

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890212
 研究課題名（和文）P-糖タンパク機能制御の解明を目指した細胞内局在制御因子の探索
 研究課題名（英文）Search for regulatory factors controlling intracellular localization of P-glycoprotein

研究代表者

叶 隆 （Kano Takashi）
 高崎健康福祉大学・薬学部・助手
 研究者番号：70509257

研究成果の概要（和文）：癌多剤耐性を惹起する原因のひとつである P-糖タンパク（P-gp）の転写レベルに関わる因子として、ERM（Ezrin-radixin-moesin）タンパクに属する ezrin を、さらに翻訳後に膜上への発現を制御する因子として radixin を見出した。P-gp の機能は mRNA 量と相関しないため、P-gp の翻訳後因子である radixin が P-gp の機能を制御する有力な因子であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：ERM proteins (ezrin-radixin-moesin) are a closely related family of membrane-cytoskeleton crosslinkers. In this study, we identified ezrin as one of the transcriptional factors of P-glycoprotein (P-gp) and radixin as one of the post-translational factors of P-gp. The function of P-gp does not correlate well with the mRNA level. Therefore, we hypothesize that radixin act as a potent regulatory factor for P-gp function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：P-タンパク、調節因子、ERMタンパク、癌多剤耐性

1. 研究開始当初の背景

一般的に DNA は mRNA に転写された後、タンパクに翻訳され、さらに様々な翻訳後修飾を受けその機能を発揮する。昨今、タンパクの機能活性の指標として mRNA の量がしばし

ば測定されているが、タンパクとしての発現量あるいは活性はその mRNA 量に依存しない例が報告されている。排出系 ABC トランスポーターのひとつである P-糖タンパク（P-gp）も、タンパクの発現量あるいは活性はその

mRNA 量のみには依存せず、他の要因、例えば翻訳を制御する因子や P-gp を膜上に移動させたり、あるいは膜上に留めておこなんらかの因子の制御を受けていることが推測される。

P-gp は当初、がん細胞で多剤耐性を引き起こす因子として発見されたが、多くの正常組織においても発現し、薬物の体内動態を制御していることが知られている。今までに国内外の様々な研究において P-gp の基質特異性が明らかにされ、薬物の生体膜透過や体内動態に占める P-gp の役割に関する知見も多く集積されている。しかしながら、P-gp の発現・機能調節機構に関するメカニズムはほとんど明らかになっていない。

がん化学療法における課題のひとつが抗がん剤長期投与における多剤耐性の惹起であり、その原因のひとつは P-gp に代表される ABC トランスポーターの発現誘導である。そこで、P-gp と直接相互作用する因子を見出し、その因子の P-gp に及ぼす生理的役割を解析して、さらに他の ABC トランスポーターを含めた発現および誘導因子の解明にも発展させることにより、多剤耐性の問題を含めたトランスポーターによる高次レベルでの薬物の体内動態制御機構が解明できると期待される。

2. 研究の目的

P-gp の発現調節に関わる様々な因子のうち、翻訳後に P-gp と直接相互作用して P-gp の膜上への発現を制御する因子を同定し、さらに多剤耐性に関わる ABC トランスポーター群と直接相互作用する共通因子を見出し、その生理的役割を解析して、トランスポーターの細胞膜上への発現および誘導メカニズムを解明することを目的とした。P-gp は ezrin、radixin および moesin (ERM タンパク) のいずれとも結合することから、まず、これらのタンパクが、P-gp の転写、翻訳または翻訳後修飾のどの段階で働くかを検討した。

3. 研究の方法

培養細胞を用いた検討

(1) P-gp および各 ERM タンパクが発現している細胞のスクリーニング

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞などの複数の細胞を用いて、P-gp および各 ERM タンパクの mRNA の発現を RT-PCR 法で、タンパク量の発現をウエスタンブロッティング法で確認した。

(2) siRNA 法による検討

定法に従い、ezrin, radixin, moesin および P-gp の stealth RNA で HepG2 細胞を処理し、標的 mRNA および標的タンパクのノックダウンを検討し、その効果を確認した。

siRNA 法で各 ERM タンパクをノックダウン

した後、P-gp の mRNA 量を定量した。また、同様に siRNA 法で処理した細胞の細胞膜を細胞内オルガネラと分離して、膜上に発現する P-gp のタンパク量を定量した。さらに siRNA 法を用いて標的タンパクをノックダウンした後、P-gp の基質である Rhodamine123 (Rho123) を用いて、取り込み試験を行った。

(3) 免疫沈降法を用いた radixin と P-gp または BCRP との相互作用の確認

定法に従い、ビーズに P-gp の抗体を結合させ、そのビーズ-抗体複合体を用いて、HepG2 細胞溶解液中の P-gp を精製し、ビーズ-抗体複合体から P-gp を解離、変性させた。その後、P-gp、radixin および actin の抗体を用いて、各タンパクを検出した。

さらに、Breast cancer resistance protein (BCRP) / ABCG2 にも着目し、radixin との相互作用を調べるため、BCRP の抗体とビーズを結合させ、上記と同様の方法で BCRP を精製し、BCRP、radixin および actin の抗体を用いて、各タンパクを検出した。

4. 研究成果

(1) P-gp および各 ERM タンパクが発現している細胞のスクリーニング

RT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法にて、P-gp と ERM タンパクが発現していることを確認したところ、HepG2 細胞において、P-gp および各 ERM タンパクが強く発現していた。そのため以下の検討では、HepG2 細胞を用いた (図 1)。

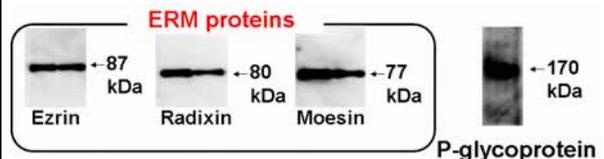


図1 HepG2細胞を用いたP-糖タンパク及び ERMタンパクのウエスタンブロッティング

(2) siRNA 法による検討

siRNA 法の効果を検証するために、P-gp または各 ERM タンパクの mRNA をノックダウンした後、それらの mRNA およびタンパク量を測定したところ、siRNA 法を施した各細胞において、mRNA およびタンパク量は有意に減少していた (図 2)。

Ezrin, radixin および moesin が転写の段階で P-gp の機能に関与する可能性を考慮して、各タンパクを siRNA 法でノックダウンしたときの P-gp の mRNA 量を検討した。その結果、**ezrin をノックダウンしたときのみ、P-gp の mRNA 量は減少した。(図 3)。**

ERM タンパクの中で ezrin は核内に存在するという報告があることから、ezrin のノッ

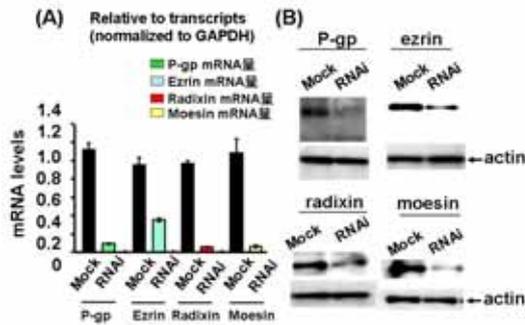


図2 siRNA法の効果

クダウンはP-gpのmRNAの発現に影響を与えると考えられた。

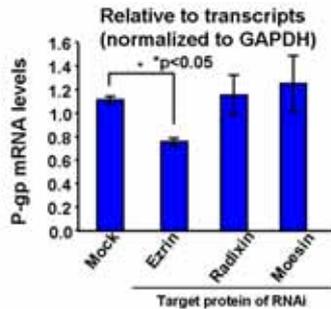


図3 各ERMタンパクをノックダウンしたときのP-糖タンパクのmRNA量

また、ezrin, radixin およびmoesinが翻訳および翻訳後の段階でP-gpの制御に関与する可能性を考え、細胞全体と細胞膜上のP-gpのタンパク量を比較した。その結果、細

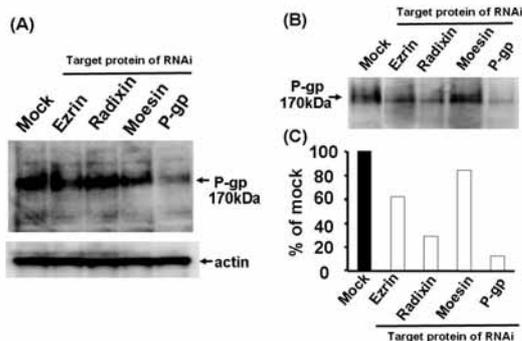


図4 P-糖タンパクのウェスタンブロットニング (A) Total lysate (B) Membrane protein (C) Bにおけるバンドの濃さの定量

胞全体のP-gpのタンパク量は、ezrin, radixin またはmoesinをノックダウンした場合でも、mockの場合と差が認められなかったが、膜上のP-gpのタンパク量はradixinをノックダウンしたときのみ減少していた(図4)。次いで、siRNA法を用いてezrin, radixin およびmoesinまたはこれらタンパクを組み合わせるとノックダウンした後、P-gpの基質であるRho123を用いて取り込み実験を行ったところ、radixinをノックダウンしたときの

み有意にCell to Medium (C/M) ratioが上昇した。つまり、radixinがノックダウンされると、P-gpの膜上発現が減少し、Rho123の細胞外への掃き出しが阻害されると考えられた(図5)。

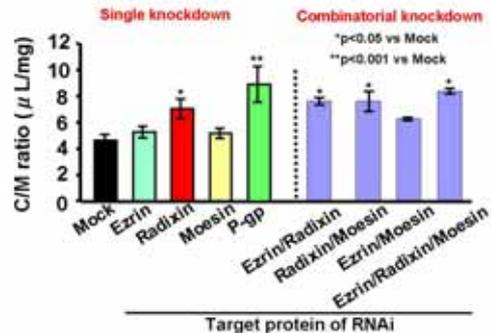


図5 HepG2細胞を用いたRhodamine123の取り込み実験

(3) 免疫沈降法を用いた Radixin と P-gp または BCRP との相互作用の確認

さらに HepG2 細胞を用いて、P-gp と radixin の相互作用を免疫沈降法で確認したところ、radixin は P-gp と結合することが確認された(図6)。

P-gpと同じく多剤耐性に関わる重要な排出系 ABC トランスポーターのひとつとして、BCRP が知られている。そこで、radixin と BCRP の相互作用を検討するために、P-gp の場合と同様に免疫沈降法を行った。しかしながら、BCRP と radixin の相互作用は確認できなかった。

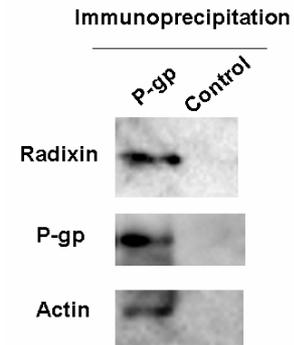


図6 免疫沈降法の結果

まとめ

以上の結果より、P-gpの転写に影響を与える因子として ezrin を、また翻訳後に P-gp と直接相互作用し P-gp の膜上への発現を制御する因子として、radixin を同定した。ここまでの結果については、論文投稿準備中である。

なお、今回の検討では、radixin と BCRP の相互作用は確認できなかったが、さらに免疫沈降法の検討を行う必要があると考える。

また、radixin と P-gp との相互作用を in vivo で確認するために、radixin ノックアウトマウスを入手して、消化管、脳、腎臓および肝臓に発現する P-gp の機能に対する radixin の役割を解析中である。さらに並行

して、BCRP および MRP_s などの他の ABC トランスポーターと ERM タンパクの関係についてもより詳細に検討していく予定である。

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)

[学会発表](計1件)

Takashi Kano, Kaori Morimoto, Yukio Kato, Takuo Ogihara. Effect on the function of P-gp by knockdown of ezrin, radixin and moesin in HepG2 cells. 日本薬物動態学会第24回年会 平成21年11月27日(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

叶 隆 (Kano Takashi)
高崎健康福祉大学・薬学部・助手
研究者番号：70509257

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：