

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19390024

研究課題名（和文） ゲノム創薬をめざした MAP キナーゼシグナルの制御機構の解明

研究課題名（英文） Molecular Genetic Analysis of the MAPK Signaling Pathway

研究代表者

杉浦 麗子 (SUGIURA REIKO)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：90294206

研究成果の概要（和文）：本研究は、分裂酵母モデル生物を用いた独自のゲノム薬理学的手法により、細胞の増殖・がん化に重要な役割をもつ MAPK の制御因子の同定と制御機構の解明を目的とする。本研究の成果として、1) Pmk1 MAPK 抑制因子として、タイプ 2C ホスファターゼである Ptc1, Ptc3, 細胞表面膜タンパク質である Ecm33 を同定した。2) Pmk1 MAPK 標的因子として、転写因子 Atf1, RNA 結合タンパク質 Nrd1 を同定した。3) 上記の MAPK の制御因子群による MAPK のフィードバック制御機構を発見した。4) 新規 MAPK シグナル阻害活性をもつ化合物も同定した。

研究成果の概要（英文）：This project aims to identify regulators of MAPK signaling using fission yeast *S. pombe* as a model organism. We identified negative regulators of Pmk1 MAPK, such as *ptc1*⁺, *ptc3*⁺, encoding PP2Cs, and *ecm33*⁺, encoding a cell surface protein. We also identified targets of Pmk1 including the Atf1 transcription factor and the Nrd1 RNA-binding protein. We also demonstrated feedback mechanisms involving these regulators of Pmk1 MAPK and identified several compounds with potent MAPK inhibitory action.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：細胞内情報伝達、ゲノム薬理

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：MAP キナーゼ、細胞内シグナル伝達、ゲノム創薬、ゲノム薬理、分裂酵母モデル生物、RNA 結合タンパク質、分子遺伝学、タンパク質リン酸化

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の杉浦は、哺乳動物細胞のがん化に関与する MAPK/ERK の分裂酵母ホモログである Pmk1 マップキナーゼ経路を世界に先駆けて同定し、機能解析を行ってきた (*Mol. Cell. Biol.* 1996)。

特に免疫抑制薬の標的分子であるタンパク質脱リン酸化酵素 カルシニューリンと Pmk1 が塩ストレスにおいて拮抗的に働くことを利用した独自の遺伝学的スクリーニングにより、MAP キナーゼの制御因子を数多く同定し、傑出した業績をあげてきた。

このスクリーニングにより、現在までに Pmk1 MAPK の抑制因子として MAPK ホスファターゼ Pmp1 (MKP-1/Dsp1 相当) を同定した (*EMBO J.* 1998, Sugiura *et al.*,)。

さらに Pmk1 の上流で機能する MAPK キナーゼも同定し、マップキナーゼの活性化因子として機能するのみならず、非リン酸化状態ではマップキナーゼシグナルを抑制する<リン酸化依存的なスイッチ分子>としての機能を持つというモデルを提唱した (*Nature* 1999 Sugiura *et al.*,)。

また、同一のスクリーニングにより新規 RNA 結合タンパク質 Rnc1 を同定し、Rnc1 がマップキナーゼホスファターゼの mRNA に結合し、安定化することを証明した。これは RNA 結合タンパク質によってマップキナーゼが制御される世界で最初の報告であり、今後高等生物においても RNA レベルでの MAP キナーゼ抑制のメカニズムを予見し、さらには抗がん薬開発の基礎となる知見である (*Nature* 2003, Sugiura *et al.*,)。

さらに、ファルネシル転移酵素 Cpp1 ならびにその標的分子 Rho2 (高等生物 RhoB ホモログ) を同定し、Rho2 から Pmk1 に至るシグナル経路を明らかにするとともに、Rho を分子標的とする抗がん薬開発の可能性を提唱した (*Mol. Biol. Cell* 2006)。

2. 研究の目的

本研究は、高等生物に極めて近い細胞内情報伝達経路をもつモデル生物である分裂酵母を用いて、細胞の増殖・がん化に重要な役割をもつマップキナーゼ (MAPK) の制御因子の同定と制御機構の解明を目的とする。

申請者の発見した MAP キナーゼである ERK ホモログ、Pmk1 MAPK、さらには申請者が独自に確立した遺伝学的スクリーニングを駆使して、マップキナーゼの活性化と抑制に関わる新しい因子を同定し、その機能解析を通して MAP キナーゼを介するシグナル伝達経路のネットワークを解明することを目的とする。さらに、カルシニューリンとマップキナーゼのクロストークを利用して、マップキナーゼのインヒビターを化合物ライブラリーよりスクリーニングし、ゲノム創薬の基礎となる知見を集積する。

3. 研究の方法

(1) カルシニューリンとの拮抗的な関係を利用した独自の遺伝学的スクリーニングに

より、MAPK シグナルの抑制因子、活性化因子、標的因子を同定する。具体的には、カルシニューリンノックアウト細胞の示す高塩感受性を、過剰発現により回復できる遺伝子、あるいは抑圧変異により回復できる遺伝子群を同定する。

(2) DNA マイクロアレイを用いて、Pmk1 ノックアウトにより発現が変化する遺伝子群の同定と機能解析を行う。

(3) TOF-MS を用いた MAP キナーゼ標的分子の同定を行うことによりマップキナーゼの制御に関わる分子を同定し、その制御のメカニズムを分子レベルで明らかにするとともに、マップキナーゼの標的分子を同定することでマップキナーゼを介するシグナル伝達経路の全容を解明する。

(4) カルシニューリンと MAP キナーゼの拮抗的な関係を利用した独自のゲノム薬理学的アプローチにより、MAPK シグナルの阻害活性を有する化合物を探索する。

4. 研究成果

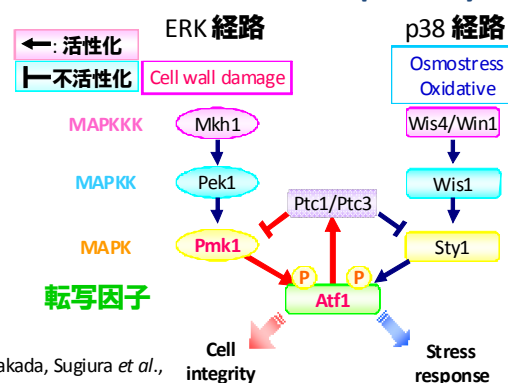
(1) Pmk1 MAPK 抑制因子としてのタイプ 2C プロテインホスファターゼである Ptc1, Ptc3 の同定。

上記 (1) の遺伝学的スクリーニングにより PP2C ファミリーである Ptc1, Ptc3 を同定し、これらの脱リン酸化酵素が p38 MAPK に加えて、Pmk1 MAPK シグナルをネガティブフィードバック制御することを証明した (下図参照)。

さらに、PP2C の遺伝子発現を制御する転写因子である Atf1 (ATF2 ホモログ) が、Pmk1 MAPK により直接にリン酸化され、転写活性が制御されることを発見した (下図参照)。

これらの成果は、転写因子 Atf1 を介する、ストレス応答 p38 MAPK シグナルと、ERK MAPK のホモログである細胞統御 Pmk1 MAPK シグナルの新しいクロストーク機構を提唱するものである (下図)。

Atf1 is a novel downstream component of the Pmk1 MAPK pathway



Takada, Sugiura *et al.*,
Mol. Biol. Cell, 2007

図 1 Ptc1, Ptc3 による MAPK シグナルのフィードバック制御

(2) DNA マイクロアレイを用いた Pmk1/Atf1 シグナルの転写標的 Ecm33 の同定と、in vivo real-time MAPK シグナルモニタリングシステムの確立。

上記で述べたように、申請者は Pmk1 MAPK の新たな下流因子として転写因子 Atf1 を同定した。そこで、研究方法(2)に記載した手法を用いて、Pmk1/Atf1 の転写標的を同定するために、DNA マイクロアレイを行った。具体的には、Pmk1/Atf1 ノックアウトにより遺伝子発現が顕著に減少する遺伝子群の中で、Ecm33 に焦点をあてた解析を行った。

その結果、Ecm33 は転写因子 Atf1 と MEF2 ホモログである Mbx1 によって調節されるプロモーター領域を有することを見出し、それぞれの転写因子のコンセンサス配列とルシフェラーゼを融合したレポーター構築を作成し、正常細胞ならびに、転写因子群のノックアウト細胞で解析を行った。その結果、Ecm33 の遺伝子発現は、この二つの転写因子に依存することが明らかになった。

さらに、Atf1 は、Pmk1 MAPK と Sty1 MAPK シグナルによりその活性が制御されること、Mbx1 は Pmk1 MAPK によりその活性が調節されることから、これらのレポーター構築は、MAPK シグナルの活性をも反映していることが証明できた (図2)。

すなわち、MAPK シグナルを測定するアッセイ系として、不安定型ルシフェラーゼ (Luc) によるレポーターを構築し (CRE-Luc)、このレポーターが MAPK の活性を極めて鋭敏にリアルタイムに反応することを証明し、MAPK 活性測定と、抗がん薬の探索法を確立した (Mol. Bio. Cell 2006, 2010, JBC 2010, 特許出願 2010:業績 9)。

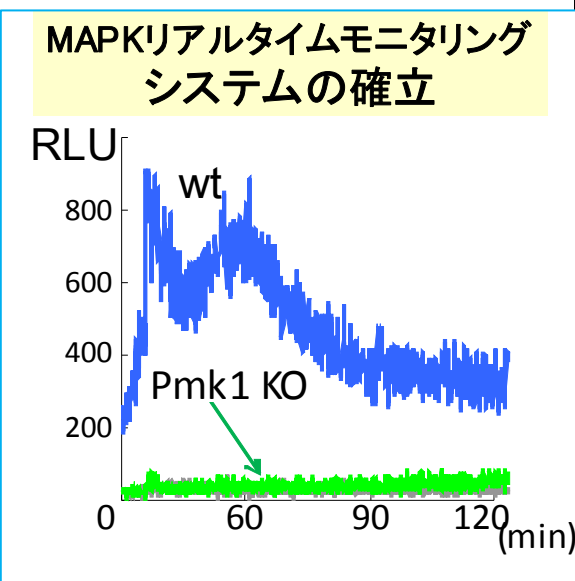


図2 Pmk1 MAPKのリアルタイムモニタリングシステムの確立

(3) 細胞膜表面タンパク質Ecm33によるCa²⁺ホメオスタシスの調節を介したMAPKシグナル抑制メカニズムの発見。

さらに、申請者らは、Ecm33 が Pmk1 MAPK シグナルを抑制することを見出し、そのメカニズムを解析した。Ecm33 KO 細胞が、Ca²⁺感受性を示すことに着目し、Ecm33 過剰発現、ならびに ecm33 KO 細胞の細胞内 Ca²⁺濃度を測定した結果、Ecm33 が細胞内 Ca²⁺濃度を負に制御すること、さらにこれらの現象が MAPK シグナルの活性化と密接にリンクしていることを見出した。すなわち図3に示すように、Ecm33 は細胞内 Ca²⁺ホメオスタシスの調節を介して MAP キナーゼシグナルの制御に関わるというメカニズムを見出した (Mol. Bio. Cell 2010)。

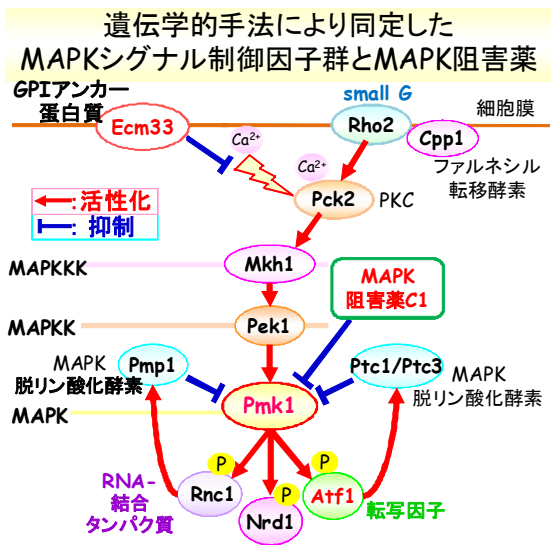


図3 遺伝学的手法により同定した MAPK シグナル制御因子群と MAPK 阻害化合物

(4) MAPK シグナル阻害活性化化合物の同定。

代表者が独自に考案したカルシニューリンとMAPKの拮抗的な関係を利用したゲノム薬理学的手法を用いて、MAPKシグナルを阻害する化合物を天然物ライブラリーからスクリーニングし、生理活性物質の分離と構造同定に成功した。今後この化合物のターゲット、作用するシグナル伝達経路を分子レベルで明らかにすることにより、高等生物の抗がん活性を有する分子標的治療薬創製における重要な知見が得られると考えられる。

さらに、高等生物のマップキナーゼ阻害薬が本スクリーニングにおいてもポジティブ化合物として同定されたこと、申請者が本スクリーニングにおいて既に同定した化合物が高等生物のERKの活性を特異的に抑制し、各種癌細胞の増殖を抑制することを証明した (Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009) (特許出願 2008)。また、前述のMAPKリアルタイムモニタリングシステム(図2)を活用して抗がん剤の探索と解析システムを確立した。

(5) Pmk1 MAPK の新たな標的としての RNA 結合タンパク質 Nrd1 の発見。

さらに申請者らは、独自の遺伝学的スクリーニングにより、mRNA 結合タンパク質 Nrd1 を同定し、従来提唱されていた減数分裂における役割に加えて、細胞質分裂における働きを発見した。

具体的には、Nrd1 が、細胞質分裂の鍵となるミオシン軽鎖である Cdc4 mRNA と結合し、安定化することにより、細胞質分裂を制御するというメカニズムを発見した。

興味深いことに、Nrd1 は高等生物の TIA-1 と高い相同性を示し、TIA-1 のコンセンサス配列が Cdc4 ORF 内に存在した。そこで、このコンセンサス配列に変異を導入した Cdc4 mRNA を作成したところ、Nrd1 と Cdc4 mRNA の結合が低下し、Cdc4 mRNA が不安定になることが証明できた。

さらに、染色体上の TIA-1/Nrd1 結合配列に変異を導入した Cdc4 変異細胞を作成したところ、細胞質分裂の異常が観察されたことから、Nrd1 と Cdc4 mRNA の結合が低下することが Cdc4 mRNA の不安定性を引き起こし、細胞質分裂の異常をもたらしたことが明らかになった。

さらに興味深いことに、Nrd1 は Pmk1 MAPK によりリン酸化されること、そして Pmk1 MAPK によってリン酸化された Nrd1 は Cdc4 mRNA との結合能力が低下することが証明できた。すなわち、Nrd1 は MAPK シグナルを介してミオシン mRNA の安定性を調節することにより、細胞質分裂に関わる全く新しい制御因子であることが明らかになった (図 4)。

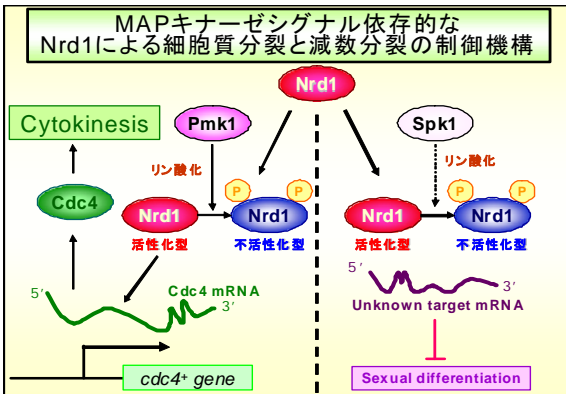


図 4 MAPK シグナル依存的な Nrd1 による細胞運命制御機構

さらに、Pmk1 MAPK の活性は細胞周期依存的に変動する。そこで、Nrd1 のリン酸化、そしてそれに伴う Cdc4 mRNA の安定性も細胞周期依存的な変動を示すのではないかと考え、同調培養を行い、これらの要素を計測した。

その結果、予想通りに、Pmk1 MAPK は G1 期に活性化のピークを迎え、Nrd1 のリン酸化は S 期にピークを迎えることが明らかとなった。一方、Cdc4 mRNA のピークは M 期にあり、S

期には最も mRNA 量が低下することが明らかになった。すなわち、Cdc4 mRNA 量は Nrd1 のリン酸化がピークを迎える時期に最も低く、逆に Nrd1 のリン酸化レベルが極めて低い M 期に Cdc4 mRNA がピークを迎えることがわかった (図 5)。

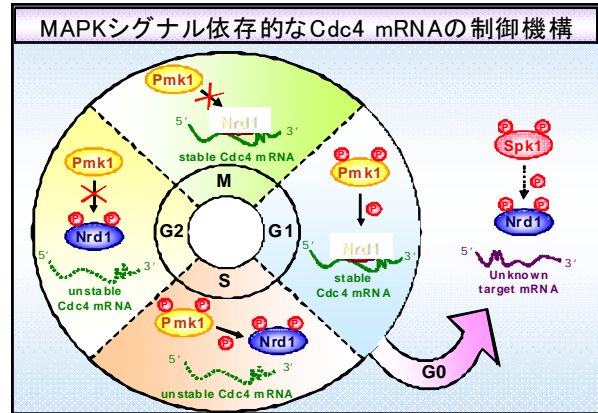


図 5 MAPK シグナルはミオシン mRNA の発現を細胞周期依存的に制御する。

これらの結果は、MAPK シグナルという高度に保存された細胞内シグナル伝達システムが、ミオシンという細胞質分裂の鍵因子を mRNA レベルで調節するという全く新しい制御機構を提唱するとともに、RNA 結合タンパク質 Nrd1 が MAPK によるリン酸化依存的に細胞質分裂と減数分裂という二つの細胞運命に関わる可能性を示唆する重要な発見であると考えられる。

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 82 件)

- ① Role of RNA-Binding Proteins in MAPK Signal Transduction Pathway
Reiko Sugiura, Ryosuke Satoh, Shunji Ishiwata, Nanae Umeda, Ayako Kita
Journal of Signal Transduction, 2011; 2011:109746 査読有
- ② Role of the Small GTPase Rho3 in Golgi/Endosome Trafficking through Functional Interaction with Adaptin in Fission Yeast
Ayako Kita, Cuifang Li, Yang Yu, Nanae Umeda, Akira Doi, Mitsuko Yasuda, Shunji Ishiwata, Atsushi Taga, Yoshihiro Horiuchi, Reiko Sugiura
PLoS ONE, 2011; 6(2):e16842 査読有
- ③ In vitro assay of the interaction between Rnc1 protein and Pmp1 mRNA by affinity capillary electrophoresis with a carboxylated capillary
Atsushi Taga, Ryosuke Satoh, Shunji Ishiwata, Shunji Kodama, Atsushi Sato, Kentaro Suzuki, Reiko Sugiura

- Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 53 (2010) 1332-1337 査読有
- ④ MAPKKK-dependent and -independent activation of Sty1 stress MAPK in fission yeast
Xin Zhou, Yan Ma, Reiko Sugiura, Daiki Kobayashi, Masahiro Suzuki, Lu Deng, Takayoshi Kuno
J. Biol. Chem. 2010; 285(43):32818-32823 査読有
- ⑤ Isolation of a fission yeast mutant that is sensitive to valproic acid and defective in the gene encoding Ric1, a putative component of Ypt/Rab-specific GEF for Ryl1 GTPase.
Yan Ma, Reiko Sugiura, Lili Zhang, Xin Zhou, Mai Takeuchi, Yi He, Takayoshi Kuno
Mol. Genet. Genomics, 2010; 284(3):161-171. 査読有
- ⑥ The Cell Surface Protein Gene *ecm33⁺* Is a Target of the Two Transcription Factors Atf1 and Mbx1 and Negatively Regulates Pmk1 MAPK Cell Integrity Signaling in Fission Yeast.
Hirohumi Takada, Aiko Nishida, Mitsuhiro Domae, Ayako Kita, Yuki Yamano, Atsushi Uchida, Shunji Ishiwata, Yue Fang, Xin Zhou, Takashi Masuko, Mitsuhiro Kinoshita, Kazuaki Kakehi, Reiko Sugiura.
Mol. Biol. Cell. 2010;21(4):674-85. 査読有
- ⑦ Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast.
Yan Ma, Mai Takeuchi, Reiko Sugiura, Susie O. Sio, and Takayoshi Kuno
Genes Cells, 2009; 14: 1015-1028. 査読有
The Role of the RNA-Binding Protein Nrd1 and Pmk1 MAPK in the Regulation of Myosin mRNA Stability in Fission Yeast
Ryosuke Satoh, Takahiro Morita, Hirofumi Takada, Ayako Kita, Shunji Ishiwata, Akira Doi, Kanako Hagihara, Atsushi Taga, Yasuhiro Matsumura, Hideki Tohda, Reiko Sugiura.
Mol. Biol. Cell. 2009. 20(9): 2473-2485. 査読有
- ⑧ Pleiotropic phenotypes caused by an opal nonsense mutation in an essential gene encoding HMG-CoA reductase in fission yeast
Yue Fang, Kiwamu Imagawa, Xin Zhou, Ayako Kita, Reiko Sugiura, Wurentuya Jaiseng, Takayoshi Kuno
Genes to Cells, 2009; 14: 759 - 771. 査読有
- ⑨ Cation Diffusion Facilitator Cis4 is Implicated in Golgi Membrane Trafficking via Regulating Zinc Homeostasis in Fission Yeast.
Yue Fang, Reiko Sugiura, Yan Ma, Tomoko Yada-Matsushima, Hirotsu Umeno, Takayoshi Kuno
Mol. Biol. Cell, 2008, 19(4): 1295 - 1303. 査読有
- ⑩ Atf1 Is a Target of the MAP Kinase Pmk1 and Regulates Cell Integrity in Fission Yeast.
Hirofumi Takada, Masayuki Nishimura, Yuta Asayama, Yoshiaki Mannse, Shunji Ishiwata, Ayako Kita, Akira Doi, Aiko Nishida, Naoyuki Kai, Sayako Moriuchi, Hideki Tohda, Yuko Giga-Hama, Takayoshi Kuno, Reiko Sugiura.
Mol. Biol. Cell, 2007 18(12):4794-4802. 査読有
- ⑪ Wobble inosine tRNA modification is essential to cell cycle progression in G1/S and G2/M transitions in fission yeast.
Satoshi Tsutsumi, Reiko Sugiura, Yan Ma, Hideki Tokuoka, Kazuki Ohta, Rieko Ohte, Akiko Noma, Tsutomu Suzuki, Takayoshi Kuno.
J. Biol. Chem. 2007 282(46):33459-33465 査読有
- ⑫ Essential roles of class E Vps proteins for sorting into multivesicular bodies in *Schizosaccharomyces pombe*.
Tomo Iwaki, Masayuki Onishi, Masaru Ikeuchi, Ayako Kita, Reiko Sugiura, Yuko Giga-Hama, Yasuhisa Fukui, Kaoru Takegawa.
Microbiology 153, 2753-2764 (2007) 査読有
- ⑬ Six new amino acid-auxotrophic markers for targeted gene integration and disruption in fission yeast.
Yan Ma, Reiko Sugiura, Mariko Saito, Atsushi Koike, Susie Ong Sio, Yasuko Fujita, Kaoru Takegawa and Takayoshi Kuno.
Curr. Genet., 2007; 52(2): 97-105. 査読有
- ⑭ Valproic Acid Affects Membrane Trafficking And Cell Wall Integrity in Fission Yeast.
Makoto Miyatake, Takayoshi Kuno, Ayako Kita, Kosaku Katsura, Kaoru Takegawa, Satoshi Uno, Toshiya Nabata, Reiko Sugiura
Genetics, 2007 175: 1695 - 1705. 査読有
- 他 68 件
〔学会発表〕 (計 292 件)
- ① A Powerful Genetic Strategy to Screen for Inhibitors of MAP kinase Signalling and Its Application to Genomic Drug Discovery
Reiko Sugiura

- 1st International Symposium on Carcinogenic Spiral & 9th International Conference on Protein Phosphatase February 1-3, 2011 Tokyo
- ② RNA-BINDING PROTEINS AS REGULATORS OF MAPK SIGNALING
Reiko Sugiura
The Fifth International Fission Yeast Meeting Pombe 2009 Tokyo 26-31 October 2009
- ③ Molecular genetic approach to identify regulators of MAPK signaling
Reiko Sugiura
IMC9 THE BIOLOGY OF FUNGI 1-6 August 2010 (Edinburgh, UK)
- ④ RNA を介する MAP キナーゼシグナルの新たな制御機構と創薬への展望
杉浦麗子
日本薬学会第 130 年会 3 月 28 日～30 日 (岡山), 2010
- ⑤ RNA-BINDING PROTEINS AS REGULATORS OF MAPK SIGNALING
Reiko Sugiura
The 5th International Fission Yeast Meeting (Pombe 2009), October 26-31, 2009, Tokyo, Japan
- ⑥ MAP キナーゼシグナル伝達による mRNA 結合タンパク質の制御
杉浦麗子
第 82 回日本生化学会大会 10 月 21 日～24 日 (神戸), 2009
- ⑦ Molecular Genetic Analysis of the Calcineurin-mediated Signaling Pathways
Reiko Sugiura
8th International Conference on Protein Phosphatases, Maebashi, 12-14 Nov. 2008
他 287 件
- [図書] (計 6 件)
WELCOME TO ゲノムワールド ゲノム創薬科学最前線
杉浦麗子編著
京都廣川書店, 2009 年, 総ページ 264
Sourcebook of Models for Biomedical Research
Shunji Ishiwata, Takayoshi Kuno, Hirofumi Takada, Atsushi Koike, Reiko Sugiura,
Humana Press Inc., 2008, 439-44
他 4 件
- [産業財産権]
○出願状況 (計 18 件)
名称: mRNA 発現を指標にした MAP キナーゼシグナリングのリアルタイム測定法の開発と抗がん剤探索法
発明者: 杉浦麗子、高田宏文、石渡俊二、喜多綾子
権利者: 学校法人近畿大学
種類: 特許・特願
番号: 2009-207005

出願年月日: 2010 年 7 月 16 日
国内外の別: 出願

名称: キャピラリー電気泳動による核酸-タンパク質の結合解析法
発明者: 杉浦麗子、多賀淳、石渡俊二、佐藤亮介
権利者: 学校法人近畿大学
種類: 特許・特願
番号: 2009-207005
出願年月日: 2009 年 9 月 8 日
国内外の別: 出願

名称: キャビコール類縁体化合物、キャビコール類縁体化合物の製造方法、および MAP キナーゼシグナル伝達阻害薬
発明者: 杉浦麗子、萬瀬貴昭、村岡修、吉川雅之、安原智久
権利者: 学校法人近畿大学、株式会社ダイアベティム
種類: 特許・特願
番号: 2008-33133
出願年月日: 2008 年 2 月 14 日
国内外の別: 出願
他 15 件

○取得状況 (計 2 件)
名称: 容器用封止具
発明者: 石渡俊二、多賀淳、藤田秀樹、西田升三、喜多綾子、杉浦麗子
権利者: 学校法人近畿大学
種類: 意匠
番号: 登録第 1393220 号
取得年月日: 2010 年 6 月 25 日
国内外の別: 国内
他 1 件
〔その他〕
ホームページ等
<http://www.phar.kindai.ac.jp/genome/>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
杉浦 麗子 (SUGIURA REIKO)
近畿大学・薬学部・教授
研究者番号: 90294206
- (2) 研究分担者
喜多 綾子 (KITA AYAKO)
近畿大学・薬学部・助教
研究者番号: 00388498
掛樋 一晃 (KAKEHI KAZUAKI)
近畿大学・薬学部・教授
研究者番号: 30101405
村岡 修 (MURAOKA OSAMU)
近畿大学・薬学部・教授
研究者番号: 20142599