

「生体防御のメカニズム」
平成9年度採択研究代表者

杉山 雄一

(東京大学大学院薬学系研究科・教授)

「異物排除システムの分子基盤」

1. 研究実施の概要

異物・生理的物質トランスポーターとして、ATP-依存的な基質排出能力を有する multidrug resistance associated proteinファミリーについて、機能解析および異物解毒における意義について検討を加えた。また、ABCトランスポーターを抗がん剤の感受性を制御する分子標的としての臨床診断へ利用するために、がんにおける特異的発現の分子的機構について解析を行った。さらに、有機アニオン取り込みトランスポーターに分類されるOATPならびに有機カチオン取り込みトランスポーターに分類されるOCTNトランスポーターについて、新規分子種のクローニングならびに機能解析を行った。輸送機能と蛋白構造の関係について理解するため、細菌と動物細胞の異物排出蛋白について、蛋白工学的手法により分子構造と機能残基を詳細に解析するとともに、細菌異物排出蛋白の結晶化に初めて成功した。また、排出蛋白の細胞内局在性決定因子の解析を行った。

2. 究実施内容

一次性能動輸送グループ

異物解毒に関与するトランスポーターとして、ABCトランスポーターの中で特にMDR1 P-糖蛋白と multidrug resistance associated protein (MRP)ファミリーに焦点を当てた解析を行った。これらのトランスポーターは、薬物の体内動態に大きな影響を与える要因となるため、in vivoにおけるトランスポーター機能を予測するin vitro評価系の作成を目指した。MDR1のin vivo機能については、特にこの蛋白が血液脳関門に発現されて基質の脳移行を制限していることに着目し、MDR1ノックアウトマウスにおける脳/血液濃度比を、正常マウスにおける比で除した値を定義した。さらに、in vitro評価系としては、MDR1遺伝子を導入した単層培養細胞系(LLC-PK1細胞)を介した経細胞輸送について検討を加えた。すなわち、導入細胞におけるbasal-to-apical fluxを逆向きのfluxで除した比を、非導入細胞における比で除した値を定義した。その結果、in vivoとin vitroの間には良好な相関が観察され、in vivoにおけるMDR1機能をin vitroデータから定量的に予

測しうることが示された。さらに、MRPファミリーは種々体細胞に発現されるが、消化管において、有機アニオン系化合物の吸収に關与することを示すことができた。また、MRP2のin vitro機能解析系としては、apical側にMRP2を、basal側に取り込みトランスポーター（OATP2など）を発現させた、MDCK細胞を介した経細胞輸送を解析する系を提唱することができた。また、MRP2については、部位突然変異導入により、機能に必須なアミノ酸残基を同定した。

二次性能動輸送グループ

二次性能動輸送に關与するトランスポーターとして、既に新規有機カチオン/カルニチントランスポーターとして同定・解析を行ったヒトOCTNトランスポーターと同様、マウスOCTNの解析を進めた。その結果、マウスにおいては既知OCTN2に加え、新規にOCTN1ならびにOCTN3の二種類の分子種を見いだした。OCTN1はヒトOCTN1と対応する分子であるが、OCTN3はヒトでのオルトログが不明な新しいタイプと考えられた。機能的には、既知OCTN2がカルニチントランスポーターとして重要であるが、OCTN2は有機カチオントランスポーターとして、特に腎での有機カチオンの尿細管分泌に働いていることが示された。即ち、OCTN2遺伝子変異動物のjvsマウスでは有機カチオンの尿細管分泌が抑制された。また免疫組織化学的解析によってOCTN2は尿細管上皮細胞刷子縁膜に発現していた。以上より、OCTN2は上皮細胞内から尿中への有機カチオン分泌に働くことが示された。また、マウスOCTN1はOCTN2と異なり、有機カチオン輸送活性は高いが、カルニチン輸送活性は低かった。一方、マウスOCTN3は有機カチオン輸送活性は極めて低く、カルニチン特異性が高かった。また、OCTN3はOCTN1あるいはOCTN2とは異なりカルニチン輸送にナトリウム依存性が観測されなかった。以上、マウスOCTNトランスポーターは機能特性が分子種間で異なり、それぞれ異なる生理学的役割を果たしており、薬物動態的にはOCTN1ならびにOCTN2が重要であるものと考えられた。

有機アニオントランスポーターとして、ヒトOATPファミリーの分子的同定と機能解析を行った。OATP分子種として新規にOATP-B、OATP-D、ならびにOATP-Eを見いだした。これらはいずれも既知OATP-AあるいはOATP-Cと異なり、幅広い組織分布性を有していた。OATP-D,Eについてはその基質を明らかにできていないが、OATP-Bはステロイドの硫酸抱合代謝物輸送に働くことが示された。しかし、グルクロン酸抱合体の輸送活性は観測されず、肝臓特異的なOATP-Cとは異なっていた。一方、OATP-Cについては、新たに高親和性のステロイド抱合代謝物トランスポーターであることを見いだした。即ちステロイド硫酸抱合代謝物に対してOATP-Cは高親和性・低親和性の2カ所の活性部位を有しており、高親和性部位は数十nMのKm値と生理的濃度に近く、既知の数マイクロモ

ル濃度より特異性の高いトランスポーターであることを示した。

異物排出蛋白分子構造解析グループ

輸送機能と蛋白構造の関係について検討を加えた。モデルとしてテトラサイクリン排出蛋白を選び、この蛋白の完全Cys走査変異体を構築し、SH試薬との反応性から詳細なトポロジーを決定した。また、Cys二重変異体を系統的に多数構築し、酸化による架橋形成の有無を調べることにより、分子内の2残基間の距離を推定し、膜貫通ヘリックスの3次元配置を決定した。さらに、大腸菌ゲノム配列から推定される34種類の推定異物排出遺伝子ORF全てを強制発現クローニングしたライブラリーを構築し、多数の新しい異物排出蛋白遺伝子を同定した。また、その過程で二成分情報伝達系による異物排出遺伝子発現調節による多剤耐性化という新しいメカニズムを発見した。排出蛋白質の構造に関しては、大腸菌マルチコンポーネント型異物排出蛋白AcrAB-TolC系をモデルとして選び、このうちAcrBとAの結晶化に成功し、現在X線結晶解析により構造解析中である。また、MRP2のapical局在性を規定する因子として、PDZK1とmerlinを同定した。

薬剤耐性機構解析グループ

ABCトランスポーターの病態時における発現変動の解析を行った。MRP2の発現がヒト大腸がんで特異的に上昇していること、MRP1、MRP2とMRP3の大腸における発現レベルに1000倍近い個人差があることなどを観察した。さらにMRP3がエトポシドならびにシスプラチンの感受性とATP依存性排出に関与すること、脳腫瘍の症例におけるがん部位でのMRP1とMRP3の発現上昇などを見出した。さらに、ヒトMDR1遺伝子のがん細胞における発現上昇にプロモーター領域でのAlu配列や他遺伝子の挿入などによる再配列が観察された。膀胱腫瘍において再発症例でのMDR1発現上昇にはプロモーター領域のCpGの脱メチル化が関与していることを明らかにした。さらに、マウス白血病の化学療法の途中で上昇してくる多剤耐性mdr遺伝子の上昇にプロモーターでのレトロウイルスLTR配列の挿入を見出した。MDR1遺伝子の発現誘導に関与するプロモーター上のY-boxと結合するYB-1はp53と結合することを明らかにした。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

一次性能動輸送グループ

N. Morita, H. Kusuhara, T. Sekine, H. Endou and Y. Sugiyama : Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 298, 1179-1184(2001)

H. Kusuhara and Y. Sugiyama : Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs : transporters in the liver, kidney, intestine and brain. J. Controlled Rel. 78, 43-54(2002)

Y. Adachi, H. Suzuki and Y.Sugiyama : Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vivo function of MDR1 P-glycoprotein. Pharm. Res., 18, 1660-1668(2001)

A.Akita, H.Suzuki and Y.Sugiyama : Sinusoidal efflux of taurocholate is enhanced in Mrp2-deficient rat liver. Pharm.Res., 18, 1119-1125(2001)

H. Kusahara and Y. Sugiyama : Drug-drug interactions involving the membrane transport process. Rodrigues Ed. Drug-drug interactions. pp123-188, Marcel Dekker, New York(2001)

Han, Y. Kato, Y. Watanabe, K. Terao, Y. Asoh, and Y. Sugiyama : : Carrier-mediated hepatobiliary transport of a novel antifolate, N⁴-(2,4-diamminopteridine-6-yl)methyl-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazin-7-yl-carbonyl-L-homoglutamic acid, in rats. Drug Metab. Dispos. 29 : 394-400(2001)

A. Nishino, Y. Kato, T. Igarashi, and Y. Sugiyama : Both cMOAT/MRP2 and another unknown transporter(s) are responsible for the biliary excretion of glucuronide conjugate of the non-peptide angiotensin II antagonist, Telmisartan. Drug Metab. Dispos. 28 : 1146-1148(2000)

K.Ogawa, H.Suzuki, T.Hirohashi, T.Ihsikawa, P.J.Meier, K.Hirose, T.Akizawa, M.Yoshioka and Y.Sugiyama : Characterization of the inducible nature of MRP3 in rat liver. Am.J.Physiol. 278 : G438-G446(2000)

H.Kouzuki, H.Suzuki and Y.Sugiyama : Pharmacokinetic study of the hepatobiliary transport of indomethacin. Pharm.Res., 17, 432-438(2000).

A.Morikawa, Y.Gotoh, H.Suzuki, T.Hirohashi and Y.Sugiyama : Biliary excretion of 17 β -estradiol 17 β -D-glucuronide is predominantly mediated by cMOAT/MRP2. Pharm.Res., 17, 546-552(2000)

Y.Sugiyama and Y.Kato : Tissue selective drug delivery utilizing transporters and receptors. In "Biomaterials and Drug Delivery toward New Millenium" Ed. By K.D.Park, I.C.Kwon, N.Yui, S.Y.Jeong and K.Park. pp. 383-393(2000)

H.Suzuki and Y.Sugiyama : Transport of drugs across the hepatic sinusoidal membrane : Sinusoidal drug influx and efflux in the liver. Semin.Liv.Dis. 20, 251-263(2000)

H.Suzuki and Y.Sugiyama : Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. Eur. J. Pharm. Sci.,12, 3-12 (2000)

二次性能動輸送グループ

K. Naruhashi, I.Tamai, Y.Sai, N.Suzuki and A.Tsuji : Secretory transport of p-

aminohippuric acid across intestinal epithelial cells in Caco-2 cells and isolated intestinal tissues. J. Pharm. Pharmacol., 53, 73-81(2001)

R.Ohashi, I.Tamai, J.Nazu, H.Nikaido, N.Hashimoto, A.Oku, Y.Sai, M.Shimane and A.Tsuji : Molecular and Physiological Evidence for Multifunctionality of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN2.

Mol. Pharmacol., 59, 358-366(2001)

H.Uchino, I.Tamai, K.Yamashita, Y.Minemoto, Y. Sai, H.Yabuuchi, K.Miyamoto, E.Takeda and A. Tsuji : *p*-Aminohippuric acid transport at renal apical membrane mediated by human inorganic phosphate transporter NPT1. Biochem. Biophys. Res. Commun., 270, 254-9(2000)

I.Tamai, J. Nezu, H. Uchino, Y.Sai, A.Oku, M.Shimane and A.Tsuji: Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter(OATP)family. Biochem. Biophys. Res. Commun., 273, 251-260(2000)

I.Tamai, T. Ogihara, H.Takanaga, H. Yabuuchi and A.Tsuji: Anion antiport is involved in transport of lactic acid across intestinal epithelial brush-border membrane. Biochim. Biophys. Acta, 1468, 285-292(2000)

I.Tamai, J.Yamashita, Y.Kido, A.Ohnari, Y.Sai, Y.Shima, K.Naruhashi, S.Koizumi and A.Tusji : Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain owing to multiple efflux transporters at the blood-brain barrier. J. Pharmacol. Exp. Ther., 295, 146-152(2000)

T.Nakanishi, I.Tamai, A.Takaki and A.Tsuji : Cancer cell targeted drug delivery utilizing oligopeptide transport activity. Int. J. Cancer , 88, 274-280(2000)

I.Tamai, R.Ohashi, J.Nezu, Y.Sai, D.Kobayashi, A.Oku, M.Shimane and A. Tsuji : Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. J. Biol. Chem., 275, 40064-40072(2000)

I.Tamai and A.Tsuji : Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. J. Pharm. Sci., 89, 1371-88(2000)

異物排出蛋白分子構造解析グループ

N.Tamura, S.Konishi, S. Iwaki, T.Kimura-Someya, S.Nada and A.Yamaguchi : Complete Cysteine-Scanning Mutagenesis and Site-Directed Chemical Modification of the Tn10-Encoded Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter. J. Biol. Chem., 276, 20330-20339(2001)

K.Nishino and A.Yamaguchi : Overexpression of the ResponseRegulator evgA of the Two-Component Signal Transduction System Modulates Multidrug

Resistance Conferred by Multidrug Resistance Transporters. J. Bacteriol., 183, 1455-1458(2001)

S.Nada, S.Murakami, S.Okamoto, Y.Kubo and A.Yamaguchi : Monoclonal Antibody That Binds to the Central Loop of the Tn10-Encoded Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli*. J. Biochem., 129, 87-91(2001)

S.Ryu, T.Kawabe, S.Nada and A.Yamaguchi : Identification of Basic Residues Involved in Drug Export Function of Human Multidrug Resistance Associated Protein 2. J. Biol. Chem., 275, 39617-39624(2000)

T.Kawabe, E.Fujihira and A.Yamaguchi: Molecular Construction of a Multidrug Exporter System, AcrAB : Molecular Interaction between AcrA and AcrB, and Cleavage of the N-Terminal Signal Sequence of AcrA. J. Biochem., 128, 195-200 (2000)

S.Iwaki, N.Tamura, T.Kimura-Someya, S. Nada and A.Yamaguchi : Cysteine-scanning Mutagenesis of Transmembrane Segments 4 and 5 of the Tn10-encoded Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter Reveals a Permeability Barrier in the Middle of a Transmembrane Water-filled Channel. J. Biol. Chem., 275, 22704-22712(2000)

T.Kimura-Someya, S.Iwaki, S.Konishi, N.Tamura, Y.Kubo and A.Yamaguchi: Cysteine-scanning Mutagenesis around Transmembrane Segments 1 and 11 and Their Flanking Loop Regions of Tn10-encoded Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter. J. Biol. Chem., 275, 18692-18697(2000)

Y.Kubo, S.Konishi, T.Kawabe, S.Nada and A.Yamaguchi : Proximity of Periplasmic Loops in the Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli* Observed on Site-directed Chemical Cross-linking. J. Biol. Chem., 275, 5270-5274 (2000)

Y.Someya, T.Kimura-Someya and A.Yamaguchi : Role of the Charge Interaction between Arg70 and Asp120 in the Tn10-encoded Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 275, 210-214(2000)

薬剤耐性機構解析グループ

J.Nagayama, M.Iino, Y.Tada, H.Kusaba, A.Kiue, K. Ohsima, M.Kuwano and M.Wada : Retrovirus insertion and transcriptional activation of the multidrug resistance(*mdr1a*)gene in leukemias treated by a chemotherapeutic agent in vivo. Blood, 97, 759-766(2001)

S.Haga, E.Hinoshita, K.Ikezaki, M.Fukui, G. L.Scheffer, T.Uchiumi and M.Kuwano; : The involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug

sensitivity and its expression in human glioma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 211-219 (2001)

T.Harada, J.Nagayama, K.Kohno, L.Mickley, T.Fojo, M.Kuwano and M.Wada : Alu-associated interstitial deletions and chromosomal re-arrangement in 2 human multidrug-resistant cell lines. *Int. J. Cancer*, 86, 506-511(2000)

E.Hinoshita, T.Uchiumi, K.Taguchi, N.Kinukawa, M.Tsuneyoshi, Y.Maehara, K.Sugimachi and M.Kuwano : Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clinical Cancer Res.*, 6, 2401-2407(2000)

Y.Tada, M. Wada, K.Kuroiwa, T.Harada, M.Tsuneyoshi, M.Nakagawa, S.Naito M.Kuwano : MDR1 overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. *Clinical Cancer Res.*, 6, 4618-4627(2000)

T.Harada, A. Nishie, K.Torigoe, K.Ikezaki, T.Shono, Y.Maehara, M.Kuwano and M.Wada : The specific expression of three novel splice variant forms of human metalloprotease-like disintegrin-like cysteine-rich protein 2 gene in brain tissues and gliomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 1001-1006(2000)

T.Okamoto, H.Izumi, T. Imamura, H.Takano, T. Ise, T.Uchiumi, M.Kuwano and K. Kohno : Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1 : a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene*, 19, 6194-6202 (2000)