癌の多剤耐性に関するヒトP-糖蛋白質の機能の解析†

(1992 年度農芸化学奨励賞受賞)

植 田 和 光

(京都大学農学部)

これまで多くの抗癌剤が開発され、癌の臨床において成果をあげてきた。しかし、抗癌剤によって、白血病などの癌が治療可能になる一方で、抗癌剤が無効な癌や、治療途上で耐性を獲得する癌がまだ多く存在している。とくに癌細胞が構造や作用点の異なる多くの薬剤に対して同時に耐性を獲得する＜多剤耐性化＞は、癌治療の大きな障害である。培養細胞においても、臨床における多剤耐性獲得の場合と同様に、1つの薬剤に対して耐性を獲得すると同時に多剤耐性になる場合が多い。細胞が耐性になる薬剤は、図1に示したように臨床でよく使われるビンカアルカロイド系抗癌剤、アンスラサイクリン系抗癌剤などを含み、構造や作用点に類似性があまりない。そのため、多剤耐性化には複数のメカニズムが連関して同時に働いていることが予想されていた。ところが、1986年にMDR1遺伝子が単離され、この遺伝子の過剰発現だけで細胞を多剤耐性にできること、MDR1遺伝子は複数の耐性メカニズムの制御因子などとして働いているのではなく、それ自身が複数の薬剤を細胞外へ排出するポンプとして働いていることが明らかになった。そこで、臨床における多剤耐性にもMDR1遺伝子が関与しているならば、この遺伝子の機能を抑えることによって多剤耐性を克服できるのではないかと期待がよせられている⁽¹⁻⁹⁾。本総説では、培養細胞の多剤耐性を担う遺伝子として単離され、癌の多剤耐性に深く関与していると現在考えられているMDR1遺伝子、およびその遺伝子のコードするP-糖蛋白質に関する最近の知見をまとめた。

I. 培養細胞の多剤耐性を担うMDR1遺伝子

1. MDR1遺伝子の単離

表1は、米国国立癌研究所 Pastan 博士の研究室で秋山伸一博士らによって樹立された多剤耐性培養細胞であり⁽¹⁰⁾、HeLa由来の薬剤感受性細胞KB-3-1のそれぞれの薬剤に対する耐性を1として比較してある⁽¹¹⁾。KB-8からKB-C4まではコルヒチンによってKB-3-1から選別された耐性細胞であり、KB-V1とKB-A1はそれぞれビンブラスチン、アドリアマイシンで選別された。このように培養細胞においても、癌でみられるように、いずれかの薬剤に耐性を獲得すると同時に他の薬剤に対しても交差耐性を示す場合が多い。Roninsonらは、彼らの開発したin-gel renaturation法を用いて、これらの多剤耐性細胞中で共通して増幅している染色体の領域を見つけMDR1と名づけた⁽¹²⁾。この領域は薬剤耐性度に比例して増幅し、実際にRNAとして転写されていることから、多剤耐性と密接に関連していることが示唆された。そこで私たちは、その領域をプローブとして用いてMDR1遺伝子の単離を行った⁽¹³⁻¹⁵⁾。

2. P-糖蛋白質の構造

予想される塩基配列から、MDR1遺伝子をコードする蛋白質は1280アミノ酸残基からなり、図2のように前半半分がほぼ2回繰り返した構造をし、12の膜貫通領域と2つのATP結合領域を持つことが予想された⁽¹⁴⁾。興味あることに、ATP結合領域は原核生物のアミノ酸や糖などを能動輸送する蛋白に非常によく似ていた^(14,16,17)。さらにcDNAのハイブリダイゼーション実験などから、MDR1遺伝子が多剤耐性培養細胞の膜に多量に存在するP-糖蛋白質をコードしていることが明らかとなった⁽¹⁸⁾。P-糖蛋白質は細胞の多剤耐性獲得に何らかの関与をしていると予想されていたが、実際にMDR1cDNAを発現ベクターにつなぎ薬剤感受性細胞

† Biochemistry of Human P-Glycoproteins, the Multidrug Transporter.
Kazumitsu UEDA(Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606)

図 1 P-糖蛋白質によって細胞が耐性になる代表的な薬剤

図 2 P-糖蛋白質の予想される2次元構造

表 1 ヒト KB 細胞由来多剤耐性細胞の薬剤耐性度と *MDR1* 遺伝子発現

細胞株	相 対 耐 性 度			<i>MDR1</i> 遺伝子	
	コルヒチン	ビンブラスチン	アドリアマイシン	遺伝子数	mRNA 量
KB-3-1	1	1	1	1	<0.1
KB-8	2.1	1.2	1.1	1	1
KB-8-5	3.8	6.3	3.2	1	3
KB-8-5-11	40	51	23	7	80
KB-C 1	263	96	162	13	120
KB-C 4	1750	159	254	30	378
KB-V 1	171	213	422	100	320
KB-A 1	19	43	97	70	270

に導入すると、図 1 に示したような構造や作用点にあまり類似性のない多くの薬剤に対して細胞が多剤耐性になることが明らかになった^(19,20)。P-糖蛋白質は発見された当初、薬剤に対する膜の透過性を変化させ細胞を耐性にする予想されたため permeability の P を取って P-

糖蛋白質と名づけられた⁽²¹⁾が、後で述べるように P-糖蛋白質は薬剤の細胞外への汲み出しポンプとして働き、細胞内の薬剤濃度を下げることによって多剤耐性になることが明らかになったため、現在では plasma membrane あるいは pump の P と考えるのが妥当であろう。

以上の結果は、P-糖蛋白質の発現だけで細胞は多剤耐性になること、そして少なくとも培養細胞においては P-糖蛋白質発現が多剤耐性の主要な原因の 1 つであることを意味している。

II. *MDR1* 遺伝子の発現制御メカニズム

1. *MDR1* 遺伝子の正常組織および癌における発現
P-糖蛋白質が培養細胞の多剤耐性の主要なメカニズムであることが明らかになったが、つぎに癌細胞の多剤耐性に P-糖蛋白質が実際に関与しているかどうか知るためには、正常組織および癌細胞における *MDR1* 遺伝子の発現を正確に知る必要がある。そこで RNase プロテクション法などを用いて検討した。その結果、*MDR1* は腎臓、大腸、肝臓、すい臓などで本来発現しており、とくに副腎では大量に発現していることが明らかになった^(22,23)。腎癌、大腸癌などは抗癌剤が最初から効きにくい、これらの癌において、多くの場合 *MDR1* 遺伝子が発現していた^(22,23)。また、神経芽細胞腫などにおいて、抗癌剤による治療の前に比べて治療後に *MDR1* 遺伝子の発現が増加している症例が多いことから、癌の再発時における多剤耐性獲得に *MDR1* 遺伝子の発現が関係していることが示唆された⁽²⁴⁾。

2. ストレスによる *MDR1* の発現誘導

以上のように癌の多剤耐性と *MDR1* 遺伝子の発現にはある程度相関があることがわかってきた。培養細胞が多剤耐性を獲得するとき、*MDR1* 遺伝子はまず転写の活性化を受ける⁽²⁵⁾。それゆえ癌の多剤耐性獲得においても、同様に *MDR1* 遺伝子が転写活性化されている可能性がある。また一部の多剤耐性培養細胞においては、*MDR1* 遺伝子は 2 つのプロモーターから転写されることが明らかになった⁽²⁶⁾。そこで *MDR1* 遺伝子の正常細胞および癌細胞における発現制御のメカニズムを理解しようとした。その結果、正常組織および癌細胞においては、主に下流のプロモーターから転写されていること^(22,26)、さらにヒト肝癌由来培養細胞 HepG 2 において、P-糖蛋白質の合成がヒ素によって誘導されることを見出した⁽²⁷⁾。*MDR1* RNA の量もヒ素処理によって増大することから、転写レベルで制御を受けていると考えられた。同様の結果は、腎癌由来の培養細胞においても報告された⁽²⁸⁾。そこで *MDR1* 遺伝子のプロモーター領域を単離し、塩基配列を決定するとともにその転写活性を CAT assay 法を用いて検討した。その結果、ヒ素に

よる誘導発現は転写レベルで行われており、プロモーター領域に存在するストレス応答エレメントが関与していることが明らかになった⁽²⁷⁾。

3. ストレス応答反応の抑制

永田博士らはストレスに応答したストレス蛋白質の合成が、植物フラボノイドの 1 種ケルセチンで抑制されることを見出した⁽²⁹⁾。そこで *MDR1* 遺伝子の誘導発現に対する影響を検討した。その結果、ケルセチンは P-糖蛋白質合成のヒ素による誘導を抑制すること、それは *MDR1* 遺伝子の転写の誘導を抑制した結果であることが明らかとなった⁽³⁰⁾。ケルセチンは天然のフラボノイドであり、*MDR1* 遺伝子の発現がこのような化合物で抑制できるという結果は、P-糖蛋白質の機能を阻害するだけでなく、発現を抑制することによっても多剤耐性を克服できる可能性を示唆する。

4. 癌遺伝子による発現誘導

近年多くの癌において癌遺伝子 *ras* や癌抑制遺伝子 *p53* が変異していることが発見され、癌の進行にこれらの遺伝子が深く関与していることが示唆されている⁽³¹⁾。そこで *MDR1* 遺伝子プロモーター領域を CAT 遺伝子につないだレポータープラスミドを、*ras* や変異 *p53* などの癌遺伝子発現ベクターとともに細胞内に導入し、これらの遺伝子の *MDR1* 遺伝子発現に与える影響を検討した⁽³²⁾。その結果、これら癌遺伝子および変異癌抑制遺伝子によって *MDR1* 遺伝子のプロモーター活性が影響を受けることが明らかになり、癌の進行に伴って *MDR1* 遺伝子が活性化される可能性が示唆された。

III. P-糖蛋白質の機能発現のメカニズム

1. 185 番目のアミノ酸置換の薬剤耐性に与える影響

P-糖蛋白質が大量に発現しているヒト正常副腎から *MDR1* cDNA を単離し、コルヒチンで選別された多剤耐性細胞 KB-C 2.5 から最初に単離した cDNA⁽¹³⁾ と比較したところ、KB-C 2.5 細胞ではコルヒチンによる選別中に変異が起り、185 番目のアミノ酸がグリニンからバリンに変化していることが明らかになった⁽³³⁾。185 番目のアミノ酸の異なる 2 種の cDNA を培養細胞内で発現させた結果、図 3 に示したように 185 番目のアミノ酸置換によって種々の薬剤に対する相対耐性度が変化し、とくにコルヒチンに対する耐性度が大きく変化することがわかった⁽³³⁻³⁵⁾。この結果は、前半部に位置する 185 番目のアミノ酸が、直接あるいは間接的に薬剤結合

図 3 P-糖蛋白質の 185 番目のアミノ酸置換の薬剤耐性に与える影響

COL, コルヒチン; VBL, ビンブラスチン; ADR, アドリアマイシン。

に参与していることを示唆している。

2. 薬剤認識機構

P-糖蛋白質の最も興味ある特徴として、構造にあまり類似性のない多くの薬剤を認識することがあげられる。薬剤認識機構を解明することは、P-糖蛋白質に対する効果的な阻害剤を開発するために重要である。これまでに、1) P-糖蛋白質の基質の1つであるアジドビンが主に後半の膜貫通領域に結合すること^(36,37)、2) 上で述べたように前半部に位置する 185 番目のアミノ酸が直接あるいは間接的に薬剤結合に関与していること、また 3) マウスの P-糖蛋白質では、12 の膜貫通領域のうち 5 から 8 番目が薬剤輸送に重要な役割をしており⁽³⁸⁾、さらに 4) 11 番目の膜貫通領域内のアミノ酸置換が相対薬剤耐性度を変化させるため薬剤認識に関与していると考えられる⁽³⁹⁾ことなどが明らかになっている。つまり薬剤認識には前後半両方の膜貫通領域が複雑に関与していると考えられ、まだ薬剤認識機構を解明するには至っていない。そこで *in vitro* 再構成系による P-糖蛋白質の薬剤結合反応の解析を試みた⁽⁴⁰⁾。

まず P-糖蛋白質と β -ガラクトシダーゼの融合遺伝子を培養細胞内で大量に発現させ、 β -ガラクトシダーゼに対する抗体を用いて融合蛋白質を部分精製した。RI 標識アジドビンと反応後、紫外線照射するとアジドビンはアジド基によって P-糖蛋白質に共有結合する⁽⁴¹⁾ため、電気泳動後オートラジオグラムによって結合量を測定できる。リボソーム中のリン脂質とコレステロールの比率を変化させ、過剰量のビンブラスチンで競合阻害されるアジドビンの量を特異的薬剤結合量としてプロットする

図 4 P-糖蛋白質の *in vitro* アジドビン結合活性に対するコレステロールの促進作用

と、特異的薬剤結合はコレステロールの量に依存し、動物細胞の膜中のコレステロール量にほぼ相当する条件で最高になることが明らかとなった⁽⁴⁰⁾ (図 4)。植物のステロール成分であるスチグマステロールは、一応アジドビンの特異的結合を促進するが、その程度はコレステロールよりも弱く、さらに酵母の膜の構成成分であるエルゴステロールはほとんど促進しないことがわかった。これらの結果は、コレステロールが P-糖蛋白質の活性発現に関与していることを示唆している。

さらにそれを確認するため、ヒト P-糖蛋白質を酵母で発現させ機能を解析した⁽⁴²⁾。その結果、酵母で発現させたヒト P-糖蛋白質は、アジドビンをほとんど結合せず、酵母をアドリアマイシンに対して耐性にしないことが明らかになった。この結果も、コレステロールが P-糖蛋白質の薬剤結合および薬剤輸送になんらかの関与をしていることを示唆している。

3. P-糖蛋白質の ATPase 活性の解析

P-糖蛋白質が ATPase 活性を持ち^(43,44)、薬剤の排出に ATP の加水分解が必要なことはわかっているが⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾、これら 2 つの ATP 結合部位がどのように薬剤排出に利用されているかはわかっていない。そこで、ATP 結合領域を 2 つ持つ全長 P-糖蛋白質および前半の ATP 結合領域だけを持つ前半部 P-糖蛋白質を β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質として培養細胞内で発現させ、融合蛋白質を部分精製した後リボソームに再構成し、ATPase 活性を測定した⁽⁴⁸⁾。その結果、前半部の ATP 結合領域が単独で全長 P-糖蛋白質と同様に ATPase 活性を持つこと、ATP に対して同様の濃度依存性を持つこと、ウアバイン非感受性で、NEM やバナジン酸に感受性であることなど種々の阻害剤の効果において

全長と同じ性質を持っていることが明らかになった。しかし、全長 P-糖蛋白質が細胞を多剤耐性にしたのに対し、前半部を発現させた細胞は薬剤耐性を示さなかった^(48,49)。つまり薬剤排出ポンプとして機能し細胞を多剤耐性にするには、両方の ATP 結合領域が必要なことが明らかになった。

IV. P-糖蛋白質の正常機能の解明

1. 経細胞輸送測定系の確立

P-糖蛋白質は腎近位尿細管の管腔側で本来発現し⁽⁵⁰⁻⁵²⁾、薬剤を血液から尿中へ排出していると考えられている。そこで、ヒト副腎から単離した *MDR1* cDNA をブタ腎臓由来培養細胞 LLC-PK1 中に導入し大量発現を試みた。LLC-PK1 細胞は単層で集密化して成育すると、細胞間で密着結合し、絨毛を持った頂側膜と基底膜を形成する。遺伝子導入によって発現させたヒト P-糖蛋白質は、期待したとおり本来発現している頂側膜にだけ存在していることが金コロイドを用いた免疫電顕によって確認できた。

LLC-PK1 細胞を filter-bottomed cup に密集させて生やすと細胞は密着結合するため、細胞上部あるいは下部の培地に加えた標識化合物はかならず細胞を経由して反対側へ移動する。それゆえ経時的に反対側の培地の放射活性を計ることによって、経細胞輸送量を測定できる。脂溶性物質の場合、細胞膜をある程度自由に通過できるため、基底膜側から頂側膜側への移動量と、頂側膜側から基底膜側への移動量はほぼ等しくなる。トランスフォーマントを用いた場合、頂側膜には P-糖蛋白質が大量に発現しているため、その物質が P-糖蛋白質の基質である場合、基底膜側から頂側膜側への移動量は増大し、頂側膜側から入ってきた物質は P-糖蛋白質によってもとの培地中に戻されるため、頂側膜側から基底膜側への移動量は減少することが期待される。

実際に P-糖蛋白質によって輸送されることがわかっているビンブラスチン⁽⁵³⁾の経細胞輸送を測定すると⁽⁵⁴⁾(図 5)、ホストの細胞では両方の移動量がほぼ等しく単純拡散だけで移動していることがわかる。トランスフォーマントでは基底膜側から頂側膜側への移動量が増大し、頂側膜側から基底膜側への移動量が減少するため、ヒト P-糖蛋白質によって輸送されていることが確認できた。

図 5 P-糖蛋白質によるビンブラスチンの経細胞輸送
●▲, トランスフォーマント; ○△, ホスト細胞;
▲△, apical→basal; ●○, basal→apical.

2. P-糖蛋白質によるステロイドホルモン輸送⁽⁵⁴⁾

P-糖蛋白質は副腎皮質および妊娠中の子宮で大量に発現しており^(51,52,55-57)、実際プロゲステロンが P-糖蛋白質に結合することが報告されたため⁽⁵⁸⁾、P-糖蛋白質がステロイドホルモン輸送に関与していることが示唆されていた⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾。しかしステロイドホルモンは脂溶性が非常に高く、従来の方法では膜への結合と輸送を区別しにくいため、P-糖蛋白質がそれらを輸送するかどうかははっきりしなかった。そこで、この経細胞輸送系を用いて、P-糖蛋白質によるステロイドホルモン輸送を検討した。その結果、副腎皮質ホルモンのコルチゾール、アルドステロンおよび人工ステロイドであるデキサメサゾンの基底膜側から頂側膜側への移動量が増大し、頂側膜側から基底膜側への移動量が減少した。この結果は、これらステロイドが P-糖蛋白質によって輸送されることを意味している。ところが P-糖蛋白質に強く結合することがわかっている黄体ホルモンのプロゲステロンは輸送されなかった。コルチゾール、アルドステロン、デキサメサゾンの輸送は P-糖蛋白質に対する競合阻害剤であるベラパミルによって阻害された。さらに P-糖蛋白質によるコルチゾール輸送がプロゲステロンによって阻害されることも明らかになった。

以上の結果は、P-糖蛋白質が副腎において生理作用としてコルチゾールなどのステロイドホルモンの分泌に関与していること、およびプロゲステロンは P-糖蛋白質の機能を調節している可能性を示唆している。さらに、この系によって、強心配糖体ジゴキシンの腎尿細管分泌

が P-糖蛋白質を介していること、臨床上問題となるキニジン、ベラパミル併用時のジゴキシン腎クリアランス低下が、腎近位尿管における P-糖蛋白質の阻害に起因することが示唆された⁽⁶²⁾。この経細胞輸送系を用いることによって、P-糖蛋白質が本来発現している腎尿管、肝臓胆汁管、大腸、すい臓、子宮内膜、血液脳関門などにおける P-糖蛋白質の生理作用、さらには輸送のメカニズムが解明できるのではないかと考えている。

おわりに

以上、培養細胞の多剤耐性を担う P-糖蛋白質の発現調節機構、作用機作、生理機能などの解明をめざして研究を進めてきた。最近、臨床における癌の薬剤耐性に実際に P-糖蛋白質が関与していることを示す例が次々に報告されている。さらにこれらの研究を進展させることによって、癌の薬剤耐性の克服に少しでも寄与できればと考えている。また、これまで P-糖蛋白質の研究は、癌の治療というある程度限られた分野で展開されてきた。しかし最近になって P-糖蛋白質がペプチド輸送活性を持つこと^(63,64)、さらに興味深いことに遺伝病嚢胞性繊維症の原因蛋白である cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)⁽⁶⁵⁾ と同様にクロライドチャンネルとしても働くことが示唆され⁽⁶⁶⁾、P-糖蛋白質は特殊な多機能蛋白質として、多様な生理機能を持っているらしいことがわかってきた。さらに P-糖蛋白質の機能を明らかにしたいと考えている。

本総説は 1992 年度農芸化学奨励賞の対象となった研究をもとにまとめたものです。本研究の遂行にあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました京都大学農学部教授駒野 徹先生に心より感謝いたします。本研究は、京都大学農学部農芸化学科生物化学研究室において、山野好章博士、木岡紀幸博士、シマブク アルフレッド氏、佐伯徹氏、坪田 潤氏、大坪嗣輝氏をはじめとする多くの研究者とともに、また米国国立癌研究所の I. Pastan 博士、M. M. Gottesman 博士をはじめとする多くの共同研究者、京大医学部寛 善行博士、胸部疾患研究所永田和宏博士、京大病院薬剤部堀 了平博士、谷川原裕介博士、平井みどり博士、岡村 昇氏、サントリー研究センター柴野裕次博士たちとの共同研究として行われたものであり、これらの方々に深く感謝いたします。

(1) J. A. Endicott and V. Ling : *Annu. Rev.*

Biochem., **58**, 137—171 (1989).

- (2) M. M. Gottesman and I. Pastan : *J. Biol. Chem.*, **263**, 12163—12166 (1988).
- (3) 植田和光：蛋白質 核酸 酵素, **33**, 1287—1299 (1988).
- (4) 植田和光：細胞工学, **9**, 96—104 (1990).
- (5) 植田和光：ファルマシア, **26**, 809—813(1990)
- (6) 植田和光, 駒野 徹：化学, **46**, 428—429 (1991).
- (7) 植田和光：化学と生物, **30**, 410—411 (1992).
- (8) 鶴尾 隆：蛋白質 核酸 酵素, **32**, 1400—1412 (1987).
- (9) 鶴尾 隆：生化学, **62**, 1144—1153 (1990).
- (10) S. Akiyama, A. Fojo, J. A. Hanover, I. Pastan, and M. M. Gottesman : *Somat. Cell Genet.*, **11**, 117—126 (1985).
- (11) D.-W. Shen, C. Cardarelli, J. Hwang, M. Cornwell, N. Richert, S. Ishii, I. Pastan, and M. M. Gottesman : *J. Biol. Chem.*, **261**, 7762—7770 (1986).
- (12) I. B. Roninson, J. E. Chin, K. Choi, P. Gros, D. E. Housman, A. Fojo, D.-W. Shen, M. M. Gottesman, and I. Pastan : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4538—4542 (1986).
- (13) K. Ueda, D. P. Clark, C.-J. Chen, I. B. Roninson, M. M. Gottesman, and I. Pastan : *J. Biol. Chem.*, **262**, 505—508 (1987).
- (14) C.-J. Chen, J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman, and I. B. Roninson : *Cell*, **47**, 381—389 (1986).
- (15) C.-J. Chen, D. Clark, K. Ueda, I. Pastan, M. M. Gottesman, and I. B. Roninson : *J. Biol. Chem.*, **265**, 506—514 (1990).
- (16) P. Gros, J. Croop, and D. Housman : *Cell*, **47**, 371—380 (1986).
- (17) C. F. Higgins, M. P. Gallagher, M. L. Mimmack, and S. R. Pearce : *BioEssays*, **8**, 111—116 (1988).
- (18) K. Ueda, M. M. Cornwell, M. M. Gottesman, I. Pastan, I. B. Roninson, V. Ling, and J. R. Riordan : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 956—962 (1986).
- (19) K. Ueda, C. Cardarelli, M. M. Gottesman, and I. Pastan : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3004—3008 (1987).
- (20) I. Pastan, M. M. Gottesman, K. Ueda, E. Lovelace, A. V. Rutherford, and M. C. Willingham : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4486—4490 (1988).
- (21) R. Juliano and V. Ling : *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 152—162 (1976).
- (22) K. Ueda, Y. Yamano, N. Kioka, Y. Kakehi, O. Yoshida, M. M. Gottesman, I. Pastan, and T. Komano : *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 1127

- 1132 (1989).
- (23) A. T. Fojo, K. Ueda, D. J. Slamon, D. G. Poplack, M. M. Gottesman, and I. Pastan: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 265—269 (1987).
- (24) L. J. Goldstein, A. T. Fojo, K. Ueda, W. Crist, A. Green, G. Brodeur, I. Pastan, and M. M. Gottesman: *J. Clin. Oncol.*, **8**, 128—136 (1990).
- (25) D.-W. Shen, A. Fojo, J. E. Chin, I. B. Roninson, N. Richert, I. Pastan, and M. M. Gottesman: *Science*, **232**, 643—645 (1986).
- (26) K. Ueda, I. Pastan, and M. M. Gottesman: *J. Biol. Chem.*, **262**, 17432—17436 (1987).
- (27) N. Kioka, Y. Yamano, T. Komano, and K. Ueda: *FEBS Lett.*, **301**, 37—40 (1992).
- (28) K.-V. Chin, S. Tanaka, G. Darlington, I. Pastan, and M. M. Gottesman: *J. Biol. Chem.*, **265**, 221—226 (1990).
- (29) N. Hosokawa, K. Hirayoshi, A. Nakai, Y. Hosokawa, N. Marui, M. Yoshida, T. Sakai, H. Nishino, A. Aoike, K. Kawai, and K. Nagata: *Cell Struct. Funct.*, **15**, 393—401 (1990).
- (30) N. Kioka, N. Hosokawa, T. Komano, K. Hirayoshi, K. Nagata, and K. Ueda: *FEBS Lett.*, **301**, 307—309 (1992).
- (31) J. B. Bishop: *Cell*, **64**, 235—248 (1991).
- (32) K.-V. Chin, K. Ueda, I. Pastan, and M. M. Gottesman: *Science*, **255**, 459—462 (1992).
- (33) N. Kioka, J. Tsubota, Y. Kakehi, T. Komano, M. M. Gottesman, I. Pastan, and K. Ueda: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 224—231 (1989).
- (34) K. Choi, C.-J. Chen, M. Kriegler, and I. B. Roninson: *Cell*, **53**, 519—529 (1988).
- (35) A. R. Safa, R. K. Stern, K. Choi, M. Agresti, I. Tamai, N. D. Mehta, and I. B. Roninson: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7225—7229 (1990).
- (36) E. P. Bruggemann, U. A. Germann, M. M. Gottesman, and I. Pastan: *J. Biol. Chem.*, **264**, 15483—15488 (1989).
- (37) A. Yoshimura, Y. Kuwazuru, T. Sumizawa, M. Ichikawa, S. Ikeda, T. Uda, and S. Akiyama: *J. Biol. Chem.*, **264**, 16282—16291 (1989).
- (38) E. Buschman and P. Gros: *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 595—603 (1991).
- (39) P. Gros, R. Dhir, J. Croop, and F. Talbot: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7289—7293 (1991).
- (40) T. Saeki, A. M. Shimabuku, K. Ueda, and T. Komano: *Biochim. Biophys. Acta*, **1107**, 105—110 (1992).
- (41) A. R. Safa, C. J. Glover, J. L. Sewell, M. N. Meyers, J. L. Biedler, and R. L. Felsted: *J. Biol. Chem.*, **262**, 7884—7888 (1987).
- (42) T. Saeki, A. M. Shimabuku, Y. Azuma, Y. Shibano, T. Komano, and K. Ueda: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1859—1865 (1991).
- (43) H. Hamada and T. Tsuruo: *J. Biol. Chem.*, **263**, 1454—1458 (1988).
- (44) A. M. Shimabuku, T. Saeki, K. Ueda, and T. Komano: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1075—1080 (1991).
- (45) M. Horio, M. M. Gottesman, and I. Pastan: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3580—3584 (1988).
- (46) M. Naito and T. Tsuruo: *Cancer Res.*, **49**, 1452—1455 (1989).
- (47) M. Inaba, H. Kobayashi, Y. Sakurai, and R. K. Johnson: *Cancer Res.*, **39**, 2200—2203 (1979).
- (48) A. M. Shimabuku, T. Nishimoto, K. Ueda, and T. Komano: *J. Biol. Chem.*, **267**, 4308—4311 (1992).
- (49) S. J. Currier, K. Ueda, M. C. Willingham, I. Pastan, and M. M. Gottesman: *J. Biol. Chem.*, **264**, 14376—14381 (1989).
- (50) I. Sugawara, I. Kataoka, Y. Morishita, H. Hamada, T. Tsuruo, S. Itoyama, and S. Mori: *Cancer Res.*, **48**, 1926—1929 (1988).
- (51) F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan, and M. C. Willingham: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7735—7738 (1987).
- (52) F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan, and M. C. Willingham: *J. Histochem. Cytochem.*, **37**, 159—164 (1989).
- (53) M. Horio, K.-V. Chin, S. J. Currier, S. Goldenberg, C. Williams, I. Pastan, M. M. Gottesman, and J. Handler: *J. Biol. Chem.*, **264**, 14880—14884 (1989).
- (54) K. Ueda, N. Okamura, M. Hirai, Y. Tanigawara, T. Saeki, N. Kioka, T. Komano, and R. Hori: *J. Biol. Chem.*, in press.
- (55) I. Sugawara, M. Nakahama, H. Hamada, T. Tsuruo, and S. Mori: *Cancer Res.*, **48**, 4611—4614 (1988).
- (56) R. J. Arceci, J. M. Croop, S. B. Horwitz, and D. Housman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4350—4354 (1988).
- (57) C. A. Axiotis, R. Guarch, M. J. Merino, N. Laporte, and R. D. Neumann: *Lab. Invest.*, **65**, 577—581 (1991).
- (58) X.-D. Qian and W. T. Beck: *J. Biol. Chem.*, **265**, 18753—18756 (1990).
- (59) M. Naito, K. Yusa, and T. Tsuruo: *Bio-*

- chem. Biophys. Res. Commun.*, **158**, 1066—1071 (1989).
- (60) C.-P. H. Yang, S. G. DePinho, L. M. Greenberger, R. J. Arceci, and S. B. Horwitz : *J. Biol. Chem.*, **264**, 782—788 (1989).
- (61) C.-P. H. Yang, D. Cohen, L. M. Greenberger, S. I.-H. Hsu, and S. B. Horwitz : *J. Biol. Chem.*, **265**, 10282—10288 (1990).
- (62) Y. Tanigawara, N. Okamura, M. Hirai, M. Yasuhara, K. Ueda, N. Kioka, T. Komano, and R. Hori : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press.
- (63) R. C. Sharma, S. Inoue, J. Roitelman, R. T. Schimke, and R. D. Simoni : *J. Biol. Chem.*, **267**, 5731—5734 (1992).
- (64) M. Raymond, P. Gros, M. Whiteway, and D. Y. Thomas : *Science*, **256**, 232—234 (1992).
- (65) F. S. Collins : *Science*, **256**, 774—779 (1992).
- (66) M. A. Valverde, M. Diaz, F. V. Sepulveda, D. R. Gill, S. C. Hyde, and C. F. Higgins : *Nature*, **355**, 830—833 (1992).
-