

薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 田辺 公一

研究要旨 病原真菌の多剤耐性化は、抗真菌薬開発において克服しなければいけない重要な課題である。多剤耐性の原因となる薬剤排出トランスポーターの基質認識と輸送のメカニズムを明らかにする。

A. 研究目的

本研究においては、病原真菌 (*Candida glabrata* を中心として) の多剤耐性に関わる ATP binding cassette (ABC) タンパク質の生化学的、酵素化学的性質を明らかにすることを目的とする。そのために、様々な病原真菌から ABC タンパク質遺伝子を単離し、出芽酵母において大量発現させて機能解析を行う。

治療薬の開発に役立てる。

B. 研究方法

出芽酵母の開口分泌の研究において、*Sec6-4* 遺伝子変異が知られている。この遺伝子変異をもつ変異株は、許容温度においては通常の生育を示すが、制限温度である 37°C で培養すると分泌小胞を細胞内に大量に蓄積する。

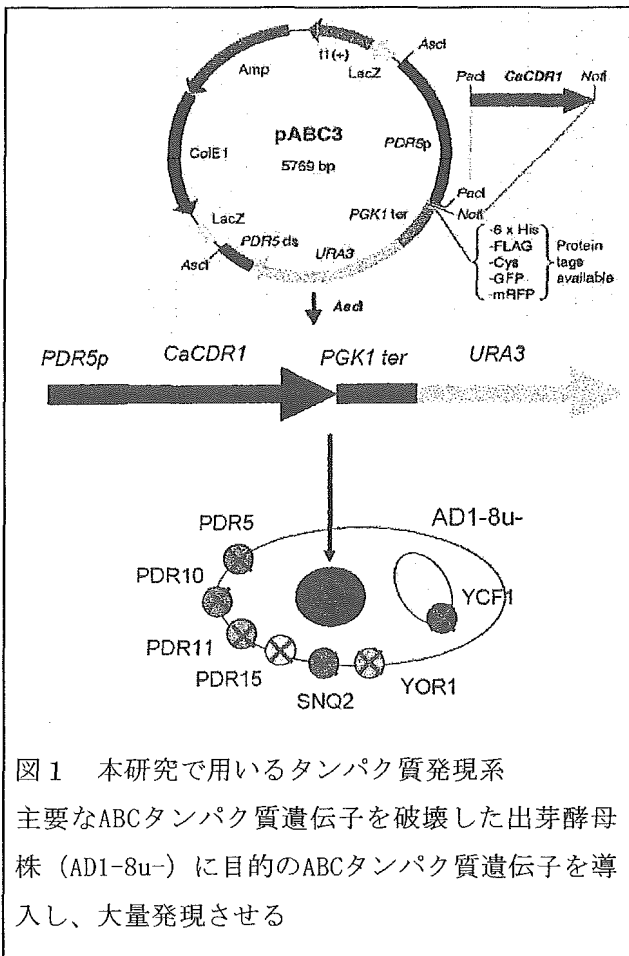


図1 本研究で用いるタンパク質発現系
主要なABCタンパク質遺伝子を破壊した出芽酵母株 (AD1-8u-) に目的のABCタンパク質遺伝子を導入し、大量発現させる

また、ABCタンパク質による薬剤排出活性を簡便に再現性よく測定できる分泌小胞を用いた新規実験系を構築し、薬剤排出機構の解明、真菌症

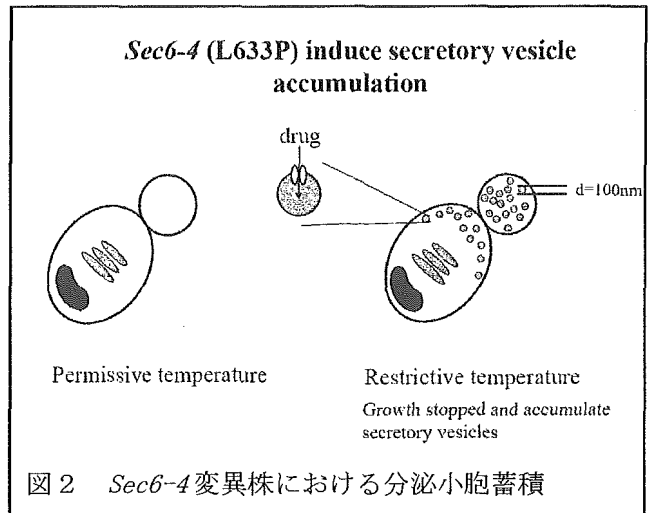


図2 *Sec6-4* 変異株における分泌小胞蓄積

出芽酵母の主要な ABC タンパク質遺伝子を破壊した株 (AD1-8u-) に、さらに *Sec6-4* 遺伝子変異を導入し、制限温度において分泌小胞を細胞内に蓄積するような変異株 (AD1-8u-*sec6-4*) を作成する。まず、この細胞株を用いて、最も多くの分泌小胞を細胞内に蓄積させるような培地、培養温度、生育時期などについて条件検討を行う。いくつかの条件で培養した細胞を透過型電子顕微鏡で観察し、分泌小胞の蓄積を比較する。また、分泌小胞の調製方法についても、細胞の破碎方法、破碎液の分画方法などを検討し、分泌小胞に特異的に存在するタンパク質をマーカーとして、純度と収

量の向上をめざす。

ABC タンパク質の細胞質ドメインのリン酸化は、薬剤排出活性やタンパク質の局在を制御していると考えられている。病原真菌 *Candida glabrata* の ABC タンパク質、Cdr1p と Pdh1p およびそれらのリン酸化部位の変異タンパク質を AD1-8u 株において発現させて、リン酸化と薬剤排出活性との相関を調べる。

(倫理面への配慮)

当研究においては、病原真菌と薬剤との相互作用に焦点をあてて研究を行っているために、現段階で動物実験を行う予定はない。また、病原真菌の薬剤排出ポンプ遺伝子を出芽酵母において発現させて機能解析を行っているために、実験材料を P1 レベルで取り扱うことができる。環境への拡散も遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律にのっとり、十分に配慮して研究を行っている。

C. 研究結果

出芽酵母は *Sec6* 遺伝子の変異 *Sec6-4* によって、25°C では正常に生育するが、制限温度では分泌小胞を細胞内に大量に蓄積することが知られている。出芽酵母の主な ABC タンパク質遺伝子を破壊した株 (AD1-8u) にこの *Sec6-4* 遺伝子変異を導入し、制限温度において分泌小胞を蓄積するような株 (AD1-8u-*sec6-4*) を構築した。まず、この酵母株がどのような温度において報告されているような分泌小胞を蓄積するのかを透過型電子顕微鏡観察により検討した。その結果、AD1-8u-*sec6-4* は 25 度でも少量の分泌小胞の蓄積が見られ、温度依存的に小胞の蓄積が増えていくが、37°C では正常な細胞形態をとっていなかった。また、この酵母株は 34°C までは生育できるが、37°C では生育速度が著しく低下した。そこで 34°C を指摘温度と判断し、現在、分泌小胞の調製方法を検討している。

Temperature dependent vesicle accumulation of AD *Sec6-4* cells

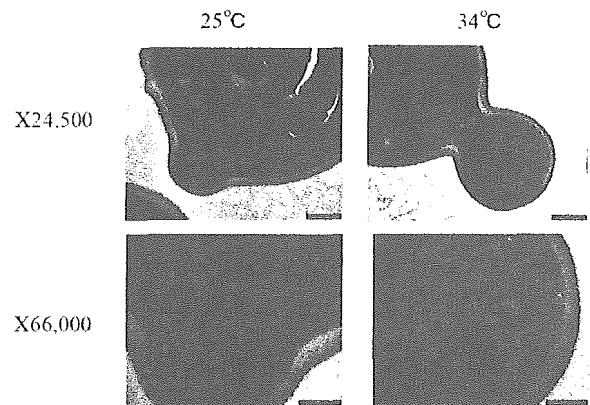


図3 分泌小胞を蓄積している出芽酵母の電子顕微鏡写真

25°Cでも出芽部位に分泌小胞が蓄積している

病原真菌 *Candida glabrata* の ABC タンパク質、Cdr1p と Pdh1p はアゾール系抗真菌薬を排出し、真菌に薬剤耐性を付与する。我々は、Cdr1p と Pdh1p を出芽酵母において大量発現させて、タンパク質のリン酸化状態と薬剤排出機能の相関を調べた。様々なリン酸化ペプチドを認識する抗体を用いたウエスタンブロットにおいて、抗リン酸化 Akt-substrate 抗体は Cdr1p と Pdh1p を、抗リン酸化 PKA-substrate 抗体は Pdh1p のみを認識した。しかし、抗 PKC-phosphoprotein 抗体や抗リン酸化チロシン抗体はいずれのタンパク質も認識しなかった。以上の結果より、Cdr1p と Pdh1p はともに PKA もしくは類似のキナーゼに依存したリン酸化を受けていることが推測された。そこで、PKA の触媒サブユニット遺伝子 *TPK1*、*2*、*3* を破壊した株において Cdr1p と Pdh1p を発現させてリン酸化状態を調べ、両者はそれぞれ異なる PKA の触媒サブユニットによってリン酸化されることを示した。

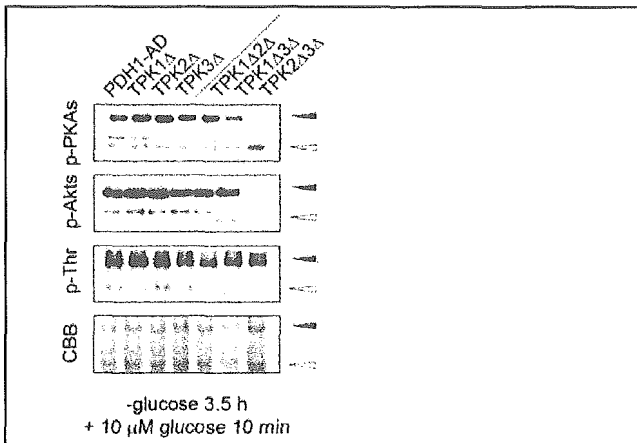


図4 Pdh1pのリン酸化

出芽酵母のもつ3つのPKA catalytic subunit (TPK) 遺伝子をそれぞれ破壊し、Pdh1pのリン酸化量の変化を調べた。Pdh1pは主にTpk2pとTpk3pによってリン酸化されていることが明らかになった。

また、細胞を様々な培養条件で培養し、調製した膜画分を用いて同様のウェスタンブロットを行い、Cdr1pのリン酸化量がストレスや栄養条件によって変動することを明らかにした。

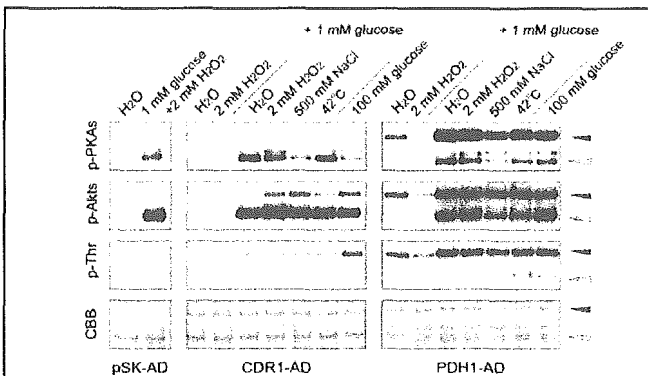


図5 Cdr1p、Pdh1pのストレスに応答したリン酸化
Pdh1pのリン酸化量は比較的一定であるが、Cdr1pのリン酸化量はストレスや栄養条件によって変動する。

さらに、Cdr1pのリン酸化部位を同定するために、推測されるAktによるリン酸化部位をひとつずつアラニンに置換した変異タンパク質を発現させて、リン酸化状態と薬剤排出能、薬剤耐性を比較した。

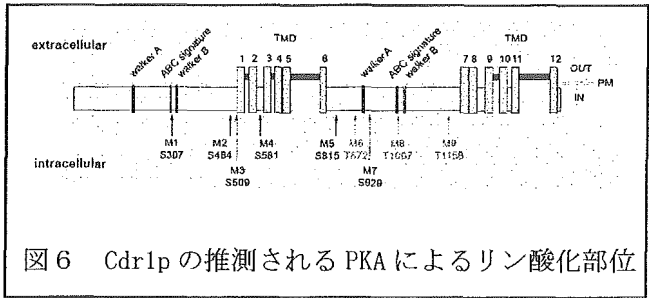


図6 Cdr1pの推測されるPKAによるリン酸化部位

8つある候補のうち nucleotide binding domain (NBD) 1の付近にある307番目(M1)と484番目(M2)のセリンのアミノ酸置換変異は抗リン酸化Akt-substrate抗体によるウェスタンブロットにおいてシグナルが大幅に減少し、二つ同時にアラニンに置換した変異タンパク質(M1,2)ではシグナルを全く検出できなかった。

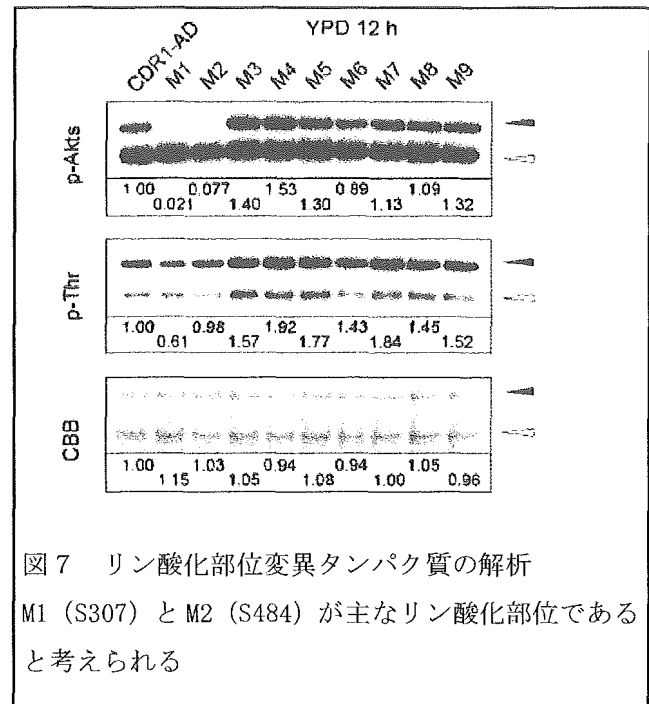


図7 リン酸化部位変異タンパク質の解析
M1 (S307) と M2 (S484) が主なリン酸化部位であると考えられる

また、これらの変異タンパク質を発現している酵母株の薬剤耐性度も野生型と比較して有意に低下していた。

Strain	Fluconazole
pSK-AD	0.5
CDR1-AD	128
CDR1-M1	64
CDR1-M2	128

(MIC80 μg/ml)

図8 リン酸化部位変異株のフルコナゾール感受性

これらのリン酸化部位は近傍にある NBD (nucleotide binding domain) の活性を調節し、タンパク質全体の薬剤輸送活性を調節するものと考えられる。

D. 考察

ABC タンパク質の生理的な役割は、膜脂質のトランスロケーターであると考えられている。ヒト MDR2 はリン脂質のトランスポーター、ABCA1 はコレステロールのトランスポーターであるという報告がある。病原真菌においても *Candida albicans* の CDR1 がリン脂質を輸送するという報告がなされているが、大半の ABC タンパク質の生理的機能は未だに不明である。出芽酵母には約 20 種類の ABC タンパク質が存在することが報告されており、複数個存在するファミリータンパク質が様々な基質を輸送することで、機能分担を行っていると考えられる。このたび、主要な ABC タンパク質を欠失した AD1-8u 株において *Sec6-4* 変異が野生株よりも表現型に大きな影響を及ぼしていたことから、分泌小胞の輸送において脂質の分配が重要であると考えられた。さらに、脂質分子は単に膜成分としてだけではなく、増殖や分化といったイベントにおけるシグナル分子としても機能することから、本研究で用いる酵母株の表現型をより詳しく調べておく必要があると考えられる。

Candida glabrata の ABC タンパク質のリン酸化と機能との相関を以前から研究していたが、今回、リン酸化部位の変異タンパク質を用いて、酵素活性、基質輸送活性を詳細に調べた。その結果、Cdr1p、Pdh1p はともにリン酸化を受けており、特に Cdr1p においては栄養条件や細胞外ストレスによってリン酸化量の変動することを明らかにした。また、Cdr1p のリン酸化部位変異タンパク質は野生型と比較して薬剤排出能、酵素活性がともに低下していた。これらの結果は、Cdr1p のリン酸化と機能の強い相関を示唆しており、リン酸化は細胞の代謝レベルやストレス応答のシグナルをタンパク質の機能に伝達する働きをもっていると推測される。

ABC タンパク質は ATP の加水分解エネルギーを

利用して構造変化し、基質を輸送すると考えられている。ATP は生命活動のためのエネルギー源であり、それを利用するタンパク質、酵素はエネルギーを無駄に消費しないように細胞の代謝状態や生育環境に応じて調節を受けているのかもしれない。

E. 結論

病原真菌の薬剤排出ポンプ、ABC トランスポーターの酵素化学的解析を行うために、分泌小胞を用いた新規実験系の構築を開始した。ABC タンパク質を含む膜タンパク質を分泌小胞に大量に発現させられる酵母株を構築できた。

病原真菌 *Candida glabrata* の ABC タンパク質 Cdr1p と Pdh1p のリン酸化と機能の相関を調べた。Cdr1p は代謝条件やストレスによってリン酸化状態が変化し活性が調節されているというモデルを提唱した。

F. 研究発表

1. Wada S, Tanabe K, Yamazaki A, Niimi M, Uehara Y, Niimi K, Lamping E, Cannon RD, Monk BC
Phosphorylation of *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporter Cdr1p regulates drug efflux activity and ATPase stability
Journal of Biological Chemistry 280(1):94-103 (2005)
2. Umeyama T, Kaneko A, Nagai Y, Hanaoka N, Tanabe K, Takano Y, Niimi M, Uehara Y
Candida albicans protein kinase CaHsl1p regulates cell elongation and virulence
Molecular Microbiology 55(2):381-95 (2005)
3. Niimi M, Wada S, Tanabe K, Kaneko A, Takano Y, Umeyama T, Hanaoka N, Uehara Y, Lamping E, Niimi K, Tsao S, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD
Functional Analysis of Fungal Drug Efflux Transporters by Heterologous Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし