

L-乳酸輸送体が基質を選択するメカニズムを解明

～基質輸送経路に存在する2つの残基の重要な役割～

ポイント

- ・ヒトモノカルボン酸輸送体の基質選択性に関与するアミノ酸残基を同定。
- ・同定されたアミノ酸残基は基質輸送経路を構築し、基質や近傍のアミノ酸残基と相互作用し得る。
- ・L-乳酸輸送体を標的とする医薬品の開発に期待。

概要

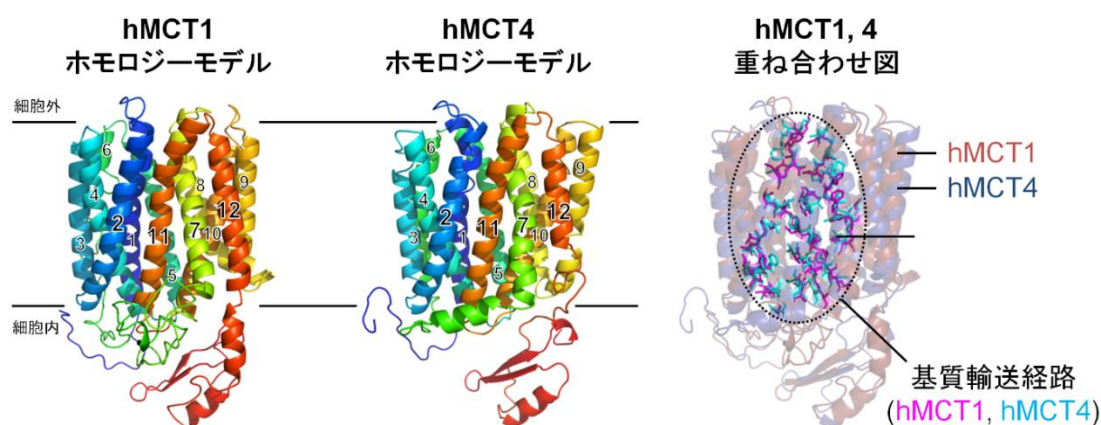
北海道大学大学院生命科学院博士課程・日本学術振興会特別研究員の二木悠哉氏，同大学大学院薬学研究院の井関 健教授らの研究グループは，ホモロジーモデリング法及び部位特異的変異導入法を用いて，ヒトモノカルボン酸輸送体 1, 4 (hMCT1, 4) の基質選択性に関わるアミノ酸残基を同定しました。

hMCT1, 4 は，生体内でのエネルギー代謝に関わる化合物である L-乳酸の輸送を担う輸送体です。これまでに，hMCT1 は L-乳酸に加え 5-オキソプロリンを輸送する一方で，hMCT4 は 5-オキソプロリンを輸送しないという知見が得られており，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の存在が予測されていました。そこで，研究グループは hMCT1, 4 の予測 3 次元構造とアフリカツメガエル卵母細胞を用いた hMCT1, 4 の輸送活性評価系を利用し，hMCT1 選択的な 5-オキソプロリン輸送に重要な 2 つのアミノ酸残基 (69 番目のメチオニン残基及び 367 番目のフェニルアラニン残基) を同定しました。

本研究により，hMCT1, 4 の基質選択に関わるメカニズムの一端が明らかとなり，その構造と機能との関連に新たな知見を与えました。将来的に，L-乳酸輸送体が医薬品の新たな標的分子となることが期待されます。

なお，本研究成果は，2019 年 5 月 17 日 (金) に Cellular and Molecular Life Sciences 誌にオンライン掲載されました。

また，本研究は日本学術振興会科学研究費補助金 (17J00013) の助成を受け，実施されました。



hMCT1, 4 のホモロジーモデルと基質輸送経路

【背景】

ヒトモノカルボン酸輸送体 1, 4 (hMCT1, 4) は、L-乳酸やピルビン酸といったモノカルボン酸^{*1}を輸送するトランスポーター^{*2}で、脳や肝臓をはじめとするエネルギー代謝の盛んな組織に発現が認められ、効率的な基質^{*3}輸送を担っています。

hMCT1, 4 は、その共通の基質として L-乳酸を輸送しますが、hMCT1 は hMCT4 と比較してより広い基質選択性を示すことが知られており、研究グループはこれまでに 5-オキソプロリンというモノカルボン酸が hMCT1 の選択的な基質となることを見出しています。また、hMCT1, 4 を介した L-乳酸輸送に対する 5-オキソプロリンの阻害効果について検証したところ、hMCT1 に対しては阻害効果が認められた一方で、hMCT4 では阻害効果が認められなかったという知見も得ていました。これらの結果は、5-オキソプロリンが hMCT1 選択的に認識されることを示しています。研究グループはその理由を、「基質が輸送される経路を構成するアミノ酸残基^{*4}の違いが、hMCT1, 4 の基質選択性を決定しているから」なのではないかと考察していました。

そこで、本研究では hMCT1, 4 の基質選択性に関わるアミノ酸残基の同定を目的とし、種々検証を行いました。

【研究手法】

hMCT1, 4 の基質輸送能を評価するため、アフリカツメガエル卵母細胞^{*5}に hMCT1, 4 遺伝子を直接注入することで、hMCT1, 4 を発現させた卵母細胞を得ました。この卵母細胞を用いて、放射標識された L-乳酸及び 5-オキソプロリンの輸送活性を測定しました。

また、hMCT1, 4 の基質選択性に関わるアミノ酸残基を同定するため、基質輸送経路を構成するアミノ酸残基のうち、hMCT1, 4 間で共通していない残基に着目しました。そこで、抽出された各 20 アミノ酸残基について hMCT1, 4 間で置換した変異体を作製し、基質選択性の変動を評価しました。

さらに、同定された基質選択性に関わるアミノ酸残基が、hMCT1, 4 の 3 次元構造中のどの位置に存在しているかを明らかにするため、hMCT1, 4 のホモロジーモデル^{*6}を構築しました (p.1 図)。

【研究成果】

研究グループは、作製した hMCT1 変異体のうち、69 番目のメチオニン残基をロイシン残基に変異させた (M69L) 変異体、367 番目のフェニルアラニン残基をチロシン残基に変異させた (F367Y) 変異体で、それぞれの 5-オキソプロリン輸送活性が L-乳酸輸送活性よりも低下することを見出しました。このことから、69 番目のメチオニン (M69) 残基と 367 番目のフェニルアラニン (F367) 残基が、hMCT1 の基質選択性に関わることが示唆されました。その一方で、hMCT1 で基質選択性に変動が認められた部位に対応する hMCT4 の L71M 及び Y332F 変異体については、hMCT4 と同程度の L-乳酸輸送活性が保持されていたものの、どちらも 5-オキソプロリン輸送活性を示しませんでした。

このことから、hMCT1 においては M69 及び F367 の 2 つのアミノ酸残基が基質選択性に関わっている一方で、hMCT4 においてはこれら 2 つの残基の基質選択性への関与が小さいか、もしくはこれら以外にも基質選択性の発現に必須な残基が存在することが示唆されました。

同定された 2 つのアミノ酸残基の 3 次元構造上での位置を確認するため、hMCT1 のホモロジーモデルを構築した結果、2 つの残基とも基質輸送経路に面した位置に存在しており、hMCT1 内部を通過する基質や近傍のアミノ酸残基との相互作用が可能であることを確認できました (図 1)。

【今後への期待】

本研究により、hMCT1 を介した 5-オキソプロリン輸送に重要な 2 つの残基(M69 及び F367 残基) を同定しました。しかし、これら 2 つの残基以外にも hMCT1 の基質選択性に関わる残基が存在する可能性は残されています。本研究で同定された残基や、未知の基質選択性に関与する残基に関する知見が蓄積していくことで、モノカルボン酸輸送体の構造と機能との関連が明らかとなり、将来的に L-乳酸輸送体が医薬品の新たな標的分子となることが期待されます。

論文情報

論文名 Homology modeling and site-directed mutagenesis identify amino acid residues underlying the substrate selection mechanism of human monocarboxylate transporters 1 (hMCT1) and 4 (hMCT4) (ホモロジーモデリング法および部位特異的変異導入法を利用したヒトモノカルボン酸輸送体 hMCT1, 4 の基質選択メカニズムに関与するアミノ酸残基の同定)

著者名 二木悠哉^{1,2}, 小林正紀^{3,4}, 鳴海克哉³, 古堅彩子³, 井関 健^{3,4} (1北海道大学大学院生命科学院, 2日本学術振興会特別研究員 DC, 3北海道大学大学院薬学研究院, 4北海道大学病院薬剤部)

雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences (生物学, 生物医学の専門誌)

DOI 10.1007/s00018-019-03151-z

公表日 2019年5月17日(金)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 教授 井関 健 (いせきけん)
TEL 011-706-3770 FAX 011-706-3770 メール ken-i@pharm.hokudai.ac.jp
URL <http://rinshoyakuzaigaku.pharm.hokudai.ac.jp/>

配信元

北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)
TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール kouhou@jimuhokudai.ac.jp

【用語解説】

- *1 モノカルボン酸 … カルボキシ基 (COOH 基) をその構造中に一つだけ有する化合物のこと。
- *2 トランスポーター … 生体膜において物質の輸送に関わるタンパク質のこと。
- *3 基質 … 酵素やトランスポーターなどのタンパク質が相互作用する相手の物質のこと。
- *4 アミノ酸残基 … タンパク質を構成しているアミノ酸の 1 単位に相当する部分のこと。
- *5 アフリカツメガエル卵母細胞 … アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) より得られる卵母細胞で、その取扱いの容易さからトランスポーターなどの膜タンパク質の生物活性評価に汎用されている。
- *6 ホモロジーモデル … アミノ酸配列が類似したタンパク質の 3 次元構造をもとに、3 次元構造未知のタンパク質の構造を予測して得られたモデルのこと。

【参考図】

hMCT1
基質選択性に関わる残基

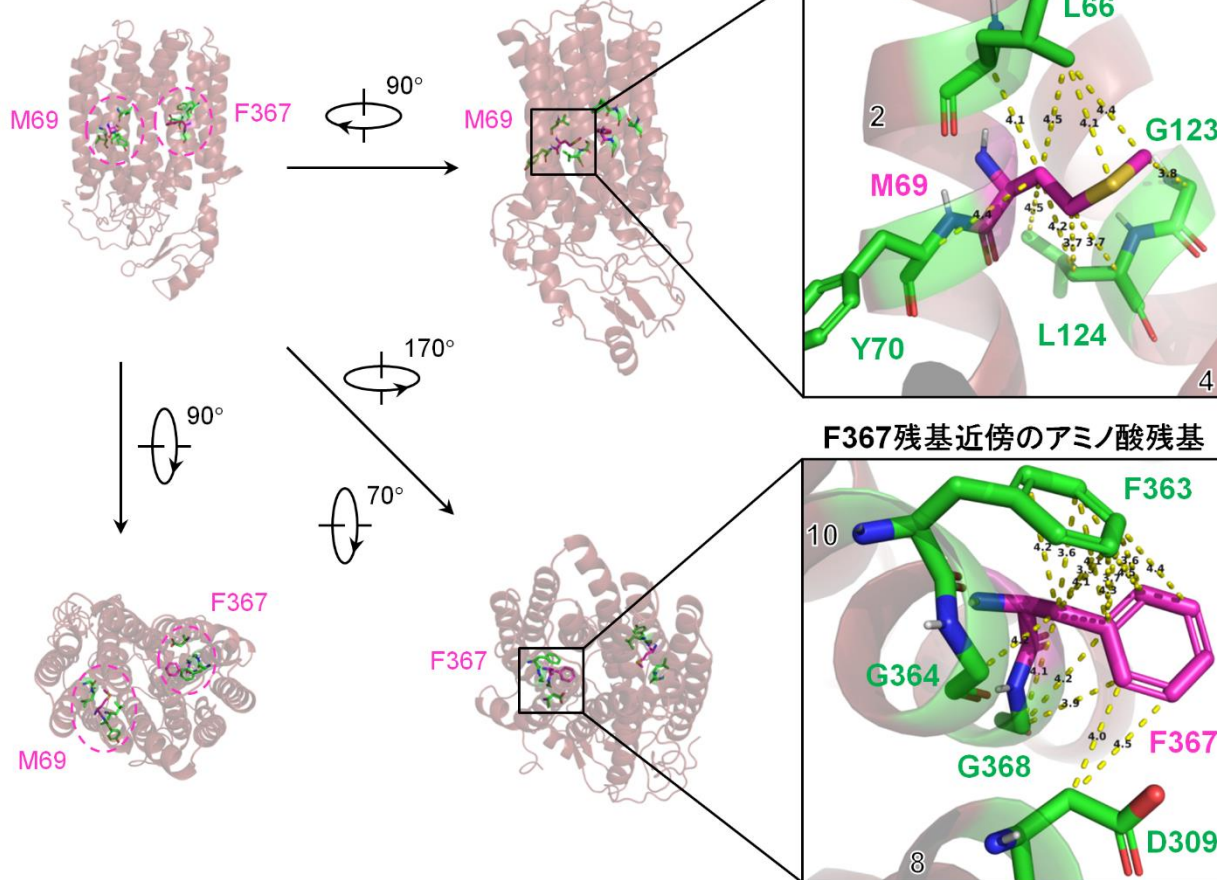


図 1. hMCT1 の基質選択メカニズムに関わるアミノ酸残基 M69, F367 とその近傍のアミノ酸残基。