

「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

平成11年度研究実施計画に基づき、本年度は医薬品を含む広範な低分子異物に対して生体が備えている異物排除機構について、(1)分子輸送による排除機構、(2)分子変換による排除の関連、(3)異物排除系の臓器相関と体内動態の解明とその制御という観点から検討を加えた。具体的には以下、研究実施内容の項で述べる。

### 2. 研究実施内容

#### 一次性能動輸送グループ

肝細胞胆管側膜上に発現され、種々異物の胆汁排泄に関与するMRP2機能について検討を加えた結果、還元型葉酸を生理的基質とすることが示された。さらに速度論解析の結果、*in vivo*における胆管側膜透過能力を、*in vitro*単離胆管側膜ベシクルにおける輸送能力から定量的に予測しうることを示した。この方法論に基づいてヒトにおける胆汁排泄能力を予測する目的で、ヒト胆管側膜ベシクルを調製し、輸送実験を行ったところ、ラットとの大きな種差が観察された。

我々はすでに、MRP2機能が低下した条件下でMRP3が肝細胞血管側膜上に誘導されることを見い出している。その機能について検討した結果、MRP3は、MRP2と同様に、種々グルクロン酸抱合体および非抱合型有機アニオン類を基質としたが、MRP2とは異なり、グルタチオン抱合体はpoor substrateにしかならないことが示された。さらに、1価の胆汁酸(タウロコール酸など)および硫酸抱合体(タウロリトコール酸硫酸抱合体など)をも基質とすることが示された。これは、MRPファミリーの中にあっては極めて特異的な性質であった。生体防御という観点からも、MRP3は肝障害時のレスキュー蛋白として重要であり、現在その発現調節機構について検討を加えている。

さらに、肝臓以外にも小腸上皮細胞、血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞にMRP活性の存在を見い出し、機能調節により化合物の消化管吸収性、脳内移行性を増大させうることを示すことができた。

#### 二次性能動輸送グループ

有機イオン性物質輸送に関わるトランスポーター群の同定と機能解析を行っ

た。カチオン輸送体としてのOCTN、アニオン輸送体としてのNpt1およびヒトOATPIについて機能の詳細と遺伝子クローニングを試みた。OCTN2は有機カチオンであるテトラエチルアンモニウム輸送と同時にビタミンの一つカルニチンを輸送する生理機能を有する。OCTN2の基質認識について新たにカルニチン生合成前駆物質　ブチロベタインやアセチルカルニチンなどを、さらに薬物としてペラパミル、キニジンおよびメピラミンなどが含まれることが明らかになった。また、カルニチン類はナトリウム依存性を示すのに対して、カチオン性薬物はナトリウム要求性がなく、OCTN2は両者を異なるメカニズムによって輸送する多機能的なトランスポーターであることが見いだされた。特にOCTN2は腎尿細管上皮細胞apical膜に存在することから、糸球体濾過を受けたカルニチンの再吸収ならびに血液中から上皮細胞中に取り込まれた有機カチオン性化合物の細胞内から尿中への分泌に寄与することが示された。一方、無機リン酸トランスポーターとして知られているNpt1の機能解析を進めたところ、 $\beta$ -ラクタム抗生物質やパラアミノ馬尿酸を含む有機アニオン輸送に働くことが明らかになった。

Npt1はOCTN2と同様に尿細管上皮細胞apical側膜に存在することから、有機アニオン性物質の尿細管分泌に寄与するものと考えられる。さらに、有機アニオントランスポーターとしてヒトにおいて機能すると考えられるOATPIについては少なくとも5種類のメンバーからなることが遺伝子解析によって示すことができたが、その組織分布、機能解析は今後の課題である。以上のような種々有機イオン性物質に働くトランスポーターの同定と機能解析によって、生体異物の処理ならびに生体の維持機構の解明が進むものと期待された。

#### 異物排出蛋白分子構造解析グループ

##### (1) 蛋白工学的解析

細菌の最も代表的な異物排出蛋白であるテトラサイクリン排出蛋白を構成する全401アミノ酸残基のうち、N末端のMetを除く400アミノ酸残基を全て一つずつCys残基に置換したCys走査変異体の完全セットの構築し、各種のSH特異的修飾試薬との反応性に基づき分子の詳細構造を解析した。これにより、1) 膜貫通領域の範囲が実験的に精密に決定でき、2) 分子内に水で満たされた膜貫通チャネルが存在し、3) その中間に親水性分子に対する透過障壁のあることが示された。さらに、分子内に複数のCys残基を導入してS-S架橋形成の有無を系統的に調べることにより、膜貫通ヘリックスの立体配置を決定した。

##### (2) 細菌の全推定異物排出蛋白遺伝子を網羅したクローニングライブラリの構築と解析

大腸菌の異物排出蛋白遺伝子と推定されるORF34個すべてのクローニングライブラリを構築し、半数の17個が何らかの薬剤耐性に関与していることを見い

でした。さらにこれらの薬剤排出蛋白の発現が二成分情報伝達系により調節されているという全く新しい耐性機構を発見した。

### (3) 異物排出蛋白立体構造の決定

テトラサイクリン排出蛋白を安定的に精製できる界面活性剤をスクリーニングし、二次元結晶の作成に成功した。また、マルチコンポーネント型異物排出蛋白AcrBの大量産生、精製に成功し、3次元結晶を得た。

### 薬剤耐性機構解析グループ

ABCトランスポーターの多くは生体内の様々な器官や組織において発現しており異物・毒物排出ポンプとしての重要な生理的作用をしている。がんにおける抗がん剤の感受性を制御する分子標的としてのABCトランスポーターの特異的発現の分子機構を把握することが必須である。我々はⅠ. P-糖蛋白質/MDR1遺伝子の発現の分子機序として、MDR1プロモーターのメチル化が発現に重要であること、またゲノム不安定性に伴う遺伝子再編成により発現を活性化する機構を発見した。Ⅲ. ヒトcMOAT/MRP2やMRP3については1) cMOATのヒトゲノムDNAを単離し、幾つかのDubin-Johnsonの家系で変異が第1と第2のATP結合領域に集中していることを示した。2) cMOAT・cDNAのCHOやLLCK-PK細胞への導入株を用いてピンクリスチンやシスプラチンに対して耐性を示すことを観察した。また、MRP2はグルタチオン抱合体を輸送しうることを明らかにした。3) 大腸癌患者サンプルの癌部、非癌部におけるABCトランスポーターの発現を定量的PCR方にて検討した結果、MDR1,MRP3の発現は癌部にて発現の低下が認められたが、MRP2の発現は、逆に亢進していた。4) MRP2のプロモーター領域2kbを単離し、MRP2の発現が肝臓で特異的に行われ、転写因子 ontfamily>C/EBPが関与していることを明らかにした。

### 代謝・排泄協関解析グループ

グルクロン酸転移酵素(UGT)は、主に肝臓において異物等にグルクロン酸を付加する抱合酵素である。UGTにより抱合された代謝物は、cMOAT/MRP2によって能動的に胆汁中に排泄されるが、異物解毒における抱合酵素と一次性輸送担体の協関関係の分子機構についてはほとんど理解されていない。そこでこの協関関係をin vitro で再現できる系を構築することを目指とした。本年度はまずUGTの単独発現系を構築した。ヒト肝総RNAよりUGT1A1 cDNAを単離し、発現ベクターに組み込んだ。宿主は基質化合物の細胞内への取りこみ易さを考慮し、サルモネラ菌TA1535株を用いた。発現プラスミドをエレクトロポレーション法にて導入し、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(PTG)添加によりUGT1A1の発現を誘導した。蛋白質の発現はウエスタンブロッティングにより行い、約53kDaの位置にUGT1A1蛋白質の発現が確認された。 - グルクロニダーゼ阻害薬の共存

下において、代表的基質ビリルビンに対する抱合活性が検出されたことから、活性を有するUGTをバクテリアに発現させることにはじめて成功した。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

" I.Kino, Y.Kato, J.H.Lin and Y.Sugiyama: Renal handling of biphosphonate alendronate in rats. *Biopharm.Drug Dispos.*, 20: 193-198 (1999) "

" H.Ishizuka, K.Konno, T.Shiina, H.Naganuma, N.Nishimura, K.Ito, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Species differences in the transport activity for organic anions across the bile canalicular membrane. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 290: 1324-1330 (1999) "

" S.Akhteruzzaman, Y.Kato, H.Kouzuki, H.Suzuki, A.Hisaka, B.Stieger, P.J.Meier and Y.Sugiyama: Carrier-mediated hepatic uptake of peptidic endothelin antagonists in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 290: 1107-1115 (1999) "

" H. Sasabe, Y. Kato, A. Tsuji, and Y. Sugiyama: Differences in the hepatobiliary transport of two quinolone antibiotics, grepafloxacin and lomefloxacin, in the rat. *Biopharm. Drug Disp.*, 20: 151-158 (1999) "

" K. Niinuma, Y. Kato, H. Suzuki, C. A. Tyson, V. Weizer, J. E. Dabbs, R. Froelich, C. E. Green, and Y. Sugiyama: Primary active transport of organic anions on bile canalicular membrane in humans. *Am. J. Physiol.*, 276: G1153-G1164 (1999) "

" Y. Han, Y. Kato, H. Kusuhara, H. Suzuki, M. Shimoda, E. Kokue, and Y. Sugiyama: Kinetic profile of overall elimination of 5-methyltetrahydropteroylglutamate in rats. *Am. J. Physiol.*, 276 : E580-E587 (1999)"

" Y. Kato, S. Akhteruzzaman, A. Hisaka, and Y. Sugiyama: Hepatobiliary transport governs overall elimination of peptidic endothelin antagonists in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288 : 568-574 (1999)"

" X. Chu, Y. Kato, and Y. Sugiyama: Possible involvement of P-glycoprotein in biliary excretion of CPT-11 in rats. *Drug Metab. Disp.*, 27 : 440-441 (1999)"

"S. Akhteruzzaman, Y. Kato, A. Hisaka, and Y. Sugiyama : Primary active transport of peptidic endothelin antagonists by rat hepatic canalicular membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288 : 575-581 (1999)"

" H.Kouzuki, H.Suzuki, R.Ohashi, K.Ito and Y.Sugiyama: Contribution of organic anion transporting polypeptide to the uptake of its possible substrates into rat hepatocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 288: 627-634 (1999)"

" X.-Y.Chu, H.Suzuki, K.Ueda, Y.Kato, S.Akiyama and Y.Sugiyama: Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 288, 735-741 (1999)"

" M.Honma, H.Suzuki, H.Kusuhara, M.Naito, T.Tsuruo and Y.Sugiyama: High affinity

efflux transport system for glutathione conjugates on the luminal membrane of a mouse brain capillary endothelial cell line(MBEC4). *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 288: 198-203 (1999) "

" S.-H.Song, H.Suzuki, R.Kawai and Sugiyama, Y.: Effect of PSC 833, a P-gp modulator, on the disposition of vincristine and digoxin in rats. *Drug Metab.Dispos.*, 27: 689-694 (1999) "

" M.Achira, H.Suzuki, K.Ito and Y.Sugiyama: Comparative studies to determine the selective inhibitors for P-glycoprotein and cytochrome P450 3A4. *Pharm.Sci.* 1 (1999) "

" Y.Gotoh, H.Suzuki, S.Kinoshita, T.Hirohashi, Y.Kato and Y.Sugiyama: Involvement of an organic anion transporter(cMOAT / MRP2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 292: 433-439 (2000) "

" H.Kouzuki, H.Suzuki, B.Stieger, P.J.Meier and Y.Sugiyama: Characterization of the transport properties of organic anion transporting polypeptide1 (oatp1) and Na<sup>+</sup> / taurocholate co-transporting polypeptide(Ntcp): comparative studies on the inhibitory effect of their possible substrates in hepatocytes and cDNA-transfected COS-7 cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 292: 505-511 (2000)"

" H. Yabuuchi, I. Tamai, J. Nezu, K. Sakamoto, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai and A. Tsuji: Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional and pH-dependent transport of organic cations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289: 768-773 (1999) "

" M. Murata, I. Tamai, H. Kato, O. Nagata, H. Kato and A. Tsuji: Efflux transport of a new quinolone antibacterial agent, HSR-903, across the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290: 51-57 (1999) "

" K. Yokogawa, M. Takahashi, I. Tamai, H. Konishi, M. Nomura, S. Moritani, K. Miyamoto and A. Tsuji: P-Glycoprotein-dependent disposition kinetics of tacrolimus: Studies in *mdr1a* knockout mice. *Pharm. Res.*, 16: 1213-1218 (1999) "

" K. Yokogawa, K. Miya, I. Tamai, Y. Higashi, M. Nomura, K. Miyamoto and A. Tsuji: Characteristics of L-carnitine transport in cultured hepatoma HLF cells from man. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51: 935-940 (1999) "

" K. Yokogawa, M. Yonekawa, I. Tamai, R. Ohashi, Y. Tatsumi, Y. Higashi, M. Nomura, N. Hashimoto, H. Nikaido, J. Hayakawa, J. Nezu, A. Oku, M.Shimane, K. Miyamoto and A. Tsuji: Loss of wild-type carrier-mediated L-carnitine transport activity in hepatocytes of juvenile visceral steatosis mice. *Hepatology*, 30: 997-1001 (1999)

" I. Tamai, Y. Sai, A. Ono, Y. Kido, H. Yabuuchi, H. Takanaga, E. Satoh, T. Ogihara, O. Amano, S. Izeki and A. Tsuji: Immunohistochemical and functional characterization of

pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by monocarboxylic acid transporter MCT1. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51: 1113-1121 (1999) "

" T. Ogihara, I. Tamai and A. Tsuji: Structural characterization of substrates for the anion exchange transporter in Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.*, 88: 1217-1221 (1999) "

" R. Ohashi, I. Tamai, H. Yabuuchi, J. Nezu, A. Oku, Y. Sai, M. Shimane and A. Tsuji: Na<sup>+</sup>-dependent carnitine transport by OCTN2 and its pharmacological and toxicological relevance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291: 778-784 (1999) "

"A. Tsuji, and I. Tamai: Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood-brain barrier. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 36: 277-290 (1999)"

" M. Kawahara, A. Sakata, T. Miyashita, I. Tamai and A. Tsuji: Physiologically based pharmacokinetics of digoxin in *mdr1a* knockout mice. *J. Pharm. Sci.*, 88: 1281-1287 (2000) "

" Y. Kido, I. Tamai, M. Okamoto, F. Suzuki and A. Tsuji: Functional clarification of MCT1-mediated transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier of rats using in vitro cultured cells and in vivo BUI studies. *Pharm. Res.*, 17: 55-62 (2000) "

" H. Uchino, I. Tamai, H. Yabuuchi, K. China, K. Miyamoto, E. Takeda and A. Tsuji: Faropenem transport across the renal epithelial luminal membrane via inorganic phosphate transporter Npt1. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 574-577 (2000)"

" 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) "

" T. Kawabe and A. Yamaguchi: Transmembrane remote conformational suppression of the Gly-332 mutation of the Tn10-encoded metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter. *FEBS Lett.* 457: 169-173 (1999) "

" S. Konishi, S. Iwaki, T. Kimura-Someya and A. Yamaguchi: Cysteine-scanning mutagenesis around segment VI of Tn10-encoded metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter. *FEBS Lett.* 461: 315-318 (1999) "

" Y. Someya, T. Kimura-Someya and A. Yamaguchi: Role of the charge interaction between Arg70 and Asp120 in the Tn10-encoded metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 275: 210-214 (2000) "

" Y. Kubo, S. Konishi, T. Kawabe, S. Nad and A. Yamaguchi: Proximity of periplasmic loops in the metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli* observed on site-directed chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.*, 275: 5270-5274 (2000) "

" S. Toh, M. Wada, T. Uchiumi, A. Inokuchi, Y. Makino, H. Horie, Y. Adachi, S.

Sakisaka and M. Kuwano: Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene and mutations in the ATP binding cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am. J. Human Genet.*, 64:739-746 (1999) "

" H. Kusaba, M. Nakayama, T. Harada, M. Nomoto, K. Kohno, M. Kuwano and M. Wada: Association of 5' CpG demethylation and altered chromatin structure in the promoter region with transcriptional activation of multidrug resistance 1 gene in human cancer cells. *Europ.J. Biochem.*, 262: 924-932 (1999) "

" T. Tanaka, T. Uchiyumi, M. Nomoto, K. Kohno, T. Kondoh, K. Nishio, N. Saijo and M. Kuwano: Cellular balance of glutathione levels through the expression of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase and glutathione thiol transferase gene in human hepatic cells resistant to a glutathione poison. *Biochim. Biophys. Acta*, 1427: 367-377 (1999) "

" T. Kawabe, Z. Chen, M. Wada, T. Uchiyumi, M. Ono, S. Akiyama and M. Kuwano: Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C<sub>4</sub> by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.*, 456: 327-331 (1999) "

" T. Tanaka, T. Uchiyumi, E. Hinoshita, A. Inokuchi, S. Toh, M. Wada, H. Takano, K. Kohno and M. Kuwano: The Human Multispecific Resistance Protein 2 Gene : Functional Characterization of 5'-Flanking Region and Expression in Hepatic Cells. *Hepatology*, 30:1507-1512 (1999) "

" Z. Chen, T. Kawabe, M. Ono, S. Aoki, T. Sumizawa, T. Furukawa, T. Uchiyumi, M. Wada, M. Kuwano and S. Akiyama: Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol. Pharmacol.*, 56:1219-1228 (1999) "

" E. Hinoshita, T. Uchiyumi, K. Taguchi, N. Kinugawa, 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. *Clin. Cancer Res.* 6 in press (2000) "

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

" K. Fujita, A. Mogami, A. Hayashi and T. Kamataki: Establishment of *Salmonella* strain expressing catalytically active human UDP-glucuronosyl-transferase 1A1 (UGT1A1). *Life Sci.* in press (2000) "