

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390017
 研究課題名（和文） 薬物トランスポーターの細胞内局在を制御する因子群の網羅的解析
 研究課題名（英文） Comprehensive analysis of genes involved in the regulation of subcellular localization of drug transporters
 研究代表者
 紺谷 圏二（KONTANI KENJI）
 東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
 研究者番号：30302615

研究成果の概要：

薬物トランスポーターPGP-1 のアピカル膜への局在制御に関与する因子群を明らかにする目的で、PGP-1-GFP を発現するトランスジェニック線虫を作成し、それを用いて RNAi 及び突然変異誘発法による遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、微小管に沿って小胞を輸送するモータータンパク質であるダイニン/ダイナクチン複合体の構成因子や膜融合に関与する SNAP29 などが PGP-1 のアピカル膜への局在制御に関与していることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬物トランスポーター、上皮細胞、線虫、細胞内輸送、スクリーニング、RNAi

1. 研究開始当初の背景

薬物トランスポーターは、薬物の吸収を行う小腸や、排泄を担う肝臓や腎臓、および薬物の透過を制限するための血液脳関門などに発現し、薬物動態に大きな影響を与える細胞膜蛋白質である。種々の薬物トランスポーターはそれぞれの機能に応じて、これらの臓器の上皮細胞の特異的膜領域（管腔側もしくは基底膜側）に局在化している。この局在化は薬物トランスポーターの機能発現に必須であるが、その局在化メカニズムに関しては大部分が未解明である。

上皮細胞における膜蛋白質の選別輸送に

は多様な経路が存在し、ゴルジ体での糖鎖付加や選別、脂質ラフトや輸送小胞への組み込み、細胞膜へのターゲティングといった多段階からなるステップにより複雑に制御されていると考えられる。これまでの上皮細胞における選別輸送の研究においては、培養細胞を用いた生化学的・分子生物学的手法により、膜蛋白質の細胞膜移行に必要なドメインの絞り込みや結合蛋白質の同定といった解析が主であった。しかし前述のように選別輸送が多段階からなる複雑なステップで制御されていることを考えると、このような実験系に加えて選別輸送に関与する因子群を系

統的に解析するアプローチが必要である。申請者はこれまでに、線虫を用いた遺伝学的・細胞生物学的手法により上皮細胞の機能解析を行ってきた経験を有しており (Kontani et al., Dev Cell 2005, Kontani & Rothman, Curr Biol 2005)、この研究過程で上皮細胞における蛋白質の局在制御の解析に取り組むきっかけを得た。線虫の腸上皮細胞アピカル膜には哺乳動物と同様に薬物トランスポーターPGP-1 が局在化することから、申請者は線虫の様々な利点を生かし、PGP-1 の局在化制御因子の網羅的同定と機能解析という着想に至った。

2. 研究の目的

最もよく知られた薬物トランスポーターの一つである P 糖蛋白質 (PGP-1) は小腸上皮細胞においてアピカル膜 (管腔側) に局在化し、薬物を細胞内から汲みだす機能を担っている。そのため PGP-1 は薬物の吸収効率に大きな影響を及ぼしており、特に癌細胞においては PGP-1 の細胞膜での発現量増加が多剤耐性の大きな原因となっている。よって PGP-1 の膜局在化の分子メカニズムを明らかにすることは、薬物動態を調節する新しい手法の開発にもつながることが期待できる。そこで本研究では、申請者が新たに構築した線虫をモデル生物としたスクリーニングシステムにより、PGP-1 のアピカル膜への局在化に関与する因子群の網羅的同定・機能解析を行い、PGP-1 のアピカル膜局在化の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) スクリーニングの概略：線虫は遺伝学的スクリーニングが可能であり、体が透明なので生きた個体のまま GFP 融合蛋白質の発現や細胞内局在を解析できるという利点を有している。PGP-1 の C 末端に GFP タグが付加された PGP-1-GFP を発現するトランスジェニック線虫において、PGP-1-GFP は、ヒトなどの哺乳動物における小腸上皮細胞での局在と同様、腸上皮細胞のアピカル膜に局在する。よって線虫でも哺乳動物と同様に PGP-1 をアピカル膜に局在化させる分子機構が存在すると想定される。そこで本研究ではこの PGP-1-GFP を発現する線虫を出発材料に用い、その細胞内局在を制御する因子群の遺伝学的スクリーニングを行った。

スクリーニングの方法としては二通りの方法を用いた。ひとつは近年開発された Feeding RNAi library を用いたゲノムワイドスクリーニングである。線虫は大腸菌を食べて成長するが、餌である大腸菌にあらかじめノックダウンしたい遺伝子に対する double-strand RNA (dsRNA) を発現させておき、それを摂取した線虫で RNAi を効かせる

ことができるという非常に簡便で優れた方法である。もう一つの方法は、トランスジェニック動物を EMS などの突変原誘発剤で処理し、PGP-1-GFP の細胞内局在に変化が生じた変異体を単離する方法である。

(2) Feeding RNAi library を用いたスクリーニングの実際：Feeding RNAi ライブラリーに関しては Geneservice 社及び Open Biosystems 社から購入した。個々の遺伝子に対する double-strand RNA (dsRNA) を発現する大腸菌は 96 well または 384 well フォーマットで供給されるので、まず各クローンを液体培養後、Feeding RNAi 用の 12 well プレートに培養した。それらを餌としてトランスジェニック動物を生育させることにより、その個体に RNAi を作用させて PGP-1-GFP の局在を観察した。この方法ではある程度生育した時点から RNAi を効かせられるので、生存に必須な遺伝子に対する RNAi を行った動物も観察できるという利点も有する。

(3) EMS によるスクリーニングの実際：線虫は雌雄同体であり、EMS で処理したトランスジェニック動物から自家受精で生まれた子供世代 (F1) は、ある突然変異 m のヘテロ接合体 (+/m) になっている。そこでの F1 を小シャーレに単離し、F1 から生まれた子供世代 (F2) のうち、4分の1の確率で生まれるホモ接合体 (m/m) で PGP-1 のアピカル膜への局在化に異常が生じているものを選別した。得られた変異体は何回か野生型と交配して余分な変異を除いた後、SNP を用いたポジショナルクローニングを行った。

4. 研究成果

これまでの報告から、極性形成や輸送において重要な役割を担う因子の機能を欠損した線虫は致死性を示す事が知られている。そこで、遺伝子発現抑制により致死性を示す因子 (1170 個) に焦点を当て、PGP-1 の細胞内局在に影響を与える因子のスクリーニングを行った。その結果、PGP-1-GFP の局在に影響を与える計 302 個の候補クローンを同定した。これらの因子を発現抑制すると、腸管のアピカル膜に選択的に局在していた PGP-1-GFP が細胞質内にも散在するなどの様子が観察された。本スクリーニングでは、RNA 関連因子が多数取得されたが、これは転写、翻訳といった機能が欠損したことによる二次的な影響がみられたためであると考えられた。そこで以降の解析には、細胞内小胞輸送に関すると考えられる因子群に焦点を当てて解析を行った。

今回の RNAi スクリーニングで得られた候補因子群の中には微小管に沿って小胞を輸送するモータータンパク質であるダイニン/ダイナクチン複合体の構成因子が複数存在した。これらの因子の発現抑制の際には、

極性形成に必要なアピカルジャンクション(タイトジャンクション)及びバソラテラル膜に局在する蛋白質の局在には変化は見られなかったことから、細胞の極性形成自体は維持されていると考えられた。極性細胞においては、非極性細胞と異なり、微小管のプラス端からマイナス端への極性がバソラテラル側からアピカル側へと向いている。ダイニン/ダイナクチン複合体は微小管のプラス端からマイナス端へと小胞を輸送することから、PGP-1のアピカル膜への局在化は、ダイニン/ダイナクチン複合体を介した微小管依存的な小胞輸送系が重要な役割を果たしていると考えられた。

申請者は、候補因子群の一つである PHI-28 の機能を抑制した際に、PGP-1-GFP が細胞内に異常に蓄積するという特徴的な表現型を示す事を見出した。PHI-28 は膜融合の際に重要な役割を果たす SNARE であり、ヒトにおけるホモログは SNAP29 である。近年、神経症状と角化異常症を示す CEDNIK 症候群の原因遺伝子として SNAP29 が同定されており、SNAP29 の発現が低下した患者の皮膚では分泌小胞の細胞内蓄積が見られることが報告されているものの、SNAP29 がどのような細胞内小胞輸送系を制御するかについては未解明である。

線虫において PHI-28 の機能を抑制した際に観察された、PGP-1 の局在異常の表現型が種を超えて保存されているかを検討する目的で、ヒト培養細胞系を用いて、以下の実験を行った。まず、HeLa 細胞において PHI-28 のヒトホモログである SNAP29 の局在を検討したところ、トランスゴルジ網を含むいくつかの膜オルガネラのマーカートンパク質と SNAP29 は共局在したことから、SNAP29 は細胞内の様々なオルガネラ膜間輸送に関与することが示唆された。

一般に細胞内輸送においては低分子量 G タンパク質である Rab ファミリーが重要な役割を担っている。そこで SNAP29 が Rab ファミリーと協調して機能している可能性を考え、SNAP29 と各種 Rab との共局在性及び相互作用の有無を検討した。その結果、細胞内で SNAP29 と Rab8 が共局在し、他の Rab と比較して強く相互作用することを見出した。近年 Rab8 はアピカル膜への輸送過程に関与することが示されており、以上の結果を考え合わせると SNAP29 が Rab8 との相互作用を介して PGP-1 のアピカル膜への局在化制御に関与する可能性が考えられた。

EMS によるスクリーニングに於いては、F1 の数として 6000 クローンを単離し、PGP-1 の局在に異常が見られる 10 個以上の変異体の単離に成功した。このうち顕著な表現型を示す変異体 td52 では PGP-1-GFP はアピカル膜だけでなく、細胞質中にも拡散する細胞内

局在を示した。また他のアピカルマーカである VHA-6 も同様に細胞内に拡散するパターンを示した。一方、td52 変異体ではバソラテラルマーカである NFM-1 に関しては顕著な細胞内局在の異常は観察されなかった。よって、td52 変異体ではアピカル膜への局在化が特異的に異常になっている可能性が示唆された。SNP を用いて td52 のポジショナルクローニングを行ったところ、td52 では Y41E3.11 遺伝子に変異が生じていることが明らかとなった。Y41E3.11 は、SPRY ドメインを含む、hnRNP と推定されている蛋白質をコードしており、td52 では 92 番目のロイシン残基がフェニルアラニン残基に置換されていた。92 番目のロイシン残基は hnRNP で高く保存されている RNA 結合モチーフの変異であり、Y41E3.11 産物と標的となる RNA との相互作用に変化が生じ、それが td52 の表現型を惹起する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

(1) Tanemura S, Momose H, Shimizu N, Kitagawa D, Seo J, Yamasaki T, Nakagawa K, Kajihio H, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Blockage by SP600125 of Fcepsilon receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway. *J Biochem.* 145: 345-354 (2009) [Cover of the issue] (査読有り)

(2) Ohata S, Nawa M, Kasama T, Yamasaki T, Sawanobori K, Hata S, Nakamura T, Asaoka Y, Watanabe T, Okamoto H, Hara T, Terai S, Sakaida I, Katada T, Nishina H. Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 379: 817-823 (2009) (査読有り)

(3) Kobayashi T, Hori Y, Ueda N, Kajihio H, Muraoka S, Shima F, Kataoka T, Kontani K, Katada T. Biochemical characterization of missense mutations in the Arf/Arl-family small GTPase Arl6 causing Bardet-Biedl syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 381: 439-442 (2009) (査読有り)

(4) Kontani K, Hori Y, Katada T. Arf-like protein 13B. *Nature Molecule Pages,*

Published online:
doi:10.1038/mp.a003975.01 (2009) (査読
有り)

(5) Shimizu N, Watanabe H, Kubota J, Wu J, Saito R, Yokoi T, Era T, Iwatsubo T, Watanabe T, Nishina S, Azuma N, Katada T, Nishina H. Pax6-5a promotes neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Biol. Pharm. Bull.* 32 (6): 999-1003 (2009) [Cover of the issue] (査読有り)

(6) Saito R, Yamasaki T, Nagai Y, Wu J, Kajiho H, Yokoi T, Noda E, Nishina S, Niwa H, Azuma N, Katada T, Nishina H. CrxOS maintains the self-renewal capacity of murine embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 (4): 1129-1135 (2009) (査読有り)

(7) Negishi T, Nagai Y, Asaoka Y, Ohno M, Namae M, Mitani H, Sasaki T, Shimizu N, Terai S, Sakaida I, Kondoh H, Katada T, Furutani-Seiki M, Nishina H. Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka. *Hepatology* 51(3): 1037-1045 (2009) (査読有り)

(8) Wada T, Stepniak E, Hui L, Leibbrandt A, Katada T, Nishina H, Wagner EF, Penninger JM. Antagonistic control of cell fates by JNK and p38-MAPK signaling. *Cell Death Differ.* 15: 89-93 (2008) (査読有り)

(9) Hara-Yokoyama M, Kimura T, Kaku H, Wakiyama M, Kaitsu Y, Inoue M, Kusano S, Shirouzu M, Yokoyama S, Katada T, Hirabayashi Y, Takatsu K, Yanagishita M. Alteration of enzymatic properties of cell-surface antigen CD38 by agonistic anti-CD38 antibodies that prolong B cell survival and induce activation. *Int. Immunopharmacol.* 8: 59-70 (2008) (査読有り)

(10) Ohsawa S, Watanabe T, Katada T, Nishina H, Miura M. Novel antibody to human BASP1 labels apoptotic cells post-caspase activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 639-643 (2008) (査読有り)

(11) Yoshikawa M, Kajiho H, Sakurai K, Minoda T, Nakagawa S, Kontani K, Katada T. Tyr-phosphorylation signals translocate

RIN3, the small GTPase Rab5-GEF, to early endocytic vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372: 168-172 (2008) (査読有り)

(12) Hori Y, Kobayashi T, Kikko Y, Kontani K, Katada T. Domain architecture of the atypical Arf-family GTPase Arl13b involved in cilia formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373: 119-124 (2008) (査読有り)

(13) Takahashi S, Araki Y, Ohya Y, Sakuno T, Hoshino S, Kontani K, Nishina H, Katada T. Upf1 potentially serves as a RING-related E3 ubiquitin ligase via its association with Upf3 in yeast. *RNA* 14: 1950-1958 (2008) (査読有り)

(14) Takahashi S, Kontani K, Araki Y, Katada T. Caf1 regulates translocation of ribonucleotide reductase by releasing nucleoplasmic Spd1-Suc22 assembly. *Nucleic Acid Res.* 35: 1187-1197 (2007) (査読有り)

(15) Nakano-Kobayashi A, Yamazaki M, Unoki T, Hongu T, Murata C, Taguchi R, Katada T, Frohman MA, Yokozeki T, Kanaho Y. Role of activation of PIP5Kgamma661 by AP-2 complex in synaptic vesicle endocytosis. *EMBO J.* 26: 1105-1116 (2007) (査読有り)

(16) Ito G, Okai T, Fujino G, Takeda K, Ichijo H, Katada T, Iwatsubo T. GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. *Biochemistry* 46: 1380-1388 (2007) (査読有り)

(17) Shintani M, Tada M, Kobayashi T, Kajiho H, Kontani K, Katada T. Characterization of Rab45/RASEF containing EF-hand domain and a coiled-coil motif as a self-associating GTPase. *Biochem Biophys Res Commun.* 357: 661-667 (2007) (査読有り)

(18) Ura S, Nishina H, Gotoh Y, Katada T. Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by MST1 is essential and sufficient for the induction of chromatin condensation during apoptosis. *Mol Cell Biol.* 27: 5514-5522 (2007) (査読有り)

(19) Funakoshi Y, Doi Y, Hosoda N, Uchida N, Osawa M, Shimada I, Tsujimoto M, Suzuki T, Katada T, Hoshino S. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev.* 23: 3135-3148 (2007) (査読有り)

(20) Kobayashi T, Gengyo-Ando K, Ishihara T, Katsura I, Mitani S. IFT-81 and IFT-74 are required for intraflagellar transport in *C. elegans*. *Genes Cells* 12: 593-602 (2007) (査読有り)

(21) Gengyo-Ando K, Kuroyanagi H, Kobayashi T, Murate H, Fujimoto K, Okabe S, Mitani S. The SM protein VPS-45 is required for RAB-5-dependent endocytic transport in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Rep.* 8: 152-157 (2007) (査読有り)

(22) Wang X, Wang J, Gengyo-Ando K, Gu L, Sun C-L, Yang C, Shi Y, Kobayashi T, Shi Y, Mitani S, Xie X-S, Xue D. *C. elegans* mitochondrial factor WAH-1 promotes phosphatidylserine externalization in apoptotic cells through phospholipid scramblase SCRM-1. *Nat. Cell Biol.* 9: 541-549 (2007) (査読有り)

[学会発表] (計 20 件)

(1) 福山 征光、他；The insulin/IGF signaling and Rag-mediated pathways couple nutrients and stem cell quiescence in *C. elegans* [第 32 回日本分子生物学会；2009 年 12 月 12 日／横浜]

(2) 新谷 真未、他；ユニークな一次構造を有する Rab ファミリー G 蛋白質 Rab45 の機能解析 [第 32 回日本分子生物学会；2009 年 12 月 11 日／横浜]

(3) 中江 郁青、他；The Arf-like GTPase ARL-8 is required for lysosome biogenesis in *C. elegans* [第 32 回日本分子生物学会；2009 年 12 月 11 日／横浜]

(4) 堅田 利明；リソソームの成熟過程に介在する新奇低分子量 G タンパク質 Ar18: G タンパク質が果たす役割の拡大に向けて [高崎健康福祉大学・薬学部；2009 年 11 月 27 日／高崎]

(5) 福山 征光、他；アミノ酸シグナルにおける Rag の機能解析 [第 82 回日本生化学会大会；2009 年 10 月 24 日／神戸]

(6) 堅田 利明、他；後期エンドソームとリソソームの融合・再形成過程に介在する低分子量 G 蛋白質 Ar18 [第 82 回日本生化学会大会；2009 年 10 月 23 日／神戸]

(7) 福山 征光；体外栄養源による配偶子幹細胞の発生進行制御機構の解明 (口頭発表) [文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「配偶子幹細胞制御機構」領域会議；2009 年 10 月 14 日／葉山]

(8) 紺谷 圈二、中江 郁青、堅田 利明；リソソームにおける低分子量 G 蛋白質 Ar18 の機能解析 [文部科学省特定領域研究「細胞情報ネットワークを統合する G 蛋白質シグナル研究の新展開」班会議；2009 年 9 月 11 日／南房総・富浦]

(9) 新谷 真未、他；ユニークな一次構造を有する G 蛋白質 Rab45 の生理機能の解析 [文部科学省特定領域研究「細胞情報ネットワークを統合する G 蛋白質シグナル研究の新展開」班会議；2009 年 9 月 10 日／南房総・富浦]

(10) 堀 裕次、他；繊毛形成に関与する G 蛋白質 Ar113b の機能解析 [文部科学省特定領域研究「細胞情報ネットワークを統合する G 蛋白質シグナル研究の新展開」班会議；2009 年 9 月 10 日／南房総・富浦]

(11) Nakae I, 他：The Arf-like GTPase ARL-8 is required for lysosome biogenesis in *C. elegans* [17th International *C. elegans* Meeting] Los Angeles, CA, USA, 2009 年 6 月 27 日

(12) Fukuyama M, 他：Distinct control of survival, and somatic and germline development during L1 diapause by the insulin/IGF signaling and AMPK pathway [17th International *C. elegans* Meeting] Los Angeles, CA, USA, 2009 年 6 月 26 日

(13) 堀 裕次、他；繊毛に局在する G 蛋白質 Ar113b の性状解析 [第 61 回日本細胞生物学会大会；2009 年 6 月 4 日／名古屋]

(14) 菊香 順史、他；リソソーム酵素の成熟過程における低分子量 G 蛋白質 Ar18 の機能解析 [文部科学省特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」細胞情報ネットワークを統合する G 蛋白質シグナル研究の新展開] 合同若手ワークショップ；2009 年 1 月 30 日／神戸]

(15) 新谷 真未、他；ユニークな一次構造を有するG蛋白質 Rab45の生理機能の解明 [文部科学省特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」「細胞情報ネットワークを統合するG蛋白質シグナル研究の新展開」合同若手ワークショップ；2009年1月29日／神戸]

(16) 菊香 順史、他；低分子量G蛋白質 Arl8の活性制御機構の解明 [第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会；2008年12月9日／神戸]

(17) Katada T, 他；The Arf-like GTPase Arl8 is required for lysosome biogenesis in *C. elegans*. [IUPS 2009: PSJ Symposium, VI-5; Recent progress on G-protein signalings] Kyoto, Japan, 2008年7月28日

(18) 堀 裕次、他；バルデー・ビードル症候群に関わる低分子量Gタンパク質 Arl6変異体の性状解析 [第60回日本細胞生物学会大会；2008年6月30日／横浜]

(19) 紺谷 圏二、他；Functional analysis of the Arf-like small GTPase Arl8 in lysosomes [第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会；2007年12月13日／横浜]

(20) 紺谷 圏二、他；線虫を用いた低分子G蛋白質 Arl8の機能解析 [文部科学省特定領域研究「細胞情報ネットワークを統合するG蛋白質シグナル研究の新展開」班会議；2007年7月26日／東京]

[その他]

ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紺谷 圏二 (KONTANI KENJI)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：30302615

(2) 研究分担者

堅田 利明 (KATADA TOSHIAKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：10088859

福山 征光 (FUKUYAMA MASAMITSU)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：20422389

小林 哲夫 (KOBAYASHI TETSUO)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：80433994

(3) 連携研究者

なし