

## 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 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390048

研究課題名(和文) モデル生物を用いた薬物感受性遺伝子に関するゲノム薬理学的研究

研究課題名(英文) Pharmacogenomic study on the drug-sensitive genes using model organisms

## 研究代表者

久野 高義 (KUNO TAKAYOSHI)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：50144564

研究成果の概要(和文)：本研究では、薬物の副作用機序の解明だけではなく、薬物耐性のメカニズムを明らかにする目的で、様々な薬物に対して超感受性や耐性を示す分裂酵母変異体を解析する研究を中心に数多くの実験を行った。その結果、免疫抑制薬、抗真菌薬、バルプロ酸、コバルトなどに対して、どのような遺伝子に変異すると感受性を示すかが明らかになった。これらは、免疫抑制薬の副作用の軽減、新しい抗真菌薬の分子標的の発見と耐性の克服、バルプロ酸の新しい臨床応用などに役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study we performed many experiments to clarify the molecular mechanisms of adverse action of drugs as well as to overcome the drug resistance. For this purpose we genetically analyzed various fission yeast mutant strains that show hypersensitivity or resistance to various drugs. As results, we identified various genes that are responsible for the changes in the drug sensitivity. These results will be helpful to reduce the adverse effects of immunosuppressants, to identify novel target molecules for antifungal drugs, to overcome the drug resistance, or to find a new clinical application of valproic acid.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：免疫抑制薬、抗真菌薬、ストレス応答、細胞内情報伝達、細胞内輸送、モデル生物

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ：薬物を服用した場合、重篤な副作用が特定の遺伝子の変異により出現することがある。これは、臨床的に極めて重要な問題であるが、遺伝病と異なり、服薬して初めて表現型(症状)が出現するため、悪性高熱症などの一部の例外を除いて、原因遺伝子の同定やその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、このような薬物感受性を規定する遺伝子について、モデル生物として用いて薬物感受性遺伝子を研究しようとするものである。現在、薬物感受性遺伝子についての研究は、薬物代謝酵素や輸送タンパクなどをコードする遺伝子の多型に注目した研究が盛んに行われている。一方、各種シグナル伝達経路の中核であるタンパク質リン酸化酵素を標的とした分子標的薬が近年数多く導入されているが、これらの副作用バイオマーカー

の確立に向けての研究は不十分である。モデル生物を用いた遺伝学的研究は、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、哺乳動物でのメカニズムを予見する役割を果たして来たが、モデル生物を用いて薬物感受性遺伝子をゲノム薬理学的に同定しようとする研究はほとんど行われていない。

(2) これまでの研究成果の内容と着想に至った経緯：応募者等は、免疫抑制薬の分子標的であるカルシニューリンの全一次構造を世界で最初に決定して以来、カルシニューリンの研究を続けている。カルシニューリンはタンパク質脱リン酸化酵素であるが、生化学的解析だけでは生理機能の解明が困難である。応募者は、分裂酵母をモデル生物として研究を進めている。酵母では遺伝子間の相互作用が「合成致死表現型」として解析できる。即ち、薬物の標的分子が分裂酵母からヒトまで保存されている場合に、薬物標的分子と機能的に関連する分子の変異体とその薬物に対する超感受性変異体として単離できる。この着想により、分裂酵母モデル系を用いて免疫抑制薬感受性遺伝子の研究を開始した。その結果、カルシニューリン経路とマップキナーゼ経路のクロストークを発見し、これら2つの経路の拮抗関係を利用した遺伝学的スクリーニングにより、マップキナーゼの新しい調節メカニズムや調節因子を発見した。このカルシニューリンとマップキナーゼ経路とのクロストークの発見が今回の着想へと導いた。本研究では、免疫抑制薬感受性遺伝子と同時に、主要なシグナル伝達経路阻害薬に対する薬物感受性変異体解析を進めることで、酵母からヒトまで保存された副作用発現の分子機構および、シグナル伝達経路間クロストークの分子機構の解明をめざした。

## 2. 研究の目的

(1) 何をどこまで明らかにしようとするのか：上記のように、薬物感受性遺伝子の同定は、当該薬物による副作用原因遺伝子の同定に直結している。本研究では、標的分子が分裂酵母からヒトまで保存されている薬物として、免疫抑制薬、タンパク質リン酸化酵素阻害薬などのシグナル伝達系路阻害薬を中心として研究を進めた。薬物感受性を示す変異体の変異遺伝子との密接な機能的関係が分裂酵母からヒトまで進化上保存されていれば、これらの変異遺伝子のヒト相同遺伝子に何らかの変異がある場合、薬物を投与し、標的分子の機能を抑制すると、通常では認められないような副作用が引き起こされる可能性が高い。本研究は、分裂酵母のシグナル伝達系路阻害薬感受性変異体の原因遺伝子を可能な限り多く同定・解析し、これを手がかりとして、マウスにおける相同遺伝子の操

作、哺乳動物培養細胞系でのノックダウンなどによる機能解析に基づき、薬物投与により重大な副作用を引き起こす遺伝子変異を明らかにする。同時に、標的分子を介する細胞内シグナル伝達機構やクロストークの分子機構の解明もめざしている。

(2) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義：重大な薬物副作用を引き起こす原因遺伝子としては、吸入麻酔薬によって起こる悪性高熱症が、リアノジン受容体遺伝子に変異を持つ個体で起こりやすいということが良く知られているが、免疫抑制薬や分子標的薬の副作用の原因遺伝子が明らかにされている例は、ほとんど知られていない。本研究の特色及び独創性は、遺伝学的解析の容易なモデル生物を用いて、薬物の副作用の原因となる遺伝子を明らかにしようとする点にある。酵母、線虫などのモデル生物を用いた研究は、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、哺乳動物でのメカニズムを予見する役割を果たして来た。シクロスポリンやタクロリムス等の免疫抑制薬は、現在の臓器移植医療において必須の薬物であるが、重篤な副作用がしばしば問題となる。一方、ゲフィチニブなどの分子標的薬が遺伝的なバックグラウンドによって思いがけない副作用を引き起こすことも示唆されている。このような副作用を予測するためのゲノム薬理学的研究は、前例のない独創的なものであり、臓器移植時のレシピエントやがん治療における薬物の選択に直結する重要な成果が期待される。また、モデル生物を用いる戦略は、他の様々な薬物の副作用についても応用可能であり、本研究の成果は、人類の福祉に大きく貢献する事が期待される。免疫抑制薬感受性遺伝子については、先行の基盤研究により既に多くの成果をあげており、本研究はさらに格段に発展させるための研究計画である。

## 3. 研究の方法

(1) 薬物感受性変異体の遺伝子同定と解析：

①免疫抑制薬感受性：実験開始時点までの遺伝学的実験により、約50種の異なる免疫抑制薬感受性アリルの存在が明らかにされていた。残り約40種の免疫抑制薬感受性アリルについて同定と解析を行った。これら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、タクロリムス感受性を相補する遺伝子を分離した。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

ースをサーチした。免疫抑制薬感受性アリの  
の中、遺伝子が同定されたが未報告の約 20  
個の遺伝子はすべて酵母からヒトまで普遍  
的に保存されていることが予備的な実験に  
より明らかになっていた。機能未知の遺伝子  
を中心に、主に次の 2 つの方法により解析し  
た。1) 遺伝子の過剰発現およびノックアウト  
細胞を作成し、表現型の変化を調べる。2)  
大腸菌や酵母に発現させた蛋白質の蛋白質化  
学的解析や、GFP との融合蛋白質の発現等の  
細胞生物学的解析を行い、これら遺伝子産物  
の生理機能を明らかにする。特に、なぜ免疫  
抑制薬に対して感受性になるのかを中心に  
解析した。

②バルプロ酸感受性：ヒストン脱アセチル化  
酵素阻害薬であるバルプロ酸感受性変異体  
について約 10 個の変異体を単離し、4 個の遺  
伝子を同定し、解析を進めた。遺伝子の同定  
や解析は上記の免疫抑制薬感受性変異体と  
同様に行う。

③免疫抑制薬とバルプロ酸以外の薬物とし  
ては、ビタミン B12 の構成成分であるコバル  
トに対して超感受性あるいは耐性を示す変  
異体を単離して、上記と同様に遺伝子の同定  
と解析を進めた。

(2) 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  
の最大のメリットは変異体の表現型を過剰  
発現により相補する遺伝子 (multicopy  
suppressor, MCS) 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システマ  
ティックに単離、同定できることである。薬  
物感受性遺伝子と機能的・遺伝的に関連する  
遺伝子が単離されることで、薬物標的分子と  
薬物感受性遺伝子によってコードされる分  
子の関連やシグナルのクロストークメカニ  
ズムの解明が期待できる。これらの機能解析、  
変異遺伝子とのダブルノックアウトなど  
による機能解析を行った。本研究では、我々が  
発見したゴルジに存在する亜鉛トランスポ  
ーター変異体の MCS の単離、同定、解析を行  
った。同様に、カルシニューリンの下流で働  
く zinc finger 型の転写因子 Prz1 の過剰発  
現による細胞増殖抑制の MCS の同定・解析を  
行った。

#### 4. 研究成果

(1) バルプロ酸感受性遺伝子の単離と細胞  
内輸送機構の解明：これまでバルプロ酸に超  
感受性を示す分裂酵母変異体の原因遺伝子  
として、Vps45 と Aps1 という 2 つの細胞内輸  
送に関連する遺伝子を同定した。今回は、バ  
ルプロ酸に感受性を示す別の変異体 vas3-1/  
ric1-v3 を解析した。その結果、Ric1 という  
Ryh1 Rab ファミリー GTP 結合タンパク質のグ  
アニンヌクレオチド交換因子のサブユニット  
をコードする遺伝子を同定できた。Ric1 ノ

ックアウト株は vas3-1 変異株とほぼ同様の  
表現型を示し、野生型および恒常的活性型の  
Ryh1 はこれらの株の表現型を部分的に相補  
した。さらに、ric1-v3 変異株の温度感受性  
を過剰発現によって相補する遺伝子として、  
細胞内輸送に関わるタンパク質リン酸化酵  
素として知られている Vps15 を同定した。こ  
の遺伝子の過剰発現は Ric1 ノックアウト株  
の表現型は相補しないので、Vp15 が Ric1 活  
性を制御する可能性が示唆された。

(2) MAPKKK 依存性および非依存性ストレス  
応答 MAP キナーゼ活性化経路の同定：分裂酵  
母のストレス応答 MAP キナーゼ経路は、ヒト  
の経路とほぼ同様に、高浸透圧と酸化スト  
レスに応答することが知られているが、そのメ  
カニズムは不明だった。我々は、MAP キナー  
ゼ Sty1 によってリン酸化されて活性化され  
る転写因子 Atf1 の活性をルシフェラーゼを  
用いて生きた細胞で測定するシステムを構  
築した。この系を用いて、5 つの MAPKKK をす  
べてノックアウトした細胞での Atf1 活性を  
測定したところ、高浸透圧による刺激応答は  
完全に消失したが、酸化ストレスによる刺激  
応答は残っていた。さらに、酸化ストレスは  
Sty1 の脱リン酸化酵素 Pyp1 を阻害して Atf1  
を活性化することが明らかになった。以上の  
ように、2 つの MAP キナーゼ活性化経路の存  
在を明らかにした。

(3) 抗真菌薬に対する感受性決定遺伝子の  
同定：真菌感染症は免疫不全における最も致  
死的な感染症であり、超高齢化社会の到来と  
ともにその重要性は増しているが、治療薬と  
しては古くからのアゾール系薬物など数種  
しか知られていない。本研究では、アゾール  
薬と相乗効果を示す薬物の分子標的を探索  
する目的で、抗真菌薬に感受性を示す遺伝子  
ノックアウト株をゲノムワイドにスクリー  
ニングした。その結果、109 個の感受性遺伝  
子と 11 個の耐性遺伝子を同定した。これら  
は、膜輸送、ヒストンアセチル化、ユビキチ  
ン化など様々な生命現象に関与していた。

(4) 免疫抑制薬に対する感受性と関連する  
遺伝子の同定：(3) と同様に、免疫抑制薬  
タクロリムスの存在下で生育不能になる遺  
伝子ノックアウト株を探索した。その結果、  
72 個の感受性遺伝子が同定された。これらは、  
11 の機能的グループに分けられた。最大は膜  
輸送 (16 個) でシグナル伝達 (10 個) がそ  
れに続いた。これらの結果は、カルシニュー  
リンが様々な細胞機能に関与し、多くのシグ  
ナル伝達経路とクロストークしていること  
を示している。3. TRP チャネルと Yam8/Cch1  
チャネルの分裂酵母細胞内 Ca<sup>2+</sup>調節機能に  
おける役割 GFP とエクオリンの融合タンパク  
質を発現させることで、生きた分裂酵母細胞  
内における Ca<sup>2+</sup>濃度を高感度で測定する方法  
を開発した。その結果、TRP チャネルを過剰

発現した細胞では、細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇により、急激な細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇が認められた。さらに、Yam8/Cch1 を介する Ca<sup>2+</sup> 流入は Pmk1 マップキナーゼ経路により活性化され、カルシニューリンにより抑制されることが明らかになった。

(5) HMGCoA 還元酵素の抑制効果について：HMGCoA 還元酵素はヒトが最も大量に消費している薬物である高コレステロール血症治療薬スタチン類の標的であるが、その臨床効果が真に血中コレステロール量の低下によるものかどうかについては議論がある。本研究では、モデル生物において、HMGCoA 還元酵素の抑制による増殖抑制はエルゴステロール量の減少ではなく、ファルネシルピロリン酸 (FPP) などの中間代謝産物の減少によるものであることを明らかにした。FPP は、がん遺伝子の活性化にも必須の物質なので、スタチンの臨床効果もこれらの中間代謝産物の減少を介している可能性が示された。

(6) 我々が同定した免疫抑制薬感受性遺伝子がコードする亜鉛輸送タンパク質 Cis 4 が GPI アンカーの細胞内輸送に重要な役割を果たしていることを明らかにすると共に、分裂酵母の GPI アンカーは、ヒトなどと同様にクラスリン小胞輸送経路により ER から細胞表面まで輸送されることを明らかにした。

(7) コバルト感受性遺伝子の同定とホメオスタシス維持機構の解明：コバルトは、ビタミン B12 の構成成分として生体に必須の金属であるが、過剰に摂取すると毒性が生じるため、その制御機構は重要である。しかし、その機構には不明の部分が多い。我々は、モデル生物の遺伝子ノックアウトライブラリーを用いて解析を行い、コバルトがヒスチジンというアミノ酸とともに細胞に取り込まれること、Zhf1 という亜鉛輸送体がコバルトを細胞から排出するために重要であること、Rhp6 というユビキチン関連酵素やストレスマップキナーゼ経路がコバルトのホメオスタシス維持に関連していることを明らかにした。

(8) ストレス応答機構における新しい発見：ストレスに応答する転写因子 Atf1 が細胞内にある全てのマップキナーゼをノックアウトしても酸化ストレスに応答して活性化されることを発見した。Atf1 が酸化ストレスによって直接活性化される可能性が示唆された。

## 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 10 件)

- ① Atsushi Koike, Toshiaki Kato, Reiko Sugiura, Yan Ma, Yuki Tabata, Koji

Ohmoto, Susie O. Sio, Takayoshi Kuno Genetic screening for regulators of Prz1, a transcriptional factor acting downstream of calcineurin in fission yeast, *J. Biol. Chem.*, 2012; 287, p. 19294-19303 (査読有)

doi: 10.1074/jbc.M111.310615

- ② Yan Ma, Weijuan Jiang, Qingbin Liu, Sayomi Ryuko, Takayoshi Kuno Genome-Wide Screening for Genes Associated with FK506 Sensitivity in Fission Yeast, *PLoS ONE*, 2011, 6(8): e23422. (査読有)
- doi:10.1371/journal.pone.0023422.

[学会発表] (計 9 件)

- ① Yue Fang, A genome-wide screen in *Schizosaccharomyces pombe* for genes affecting the sensitivity of antifungal drugs that target ergosterol biosynthesis. British Pharmacology Society Meeting, 2011 12 14, London, Great Britain
- ② Yan Ma, Transient Receptor Potential (TRP) and Cch1-Yam8 Channels Play Key Roles in the Regulation of Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in Fission Yeast, Cold Spring Harbor Meeting on Yeast Cell Biology, 2011 8 16, Cold Spring Harbor, New York, USA

[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

久野 高義 (KUNO TAKAYOSHI)  
神戸大学・医学研究科・特命教授  
研究者番号：50144564

### (2) 研究分担者

馬 艶 (MA YAN)  
神戸大学・医学研究科・講師  
研究者番号：70457050

向井 秀幸 (MUKAI HIDEYUKI)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・  
准教授  
研究者番号：80252758

### (3) 連携研究者

なし