

## 抗ガン剤排出タンパク質 MRP1 の基質特異性の決定に関与する部位の同定

山本茂隆<sup>1</sup>, 篠田 桂<sup>1</sup>, 道下真介<sup>1</sup>, 大野喬子<sup>2</sup>, 水谷有希<sup>2</sup>, 田口善智<sup>2</sup>, 佐伯和弘<sup>1,2</sup>

### 要旨

MRP1(ABCC1)は、ガンの化学療法の大きな障害であるガン細胞の多剤耐性化を引き起こすタンパク質の一つである。MRP1 は細胞膜に発現すると、構造に類似性のない様々な抗ガン剤を基質として認識し、細胞内から細胞外へ排出する。しかし、MRP1 による基質認識及び輸送機構は明らかにされていない。これまでの研究から、ウシより新規に単離された MRP1 とヒトの MRP1 とのアミノ酸レベルでの同一性は 91% あるにもかかわらず、両者の基質特異性は大きく異なることが明らかにされている。このようなウシ MRP1 とヒト MRP1 の基質特異性の違いは、両者のアミノ酸の違いによって引き起こされており、これら両者の間で異なっているアミノ酸の中には、MRP1 の基質認識及び輸送機構に重要な働きをしているアミノ酸があるのではないかと考えた。今回、我々はウシ MRP1 の 1088 番目のアミノ酸 (グルタミン) に注目した。ヒト MRP1 において、このアミノ酸に相当するアミノ酸は、側鎖に負電荷持つアミノ酸であるグルタミン酸である。ウシ MRP1 の 1088 番目のグルタミンをグルタミン酸に置換した変異体をヒト由来の培養細胞で発現させ、その細胞が抗ガン剤に対して示す耐性度のパターンを、野生型のウシ及びヒト MRP1 の発現細胞のパターンと比較した。その結果、この変異体の発現細胞はウシ野生型 MRP1 と比較して、抗生物質系の抗ガン剤であるドキソルビシンに対する耐性度が特異的に上昇していることが分かった。この結果から、ウシ MRP1 の 1088 番目のアミノ酸はドキソルビシンの基質認識または輸送に関与していることが示唆された。

### 1. 緒論

ガン細胞は、治療中に投与した抗ガン剤に対して耐性になると同時に、治療には用いていない抗ガン剤、しかも作用機構や構造の異なる複数の薬剤に対しても耐性になることがある。このような現象は、ガン細胞の多剤耐性化と呼ばれ、ガンの化学療法にとって大きな障害となっている。ガン細胞の多剤耐性化の原因の一つとして考えられているのが、MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1) である<sup>(1,2)</sup>。MRP1 がガン細胞の細胞膜に発現すると、構造に類似性のない様々な抗ガン剤を認識し、細胞内から外へ排出するポンプタンパク質として機能する<sup>(3)</sup>。その結果、MRP1 は、ガン細胞を抗ガン剤に対して耐性化する。

MRP1 は ABCC1 という名称でも呼ばれている ABC タンパク質の一つである。ABC タンパク質は、ATP Binding Casstte(ABC)と呼ばれる ATP 結合領域を共通して持っているタンパク質ファミリーであり、ヒトのゲノム上には 49 種類の ABC タンパク質をコードする遺伝子が存在することが明らかにされている<sup>(4)</sup>。MRP1 は、ヒトでは、1531 アミノ酸から構成されている膜タンパク質であり、17 個の膜貫通ヘリックスと、2 個の ABC タンパク質特有の ATP 結合領域を持つ<sup>(5)</sup>。そのアミノ酸配列から、MRP1 は、N 末端側に 5 個の膜貫通ヘリックスから成る TMD0 (Transmembrane domain 0) と、130 アミノ酸からなる細胞内ループ(Lo)を持っており、それに続いて 6 個の膜貫通ヘリックスと 1 個の ATP 結合領域から成るユニットが 2 回繰り返したような構造をとると予想されている (図 1)。

原稿受付 2007 年 6 月 15 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.05-I-3, 2006 の助成を受けた。

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

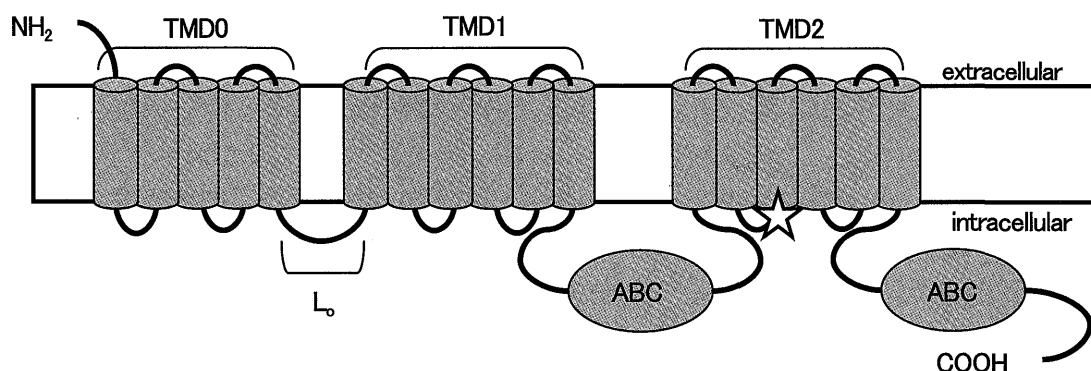


図1 MRP1の予想される二次元構造

3個の膜貫通ドメイン(TMD0,1,2)、TMD0と1を繋ぐ細胞内領域のLoループ、2個のATP結合領域(ATP Binding Cassette:ABC)を持つと予想されている。☆は今回変異を導入した1088番目のアミノ酸の位置を示す。

MRP1の大きな特徴は、構造に類似性のない様々な抗ガン剤の他、グルタチオン抱合体、グルクロン酸抱合体等の負電荷を持つ抱合体や、一部の重金属等の極めて多様な物質を基質として認識し、細胞内から細胞外へ輸送できることである<sup>(6-12)</sup>。しかし、MRP1による基質認識及び輸送機構は明らかにされていない。

当研究室では、ウシ乳腺より新規にウシのMRP1のcDNAを単離した<sup>(13)</sup>。単離されたウシMRP1cDNAの配列から、ウシMRP1とヒトMRP1は、アミノ酸レベルで約90%の同一性があることが明らかにされた。しかし、この両者のMRP1をそれぞれ安定発現する培養細胞の抗ガン剤に対する耐性度を比較すると、両者の耐性度のパターンは明確に異なっていた。具体的には、ドキシソルビシンに対しては、ヒトMRP1の発現細胞は高い耐性度を示すが、ウシMRP1の発現細胞はほとんど耐性を示さなかった。一方で、VP16に対しては、ウシMRP1の発現細胞がヒトMRP1の発現細胞よりも、はるかに高い耐性度を示した<sup>(13)</sup>。この結果から、ウシMRP1とヒトMRP1は約90%のアミノ酸が同一であるにも関わらず、両者の基質特異性は明確に異なることが示された。また、ウシMRP1とヒトMRP1で異なる約10%のアミノ酸のいずれかが、MRP1による基質の認識、及び輸送に重要な役割を果たしている可能性が示唆された<sup>(13)</sup>。

そこで我々は、上に述べたウシMRP1とヒトMRP1の構造と機能の差異を利用して、MRP1の基質の輸送に関与するアミノ酸を同定し、MRP1の基質認識機構を明らかにしたいと考えた。具体的には、ウシMRP1のアミノ酸のうち、ヒトMRP1と異なるアミノ酸を、ヒトMRP1と同じアミノ酸に置換した変異型ウシMRP1を培養細胞で発現させ、その変異型ウシMRP1の発現細胞と、野生型ウシMRP1の発現細胞の薬剤に対する耐性度の測定、比較を行い、もし両者間で耐性度のパターンが変化していれば、その変異が導入されたアミノ酸がMRP1による基質輸送に関与していると結論できると考えた。

今回、我々は、ウシMRP1の14番目の膜貫通ヘリックスより、わずかに細胞質側に存在すると予想されている1088番目のグルタミン(Gln<sup>1088</sup>)に注目した。このアミノ酸は、ヒトMRP1では酸性アミノ酸のグルタミン酸(Glu<sup>1089</sup>)である。ウシMRP1の1088番目のGlnをヒトMRP1と同じGluに置換した変異体を作製し、その変異体を発現する培養細胞の様々な抗ガン剤に対する耐性度を調べ、野生型ウシMRP1及びヒトMRP1を発現する培養細胞の耐性度のパターンとの比較を行った。

## 2. 材料と方法

### 2.1 変異型ウシ MRP1 の作製

田口らにより単離されたウシMRP1 cDNAに対し、site-directed mutagenesis によってウシMRP1の1088番目のアミノ酸であるグルタミンをグルタミン酸に置換した変異型ウシMRP1 cDNAを作製した。site-directed mutagenesis は、QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社)のプロトコールに従って行った。変異導入には2本のオリゴヌクレオチド(primer1 : 5'-GACTCGATGATCCCGGAGGTCATCAAGATG-3'、primer2 : 5'-CATCTTGATGACCTCCGGGATCATCGAGTC-3')を用いた。変異の導入は、変異導入部位付近の塩基配列を決定することにより確認した。

### 2.2 発現ベクターの構築

変異型ウシ MRP1、野生型ウシ MRP1、及び野生型ヒト MRP1 を、それぞれ培養細胞で発現させるための発現ベクターを構築した。発現ベクターは、CMV (Cytomegalovirus) プロモーターの下流に MRP1 cDNA を連結し、さらにそのすぐ下流に IRES (internal ribosome entry site) をはさんでネオマイシン耐性遺伝子と SV40 ウイルス由来の転写終結部位を連結するように構築した。このベクターは、MRP1 とネオマイシン耐性遺伝子をバイストロニックに発現させることができるため、このベクターを導入して得られるネオマイシン (G418) 耐性細胞には、高い確率で MRP1 を発現していることが期待される。したがって、このベクターを用いれば野生型及び変異型の MRP1 の安定発現細胞をより迅速に得ることができると考えた。

### 2.3 MRP1 を安定発現する HEK293 の作製

発現ベクターを導入する細胞としてヒト由来の培養細胞である HEK293 を使用した。細胞の培養は、10% FBS を含む DMEM 培地を用いて、37°C/CO<sub>2</sub> 5%の条件で行った。HEK293 へのそれぞれの発現ベクターの transfection は、GIBCO Invitrogen 社の Lipofect Amine2000 を用いたリポフェクション法によって行った。発現ベクターを transfection した HEK293 を GIBCO Invitrogen 社の Geneticin (G418 1.2mg/ml) による選抜を行うことで、それぞれの MRP1 の発現ベクターが導入された HEK293 を得た。得られたそれぞれの HEK293 から膜タンパク質を抽出し、MRP1 を認識するモノクローナル抗体である MRPm6<sup>(14)</sup>を用いた Western blotting を行うことで、それぞれの HEK293 における MRP1 の安定発現を確認した。

### 2.4 薬剤耐性度の測定

MTT アッセイにより安定発現細胞の様々な薬剤に対する耐性度を測定した<sup>(15)</sup>。薬剤は、ビンクリスチン、コルヒチン、ビンブラスチン、アクチノマイシン D、ドキシソルビシンは和光純薬製、VP16 は SIGMA 社製のものを使用した。96 穴ディッシュの 1 穴あたり 2500 個の細胞を播種し、その細胞に様々な濃度の各薬剤を加えて、37°C/CO<sub>2</sub> 5%の条件で培養した。4 日間の培養後、MTT (SIGMA 社) を PBS で 1mg/ml に溶かして 50µl ずつ各穴に分注し、37°C/CO<sub>2</sub> 5%の条件で 3 時間培養した。培養後、培地を全て吸引し、DMSO を各穴に 100µl ずつ分注・振盪させることで色素を DMSO に溶解させ、マイクロプレートリーダーを用いて、波長 540nm の吸光度を測定した。薬剤を含まない培地で培養した細胞の吸光度を 100%としたときに、吸光度が 50%となるような薬剤の濃度を、薬剤濃度と波長 540nm の吸光度の相関グラフから求めて、IC<sub>50</sub> 値とした。

### 3. 結果

まず、site-directed mutagenesis によってウシ MRP1 の 1088 番目のアミノ酸であるグルタミンを、ヒト MRP1 において、この部位に相当するアミノ酸であるグルタミン酸に置換した変異型ウシ MRP1 cDNA を作製した。変異型ウシ MRP1、野生型ヒト及び野生型ウシ MRP1 のそれぞれの cDNA と G418 耐性遺伝子をバイシストロニックに発現させることのできる発現ベクターを構築し、これらのベクターをリポフェクション法によりヒト由来の培養細胞である HEK293 へ導入した。ベクターを導入した HEK293 を G418 で選抜することによって、MRP1 を安定発現していると期待される細胞を得た。RT-PCR によって、これらの細胞で発現している MRP1 が導入した野生型及び変異型ウシ MRP1、もしくは野生型のヒト MRP1 であることを確認した後、それぞれの細胞から抽出した膜タンパク質に対して、MRP1 に対するモノクローナル抗体である MRPm6 を用いて Western blotting を行った (図 2)。その結果、それぞれの MRP1 を導入し、G418 で選抜した HEK293 細胞では、MRP1 の分子量である約 190kDa のバンドが検出された。このことから、変異型ウシ MRP1、野生型ウシ MRP1 及び野生型ヒト MRP1 のそれぞれが、導入された HEK293 において安定発現していることが確認された。また、検出されたバンドの濃度がほぼ同じであることから、それぞれの安定発現細胞における MRP1 の発現量は、ほぼ同じであると予測された。

それぞれの MRP1 を安定発現する HEK293 の、抗生物質系の抗ガン剤であるドキソルビシン(Dox)、コルヒチン(Col)、アクチノマイシン D (AcD)、植物アルカロイド系の抗ガン剤である VP16、ビンクリスチン(Vcr)、ビンブラスチン(Vbl)に対する耐性を測定した(図 3)。

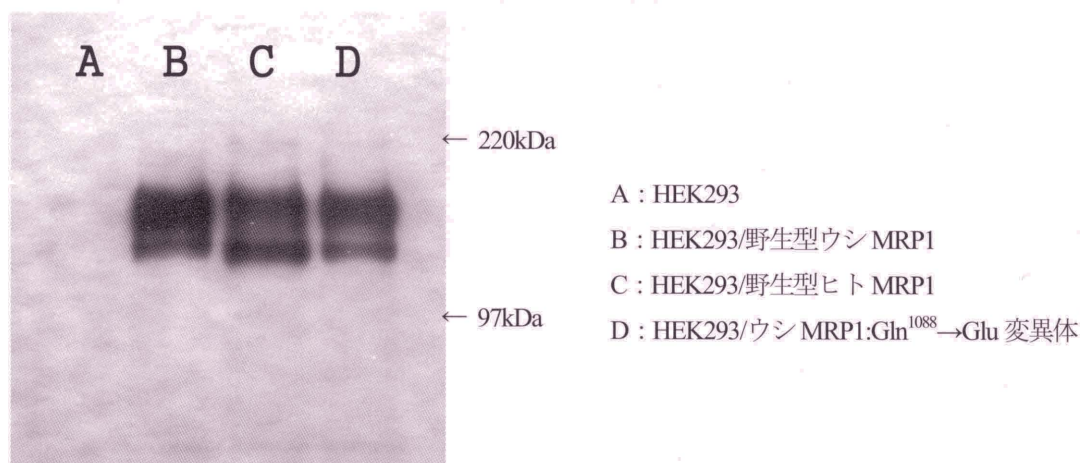


図2 Western blotting による MRP1 タンパク質の発現確認

- 各レーンにはそれぞれの細胞から抽出した膜タンパク質 7 $\mu$ g をアプライした。
- B、C、D レーンでは、高分子量のメジャーバンド(分子量約 190kDa)と、低分子量のマイナーバンドが検出されたが、前者は、細胞膜に存在する糖鎖付加の完全な成熟型の MRP1 に由来し、後者は、細胞内に留まっている糖鎖付加の不完全な MRP1 に由来すると予測される。

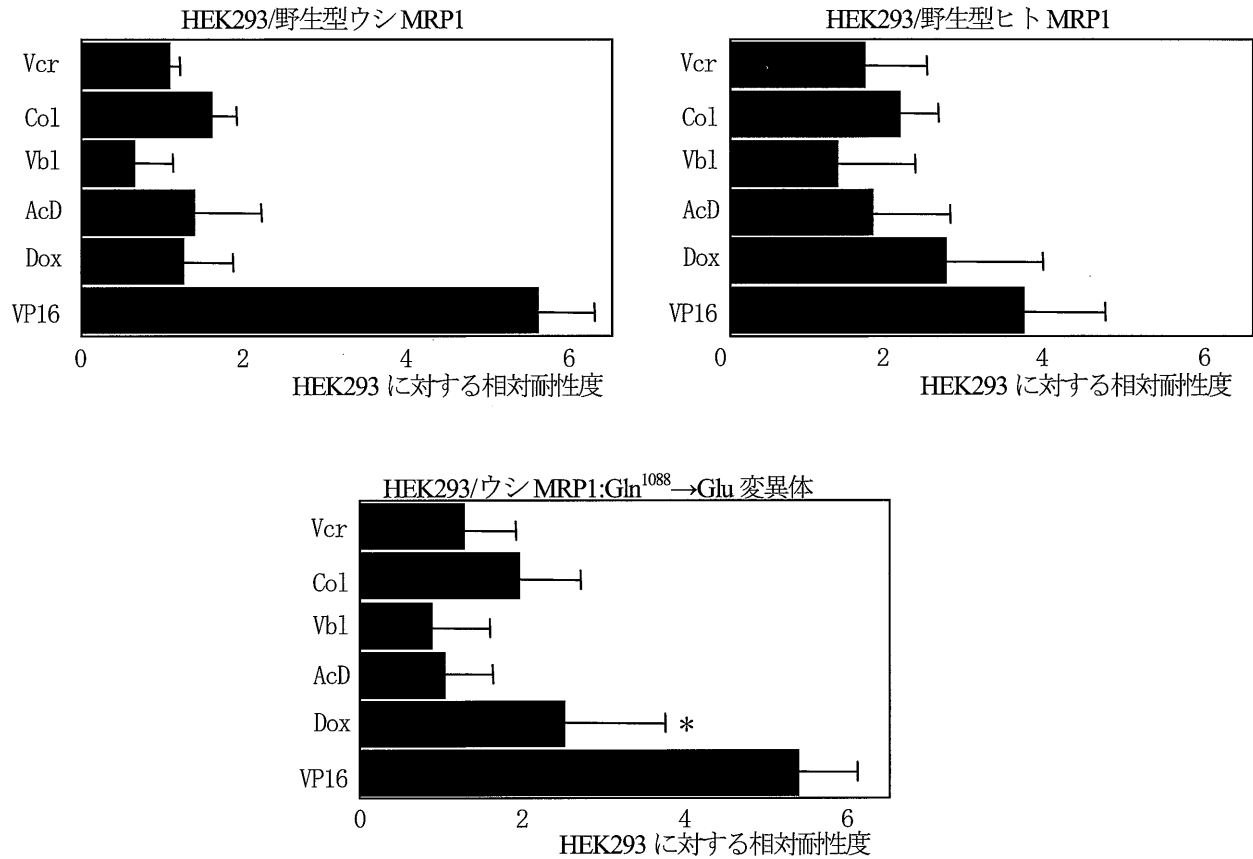


図3 MRP1 を発現する HEK293 の薬剤耐性度

縦軸には耐性度を測定した抗ガン剤の名称を示す(Vcr:ビンクリスチン、Col:コルヒチン、Vbl:ビンブラスチン、AcD:アクトノマイシン D、Dox:ドキシソルビシン)。横軸は HEK293 が各薬剤に対して示す耐性度を 1 とした場合の相対耐性度を示す。耐性度の指標として、各細胞のそれぞれの薬剤に対する IC<sub>50</sub> 値を用いた。グラフに示す耐性度の値は、3 回から 4 回の独立した実験の結果を平均して得た。\* は、HEK293/ウシ MRP1: Gln<sup>1088</sup>→Glu 変異体と HEK293/野生型ウシ MRP1 のそれぞれの薬剤に対する耐性度の値を比較し、統計的に有意な差異があることを示す(p<0.01)。

その結果、ドキシソルビシンに対して、ウシ野生型 MRP1 の発現細胞は、ほとんど耐性を示さなかった (HEK293 の約 1.3 倍の耐性度) のに比べ、ウシ MRP1 の 1088 番目のグルタミンをグルタミン酸に置換した変異型体の発現細胞は、高い耐性度 (HEK293 の約 2.5 倍の耐性度) を示した。この変異体のドキシソルビシンに対する耐性度は、ヒト野生型 MRP1 の発現細胞の示す耐性度 (HEK293 の約 2.7 倍) とほぼ同じであった。この結果から、ウシ MRP1 の 1088 番目のアミノ酸は、MRP1 によるドキシソルビシンの認識及び輸送に関与していることが示唆された。

一方、VP16 に対しては、ウシ MRP1 の 1088 番目のグルタミンをグルタミン酸に置換した変異体の発現細胞は、HEK293 の 5.4 倍の耐性度を示した。この耐性度は、ウシ野生型 MRP1 の発現細胞が VP16 に対して示す耐性度 (HEK293 の約 5.6 倍) とほぼ同じであり、どちらもヒト MRP1 の発現細胞 (HEK293 の約 3.6 倍の耐性度) と比較すると、高い耐性度を示した。以上の結果から、ウシ MRP1 の 1088 番目のアミノ酸は、MRP1 のドキシソルビシンの輸送に関与する一方で、VP16 の輸送には関与していないことが示唆された。さらに、ビンクリスチン、コルヒチン、ビンブラスチン、アクトノマイシン D に対しては、ウシ、ヒト野生型 MRP1 の発現細胞、及びウシ MRP1 の 1088 番目の変異体の発現細胞は、ほぼ同様の耐性度を示した。

この結果から、ウシ MRP1 の 1088 番目のアミノ酸は、MRP1 のピンクリスチン、コルヒチン、ビンブラスチン、アクチノマイシン D の輸送にも特に重要な寄与はしていないことが示唆された。

#### 4. 考察

マウス MRP1 において、ウシ MRP1 の 1088 番目、ヒト MRP1 の 1089 番目のアミノ酸に相当するアミノ酸は、ウシ MRP1 と同様にグルタミン(1086 番目)である<sup>(16)</sup>。そして、マウス MRP1 を発現する培養細胞も、ウシ MRP1 を発現する培養細胞と同様に、ドキソルビシンに対する耐性は低く、このアミノ酸をヒト MRP1 と同様のグルタミン酸に置換すると、その耐性が上昇することが報告されている<sup>(17,18)</sup>。今回の我々の実験から、ウシ MRP1 の 1088 番目のグルタミンをヒトと同様のグルタミン酸に置換すると、マウスとヒトの MRP1 の比較の実験と同様に、ドキソルビシンに対する耐性が上昇することが分かった。この結果は、MRP1 の第 14 膜貫通ヘリックスの近傍に存在するウシ MRP1 の 1088 番目のアミノ酸に相当するアミノ酸は、種の差異を越えて、ドキソルビシンの輸送に重要な寄与をしていることを示唆するものである。

グルタミンは非電荷極性アミノ酸である一方、グルタミン酸は側鎖にマイナスの電荷を持つ酸性アミノ酸である。今回、ウシ MRP1 の 1088 番目のグルタミンをグルタミン酸に置換した変異によってドキソルビシンに対する耐性が変化したことから、このアミノ酸部位の電荷が、ドキソルビシンとの相互作用に関与している可能性が示唆された。ドキソルビシンは、全体としては疎水性の化合物であるが、そのアミノ糖の部位に一つプラスの電荷を持つ。ウシ MRP1 の 1088 番目のアミノ酸がドキソルビシンの持つ電荷と相互作用しており、このアミノ酸がマイナスの電荷を持つアミノ酸に置換されることで、ドキソルビシンとの静電的相互作用が強化され、MRP1 によるドキソルビシンの輸送が上昇した可能性も考えられる。この仮説を検証するためには、このアミノ酸をグルタミン酸と同様に側鎖にマイナスの電荷を持つアスパラギン酸や、プラスの電荷を持つアルギニン、リジンに置換したときにドキソルビシンに対する耐性がどのように変化するかを検討する必要がある。

一方で、ウシ MRP1 の 1088 番目のグルタミンをグルタミン酸に置換した変異によっても VP16 に対する耐性は変化しなかった。この結果は、このアミノ酸部位が VP16 の基質輸送には重要な寄与をしていないことを示唆している。ヒト MRP1 の発現細胞と比較して、ウシ MRP1 の発現細胞は、VP16 に対してはるかに高い耐性を示す。この耐性の違いの原因となっている、VP16 の基質輸送に重要な働きをするアミノ酸は、ウシ、ヒトの MRP1 の間で性質の異なるアミノ酸のうち、今回のウシ MRP1 の 1088 番目以外のアミノ酸である可能性が高い。今後、ウシ MRP1 の 1088 番目のアミノ酸以外のウシ、ヒト間で性質の異なるアミノ酸に関しても変異を導入し、その変異体の活性を調べることで、これまでに報告されていない、MRP1 の基質の認識及び輸送に関与する部位に関する新しい情報が得られることが期待される。

#### 参考文献

- (1) Cole, S.P., G. Bhardwaj, J.H. Gerlach, J.E. Mackie, C.E. Grant, K.C. Almquist, A.J. Stewart, E.U. Kurz, A.M. Duncan, and R.G. Deeley (1992), Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 258 (5088): pp. 1650-4.
- (2) Deeley, R.G. and S.P. Cole (2006), Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett.* 580 (4): pp. 1103-11.
- (3) Zaman, G.J., M.J. Flens, M.R. van Leusden, M. de Haas, H.S. Mulder, J. Lankelma, H.M. Pinedo, R.J. Scheper, F. Baas, H.J. Broxterman, and et al. (1994), The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91 (19): pp. 8822-6.

- 
- (4) 植田 和光 編 (2005)、A B C蛋白質、初版、pp.4-5、学会出版センター
  - (5) Bakos, E., R. Evers, E. Sinko, A. Varadi, P. Borst, and B. Sarkadi (2000), Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol Pharmacol* . 57 (4): pp. 760-8.
  - (6) Leier, I., G. Jedlitschky, U. Buchholz, S.P. Cole, R.G. Deeley, and D. Keppler (1994), The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem* . 269 (45): pp. 27807-10.
  - (7) Muller, M., C. Meijer, G.J. Zaman, P. Borst, R.J. Scheper, N.H. Mulder, E.G. de Vries, and P.L. Jansen (1994), Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 91 (26): pp. 13033-7.
  - (8) Jedlitschky, G., I. Leier, U. Buchholz, K. Barnouin, G. Kurz, and D. Keppler (1996), Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* . 56 (5): pp. 988-94.
  - (9) Loe, D.W., K.C. Almquist, S.P. Cole, and R.G. Deeley (1996), ATP-dependent 17 beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP). Inhibition by cholestatic steroids. *J Biol Chem* . 271 (16): pp. 9683-9.
  - (10) Loe, D.W., K.C. Almquist, R.G. Deeley, and S.P. Cole (1996), Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J Biol Chem* . 271 (16): pp. 9675-82.
  - (11) Zaman, G.J., N.H. Cnubben, P.J. van Bladeren, R. Evers, and P. Borst (1996), Transport of the glutathione conjugate of ethacrynic acid by the human multidrug resistance protein MRP. *FEBS Lett* . 391 (1-2): pp. 126-30.
  - (12) Evers, R., N.H. Cnubben, J. Wijnholds, L. van Deemter, P.J. van Bladeren, and P. Borst (1997), Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1. *FEBS Lett* . 419 (1): pp. 112-6.
  - (13) Taguchi, Y., K. Saeki, and T. Komano (2002), Functional analysis of MRP1 cloned from bovine. *FEBS Lett* . 521 (1-3): pp. 211-3.
  - (14) Hipfner, D.R., et al. (1998), Epitope mapping of monoclonal antibodies specific for the 190-kDa multidrug resistance protein (MRP). *Br J Cancer* . 78 (9): pp. 1134-40.
  - (15) Carmichael, J., W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna, and J.B. Mitchell (1987), Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* . 47 (4): pp. 936-42.
  - (16) Stride, B.D., G. Valdimarsson, J.H. Gerlach, G.M. Wilson, S.P. Cole, and R.G. Deeley (1996), Structure and expression of the messenger RNA encoding the murine multidrug resistance protein, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Pharmacol* . 49 (6): pp. 962-71.
  - (17) Zhang, D.W., S.P. Cole, and R.G. Deeley (2001), Identification of an amino acid residue in multidrug resistance protein 1 critical for conferring resistance to anthracyclines. *J Biol Chem* . 276 (16): pp. 13231-9.
  - (18) Grant, C.E., G. Valdimarsson, D.R. Hipfner, K.C. Almquist, S.P. Cole, and R.G. Deeley (1994), Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* . 54 (2): pp. 357-61.

英文抄録

**Alteration of Substrate Specificity by Mutation at the Gln<sup>1088</sup>  
Position of Bovine MRP1 (ABCC1)**Shigetaka Yamamoto<sup>1</sup>, Katsura Shinoda<sup>1</sup>, Shinsuke Michishita<sup>1</sup>, Takako Ohno<sup>2</sup>,  
Yuki Mizutani<sup>2</sup>, Yoshitomo Taguchi<sup>2</sup>, and Kazuhiro Saeki<sup>1,2</sup>

Multidrug resistance protein 1 (MRP1), a member of the ATP-binding cassette (ABC) family of membrane transport proteins, functions as an energy-dependent efflux pump that extrudes many kinds of xenobiotics out of cells. It has been suggested that bovine MRP1, the cDNA of which was recently cloned from mammary gland of lactating cow, apparently differs from human MRP1 in substrate specificity, despite a high degree of similarity in amino acid, and that some of non-conserved amino acids between two orthologs might be important in deciding the substrate specificity of MRP1.

In this work, we focused on the Gln<sup>1088</sup> position of bovine MRP1. The amino acid residue in human MRP1 corresponding to the Gln<sup>1088</sup> of bovine MRP1 is Glu<sup>1089</sup>. We changed Gln<sup>1088</sup> in bovine MRP1 by Glu, and the drug-resistance profiles of HEK293 cells stably expressing the mutated bovine MRP1 was examined. The resistance to doxorubicin was remarkably increased by this replacement, suggesting that this amino acid would play important roles in the recognition and/or transport of substrates, especially doxorubicin, by MRP1.

---

1. Graduate School of Biology Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan