

特集：膜輸送ナノマシンの構造・作動機構と制御

ATP加水分解共役型排出輸送体の構造，生理機能と疾病

和田守正，藤田京子

ABC膜輸送タンパク質は大腸菌からヒトまで良く保存されているばかりでなく，ヒトで最も大きな遺伝子ファミリーの一つを構成しており，重要な生物機能を担っていることが予想される．実際，ヒトの遺伝性疾患や，黄斑変性症，動脈硬化などの生活習慣病への関与も明らかになり，臨床的な意義も大きいことが認識されてきた．しかしながら，多くのABC膜輸送タンパク質については生理機能や疾病への関与が明らかでなく，また幅広い基質の輸送を可能にするしくみや生体膜上での機能制御といった，効果的な創薬に必要な不可欠な問題の多くが未解明のまま残されている．本稿では，異物の排除による生体防御を担っているATP加水分解共役型排出輸送体を中心に，構造と生理機能に絞って最近の知見を紹介する．

1. はじめに

生体には毒物・薬物などの異物を体内から排除して生体を防御する仕組みが備わっている．また，コレステロールやホルモンなどの生理基質を細胞膜を通して輸送する機能も必須である．この仕組みが障害されると様々な病気が発症し，過剰に働くと薬が効かない耐性ががんや耐性病原菌が出現する．これらの仕組みを担っている実体のいくつかは明らかにされてみると，ABC (ATP binding cassette; ATP結合カセット) 膜輸送タンパク質と呼ばれる一群の輸送タンパク質であることが分かってきた．

このタンパク質群は，ATPのエネルギーに依存して作動する膜輸送体であり，数回の膜貫通領域と，ATP結合および加水分解に与る細胞質領域から構成されている．大腸菌やヒトのゲノムが解読されたことにより，ABC膜輸送タンパク質は最も大きな遺伝子群を形成していることが

分かり，このタンパク質群が大腸菌からヒトまで如何に重要な働きを担っているかが推察される．さらに，疾病に結びつくABC膜輸送タンパク質の機能障害が少なくとも11例明らかにされており，医学・薬学領域においても重要な解析対象になってきた．しかしながら，多くのABC膜輸送タンパク質については生理機能や疾病への関与が明らかでなく，また幅広い基質の輸送を可能にする仕組みや生体膜上での機能制御といった，効果的な創薬に必要な不可欠な問題の多くが未解明のまま残されている．ここでは，ABC膜輸送タンパク質のなかでも，異物の排除に関与するATP加水分解共役型排出輸送体について，構造と生理機能およびその破綻による疾病に絞って最近の知見を紹介する．

2. ABC膜輸送タンパク質の構造

ATP加水分解共役型排出輸送体を含め，ABC膜輸送タンパク質の構造についてはそのアミノ酸配列から，図1のようなトポロジーが予測され，エピトープ特異的抗体などを用いて証明されてきた．すなわち，数回膜を貫通するドメインとヌクレオチド結合ドメイン (nucleotide binding domain, NBD) が2回くり返される構造を基本とする．

NBDはそのアミノ酸配列が大腸菌からヒトまで良く保存されており，ATP結合カセット (ATP binding cassette) とも呼ばれることから，ABC膜輸送タンパク質の名前の

長崎国際大学薬学部薬学科分子生物学研究室 (〒859-3298 長崎県佐世保市ハウステンボス町 2825-7)

Structure and physiological function of ATP binding cassette exporters

Morimasa Wada and Kyoko Fujita (Division of Molecular Biology, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Huis Ten Bosch, Sasebo, Nagasaki 859-3298, Japan)

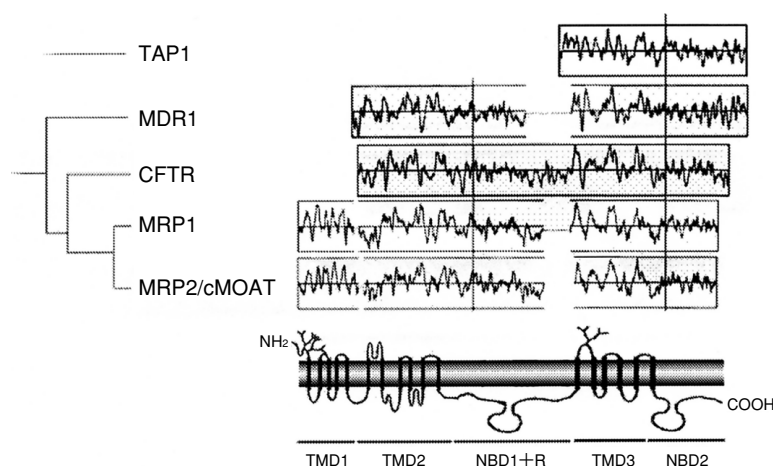


図1 ABC膜輸送タンパク質の構造

図上部に代表的なABC膜輸送タンパク質の疎水性解析の結果を示す。図下部には、この疎水性解析の他に、糖鎖付加阻害実験、限定タンパク質分解実験などから予想されているトポロジーを示す。TMD：膜貫通ドメイン、NBD：ヌクレオチド結合ドメイン、R：CFTRに存在する活性制御ドメイン

由来になっている。NBDの中でも、特に配列の相同性が高く重要なモチーフが存在する。ABC膜輸送タンパク質以外のATPaseとも相同性のあるWalkerA（Pループ）およびWalkerB、ABC膜輸送タンパク質に特徴的なABC signatureモチーフ（conserved配列、Cモチーフとも呼ばれる）、Qループなどである（図2）。これまでに、変異の導入による機能障害を検討することにより、ATPの結合と加水分解における役割が解析されてきたが、ABC膜輸送タンパク質の結晶構造解明に伴い、輸送機構に直接結びつけて理解することが可能になってきた。

ABC膜輸送タンパク質の三次元構造については、まず幾つかのバクテリアタンパク質由来NBDに関して結晶構造が報告された。ここで、二つのNBD相互の位置関係がタンパク質の種類ごとに異なることが議論になった¹⁾。最初に発表されたHisP²⁾ではヌクレオチドの結合面がお互いに背中合わせに逆を向いていたが、MalKでは向き合い且つ、かみ合った形になっていた。さらに、ABC膜輸送タンパク質ではないものの、ATPaseの一つであるRad50³⁾の場合には二つのNBDがhead-to-tailの構造になっていた。従来の生化学的解析により、二つのNBDは相互作用していると推測されていたため⁴⁾、このhead-to-tailモデルはABC膜輸送タンパク質の場合にも一般的な構造ではないかと注目を集めた。以下に述べるように、その後、膜貫通ドメイン（transmembrane domain, TMD）も含んだ全体構造がいくつか報告されたが、ほとんどがこのhead-to-tailモデルを支持するものであった。

TMDも含んだ全体構造については、2001年からの5年間に、大腸菌の脂質フリッパーゼMsbA⁵⁾、大腸菌でビタミンB12の取り込みに関与するBtuCD⁶⁾、スタフィロコッ

カス菌由来でヒトのATP加水分解共役型排出輸送体である多剤耐性因子MDR1と相同性の高いSav1866⁷⁾、インフルエンザ菌で金属キレート種の取り込みに関与すると推測されているHI1470/1⁸⁾、古細菌でモリブデンの取り込みに関与すると推測されているModB₂C₂⁹⁾の5種類につき結晶構造が報告された。残念ながら、MsbAに関する5報については、解析ソフトの問題から誤った結果を導き出していたことが判明し、今年になって取り下げられたが、その他の報告からABC膜輸送タンパク質の三次元構造と輸送機構についての像が次第に明らかになってきた。以下、バクテリアのATP加水分解共役型排出輸送体Sav1866を中心に紹介する。

3. バクテリア ATP加水分解共役型排出輸送体の構造

得られたSav1866の結晶構造は二量体で非結晶学的2回対称になっており、膜貫通ドメイン（TMD）が外向き（細胞外）に開いた形になっていた（図3）。ヌクレオチド結合ドメイン（NBD）はhead-to-tail構造で、一方のモノマーのWalkerA（Pループ）が他方のモノマーのABC signatureモチーフと向かい合っ一つのヌクレオチド結合サイトを形成していた（図4）。本報告の結晶はADP2分子との共結晶であるが、ヌクレオチド非結合型のBtuCDなどと比較すると、ADPを挟んでWalkerA（Pループ）とABC signatureモチーフがより接近していることが明らかになった（図4A）。すなわち、ヌクレオチドの結合により二つのNBDは強固な二量体へと構造変換することが予測された（図4B）。さらに、このADP結合型の構造は、加水分解が不可能なAMP-PNPアナログとSav1866との共結晶¹⁰⁾や、ATPと古細菌由来MJ0796のNBDとの共結晶構造¹¹⁾と区

別できないことから (図4A), ATPの結合そのものが構造変換を引き起こすのであって, ATPからADPへの加水分解によっては大きな構造変換が起こるわけではないと著者は推測している. 一方, 加水分解後のADP, リン酸の解離は, 各NBDモノマーの分離による初期状態への復帰への引き金になると推測される (後述).

ATPの結合によるNBDの構造変化はどのようにしてTMDに伝達されるのであろうか. 遺伝学的な解析から, TMDのうち細胞質に突き出た細胞内ループ (intracellular loop, ICL) がこの役割を担っていると推測されていたが, 今回の結晶構造からも, ICL1と2, とりわけ細胞膜面と並行に配向している短いヘリックス (共役ヘリックス) がNBDとの会合面を形成していることが示された (図3). さらに意外にも, ICL1は他方のモノマーのNBDとも接しているし, ICL2は他方のモノマーのNBDのみと相互作用するいわゆるドメインスワッピングの形になっていた. このような構成は, NBDの小さな構造変化を増幅して無理なくTMDに伝えるために有効なのであろうか. 一方, NBDの中のどの部分がICLとの会合に参加しているのであろうか. BtuCDと同様に (図5), Sav1866の場合にもQループがICLを取り囲んだ構造になっており, とりわけグルタミン酸がヌクレオチド (BtuCDの場合にはバナジン酸) に最も近接していた. このグルタミン酸は, NBDの結晶構造のうち最初に報告されたHisPにおいて, 水分子を介してATPの γ 位リン酸と相互作用しうることが既に予想されていた²⁾. さらに, このアミノ酸はヒトのDubin-Johnson症候群において変異しているアミノ酸の一つであること^{12,13)}, このグルタミン酸が変異したタンパク

質は確かにATPの加水分解能を失うこと¹⁴⁾が私たちにより明らかにされ, 機能的にも臨床的にも重要であることが示されている.

Sav1866の構造モデルから, 基質の結合と通過経路についてはどのように推測できるであろうか. 上記のように, Sav1866の結晶構造はTMDが外向き (細胞外) に開いた形になっていた (図3). 一方のモノマー由来の膜貫通ヘリックスTM1と2が, 他方のモノマー由来のTM3-6と絡まり合って二つの羽を形成しており, 内側には空洞ができています. この外向き構造は, 電子顕微鏡による解析で明らかにされたATP結合型ヒトMDR1タンパク質の構造と一致している. このような外向き状態では, 基質は細胞質側からも, 脂質二重層の内層からも空洞に侵入できないが, 細胞外または脂質二重層の外層には放出される (図6第三段階). 内層部分の空洞表面は, 極性および電荷をおびたアミノ酸により親水性になっているので, 疎水性の基質に対するアフィニティーはかなり低く, 基質は容易に放出されると考えられる. 一方, スクレオチド非結合型として決定されたModB₂C₂やHI1470/1は内向きの構造を取っていたことから, 著者は, Sav1866でもスクレオチド非結合型は内向き配向を取っている可能性があり, そうだとすれば, 脂質二重層の内層から空洞への経路ができるので, 基質結合時には都合が良いと考察している (図6第一段階). しかしながら, ModB₂C₂とHI1470/1はともに排出トランスポーターではなく取り込みトランスポーターであること, 同じく取り込みトランスポーターでもBtuCDの場合にはスクレオチド非結合型でありながら外向き配向を取っていること, などからこの点は今後の解析を待つ必要がある. また, 全体の形としては外向き配向を取っていても, 膜貫通ヘリックスが“スクイズ”型の構造変換でゲートの開閉や内層からの経路を確保できれば同様の説明が可能である. この点から, Sav1866のスクレオチド非結合型で, 膜貫通ヘリックスのねじれにより空洞表面が疎水性になりうるかに興味を持たれる. いずれにしても, 今回明らかになった, 膜貫通ヘリックス全てが基質の通過経路に関与するという構造は, 架橋実験により複数の基質結合部位が同定される事実と一致し, 大きさや性質が様々な幅広い基質を輸送できる根拠になっていると推測される.

以上をまとめると, 図6のような輸送機構が推測される. しかしながら, まだ不明な点も多い. 例えば, 基質の結合とNBDでの酵素反応はどのように共役しているのであろうか. 外向き配向の段階には, 基質が解離した後にATPの加水分解またはADPの解離が必要があるし, 内向き配向の段階では, 基質が結合した後にATPの結合が成されなければならない. TMDにおける基質の結合や解離の情報が, どのような構造変換を介してNBDに伝達されるかについては, 基質との共結晶など, さらなる

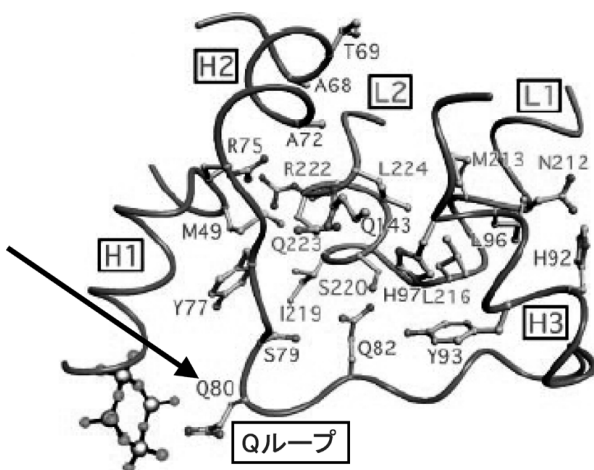


図5 BtuCDにおけるNBDとTMDの会合 (文献6より引用) TMD由来のモチーフL (Sav1866の共役ヘリックスに相当), NBD由来のヘリックスH, Qループがboxで示されている. 左下のボール・スティック構造はバナジン酸, 矢印は水分子を介してATPの γ 位リン酸と相互作用することが予想されているグルタミン酸 (Q80) をそれぞれ示す.

			Walker A	Q-ループ	ABC Signature	Walker B
H.sap_MDR1	NBD1	422	TVALVGNSSGGKSTTVQLMQRLYDVVSQEPVLFALSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSALD
	NBD2	1065	TLALVGSSSGGKSTVVQLLERFYDIVSQEPIILFDLSGGQKQRIAIARALVRQPHILLLDEATSALD
H.sap_MRP2	NBD1	666	LVAVIGPVGSGKSSLSIAMLGEMEYVPQQSWIQNLSGGQKQRIISLARATYQNLDIYLLDDPLSAVD
	NBD2	1329	KIGVVGRTGAGKSSLTNCLFRILEIIPQDPIILFSLSIGQRQLLCLGRALLRKSKILVLDEATAAVD
E.coli_BtuD		28	ILHLVGPNGAGKSTLLARMAGMTSYLSQQQTTPPFLSGGGWQRVRLAAVVLQITPQANPAGQLLLDDEPMNSLD	
S.typ_HisP		33	VISIISSSSGGKSTFLRCINFLFKMVFQHFNLWSLSGGQQRVSIARALAMEPDVLDFDEPTSLD
P.fur.Rad50		25	INLIIGQNGSGKSSLLDAILV---YIRQGG---LSGGERIALGLAFRLAMSLYLA-GEISLLILDEPTPYLD	
S.aur_Sav1866		369	TVAFVGMSSGGKSTLINLIPRFYDGLVQQDNILFSLSGGQKQRLSIARIIFLNPPILILDEATSALD

図2 ヌクレオチド結合ドメイン (NBD) の機能モチーフ

ヒトおよびバクテリア4種のNBDにつき配列比較を示す。重要な機能モチーフにはシャドウをつけている。BtuCDタンパク質はBtuC(膜貫通ドメイン, TMD)とBtuD(NBD)の二つの遺伝子産物から構成されており,ここではNBDの配列比較なのでBtuDと記載している。H. sap: *Homo sapiens*, S. typ: *Salmonella typhimurium*, P. fur: *Pyrococcus furiosus*, S. aur: *Staphylococcus aureus*

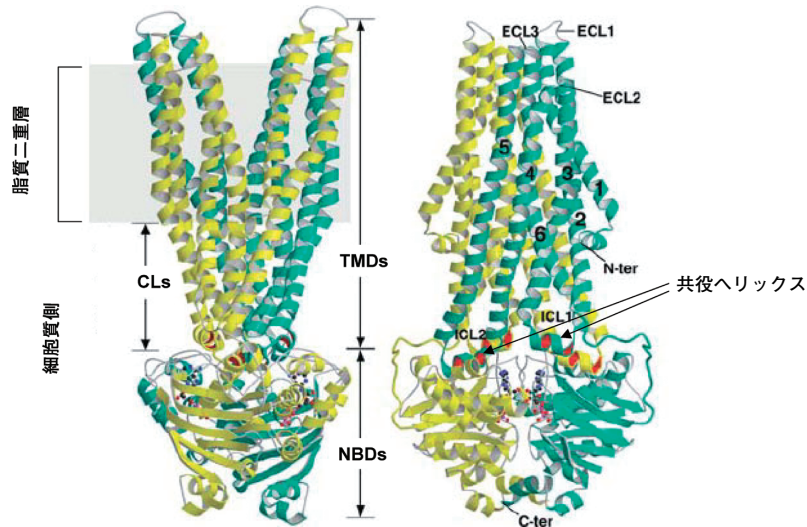


図3 Sav1866の構造(文献7より引用)

Sav1866のリボンモデル。二量体の各サブユニットが青と黄色で示されている。脂質二重層はうす灰色四角で、結合ADPはボール・スティックモデルで示されている。右側は左側から、縦対象軸のまわりを90°回転させた図。TMDs:膜貫通ドメイン, NBDs:ヌクレオチド結合ドメイン, ICL:細胞内ループ, ECL:細胞外ループ, 数字は膜貫通ヘリックス(TM)番号を示す。

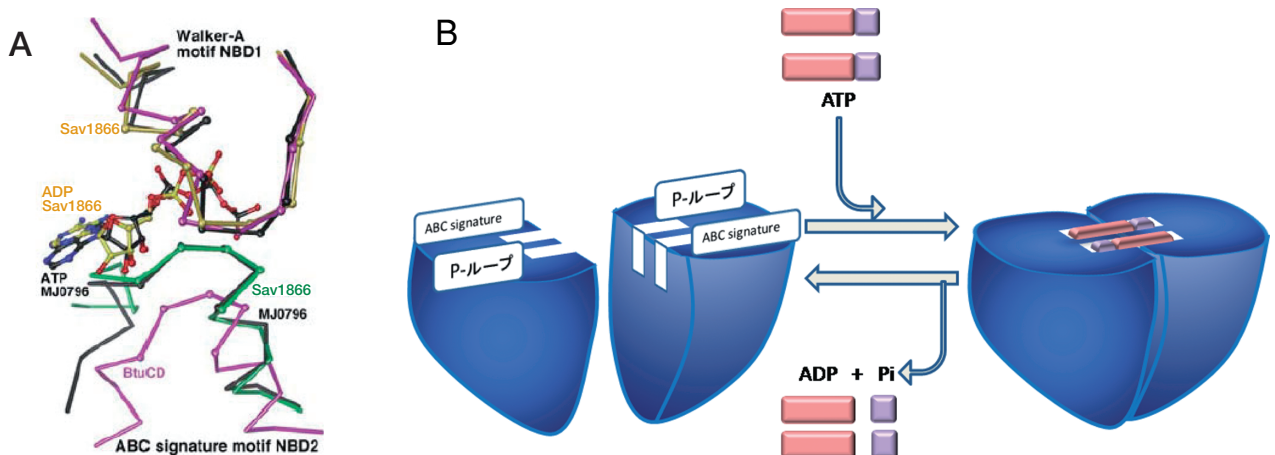


図4 ヌクレオチド結合ドメイン (NBD) の構造と二量体化

A(文献7より引用): WalkerA(P-ループ), ABC signatureモチーフと結合ヌクレオチドの骨格構造。Sav1866はADP結合型, MJ0796はATP結合型, BtuCDはヌクレオチド非結合型の結晶構造。ヌクレオチド結合型は非結合型に比較して, WalkerAとABC signatureモチーフの間隔が狭いことに注意。B: 二つのNBDはhead-to-tailの配置になっており, 両サブユニット由来のモチーフが共同して一つのヌクレオチド結合サイトを形成しているので, ATPの結合により二量体化する。

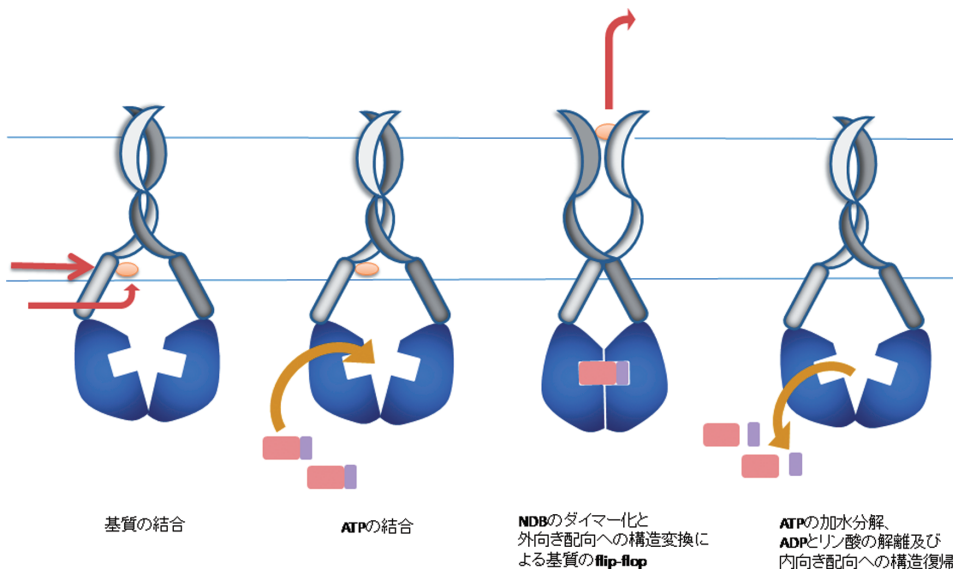


図6 ATP加水分解共役型排出ポンプによる基質輸送の段階とスクイズモデル

左から右に、第一段階：脂質二重層の内層からTMDへの基質結合、第二段階：ATPのNBDへの結合によるNBDの二量体化、第三段階：NBDの二量体化によるTMDの捻れを介した外向き配向への構造変換と、基質の脂質二重層外層方向へのflip-flopまたは細胞外への放出、第四段階：ATPの加水分解、ADPとリン酸の解離による内向き配向への構造復帰。横方向からの構図のため、一つのATP結合サイトのみを示す。

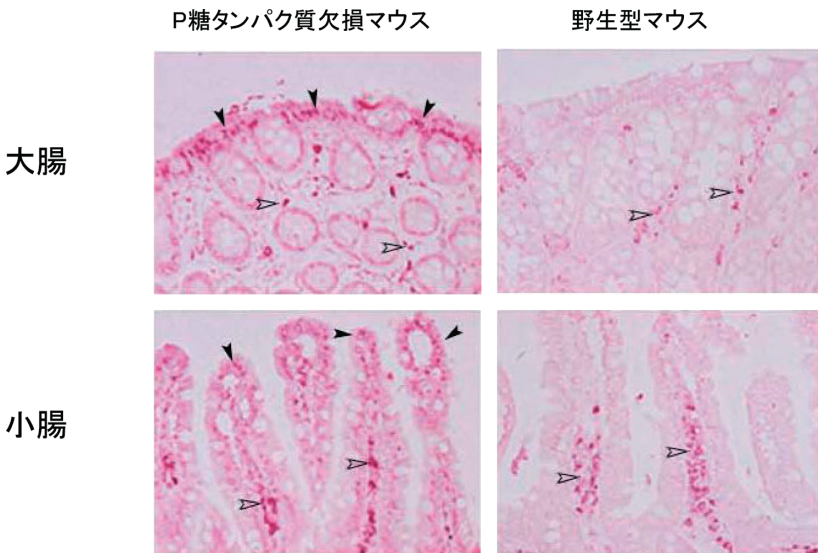


図8 P糖タンパク質欠損マウスにおけるDNA障害の増加

腸管粘膜におけるDNA障害の量を、抗8-オキソグアニン抗体(N45.1)による組織免疫染色により解析した。黒矢尻は粘膜上皮細胞の染色を示し、白矢印は、ストローマ細胞の染色を示す。内部対照のストローマ細胞における染色強度はP糖タンパク質欠損マウス(*Abcb1a*^{-/-}, *Apc*^{Min/+})と野生型マウス(*Abcb1a*^{+/+}, *Apc*^{Min/+})で差異が見られないが、粘膜上皮細胞の染色はP糖タンパク質欠損マウスのみに見られることに注意。

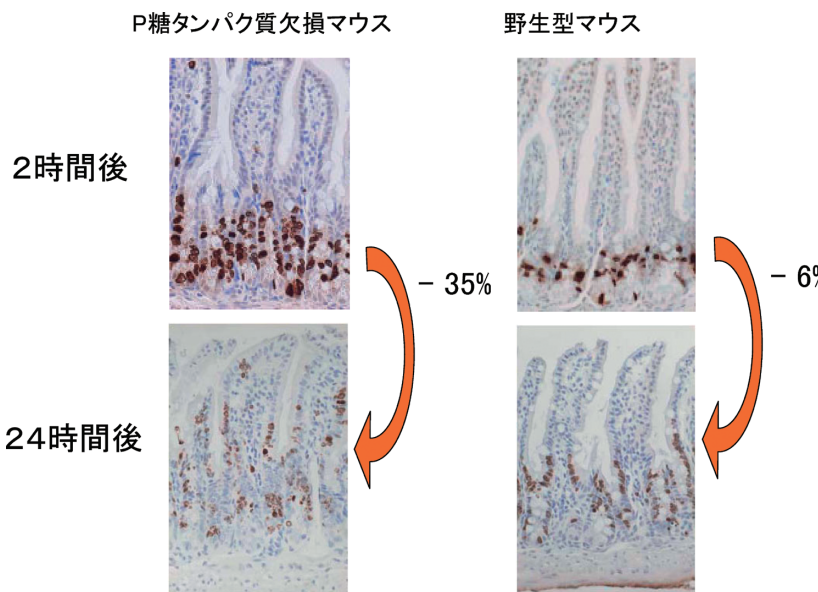


図9 P糖タンパク質欠損マウスにおける腸管細胞のターンオーバー

BrdUをマウスに経口投与し、2および24時間後に腸管を採取して、抗BrdU抗体にて組織免疫染色した。ここでは、小腸の結果のみを示す。抗BrdU抗体により染色される細胞、すなわちDNA合成が活発な細胞は、P糖タンパク質欠損マウスで増加していることに注意。また、24時間後の染色細胞の位置により、上皮細胞の移動状況を追うことができる。数字は、2時間後に対する24時間後の染色細胞数の減少率を示す。

表1 ABC膜輸送タンパク質の生理機能と疾病

サブファミリー	遺伝子	遺伝子シンボル	OMIM ¹⁾	機能/関連疾病など	
A	<i>ABC 1</i>	ABCA1	600046	コレステロールの輸送/Tangier病(家族性HDL欠損症)	
	<i>ABC 2</i>	ABCA2	600047	Alzheimer病? ²⁾	
	<i>ABC 3</i>	ABCA3	601615	新生児性サーファクタント欠損症?	
	<i>ABCR</i>	ABCA4	601691	リン脂質の輸送/Stargardt病, 黄斑変性症	
	<i>ABC7</i>	ABCA7	605414	Sjogren症候群?	
	<i>ABC12</i>	ABCA12	607800	葉状魚鱗癬?, まだら色魚鱗癬?	
B	<i>MDR 1</i>	ABCB1	171050	疎水性物質の輸送/抗がん剤多剤耐性, 潰瘍性大腸炎	
	<i>TAP 1</i>	ABCB2	170260	MHCクラスIの抗原提示/免疫不全症?	
	<i>TAP 2</i>	ABCB3	170261	MHCクラスIの抗原提示/Wegener肉芽腫症?	
	<i>MDR 3</i>	ABCB4	171060	リン脂質の輸送/進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型	
	<i>ABC 14/MTABC 3</i>	ABCB6	603358	ミトコンドリア機能欠損/胎児致死性代謝疾患?	
	<i>ABC 7</i>	ABCB7	300135	X染色体連鎖鉄利用不能性貧血	
	<i>BSEP/SPGP</i>	ABCB11	603201	胆汁酸の輸送/進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型	
C	<i>MRP 1</i>	ABCC1	158343	疎水性と親水性物質の輸送/抗がん剤多剤耐性	
	<i>MRP 2/cMOAT</i>	ABCC2	601107	有機アニオン・トランスポーター/Dubin-Johnson症候群(体質性黄疸)	
	<i>MRP 6</i>	ABCC6	603234	弾性繊維性仮性黄色腫	
	<i>CFTR</i>	ABCC7	602421	Clチャンネル/嚢胞性繊維症	
	<i>SUR 1</i>	ABCC8	600509	スルフォニルウレア・レセプター/家族性持続性高インスリン性低血糖症	
	<i>SUR 2</i>	ABCC9	601439	拡張型心筋症?	
	D	<i>ALD/ALDP</i>	ABCD1	300371	極長鎖脂肪酸の輸送/副腎白質ジストロフィー
		<i>ALDL 1</i>	ABCD2	601081	脂肪酸の輸送/副腎白質ジストロフィー, Zellweger症候群?
<i>PKMP 1</i>		ABCD3	170995	脂肪酸の輸送/Zellweger症候群?	
G	<i>MXR/BCRP</i>	ABCG2	603756	プロトポルフィリン症?	
	<i>White 3</i>	ABCG5	605459	フィトステロール血症	
	<i>White 4</i>	ABCG8	605460	フィトステロール血症	

1) OMIM: Online Mendelian Inheritance of Men

2) 表中の?マークは、関連が示唆されるものの、各ABC膜輸送タンパク質遺伝子をそれぞれの疾病の責任遺伝子として遺伝学的に確定するまでには至っていないことを示す。

中間体のスナップショットを得る必要があるだろう。また、このような基盤機構が明らかになった次は、それぞれのサブファミリーのみに特徴的な機能ドメインの役割を構造から理解することが必要である。例えば、CサブファミリーのMRP1やMRP2には、上記Sav1866と相同性の高いヒトMDR1には存在しない膜貫通ドメインTMD1が存在するし、嚢胞性繊維症の責任遺伝子産物CFTRにはRドメインが存在する(図1)。基質結合の親和性を決定しているのは、意外にも基質結合部位そのものではなく、このTMD1であることが明らかになり¹⁵⁾、また基質の通過経路の開閉に関与するという報告もなされて¹⁶⁾、その重要性が認識され始めた。一方、RドメインはPKAによってリン酸化されることによりチャンネルの活性化に関与することが分かっている¹⁷⁾。TMD1やRドメインは、一体どのような構造変換を介して、基質親和性、基質通過経路の開閉やチャンネルの活性化に関与しているのか、今後の解析が待たれる。

4. ABC膜輸送タンパク質の生理機能と遺伝性疾患

Tangier病, Stargardt病, 肝内胆汁うっ滞症, Dubin-Johnson症候群, 嚢胞性繊維症, 低血糖症, 副腎白質ジス

トロフィーなどの遺伝病や遺伝子破壊マウスの病態解析から、ABC膜輸送タンパク質は様々な生理機能を担っていることが明らかになってきた(表1)。さらに、ABC膜輸送タンパク質の疾病への関与は単一遺伝子疾患にとどまらず、Alzheimer病, 黄斑変性症, 潰瘍性大腸炎, 動脈硬化, 免疫不全症, プロトポルフィリン症, フィトステロール血症など、いくつかの疾患の発症リスクや病態にも関与することが明らかになり始め、臨床的な意義もますます大きなものとなってきた。一方、ABC膜輸送タンパク質の遺伝子多型が耳あかタイプの決定に関与するというユニークな報告は、ヒトの遺伝進化を考察する上で有力なツールになることが期待される¹⁸⁾、タンパク質合成の開始因子に結合して翻訳過程に必須の役割をはたすものも酵母やアフリカツメガエルで報告され¹⁹⁾、ABC膜輸送タンパク質は想像以上に広い生理機能を担っていることが推測される。以下、異物・薬物輸送に関与するATP加水分解共役型排出輸送体を中心に、生理機能とその破綻による疾病について紹介する。

(1) P糖タンパク質/MDR1/ABCB1

MDR1は最初に同定されたABC膜輸送タンパク質であり、物質の膜透過(permeability)に関与する糖タンパク

質ということで、P糖タンパク質とも呼ばれる。その後同定されたMRP (multidrug resistance protein) 群なども含めて、抗がん剤耐性に関与するATP加水分解共役型排出輸送体は外界と接する臓器に特異的に発現する傾向が示唆されている。このことから、抗がん剤耐性に関与するATP加水分解共役型排出輸送体の生理機能として、外界から移入される薬物・毒物を生体から排除する働きが推察されるわけである。実際に、P糖タンパク質は、血液脳関門部位で高い発現がみられるが、*Mdr3* (ヒト *MDR1/ABCB1* 遺伝子のオルソログ) 遺伝子破壊マウスは抗がん剤を含む薬物に対する感受性が増し、特に脳への影響が大きく、野生型マウスではP糖タンパク質が血液脳関門で薬物・毒物の排除に働いていることが示された²⁰⁾。

また、P糖タンパク質の発現は腸でも高いが、*Mdr3* 遺伝子破壊マウスを長期飼育すると、クローン病などの潰瘍性大腸炎に似た症状を呈する²¹⁾。P糖タンパク質は、腸内細菌が生産する何らかの物質が生体内に進入して免疫系を活性化することを防いでいると解釈される。さらに私たちは5節で詳述するように、*Mdr3* 遺伝子破壊マウスでは野生型マウスに比較し、腸管における腫瘍形成が顕著に抑制されるという結果を得た。実際にヒトでも、P糖タンパク質の機能や発現量の個人差が、潰瘍性大腸炎や大腸がんの発症リスクになることが、ゲノム疫学的解析によって明らかにされつつある^{22~24)}。

(2) MDR3/ABCB4

多剤耐性に関与しない *Mdr2* 遺伝子 (ヒト *MDR3/ABCB4* のオルソログ) の遺伝子破壊マウスでは、血清中のビリルビン、アルカリホスファターゼなどの酵素活性が上昇しており、肝機能障害が推測された²⁵⁾。実際、肝組織に関する病理学的検討の結果、胆管細胞の増殖や炎症が観察された。胆汁成分の分析を行った結果、*Mdr2* 遺伝子破壊マウスではリン脂質の分泌が顕著に減少していることが明らかになった。リン脂質不在の胆汁が毛細胆管細胞膜からリン脂質、コレステロールを溶出させ、その結果、肝に障害を与えるのではないかと考えられている。

このような *Mdr2* 遺伝子破壊マウスが示す表現型は、3型の進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の臨床所見に一致している。胆汁は胆汁酸、電解質、脂質により構成され、腸で脂肪の乳濁、ぜん動増加および腐敗の防止を行う。また、胆汁は肝臓から胆管を経由して十二指腸に放出されるが、この胆汁流 (bile flow) は、各成分の能動輸送により生ずると考えられている。この胆汁産生や胆汁流の衰弱した状態が胆汁うっ滞である。3型の患者では *MDR3* の mRNA とタンパク質が欠如していること、さらに *MDR3/ABCB4* 遺伝子に変異を持つことが示された²⁶⁾。

(3) BSEP/SPGP/ABCB11

一方、2型進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の責任遺伝子

もABCトランスポーターファミリーであることがわかった²⁷⁾。この遺伝子、*BSEP/SPGP* (bile salt export pump/sis-ter p-glycoprotein) は名前の通り、胆汁酸を主な基質とする *MDR1* 遺伝子に類似の遺伝子であり、やはり肝臓で発現している。

(4) MRP1/ABCC1

MRP1は広範な組織で発現している。MRP1は *in vitro* でロイコトリエンC4などを含むグルタチオン抱合体を輸送することから、アナフィラキシーや喘息に関係する可能性が考えられていた。実際、野生型マウスの耳をアラキドン酸で処理すると炎症の指標である血管透過性が増して浮腫を起こすが、*Mrp1* 遺伝子破壊マウスではこの反応が起こらない²⁸⁾。また、*MrpP1* 遺伝子破壊マウスはエトポシドなどの抗がん剤に感受性になることから、生体の広範な組織でP糖タンパク質同様、薬物・毒物の排除による生体の防御に働いていると考えられる。

(5) MRP2/cMOAT/ABCC2

ラットの胆管から調製した膜ベシクルを用いた薬理学的研究から、正常の胆管には直接ビリルビンや他の有機アニオンを輸送する活性が存在することが分かっており、この輸送体活性を担っている仮想タンパク質は *Mrp2/cMoat* (canalicu-lar multispecific organic anion transporter) と命名されていた。また、この活性を欠いたラットの責任遺伝子としてラット *Mrp2/cMoat* 遺伝子が単離された²⁹⁾。

一方、ヒトにおける *MRP2/cMOAT/ABCC2* 遺伝子は抗がん剤感受性機構の研究分野から、薬剤排出トランスポーターとして同定された。MRP2/cMOATタンパク質は、(1)肝臓の胆管側膜に特異的に発現していること、(2)MRP2/cMOATに近縁のMRP1はグルタチオンおよびグルクロン酸抱合体を排出すること、(3)ビリルビンはグルクロン酸抱合をうけて肝臓より排出されるが、その排出障害が遺伝性黄疸Dubin-Johnson症候群の原因であると考えられていることより、我々は *MRP2/cMOAT/ABCC2* 遺伝子がDubin-Johnson症候群の責任遺伝子であると想定し、患者で変異を同定することを試みた結果、6家系7人の患者から4種類の変異が同定され、ヒトにおいても異物・薬物輸送タンパク質の実体はABCC2であることを証明した^{12,13)}。

5. ATP加水分解共役型排出輸送体と発がんとの予想外の関連

最後に、ATP加水分解共役型排出輸送体の発がんへの関与という予想外の結果について紹介する³⁰⁾。

きっかけは、がん細胞の多剤耐性獲得に至るP糖タンパク質の発現亢進機構につき解析を進める過程で、がん化の段階においても発現の変動が見られることから、P糖タンパク質のがん化への関与があるかもしれない、と考えた

表2 ATP加水分解共役型排出輸送体により輸送される発がん物質

排出輸送体	発がん物質	発現組織	文献
P糖タンパク質/MDR1	PhIP ヒ素	腸, 肝臓	Walle and Walle, 1999 Liu et al., 2001
MRP1	アフラトキシン B1 NNAL PhIP ヒ素	肺	Loe et al., 1997 Leslie et al., 2001 Walle and Walle, 1999 Liu et al., 2001
MRP2	PhIP 亜ヒ酸塩	肝臓, 小腸	Dietrich et al., 2001 Dietrich et al., 2001
BCRP	PhIP	小腸, 大腸, 肝臓	van Herwaarden et al., 2003

PhIP, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine; NNAL, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol

ことであった。上述したように、P糖タンパク質は外界から移入される異物、毒物を生体から排除する働きがあるので、もし発がん物質も基質の一つであるならば、P糖タンパク質は生体を発がんから防御する働きをになっていると考えられる。実際、表2のように、様々な発がん物質がATP加水分解共役型排出輸送体の基質になるという報告がなされている。一方、P糖タンパク質は抗アポトーシスに働くという報告があり³¹⁾、また、P糖タンパク質の発現と大腸がんの浸潤、転移に正の相関があることが報告されていることから³²⁾、P糖タンパク質はむしろ腸管の発がんを促進的に働く可能性もある。この二つの可能性のいずれが正しいのか、そもそもP糖タンパク質は発がんに関与しているのか、ということを確認するために、私たちはマウスの発がんモデルを用いることにした。

(1) 遺伝子欠損マウスを用いた実験病理解析

P糖タンパク質の発がんへの関与を明らかにするために、ヒト家族性大腸ポリポーシスのマウスモデルで腸管にポリープを多数発生するApc^{Min}マウスにP糖タンパク質の変異アリルを導入して二重欠損変異マウスを作製し、1年後の自然発がん率を解析した。結果は明らかであり、小腸、大腸いずれにおいても、P糖タンパク質欠損マウスでは腫瘍形成が抑制された(図7)。特に、腸管腫瘍の多発部位である遠位小腸では、差異の有意差を示すP値は0.0008を示した。このような予想外の結果であったが、期せずして他のグループからも同様な結果が報告された³³⁾。さらに、その後、ラットの化学誘発肝および乳がんが、P糖タンパク質阻害剤により抑制されるという報告もなされ、結果の信憑性が裏付けられた^{34,35)}。

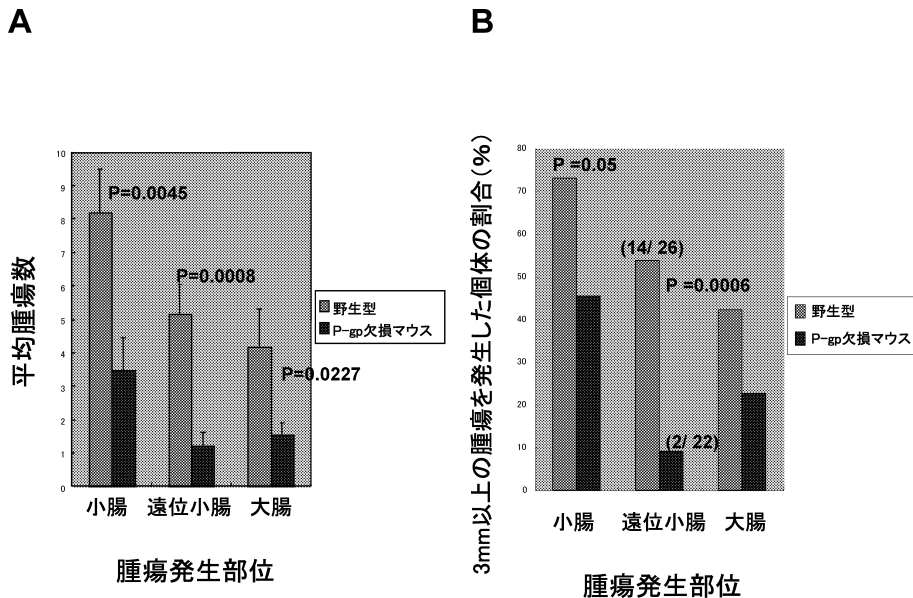


図7 P糖タンパク質欠損マウスにおける腸管腫瘍数とサイズの減少

P糖タンパク質欠損マウス(濃い灰色)および野生型マウス(薄い灰色)における腸管腫瘍数(A)とサイズ(B)を、腫瘍発生部位別に示した。解析マウス個体数は、P糖タンパク質欠損マウス22頭、野生型マウス26頭である。また、統計学的有意差をP値として示している。カッコ内の数字は、3mm以上の腫瘍を発生した個体数/解析総数、を示す。

これは、発がん物質を排出して腸管細胞を防御しているという予測とは一見逆の結果であったので、まず、腸管粘膜上皮細胞において、発がん物質による DNA 障害の状況が、P 糖タンパク質欠損マウスと野生型マウスの間で異なるのか否かを解析した。図 8 に示されるように、代表的な DNA 障害の一つである 8-オキシグアニンの量は、小腸、大腸いずれにおいても P 糖タンパク質欠損マウスで増加していたので、P 糖タンパク質が DNA 障害物質から腸管細胞を防御していることは間違いないようである。

次に、DNA 障害からがん細胞発生への経路を探るために、BrdU 染色と染色細胞の追跡により腸管細胞のターンオーバーを解析した (図 9)。BrdU は DNA 合成の基質なので、DNA 合成が活発な細胞に取り込まれる。また、染色された細胞を追跡することにより、移動状況を追うことができる。その結果、1) P 糖タンパク質欠損マウスでは陰窩 (crypt) の底部において DNA 合成が数倍活発化していること、2) P 糖タンパク質欠損マウスでは、陰窩底部から絨毛方向への腸管上皮細胞の移動が活発化していること、3) 野生型では 22 時間で染色細胞の 6% のみが失われているのに対し、P 糖タンパク質欠損マウスでは 35% 減少していること、が分かった。以上の結果から、現在図 10 のような作業仮説を考えている。すなわち、野生型マウスでは腸管粘膜に P 糖タンパク質が発現しており、発がん物質などによる DNA 障害から上皮細胞を防御している。遺伝子破壊マウスでは、そのような物質が細胞内に侵入し DNA を障害する。その結果、粘膜上皮細胞はアポトーシスやアノキスといった細胞死機構により腸管に剥がれ落ちていく。減少した細胞を補充するために、陰窩底

部の増殖帯で細胞増殖が活発化し、底部から絨毛方向への腸管上皮細胞の移動も活発化する。

この作業仮説が正しいか否かは今後検証していくべき重要な課題であるが、少なくとも「DNA 障害ががん化に促進的に関与する」、あるいは「増殖の活発化もがん化に促進的に関与する」という短絡的な構図は、組織構築の枠組みで個体レベルの発がんを考えれば、必ずしも当てはまらないことを示す好例と言えよう。

(2) 発現量に関与する SNP (single nucleotide polymorphism) の同定

P 糖タンパク質の発がんへの関与はヒトでも当てはまるのであろうか。現在、ヒト P 糖タンパク質の欠損が遺伝性疾患に結びつく例は報告されていない。そこで、ヒトを対象にした関連解析に移行するために、遺伝子多型の同定と腸管粘膜および肝組織における発現量との相関を明らかにした。

ヒト *MDR1/ABCB1* 遺伝子については Hoffmeyer らが初めて包括的な遺伝子多型の検索結果を報告した³⁶⁾。健康人の十二指腸バイオプシーを用いた解析を進め、アリル頻度の高い 3435C>T について、P 糖タンパク質の発現レベルおよび P 糖タンパク質の基質であるジゴキシンの血中濃度と相関することを報告している。しかしながら、その後 3435C>T については、相矛盾する結果が報告されているし、また、アミノ酸置換を伴わない塩基置換なので、P 糖タンパク質の発現レベルや薬物の体内動態へどのように関与するのかが不明である。私たちは、遺伝子発現に直接的に関与する 5' 制御領域に注目し、8 種類の SNP を同定した³⁷⁾。その中の 5 SNP を用いてハプロタイプを組むと 96% は三つのハプロタイプでカバーできることが分かった (表 3)。既存の SNP を併せて解析した結果、日本人集団においては、3435C>T は大腸における *MDR1* の発現レベルと相関せず、5' 制御領域の SNPs およびそれらのハプロタイプが良く相関するという結果を得た³⁷⁾ (図 11)。これで、ヒトを対象にした関連解析に移行するための準備が調ったので、ヒト発がんへの P 糖タンパク質の関与について解析を進めた。

表 3 *ABCB1/MDR1* 遺伝子 5' 制御領域に同定された SNP とハプロタイプ

ハプロタイプ	-2410	-2352	-1910	-934	-692	頻度 (%)
1	T	G	T	A	T	64
2	T	A	T	A	T	24
3	C	G	C	G	C	8
4	C	A	C	G	C	2
5	T	A	T	G	T	2

ハプロタイプと頻度は、25 人の日本人健康者末梢血由来のゲノム DNA から当該全領域を PCR 増幅後クローン化し、各 10 クローンの塩基配列を解析することにより決定した。

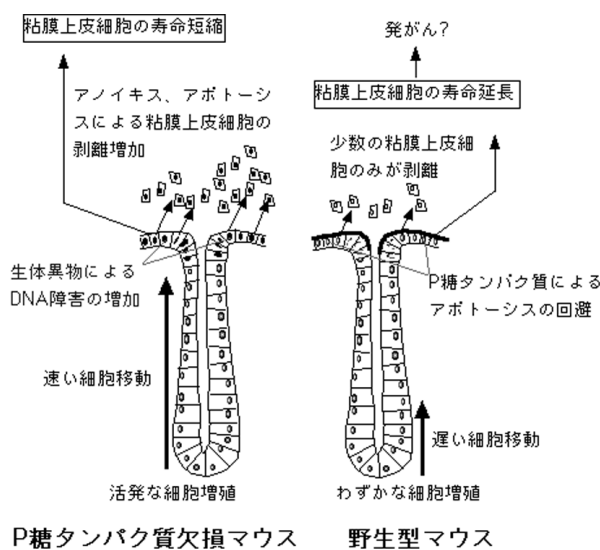


図 10 腸管粘膜および腸発がんにおける P 糖タンパク質の役割。粘膜上皮の細胞膜における P 糖タンパク質の発現と、核における DNA 障害を灰色で示す。

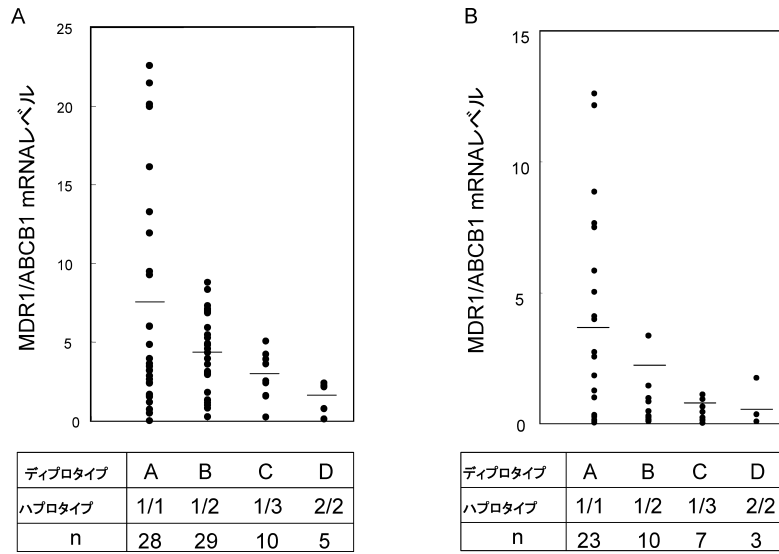


図 11 *ABCB1/MDR1* 遺伝子 5'制御領域のディプロタイプと mRNA レベル
腸管粘膜 (A) および肝組織 (B) における mRNA レベルをリアルタイム PCR
法により測定し、*ABCB1/MDR1* 遺伝子 5'制御領域のディプロタイプとの
相関を解析した。ディプロタイプは、表 3 に記載のハプロタイプの組み合わ
せにより定義している。

(3) 症例対照研究によるヒトでの証明

上記 SNP を用い、大腸がんリスクとの関連を明らかに
するために、健常人ボランティア 783 人を対照とし、大腸
がん患者 460 人を症例として、大腸がんの症例対照研究を
行った。その結果、MDR1 の発現レベルが高いディプロ
タイプ A (メジャーアレル) 保有個体に対し MDR1 の発
現レベルが低いディプロタイプ DE は約 1/2 のオッズ比、
すなわち発症リスクが半分であった (図 12)。このことか

ら、マウス実験病理の結果がヒトでも当てはまることが明
らかになった。

このような予想外の結果は生物学的にも大変興味深い
が、医学、薬学領域への展開が可能である。P 糖タンパク
質は大腸がんに関与することが明らかになった
ので、P 糖タンパク質の機能や発現を抑制すれば大腸がん
を抑制できるかもしれない。P 糖タンパク質はがん細胞
の抗がん剤多剤耐性を担う因子の一つであることから、

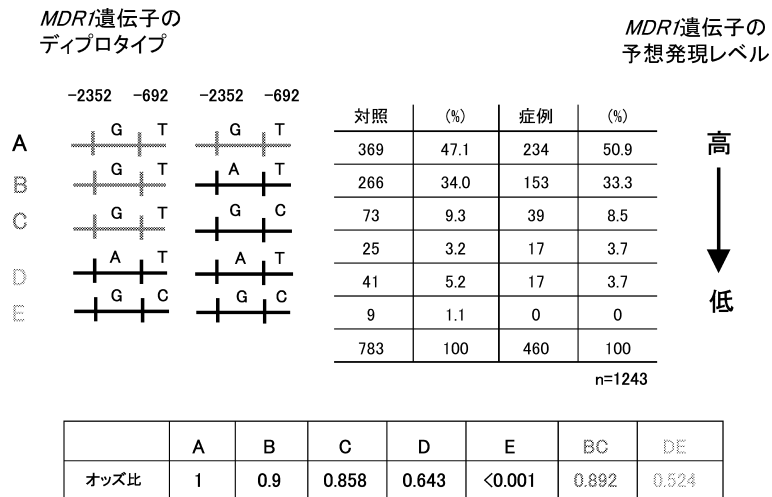


図 12 症例対照研究における、*ABCB1/MDR1* 遺伝子 SNP と大腸がんリス
クの相関

図左側のアルファベットは図 11 に示したディプロタイプを、中のアルファ
ベットは、それを構成している SNP を示す。各ディプロタイプと *ABCB1/*
MDR1 遺伝子発現量との関係を図右側に示す。図下のボックスは、各ディ
プロタイプを有する個体の大腸がんリスクをオッズ比で示す。

verapamil, cyclosporinA, PSC833 に始まり, より特異性の高い OC144-093, XR9576, GF120918, LY335979 など多くの阻害剤が耐性克服薬候補として開発されてきた。これらを利用したがんの化学予防が, 遺伝性など発症のリスクが高い集団には特に有効かもしれないし, グレープフルーツなど, P糖タンパク質の機能や発現を修飾する食物などは健康人に対する発がん予防効果を検証する価値があるかもしれない。

6. おわりに

ヒトゲノムプロジェクトの配列データにより, ヒト ABC 膜輸送タンパク質は 49 種類もの数に昇ることが明らかになってきた。また, 紆余曲折はあるものの, バクテリア ABC 膜輸送タンパク質の結晶構造も解かれはじめ, 輸送のしくみや機能を構造から語れるようになり始めた。一方, P糖タンパク質の同定から 20 年が過ぎようとして, ようやく, 発がんへの関与という意外な機能と病態に関与していることが明らかになった。ATP 加水分解共役型排出輸送体の生理機能の解明と医学・薬学へのリンクは, まだこれからの問題であり, まますます面白い領域になってきた。

なお, 今回紹介できなかった脂質代謝, チャネル機能とその修飾などに関与する ABC 膜輸送タンパク質や, SNP と薬剤応答性, 抗がん剤耐性への関与などについては, 他の総説³⁸⁻⁴²⁾をご参照下さい。また, SNP の同定については九州大学生体防御医学研究所の林健志先生, ヒト大腸がんの症例対照研究については九州大学医学研究院の古野純典先生との共同研究として行われ, その他, 本総説で紹介した私たちの研究は, 久留米大学の桑野信彦先生を始めとする多くの研究者と大学院生の協力により得られたものです。この場をお借りしてお礼申し上げます。

文 献

- Kerr, I.D. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, 85536, 1-18.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F., & Kim, S.H. (1998) *Nature*, 396, 703-707.
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P., & Tainer, J.A. (2000) *Cell*, 101, 789-800.
- Senior, A.E. & Bhagat, S. (1998) *Biochemistry*, 37, 831-836.
- Chang G., Roth, C.B., Reyes, C.L., Pornillos, O., Chen, Y.J., & Chen, A.P. (2006) *Science*, 314, 1875.
- Locher, K.P., Lee, A.T., & Rees, D.C. (2002) *Science*, 296, 1091-1098.
- Dawson, R.J.P. & Locher, K.P. (2006) *Nature*, 443, 180-185.
- Pinkett, H.W., Lee, A.T., Lum, P., Locher, K.P., & Rees, D.C. (2007) *Science*, 315, 373-377.
- Hollenstein, K., Frei, D.C., & Locher, K.P. (2007) *Nature*, 446, 213-216.
- Dawson, R.J.P. & Locher, K.P. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 935-938.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J., & Hunt, J.F. (2002) *Mol. Cell*, 10, 139-149.
- Wada, M., Toh, S., Taniguchi, K., Uchiyama, T., Kohno, K., Yoshida, I., Kimura, A., Sakisaka, S., Adachi, Y., & Kuwano, M. (1998) *Hum. Mol. Genet.*, 7, 203-207.
- Toh, S., Wada, M., Uchiyama, T., Inokuchi, A., Makino, Y., Horie, H., Adachi, Y., Sakisaka, S., & Kuwano, M. (1999) *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 739-746.
- Hashimoto, K., Uchiyama, T., Konno, T., Ebihara, T., Nakamura, T., Wada, M., Sakisaka, S., Maniwa, F., Amachi, T., Ueda, K., & Kuwano, M. (2002) *Hepatology*, 36, 1236-1245.
- Konno, T., Ebihara, T., Hisaeda, K., Uchiyama, T., Nakamura, T., Shirakusa, T., Kuwano, M., & Wada, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 22908-22917.
- Chen, Q., Yang, Y., Li, L., & Zhang, J-T. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 31152-31163.
- Cheng, S.H., Rich, D.P., Marshall, J., Gregory, R.J., Welsh, M. J., & Smith, A.E. (1991) *Cell*, 66, 1027-1036.
- Yoshiura, K.,ほか 38 名 (2006) *Nat. Genet.*, 38, 324-330.
- Chen, Z.-g., Dong, J., Ishimura, A., Daar, I., Hinnebusch, A.G., & Dean, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 7452-7457.
- Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellinghen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P., Berns, A.J.M., & Borst, P. (1994) *Cell*, 77: 491-502.
- Panwala, C.M., Jones, J.C., & Viney, J.L. (1998) *J. Immunol.*, 161, 5733-5744.
- Schwab, M., Schaeffeler, E., Marx, C., Fromm, M.F., Kaskas, B., Metzler, J., Stange, E., Herfarth, H., Schoelmerich, J., Gregor, M., Walker, S., Cascorbi, I., Roots, I., Brinkmann, U., Zanger, U.M., & Eichelbaum, M. (2003) *Gastroenterology*, 124, 26-33.
- Brant, S.R., Panhuysen, C.I., Nicolae, D., Reddy, D.M., Bonen, D.K., Karaliukas, R., Zhang, L., Swanson, E., Datta, L.W., Moran, T., Ravenhill, G., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Karban, A. S., & Cho, J.H. (2003) *Am. J. Hum. Genet.*, 73, 1282-1292.
- Farrell, R.J., Murphy, A., Long, A., Donnelly, S., Cherikuri, A., O'Toole, D., Mahmud, N., Keeling, P.W., Weir, D.G., & Kelleher, D. (2000) *Gastroenterology*, 118, 279-288.
- Smit, J.J.M., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P.J., Groen, A. K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M.T., van Roon, M.A., van der Valk, M. A., Offerhaus, G.J.A., Berns, A.J.M., & Borst, P. (1993) *Cell*, 75, 451-462.
- Deleuze, J.F., Jacquemin, E., Dubuisson, C., Creteil, D., Dumont, M., Erlinger, S., Bernard, O., & Hadchouel, M. (1996) *Hepatology*, 23, 904-908.
- de Vree, J.M., Jacquemin, E., Sturm, E., Creteil, D., Bosma, P.J., Aten, J., Deleuze, J.F., Desrochers, M., Burdelski, M., Bernard, O., Oude Elferink, R.P., & Hadchouel, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 282-287.
- Wijnholds, J., Evers, R., van Leusden, M.R., Mol, C.A., Zaman, G.J., Mayer, U., Beijnen, J.H., van der Valk, M., Krimpenfort, P., & Borst, P. (1997) *Nature Med.*, 3, 1275-1279.
- Paulusma, C.C., Bosma, P.J., Zaman, G.J., Bakker, C.T., Otter, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Borst, P., & Oude Elferink, R.P. (1996) *Science*, 271, 1126-1128.
- Mochida, Y., Taguchi, K., Taniguchi, S., Tsuneyoshi, M., Kuwano, H., Tsuzuki, T., Kuwano, M., & Wada, M. (2003) *Carcinogenesis*, 24, 1219-1224.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., & Smyth, M.J. (2000) *Trends Biochem. Sci.*, 25, 1-6.

- 32) Weinstein, R.S., Jakate, S.M., Dominguez, J.M., Lebovitz, M. D., Koukoulis, G.K., Kuzak, J.R., Klusens, L.F., Grogan, T. M., Saclarides, T.J., Roninson, I.B., & Coon, J.S. (1991) *Cancer Res.*, **51**, 2720–2726.
- 33) Yamada, T., Mori, Y., Hayashi, R., Takada, M., Ino, Y., Naishiro, Y., Kondo, T., & Hirohashi, S. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 895–901.
- 34) Kankesan, J., Yusuf, A., Laconi, E., Vanama, R., Bradley, G., Thiessen, J.J., Ling, V., Rao, P.M., Rajalakshmi, S., & Sarma, D.S. (2003) *Carcinogenesis*, **24**, 1977–1984.
- 35) Kankesan, J., Vanama, R., Yusuf, A., Thiessen, J.J., Ling, V., Rao, P.M., Rajalakshmi, S., & Sarma, D.S. (2004) *Carcinogenesis*, **25**, 425–430.
- 36) Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H.P., Brockmoller, J., Johne, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., & Brinkmann, U. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 3473–3478.
- 37) Taniguchi, S., Mochida, Y., Uchiumi, T., Tahira, T., Hayashi, K., Takagi, K., Shimada, M., Maehara, Y., Kuwano, H., Kono, S., Nakano, H., Kuwano, M., & Wada, M. (2003) *Mol. Cancer Ther.*, **2**, 1351–1359.
- 38) Wada, M., Uchiumi, T., & Kuwano, M. (2003) in MEMBRANE TRANSPORT DISEASES—Molecular basis of inherited transport defects— (Broer, S. & Wagner, C.A. eds), pp. 263–289, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- 39) 和田守正, 内海 健, 桑野信彦 (2001) 生化学, **73**, 537–546.
- 40) 植田和光編 (2005) ABC蛋白質, 学会出版センター.
- 41) 古川龍彦, 秋山伸一 (2006) 生化学, **78**, 110–121.
- 42) Wada, M. (2006) *Cancer Letters*, **234**, 40–50.
-