

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16408

研究課題名（和文）翻訳後修飾に基づくABCG2トラフィッキング異常機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of abnormal ABCG2 localization regulated by post-transcriptional modification

研究代表者

小森 久和 (Komori, Hisakazu)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00634180

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ABCG2トランスポーター（別名breast cancer resistance protein, BCRP）は日本人において一塩基多型のアレル頻度が高く、中でもQ141K変異体（c. 421C>A）は低発現型であるため基質のクリアランスが低下する。我々はQ141K変異体の発現低下メカニズムを翻訳後修飾に基づいて検討した。その結果、野生型のGln141が安定性に重要であること、また、Q141K変異体はGln141の喪失による安定性の低下に加え、獲得したLys141でユビキチン化を受けることで初期から後期エンドソームへの移行が促進され、発現量が低下していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABCG2は高尿酸血症や痛風の原因遺伝子として見出されているほか、ABCG2の機能低下は生活習慣病の重要な危険因子と考えられている。他にも、臨床で基質薬物のクリアランスが低下するなど、Q141K変異体は生体ホメオスタシスや薬物治療上の問題点となっている。本検討結果はc. 421C>Aによる遺伝性疾患であっても薬物によりUb化を制御することで発現を回復できる可能性を示すものである。本研究により、翻訳後修飾を調節することでトランスポーターを制御し、関連疾患症状の改善および基質薬物の動態を至適化できる新しい方法論を提唱することができるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The ABCG2 transporter (also known as breast cancer resistance protein, BCRP) has a high allele frequency of single nucleotide polymorphisms in Japanese. Among them, the Q141K mutant (c. 421C>A) shows a lower expression, resulting in decreased substrate clearance. In this study, we investigated the mechanism of reduced expression of the Q141K mutant based on post-translational modifications. Our results showed that wild-type Gln141 might be important for protein stability and that the Q141K mutant is down-regulated due to reduced stability caused by loss of Gln141 as well as ubiquitination at the Lys141, which promotes early to late endosomal translocation.

研究分野：薬物動態学

キーワード：ABCG2 Ubiquitination Hyperuricemia Transporter

1. 研究開始当初の背景

ATP-binding cassette トランスポーター ABCG2 (別名 breast cancer resistance protein, BCRP) は小腸、腎臓、肝臓など様々な臓器で発現し、種々の生理活性物質や生体外異物を細胞外に排出することで生体保護に寄与している。ABCG2 は高尿酸血症や痛風の原因遺伝子として見出されているほか、生活習慣病などの慢性炎症疾患との関連が明らかにされており、ABCG2 の機能低下は生活習慣病の重要な危険因子と考えられている。

ゲノムワイド関連解析によると、血清尿酸値の上昇及び痛風の原因遺伝子として ABCG2 及びその足場タンパク質 PDZK1 が見出されている。ABCG2 の一遺伝子多型のアレル頻度は日本人で高く、c.34G>A で 19.2%、c.376C>T で 2.8%、c.421C>A で 31.9% と報告されている⁽¹⁾。中でも c.421C>A (p.Q141K) は形質膜及び細胞全体での発現量が低下していることで、基質輸送活性が低いことが知られている⁽²⁾。Q141K 変異体は高尿酸血症との関連の他に、臨床で基質薬物のクリアランスが低下するなど、生体ホメオスタシスや薬物治療上の問題点となっている⁽³⁾。Q141K 変異体は野生型 (WT) と比べて mRNA 量が同程度にも関わらず、総タンパク質及び形質膜発現量が低下することが報告されている⁽⁴⁾。したがって、Q141K 変異体の発現低下は翻訳以降の制御に起因すると考えられた。実際、Q141K 変異体は野生型と比較してユビキチン化が亢進していることが既に報告されているが⁽⁴⁾、どの lysine 残基 (Lys) で修飾されているのか、また、どの Lys のユビキチン化が何に寄与しているのかは検討されていない。このように、Q141K 変異体が低発現型となる根本的な要因として、なぜ Q141K 変異体が不安定なのか、なぜ Ub 化が亢進しているのかは解明されてこなかった。

2. 研究の目的

Q141K のアミノ酸残基に注目すると、変異により獲得した lysine 残基 (Lys) はユビキチン (Ub) 化やアセチル化などの翻訳後修飾を受ける特徴がある。Ub 化はタンパク質分解、トラフィッキング、シグナル伝達等に寄与し、一方でアセチル化は Lys の Ub 化をブロックする作用がある。そこで、我々は Q141K 変異体の 141 番目の Lys (Lys141) 上での翻訳後修飾が発現に及ぼす影響を調べることで、Q141K 変異体の発現異常が生じるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

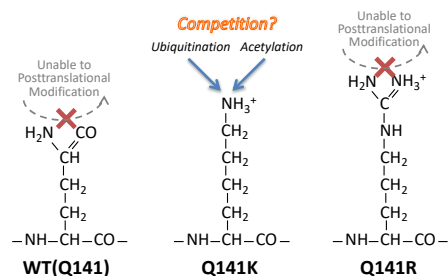


図1 予想される ABCG2 の 141 番目のアミノ酸における修飾

3. 研究の方法

- (1) ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に pEGFP-C1/ABCG2-WT, -Q141K, 及び-Q141R を導入した。また、WT 及び Q141K に S143A 及び S143D を導入した。
- (2) アミノ酸残基特異的なユビキチン修飾は ABCG2 発現細胞から GFP 抗体で免疫沈降後、LC-MS/MS を用いて質量分析により解析した。ABCG2 分子全体の Ub 化レベルは、HA タグ付き Ub を ABCG2 と共発現させた細胞から GFP 抗体で免疫沈降し、HA 抗体で検出した。
- (3) Flow cytometry による ABCG2 のタンパク質の発現量評価では、GFP の蛍光を総発現量とし、細胞表面を APC 標識 ABCG2 抗体で染色した蛍光を形質膜発現として測定した。細胞内局在は EGFP の蛍光を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) Q141K 変異体のタンパク質発現に及ぼす Lys141 でのユビキチン化の寄与

質量分析により Q141K 変異体での翻訳後修飾部位をアミノ酸残基特異的に探索したところ、Lys141 で Ub 化が検出された。そこで、Lys141 での Ub 化が及ぼす影響を明瞭にするため、Lys と同じく塩基性アミノ酸で翻訳後修飾を受けない arginine (Arg) に変異させた Q141R 変異体を作製した。各変異体の総 Ub 化レベルは WT と比較して Q141K 変異体で 1.44 倍、Q141R 変異体で 1.27 倍増加した。また、タンパク質発現量の比較では、Q141K 変異体は形質膜及び総発現量は WT と比較して 31% 及び 35% に減少した。一方、Q141R 変異体でも形質膜発現及び総発現量は 75% 及び 65% に減少していた。したがって、Q141K 変異体の発現低下は Lys141 の Ub 化だけに起因しないことが示唆された。

(2) Lys141 でのユビキチン化が安定性に及ぼす影響

ABCG2-WT の細胞内局在は従来の報告通り形質膜で観察され、Q141K 変異体は細胞全体で発現が低く、局在部位も不明瞭であった。Q141R 変異体は形質膜での発現に加え、細胞質で粒状に観察されたため、細胞内オルガネラに蓄積が増加している可能性が考えられた。過去の報告で Q141K 変異体は WT と比較して lysosome 分解が増大することが示されている。そこで、発現減少

における分解の寄与を比較したところ、翻訳阻害剤 cycloheximide 処置下で WT は 48 時後でもほとんど減少しなかったのに対し、Q141K 変異体は処置開始時と比較して 68%に減少し、Q141R 変異体では 89%であった。したがって、Q141K 変異体の Lys141 での翻訳後修飾は分解を促進することが示唆された。

(3) エンドソーム移行における Lys141 でのユビキチン化の役割

一般的に、Ub 化は形質膜からのエンドサイトーシスやエンドソーム間のトラフィックの起点となる。Ub 化阻害剤 PYR41 処置したところ、WT 及び Q141K 変異体は形質膜発現が増加し、どちらもエンドサイトーシスに Ub 化が寄与していることが示された。また、細胞内局在は PYR41 処置下で WT では変化が見られず形質膜に発現したのに対し、Q141K 変異体では細胞内に粒状に観察され、Q141R 変異体と類似した細胞内蓄積が見られた。そこで、Lys141 の Ub 化がエンドソーム間の移行に寄与する可能性が考えられたことから、初期及び後期エンドソームのマーカータンパク質 Rab5 及び Rab7 との共局在を検討した。Q141K 変異体は両マーカーとの共局在に差がなかったが、Q141R 変異体は Rab5 と比較して Rab7 との共局在が高かった。さらに PYR41 処置で Q141K 変異体は Rab7 との共局在が増加した。したがって、Lys141 での Ub 化は初期エンドソームから後期エンドソームへの移行に寄与することが示唆された。

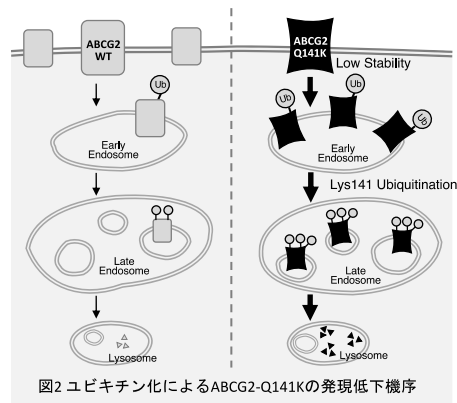


図2 ユビキチン化によるABCG2-Q141Kの発現低下機序

(4) Lys141 近傍のアミノ酸残基での翻訳後修飾が Q141K 変異体の発現に及ぼす影響

ユビキチン化は他の翻訳後修飾と相互に影響し合う事例が複数のタンパク質で報告されている。例えば、アセチル化とユビキチン化が同じ Lys 上で競合することで、修飾タンパク質の安定化と分解がそれぞれ制御されている。また、リン酸化が E3 ユビキチンリガーゼをリクルートしてユビキチン化を促す“phosphodegron”や E3 リガーゼ認識配列上でのリン酸化がリガーゼ結合を阻害する“phospho-inhibited degron”のように、リン酸化とユビキチン化が影響し合う事例が報告されている。先述の質量分析解析において、Lys141 のユビキチン化を示すフラグメントの中に Ser143 がリン酸化されたフラグメントも得られた。したがって、phosphodegron のように Ser143 のリン酸化が Lys141 のユビキチン化を制御する可能性が考えられた。そこで、Q141K 変異体に Ser143 のリン酸化モデル S143D 及び非リン酸化モデル S143A を変異導入したところ、Q141K/S143D 変異体でタンパク質発現が著しく低下し、Q141K/S143A 変異体では Q141K 変異体と比較して増加した。しかし、その増加は WT と同程度には回復せず、また細胞内局在も形質膜のみならず細胞質でも観察されたことから、Ser143 のリン酸化は局在ではなく、安定性に寄与することが示唆された。このように ABCG2 Q141K 変異体のユビキチン化も他の翻訳後修飾とのクロストークにより制御される可能性が考えられたことから、今後は、Q141K 変異体での翻訳後修飾の相互作用を明らかにすることで、薬物を用いて翻訳後修飾制御することによって発現回復させる方法を模索する。

<引用文献>

- (1) Maekawa, K., Itoda, M., Sai, K., Saito, Y., Kaniwa, N., Shirao, K., Hamaguchi, T., Kunitoh, H., Yamamoto, N., Tamura, T., Minami, H., Kubota, K., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Kamatani, N., Ozawa, S., and Sawada, J. (2006) Genetic variation and haplotype structure of the ABC transporter gene ABCG2 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* **21**, 109–121
- (2) Mizuarai, S., Aozasa, N., and Kotani, H. (2004) Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer* **109**, 238–246
- (3) Zamber, C. P., Lamba, J. K., Yasuda, K., Farnum, J., Thummel, K., Schuetz, J. D., and Schuetz, E. G. (2003) Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine. *Pharmacogenetics* **13**, 19–28
- (4) Basseville, A., Tamaki, A., Ierano, C., Trostel, S., Ward, Y., Robey, R. W., Hegde, R. S., and Bates, S. E. (2012) Histone deacetylase inhibitors influence chemotherapy transport by modulating expression and trafficking of a common polymorphic variant of the ABCG2 efflux transporter. *Cancer Res* **72**, 3642–3651

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mayumi Arai, Hisakazu Komori, Daichi Fujita, Ikumi Tamai	4. 巻 38
2. 論文標題 Uptake Pathway of Apple-derived Nanoparticle by Intestinal Cells to Deliver its Cargo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 523-530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11095-021-03018-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小森久和、村山枝美果、八杉優護、玉井郁巳
2. 発表標題 ABCG2 Q141K変異体の発現局在に及ぼす翻訳後修飾の影響
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学 薬物動態学研究室webページ http://dmpkatku.jp/index.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------