

平成23年度群馬大学医学部医学科入学試験

問題

編入学

小論文(1)問題

注意事項

1. 試験開始の合図があるまでこの問題冊子を開いてはいけません。
2. 問題冊子のページ数は7ページです。問題冊子および答案用紙(4枚)、および下書き用紙(3枚)に、落丁、乱丁、印刷不鮮明などの箇所がある場合は申し出てください。
3. 解答は指定の答案用紙に記入してください。
 - (1) 文字はわかりやすく、横書きで、はっきりと記入してください。
 - (2) 解答の字数に制限がある場合は、それを守ってください。
 - (3) 訂正、挿入の語句は余白に記入してください。
 - (4) ローマ字、または数字を使用するときは、まず目にとらわれなくともかまいません。
4. 試験時間は90分です。
5. 答案用紙は持ち帰ってはいけません。
6. 問題冊子と下書き用紙は持ち帰ってください。

次の文章を読んで設問A-Dに答えなさい。

医療機器の環境 <電気工学の基礎>

電気とは何か

電気とはいったい何なのか、ということから考えてみたい。

すべての物質の構成単位は原子であり、原子の種類は118にも及ぶ(ただし国際的には113以降は正式に認定されていない)。すべての原子は、原子核と電子とからできており、その原子核を構成しているのが陽子と中性子である。陽子はプラスの電気、電子はマイナスの電気をもっているが、中性子は電氣的には中性である。

ふつうの状態では、1つの原子は電氣的にも中性、つまり、陽子の数と電子の数が一致している。しかし、何らかの力によって原子核と電子が切り離されると、プラスまたはマイナスの電気を帯びることになる。絶縁物を摩擦すると、「静電気」を帯びることはすでに示した。

1つの電子は、以下のように一定の質量と一定の電気の量(電荷という)を保有している。

質量: 約 9.1×10^{-31} kg

電荷: 約 -1.6×10^{-19} C

ここで、電荷の単位としてCと表されているのはクーロンという標準単位である。

オームの法則と電気抵抗

電荷すなわち電気の量とは、静止している電気、すなわち静電気と考えればよい。この電荷が移動する現象はよく起こる。これが電流であり、1クーロンが1秒間に動く場合、その単位が1アンペアである。また、その電流の起因となる力は起電力または電圧ともいわれる。

ここで、電気の最も基本的な法則であるオームの法則を示す。

$$I = E/R$$

ここでI: 電流(単位: アンペア)、E: 起電力(電圧、単位: ボルト)、R: (電気)抵抗(単位: オーム)

交流回路とは

電線を通る電流は、大きく直流と交流に分けられる。交流の電圧は時間とともに周期的に変化し、その波形はサイン波(正弦波)の形状を呈している。この電圧Eを数式で表すと次のようになる。

$$E = E_m \sin \omega t$$

この式で、電圧Eは瞬時値と呼ばれ、時刻tにおける電圧の値を示している。これに対しE_mは最大値と呼ばれ、交流電圧のいちばん大きくなる値を示す。わが国では、E_mは、およ

そ 141 ボルトである。通常、100 ボルトとっているのは実効値と呼ばれ、最大値 E_m のおよそ 1/1.41 である。

ω は角速度と呼ばれ、周波数を f (Hz) とすると、

$$\omega = 2\pi f$$

という関係にある。つまり、交流とは一定の角速度をもった回転に相当する、と考えることもできる。角速度 ω は、周波数が f (Hz) のときには、 $2\pi f$ だけ回転すると考えればよい。

図 1 に、交流電圧を抵抗 R に加えたときのようなすを示す。

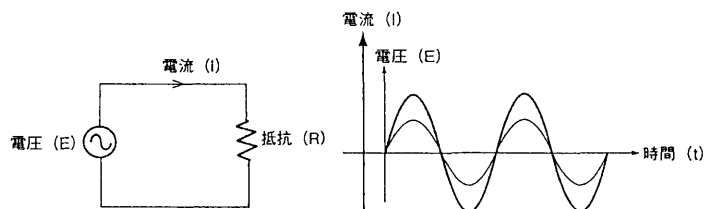


図 1 交流回路 (抵抗)

抵抗 R に流れる電流を I とすると、このときにもオームの法則が適用され、以下の式で表される。

$$I = \frac{E}{R} = \frac{E_m}{R} \sin \omega t$$

この式からわかることは、抵抗 R に流れる電流もサイン波の形をしており、最大値は E_m/R となる。サイン波の交流電流と交流電圧は、抵抗 R を通してみると、瞬間的には同じ時点で最大になり、また同じ時点で最小になる。このような状態を同相と呼んでいる。

電荷を貯めるコンデンサ

ここで、電気素子としてのコンデンサについて説明しておく。コンデンサは、導電体の 2 枚の平板が向き合っているような構造になっており、その間に絶縁物が詰められている。コンデンサは電荷 (Q : electric charge) を蓄えられるもので、その量を電気容量 (C : capacitance) という。容量の単位はファラド (F: farad) が使われる。

コンデンサ C に直流電圧 E を加えた場合、コンデンサに蓄積される電荷 Q は、次のようになる。

$$Q \text{ (クーロン)} = C \text{ (ファラド)} \times E \text{ (ボルト)}$$

1 クーロンとは、1 ファラドの電気容量をもったコンデンサに 1 ボルトの電圧を加えた

ときに、コンデンサに蓄えられる電荷である。なお、1 クーロンの電荷が 1 秒間に移動した場合の電流の単位が 1 アンペアなので、電流 I と電荷 Q との関係は、次の式で表される。

$$I = \frac{d}{dt} Q$$

ここで示す微分とは、「変化する割合」を表している。もし、電荷の流れが時間経過に対して一定であれば、 t 秒間に流れる電荷 Q の流れ、電流 I は、

$$I \text{ (アンペア)} = \frac{Q}{t} \text{ (クーロン/秒)}$$

と表される。しかし、 Q は一般的には時間とともに変化するので、このような場合には微分を使わなければならない。すなわち、電荷が時間とともに変化する割合が「電流」と定義できる。

図 2 (左) は、コンデンサ C に交流電圧を加えたとき、電流がどう流れるかについて表現している。

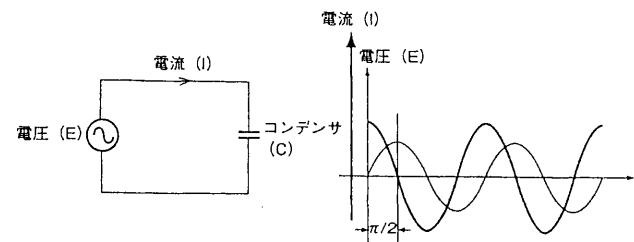


図 2 交流回路 (コンデンサ)

前の電荷と電流の式から、

$$I = \frac{d}{dt} Q$$

$$I = \frac{d}{dt} CE$$

となる。ここで、 E が交流すなわち $E_m \sin \omega t$ のとき、

$$I = \frac{d}{dt} (C E_m \sin \omega t)$$

$$= (1) \text{ } \omega t$$

$$= (2) \text{ } (\omega t + \pi/2)$$

となる。これを図示したものが図2(右)である。

電気抵抗 R に交流電圧を加えたときには、交流電流のサイン波形は、(3) _____ であることを示した。しかし、コンデンサ C に交流電圧を加えたときには、交流電流のサイン波形が(4) _____ だけ前に進むことになる。

医療機器の基礎技術 <電極とセンサ>

化学的センサ

代表例として、経皮血中ガス測定用のセンサについて解説する。基本的には、電気化学の分野でいわれるポーラログラフィー (polarography) という方式に基づいている。この方式は、チェコの科学者、ヤロスラフ・ヘイロフスキー (1890-1967) によって1922年に開発された。実際の酸素電極に関しては、アメリカの生化学者、レーランド・クラーク (1918-2005) によって開発されたものである。そのため、このセンサは“Clark electrode クラーク電極”と呼ばれており、開発時期は1953年ごろである。

図3には、酸素を検出するための電極の原理図を示した。酸素を検知する電極(A)は白金でできており、電池(F)により数ボルトのマイナス電圧がかけられる。酸素が白金電極に達すると、飽和 KCl 溶液(C)を通して陽極(B)の Ag-AgCl 電極との間に電流が流れる。したがって、その電流を測定すれば、酸素の量が計算できる。

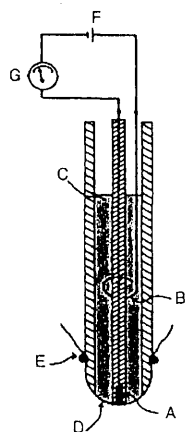


図3 クラーク電極

図4には、人体の体表からの酸素分圧 PO_2 および炭酸ガス分圧 PCO_2 を検出するためのコンビセンサの測定原理を示す。センサ内には、体表からの PO_2 および PCO_2 を検知するための電極が配置されている。

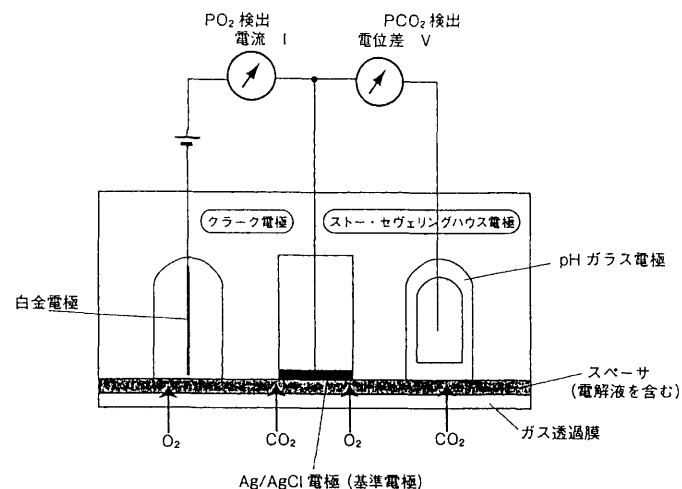


図4 コンビセンサの原理

Ag-AgCl 電極は、これらを検出するための共通の基準電極である。白金電極(クラーク電極)が PO_2 を検出するための電極であり、基準電極との間に電圧をかける。また、皮膚表面からの炭酸ガスが pH ガラス電極に達すると、pH ガラス電極と Ag-AgCl 電極の間には、 PCO_2 に応じて電圧が発生する。その電圧を測定することによって、 PCO_2 が換算できる。このセンサは、アメリカの生化学者、リチャード・ストゥ (1916-) が考案したものである。ところが、安定性に問題があったため、1957年にアメリカの麻酔医、ジョン・セヴェリングハウス (1922-) によって改良が加えられた。これにより安定して PCO_2 の測定ができるようになったため、「ストゥ・セヴェリングハウス電極」と呼ばれる。

「医療機器 生き立ち・役目と働き・望まれる姿」 久保田博南 著、真興交易(株) 医書出版部 一部抜粋・改変)

設問

A. 本文内、下線部 (1), (2), (3), (4) の空欄を埋めて数式や文を完成しなさい。

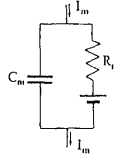
解答は答案用紙 1-1 の A(1)-(4) に記入しなさい。

B. 神経細胞では、細胞膜の内外にイオン濃度の不均衡があり、そのため電位差が存在する。細胞膜は脂質二重膜からなる薄い絶縁体で、その両側に導電体である電解質液があるためコンデンサ（キャパシタ）として振る舞う。

B-1 電解質液で満たされた 2 個の 1 辺 10 cm の立方体が 1 つの面で接している。接している面は電気容量 $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ の細胞膜で隔てられているとする。10 pmol のカルシウムイオンが一方の立方体からもう一つの立方体に移動したとすると、電位は何 mV 変化するか計算しなさい。ただし、答え (mV) は小数点第 2 位を四捨五入しなさい。

解答は答案用紙 1-1 の B-1 欄に記入しなさい。

B-2 神経細胞の内部に差し入れた電極から細胞内に電流を注入したときの膜の様子は、右図のように単純化した等価回路で表すことができる。細胞膜の抵抗を R_m 、膜容量を C_m 、電流注入によって膜に電流 I_m が流れたときの膜の電位変化を V とすると、 I_m はどのような式で表されるか。



解答は答案用紙 1-2 の B-2 欄に記入しなさい。

B-3 この神経細胞に 100 pA の電流を十分長い間注入すると、膜電位は +5 mV 変化した。この神経細胞の膜抵抗 R_m (Ω) を求めなさい。

解答は答案用紙 1-2 の B-3 欄に記入しなさい。

C. 図 3 において、電極 A と電極 B では、それぞれどのような反応が起こり、酸素濃度が測定できるのか、化学反応式を用いて日本語 250 字以内（句読点を含めて）で答案用紙 1-3 の C 欄に説明しなさい。

D. 図 4 において、 PCO_2 測定用 pH ガラス電極のガス透過膜とガラス電極の間のスペーサ部分には、蒸留水ではなく重炭酸イオンおよび、遊離の Na^+ イオンを含んだ電解液が入っている。その理由について、化学反応式を用いて日本語 300 字以内（句読点を含めて）で答案用紙 1-4 の D 欄に説明しなさい。

平成 22 年度群馬大学医学部医学科入学試験

問題

編入学

小論文 (1) 問題

注意事項

1. 試験開始の合図があるまでこの問題冊子を開いてはいけません。
2. 問題冊子のページ数は9ページです。問題冊子および答案用紙 (4枚)、および下書き用紙(3枚)に、落丁、乱丁、印刷不鮮明などの箇所がある場合は申し出てください。
3. 解答は指定の答案用紙に記入してください。
 - 1) 文字はわかりやすく、横書きで、はっきりと記入してください。
 - 2) 解答の字数に制限がある場合は、それを守ってください。
 - 3) 訂正、挿入の語句は余白に記入してください。
 - 4) ローマ字、または数字を使用するときは、ます目にとらわれなくもかまいません。
4. 試験時間は90分です。
5. 答案用紙を持ち帰ってはいけません。
6. 問題冊子は持ち帰ってください。

次の文章を読んで設問 A-F に答えなさい。星印(*)がついた言葉には文末に説明があります。

抗癌剤の発達によって、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剤に対して感受性が低い。また抗癌剤が最初は有効であっても、治療中に効かなくなってしまうことがしばしばある。しかも困ったことに、投与した抗癌剤に対してだけでなく治療には用いていない作用機構や構造が異なる抗癌剤も効かなくなってしまうのである。これらの現象は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*1は、癌細胞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。

筆者は日本で開発された抗癌剤であるマイトマイシンCおよびブレオマイシンの DNA に対する作用機構に関する研究で京都大学農学部から 1984 年に博士号を授与された。研究の次の展開として細胞レベルの研究プロジェクトを探していたところ、米国国立癌研究所の Pastan 博士が「癌の多剤耐性に関与する遺伝子を単離する」プロジェクトのために研究者を探していることを知り、幸運にもそれに参加する機会を得た。Pastan 博士の研究室では、ちょうどその頃、秋山伸一博士が多剤耐性を示すヒト癌細胞の樹立に成功し、さらに抗癌剤耐性が増すにつれて染色体の一部が増幅しコピー数が増えていることが発見されたところであった。筆者らは、多剤耐性を示す細胞で共通して増幅している染色体領域の単離から始め、最後に多剤耐性癌細胞で共通して過剰発現している遺伝子の全長 cDNA の単離に成功した。その遺伝子は、多剤耐性 multidrug resistance にちなんで *MDR1* と名付けられた。塩基配列からその遺伝子産物のアミノ酸配列を予想した結果、*MDR1* のコードするタンパク質は膜蛋白質であり、アミノ酸配列の一部がバクテリアがアミノ酸や糖などの栄養物を取り込むために持っている ATP 依存トランスポーターと似ていることが判明した。

多剤耐性癌細胞の細胞膜に糖鎖付加を受けた約 170kDa の蛋白質が高発現していることはカナダの Ling 博士らによって 1976 年に報告された。その糖蛋白質は膜の薬剤透過性を変化させることによって細胞を多剤耐性に行っていると予想されたために、permeability の頭文字 p をつけて P 糖蛋白質と名付けられた。筆者らが *MDR1* cDNA を単離したちょうどその頃、Ling 博士らはモノクローナル抗体を用いて単離したハムスターの P 糖蛋白質遺伝子の一部と思われる DNA 断片を得ていた。そこでその DNA 断片を入手して比較した。その結果、*MDR1* 遺伝子が P 糖蛋白質をコードしていることが明らかになった。

しかし、それまでに知られているトランスポーター（その頃はキャリアやパーミアーズと呼ばれていた）はイオンや水溶性化合物を特異的に輸送するものであり、ひとつのトランスポーターが構造に類似性のない複数の抗癌剤を ATP に依存して排出すると予想した人は少なかった。ところが、MDR1 cDNA を発現ベクターにつないで薬剤感受性細胞に導入してみたところ、その結果は多くの人の予想をうらざり、MDR1 の発現した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ったのである。バクテリアの類似タンパク質の場合は、アミノ酸や糖を細胞内に取り込む方向に輸送しているのに対し、筆者らが単離した MDR1 は基質の輸送方向が逆であり、抗癌剤を細胞外へ排出するトランスポーターとして機能していることが示唆された。また、MDR1 は多くのヒトの正常組織の細胞で発現しているだけでなく、癌細胞で高発現していることも明らかになった。

ゲノムプロジェクトの結果、MDR1 の ATP 結合領域と 200 アミノ酸にわたって配列がよく保存された類似のドメインを持つ膜蛋白質がヒトの染色体上に 48 あるいは 49 存在することがわかった。また、地球上のほとんど全ての生物が 50 種類前後の MDR1 類似遺伝子を染色体上にもっており、生物界全体の遺伝子ファミリーとしては最も大きなもののひとつであることがわかった。バクテリアにおいては類似の ATP 結合領域はサブユニットとして 1) 膜貫通サブユニット と分子集合しているのに対して、真核生物においては 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 つ挿入されていることが多い。そこで、MDR1 と類似のアミノ酸配列をした ATP 結合領域を持つ膜蛋白質は、ATP 結合カセット(ATP-Binding Cassette)蛋白質を略して ABC 蛋白質、あるいは ABC トランスポーターファミリーと命名された。遺伝子名を統一するため、MDR1 は現在では ABCB1 と呼ぶことが提唱されている。しかし本稿では、複雑になるのを避けるため MDR1 の遺伝子名はいままでどおり MDR1 と書くことにする。

P 糖蛋白質の発見者である Ling 博士は、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おこない、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おこなった。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。酵母と線虫の間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、それとは対照的であった。ヒト ABC 蛋白質は ATP 結合領域のアミノ酸配列の相同性から A から G の 7 つのサブファミリーに分類できる

が、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)はそれぞれ別のサブファミリーに属する。このことは、2) ABC 蛋白質は様々な構造の薬剤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 蛋白質ファミリーがすべての生物のほとんどすべての細胞で機能し、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各々の化合物に適応した結果であると思われる。後で述べるが、ABC 蛋白質の多くが膜脂質の移動や恒常性に関与している。膜脂質の構成成分は生物によって大きく異なり、進化に伴って変化している。ABC 蛋白質遺伝子ファミリーの生理的役割は、膜脂質の進化および生理的役割の変化とともに進化してきたと考えられる。

さて、ここで生理的重要性について、もう一度考えてみたい。生化学的反応というものは基質特異性が高く、基質との親和性が高いほど生理的に意味があるというのが一般的な考え方である。酵素全般的にそうであるし、ホルモン受容体や神経伝達物質受容体、抗体もそうである。しかし、ABC 蛋白質の仲介する反応の基質特異性は低く、基質結合性も μ M オーダーと生化学反応としては例外的に低い。では、ABC 蛋白質の仲介する反応は生理的重要性が低いのであろうか？ 実際、ABC 蛋白質ファミリー遺伝子のノックアウトマウス²⁾は、通常の生育条件では多くの場合何の支障もないように見える。しかし、ヒトにおいては ABC 蛋白質遺伝子の異常がさまざまな疾病を引き起こすことが現在わかっている。つまり、ABC 蛋白質は生存には必須ではないが健康な体の維持に必要であり、そのことが ABC 蛋白質の機能を理解する鍵をにぎっていると思われる。

生物は環境や食物中に含まれるさまざまな構造の脂溶性物質にさらされている。問題は、それら脂溶性物質の多くが動物にとって有害であることである。それらの脂溶性化合物が体内に入らないようにするには、微生物のように高分子の脂溶性物質が透過しにくい細胞壁をもつか、それぞれの脂溶性化合物を高親和性で結合する排出ポンプを数多く用意するかを選択肢しかないだろう。しかし、多細胞動物は消化管を細胞壁で覆うわけにはいかない。また、何千、何万という数の脂溶性化合物を考えれば 2 番目の選択肢も不可能である。

そこで哺乳類がとった戦略が MDR1 であったと考えられる。さまざまな構造の脂溶性化合物が 3) μ M オーダー以上の濃度で膜を通過しようとする時、消化管上皮細胞の管腔側膜に存在する MDR1 はそれらを結合し排出するのである。低い濃度の場合は、P450 酵素な

どその他の解毒機構などに任せればよい。その代わりに驚異的と言えるほどさまざまな構造の化合物、分子量も 300 から 2000 を超える化合物までを基質として排出する。

一方、リン脂質やコレステロールを輸送基質とする場合を考えてみよう。ホスファチジルコリンやコレステロールは本来細胞膜の主成分であり、どちらも細胞膜の約 20% を占めている。それ故、脂質を輸送するトランスポーターは脂質に対する親和性を低く抑えておかないと基質の遊離が抑制されて効果的に働くことができないと思われる。では、脂溶性物質を輸送する ABC 蛋白質はどのように基質を認識し、輸送しているのだろうか。次に、4) 膜脂質輸送 ABC 蛋白質である MDR2 と薬剤輸送 MDR1 の機能を比較することによって、ABC 蛋白質の基質認識機構を考えてみたい。

MDR1 は消化管上皮細胞の管腔側膜に発現しており、食物中に含まれる低分子脂溶性化合物が小腸上皮細胞を透過して体内に入ろうとすると、膜中でそれらを結合し ATP 加水分解に依存して管腔中へと排出する。それによって食物中のさまざまな構造の有害な脂溶性化合物が体内に吸収されるのを防いでいる。肝臓および腎臓では、胆汁中、尿中へ排出することによって脂溶性有害物を体外へと排泄している。また、脳や精巣の毛細血管では、大切な組織である脳や精巣中に異物が浸入することを防いでいる。免疫系では、体外から浸入するありとあらゆる異物に対して、高親和性で結合する無限とも言えるほどの数の抗体を遺伝子の再編成や変異を利用して産生して対応している。それに対して、MDR1 は 1 種類の蛋白質が分子量 300~2000 程度までの無数の脂溶性化合物を結合し排出するのである。

5) 非常にユニークな蛋白質と言えるだろう。

では、どのようなメカニズムで MDR1 はさまざまな分子量と構造の化合物を結合するのだろうか？一時期、MDR1 が輸送しているのは H⁺であり、薬剤は MDR1 が形成した pH 勾配に従って輸送されると主張する研究者がいたが、現在はその説は消えてしまった。MDR1 の 1 アミノ酸置換によって MDR1 が輸送する基質特異性が大きく変化するという実験事実は、その説では説明できない。MDR1 が抗がん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。最終的には、基質を結合した MDR1 の構造が 6) 結晶構造解析によって解かれる必要がある。しかし、現時点において、ABC 蛋白質の構造生物学的知見は限られている。

生化学的解析に基づいて、MDR1 の基質結合部位に関して少なくとも 2 つの可能性が考えられている。一つ目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 つ目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である。

MDR1 の基質認識機構を考えると、MDR1 との相同性が最も高い遺伝子であり、第 7 染色体上の MDR1 の隣に存在する MDR2 (統一遺伝子名は ABCB4。ヒトでは MDR3 と呼ばれることもある) が重要な情報を与えてくれる。MDR2 は、MDR1 のアミノ酸配列と 76% が同一で 86% が相同という高い相同性を持っているにもかかわらず、細胞に発現させてもほとんど抗癌剤耐性を付与しない。一方、*mdr2* 遺伝子をノックアウトしたマウスでは、胆汁中からホスファチジルコリンが消失する。*mdr2* が発現している毛細血管の同じ膜には *mdr1* が発現しているにもかかわらずである。これらの結果は、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、MDR1 は同じ膜に発現しながら、MDR2 の機能を相補できないことを示している。肝臓においてコレステロールから変換されてできる胆汁酸は、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消化・吸収を促進する。胆汁中へは胆汁酸と同時に大量のホスファチジルコリンが肝臓から分泌され、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と考えられている。

しかし、MDR2 の機能に関しては細胞レベルでの研究はあまり行われておらず、不明な点が多く残されていた。そこで、筆者らはヒト MDR2 を安定発現した細胞を樹立し、リン脂質排出について調べた。その結果、培地中に胆汁酸塩が存在していると MDR2 は細胞外へホスファチジルコリンを排出することが明らかになった。胆汁酸塩が存在しないとホスファチジルコリンは分泌されない。また、MDR1 は胆汁酸存在下でもホスファチジルコリンを細胞外へ排出しないことがわかった。さらに興味深いことに、MDR2 発現細胞からは、ホスファチジルコリンの排出と同時にコレステロール排出が起こることがわかった。

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。しかし不思議なことに、MDR1 は C16 や C18 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* 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剤に対して耐性になり、その耐性はビンプラスチンやシクロスポリンなどで阻害される。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 が弱いながら抗癌剤を輸送する活性を持つことも報告されており、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高いと思われる。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予想される。

以上のように、MDR2 はホスファチジルコリンとコレステロールを基質として認識し、輸送しているように見える。では MDR2 と 80% 近くアミノ酸配列が保存されている MDR1 は膜の構成成分とは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。また、細胞膜のコレステロール濃度を β 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 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。しかし、これらの報告は MDR1 とコレステロールの相互作用を間接的に推測しているだけであった。

そこで、筆者らはヒト MDR1 を昆虫培養細胞に大量発現させ、機能を保ったまま高純度で精製することによって、MDR1 とコレステロールの相互作用をより詳細に検討することにした。しかし、従来の ATP 加水分解活性方法を用いて解析するためにはミリグラム単位の精製蛋白質が必要であること、ミリグラム単位の MDR1 を活性を保ったまま大量に精製するには、半端ではない労力と費用が必要であることが判明した。筆者らは、そこでまず ATP 加水分解活性測定方法を改良することを試みた。その結果、リン酸を結合するチタンカラムと HPLC を利用して 1 アッセイ数十ナノグラムの精製蛋白質で ATP 加水分解活性を検出できる実験系を開発した。

その方法を用いて検討した結果、コレステロールによって MDR1 の ATP 加水分解活性が促進されること、さまざまな化合物による ATP 加水分解促進がコレステロールによって影響を受けることを見出した。その効果は基質となる化合物の分子量によって大きく異なっており、コレステロールは分子量が 500 以下の比較的小さな輸送基質の MDR1 に対する親和性を向上させた。一方、分子量が 800–900 程度の化合物に対してはコレステロールによる親和性の変化は観察されなかった。また、コレステロールが MDR1 に直接結合するこ

とも明らかになった。

以上の結果から、MDR1 の基質認識に関して次のようなモデルを提唱した。①基質ポケットはいくつかのポケットから構成されているのではなく、柔軟性に富むひとつの大きなポケットからできている。②そのポケットは分子量 800–900 程度の化合物を認識するのに最適な大きさをしている。③化合物の分子量が小さい場合には、基質結合部位のすきまの空間にコレステロールが入ることによって基質の親和性を上昇させる。

つまり、MDR1 の基質認識はこれまでの酵素・基質相互作用の基本である基質特異的な one-to-one 対応の認識機構ではなく、非常に柔軟な one-to-many 対応をしており、そのような MDR1 の柔軟な基質認識機構に細胞膜中のコレステロールが重要な役割を果たしている。筆者らは、このメカニズムを「コレステロール-Fill-in モデル」と呼びたいと考えている。

「トランスポーター科学最前線」 廣川書店(2008年) (一部抜粋)

*1 筆者は、蛋白質とそれをコードする遺伝子を区別するために、遺伝子を斜体(イタリック)で表している。また、ヒト由来とマウス由来のものを区別するために、マウス由来のものは小文字で表している。

例) MDR1 ヒトの MDR1 蛋白質
MDR1 ヒトの *MDR1* 遺伝子
 mdr1 マウスの mdr1 蛋白質
mdr1 マウスの *mdr1* 遺伝子

*2 組換え DNA 技術を用いて特定の遺伝子を欠損させたマウス

設問

- A. 下線部 1) 「膜貫通サブユニット」について、一般に蛋白質の膜貫通領域には細胞膜成分と親和性が高いアミノ酸が多く含まれるが、それはどのようなアミノ酸か。アミノ酸名を含めて 100 文字以内で説明しなさい。
- B. 下線部 2) のように考えられる理由を 250 文字以内で説明しなさい。
- C. 下線部 3) について、分子量 300 の物質 1g を水に溶解して濃度を $10 \mu\text{M}$ とするためには、水が何リットル必要か。小数点以下第 1 位を四捨五入して答えなさい。
- D. 下線部 4) について、MDR1 と MDR2 では、どちらがより古い遺伝子であると考えられるか。理由も含めて 300 字以内で説明しなさい。
- E. 下線部 5) について、どのような点がユニークか、100 字以内で説明しなさい。
- F. 下線部 6) について、以下の結晶構造解析に関する説明文中の [] の中に入る条件を示しなさい。

「X線結晶構造解析では、原子が周期的に配列した結晶に対してX線を照射し、結晶格子によるX線の回折の結果を解析して結晶内部の原子の配列を決定する。結晶の空間格子のなかの一群の平行な格子面の間隔を d とし、この格子面群による反射波を考えると、視射角（入射角の余角）を θ 、入射X線の波長を λ とすれば、ブラッグ条件 [] が成立するとき、各格子面からの反射波が同位相となって強めあうので、その方向に回折が現れる。」

