[Nippon Nôgeikagaku Kaishi Vol. 74, No. 7, pp. 791~794, 2000]

環境有害物質に対する生体防御の分子メカニズム[†]

植田和光, 天知輝夫

(京都大学大学院農学研究科)

Key words: multidrug resistance; P-glycoprotein; ABC protein; host dependence; drug-drug interaction

1. はじめに

生物は、さまざまな有害物やウイルスなどの侵略者にさらされながら生活している。生物は、それら有害物や侵略者から身を守るため、さまざまな生体防御システムを発達させてきた。解毒機構や免疫機構は、体の中に入ってしまった有害物や侵略者から身を守るために生物が獲得したすばらしい生体防御システムであり、これまでに多くの研究がなされてきた。しかし、有害物質に対する最も有効な防御機構は、おそらく体や組織に有害物が入らないようにすることであろう。ただし、環境中には多種多様な構造の脂溶性の有害物が存在し、しかもそれらは脂質 2 重膜を自由に通過できる性質をもっている。それゆえ、それらすべての脂溶性の有害物質が細胞膜あるいは細胞を通過しないようにするのは大変な仕事である。この困難な仕事に ABC トランスポーターファミリーと呼ばれる一群のタンパク質 (ABC タンパク質) が関与していることが最近わかってきた。これまでに微生物からヒトまで、500 以上の ABC タンパク質関連遺伝子が見つかり、それらの働きによってそれぞれの生物が脂溶性の有害物から身を守ってきたらしい。さらに真核生物には、チャネルやレセプターに分化した ABC タンパク質も存在し、生体内のさまざまな有害物に対する生体防御機構として機能している。本稿では、哺乳動物の ABC タンパク質として最初に同定された MDR1 を中心に、われわれの体をさまざまな有害物から保護するために ABC タンパク質がどのように機能してい

るのかを概説する。

2. MDR1 は、小腸や脳毛細血管においてバリアーとして働いている

私たちの摂取した食べ物は消化されつつ小腸まで運ばれ、吸収される。消化されたもののうち、糖やアミノ酸などの水溶性の栄養素はそれぞれ特異的な輸送体によって吸収され、血中へと運ばれる。いくら有害な物質であっても、水溶性である限り体内に取り込まれることは少ない。それに対して、脂溶性の低分子量化合物の場合、物性として単純拡散で細胞膜を通過するため、それらが体内に吸収されるのを防ぐことは一見不可能に近い。しかし、実際には、脂溶性は高いのに小腸からは吸収されない化合物が存在する。また、脂溶性が高く低分子量にもかかわらず血液から脳内には吸収されない化合物も存在する。そのため、脳毛細血管や小腸には何かバリアーが存在するのではないかと考えられ、特に脳においてそのバリアーは、血液脳関門と呼ばれてきた。本稿で紹介する MDR1 遺伝子はこのような小腸や脳毛細血管における脂溶性有害物に対するバリアーとして働いている。

3. MDR1 は多剤耐性がん細胞から単離された

近年の抗がん剤の発展によってある種のがん、特に血球系のがんは治癒可能になった。しかし、再発時のがん細胞が治療に用いた抗がん剤だけでなく他の多くの抗がん剤に対しても非感受性になってしまうことがしばしばある。この現象をがん細胞の獲得多剤耐性という。がん細胞の多剤耐性は抗がん剤治療の最も大きな障害の一つであり、それを克服できれば抗がん剤の有効性は大幅に上昇することが期待できる。われわれはこのがん細胞の多剤耐性のメカニズムの解明を目指して研究中、いろいろな多剤耐性がん細胞で常に発現が上昇している遺伝子 MDR1 を単離した^(1,2)。そしてこの単離した MDR1 遺伝子を発現ベクターにつなぎ培養細胞に導入すると、構造や作用点の異なるさまざ

[†] Molecular Mechanism of Defence to Toxic Substance
Kazumitsu UEDA and Teruo AMACHI (Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

まな抗がん剤に対する耐性を獲得することが明らかになった⁽³⁾。臨床においても少なくとも血球系のがんにおいては、再発時に *MDR1* 遺伝子の発現が上昇していることが多い。現在 *MDR1* の阻害剤を併用することによって、がん細胞の多剤耐性を克服しようという試みが臨床において進められている。

4. P 糖タンパク質はさまざまな構造の化合物を輸送する

さて、われわれの単離した *MDR1* 遺伝子がコードするタンパク質 (P 糖タンパク質と呼ばれる) は 1280 のアミノ酸からなり、6つの膜貫通 α -ヘリックスをもつ膜貫通領域とそれに続く ATP 結合領域 (NBF) が分子内で2回繰り返した2次構造 (図1) をしている。第1細胞外ループに3カ所の糖鎖付加部位があり

図1 *MDR1* 遺伝子がコードする P 糖タンパク質の予想される2次構造

170 kDa の糖タンパク質として細胞膜におもに存在する。

一般に酵素は、特定の基質の構造を認識し結合する。基質特異性の低い酵素であってもその基質間にはある程度構造的な共通点が存在する。しかし、P 糖タンパク質は特異である。P 糖タンパク質は分子量が 300 から 2000 までの両親媒性物質の化合物の多くを輸送する。これまでに何百あるいは千以上の化合物が P 糖タンパク質によって輸送されることがわかっている。P 糖タンパク質がどのような機構でこれほど多様な基質を認識しているかはいまだ不明である。基質結合部位もまだ同定されていないが、基質特異性を変化させるアミノ酸変異の研究などから、おそらく膜貫通 α -ヘリックスが何本か集まって基質結合ポケットを形成していると予想される⁽⁴⁾。多くの基質は、その基質結合部位に細胞膜から直接入るらしい。後から述べるように、*MDR1* の属する ABC タンパク質の輸送する基質には、リン脂質やコレステロールのように本来膜中に存在するものが多く、細胞膜から基質結合部位に直接相互作用するというメカニズムは、ABC タンパク質にある程度共通するものと考えられる。

5. P 糖タンパク質は ATP 加水分解に依存して基質を極性輸送する

われわれは、ヒト *MDR1* 発現ベクターをブタ腎臓由来培養細胞 LLC-PK1 中に導入し、P 糖タンパク質を介する経細胞輸送モデル実験系を 1992 年に確立した (図2)⁽⁵⁾。LLC-PK1 細胞は集密化して育成すると、細胞間で密着結合し、微絨毛をもった頂側膜と側底膜

図2 P 糖タンパク質を介する経細胞輸送モデル実験系

検査する化合物が LLC-PK1 細胞の細胞膜を単純拡散で通過する場合、化合物の基底膜側から頂側膜側への経細胞輸送量と頂側膜側から基底膜側への経細胞輸送量は等しい。その化合物が P 糖タンパク質の基質である場合、LLC-GA5 (ヒト P 糖タンパク質発現細胞) において、基底膜側から頂側膜側への経細胞輸送量が増加し、頂側膜側から基底膜側への経細胞輸送量は減少する。ある化合物の LLC-GA5 における経細胞輸送量が他の化合物の添加によって影響を受ける場合、それらの化合物が P 糖タンパク質を介して相互作用することが示唆される。

図3 小腸, 脳毛細血管, 腎尿細管におけるP糖タンパク質の極性発現と輸送の方向

P糖タンパク質は、太線で示した膜に極性発現している。

に極性分化した単層を形成する。頂側膜とは、図3に示したように、小腸の管腔膜、脳毛細血管の血液と接する膜や腎尿細管の尿側の膜にあたる。つまり、LLC-PK1細胞の頂側膜側から基底膜側への経細胞輸送は小腸管腔から体液中への吸収や脳毛細血管から脳内への吸収に相当する。また、基底膜側から頂側膜側への経細胞輸送は腎尿細管での尿中への排泄に相当する。

LLC-PK1細胞中で発現させたP糖タンパク質は頂側膜にだけ局在した。P糖タンパク質は小腸、脳毛細血管、腎尿細管などの管腔膜に極性発現しており、LLC-PK1細胞中での発現場所は生理的な発現場所と一致している。われわれは、この経細胞輸送実験系を用いることによって、さまざまな抗がん剤がP糖タンパク質によって輸送されることを示した。さらに、心臓病の治療薬であるジゴキシンがP糖タンパク質の基質であり、ジゴキシンのP糖タンパク質による輸送がシクロスポリンAやキニジンなどによって抑制されることを報告した⁽⁶⁾。P糖タンパク質による薬剤輸送がATPに依存していることは、膜ベシクルを用いた輸送実験などから明らかになった。これらの結果は、さまざまな薬剤の小腸からの吸収や脳内への移行がP糖タンパク質によって抑制されていること、P糖タンパク質はATP加水分解のエネルギーを利用して薬剤を能動輸送するポンプとして機能していることを示している。さらに臨床において強心配糖体ジゴキシンの血中濃度がさまざまな薬剤との併用で大きく変化し、それが臨床上大きな問題となっているが、その原因がP糖タンパク質を介してそれらの薬剤が相互作用しているためであることを示している。上記の経細胞輸送実験系は薬物がP糖タンパク質の基質であるかどうか、その輸送活性にどのような影響を与えるの

か、さらにどの薬剤とどの薬剤が相互作用するかを*in vitro*で効率的にスクリーニングできる長所を有しており、臨床における相互作用を予測しうる系として広く応用が期待される。

6. P糖タンパク質は胎児を有害物から保護している

このようにわれわれの確立した経細胞輸送実験系はP糖タンパク質がさまざまな薬剤の小腸からの吸収や脳内への移行に影響を与えることを示唆していた。そのことは、SchinkelらによってMDR1のノックアウトマウスが作製され⁽⁷⁾、そのマウスでは野生型マウスに比べてさまざまな薬剤の小腸からの吸収が上昇し、脳内への蓄積量が大幅に増大することが示されることによって実証された。つまり、2章で書いたように小腸や脳毛細血管における脂溶性有害物に対するバリアーとしてP糖タンパク質が実際に機能していることが明らかになったのである。

さらに1998年になって、P糖タンパク質が胎児を有害物から護っていることが明らかになった。CF-1マウスの系統には、*mdr1*遺伝子の欠損マウスが混ざっており、母親マウスが妊娠中にアベルメクチンというノミ駆除剤にさらされると*mdr1*(-)の遺伝形質をヘテロあるいはホモにもつ胎児が奇形をもって生まれてくること、*mdr1*(-)胎児内のアベルメクチン蓄積量が上昇していることが報告されたのである⁽⁸⁾。胎盤では、母親の血液と胎児の血液は絨毛膜でへだてられ混ざりあわないようになっている。CF-1マウスの結果は、有害な脂溶性物質が母親の血液から胎児側に入らないようにMDR1が絨毛膜においてバリアーとして機能していることを示している。また、精巣においても同様に働いているらしい。

それではなぜ、胎児や精子が内分泌かく乱物質と呼ばれる化合物に曝されて、深刻な影響を受けてしまうのだろうか。それに答えるには、詳細な研究を待たねばならない。そのような内分泌かく乱作用を示す化合物はP糖タンパク質によって輸送されにくい性質を持っているのかもしれない。あるいはまた、それらの物質は脂肪組織に蓄積し、非常に低濃度が常に血中にもれ出てくるという性質をもっており、トランスポーターであるP糖タンパク質にとって苦手な基質なのかもしれない。

7. 抱合解毒産物を輸送する MRP ファミリー

以上のように, P 糖タンパク質はさまざまな構造の脂溶性の有害物が細胞に浸入する前につかまえ, 細胞外へ排出することによって, 細胞や組織を有害物から護っている。しかし, すべての脂溶性有害物を細胞膜を通過する短時間に結合し排出できるわけではない。そのような, P 糖タンパク質が排出しきれなかった脂溶性有害物の多くは, 細胞内でグルタチオンやグルクロン酸と抱合体化され無毒化される。しかし, グルタチオン抱合体, グルクロン酸抱合体となった化合物は水溶性が増すため, 細胞膜を単純拡散で通過し細胞外へ出ていくことはできず, そのままでは細胞内に蓄積してしまうことになる。抱合体の細胞内蓄積は抱合体化を触媒する酵素にとって好ましくないし, また化合物の中には, 抱合体になっても無毒化されないものも存在する。そのようなグルタチオン抱合体, グルクロン酸抱合体は, P 糖タンパク質と同じく ABC タンパク質に属する MRP によって細胞外へ排出されていることが最近明らかになった⁽⁹⁾。MRP は, ABC タンパク質の中でサブファミリーを形成しており, それらが協調してさまざまなグルタチオン抱合体, グルクロン酸抱合体などを体外へ排出しているらしい。

8. ABC タンパク質

MDR1 や MRP を含む ABC タンパク質は, 分子内によく保存された ATP 結合部位を二つ有する膜タンパク質ファミリーであり, ATP Binding Cassette の頭文字をとって ABC タンパク質と呼ばれる。ほ乳類では, 1986 年に私たちが *MDR1* 遺伝子を単離して以来, 次々に類似の構造をしたタンパク質遺伝子が発見され, 現在ヒトは 40 以上の ABC タンパク質遺伝子をもつことが明らかになっている。ABC タンパク質には, MDR1, MRP 以外にコレステロール輸送への関与が示唆されている ABC1, 極長鎖脂肪酸の代謝に関与するペルオキシソーム ABC タンパク質, 血糖値調節に関与する SUR1⁽¹⁰⁾ などが含まれ, 多くの ABC タンパク質の異常がさまざまな病気と関係していることが最近明らかになってきた⁽¹¹⁾。

9. おわりに

これまで機能の明らかにされた ABC タンパク質は, 生命そのものには必ずしも必要ではないが, 健康体の維持のために重要な機能を果たしている。ABC タンパク質にはまだ機能や生理的役割が未解明のものが多く残されている。それらが解明されることによって, 生物が環境有害物質に対してどのように防御メカニズムを発達させてきたかが明らかになるとともに, 新たな医薬開発のターゲットになることが期待される⁽¹²⁾。

- (1) C. Chen, J.E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman, and I. B. Roninson: *Cell*, **47**, 381-389 (1986).
- (2) K. Ueda, D. P. Clark, C.-j. Chen, I. B. Roninson, M. M. Gottesman, and I. Pastan: *J. Biol. Chem.*, **262**, 505-508 (1987).
- (3) K. Ueda, C. Cardarelli, M. M. Gottesman, and I. Pastan: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 3004-3008 (1987).
- (4) K. Ueda, Y. Taguchi, and M. Morishima: "Seminars in Cancer Biology," ed. by P. Borst, Academic Press, UK, 1997, pp. 151-160.
- (5) K. Ueda, N. Okamura, M. Hirai, Y. Tanigawara, T. Saeki, N. Kioka, T. Komano and R. Hori: *J. Biol. Chem.*, **267**, 24248-24252 (1992).
- (6) Y. Tanigawara, N. Okamura, M. Hirai, M. Yasuhara, K. Ueda, N. Kioka, T. Komano, and R. Hori: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**, 840-845 (1992).
- (7) A. H. Schinkel, J. J. Smit, O. van Tellingen, J. H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol, M. A. van der Valk, E. C. Robanus-Maandag, H. P. te Riele, A. J. M. Berns, and P. Borst: *Cell*, **77**, 491-502 (1994).
- (8) G. R. Lankas, M. E. Cartwright, and D. Umbenhauer: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 357-365 (1997).
- (9) 植田和光ほか: 農化, **71**, 783-819 (1997).
- (10) K. Ueda, J. Komine, M. Matsuo, S. Seino, and T. Amachi: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 1268-1272 (1999).
- (11) 清野 進ほか: 最新医学, **54**, 349-447 (1999).
- (12) 植田和光, 天知輝夫: バイオサイエンスとインダストリー, **58**, 23-27 (2000).