

平成18年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## 政策創薬総合研究

### 課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 …… 12
KH23304	Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 …… 66
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル …… 79
KH33310	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	田辺公一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFc $\gamma$ 受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

## 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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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* 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。

- (1) ABC タンパク質は膜タンパク質であり、精製するためには、界面活性剤で脂質を一旦タンパク質から乖離させる必要がある。しかし、精製したタンパク質に脂質を加えることで再構築しても、元の立体構造をとって機能するとは限らない。そこで、本研究では、ABC タンパク質による薬剤排出活性と酵素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、真菌症治療薬の開発に役立てる。
- (2) 多剤耐性化した *Candida albicans* においては ABC タンパク質である Cdr1p と Cdr2p の発現量が亢進していることが多い。Cdr1p と Cdr2p はアミノ酸配列において高い相同性を有するが、排出する薬剤や阻害剤に対する応答が異なる。これらの二つのタンパク質のドメインを交換したキメラタンパク質を作製し、機能解析を行うことで、基質認識に関わるドメインを同定し、薬剤結合部位を決定する。

### B. 研究方法

- (1) 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。

まず、分泌小胞を蓄積する *sec6-4* 遺伝子変異を同定する。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。

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。

- (2) *Candida albicans* の Cdr1p と CaCdr2p は nucleotide binding domain (NBD) と transmembrane domain (TMD) が 2 回繰り返される二次構造をとると考えられている。推定される二次構造から、NBD と TMD の間でペプチド鎖を 4 分割し、Cdr1p と Cdr2p でドメインを互いに交換する。具体的には、まず各ドメインをコードする cDNA 領域を PCR によって増幅する。続いて互いにオーバーラップした部分を用いて最も外側に位置するプライマーによる PCR で、全ての断片を連結させる。

このようにして作製した遺伝子カセットを出芽酵母

AD-1-8u 株に導入し発現させて、薬剤感受性試験および酵素化学的解析を行う。

(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

(1) 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。前年度までに出芽酵母の主な 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。この実験系における *Sec6p* タンパク質の挙動および *sec6-4* 遺伝子変異について詳細に解析をすすめた。*sec6-4* 変異を有する SY1 株の *SEC6* 遺伝子の配列を決定し、633 番目の leucine が proline になるような遺伝子変異 (T1898C) を同定した。*Sec6p* もしくは *Sec6-4p* を GFP 融合タンパク質として発現させる遺伝子カセットを作製し、AD1-8u 株に導入した。*Sec6p* は主に出芽根部分に局在し、37°C の制限温度においてもその局在は変化しなかったが、*Sec6-4p* は 37°C においては細胞内に蓄積するような局在を示した。さらに、*Sec6-4* 株において RFP を C 末端に結合させた *Candida albicans* ABC タンパク質 CaCdr1p を大量発現させて、その局在を調べた。CaCdr1p は 23°C においては主に細胞質膜に局在し、37°C においては一部が細胞質に局在するようになった。

(2) *Candida albicans* の Cdr1p と Cdr2p の各ドメインを交換したキメラタンパク質を AD1-8u 株において大量発現させて機能解析を行った。まず、TMD

を互いに置き換えたコンストラクトについて調べた。以後、キメラコンストラクトについては N 末端から C 末端に向かって並ぶドメインの順番にしたがって 1212 (それぞれ NBD1 が Cdr1、TMD1 が Cdr2、NBD2 が Cdr1、TMD2 が Cdr2) のように記述する。抗真菌薬や抗癌剤を含む 27 種類の化合物に対する薬剤感受性試験の結果、それぞれ 2121 は Cdr1p と、1212 は Cdr2p と同様の薬剤耐性を示したことから、TMD によって基質特異性は決定されている、言い換えれば NBD は Cdr1p または Cdr2p であってもタンパク質は機能すると考えられた。各膜貫通ドメインの置換に関して様々な基質に対する感受性、および阻害剤に対する感受性を調べた結果、以下のような結果を得ることができた。

- (ア) TMD1 を CaCdr2p 由来の配列に置換すると nigericin、monensin、bafilomycin A1 に対する薬剤感受性が大幅に低下する
- (イ) TMD1 が CaCdr1p 由来、TMD2 が CaCdr2p 由来であるキメラタンパク質発現株は蛍光基質であるローダミンの排出活性が特異的に低下する。
- (ウ) TMD1 が CaCdr1p 由来の配列であるキメラタンパク質の ATPase 活性は oligomycin 感受性を示す。
- (エ) TMD1 と TMD2 の両方が CaCdr1p 由来の配列であるキメラタンパク質のみが CaCdr1p の特異的阻害剤 FK506 による阻害を受ける。

### 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。

Sec6p は、開口分泌における分泌小胞の細胞質膜との融合において重要なタンパク質であるが、その代表的な温度感受性変異である *sec6-4* 変異の実体が L633P であることを突き止めた。実際に L633P 変異を導入した酵母株は SY1 株と同様に、低温では生育できるが、37°C では生育が阻害された。L633P 変異は 37°C になった際に、タンパク質の機能に影響するのか、もしくは立体構造に異常をきたして分解が促進されてしまうのではないかと考えられる。GFP 融合タンパク質を用いた顕微鏡観察により、野生型の Sec6p はどのような温度でも出芽部分もしくは分裂環付近に局在しているのに対して、L633P 変異をもつ Sec6p は高温になると細胞内に拡散した局在を示したことから、Sec6p は L633P 変異によって開口分泌に必須の機能複合体から乖離してしまうのではないかと推測される。

*Candida albicans* の Cdr1p と Cdr2p は多剤耐性化の主要な原因となる薬剤排出ポンプとして精力的に研究が進められてきた。近年、プロモーター領域の同定、転写調節因子の解析が進み、様々な環境ストレスや宿主からもたらされる因子に応答して *CDR1* と *CDR2* の発現が亢進することが明らかとなってきた。したがって、病原真菌の薬剤耐性化を避けることは困難であり、耐性化した菌を効果的に駆逐する手法の開発が必要となってくる。Cdr1p や Cdr2p の基質認識機構を明らかにすることは効果的な薬剤の探索や、ポンプ機能を抑えるような特異的阻害剤の開発にも大きく貢献するものと考えられる。

本研究においては、きわめてよく似たアミノ酸配列をもつ Cdr1p と Cdr2p が異なる薬剤排出活性をもつという性質を利用し、それぞれのドメインを交換したキメラタンパク質を解析することで、基質特異性を決定する領域を調べることにした。キメラタンパク質発現遺伝子の作製は複数の PCR 断片を一本の DNA 鎖に連結させる cross over PCR によって行った。この方法はプラスミドを用いた

従来の遺伝子組み換え実験手法と比較してはるかに効率がよく、きわめて容易にキメラタンパク質発現カセットを作製することができた。

いずれのキメラコンストラクトも野生型と比較して遜色のないタンパク質発現量を示し、GFP を C 末端に融合させたタンパク質での細胞内局在も野生型の Cdr1p と類似したものであった。従来のドメイン交換解析においては、タンパク質のミスフォールドなどによる発現量の低下から、解析できないドメインの組み合わせがあるのが通常であったが、本実験においては、アミノ酸配列の相同性の高い分子を選択したことで、タンパク質の立体構造に大きなひずみが生じなかったために、全ての組み合わせを解析できたと考えられる。

調べたドメインの組み合わせのうち、TMD1 の交換は、nigericin、monensin、bafilomycin A1 に対する薬剤感受性を変化させ、酵素活性 (ATPase) の阻害剤 oligomycin に対する感受性に影響を及ぼすことを明らかにした。nigericin、monensin、bafilomycin A1、oligomycin は環状のマクロライド様の構造をとると考えられており、類似の立体構造をもつ基質あるいは阻害剤との相互作用が TMD1 の配列に依存すると推測される。また、ふたつの TMD が CaCdr1p 由来の配列でなければ阻害剤 FK506 が作用しなかったことや、TMD1 が CaCdr1p、TMD2 が CaCdr2p の組み合わせのタンパク質のローダミン排出活性が特異的に低下していたことから、ドメイン同士の相互作用も基質認識にとって重要であることが示唆された。

TMD が基質特異性の決定に関与しているという結果は、これまでの他の ABC タンパク質での実験結果を支持するものである。また、Cdr1p と Cdr2p のアミノ酸配列において、TMD は保存性が比較的低いことから、TMD が基質特異性の決定において主要な役割を果たしている可能性は高い。

今後、さらに狭い領域でドメイン置換を行い、基質認識部位を絞り込んでいく。Cdr1p と Cdr2p の TMD は相同性の高い領域と低い領域がパッチ状に点在している。したがって、以後のさらに狭い領域でアミノ酸配列を置換していくのも比較的容

易である。

## 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 albicans* の ABC トランスポーター CaCdr1p と CaCdr2p の間でドメイン交換解析を行い、基質認識および阻害剤に対する応答性を決定するドメインを決定した。また、複数のドメインの組み合わせ、相互作用によっても基質特異性が決定することを明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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) 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*  
Japanese Journal of Infectious Diseases 58(1):1-7 (2005)

3) Lamping E, Tanabe K, Niimi M, Uehara Y, Monk BC, Cannon RD. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *sec6-4* mutation and tools to create *S. cerevisiae* strains containing the *sec6-4* allele Gene 361:57-66 (2005)

4) Niimi M, Tanabe K, Wada S, Yamazaki A, Uehara Y, Niimi K, Lamping E, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD. ABC transporters of pathogenic fungi: recent advances in functional analyses 日本医真菌学会雑誌 46(4): 249-60 (2005)

5) Holmes AR, Tsao S, Lamping E, Niimi K, Monk BC, Tanabe K, Niimi M, Cannon RD. Amino acid residues affecting drug pump function in *Candida albicans*—*C. albicans* drug pump function. 日本医真菌学会雑誌 47(4): 275-81 (2006)

### 2. 学会発表

1) 田辺公一、和田俊一、山崎亜希子、新見昌一、上原至雅、新見京子、Erwin Lamping、Richard D. Cannon、Brian C. Monk : *Candida glabrata* の ABC タンパク質 Cdr1p のリン酸化は薬剤排出活性と ATP 加水分解活性を調節する 第 37 回 酵母遺伝学フォーラム研究報告会 2004 年 9 月

2) 田辺公一、和田俊一、山崎亜希子、Kyoko Niimi、Erwin Lamping、Richard D. Cannon、Brian C. Monk、上原至雅、新見昌一：病原真菌 *Candida glabrata* の ABC タンパク質 Cdr1p のリン酸化は薬剤排出活性と ATP 加水分解活性を調節する 第 27 回 日本分子生物学会大会 2004 年 12 月

3) 田辺公一、和田俊一、山崎亜希子、Kyoko Niimi、Erwin Lamping、Richard D. Cannon、Brian C. Monk、上原至雅、新見昌一：病原真菌 *Candida glabrata* の ABC タンパク質 Cdr1p のリン酸化は薬剤排出活性と ATP 加水分解活性を調節する 第一回 真菌若手研究会 2005 年 3 月

4) 田辺公一、Kyoko Niimi、Erwin Lamping、Richard D. Cannon、Brian C. Monk、上原至雅、新見昌一：病原真菌の ABC タンパク質の作用メカニズムの解明に向けて 第二回 真菌若手研究会 2005 年 8 月

5) 田辺公一、上原至雅、新見昌一：病原真菌 ABC タンパク質と機能阻害物質との相互作用部位の検討 第 79 回 日本細菌

6) Koichi Tanabe, Yukie Takano, Yoshimasa Uehara, Masakazu Niimi: Novel mutations in a fungal ABC protein result in insensitivity to the efflux pump inhibitor FK506  
20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology

7) 田辺公一、高野幸枝、梅山隆、上原至雅、新見昌一、病原真菌 ABC トランスポーターと阻害剤の相互作用 第5回 感染症沖縄フォーラム 2007年2月

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



---

平成18年度

政策創薬総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社