

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790241

研究課題名（和文）モデル生物を用いた膜輸送系におけるバルプロ酸標的分子の同定

研究課題名（英文）Identification of Molecular Targets for Valproic Acid in Membrane Transport System Using Fission Yeast Model Organism

研究代表者

馬 艶 (MA YAN)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70457050

研究成果の概要（和文）：

バルプロ酸は、抗てんかん薬として広く用いられる。近年、抗がん薬の作用を増強すること、iPS 細胞の作製効率を上昇させること、また脊髄損傷マウスへの神経幹細胞移植の効果を増強することが報告されている。我々は、多彩な作用を示すバルプロ酸の標的分子が何であるのか、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。分裂酵母モデル生物として、バルプロ酸の標的分子同定を行った。バルプロ酸は細胞内輸送に深く関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Valproic acid (VPA) is widely used as an anticonvulsant. More recently, it has been reported that VPA reinforces action of the anticancer drug, improves the reprogramming efficiency in the induction of pluripotent stem cells, and dramatically enhances the restoration of hind limb function after transplantation of neural stem cells. The exact mechanisms of action of VPA in these conditions remain unclear, although it has been shown to alter a wide variety of signaling pathways. To gain further insights into the molecular mechanisms of drug action, we have developed a genetic screen for mutants that show hypersensitivity to VPA in fission yeast. We found that VPA is involved in intracellular membrane trafficking.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：(1)バルプロ酸 (2)薬物感受性 (3)薬物耐性 (4)細胞内輸送  
(5)モデル生物

### 1. 研究開始当初の背景

バルプロ酸は、抗てんかん薬、抗躁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、iPS 細胞の作成過程でバルプロ酸を加えると、作製効率が 100 倍以上上昇すること、また、神経幹細胞移植とバルプロ酸の同時投与による脊髄損傷マウスの治癒が報告されている。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。酵母をモデル生物として用いる分子遺伝学的研究は、発癌、細胞死などの分子機構の解明において、常に先駆的な結果をもたらし、抗がん薬の標的分子の同定やメカニズムの解明においても、多くの研究成果があるが、酵母をバルプロ酸の分子標的研究に応用した例はこれまで皆無である。

### 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同定しようとするものである。私たちはバルプロ酸が治療低濃度で分裂酵母の細胞内膜輸送系を阻害することを明らかにした。分裂酵母の細胞内膜輸送系で働く分子は、ほぼ完全に哺乳動物の細胞内膜輸送系でも保存されているので、分裂酵母におけるバルプロ酸の膜輸送系標的分子の同定は、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。一方、細胞内膜輸送系は細胞のがん化や遺伝子発現において重要な働きをしているが、その分子メカニズムにも多くの重要な問題が未解決のまま残っている。本研究は、分裂酵母細胞内膜輸送系におけるバルプロ酸の標的分子の同定及び作用メカニズムの全貌解明を行うことで、細胞内膜輸送を制御する分子機構の解明、効果的ながん治療法の開発、高効率細胞初期化法の確立に役立つことをめざしている。

### 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。そのステラテジーは図 1 で示している。具体的には下記の方法で行っている。

(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：バルプロ酸超感受性変異体の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。機能未知の遺伝子を中心に、主に次の 4 つの方法により解析する。①過剰発現及びシングルおよび多重 KO 細胞を作成し、表現型および合成効果を調べる。②緑色蛍光タンパク質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。③大腸菌や酵母に発現させた蛋白質を精製し、蛋白化学的な解析を行う。④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。

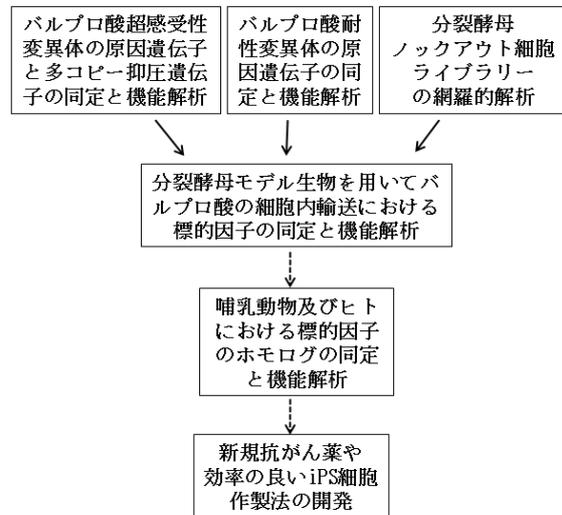


図 1 研究のステラテジー

(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：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(バルプロ酸感受性を回復できるが原因遺伝子ほどではない遺伝子)を単離、同定する。また、プルダウンと質量分析に基づくプロテオーム解析により、原因遺伝子によるコードされるタンパク質と結合するタンパク質を探索する。同定できた遺伝子との機能的な関連を主に上記の方法により解析する。

(3). 分裂酵母ノックアウトライブラリーの細胞を網羅的に解析する：分裂酵母のほぼすべての非必須遺伝子のノックアウト細胞ライブラリーを既に入手したので、これらの細胞をバルプロ酸含有プレートにストリークし、超感受性またはバルプロ酸耐性の細胞をスクリーニングする。特に細胞内輸送、細胞増殖、細胞周期やシグナル伝達経路に関連する遺伝子に着目して解析する。

(4). バルプロ酸耐性変異体の遺伝子及び機

能的に関連する因子の同定と解析)：これまでの研究において、過剰発現により野生細胞にVPA耐性を付与する遺伝子の同定を試みたが、単離できなかった。一方、ニトロソグアニジン処理した変異細胞ライブラリーをスクリーニングした結果、野生細胞が生育できない15mM~20mMバルプロ酸培地で生育できるバルプロ酸耐性変異体を6個同定できた。耐性以外の表現型が認められない場合、原因遺伝子の同定については(1)と同様な手法ではとても難しいので、次世代シケンサーを用いた全ゲノム解析によって原因遺伝子の同定を試みる。機能解析については(1)と同様な手法を進める。

(1)、(2)、(3)と(4)でえられた結果を総合して、バルプロ酸の細胞内膜輸送系における標的分子を同定し、その働くメカニズムを解明する。

(5) 哺乳動物細胞における相同遺伝子の解析：分裂酵母での機能解析と平行して、哺乳動物培養細胞系での機能解析を試みる。具体的には同定できた遺伝子は哺乳動物細胞において高度に保存された遺伝子であり、これらの遺伝子をRNAiによりノックダウンし、種々の細胞内膜輸送系に与える影響を調べる。また、上記細胞系におけるバルプロ酸の効果を検討し、実際に候補遺伝子産物がバルプロ酸の標的分子であることを確認する。

#### 4. 研究成果

(1) 分裂酵母ヘテロアダプチン複合体の四つのサブユニットをコードする遺伝子を破壊して表現型を比較した。興味深いことに、ミューサブユニットとシグマサブユニットの単独ノックアウト細胞は異なる感受性を、ミューサブユニットとベータサブユニットの単独ノックアウト細胞は同程度、シグマサブユニットとガンマサブユニットの単独ノックアウト細胞は同程度の薬物感受性を示した。また、シグマサブユニットとガンマサブユニットのダブルノックアウト細胞は親細胞と同程度の薬物感受性を示し、シグマサブユニットとベータサブユニットのダブルノックアウト細胞は親細胞より強い同程度の薬物感受性を示している。さらに、プルダウン実験により、シグマサブユニットとガンマサブユニットの結合はミューサブユニットとベータサブユニットを介せず、ミューサブユニットとベータサブユニットの結合はシグマサブユニットとガンマサブユニットを介さないことを明らかにした。サブユニットによって作られるヘミコンプレックスの存在は知られていたが、その生理機能は全く不明だった。本研究はアダプチン・ヘミコンプレックスの生理機能を初めて示した報告である。

(2) バルプロ酸感受性変異体を解析した結果、グアニンヌクレオチド交換因子として働くRic1を同定した。この変異体の表現型を詳細に解析したところ、Rabファミリーの低分子量G蛋白であるRyh1のノックアウト細胞と非常に類似してことが分かった。またRyh1の過剰発現はRic1ノックアウト細胞の表現型を部分的に回復でき、Ric1ノックアウト細胞において野生型と恒常活性型Ryh1はゴルジ・エンドソームへ局在できなくなることを見つけた。これにより、Ric1はRyh1のグアニンヌクレオチド交換因子として働くことを明らかにした。本変異体の高温感受性を相補する遺伝子としてセリン/スレオニンキナーゼをコードする遺伝子を単離した。さらに、Ric1の活性が本キナーゼにより制御されていることを明らかにした。この論文は生物医学系の学術研究に対する国際的な評価システム(Faculty of 1000 Biology)により高く評価された。

(3) ノックアウト細胞ライブラリーを用いて、バルプロ超感受性と耐性変異体のシステムティックに取得と解析：今年度、分裂酵母のほぼすべての非必須遺伝子のノックアウト細胞ライブラリーが入手できたので、これらの細胞をバルプロ含有プレートにストリークし、バルプロ超感受性または耐性の細胞をスクリーニングした。現在詳細の結果を確認しているところである。今後さらなる解析を行う予定である

#### 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3件)

① MAPKKK-dependent and -independent activation of Styl stress MAPK in fission yeast.

Xin Zhou, Yan Ma, Reiko Sugiura, Daiki Kobayashi, Masahiro Suzuki, Lu Deng, and Takayoshi Kuno

査読有, J. Biol. Chem. 2010; 285: 32818 - 32823.

② 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 Ryh1 GTPase.

Yan Ma, Reiko Sugiura, Lili Zhang, Xin Zhou,

Mai Takeuchi, Yi He, and Takayoshi Kuno

査読有, Mol. Genet. Genomics, 2010; 284(3):161-171.

③ 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  
査読有, Genes Cells, 2009; 14: 1015-1028.

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔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・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70457050

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

久野 高義 (KUNO TAKAYOSHI)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50144564