$K_{i, \text{L-OPro}}/K_{i, \text{L-Lactate}}$	$k_{\text{cat, L-OPro}}/k_{\text{cat, L-Lactate}}$
hMCT1	(0.26 ± 0.03)	3.0 ± 0.4	(0.34 ± 0.02)	12	4.1
M69L/F367Y	(1.6 ± 0.3)	39.5 ± 3.4 ^d	(0.032 ± 0.012)	24	0.76

The K_i values for each of the shown inhibitors were obtained from data presented in Table 2-5 and Fig. 2-9c and the $CL_{\text{L-OPro}}/CL_{\text{L-Lactate}}$ values were taken from data presented in Fig. 2-7b. The $K_{i, \text{L-OPro}}/K_{i, \text{L-Lactate}}$ and $k_{\text{cat, L-OPro}}/k_{\text{cat, L-Lactate}}$ values were then calculated. Kinetic data were analyzed, as described in the "Materials and methods" section. The presented K_i parameters represent the means ± S.E. from 3 independent experiments. ^d, $p < 0.001$ versus WT.



<Fig. 2-9. Characterization of the inhibitory kinetics of L-lactate transport by hMCT1 and hMCT4 mutants. **a-e** L-¹⁴C]Lactate (1 μ M) uptake by hMCT1 (**a, b, c**) and hMCT4 (**d, e**) mutants in the presence of unlabeled L-lactate (**a, d**) or L-OPro (**b, c, e**). Oocytes were incubated for 10 min at 25 °C. Data are expressed as % of control (absence of competitor) after the subtraction of uptake into water-injected oocytes. Values represent the means $\pm$ S.E. from 3 independent experiments, each performed with 3–5 replicates. Each experiment shown in the panels, **a-e** was performed using a single batch of oocytes. **f** 3D structure models of hMCT1 with the M69 and F367 residues (magenta) and their neighboring residues (green). **g, h** Interactions between the key residues involved in substrate specificity (M69 [**g**] and F367 [**h**]) and their neighboring residues (distances in Å). The helices are numbered as shown in Fig. 2-2e.

さらに M69L/F367Y については阻害定数比の増大と輸送サイクル比の低下の両方が認められたことから、単一変異導入で得られていたデータとの整合性が得られた (Table 2-6)。

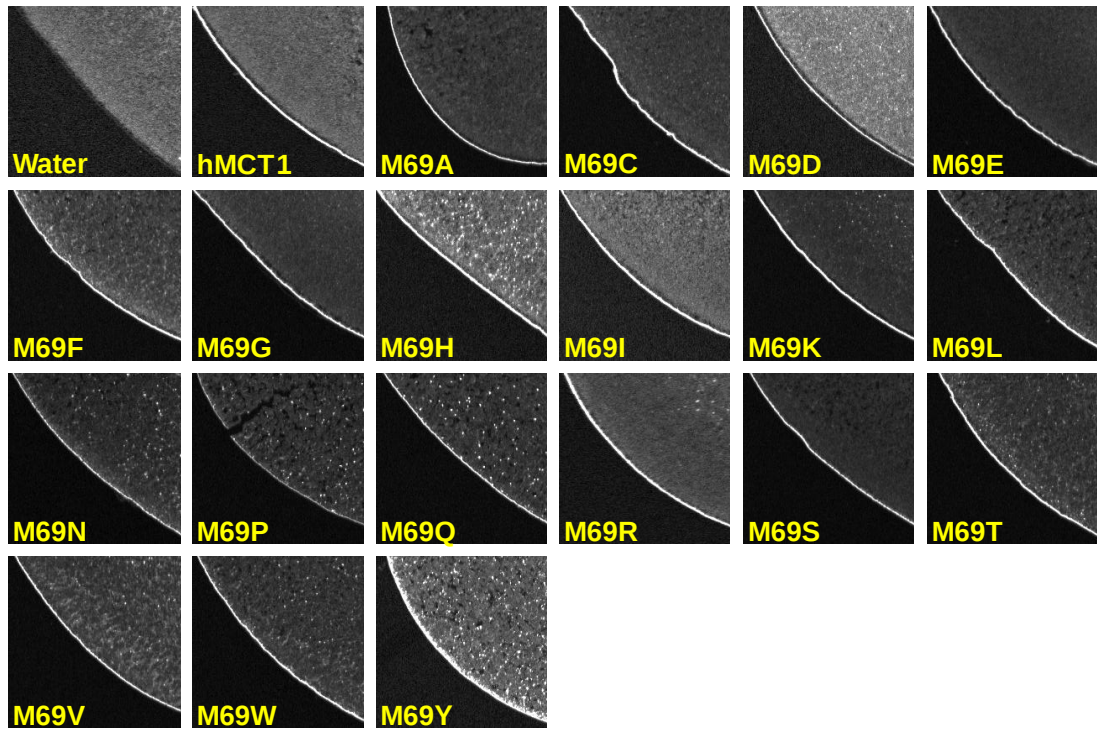
これらの結果から、hMCT1 の基質選択性が輸送サイクル (M69) および基質親和性 (F367) に関与する残基によって調節されていることが示された。hMCT1 変異体に関する検証と同様に、対応する hMCT4 変異体 (L71M, Y332F および L71M/Y332F) について阻害特性を評価した (Fig. 2-9d, e)。Y332F および L71M/Y332F 変異体の L-乳酸に対する K_i 値は hMCT4-WT と比しておよそ 1/6 に減少した (Table 2-5)。これは、対応する hMCT1-F367Y, -M69L/F367Y 変異体において L-乳酸に対する K_i 値が hMCT1-WT と比して増大していた結果と整合性がある。しかしながら、L-乳酸に対する K_i 値について L71M 変異体と hMCT4-WT との間に統計学的に有意な差は認められなかった。さらに、hMCT4-WT と同様に hMCT4 変異体においても L-OPro による阻害効果は認められなかった (Fig. 2-9e)。これは、hMCT4 変異体に L-OPro 輸送活性が認められなかったというさきの結果と一致する (Fig. 2-5c, 2-7a)。

基質選択性への関与が示された M69 および F367 残基とその近傍の残基との間の相互作用を視覚化するため、両残基の hMCT1 ホモロジーモデル上での空間的配置を確認した。その結果、M69 および F367 の側鎖は推定基質輸送経路に面しており (Fig. 2-2g, 2-9f)、近傍の領域と疎水性相互作用 ($\leq 4.5\text{\AA}$) を形成し得ることが明らかとなった (Fig. 2-9g, h)。TM2 に存在する M69 の側鎖は、L66 および Y70 (TM2) 残基ならびに G123 および L124 (TM4) 残基と疎水性相互作用を形成し得ることが示された (Fig. 2-9g)。また、TM10 に存在する F367 の側鎖とは、4 つの残基 (TM8 の D309 ならびに TM10 の F363, G364 および G368) がそれぞれ疎水性相互作用を形成することが示唆された (Fig. 2-9h)。M69L 変異体で認められた輸送サイクル比の変動ならびに F367Y 変異体で認められた基質親和性の変動は、これらの残基とその近傍の残基との間の疎水性相互作用の破壊によって引き起こされる可能性が示された。

2.3.5 hMCT1 の 69 番目および 367 番目のアミノ酸残基が基質選択に果たす役割

M69 および F367 残基のどのような物理化学的性質が hMCT1 の基質輸送および選択性に影響を与えるのか検証するために、これらの残基に飽和変異 (M69X および F367X) を導入しその L-乳酸および L-OPro 輸送活性を評価した。M69P および F367P を除く全ての変異体で、細胞膜への正常な局在が確認された (Fig. 2-10)。M69P および F367P では膜発現の低下が認められたため、これらの残基に対する Pro への変異導入が hMCT1 タンパク質のミスフォールディングを引き起こしたと考えられる。M69X 変異体については、芳香族もしくは塩基性アミノ酸残基の導入により基質輸送活性が消失した (Fig. 2-11a, b)。特に、M69 の Lys への置換 (立体的に保存されているが Met よりも極性が高い) により基質輸送活性が消失したことから、M69 残基周辺の疎水的環境が基質輸送に重要であることが示唆された。残る全ての M69X 変異体には基質輸送活性が認められたものの、その $CL_{L-OPro}/CL_{L-Lactate}$ 値は hMCT1-WT と比較して有意に減少した (Fig. 2-11c)。これらの結果から、L-OPro の効率的な輸送には Met 側鎖の疎水的かつ長い直線構造が M69 残基の占める位置に必要であることが示された。また F367X 変異体については、hMCT1-WT よりはその輸送活性が低いものの、かさ高い脂肪族もしくは芳香族アミノ酸残基で置換した場合のみ L-乳酸を輸送するという明確な傾向が示された (Fig. 2-11d, e)。さらに、F367 を立体的に類似しているが塩基性の His 残基と置換した場合、その基質輸送活性は顕著に低下した。このことは、hMCT1 を介した基質輸送において F367 残基の占める部位の疎水的環境が重要であることを示している。このことは、他のかさ高い疎水性官能基と F367 側鎖のベンジル基を置換しても基質輸送能力が維持されることと矛盾しない。F367X 変異体の基質選択性の変動を検証するために、 $CL_{L-OPro}/CL_{L-Lactate}$ 値を算出した (Fig. 2-11f)。取り込みクリアランス比は全ての変異体において有意に低下したものの、F367L 変異体はその影響が比較的小さかった。これらの結果から、L-OPro の効率的な輸送には F367 残基の占める位置に γ 位で分岐した側鎖構造が必要であることが示された。

a



b

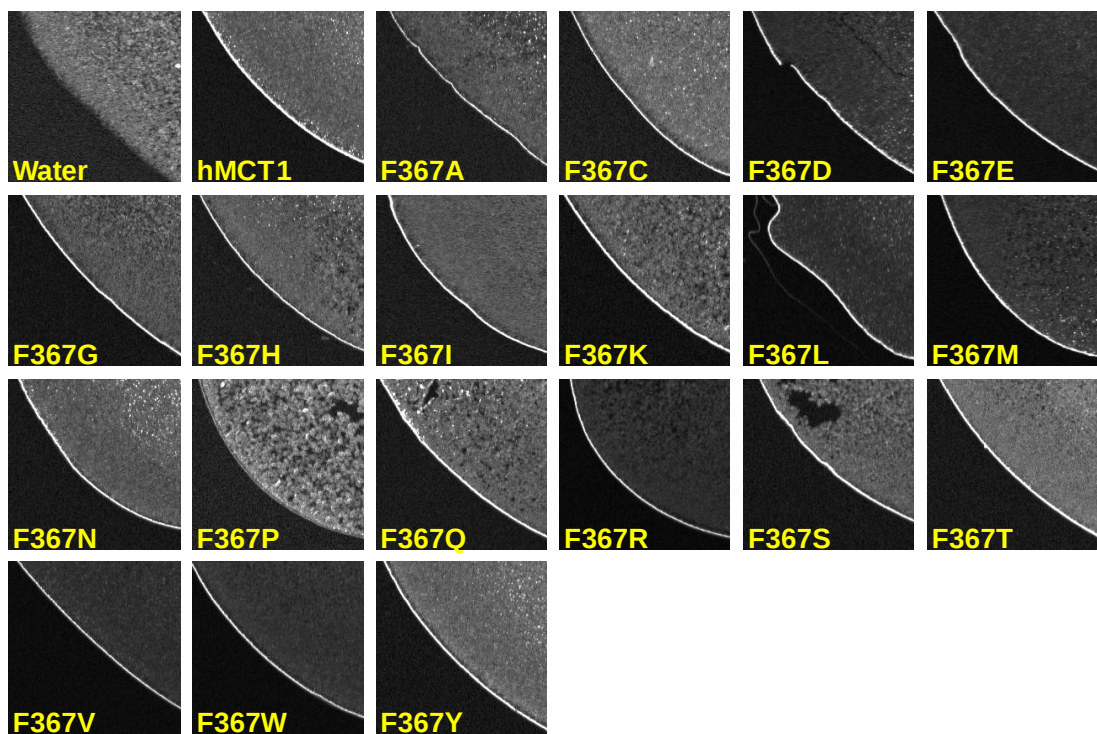


Fig. 2-10. Membrane localization of M69X and F367X mutants of hMCT1. Localization of M69X (a) and F367X (b) mutants of hMCT1 in the oocyte membrane. Oocytes were treated with antibodies against hMCT1.

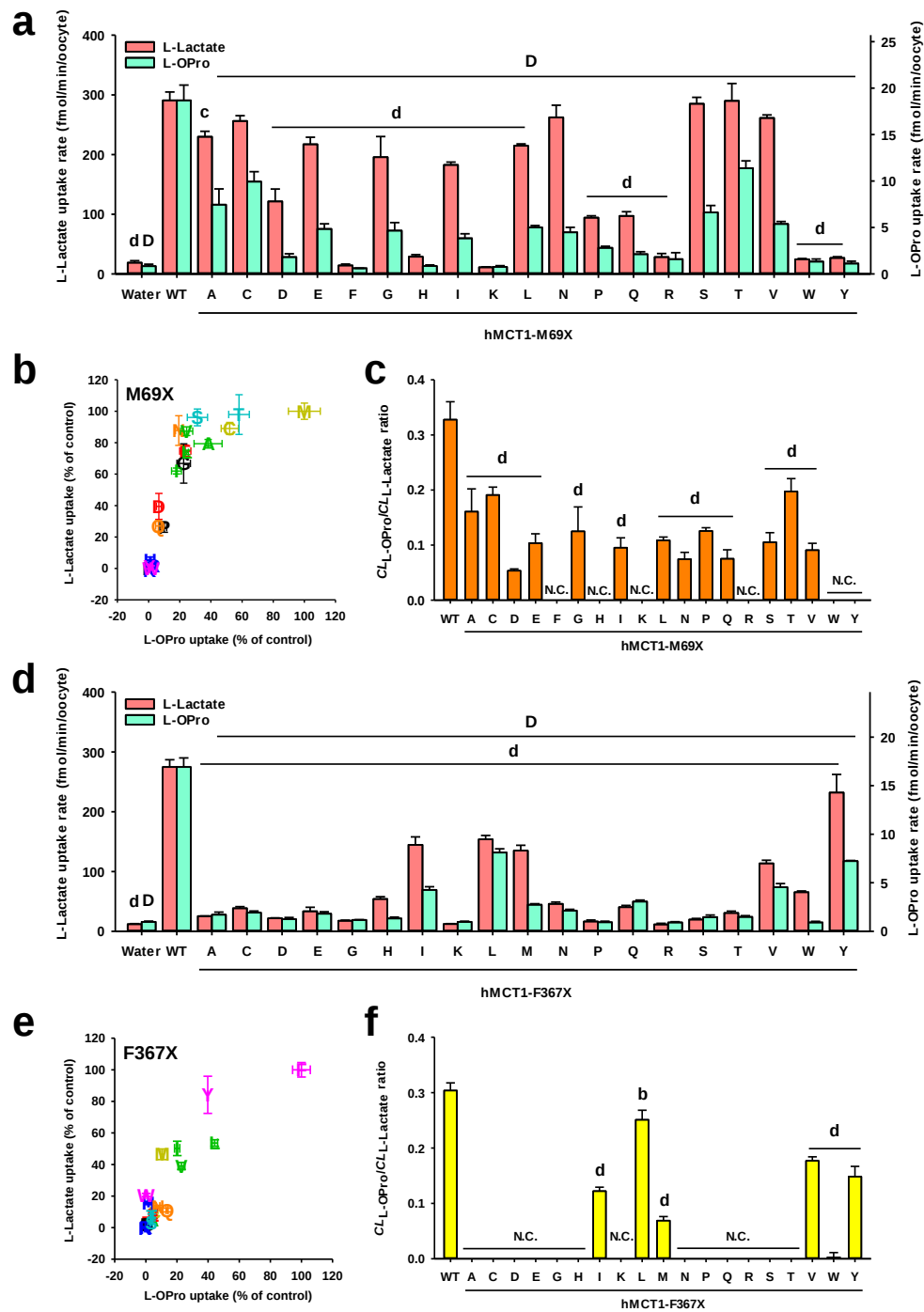


Fig. 2-11. The role of position 69 and 367 in determining the substrate specificity of hMCT1. **a, d** L - $[^{14}C]$ Lactate (1 μ M) and L - $[^3H]$ OPro (0.2 μ M) transport activity of M69X (**a**) and F367X (**d**) mutants of hMCT1. Oocytes were incubated for 10 min (L - $[^{14}C]$ Lactate) or 15 min (L - $[^3H]$ OPro) at 25 °C. ^c, $p < 0.005$; ^d, $p < 0.001$ versus WT (L -lactate), and ^D, $p < 0.001$ versus WT (L -OPro). **b, e** These data were taken from Fig. 2-11a and d. Data are expressed as % of control (hMCT1-WT) after the subtraction of uptake into water-injected oocytes. Different colors represent different amino acid characteristics: red, acidic; orange, amide; yellow, sulfur; green, aliphatic; cyan, hydroxy; blue, basic; magenta, aromatic; black, Gly/Pro. **c, f** Normalized L -OPro initial uptake clearance ($CL_{L-OPro}/CL_{L-Lactate}$) by the M69X (**c**) and F367X (**f**) mutants. Transporter-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in water-injected oocytes from the uptake in cRNA-injected oocytes. N.C., not calculated; ^b, $p < 0.01$; ^d, $p < 0.001$ versus WT. Values represent the means $\pm$ S.E. from 3–6 independent experiments using different batches of oocytes, each performed with 3–5 replicates.

2.3.6 hMCT1 変異体リガンドの構造親和性相関

hMCT1 とそのリガンド間の相互作用に与える M69L および F367Y 変異の影響について検証するため、hMCT1 と L-OPro 類縁体との結合親和性について評価した。Fig. 2-12a, b に CPC および (*R*)-3-oxocyclopentanecarboxylate (L-OCPC) の M69L および F367Y 変異体を介した L-[¹⁴C]乳酸輸送に対する阻害特性を示した。

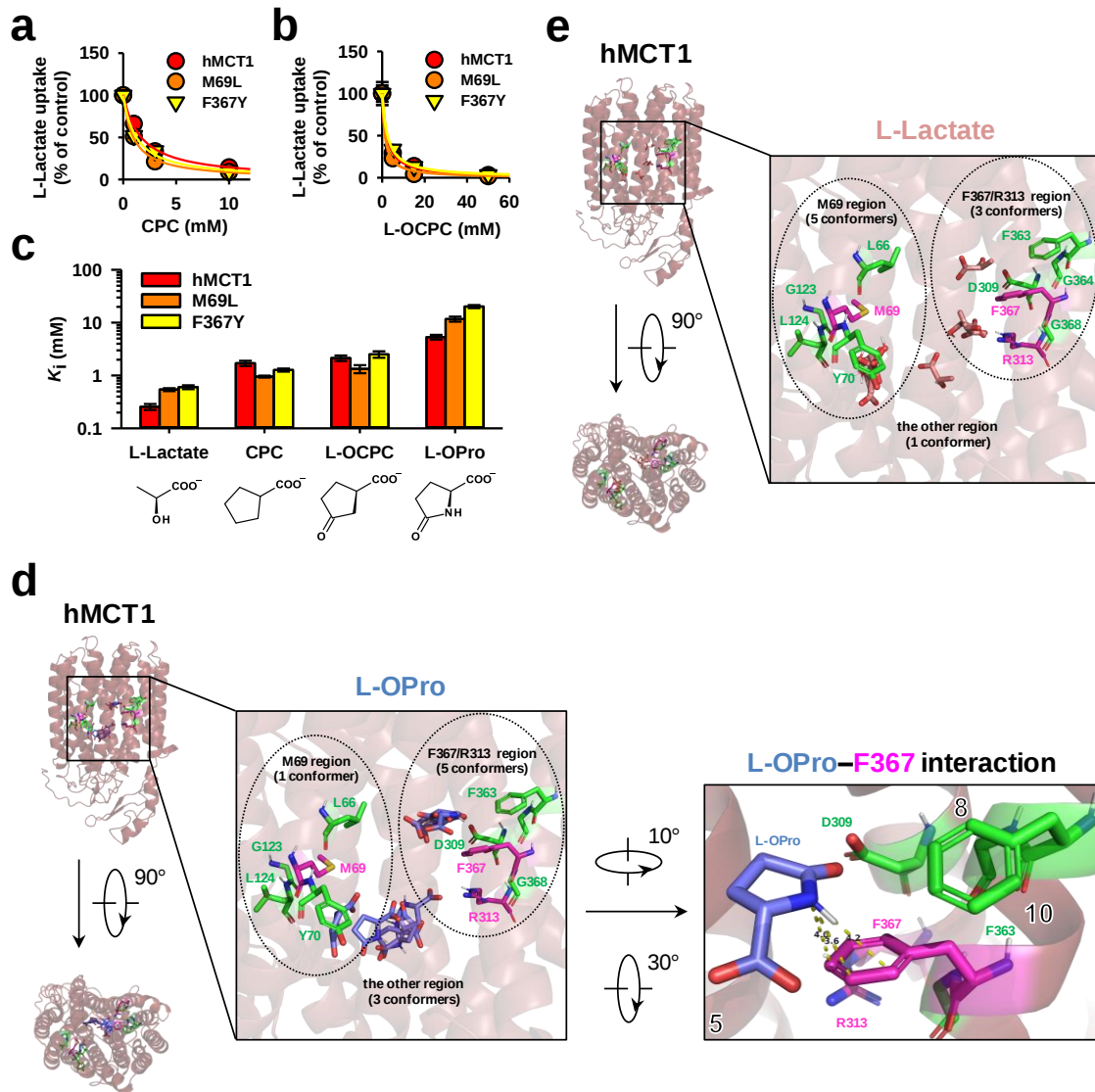


Fig. 2-12. Structure-affinity relationships of small monocarboxylates for hMCT1 mutants, M69L and F367Y. **a**, **b** L-[¹⁴C]Lactate (1 μ M) uptake by hMCT1 single mutants in the presence of CPC (**a**) or L-OCPC (**b**). Oocytes were incubated for 10 min at 25 °C. Data are expressed as % of control (absence of competitor) after the subtraction of uptake into water-injected oocytes. **c** K_i values of hMCT1 single mutants from radioligand competition assays with four different inhibitors are shown as bars. The K_i values for each of the shown inhibitors were obtained from data presented in Table 2-5 and Table 2-7. Values represent the means $\pm$ S.E. from 3 independent experiments, each performed with 3–5 replicates. Each experiment in the panels **a**, **b** was performed using a single batch of oocytes. **d**, **e** Docking poses of L-OPro (**d**) and L-lactate (**e**) into the substrate selection region in the 3D structure models of hMCT1 (distances in Å). The helices are numbered as shown in Fig. 2-2e.

Table 2-7. Inhibition kinetics of CPC and L-OCPC on L-lactate uptake by hMCT1 single mutants.

	K_i , CPC mM	K_i , L-OCPC mM
hMCT1	1.7 ± 0.2	2.1 ± 0.3
M69L	0.96 ± 0.04^a	1.3 ± 0.2
F367Y	1.3 ± 0.1^a	2.5 ± 0.4

The K_i values for each of the shown inhibitors were obtained from data presented in Fig. 2-12a and b. Kinetic data were analyzed, as described in the "Materials and methods" section. The presented K_i parameters represent the means $\pm$ S.E. from 3 independent experiments. ^a, $p < 0.05$ versus WT.

これらの化合物は M69L および F367Y 変異体の輸送活性を阻害したものの、その CPC および L-OCPC に対する K_i 値は hMCT1-WT と比較して増大しなかった (Table 2-7)。次に、L-OCPC および L-OPro の K_i 値の比較により、L-OPro の 1 位の窒素原子がリガンド認識に与える影響について評価した (Fig. 2-12c)。この窒素原子の炭素原子への置換により、M69L および F367Y 変異体のリガンドへの親和性が 8 倍以上増大することが示された。これらの結果から、M69 および F367 残基が L-OPro の $-\text{NH}-$ 構造の認識に関与していることが示唆された。さらに *in silico* ドッキングシミュレーション解析により、L-OPro と M69 および F367 残基の存在する領域との間に潜在的な相互作用が確認された (Fig. 2-12d)。特に、解析で得られた L-OPro の配座異性体のうちの 1 つについては、そのアミド窒素原子と F367 残基の芳香族炭素原子との間に相互作用が存在する可能性が示された。また、hMCT1-WT, -M69L, -F367Y の CPC および L-OCPC に対する K_i 値は類似していたため (2 倍未満; Fig. 2-12c)、L-OPro のカルボニル基は hMCT1 との相互作用にほとんど関与しないことが示唆された。さらに、hMCT1 変異体の L-乳酸および CPC に対する K_i 値の比較により、母核構造の剛直化ならびに β 位酸素原子の炭素原子への置換によるリガンド認識性への影響について評価した。L-乳酸から CPC への構造変換により、hMCT1-WT のリガンドへの親和性がおよそ 1/7 に減少した。これらの結果から、L-乳酸のフレキシブルかつ極性を有する構造への認識には M69 および F367 残基が重要であることが示唆された。この可能性は、L-乳酸と M69 および F367 残基間の潜在的な相互作用が示された *in silico* ドッキングシミュレーションの結果によっても支持された (Fig. 2-12e)。

2.4 考察

本章では、hMCT1, 4 の部位特異的変異導入株の基質輸送能を評価することで、その基質選択性の調節に関わる残基の同定を目指した。hMCT1, 4 は SLC16A ファミリーに属しており、その共通の基質として L-乳酸を輸送する。しかしながら、その基質選択性には違いも認められており、特にグルタミン酸誘導体である L-OPro は hMCT1 によって輸送されるのに対し、hMCT4 によっては輸送されない。先行研究において、齧歯類 MCT1 の TM4/5loop および TM10 がその基質選択性に関わることを示すいくつかの証拠がある。例えば、Galić らは TM4/5loop 中の K142 および R143 残基が rat MCT1 の立体選択性に関わることを報告している [73]。さらに、齧歯類 MCT1 への F360C 変異導入によりその基質としてメバロン酸を輸送するようになることも知られている [22, 59]。この齧歯類 MCT1 の F360 残基は hMCT1 の F367 残基に対応しており、この残基は本研究において基質選択性に関わることが見出された。最近、TM2, TM4 および TM5 の特定の残基 (hMCT10 の S121, Y184 および T207 に対応) が hMCT8, 10 の基質選択性に重要であるという報告もなされた [82]。これらの研究に基づき、筆者は hMCT1, 4 の基質輸送経路を構成するアミノ酸残基の違いが、その基質選択性を決定するとの仮説を立てた。hMCT1 介在性 L-OPro 輸送に必須なアミノ酸残基を同定するために、部位特異的変異導入法を用いて hMCT1, 4 の推定基質輸送経路を構成するアミノ酸残基を他方の対応する残基に置換した変異体を作製し、その基質輸送能を評価した。本検証の過程で筆者は、その基質輸送活性が低下するいくつかの変異体を同定した。それらの変異体のうち、hMCT1-L281P, hMCT4-V239F, -V250S, -G336S は rat MCT1, 4 (rat MCT1-L274P, rat MCT4-V243F, -V254S, -G340S) においても低活性であることが既に報告されている [81]。また Stäubli らは、アフリカツメガエル卵母細胞ならびにヒト HEK293T 細胞を用いた hMCT12 発現系を利用して、hMCT12-S158P を介したクレアチン輸送が WT と比較して減少することを示した [113]。hMCT12 の S158 残基は hMCT1 の N129 残基、hMCT4 の Q131 残基に対応するので、hMCT4-Q131N 変異体で認められた L-乳酸輸送活性の低下は合理的な結果であるといえる。さらに筆者は、hMCT1, 4 の推定基質輸送経路を構成するそれぞれ 20 残基の中で、L-OPro 輸送に対して最も重要な役割を果たす 2 つのアミノ酸残基 (M69^{TM2} および F367^{TM10}) を同定した。これらの残基への二重変異導入により、hMCT1 の L-OPro 輸送能はほとんど失われることが明らかとなった。Johannes らの先行研究で、hMCT10 の S121, Y184 および T207 残基が基質選択性を決定する残基として同定されていたため [82]、筆者は当初、hMCT1/hMCT4 の M65/L67, L128/F130 および M151/A153 残基 (それぞれ hMCT10 の S121, Y184 および T207 残基に対応) が基質選択性に関与するのではないかと予想していた。しかしながらこの予想に反し、これらの残基は基質選択性に関与していないことが単一変異体の基質輸送能解析の結果から明らかとなった。本研究では、hMCT1, 4 の基質輸送経路を形成するアミノ酸残基の 3 次元的な位置を確認するため、そのホモロジーモデルを構築している。このモデルにおいて、hMCT1 の基質選択性に関わる残基として

見出された M69 および F367 残基は、その近傍の領域と疎水性相互作用を形成し得ることが確認された。この結果は、M69 および F367 残基が L-OPro の結合や輸送サイクルに対して重要な役割を果たしていた事実と整合性がある。さらに、M69 および F367 残基への飽和変異導入株 (M69X および F367X) の基質輸送能解析の結果、L-OPro の効率的な輸送には hMCT1 の 69 番目に疎水的かつ長い直鎖構造を有するアミノ酸残基と、367 番目に疎水的かつ γ 位で分岐した構造を有するアミノ酸残基が必要であることが明らかとなった。この結果は、ホモロジーモデルで確認された疎水性相互作用モデルを支持している。また、本研究で得られた結果より、L-OPro の $-NH-$ 部位と L-乳酸のフレキシブルかつ極性を有する構造への認識における M69 および F367 残基の関与も示唆された。筆者らは先行研究で、CPC が hMCT1, 4 阻害能を有する一方、DL-OCPC は hMCT1 選択的な阻害能を有することを見出しており、このことから CPC の 3 位へのカルボニル基導入が hMCT1, 4 のリガンド選択性の決定に重要な役割を果たすことが示唆されていた [72]。本研究の構造親和性相関解析で得られたデータからは、L-OPro アナログの 3 位カルボニル基が hMCT1 との相互作用にほとんど関与しないことが示された。したがって、hMCT1, 4 間で認められた L-OPro 認識性の違いは、カルボニル基の導入により hMCT1 および L-OPro 間に好ましい相互作用が生じたためであるというよりも、むしろ導入されたカルボニル基が hMCT4 による L-OPro 認識能を低下させるために生じると考えられた。

次に、M69 および F367 変異体の基質選択性が変動した要因についてアミノ酸側鎖構造の観点から考えてみたい。一般的に、Met 側鎖は極めて反応性に乏しいため、トランスポーターを介した基質輸送に直接的に関与することはほとんどない。したがって、基質選択性の決定という点においては、タンパク質分子中の Met 側鎖のほとんどはその立体構造に基づく役割を果たすことが多いと考えられる。筆者の構築したホモロジーモデルによれば、M69 とその近傍の残基 (L66, Y70, G123 および L124) との間に疎水性相互作用が見出されており、これらの相互作用はより短い側鎖を有する M69X 変異体 (e.g. M69G, M69A, M69C および M69T) においては破壊されることが予測される。実際、これらの変異体の $CL_{L-OPro}/CL_{L-Lactate}$ 値はいずれも hMCT1-WT と比較して有意な減少が認められ、予測との整合性が確かめられた。M69 残基の hMCT1 における役割についてはこれまで全く研究されていなかったが、最近 Nancolas らは AR-C155858 (rat MCT1, 2 選択的阻害剤) と相互作用しうる残基を同定する目的でこの Met 残基の重要性を検証している [81]。その結果、rat MCT1 の M69 残基は AR-C155858 の結合に関与しないことが明らかとなった。しかしながら、筆者は M69 残基を hMCT1 の基質選択性を決定する残基のひとつとして同定した。これらの結果は、哺乳類 MCT1 のリガンド認識機構が、たとえ同じ選択的リガンドであっても基質と阻害剤との間で異なることを示唆している。本研究で、F367 側鎖フェニル基の p 位へのフェノール性酸素の単純な付加 (F367Y) により、 $CL_{L-OPro}/CL_{L-Lactate}$ 値の減少が認められていた。さらに、この Phe 残基を Val 残基へ置換するとその輸送活性は低下したものの、消失はしなかった。これに対して、Thr 残基へ置換した変異体ではその輸送活性が完全に消失した。Val

および Thr は類似した立体構造を有しており、その違いは β 位の置換基のみである (メチル基もしくはヒドロキシ基)。したがって、F367T 変異体における基質輸送活性の低下は、Thr 残基のヒドロキシ基の立体的もしくは静電的な効果によって引き起こされたものと考えられた。また、F367 の芳香族側鎖が他の疎水性アミノ酸側鎖もしくはリガンドとの疎水性相互作用に関与している可能性もある。本研究で構築した hMCT1 ホモロジーモデルから得られた情報に基づくと、F367 残基とその近傍の残基 (D309, F363, G364 および G368) が疎水性相互作用を起こす可能性が示されていた。F367 残基をとり囲む残基のひとつである D309 残基 (rat MCT1 では D302 に相当) は、TM8 に存在する Arg 残基と塩橋を形成し、基質のトランスロケーションにおいて重要な役割を果たすことが報告されている [59, 114]。したがって、この Phe 残基は D309 残基の 3 次元的な位置を決めるのに重要であり、ひいては D309 残基の存在する TM8 全体の配向を調節する可能性がある。また、F367 残基の占める部位に存在する側鎖が嵩高く疎水性である限り、その近傍の残基との間の相互作用は維持されると考えられた (e.g. F367I, F367L, F367M, F367V, F367W および F367Y)。特に、F367L 変異体の $CL_{L-OPro}/CL_{L-Lactate}$ 値は hMCT1-WT とほぼ同じであり、この位置における γ 位で分岐した疎水性側鎖構造の重要性を示している。部位特異的変異導入法を使用した先行研究において、この Phe 残基ならびに hMCT8 において等価な Asp 残基が効率的な基質輸送に必須であると報告されており、また、齧歯類 MCT1 への F360C 変異導入によりメバロン酸輸送が認められるようになることは前述の通りである [22, 59, 81, 110, 115]。しかしながら筆者は、F367C 変異体 (齧歯類 MCT1 では F360C に相当) が L-乳酸または L-OPro を輸送しないことを実証した。これは、hMCT1 の基質選択性に与える F367 の影響が、それらの基質とメバロン酸とで異なることを示している。

結論として、本研究の遂行により hMCT1 選択的な L-OPro 輸送に重要な 2 つのアミノ酸残基 M69 および F367 残基を同定した。しかしながら、これら 2 つの残基以外にも hMCT1 の基質選択性の決定に関与する残基が存在する可能性を排除することはできない。本研究で同定された残基は、hMCT1 の基質認識ならびにコンフォメーション変化に関与していると予想される。これらの情報をもとに hMCTs の構造と機能との関連が明らかとなり、将来的に hMCTs が医薬品の新たな標的分子となることが期待される。

第3章 hMCT2の基質認識性の解析

3.1 緒言

hMCT2 (SLC16A7) はhMCT1, 4と同じくhMCTファミリーに属するMFSトランスポーターである [112]。哺乳類MCT2はMCT1と比して高親和性の基質 (*e.g.* L-乳酸、ピルビン酸) 輸送を担い [45, 116, 117]、その発現分布はエネルギー代謝の盛んな組織に局限している [4]。hMCT1, 4と同様に、hMCT2の生理学的な役割を明らかにするため、いくつかのhMCT2選択的なリガンドが見出されてきた。たとえば、*rat* MCT1, 2選択的な基質として γ -ヒドロキシ酪酸アナログであるHOCPCAが報告されているほか、AR-C155858が*rat* MCT1, 2選択的な阻害剤であることが明らかとなっている [26, 56]。しかしながら、MCT2の基質認識メカニズムに関する報告は極めて乏しく、*rat* MCT2の基質輸送にはTM1のK44残基およびTM8のR301残基が重要であることが報告されているのみである [56]。筆者らはこれまでの研究で、hMCT1選択的なL-OPro輸送に重要な2つのアミノ酸残基M69およびF367残基を同定している [60]。hMCT2はhMCT1と最も近縁なアイソフォームであるため [4]、hMCT2においてもこれらの残基が基質認識メカニズムに重要である可能性がある。

そこで本章では、hMCT1選択的なL-OPro輸送に関わるM69およびF367残基がhMCT2においても保存されていることを示し、hMCT2の基質認識性がhMCT1と類似していることを実証した。

3.2 実験材料および方法

3.2.1 実験動物

第 1 章 (1.2.1) と同様の方法で入手し飼育した。

3.2.2 試薬

Sodium L-[^{14}C]lactate は PerkinElmer (Waltham, MA, USA) から購入した。L-5-[^3H]Oxoproline ([^3H]pyroglutamic acid) および sodium [^3H]valproate は Moravek (Brea, CA, USA) から購入した。Sodium [^{14}C]butyrate は American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA) から購入した。オリゴ DNA は Eurofins Genomics (東京、日本) に合成と精製を依頼した。その他の試薬は特に断らない限り特級もしくは生化学用、分子生物学用のものを用いた。

3.2.3 プラスミド

hMCT2 発現プラスミド (pGH19-hMCT2) については、ダナフォーム (横浜、神奈川県) から購入した hMCT2 cDNA の組み込まれたプラスミド (pBluescriptR-hMCT2, Clone ID: 4827290) を用いて、第 1 章 (1.2.3) と同様の方法で作製した。使用したプライマーは **Table 3-1** に示した。組み込んだ配列が、過去に報告されている hMCT2 の塩基配列 (GenBank accession number: BC030693) と一致することをシーケンスプライマー (**Table 3-1**) を用いてシーケンス解析により確認した。hMCT1, 4 発現プラスミドについては、第 1 章 (1.2.3) で作製したものを使用した。

Table 3-1. Sequences of used primers.

Primer	Sequence (5'–3')	Purpose
Forward: hMCT2-XmaI	GTGATCTCCTCCCGGATGCCACCAATGCC	Gene cloning
Reverse: hMCT2-XbaI	TCTCTACACTTCTAGATTAAATGTTAGTTTCTC	Gene cloning
MCT2-S1	TTCCCCAAAGCTGTCACC	DNA sequencing
MCT2-S2	ACTTTTGAATGCCTGTGTGG	DNA sequencing
MCT2-S3	GCCTTGGATTTGGGAGTG	DNA sequencing
MCT2-S4	AAGGAGGCCAACACCATTC	DNA sequencing

3.2.4 大腸菌の培養とプラスミド抽出

第 1 章 (1.2.4) と同様の方法で行った。

3.2.5 cRNA の調製

第 1 章 (1.2.5) と同様の方法で行った。

3.2.6 アフリカツメガエル卵母細胞 (oocytes) の調製

第 1 章 (1.2.6) と同様の方法で行った。

3.2.7 Oocytes への遺伝子導入

第 1 章 (1.2.7) と同様の方法で行った。

3.2.8 基質輸送実験

第 1 章 (1.2.8) と同様の方法で行った。

3.2.9 シーケンスアラインメント、分子系統樹の作製

シーケンスアラインメントは第 2 章 (2.2.11) と同様の方法で行った。使用した hMCTs のアミノ酸配列情報は以下の通りである: hMCT1, NP_001159968; hMCT2, NP_001257551; hMCT3, AAF03489; hMCT4, NP_001035887; hMCT5, NP_004687; hMCT6, NP_001258694; hMCT7, AAC52014; hMCT8, NP_006508; hMCT9, NP_001310910; hMCT10, NP_061063; hMCT11, Q8NCK7; hMCT12, NP_998771; hMCT13, NP_963860; hMCT14, NP_689740。また、使用した脊椎動物 MCT2 のアミノ酸配列情報は以下の通りである: human, NP_001257551; rat, NP_058998; chicken, NP_001186533; green anole, XP_003221232; western clawed frog, NP_001106392; zebrafish, NP_001092889。分子系統樹は ClustalX 2.1 for Windows [118] を用いてブートストラップ解析 [119] を 1000 回行った後、Neighbor-joining 法 [120] により構築した。

3.2.10 ホモロジーモデリング

hMCT2 の 3 次元ホモロジーモデルは第 2 章 (2.2.12) と同様の方法で作製した。このモデリング過程において、6 種類のトランスポーター (MFS トランスポーター) を confidence levels, percentage identity および alignment coverage に基づいて選定しテンプレートとして使用した (**Fig. 3-1**)。テンプレートには 1PW4 (inward open) [95], 4CL5 (inward open) [76], 3WDO (outward open) [97], 4J05 (inward-facing occluded) [78], 6H7D (Outward-facing occluded) [121]

および 4LDS (inward open) [96] を用いた。Phyre2 ホモロジーモデルのエネルギー最小化、ラマチャンドラプロット解析、3 次元構造アラインメント、ホモロジーモデルの描画および解析は第 2 章 (2.2.12) と同様の方法で行った。hMCT1 の 3 次元ホモロジーモデルについては、第 2 章 (2.2.12) で作製したものを使用した。

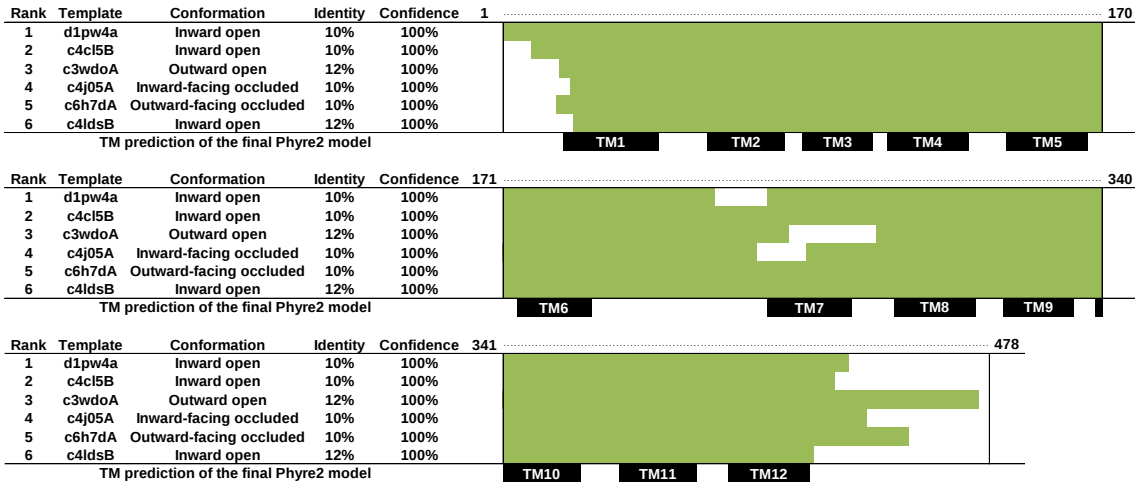


Fig. 3-1. Multiple template information on the homology modeling of hMCT2. Six templates (MFS transporters) were selected to model hMCT2 protein, based on heuristics to maximize confidence levels, percentage identity, and alignment coverage. The colored regions indicate which structural templates were used for which regions of the sequence of hMCT2.

3.2.11 数値解析

低分子化合物の pK_a 予測および統計解析は第 2 章 (2.2.14) と同様の方法で行った。

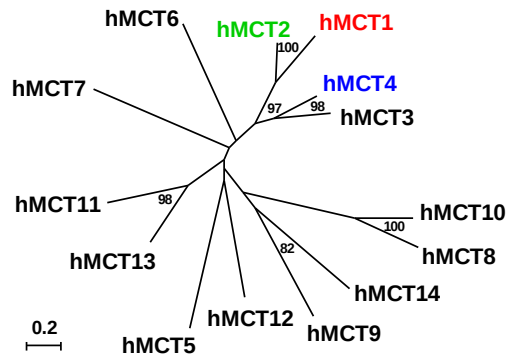
3.3 結果

3.3.1 hMCT2 のホモロジーモデリング

hMCT2 は hMCTs の中でも hMCT1 と最も配列類似性が高く (Fig. 3-2a)、いずれも L-乳酸やピルビン酸を基質として輸送する [45]。筆者らがこれまでの研究で同定した hMCT1 選択的な L-OPro 輸送に重要な 2 つのアミノ酸残基 M69 および F367 残基が hMCT2 においても保存されているかを確認するため [60]、hMCTs のシーケンスアラインメントを作製した (Fig. 3-2b)。その結果、hMCT1 の M69 および F367 残基は hMCT2 においてのみ保存されていることが明らかとなった。また、hMCT2 の M69 および F351 残基 (hMCT1 の M69 および F367 残基に対応) は脊椎動物 MCT2 においても完全に保存されていることが示された (Fig. 3-2c)。これらの結果から、hMCT1 に特徴的な基質選択性が、hMCT2 においても同様に認められる可能性が示された。hMCT1, 2 間で保存された Met および Phe 残基の 3 次元構造上での位置を確認するため、Phyre2 を利用して hMCT2 の 3 次元ホモロジーモデルを構築し [89]、さらに 3Drefine を用いて得られたモデルのエネルギー最小化を行った (Fig. 3-2d, e) [98]。なお、hMCT1 の 3 次元ホモロジーモデルについては既報で作製している [60]。Quistgaard らによれば、MFS トランスポーターは全て共通の折り畳み構造を有することが明らかとなっている [111]。hMCTs は MFS に属しているため、hMCT2 は 3 次元構造既知の MFS トランスポーターと同様の折り畳み構造を形成していると予想される [112]。エネルギー最小化後の hMCT2 ホモロジーモデルは MFS トランスポーターに特徴的な 12 本の膜貫通ヘリックスを有していた [112]。hMCT2 ホモロジーモデルの立体化学的な妥当性を評価するため、RAMPAGE を利用し Ramachandran プロット解析を行った (Fig. 3-3) [99]。その結果、hMCT2 ホモロジーモデル上のほとんどの残基が立体的に許容されていることが明らかとなったため (>96%)、得られたモデルは構造生物学的解析に利用可能であることが示された。hMCT1, 2 間で保存された Met および Phe 残基の 3 次元構造上での位置を確認したところ、両残基の相対的な位置は hMCT1, 2 間で極めて類似しており、これらの残基が hMCT2 においても基質選択性に関与しうることが示された (Fig. 3-2f)。

> **Fig. 3-2. The key residues involved in hMCT1 substrate specificity are completely conserved in hMCT2.** **a** Multiple sequence alignment was performed using Clustal Omega. The unrooted phylogenetic tree (1000 times bootstrap) was constructed via Neighbor-joining method in ClustalX 2.1 for Windows. Bootstrap percentage values (above 80%) are shown at the internal nodes. **b, c** Multiple protein sequence alignments were performed between hMCTs (**b**) and vertebrate MCT2 (**c**; hsa, human; rno, rat; gga, chicken; acs, green anole; xtr, western clawed frog; dre, zebrafish). The alignments were generated using Clustal Omega, under default parameters and were visualized using GeneDoc. The conserved Met and Phe residues are marked in red (MCT1) or green (MCT2). **d, e** 3D structure models of hMCT1 (**d**) and hMCT2 (**e**) were generated by the homology modeling technique, and the TMs are numbered. Six templates were selected to model each protein: PDB accession numbers 1PW4, 4IU8, 4LDS, 3WDO, 4CL5, and 4J05 for the hMCT1 model and 1PW4, 4CL5, 3WDO, 4J05, 6H7D and 4LDS for the hMCT2 model. **g** Homology model of hMCT1 superimposed upon the model of hMCT2. The conserved Met and Phe residues of the transporters are shown as sticks.

a



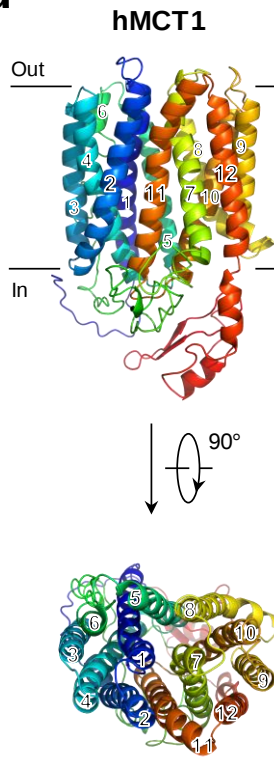
b

M69 _{hMCT1,2}			F367 _{hMCT1} , F351 _{hMCT2}		
hMCT8	: LAMGMIFFC	: 158	hMCT8	: VCLFLGLCDG	: 425
hMCT10	: LSMGMIFFC	: 129	hMCT10	: VCLIMGLFDG	: 397
hMCT9	: LASGVGLLAS	: 66	hMCT9	: LSGILGLFTG	: 410
hMCT14	: LSMGITLIVG	: 87	hMCT14	: ICALIGFSSG	: 420
hMCT5	: IMSSLRFACG	: 74	hMCT5	: YTCFAIFAG	: 404
hMCT12	: IVDCVTMLCA	: 102	hMCT12	: FSCTFGYFDG	: 388
hMCT6	: ILTAVLHMAG	: 67	hMCT6	: YCLAYSVSMS	: 343
hMCT1	: IMLAVMYGGG	: 73	hMCT1	: YAGFFGFAG	: 368
hMCT2	: IMLAVMYAGG	: 73	hMCT2	: YAVFFGLG	: 352
hMCT3	: IMLAMLYGTG	: 72	hMCT3	: FCVAFGLSYG	: 358
hMCT4	: ILLAMLYGTG	: 75	hMCT4	: FCIFFGISYG	: 333
hMCT7	: ICFVLTFS	: 78	hMCT7	: CSIFFGFVMG	: 397
hMCT11	: LALAVQQAAS	: 92	hMCT11	: AAVAYGLSAG	: 354
hMCT13	: IGIADVQFGS	: 67	hMCT13	: LAVAYGFTSG	: 319

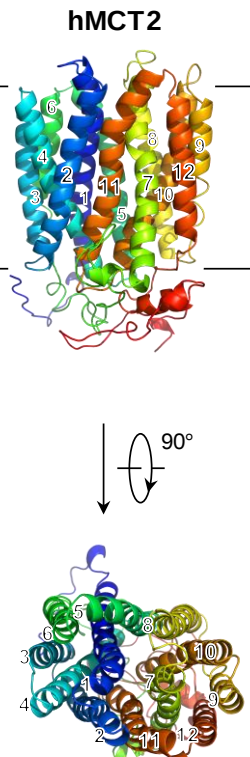
c

M69 _{human}			F351 _{human}		
hsaMCT2	: MLAVMYAGGP	: 74	hsaMCT2	: VFFGLGGSV	: 354
rnoMCT2	: MLAVMYAGGP	: 80	rnoMCT2	: IFFGIGFSI	: 358
ggaMCT2	: MLAVMYAGGP	: 73	ggaMCT2	: VFFGFAGMV	: 351
acsMCT2	: MLAVMYAGGP	: 73	acsMCT2	: VFFGLAGMV	: 351
xtrMCT2	: MLAVMYAGGP	: 73	xtrMCT2	: VFFGFAGMV	: 347
dreMCT2	: MLAVMYAGGP	: 73	dreMCT2	: VFFGFAGMV	: 347

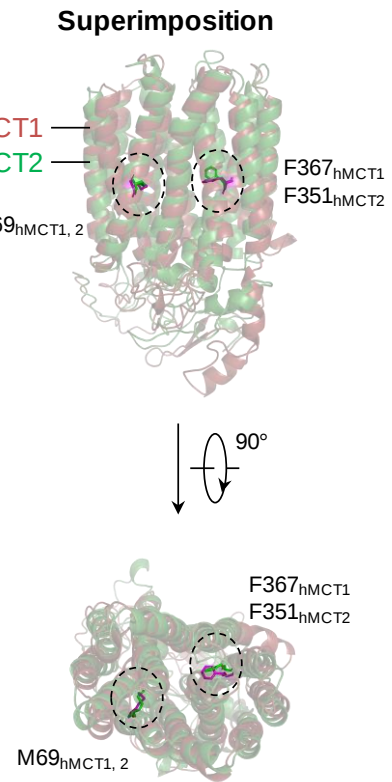
d

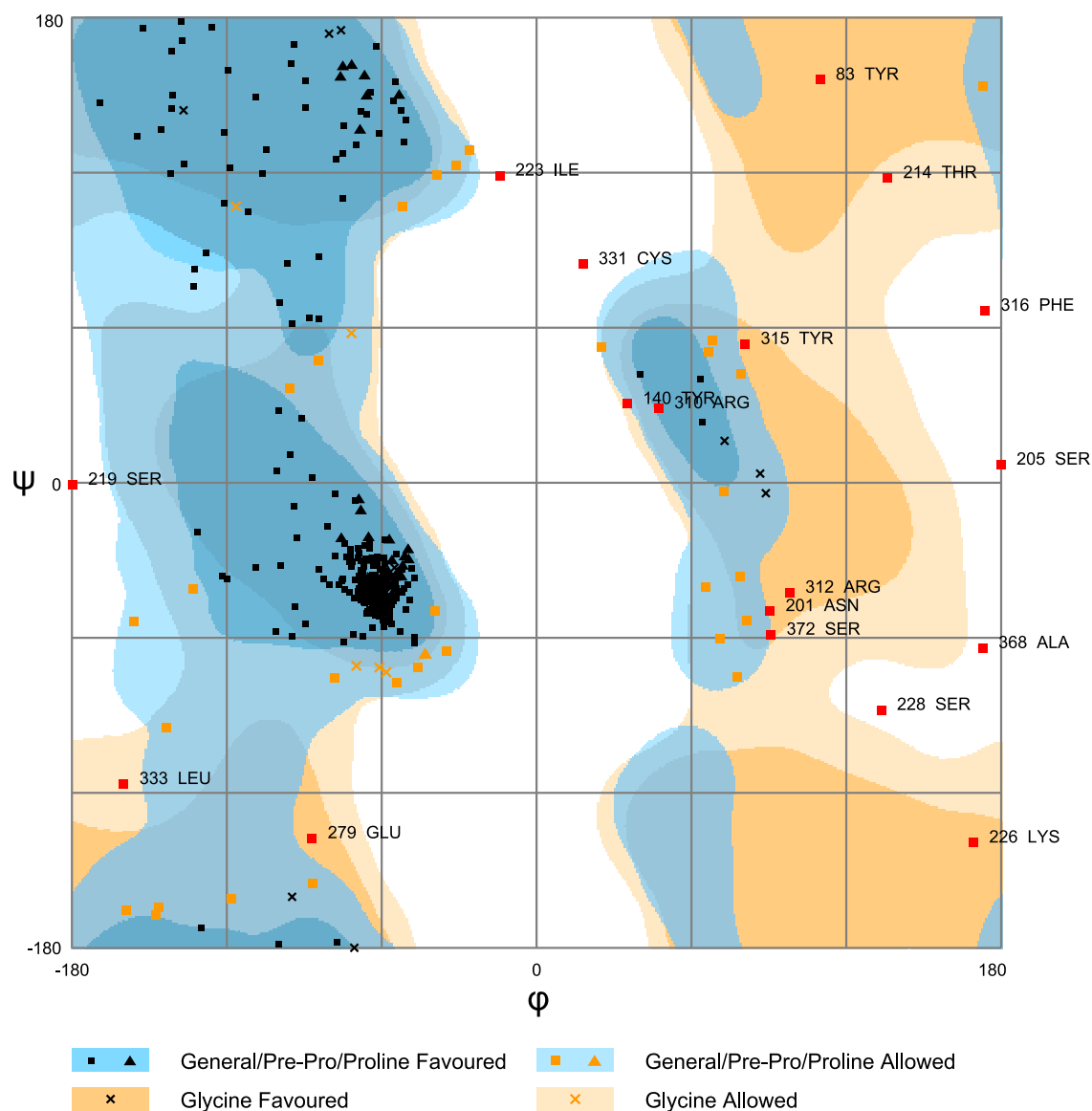


e



f





Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 422 (88.7%)
 Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 36 (7.6%)
 Number of residues in outlier region : 18 (3.8%)

RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/rampage/>

Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002)
 Structure validation by Ca geometry: ϕ/ψ and C β deviation. Proteins: Structure, Function & Genetics. 50: 437-450

Fig. 3-3. Structural parameters for hMCT2. Ramachandran plot analysis using RAMPAGE was performed to predict the stereochemical quality of the homology models of hMCT2.

3.3.2 hMCT2 の基質認識性

これまでの検証により、hMCT1 の基質選択性に関わる Met および Phe 残基が hMCT2 においても保存されており、その 3 次元構造上での位置も類似していることが明らかとなった。これらの結果は、hMCT1, 2 の基質選択性が類似する可能性を示している。そこで筆者は、4 種の低分子モノカルボン酸 (L-乳酸、L-OPro、酪酸、バルプロ酸) を用いて hMCT1, 2, 4 を介した基質輸送能を評価することとした。その結果、L-乳酸は hMCT1, 2, 4 を介して輸送された一方で (Fig. 3-4a)、L-OPro は hMCT1, 2 によってのみ輸送された (Fig. 3-4b)。このことは、M69_{hMCT1} (M69_{hMCT2} に対応) 残基および F367_{hMCT1} (F351_{hMCT2} に対応) 残基が hMCT1, 2 を介した L-OPro 輸送に重要な役割を果たしていることを示唆している。また、酪酸およびバルプロ酸は hMCT1, 2, 4 によって輸送されなかった (Fig. 3-4c, d)。これらの結果は、hMCT1, 2, 4 を介したモノカルボン酸輸送に必須な何らかの構造が酪酸およびバルプロ酸に存在しなかったためであると考えられる。

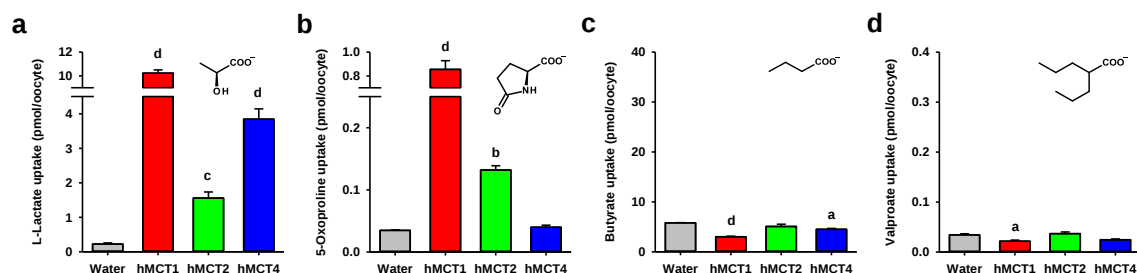


Fig. 3-4. Substrate selectivity of hMCT2. a–d L-[¹⁴C]Lactate (a; 2.5 μ M), L-[³H]OPro (b; 0.8 μ M), [¹⁴C]butyrate (c; 1.7 μ M), and [³H]valproate (d; 18 nM) uptake via hMCT1, hMCT2, and hMCT4 compared to controls (water-injected oocytes). Oocytes were incubated for 20 min at 25 °C. Values represent the means $\pm$ S.E. from 3 to 6 independent experiments using different batches of oocytes, each performed with 3–5 replicates. ^a, $p < 0.05$; ^b, $p < 0.01$; ^c, $p < 0.005$; ^d, $p < 0.001$ versus water-injected oocytes.

3.4 考察

本章では、hMCT2 の 3 次元構造および低分子モノカルボン酸輸送能を評価することで、その基質選択性が hMCT1 と類似していることを明らかにした。hMCT1, 2 は hMCTs の中でもその配列類似性が高いペアであり、その共通の基質として L-乳酸やピルビン酸を輸送する [45]。しかしながら、hMCT1, 2 の類似した基質選択性に関わる分子メカニズムについてはこれまでにほとんど研究がなされてこなかった。筆者らは最近、hMCT1 選択的な L-OPro 輸送に重要な 2 つのアミノ酸残基 M69 および F367 残基を同定している [60]。これらの残基は hMCT2 の M69 および F351 残基に対応しており、本研究の hMCT1, 2 の 3 次元構造と基質輸送能のデータとを併せて考えると、基質選択性に関与する可能性が示された。MCT2 は MCT1 と比して基質に対する親和性は高いものの、その基質輸送活性は低いことが明らかとなっている [45, 116, 117]。この傾向は本研究で行った hMCT1, 2 の基質輸送能解析においても認められていた。トランスポーターの基質輸送活性は、基質に対する親和性 (K_m)、基質の輸送サイクル (k_{cat}) およびトランスポーターの発現量によって規定されるため、上記の現象は MCT2 の基質に対する輸送サイクルが小さいか、MCT2 の細胞膜への発現量が低いことによって引き起こされた可能性がある。前者については、輸送サイクルが温度の影響を受ける場合が想定される。すなわち、MCT2 が温度感受性の高いトランスポーターであった場合には、生体内 ($\approx 37^\circ\text{C}$) と *Xenopus oocyte* 発現系 ($\approx 25^\circ\text{C}$) とでその輸送活性に差が生じると考えられる。また後者については、MCT1 と MCT2 とで細胞膜への発現のしやすさが異なっている場合が想定される。すなわち、MCT1 は膜発現に関わる補助タンパクとして basigin/CD147 を利用する一方で [122]、MCT2 は embigin/gp70 を利用するため [123]、これらの *Xenopus oocyte* 細胞膜への発現量に差がある場合には、hMCT2 の膜発現量にも影響を及ぼすと考えられる。実際に、*Xenopus oocyte* 細胞膜には内因性の basigin が存在する一方で [122]、内因性の embigin は存在しないことが明らかとなっている [124]。また、*Xenopus oocyte* に embigin と rat MCT1 もしくは rat MCT2 を共発現させた場合、rat MCT1 と比して rat MCT2 でより顕著な膜発現および輸送活性の増大が認められている [124]。これらの知見から、*Xenopus oocyte* 発現系で認められた MCT2 の低い基質輸送活性には、温度や膜発現量などの複数の要因が関わっている可能性が考えられた。本研究における hMCT2 を介した基質輸送能解析では、4 種の低分子モノカルボン酸を用いた。hMCTs のシーケンスアラインメントの結果から予測された通り、hMCT2 は hMCT1 と同様に L-OPro に対する選択的な輸送能を有していることが明らかとなった。Rat MCT1, 2 の選択的基質である HOCPCA は L-OPro と類似した構造を有しているため、その認識メカニズムも類似している可能性がある [56]。また、酪酸およびバルプロ酸は hMCT1, 2, 4 によって全く輸送されなかったことから、これらの化合物には、hMCT1, 2, 4 を介した基質輸送に必要な構造 (e.g. β 位の O, N 原子もしくはこれらの原子に結合した δ^+ 性の水素原子) が失われているものと考えられる。生体内における酪酸およびバルプロ酸輸送には、 H^+ 感受性の輸送システムが関与しているとの報告

が存在する [125, 126]。しかしながら、これらのモノカルボン酸化合物は齧歯類 MCT1 によって全く輸送されないことが報告されている [46, 54]。本研究の結果から、hMCT1 ならびに hMCT2, 4 も酪酸およびバルプロ酸の輸送に関与しないことが示された。したがって、生体内におけるこれらのモノカルボン酸の輸送には、未知の H^+ 感受性の輸送担体が寄与しているものと考えられる。

結論として、本研究の遂行により hMCT2 に存在する 2 つのアミノ酸残基 M69 および F351 が hMCT1 と同様に L-OPro の輸送に関わっている可能性が示された。これらの情報をもとに、未だその輸送基質の不明なオーファン hMCTs の生物学的な役割が明らかとなることが期待される。

総括

本研究では、「hMCT1, 4 間の基質選択性の違いをその TM6/7loop 配列の違いで説明できなかった」という筆者らの先行研究の結果を受け、hMCT1, 4 の基質選択性の違いを決定する分子メカニズムを解明することを目的とした。hMCT1, 4 の基質構造とタンパク質分子構造に着目し、*Xenopus oocyte* 異種発現系や *in silico* の手法を用いて種々の検証を行い、以下の結果を得た。

1. hMCT1, 4 とその基質類縁体との構造活性相関を明らかにし、強力な hMCT4 選択的
非競合阻害剤である bindarit (2-[(1-benzyl-1H-indazol-3-yl)methoxy]-2-methylpropionic
acid) を同定した。
2. hMCT1 選択的な L-OPro 輸送に重要な 2 つのアミノ酸残基 M69 および F367 残基を
同定し、その基質選択に関わる分子メカニズムの一端を明らかにした。
3. hMCT1 選択的な L-OPro 輸送に関わる M69 および F367 残基が hMCT2 においても保
存されていることを示し、hMCT2 の基質認識性が hMCT1 と類似していることを実
証した。

hMCT1, 4 に関する先行研究は、がん細胞における hMCT1, 4 発現の多少と病態との関連を検証する事例が多く、hMCT1, 4 の輸送機能そのものを評価した事例は少なかった。本研究は、hMCT1, 4 の構造と基質選択性の関係を明らかにしたものであり、その分子メカニズムを解明することで、ヒト組織における hMCT1, 4 の役割と機能的な住み分けがより明確になったと考えられる。hMCT1, 4 の属する SLC16A ファミリーは、他の SLC ファミリーと比して機能未知のトランスポーターが多く属している。例えば、2 型糖尿病発症リスク関連遺伝子である hMCT11/SLC16A11 および hMCT13/SLC16A13 は構造に関する情報はあろうか、詳細な機能解析に耐えうる輸送基質さえ不明である。本研究により得られた hMCT1, 4 の構造と機能に関する知見は、これらのオーファントランスポーターの構造と機能を明らかにする上で重要となると考えられる。さらに、本研究で構築した hMCT1, 4 の異なる基質選択性を反映したホモロジーモデルを利用することでアイソフォーム選択的な hMCTs 阻害剤の開発に貢献できると考える。特に hMCT4 選択的な阻害剤に関しては、本研究で同定した fibrates や bindarit を除き報告が存在しないため、本研究の結果はより強力な hMCT4 阻害剤の設計に重要な知見を与えるものと考えられる。hMCT1, 4 は正常組織だけでなくがん細胞においても高発現し、がん細胞の浸潤や増殖に関与することが知られているため、アイソフォーム選択的な hMCTs 阻害剤は抗悪性腫瘍薬のファースト・インクラスとなり得る。

論文目録

主論文

1. Futagi Y, Kobayashi M, Narumi K, et al (2019) Homology modeling and site-directed mutagenesis identify amino acid residues underlying the substrate selection mechanism of human monocarboxylate transporters 1 (hMCT1) and 4 (hMCT4). *Cell Mol Life Sci* 76:4905–4921. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03151-z>
2. Futagi Y, Kobayashi M, Narumi K, et al (2018) Identification of a selective inhibitor of human monocarboxylate transporter 4. *Biochem Biophys Res Commun* 495:427–432. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.025>

副論文

1. Futagi Y, Narumi K, Furugen A, et al (2019) Molecular characterization of the orphan transporter SLC16A9, an extracellular pH- and Na⁺-sensitive creatine transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 522:539–544. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.137>
2. Yamaguchi A, Futagi Y, Kobayashi M, et al (2020) Extracellular lysine 38 plays a crucial role in pH-dependent transport via human monocarboxylate transporter 1. *Biochim Biophys Acta – Biomembr* 1862:183068. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183068>
3. Ideno M, Kobayashi M, Sasaki S, et al (2018) Involvement of monocarboxylate transporter 1 (SLC16A1) in the uptake of L-lactate in human astrocytes. *Life Sci* 192:110–114. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.10.022>
4. Futagi Y, Sasaki S, Kobayashi M, et al (2017) The flexible cytoplasmic loop 3 contributes to the substrate affinity of human monocarboxylate transporters. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1859:1790–1795. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.014>
5. Sasaki S, Futagi Y, Ideno M, et al (2016) Interaction of atorvastatin with the human glial transporter SLC16A1. *Eur J Pharmacol* 788:248–254. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.06.033>
6. Sasaki S, Futagi Y, Ideno M, et al (2016) Effect of diclofenac on SLC16A3/MCT4 by the Caco-2 cell line. *Drug Metab Pharmacokinet* 31:218–223. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2016.03.004>
7. Ideno M, Sasaki S, Kobayashi M, et al (2016) Influence of high glucose state on bromopyruvate-induced cytotoxicity by human colon cancer cell lines. *Drug Metab Pharmacokinet* 31:67–72. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2015.10.006>
8. Sasaki S, Kobayashi M, Futagi Y, et al (2015) Involvement of histidine residue His382 in pH regulation of MCT4 activity. *PLoS One* 10:e0122738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122738>

9. Sasaki S, Futagi Y, Kobayashi M, et al (2015) Functional characterization of 5-oxoproline transport via SLC16A1/MCT1. *J Biol Chem* 290:2303–2311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581892>
10. Sasaki S, Kobayashi M, Futagi Y, et al (2013) Crucial residue involved in L-lactate recognition by human monocarboxylate transporter 4 (hMCT4). *PLoS One* 8:e67690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067690>

引用文献

1. Pramod AB, Foster J, Carvelli L, Henry LK (2013) SLC6 transporters: Structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Aspects Med* 34:197–219. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.002>
2. Whalen K, Miller S, Onge ES (2015) The role of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Clin Ther* 37:1150–1166. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.03.004>
3. Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM (2015) SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 14:543–560. <https://doi.org/10.1038/nrd4626>
4. Fisel P, Schaeffeler E, Schwab M (2018) Clinical and functional relevance of the monocarboxylate transporter family in disease pathophysiology and drug therapy. *Clin Transl Sci* 11:352–364. <https://doi.org/10.1111/cts.12551>
5. Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, et al (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144:810–823. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018>
6. Koho N, Maijala V, Norberg H, et al (2005) Expression of MCT1, MCT2 and MCT4 in the rumen, small intestine and liver of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.). *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 141:29–34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.03.003>
7. Thomas C, Bishop DJ, Lambert K, et al (2011) Effects of acute and chronic exercise on sarcolemmal MCT1 and MCT4 contents in human skeletal muscles: current status. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 302:R1–R14. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00250.2011>
8. Carneiro L, Pellerin L (2015) Monocarboxylate transporters: New players in body weight regulation. *Obes Rev* 16:55–66. <https://doi.org/10.1111/obr.12256>
9. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2010) Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* 14:771–794. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x>
10. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, et al (2012) Role of monocarboxylate transporters in human cancers: State of the art. *J Bioenerg Biomembr* 44:127–139. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9428-1>
11. Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, et al (2008) Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118:3930–3942. <https://doi.org/10.1172/JCI36843>
12. Nakayama Y, Torigoe T, Inoue Y, et al (2012) Prognostic significance of monocarboxylate transporter 4 expression in patients with colorectal cancer. *Exp Ther Med* 3:25–30. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.361>
13. Zhu J, Wu YN, Zhang W, et al (2014) Monocarboxylate transporter 4 facilitates cell proliferation and migration and is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS One* 9:e87904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087904>

14. Gao HJ, Zhao MC, Zhang YJ, et al (2015) Monocarboxylate transporter 4 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and is associated with cell proliferation and migration. *J Cancer Res Clin Oncol* 141:1151–1162. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1888-8>
15. Ruan Y, Zeng F, Cheng Z, et al (2017) High expression of monocarboxylate transporter 4 predicts poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Oncol Lett* 14:5719–5726. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6964>
16. Kim HK, Lee I, Bang H, et al (2018) MCT4 expression is a potential therapeutic target in colorectal cancer with peritoneal carcinomatosis. *Mol Cancer Ther* 17:838–848. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0535>
17. Cao YW, Liu Y, Dong Z, et al (2018) Monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 are independent prognostic biomarkers for the survival of patients with clear cell renal cell carcinoma and those receiving therapy targeting angiogenesis. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 36:311.e15–311.e25. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.03.014>
18. Li Z, Wu Q, Sun S, et al (2018) Monocarboxylate transporters in breast cancer and adipose tissue are novel biomarkers and potential therapeutic targets. *Biochem Biophys Res Commun* 501:962–967. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.091>
19. Todenhöfer T, Seiler R, Stewart C, et al (2018) Selective inhibition of the lactate transporter MCT4 reduces growth of invasive bladder cancer. *Mol Cancer Ther* 17:2746–2755. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0107>
20. Abe Y, Nakayama Y, Katsuki T, et al (2019) The prognostic significance of the expression of monocarboxylate transporter 4 in patients with right- or left-sided colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* 15:e49–e55. <https://doi.org/10.1111/ajco.13077>
21. Chen HL, OuYang HY, Le Y, et al (2018) Aberrant MCT4 and GLUT1 expression is correlated with early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Cancer Med* 7:5339–5350. <https://doi.org/10.1002/cam4.1521>
22. Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, et al (1994) Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 76:865–873. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90361-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90361-1)
23. Manning Fox JE, Meredith D, Halestrap AP (2000) Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J Physiol* 529:285–293. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00285.x>
24. Sasaki S, Kobayashi M, Futagi Y, et al (2013) Crucial residue involved in L-lactate recognition by human monocarboxylate transporter 4 (hMCT4). *PLoS One* 8:e67690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067690>
25. Colen CB, Shen Y, Ghoddoussi F, et al (2011) Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an *in vivo* study. *Neoplasia* 13:620–632. <https://doi.org/10.1593/neo.11134>

26. Ovens MJ, Davies AJ, Wilson MC, et al (2010) AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7–10. *Biochem J* 425:523–530. <https://doi.org/10.1042/BJ20091515>
27. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, et al (2011) CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci* 108:16663–16668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106123108>
28. Doherty JR, Yang C, Scott KEN, et al (2014) Blocking lactate export by inhibiting the myc target MCT1 disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer Res* 74:908–920. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2034>
29. Curtis NJ, Mooney L, Hopcroft L, et al (2017) Pre-clinical pharmacology of AZD3965, a selective inhibitor of MCT1: DLBCL, NHL and Burkitt's lymphoma anti-tumor activity. *Oncotarget* 8:69219–69236. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18215>
30. Polanski R, Hodgkinson CL, Fusi A, et al (2014) Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 20:926–937. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2270>
31. Noble RA, Bell N, Blair H, et al (2017) Inhibition of monocarboxylate transporter 1 by AZD3965 as a novel therapeutic approach for diffuse large B-cell lymphoma and burkitt lymphoma. *Haematologica* 102:1247–1257. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.163030>
32. Afonso J, Pinto T, Simões-Sousa S, et al (2019) Clinical significance of metabolism-related biomarkers in non-Hodgkin lymphoma – MCT1 as potential target in diffuse large B cell lymphoma. *Cell Oncol.* 42:303–318. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00426-2>
33. Sasaki S, Futagi Y, Kobayashi M, et al (2015) Functional characterization of 5-oxoproline transport via SLC16A1/MCT1. *J Biol Chem* 290:2303–2311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581892>
34. Futagi Y, Sasaki S, Kobayashi M, et al (2017) The flexible cytoplasmic loop 3 contributes to the substrate affinity of human monocarboxylate transporters. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1859:1790–1795. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.014>
35. Jones RS, Morris ME (2016) Monocarboxylate transporters: therapeutic targets and prognostic factors in disease. *Clin Pharmacol Ther* 100:454–463. <https://doi.org/10.1002/cpt.418>
36. Pinheiro C, Albergaria A, Paredes J, et al (2010) Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma. *Histopathology* 56:860–867. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03560.x>
37. Pérttega-Gomes N, Vizcaíno JR, Miranda-Gonçalves V, et al (2011) Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer* 11:312. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-312>
38. Hong CS, Graham NA, Gu W, et al (2016) MCT1 modulates cancer cell pyruvate export and growth of tumors that co-express MCT1 and MCT4. *Cell Rep* 14:1590–1601. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.057>

39. McKeown SR (2014) Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol* 87:20130676. <https://doi.org/10.1259/bjr.20130676>
40. Eales KL, Hollinshead KER, Tennant DA (2016) Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 5:e190. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.50>
41. Weidemann A, Johnson RS (2008) Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ* 15:621–627. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.12>
42. Nath K, Guo L, Nancolas B, et al (2016) Mechanism of antineoplastic activity of lonidamine. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1866:151–162. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.08.001>
43. Wang H, Yang C, Doherty JR, et al (2014) Synthesis and structure-activity relationships of pteridine dione and trione monocarboxylate transporter 1 inhibitors. *J Med Chem* 57:7317–7324. <https://doi.org/10.1021/jm500640x>
44. Gurrapu S, Jonnalagadda SK, Alam MA, et al (2016) Coumarin carboxylic acids as monocarboxylate transporter 1 inhibitors: In vitro and in vivo studies as potential anticancer agents. *Bioorganic Med Chem Lett* 26:3282–3286. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.054>
45. Lin RY, Vera JC, Chaganti RSK, Golde DW (1998) Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J Biol Chem* 273:28959–28965. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.44.28959>
46. Tamai I, Sai Y, Ono A, et al (1999) Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1. *J Pharm Pharmacol* 51:1113–1121. <https://doi.org/10.1211/0022357991776804>
47. Ballatore C, Hury DM, Smith AB (2013) Carboxylic acid (bio)isosteres in drug design. *ChemMedChem* 8:385–395. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200585>
48. Hiraga K (1965) Structures of cyclopentanepolyones. *Chem Pharm Bull* 13:1300–1306. <https://doi.org/10.1248/cpb.13.1300>
49. Kumler WD (1938) The dissociation constants of some enols related to l-ascorbic acid. Tetronic acid, α -chlorotetronic acid, α -bromotetronic acid, α -iodotetronic acid, α -hydroxytetronic acid and ethyl α -iodoacetoacetate. *J Am Chem Soc* 60:859–864. <https://doi.org/10.1021/ja01279a611>
50. Mihina JS, Herbst RM (1950) The reaction of nitriles with hydrazoic acid: synthesis of monosubstituted tetrazoles. *J Org Chem* 15:1082–1092. <https://doi.org/10.1021/jo01151a027>
51. Kim J, Kim H, Park SB (2014) Privileged structures: Efficient chemical “navigators” toward unexplored biologically relevant chemical spaces. *J Am Chem Soc* 136:14629–14638. <https://doi.org/10.1021/ja508343a>
52. Evans BE, Rittle KE, Bock MG, et al (1988) Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem* 31:2235–2246. <https://doi.org/10.1021/jm00120a002>

53. Bröer S, Rahman B, Pellegrini G, et al (1997) Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *J Biol Chem* 272:30096–30102. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30096>
54. Bröer S, Schneider HP, Bröer A, et al (1998) Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem J* 333:167–174. <https://doi.org/10.1042/bj3330167>
55. Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, et al (2000) The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 350:219–227. <https://doi.org/10.1042/bj3500219>
56. Thiesen L, Kehler J, Clausen RP, et al (2015) In vitro and in vivo evidence for active brain uptake of the GHB analog HOCPCA by the monocarboxylate transporter subtype 1. *J Pharmacol Exp Ther* 354:166–174. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.224543>
57. Schuster VL, Itoh S, Andrews SW, et al (2000) Synthetic modification of prostaglandin F_{2α} indicates different structural determinants for binding to the prostaglandin F receptor versus the prostaglandin transporter. *Mol Pharmacol* 58:1511–1516 <https://doi.org/10.1124/mol.58.6.1511>
58. Tominey AF, Docherty PH, Rosair GM, et al (2006) Unusually weak binding interactions in tetrazole-amidine complexes. *Org Lett* 8:1279–1282. <https://doi.org/10.1021/ol053072+>
59. Rahman B, Schneider HP, Bröer A, et al (1999) Helix 8 and helix 10 are involved in substrate recognition in the rat monocarboxylate transporter MCT1. *Biochemistry* 38:11577–11584. <https://doi.org/10.1021/bi990973f>
60. Futagi Y, Kobayashi M, Narumi K, et al (2019) Homology modeling and site-directed mutagenesis identify amino acid residues underlying the substrate selection mechanism of human monocarboxylate transporters 1 (hMCT1) and 4 (hMCT4). *Cell Mol Life Sci* 76:4905–4921. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03151-z>
61. Mirolo M, Fabbri M, Sironi M, et al (2008) Impact of the anti-inflammatory agent bindarit on the chemokinome: Selective inhibition of the monocyte chemotactic proteins. *Eur Cytokine Netw* 19:119–122. <https://doi.org/10.1684/ecn.2008.0133>
62. Gazzaniga S, Bravo AI, Guglielmotti A, et al (2007) Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J Invest Dermatol* 127:2031–2041. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700827>
63. Zollo M, Di Dato V, Spano D, et al (2012) Targeting monocyte chemotactic protein-1 synthesis with bindarit induces tumor regression in prostate and breast cancer animal models. *Clin Exp Metastasis* 29:585–601. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9473-5>
64. Talele TT (2018) Natural-products-inspired use of the *gem*-dimethyl group in medicinal chemistry. *J Med Chem* 61:2166–2210. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00315>

65. Gaikwad DD, Chapolikar AD, Devkate CG, et al (2015) Synthesis of indazole motifs and their medicinal importance: An overview. *Eur J Med Chem* 90:707–731. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.029>
66. Quanz M, Bender E, Kopitz C, et al (2018) Preclinical efficacy of the novel monocarboxylate transporter 1 inhibitor BAY-8002 and associated markers of resistance. *Mol Cancer Ther* 17:2285–2296. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1253>
67. Bachhawat AK, Yadav S (2018) The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ -glutamyl cycle. *IUBMB Life* 70:585–592. <https://doi.org/10.1002/iub.1756>
68. Kumar A, Bachhawat AK (2012) Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite. *Curr Sci* 102:288–297 <https://www.jstor.org/stable/24083854>
69. Chou J, Liu R, Yu J, et al (2018) Fasting serum α -hydroxybutyrate and pyroglutamic acid as important metabolites for detecting isolated post-challenge diabetes based on organic acid profiles. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 1100–1101:6–16. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.004>
70. Qi S, Xu D, Li Q, et al (2017) Metabonomics screening of serum identifies pyroglutamate as a diagnostic biomarker for nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 473:89–95. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.08.022>
71. Yu B, Zheng Y, Nettleton JA, et al (2014) Serum metabolomic profiling and incident CKD among African Americans. *Clin J Am Soc Nephrol* 9:1410–1417. <https://doi.org/10.2215/CJN.11971113>
72. Futagi Y, Kobayashi M, Narumi K, et al (2018) Identification of a selective inhibitor of human monocarboxylate transporter 4. *Biochem Biophys Res Commun* 495:427–432. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.025>
73. Galić S, Schneider HP, Bröer A, et al (2003) The loop between helix 4 and helix 5 in the monocarboxylate transporter (MCT1) is important for substrate selection and protein stability. *Biochem J* 376:413–422. <https://doi.org/10.1042/BJ20030799>
74. Deng D, Sun P, Yan C, et al (2015) Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature* 526:391–396. <https://doi.org/10.1038/nature14655>
75. Zhao Y, Heng J, Zhao Y, et al (2015) Substrate-bound structure of the *E. coli* multidrug resistance transporter MdfA. *Cell Res* 25:1060–1073. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.94>
76. Parker JL, Newstead S (2014) Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature* 507:68–72. <https://doi.org/10.1038/nature13116>
77. Sun J, Bankston JR, Payandeh J, et al (2014) Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature* 507:73–77. <https://doi.org/10.1038/nature13074>
78. Pedersen BP, Kumar H, Waight AB, et al (2013) Crystal structure of a eukaryotic phosphate transporter. *Nature* 496:533–536. <https://doi.org/10.1038/nature12042>
79. Yan H, Huang W, Yan C, et al (2013) Structure and mechanism of a nitrate transporter. *Cell Rep* 3:716–723. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.007>

80. Sun L, Zeng X, Yan C, et al (2012) Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature* 490:361–366. <https://doi.org/10.1038/nature11524>
81. Nancolas B, Sessions RB, Halestrap AP (2015) Identification of key binding site residues of MCT1 for AR-C155858 reveals the molecular basis of its isoform selectivity. *Biochem J* 466:177–188. <https://doi.org/10.1042/BJ20141223>
82. Johannes J, Braun D, Kinne A, et al (2016) Few amino acid exchanges expand the substrate spectrum of monocarboxylate transporter 10. *Mol Endocrinol* 30:796–808. <https://doi.org/10.1210/me.2016-1037>
83. Edwards N, Anderson CMH, Conlon NJ, et al (2018) Resculpting the binding pocket of APC superfamily LeuT-fold amino acid transporters. *Cell Mol Life Sci* 75:921–938. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2677-8>
84. Kryptou E, Kosti V, Amillis S, et al (2012) Modeling, substrate docking, and mutational analysis identify residues essential for the function and specificity of a eukaryotic purine-cytosine NCS1 transporter. *J Biol Chem* 287:36792–36803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400382>
85. Monné M, Miniero DV, Daddabbo L, et al (2012) Substrate specificity of the two mitochondrial ornithine carriers can be swapped by single mutation in substrate binding site. *J Biol Chem* 287:7925–7934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.324855>
86. Gui C, Hagenbuch B (2008) Amino acid residues in transmembrane domain 10 of organic anion transporting polypeptide 1B3 are critical for cholecystokinin octapeptide transport. *Biochemistry* 47:9090–9097. <https://doi.org/10.1021/bi8008455>
87. Sievers F, Wilm A, Dineen D, et al (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
88. Nicholas KB, Nicholas HB Jr, Deerfield DW II (1997) GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnet News* 4:1–4
89. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, et al (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10:845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015-053>
90. Remmert M, Biegert A, Hauser A, Söding J (2012) HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat Methods* 9:173–175. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1818>
91. Jones DT (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292:195–202. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3091>
92. Söding J (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21:951–960. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti125>
93. Jefferys BR, Kelley LA, Sternberg MJE (2010) Protein folding requires crowd control in a simulated cell. *J Mol Biol* 397:1329–1338. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.074>

94. Xie W, Sahinidis N V. (2006) Residue-rotamer-reduction algorithm for the protein side-chain conformation problem. *Bioinformatics* 22:188–194. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti763>
95. Huang Y, Lemieux MJ, Song J, et al (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 301:616–620. <https://doi.org/10.1126/science.1087619>
96. Iancu C V., Zamoon J, Woo SB, et al (2013) Crystal structure of a glucose/H⁺ symporter and its mechanism of action. *Proc Natl Acad Sci* 110:17862–17867. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311485110>
97. Jiang D, Zhao Y, Wang X, et al (2013) Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. *Proc Natl Acad Sci* 110:14664–14669. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308127110>
98. Bhattacharya D, Nowotny J, Cao R, Cheng J (2016) 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. *Nucleic Acids Res* 44:W406–W409. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw336>
99. Lovell SC, Davis IW, III WBA, et al (2003) Structure validation by α geometry: ϕ, ψ and $C\beta$ deviation. *Proteins: Structure. Funct Genet* 50:437–450 <https://doi.org/10.1002/prot.10286>
100. Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, et al (2017) CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res* 45:D200–D203. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1129>
101. Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004) CD-Search: Protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* 32:327–331. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh454>
102. Menke M, Berger B, Cowen L (2008) Matt: local flexibility aids protein multiple structure alignment. *PLoS Comput Biol* 4:0088–0099. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0040010>
103. Kim S, Chen J, Cheng T, et al (2019) PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res* 47:D1102–D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>
104. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
105. Shapovalov M V., Dunbrack RL (2011) A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure* 19:844–858. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.019>
106. Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA (2006) Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model* 25:247–260. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2005.12.005>
107. Trott oleg, Arthur J. Olson (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31:455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

108. Sasaki S, Futagi Y, Ideno M, et al (2016) Effect of diclofenac on SLC16A3/MCT4 by the Caco-2 cell line. *Drug Metab Pharmacokinet* 31:218–223. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2016.03.004>
109. Vivian D, Polli JE (2014) Mechanistic interpretation of conventional Michaelis-Menten parameters in a transporter system. *Eur J Pharm Sci* 64:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.08.007>
110. Groeneweg S, Friesema ECH, Kersseboom S, et al (2014) The role of Arg445 and Asp498 in the human thyroid hormone transporter MCT8. *Endocrinology* 155:618–626. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1521>
111. Quistgaard EM, Löw C, Guettou F, Nordlund P (2016) Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:123–132. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.25>
112. Perland E, Fredriksson R (2017) Classification systems of secondary active transporters. *Trends Pharmacol Sci* 38:305–315. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.008>
113. Stäubli A, Capatina N, Fuhrer Y, et al (2017) Abnormal creatine transport of mutations in monocarboxylate transporter 12 (MCT12) found in patients with age-related cataract can be partially rescued by exogenous chaperone CD147. *Hum Mol Genet* 26:4203–4214. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx310>
114. Manoharan C, Wilson MC, Sessions RB, Halestrap AP (2006) The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity. *Mol Membr Biol* 23:486–498. <https://doi.org/10.1080/09687860600841967>
115. Islam MS, Namba N, Ohata Y, et al (2018) Functional analysis of monocarboxylate transporter 8 mutations in Japanese Allan-Herndon-Dudley syndrome patients. *Endocr J* 66:19–29. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ18-0251>
116. Bröer S, Bröer A, Schneider HP, et al (1999) Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 341:529–535. <https://doi.org/10.1042/bj3410529>
117. Garcia CK, Brown MS, Pathak RK, Goldstein JL (1995) cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *J Biol Chem* 270:1843–1849. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.4.1843>
118. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
119. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
120. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

121. Paulsen PA, Custódio TF, Pedersen BP (2019) Crystal structure of the plant symporter STP10 illuminates sugar uptake mechanism in monosaccharide transporter superfamily. *Nat Commun* 10:407. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08176-9>
122. Kirk P, Wilson MC, Heddle C, et al (2000) CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 19:3896–3904. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.15.3896>
123. Wilson MC, Meredith D, Manning Fox JE, et al (2005) Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: The ancillary protein for the insensitive MCT2 is embigin (gp70). *J Biol Chem* 280:27213–27221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411950200>
124. Ovens MJ, Manoharan C, Wilson MC, et al (2010) The inhibition of monocarboxylate transporter 2 (MCT2) by AR-C155858 is modulated by the associated ancillary protein. *Biochem J* 431:217–225. <https://doi.org/10.1042/BJ20100890>
125. Hadjiagapiou C, Schmidt L, Dudeja PK, et al (2000) Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G775–80. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.4.G775>
126. Nakamura H, Ushigome F, Koyabu N, et al (2002) Proton gradient-dependent transport of valproic acid in human placental brush-border membrane vesicles. *Pharm Res* 19:154–161. <https://doi.org/10.1023/A:1014242931475>

謝辞

本研究は日本学術振興会科研費 JP17J00013 の助成、ならびに日本薬学会長井記念薬学研究奨励金による支援を受け実施されました。

本研究を遂行するに際し、御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 井関健 教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の副査として御審査ならびに御指導賜りました北海道大学大学院薬学研究院薬物動態解析学研究室／北海道大学病院薬剤部 菅原満 教授、北海道大学病院薬剤部 武隈洋 准教授ならびに北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 小林正紀 准教授に厚くお礼申し上げます。

pGH19 ベクターを供与して頂いた Yale 大学の Peter S. Aronson 博士に心から感謝申し上げます。

研究についての御指導・御協力を頂いた京都大学医学部附属病院薬剤部 佐藤夕紀 助教ならびに北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 鳴海克哉 助教、古堅彩子 助教に深く感謝致します。

学士課程在籍時にご指導を賜り、現在の礎を築いて頂いた山形大学大学院医学系研究科／山形大学医学部附属病院薬剤部 山口浩明 教授、東邦大学薬学部薬物動態学教室 佐々木将太郎 講師、東北大学病院薬剤部 小倉次郎 助教に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、御協力を頂いた 岡本敬介 学士、八木沙織 学士、山口敦史氏、野中美玖 氏をはじめ、共に北海道大学での研究生生活を過ごした学生一同に謹んで感謝申し上げます。

最後に、北海道大学での研究生生活を支援してくれた友人と家族に心から感謝致します。

2020 年 3 月

二木 悠哉