

# 薬 学 研 究 科

平 成 26 年 度

(課程修了による博士論文)

土 井 章

## 学位論文審査結果の報告書

氏 名

土井 章

---

生 年 月 日

昭和・平成 58 年 10 月 8 日

本 籍 (国籍)

三重

---

学位の種類

博 士 ( 薬 科 学 )

学位記番号

第 129 号

学位授与の条件  
(博士の学位)

学位規程第5条該当

論 文 題 目

ケミカルゲノミクスを用いた

---

MAPKシグナルおよびTORCシグナル伝達経路に関する研究

---

---

審 査 委 員

(主 査) 杉浦 麗子 教授



(副主査) 松山 賢治 教授



(副主査) 益子 高 教授



(副 査)



(副 査)



## 論文内容の要旨

ケミカルゲノミクスとは、免疫抑制薬FK506の標的因子がカルシニューリンであることを明らかにしたSchreiber博士により提唱された概念であり(Schreiber 1998)、化合物により影響を受ける遺伝子機能をゲノム規模に網羅的に解析することで生命現象を解明しようとする研究分野である(Yoshida 2005; Hagiwara 2008)。近年のハイスループットスクリーニング技術の革新的進歩により、化合物に対するDNA, RNA, タンパク質の変動情報が日々蓄積されている。これらの情報は、化合物の標的因子の発見、および新規薬剤開発に重要である。

分裂酵母(*S. pombe*)は、2002年にゲノム配列決定が行われ(Wood *et al.* 2002)、現在では約5380の遺伝子が存在することが知られている。分裂酵母の遺伝子数は、ヒトの遺伝子数と比べ約十分の一であるが(Pennisi 2012)、MAPK (Toda *et al.* 1996)、低分子量Gタンパク質(Nakano & Mabuchi 1995)、TOR (Weisman & Choder 2001)、カルシニューリン(CN) (Yoshida *et al.* 1994)など細胞内シグナル伝達経路の構成因子が高度に保存されており、結節性硬化症の原因遺伝子であるTsc1など疾患に関与する遺伝子も多く保存されていることから(Yanagida 2009)、疾患のメカニズム解析、薬の作用メカニズム解明を行う上で魅力的なモデル生物である。さらに分裂酵母には、非必須遺伝子ノックアウト(KO)ライブラリーやORFeomeと呼ばれる個々の遺伝子を過剰発現可能なORFのプラスミドライブラリー、Bähler研究室により公開されている各細胞周期やストレス条件下における全遺伝子の発現情報データなど(Matsuyama *et al.* 2006; Kim *et al.* 2010)、ゲノムワイドなツールやリソースが完備されていることから、chemical geneticsやgenomic analysisを駆使することができる非常に有用なモデル生物である。

現在までに、当研究室では、高等生物に非常に近い細胞内シグナル伝達経路を有する分裂酵母を用いた独自の分子遺伝学的アプローチにより、様々な細胞内シグナル伝達機構や細胞内輸送機構を明らかにしてきた(Sugiura *et al.* 1998; Sugiura *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2000; Sugiura *et al.* 2003; Kita *et al.* 2004; Ma *et al.* 2011b; Satoh *et al.* 2012)。とりわけ、ERK MAPKの分裂酵母ホモログであるPmk1 MAPKとCNが拮抗的にCl<sup>-</sup>ホメオスタシスを制御していることを活用した遺伝学的スクリーニングにより、Pmk1 MAPKシグナル伝達経路の構成因子を多数同定してきた(Toda *et al.* 1996; Sugiura *et al.* 1998; Sugiura *et al.* 1999; Sugiura *et al.* 2003; Ma *et al.* 2006; Satoh *et al.* 2009)。すなわちCN KO細胞は、培地に高濃度のCl<sup>-</sup>が存在すると生育することができないが、Pmk1 MAPK経路の抑制因子を過剰発現すると高濃度のCl<sup>-</sup>存在下でもCN KO細胞が生育できる。この遺伝学的スクリーニングによりMAPK脱リン酸化酵素Pmp1 (Sugiura *et al.* 1998)、Pmk1によりリン酸化され、Pmp1のmRNAを安定化することでMAPKを抑制的に制御するRNA結合タンパク質Rnc1 (Sugiura *et al.* 2003)などが同定されている。さらに、CN特異的阻害薬であるFK506かつ高濃度のCl<sup>-</sup>存在下では正常細胞が生育できないことを利用し、FK506かつ高濃度Cl<sup>-</sup>存在下でも生育可能を意味するvic (viable in the presence of immunosuppressant and chloride ion) 表現型を指標とした遺伝学的スクリーニングが行われている(Ma *et al.* 2006)。このスクリーニングにより、vic1 mutantの原因遺伝子としてファルネシルトランスフェラーゼcpp1<sup>+</sup>が同定され、Cpp1が低分子量Gタンパク質Rho2の細胞膜局在を制御することによりPmk1 MAPKを促進的に制御していることが明らかとなっている(Ma *et al.* 2006)。

前述のとおりPmk1 MAPKはヒトERK MAPKのホモログであり、ERK MAPKは細胞分裂、増殖、がん化と深く関係することが知られており(Kim & Choi 2010)、2013年には、ERK MAPK経路の阻害薬であるMekinistがメラノーマの治療薬として承認されるなど、MAPK経路は創薬のターゲットとして注目をあびている(Menzies & Long 2014)。そのため、MAPK経路の制御機構の解明は創薬の基盤となる。

また、分裂酵母にはMAPKと同様に細胞の分裂、増殖、がん化に深い関係あるTORC経路も高度に保存されている(Takahara & Maeda 2013)。出芽酵母の遺伝学的スクリーニングにより、Rapamycinの標的因子として同定されたTOR (target of rapamycin)は (Helliwell *et al.* 1994)、高等生物ではmTOR (mammalianあるいはmechanistic target of rapamycin)として知られている。出芽酵母における *tor* mutantやRapamycinを使用したTORの機能解析の結果、TORは細胞の栄養やエネルギー状態などの情報を統合し細胞の分裂、増殖、代謝などに不可欠な役割を担っていることが明らかとなっている(Wullschlegel *et al.* 2006)。そのため、TORシグナル伝達経路阻害薬であるRapamycinおよびRapamycin analogは、免疫抑制薬のみならず抗腫瘍薬としても使用されている(Populo *et al.* 2012)。さらに、Rapamycinを投与することにより酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウスの寿命が延長することが明らかとなったことから(Johnson *et al.* 2013)、出芽酵母、植物、動物、ヒトなど様々な種において活発な研究が行われている (Deprost *et al.* 2007; Takahara & Maeda 2013)。分裂酵母においてTORシグナルを研究する利点として、高等生物におけるTORの制御因子であるRhebやTSCのホモログや(Yanagida 2009)、LAMTORと呼ばれるリソソーム膜表面上でmTORをアンカリングし、Rhebによる活性化を促進させる因子のホモログの存在があげられる(Ryan *et al.* 2012)。このため、これらの因子が保存されていない出芽酵母では解明しきれない、高等生物におけるmTORCシグナル伝達経路の制御機構に対する重要な知見が得られるのではないかと考えられる。

本研究では、薬剤の発見から現在まで注目を浴び続け、ケミカルゲノミクスの誕生に関わった免疫抑制薬FK506とRapamycinを使用して、MAPKシグナル伝達経路およびTORCシグナル伝達経路の新たな細胞内制御機構を明らかにする目的で実験を行った。

第1章では、免疫抑制薬FK506を使用したスクリーニングにより取得されたグラニルグラニルトランスフェラーゼであるCwg2の機能解析を行った。この機能解析の結果、Cwg2が低分子量Gタンパク質Rho1/Rho4/Rho5の制御を介してPmk1 MAPKシグナル伝達経路を促進的に制御していることを明らかにした (Doi *et al.* in press)。

第2章では、非必須遺伝子KOライブラリーを使用して、TORC1を標的とする免疫抑制薬であるRapamycinに対して感受性を示す遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを行った。これらのRapamycin感受性遺伝子群は、細胞周期、細胞内代謝、クロマチン構成、細胞内輸送、翻訳、および細胞内シグナル伝達に関わっており、さらにtRNAの修飾やミトコンドリア機能に関わる因子が濃縮されていることを明らかにした (Doi *et al.* in press)。

MAPKシグナルおよびTORCシグナル伝達機構は、抗がん薬開発の主要なターゲットである。本研究で得られた知見を活かし、発がんメカニズムの解明、新薬開発などに貢献できることを期待する。

## 論文審査結果の要旨

ケミカルゲノミクスは、有機化合物によって影響を受ける生命現象について遺伝学を駆使し解明する研究分野である。この研究分野は免疫抑制剤FK506の完全合成を成し遂げ、FK506の分子標的がカルシニューリンであることを発見したシュライバー博士等により提唱された。近年の網羅的スクリーニング系の進歩により、様々な化合物によるDNA, RNA, タンパク質の変動情報が蓄積されている。

申請者は、ケミカルゲノミクスの誕生に関わった免疫抑制薬FK506と近年免疫抑制薬としてのみならず、抗がん薬としても注目を集めているRapamycinを使用し、ゲノムサイズが真核生物の中でも最小クラスであり、高等生物における細胞内シグナル伝達経路の優れたモデル生物である分裂酵母 (*S. pombe*) を用いて、細胞の分裂、増殖、代謝などに不可欠な役割を担っているMAPKシグナル伝達経路およびTORCシグナル伝達経路の新規制御機構を明らかにした。

第一章では、申請者は、ヒトERK MAPKの分裂酵母ホモログであるPmk1 MAPKシグナル伝達経路の新規制御因子を同定する目的で、分裂酵母で *vic* (viable in the presence of immunosuppressant and chloride ion) 表現型を示す *vic2-1/cwg2-v2* mutant細胞の遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、新規Pmk1 MAPKシグナル伝達経路の制御因子としてGGTase Iの $\beta$ サブユニットをコードする *cwg2<sup>+</sup>* を同定した。*Cwg2*は、Rho GTPaseであるRho1, Rho4, Rho5およびCdc42のゲラニルゲラニル化を行うことで、これらのRhoタンパク質の細胞膜、液胞膜局在を空間的に制御し、Pmk1 MAPKシグナル伝達経路をポジティブに制御することを明らかにした。また、これまでPmk1 MAPK経路との関係が明らかとされていなかったRho4およびRho5がPck2の上流に位置し、Pck2依存的にPmk1 MAPKシグナル伝達経路にシグナルを伝えていることを明らかにした。

Rho GTPaseは、Rasスーパーファミリーに属するタンパク質ファミリーである。このRasスーパーファミリーは、高等生物の癌種において高頻度な活性化が報告されており、魅力的ながん治療薬開発のターゲットである。そのため、Rasシグナル伝達経路に対する阻害薬の開発が続けられている。今回、明らかとなったRhoタンパク質の液胞膜局在など、Ras/Rhoファミリーの細胞内コンパートメントにおける機能情報が、今後のRas/Rhoファミリーをターゲットとした阻害薬開発において有用な知見となる可能性がある。この成果から申請者はGenes to Cellsという学術雑誌に筆頭著者として掲載された。

第二章では、申請者は、酵母からヒトまで高度に保存されたTORCシグナル伝達経路関連因子の新規関連因子の同定を目的として、TORC1シグナルの特異的阻害薬であるRapamycinに感受性を示すKO細胞のゲノムワイドスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、59種のRapamycin感受性遺伝子が同定され、システムティックな解析により、これらのRapamycin感受性遺伝子群は、細胞周期、細胞内代謝、クロマチン構成、細胞内輸送、翻訳、および細胞内シグナル伝達に関わっており、さらにtRNAの修飾やミトコンドリア機能に関わる因子が濃縮されていることが明らかとなった。また、濃縮されたミトコンドリア機能に関わる因子のKO細胞の大半は、TORのATP競合的阻害薬に対して感受性をしめさなかったことから、Rapamycin感受性のメカニズムには少なくとも複数が存在することを示唆している。この成果から申請者はGenes to Cellsという学術雑誌に筆頭著者として掲載された。

MAPKシグナル伝達経路およびTORCシグナル伝達経路をターゲットとする分子標的抗がん剤が数多く開発段階にある。そのため、これらのシグナル伝達経路の更なる機能解析は、新薬開発および副作用発現メカニズムの解明のため非常に重要である。

申請者が研究を行ったMAPKシグナル伝達経路およびTORCシグナル伝達経路は、ともに酵母からヒトまで高度に保存されており、細胞増殖、分裂に関与することで細胞の生育に必須な機能を担っている。しかしながら、細胞内コンパートメント毎の機能についての詳細な報告は未だ少数のみである。そのため、分裂酵母における両経路の各細胞内コンパートメントの活性化機構および制御機構の解明により、これまでの研究では説明しきれなかったがん化メカニズムの解明や、これらの経路をターゲットとする薬剤の抗腫瘍活性発揮のメカニズムに貢献できる可能性がある。これらの研究成果から、申請者は2報の原著論文を発表しており、博士後期課程学位の要件を満たしている。以上の理由から、博士後期課程学位論文として価値をもつものとする。