

論文の内容の要旨

論文題目 乳癌耐性蛋白質 (Breast Cancer Resistance Protein) の高次構造解析研究

--- ジスルフィド結合を介するオリゴマー形成の検討 ---

氏 名 鹿毛 久身江

[研究の背景と目的]

ATP 結合カセット (ATP-Binding Cassette, ABC) トランスポーター (=ABC 蛋白質) は、ATP を加水分解したエネルギーを利用して細胞の膜輸送を担うポンプとして働く。本研究の対象である乳癌耐性蛋白質 (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP) は 1998 年に同定された ABC トランスポーターで G ファミリーに属しており、マイトザントロン耐性関連蛋白質 (Mitoxantrone Resistance-associated protein, MXR)、胎盤特異的 ABC トランスポーター (ABC transporter in placenta, ABCP) とも呼ばれる。ABC トランスポーターの機能分子には 2 つの ATP 結合部位と 2 つの膜結合部位が必要とされているが BCRP にはそれらが 1 つずつ存在することが知られている。

BCRP は抗癌剤排出ポンプとしても働くため化学療法施行時の耐性に大きく関与している。その高次構造に関する知見を得ることは BCRP 阻害剤の開発等への貢献となり臨床医学上重要であるため、本研究を行った。

[研究の方法]

A. BCRP の機能単位および結合様式の解析

pHa レトロウイルスに *MycBCRP* cDNA を導入した pHa-MycBCRP を PA317 細胞に遺伝子導入しマイトザントロンで選択したものを PA/MycBCRP と名付けた。一方、*HABCRP* cDNA をバイシストロン

性ベクターに導入して pHaL-HABCRP-IRES-DHFR を作成した。これを導入した細胞には BCRP 遺伝子とメソトレキセート (MTX) 耐性を賦与する DHFR 遺伝子が共発現するため、MTX で選択すれば BCRP を発現する細胞をほぼもれなく選別することが出来る。PA317 にこのベクターを導入して MTX で選択したものを PA/HABCRP、また PA/MycBCRP に導入して *MycBCRP* と *HABCRP* を共発現させ MTX で選択したものを PA/HA+Myc と名付けた。BCRP の発現はウエスタンブロットで、マイトザントロンまたは SN-38 に対する感受性は細胞増殖抑制試験で評価した。次に BCRP ダイマーの counterpart を同定するために、非還元条件下で 3 種類の細胞から採ったライセートに含まれる 140-kDa の BCRP タンパクを抗 Myc 抗体で免疫沈降し、その沈降物でウエスタンブロットを行って抗 HA 抗体に反応させ解析した。その後、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の site-directed mutagenesis system により 22 個の変異 HABCRP cDNA クローンを作成して PA317 細胞に導入し、薬剤感受性試験を行なって 8 個の非活性クローンを得た。それらを MycBCRP と共発現させたものの薬剤耐性を調べた。

B. BCRP 分子内のシステイン残基への変異導入による BCRP 構造と機能の変化の検討

次に、BCRP モノマー間の S-S 結合を破壊する目的で、BCRP 分子の 12 個のシステインのうち膜外部分にある 3 個を 1 つずつセリンで置き換え、同時に残りの 9 個も同様に処理し、これらの一次構造変化に伴う機能分子の形態や機能の変化をウエスタンブロットと FACS で解析した。変異蛋白発現量の低下が mRNA の発現低下によるものでないことは逆転写 (RT-)PCR により証明した。変異体の SN-38 に対する感受性は細胞増殖抑制試験により検討した。モノマー間の S-S 結合に重要と判明した Cys-603 に関しては、セリン以外に 7 種類のアミノ酸で置き換えた変異体を作り、ウエスタンブロットと SN-38 に対する感受性試験を行ってさらに検討した。

[結果及び考察]

A. BCRP の機能単位および結合様式の解析

還元条件下で、PA/MycBCRP, PA/HABCRP, PA/HA+Myc の生産する BCRP 蛋白 (MycBCRP, HABCRP, HMBCRP) は 70-kDa の蛋白として認められ、HMBCRP のみは抗 Myc、抗 HA、および抗 BCRP 抗体全てと反応した。非還元条件下では全種類の BCRP は 140-kDa の蛋白として発現し、HMBCRP のみは全ての抗体で検出された。以上は HMBCRP は異なるタグを持つモノマーとホモダイマーを作っている可能性があることを示している。140-kDa の BCRP は 100°C 加熱で安定だったが DTT 添加後 70-kDa の BCRP に分解したため、複合体内には S-S 結合が存在すると考えられた。次に BCRP ダイマーの counterpart を同定するために、3 種類の 140-kDa BCRP を含むライセートを抗 Myc 抗体で免疫沈降し、その沈降物をウエスタンブロットで解析した。HMBCRP は非還元条件下と還元条件下で抗 BCRP 抗体および抗 HA 抗体と反応し、それぞれ 140-kDa 複合体と 70-kDa の BCRP として検出されたことから、HMBCRP 複合体は MycBCRP と HABCRP を含んでいることが明らかとなった。以上より BCRP

は S-S 結合によりホモダイマーを形成していることが分かったため、不活性の変異 BCRP 共発現による機能の変化を検討した。[研究の方法]で述べた手順で得た非活性変異体のうち、L554P 変異の *HABCRP* cDNA クローン 15 (*HABCRP-15*) を共発現させた PA/MycBCRP+*HABCRP-15* のみが、薬剤耐性が PA/MycBCRP よりも有意に低かった。また、*HABCRP-15* の導入は *MycBCRP* の発現には影響しないことをウエスタンブロットにより確かめた。以上より、BCRP は S-S 結合で架橋されたホモダイマーを形成しており、不活性変異体を共発現させることで薬剤耐性は減弱することが分かった。

B. BCRP 分子内のシステイン残基への変異導入による BCRP 構造と機能の変化の検討

次に分子内の 12 個のシステインのうち膜外領域の 3 個を 1 つずつセリンで置き換え、同時に残りの 9 個も同様に処理した変異 BCRP の発現変化を、ウエスタンブロットと FACS で解析した。還元条件下では、野生株と全ての変異体においてモノマーが検出された。非還元条件下では Cys-603 をセリンに置き換えた BCRP (BCRP-C603S) 以外の変異体および野生株の BCRP は 140-kDa のダイマーとして検出されたが、BCRP-C603S では少量のダイマーと共に多量の 70-kDa モノマーが検出された。BCRP-C438S、BCRP-C592S、BCRP-C608S の発現量が著しく少なかったため非還元条件下でのウエスタンブロットの暴露時間を長くしたところ、発現量は BCRP-WT の 10% 以下であったが BCRP-C603S と同様 140-kDa のダイマーと共に 70-kDa のモノマーも検出された。これらのモノマーのダイマーに対する比率は WT よりも著しく高かった。FACS 解析では、BCRP-C592S と BCRP-C608S においては膜上の BCRP 発現を全く検出できなかった。この理由として、二者において変異による構造変化が著しかったために膜上に発現出来なかった、FACS 抗体の認識部位内に変異があったため検出できなかった、等が考えられた。それ以外の変異体では発現量は還元条件下で行ったウエスタンブロットで見られたモノマーの蛋白量と一致していた。BCRP-C438S はウエスタンブロット、FACS 共にほとんど発現が認められず薬剤非耐性であったことから、この部位における変異は BCRP の発現と活性を著しく低下させると思われた。これらの変異体で見られたタンパク発現量の低下は mRNA の発現低下によるものではないことを RT-PCR により確かめた。次に、変異体の SN-38 に対する感受性を検討したところ、耐性度(変異体 IC_{50} /野生株 IC_{50})は BCRP モノマーの量と正比例していた。非還元条件下でダイマーの発現がかなり少なかった PA/C603S の耐性度が PA/WT のそれと同程度であったことも考慮すると、BCRP の耐性度はモノマーの量に比例しており機能発現には共有結合によるダイマー形成は必ずしも必要ではないと考えられた。Cys-603 の重要性をさらに検討するため、PA/C603X (X=D, H, R, S, Y, A, W) を作成してウエスタンブロットと感受性試験を行った。非還元条件下では全ての変異体で BCRP-C603S と同様に多量のモノマーと減少したダイマーが認められ、還元条件下では、発現量にはややバラツキがあったが全ての変異体でモノマーのみが認められた。SN-38 に対してはモノマー量に比例した耐性を示した。以上より、Cys-603 は直接的に BCRP モノマーの結合に関与しているが、ポンプ機能発現には共有結合によるダイマー形成は必ずしも必要ではないことが明らかとなった。

[結語]

本研究により次のような結果を得た。

1. BCRP は S-S 結合で架橋されたホモダイマーを形成する。
2. モノマー間の S-S 結合においては Cys-603 が重要であるが、BCRP のポンプ機能発現には共有結合によるホモダイマー形成は必ずしも必要ではない。
3. 野生型 BCRP を発現している細胞に不活性型 BCRP 遺伝子を導入してダイマーを形成させることで、薬剤耐性を減弱させることができた。