

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590268

研究課題名（和文）免疫抑制薬の副作用発現に關与する遺伝子の同定と機能解析

研究課題名（英文） Genomic analysis of immunosuppressant effect-related genes using fission yeast as a model system

研究代表者

春藤 久人（SHUNTOH HISATO）

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：70206259

研究成果の概要（和文）：

カルシニューリンは免疫抑制薬の標的である。免疫抑制薬の副作用発現に關与する遺伝子の同定を目的として分裂酵母免疫抑制薬感受性変異体の機能解析を行い、カルシニューリンが細胞内輸送、細胞質分裂、細胞形態形成などのアクチン細胞骨格の再編成に關与することが示唆された。アクチン細胞骨格制御因子である Wiskott-Aldrich 症候群の原因遺伝子の分裂酵母ホモログ遺伝子の変異体が免疫抑制薬感受性であることを見出した。免疫抑制薬感受性変異体の原因遺伝子の解析から、細胞内輸送系の異常が免疫抑制薬の副作用発現に關与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Calcineurin is a target of immunosuppressive drugs. We reported that calcineurin is implicated in membrane trafficking, cytokinesis, and cell morphogenesis, in which reorganization of actin cytoskeleton is involved, by screening and analysis of immunosuppressant-sensitive mutants in fission yeast. *wsp1* gene encodes a fission yeast Wiskott-Aldrich syndrome protein homolog, which plays a key role in integrating reorganization of action cytoskeleton. *wsp1* null cells were immunosuppressant-sensitive. Analysis of immunosuppressant-sensitive mutants suggested that immunosuppressant side effect may be attributable to abnormality in membrane trafficking.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
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：基礎医学・薬理学一般

キーワード：受容体・チャネル・輸送系・シグナル情報伝達系

## 1. 研究開始当初の背景

免疫抑制薬は移植医療に必須の薬物であり、遺伝的要因による副作用の出現を予測することは、投与の適否を決定する際に非常に重

要であるが、今のところ、手がかりとなるようなゲノム薬理的な情報は皆無である。カルシニューリンはシクロスポリンやタクロリムスなどの免疫抑制薬の標的分子であり、

分裂酵母でも免疫抑制薬の投与はカルシニューリン遺伝子破壊と同様の効果を示す。分裂酵母のカルシニューリンは、免疫抑制薬によりその機能を抑制しても細胞増殖には影響がない。細胞増殖に活性型カルシニューリン遺伝子の存在を必須とする分裂酵母変異株、即ち免疫抑制薬感受性変異株のスクリーニングを行ったところ、当初の予測を超えるほど多数得たことが本研究課題の着想の出発点である。非常に多くの遺伝子座位における変異が免疫抑制薬感受性を示したことは予想外であった。分裂酵母野生株が免疫抑制薬に非感受性であることを考えると、この事実は非常に多くの遺伝子がカルシニューリンと機能的に関連する事を示唆すると共に、ヒトにおいてもこれらの変異遺伝子と相同な遺伝子に何らかの異常が生じた場合は免疫抑制薬投与により重大な副作用が発生する可能性を示唆している。

研究代表者は、カルシニューリンと機能的に関連する遺伝子を同定する目的で、免疫抑制薬の存在下で致死となる酵母変異体を20数種類、単離し、そのうちの10種類については、変異遺伝子の同定および解析結果を既に報告している。これらの変異遺伝子産物のホモログのほとんどのものがヒトゲノム上にも存在しており、ヒトにおいてもこれらの遺伝子産物は生体にとって必須の機能をカルシニューリンと分かち合っているものと考えられる。従って、分裂酵母での結果から、これらのヒト相同遺伝子に変異がある場合、あるいはその遺伝子産物の機能が薬物によって抑制されている条件下では、免疫抑制薬の投与により、カルシニューリンの機能が抑制されると、予測不可能な重篤な副作用を引き起こされる可能性が高いと考えられる。分裂酵母は細胞周期、シグナル伝達系などの研究におけるモデル生物として多用されているが、モデル生物を用いて、副作用を引き起こす原因遺伝子の同定を行っている研究は他に例を見ない。

## 2. 研究の目的

薬物の重篤な副作用が特定の遺伝子変異により出現することがあるが、一部の例を除いて、副作用の原因となる遺伝子の同定や副作用発現に至る分子メカニズムは殆ど明らかにされていない。本研究は、分子遺伝学および分子生物学的解析が駆使できるモデル生物である分裂酵母を用いて免疫抑制薬の副作用発現に関する原因遺伝子を同定し、その分子メカニズムを解明することを目的としている。

(1) モデル生物である分裂酵母を用いて免疫抑制薬の副作用発現に関する原因遺伝子を同定しそのメカニズムを明らかにする。

(2) 免疫抑制薬の標的であるカルシニューリンが分裂酵母にも存在する点に着目して、

免疫抑制薬感受性変異体を取得する。その原因遺伝子を同定し、その遺伝子産物の機能解析により副作用発現のメカニズムを明らかにする。

(3) 複数の免疫抑制薬感受性変異体の原因遺伝子の相互作用を解析することにより、カルシニューリンのシグナル伝達系ネットワークを明らかにする。

## 3. 研究の方法

研究目的達成のために、すでに単離している免疫抑制薬感受性変異体について、その変異遺伝子の同定と遺伝子機能の解析を行うと同時に、さらに免疫抑制薬感受性変異体の網羅的単離と同定を行う。

(1) 免疫抑制薬感受性変異体の変異遺伝子の同定：タクロリムス感受性相補能を指標にした免疫抑制薬感受性遺伝子座位の同定：これまでの遺伝学的実験により、少なくとも20種の異なる免疫抑制薬感受性遺伝子座位が明らかにされている。これらのうちの約10種類についてはすでに変異遺伝子の機能解析の結果を報告している。さらに、残りの変異体の変異遺伝子を同定するために、個々の酵母変異株に多コピー分裂酵母遺伝子ライブラリーを導入する。このトランスフォーマントをタクロリムスを含むプレートにレプリカし、このプレート上で生育可能なコロニー、すなわち、変異体のタクロリムス感受性が相補されたコロニーを単離する。この相補能がプラスミド上の遺伝子に依存していることを確認した後、プラスミドを分離する。分離した遺伝子と変異が起きている遺伝子が同一かどうかを遺伝学的方法により決定する(インテグレーションマッピング法)。引き続き、これらの遺伝子のDNA配列を決定し、遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を推測し、各種データベースをサーチする。

(2) 免疫抑制薬感受性を与える遺伝子産物の機能解析：単離した遺伝子産物の機能を明らかにする目的で、以下の実験を行う。

遺伝子破壊：分離された遺伝子のゲノム上のopen reading frameをマーカー遺伝子で置換えて、遺伝子破壊体を作製する。遺伝子破壊体は何らかの表現型を示せば、その現象から遺伝子産物の機能を示唆しうる。

遺伝子過剰発現：遺伝子破壊とは逆に、遺伝子産物が過剰に機能したときの表現型を観察する。遺伝子過剰発現体は何らかの表現型を示せば、その現象から遺伝子産物の機能を示唆しうる。

分子遺伝学的解析：これまでに単離された他の免疫抑制薬感受性変異体、および他の既知の分裂酵母変異体との遺伝学的関連を解析することにより、遺伝子産物の機能解析を行う。新たに単離された変異体と既知の変

異体を交配させ、子孫を作り出す。この子孫の表現型を解析することにより、2つの遺伝子間の相互作用を明らかにすることが出来る。また、既知の遺伝子を変異体に導入し、免疫抑制薬感受性の相補能を見る。相補能を示せば、この変異体の原因遺伝子と変異体に導入した既知遺伝子との間に機能的関連があることになる。

細胞生物学的解析：分離した遺伝子を、GFPとの融合タンパク質として酵母細胞内で発現させ、細胞内局在を観察する。

蛋白化学的解析：分離した遺伝子を、GST、HA、FLAGなどのタグとの融合タンパク質の形で酵母細胞内で発現させる。酵素の様に活性を持つタンパク質の場合、発現タンパク質をアフィニティカラムにより精製し、活性測定を行う。

上記の解析を、分離した遺伝子すべてについて行い、遺伝子産物の生理機能を明らかにする。特に、これらの遺伝子産物とカルシニューリンとの機能的関連および、なぜその変異が免疫抑制薬感受性を引き起こすのかを中心に解析を進める。

(3) 免疫抑制薬感受性変異体の網羅的単離と同定：研究代表者はこれまでに20種以上の免疫抑制薬感受性遺伝子座位を取得しているが、このスクリーニングはまだ飽和していない。従って、免疫抑制薬感受性座位を網羅的に同定するために、さらに免疫抑制薬感受性変異体を可能な限り多く取得し、その原因遺伝子を同定する。

point mutationの導入：分裂酵母細胞をニトロソグアニジンで処理して、染色体遺伝子上にpoint mutationを導入する。これらの酵母変異体を至適条件下でプレート上で生育させた後、タクロリムスを含むプレートにレプリカする。タクロリムスによって生育が阻害される変異体、すなわち免疫感受性変異体を取得する。

相補性試験：取得した変異体同士を交配させ、その子孫の表現型を解析することにより、変異遺伝子座位を分類する。

分子遺伝学的解析：これらの変異体をカルシニューリン遺伝子破壊株と交配して二重変異体を作成し、カルシニューリン遺伝子との合成致死性を確認する。

#### 4. 研究成果

研究代表者はこれまでに分裂酵母免疫抑制薬感受性変異体を数種類取得し、その原因遺伝子の機能解析を行っている。その結果から、カルシニューリンが細胞内輸送、細胞質分裂、細胞形態形成などのアクチン細胞骨格のダイナミックな再構成に関与することを見出している。アクチン細胞骨格制御に関わる遺伝子を解析する過程で、Wiskott-Aldrich症候群の原因遺伝子の分裂酵母ホモログであ

る *wsp1* 遺伝子の変異体が Cl<sup>-</sup> イオン感受性かつ免疫抑制薬感受性であることを見出した。そこで、カルシニューリンの機能及び免疫抑制薬の副作用発現のメカニズムを明らかにすることを目的に *wsp1* 遺伝子産物の機能解析を行った。これまでに、以下のような成果を得ている。

(1) *wsp1* 遺伝子破壊株は細胞増殖が著しく遅くなり、免疫抑制薬感受性を示した。また、細胞質分裂、細胞壁 integrity 及びアクチンの細胞内局在に異常を認めた。

(2) *wsp1* 遺伝子破壊株の細胞質分裂異常のメカニズムについて解析した結果、収縮環の位置を正しく決定するために、Wsp1 とカルシニューリンが協同的に働いていることが示唆された。

(3) *wsp1* 遺伝子産物は F 型アクチンと共局在し、*wsp1* 遺伝子破壊株ではアクチンの局在異常が認められた。また、*wsp1* 遺伝子破壊株では v-SNARE の局在異常、分泌機能異常、エンドサイトーシス及び液胞融合の障害が見られた。

(4) *wsp1* 遺伝子破壊株の Cl<sup>-</sup> イオン感受性を相補する抑圧変異体 *swd* (suppressor of *wsp1* deletion) 変異体を数種類、取得した。*swd1-1* はクラスリン重鎖 (*chc\**) の変異アリルであった。*swd1-1* は温度感受性であるが、FK506 感受性を示さなかった。*swd1-1* の *chc1* 遺伝子の解析から、mutation site が 1459 番目の tyrosine より C 末端側にあることが判明した。クラスリン重鎖の C 末端部は三量体形成に重要な部位であることから、*swd1-1* ではクラスリン重鎖が重合できず、機能低下あるいは欠損のあることが示唆された。

(5) 1 アダプチン (*apl2*) および Ypt3 (*ypt3*) の 2 つの細胞内輸送に関連したそれぞれの遺伝子変異株と *wsp1* 遺伝子破壊株との二重変異株は、いずれも *wsp1* 遺伝子破壊株の Cl<sup>-</sup> イオン感受性を抑圧した。以上の結果より、Wsp1 がエンドサイトーシス及び細胞内輸送系に関与していること、および細胞内輸送に関連する遺伝子と Wsp1 との間に Cl<sup>-</sup> イオンホメオスタシスに関して遺伝学的に関連することが示唆された。

以上の結果から、免疫抑制薬の副作用発現において、細胞内輸送系の異常が関与することが示唆された。細胞内輸送系の異常が副作用発現に至るメカニズムについて、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2件)

春藤久人、分裂酵母を用いたアクチン細胞骨格制御因子 WASP の機能解析、神戸学

院総合リハビリテーション研究、査読有、  
7 巻、2012、95-108  
春藤久人、分裂酵母のアクチン細胞骨格  
制御因子 Wsp1 は細胞内輸送に関する、  
神戸学院総合リハビリテーション研究、  
査読有、7 巻、2012、109-119

〔学会発表〕(計 1 件)

高田将司、春藤久人、分裂酵母を用いた  
アクチン細胞骨格の解析、2010 年度神戸  
学院大学総合リハビリテーション学部卒  
業研究発表会、2010 年 12 月 27 日、2010  
年 12 月 27 日、神戸学院大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

春藤 久人 (SHUNTOH HISATO)  
神戸学院大学・総合リハビリテーション学  
部・教授  
研究者番号：70206259