

平成 21 年 4 月 29 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：19790116

研究課題名（和文）

PKC 分子種依存的な Mrp2, Bsep の膜動輸送の分子論的解析と生体への影響

研究課題名（英文）

Molecular analysis and biological effect of PKC isoforms dependent membrane trafficking of Mrp2/Bsep

研究代表者

氏名（ローマ字）：関根 秀一 (Sekine Shuichi)

所属機関・部局・職：千葉大学・薬学研究院・助教

研究者番号：70401007

研究成果の概要：肝臓の毛細胆管側膜に発現している胆汁排泄輸送体（Mrp2, Bsep）の機能低下がリン酸化酵素 PKC の分子種依存的に胆管側膜から細胞質へ局在が変化することを見出した。また、胆汁輸送体と細胞骨格のアンカー蛋白質である Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) family のうち肝臓で高発現の Radixin のリン酸化状態の変動が Mrp2 の局在に影響することを明らかとし、ERM の発現プロファイルの違いが PKC 分子種依存的な胆汁排泄輸送体の局在制御機構に関わっていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,000,000	0	2,000,000
20 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	240,000	3,040,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態学、胆汁排泄輸送体、膜動輸送、胆汁うっ滞、PKC

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに Mrp2 の胆管側膜における局在が、細胞内 GSH の濃度の変動に応じた可逆的な機構により制御されていること明らかとしてきた。さらに肝臓と小腸に発現している Mrp2 の局在制御機構に PKC の分子種に依存したシグナル伝達が存在していることを見出してきた。

## 2. 研究の目的

申請者が得ている実験結果から Mrp2 と F-actin とのアンカーとして働き、Mrp2 の膜

における安定発現に重要である Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) family の蛋白質は肝臓と小腸とで異なる局在性を示すことから、申請者はこの ERM 蛋白質の臓器間における ERM の発現プロファイルの相違が、PKC 分子種依存的な Mrp2 の局在変化に対する臓器間の差の原因であると考え、この仮説を検証することを目的とした。さらに輸送体の局在変化が、薬物の体内動態の変動や胆汁酸などの内因性の基質の蓄積に伴った肝障害の悪化に寄与するかを評価することで、Mrp2 の内在化が及ぼす生体への影響に

ついて明らかとすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) PKCの標的分子の単離と標的蛋白質とMrp2, Bsep結合性に対する影響

##### ① PKCによるリン酸化標的蛋白質の同定

酸化ストレス、Thymeleatoxinにより活性化されたPKC分子種の肝臓、小腸におけるリン酸化の標的分子を同定することを目的として、肝臓、小腸より単離した遊離細胞を用いて [<sup>32</sup>P] 無機リン酸で代謝ラベルし、酸化ストレス、Thymeleatoxin処理後、Mrp2, Bsep或いはERM family, HAX-1, F-actinに特異的な抗体で免疫沈降し、電気泳動によって分離後、バイオイメージアナライザーにて検出・定量を行い、リン酸化状態を比較する。

##### ② リン酸化標的蛋白質とMrp2, Bsepとの結合性の評価

酸化ストレス、Thymeleatoxin処理した肝臓、小腸より単離した遊離細胞の可溶性画分とMrp2, Bsep, F-actinに対して特異的な抗体を用いて免疫沈降した後、Ezrin, Radixin, HAX-1に特異的な抗体によりWestern blotを行い、リン酸化による輸送体及び細胞骨格との結合性を評価する。

#### (2) 新規Mrp2, Bsep結合蛋白質の探索とMrp2, Bsep内在化に与える影響

各蛋白質のリン酸化状態の比較によってもリン酸化の変化が認められない場合は、Mrp2, Bsepとの結合性が変化する新規会合因子の同定を、Mrp2, Bsep C末端細胞質ドメインをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と融合させたタンパクMrp2-GST, Bsep-GSTを用いて、肝臓、小腸の単離細胞の可溶性画分とのGST-pull down assayを行う。酸化ストレス及びThymeleatoxin処理の有無で共沈量差、又はリン酸化状態に変化のある蛋白質を二次元電気泳動後に銀染色、代謝ラベルされた [<sup>32</sup>P] を検出する。得られた蛋白質をゲルより切り出し、MALDI-TOF MSにて一次構造解析を行い、既知蛋白質データベースとの照合を行う (外部発注予定)。

以上の実験により、酸化ストレス、Thymeleatoxin 処理によるシグナルの最下流に位置する Mrp2 の膜での安定制御蛋白質のリン酸化による制御の全体像をつかむことが可能となる。

#### (3) 肝臓、小腸におけるMrp2内在化に伴う薬物体内動態の変動に対する影響

胆汁輸送体の局在変化が及ぼす薬物の体内動態に対する影響を評価することを目的として、酸化ストレス、Thymeleatoxin処理をしたラットに、Mrp2の選択的な蛍光基質である 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMF-DA) を静脈、及び経口よ

り投与し胆汁中、血清中のCMFの測定を行い、得られたCMFの濃度推移から、酸化ストレスによる肝臓のMrp2内在化時、Thymeleatoxin処理による小腸のMrp2内在化におけるCMFの体内動態に及ぼす影響について検討を行う。また、実験終了後の肝臓、小腸を摘出し、スクロース密度勾配を用いて細胞膜画分を調製し、ウエスタンブロット法にて膜画分における各PKC分子種、Mrp2, ERM familyの発現量の定量を行い、PKC分子種の活性化とMrp2の局在変化が起こっていることを確認する。

#### (4) Bsep内在化に伴う胆汁酸の蓄積と肝障害に対する影響

肝灌流法は、他の臓器からの影響を排除し、より生体に近い状況で薬物の肝内動態を検討することができる。そこで肝臓におけるBsepを内在化させるためにThymeleatoxinをラット肝灌流法により門脈より灌流を行い、肝臓から灌流液中に漏出するAlanine amino transferase (ALT) を測定し胆汁酸の蓄積による肝障害を評価する。さらに、リトコール酸の経時的な胆汁中への排泄、灌流後の肝臓中における蓄積量をHPLCにより定量する。またPKCの選択的阻害剤を同時に灌流し、Bsepの内在化が阻害された時の胆汁中へのリトコール酸の排泄の回復、肝臓中におけるリトコール酸の濃度、灌流液中へのALTの漏出について阻害剤の影響を検討する。

### 4. 研究成果

cPKCの活性化により小腸に発現しているEzrinのリン酸化状態の変化することを見出し、Mrp2の局在制御に重要な因子であることを明らかとした。更に、本年度に行った研究より、肝臓においてもRadixinのリン酸化状態の変化がMrp2の局在変化に関与すること、またこのリン酸化状態の変化が酸化ストレスに応じて起こる事を明らかとし、ERM familyの蛋白質がPKCの分子種に依存したMrp2の内在化現象の要因であることが見出された。また長期の酸化ストレス持続時においては、Mrp2の分解が亢進することを見出し、このメカニズムとして蛋白質の分解保護に働く修飾因子であるUbiquitin様修飾因子 (SUMO) のMrp2からの脱離が関与する可能性を明らかとした。更に、グラム陰性菌由来の毒素であり、肝炎のモデルとして繁用されるLPSの投与ラットにおいてもMrp2の内在化が確認され、また沖縄の発酵食品の抽出成分である抗酸化物質(Dimerumic acid)の投与により、LPSにより誘発されるMrp2の内在化に対して、抑制効果をもつことが明らかとなった。

これは、炎症時に見られる胆汁うっ滞時においても、酸化ストレスを引き金としたMrp2の内在化が原因となることを示唆しており、薬剤性肝障害のみならず、C型肝炎をはじめとする慢性の炎症時にみられる胆汁うっ滞の原因と機序の解明に繋がる知見となる可能性を示唆している。

本研究を更なる遂行していくことにより、PKC 分子種の活性化を指標とした候補医薬品の肝毒性や薬物動態の変動に対する新規スクリーニング系の構築に繋がることが期待され、今後発展性のある研究成果が得られた。

#### 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 3 件)

① Nakano T, Sekine S, Ito K, Horie T. Correlation between apical localization of Abcc2/Mrp2 and phosphorylation status of ezrin in rat intestine.

Drug Metab Dispos. 2009 Epub ahead of print

② Minami S, Ito K, Honma M, Ikebuchi Y, Anzai N, Kanai Y, Nishida T, Tsukita S, Sekine S, Horie T, Suzuki H.

Posttranslational regulation of Abcc2 expression by SUMOylation system.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009, 296(5): G406-413

③ Sekine S, Ito K, Horie T.

Canalicular Mrp2 localization is reversibly regulated by the intracellular redox status.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009, 295(5): G1035-1041

[学会発表] (計 11 件)

① 三ツ木香織、関根秀一、堀江利治

酸化ストレス時における Mrp2 タンパク分解に対するユビキチン様修飾因子の関与

日本薬学会第 129 年会

2009.3.26-28 京都

② 関根秀一、木村友映、本山碧、堀江利治

薬物誘発性ミトコンドリア膜透過性遷移における種差の解明

日本ミトコンドリア学会年会

2008.12.18-20 東京

③ 中埜貴文、関根秀一、伊藤晃成、堀江利治

cPKC活性化が及ぼすラット小腸Mrp2及びMdr1

膜局在への影響の相違

日本薬物動態学会

2008.10.30-11.1 熊本

④ 松尾玲子、関根秀一、堀江利治

Estradiol 17 $\beta$ -glucuronide の小腸上皮トランスポーターの機能に対する影響について

日本薬剤学会第 23 年会

2008.5.20-22

札幌

⑤ 矢野健太郎、関根秀一、堀江利治

LPS により誘発される Mrp2 局在変化に対する dimerumic acid の抑制効果について

日本薬剤学会第 23 年会

2008.5.20-22

札幌

⑥ 根本華奈子、矢野健太郎、関根秀一、平田晃陰、不破享、堀江利治

LPS 誘発性胆汁うっ滞に対する Dimerumic acid の防御効果について

日本薬学会第 128 年会

2008.3.26-28 横浜

⑦ 高島有紀、関根秀一、堀江利治

cAMP と Genipin による胆汁排泄輸送体 Mrp2 の膜局在誘導メカニズムの解析

日本薬学会第 128 年会

2008.3.26-28 横浜

⑧ 関根秀一、伊藤晃成、堀江利治

PKA/PKC 活性化平衡の変動による Mrp2 の可逆的膜動輸送制御について

第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム

2007/11/26-27 仙台

⑨ Shuichi Sekine, Kousei Ito, Toshiharu Horie

Mrp2 localization is reversibly regulated by protein kinases.

8th International ISSX

2007/10/9-12 仙台

⑩ Takahumi Nakano, Shuichi Sekine, Kousei Ito, Toshiharu Horie

The phosphorylation status of ezrin regulates Mrp2 localization in rat intestine

8th International ISSX

2007/10/9-12 仙台

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/yakuzai/index.html>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 秀一 (Sekine Shuichi)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：70401007

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：