

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460339

研究課題名(和文)モデル生物を用いたバルプロ酸新規標的遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identify the novel target molecules of valproic acid using model organism

研究代表者

馬 艶 (Yan, Ma)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70457050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：バルプロ酸(VPA)は、抗てんかん薬として広く用いられている。近年、iPS細胞の作製効率を向上させること、脊髄損傷マウスの治療を促進することが報告されている。VPAの多彩な作用の標的分子の正体は不明である。我々は、分裂酵母モデル生物を用いて、分子遺伝学的研究を進め、以下の結果を得た。VPA超感受性株の原因遺伝子としてVrg4遺伝子を同定できた。その人ホモログは蝸牛様骨盤異形成症である。我々はVrg4がゴルジに局在していた。また、vrg4変異体細胞を用いて多コピー抑圧遺伝子数種類を同定できた。また、VPAで処理した野生細胞では多くの遺伝子の発現は上昇していることをCAGE法にて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Valproic acid (VPA) is widely used as an anticonvulsant drug. More recently, it has been reported that VPA improved the efficiency upon iPS reprogramming and the administration of VPA dramatically enhanced the restoration of hind limb function. The exact target molecules of the various effects of VPA remain unclear. We have developed a genetic approach using *S. pombe* as a model organism. This study led to the following findings. We identified a novel VPA sensitive mutant of *vas4-1/vrg4-v4*, a mutant allele of the *vrg4+* gene encoding *S. pombe* homolog of Golgi GDP-mannose transmembrane transporter, and its mammalian homologue encodes disease responsible gene of cochlear like pelvic dysplasia. We found that Vrg4 localizes to Golgi, and isolated several genes as dosage-dependent suppressors of the VPA-sensitive phenotype of *vrg4-v4* mutant. Furthermore we found the expression level of many genes was markedly increased or decreased upon VPA treatment using cap analysis of gene expression.

研究分野：分子薬理

キーワード：バルプロ酸 分子標的 分裂酵母

### 1. 研究開始当初の背景

バルプロ酸は、抗てんかん薬として広く用いられ、抗がん薬の作用を増強することも知られている。近年、バルプロ酸は iPS 細胞の作製効率を 100 倍以上上昇させることや神経幹細胞移植時にバルプロ酸の投与は脊髄損傷マウスの治癒を促進することが報告されている。このようにバルプロ酸は多彩な作用を示すが、その標的分子が何であるのか、そしてどのような分子メカニズムで働くのかに関してはほとんど不明である。近年我々は、バルプロ酸は HDAC 阻害剤である一方多くの標的分子を有する可能性を明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究は、バルプロ酸の標的分子を生化学、遺伝学および細胞生物学的手法がフルに駆使できる分裂酵母をモデル生物として用いて多様な生命現象におけるバルプロ酸の新規標的分子を同定しようとするものである。同定できた分子は哺乳類まで高度に保存されている場合、ヒトにおけるバルプロ酸標的分子の同定に直結していると期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究は厳密かつ迅速な分子遺伝学的解析が可能な分裂酵母をモデル生物として用いて、バルプロ酸の生体内での標的分子をゲノム薬理的に同定しようと考えている。具体的には下記の方法で研究を行っている。

(1)バルプロ酸超感受性変異体の原因遺伝子の同定と解析:変異遺伝子を同定するために、個々の変異体に多コピー分裂酵母遺伝子ライブラリーを導入し、バルプロ酸感受性を相補する遺伝子を分離する。分離した遺伝子を栄養要求性マーカーとともに染色体に組み込み、変異が起こっている遺伝子と同一かどうかを遺伝学的方法により決定する。引き続き、これら遺伝子の DNA 配列を決定し、分裂酵母データベースをサーチする。同定できた遺伝子特に哺乳類で高度に保存されている且つ機能はほぼ未知の遺伝子を中心に、その機能に関して、主に次の 4 つの方法により解析する。過剰発現及びシングルおよび多重ノックアウト細胞を作成し、表現型および合成効果を調べる。GFP との融合蛋白質を酵母細胞に発現させ、動的に機能する様子を観察する。大腸菌や酵母に発現させた蛋白質を精製し、蛋白質化学的な解析を行う。特に、なぜバルプロ酸感受性を示すのか、バルプロ酸の標的分子なのかを中心に解析する。

(2)多コピー抑圧遺伝子の取得とプルダウンにより、薬物感受性遺伝子と機能的関連をもつ遺伝子の同定と機能解析:酵母遺伝学的手法を駆使し過剰発現により変異体の表現型を相補する多コピー抑圧遺伝子を単離することで、変異遺伝子と機能的に関連する遺伝子が単離、同定できることである。得られたバルプロ酸感受性変異体の中から、その変異

遺伝子がヒトにまで保存されているものを選び、その変異体の多コピー抑圧遺伝子を単離、同定する。

(3)CAGE 解析 バルプロ酸未処理とバルプロ酸 1 時間処理の野生細胞から抽出した mRNA を用いて CAGE(Cap Analysis of Gene Expression)解析を行い、バルプロ酸に应答する遺伝子を網羅的に同定する。また変動は 10 倍以上の遺伝子について RT - PCR にて確認する。その後はメカニズムの解明を試みる。

(1)(2)と(3)の結果を総合して、バルプロ酸の新規標的分子を同定し、その働くメカニズムを解明する。

### 4. 研究成果

バルプロ酸超感受性株の原因遺伝子として Vrg4 遺伝子を同定できた。Vrg4 は Golgi GDP-mannose transmembrane transporter をコードしている。その哺乳類ホモログは出産直後に死亡してしまう「蝸牛様骨盤異形成症」といった骨格異常疾患の原因遺伝子で、小脳体での糖ヌクレオチドの輸送および軟骨でのコンドロイチン硫酸鎖の合成に参与していることが知られている。我々は Vrg4 の細胞内局在を確認したところ、ゴルジに局在していた。Vrg4 遺伝子は必須遺伝子で、この貴重な変異体細胞を用いて多コピー抑圧遺伝子数種類を同定できた。これらの結果は Vrg4 が多くの分子標的を有する可能性を強く示唆している。また、バルプロ酸で処理した野生細胞では多くの遺伝子の発現は上昇していることを CAGE 法にて明らかにした。一部のデータをルシフェラーゼレポーターや qRT-PCR により確認した。現在、転写開始点の決定におけるバルプロ酸の作用とそのメカニズムを解明しているところである。

### 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 9 件)

Genetic Interactions among AMPK Catalytic Subunit Ssp2 and Glycogen Synthase Kinases Gsk3 and Gsk31 in *Schizosaccharomyces pombe*.

Qingyun, Ma Y, Kato T, Furuyashiki T.

査読有,Kobe J Med Sci. 2016, 62(3):E70-8.

Genetic evidence for involvement of membrane trafficking in the action of 5-fluorouracil.

Hu L, Yao F, Ma Y, Liu Q, Chen S, Hayafuji T, Kuno T, Fang Y.

査読有,Fungal Genet Biol. 2016, 93:17-24.

The Loss of Lam2 and Npr2-Npr3 Diminishes

the Vacuolar Localization of Gtr1-Gtr2 and Disinhibits TORC1 Activity in Fission Yeast.

Ma N, Ma Y, Nakashima A, Kikkawa U, Furuyashiki T.

査読有, PLoS One. 2016, 11(5):e0156239.

Tor Signaling Regulates Transcription of Amino Acid Permeases through a GATA Transcription Factor Gaf1 in Fission Yeast.

Ma Y, Ma N, Liu Q, Qi Y, Manabe R, Furuyashiki T.

査読有, PLoS One. 2015, 10(12):e0144677.

Characterization of Tamoxifen as an Antifungal Agent Using the Yeast *Schizosaccharomyces pombe* Model Organism.

Zhang X, Fang Y, Jaiseng W, Hu L, Lu Y, Ma Y, Furuyashiki T.

査読有, Kobe J Med Sci. 2015, 61(2):E54-63.

Constitutive Tor2 Activity Promotes Retention of the Amino Acid Transporter Agp3 at Trans-Golgi/Endosomes in Fission Yeast.

Liu Q, Ma Y, Zhou X, Furuyashiki T.

査読有, PLoS One. 2015, 10(10):e0139045.

Azoles activate Atf1-mediated transcription through MAP kinase pathway for antifungal effects in fission yeast.

Hu L, Fang Y, Hayafuji T, Ma Y, Furuyashiki T.

査読有, Genes Cells. 2015, 20(9):695-705.

The MluI cell cycle box (MCB) motifs, but not damage-responsive elements (DREs), are responsible for the transcriptional induction of the *rhp51<sup>+</sup>* gene in response to DNA replication stress.

Sartagul W, Zhou X, Yamada Y, Ma N, Tanaka K, Furuyashiki T, Ma Y.

査読有, PLoS One. 2014, 9(11):e111936.

E3 ubiquitin ligase Pub1 is implicated in endocytosis of a GPI-anchored protein Ecm33 in fission yeast.

Fang Y, Jaiseng W, Ma Y, Hu L, Yamazaki S, Zhang X, Hayafuji T, Shi L, Kuno T.

査読有, PLoS One. 2014, 9(1):e85238.

〔学会発表〕(計2件)

分裂酵母において TOR は GATA 転写因子を介してアミノ酸輸送体 Isp5 の転写を制御する

馬 艶、馬 寧、劉 慶彬、斉 瑤、古屋敷 智之

第88回日本薬理学会年会, 3月20日(名古屋), 2015

Tor2 activity promotes retention of Agp3 amino acid transporter in trans-Golgi/endosomes in fission yeast

Ma Y, Liu Q, Ma N, Qi Y, Zhou X, Furuyashiki T.

8th International Fission Yeast Meeting, Jun 21-16 (Kobe), 2015

〔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

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/pharma/welcome.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬 艶 (MA, Yan)

神戸大学・医学部附属病院大学院・医員

研究者番号: 70457050

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

研究者番号：

(4)研究協力者