

トランスポーターの制御による分子標的治療法の開発と薬効評価に関する研究

研究分担者 杉本 芳一 慶應義塾大学薬学部教授

研究要旨

ubiquitin E3 ligaseのFBX015が、P-糖タンパク質（P-gp）のC末の細胞内ドメインに結合することを見出した。このFBX015とubiquitin E2 enzymeのUbe2r1が、協同してP-gpのポリユビキチン化に働き、P-gpの分解を誘導して発現を低下させることを示した。以上より、FBX015とUbe2r1が、P-gpのユビキチン-プロテアソーム系による分解の担い手であることを明らかにした。

A. 研究目的

P-糖タンパク質（P-gp）は、がん化学療法において、がん細胞の抗がん剤耐性および抗がん剤の体内動態の制御に関与する重要な因子である。我々はこれまでに、MEK阻害薬がP-gpの分解を促進させ、P-gpの発現を低下させることを明らかにしてきた。本研究では、P-gpの翻訳後修飾にかかわる因子を同定し、その機能を解析することを目的とした。

B. 研究方法

P-gpのC末の細胞内ドメイン（997-1280 a.a.）にFLAGタグとHAタグを付加したcDNAを作成した。これを発現ベクターに組み込んでHEK293細胞に導入した。この細胞より、anti-FLAG M2 affinity gelとanti-HA affinity gelを用いてP-gp-Cを精製した。得られた免疫沈降物をSDS-PAGEで分離後、Coomassie Brilliant Blue染色により結合タンパク質を確認した。各バンドを切り出してトリプシン消化後、MALDI-TOF/MS解析を行った。P-gpの発現はwestern blotで、細胞膜上のP-gp発現はFACSで解析した。P-gpのユビキチン化は免疫沈降-western blotにより検討した。また、ヒトの23個のE2 ubiquitin-conjugating enzymeを全てクローニングして細胞に導入し、P-gpとの相互作用について検討した。P-gpの機能は、rhodamine123（R123）の細胞内蓄積とビンクリスチン（VCR）の感受性試験で調べた。

（倫理面への配慮）

本研究における遺伝子組換え実験は、所属機関の遺伝子組換え実験安全要綱に従って行なわれた。

C. 研究結果

免疫沈降によりP-gpのC末の細胞内ドメインに結合するタンパク質を分離した。SDS-PAGEにより、17本の

タンパク質のバンドを検出した。これをMALDI-TOF/MS解析したところ、22種類の候補タンパク質が同定された。このうち、ubiquitin E3 ligaseのFBX015に着目して実験を進めた。

プロテアソーム阻害薬のMG132は、P-gpのユビキチン化を亢進させ、P-gpの発現量を増大させた。また、ユビキチン化 P-gpの消失を遅延させた。リソソーム阻害薬はP-gpの発現に影響しなかった。これにより、P-gpの分解にユビキチン-プロテアソーム系が関与することが示唆された。

タンパク質のユビキチン化には、E2 ubiquitin-conjugating enzymeとE3 ligaseが必要である。FBX015と協調してP-gpのユビキチン化に働くE2 enzymeを同定するため、ヒトの23個のE2 enzymeの全てのcDNAを作成してそれぞれ細胞に導入し、FBX015およびP-gpとの結合を検討した結果、Ube2r1がこの両者に結合することが明らかになった。

FBX015とUbe2r1の、P-gpのユビキチン化と分解に対する効果を検証するため、cDNA導入実験およびsiRNA導入実験を行った。その結果、FBX015のcDNA導入により、P-gpのユビキチン化は亢進した。このユビキチン化は、FBX015のsiRNAの導入によりキャンセルされた。また、FBX015、Ube2r1をノックダウンすると、P-gpのユビキチン化は抑制され、P-gpの発現は増大した。FBX015のノックダウンにより、細胞へのrhodamine123の取り込みが低下し、vincristine に対する感受性が低下した。

以上より、Ube2r1とFBX015は、協同してユビキチン-プロテアソーム系によるP-gpのユビキチン化と分解に働くと結論された。

D. 考察

がん細胞におけるP-gpの発現は、そのがんの抗がん剤感受性の重要な決定因子である。これまで、P-gpの発現制御機構として、MDR1遺伝子（P-gpの遺伝子）の増幅や転写活性化、メチル化などの研究が多く行われて

きたが、P-gpの分解の制御機構に関する研究はほとんど行われてこなかった。本研究は、P-gpの分解の機構を明らかにするとともに、細胞膜タンパク質のユビキチン-プロテアソーム系による分解機構についても新たな知見を提供するものである。

- 2. 実用新案登録なし
- 3. その他

E . 結論

ubiquitin E3 ligaseのFBX015が、P-糖タンパク質（P-gp）のC末の細胞内ドメインに結合することを見出した。このFBX015と、ubiquitin E2 enzymeのUbe2r1が、協同してP-gpのポリユビキチン化に働き、P-gpの分解を誘導して発現を低下させることを示した。以上より、FBX015とUbe2r1が、P-gpのユビキチン-プロテアソーム系による分解の担い手であることを明らかにした。

F . 健康危険情報

G . 研究発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

1. 論文発表

1. Katayama, K., Noguchi, K., Sugimoto, Y. FBX015 regulates P-glycoprotein/ABCB1 expression through the ubiquitin- proteasome pathway in cancer cells. *Cancer Sci.*, 104(6):694-702, 2013.
2. Fujita. Y., Noguchi, K., Suzuki, T., Katayama, K., Sugimoto, Y. Biochemical Interaction of Anti-HCV Telaprevir with the ABC Transporters P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein. *BMC Res, Notes*, 6:445, 2013.
3. Katayama, K., Yamaguchi, M., Noguchi, K., Sugimoto, Y. Protein phosphatase complex PP5/PPP2R3C dephosphorylates P-glycoprotein/ABCB1 and down-regulates the expression and function. *Cancer Lett.*, 345(1):124-131 2013.
4. Noguchi, K., Katayama, K., Sugimoto, Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: Basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmacogenomics Pers. Med.*, 7(1):53-64, 2014.

H . 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得なし

