

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790251

研究課題名(和文)メンブレン・トラフィック作用薬としてのバルプロ酸の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism by which valproic acid affects intracellular membrane traffic

研究代表者

馬 艶 (MA, YAN)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70457050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 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100倍以上上昇させること、神経幹細胞移植時に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。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。分裂酵母のノックアウトライブラリーを用いてゲノムワイドスクリーニングを行い、多数のVPA超感受性株を同定した。これらの感受性遺伝子は細胞内輸送、シグナル伝達、クロマチンリモデリングなどの生命現象に関わっている。興味深いことにVPA超感受性株の多くはHDAC阻害薬である酪酸に感受性を示さなかった(Zhang et al. 2013)。

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 by more than 100-fold upon iPS reprogramming and the administration of VPA dramatically enhanced the restoration of hind limb function upon 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. We have been using *Schizosaccharomyces pombe* as a model organism to study the molecular mechanisms of VPA action. This study led to the following findings. We performed a genome-wide screen of non-essential haploid deletion strains and confirmed 148 deletion strains to be VPA sensitive. Most of the VPA sensitive strains did not show sensitivity to another aliphatic acid sodium butyrate.

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：バルプロ酸 メンブレン・トラフィック モデル生物 薬物感受性

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。近年我々は、バルプロ酸の新しい作用点としてメンブレン・トラフィック機構が重要であることを明らかにした。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。

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メンブレン・トラフィック作用薬としてのバルプロ酸の分子機構を解明しようとするものである。分裂酵母のメンブレン・トラフィックで働く分子は、ほぼ完全に哺乳動物のメンブレン・トラフィック機構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働く分子機構の解明は、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。

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。機能未知の遺伝子特にメンブレン・トラフィックに関わる遺伝子を中心に、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を単離することで、バルプロ酸の生物効果を発揮するメカニズムの解明が期待できる。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(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、原因遺伝子により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。さらに超感受性と耐性を示すメカニズムを解明する。

(1)(2)と(3)の結果を総合して、バルプロ酸のメンブレン・トラフィック機構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。

4. 研究成果

分裂酵母のほぼすべての必須遺伝子のノックアウトライブラリーの 3004 株を用いてゲノムワイドスクリーニングを行い、多数の VPA 超感受性株を同定できた。これらの感受性遺伝子は細胞内輸送、シグナル伝達、クロマチンリモデリングなどの生命現象に関わっている。興味深いことに VPA 超感受性株の多くは HDAC 阻害薬である酪酸に感受性を示さなかった。また VPA は細胞内へのカルシウム流入を引き起こすが、酪酸はカルシウム流入を引き起こさなかった(Zhang et al. 2013)。これらの結果は VPA が HDAC 阻害薬である一方、多くの分子標的を有する可能性を強く示唆している。

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 6 件)

Possible Involvement of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Glucose Deprivation-Induced Activation of Transcription Factor Rst2

Toshiaki Kato, Xin Zhou, Yan Ma

査読有, *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e78012.

TORC1 Signaling Is Governed by Two

Negative Regulators in Fission Yeast
Ning Ma, Qingbin Liu, Lili Zhang,
Elizabeth Petri Henske and Yan Ma
査読有, *Genetics*. 2013, 195(2):457-68.

Genome-Wide Screening for Genes
Associated with Valproic Acid Sensitivity
in Fission Yeast

Lili Zhang, Ning Ma, Qingbin Liu, Yan Ma
査読有, *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e68738.

A Genome-Wide Screening of Potential
Target Genes to Enhance the Antifungal
Activity of Micafungin in
Schizosaccharomyces pombe.

Xin Zhou, Yan Ma, Yue Fang, Wugan gerile,
Wurentuya Jaiseng, Yuki Yamada, Takayoshi
Kuno

査読有, *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e65904.

Genome-wide screen reveals novel
mechanisms for regulating cobalt uptake
and detoxification in fission yeast.

Sayomi Ryuko, Yan Ma, Ning Ma, Motoyoshi
Sakaue, and Takayoshi Kuno

査読有, *Mol Genet Genomics*, 2012,
287:651-662

A measurable activation of the bZIP
transcription factor Atf1 in a fission
yeast strain devoid of stress-activated
and cell-integrity MAPK activities.

Xin Zhou, Yan Ma, Toshiaki Kato, and
Takayoshi Kuno

査読有, *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(28):
23434-23439

〔学会発表〕(計 16 件)

Feedback regulation of TORC1 signaling
in fission yeast

Ning Ma, Qingbin Liu, Lili Zhang, Yao Qi,
Yan Ma

The 2013 American Society for Cell Biology
Annual Meeting, 14-18 December (New
Orleans, LA), 2013

Possible involvement of nitric oxide and
reactive oxygen species in glucose
deprivation-induced activation of
transcription factor Rst2

Toshiaki Kato, Xin Zhou, Yan Ma

The 2013 American Society for Cell Biology
Annual Meeting, 14-18 December (New
Orleans, LA), 2013

Feedback regulation of TORC1 signaling
by Npr2, but not by Tsc2

Yan Ma, Ning Ma, Qingbin Liu, Lili Zhang,
Elizabeth Henske, Takayoshi Kuno

EMBO Conference on Fission Yeast: pombe
2013, 7th International Fission Yeast
Meeting

London, United Kingdom, 24 - 29 June 2013

低グルコース状態における転写因子 Rst2 の
活性化に一酸化窒素・活性酸素種が関与する
加藤俊明、周キン、馬艶

第 36 回 日本分子生物学会年会 12 月 3 日
(神戸), 2013

TORC1 signaling is governed by two
negative regulators in fission yeast

Ma Ning, Liu Qingbin, Zhang Lili, Henske
Elizabeth, Yan Ma

第 36 回 日本分子生物学会年会 12 月 3 日
(神戸), 2013

アゾール系抗真菌薬に応答する分裂酵母
Erg11 プロモーターの解析

早藤励、胡玲玲、房月、馬艶

第 124 回 日本薬理学会近畿部会 11 月 1 日
(京都), 2013

分裂酵母モデル系を用いた脊髄性筋萎縮
症の原因タンパク質 Snn1 の機能解明

西島数人、加藤俊明、馬艶、西尾 久英

第 124 回 日本薬理学会近畿部会 11 月 1 日
(京都), 2013

分子遺伝学的手法による TOR の関連遺伝子
の探索

福間久友、馬寧、齊瑤、馬艶

第 124 回 日本薬理学会近畿部会 11月1日
(京都), 2013

Npr2 Negatively Regulates TORC1
Signaling in Fission Yeast

Ning Ma, Qingbin Liu, Lili Zhang,
Elizabeth P. Henske, Yan Ma

酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会
9月8-9日(仙台), 2013

Genome-Wide Screening for Genes
Associated with Valproic Acid Sensitivity
in Fission Yeast

Lili Zhang, Ning Ma, Qingbin Liu, Yan Ma

酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会
9月8-9日(仙台), 2013

ラパマイシン標的分子 Tor2 制御における
Npr2 の役割: ゲノムワイド解析による解明

馬艶、馬寧、劉慶彬、張麗麗、福間久友、西
島数人、久野高義

第 86 回 日本薬理学会年会 3月21日~3
月23日(福岡), 2013

分裂酵母における NO 応答転写調節メカニ
ズムの解明

烏干格日樂、山田優希、加藤俊明、Xin Zhou、

馬艶、久野高義

第 122 回 日本薬理学会近畿部会 11月16
日(大阪), 2012

分裂酵母における DNA 損傷応答メカニ
ズムの解明

山田優希、烏干格日樂、Xin Zhou、馬艶、久
野高義

第 122 回 日本薬理学会近畿部会 11月16
日(大阪), 2012

低グルコースで活性化される転写因子
Rst2 の転写活性のリアルタイムモニタリン
グ

加藤俊明、馬艶、久野高義

第 122 回 日本薬理学会近畿部会 11月16
日(大阪), 2012

分裂酵母ノックアウトライブラリーを用
いたバルプロ酸感受性遺伝子の探索と解析

張麗麗、馬艶、馬寧、劉慶彬、久野高義

第 122 回 日本薬理学会近畿部会 11月16
日(大阪), 2012

分裂酵母ノックアウトライブラリーを用
いた亜鉛感受性及び耐性遺伝子のゲノムワ
イドスクリーニング

長谷川よしの、柳幸佐代美、馬艶、久野高義
第 122 回 日本薬理学会近畿部会 11月16
日(大阪), 2012

〔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・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 70457050

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
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