S2-06

有機アニオン系化合物の胆汁排泄におけるABCトランスポーターの関与

○鈴木 洋史¹⁾、伊藤 晃成¹⁾、広橋 智子¹⁾、新沼 佳世子¹⁾、糸 和彦²⁾、清水 孝雄²⁾、杉山 雄一¹⁾¹⁾東京大学薬学部、²⁾東京大学医学部Role of ABC transporters for the biliary excretion
of organic anionsHiroshi SUZUKI¹⁾, Kousei ITO¹⁾, Tomoko HIROHASHI¹⁾,
Kayoko NIINUMA¹⁾, Kazuhiko KUME²⁾, Takao SHIMIZU²⁾
and Yuichi SUGIYAMA¹⁾¹⁾Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University
of Tokyo, Tokyo 113, ²⁾Faculty of Medicine,
The University of Tokyo, Tokyo 113

【目的】グルタチオンおよびグルクロン酸抱合化合物を含む多くの有機アニオン系化合物は、胆管側膜上に存在するcanalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) の基質として認識され、ATP-依存的に胆汁中へと排泄される¹⁾。近年、この過程は、酸化代謝 (Phase I代謝)、抱合代謝 (Phase II代謝) と並び、Phase III解毒と称され、その重要性が注目を集めるに至っている。単離胆管側膜ベシクルを用いた輸送研究が進歩を遂げ、またcMOAT機能を遺伝的に欠損している変異ラット (Eisai hyperbilirubinemic rat; EHBR) が確立されたことから、本研究分野の飛躍的な進展が見られたものの¹⁾、cMOATの実体を明らかにする試みは着手されたばかりである。

本研究は、cMOATのcDNAクローニングを行い、有機アニオン系化合物の胆汁排泄機構の実体を分子レベルで明らかにするとともに、EHBRにおけるcMOATの欠損機構についても検討を加えることを目的とした^{2,3)}。また、最近の当研究室の研究により、EHBRの胆管側膜上にも、有機アニオンに対する一次性能動輸送担体が存在することが示されたことから、cMOAT関連遺伝子の解析を行うことも目的とした。

【方法】1) cMOATおよびその関連遺伝子のcDNAクローニング: human multidrug resistance associated protein (hMRP) は、cMOATと類似した基質特異性を有し、更に一連の一次性能動輸送担体が、保存

されたATP-binding cassette (ABC) 領域を有することに着目し、hMRPのカルボキシ末端のABC部位に対するdegenerated PCR primerを作成し、SD系ラットおよびEHBR肝cDNAから、PCRによる増幅を試みた²⁾。増幅されたフラグメントを基に、cDNA libraryのスクリーニングを行った³⁾。

2) EHBRにおける欠損機構: SD系ラット肝からクローニングされたcMOATのcDNA配列に基づき、約500 bp間隔でPCR primerを作成した³⁾。EHBR肝より抽出したpoly A⁺ RNAに対して、RT-PCRを行い、open reading frame (ORF) 領域を全てカバーする様に、cDNA フラグメントを増幅した³⁾。

【結果と考察】1) cMOATのcDNA クローニング: hMRPのABC領域に対するdegenerated primerを用いることにより増幅された421 bpの配列は、hMRPと核酸レベルで66%、アミノ酸レベルで73%のhomologyを有していた²⁾。このフラグメントを用い、Northern blotを行ったところ、SD系ラットにおいては、約5, 6, 8 kb付近にbandが検出されたが、EHBRにおいては、いずれの発現も顕著に低下しており、この配列が、cMOAT遺伝子の一部をコードする可能性が示唆された²⁾。

更に、このフラグメントを用いて、SD系ラット肝cDNA libraryをスクリーニングすることにより、1541アミノ酸をコードし、一次性能動輸送担体の特徴となる、2つのABC領域を有するcDNA全長を単離することができた³⁾。全長で比較した

場合、cMOATはhMRPと、cDNAレベルで53%、アミノ酸レベルで46%のhomologyを有していた³⁾。

スクリーニングにより得られたcDNA分子種の解析を進めることにより、ORFの配列は同じであるが、3'-untranslated region (UTR) の長さの異なる3種のcDNA分子種が存在することが明らかとなった。従って、上述の複数のbandは、3'-UTRの長さの差による可能性が示唆された³⁾。

さらに、cMOAT全長をプローブとしてNorthern blotを行ったところ、EHBRにおいてはcMOAT全長の発現が低下することが明らかとなった³⁾。また、SD系ラットの各臓器のpoly A⁺ RNAに対してNorthern blotを行ったところ、肝臓の他、発現は弱いものの、腎臓、空腸、十二指腸においても同様な位置にbandが検出された³⁾。

2) EHBRにおけるcMOAT発現欠損機構の解析:

Northern blotにより、EHBR肝においても極めて弱いながら、cMOAT cDNAとhybridizeする分子種が検出されたため、RT-PCRによる解析を試みた。その結果、EHBRにおいては、cMOATのORF中に、1塩基置換によりstop codonが挿入されることが明らかとなった³⁾。ORF中にstop codonが挿入されることにより、mRNAが不安定になることが報告されているため、この置換の結果として、cMOATの発現が低下する可能性が示唆された。更に、

EHBRの腎臓、空腸、十二指腸において、同一の変異が生じていることから、各臓器で観察されたNorthern blot上のbandが、全て同じ遺伝子由来であることが明らかとされた³⁾。

3) cMOAT様蛋白の解析: EHBR肝poly A⁺ RNAに対し、上述のdegenerated PCR primerを用いてRT-PCRを行い、2種類のMRP-like protein (MLP-1, 2) のABC領域を増幅することができた。これらのフラグメントは、hMRPとcDNAレベルで、それぞれ68%, 70%のhomologyを有し、Northern blotの結果、MLP-1はSD系ラットおよびEHBR肝poly A⁺ RNAとほぼ同等の強度で、約6 kbの分子種とhybridizeした。MLP-1は、肝臓の他、弱いながらも腎臓、十二指腸にも、その発現が検出された。

一方、MLP-2の発現は、SD系ラットに比べ、EHBR肝でむしろinduceされており、Northern blotの結果、約5 kbのbandが観察された。MLP-2の発現は、空腸、十二指腸などで強く、これらの組織で有機アニオンの排泄に関与する可能性が考えられた。cDNA cloningを試みた結果、MLP-1, 2共に、一次性能動輸送担体に保存された2つのABC領域を有することが明らかとなった。これらの蛋白が、上述したEHBRにも存在する輸送担体に対応する可能性が考えられ、現在、機能解析を進めている。

[ABSTRACT] Several organic anions, including the glutathione- and glucuronide-conjugates, are excreted into the bile via a canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT), which is hereditarily defective in mutant rats such as Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR). In the present study, we cloned cMOAT from the SD rat liver cDNA library using the ATP-binding cassette region as a probe which was amplified by PCR with the degenerated primers for human multidrug resistance associated protein (hMRP). cMOAT was encoded by 4623 bp cDNA with a homology of 53.0 % and 46.3 % with hMRP at the cDNA and deduced amino acid level, respectively. By screening the library, three kinds of cDNA species for cMOAT with the same open reading frame and different 3'-untranslated region lengths were isolated. The Northern blot analysis of poly A⁺ RNA from the liver with the entire open reading frame of cMOAT as a probe revealed that the expression of plural bands (approximately 5, 6 and 8 kb) was defective in EHBR and this may be due to the presence of these cDNA species. RT-PCR and subsequent sequence analysis were performed using RNA specimens from EHBR liver. The analysis revealed that one base pair replacement within the open reading frame resulted in the introduction of the premature stop codon. The impaired expression of this particular protein is related to the pathogenesis of hyperbilirubinemia in the mutant rats. Although the expression of cMOAT is defective in EHBR, our recent kinetic studies suggested the presence of ATP-dependent organic anion transporters other than cMOAT in EHBR. Using the degenerated PCR primers described previously, we could amplify two kinds of PCR product (MRP like protein (MLP-1 and MLP-2)) from EHBR liver. The nucleotide homology of ABC region between MLP-1, 2, MRP and cMOAT was approximately 60-70%. Northern blot analysis indicated that MLP-1 hybridized with a single 6 kb transcript in the liver of SD rats and EHBR. In contrast, MLP-2 hybridized to a single 5 kb transcript in the liver and the expression was rather induced in EHBR. These results may suggest the possibility that MLP-1 and MLP-2 are novel transporters for organic anions.

[REFERENCES] 1) Yamazaki et al. Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharm. Res.* 13, 497-513 (1996). 2) Ito et al. Expression of a putative ATP-binding cassette region, homologous to that in multidrug resistance-associated protein (MRP), is hereditarily defective in Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR). *Int. Hepatol. Commun.* 4, 291-298 (1996). 3) Ito et al. Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) whose expression is defective in mutant rats with hereditary conjugated hyperbilirubinemia (EHBR). *Am. J. Physiol.* accepted for publication.