

蛋白質輸送を規定する細胞極性形成メカニズム解析
- 輸送基質で誘導される高親和性コリントランスポーターの
細胞内移行の解析 -

薬理学講座：奥田隆志、三澤日出巳

[研究目的] コリン作動性神経は中枢・末梢神経系において自律、運動、認知など多くの重要な生理機能を司り、その破綻は多くの病態に関与する。コリン作動性神経末端においてアセチルコリン合成の前駆体として必須であるコリンは高親和性コリン取り込み系によって細胞外から輸送される。この輸送系を担う高親和性コリントランスポーター (CHT1) は 2000 年にクローニングされ、コリン作動性神経に特異的に発現することが確立している (Okuda et al., *Nature Neuroscience*, 2000)。CHT1 はアセチルコリン合成の律速段階を担うため、その活性はアセチルコリン合成量を規定する重要な因子であるが、生理的な活性制御機構は明らかとなっていない。我々は、CHT1 の活性制御機構を解析する過程で、輸送基質であるコリンが CHT1 の細胞内移行を誘導することを見出した。

[結果] CHT1 の輸送基質であるコリン、あるいは競合的阻害剤であるヘミコリニウム-3 (HC-3) でラット海馬シナプトソームを 15 分間処理した後に高親和性³Hコリン取り込みを測定した。10 μM コリンの前処理で³Hコリン取り込みは約 20% 減少し、1 μM HC-3 の前処理により約 1.2 倍に増加することを見出した。特異的³HHC-3 結合量も同様の増減を示した。リガンド前処理によるこれらの効果は線条体由来のシナプトソームにおいても同様に観察された。シナプトソームにおいてコリン非存在下でも定常的に³Hコリン取り込み減少が観察されたため、内在性の細胞外コリンが CHT1 の細胞内移行に寄与している可能性を考え、シナプトソームをコリンオキシダーゼ処理することによりコリンを枯渇させたところ、³Hコリン取り込みは有意に増加した。次に株化細胞発現系で検討を行ったところ、CHT1 を遺伝子導入した PC12 細胞における³HHC-3 結合は 20 μM コリンの前処理により約 30% 減少し、1 μM HC-3 により約 1.5 倍に増加した。HEK293、COS-7、HeLa など他の細胞系でも同様であったことから、リガンドによる細胞表面発現量の変化は CHT1 の普遍的特性であると考えられる。

HEK293 細胞をモデル系として CHT1 安定的発現株を樹立し、リガンド前処理による細胞表面 CHT1 量の制御機構を詳細に解析した。細胞を 20 μM コリンで前処理すると³HHC-3 結合活性は 30-50% に減少し、1 μM HC-3 前処理では約 2-4 倍に増加した。³Hコリン取り込み活性についても同様の増減が観察された。リガンド前処理の効果は Na⁺

依存的であり、それらの EC_{50} 値は CHT1 のリガンドに対する K_m 、 K_d 値と同程度であったことから、リガンドが CHT1 に直接作用することにより HC-3 結合・コリン取り込み活性を制御することが示唆された。FLAG タグ付加 CHT1 cDNA を恒常発現細胞株を用いた細胞表面選択的抗体染色や、親水性ビオチン化試薬を用いた細胞表面タンパクの精製・解析により、リガンド前処理後の細胞表面 CHT1 量を評価したところ、リガンドによる同様の効果が観察された。また、可逆的な細胞表面ビオチン化を利用してエンドサイトーシス速度の解析を行ったところ、CHT1 細胞内移行はコリン存在下で有意に促進され、逆に HC-3 存在下で有意に抑制された。以上の結果から、細胞外のリガンドは CHT1 の細胞内移行速度を制御することにより細胞表面 CHT1 量を規定すると考えられる。クラスリンエンドサイトーシス関連タンパクに対する RNAi や薬理的解析の結果、少なくとも株化細胞発現系においてコリンで誘導される CHT1 の細胞内移行は、主としてクラスリン非依存性・ダイナミン依存性のエンドサイトーシス経路を介することが示唆された。

[考察] 今回我々は、細胞外の輸送基質が CHT1 の細胞内移行を誘導することによりその細胞表面発現量を制御することを新たに見出した。この分子機構は不明であるが、基質が細胞内移行に促進的な作用を示し、競合的阻害剤が基質とは逆の作用を示すことから、CHT1 タンパクのコンフォメーション変化が引き金になると予想される。基質輸送に伴って CHT1 の内向きコンフォメーション型の割合が増大し、エンドサイトーシス関連タンパクとの相互作用などを介して細胞内移行が促進されると考えられる。基質誘導による細胞内移行は、トラフィッキングにより CHT1 の細胞表面発現量を制御する新たなフィードバック機構である。脳内のシナプス間隙におけるコリン濃度は数 μM と推測されることから、細胞外コリン濃度は細胞表面 CHT1 量を規定する重要な因子であり、生体内で CHT1 は定常的に細胞内へ移行すると予想される。また、この機構は、コリン作動性神経の高頻度刺激時に神経末端における高親和性コリントランスポーターのリサイクリングを促進することで、アセチルコリンの持続的な合成・放出に重要なメカニズムとして機能していると考えられる (Okuda et al., *J. Neurosci.*, in press)。

生物学的製剤の効率的な細胞内への導入による がん細胞増殖抑制の解析

生化学講座 多胡 めぐみ、園田 よし子、笠原 忠

【研究の目的】 チロシンキナーゼは、細胞の分化、増殖、接着、生存などに関わる重要なシグナル伝達因子である。非受容体型チロシンキナーゼである接着斑キナーゼ FAK は、多くのがん細胞で発現の亢進が認められることが知られている。これまでに私達は、FAK を発現したメラノーマ細胞は、増殖能や転移能が増強することを報告してきた。また、FAK 発現細胞において高発現する膜タンパク質 PLP2 が、FAK と同様に、転移能や浸潤能の増強作用を示すことを見出した (論文 1, 2)。 (1) 本研究では、FAK による細胞増殖、転移の分子機構を解析するために、siRNA を用いて、メラノーマ細胞の FAK および PLP2 の発現を抑制し、増殖や転移における FAK および PLP2 の役割を解析するとともに、メラノーマ細胞を移植したマウスに、siRNA を投与する方法を用いた治療実験を試みた。

また、慢性骨髄増殖性腫瘍の原因遺伝子であるチロシンキナーゼ JAK2 の点変異体 (V617F) は、血球細胞の無秩序な異常増殖を引き起こすことが報告されている。私達は、JAK2 変異体が、増殖刺激に依存しない細胞増殖や腫瘍形成を誘導する強力な癌遺伝子であることを明らかにしてきた (論文 3, 4)。しかしながら、現在まで、JAK2 変異体がどのように造血細胞の増殖制御機構の破綻を引き起こすのかは明らかにされておらず、慢性骨髄増殖性腫瘍の発症機構を分子レベルで理解する上で、JAK2 変異体による癌化シグナルの全容を解明することは重要であると考えられた。これまでに私達は、JAK2 変異体が転写因子 STAT5 や c-Myc の活性化および発現を誘導すること、またこれらの転写因子の活性化が JAK2 変異体による発がんシグナルに必須の役割を果たしていることから、STAT5 や c-Myc の標的遺伝子群が JAK2 変異体による癌化シグナルにおける実行因子として機能する可能性が極めて高いという発想に至った。そこで、(2) 本研究では、JAK2 変異体が STAT5 や c-Myc を介して発現を誘導する遺伝子として同定したセリン・スレオニンキナーゼ Pim1 および Pim2 や分裂期キナーゼ Aurora kinase A (Aurka) の JAK2 変異体のシグナル伝達経路における役割を shRNA によるノックダウン法を用いて解析することを目的とした。

【方法】 ①細胞株の樹立：マウスメラノーマ B16BL6 細胞に、FAK および PLP2 に対する siRNA 発現プラスミド (pcDNA6.2-GW/EmGFPmiRNA) をトランスフェクションにより導入し、安定発現株を得た。レトロウイルス感染により、マウス Ba/F3 細胞にエリスロポエチン受容体 (EpoR) と共に、野生型 JAK2 および JAK2 変異体を発現させた細胞株 (WT/EpoR 細胞、V617F/EpoR 細胞) を樹立した。同様に、Ba/F3 細胞に、Pim1、Pim2、Aurka、Aurka キナーゼ欠損変異体 (K175R) を発現させた。また、V617F/EpoR 細胞株に STAT5、Pim1、Pim2、c-Myc、Aurka に対する shRNA をレトロウイルス感染により導入した。②DNA アレイ法： WT/EpoR 細胞および V617F/EpoR 細胞における遺伝子発現の差異を 3D-Gene (東レ) により解析した。③細胞死の検討：シスプラチン (CDDP) で 24 時間処理後、細胞生存率を算出した。DNA ラダーの検出および細胞周期の解析によりアポトーシス誘導能を検討した。④FAK, PLP2 siRNA 発現細胞の in vivo 転移能の検討：FAK および PLP2 の特異的 siRNA 発現細胞を右後肢腫に移植後、リンパ節ならびに肺への転移数を計量した。さらに、B16BL6 細胞を右後肢腫に移植後 10 日目に、腫瘍部位に FAK および PLP2 の特異的

siRNA を投与する治療実験を行った。

【結果・考察】

(1) FAK ならびに PLP2 siRNA 導入による転移抑制の試み: ①FAK をノックダウンすると、PLP2 の発現が低下することが明らかになった。②FAK および PLP2 をノックダウンした B16BL6 細胞は、増殖能および転移能が有意に抑制された (論文 6)。③B16BL6 細胞を移植し形成された腫瘍に、FAK および PLP2 に対する siRNA を直接導入すると、腫瘍の増大が抑制され、治療効果が認められた。以上の結果より、PLP2 は、FAK の下流における増殖、転移に重要なエフェクター分子である可能性が示唆された。これまでに、Y925 のリン酸化が阻害された FAK には、PLP2 の発現誘導能が認められないことを確認している。今後、FAK による PLP2 の発現誘導機構を解析することにより、メラノーマの増殖や転移の分子機構の解明へと繋がることと期待される。

(2) JAK2 変異体のシグナル伝達の解析: ①JAK2 変異体は、STAT5 の活性化を介して Pim1 および Pim2 の発現を誘導した。Pim1 を発現した Ba/F3 細胞は、サイトカイン除去によるアポトーシスに抵抗性を示した。一方、Pim2 を発現した Ba/F3 細胞は、空ベクター発現 Ba/F3 細胞と同様にサイトカイン非存在下でアポトーシスを誘導した。また、V617F/EpoR 細胞に Pim1 shRNA を導入すると、アポトーシスが誘導されたが、Pim2 shRNA は V617F/EpoR 細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。② JAK2 変異体は、c-Myc を介して Aurka の発現を誘導した。Aurka およびそのキナーゼ欠損変異体、Aurka のノックダウンにより、V617F/EpoR 細胞の増殖能は変化しなかったが、V617F/EpoR 細胞は WT/EpoR 細胞に比べて、CDDP によるアポトーシスに抵抗性を示した。Aurka を発現した Ba/F3 細胞もまた、CDDP に対する抵抗性を獲得したが、Aurka キナーゼ欠損変異体の発現は Ba/F3 細胞の CDDP に対する感受性を増大した。さらに、Aurka をノックダウンした V617F/EpoR 細胞の CDDP に対する感受性は増大した (論文 7)。以上の結果より、JAK2 変異体による異常な細胞増殖および腫瘍形成に、転写因子 STAT5 および c-Myc の標的遺伝子が重要な役割を果たしていることが明らかになった。STAT5 を介して発現が誘導される Pim1 および Pim2 は相同性の高いセリン・スレオニンキナーゼであるが、本研究で初めて、JAK2 変異体のシグナル伝達経路における各分子の機能は大きく異なることが示唆された。これまでに、Pim1、Pim2 の基質に関する報告はほとんどなく、今後、各キナーゼの基質特異性を解析することにより、Pim1 を介した JAK2 変異体の癌化シグナルを解明することが可能であると考えられる。また、JAK2 変異体により発現が誘導される Aurka は、JAK2 変異体の持つ DNA 損傷に対する抵抗性に重要な役割を果たすことが明らかとなり、Aurka 阻害剤の併用が治療効果の改善に応用される可能性が示された。今後、JAK2 変異体のシグナル伝達経路のネットワークを詳細に解明することにより、シグナル分子を標的とした疾患の予防・診断・治療の研究開発へと繋がることと期待される。

【発表論文】 1. Kaneda Et al. *Cancer Lett.* 270(2):354-61, 2008. 2. Sonoda Y et al. *Oncol Rep.* 23(2):371-6, 2010. 3. Abe Y. et al. *Int Immunopharmacol.* 9(7-8):870-7, 2009. 4. Funakoshi-Tago M et al. *J Biol Chem.* 285(8):5296-307, 2010. 5. Kamishimoto J et al. *Cell Signal.* 23(2):363-70, 2011. 6. Ozawa H et al. *Oncol Lett.* 2011, in press, 7. Sumi K, et al. *FEBS Lett.* 585(12):1884-90, 2011.

薬物動態に関与するトランスポーターを介した相互作用解明

薬剤学講座 西村友宏、登美斉俊、崔 吉道、中島恵美

胎盤による母体-胎児間の物質交換は厳密に制御されており、胎盤機能の維持は正常な胎児に発育に重要である。妊娠中に胎盤は急激に分化成熟しながら、妊娠経過とともに機能的にも質的变化をされると考えられる。このため、生体膜内外において物質交換を司るタンパクであるトランスポーターの役割は胎盤において発現変動、機能制御など多様な観点での解明が必要である。トランスポーターによる胎盤機能維持機構および胎盤での薬物間相互作用は、薬物治療および薬物の胎児移行性の予測と評価、毒性の個人内・個人間での変動要因として重要である。

1) Ezrin の胎盤の生理機能に及ぼす影響

Ezrin は ERM(Ezrin/Radixin/Moesin)ファミリーに属する細胞膜タンパク質アダプターであり、細胞骨格である β -actin と細胞膜タンパクを結合する作用がある。我々は成長遅延を示す ezrin KO マウス胎児のメタボローム解析により taurine 前駆体である hypotaurine が顕著に減少していることを見出した。Taurine および hypotaurine の前駆体である cysteine の濃度は野生型とホモ欠損型で差がないことから、『hypotaurine の胎盤中濃度は母体血漿中からの供給により維持されており、ezrinKOにより、その供給機構が破綻したために hypotaurine の胎盤中濃度が減少した』との可能性が考えられた。これまでに hypotaurine の細胞膜輸送におけるトランスポーターは一切同定されていない。そこで胎盤における hypotaurine 輸送を解明するため、ラット胎盤より刷子縁膜小胞への hypotaurine 取込み輸送を検討した。Hypotaurine 取込み輸送には Na⁺および Cl⁻依存的トランスポーターである Slc6a ファミリーの関与が推察された。Slc6a ファミリーのうち少なくとも胎盤に発現する Slc6a6、Slc6a12、Slc6a13 に注目し、各トランスポーターの阻害剤によるスクリーニングにより Slc6a13 が hypotaurine 取込み輸送に関与すると推定された。さらに胎盤において、Slc6a13 と ezrin がタンパク間相互作用をしていることが免疫沈降法により示された。そこで Slc6a13 の遺伝子強制発現細胞を作製し、hypotaurine 輸送を検討したところ、Slc6a13 は顕著な hypotaurine 取込み活性を示した。また、Slc6a13 および ezrin を同時に強制発現した場合には、Slc6a13 を単独で発現した場合と比較して、有意に高い取込み輸送活性を示した。以上より、胎盤において Slc6a13 は ezrin により活性が調節された状態で機能的に発現しており、母体血漿中から hypotaurine を胎児胎盤系へ濃縮的に供給するトランスポーター分子としての役割をされると考えられた。

2) 胎盤における核酸トランスポーター分子の機能的発現

生体における核酸の細胞膜輸送は主に促進拡散型核酸トランスポーターENT ファミリーおよび濃縮型核酸トランスポーターCNT ファミリーにより制御されている。我々はこれまでに血液胎盤関門モデル細胞株 TR-TBT において、ENT1 および ENT2 が機能的に発現していることを示し、核酸類縁体医薬品の胎盤透過にも一部関与する可能性を示唆してきた。これらのモデル細胞で得られた

知見の一般性を証明するため、生体における胎盤組織でのこれら核酸トランスポーターの機能を検討した。Adenosine のラット胎盤取込み特性は、ENT1 および ENT2 における adenosine 取込み輸送特性と類似しており、ENT1 および ENT2 は胎盤においても機能的に発現することが示された。胎盤の母体血側細胞膜小胞における adenosine の取込み輸送は、生理的な濃度の核酸および、臨床上想定される濃度の核酸類縁体医薬品では相互作用は示さなかった。したがって、母体血漿中から胎盤への adenosine 取込み輸送には相互作用が問題となることは少ないと推察された。

妊娠糖尿病時における胎盤における核酸輸送変動を検討したところ、糖尿病モデルラットにおいては CNT2 が有意に発現上昇することが示された。また adenosine 輸送における Na⁺依存性が増加し、CNT2 が adenosine の取込み輸送に関与することが示唆された。Adenosine は血管収縮作用があり、臍帯における血管収縮は胎児成長に影響を及ぼすことが知られており、糖尿病時における CNT2 の発現誘導は胎児成長にも影響する可能性のある興味深い知見である。

3) 浸透圧耐性機構としてのオスモライトトランスポーターの発現誘導

胎盤は母体血漿中から受ける多様なストレスに対し、胎盤機能を維持するための細胞保護機構をもつ。我々はこれまでに TR-TBT 細胞が高浸透圧ストレスに暴露されると、有機オスモライトである taurine および betaine の取込み輸送が顕著に上昇することを示している。誘導された taurine の取込み輸送は一般に知られる taurine トランスポーターである tut が関与することが示された一方で、誘導された betaine の取込み輸送は一般に知られる betaine トランスポーター BGT1 の関与は少なく、BGT1 以外のトランスポーターが関与することが示唆された。そこで betaine の取込み輸送は濃縮的であること、また浸透圧感受性のトランスポーターであることから、System A アミノ酸輸送系に着目した。System A は中性アミノ酸を Na⁺依存性に能動輸送するトランスポーターとして知られるが、betaine の取込み輸送に関与するかは不明である。System A の分子として A¹、A²、A³ の TR-TBT における発現を調べたところ、いずれの mRNA も発現が観察された。また、A² および A³ は浸透圧により誘導されることが示された。さらに A² および A³ 遺伝子を Cos7 細胞に強制発現することにより、betaine 輸送能を検討したところ、A² は有意に betaine の取込み輸送能を示した。一方で、A³ は betaine の取込み輸送能を示さなかった。以上より、胎盤においては浸透圧ストレスにより、A² が誘導され betaine を濃縮的に取込むことにより細胞保護作用の役割を果たすと推察された。

以上より、我々は胎盤機能維持に重要なトランスポーター群の分子同定および制御機構解明、薬物動態学的相互作用解明に取り組んできた。胎盤関門トランスポーターは薬物の胎児移行性を制御することで、薬物動態に重要な影響を及ぼすため、今後の薬物間相互作用、薬物治療および毒性の個体差の解明に重要である。

消化管での薬物代謝酵素・薬物輸送担体機能に対する機能性食品の影響

衛生化学講座 田村悦臣

近年、「健康志向」の高まりから、「健康食品」を日常的に摂取する機会は多い。しかしその安全性の評価については十分に確立していない。特に、「健康食品」を何らかの疾病の改善・治療の目的で飲食する人は、他に医薬品を摂取している場合が多く、併用する医薬品に対する食品成分の影響が問題となってくる。事実、食品成分が薬物代謝酵素やトランスポーターの機能に影響を与え、薬効や副作用に影響を及ぼす事例が知られ、適正な医薬品の使用にとって大きな問題となっている。そのような背景のもと、本講座では消化管に存在する薬物代謝酵素群やトランスポーターの機能およびその遺伝子発現に対する飲料（果汁、緑茶、コーヒー、ハーブ等）や機能性食品（乳酸菌、ビタミン等）の影響を調べ、医薬品の使用に際しての安全性を評価することを目的として研究を進めている。今回のオープン・リサーチでは、ヒト消化管モデルとして Caco-2 細胞、食品成分として、世界で最も多く飲まれているコーヒー、抗酸化作用を持ち果汁やサプリメントとして多用されるビタミンC、さらに健康食品としてプロバイオティクスに着目し、薬物代謝に対する効果について研究を推進してきた。

今回、Caco-2 細胞における薬物輸送タンパク質 BCRP へのコーヒーの影響、並びに、末期がん治療等で大量投与されるビタミンCの抱合反応に対する影響を、Caco-2 細胞に加え、ヒト肝由来 HepG2 細胞について検討した。

【方法】

① ビタミンC(VC)の抱合反応に対する効果

Caco-2 細胞は MEM(+10%FBS)培地で3週間培養し分化を誘導した。HepG2 細胞は DMEM(+10%FBS)培地で4日間培養した。通常培養した Caco-2 および HepG2 細胞に 0-50mM VC を添加し、24 時間処理した。細胞より RNA を抽出し、UGT および SULT 遺伝子の発現を real-time PCR にて測定した。さらに、ミクロソーム及びサイトゾルを調製し、*in vitro* における UGT および SULT 活性を測定した。細胞レベルの抱合反応は 1-naphthol(1-NA)を基質として生成する抱合体の量を HPLC により定量した。

② コーヒーの BCRP に対する効果

3週間培養した Caco-2 細胞にコーヒーを添加し(0-5%)、24 時間処理後、BCRP について、real-time PCR による遺伝子発現、Western blotting によるたんぱく質発現、Hoechst333442 を用いて輸送活性を調べた。

【結果と考察】

① ビタミンCの効果

Caco-2 細胞における 1-NA のグルクロン酸抱合および硫酸抱合を高用量の VC が阻害することをすでに報告した。硫酸抱合の阻害は SULT 遺伝子発現の抑制によると考えられたが、VC による UGT 遺伝子発現の促進が見られたことから、グルクロン酸抱合の阻害のメカニズムは不明であったが、今回、抱合体輸送に関わるトランスポーターの遺伝子発現をみたところ、VC による抑制化見られた(図1)。したがって、VC によるグルクロン酸抱合の阻害は、トランスポーター遺伝子発現阻害による可能性が示唆された。

また、近年、末期がんの治療法として高濃度 VC 点滴療法が行われているが、高用量 VC の肝臓での抱合反応に対する影響を検討する目的で、ヒト肝由来 HepG2 細胞を用いて、VC の抱合反応への効果を調べた。その結果、Caco-2 細胞に比べ、低濃度でグルクロン酸抱合、硫酸抱合を阻害する

ことが判った (図 2)。高濃度 VC 点滴療法では、抗がん剤の治療効果が高くなることが報告されており、今回、明らかとなった VC による肝由来細胞での抱合反応の阻害が影響している可能性が考えられる。

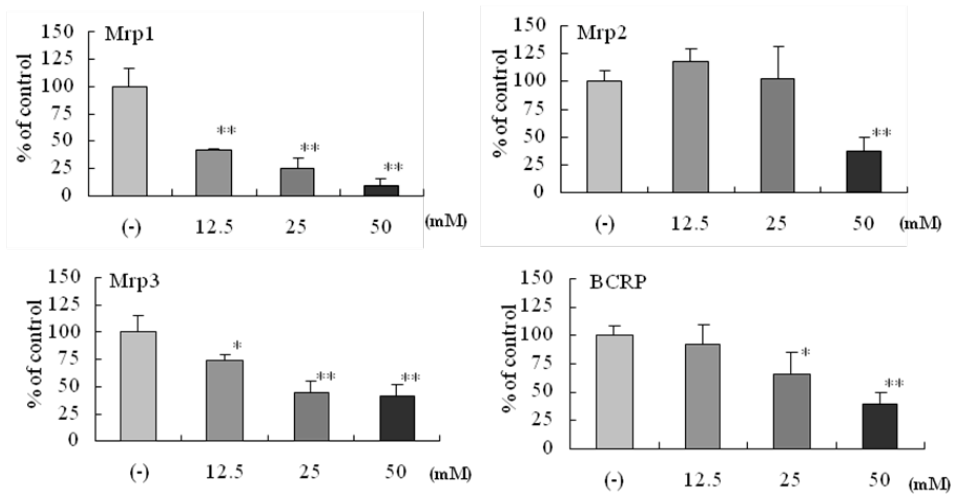


図1 VCによる輸送タンパク質遺伝子の発現抑制

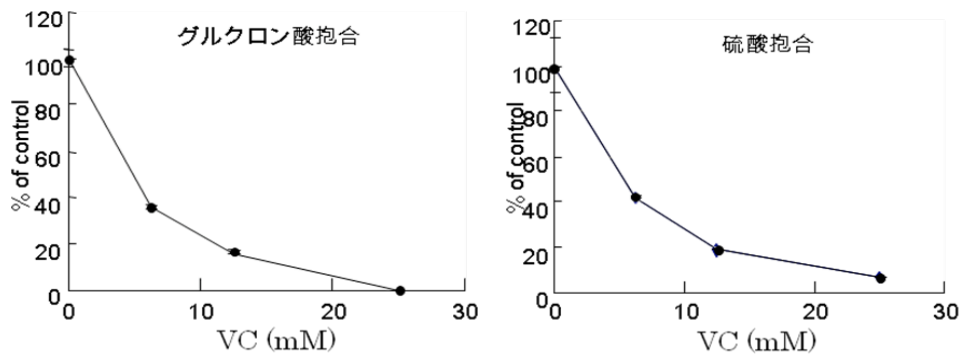


図2 VCによるHepG2細胞の抱合反応に対する阻害効果

②Caco-2 細胞の BCRP に対するコーヒーの効果

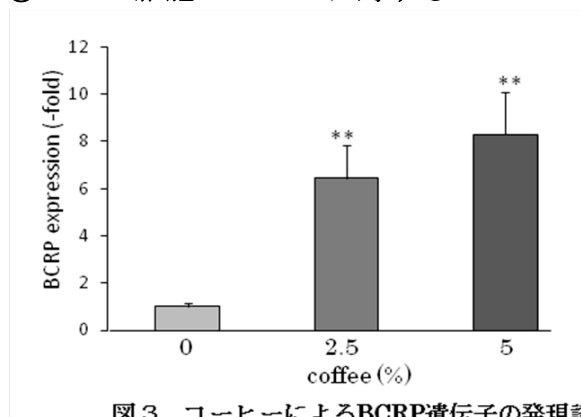


図3 コーヒーによるBCRP遺伝子の発現誘導

BCRP は抗生物質や抗がん剤などの排出に関与するトランスポーターで、その活性変動は薬効に影響することが知られている。今回、消化管モデル Caco-2 細胞の BCRP の発現に対するコーヒーの影響を検討した。その結果、コーヒーは数%の低濃度で、BCRP 遺伝子発現を誘導し、その効果は、BCRP たんぱく質および輸送活性の増大につながる事が明らかとなった (図 3)。また、この誘導には転写因子 NF- κ B が関与していることが示唆された。

【今後の展望】

- ①VC による UGT, SULT および輸送担体遺伝子の発現調節機構を明らかにする。また、VC の遺伝子発現調節効果と VC の還元性との関係を明らかにする。
- ②今回培養細胞で得た結果を動物レベルで検証していく必要がある。

トランスポーター阻害物質の薬物動態に及ぼす影響

化学療法学講座 杉本芳一、野口耕司

1. 当該研究の成果が研究プロジェクトに果たす役割

薬剤耐性と関連した薬物排出トランスポーター阻害作用をもつ物質の探索とその影響の解析

2. 研究内容

P-糖タンパク質の分解に関わる分子を同定し、そのメカニズムを明らかにする。さらに、同定した分子が、P-糖タンパク質によるがん細胞の抗がん剤耐性を低下させるための標的となる可能性について検討する。

3. 平成 22 年度最終報告要旨

我々は以前に、MEK 阻害剤により MAPK カスケードを阻害すると P-糖タンパク質の分解が促進し、P-糖タンパク質の発現が低下することを明らかにした。この研究成果に基づいて、本研究ではタンパク質分解装置であるプロテアソームおよびリソソームの関与について調べた。MEK 阻害剤の前処理により発現が低下した P-糖タンパク質はプロテアソーム阻害剤を処理することにより発現量の克服が観られた。同時に、MEK の下流キナーゼである ERK の再活性化も認められた。プロテアソーム阻害剤は単独でも P-糖タンパク質の発現を増大したが、リソソーム阻害剤にはそのような発現増大は認められなかった。P-糖タンパク質はユビキチンと共沈した。P-糖タンパク質はポリユビキチン化を受けており、プロテアソーム阻害剤を処理するとポリユビキチン化 P-糖タンパク質の量は増大した。これらの結果から、P-糖タンパク質はユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが示唆された。そこで、P-糖タンパク質のユビキチン化機構を解明すべく、P-糖タンパク質に結合するタンパク質の同定を試みた。

P-糖タンパク質は 1280 アミノ酸から成るポリペプチドで、6 回膜貫通領域を 2 個、その中間と C 末端領域に ATP 結合領域をそれぞれ 1 個ずつ有している。この C 末端側の細胞内ドメインに結合するタンパク質を、免疫沈降-MALDI-TOF/MS 解析により探索した。免疫沈降物を SDS-PAGE したところ、1 本の P-糖タンパク質フラグメントと、17 本の共沈タンパク質と想定されるバンドを検出した。この 17 本のバンドについて MALDI-TOF/MS 解析したところ、21 種類の候補タンパク質を同定できた。これらの候補タンパク質のうち細胞内で

P-糖タンパク質と結合していることが確認できた FBX015 と USP16 について注目し、P-糖タンパク質の発現と分解に与える影響について調べている。

FBX015 はユビキチン化機構において基質認識タンパク質 (E3 リガーゼ) に分類されている。一方、USP16 はユビキチン化されたタンパク質のユビキチン鎖を切断するペプチダーゼであり、ユビキチン-プロテアソーム系でのタンパク質分解に拮抗するものと考えられる。

FBX015 および *USP16* siRNA を細胞内に遺伝子導入し、P-糖タンパク質の発現変化を調べたところ、*FBX015* siRNA 導入細胞では P-糖タンパク質の発現量は増大し、逆に *USP16* siRNA 導入細胞では減少した。これらの結果から、P-糖タンパク質は FBX015 を介してユビキチン化を受けてプロテアソームで分解されること、USP16 は P-糖タンパク質を脱ユビキチン化して分解を妨げていることが示唆されるが、詳細については今後の検討課題である。MAPK カスケードと FBX015 や USP16 との関連についても検討し、MEK 阻害剤による P-糖タンパク質の発現抑制機構を解明していく。さらに、P-糖タンパク質による抗がん剤耐性の克服薬開発の標的になり得るかを評価していく。

4. 論文発表

- (1) Yamazaki R, et al. Mol Cancer Ther 10: 1252-1263, 2011.
- (2) Hatsugai K, et al. FEBS Lett 584: 3885-3890, 2010.
- (3) Mitsuhashi J, et al. J Gene Med 12: 596-603, 2010.
- (4) Shigeta J, et al. Cancer Sci 101: 1813-1821, 2010.
- (5) Yoshioka H, et al. Biochem Biophys Res Commun 394: 1000-1005, 2010.
- (6) Yashiroda Y, et al. Biochem Biophys Res Commun 394: 569-573, 2010.
- (7) Kawahara H, et al. Cancer Sci 101: 1493-1500, 2010.
- (8) Usuda J, et al. Lung Cancer 67: 198-204, 2010.

アスコルビン酸トランスポーターの機能解析による眼内動態の制御

分子機能生理学講座 岡 美佳子 中澤 洋介 竹鼻 眞

白内障は水晶体が白濁する疾病である。その原因は老化、紫外線、遺伝性、先天性など様々である。外科的手術によって混濁水晶体を人工透明眼内レンズと置き換える治療が一般的であるが、混濁の原因を特定し、予防や薬物による発症の遅延が可能になれば患者数が激減することは明らかであり、現在明らかにされていない発症原因の解明が待たれている。従って白内障においては、現在のところ外科的手術以外に治療法がなく、治療よりも予防が現実的である。

食習慣などについてのアンケート調査による疫学調査では、アスコルビン酸の摂取量が多いほど、老人性白内障と診断される率が低くなり、老人性白内障の手術を受ける率も低くなることが判明している。

水晶体混濁の主たる原因は、紫外線などにより発生するフリーラジカルや活性酸素種に因るところが大きいとされている。事実、水晶体内には、これらによる酸化障害を防御する還元型グルタチオンやアスコルビン酸、スーパーオキシドデスムターゼなどの水晶体を還元状態に保つための分子が高濃度に含まれている。アスコルビン酸に関しては、水晶体中でリサイクルされており、紫外線等によって生じたラジカルをアスコルビン酸が補足すると、アスコルビン酸はアスコルビン酸フリーラジカルとなる。これはアスコルビン酸フリーラジカル(AFR)還元酵素およびデヒドロアスコルビン酸(DHA)還元酵素により、NADH を介してアスコルビン酸に還元され、水晶体中の還元状態を維持している。

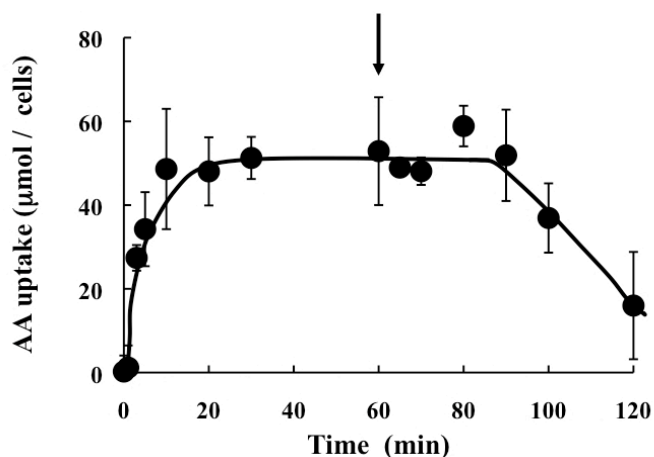
アスコルビン酸は、水晶体細胞内に Na 依存性のアスコルビン酸トランスポーターSV CT2、およびグルコーストランスポーターGLUT3 によって取り込まれる。これまでに、ストレプトゾトシンの腹腔内投与により糖尿病を発症させたラット水晶体では、糖尿病発症により水晶体中のアスコルビン酸量は減少すること、アスコルビン酸を水に混入し給水すると、正常ラットでは水晶体中のアスコルビン酸量に変化はないが、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルラットでは、水晶体中のアスコルビン酸の量が通常水給水ラットと比べ増加する事を報告した。また、水晶体の SV CT2 と GLUT3 の発現量は変化しない事を報告した。これに対して、水チャネルであるアクアポリン0 は、糖尿病を発症に伴って水晶体中の発現量の増加がみられた。

これまでもアクアポリン0 がアスコルビン酸を通す事が示唆されていたため、遺伝子導入した培養細胞を用い、アクアポリン0 のアスコルビン酸透過について検討した。マウス線維芽細胞由来 L-cell にアクアポリン遺伝子を導入し、G418 で選別する事で、恒常的にアクアポリンを発現する L-A QP0 細胞株を樹立した。アスコルビン酸含有培地で細胞を培養し、アスコルビン酸の取り込みを HPLC およびジクロロフェノールインドフェノール法で測定した。その結果 L-A QP0 の細胞内アスコルビン酸濃度は、コントロール細胞に比べ外液濃度依存のおよび時

間依存的に増加した。また、アスコルビン酸取り込みの後、通常培地へ交換したときのアスコルビン酸の減少速度は取り込み速度に比べ遅い事も判明した (図1 参照)。

次にアクアポリン0の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションする事で卵母細胞膜にアクアポリン0を発現させた。アクアポリン0発現卵母細胞をアスコルビン酸含有培地で30分静置した後、HPLCで卵母細胞内のアスコルビン酸量の変化を測定したところ、卵母細胞でもアスコルビン酸量の増加が確認された。

水晶体は高濃度のアスコルビン酸濃度を維持するために房水からアスコルビン酸を濃縮して取り込む必要が有る。本研究の結果から、水晶体線維細胞特異水チャネルであるアクアポリン0を介して線維細胞内のアスコルビン酸が輸送されることが明らかとなった。



発表論文 (2009-2011 年度)

1. Bando M, Inoue T, Oka M, Kawai K, Obazawa H, Takehana M. Amino Acid Sequence and Western Blot Analysis of Ascorbate Free Radical Reductase Purified from Rabbit Lens Soluble Fraction. *J. Jap. Soc. Cat. Res.*, 21, 50-55 (2009).
2. Nakazawa Y, Takehana M, Oka M, Shibuya F, Katakawa J, Sano Y. UV-B irradiation-induced electron transfer between 3-hydroxykynurenine and tryptophan. *J. Biol. Macromol.*, 26, 13-22 (2009).
3. Bando M, Oka M, Nakazawa Y, kawai K, Obazawa H, Takehana M. Suppression of Redox Activities of Rabbit Lens Lambda-Crystallin by Glutathionylation. *J. Jap. Soc. Cat. Res.*, 22, 43-49 (2010).
4. Nakazawa Y, Oka M, Bando M, Inoue T, Takehana M. The role of ascorbic acid transporter in the lens of streptozotocin-induced diabetic rat. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 1, 43-48 (2011).