

総 説

病原真菌の ABC トランスポーター ー機能解析に関する最近の知見ー

新 見 昌 一¹ 田 辺 公 一¹ 和 田 俊 一¹ 山 崎 亜希子¹

上 原 至 雅¹ Kyoko Niimi² Erwin Lamping² Ann R. Holmes²

Brian C. Monk² Richard D. Cannon²

¹国立感染症研究所生物活性物質部

²Department of Oral Sciences, School of Dentistry, University of Otago

要 旨

ABC トランスポーターは、分子内に高度に保存された ATP 結合領域をもち、ATP の加水分解によって機能するタンパク質である。さまざまな生物種に存在し、トランスポーターとしての働きだけでなく、レセプターやチャネルとして機能するものもある。ある種の ABC トランスポーターは、病原微生物や癌細胞で薬剤を細胞外へ汲み出す排出ポンプとして働き、その発現亢進は薬剤耐性を招く。また、ヒトではいくつかのトランスポーターの異常が種々の疾患に関わっていることが知られており、ABC トランスポーターは生物学的にも医学的にもきわめて重要なタンパク質であるといえよう。病原真菌においてもアゾール剤耐性に ABC トランスポーターが主要な役割を果たしており、薬剤排出を担う様々なトランスポーターが深在性真菌症の起因菌から見いだされている。近年、ABC トランスポーターの解析が進み、これらの発現制御機構、基質認識、ATP の加水分解による機能制御、そして本来の生理的機能などが徐々に解明されつつある。本稿では病原真菌の ABC トランスポーターに関する新しい知見を、我々の研究結果を交えて概説した。

Key words: ABC トランスポーター (ABC transporter), 制御と機能 (regulation and function), 病原真菌 (pathogenic fungi), 多剤耐性 (multidrug resistance)

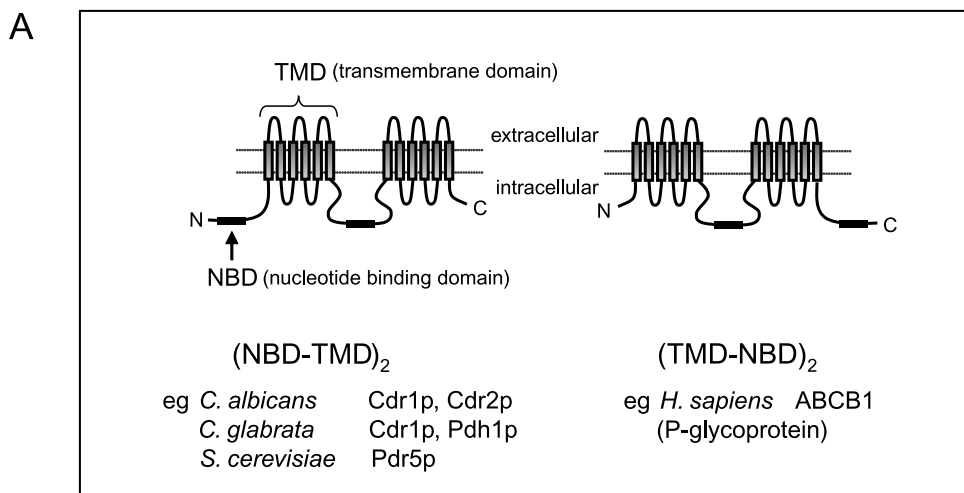
はじめに

ABC トランスポーターは、分子内にアミノ酸配列のよく保存された ATP 結合領域をもち、ATP の加水分解を利用して物質の輸送を行うタンパク質である。この種のタンパク質には、トランスポーターだけでなく、レセプターやチャネル機能をもつものもあり、広く ABC タンパク質ファミリーとして知られている。ABC トランスポーターは細菌からヒトに至るさまざまな生物種に普遍的に存在し、あるものは細胞膜に局在し薬剤を細胞外へ汲み出す排出ポンプとして働き、微生物や癌細胞に薬剤耐性を付与する。またヒトのトランスポーター遺伝子に異常が生じると、糖尿病や嚢胞性線維症などの疾患の要因となる (ABC トランスポーターの全般的な参考書として文献 1 と 2 を参照)。従って、ABC トランスポーターの構造と機能を解明することは細胞生物学的に興味深だけでなく、医学の見地からもきわめて重要である。病原真菌においてもアゾール剤耐性機構に ABC トランスポーターが深く関わっている。1990 年代半ばよ

り、*Candida albicans* を始めとする主要な病原真菌から薬剤排出を担う ABC トランスポーター遺伝子が次々とクローン化され、それらの機能に関する報告が相次いでなされてきた。現在は、トランスポーターの働きが遺伝的にどのように制御されているのか、構造的に多様な化合物をどのように基質として認識するのか、ATP の結合と加水分解が薬剤の排出にどうかかわっているのか、そしてこれら ABC トランスポーターの本来の生理的機能は何かという諸点に関心が集まっている。近年の細菌や動物細胞における ABC トランスポーター解析の進展に伴って、病原真菌の ABC トランスポーターについても新しい知見が得られつつあり、それらを我々の研究結果と交えて紹介したい。

構造と機能ーATP の加水分解による薬剤の排出

真菌の PDR (pleiotropic drug resistance) ファミリーおよびヒトの p-glycoprotein を例にとって、ABC トランスポーターの模式図を Fig. 1 に示した。これらのトランスポーターの一般的な特徴は、ATP 結合領域 (nucleotide binding domain; NBD) と細胞膜を 6 回貫通する疎水性領域 (transmembrane domain; TMD) を 1 つのユニットとし、これが 2 回繰り返された構造 [(NBD-



B

N-terminal NBD	Walker A	ABC signature	Walker B
ScPdr5p	191 VLGRPGSGCTTL---307	RGVSGGERKRVS---335	ATRGLDSATA
CaCdr1p	185 VLGRPGAGCSTL---301	RGVSGGERKRVS---329	ATRGLDSATA
CaCdr2p	183 VLGRPGAGCSTL---299	RGVSGGERKRVS---327	ATRGLDSATA
CgCdr1p	180 VLGRPGSGCTTL---296	RGVSGGERKRVS---324	ATRGLDSATA
CgPdh1p	190 VLGRPGSGCTTL---306	RGVSGGERKRVS---334	ATRGLDSATA
HsABCB1	424 LVGNSGCGKSTT---528	AQLSGGQKORIA---548	KILLLDEATS
C-terminal NBD	Walker A	ABC signature	Walker B
ScPdr5p	903 LMGASGAGKTTL---1008	EGLNVEQRKRLT---1037	PTSGLDSQTA
CaCdr1p	893 LMGASGAGKTTL---999	EGLNVEQRKRLT---1028	PTSGLDSQTA
CaCdr2p	891 LMGASGAGKTTL---997	EGLNVEQRKRLT---1026	PTSGLDSQTA
CgCdr1p	891 LMGASGAGKTTL---996	EGLNVEQRKRLT---1025	PTSGLDSQTA
CgPdh1p	919 LMGASGAGKTTL---1024	EGLNVEQRKRLT---1053	PTSGLDSQTA
HsABCB1	1067 LVGSSGCGKSTV---1173	TQLSGGQKORIA---1194	HILLLDEATS

Fig. 1. **A.** Schematic representation of the predicted membrane topology of prototypic fungal and human full-size ABC transporters.

B. Sequence comparison of conserved motifs within fungal ABC transporter NBDs (compared with HsABCB1). Conserved amino acid sequences of *S. cerevisiae* Pdr5p, *C. albicans* Cdr1p (CaCdr1p), Cdr2p (CaCdr2p), *C. glabrata* Cdr1p (CgCdr1p) and Pdh1p (CgPdh1p) are aligned. Conserved amino acid motifs within nucleotide binding domains (NBDs) are boxed.

TMD)₂ または (TMD-NBD)₂ topology] をもつことである。しかし、ABC トランスポーターによってはハーフサイズのものや膜貫通部位が12以上のもの、あるいは膜貫通ドメインをもたないものもある。ATP 結合領域には Walker A および B motif と ABC signature motif と呼ばれる3つの領域 (ATP Binding Cassette) があり (Fig. 1B), これゆえに ABC トランスポーターと呼ばれる。この部分のアミノ酸は生物種を越えてよく保存されている。NBD は、いわばトランスポーターのエンジン部分に相当し、分子内の2つの ATP 結合部位で ATP が交互に加水分解されるとトランスポータータンパク質に構造変化が生じ、その構造変化が薬剤を始めトランスポーターの基質となる物質の輸送を行うものと考えられている。全身の外分泌異常を主症状とするヒトの嚢胞性線維症は、Cl⁻ の透過性を担う ABC トランスポーターの CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) にさまざまな異常が生じて起きる疾患であり、多くの場

合このトランスポーターの NBD 部分を構成するアミノ酸の置換や欠失が原因であることが明らかになっている。

医真菌の分野ではカンジダを中心に解析が進められているが³⁾、その他の病原真菌のアゾール剤耐性に関わる ABC トランスポーターもアミノ酸配列から推測してカンジダの CDR (Candida drug resistance) ファミリーのものと同様の構造を有していると考えられる。ATP 結合領域はトランスポーターが機能する上で非常に重要な部分であり、それは以下に挙げたような領域内へのランダム変異の挿入やアミノ酸置換の導入などの例を見ても明らかである。*C. albicans* の ABC トランスポーター Cdr2p では、191 番目のシステインは N 末端側 NBD の Walker A motif 内に存在し ATP との結合あるいは加水分解活性の一端を担っていると想像されるが、これをリジンに置き換えるとアゾール剤耐性は野生型の 50% に減少し、C 末端側 NBD の Walker A motif に K899C を導入すると

耐性が完全に失われる⁴⁾。同様に *C. albicans* Cdr1p の N 末端側 NBD に D232K または G296D 変異や、C 末端側 NBD に G995S 変異が生じると耐性度が低下する⁵⁾。我々の研究では、*C. glabrata* Cdr1p の N 末端側 NBD の Walker A motif に位置する 188 番目のシステインをアラニンに置換しても排出ポンプ機能はほぼ正常であったが、C 末端側 NBD の Walker A motif 内の K899A 置換を行うとフルコナゾール耐性が完全に失われるという結果を得た (田辺ら, 未発表データ)。一方、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の薬剤排出を担うトランスポーター Pdr5p においても、C 末端側 NBD の Walker A motif に G905S と G908S の同時置換が生じた変異株はアゾール剤耐性を完全に失うという報告がなされている⁶⁾。

以上のことから 2 つの ATP 結合領域は互いによく似ているものの、機能的には非対称的に働いていることが想像される。NBD での ATP の結合あるいは加水分解反応が阻害されると、エネルギー供給が断たれポンプ機能が失われることは容易に想像される。しかし 2 つの NBD が互いに非対称的に働くのであれば、それらはどのような関わり方をしているのであろうか。この点を解明することが ABC トランスポーターの機能を知る上でひとつの重要な鍵になるであろう^{7, 8)}。

基質認識

C. albicans の Cdr1p および Cdr2p は Major Facilitator Superfamily (MFS) タイプのトランスポーター Ben^rp と比較して基質認識の幅が広く、アゾール剤のみならず構造的に共通性のない物質も排出する^{9, 10)}。一方、Ben^rp はフルコナゾールとボリコナゾールを基質とするが、他のアゾール剤は排出しないなど基質認識の幅が狭い¹¹⁾ (新見ら, 未発表データ)。同じく *C. albicans* の Cdr3p と Cdr4p もアミノ酸配列から ABC トランスポーターであると考えられるが、薬剤耐性には関与していない¹²⁻¹⁴⁾。*C. glabrata* の Cdr1p および Pdh1p (Cdr2p) は互いに類似した ABC トランスポーターであり、両方ともほとんど同じ化合物群を基質として認識するが、排出能力には若干の差があり、後述するようにリン酸化による活性調節も異なっている¹⁵⁾。このように基本的には類似の構造を有する ABC トランスポーターはどのような仕組みで基質特異性を決定するのであろうか。ATP 結合領域の解析の場合と同様に、アミノ酸変異の導入と基質特異性の変化との関係がほ乳類の ABC トランスポーターでよく調べられている。ヒトの ABC トランスポーターの場合、基質特異性がよく似たサブファミリー内では膜貫通ドメインのアミノ酸配列の相同性が高く、異なるサブファミリー間ではアミノ酸相同性はほとんどないといわれている¹⁾。従って基質特異性を決定する部位は、おそらく細胞膜貫通の疎水性領域に存在するのであろう。真菌の CDR (PDR) ファミリーのトランスポーターにおいても、膜貫通領域に位置するアミノ酸の変異と基質特異性の変化との関係が認められる。例えば *C. albicans* Cdr1p の TMD 1 にある第 6 番目の膜貫通セグメントに位置する

774 番目のフェニルアラニンアラニンに置き換えるとフルコナゾール耐性度が低下する⁵⁾。最近我々は、*C. albicans* の CDR 遺伝子の対立遺伝子間にみられる変異について調べ、遺伝子多型 (single nucleotide polymorphisms) が薬剤感受性や基質特異性に影響を与えることを見いだした。一例を挙げると、CaCDR2 を高発現する *S. cerevisiae* 株において、連続して起きたアミノ酸変異 (G1473A と I1474V) が、フルコナゾール感受性を変化させる原因になっていることである (A.R. Holmes, 未発表データ)。一方、*S. cerevisiae* の Pdr5p では、TMD10 の S1360 がフェニルアラニンに置き換わるとアゾール剤感受性および FK506 耐性になり、アラニンに置き換わると FK506 感受性になるということから、この部分が基質認識に重要な役割を担っていると思われる¹⁶⁾。基質特異性とは直接関係はないが、TMD11 と TMD12 の間に位置する細胞外ループ (extracellular loop 6) に C1427Y 変異が生じるとタンパク質のアセンブリーや細胞膜へのターゲティングが障害されてポンプ機能が完全に消失するという例もある¹⁷⁾。今のところ病原真菌の ABC トランスポーターの基質認識に関するデータはわずかに散見されるに過ぎないが、今後アミノ酸配列と基質特異性の関係についての情報が蓄積するにつれて、基質認識 (薬剤特異性) の仕組みも次第に明らかになるであろう。それによって将来、トランスポーターの基質にならないような (真菌細胞外に排出されにくい) 薬剤の探索と開発、すなわち、タンパク質の構造に基づいた薬剤のデザインが可能になるかもしれない。

生理機能

ABC トランスポーターは、原核細胞・真核細胞を問わずさまざまな細胞の膜に存在し、糖、アミノ酸、脂質、ビタミンなどの栄養源の取り込み、細胞の浸透圧の維持、毒性物質の排出などを行って細胞の恒常性を保つための重要な役割を果たしている^{1, 2)}。真菌の ABC トランスポーターも薬剤の排出以外に、Table 1 に挙げたような種々の生理機能を担っていることが指摘されているが、まだ十分には解明されていない。

真菌の細胞生理と ABC トランスポーターの発現に関連していくつかの興味深い観察がある。*C. glabrata* のミトコンドリア喪失による呼吸欠損株 (petite mutant) では、Cdr1p や Pdh1p の発現が亢進し、結果的にアゾール剤耐性となる^{18, 19)}。また呼吸阻害剤や変異の導入によって部分的に呼吸障害が生じてトランスポーターが高発現し、フルコナゾール感受性が低下する^{20, 21)}。*S. cerevisiae* でも同様な現象が認められているが、それにはミトコンドリアで負の制御を受けている zinc cluster family の転写因子 PDR3 が、ミトコンドリアの消失に伴って制御から解除され、その支配下の PDR5 の発現を亢進するという図式が考えられている²²⁾。我々も嫌気培養や高グルコース培地で *C. glabrata* を培養すると、CDR1, PDH1, ERG11 (エルゴステロール合成酵素遺伝子) の発現が亢進し、フルコナゾール感受性が低下することを

Table 1. Fungal ABC transporters and putative physiological functions

Fungal species	ABC transporter	Putative substrates	Putative physiological functions	Reference
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pdr5p	Azoles and other xenobiotics	Transport of steroid substrates and mycotoxins	54, 55, 56, 57
	Snq2p	4-nitroquinoline N-oxide and other xenobiotics		58, 59
	Pdr12p	Weak acids	Acid resistance	60
	Yor1p	Oligomycin		61
	Ycf1p	Heavy metal (cadmium)	Heavy metal resistance	62
	Ste6p	a -factor	Export of a -factor mating pheromone	63
	Aus1p } Pdr11p }	Ergosterol Cholesterol	Sterol uptake	24
<i>Candida albicans</i>	Cdr1p } Cdr2p }	Azoles and other xenobiotics Phospholipid	Human steroid hormones (β -estradiol and corticosterone) transport or phospholipid flippase	64, 65, 66, 67, 68
	Cdr3p			
	Hst6p	a -factor	Export of a -factor mating pheromone (Ste6p and mammalian P-glycoprotein orthologs)	69
<i>C. glabrata</i>	Cdr1p } Pdh1p }	Azoles and other xenobiotics		15, 52, 70, 71
<i>C. krusei</i>	Abc1p	Fluconazole, miconazole, cycloheximide		72
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Mdr1p } Afr1p } Afr2p }	Azoles and other xenobiotics		73, 74 (unpublished data)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Mdr4p	Itraconazole		75
<i>A. nidulans</i>	AtrBp	Cycloheximide, azoles		76
	AtrDp	Cycloheximide and other cytotoxic compounds		77

観察した（新見ら，未発表データ）。このことから想像されるのは，呼吸の低下に伴って菌の代謝経路が変わり，細胞内に蓄積した代謝の老廃物などをABCトランスポーターが基質として認識し，細胞外に排出するためにその発現が高まるということである。好気性細胞の *C. albicans* では呼吸完全欠損株を生じにくく，また呼吸に関してグルコース効果を受けないためか，この現象に関する報告はまだない。ちなみに嫌気条件下で *C. glabrata* の *ERG11* 発現が亢進するのは，エルゴステロール合成酵素による脱メチル化反応が酸化的に起こるため，酸素分圧が下がった場合は酵素濃度を上げることで反応速度を高めて補償するというような合理的調節が働くためと思われる。

臨床分離株の中にはアゾール剤に対して *in vitro* で感受性を示すにもかかわらず，薬剤の治療効果の得られない場合がある。*in vitro* と *in vivo* の薬剤評価に乖離がみられることは日常の臨床においては珍しくないが，これにABCトランスポーターが一役かっている可能性が最

近の報告に見られる。*Aspergillus fumigatus* はステロールの細胞内輸送系を保有しており，アゾール剤によってステロールの合成が障害されてもヒト体内では代替ステロールを取り込むことができ，薬剤の効果を回避できるというものである²³⁾。従ってMIC測定には培地中にコレステロールを加えた方がより生体に近い条件になるという指摘がある。*S. cerevisiae* でもTable 1に挙げたように，ステロールの細胞内輸送を担うABCトランスポーターAus1pとPdr11pが見つかった²⁴⁾。また *C. glabrata* でも，その全ゲノムの解読が最近終了し²⁵⁾，ステロールの細胞内取り込みを担うABCトランスポーターもパン酵母と同様に存在している (http://cbi.labri.fr/Genolevures/C_glabrata.php)。免疫不全患者のカンジダ症やアスペルギルス症は増加の一途をたどっており，真菌が薬剤の作用を回避するために備えている巧妙な仕組みが明らかになるにつけても，作用機作の点で変化に富み治療効果の高い抗真菌薬の開発が待たれる。

制御機構

トランスポーターの遺伝子発現を制御する転写因子については、*S. cerevisiae* で最もよく調べられており、代表的なものとして Zinc(2)-Cysteine(6) DNA binding motifs をもつ binuclear zinc cluster family (*PDR1*, *PDR3*) と basic region-leucine zipper domain をもつ bZip タンパク質 (Yap family) の二種類の転写因子が挙げられる²⁶⁾。前者のグループに属する転写因子としては *PDR1* および *PDR3* が挙げられ、これらの遺伝子産物は *PDR5* のプロモーター領域の pleiotropic drug response element (PDRE) に結合してトランスポーターの発現を促進する。我々が確立した *S. cerevisiae* の発現系も、F815S の変異を起こした *PDR1* (*pdr1-3*; a gain-of-function allele)²⁷⁾ と *PDR5* のプロモーターを利用しており、その下流にポンプ遺伝子を繋ぐことによって、種々のトランスポーターの高発現を可能にしている²⁸⁾。一方、後者の bZip タンパク質に属する転写因子としては *YAPI* (Yeast activator protein) があり、これは酸化的ストレスに応答してカドミウム耐性を付与するトランスポーター *Ycf1p* を制御している²⁹⁾。*C. glabrata* においても *S. cerevisiae* の *PDR1* 類似の転写因子の存在が示され、*CgPdr1p* の P927L 変異によって *CDR1* と *PDH1* が共に高発現したアゾール耐性株が *in vitro* で分離されている。しかし、両トランスポーターが共発現するにも関わらず *CgPdr1p* の変異が認められない臨床分離株もあり、さらに別の転写因子が関与する可能性も残っている³⁰⁾。

C. albicans のアゾール耐性臨床分離株が *CDR1* と *CDR2* を同時に過剰発現することはよく知られている³¹⁾。両トランスポーターは基質認識の点で相違点もあるが³²⁾、遺伝子の相同性が高く発現制御機構には共通点が多い。最近、両トランスポーターを共通に制御する zinc cluster family の転写因子 *TAC1* が同定された³³⁾。すなわち *CDR1* と *CDR2* はともに *TAC1* の結合する drug-responsive element (DRE) をプロモーター領域に持ち、*TAC1* によって転写の制御がなされる。興味深いことに耐性株由来の *TAC1* で *TAC1* 破壊株を相補すると、感受性株由来のそれと相補した場合よりも高い耐性が得られる。おそらく *TAC1* に生じた変異 (gain (loss)-of-function) が関係していると予想され、*S. cerevisiae* の転写因子と同様な解析が進められている^{27, 34)}。なお *CDR1* については *TAC1* を破壊してもわずかな発現がみられるので、別の転写因子の制御を受けている可能性もある。その一つが zinc finger motif を含む転写因子 *FCR1* で、*C. albicans* では *FCR1* 破壊によりアゾール耐性となる。従って *FCR1* は *TAC1* とは逆に、負の制御をするのであろう。しかし、*Pdr1p*, *Pdr3p* の変異によってアゾール感受性になった *S. cerevisiae* に *FCR1* を導入すると、逆に感受性が低下するので³⁵⁾、同じ転写因子でも本来の宿主と違う環境におかれた場合には異なる働きを示すのかもしれない。*TAC1* はトランスポーター遺伝子のほかにも、

プロモーター中に DRE をもつ様々な遺伝子の発現も制御しているようである³³⁾。これらの転写因子は *S. cerevisiae* の *PDR1* や *PDR3* の場合と同様に、様々な標的遺伝子に対して正あるいは負の制御を行い、転写制御の複雑なネットワークを形成していると思われる³⁶⁾。一方、bZip タンパク質に属する転写因子として *C. albicans* では *CAP1* が見いだされており、カドミウム耐性 *CaYCF1* や MFS トランスポーター *BEN^R* の発現調節³⁷⁾ を担っている。また酸化ストレス耐性をつかさどっているため、食菌作用抵抗性との関連が示唆されている³⁸⁾。

以上挙げた個々の転写因子の詳細な働きについては、今後に残された研究課題である。また同時に、転写制御のネットワークの全体像を把握することも重要で、既に実用化されて久しい DNA マイクロアレイが興味深い結果を生み出しつつある³⁹⁻⁴³⁾。この解析法は大きな可能性を秘めた革新的な技術であるが、得られたデータの生物学的意味をさらに検証することが重要である。

リン酸化による活性調節

タンパク質が生体内で正常に機能するためには、糖鎖付加や分子内切断、リン酸化等の翻訳後修飾、適切な場所への輸送、更には正しいタイミングで分解されることが必要である。タンパク質の翻訳後修飾の研究は、近年著しい発展を遂げてきたが、中でも細胞内シグナル伝達系の主要な伝達手段であるタンパク質のリン酸化と脱リン酸化は古くから重要視されてきた。ABC トランスポーターのリン酸化に関しても、これまでにヒトのタンパク質を中心にいくつかの例が報告されている。コレステロールやリン脂質のトランスポーターであると考えられている ABCA1 は複数のキナーゼによってリン酸化され、リン脂質排出活性や ABCA1 自身の合成、分解速度が制御されている^{44, 45)}。嚢胞性線維症の原因遺伝子産物であり、Cl⁻チャネルである CFTR (ABCC7) はプロテインキナーゼ A (PKA)⁴⁶⁾ およびプロテインキナーゼ C (PKC) によってリン酸化されることで、チャネル活性が調節される⁴⁷⁾。また胆汁酸排出トランスポーターの MRP2 (ABCC2) は、C 末端にある PDZ (PSD-95/D1h/ZO1 の略: 膜タンパク質の局在を規定する働きをもつタンパク質) 結合モチーフが PKC によってリン酸化されると PDZ タンパク質との親和性が変化し、細胞内の局在が調節される⁴⁸⁾。真菌のトランスポーターについても、リン酸化による制御の例が報告されている。出芽酵母の *Pdr5p* では 420 番目のセリンがカゼインキナーゼによってリン酸化され、タンパク質自身の分解速度が調節される⁴⁹⁾。これらの例を見ても分かるように、ABC トランスポーターの各種キナーゼによるリン酸化は、トランスポーターの機能や細胞内局在をコントロールし、それによって細胞は栄養増殖や代謝状態の変化、細胞外ストレスなどに対応するのであろう。しかし一方で、癌細胞において高発現し、抗癌剤を排出するトランスポーター MDR1 (ABCB1) は PKA や PKC によってリン酸化を受けるが、これらのリン酸化は抗癌剤排出活性には影

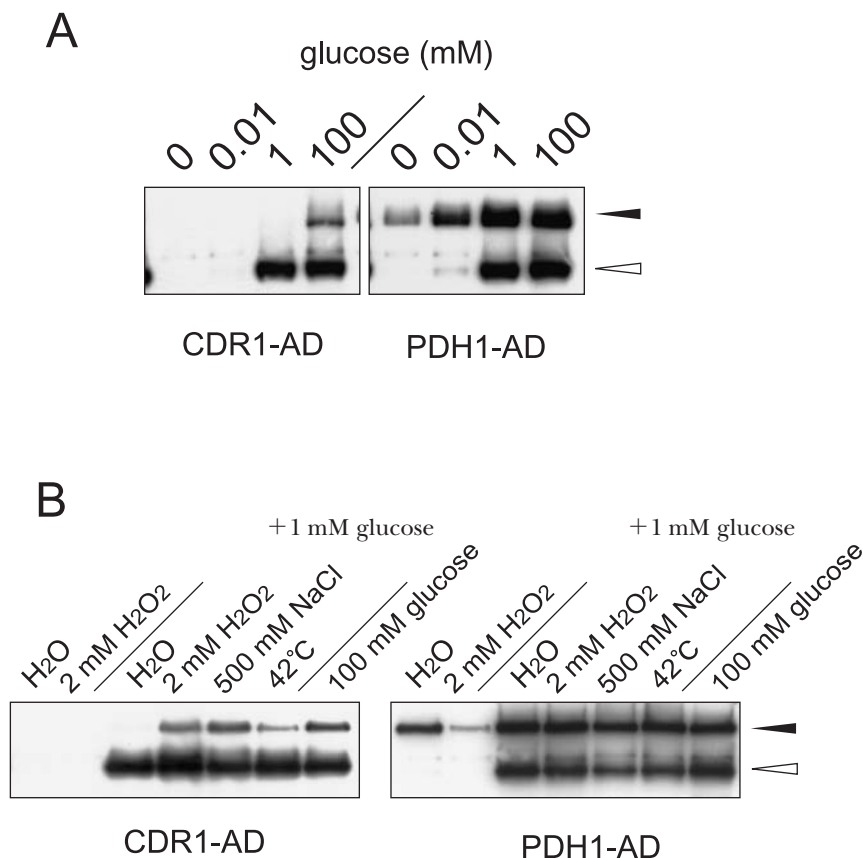


Fig. 2. Phosphorylation of *C. glabrata* Cdr1p and Pdh1p.

- A.** *C. glabrata* Cdr1p- or Pdh1p- expressing *S. cerevisiae* strains (CDR1-AD or PDH1-AD, respectively) were glucose-starved in glucose-free medium and then treated with 0-100 mM glucose for 10 min. Membrane fractions from those cells were analyzed with anti-pAkts antibody. Filled arrowheads show ABC transporter protein bands. Open arrowheads indicate Pma1p.
- B.** Glucose-starved CDR1-AD or PDH1-AD cells were stressed as indicated or treated with 100 mM glucose for 10 min. Stress experiments that included 1 mM glucose are indicated.

響を及ぼさないという報告もあり、未知のキナーゼによるリン酸化が活性制御に関わっている可能性も考えられる^{50, 51)}。

我々はこれまでに、*C. glabrata*のABCトランスポーターCdr1p, Pdh1pについて生化学的な解析を行い、どちらも代謝レベルや細胞外ストレスによって活性調節を受けるということを見いだした。その後の解析でこれらのトランスポーターもリン酸化による活性調節を受けることが明らかになったので、以下にその概要を紹介する^{15, 52)}。

Cdr1p と Pdh1p のリン酸化による機能調節

Cdr1p と Pdh1p の詳細な機能解析を行うために、*CDR1*, *PDH1* 遺伝子を7種類の主要なABCトランスポーター遺伝子を破壊した出芽酵母株に導入し、それぞれのタンパク質を大量発現する酵母株を作製した。これらの株から単離した膜画分を用い、抗リン酸化ペプチド抗体によるウエスタンブロット解析を行った結果、Cdr1p と Pdh1p は、PKA によるリン酸化部位を認識する抗体によって強く認識され、いずれのトランスポーター

も 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。また、Cdr1p と Pdh1p のリン酸化シグナルは培地中のグルコースの欠乏によって消失または減少し、グルコースの添加によって再び回復することも分かった (Fig. 2A)。このとき Pdh1p は 1 mM のグルコースでリン酸化が回復するが、Cdr1p は 100 mM までリン酸化が回復しなかったため、両者は異なるキナーゼによってリン酸化されと考えられる。さらに、Cdr1p のリン酸化は高濃度の NaCl、熱ショック、H₂O₂ 添加などの細胞外ストレスによっても亢進した (Fig. 2B)。出芽酵母では、グルコースによる栄養増殖やストレス応答反応に PKA が関与すると考えられており、我々の結果からも Cdr1p や Pdh1p のリン酸化が PKA によっておこる可能性が強く示唆された。

次に Cdr1p のリン酸化部位を同定するため、リン酸化が推測される9箇所のセリンまたはスレオニンをつずつアラニンに置換し、それぞれの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および薬剤耐性を比較した (Fig. 3)。その中で最も大きな変化の見られたのは、N 末端側 NBD の付近にある 307 番目 (M1) と

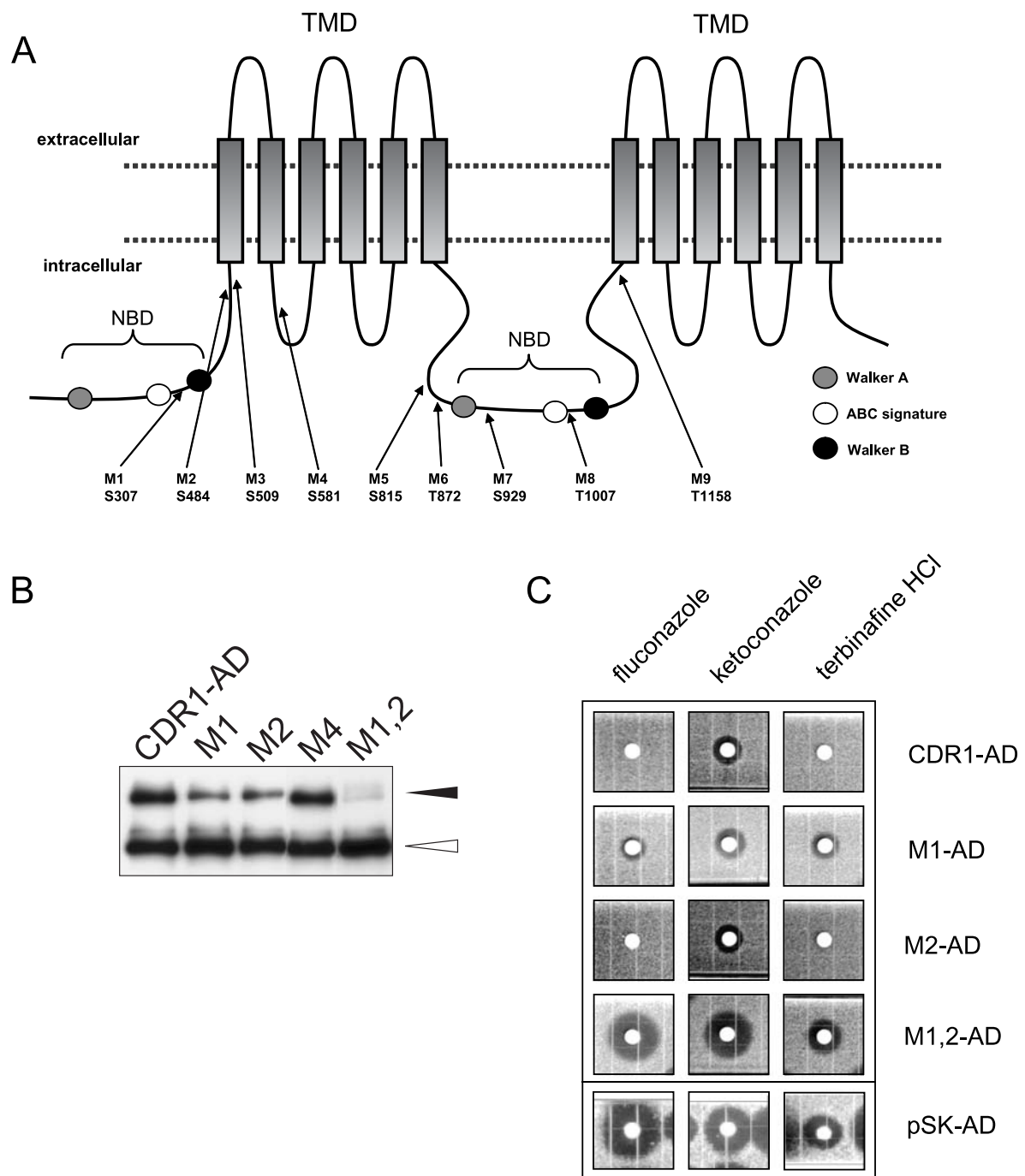


Fig. 3. Effect of phosphorylation on pump function.

- A.** The nine putative phospho-Akt substrate antibody recognition sites of *C. glabrata* Cdr1p are shown (M1-M9). The conserved motifs of the nucleotide binding cassette, Walker A, B, and ABC signature are indicated, and twelve transmembrane spans are depicted with gray bars. CDR1-M1 through CDR1-M9 yeast strains, whose Ser or Thr residues were replaced by Ala at each M1-M9 site, were constructed.
- B.** The phosphorylation of phospho-Akt substrate antibody recognition sites of CgCdr1p was analysed. The *S. cerevisiae* recombinants CDR1-AD, the point mutants CDR1-M1, CDR1-M2, CDR1-M4 and CDR1-M1,2 were glucose-starved and then treated with 100 mM glucose for 10 min. M4-M9 gave essentially identical profiles.
- C.** Susceptibility of CDR1-AD and its parent and mutant strains to antifungal drugs. Filter disks containing drugs were applied to the plates. Concentrations of drugs applied to the sensitive parent strain pSK-AD and the other four strains were 10 and 120 μ g of fluconazole, 0.02 and 8 μ g of ketoconazole, and 20 and 300 μ g of terbinafine HCl, respectively.

484番目 (M2) のセリンのアラニン置換変異で, ウエスタンプロットのリン酸化シグナルが大幅に減少した. 更に両セリンを同時にアラニンに置換した変異タンパク質 (M1, 2) では, シグナルが全く検出できなかった. これらの変異タンパク質発現株はローダミン排出活性 (薬剤排出活性) およびフルコナゾール耐性が野生型 Cdr1p 発現株と比較して有意に低下し, さらに基質輸送に必須な ATP 加水分解活性は M1, 2 では完全に消失していた.

以上の結果から, Cdr1p と Pdh1p はグルコースの添加や細胞外ストレスに応じて, PKA または類似のリン酸化活性をもつキナーゼによってリン酸化され, Cdr1p ではこのような培養条件において M1, M2 のセリンがリン酸化されていることが明らかになった. M1 や M2 のアラニン変異は薬剤排出活性を大きく低下させるので, この部位のリン酸化状態が薬剤排出活性を調節しているであろう. M1 や M2 の位置がそれぞれ NBD 内, もしくは NBD の近傍であることから考えても, この位置のリン酸基のもつ負の電荷が NBD の活性やドメインの動きを調節しているのはほぼ間違いない.

おわりに

以上述べたような ABC トランスポーターの構造, 機能そして調節の仕組みは, これまで主として遺伝学的, 生化学的な手法によって調べられて来た. しかしその多くはまだ断片的な観察の累積であり, トランスポーターの全体像を描くためにはこれらの知見を統合すると共に, タンパク質そのものの結晶構造の解析が必要である. 膜タンパク質は, 可溶性タンパク質に比べて取り扱いが著しく困難であり, その機能 (活性) を維持したまま結晶化に成功するためには, タンパク質発現量の増加, 膜脂質との相互関係の解明, 構造的に均一な分子をそろえることなど解決すべき問題が残されている. 今後これらの問題点を解決し, タンパク質の結晶構造が得られるようになれば, 変異によって引き起こされるタンパク質の構造変化が機能にどのような影響を及ぼすかが一段とはっきりするようになるであろう. また化合物ライブラリーのスクリーニングによって ABC トランスポーターの特異的な阻害剤を探し⁵³⁾, タンパク質と阻害剤の共結晶が得られるようになれば, タンパク質の構造に基づいた新規薬剤の開発にも大きく貢献する筈である. 冒頭にも記したように, ABC トランスポーターは病原微生物や癌細胞に薬剤耐性を付与するだけでなく, 遺伝的な疾患や糖尿病, 心臓血管系の疾病にも深く関わっている. これらの疾病の予防や治療を容易にするためにも, それぞれのトランスポーターの基質輸送メカニズムについてよりよく知ることが不可欠であり, そのための優れた研究が各分野で盛んに行われている. 生命体維持に必須な ABC トランスポーターが如何に重要で興味深いタンパク質であるか, 本稿を通してその概観を述べた.

引用文献

- 1) ABC proteins from bacteria to man. (Holland IB, Cole SPC, Kuchler K, Higgins CF ed), pp.1-647, Academic Press, Amsterdam, 2003.
- 2) 稲垣暢也, 植田和光, 鈴木洋史: ABC トランスポーター生体防御の ABC 遺伝子から疾患まで (清野 進監修), pp.1-82, 診断と治療社, 東京, 2002.
- 3) 新見昌一: 薬剤耐性遺伝子のパン酵母における発現と機能解析. 真菌誌 45: 63-69, 2004.
- 4) Gauthier C, Raymond M: Mutational analysis of the divergent Walker A motif from a yeast ABC transporter. In 4th FEBS Advanced Lecture Course ATP-binding cassette (ABC) proteins: from genetic disease to multidrug resistance. p.114, Gosau, Austria, 2003.
- 5) Shukla S, Saini P, Smriti, Jha S, Ambudkar SV, Prasad R: Functional characterization of *Candida albicans* ABC transporter Cdr1p. Eukaryot Cell 2: 1361-1375, 2003.
- 6) Egner R, Rosenthal FE, Kralli A, Sanglard D, Kuchler K: Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. Mol Biol Cell 9: 523-543, 1998.
- 7) Jones PM, George AM: The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. Cell Mol Life Sci 61: 682-699, 2004.
- 8) Higgins CF, Linton KJ: The ATP switch model for ABC transporters. Nat Struct Mol Biol 11: 918-926, 2004.
- 9) Prasad R, De Wergifosse P, Goffeau A, Balzi E: Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. Curr Genet 27: 320-329, 1995.
- 10) Niimi M, Niimi K, Takano Y, Holmes AR, Fischer FJ, Uehara Y, Cannon RD: Regulated overexpression of *CDR1* in *Candida albicans* confers multidrug resistance. J Antimicrob Chemother 54: 999-1006, 2004.
- 11) Fling ME, Kopf J, Tamarkin A, Gorman JA, Smith HA, Koltin Y: Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. Mol Gen Genet 227: 318-329, 1991.
- 12) Balan I, Alarco AM, Raymond M: The *Candida albicans* *CDR3* gene codes for an opaque-phase ABC transporter. J Bacteriol 179: 7210-7218, 1997.
- 13) Franz R, Michel S, Morschhauser J: A fourth gene from the *Candida albicans* *CDR* family of ABC transporters. Gene 220: 91-98, 1998.
- 14) Maebashi K, Niimi M, Kudoh M, Fischer FJ, Makimura K, Niimi K, Piper RJ, Uchida K, Arisawa M, Cannon RD, Yamaguchi H: Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. J Antimicrob Chemother 47: 527-536, 2001.
- 15) Wada S, Niimi M, Niimi K, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD, Uehara Y: *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Pdh1p expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane

- transporters show phosphorylation-dependent pumping properties. *J Biol Chem* **277**: 46809–46821, 2002.
- 16) Egner R, Bauer BE, Kuchler K: The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility. *Mol Microbiol* **35**: 1255–1263, 2000.
 - 17) Plemper RK, Egner R, Kuchler K, Wolf DH: Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem* **273**: 32848–32856, 1998.
 - 18) Defontaine A, Bouchara JP, Declerk P, Planchenault C, Chabasse D, Hallet JN: In-vitro resistance to azoles associated with mitochondrial DNA deficiency in *Candida glabrata*. *J Med Microbiol* **48**: 663–670, 1999.
 - 19) Sanglard D, Ischer F, Bille J: Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1174–1183, 2001.
 - 20) Brun S, Aubry C, Lima O, Filmon R, Berges T, Chabasse D, Bouchara JP: Relationships between respiration and susceptibility to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 847–853, 2003.
 - 21) Hallstrom TC, Moye-Rowley WS: Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic drug resistance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 37347–37356, 2000.
 - 22) Kaur R, Castano I, Cormack BP: Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of calcium signaling and mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1600–1613, 2004.
 - 23) Xiong Q, Hassan SA, Wilson WK, Han XY, May GS, Tarrand JJ, Matsuda SP: Cholesterol import by *Aspergillus fumigatus* and its influence on antifungal potency of sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 518–524, 2005.
 - 24) Wilcox IJ, Balderes DA, Wharton B, Tinkelenberg AH, Rao G, Sturley SL: Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. *J Biol Chem* **277**: 32466–32472, 2002.
 - 25) Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuveglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL: Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35–44, 2004.
 - 26) Wolfger H, Mamnun YM, Kuchler K: Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res Microbiol* **152**: 375–389, 2001.
 - 27) Carvajal E, van den Hazel HB, Cybularz-Kolaczowska A, Balzi E, Goffeau A: Molecular and phenotypic characterization of yeast *PDR1* mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. *Mol Gen Genet* **256**: 406–415, 1997.
 - 28) 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*. *Jpn J Infect Dis* **58**: 1–7, 2005.
 - 29) Wemmie JA, Szczypka MS, Thiele DJ, Moye-Rowley WS: Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *J Biol Chem* **269**: 32592–32597, 1994.
 - 30) Vermitsky JP, Edlind TD: Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3773–3781, 2004.
 - 31) Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martinez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF: Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2676–2684, 2001.
 - 32) Gauthier C, Weber S, Alarco AM, Alqawi O, Daoud R, Georges E, Raymond M: Functional similarities and differences between *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1543–1554, 2003.
 - 33) Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D: *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot Cell* **3**: 1639–1652, 2004.
 - 34) Nourani A, Papajova D, Delahodde A, Jacq C, Subik J: Clustered amino acid substitutions in the yeast transcription regulator Pdr3p increase pleiotropic drug resistance and identify a new central regulatory domain. *Mol Gen Genet* **256**: 397–405, 1997.
 - 35) Talibi D, Raymond M: Isolation of a putative *Candida albicans* transcriptional regulator involved in pleiotropic drug resistance by functional complementation of a *pdr1 pdr3* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**: 231–240, 1999.
 - 36) DeRisi J, van den Hazel B, Marc P, Balzi E, Brown P, Jacq C, Goffeau A: Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast

- mutants. *FEBS Lett* **470**: 156-160, 2000.
- 37) Alarco AM, Raymond M: The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 700-708, 1999.
 - 38) Zhang X, De Micheli M, Coleman ST, Sanglard D, Moye-Rowley WS: Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol Microbiol* **36**: 618-629, 2000.
 - 39) Kontoyiannis DP, May GS, De Backer MD, Luyten WHM, Bossche HV: Identification of azole-responsive genes by microarray technology: why are we missing the efflux transporter genes? Letters to the editor. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 3674-3676, 2001.
 - 40) Roger PD, Barker KS: Evaluation of differential gene expression in fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3412-3417, 2001.
 - 41) Cowen LE, Nantel A, Whiteway MS, Thomas DY, Tessier DC, Kohn LM, Anderson JB: Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 9284-9289, 2002.
 - 42) Barker KS, Pearson MM, Rogers PD: Identification of genes differentially expressed in association with reduced azole susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1131-1140, 2003.
 - 43) Karababa M, Coste AT, Rognon B, Bille J, Sanglard D: Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3064-3079, 2004.
 - 44) See RH, Caday-Malcolm RA, Singaraja RR, Zhou S, Silverston A, Huber MT, Moran J, James ER, Janoo R, Savill JM, Rigot V, Zhang LH, Wang M, Chimini G, Wellington CL, Tafuri SR, Hayden MR: Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *J Biol Chem* **277**: 41835-41842, 2002.
 - 45) Roosbeek S, Peelmann F, Verhee A, Labeur C, Caster H, Lensink ME, Cirulli C, Grooten J, Cochet C, Vandekerckhove J, Amoresano A, Chimini G, Tavernier J, Rosseneu M: Phosphorylation by protein kinase CK2 modulates the activity of the ATP binding cassette A1 transporter. *J Biol Chem* **279**: 37779-37788, 2004.
 - 46) Chang XB, Tabcharani JA, Hou YX, Jensen TJ, Kartner N, Alon N, Hanrahan JW, Riordan JR: Protein kinase A (PKA) still activates CFTR chloride channel after mutagenesis of all 10 PKA consensus phosphorylation sites. *J Biol Chem* **268**: 11304-11311, 1993.
 - 47) Chappe V, Hinkson DA, Howell LD, Evagelidis A, Liao J, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW: Stimulatory and inhibitory protein kinase C consensus sequences regulate the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 390-395, 2004.
 - 48) Hegedus T, Sessler T, Scott R, Thelin W, Bakos E, Varadi A, Szabo K, Homolya L, Milgram SL, Sarkadi B: C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **302**: 454-461, 2003.
 - 49) Decottignies A, Owsianik G, Ghislain M: Casein kinase I-dependent phosphorylation and stability of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem* **274**: 37139-37146, 1999.
 - 50) Germann UA, Chambers TC, Ambudkar SV, Licht T, Cardarelli CO, Pastan I, Gottesman MM: Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* **271**: 1708-1716, 1996.
 - 51) Szabo K, Bakos E, Welker E, Muller M, Goodfellow HR, Higgins CF, Varadi A, Sarkadi B: Phosphorylation site mutations in the human multidrug transporter modulate its drug-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem* **272**: 23165-23171, 1997.
 - 52) 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. *J Biol Chem* **280**: 94-103, 2005.
 - 53) Niimi K, Harding DRK, Parshot R, King A, Lun DJ, Decottignies A, Niimi M, Lin S, Cannon RD, Goffeau A, Monk BC: Chemosensitization of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1256-1271, 2004.
 - 54) Bissinger PH, Kuchler K: Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *STS1* gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. *J Biol Chem* **269**: 4180-4186, 1994.
 - 55) Hirata D, Yano K, Miyahara K, Miyakawa T: *Saccharomyces cerevisiae* *YDR1*, which encodes a member of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, is required for multidrug resistance. *Curr Genet* **26**: 285-294, 1994.
 - 56) Kolaczowski M, Kolaczowska A, Luczynski J, Witek S, Goffeau A: *In vivo* characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb Drug Resist* **4**: 143-158, 1998.
 - 57) Mahe Y, Lemoine Y, Kuchler K: The ATP binding cassette transporters Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids *in vivo*. *J Biol Chem* **271**: 25167-25172, 1996.
 - 58) Servos J, Haase E, Brendel M: Gene *SNQ2* of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. *Mol Gen Genet* **236**: 214-218, 1993.
 - 59) Decottignies A, Lambert L, Catty P, Degand H, Epping EA, Moye-Rowley WS, Balzi E, Goffeau A: Identification and characterization of *SNQ2*, a new multidrug ATP binding cassette transporter of the yeast plasma membrane. *J Biol Chem* **270**: 18150-18157, 1995.
 - 60) Piper P, Mahe Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak

- C, Egner R, Muhlbauer M, Coote P, Kuchler K: The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J* **17**: 4257-4265, 1998.
- 61) Katzmann DJ, Hallstrom TC, Voet M, Wysock W, Golin J, Volckaert G, Moye-Rowley WS: Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (*YORI*) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**: 6875-6883, 1995.
- 62) Szczypka MS, Wemmie JA, Moye-Rowley WS, Thiele DJ: A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **269**: 22853-22857, 1994.
- 63) Kuchler K, Sterne RE, Thorner J: *Saccharomyces cerevisiae STE6* gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J* **8**: 3973-3984, 1989.
- 64) Prasad R, De Wergifosse P, Goffeau A, Balzi E: Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDRI*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* **27**: 320-329, 1995.
- 65) Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF: Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2835-2841, 1996.
- 66) Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J: Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* **143**: 405-416, 1997.
- 67) Krishnamurthy S, Gupta V, Snehlata P, Prasad R: Characterisation of human steroid hormone transport mediated by Cdr1p, a multidrug transporter of *Candida albicans*, belonging to the ATP binding cassette super family. *FEMS Microbiol Lett* **158**: 69-74, 1998.
- 68) Smriti, Krishnamurthy S, Dixit BL, Gupta CM, Milewski S, Prasad R: ABC transporters Cdr1p, Cdr2p and Cdr3p of a human pathogen *Candida albicans* are general phospholipid translocators. *Yeast* **19**: 303-318, 2002.
- 69) Raymond M, Dignard D, Alarco AM, Mainville N, Magee BB, Thomas DY: A Ste6p/P-glycoprotein homologue from the asexual yeast *Candida albicans* transports the a-factor mating pheromone in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **27**: 587-598, 1998.
- 70) Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA, Bille J: The ATP binding cassette transporter gene *CgCDRI* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2753-2765, 1999.
- 71) Miyazaki H, Miyazaki Y, Geber A, Parkinson T, Hitchcock C, Falconer DJ, Ward DJ, Marsden K, Bennett JE: Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, *PDHI*, in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1695-1701, 1998.
- 72) Katiyar SK, Edlind TD: Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. *Med Mycol* **39**: 109-116, 2001.
- 73) Thornewell SJ, Peery RB, Skatrud PL: Cloning and characterization of *CneMDR1*: a *Cryptococcus neoformans* gene encoding a protein related to multidrug resistance proteins. *Gene* **201**: 21-29, 1997.
- 74) Posteraro B, Sanguinetti M, Sanglard D, La Sorda M, Boccia S, Romano L, Morace G, Fadda G: Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, *CnAFRI*, involved in the resistance to fluconazole. *Mol Microbiol* **47**: 357-371, 2003.
- 75) Nascimento AM, Goldman GH, Park S, Marras SAE, Delmas G, Oza U, Lolans K, Dudley MN, Mann PA, Perlin DS: Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1719-1726, 2003.
- 76) Del Sorbo G, Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Van Kan JA, Balzi E, De Waard MA: Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Mol Gen Genet* **254**: 417-426, 1997.
- 77) Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Peery RB, Skatrud PL, De Waard MA: The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. *Mol Gen Genet* **263**: 966-977, 2000.

ABC Transporters of Pathogenic Fungi: Recent Advances in Functional Analyses

Masakazu Niimi¹, Koichi Tanabe¹, Shun-ichi Wada¹, Akiko Yamazaki¹,
Yoshimasa Uehara¹, Kyoko Niimi², Erwin Lamping², Ann R. Holmes²,
Brian C. Monk² and Richard D. Cannon²

¹Department of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases,
1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

²Department of Oral sciences, School of Dentistry, University of Otago,
310 Great King St, Dunedin, New Zealand

ABC (ATP binding cassette) transporters consist of transmembrane domains which confer specificity, and structurally conserved nucleotide binding domains that contain highly conserved amino acid motifs. They act not only as transporters but also as receptors or channels that use energy generated by ATP hydrolysis. ABC transporters are widely dispersed in nature. They are found in cells ranging from prokaryotes (bacteria) to eukaryotes (including humans) and several are considered to play crucial roles in cellular homeostasis. Defects in ABC transporters in humans are associated with severe diseases such as type 2 diabetes and cystic fibrosis. Some ABC transporters extrude xenobiotics and confer resistance to chemotherapeutics on microbial pathogens and cancer cells. Thus ABC transporters are of considerable medical importance. Structure-function analysis of ABC transporters has begun to elucidate their mechanisms of substrate recognition, the functional regulation of ATP-binding and hydrolysis and to identify intrinsic physiological functions. In pathogenic fungi, ABC transporters contribute to the clinical problem of drug resistance. The application of new technologies to the examination of fungal ABC transporter function is providing new insights into the use of antifungal drugs in medical mycology and contributing to a better understanding of these important membrane proteins.

この論文は、第48回日本医真菌学会総会の“シンポジウム3：カンジダとカンジダ感染症の研究の現状－基礎と臨床の連携を目指す－”において発表されたものです。