

酵母多剤耐性 ABC トランスポーターの新規機能解明と 阻害剤開発への応用

宮川 都吉

(広島大学大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻)

構造および作用機作を異にする広範な薬剤を ATP 依存的能動的プロセスにより細胞外排出する多剤耐性 ABC トランスポーターは、酵母からヒトに至るまで生物種を越えて保存性が高い。このことは、本機構が真核生物細胞の生命維持装置として重要なことを物語っている。ABC トランスポーター機能の解明は、がんの化学治療における大きな障害である多剤耐性克服にも重要な課題である。Saccharomyces cerevisiae ゲノム情報によれば、酵母ゲノムには 30 種の ABC タンパク質が存在するが、とりわけ Pdr5p は他の ABC タンパク質と比べ圧倒的に多種類の薬剤に対する耐性に関与しているため、多剤耐性現象では特に重要なトランスポーターである。本研究では、実験系としての酵母のすぐれた特性を利用し、Pdr5p トランスポーターの薬剤特異性を分子遺伝学的解析手法により解析した。

1. 薬剤特異性が変化した変異 Pdr5p の取得と解析

ABC トランスポーターがおびただしい数の薬剤を認識し、細胞外輸送する機構は大きな謎である。この問題にアプローチするのに、動物細胞を用いて薬剤認識・輸送能が変化したトランスポーター変異株を多数取得・解析するには大きな困難が予想される。これに対し、酵母では変異株を取得して遺伝学的に解析することが比較的容易に行えることを利用し、薬剤特異性が変化した S. cerevisiae 変異株の取得と解析を行った。PDR5 遺伝子を含むプラスミドをヒドロキシルアミン処理し、in vitro でランダム変異を導入した後、染色体上の PDR5 遺伝子を破壊した株をこのプラスミドで形質転換し、薬剤耐性が Pdr5p 依存的であることが知られる 5 種薬剤 (cycloheximide, cerulenine, tautomycin, fluphenazine, staurosporin) を利用し、これらのある特定の一つまたは複数の薬剤に対する特異性 (耐性) を失った変異型 Pdr5p を多数取得し (ここで、これらすべての薬剤に対し特異性を失ったものは排除した)、シークエンスにより各変異株の変異点を同定し、その薬剤特異性を調べた (図および表)。これらの結果から、変異点は当初予想された Pdr5p 膜貫通領域に局在するのではなく、分子全体にわたり分布することが明らかになった。すなわち、ある薬剤への特異性を失わせる変異アミノ酸残基は、膜貫通領域のみならず細胞質領域さらには細胞外領域にも見いだされたことから、Pdr5p は各薬剤に特定の部位で対応しているのではなく、Pdr5p 分子構造全体が薬剤特異性の決定に関わっていることが予想された。ABC トランスポーターによる薬剤認識機構に新しい情報をもたらす重要な知見である。

2. Pdr5p による薬剤耐性の低下

多剤耐性 ABC トランスポーターは多くの薬剤に対する耐性獲得に重要で、Pdr5p が耐性に関与する薬剤の種類は何百にもものぼるといわれている。今回、野生株と PDR5 破壊株での耐性の違いを多くの薬剤を用いて調べるうち、意外にもごく少数の薬剤に対しては、PDR5 遺伝子を破壊することにより耐性が増し、逆に PDR5 遺伝子を高発現することにより耐性が低下することを見いだした。そのような薬剤として、p-chlorophenol; Naban; β -octylglucoside などがあった。Pdr5p がこれら薬剤の細胞内取り込み促進に関与している可能性があり、現在その機構の詳細を調べている。

3. Ca^{2+} シグナルと Pdr5p

Pdr5p 抗体を利用するウエスタン解析により、Pdr5p は Ca^{2+} シグナル活性化により（培地の高 Ca^{2+} が存在する条件）、ユビキチン化経路で SCF^{Cdc4} 依存的に分解されることを見いだした。このことは、Pdr5p が Ca^{2+} の取り込みの制御にも関与する可能性を示唆する。実際、PDR5 遺伝子破壊により、培地 Ca^{2+} の取り込みが見かけ上低下した。 Ca^{2+} の過剰な取り込みは細胞増殖を強く阻害することを利用し、Pdr5p 阻害剤の効率的スクリーニング系の構築を行っている。

図 薬剤特異性が変化した Pdr5p の変異点
 (m1 m7 は同定された変異点を示す)

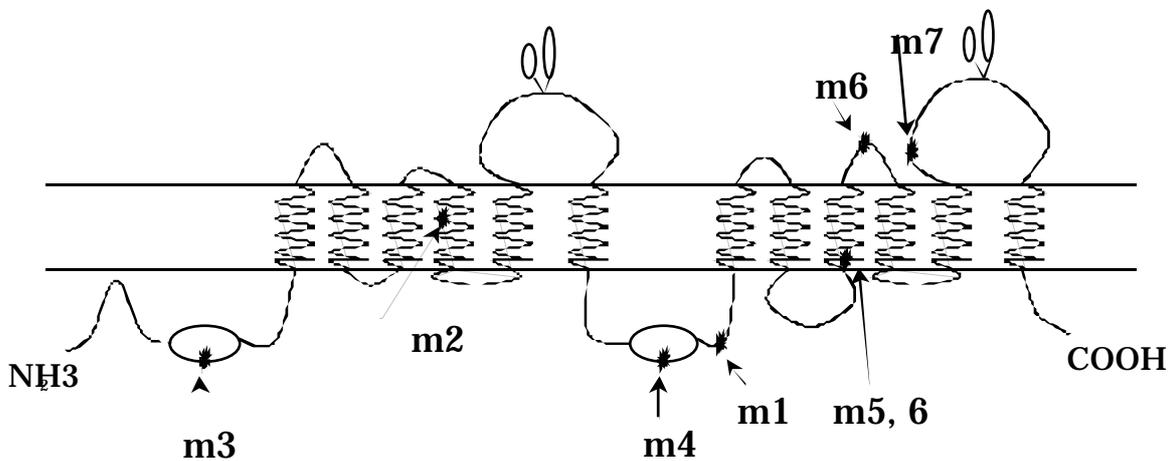


表 各種 Pdr5p 変異株の薬剤特異性

| Mutant | Phenotype of $\Delta pdr5\Delta snq2$ strain carrying indicated <i>pdr5</i> mutants | | | | | Mutation point |
|--------|---|-----|-----|-----|----|------------------|
| | Cyh | tau | Cer | Tau | Fp | |
| pdr5-1 | S | R | S | R | R | S1048V |
| pdr5-2 | S | R | S | R | R | S648F |
| pdr5-3 | S | R | S | R | R | T257I |
| pdr5-4 | S | R | | S | R | G1040D |
| pdr5-5 | S | R | S | R | R | E1289K |
| pdr5-6 | S | R | S | R | S | E1289K Y1311S |
| pdr5-7 | S | R | S | R | R | T1393I |

S:感受性 R:耐性