

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18966

研究課題名(和文)ERMタンパク質リン酸化状態およびトランスポーター機能に対する炎症因子の影響

研究課題名(英文)Effects of inflammatory factors on ERM proteins and transporters functions

研究代表者

川瀬 篤史(KAWASE, Atsushi)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：80411578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：様々な疾患の発生や進行に関わっている炎症は、薬物の体内動態にも影響することが知られている。トランスポーターは薬物の体内動態を決定する因子のひとつであり、その膜局在および機能発現には裏打ちタンパク質が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。本課題では、炎症時のERMタンパク質リン酸化状態およびトランスポーター機能に対する炎症因子の影響について検討を行った。今回得られた結果より、一部の炎症性サイトカインがradixinのリン酸化状態を変動し、裏打ちタンパク質としての機能を調整しトランスポーターの膜局在に影響していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Inflammation affects pharmacokinetics of various drugs via alterations of metabolic enzymes and transporters expression. Plasma membrane localization of transporters such as P-glycoprotein and MRPs are regulated by scaffold proteins such as ERM proteins (ezrin/radixin/moesin). However, the effects of inflammation on the phosphorylation of ERM proteins and transporter activities remain unclear. This study demonstrated that some inflammatory factors decrease the ratios of phosphorylated radixin in liver.

研究分野：薬物動態学

キーワード：トランスポーター 裏打ちタンパク質 炎症 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素やトランスポーターの発現および活性は、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。例えば、感染症や炎症性疾患では、活性化した単球/マクロファージから産生された炎症性サイトカインにより、multidrug resistance-associated protein (MRP)2を含むトランスポーターの発現量および活性が変動する。トランスポーター発現および機能変動は、基質薬物の体内動態に影響し、効果減弱や副作用を引き起こす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、臨床上極めて重要である。特に肝臓はウイルス性肝炎など炎症を受けやすいうえ、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、これまでに炎症時の肝臓トランスポーターの発現および機能変動に関する研究に取り組んできた。そのなかで、炎症時の肝臓にてトランスポーター (MRP2, P-糖タンパク質 (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP))の発現量自体は変化しないものの、膜への局在が大きく低下することを明らかにした。したがって、MRP2, P-gp および BCRP の膜局在を決定する何らかの因子が炎症時に変動することが示唆された。

一方で近年、トランスポーターの細胞内局在を制御する因子として、ERM タンパク質 (Ezrin, Radixin, Moesin)が報告された。ERM タンパク質は、細胞質で不活性な closed 型として存在し、C 末がリン酸化を受けると活性な open 型となり、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 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。Radixin は肝臓における主要な ERM タンパク質であるが、Radixin 欠損マウスでは MRP2 の胆管側膜への局在化が低下し、高ビリルビン血症となる。すなわち、Radixin は MRP2 の膜局在において重要な役割を担っている。

このように ERM タンパク質はトランスポーターの機能制御に極めて重要な因子であるものの、炎症時の ERM タンパク質のリン酸化状態 (活性化状態) およびトランスポーター機能に対する影響についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。

2. 研究の目的

炎症状態では、いくつかの薬物トランス

ポーターの発現・機能が変動することが知られている。一方で近年、トランスポーターの細胞膜での安定発現・機能に細胞骨格タンパク質である ERM タンパク質が重要な働きを担うことが指摘されているが、炎症因子の ERM タンパク質活性化およびトランスポーター機能に及ぼす影響については全く明らかとなっていない。例えば、ERM タンパク質のひとつである radixin の肝臓での機能低下は MRP の膜局在を低下させることが知られているが、炎症時に radixin およびトランスポーター活性がどのように変化するかおよびその機構については不明な点が多い。トランスポーター自体を標的とした検討はなされているものの、周辺タンパク質を利用したトランスポーター活性変動についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、炎症モデル動物、炎症因子で処理したサンドイッチ培養肝細胞、細胞株を用い、ERM タンパク質活性化およびトランスポーター発現を targeted proteomics 法により定量する。これにより、炎症時の薬物動態における ERM タンパク質の重要性について考察し、創薬ターゲットとしての ERM タンパク質の可能性を評価する。

3. 研究の方法

(1) ERM タンパク質リン酸化状態、トランスポーター発現および ERM タンパク質-トランスポーター複合体の同時定量法の確立

Control ラットとして AA ラットの作製に適した7週齢雌性SDラットを用い、肝臓を摘出した。肝ホモジネートを常法に従って調製するとともに、膜タンパク質を得た。トランスポーター発現およびリン酸化 ERM タンパク質の検討では、肝ホモジネートでの発現量評価に加えて、膜タンパク質を用いた検討を実施した。サンプルの処理は一般的に行われるタンパク質を還元・アルキル化した後にトリプシン等で酵素消化を行った。今回 ERM タンパク質、トランスポーターおよび ERM-タンパク質トランスポーター複合体の定量法を確立した。

リン酸化 ERM タンパク質はトランスポーターとの複合体形成に関与し、トランスポーターの膜局在および輸送機能発現に関わる。ERM タンパク質-トランスポーター複合体の測定においては免疫沈降後のサンプルを還元・アルキル化後、酵素処理を行った。

(2) AA ラットおよび炎症因子処理細胞における ERM タンパク質発現および機能評価

確立したリン酸化 ERM タンパク質，トランスporter発現および ERM タンパク質-トランスporter複合体の測定条件を用い，AA ラット肝臓および炎症因子を処理した細胞株における ERM タンパク質発現および機能評価を行った。AA ラットを用いた検討では，アジュバント投与 21 日後（慢性期）のラットを用い検討した。

炎症因子としては，炎症性サイトカインである interleukin (IL)-1 β ，IL-6 および tumor necrosis factor (TNF)- α を細胞に添加し検討を行った。さらに，トランスporter機能に対する炎症因子の影響を蛍光基質を用い検討した。

(3) 炎症因子処理 ,ERM タンパク質ノックダウン時の ERM タンパク質リン酸化状態に与える影響

炎症因子処理は前項目と同様に行い ,ERM タンパク質のノックダウンは各ターゲットタンパク質に対する siRNA を用い行った。炎症因子処理または ERM タンパク質ノックダウン時の ERM タンパク質リン酸化状態について検討した。

4 . 研究成果

様々な疾患の発生や進行に関わっている炎症は，薬物の体内動態にも影響することが知られている。トランスporterは薬物の体内動態を決定する因子のひとつであり，近年，その膜局在および機能発現には裏打ちタンパク質が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。本課題では，炎症時の ERM タンパク質リン酸化状態およびトランスporter機能に対する炎症因子の影響について検討を行った。

標的プロテオミクス法によるトランスporterおよび ERM タンパク質の同時定量法の確立では，各タンパク質から定量性の高いペプチド断片を選択し，同一サンプルで一斉に測定可能となった。当初予定していたトランスporterと ERM タンパク質の複合体形成量の定量は予備的段階まで進行し，LC-MS/MS 法にて測定が可能と判断された。このことより標的プロテオミクス法によるトランスporterおよびトランスporter周辺タンパク質の定量法の確立が達成され，従来のウエスタンブロット法などによるタンパク発現量の定量に比べ迅速に多くのタンパク発現量の測定を行うことが可能となった。複合体量の発現についても今後検討を進めていく予定である。

標的プロテオミクス法を用い炎症モデルでの ERM タンパク質およびトランスporter発現量の測定を行い，発現変動を明らかにした。肝細胞を用いた検討では，炎症性サイトカインおよび siRNA を用いたノックダウン時の ERM タンパク質の発現および機能変動を明らかにした。

以上の検討より，一部の炎症性サイトカインが radixin のリン酸化状態を変動し，裏打ちタンパク質としての機能を調整することでトランスporterの膜局在に影響していることが明らかとなった。得られた知見は炎症を伴う疾患時の薬物療法を考えるうえでの基礎的知見となりうるものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計2件)

Yuta Inoue, Atsushi Kawase, Sayaka Nakazaki, Erika Koizumi, Hiroaki Shimada, Masahiro Iwaki, Influence of radixin knockdown on drug efflux transporters of cancer cells. 第12回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2016年10月27~30日, Kindai University (Osaka, Japan).

Yuta Inoue, Atsushi Kawase, Sayaka Nakazaki, Erika Koizumi, Hiroaki Shimada, Masahiro Iwaki, Effect of ERM protein function depression on ABC transporter activities. 日本薬物動態学会 第31回年会, 2016年10月13日~15日, Kissei bunka hall (Nagano, Japan)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/biopharm/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川瀬 篤史 (KAWASE, Atsushi)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：80411578

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし