

Title	動物細胞異物排出蛋白質MRP2の機能と構造に関する蛋白質工学的研究
Author(s)	柳, 承希
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42289
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	柳 承 希
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 16156 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	動物細胞異物排出蛋白質 MRP 2 の機能と構造に関する蛋白工学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人 (副査) 教授 馬場 明道 教授 前田 正知 教授 花岡 文雄

論文内容の要旨

胆汁排泄は異物解毒において重要な役割を果たす。胆管側膜を介した化合物の胆汁排泄機構については、近年飛躍的に研究が進み、有機アニオン系化合物が MRP 2 / cMOAT と称される 1 次性能動輸送担体により排泄を受けることが明らかとされてきた。MRP 2 の cDNA 配列も解明され、スーパーファミリーメンバーが存在すること、またこれらの輸送担体が肝臓のほか、小腸、脳毛細血管内皮細胞などをはじめとする種々の細胞にも存在し、生体内因性の老廃物の除去にあたるほか、外来性異物の排除にも関与することが示唆されてきた。また、MRP 2 は多剤排出タンパク質である MRP 1 との相同性から、多剤耐性因子としての性格を有することも示唆される。

しかし、現在のところ、この MRP 2 について、どのように基質を認識し、どのような機構で輸送するのか、そしてそのエネルギー源は、等といった問題についてはほとんど解明されていない。また、どのような二次元トポロジーなのかという点も推測の域を脱していない。そこで、この抗癌剤を含めた異物排出と生体内老廃物の排出の両面から興味深い MRP 2 の、基質輸送機構解明を目的として、MRP 2 の培養細胞系における発現系の確立と、基質輸送活性測定法の確立を行った。また、この輸送活性測定系を用いて MRP 2 の機能残基の同定を行った。

この MRP 2 の詳細な基質認識、および基質輸送機構解析を行っていく上で、まず必要なのはそのタンパク質の発現系の構築である。そこで、MRP 2 の安定発現株として CHO-K1 細胞を、一過性発現株として COS-7 を用いて発現系の構築を行った。MRP 2 が発現していることを、MRP 2 C-terminal のペプチドに対するウサギ抗血清を用いて確認を行った結果、安定発現株である CHO-K1 / MRP 2 はもちろん一過性発現株である COS-7 / MRP 2 において MRP 2 の発現が確認された。

次に、MRP 2 の機能解析を行うにあたって、必須である基質輸送活性測定法の確立を行った。MRP 2 がグルタチオン抱合体を排出するという特徴を利用し、基質として monochlorobimane と 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) を選択した。これらの基質は疎水性が高いため、細胞膜を自由に透過することが出来る。細胞内でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) によって、グルタチオン (GSH) 抱合を受けて、それぞれ glutathione-methylfluorescein (GS-MF) (蛍光性) と glutathione-bimane (GS-B) (蛍光性) に変化し、MRP 2 により細胞外に排出されると予想される。これらを基質として輸送活性測定を行ったが、どちらの基質に関しても MRP 2 発現株において非発現株に比べ、蛍光物質の排出量に約 4 倍の差が見られ、また、排出反応後の細胞内残存の蛍光物質にも顕著な差が見られたので、MRP 2 の基質輸送活性測定法が確立出来た。

次にこの MRP 2 の輸送活性測定法を用いて MRP 2 の機能残基の同定を行った。MRP 2 が有機アニオンを輸送するという事は MRP 2 の輸送機能に塩基性残基が関わっている可能性が考えられる。MRP 2 の輸送機能における塩基性残基の役割を解析するため、膜貫通領域 6-17 に存在する塩基性残基をアラニンに置換した 13 個の変異体を部位特異的変異により構築した。各変異体の COS-7 における発現を Western blotting および免疫染色により確認した結果、K578A を除くすべての変異体においてその発現量は野生型 MRP 2 と変わらなかった。しかし、K578A 変異体においてはその発現量が顕著に減少していた。これは Lys578 が MRP 2 の発現に関与していることを示唆している。次に各変異体における輸送活性を測定した。その結果、K578A、R1210A 及び R1230A 変異体において顕著な輸送活性の低下がみられた。しかし、K578A 変異体においては Western blotting や免疫染色の結果から発現量も減少していたことから K578A における輸送活性の低下は発現量の減少によるものと考えられる。また、輸送活性の低下の原因としては MRP 2 の膜への sorting の失敗である可能性も考えられる。その可能性を確かめるため、免疫染色した細胞を confocal 顕微鏡で観察した。その結果、これらの変異体は野生型 MRP 2 同様、形質膜に発現しているのが確認された。このことは輸送活性の低下が膜への sorting の失敗によるものではないことを意味する。これは Arg1210 及び Arg1257 が MRP 2 の機能に必須な残基であること、Lys578 は MRP 2 の機能よりは発現に関与していることを示している。また、K324A および K483A においては中程度の輸送活性の低下がみられ、Lys324 及び Lys483 も MRP 2 の機能に関与していることが示唆された。

次にシクロスポリン A による MRP 2 輸送活性阻害における塩基性残基の役割について検討を行った。シクロスポリン A は MDR 1 の阻害剤でもあり、MDR 1 による多剤排出の克服に有用と考えられている。また、シクロスポリン A は MRP 2 の阻害剤としても知られている。そこで、輸送活性を保持している変異体においてシクロスポリン A で処理し、GS-MF の輸送活性を測定した。その結果、輸送活性を保持している変異体のほとんどが野生型 MRP 2 と同様、CsA により GS-MF の輸送活性が阻害されたのに対し、R1230A 変異体においては CsA による輸送活性の阻害はみられなかった。この結果から Arg1230 がシクロスポリン A による MRP 2 の輸送活性阻害に重要な残基であることが示唆された。興味深いことに MRP 2 の機能に必須な残基である Arg1210 及び Arg1257 は膜貫通領域の細胞質側に位置しているのに対し、Arg1230 は細胞外に位置していること、また膜貫通領域 16、17 に位置していることから膜貫通領域 16、17 が MRP 2 の基質輸送経路を構成している可能性が示唆された。

MRP 2 の基質輸送に膜貫通領域の塩基性残基が重要であることを示したのは今回が初めてである。このような機能アミノ酸残基の同定は薬物開発の段階において MRP 2 により排出され易い、あるいは排出され難い薬物をスクリーニングすることに役立つと考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年、高等動物を中心に、種々の異物排出タンパクが発見され、ガン細胞などの化学療法剤耐性因子としてばかりでなく、各種の遺伝的疾患の因子としても注目されてきている。本学位論文の主題である MRP 2 は、主として肝臓における解毒の最終段階としてのグルタチオン・グルクロン酸等の複合体の胆管への能動的排泄に関わる ABC 型膜輸送タンパク質である。その遺伝子変異によって Dubin-Johnson 症などの遺伝的疾患が起り、また、ガン細胞での過剰発現によって抗ガン剤耐性も引き起こすが、詳しい分子構造や異物排出機構は知られていない。

柳さんは、MRP 2 遺伝子をクローニングし発現した培養細胞系を用いて、まず、MRP 2 による膜輸送活性測定法を確立した。その方法は、通常は蛍光を発しないが、細胞に取り込まれてエステラーゼ分解を受けると蛍光を発する基質をプローブとして、MRP 2 を発現しない細胞をコントロールとして、(1)細胞内蛍光量の顕微鏡観察、(2)排出蛍光量の蛍光分光光度計による定量によって行った。ついで、膜輸送に関与する機能残基の検索を部位特異変異導入法で行った。輸送される基質はアニオン性有機化合物なので、膜貫通領域の塩基性残基が輸送に関与していると推測される。そこで、膜貫通領域に保存されている 13 個の塩基性残基に着目し、これらを一ずつ Ala に置換した。その結果、活性に必須なアルギニン残基 2 つ (Arg1210、1257) と活性には直接関与しないが、阻害剤シクロスポリン A の結合に関与する残基 Arg1230 を同定した。これは MRP 2 における初めての機能残基同定であり、予測通り、塩基

性残基の関与を支持するものであった。本研究の成果は、今後の阻害剤等の開発にも有用な知見を提供するものであり、博士（薬学）の学位を授与するのにふさわしいと考えられる。