

- [98] Himmelreich U, Dobson GP. Detection and quantification of free cytosolic inorganic phosphate and other phosphorus metabolites in the beating mouse heart muscle in situ. *NMR Biomed* 2000;13(8):467–73.
- [99] Askenasy N, Navon G. Intermittent ischemia: energy metabolism, cellular volume regulation, adenosine and insights into preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(6):1715–30.
- [100] Ghosh A, Ronner P, Cheong E, Khalid P, Matschinsky F. The role of ATP and free ADP in metabolic coupling during fuel-stimulated insulin release from islet beta-cells in the isolated perfused rat pancreas. *J Biol Chem* 1991;266(34):22887–92.
- [101] Weiss JN, Venkatesh N. Metabolic regulation of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Cardiovasc Drugs Ther* 1993;3:499–505.
- [102] Selivanov VA, Alekseev AE, Hodgson DM, Dzeja PP, Terzic A. Nucleotide-gated KATP channels integrated with creatine and adenylate kinases: amplification, tuning and sensing of energetic signals in the compartmentalized cellular environment. *Mol Cell Biochem* 2004;257(1–2):243–56.
- [103] Carrasco AJ, Dzeja PP, Alekseev AE, Pucar D, Zingman LV, Abraham MR, et al. Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(13):7623–8.
- [104] Pasyk EA, Kang Y, Huang X, Cui N, Sheu L, Gaisano HY. Syntaxin-1A binds the nucleotide-binding folds of sulphonylurea receptor 1 to regulate the KATP channel. *J Biol Chem* 2004;279(6):4234–40.



*contents continued*

**Abstracts**

Abstracts from the 25th Annual ISHR European Section Meeting, Tromso, Norway, June 21-25, 2005.	997
Author Index to Volume 38	1095
Subject Index to Volume 38	1102

**Invitation to join the ISHR**

Meetings of Interest

**Instructions to Authors**

The home page for the *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* can be found at:

<http://www.elsevier.com/locate/issn/0022-2828>

Information about the production stage of an article can then be found by clicking on the hyperlink Author Gateway on the right side of this home page; corrected proofs and final publications can be found by clicking on the small box Science Direct also on the right side of this home page.

The ISHR's home page can be found at: <http://www.ishrworld.org>

Volume 38

Number 6

June 2005

CONTENTS

	Page
<b><i>K<sub>ATP</sub> Channels: From Biogenesis to Disease</i></b>	
<b>I. Neagoe and B. Schwappach</b> Pas de deux in groups of four—the biogenesis of K <sub>ATP</sub> channels	887
<b>A.E. Alekseev, D.M. Hodgson, A.B. Karger, S. Park, L.V. Zingman and A. Terzic</b> ATP-sensitive K <sup>+</sup> channel channel/enzyme multimer: Metabolic gating in the heart	895
<b>M. Matsuo, Y. Kimura and K. Ueda</b> K <sub>ATP</sub> channel interaction with adenine nucleotides	907
<b>T. Miki and S. Seino</b> Roles of K <sub>ATP</sub> channels as metabolic sensors in acute metabolic changes	917
<b>S. Haider, J.F. Antcliff, P. Proks, M.S.P. Sansom and F.M. Ashcroft</b> Focus on Kir6.2: a key component of the ATP-sensitive potassium channel	927
<b>G.C. Kane, X.-K. Liu, S. Yamada, T.M. Olson and A. Terzic</b> Cardiac K <sub>ATP</sub> channels in health and disease	937
<b>K. Yamada and N. Inagaki</b> Neuroprotection by K <sub>ATP</sub> channels	945
<b>C. Moreau, A.-L. Prost, R. Dérand and M. Vivaudou</b> SUR, ABC proteins targeted by K <sub>ATP</sub> channel openers	951
<b><i>Editorial</i></b>	
<b>Z.I. Zhu and C.E. Clancy</b> From mutation to clinical presentation: mechanisms in the black box	965
<b><i>Original articles</i></b>	
<b>J.P.P. Smits, T.T. Koopmann, R. Wilders, M.W. Veldkamp, T. Opthof, Z.A. Bhuiyan, M.M.A.M. Mannens, J.R. Balsler, H.L. Tan, C.R. Bezzina and A.A.M. Wilde</b> A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families *	969
<b>C.R. Partridge, E.S. Williams, R. Barhoumi, M.G. Tadesse, C.D. Johnson, K.P. Lu, G.A. Meininger, E. Wilson and K.S. Ramos</b> Novel genomic targets in oxidant-induced vascular injury	983

\* Accompanied by an Editorial in this issue

contents continued on inside back cover



0022-2828 (200506) 38:6;1-U

Journal is covered in Index Medicus, EMBASE and Current Contents

Printed in France by Jouve, Paris  
This journal is printed on acid-free paper

*Frontiers in Cancer Treatment*

# 癌治療と宿主

—別刷—

---

**(株)メディカルレビュー社**

〒113-0034 東京都文京区湯島 3-19-11 イトーピア湯島ビル Tel. 03-3835-3041

# ABC トランスポーター研究の動向 —ABC 蛋白質の進化と多剤耐性

*Recent development of ABC transporter research*

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻細胞生化学研究室 ————— 木村泰久  
同 応用生命科学専攻細胞生化学研究室 ————— 松尾道憲  
同 応用生命科学専攻細胞生化学研究室教授 ————— 植田和光

## はじめに

真核生物の ABC 蛋白質の原型は、非特異的に脂溶性物質を結合し体外へ排出することによって生体異物から体を防御する「非特異的生体異物排出ポンプ」である、と一般的にはとらえられているのではないだろうか。それは、第1にはヒト ABC 蛋白質の研究が癌の多剤耐性の研究から始まったことが影響していると考えられる。最初にみつかったヒト ABC 蛋白質ファミリーの遺伝子は多剤耐性癌細胞から単離された *MDR1* (*ABCB1*) であり、MDR 1 の発現だけでさまざまな抗癌剤が排出され、細胞は多剤耐性になる。次に単離されたのは遺伝病嚢胞性線維症の原因遺伝子 *CFTR* (*ABCC7*) であり、それ自身が Cl<sup>-</sup> チャンネルとして機能する特殊な ABC 蛋白質であったが、それに引き続いて単離されたのが *MRP1* (*ABCC1*) であり、MRP 1 はグルタチオンやグルクロン酸付加を受け解

毒された生体異物を基質として輸送することが明らかになった。このような研究の経緯から「ABC 蛋白質=非特異的生体異物排出ポンプ」という概念が生まれたと思われる。

さらに、このような歴史的な要因と同時に、MDR 1 の機能の特異さが癌化学療法や薬物動態の領域に強いインパクトを与えたことが「ABC 蛋白質=非特異的生体異物排出ポンプ」という概念の定着に影響したと思われる。つまり MDR 1 の輸送する基質の構造の多様さ、種類の多さはそれまでの酵素や受容体の基質・リガンドとの相互作用を表す「鍵と鍵穴」という概念から完全に逸脱していた。このような性質こそ、癌細胞の多剤耐性を引き起こす元凶であるが、MDR 1 の発見までは考えられないことだった。

しかし、近年遺伝病の解析などから ABC 蛋白質がそれぞれの組織で特異的な脂質を生理的基質として輸送し、体内の脂質ホメオスタシスに関与することが明らかになりつつある。本稿では、ヒトの ABC 蛋白質

# 最近における薬剤耐性の研究の進歩

の生理的役割と基質認識について考察した。

## ABC 蛋白質の進化と多剤認識能の獲得

MDR1のコードするP糖蛋白質の発見者であるLing博士らは、最近、線虫の染色体上の60のABC蛋白質遺伝子の系統発生樹解析を行い、ヒト49種、酵母30種、ハエ57種のABC蛋白質遺伝子との比較を行った<sup>1)</sup>。その結果、それぞれの種間で同じ機能を保持していると思われる遺伝子(オーソログ遺伝子)の比率は期待よりも低く、ヒトと線虫間で16%、酵母と線虫間で10%にすぎなかった。酵母と線虫のあいだでオーソログ遺伝子対を形成する割合が57%にも達する遺伝子ファミリーも報告されており<sup>2)</sup>、それとは対照的であった。ABC蛋白質遺伝子ファミリーは、生理的役割が進化の途上で特に保存されてきたわけではなさそうである。さらに興味深いことに、いわゆる多剤トランスポーターとして機能するABC蛋白質であるMDR1(ABCB1)、MRP1(ABCC1)、BCRP(ABCG2)はそれぞれABCB、ABCC、ABCGサブファミリーに属することから、ABC蛋白質はさまざまな構造の基質を認識するという特殊な性質を進化の途上で少なくとも3回は獲得したことになる。ABC蛋白質ファミリーに属するトランスポーターは、ほとんどすべての生物のほとんどすべての細胞で機能しており、生物界で最大といえるほどの大きな遺伝子ファミリーを形成している。このように、1つの生物種に多くのファミリー遺伝子が存在するにもかかわらず別種の生物を比較したときにオーソログ遺伝子が少ないということは、遺伝子重複と欠失が進化の途上で頻繁に繰り返され、それぞれの生物において膜を介して輸送されるおのおのの化合物に適応した結果と思われる。さらに、次に述べるように、脂質二重層中に存在する脂溶性基質を認識するというABC蛋白質の特殊な基質認識機構は、さまざまな構造の基質への適応を可能にしたのではないだろうか。

## MDR1の基質認識機構

現時点においてMDR1の構造生物学的知見は限られており、MDR1がどのようにして基質を結合し輸送するのか不明である。しかし、発現ベクターを導入してMDR1を薬剤感受性細胞で発現させると、細胞は構造や作用点に類似性のない多くの薬剤に対して耐性になる<sup>3)</sup>。さらに、それら薬剤の細胞内蓄積量がATP依存的に減少すること、MDCKやLLC-PK1などの極性をもった上皮細胞に発現させると薬剤が頂端側へ経細胞輸送される<sup>4)</sup>こと、MDR1に結合する薬剤によって輸送が競合的に阻害されることなどから、MDR1が抗癌剤を含むさまざまな薬剤を直接結合し輸送していることは明らかである。培地に添加したカルセインAMが細胞内のエステラーゼによってカルセインに変換される前にMDR1によって排出されることから、基質結合部位がMDR1の脂質二重膜に埋め込まれた領域に存在すると考えられている。また、MDR1によって輸送される基質の分子量は、約300~2,000のあいだであり、たとえばペプチド性の物質では、輸送されるのは3~15アミノ酸のあいだである。脂質二重膜に埋め込まれた基質結合部位は、さまざまな大きさや構造の基質に適応できる性質をもっていると思われる。MDR1の基質結合部位に関しては、少なくとも2つの可能性が考えられる。1つめは結合部位が非常に柔軟性に富み、基質の大きさによって結合部位が適応して変化するというモデル、2つめは大きな基質ポケットはいくつかのポケットから構成されており、小さな基質はそのどれかのポケットに適合すれば基質として認識され、大きな基質はいくつかのポケットと同時に相互作用するというモデルが予想される。

これまでのMDR1の基質結合に関する生化学的研究をまとめると、MDR1には複数の輸送基質結合部位が存在すると思われる。それらの輸送基質結合部位には協調性があり、互いにアロステリックに影響するようである。たとえばShapiroらは、輸送基質であ

る Hoechst 33342 と Rhodamine 123 が異なる基質結合部位に結合し (H-site, R-site), 相互に輸送活性を促進すると報告している<sup>9)</sup>。さらにプロゲステロンは上記の 2 つとは異なる場所に結合し (P-site), R-site, H-site 両方の輸送活性を上昇させる。一方, Martin らは輸送基質結合部位とは別に薬剤の結合サイトが存在し, 輸送基質結合サイトをアロステリックに制御すると報告している<sup>9)</sup>。

## MDR1 のホモログ遺伝子 MDR2

MDR1 の基質認識機構を考えると, MDR1 の最も相同性の高いホモログ遺伝子であり, 第 7 染色体上の MDR1 の隣に存在する MDR2 (ヒトでは MDR3 とも呼ばれる) が重要な情報を与えてくれる。MDR2 がホスファチジルコリンを生理的基質として輸送することは, *mdr2* 遺伝子ノックアウトマウスの解析から明らかになった<sup>7)</sup>。胆汁に含まれている胆汁酸は非常に強力な界面活性作用をもっており, 食物中の脂肪を乳化し小腸での脂肪の消化・吸収を促進させる。胆汁中には胆汁酸と同時に大量のホスファチジルコリンが分泌され, 食物と出会うまで胆汁酸をホスファチジルコリンのミセルのなかに封じ込めることによって胆汁酸の毒性を抑制している。しかし, *mdr2* ノックアウトマウスでは, 胆汁中にホスファチジルコリンを分泌できないため, 胆汁酸分泌が正常に起こらず肝内胆汁うっ滞症になる。肝臓の細胞は, 細胞内でホスファチジルコリンを大量に合成しており, MDR2 はそのホスファチジルコリンを特異的に細胞外へ輸送していると予想されている。MDR1 は短鎖脂肪酸をもったホスファチジルコリン, ホスファチジルエタノールアミン, スフィンゴミエリン, グルコシルセラミドの類縁体を脂質二重層の内層から外層へ移動させる活性をもつと報告されている<sup>8)</sup>。しかし不思議なことに, MDR1 は C<sub>16</sub> や C<sub>18</sub> の脂肪酸をもつ生体膜中のホスファチジルコリンを基質とすることはできない。これらの結果は, *mdr2* のノックアウトマウスの胆汁管には

*mdr1* は正常に発現しているにもかかわらず, *mdr2* の機能を代替できないこととつじつまがあっている。

一方, ヒト MDR1 と MDR2 を酵母で発現させると, どちらも同じペプチド性抗真菌薬に対して耐性になり, その耐性はビンブラスチンやシクロスポリンなどで阻害される<sup>9)</sup>。それゆえ, MDR1 と MDR2 はよく似た基質結合部位をもっていると考えられる。MDR2 が非常に弱いながら抗癌剤を輸送する活性をもつことも報告されており<sup>10)</sup>, MDR2 は MDR1 に似た基質結合部位をもつが, ホスファチジルコリンに対する親和性が特に強いと思われる。逆に, MDR1 は生体異物を基質とするように進化しており, 膜の主要構成成分であるホスファチジルコリンに対する親和性が低いと予想される。

## MDR1 と膜脂質との相互作用

このように, MDR2 は膜の主な構成成分であるホスファチジルコリンを基質として認識する。では, MDR2 と 80% 近くアミノ酸配列が保存されている MDR1 は膜の構成成分と相互作用しないのだろうか? Garrigues らは, 膜中のコレステロールが MDR1 の輸送基質であり, コレステロールが単独で MDR1 の ATP 加水分解を誘導しうること, また MDR1 を発現した細胞から調製したベシクル中のコレステロールが ATP 依存的に存在状態が変化することを報告した<sup>11)</sup>。また, 細胞膜のコレステロール濃度を  $\beta$  シクロデキストリンによって低下させると, Rhodamine 123 の細胞からの排出が有意に低下することも報告されている<sup>12)</sup>。これらの報告は, 主に細胞膜から  $\beta$  シクロデキストリンを用いてコレステロールを引き抜き MDR1 の活性に与える影響をみることによって, MDR1 とコレステロールの相互作用を推測している。われわれは最近, 精製 MDR1 を, コレステロールを含む人工リポソームに再構成することによって MDR1 とコレステロールの相互作用を検討した。その結果, コレステロールは MDR1 と直接相互

# 最近における薬剤耐性の研究の進歩

作用し、輸送基質とMDR1の相互作用にさまざまな影響を与えることを見出した(木村, 投稿中).

## ABC 蛋白質と膜脂質との相互作用

最近, 多くのABC蛋白質が膜脂質を生理的基質として輸送することが明らかになりつつある. ABCA1, ABCA7はアポA-Iにコレステロールとリン脂質を受け渡し高密度リポ蛋白質(HDL)を新生する<sup>13-15</sup>. 致死的な新生児肺サーファクタント欠損症の原因遺伝子として同定された*ABCA3*は, 培養細胞で発現させると細胞内に大きなlamellar body様ベシクルを形成し, そのなかにコレステロールを蓄積する<sup>16</sup>. Stargardt病の原因遺伝子として1997年に同定された*ABCA4*(*ABCR*)は, 光を受けて異性化したロドプシン中のレチナールとホスファチジルエタノールアミンとの複合体の細胞外への輸送に関与していると考えられている<sup>17</sup>. また, ハーフサイズのABC蛋白質である*ABCG5*と*ABCG8*はヘテロ二量体を形成し, 植物ステロールの体外への排出に関与しており<sup>18,19</sup>, *ABCG1*もコレステロールの細胞外への排出に関与していると考えられている<sup>20</sup>. MDR1が膜中のコレステロールと相互作用することを考えあわせると, ABC蛋白質は「それぞれの組織で膜を介して脂溶性基質を輸送する」ことが本来の性質であり, MDR1のような非特異的といえるほど幅広い基質を認識し輸送するといった性質は, 進化の途上で獲得した特異な性質である可能性が考えられる.

## References

- 1) Sheps JA, Ralph S, Zhao Z et al : The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol* 5 : R15, 2004
- 2) Chervitz SA, Aravind L, Sherlock G et al : Comparison of the complete protein sets of worm and yeast : orthology and divergence. *Science* 282 : 2022-2028, 1998
- 3) Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I : Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 3004-3008, 1987
- 4) Ueda K, Okamura N, Hirai M et al : Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 267 : 24248-24252, 1992
- 5) Shapiro AB, Fox K, Lam P, Ling V : Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur J Biochem* 259 : 841-850, 1999
- 6) Martin C, Berridge G, Higgins CF et al : Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 58 : 624-632, 2000
- 7) Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP et al : Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75 : 451-462, 1993
- 8) Helvoort Av, Smith AJ, Sprong H et al : MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87 : 507-517, 1996
- 9) Kino K, Taguchi Y, Yamada K et al : Aureobasidin A, an antifungal cyclic depsipeptide antibiotic, is a substrate for both human MDR1 and MDR2/P-glycoproteins. *FEBS Lett* 399 : 29-32, 1996
- 10) Smith AJ, van Helvoort A, van Meer G et al : MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem* 275 : 23530-23539, 2000
- 11) Garrigues A, Escargueil AE, Orlowski S : The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 10347-10352, 2002
- 12) Troost J, Albermann N, Emil Haefeli W, Weiss J : Cholesterol modulates P-glycoprotein activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem*



## ABC トランスポーター研究の動向— ABC 蛋白質の進化と多剤耐性

- Biophys Res Commun* 316 : 705-711, 2004
- 13) Tanaka AR, Abe-Dohmae S, Ohnishi T et al : Effects of mutations of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding/hydrolysis. *J Biol Chem* 278 : 8815-8819, 2003
  - 14) Abe-Dohmae S, Ikeda Y, Matsuo M et al : Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate high density lipoprotein. *J Biol Chem* 279 : 604-611, 2004
  - 15) Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S et al :  $\alpha_1$ -synuclein modulates turnover of ABCA1. *J Biol Chem* 279 : 15091-15095, 2004
  - 16) Nagata K, Yamamoto A, Ban N et al : Human ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 324 : 262-268, 2004
  - 17) Weng J, Mata NL, Azarian SM et al : Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* 98 : 13-23, 1999
  - 18) Berge KE, Tian H, Graf GA et al : Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290 : 1771-1775, 2000
  - 19) Lee MH, Lu K, Hazard S et al : Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 27 : 79-83, 2001
  - 20) Wang N, Lan D, Chen W et al : ATP-binding cassette transporters G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 9774-9779, 2004

## 創薬ターゲットとしてのABCタンパク質

小林 綾, 木村 泰久, 松尾 道憲, 植田 和光

要約: ABCタンパク質は、よく保存されたATP結合ドメインを1機能分子あたり2つもつ膜タンパク質ファミリーであり、バクテリアからヒトまで生物界に幅広く存在する。ヒトのもつ49種類のABCタンパク質は生理的に重要な役割を負っており、それぞれの遺伝子の異常がさまざまな疾病を引き起こす。特に、癌の薬剤耐性や、糖尿病、動脈硬化などの現代人にとって重大な疾患と関連しており、創薬のターゲットとして重要である。MDR1は幅広い構造の多種類の薬剤を結合し、ATP加水分解に依存して細胞や体内から排出する。MDR1は癌の多剤耐性だけでなく、多くの薬剤の小腸からの吸収性や体内動態と直接結びついており、薬剤の開発において重要である。糖尿病治療薬スルホニル尿素剤の受容体であるSURは、ATP感受性K<sup>+</sup>チャネルの制御サブユニットとして機能し、細胞内代謝状態の変化にともなって膜電位を調節し、膵β細胞からのインスリン分泌および虚血時の心筋細胞保護に重要な役割を果たしている。また最近、ABCA1やABCG5, ABCG8など多くのABCタンパク質が脂質恒常性維持に関与していることが明らかになりつつある。ABCA1はapoA-Iにコレステロールとリン脂質を受け渡し高密度リポタンパク質(HDL)を形成する過程に重要な役割を果たしている。しかし、そのメカニズムや翻訳後調節機構はいまだ未知であり、それらの解明がABCA1をターゲットとした脂質恒常性改善薬の開発には必須である。また、ABCG5やABCG8などのハーフサイズのABCタンパク質が、植物ステロールの吸収の抑制やHDL形成に関与していることが明らかになりつつある。脂質の動態の分子メカニズムの解明および脂質恒常性維持に関与するABCタンパク質をターゲットとした創薬はこれから

佳境に入ろうとしている。

## はじめに

我々は、毎日さまざまなものを食餌、薬などとして摂取しており、それらは消化されつつ小腸まで運ばれ、吸収される。重要な栄養素のうち糖やアミノ酸などの水溶性のものはそれぞれに特異的な輸送体を介して吸収されるので話は簡単である。一方、コレステロールや脂肪酸などは単純拡散で細胞膜を通過し体内に吸収されると考えられる。それと同時に、自然界の有害な脂溶性低分子化合物も単純拡散で膜を通過し体内に侵入する。それ故、我々の体はそれらを何らかの方法で見分けて有害なものを排出する必要がある。たとえば、植物ステロールであるシトステロールとコレステロールの構造の違いはエチル基ひとつだが、コレステロールが摂取量の50-60%が吸収されるのに対して、シトステロールは摂取量の1%以下しか吸収されない。また、脂溶性が高い化合物でも脳内への取り込みや小腸からの吸収性が悪いものが存在する。さらに、複数の薬物を併用投与した時に、時として血中濃度が変化し予期せぬ副作用が見られることがある。これらの脂質や脂溶性化合物の吸収、排出にさまざまなABCタンパク質が密接に関係していることが近年明らかになりつつある。

本稿では、ヒトの体で重要な役割を果たすABCタンパク質のうち、薬物動態、抗癌薬耐性に関わるMDR1、血糖値調節に関わるSUR、脂質恒常性にかかわるABCA1などを中心にABCタンパク質の生理的役割と分子メカニズムを概説し、創薬のターゲットとしての重要性を紹介する。

キーワード: ABCタンパク質, 脂質恒常性, 生活習慣病, 糖尿病, トランスポーター  
 京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 細胞生化学研究室 (〒606-8502 京都市左京区北白川)  
 e-mail: uedak@kais.kyoto-u.ac.jp  
 原稿受領日: 2004年12月22日, 編集委員会依頼原稿  
 Title: ABC proteins as molecular targets for drug discovery  
 Author: Aya Kobayashi, Yasuhisa Kimura, Michinori Matsuo, Kazumitsu Ueda

表1 主なヒトABCタンパク質遺伝子の分類と関連する疾病

通称遺伝子名	新遺伝子名	アミノ酸数	機能・特徴/過剰発現・異常による表現型
ABCA サブファミリー			
ABC1	ABCA1	2261	コレステロール・リン脂質輸送/HDL欠損症
ABC2	ABCA2	2436	脳オリゴデンドロサイト特異的発現
ABC3	ABCA3	1704	肺サーファクタント分泌/新生児呼吸窮迫症候群
ABCR	ABCA4	2273	レチノイン酸輸送/黄斑部変性症
ABCA7	ABCA7	2146	コレステロール・リン脂質輸送
ABCA12	ABCA12	2595	?/II型葉状魚鱗癬
ABCB サブファミリー			
MDR1, PGY1	ABCB1	1280	生体異物排出ポンプ/がん細胞の多剤耐性
TAP1	ABCB2	808	抗原ペプチドのER内への輸送
TAP2	ABCB3	653	抗原ペプチドのER内への輸送
MDR2/3	ABCB4	1279	ホスファチジルコリン輸送/肝内胆汁うっ滞症
ABC7	ABCB7	752	鉄イオウ複合体の輸送(ミトコンドリア)
SPGP, BSEP	ABCB11	1321	胆汁酸輸送/肝内胆汁うっ滞症
ABCC サブファミリー			
MRP1	ABCC1	1531	グルタチオン/グルクロン酸抱合体排出/がん細胞の多剤耐性
MRP2/cMOAT	ABCC2	1545	グルタチオン/グルクロン酸抱合体排出/体質性黄疸
MRP3	ABCC3	1527	グルタチオン/グルクロン酸抱合体排出
MRP4	ABCC4	1325	抗ウイルス核酸誘導体輸送
MRP5	ABCC5	1437	核酸類縁体輸送
MRP6	ABCC6	1503	?/弾性線維性仮性黄色腫
CFTR	ABCC7	1480	クロライドチャネル/嚢胞性線維症
SUR1	ABCC8	1581	ATP感受性Kチャネルサブユニット/低血糖症
SUR2	ABCC9	1549	ATP感受性Kチャネルサブユニット
ABCD サブファミリー			
ALDP	ABCD1	745	極長鎖脂肪酸輸送/副腎白質ジストロフィー
ALDR	ABCD2	740	ベルオキシソーム膜に局在
PMP70	ABCD3	659	極長鎖脂肪酸輸送?
ABCG サブファミリー			
ABCG1	ABCG1	638	コレステロール・リン脂質輸送
ABCP, BCRP	ABCG2	655	抗がん剤耐性, 幹細胞に発現
ABCG4	ABCG4	627	コレステロール・リン脂質輸送
ABCG5	ABCG5	651	植物ステロール排出/シトステロール血症
ABCG8	ABCG8	673	植物ステロール排出/シトステロール血症

## 1. ABCタンパク質とは

ABC (ATP-Binding Cassette) タンパク質は、アミノ酸配列がよく保存されたATP結合ドメインを1機能分子あたり2つもつ膜タンパク質ファミリーであり、バクテリアからヒトまで生物界に幅広く存在する。ABCタンパク質はいずれも類似の2次構造をもち、細胞内ATPによって駆動あるいは制御されているが、トランスポーター、チャネル、レギュレーターに分化し、それぞれの生物で重要な生理機能を果たしている。バクテリアからヒトまであらゆる生物において、それぞれ数10から100程度のABCタンパク質が働いており、遺伝子ファミリーとしても最も大きなもののひとつである。ヒトの染色体には49のABCタンパク質遺伝子がコードされている。

ABCタンパク質のATP結合領域は200アミノ酸に

わたって配列がよく保存されており、図1に示した3つのアミノ酸配列モチーフを含むことが特徴である。

真核生物のABCタンパク質においては、ATP結合領域はちょうどカセットのようにペプチド鎖中に2つ挿入されている。また、バクテリアのABCタンパク質においては、2つのATP結合カセットはサブユニットとして膜貫通サブユニットと分子集合している。ABCタンパク質は、このようにアミノ酸配列のよく似たATP結合領域がカセットのようにいろいろな膜タンパク質に挿入あるいはサブユニットとして使われていることからATP Binding Cassetteの頭文字をとって名付けられた。

ヒトのABCタンパク質で最初に単離されたのは、抗癌薬耐性に関与する薬剤排出ポンプMDR1 (ABCB1) である(1,2)。それに引き続いて単離されたのは白人でもっとも多い遺伝病である嚢胞性線維症

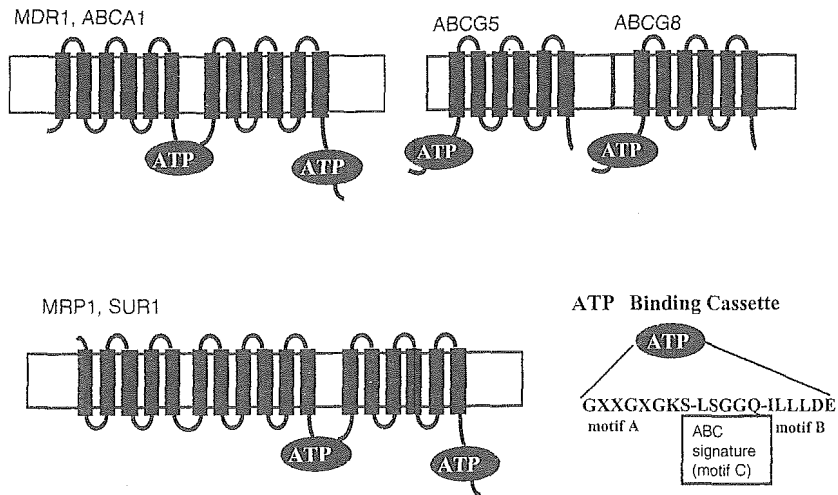


図1 代表的なヒト ABC タンパク質の予想される2次構造  
モチーフA、モチーフB、モチーフCはATP結合領域中で特に保存されたアミノ酸配列

の原因遺伝子産物 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) (ABCC7) であり、それ自身が Cl<sup>-</sup>チャネルであるとともに、外向き整流性 Cl<sup>-</sup>チャネル (ORCC) や容積調節性 Cl<sup>-</sup>チャネル (VRCC) を制御することが知られている。それ以降つぎつぎに ABC タンパク質遺伝子が単離されたが、それらのうち多くが変異があると疾病をひきおこすことが明らかになった。ヒトの ABC タンパク質のうち、機能や疾病との関連が明らかになっているものを表1にまとめた。

## 2. 薬物動態に関わる ABC タンパク質：MDR1

### 1) MDR1：抗癌薬排出ポンプ

抗癌薬の発達によって、急性白血病、悪性リンパ腫などは治癒可能な病気となった。しかし、残念ながら多くの固形癌は抗癌薬に対して感受性が低い。また抗癌薬が有効な癌においても、治療途中で効果が低下し、治療には用いていない抗癌薬、しかも作用機構や構造が異なる複数の薬剤に対しても同時に耐性になることがしばしばある。これらの現象は癌の自然耐性あるいは獲得多剤耐性と呼ばれ、癌による死亡の大半に関係している。MDR1 遺伝子は、この癌の多剤耐性のメカニズムを解明し、克服する方法を見つけようとする研究の過程で発見された。

発現ベクターを導入して MDR1 を薬剤感受性細胞で発現させると、細胞は構造や作用点に類似性のない多くの薬剤に対して耐性になる(3)。さらに、それら薬剤の細胞内蓄積量が ATP 依存的に減少すること、MDCK や LLC-PK1 などの極性をもった上皮細胞に

発現させると薬剤が頂端側へ経細胞輸送される(4)ことから、MDR1 が抗癌薬排出ポンプとして機能することは明らかである。MDR1 は P-糖タンパク質とも呼ばれる。P-糖タンパク質とは、MDR1 遺伝子の発見の約 10 年前の 1976 年に抗癌薬耐性細胞の細胞膜に約 170 kDa の糖タンパク質が高発現していることをカナダの Ling 博士が見つけ、薬剤の透過性 (Permeability) に関係すると予想して名づけた名前である。ヒト MDR1 遺伝子は、28 のエキソンを持ち、100 kb 以上の大きな遺伝子として第 7 染色体上に存在する。その隣には MDR1 とアミノ酸配列が 80% 近く相同な MDR2 (ABCB4) 遺伝子 (ヒトでは MDR3 と呼ばれる) が存在する。ヒトにおいては MDR1 相同遺伝子は、MDR1 と MDR2 の 2 つであるのに対して、マウスには *mdr1a*, *mdr1b*, *mdr2* (ヒト MDR2 に相当する) の 3 つの遺伝子が存在する。興味深いことに、MDR1 が多くの組織で発現し広い基質特異性を持っているのに対して、MDR2 は肝臓で特異的に発現し、ホスファチジルコリンを生理的基質として輸送する(5)。

### 2) MDR1 の基質認識機構

MDR1 は低分子化合物を基質とするタンパク質の中で最も幅広い構造の多種類の基質を認識する。MDR1 と同様に生体異物の排出に関わる MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2) がグルタチオンやグルクロン酸付加を受け、水溶性の増した解毒後の生体異物を基質として輸送するのにに対して、MDR1 は脂溶性生体異物そのものを基質として輸送する。どのような機構で構造に類似性のない多種類の基質を認識でき

るのかはいまだ不明である。この項では、まず MDR1 の基質に関してわかっていることを述べた後に MDR2 との比較をしてみたい。

MDR1 の基質は少なくとも分子の大きさと疎水性という2つの共通点をもっている。MDR1 によって輸送される基質の分子量は、300 から 2,000 の間である。最も小さい基質の一つであるコルヒチンの類縁体を用いた研究では、ある大きさ以下の類縁体は輸送されない。またペプチド性の物質では、輸送されるのは3から15アミノ酸の間である。ABCタンパク質の一種であり抗原ペプチド輸送に関与している TAP1/TAP2 (ABCB2/ABCB3) が最も効果的に輸送するのも8から14アミノ酸のペプチドであり、基質の大きさが MDR1 および TAP 複合体によって輸送されるための重要な因子の一つと考えられる。MDR1 の基質はほとんどが高い疎水性を示す。しかし、ステロイドホルモンの中では最も疎水性の高いプロゲステロンは輸送されず、比較的疎水性の低いコルチゾール、アルドステロン、デキサメサゾンが輸送される(4)。MDR1 は適度な疎水性あるいは両親媒性を持つ物質を輸送していると考えられる。

現時点において MDR1 の構造生物学的知見は限られており、MDR1 がどのようにして基質を結合し、輸送するのかは不明である。しかし、生化学的解析によって MDR1 の脂質2重層に埋め込まれた領域に複数の輸送基質結合部位が存在することが予想されている。それらの輸送基質結合部位には協調性があり、互いにアロステリックに影響していると考えられている。たとえば Shapiro らは輸送基質である Hoechst33342 とローダミン 123 が異なる基質結合部位に結合し (H-site, R-site)、相互に輸送活性を促進すると報告している(6)。さらにプロゲステロンは上記の2つとは異なる場所に結合し (P-site)、R-site, H-site 両方の輸送活性を上昇させる。一方、Martin らは輸送基質結合部位とは別に薬剤の結合サイトが存在し、輸送基質結合サイトをアロステリックに制御すると報告している(7)。

Garrigues らは膜中のコレステロールが MDR1 の輸送基質であり、コレステロールが単独で MDR1 の ATP 加水分解を誘導しうること、また MDR1 を発現した細胞から調製したベシクル中のコレステロールの存在状態が ATP 依存的に変化すると報告している(8)。また、細胞膜のコレステロール濃度を  $\beta$  シクロデキストリンによって低下させると、ローダミン 123 やベラパミルの細胞からの排出が有意に低下することも報告されている(9)。我々は最近、精製 MDR1 をコ

レステロールを含む人工リポソームに再構成することにより、コレステロールが MDR1 と相互作用し、輸送基質と MDR1 の相互作用にアロステリックに影響を与えることを見いだしている(木村, 投稿準備中)。

一方、MDR2 がホスファチジルコリンを生理的基質として輸送することは *mdr2* 遺伝子ノックアウトマウスの解析から明らかである(5)。胆汁に含まれている胆汁酸は非常に強力な界面活性作用をもっており、食物中の脂肪を乳化し小腸での脂肪の消化・吸収を促進させる。胆汁中には胆汁酸と同時に大量のホスファチジルコリンが分泌され、食物と出会うまで胆汁酸をホスファチジルコリンのミセルの中に封じ込めることによって胆汁酸の毒性を抑制している。しかし、*mdr2* ノックアウトマウスでは、胆汁中にホスファチジルコリンを分泌できないため、胆汁酸分泌が正常におこらず肝内胆汁うっ滞症になる。肝臓の細胞は、細胞内でホスファチジルコリンを大量に合成しており、MDR2 はそのホスファチジルコリンを特異的に細胞外へ輸送していると予想されている。MDR1 は短鎖脂肪酸を持ったホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン、グルコシルセラミドの類縁体を脂質二重層の内層から外層へ移動させる活性をもつと報告されている(10)。しかし不思議なことに、MDR1 は  $C_{16}$  や  $C_{18}$  の脂肪酸をもつ生体膜中のホスファチジルコリンを基質とすることはできない。これらの結果は、*mdr2* のノックアウトマウスの胆汁管には *mdr1* は正常に発現しているにもかかわらず、*mdr2* の機能を代替できないこととつじつまがあっている。

ヒト MDR1 と MDR2 を酵母で発現させると、どちらも同じペプチド性抗真菌剤に対して耐性になり、その耐性はビンブラスチンやシクロスポリンなどで阻害される(11)。それ故、MDR1 と MDR2 はよく似た基質結合部位を持っていると考えられる。MDR2 が非常に弱いながら抗癌薬を輸送する活性を持つことも報告されており(12)、MDR2 は MDR1 に似た基質結合部位をもつが、ホスファチジルコリンに対する親和性が特に強いと思われる。逆に、MDR1 は生体異物を基質とするように進化しており、膜の主要構成成分であるホスファチジルコリンに対する親和性は低いと予想される。

### 3. 細胞内代謝レベルのセンサーとして機能する ABC タンパク質: SUR

血中グルコースは細胞のエネルギー源としてだけでなく発達・成長にとって重要であり、それは新生児の

表2 SUR サブタイプの ATP, ADP 結合性

SUR subtype	NBD	K <sub>i</sub> (μM) ATP	K <sub>i</sub> (μM) ADP
SUR1	NBD1	4.4 ± 3.7	26 ± 8.6
	NBD2	60 ± 26	100 ± 26
SUR2A	NBD1	110 ± 41	86 ± 23
	NBD2	120 ± 39	170 ± 70
SUR2B	NBD1	51 ± 13	66 ± 7.5
	NBD2	38 ± 26	67 ± 40

持続性高インスリン性低血糖症 (PHHI) が中枢神経の発達異常を引き起こすことから明らかである。逆に、高血糖はさまざまな障害を全身で引き起こし、日本だけでも 400 万人以上が糖尿病で苦しんでいる。それゆえ、血中グルコース濃度はさまざまな機構で厳密に調節されている。たとえば、膵β細胞 ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネル (K<sub>ATP</sub> チャンネル) は血中グルコースの濃度が上昇するとチャンネル孔を閉鎖し、それによって膜電位が脱分極し、電位依存性カルシウムチャンネルが開く。そして流入したカルシウムイオンによって膵β細胞からのインスリン分泌が起こり、筋肉へのグルコースの取り込みが促される。この時、膵β細胞は血中のグルコース濃度の変化そのものを感知しているのではなく、細胞内に取り込まれたグルコースが代謝され ATP あるいは ADP 濃度が変化することによって K<sub>ATP</sub> チャンネルの開閉が調節されている。

一方、心筋の K<sub>ATP</sub> チャンネルは、普段は閉鎖しており、虚血時など酸素低下によって細胞内の代謝状態が変化した時に開口し、膜を過分極させることによって活動を停止させ、細胞死を免れる (13)。このように K<sub>ATP</sub> チャンネルは、細胞内代謝状態の変化に対応するため、さまざまな組織で重要な生理的スイッチとして機能している。SUR (sulfonylurea receptor) は、世界で最も広範に用いられている糖尿病治療薬スルホニル尿素剤の受容体として発見されたタンパク質であり、ABC タンパク質の 1 つである。SUR は K<sub>ATP</sub> チャンネルの制御サブユニットとして機能しており、創薬の重要なターゲットである。

膵β細胞型 K<sub>ATP</sub> チャンネルと、心筋型、血管平滑筋型 K<sub>ATP</sub> チャンネルでは、通常の代謝状態でそれぞれ開口、閉鎖している点で、生理的特性が異なる。K<sub>ATP</sub> チャンネルは、ABCC サブファミリーに属する ABCC8 (SUR1) または ABCC9 (SUR2) と内向き整流性カリウムチャンネルファミリーに属する Kir6.1 または Kir6.2 の 4:4 のヘテロ 8 量体である。膵β細胞の K<sub>ATP</sub> チャンネルは 4 分子の SUR1 と 4 分子の Kir6.2

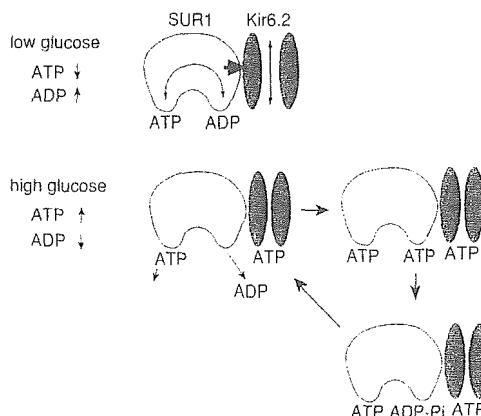


図2 SUR1 による Kir6.2 チャンネルの開閉制御モデル  
細胞内の ATP 濃度が低く ADP 濃度が高い時、SUR1 の NBD1 には ATP が結合し、NBD2 には ADP が結合する。その時 SUR1 は大きく構造変化し、Kir6.2 の構造変化をもたらしてチャンネルが開く。細胞内の ATP 濃度が高く ADP 濃度が低い時、NBD2 に結合した ATP は加水分解されて ADP となったあと遊離する。閉鎖状態の Kir6.2 に ATP が結合し長期閉鎖状態となる。

から構成されているのに対し、心筋型の K<sub>ATP</sub> チャンネルは 4 分子の SUR2A と 4 分子の Kir6.2 から構成されている。このように、それぞれの K<sub>ATP</sub> チャンネルポアを構成する Kir6.2 は同じであるのに対して、SUR サブタイプが異なっており、SUR のサブタイプが生理的特性を決定していると予想されていた。実際に、ATP, ADP に対する親和性は SUR サブタイプ SUR1, SUR2A, SUR2B 間で大きく異なっている (表 2) (14)。さらに、日本人 PHHI の患者で同定された SUR1 の R1420C 変異によって、2 つの ATP 結合領域のうち 2 番目 (NBD2: nucleotide binding domain 2) の ATP, ADP に対する親和性が約 5 倍低下していた (15)。このことから、NBD2 のヌクレオチドに対する親和性は、生理条件下でのチャンネルの開閉に影響することが示唆された。従って、膵β細胞型、心筋型、血管平滑筋型 K<sub>ATP</sub> チャンネルの性質の相違の一部は、NBD のヌクレオチド結合に対する親和性の相違による可能性がある。我々は、SUR の NBD1 に ATP, NBD2 に ADP が結合した形が SUR の活性型で、Kir6.2 サブユニットに作用してチャンネルポアを開口させるというモデルを提出している (図 2)。細胞内の ADP 濃度は代謝状態によって 10 μM から 500 μM の範囲で変化すると考えられており、細胞内の代謝状態が悪い時、つまり ATP 濃度が低く ADP 濃度が高い時は、平衡状態が NBD2 に ADP が結合した状態に傾くため、活性型の割合が多くなると予想される。SUR が活性型するとき、開口シグナルが Kir6.2 に伝えられ、Kir6.2 に ATP が結合できないためチャンネルは開口状態とな

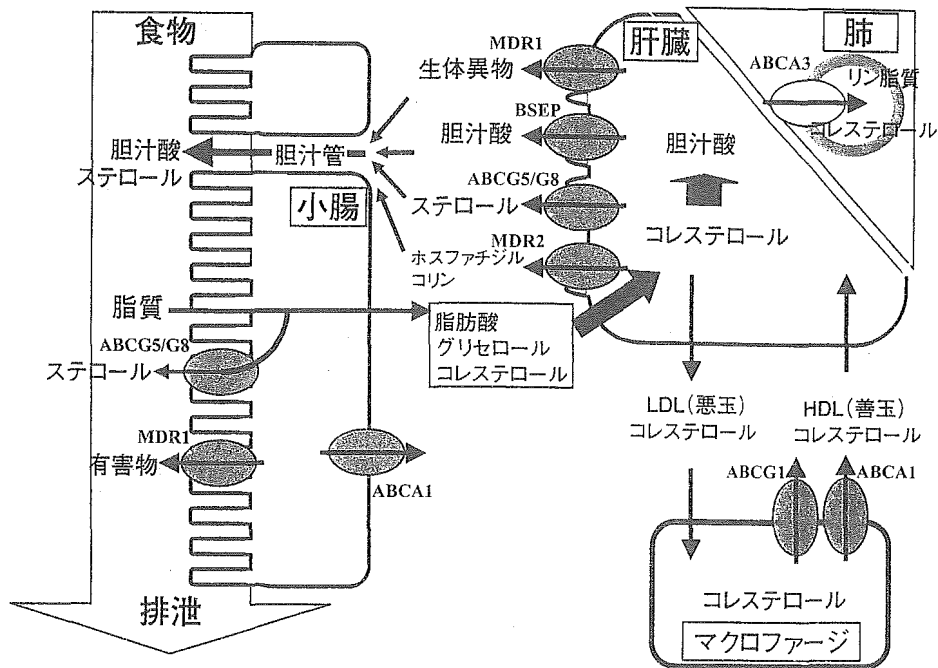


図3 脂質ホメオスタシスに関与する主な ABC タンパク質

る。逆に、細胞内の代謝状態のよい時、つまり ATP 濃度が高く ADP 濃度が低い時は、NBD2 から ADP が解離しやすいため不活性型になり、Kir6.2 に ATP が結合してチャンネルは閉鎖する。これはちょうど GTP 結合タンパク質が GTP を結合したときは活性型、GDP を結合した時は不活性型となり、他のタンパク質の機能を調節するスイッチとして機能するのに似ている。

このモデルの重要なところは、SUR が GTP 結合タンパク質のようにスイッチとして機能するだけでなく、ADP の濃度を感知するセンサーとして機能することである。GTP 結合タンパク質は、GTP 結合型が活性型であり GDP 結合型が不活性型である。GDP を結合した不活性型 GTP 結合タンパク質は、GDP/GTP 交換因子の働きで GDP を放出し、GTP を代わりに結合することによって活性型へと変換する。活性型 GTP 結合タンパク質は、GTPase 促進因子の働きで潜在性加水分解活性が促進され、GTP を GDP に分解し不活性型に戻る。この反応は、Ras による細胞増殖制御をはじめとして、さまざまな GTP 結合タンパク質による生体反応の調節に関与している。しかし、GTP 結合タンパク質は細胞内の GTP と GDP の濃度変化は感知しないし、そもそも細胞内の GTP と GDP の濃度が変化し、それが生体反応の調節に関与するとは考えられていない。SUR は GTP 結合タンパク質のようにスイッチとして機能するだけでなく、ADP

濃度のセンサーとして働くことで  $K_{ATP}$  チャンネルの開閉を制御し、細胞の代謝レベルの監視役として機能すると考えられる。

#### 4. コレステロール恒常性に関わる ABC タンパク質

##### 1) ABCA1 と HDL 形成

末梢細胞ではコレステロールは細胞内で合成されるとともに肝臓から LDL の形で供給される。ステロイド合成をおこなう組織以外ではコレステロールは異化されない。そのため高密度リポタンパク質 (HDL) として肝臓へ逆転送される経路が、末梢細胞からコレステロールが放出される唯一の経路である (図 3)。その HDL 形成に ABC タンパク質である ABCA1 が関与していることが、血中 HDL がなくなる遺伝病であるタンジール病や家族性低 HDL 症の患者の遺伝解析から 1999 年に明らかにされた (16~18)。ABCA1 遺伝子はすでに 1994 年に単離されていたが、機能としてはホスファチジルセリンを脂質二重層の外層へフリップシヤポトシス細胞の貪食に関与する (19)、あるいはアニオンを輸送する活性をもつ (20) と提唱されていた。タンジール病の原因遺伝子としての発見によって、ABC タンパク質である ABCA1 が HDL 新生に重要な役割を果たしていること、ABCA1 がリン脂質だけでなくコレステロールも輸送している可能性が示された。

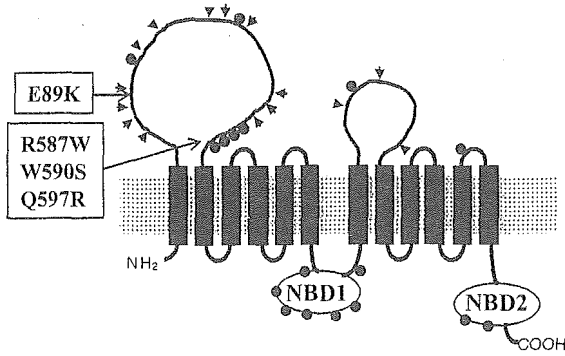


図4 ABCA1の予想される2次構造とタンジール病および家族性低HDL血症を引き起こす ABCA1 遺伝子の変異 E89K 変異は WHAM ニワトリで見つかったアミノ酸置換 ●アミノ酸置換部位 ▼糖鎖付加予想部位

## 2) ABCA1 による HDL 形成メカニズム

これまでにタンジール病や家族性低 HDL 症の患者の ABCA1 遺伝子に多くの変異が同定されているが、その多くが第1細胞外ドメインや ATP 結合領域にマップされている(21)(図4)。ABCA1の第1細胞外ドメインのアミノ酸配列はニワトリからヒトまで非常によく保存されており、重要な役割を果たしていると考えられる。タンジール病を引き起こすアミノ酸置換(R587W, W590S, あるいは Q597R)を第1細胞外ドメインに導入すると、そのうちの2つ R587W と Q597R は細胞内局在に影響を与えることが明らかになった(22)。また、ATP 結合領域の変異によって HDL が形成されなくなることで、ABCA1 が ATP 加水分解活性をもつこと(22)も明らかになっている。ABCA1 を安定発現させた培養細胞の培養液に脂質の結合していない apoA-I を加えると、apoA-I にコレステロールとリン脂質が結合した HDL が培地中に出現する(23, 24)。また、apoA-I と ABCA1 を化学的に架橋することができる。それらの事実から予想される ABCA1 の作用メカニズムは、以下のようなものであろう。つまり、1) apoA-I が細胞膜上の ABCA1 の細胞外ドメインと相互作用する。2) ABCA1 が ATP 加水分解することによって構造変化する。3) 膜中のコレステロールとリン脂質が ABCA1 によって押し出され、apoA-I と複合体を形成する。

しかし、実際に ABCA1 の第1細胞外ドメインが apoA-I との相互作用に直接関与していることを示す証拠はいまだ得られていない。また、ABCA1 が ATP のエネルギーを用いてリン脂質とコレステロールをどのように輸送しているのかについても議論が分かれており、ABCA1 を介した pre $\beta$ -HDL 形成のメカニズ

ムはいまだ明らかではない。

## 3) HDL 形成と ABCA1 の細胞内リサイクリング

C 末端に GFP を融合させた ABCA1-GFP を HEK 293 細胞に安定発現させると、主に細胞膜に発現し、一部細胞内コンパートメントに局在する(22, 25)。ABCA1-GFP の一部は初期エンドソームのマーカーと共局在し、シクロヘキシミドで新規タンパク質合成を阻害した後に、モネンシン(膜タンパク質のエンドソームから細胞膜への移動を阻害する)で処理すると、時間を追って細胞内コンパートメントに局在する ABCA1 の量が増加した(22)。この結果は、ABCA1 はまず細胞膜へ運ばれた後、細胞膜とエンドソームの間をすばやくリサイクリングしていることを示唆している。

タンジール病患者から単離された細胞では、そのような後期エンドソーム循環が起こらないと Neufeld らは報告している(26)。その結果、後期エンドソームにはコレステロールが蓄積する。さらにそれらは界面活性剤では引き抜かれないため、おそらくスフィンゴミエリンとともにマイクロドメインを形成していると思われる。興味深いことにそのコレステロールが蓄積した後期エンドソームには Niemann-Pick 病の責任遺伝子産物である NPC1 が大量に局在している。そのような状態の細胞に ABCA1 発現アデノウイルスを感染させると、後期エンドソーム循環が正常になり、apoA-I 依存コレステロール排出も検出された。正常細胞に発現させた ABCA1-GFP の存在するエンドソームには apoA-I が取り込まれており、NPC1 を含むエンドソームは減少していた。

以上の結果から、ABCA1 は、NPC1 を含んだ後期エンドソーム中の脂質をエンドサイトーシスされた apoA-I と相互作用できるように変換し、最終的には新生 HDL として細胞外へ排出しているというモデルが考えられる(26)。

## 4) ABCA1 の翻訳後の活性調節

コレステロールの過剰な蓄積は細胞にとって有害である。しかし、それと同時に、コレステロールは細胞の生存にとって必須であり、減少しすぎでは増殖できない。それ故、コレステロール合成系の酵素と同様に ABCA1 は転写レベルと同時にタンパク質レベルでも厳密に制御を受け、発現した ABCA1 は半減期 1~2 時間ですばやく分解される。ABCA1 の翻訳後調節機構を明らかにするため、ABCA1 の PDZ 結合モチーフを含む C 末端 120 アミノ酸に結合するタンパク質を酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングしたところ、PDZ タンパク質である  $\alpha$ 1-syntrophin と Lin-7



が、候補として見つかった(27).  $\alpha 1$ -syntrophin は、マウスでは骨格筋、心臓、脳で高発現しており、dys-trophin や utrophin を介して細胞骨格および細胞外マトリクスと複合体を形成することが知られている。そこでマウス脳を可溶化し抗  $\alpha 1$ -syntrophin 抗体を用いて免疫沈降実験を行ったところ、マウス ABCA1 が  $\alpha 1$ -syntrophin とともに沈降したことから、 $\alpha 1$ -syntrophin と ABCA1 が生理的条件下で実際に相互作用していることが明らかになった。つぎに、培養細胞 HEK293 に両者を発現させることによって、 $\alpha 1$ -syntrophin は ABCA1 の C 末端の数アミノ酸を介して強固に結合していること、両者は細胞膜周辺で共局在していることが明らかになり、さらに ABCA1 の分解が抑制され、半減期が約 5 倍長くなることが分かった(27)。Lin-7 にはこのような効果は見られなかったことから、 $\alpha 1$ -syntrophin は特異的に ABCA1 の分解を抑制していると考えられる。

ABCA1 は、apoA-I と相互作用することによってリン酸化状態が変化し、カルパインによる分解に対して抵抗性になることを横山らは報告している(28, 29)。ABCA1 の安定性を決定する細胞内情報伝達に、我々が見いだした  $\alpha 1$ -syntrophin のようなアダプタータンパク質が関与している可能性がある。

### 5) 細胞内ベシクルで機能する ABCA3

ABCA1 と高い相同性をもつ ABCA3 は、致死的な新生児肺サーファクタント欠損症の原因遺伝子として最近同定された。ABCA3 は、肺サーファクタント(肺界面活性物質)を産生・分泌する肺胞 II 型細胞中の lamellar body という構造体の限界膜に特異的に発現している。肺サーファクタントは種々の脂質からなる混合物であり、肺胞内腔の液相-気相界面での表面張力を減らすことによって肺の拡張不全を防いでいる。未熟児では肺サーファクタントの産生が不十分で、肺がうまく膨らまないことが死亡の主因のひとつであり未熟児窮迫症候群と呼ばれる。我々は、ABCA3 の機能を解析するため ABCA3 を安定発現する培養細胞株を樹立した。その結果、ABCA3 によって細胞内に大きな lamellar body 様ベシクルが形成され、ABCA3 はその膜上に存在することが明らかになった。ABCA3 は細胞膜上にはほとんど発現しなかった。Filipin 染色によってそのベシクル中にコレステロールが蓄積していることがわかり、さらに電顕によって脂質を蓄積した multilamellar vesicle 様構造を形成していることが観察された(30)。これらの結果から、ABCA3 は細胞内ベシクル上で機能し、その中に脂質を輸送していることが示唆された。ABCA1 は細胞膜上において

だけでなく、リサイクリングしている細胞内ベシクル上で機能している可能性もあると考えられる。

### 6) ABCA1 とコレステロールの小腸吸収

WHAM (Wisconsin hypoalpha mutant) と名づけられたニワトリは血中に HDL が存在しない。おそらくそのためにカロテノイドが血中に保持されないため白い皮膚と白いくちばしをもつ。遺伝解析の結果、そのニワトリの ABCA1 の第 1 細胞外ドメイン中の 89 番目のアミノ酸がグルタミン酸からリジンに置換(図 4)していることが明らかになった(31)。この WHAM ニワトリでは、食餌中のコレステロールが小腸からほとんど吸収されない。哺乳類では、食物中の脂質成分はそのほとんどがカイロミクロンとして小腸から吸収され、まずリンパ液にはいり、血液を介して肝臓へ運ばれると考えられている。それに対し、鳥類ではコレステロールは小腸から直接血中に HDL として吸収され、即座に肝臓へと運ばれるのである。ヒトの腸由来の培養細胞である Caco-2 においても、ABCA1 は細胞の側面と基底側膜に発現している(32)。以上の結果は、進化的には ABCA1 は小腸からコレステロールを吸収する役割を担ってきており、ヒトにおいてもコレステロールはカイロミクロンを介した経路だけでなく、一部は HDL として血液中に直接吸収されている可能性がある。また、ABCA1 欠損マウスでは血中のビタミン E が大幅に減少することから(33)、ABCA1 はビタミン E などの脂溶性ビタミンの消化管上皮における吸収にかかわっている可能性がある。

### 7) ABCA7

ABCA7 は ABCA1 と相同性が高く、ABCA1 と同じくコレステロール蓄積によって発現誘導される遺伝子として単離された(34)。我々はほぼ同時期に、ABCA1 の第 1 細胞外ドメインのアミノ酸番号 270 から 449 の間のアミノ酸配列が自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の自己抗原 SS-N と高い相同性を持つことを見だし、それをコードしている遺伝子の全長 cDNA を単離した。それは ABCA7 と同一の遺伝子であった(23)。ABCA7 は ABCA1 と比べて発現の組織特異性が高く、胸腺、リンパ節、骨髄、末梢白血球、脾臓、脳などで 8-9 kb の poly(A) RNA として発現しており、免疫系の組織および脳で何らかの機能を果たしていることが示唆された。また、組織特異的にスプライシングされている(35)。ヒト ABCA7 を培養細胞に安定発現させると、ABCA1 の場合と同様に apoA-I に依存してリン脂質とコレステロールを細胞外へ排出する(35, 36)。米国のグループは、マウスの ABCA7 を培養細胞に発現させるとリン脂質は排出す

るが、コレステロールは排出しないと報告した(37)。ABCA7の機能には種特異性があるのかもしれない。ABCA7によるHDL形成の生理的意味はいまだ不明である。

#### 8) ABCG5/ABCG8 およびコレステロール恒常性維持に関するその他のABCタンパク質

我々は、コレステロールと同様にシトステロールを代表とする植物性ステロールなどの非動物性ステロールを毎日摂取している。その量は200~400 mgであり、コレステロールとほぼ同量である。しかし、摂取したコレステロールの50-60%が小腸から吸収されるのとは対照的に、植物性ステロールは1%以下しか吸収されない。その仕組みの中心はABCG5とABCG8である(38, 39)。ABCG5とABCG8はハーフサイズのABCタンパク質であり(図1)、ABCG5とABCG8がヘテロ二量体を形成し植物性ステロールの小腸からの吸収を防ぐとともに、胆汁中に排出している。ABCG5とABCG8遺伝子の変異は植物ステロールの異常な蓄積を引き起こし、常染色体劣性の高シトステロール血症という脂質代謝異常症を引き起こす(38, 39)。また、ABCG5、ABCG8と同様にハーフサイズのABCタンパク質であるABCG1は、ABCA1によって形成されたpre $\beta$ -HDLの成熟に関与していると最近報告された(40)。我々は最近、ABCG1がABCA1とは異なって、apoA-Iに非依存的にリン脂質とコレステロールを輸送することを見い出している(小林, 投稿準備中)。

本稿で述べた以外にも、肝臓中でコレステロールが酵素的に変換され生成した胆汁酸を分泌するABCB11 (BSEP) (41)、ペルオキシソーム内へ長鎖および極長鎖脂肪酸を輸送するABCD2 (ALDP) やABCD3 (PMP70) (42, 43) などさまざまなABCタンパク質が脂質恒常性維持に関与している(図4)。また、脳内の脂質恒常性維持にもABCタンパク質が関与することも示唆され始めた。ヒトは49のABCタンパク質遺伝子をもっており、生理的基質の不明なABCタンパク質がまだ多く残されている。また、ABC

タンパク質と他の脂質輸送に関わるタンパク質の協同性などに関しては、まだほとんど解明されていない。脂質の動態の分子メカニズムの解明および脂質恒常性維持に関与するABCタンパク質をターゲットとした創薬はこれから佳境に入ろうとしている。

### 文 献

- 1) Chen C, et al. Cell. 1986;47:381-389.
- 2) Ueda K, et al. J Biol Chem. 1987;262:505-508.
- 3) Ueda K, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:3004-3008.
- 4) Ueda K, et al. J Biol Chem. 1992;267:24248-24252.
- 5) Smit JJ, et al. Cell. 1993;75:451-462.
- 6) Shapiro AB, et al. Eur J Biochem. 1999;259:841-850.
- 7) Martin C, et al. Mol Pharmacol. 2000;58:624-632.
- 8) Garrigues A, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:10347-10352.
- 9) Troost J, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2004;316:705-711.
- 10) van Helvoort A, et al. Cell. 1996;87:507-517.
- 11) Kino K, et al. FEBS Lett. 1996;399:29-32.
- 12) Smith AJ, et al. J Biol Chem. 2000;275:23530-23539.
- 13) Yamada K, et al. Science. 2001;292:1543-1546.
- 14) Matsuo M, et al. J Biol Chem. 2000;275:28757-28763.
- 15) Matsuo M, et al. J Biol Chem. 2000;275:41184-41191.
- 16) Brooks-Wilson A, et al. Nat Genet. 1999;22:336-345.
- 17) Bodzioch M, et al. Nat Genet. 1999;22:347-351.
- 18) Rust S, et al. Nat Genet. 1999;22:352-355.
- 19) Luciani MF, et al. EMBO J. 1996;15:226-235.
- 20) Becq F, et al. J Biol Chem. 1997;272:2695-2699.
- 21) Singaraja RR, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23:1322-1332.
- 22) Tanaka AR, et al. J Biol Chem. 2003;278:8815-8819.
- 23) Tanaka AR, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2001;283:1019-1025.
- 24) Wang N, et al. J Biol Chem. 2000;275:33053-33058.
- 25) Neufeld EB, et al. J Biol Chem. 2001;276:27584-27590.
- 26) Neufeld EB, et al. J Biol Chem. 2004;279:15571-15578.
- 27) Munehira Y, et al. J Biol Chem. 2004;279:15091-15095.
- 28) Yamauchi Y, et al. J Biol Chem. 2003;278:47890-47897.
- 29) Arakawa R, et al. J Biol Chem. 2002;277:22426-22429.
- 30) Nagata K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2004;324:262-268.
- 31) Mulligan JD, et al. J Biol Chem. 2003;278:13356-13366.
- 32) Chama T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2002;296:625-630.
- 33) Orso E, et al. Nat Genet. 2000;24:192-196.
- 34) Kaminski WE, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2000;273:532-538.
- 35) Ikeda Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2003;311:313-318.
- 36) Abe-Dohmae S, et al. J Biol Chem. 2004;279:604-611.
- 37) Wang N, et al. J Biol Chem. 2003;278:42906-42912.
- 38) Berge KE, et al. Science. 2000;290:1771-1775.
- 39) Lee MH, et al. Nat Genet. 2001;27:79-83.
- 40) Wang N, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:9774-9779.
- 41) Strautnieks SS, et al. Nat Genet. 1998;20:233-239.
- 42) Imanaka T, et al. J Biol Chem. 1999;274:1968-1976.
- 43) Tanaka AR, et al. J Biol Chem. 2002;277:40142-40147.

著者プロフィールは、207頁をご参照下さい。



# Surgery Frontier

メヂカルビュー社

# ABC 蛋白質 —トランスポーター型, チャネル型, 受容体型—

京都大学大学院農学研究科

植田 和光

Kazumitsu Ueda

(教授)

## ABC 蛋白質とは

ABC (ATP-Binding Cassette) 蛋白質は、200 アミノ酸にわたって配列がよく保存された ATP 結合ドメインを1機能分子あたり2つもつ膜蛋白質ファミリー(図1)であり、バクテリアからヒトまで生物界に幅広く存在し、それぞれの生物で重要な生理機能を果たしている。ヒトの染色体には49のABC蛋白質遺伝子がコードされており、それらの異常によってさまざまな疾病が引き起こされる(表1)ことから、ABC蛋白質が生理的に重要であることがわかる。また、バクテリアからヒトまであらゆる生物において、それぞれ数十から100以上のABC蛋白質が働いている。ABC蛋白質は遺伝子ファミリーとしても最も大きなもののひとつであり、生物界全体にとって重要な役割を果たしている。

## ABC 蛋白質の機能の 多様性と生理的役割

ABC蛋白質の大きな特徴のひとつは、いずれも類似の二次構造をもち

Surgery Frontier 12(2) : 55-57, 2005

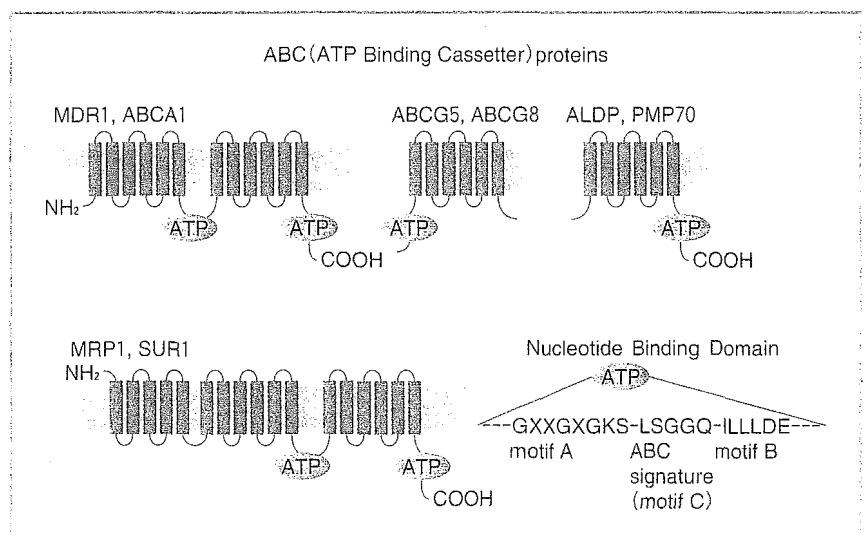


図1 哺乳類ABC蛋白質の代表的な二次構造とATP結合領域に保存されたアミノ酸配列

(図1), 細胞内ATPによって駆動あるいは制御されているにもかかわらず、機能がトランスポーター、チャネル、受容体に分化していることである<sup>2)</sup>。ヒトのABC蛋白質で最初(1986年)に単離された遺伝子 *MDR1* (*ABCB1*) は、さまざまな構造の抗癌剤や薬剤を細胞あるいは体内から排出するトランスポーター(P糖蛋白質)をコードしている<sup>3)</sup>。MDR1 (P糖蛋白質)の輸送する基質の構造の多様さ、種類の多さはそ

れまでの酵素と基質の相互作用の概念から逸脱しており、そのメカニズムの解明は純粋にサイエンスとして興味深いだけでなく、癌化学療法や薬物動態の領域に重要な意味をもつ。

1989年に、白人で最も頻度の高い遺伝病である嚢胞性線維症の原因が *CFTR* (*ABCC7*) の異常であることがわかり、ABC蛋白質のひとつ *CFTR* が  $Cl^-$  チャネルとして機能することが明らかになった<sup>4)</sup>。CFTRは、それ自身