

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790138

研究課題名（和文）エンドサイトーシス抑制によるアドリアマイシン耐性獲得機構の解明

研究課題名（英文）Studies on mechanism of adriamycin resistance induced by inhibition of endocytosis

研究代表者

高橋 勉 (TAKAHASHI TSUTOMU)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00400474

研究成果の概要（和文）：

エンドサイトーシスの抑制によるアドリアマイシン耐性獲得機構を解明するため、欠損することによって、本耐性獲得現象を消失させる遺伝子を酵母の全遺伝子の中から網羅的に検索したところ、細胞内小胞輸送に関わる因子が複数同定された。さらに詳細に検討を行ったところ、小胞体からゴルジ体およびエンドソームを經由して液胞へ蛋白質を運ぶ小胞輸送経路がエンドサイトーシス抑制によるアドリアマイシン耐性において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we found that protein sorting system from endoplasmic reticulum to vacuole plays a key role in the mechanism of adriamycin resistance induced by inhibition of endocytosis

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：制がん剤、エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

がんの化学療法においては、制がん剤の副作用や耐性がん細胞の出現が大きな妨げとなっている。これらの問題を解決するには、制がん剤の毒性発現機構ならびに耐性獲得機構の全容を明らかにする必要がある。本申請者は、真核生物モデルとして生物学的研究に広く利用されている出芽酵母を用いた独創的な制がん剤感受性決定因子のスクリーニング法を確立し、その方法によって、アントラサイクリン系制がん剤であるアドリアマイシンに対する感受性に影響を与える遺伝子を多数同定することに成功した。同定された新規アドリアマイシン耐性因子の一つに、機能未知のプロテインキナーゼ Ak11 がある。本申請者は、Ak11 がエンドサイトーシス制御に関わる複合体の構成蛋白質をリン酸化することによってその複合体の解離を促し、その結果としてエンドサイトーシス経路の初期過程（輸送小胞の形成過程）を抑制し、アドリアマイシン毒性を軽減することを既に明らかにしている。Ak11 のヒトホモログである AAK1 の高発現細胞もアドリアマイシン耐性を示すことが確認されたことから、酵母細胞のみならずヒト細胞においてもリン酸化を介したエンドサイトーシス経路の制御機構がアドリアマイシン耐性獲得機構において重要な役割を果たしていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、我々が見出した新規のアドリアマイシン耐性獲得機構（エンドサイトーシス抑制によるアドリアマイシン耐性獲得機構）の解明を目的として、本耐性獲得機構に関わる細胞内因子の網羅的検索およびその作用機構の解析を行った

3. 研究の方法

(1) エンドサイトーシス抑制によるアドリアマイシン耐性に関わる細胞内因子の検索
出芽酵母の全 6,000 種の遺伝子のうち、生存に必須なものを除く約 4,800 種の遺伝子をそれぞれ欠損させた酵母ライブラリーに、エンドサイトーシスを負に制御するキナーゼである Ak11 の高発現プラスミドを導入し、Ak11 高発現によるアドリアマイシン耐性が認められない遺伝子欠損酵母を検索・同定した。

(2) 酵母のアドリアマイシンに対する感受性試験

酵母を SD 培地で一晚振盪培養後、この培養液を SD 培地で 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 cells/mL になるように希釈し、アドリアマイシン（最終濃度 0 ~ 40 μ M）を含む SD 寒天培地に 5 μ L スポットした (5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 cells/spot)。その後、30°C で 48 時間培養し、観察した。

4. 研究成果

エンドサイトーシスの抑制によるアドリアマイシン耐性獲得機構を解明するため、「欠損することによって、エンドサイトーシスの抑制によるアドリアマイシン耐性獲得現象を消失させる遺伝子」を酵母の全遺伝子の中から網羅的に検索した。その結果、細胞内小胞輸送に関わる因子 (Vam3, Fab1, Gup1) が複数同定された。小胞輸送にはいくつかの経路が存在するので、エンドサイトーシスの抑制によるアドリアマイシン耐性獲得機構に関わる小胞輸送経路について検討したところ、小胞体からゴルジ体への小胞輸送、ゴルジ体からエンドソームへの小胞輸送、エンドソーム内への蛋白質の取り込み、エンドソームから液胞への小胞

輸送に関わる因子をそれぞれ欠損させた酵母では、エンドサイトーシスの抑制によるアドリアマイシン耐性の程度が低下することが明らかとなった。一方、ゴルジ体から細胞膜への小胞輸送、またはゴルジ体から液胞への小胞輸送に関わる因子を欠損させた酵母では、エンドサイトーシスの抑制によるアドリアマイシン耐性が認められた。したがって、エンドサイトーシスの抑制によるアドリアマイシン耐性獲得機構には、小胞体からゴルジ体およびエンドソームを経由して液胞まで蛋白質を運ぶ小胞輸送経路が重要な役割を果たしていると考えられる。また、さらに詳細に検討を行ったところ、エンドサイトーシスの抑制によって小胞体から液胞へ運ばれると考えられる蛋白質は、ユビキチン化修飾を受けるものであり、また、エンドソーム膜上で **Vps27** に捕捉されると共に、**Doa4** によって脱ユビキチン化を受ける蛋白質である可能性が示唆された。出芽酵母のエンドサイトーシス機構や細胞内小胞輸送経路は、酵母からヒトまで広く保存されていることから、本研究結果はヒトのがん細胞におけるアドリアマイシン耐性獲得機構の解明にも繋がると考えられる。小胞輸送系の異常ががんの悪性化や化学療法抵抗性に関与することが報告されており、がん治療の標的として注目されている。本研究によって得られた知見は、新しいアドリアマイシン感受性決定機構の存在を示唆するだけでなく、新たながん化学療法の開発にも貢献できるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Takahashi T. Studies on molecular mechanism of toxicity of anticancer drugs. *Yakugaku Zasshi*, (2011) 131(3), 355-358. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. 深澤ちさと、晴山聖子、廣瀬健一郎、高橋勉、永沼章、酵母でのアドリアマイシン毒性軽減機構における細胞内小胞輸送の役割、第 49 回日本薬学会東北支部大会、平成 22 年 10 月 24 日、郡山市
2. 深澤ちさと、高橋勉、永沼章、Involvement of ER-to-golgi transport pathway in protection against adriamycin toxicity、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日、大阪市
3. 増田拓朗、中島伸吾、高橋勉、永沼章、HMG-CoA synthase 高発現によるアドリアマイシン耐性獲得機構の解析、フォーラム 2010; 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010 年 9 月 9 日、東京 (星薬科大学)
4. 晴山聖子、深澤ちさと、廣瀬健一郎、高橋勉、永沼章、アドリアマイシン毒性軽減機構における脱ユビキチン化酵素 Ubp3 と小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送経路との関係、第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会、2010 年 6 月 16 日、那覇市
5. 高橋勉、制がん剤感受性を規定する遺伝子の同定およびその作用機構の解析、日本薬学会第 130 年会 (シンポジウム)、2010 年 3 月 30 日、岡山市
6. Ken-ishi Hirose, Tsutomu Takahashi, Akira Naganuama, Genome-wide screening for determinants of adriamycin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae.*, 49th Annual

Meeting of the Society of Toxicology,
2010年3月9日、Salt Lake City

7. Tsutomu Takahashi, Ken-ishi Hirose, Akira Naganuama, Role of protein phosphatase type 1 (PP1) in the protective mechanism against toxicity of Adriamycin., 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2010年3月9日、Salt Lake City
8. 廣瀬健一郎、高橋勉、永沼章、Vacuolar protein sorting plays a major role in adriamycin resistance induced by inhibition of early step in endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*., 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日、横浜市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 勉 (TAKAHASHI TSUTOMU)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00400474

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者