

氏 名	なが た こう 永 田 紅
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1427 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 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	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Functional analysis of ABC proteins involved in multidrug resistance and membrane lipid dynamics (多剤耐性および膜脂質動態に関わる ABC タンパク質の機能解析)
論文調査委員	(主 査) 教授 植田 和 光 教授 加藤 暢 夫 教授 矢崎 一 史

論 文 内 容 の 要 旨

ABCタンパク質は、よく保存されたヌクレオチド結合領域 (NBF) と、複数膜貫通領域をもつ一群の膜タンパク質である。ABCタンパク質の中には、薬物や生体異物を細胞外へ排出するトランスポーターとして、あるいはイオンチャネルやレセプターとして機能するものなど、多様な機能をもつものが含まれ、これらはいずれも細胞内 ATP によって駆動あるいは制御されていると考えられている。しかし、未だ作用機構や生理機能の不明なものも多い。そこで本研究では、ABCタンパク質の作用機構を解明すること、さらに ABCタンパク質の未知の機能に関する知見を得ることを目的とした。本論文の主な内容は以下のとおりである。

第 1 章では、抗癌剤排出ポンプ MRP1 (multidrug resistance protein 1) について、ATP との相互作用を中心に解析を行った。MRP1 は癌の多剤耐性の原因タンパク質のひとつであり、ATP の加水分解依存的に抗癌剤を細胞外へ排出する。その基質輸送には細胞内のグルタチオンが必要であると示唆されていたが、詳細は明らかではなかった。MRP1 安定発現細胞から調製した細胞膜画分をリン酸類縁体であるバナジン酸と 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ ATP と共に反応させ、生成した安定な阻害中間体を光親和標識する vanadate-induced nucleotide trapping 法によって MRP1 の ATP 加水分解活性を検討した。その結果、MRP1 の ATP 加水分解活性が抗癌剤エトポシドとグルタチオンによって相乗的に強く促進されることを明らかにした。さらに、適当な条件下でトリブシン処理を行うことによって MRP1 分子内のふたつの NBF (NBF1 と NBF2) を分離して解析することに成功し、vanadate-induced nucleotide trapping が起こるのは NBF2 においてのみであることを明らかにした。

第 2 章では、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* のベキソファジー不能株から、新規 ABC タンパク質遺伝子 *PpYORI* を単離した。*PpYORI* のコードするタンパク質は、MRP1 や *Saccharomyces cerevisiae* の Yor1p と高い相同性を示した。*PpYORI* 破壊株を樹立し、ベキソファジーの進行に与える影響を検討したところ、破壊株においてベキソファジーの進行が遅延することを見いだした。ベキソファジーは、ベルオキシソームの分解のために膜の新生、融合などダイナミックな膜脂質動態をともなう生理現象であることから、MRP1 類縁タンパク質が膜脂質動態に関与する可能性が示唆された。

第 3 章では、肺胞 II 型細胞の lamellar body 限界膜に特異的に発現する ABCA3 について解析を行った。まず、ABCA3 を安定に発現する細胞株 HEK293/hABCA3 を樹立し、ABCA3 が細胞内の lamellar body 様構造体膜にターゲティングされることを示した。ついで、HEK293/hABCA3 から調製した膜画分および 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ ATP を用いて vanadate-induced nucleotide trapping 法により ABCA3 と ATP との相互作用を検討した。その結果、ABCA3 は Mg^{2+} 存在下、バナジン酸依存的に光親和標識されることを明らかにした。8-azido- $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP を用いた同様の実験ではほとんど光親和標識されなかったことから、ABCA3 が ATP 加水分解活性をもつことを初めて示した。また、ABCA3 の ATP 加水分解反応が、他の ABC タンパク質では見られない特異な金属依存性を示すことを明らかにした。さらに、膜画分を methyl- β -cyclodextrin または phospholipase B で前処理することにより、光親和標識量が減少することを見出した。以上の結果から、

脂質成分がABCA3の輸送基質となる可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

ヒトには49個のABCタンパク質遺伝子があり、そのうちいくつかのものが癌の多剤耐性や遺伝性疾患の原因遺伝子として同定されている。また近年、ABCタンパク質と細胞内コレステロールやリン脂質輸送、これらの異常に起因する動脈硬化症や未熟児における肺サーファクタント産生不足との関連も注目を集めており、正常な生命活動のためにABCタンパク質が重要な働きを担っていることがうかがえる。本論文は、癌の多剤耐性および膜脂質動態に関与するABCタンパク質についてATPとの相互作用を中心に機能解析を行ったものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 多剤耐性原因タンパク質MRP1のATP加水分解活性が抗癌剤エトポシドとグルタチオンによって相乗的に強く促進されることを明らかにした。また、抗癌剤エトポシドは輸送の際に必ずしも従来言われていたようなグルタチオン包合体の形になる必要はなく、エトポシドとグルタチオンが共に輸送されるという新しいモデルを提出した。

2. MRP1のふたつのNBFを分離して解析することに成功し、NBF1とNBF2の非等価性を示した。これによりMRP1のふたつのNBFは何らかの機能分担をしていることを示唆した。

3. メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* のペキシファジー不能株から、新規ABCタンパク質遺伝子 *PpYOR1* を単離した。*PpYOR1* 破壊株を樹立し、破壊株においてペキシファジーの進行が遅延することを見いだした。*PpYOR1* のコードするタンパク質はMRP1と高い相同性をもつものであり、MRP1類縁タンパク質が膜脂質動態に関与する可能性を示唆した。

4. 肺胞II型細胞のlamellar body限界膜に特異的に発現するABCA3がATP加水分解活性をもつことを初めて示した。また、ABCA3発現細胞から調製した膜画分をmethyl- β -cyclodextrinまたはphospholipase Bで前処理することにより、ATP加水分解量が減少することを見いだした。lamellar body内部には、呼吸を正常に行うために必要な肺サーファクタントと呼ばれる脂質成分が溜め込まれていることから、ABCA3が脂質を基質として輸送する可能性を示した。

以上のように、本論文は多剤耐性および膜脂質動態に関与するABCタンパク質の分子メカニズムと新たな生理機能の可能性について重要な新知見を提示したものであり、生化学、分子生物学および細胞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16年2月16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。