トランスポーターの細胞内局在化機構

崔 吉 道

Yoshimichi SAI

薬物動態に関与するトランスポーター群が、cDNA クローンや遺伝子欠損動物を利用することにより、その実体を分子レベルで解析することが可能になってきた。各臓器への薬物送達の間門となる上皮あるいは内皮細胞において、薬物動態制御因子としてトランスポーターを考える場合、その機能特性のみならず、分極した細胞内でのトランスポーター分子の局在性は重要な要素となる。最近、局在性決定因子としてPDZ ドメインが見出され、この1年あまりの間に急速にその重要性がクローズアップされている¹⁻³⁾。

上皮細胞では、tight junction を境に頂端側(apical)膜と側基底(basolateral)膜との間で細胞表面の環境が大きく異なり、両膜における脂質およびタンパク質の組成も異なることが知られている。上皮細胞の側基底膜にはしばしば、非上皮細胞で恒常性維持に働く重要な膜タンパク質が見られる。例として Na^+ , K^+ -ATPase が挙げられるが、 Na^+ , K^+ -ATPase の α -サブユニットはほとんどのトランスポーターと同じく複数の膜貫通領域を持つ。シグナル伝達に関わるレセプターも主に側基底膜に見られるが、それらの多くは一回膜貫通構造を持つサブユニットで構成される。一方、頂端側膜に局在するタンパク質の代表としては、一回膜貫通構造を持つ ectoenzyme の aminopeptidase N (APN) と depeptidylpeptidase IV (DPPIV) が挙げられる。GPI アンカー型タンパク質の 5'-nucleotidase (5NT) も主に頂端側膜に見られる。

膜動輸送等により動的状態にある細胞の極性を維持するためには、タンパク質の部位選択的なターゲティング機構あるいは保持機構が働いているはずである。培養条件下で良好な分極性を示す腎臓由来株化細胞の MDCK 細胞は、細胞膜タンパク質のソーティング研究に最もよく用いられている。MDCK 細胞は大部分の頂端側および側基底膜のタンパク質を直接それぞれが機能すべき部位にソーティングすることが知られている。肝臓においては、能動的な胆汁排出を担う ABC トランスポーター群が頂端側膜(bile canalicular 膜)に局在する。そのようなトランスポーターには spgp(タウロコール酸), cMOAT/mrp2(有機アニオン), mdr1(有機カチオン), mdr2(ホスファチジルコリン)が含まれる。小胞体で生

合成された頂端側膜タンパク質はゴルジ体で修飾を受ける。ゴルジ体から頂端側膜へ到達するための経路には少なくとも、1) ゴルジからの直接送達、2) いったん側基底膜へ送達された後、側基底膜から頂端側膜へのトランスサイトosis経路を介しての送達、3) 頂端側膜近傍の細胞内プールに貯蔵された後、頂端側膜との間でリサイクリングを行う機構が存在し、いずれの経路も微小管重合に依存する小胞を介した輸送である。Johns Hopkins 大学の Hubbard ら⁴⁾は、 $[^{35}\text{S}]$ Met で代謝標識したラット肝臓の細胞分画後、目的とするタンパク質を免疫沈降することにより、APN, DPPIV, 5NT に加え pIgA receptor や ecto-ATPase である cCAM105 がトランスサイトosisによって頂端側膜に送達されることを示した。それにより従来肝臓では全ての膜タンパク質がトランスサイトosisの経路を経ると考えられていた。しかし、Tufts 大学の Arias らの研究グループは最近、GFP 蛍光キメラ化した *mdr1* を用いて ABC トランスポーターがトランスサイトosisを介さず、小胞状およびチューブ状の構造体を経て頂端側膜へ直接ソーティングされることを示し、またその過程に phosphoinositide 3-kinase が関与することを明らかにした⁵⁾。

細胞膜タンパク質ソーティング機構の制御因子としては、phosphoinositide 3-kinase の他、これまで ATP, Ca^{2+} や rab, dynamin 等 GTPase の関与が示されている。タンパク質の配列中にも局在シグナルが存在し、細胞質ドメインや、脂質や糖鎖による修飾が認識されると考えられているが、全ての分子に適合する機構として受け入れられるには至っていない。そんななか最近、PDZ ドメインが細胞の極性発現に中心的な役割を持つものとして急速に注目を集めている。

PDZ ドメインは PDS95, Dlg, ZO-1 という3つのタンパク質に保存された 80-90 アミノ酸残基の配列で、それらの頭文字から PDZ と名付けられた。PDZ ドメインは下等動物から高等動物まで、種を越えて少なくとも 75 以上のタンパク質について見出され、1 分子のタンパク質に通常複数コピー存在する。PDZ ドメインを持つ PDZ タンパク質自身の細胞内局在性はシナプスや細胞間の接着部位、頂端側細胞膜、側基底膜に限局し、タンパク質を細胞膜に複合体として会合させる役割を担うと考えられている。すなわち PDZ タンパク質は、細胞膜に局在すべき他のタンパク質中のシグナル配列 (PDZ-interacting domain) を認識・結合し、分子内に複数持つ PDZ ドメインを介してそれらのタンパク質つなぎ合わせ、細胞膜付近に空間的に適切なコンフォーメー

ションを維持する機能を持つ。

最近、いくつかのトランスポーターにも PDZ ドメインによって認識される配列を持つものが報告された。頂端側膜に局在する Cl^- チャネル CFTR は、C 末端の 3 アミノ酸残基 (TRL) に PDZ タンパク質 EBP50 (ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50) が結合する。この部分の欠損変異体は局在性を失い側基底膜や細胞内オルガネラにも分布し、この配列が頂端側膜ターゲティングシグナルであることが示された⁴⁾。γ-アミノ酪酸トランスポーター BGT-1 は、C 末端 5 アミノ酸領域に PDZ タンパク質 LIN-7 に結合する。同じく欠損変異体を作製したところ、側基底膜へのソーティングは正常に起こったが、その後エンドサイトosisにより核周辺領域に内在化されてしまった。このことから C 末の PDZ ドメイン結合配列が側基底膜への保持シグナルであることが証明された⁵⁾。

1999 年のノーベル生理学医学賞にはシグナル仮説を実証した Rockefeller 大学の Güter Blobel 博士が選ばれたのは記憶に新しいところである。今後、細胞膜タンパク質、特にトランスポーターの局在化機構が詳細に解明されれば、薬物動態制御因子としてのみならず新たな創薬への扉を開くキーとして、トランスポーターの重要性はますます高まることであろう。

文 献

- 1) Fanning A. S. and Anderson J. M.: PDZ domains: Fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J. Clin. Invest.* **103**: 767-772 (1999).
- 2) Moyer B. D., Denton J., Karlson K. H., Reynolds D., Wang S., Mickle J. E., Milewski M., Cutting G. R., Guggino W. B., Li M. and Stanton B. A.: A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J. Clin. Invest.* **104**: 1353-1361 (1999).
- 3) Perego C., Vanoni C., Villa A., Longhi R., Kaech S. M., Frohli E., Hajnal A., Kim S. K. and Pietrini G.: PDZ-mediated interactions retain the epithelial GABA transporter on the basolateral surface of polarized epithelial cells. *EMBO J.* **18**: 2384-2393 (1999).
- 4) Ihrke G., Martin G. V., Shanks M. R., Schrader M., Schroer T. A. and Hubbard A. L.: Apical plasma membrane proteins and endolyn-78 travel through a subapical compartment in polarized WIF-B hepatocytes. *J. Cell Biol.* **141**: 115-133 (1998).
- 5) Sai Y., Nies A. T. and Arias I. M.: Bile acid secretion and direct targeting of *mdr1*-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cells. *J. Cell Sci.* **112**: 4535-4545 (1999).