

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590508

研究課題名（和文）薬物輸送通路の解明-トランスポーターとギャップ結合の関連-

研究課題名（英文）Elucidation of drug transporting route - association between transporters and gap junction -

研究代表者

三浦 大作 (MIURA DAISAKU)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：60510873

研究成果の概要（和文）：生体膜における物質輸送は生体恒常性維持の基本的なメカニズムだと考えられている。本研究では、物質の組織内移動機構を薬物トランスポーターとギャップ結合に焦点を当てて明らかにすることを目的とした。RT-PCR 解析では、HEK293 細胞株においてコネキシン（Cx）26、43、45 および 59 が発現していることがわかった。ここで我々は SLC22A6（OAT1）、A8（OAT3）、A11（OAT4）および A12（URAT1）を安定に発現している HEK293 細胞株を作製し、免疫共沈降法によるタンパク質相互作用を解析したが、相互作用している結果は得られなかった。野生型 HEK293 細胞に OAT1 または URAT1 を発現させた HEK293 細胞を重層するアッセイ系を用いた解析では、上層に HEK-OAT1 を用いた場合には ^{14}C で標識した *p*-アミノ馬尿酸の蓄積量に変化はなかったが、上層に HEK-URAT1 を用いた場合には ^{14}C で標識した尿酸の蓄積量が増加した。本研究において、ギャップ結合タンパクである Cx と URAT1 との間にタンパク質相互作用は認められなかったが、細胞外の尿酸は URAT1 を通って吸収され、ギャップ結合を通して隣接した細胞間で共有されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Transport systems across the biological membrane are considered as basal mechanism for homeostasis. In this study, our aim is to elucidate transport mechanism of materials in the tissue focusing drug transporters and gap junctions. RT-PCR analysis revealed mRNA of connexin (Cx) 26, 43, 45 and 59 were expressed in the HEK293 cell line. We established stable HEK293 cell line expressing SLC22A6 (OAT1), A8 (OAT3), A11 (OAT4) and A12 (URAT1). Immuno-co-precipitation analysis showed no protein-protein interaction between Cxs and SLC22 family transporters examined in this study. In bilayer transport assay, accumulation of ^{14}C -labelled uric acid (UA) was increased by HEK-URAT1 cell line (upper layer), but accumulation of ^{14}C -labelled *p*-aminohippurate (PAH) was not increased by HEK-OAT1 cell line (upper layer). This study suggests that there seemed no protein-protein interaction between Cxs and URAT1, but extracellular UA was absorbed by URAT1 and shared among adjacent cells through gap junction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：薬物代謝酵素・トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

生体膜における物質輸送は生体恒常性維持の基本的なメカニズムであると考えられている。無機イオンや水溶性有機物質は原則的に脂質二重膜を通ることができず、それらの膜透過には特別な「通路」を必要とする。細胞内外での物質の「通路」はイオンチャネル、トランスポーターおよびポンプ等が、そして隣接する細胞間での物質の「通路」はギャップ結合が担っている (図1)。

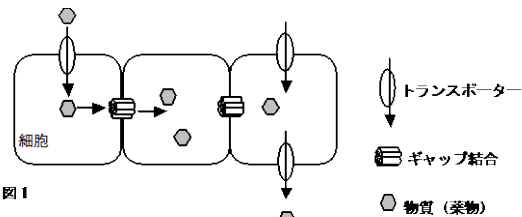


図1

トランスポーターとギャップ結合による物質輸送の模式図

による物質輸送の模式図

トランスポーター、ギャップ結合タンパクであるコネキシン等、個々の輸送分子をターゲットとした研究は国内外で盛んに行われてきた。近年では、輸送分子個々の機能の解明から、タンパク質相互作用の解析を通して細胞骨格との関連が精力的に研究されている。

(1) トランスポーターと細胞骨格の関係

我々はペプチドトランスポーターPEPT2や尿酸トランスポーターURAT1がPDZドメイン含有タンパク (PDZ タンパク) であるPDZK1 と相互作用し、トランスポーターの輸送活性を増強するという事を発見した (Noshiro R. *et al.*, *Kidney Int.*, 2006、Anzai N. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2004)。この他にも、有機アニオントランスポーターOAT4 (Kato Y. *et al.*, *Pharm. Res.* 2004)、有機カチオントランスポーターOCTN2 (Kato Y. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 2005) およびマウス有機アニオン輸送ペプチドOatpl1 (Wang p. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2005) 等がPDZK1 と相互作用し、輸送活性を制御する事が確認されている。細胞骨格構成タンパクでもある PDZ タンパクはトランスポーター分子とアクチンや微小管を結びつけ、トランスポーターの輸送活性の制御に関わっているだけでなく、細胞膜における発現を規定している (Kato Y. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006)。

(2) ギャップ結合と細胞骨格の関係

ギャップ結合の分野では、ギャップ結合タンパクのコネキシン (Cx) 43 と PDZ タンパクである (かつ密着結合関連タンパクでもある) ZO-1 が相互作用し (Bruce A. *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 2008)、心筋梗塞時のギャ

ップ結合の再構築に関与している事が発見された。また、眼のレンズに多い Cx36 や Cx57 も ZO-1 との相互作用が示唆されている (Ciolfan C. *et al.*, *Neuroscience*, 2007)。

肝臓で多く発現している Cx32 は、PDZ タンパクでかつがん抑制遺伝子である Discs Large Homolog 1 (Dlgh1) と相互作用し、また、相互作用を離れた Dlgh1 は核へと移行する事も発見されている (Heather SD. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2007)。

また我々は、マウスを用いた自然転移モデルで Cx26 がメラノーマの肺転移を増強する事を見いだした (Miura D. *et al.*, *FEBS Lett.*, 2007)。Cx は隣接する細胞間でギャップ結合を形成し、分子量が約 1500 以下の水溶性物質を通す装置として知られているが、この知見によりメラノーマが肺に転移することに関与するという Cx の新しい機能が示唆され、また Cx26 と相互作用し、機能を制御する未知のタンパク質の存在が考えられた。

(3) 物質輸送システムの異常と病態

細胞は培養系に移し株化すると、本来持つべき機能を失うことが往々にして起こる (Olsavsky KM. *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2007)。例えば、肝細胞は通常 Cx26 と Cx32 を発現しているが、肝細胞由来の HepG2 は Cx の発現がほとんど見られない。普通のラットでは四塩化炭素投与により、広範な肝細胞壊死が認められるが、肝臓で Cx32 の発現を低下させたトランスジェニックラットでは、単細胞壊死が認められる程度であったと言う報告 (Asamoto M. *et al.*, *Hepatology*, 2004) もあり、組織内における物質輸送システムの変化が毒性発現に大きな影響を及ぼす例が現実存在する。

最近ではギャップ結合タンパクが接着分子として脳新皮質における神経細胞の放射状移動に必須の物質である事が示され (Elias LA. *et al.*, *Nature*, 2007)、細胞骨格と連結された膜タンパクが調和された行動をとり、細胞の移動という複雑なメカニズムを制御している事が示されている。

また、ヒト腎臓尿管由来細胞株である HK-2 細胞を長期間 (~5 週間) 培養すると、培養初期 (~2 週間) はなかった SLC2A9 の mRNA 発現が認められるようになった (Miura D. *et al.*, 未発表データ)。長期間の培養では、HK-2 細胞の形態も培養初期から大きく変化しており、細胞骨格系との相互作用が考えられる。この SLC2A9 は最近、研究分担者の安西らにより、電位依存性尿酸トランスポーターとして痛風に関わる高尿酸血症の原因遺伝子としての役割が同定された (Anzai N. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2008)。

上述のトランスポーターやギャップ結合に関する研究をもとに、我々は物質輸送に関するそれぞれの膜タンパクが細胞骨格を通して相互作用する事、さらには、ある膜タンパクが他の膜タンパクをリクルートすることで、組織中の細胞集団は生命活動に必要な物質を取り込み、共有し、恒常性を維持しているのではないかという仮説を立てた。また、これを反対方向から見ると、各タンパクを通して細胞に取り込まれた有害な物質は、細胞集団で共有して代謝（無毒化）された後排出され、恒常性を維持しているとも考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、組織中の物質輸送の通路である「薬物トランスポーター」と「ギャップ結合による細胞間連絡」との関連を明らかにすることにより、物質の組織内移動機構、生体恒常性維持機構および病態の解明につなげ、創薬科学、毒性予測および薬害の防止に資することを目的とした。

具体的には直接、細胞骨格、あるいは細胞外マトリクスを介して相互作用するであろうトランスポーターとCxの組み合わせをプロテオミクスの手法で見いだす事を目標とし、更に可能ならば、相互作用の異常や、物質輸送の「通路」異常による病態との関連、薬物動態および毒性発現機序の関連知見を得ることも目標とした。

本研究の独創的な点は、それぞれ個別にタンパク質相互作用が研究されているトランスポーターとギャップ結合に対して、物質の取り込み・共有・排出という正常な細胞/組織で営まれている現象を統合されたものとしてとらえ、究明しようという試みである。

したがって、本研究が進展する事により、内因性および外因性物質の生体内輸送機構、恒常性維持機構の一つが明らかになり、また生体機能や病態との関わりが明らかになる事から、新規創薬ターゲットの同定、毒性発現機序の解明および薬害の防止につながる事が期待される。

3. 研究の方法

薬物トランスポーターは腎臓尿細管に多く発現していることがわかっているため、本研究では腎臓組織における物質（生体内物質および薬物）の経生体膜輸送機構の解明を目標とした。

(1) 細胞株の選択およびCxの発現確認

まず、がん由来ではない腎臓由来細胞株（HK-2細胞およびHEK293細胞）を入手し、Cx特異的プライマーを設計してRT-PCRを行った。Cx特異的プライマーは、ヒトで発現が

確認されている全20種類について作製した。

(2) 相互作用が予想されるトランスポーターとCxの組み合わせの探索

前述のHK-2細胞およびHEK293細胞について、種々のSLCファミリーの薬物トランスポーター（特に尿酸を含む有機アニオン輸送に関係するもの）のmRNA発現をRT-PCR法により調べた。同時に発現しているCxとSLCトランスポーターの組み合わせについて、タンパク質相互作用があるかどうかを免疫共沈降法により解析した。さらに、SLCトランスポーターを安定に発現させた細胞株を作製して同様の実験を行った。

(3) 薬物トランスポーターとCxが相互作用した場合の薬物輸送活性

細胞に発現しているトランスポーターに応じてトランスポーターの輸送基質を選択し、当該トランスポーターは発現していないがCxを発現している細胞と、トランスポーターとCxの両方を発現している細胞を重層して共培養した。ここにRI標識のトランスポーター輸送基質を取り込ませ、共培養細胞の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した（図2）。

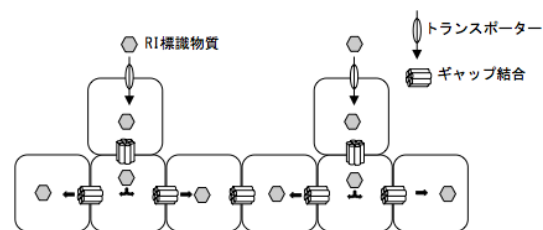


図2 トランスポーターとギャップ結合の両方を通過する物質のアッセイ方法

このアッセイ法はオリジナルなものであり、未だに殆ど判明していないギャップ結合通過物質の同定にも応用可能な画期的な発案である。トランスポーターとギャップ結合の両方を通過する化合物/分子が判明すれば、生体膜における物質輸送による生体恒常性維持機構の一端が明らかになることが予想された。

4. 研究成果

(1) HK-2細胞およびHEK293細胞におけるCxのmRNA発現

ヒト腎臓組織では、発現しているギャップ結合タンパクであるCxは、Cx30、Cx37、Cx40、Cx43およびCx45とされている。本研究で用いたHK-2細胞で発現しているCxのmRNAは、Cx26、Cx43およびCx45であった。

HK-2細胞は増殖が遅く、安定発現細胞株の作製に時間がかかりすぎたことから、HEK293細胞を用いることにした。

HEK293細胞ではCx26、Cx43、Cx45および

Cx59 の mRNA 発現が認められた (図 3)。

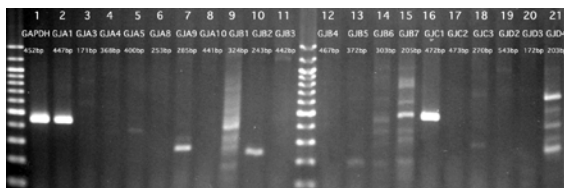


図 3 HEK293 細胞の Cx mRNA 発現

(2) Cx と薬物トランスポーター (SLC22 ファミリー) との相互作用

RT-PCR による解析の結果、HK-2 細胞では、SLC2A9 (URATv1)、SLC7A5 (LAT1)、SLC17A1 (NPT1)、SLC43A1 (LAT3)、SLC43A2 (LAT4) および SLC26A6 (CFEX) の mRNA 発現が認められた。HEK293 細胞では、SLC2A9 (URATv1)、SLC7A5 (LAT1)、SLC7A8 (LAT2)、SLC16A9 (MCT9)、SLC43A1 (LAT3) および SLC43A2 (LAT4) の mRNA 発現が認められた。HK-2 細胞および HEK293 細胞は共に薬物トランスポーターファミリーとして知られている SLC22 ファミリーのトランスポーターを発現していなかった。

本研究では薬物の輸送通路の解明を目指しているため、HEK293 細胞を用いて、代表的薬物トランスポーターである SLC22A6 (OAT1)、SLC22A8 (OAT3)、SLC22A11 (OAT4) および SLC22A12 (URAT1) について、それぞれ安定発現細胞株を作製し、免疫共沈降法によりタンパク質相互作用の解析を行ったが、相互作用が示唆される結果は得られなかった。

(3) 薬物トランスポーターと Cx が相互作用した場合の薬物輸送活性

野生型 HEK293 細胞に HEK-OAT1 細胞を重層して共培養したものに 5 μ M の 14 C 標識 p-アミノ馬尿酸 (PAH) を取り込ませた結果を図 4 に示した。

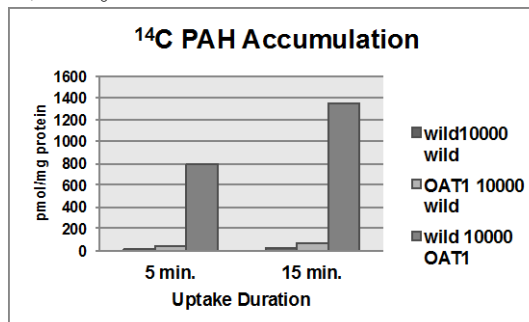


図 4 HEK-OAT1 を重層した野生型 HEK293 細胞の PAH 取り込み

下層に HEK-OAT1 をコンフレントになるまで培養したものに野生型 HEK293 細胞を 1×10^4 個重層し共培養したものに対して、野生型 HEK293 細胞を下層に、HEK-OAT1 細胞を 1×10^4 個重層し共培養したものは PAH の取り込み量はわずかであった。

野生型 HEK293 細胞に HEK-URAT1 細胞を重層して共培養したものに 10 μ M の 14 C 標識尿酸を取り込ませた結果を図 5 に示した。

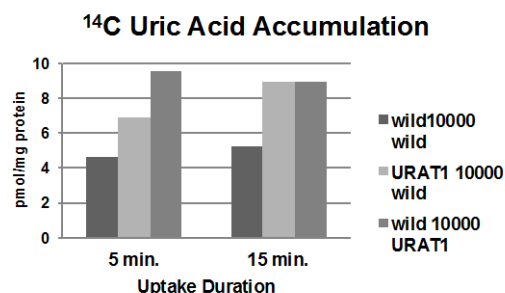


図 5 HEK-URAT1 を重層した野生型 HEK293 細胞の尿酸取り込み

下層に HEK-URAT1 をコンフレントになるまで培養したものに野生型 HEK293 細胞を 1×10^4 個重層し共培養したものに対して、野生型 HEK293 細胞を下層に、HEK-URAT1 細胞を 1×10^4 個重層し共培養したものは、15 分後にはほぼ同程度尿酸の取り込み量が認められた。

本研究において、ギャップ結合タンパクである Cx と今回調査した SLC22 ファミリートランスポーターとの間にタンパク質相互作用は認められなかった。しかし、ギャップ結合を発現している野生型 HEK293 細胞と HEK-URAT1 細胞を重層したアッセイ系において、細胞外の尿酸は URAT1 を通って吸収され、ギャップ結合を通して隣接した細胞間で共有されていることが示唆された。このことから、URAT1 とギャップ結合は少なくとも機能的には関連し、尿酸輸送活性があまりよくない URAT1 の機能を補償することが考えられた。

また、本研究において考案した細胞重層アッセイ系は未だに殆ど判明していないギャップ結合通過物質の同定にも応用可能なものであった。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 大作 (MIURA DAISAKU)
兵庫医療大学・薬学部・助教
研究者番号：60510873

(2) 研究分担者

安西 尚彦 (ANZAI NAOHIKO)
杏林大学・医学部・准教授 (H22)
獨協医科大学・医学部・教授 (H23～)
研究者番号：70276054
(H23～H24：連携研究者)

(3)連携研究者

清宮 健一 (KIYOMIYA KENICHI)
兵庫医療大学・薬学部・教授
研究者番号：50234399