

論文要旨

MRP1 mutated in the L₀ region transports SN-38 but not leukotriene C₄ or estradiol-17 (β-D-glucuronate).

(L₀領域の変異体 MRP1 は、SN-38 を輸送するが LTC₄, estradiol-17(β-D-グルクロン酸)を輸送しない。)

野口 智弘

【序論および目的】 MRP1 は、腫瘍細胞の抗癌剤多剤耐性に関与する ABC (ATP binding cassette)トランスポーターである。MRP1 は多くの基質を GSH 依存的に輸送することが明らかになってきた。一方、幾つかの分子を GSH 非依存性に輸送することが報告されている。しかしながら、MRP1 による GSH 非依存性輸送能の重要性は確立されておらず、また、GSH 依存性と非依存性の輸送機構の違いは明らかではない。我々はすでに azidophenyl agosterol-A (azidoAG-A)が、GSH 依存的に MRP1 を光標識できることを報告した。また、MRP1 の L₀領域のアミノ酸 W261 と K267 が azidoAG-A の GSH 依存的な光標識とロイコトリエン C₄ (LTC₄)の輸送活性にとって重要であることを示した。本研究では、MRP1 による GSH 依存性薬物輸送に重要と考えられている L₀領域に変異を導入した変異 MRP1 である dmL₀MRP1 を用いて GSH 非依存性輸送の機構について調べた。

【材料および方法】

1. ヒト類表皮がん KB-3-1 細胞と MRP1cDNA をトランスフェクトし、MRP1 を強制発現させた KB/MRP 細胞、His タグを付けた MRP1 や変異 MRP1 を発現させた Sf21 昆虫細胞を用いた。
2. MRP1cDNA への部位特異的塩基置換変異導入は、PCR 法により行った。
3. 上記細胞から Membrane vesicle を調製し、¹²⁵I]azido AG-A による MRP1 の光標識、MRP1 による LTC₄、estradiol-17(β-D-グルクロン酸) (E₂17β-G)、SN-38 の輸送の実験に用いた。
4. MRP1、変異 MRP1 を発現させた Sf21 昆虫細胞を固定し、膜透過性を高めたあと、抗 His 抗体、Alexa Fluor 546 でラベルした二次抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。核は DAPI で染色した。

【結果】

1. SN-38 は現在最も有用な抗癌剤の 1 つである CPT-11 の活性代謝物である。SN-38 と CPT-11 は、azidoAG-A による MRP1 の光標識を阻害したが、阻害活性は ADM や VCR に比べ弱かった。
2. KB/MRP 細胞は、親株 KB-3-1 細胞と比較して SN-38 に対し 12 倍耐性であったが、MRP1 による多剤耐性を克服する薬剤である AG-A、BSO により耐性が克服されなかった。この結果から、SN-38 が GSH 非依存性に MRP1 により輸送されることが示唆された。
3. W261A と K267M に加え W222L、W223L、R230A の変異を有する dmL₀MRP1 変異体を用いて、MRP1 の輸送能に対する影響を調べた。dmL₀MRP1 発現昆虫細胞から作製した膜小胞は、LTC₄ と E₂17β-G を輸送することができず、また azidoAG-A で光標識されなかったが、GSH 非依存性の SN-38 の輸送能は野生型と同等であった。これらのデータは、SN-38 が GSH に依存する輸送とは異なるメカニズムで輸送されることを示唆した。
4. MRP1 の輸送基質を化学構造をもとにペアワイズ比較でクラスタリングすると、GSH 非依存的な輸送が報告されている基質はすべてクラスターの 5 と 6 に分けられた。この結果から、MRP1 によって GSH 非依存的に輸送される基質を予測できる可能性を示した。

【結論及び考察】

SN-38 は MRP1 により GSH 非依存性に輸送されることが示された。少なくとも一部の GSH 非依存的輸送は、GSH 依存的輸送と異なった機構で行われていることが明らかとなった。また、MRP1 により GSH 非依存性に輸送される薬物を予測できる可能性を示した。

(Biochemical Pharmacology, Vol. 70, No.7 2005 年 掲載)

最終試験の結果の要旨

報告番号	医論第 1 4 2 9号	氏名	野口 智弘
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	小澤 政之	中川 昌之

主査及び副査の3名は、平成18年5月8日、学位申請者 野口 智弘 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めるとともに、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) 実験に哺乳類の細胞ではなく、なぜ昆虫細胞を選択したのか。

回答 変異体タンパク質を作製する時間を短縮するためです。動物細胞への遺伝子導入も試みましたが、発現の頻度が低く、また変異蛋白質の発現量も低かったので今回データは示しておりません。

質問 2) inside out の膜小胞の調製はどのように行うのか。

回答 0.25 M ショ糖存在下のバッファー中で細胞に窒素加圧を行い、これをゆっくり減圧しながら細い部分を通して破碎することでより多くのinside-out の膜小胞を得ることができます。以前の我々の結果や他のグループの報告から、その割合は50%くらいです。

質問 3) Sf21 昆虫細胞は何の昆虫由来か。バキュロウイルスの感染発現系でよく使用するのか。

回答 今回用いた Sf21 はハスモンヨトウの近縁種の *Spodoptera frugiperda* から確立された細胞株です。高い蛋白質発現能力を持つバキュロウイルスを感染させることができるため蛋白質を大量に生成する目的で一般的に用いられます。

質問 4) Fig. 2 で見ると、SN-38 は半分ぐらい抑制されている。SN-38 はグルタチオン非依存性に輸送されるという結論であるが依存性の移送もあるのか。

回答 この実験では azidoAG-A による MRP1 の光標識の阻害効果を見ているので、薬剤に MRP1 への結合活性があり、その結合部位が azidoAG-A の結合部位と少しでも重複していれば程度の差はあっても阻害されると考えられます。Fig. 2 の結果は SN-38 は MRP1 に GSH が結合する部分とは関係なく結合するが、その結合部位が一部 azidoAG-A の結合部位と重複しているために高濃度の SN-38 は azidoAG-A の光標識を阻害するものと考えられます。

質問 5) Fig. 4 と 5 を比較するとエストラジオールは野生型であっても、SN-38 の輸送される量と比較して輸送効率は悪いが理由は何か。

回答 [³H]E₂-17βグルクロン酸抱合体は比較的不安定な物質で、おそらく保存状態が悪いためであると思われます。

質問 6) 人工的に SN-38 のグルクロン酸抱合体を作って、azidoAG-A による MRP1 の光標識の阻害を確認する事はできるのか。SN-38 のグルクロン酸抱合体は簡単にできるのか。

回答 可能ですが、今回は行っていません。SN-38 よりも効率よく阻害すると予想されます。

質問 7) L₀ 領域の点変異体を作製したが、そのアミノ酸を選択した理由は何か。

回答 以前欠失変異体の解析から L₀ 部分が GSH 依存的輸送に必要である結果を得ています。SN-38 が GSH 非依存的に輸送されることを確認するためにグルタチオンと反応すると考えられる L₀ 部分の変異体 dML₀MRP1 を作製しました。

論文審査の要旨

報告番号	医論第1429号	氏名	野口 智弘
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	小澤 政之	中川 昌之

MRP1 mutated in the L₀ region transports SN-38 but not leukotriene C₄ or estradiol-17 (β-D-glucuronate).

(L₀領域の変異体 MRP1 は、SN-38 を輸送するがロイコトリエン C₄、エストラジオール-17 (β-D-グルクロン酸) を輸送しない。)

【序論および目的】 multidrug resistance protein 1 (MRP1) は、腫瘍細胞の抗癌剤多剤耐性に関与する、ATP結合領域を持ったABC (ATP binding cassette) トランスポーターである。MRP1は多くの基質をglutathione (GSH) 依存的に輸送することが明らかになってきた。一方、幾つかの分子をGSH非依存性に輸送することが報告されている。しかし、MRP1によるGSH非依存性輸送能の重要性は確立されておらず、また、GSH依存性と非依存性の輸送機構の違いは明らかでない。

申請者らはすでに azidophenyl agosterol-A (azidoAG-A) が、GSH 依存的に MRP1 を光標識できることを報告した。また、MRP1 の L₀領域のアミノ酸 W261 と K267 が azidoAG-A の GSH 依存的な光標識とロイコトリエン C₄ (LTC₄) の輸送活性にとって重要であることを示した。本研究では、MRP1によるGSH依存性薬物輸送に重要と考えられている L₀領域に変異を導入した変異 MRP1 である dnL₀MRP1 を用いて GSH 非依存性輸送の機構について調べた。

【材料および方法】

1. ヒト類表皮 KB-3-1 細胞と MRP1cDNA をトランスフェクトし、MRP1 を強制発現させた KB/MRP 細胞、His タグを付けた MRP1 や変異 MRP1 を発現させた Sf21 昆虫細胞を用いた。
2. MRP1cDNA への部位特異的塩基置換導入は、PCR 法により行った。
3. 上記細胞から膜小胞を調製し、^[25I] azidoAG-A による MRP1 の光標識、MRP1 による LTC₄、estradiol-17 (β-D-glucuronate) (E₂17β-G)、SN-38 の輸送の実験に用いた。
4. MRP1、変異 MRP1 を発現させた Sf21 昆虫細胞を固定し、膜透過性を高めた後、抗 His 抗体、Alexa Fluor546 でラベルした二次抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。核は DAPI で染色した。

【結果】

1. SN-38 は現在最も有用な抗癌剤の一つである CPT-11 の活性型代謝物である。SN-38 と CPT-11 は、azidoAG-A による MRP1 の光標識を阻害したが、阻害活性は ADM や VCR に比べ弱かった。
2. KB/MRP 細胞は、親株 KB-3-1 細胞と比較して SN-38 に対し 12 倍耐性であった。MRP1 による多剤耐性を克服する薬剤である AG-A、BSO により耐性が克服されなかった。この結果から SN-38 が GSH 非依存性に MRP1 により輸送されることが示唆された。
3. W261A と K267M と W222L、W223L、R230A の変異を有する dnL₀MRP1 変異体を用いて、MRP1 の輸送能に対する影響を調べた。dnL₀MRP1 発現昆虫細胞から作製した膜小胞は、LTC₄ と E₂17β-G を輸送することができず、また azidoAG-A で光標識されなかったが、GSH 非依存性の SN-38 の輸送能は野生型と同等であった。これらのデータは、SN-38 が GSH に依存する輸送とは異なるメカニズムで輸送されることを示唆した。
4. MRP1 の輸送基質を化学構造をもとにペアワイズ比較でクラスタリングすると、GSH 非依存性な輸送が報告されている基質はすべてクラスターの 5 と 6 に分けられた。この結果から、MRP1 によって GSH 非依存的に輸送される基質を予測できる可能性を示した。

本研究によって、SN-38 が MRP1 により GSH 非依存性に輸送されることが示された。MRP1 の GSH 非依存的輸送の少なくとも一部は、初期の基質認識が GSH 依存的輸送と異なっていることが明らかになった。また、GSH 非依存的に輸送される基質を予測できる可能性が示された。これらの結果は、これまで知られていなかった MRP1 の新たな輸送機構の存在を明確にし、またトランスポーターによる基質認識を輸送基質の構造から予測できる可能性を示し、今後のトランスポーターと薬物認識の研究へのバイオインフォマティクスの応用に新たな道を開くものであり、医学、薬学の分野に大きな貢献をもたらす可能性があると考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

質問8)トリプトファン2つをロイシンに変え、アルギニンをアラニンに変えた場合に、はたしてL₀がそれぞれの細胞内ループとして残っているのか。あるいは膜の中へ潜り込んでしまうなど、L₀の長さが短くなってしまった、という可能性はないのか。それを比べるために、例えばループの所をアミノ酸の置換ではなく、部分的に欠失した変異体蛋白質を作って検討はしなかったのか。

回答 3つのアミノ酸の置換の影響が構造全体に影響を及ぼしている可能性を否定できるデータは今のところありません。現在1アミノ酸ごとの変異を作成中です。

質問9)このシーケンスのなかでトリプトファンをアラニン以外のアミノ酸に変えた実験を行えば、トリプトファンが反応基としてエッセンシャルなアミノ酸であるかどうかにより明確になると思われるが。そのような実験を行ったか。

回答 御指摘の実験はトリプトファンが重要な働きをしているかどうかを明らかにするためには重要な実験であると思われます。現在1アミノ酸ごとの変異を作成しており、今後検討したいと思います。

質問10)例えばVP-16も、グルクロニル化され、GSH 依存的に排出される。そのときに、グルクロニル化されると、何故排出されやすくなるのか。

回答 L₀の部分は GSH との反応を行っている部分と予想している。VP-16 がグルクロン酸抱合体になることで、GSH が存在する状態でのMRP1 への結合性が高まるものと予想しています。

質問11)MRP1のL₀の部分は、これは特別なモチーフとして他のMRP familyで、保存されているのか。

回答 ファミリーの他のトランスポーターのGSH 依存性はあまり明らかではなく、L₀部分の相同性も高くありません。

質問12)SIMCOMP法を使うと、何故あのデンドログラムに分けられるのか。どういう特徴で分けられているのか。

回答 SIMCOMP法は、2つの化合物間の類似性指標であるTanimoto係数を導き出す方法です。その類似性指標を元にWard法でクラスタリングすると、デンドログラムが得られます。従って各群は構造的な特徴によって分けられています。構造的な特徴は、個別の構造を詳細に検討しなければなりません。必ず何らかの構造的な特徴で分けられているはずであり、今後の検討課題となっております。

質問13) SIMCOMP法、Tanimoto係数、Ward法について、他のトランスポーター蛋白質へ応用できるのか。MRP1のみに適応されるのか。一般的にこの方法は、どのように使われているのか。何故この方法を選んだのか。

回答 基質化合物の構造複雑性にもよりますが、他のトランスポーター蛋白質にも応用できます。SIMCOMP法は自体は代謝パスウェイ上に類似した化合物が連続で並んでいるかどうかを見るために使われるのが最も一般的です。Tanimoto係数は一般に化合物の類似性を示す指標として確立され、一般的に用いられています。Ward法も古典的なクラスタリングの手法で化合物に限らず、あらゆるクラスタリングに使われています。今回これらの方法を用いたのは、他の方法よりも明確にクラスターが分けられることが可能であったからです。

他の方法でもクラスタリングして検討しましたが、分かれたグループの意味付けが難しくなりました。つまりひとつひとつの基質化合物がなぜ該当グループに分類されたかはわかるのですが、全体としてそのグループにどのような意味があるのかを見つけるのが難しくなりました。

以前に別の構造のみのデータを分類したときに、Tanimoto係数とWard法の組み合わせでクラスタリングを行ったとき、このグループには特徴的なscaffoldがあるとか、糖がついているとか、ベンゼン環がよく現れるが特徴的な骨格はないグループなどに分けることが出来ました。そこで今回も、用いることのできるデータが化学構造だけだったので、Tanimoto係数を用いて良好なクラスター解析ができると予想されたWard法を用いました。GSH依存と非依存性の輸送基質はたまたまWard法を用いたクラスターの示す構造類似性によって分けることができることがわかりました。

したがって他の指標や他のクラスタリング手法をもちいれば、また異なった結果が得られると考えられ、今後の検討が必要であると考えます。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力と識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。