

審査の結果の要旨

氏名 鹿毛 久身江

本研究は 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であり抗癌剤排出ポンプとしても働く乳癌耐性蛋白質 (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP) の高次構造を明らかにするために、野生型 BCRP に Myc タグ、HA タグを付けた遺伝子を PA317 細胞に発現させた PA/MycBCRP と PA/HABCRP、およびそれぞれのタグを持つ遺伝子を共発現させた PA/HA+Myc を用いて、BCRP の機能単位および結合様式の解析を行った。次に、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検討して、下記の結果を得ている。

1. 還元条件下で、PA/MycBCRP, PA/HABCRP, PA/HA+Myc の生産する BCRP 蛋白 (MycBCRP, HABCRP, HMBCRP) をウエスタンブロットで解析したところ、還元条件下では 70-kDa の蛋白、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た。HMBCRP のみは抗 Myc、抗 HA、および抗 BCRP 抗体全てと反応した。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 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ところ、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 結合で架橋されたホモダイマーを形成することが示された。
2. 分子内の 12 個のシステインのうちモノマー間の S-S 結合に関与すると考えられる膜外領域の 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 を用いてウエスタンブロットを行ったところ、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。非還元条件下では野生株の BCRP および Cys-603 をセリンに置き換えた BCRP (BCRP-C603S) 以外の変異体は 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。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が、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。変異体では野生型と比べ蛋白発現量の低下が見られたが、それが 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が結果は PA/C603S と同様であり、薬剤耐性はモノマー量に比例していた。これらの事実より、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ことが明らかとなった。

3. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の site-directed mutagenesis system により 22 個の変異 HABCRCP 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。それらのうち、L554P 変異の *HABCRCP* cDNA クローン 15 (*HABCRCP-15*) を野生型と共発現させた PA/MycBCRP + *HABCRCP-15* のみが、薬剤耐性が PA/MycBCRP よりも有意に低くした。また、*HABCRCP-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、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可能であることが分かった。

以上、本論文は PA317 細胞に野生型および変異 BCRP 遺伝子を導入した細胞を用いてそれらの作る BCRP 蛋白質の解析により、BCRP の高次構造の一部を明らかにした。本研究はこれまでほとんど解明されていなかった BCRP の高次構造の詳細研究に糸口を与えて BCRP 阻害剤の開発等への重要な貢献をなすと思われ、学位の授与に値するものと考えられる。