

氏 名	た ぐち よし とも 田 口 善 智
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 931 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	MECHANISMS FOR SUBSTRATE RECOGNITION AND TRANSPORT OF ANTI-CANCER DRUG TRANSPORTERS, P-GLYCOPROTEIN AND MRP (抗癌剤耐性に関与する膜輸送体 P-糖タンパク質と MRP の基質認識及び輸送機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 駒 野 徹 教 授 林 力 丸 教 授 加 藤 暢 夫

論 文 内 容 の 要 旨

P-糖タンパク質と MRP (multidrug resistance-associated protein) は、ともに、様々な種類の抗癌剤を細胞内から細胞外へ排出する膜タンパク質であり、癌の化学療法上大きな問題である癌の多剤耐性を引き起こす要因の一つになっている。しかし、これらのタンパク質による抗癌剤の排出機構はほとんどが未解明のままである。本論文は、P-糖タンパク質と MRP の抗癌剤の認識部位の解析及び基質の輸送と ATP 加水分解の共役機構の解析を行い、以下の事象を明らかにしたものである。

第1章では、P-糖タンパク質の第1膜貫通領域の中程に存在する61番目のヒスチジン (His⁶¹) が薬剤の認識及び輸送に関与する可能性について述べている。His⁶¹ を他の全種類のアミノ酸に置換した変異体を作成し、アミノ酸置換に伴う P-糖タンパク質の基質特異性の変化を検討した。その結果、His⁶¹ を、His よりも側鎖の大きいアミノ酸 (Phe, Lys, Met, Arg, Trp) に置換すると、P-糖タンパク質の基質特異性が大きく変化することを明らかにした。また、61番目のアミノ酸の側鎖が小さいと、分子量の比較的大きい抗癌剤に対して耐性度が上昇する一方、逆に、61番目のアミノ酸側鎖が大きいと、分子量の比較的小さい抗癌剤に対して耐性度が上昇する傾向が認められた。以上の結果から、P-糖タンパク質の61番目のアミノ酸残基は、このタンパク質の基質特異性の決定に関与し、その側鎖の大きさが基質特異性を左右する要因の一つであることが確認された。

第2章では、P-糖タンパク質の第1膜貫通領域を構成する His⁶¹ 以外のアミノ酸が薬剤の認識及び輸送に関与する可能性について述べている。P-糖タンパク質の61番目のアミノ酸残基が、もし基質の認識に関与していれば、その近傍のアミノ酸変異によって同様な基質特異性の変化が期待される。そこで、His⁶¹ の前後4アミノ酸を、Arg に置換した変異体を作成し、His⁶¹ の Arg 置換体と同じように基質特異性が大きく変化するか検討した。その結果、64番目のグリシン (Gly⁶⁴) と65番目のロイシン (Leu⁶⁵) を Arg に置換すると、P-糖タンパク質の基質特異性が大きく変化し、His⁶¹ を Arg に置換した変異体と類

似の基質特異性を示すことが明らかとなった。これら3つのアミノ酸を α -ヘリックス上に配置すると、ヘリックスの1つの側面を向くことが明らかになった。以上の結果から、His⁶¹、Gly⁶⁴、Leu⁶⁵を含む第1膜貫通領域の一つの側面、あるいは1つの領域が、基質の認識または輸送に関与しているものと結論している。

第3章では、MRPの基質結合とATP加水分解の共役機構について述べている。MRPの機能にはグルタチオンが重要な役割を果たしているが、グルタチオンがMRPと直接相互作用するのか、MRPの活性にどのような影響を与えるのかは明らかでない。そこで、グルタチオンやMRPの基質となる抗癌剤が、MRPのATP加水分解活性に影響を与える可能性を検討した。その結果、MRPがATPを加水分解する際に生じる反応中間体アナログの形成が、グルタチオンや抗癌剤の存在下で促進されることが明らかとなった。このことから、グルタチオンや基質となる抗癌剤は、MRPと直接相互作用することにより、ATPが加水分解される際に生じる反応中間体の形成を促進し、MRPのATP加水分解活性に影響を与えることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

癌の多剤耐性は癌の化学療法にとって大きな障害となっており、多剤耐性を克服するためには、多剤耐性機構の解明が焦眉の急である。本論文は癌細胞が多剤耐性を獲得するのに中心的な役割を果たすP-糖タンパク質及びMRPが抗癌剤を細胞外へ排出する機構を解析したもので、評価すべき点は次のとおりである。

1. P-糖タンパク質の第1膜貫通領域の中程にある61番目のヒスチジンを部位特異的置換法により、他のアミノ酸で置換すると、その基質特異性が大きく変化した。特に、61番目のヒスチジンを側鎖の大きいアミノ酸に置換すると、分子量の比較的小さな基質が輸送されやすくなり、逆に側鎖の小さいアミノ酸に置換すると、分子量の比較的大きな基質が輸送されやすくなることを明らかにした。以上の結果は、61番目のアミノ酸の側鎖と基質が直接相互作用することを示唆しており、P-糖タンパク質の機能部位の一部を決定したことの意義は大きい。

2. P-糖タンパク質の第1膜貫通領域を構成すると予想されるアミノ酸のうち、61番目のヒスチジンを含む3つのアミノ酸の置換体は、野生型のP-糖タンパク質と比較して基質特異性が大きく変化していることが明らかとなった。この結果から、第1膜貫通領域のこれらの3つのアミノ酸を含む領域が、基質の認識または輸送に関与していることが示された。

3. MRPがATPを加水分解する過程で、P-糖タンパク質で形成されるのと同様の反応中間体が形成されることを明らかにした。その中間体の形成は、グルタチオンや基質となる抗癌剤によって促進された。以上の結果から、グルタチオン及び抗癌剤がMRPと直接相互作用し、その相互作用が、MRPのATP加水分解活性に影響を与えることを示した。

以上のように、本論文は、P-糖タンパク質の抗癌剤認識ドメインの解析及びMRPの基質の結合とATP加水分解の共役機構の解析を行ったものであり、膜輸送体の生化学並びに分子生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成9年2月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。