

氏 名	わにがせら あの一じゃ Wanigasekera Anoja W. M. P.
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 253 号
学位授与の日付	平成 13 年 7 月 26 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	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on Inhibitor for Pleiotropic Drug Resistant Pump, Pdr5 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (主査)
審 査 委 員	教 授 小田耕平 教 授 伊倉宏司 教 授 田嶋邦彦

## 論文内容の要旨

ガンの化学療法の障害となっている多剤耐性(multidrug resistance,MDR)は、構造や機能が異なる複数の薬剤に対して細胞が耐性になる現象を示す。これは、ABC(ATP-binding cassette)トランスポーター・スーパーファミリーに属する MDR タンパク質(p-糖タンパク質)が細胞膜上に高発現し、様々な抗ガン剤を細胞から排出するためである。

MDR と類似の現象が酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にも存在し、PDR(Pleiotropic drug resistance)と呼ばれている。Pdr タンパク質として Pdr5, Snq2, Ste6, Ycf1, Yrs1/Yor1 などの ABC トランスポーター・スーパーファミリーが報告されている。これらの中で、Pdr5 タンパク質は、シクロヘキシイミド、セルレニン、コンパクチン、スタウロスポリン、ローダミンなど、様々な薬剤に対する耐性を酵母に付与する。

酵母にヒトと類似の薬剤耐性機構が存在することは、酵母が MDR のモデルとして使用可能であることを示す。酵母は、遺伝子工学的手法が確立しており、且つ、ゲノムプロジェクトも終了し、モデル生物としての条件が備わった生物の 1 つである。申請者は、この酵母を使用して Pdr5 阻害物質の全く新しい検索系を構築し、これを用いて新規な阻害物質の分取に成功した。

本論文は、緒論と 2 つの章より構成されている。

緒論では、研究の背景と位置付け、及び意義について述べた。

第 1 章では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を使用して Pdr5 特異的な阻害物質を高感度に検索可能な新規スクリーニング系を構築した。検定菌にはエルゴステロール欠損( $\Delta$ erg3)をバックグラウンドに有し、更に Pdr5 と Snq2 を共に欠損させたものを用いた。この株は、Pdr5 タンパク質の基質であるシクロヘキシイミドとセルレニンに対して野生株のそれぞれ 16 倍、4 倍の感受性を示した。スクリーニング系の構築は、Pdr5 高発現株に対してシクロヘキシイミド或いはセルレニンと検定試料とを同時に作用させた時に相乗的に酵母の増殖を強く阻害し、且つ、細胞毒性が低いものが検出可能に行った。この系の感度は高く、例えば Mdr 阻害物質として最近明らかとなった FK506 の効果が低濃度( $\sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ )で検出可能であった。また、FK506 は Snq2 タンパク質には作用しないなど、このスクリーニング系の選択性が高いことも実証された。

第 2 章では、上記検索系を利用し、約 10,000 株の放線菌の培養上清を対象として検索した結果、Pdr5 阻害物質生産菌の取得に成功した。本菌は、分類の結果 *Kitasatospora* sp. E-420 と命名さ

れた。本菌の培養上清から精製された Pdr5 阻害物質の分子量は 1,193 であり、pH7~9 で安定、pH2~4 で不安定であった。本阻害物質は、KPI (*Kitasatospora* *Pdr5* *Inhibitor*) と命名され、0.3 µg/ml の濃度でシクロヘキシイミドとセルレニンの阻害力価をそれぞれ 4.0 倍、8.6 倍高めた。また、KPI が濃度依存的に蛍光色素ローダミン 123 の細胞内蓄積を生じることも認めた。更に <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR, IR 等により、その化学構造を解析した結果、KPI はトリエン構造を有する物質で、Pdr5 の *in vivo* における阻害剤として唯一報告されている FK506 とは全く異なることが明らかとなった。

以上、KPI は Pdr5 の新規阻害物質であると同時に、全く新しい化合物である可能性も示された。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、ガンの化学療法で大きな問題となっている多剤耐性について新しい切り口で展開を図ったものである。即ち、酵母細胞をヒト細胞と見立て、ヒトの薬剤排出ポンプ Mdr と機能ホモログである酵母の薬剤排出ポンプ Pdr5 タンパク質を高発現した酵母を作出し、これを利用することにより高感度で、且つ、選択性の高い Pdr5 阻害物質の検索系を構築した。続いて、この検索系を使用することにより、*Kitasatospora* sp. E-420 と分類された菌株より、新規な Pdr5 阻害物質を単離することに成功し、その部分構造と生物学的性質を明らかにした。これらの成果は、1) 阻害物質のガン治療への応用、2) Mdr や Pdr5 の構造・機能解析、3) 食品をはじめとする様々な試料からの Pdr5 阻害物質検索など、分子生物学分野や食品分野、医療分野に貢献するものと考えられる。

なお、申請者は査読制度のある学会誌に次の 2 編の論文を発表した。

本学位論文作成の基礎となった学術論文

1. K. Hiraga, A. Wanigasekera, H. Sugi, N. Hamanaka, and K. Oda

A novel screening for inhibitors of a pleiotropic drug resistant pump, Pdr5, in  
*Saccharomyces cerevisiae*

*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(7), 1589-1595 (2001).

2. A. Wanigasekera, K. Hiraga, N. Hamanaka, and K. Oda

Purification and some properties of an inhibitor for yeast pleiotropic drug resistant  
pump

from *Kitasatospora* sp. E-420

*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(10), in press (2001).