

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390021

研究課題名(和文)MAPキナーゼシグナル制御機構の解明とケミカルゲノミクスへの展開

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of MAPK signaling and its application to chemicalgenomics

研究代表者

杉浦 麗子(SUGIURA, Reiko)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：90294206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、遺伝学的と薬理学を融合した独自のケミカルゲノミクスを展開し、その成果として、細胞増殖とがん化の鍵を握るマップキナーゼ(MAPK)シグナルの調節機構を明らかにし、MAPKシグナルを標的とした創薬を展開した。具体的には、MAPKの活性化に関わる遺伝子群や標的遺伝子の同定に加え、MAPKシグナルを制御できる化合物を発見した。さらに、免疫抑制薬であるFK506、RapamycinやFTY720の感受性を決定する遺伝子群を同定し、これらの遺伝子とMAPK経路のクロストーク機構を明らかにした。これらの成果は、MAPKシグナルの破綻が引き起こすがんを始めとした疾患治療法開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research project was to elucidate novel regulatory mechanisms of the Pmk1 MAPK signaling pathway in fission yeast and its application to genome-based drug discovery. We performed chemicalgenomics screens, utilizing the functional interaction between MAPK and calcineurin, and identified regulators (such as Cwg2, Rho4 and Rho5) and targets of Pmk1 MAPK in addition to several compounds that modify the ERK MAPK signaling pathway in mammals. Furthermore, we performed genome-wide identification of the genes involved in the sensitivities to FK506, Rapamycin and FTY720 and elucidated as-yet-unidentified functional interactions between MAPK and these gene products. Collectively, our data will contribute to the development of novel and effective therapeutic approaches for diseases associated with abrogated MAPK signaling activity.

研究分野：分子遺伝学、細胞生物学、ゲノム薬理学、分子細胞生物学、シグナル伝達、ゲノム創薬

キーワード：MAPキナーゼ 細胞内シグナル伝達 ケミカルバイオロジー 分子標的治療薬 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

マップキナーゼ (MAPK) シグナルは細胞増殖や癌化に重要な役割を果たすことから、抗がん薬創製の魅力的なターゲットであり、その制御機構の解明は、癌化の理解に直結する重要な研究課題である。

研究代表者は、癌化に関わる ERK のホモログである分裂酵母の Pmk1 MAPK を発見した。さらに、タンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンと MAPK 経路の拮抗的な関係に立脚した独自のゲノム薬理学的手法を確立することにより、MAPK シグナルの構成因子、制御因子や標的因子を多数同定し、MAPK シグナルの画期的な制御機構を提唱してきた。

2. 研究の目的

本研究は、現在までの成果をさらに発展させ、遺伝学的手法を駆使して MAPK シグナルネットワーク制御機構の解明を行うとともに、MAPK シグナル伝達経路を標的としたケミカルゲノミクスを展開することで、MAPK シグナル伝達阻害薬の探索を行い、抗がん薬開発にむけての知見を蓄積することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 遺伝学的アプローチを軸として、MAPK シグナルの制御に関わる新しい遺伝子群や MAPK の標的遺伝子群を同定し、機能解析を行い、MAPK 制御のメカニズムを明らかにする。
- (2) ゲノム薬理学的アプローチにより、MAPK シグナル阻害活性を有する化合物を、化合物ライブラリーより同定する。
- (3) シグナル伝達経路を標的としたケミカルゲノミクスを展開し、化合物の標的分子や感受性に関わる遺伝子群を網羅的に同定し、化合物の作用機構を解明する。

4. 研究成果

- (1) 独自の遺伝学的アプローチと薬理学を融合した手法により、Pmk1 MAPK シグナルの制御因子を同定した。その結果、ゲラニルゲラニル転移酵素である Cwg2 を同定し、低分子量 G タンパク質である Rho4 と Rho5 の空間的制御を介して MAPK シグナルの活性化を調節することを明らかにした。また、Rho4、Rho5 はいずれも従来報告されていた細胞膜への局在に加えて、液胞などの endosomal membrane にも局在すること、さらにこれらの局在に対しても、Cwg2 を介する prenylation が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

この結果は、低分子量 G タンパク質 Rho の局在調節機構が MAPK 経路に与える重要性を示すとともに、現在まで生理機能がほとんど不明であった Rho4/Rho5 の細胞

統御シグナルにおける役割を明らかにしたものである。また、高等生物でも注目されている、Endosome 局在を介する Rho/MAPK シグナル伝達経路の重要性を示唆する所見である。

- (2) MAPK の標的因子である RNA 結合タンパク質 Nrd1 が MAPK シグナル依存的に RNA 顆粒に移行することにより、ストレス応答に関わることを明らかにした。

さらに、抗がん剤の一種である Doxorubicin が RNA 顆粒を誘導することも明らかにした。

Ca²⁺シグナルの鍵分子であり、免疫抑制薬の標的分子でもあるタンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリンが、酵素活性依存的に熱ストレスに反応して RNA 顆粒に移行することを明らかにし、現在までに報告のなかったカルシニューリンの空間的制御機構を発見した。これらの結果は、リン酸化酵素や脱リン酸化酵素を中心とするシグナル因子の制御拠点 (ハブ) としての RNA 顆粒の役割を提唱するものである。

さらに、カルシニューリンの下流で機能する転写因子 Prz1 の制御因子を同定し、scaffold タンパク質である 14-3-3、および protein kinase A, Calmodulin kinase kinase, Calmodulin kinase などのリン酸化酵素を同定した。

- (3) 化合物ライブラリーを探索し、MAPK シグナル阻害候補シーズとして、ゲルダナマイシン、BIRB を始めとする複数のヒット化合物を取得した。これらの化合物の中には、高等生物の ERK MAPK シグナルを阻害し、抗腫瘍活性を示すものも含まれていたことから、酵母を用いたケミカルゲノミクスが、抗がん剤探索の手段として極めて有用であることを示唆している。

- (4) FTY720, Rapamycin, FK506 などのシグナル伝達阻害薬を利用したケミカルゲノミクスを行い、これらの化合物の細胞内シグナル伝達経路、特に MAPK シグナルに与える影響の解析、ならびにこれらの化合物の感受性に関わる遺伝子群の網羅的同定と機能解析を行った。

特記すべきこととして、新規免疫抑制薬である FTY720 が Ca²⁺濃度の上昇と、カルシニューリンシグナルの活性化を誘導すること、さらに ROS 産生とそれに引き続くストレス応答 MAPK 経路の活性化を引き起こすことを明らかにした。

また、FK506 に感受性を示す一連の遺伝子の解析を通して、細胞内膜輸送、特にゴルジ・エンドゾーム輸送経路の制御因子であるクラスリン・アダプター複合体とその結合タンパク質 Sip1 を同定し、低分子量 G タンパク質 Rho3 との相互作用を介してゴ

ルジ・エンドゾーム経路に必須の役割を持つことを明らかにした。
高度に保存されたタンパク質リン酸化酵素である TOR の抑制薬である Rapamycin を用いたケミカルゲノミクスを展開し、ミトコンドリア機能や tRNA 修飾に関わる因子群が TOR の活性に重要であり、Rapamycin 感受性を決定する重要な因子であることを報告した。

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 21 件 全件査読有)

主要論文 6 件

Chemical genomics approach to identify genes associated with sensitivity to rapamycin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. : Doi A, Fujimoto A, Sato S, Uno T, Kanda Y, Asami K, Tanaka Y, Kita A, Satoh R, Sugiura R. *Genes to Cells*, 20(4):292-309, 2015
doi: 10.1111/gtc.12223.

Negative feedback regulation of calcineurin-dependent Prz1 transcription factor by the CaMKK-CaMK1 axis in fission yeast. : Cisneros-Barroso E, Yance-Chávez T, Kita A, Sugiura R, Gomez-Hierro A, Gimenez-Zaragoza D, Aligue R. *Nucleic Acids Research*.42(15):9573-9587, 2014
doi: 10.1093/nar/gku684.

Fingolimod (FTY720) Stimulates Ca²⁺/Calcineurin Signaling in Fission Yeast : Hagihara K, Kita A, Mizukura A, Yao M, Kitai Y, Kunoh T, Masuko T, Matzno S, Chiba K, Sugiura R. *PLoS One*.8(12):e81907, 2013

DOI: 10.1371/journal.pone.0081907
Acremomannolipin A, the potential calcium signal modulator with a characteristic glycolipid structure from the filamentous fungus *Acremonium strictum*. : Sugiura R, Kita A, Tsutsui N, Muraoka O, Hagihara K, Umeda N, Kunoh T, Takada H, Hirose D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22(21):6735-6739, 2012
doi: 10.1016/j.bmcl.2012.08.085.

Genetic screening for regulators of Prz1, a transcriptional factor acting downstream of calcineurin in fission yeast. : Koike A, Kato T, Sugiura R, Ma Y, Tabata Y, Ohmoto K, O. Sio S, Kuno T. *J. Biol. Chem*.287(23):19294-19303, 2012
doi: 10.1074/jbc.M111.310615.

Role of the RNA-binding Protein Nrd1 in Stress Granule Formation and Its Implication in the Stress Response in Fission Yeast. : Satoh R, Tanaka A, Kita A,

Morita T, Matsumura Y, Umeda N, Takada M, Hayashi S, Tani T, Shinmyozu K, Sugiura R. *PLoS ONE* 7(1): e29683, 2012
doi: 10.1371/journal.pone.0029683.

[学会発表](計 103 件)

主要発表 9 件

Pmk1 MAPK 経路とオートファジー関連因子の機能的関係 : 仁熊久美、片山雄大、小池史華、高橋宏和、南林愛、喜多綾子、佐藤亮介、杉浦麗子
第 88 回日本薬理学会年会
2015 年 3 月 18 ~ 20 日「名古屋国際会議場 (愛知県)」

MAP キナーゼシグナル依存的な RNA 結合タンパク質 Nrd1 による細胞運命制御機構
佐藤亮介、伊藤祐奈、喜多綾子、萩原加奈子、谷時雄、杉浦麗子
第 87 回日本生化学会大会
2014 年 10 月 15 ~ 18 日「国立京都国際会館 (京都府)」

ヒト PDK1 分裂酵母ホモログ Ksg1 の細胞形態制御と Ca²⁺シグナル伝達経路における役割 : 大浦惇義、土井章、宇野貴哉、佐藤駿、神田勇輝、喜多綾子、萩原加奈子、比嘉真理、佐藤亮介、杉浦麗子
第 87 回日本生化学会大会
2014 年 10 月 15 ~ 18 日「国立京都国際会館 (京都府)」

Role of RNA-binding protein in MAPK signaling and cell fate regulation.
Satoh R, Ito Y, Kita A, Hagihara K, Doi A, Sugiura R.

The FEBS EMBO 2014 Conference.
Aug 30-Sep 4, 2014 「Paris (France)」
MAP キナーゼシグナル依存的な RNA 結合タンパク質 Nrd1 によるストレス顆粒形成機構 : 佐藤亮介、伊藤祐奈、喜多綾子、萩原加奈子、谷時雄、杉浦麗子

第 16 回日本 RNA 学会年会
2014 年 7 月 23~25 日「ウインクあいち(愛知県)」

PKC および PKC 下流因子のリン酸化測定による MAPK シグナル活性の解析
神田勇輝、土井章、喜多綾子、成瀬一、杉浦麗子

第 36 回日本分子生物学会年会
2013 年 12 月 3~6 日「神戸ポートアイランド (兵庫県)」

Functional genomics of calcineurin in model organism. Sugiura R.
From Genomics to Proteomics ~ Toward Understanding Gene Function and the Mechanism of Diseases ~
June 27, 2012 「近畿大学 (大阪府)」

Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Regulation: Role of RNA-Binding Proteins in MAPK Signal Transduction Pathway.
Sugiura R.

Special Course on Global Medical Science

June 21, 2012 「神戸大学医学部(兵庫県)」
MAPK Signaling and RNA-granules
Formation in Fission Yeast. Sugiura R.
The 22nd CDB Meeting RNA Sciences in
Cell and Developmental Biology II
June 11 - 13, 2012 「理化学研究所多細胞シ
ステム形成研究センター(兵庫県)」

〔図書〕(計2件)

杉浦麗子: 酵母の生命科学と生物工学 化
学同人 原島俊、高木博史編集
第5章 シグナル伝達と細胞増殖制御
p63-77
2013年8月15日
杉浦麗子: 岩波生物学辞典 第5版 岩波
書店 巖佐庸、倉谷滋、斎藤成也、塚谷裕
一編集 2013年

〔産業財産権〕

出願状況(計6件)

名称: 抗がん剤投与用注射針および投与キッ
ト
発明者: 多賀淳、石渡俊二、喜多綾子、杉浦
麗子、齊藤永宏、高井治、稗田純子、藤田秀
樹
権利者: 学校法人近畿大学、国立大学法人名
古屋大学、有限会社ジーティーオー
種類: 特許
番号: 特願 2012-198847
出願年月日: 2012年9月10日
国内外の別: 国内

名称: 曝露防止用キャップ
発明者: 石渡俊二、多賀淳、西田升三、喜多
綾子、杉浦麗子、藤田秀樹、長谷川満
権利者: 学校法人近畿大学、有限会社ジー
ティーオー、ニプロ株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2012-124149
出願年月日: 2012年5月31日
国内外の別: 国内

意匠に係る物品: バイアル用キャップ
意匠の創作をしたもの: 石渡俊二、多賀淳、
西田升三、喜多綾子、杉浦麗子、藤田秀樹、
長谷川満
種類: 意匠
番号: 意願: 2013-005331
意匠登録出願人: 学校法人近畿大学、有限会
社ジーティーオー、ニプロ株式会社
出願年月日: 2013年3月11日
国内外の別: 国内
他3件

取得状況(計1件)

意匠に係る物品: 容器用封止具
意匠の創作をしたもの: 石渡俊二、多賀淳、
藤田秀樹、西田升三、喜多綾子、杉浦麗子
種類: 意匠
番号: 登録第 1419901号

権利者: 学校法人近畿大学
登録年月日: 2011年7月1日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等
分子医療・ゲノム創薬学研究室
<http://www.phar.kindai.ac.jp/genome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 麗子 (SUGIURA Reiko)
近畿大学・薬学部・教授
研究者番号: 90294206

(2) 研究分担者

喜多 綾子 (KITA Ayako)
近畿大学・薬学部・助教
研究者番号: 00388498

村岡 修 (MURAOKA Osamu)
近畿大学・薬学部・教授
研究者番号: 20142599

藤原 俊伸 (HUJIWARA Toshinobu)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教
授
研究者番号: 80362804

(3) 連携研究者

なし