炎症時におけるトランスポーター発現変動と ERM タンパク質の関連

川瀬 篤史

Alterations in Expression and Function of ABC Transporters and ERM Proteins in Inflammation

Atsushi Kawase

*Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Kinki University;
3-4-1 Kowakae, Higashi-osaka, Osaka 577-8502, Japan.*

(Received May 24, 2014)

Pathophysiological changes in infection or inflammation are associated with alterations in the production of numerous absorption-, distribution-, metabolism-, and excretion-related proteins. However, little information is available on the effects of inflammation on the expression levels and activities of ATP-binding cassette (ABC) transporters. We examined the effects of acute (on day 7) and chronic (on day 21) inflammation on the expression of ABC transporters in some major tissues in rats. Adjuvant-induced arthritis (AA) in rats was used as an animal model of inflammation. The mRNA levels of *mdr1a* and *mdr1b* encoding P-glycoprotein (P-gp) decreased significantly in the liver of AA rats on day 21. Hepatic protein levels of P-gp, Mrp2, and Bcrp decreased significantly in the membrane but not in the homogenate of AA rats after 7 days and after 21 days of treatment with adjuvant. Recently, ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins have been found to show linker activity for some transporters and F-actin. We examined the expression levels and functions of ERM proteins in AA because the membrane localization of ABC transporters was decreased without any change in total expression levels. In this review, we summarize our recent work and reports of ERM proteins relevant to ABC transporters.

Key words—ezrin; radixin; moesin; transporter; inflammation; liver

研究背景

輸送担体(トランスポーター)とは、肝臓、腎臓、小腸及び脳など種々の臓器に発現し、薬物などの生体異物あるいは内因性基質を細胞内外へと方向性をもって輸送する生体維持上不可欠なタンパク質である。トランスポーターは以下の2つに大きく分類できる。すなわち、ATPの加水分解エネルギーを利用して輸送を行う ATP binding cassette (ABC) トランスポーターと ATP のエネルギーを必要としない solute carrier (SLC) トランスポーターである (Fig. 1)。トランスポーターの発現及び活性は、性、内因性物質、環境、病態といった様々な要因により影響を受ける。これが、基質薬物の体内動態に影響し、効果の増減や副作用発現の原因となり得る

ため、炎症時のトランスポーター変動を正確に把握することは、臨床上極めて重要と考えられる。特に肝臓はウイルス性肝炎など炎症を伴う疾患が起こり易いうえ、薬物代謝に重要な臓器であることから、炎症時の肝臓におけるトランスポーターの発現機構解析は重要であり、当研究室ではこれまでに炎症時の薬物代謝酵素及びトランスポーターの発現及び機能変動に関する研究に取り組んできた。¹⁻⁴⁾

近年、トランスポーター単独ではなく、トランス

Fig. 1. ABC and SLC Transporters Express in Hepatocytes and Undergo the Vectorial Transport of Xenobiotics and Endogenous Substrates

The author declares no conflict of interest.

近畿大学薬学部医療薬学科生物薬剤学研究室 (〒577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1)

e-mail: kawase@phar.kindai.ac.jp

本総説は、平成25年度日本薬学会近畿支部奨励賞(医療系薬学)の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 2. The Effects of ERM Proteins Knockout on the Biliary Excretion of Conjugated Bilirubin via MRP2

ポーターと相互作用する種々の裏打ちタンパク質を含めた検討の重要性が指摘されている。すなわち、トランスポーターは、細胞膜で、その輸送活性を発揮するために適切に局在することが必要となる。いくつかのトランスポーターについて、裏打ちタンパク質のうち、ezrin/radixin/moesin (ERM) タンパク質との相互作用が膜局在及び輸送機能発現において重要であることが明らかとされている。ERM タンパク質は、Fig. 2 に示すように細胞骨格のアクチン線維 (F-アクチン) と排出トランスポーターである multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) などの膜内在性タンパク質とを連結させる機能を担っている。例えば、radixin は肝臓における主要な ERM タンパク質であるが、radixin ノックアウトマウスでは MRP2 の胆管側膜への局在化が低下し、抱合型ビリルビンの胆汁中排泄が低下することで高ビリルビン血症となる。これは、ヒトで MRP2 の遺伝子変異により発症する Dubin-Johnson 症候群と類似している。⁵⁾ このことより、radixin は MRP2 の膜局在及び輸送活性において極めて重要な役割を担っていると考えられる。また、radixin は P-糖タンパク質 (P-glycoprotein; P-gp) の膜局在にも関与することが報告されている。⁶⁾ 本総説では、当研究室で検討を行ってきた炎症時の ABC トランスポーター発現変動と ERM タンパク質との関連を含め ERM タンパク質とトランスポーターに関する最近の知見を概説する。

炎症時のトランスポーター変動

本研究では、炎症性疾患の動物モデルの 1 つであるアジュバント関節炎 (adjuvant-induced arthritis; AA) ラットを用い検討を行った。本モデルはアジュバント投与後の炎症状態により亜急性、急性、及

び慢性の炎症各期を比較することが可能であり、炎症の進行とトランスポーター及び ERM タンパク質発現の変動を関連付けて評価することができる。AA ラットの作製は、7 週齢の雌性 Sprague-Dawley ラット (180–240 g) に、アジュバントとして 1 mg の結核死菌体を右後肢足蹠部位及び尾根部に皮下投与した。アジュバント投与後、足の浮腫率を測定したところ、Fig. 3 に示すように、アジュバント投与 7 日目では投与部位の有意な腫れが観察され、21 日目では投与部位のみならず左後肢足蹠を含め全身性の浮腫がみられた。これに加え、血中の肝機能指標値などを考慮し、アジュバント投与 7 日目 (AA 7 d) を急性期、21 日目 (AA 21 d) を慢性期として実験に用いた。

結果の詳細については、筆者らの論文⁷⁾を参照したいが、その概略について以下にまとめる。肝臓の毛細胆管側膜上に発現する ABC トランスポーターのうち、薬物とその代謝物の胆汁中排泄に係わる MRP2, P-gp 及び breast cancer resistance protein (BCRP) について検討を行った。まず、MRP2, P-gp 及び BCRP の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法にて評価したところ、AA 7 d 及び AA 21 d において、コントロールと比べ有意な減少を示した。次に、タンパク発現量をウエスタンブロッ

川瀬篤史

平成 17 年 3 月 京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野 (高倉喜信教授) にて博士号 (薬学) 取得、平成 17 年 4 月 近畿大学薬学部生物薬剤学研究室 (岩城正宏教授) 助手就任、平成 19 年 4 月 同助教、平成 20 年 4 月 同講師。研究テーマは、「病態時の代謝酵素及びトランスポーター機能変動」及び「特異体質性肝毒性の発症機構」。

Fig. 3. Change in Paw Edema in Control and AA Rats
Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. ($n=4$).

	MRP2	P-gp	BCRP
mRNA	↓	↓	→
Protein (homogenate)	→	→	→
Protein (Membrane protein)	↓	↓	↓
Activity	ND	↓	ND

ND: not determined

The membrane localization of ABC transporters was decreased without total expression levels. The expression and function of ERM proteins could be altered.

Fig. 4. Summary of Alterations in MRP2, P-gp and BCRP Expression and Activity in AA Rats

ト法で検討したところ、肝ホモジネートでは、いずれのトランスポーターも変化を示さなかったのに対して、毛細胆管側膜上タンパク質では、AA 7 d 及び AA 21 d で有意な低下を示した。そこで、P-gp の典型的基質である rhodamine 123 を用い、コントロールラット及び AA 21 d ラットに rhodamine 123 を静脈内投与した後の血漿中及び胆汁中排泄量の検討を行ったところ、コントロールに比べ AA 21 d において、累積胆汁中排泄量が有意に低下することが示され、トランスポーター活性においても著しい低下が確認された (Fig. 4)。また、mRNA 発現は低下したにもかかわらず総タンパク発現量は

変動しなかったことよりなんらかの翻訳及び翻訳後調節の関与が示唆された。以上のことより、炎症時にはトランスポーターの発現量自体は変化しないものの、細胞膜での局在及び輸送活性がなんらかの原因で低下することが示唆された。そこで、ABC トランスポーターの細胞膜での局在及び機能発現に係わる ERM タンパク質に関する検討を行うこととした。

炎症時の ERM タンパク質変動と最近の知見

ヒト ERM タンパク質は比較的高いアミノ酸配列相同性を有し (73–81 %), NF2 tumor suppressor protein, Merlin とも高い相同性を有している。⁸⁾

ERM タンパク質の共通構造としては、N 末端に約 200 アミノ酸からなる four-point-one, ezrin, radixin, moesin (FERM) 領域、中央に α らせん構造、C 末端に約 100 アミノ酸からなるアクチン結合部位がある。⁹⁾ ERM タンパク質は、細胞の極性、運動性及びシグナル伝達など様々な生理学的過程に係わっているが、¹⁰⁾ 細胞質では、分子内相互作用により、大部分が不活性型 (closed form) として存在している。^{11,12)} この状態では、トランスポーターと F-アクチン間のリンカー機能を発揮しないが、C 末側のスレオニン残基がリン酸化されることで活性型 (open form) となり、N 末端がトランスポーターと直接的又は ERM binding phosphoprotein (EBP50) を介して間接的にリンカー機能を発揮する。¹³⁻¹⁵⁾ ここで、EBP50 は肝細胞の毛細胆管側膜側に発現しており、¹⁶⁾ ERM タンパク質の活性化を担うリン酸化酵素として、Rho-kinase (ROCK),¹⁷⁾ protein kinase C θ ,^{18,19)} protein kinase C α ²⁰⁾ が報告されている。

ERM タンパク質のうち、肝臓においては特に radixin が毛細胆管側膜へのトランスポーター局在と輸送活性において重要である。例えば、サンドイッチ培養したラット肝細胞の radixin を siRNA 発現アデノウイルスベクターによりノックダウンしたところ、毛細胆管側膜に局在して発現するトランスポーター量及び機能の低下がみられている。一方、血管側に発現する organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2) の局在性には影響しなかったと報告されている。²¹⁾ また、HepG2 細胞における ERM タンパク質ノックダウンの P-gp 機能に対する影響は、radixin をノックダウンすることで、総発現量は変化がないが膜上に局在している P-gp 発現量が減少し、moesin のノックダウンは P-gp の発現及び機能ともに影響しないことが示され、ezrin のノックダウンは P-gp の翻訳段階に影響することが報告されている。⁶⁾

筆者らは、前項で用いた AA ラットを使用し、全身の ERM タンパク質発現及び機能変動について検討を行っている (投稿準備中)。結果の概略としては、ERM タンパク質のうち、肝臓の radixin のみが炎症時に mRNA 発現量が低下し、トランスポーターの膜局在化機能を低下させることを明らかにしている。今回筆者らは肝臓の radixin に着目し検討を行ったが、小腸においても ERM タンパク質

のトランスポーター機能に対する影響について、いくつか報告がなされている。例えば、前述のように、肝臓では、radixin が MRP2 や P-gp の膜局在に影響しているが、小腸では、ezrin が MRP2 及び P-gp 発現に対して翻訳後調節を行っている。小腸において活性型であるリン酸化 ezrin と MRP2 発現分布の間に良好な相関関係が認められている。²²⁾ また、radixin ノックアウトマウスを用いた検討により、コントロールマウスでは、P-gp 発現が小腸上部に比べ下部で高いのに対し、radixin ノックアウトマウスでは、いずれの部位でも同じレベルを示すなど radixin は小腸において P-gp の翻訳後調節及び輸送活性に係わっていることが報告されている。²³⁾ トランスポーターに対するリンカー機能については、先に肝臓における重要性を述べた EBP50 が小腸における ERM タンパク質の機能発現にも重要であるとされている。²⁴⁾ また、小腸の ERM タンパク質の活性化に関して、etoposide が RhoA/ROCK を介して ERM タンパク質を活性化することが報告されている。^{25,26)}

本研究では、肝臓で薬物及び代謝物の胆汁中排泄に係わる ABC トランスポーターを取り上げ ERM タンパク質発現との関連を検討したが、MRP には複数の分子種があり、興味深いことに MRP 分子種間で ERM タンパク質の関与が異なることが報告されている。Radixin の MRPs の膜局在及び輸送活性に対する影響について *in vitro* で RNAi 法による radixin ノックダウンにより検討が行われ MRP1-6 のうち、MRP2 のみ選択的に発現及び輸送活性が影響を受けることが明らかとなっている。²⁷⁾

以上、ERM タンパク質は肝臓や小腸の MRP2 及び P-gp の局在及び輸送活性に大きく関与しており、炎症時には肝臓の radixin 機能が低下することによりトランスポーターの膜局在が低下することが示唆された。これより、radixin が炎症時の肝臓におけるトランスポーター機能低下を回復するうえで重要なターゲットとなり得ることが示唆された。

謝辞 本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました近畿大学薬学部医療薬学科生物薬剤学、岩城正宏教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、多くの有益な御助言と御指導を頂いた金沢大学大学院医薬保健学総合研究科分子薬

物治療学，加藤将夫教授に深く感謝いたします。最後に，実験全般にわたり御協力頂いた学生諸氏に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Kawase A., Tsunokuni Y., Iwaki M., *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 256–261 (2007).
- 2) Kawase A., Ikuta H., Uno S., Yamamoto K., Akitsu N., Nagao T., Iwaki M., *Xenobiotica*, **43**, 246–252 (2013).
- 3) Uno S., Uraki M., Ito A., Shinozaki Y., Yamada A., Kawase A., Iwaki M., *Biopharm. Drug Dispos.*, **30**, 49–54 (2009).
- 4) Uno S., Kawase A., Tsuji A., Tanino T., Iwaki M., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 313–321 (2007).
- 5) Kikuchi S., Hata M., Fukumoto K., Yamane Y., Matsui T., Tamura A., Yonemura S., Yamagishi H., Keppler D., Tsukita S., Tsukita S., *Nat. Genet.*, **31**, 320–325 (2002).
- 6) Kano T., Wada S., Morimoto K., Kato Y., Ogihara T., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 5308–5314 (2011).
- 7) Kawase A., Norikane S., Okada A., Adachi M., Kato Y., Iwaki M., *J. Pharm. Sci.*, 2014. (in press)
- 8) McClatchey A. I., Fehon R. G., *Trends Cell Biol.*, **19**, 198–206 (2009).
- 9) Pearson M. A., Reczek D., Bretscher A., Karplus P. A., *Cell*, **101**, 259–270 (2000).
- 10) Ivetic A., Ridley A. J., *Immunology*, **112**, 165–176 (2004).
- 11) Gary R., Bretscher A., *Mol. Biol. Cell*, **6**, 1061–1075 (1995).
- 12) Reczek D., Berryman M., Bretscher A., *J. Cell Biol.*, **139**, 169–179 (1997).
- 13) Suda J., Zhu L., Karvar S., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **300**, C416–C424 (2011).
- 14) Yonemura S., Matsui T., Tsukita S., Tsukita S., *J. Cell Sci.*, **115**, 2569–2580 (2002).
- 15) Simons P. C., Pietromonaco S. F., Reczek D., Bretscher A., Elias L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 561–565 (1998).
- 16) Fouassier L., Duan C. Y., Feranchak A. P., Yun C. H., Sutherland E., Simon F., Fitz J. G., Doctor R. B., *Hepatology*, **33**, 166–176 (2001).
- 17) Matsui T., Maeda M., Doi Y., Yonemura S., Amano M., Kaibuchi K., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **140**, 647–657 (1998).
- 18) Simons P. C., Pietromonaco S. F., Reczek D., Bretscher A., Elias L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 561–565 (1998).
- 19) Pietromonaco S. F., Simons P. C., Altman A., Elias L., *J. Biol. Chem.*, **273**, 7594–7603 (1998).
- 20) Ng T., Parsons M., Hughes W. E., Monypenny J., Zicha D., Gautreau A., Arpin M., Gschmeissner S., Verveer P. J., Bastiaens P. I., Parker P. J., *EMBO J.*, **20**, 2723–2741 (2001).
- 21) Wang W., Soroka C. J., Mennone A., Rahner C., Harry K., Pypaert M., Boyer J. L., *Gastroenterology*, **131**, 878–884 (2006).
- 22) Nakano T., Sekine S., Ito K., Horie T., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **305**, G807–G817 (2013).
- 23) Yano K., Tomono T., Sakai R., Kano T., Morimoto K., Kato Y., Ogihara T., *J. Pharm. Sci.*, **102**, 2875–2881 (2013).
- 24) Morales F. C., Takahashi Y., Kreimann E. L., Georgescu M. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17705–17710 (2004).
- 25) Kobori T., Harada S., Nakamoto K., Tokuyama S., *J. Pharm. Sci.*, **102**, 1670–1682 (2013).
- 26) Kobori T., Harada S., Nakamoto K., Tokuyama S., *J. Pharm. Sci.*, **102**, 1095–1105 (2013).
- 27) He X. J., Wang W. R., Zhang Y., Yang Q., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **46**, 426–434 (2012).