

## 研究サブ・グループ2

コプラナー PCBs による ABC タンパク質機能阻害が xenobiotics の細胞毒性およびステロイドホルモン代謝に与える影響

藤瀬 浩 (獣医学部)

荻原喜久美 (環境保健学部)

落合秀治 (生物科学総合研究所)

片倉 賢 (客員研究員, 群馬大学医学部)

植田和光 (客員研究員, 京都大学大学院農学研究科)

岡本芳春 (客員研究員, 鳥取大学農学部)

### 研究目的

本研究はコプラナー PCBs (Co-PCBs) による P-glycoprotein (Pgp) あるいは ABC-A1 などの ABC タンパク質の機能阻害が xenobiotics の細胞毒性およびステロイドホルモン代謝に与える影響を検討することである。初年度には変異 Pgp 導入 LLC-PK1 などを用いて, PCB-126 の薬物輸送への影響を検討した [1, 2]。本年度は以下の2つの課題を検討した。① 薬剤選択による Pgp 誘導動物腫瘍細胞への Pgp 発現を western blot および定量的 PCR で確認し, Co-PCBs の影響モデルの検討を行う。② PCB-126 による薬物蓄積および薬物輸送の阻害が Pgp-ATPase 活性を介する可能性についての検討を行う。

### 方 法

イヌ腫瘍細胞薬剤耐性株への Pgp 発現の確認:

イヌ扁平上皮がん由来細胞 (CSCC) およびイヌ線維肉腫由来細胞 (CFS) から colchicine 耐性株として選択した CSCC-COL250 および CFS-COL150 を用いた。これらの細胞への Pgp タンパク質発現を western blot で、遺伝子発現量を定量的 PCR で測定した。

Pgp-ATPase 測定:

上記薬剤耐性イヌ腫瘍細胞あるいは Pgp 発現 LLC-PK1 の膜標品を N<sub>2</sub> ガス破砕法で調製した。この膜標品の ATPase 活性を ATP regenerating 系を用い NADH の経時的減少で測定した。Pgp-ATPase 以外の ATPase, すなわち Na,K-ATPase あるいは Ca-ATPase 活性はそれぞれ阻害剤を添加して除去し, Pgp-ATPase 活性は verapamil 活性化画分として計算した [3]。

### 結果と考察

イヌ腫瘍細胞薬剤耐性株への Pgp 発現の確認:

CSCC-COL250 および CFS-COL150 とともに western blot で 170 kDa の Pgp バンドが検出された。RT-PCR により 423 bp に増幅するように設計された Pgp の mRNA 断片が CSCC-COL250 および CFS-COL150 から検出された。野生株からは、当該バンドは検出されなかった。定量的 PCR により CSCC-COL250 および CFS-COL150 で Pgp-mRNA がそれぞれ3倍および5倍に増幅していることが示された。各薬剤耐性株への Pgp 発現が、タンパク質および mRNA レベルで確認され、Co-PCBs の Pgp 影響モデルの1つが確立された。

Pgp-ATPase 測定:

Pgp 発現 LLC-PK1 およびイヌ腫瘍細胞から N<sub>2</sub> ガス圧破砕法により調製した膜標品による ATPase 活性が測定できた。しかし、ouabaine 感受性の Na,K-ATPase, EGTA 感受性の Ca-ATPase 活性画分が大きく、これらに比べ Pgp-ATPase である verapamil 活性化画分は非常に小さく、速度論的解析による阻害実験は困難であると判断

した。したがって、来年度はヒト Pgp を昆虫細胞に導入発現させ、その細胞膜から Pgp を精製し、精製 Pgp を用いての Pgp-ATPase 活性測定、さらにはその Pgp-ATPase への Co-PCBs の阻害機序の検討を行うことにした [3]。

## 文 献

- 1) Sasawatari, S., Toki, M., Horie, T., Nakano, Y., Ikeda, T., Ueda, K. and Fujise, H. Effect of PCB-126 on Intracellular Accumulation and Transepithelial Transport of Vinblastine in LLC-PK1 and Its Transformant Cells Expressing Human P-glycoprotein. J. Vet. Med. Sci. in press.
- 2) 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl Inhibits Drug Efflux Through P-glycoprotein in KB-3 Cells Expressing Mutant Human P-glycoprotein. Fujise, H., Sasawatari, S., Annoura, T., Ikeda, T. and Ueda, K. J. Biomed. Biotechnol. in press.
- 3) Microanalysis for MDR1 ATPase by high-performance liquid chromatography with a titanium dioxide column. Kimura, Y., Shibasaki, S., Morisato, K., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Matsuo, M., Amachi, T., Ueda, M. and Ueda, K. Anal. Biochem. 326: 262-266 (2004)

## 要 約

イヌ扁平上皮がん由来細胞およびイヌ線維肉腫由来細胞から colchicine 耐性株として選択した細胞への Pgp 発現を western blot および定量的 PCR で確認した。各薬剤耐性株への Pgp 発現が、タンパク質および mRNA レベルで確認され、Co-PCBs の Pgp 影響モデルの1つが確立された。Pgp 発現細胞の膜標品を N<sub>2</sub> ガス破砕法で調製し、その ATPase 活性を ATP regenerating 系で測定した。各阻害剤および活性化剤を用い Pgp-ATPase ほか Na,K-ATPase および Ca-ATPase 活性測定が可能であった。しかし、Pgp-ATPase 活性は極めて低く、本測定法では Co-PCBs 阻害の速度論的解析は困難であると判断した。したがって、次年度は Pgp を精製し、その Pgp-ATPase 活性を測定することを試みることにした。

## Research Group 2

### *“Effect of coplanar PCBs on cell toxicity of xenobiotics and metabolism of steroid hormone by functional inhibition of ABC protein.”*

Hiroshi Fujise, Hideharu Ochiai (School of Veterinary Medicine)

Kikumi Ogiwara (School of Environmental Health)

Kazumitsu Ueda (Visiting Researcher)

Ken Katakura (Visiting Researcher)

Yoshiharu Okamoto (Visiting Researcher)

**Abstract:** Expression of Pgp was confirmed by western blot and quantitative PCR in canine squamous cell carcinoma and canine fibrosarcoma which were selected as colchicine tolerance cell line. The protein and mRNA of Pgp were found in the cells, thus one of the examination models for the effect of Co-PCBs on Pgp was established. The membrane was prepared by N<sub>2</sub> disruption from Pgp expressed cells, and the ATPase was measured by ATP regeneration system. The activities of Pgp-ATPase, Na,K-ATPase and Ca-ATPase were measured by adding with the inhibitor and/or the activator. However, Pgp-ATPase activity was too small to analyze kinetics of the inhibition with Co-PCBs. Therefore, we are going to purify Pgp and measure its ATPase activity in the next year.