

Fig. 11. Effect of disruption of REG1 and/or MIG1 on the sensitivity of yeast cells to NaAsO₂. Yeast cells with disrupted genes for REG1 and/or MIG1 as indicated, were grown in SD medium containing NaAsO₂ as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.

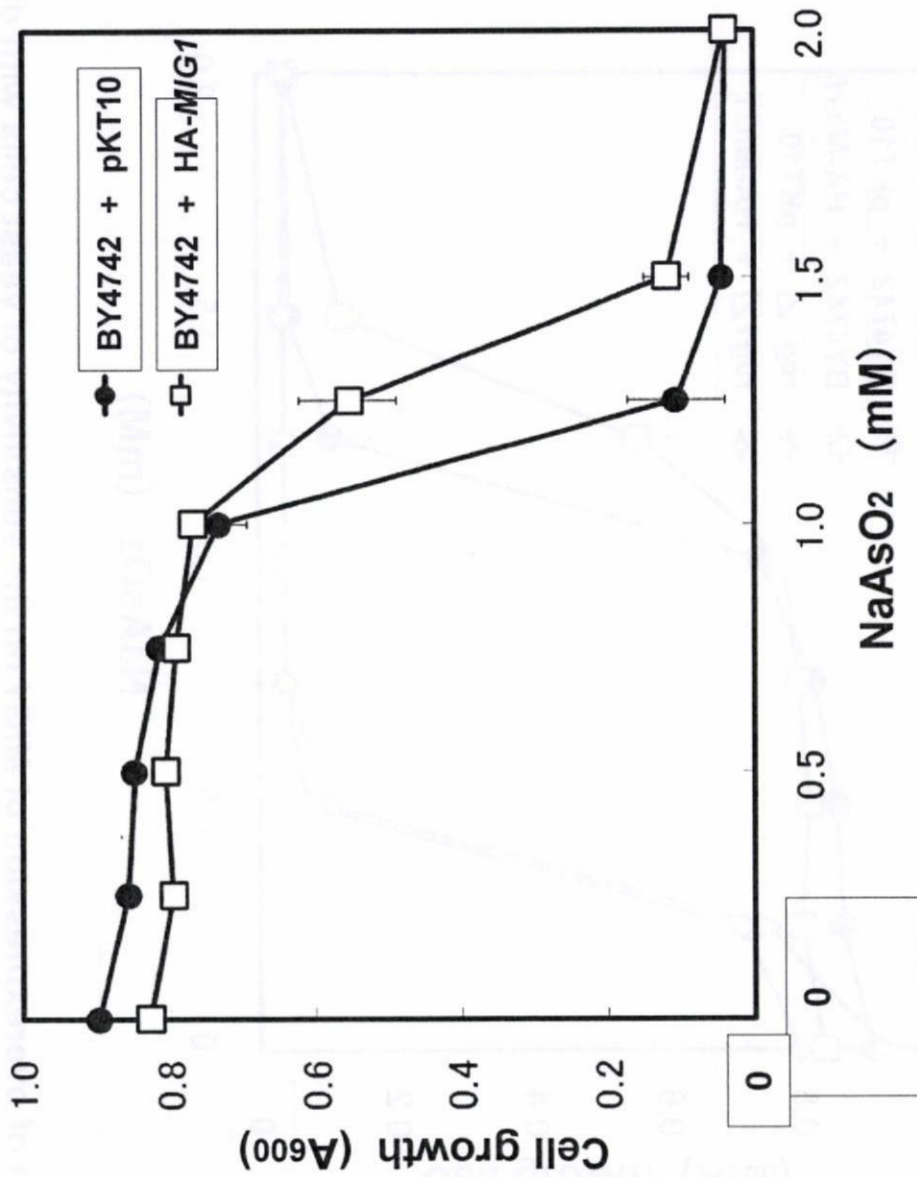


Fig. 12. Effect of overexpression of *MIG1* on the sensitivity of yeast cells to NaAsO₂. Yeast cells, were introduced plasmid pKT10, pKT10-*MIG1*, and grown in SD (-Ura) medium containing NaAsO₂ as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.

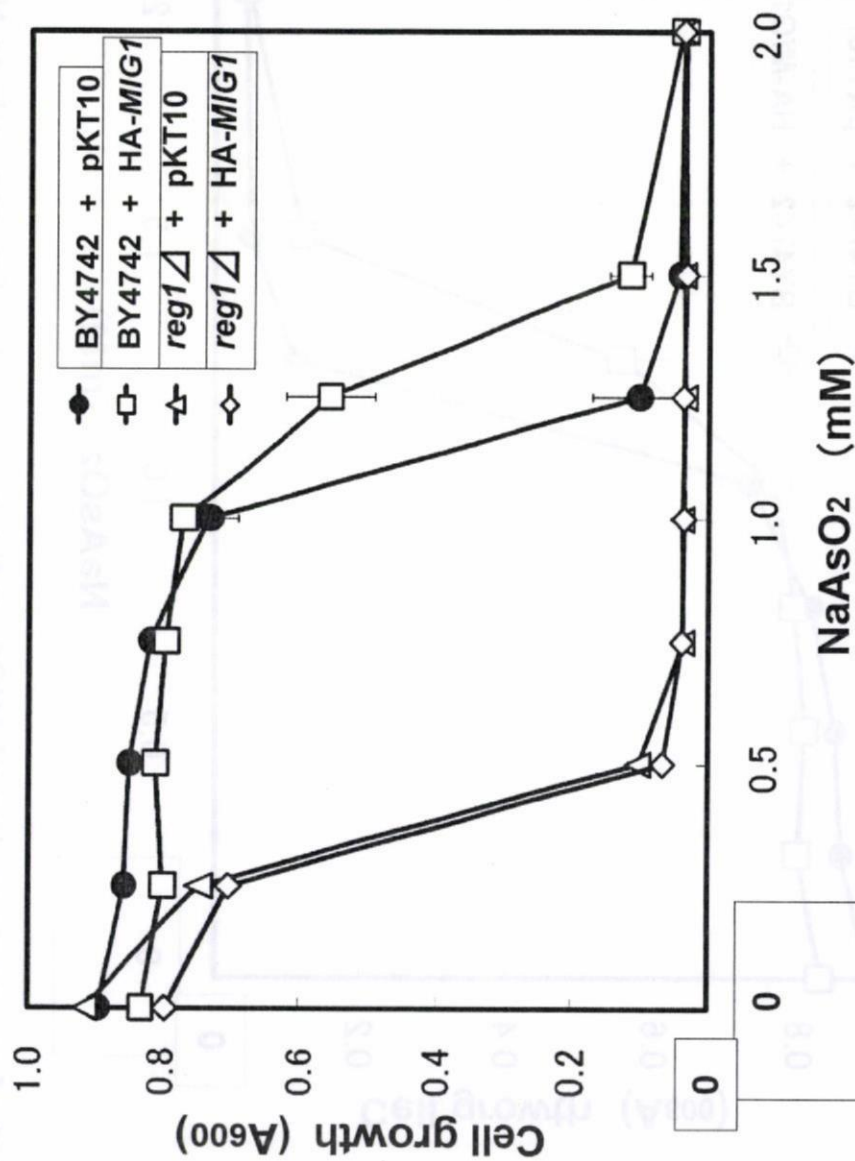


Fig. 13. Effect of overexpression of *MIG1* on the sensitivity of yeast cells with disrupted genes for *REG1* to NaAsO₂. Yeast cells, were introduced plasmid pKT10, pKT10-*MIG1*, and grown in SD (-Ura) medium containing NaAsO₂ as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.

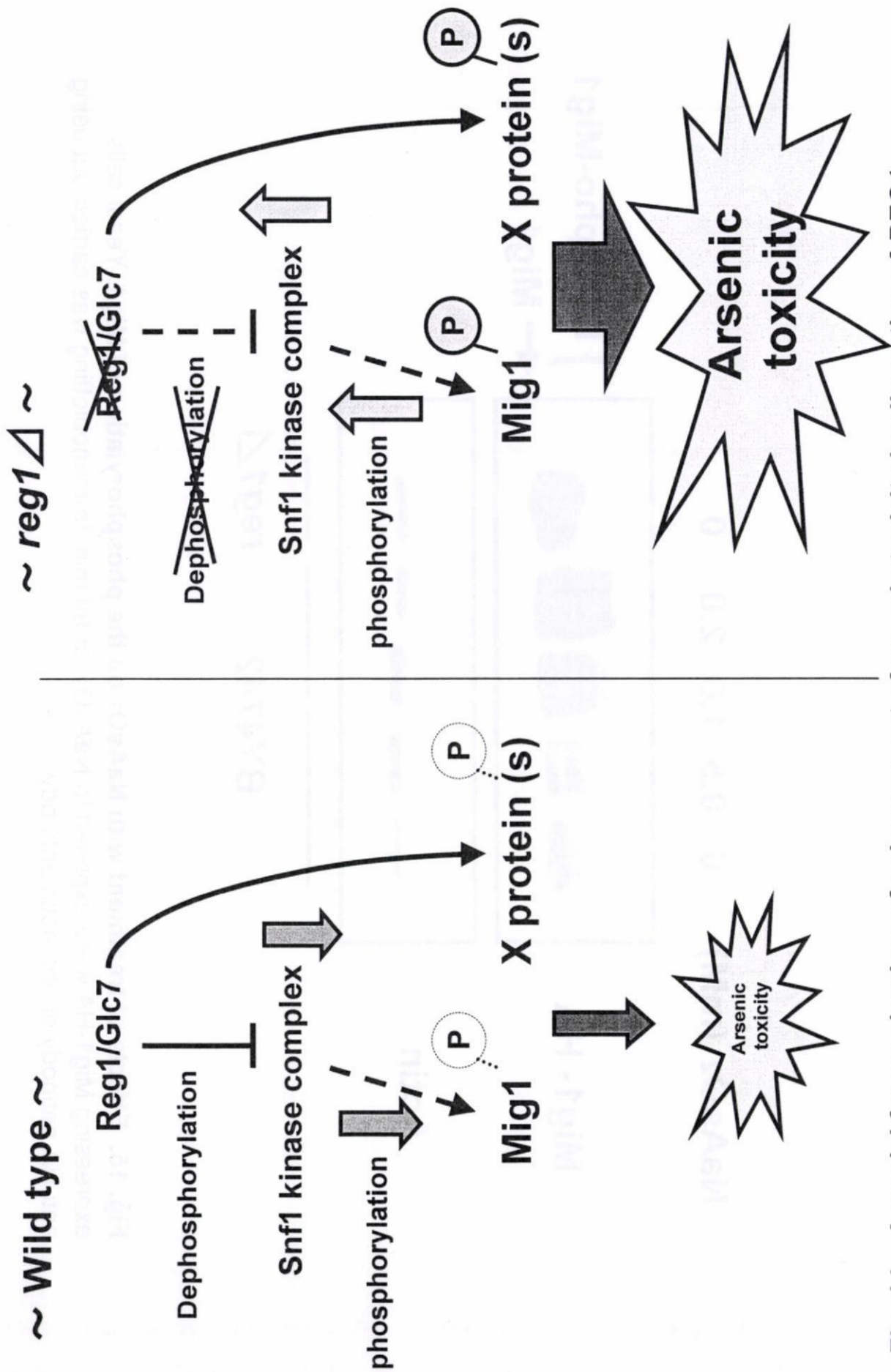


Fig. 14. A model for mechanism of enhancement of arsenic toxicity by disruption of REG1.

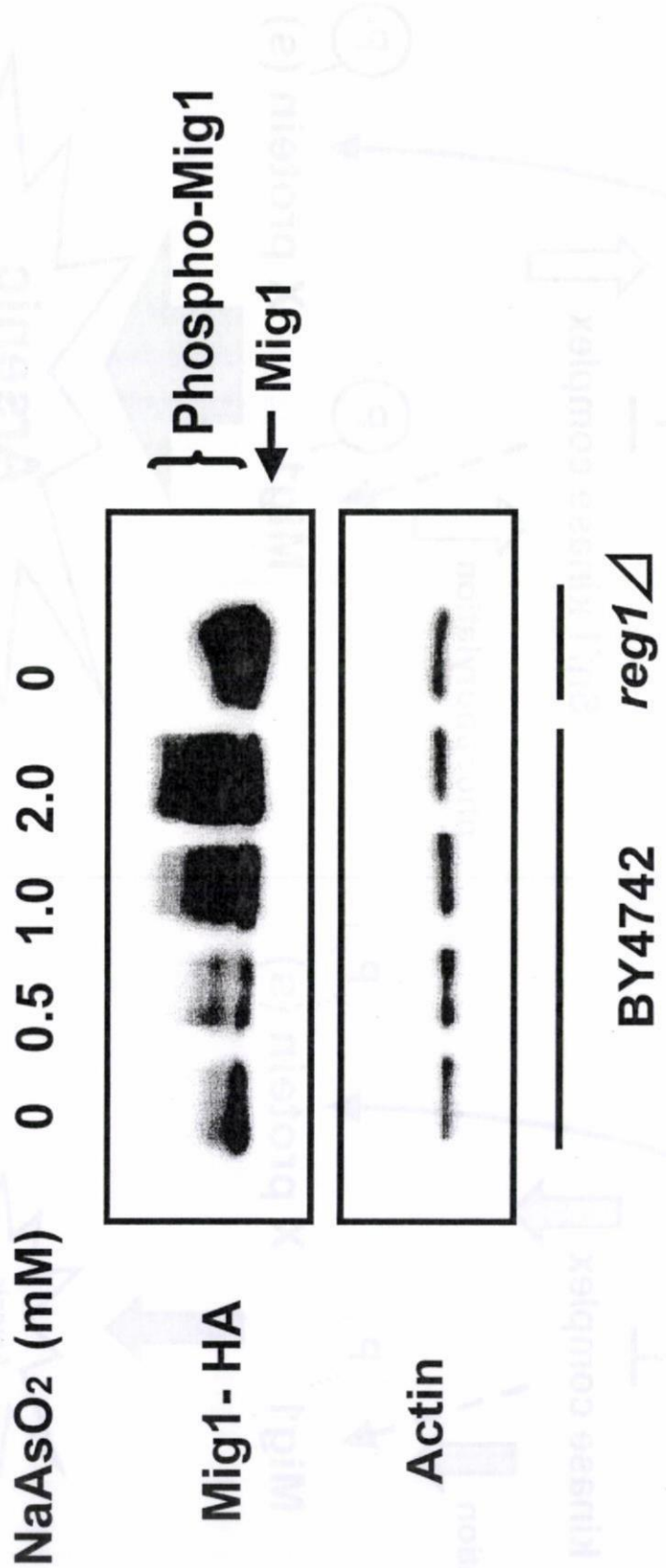


Fig. 15. Effects of treatment with NaAsO₂ on the phosphorylation of Mig1. Yeast cells expressing Mig1-HA were exposed to NaAsO₂ for 90 min. Immunoblotting was carried out using anti-HA antibody or anti-actin antibody.

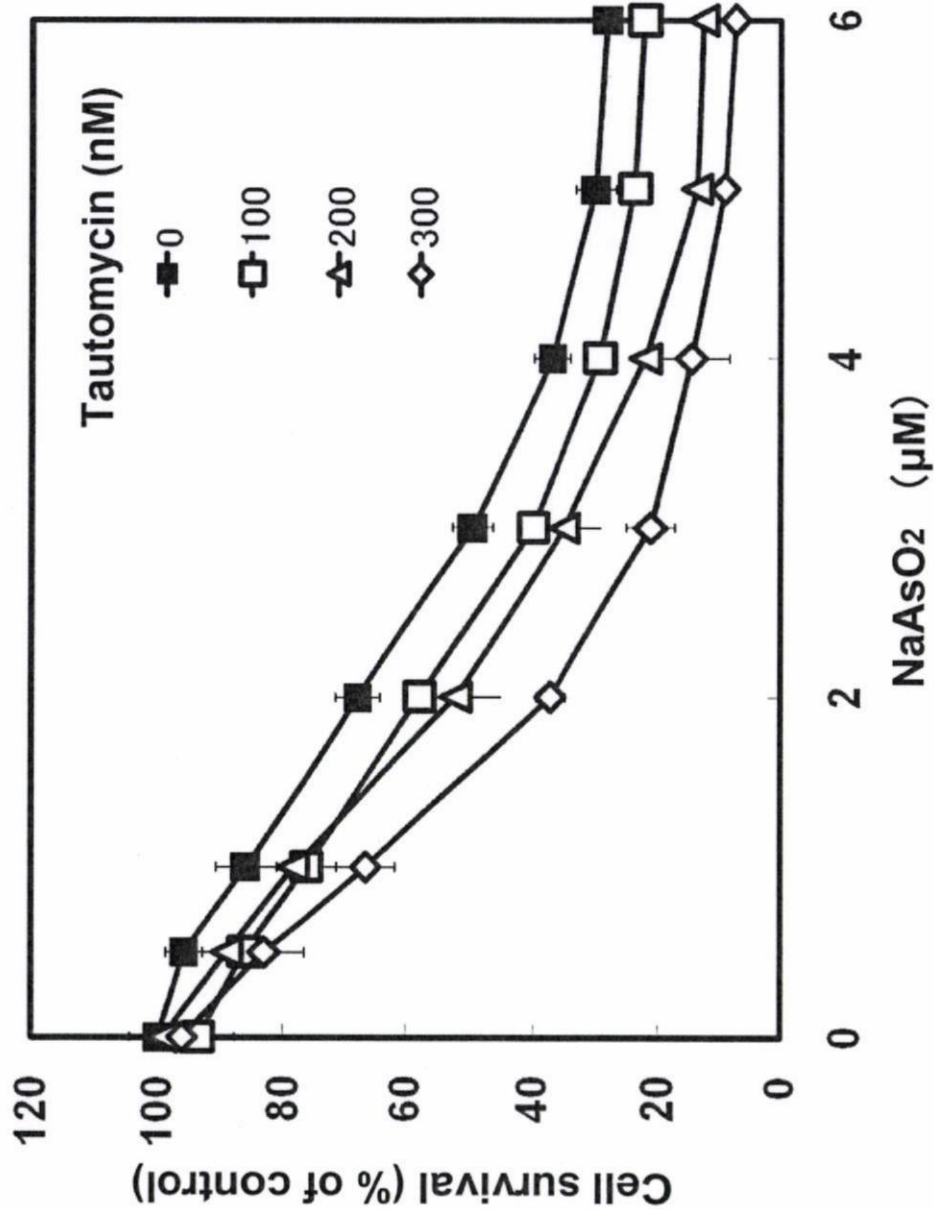


Fig. 16. Effect of tautomycin on the sensitivity of HEK293 cells to NaAsO₂. HEK293 cells were cultured in D'MEM medium. After 12-hr incubation with tautomycin, NaAsO₂ was added and cells were cultured for a further 48-hr. Cell viability was measured by the alamar blue assay. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

（分担）研究報告書

アドリアマイシン毒性の発現における脱ユビキチン化酵素の役割

分担研究者 久下周佐 東北大学大学院薬学研究科准教授

（協力研究者 高橋 勉 東北大学大学院薬学研究科助教）

我々はこれまでに、欠損によって酵母にアドリアマイシン耐性を与える細胞内因子として三種の脱ユビキチン化酵素(Ubp2, Ubp6, Ubp14)を同定している。そこで、アドリアマイシン耐性と脱ユビキチン化酵素の関係について検討した。出芽酵母に存在する17種類の脱ユビキチン化酵素をそれぞれ欠損させた酵母のアドリアマイシン感受性を調べた結果、スクリーニングによって同定されているUbp2, Ubp6, Ubp14に加えて、Ubp4の欠損も酵母にアドリアマイシン耐性を与えることが明らかとなった。一方、欠損によりアドリアマイシン毒性を増強させる脱ユビキチン化酵素としてUbp3, Ubp7, Ubp13が同定された。アドリアマイシン耐性獲得機構における各脱ユビキチン化酵素間の相互作用を明らかにするため、欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える各脱ユビキチン化酵素(Ubp2, Ubp6, Ubp4およびUbp14)を二種類同時に欠損させた酵母(*ubp2Δ ubp4Δ*, *ubp2Δ ubp6Δ*, *ubp4Δ ubp14Δ*)のアドリアマイシン感受性を検討した。その結果、各二重欠損酵母はそれぞれの単独欠損酵母と比べ、相加的なアドリアマイシン耐性の増強を示した。したがって、これらの脱ユビキチン化酵素は、それぞれ異なる経路を介してアドリアマイシン毒性に関与している可能性が考えられる。脱ユビキチン化酵素の欠損によって、細胞内ユビキチン量が低下することが報告されているが、脱ユビキチン化酵素欠損酵母(*ubp2Δ*, *ubp6Δ*)にポリユビキチンUbi4を高発現させてもアドリアマイシン感受性に変化がなかったことから、Ubp2の欠損およびUbp6の欠損によるアドリアマイシン耐性獲得には、細胞内ユビキチン量の低下は関与しないと考えられる。さらに、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得には既知のアドリアマイシン耐性獲得機構である細胞内抗酸化機構の亢進やアドリアマイシンの細胞外への排出の促進は関与していないことから、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリ

アマイシン耐性獲得機構は、これまで知られていない全く新しい耐性獲得機構である可能性が考えられる。

A. 研究目的

アドリアマイシンはアントラサイクリン系の制癌剤であり、悪性リンパ腫や乳癌、肺癌など様々な悪性腫瘍の治療に用いられる。アドリアマイシンの作用機序として、DNA インターカレーションによる核酸合成の阻害、DNA トポイソメラーゼの阻害、フリーラジカルの産生などが知られているが、不明な点も多い。

一方、アドリアマイシンを用いた癌治療において、心臓毒性や骨髄抑制などの副作用と並んで、アドリアマイシン耐性癌細胞の出現が問題となっている。癌細胞のアドリアマイシンに対する耐性獲得機構としては、P 糖蛋白質や multidrug resistance protein (MRP) などの ATP binding cassette (ABC) トランスポーターの過剰発現による薬剤の細胞外への排出促進がよく知られている。P 糖蛋白質による排出以外にもアドリアマイシン耐性に関わる因子は多数報告されているが、これらの機構だけでは説明できない耐性細胞も多く存在する。したがって、アドリアマイシン耐性獲得機構の全容解明が求められている。

我々は、全ゲノム配列が決定されてお

り、遺伝学的な解析が容易な出芽酵母を用いてアドリアマイシン感受性に影響を与える因子の網羅的な検索を行ない、欠損することで酵母にアドリアマイシン耐性を与える因子を 105 種同定している。その中には脱ユビキチン化酵素 (Deubiquitylating enzyme) が 3 種 (Ubp2, Ubp6, Ubp14) 含まれていたが、これまでに脱ユビキチン化酵素とアドリアマイシン耐性の関係についての検討例はない。そこで本研究では出芽酵母を用いて脱ユビキチン化酵素とアドリアマイシンとの関わりについて解析を行なった。

B. 実験方法

1. 酵母のアドリアマイシン感受性試験 (液体培地)

酵母を SD 培地で一晚培養後、 $1 \times 10^4/180 \mu\text{L}$ となるように SD 培地で希釈した。96-well plate に各濃度 (0 ~ 120 μM) のアドリアマイシン溶液を 20 μL ずつ添加した後、さらに各酵母の希釈液を 180 μL ずつ加え、30°C で 48 時間培養した。その後、600 nm における吸光度を Benchmark Plus™ (Bio-Rad) で測定して酵母の増殖を調べた。

2. 酵母のアドリアマイシン感受性試験

験 (寒天培地)

酵母を SD 培地で一晚培養後、 1×10^7 , 2×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 cells/mL となるように SD 培地で希釈し、アドリアマイシンを含む寒天培地に $5 \mu\text{L}$ スポットした (final : 5×10^4 , 1×10^4 , 2×10^3 , 4×10^2 cells/spot)。その後、 30°C で 48 時間培養し、観察した。

3. Glass beads 法による酵母 genomic DNA の抽出

YPAD 培地 2 mL で一晚培養した酵母を集菌し、滅菌水で洗浄した後に $200 \mu\text{L}$ の breaking buffer に懸濁した。懸濁液に $200 \mu\text{L}$ の PCI と適当量の glass beads を加え、3 分間攪拌することにより酵母を粉碎後、 $20,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、上清を回収し、当量の 2-プロパノール、および NaCl 溶液 (最終濃度 ; 0.1 M) を加えて 5 分室温で放置した。その後、 $20,000 \times g$ で 10 分間遠心分離を行い、genomic DNA を沈殿させ、70%エタノールで洗浄後、TE buffer に溶解した。

4. 二重欠損酵母の作製

分裂酵母 (*Saccharomyces pombe*) 由来の *HIS5* 遺伝子を持つ plasmid pUG27 のプロモーターおよびターミネーターの塩基配列と、遺伝子欠損株ライブラリーの酵母の kanamycin 耐性遺伝

子 *kanMX4* のプロモーターおよびターミネーターの塩基配列が同じであることを利用し、*HIS5* 遺伝子マーカーによる gene disruption cassette の作製を行なった。Complete set of *saccharomyces cerevisiae* gene disruption strains (Euroscarf) の各遺伝子欠損株に PCR で増幅した *HIS5* フラグメントを酢酸リチウム法により導入し、得られた histidine 非要求性コロニーを kanamycin 耐性遺伝子マーカーが *HIS5* マーカーに置き換わった遺伝子欠損株候補とした。

Kanamycin 耐性遺伝子マーカーの *HIS5* マーカーへの置換を確認するために、glass beads 法によって遺伝子欠損株候補から chromosomal DNA の回収を行なった。得られた chromosomal DNA を template として目的の遺伝子の外側の配列に設計した primer の PCR を行い、その PCR 産物の大きさをアガロース電気泳動で調べることにより、*HIS5* マーカーによって各遺伝子が置換されたことを確認した。また、この PCR 産物を二重欠損株の作製に用いた。

作製した各遺伝子欠損株作製用カセットを別の遺伝子欠損酵母に酢酸リチウム法により導入した。YPAD 培地 2 mL で一晚振盪培養した酵母を 5×10^6 cells/mL となるように希釈し、 30°C で 3 時間培養した。その後、集菌

した酵母を酢酸リチウム溶液で 2.0×10^9 cells/mL となるように懸濁し、 30°C で 15 分間インキュベートした。この懸濁液 $50 \mu\text{L}$ に chromosomal DNA を $1.0 \mu\text{g}$ 、加熱変性サケ精子 DNA を $50 \mu\text{g}$ 、40% polyethylene glycol (4000) を $300 \mu\text{L}$ 加え、 30°C で 30 分間インキュベートした。さらに、 42°C で 15 分間 heatshock を行なった後に集菌し、滅菌水 100L に懸濁して全量を SD 寒天培地に塗布し、 30°C で 48 時間培養した。そして、ここで得られた histidine 非要求性コロニーを遺伝子欠損株候補とした。各遺伝子の欠損を確認するために、glass beads 法によって遺伝子欠損株候補から chromosomal DNA の回収を行なった。得られた chromosomal DNA を template として各遺伝子のさらに外側に設計した primer を用いて PCR を行い、その PCR 産物の大きさをアガロース電気泳動で調べることにより、*HIS5* マーカーによって各遺伝子が欠損された酵母が作製されたことを確認した。

C. 結果・考察

1. アドリアマイシン耐性に関わる脱ユビキチン化酵素の検索

アドリアマイシン耐性に関わる脱ユビキチン化酵素を明らかにするため、17 種類の脱ユビキチン化酵素をそれ

ぞれ欠損させた酵母のアドリアマイシン感受性を検討した。その結果、廣瀬らのスクリーニングで同定された Ubp2, Ubp6 および Ubp14 の 3 種に加えて、Ubp4 を欠損させた酵母もアドリアマイシンに対して耐性を示すことが明らかとなった (Fig. 2-1)。

一方、Ubp3, Ubp7 および Ubp13 の欠損は酵母にアドリアマイシン高感受性を与えるということが明らかとなった (Fig. 2-1)。

次に、アドリアマイシン耐性獲得機構における各脱ユビキチン化酵素の相互関係を調べるために、2 種類の脱ユビキチン化酵素を同時に欠損させた酵母を作製し、液体培地におけるアドリアマイシン感受性を調べた。その結果、Ubp2/Ubp4、Ubp2/Ubp6 および Ubp4/Ubp14 の二重欠損株は、それぞれの単独欠損株に比べ、高いアドリアマイシン耐性を示した (Fig. 2-2-A)。また、Ubp6/Ubp14 の二重欠損株は wild type と同程度のアドリアマイシン感受性を示し、Ubp6 および Ubp14 それぞれの単独欠損によるアドリアマイシン耐性が認められなかった (Fig. 2-2-B)。Ubp4/Ubp6 および Ubp2/Ubp14 の二重欠損株に関しては、growth が遅く、アドリアマイシン感受性を検討することはできなかった。

2. 脱ユビキチン化酵素欠損によるア

ドリアマイシン耐性獲得機構の解析

脱ユビキチン化酵素が欠損すると、ユビキチン前駆体のプロセッシングやユビキチン化蛋白質からのユビキチンの解離ができなくなるため、細胞内のユビキチン量が減少することが知られている。そこで、細胞内ユビキチン量の低下がアドリアマイシン感受性に影響を与える可能性を考え、脱ユビキチン化酵素欠損株にポリユビキチン Ubi4 を高発現させて、アドリアマイシン感受性を調べた。その結果、Ubi4 の高発現は Ubp2 および Ubp6 の欠損によるアドリアマイシン耐性に影響を与えなかった (Fig. 3-1)。

既知のアドリアマイシン耐性獲得機構として、細胞内抗酸化機構の亢進、細胞外へのアドリアマイシンの排出促進などが知られている。そこで次に、これら既知のアドリアマイシン耐性獲得機構と脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得機構の関係を検討した。アドリアマイシン耐性を示す脱ユビキチン化酵素欠損酵母の、他の酸化ストレス誘導物質 (過酸化水素とパラコート) に対する感受性を調べたところ、Ubp2, Ubp6, Ubp14 欠損酵母は両物質に対して耐性を示さなかった。また、Ubp4 欠損株は過酸化水素に対しては wild type とほぼ同程度の感受性を示したが、パラコートに対しては逆に高感受性を示し

た (Fig. 3-2-A)。また、DNA 傷害剤であるシスプラチンおよびブレオマイシンに対して、Ubp2, Ubp6, Ubp14 欠損株は wild type とほぼ同程度の感受性を示した。また、Ubp4 欠損株はシスプラチンに対しては wild type と同程度の感受性を示したが、ブレオマイシンに対しては高感受性を示した (Fig. 3-2-B)。

さらに、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得が細胞外へのアドリアマイシン排出の促進によるものである可能性を考え、各脱ユビキチン化酵素欠損酵母の細胞内アドリアマイシン蓄積量を検討した。その結果、いずれの欠損株も wild type に比べ細胞内アドリアマイシン蓄積量が減少することはなく、Ubp6 欠損株は逆に蓄積量の増加が観られた (Fig. 3-3)。

D. 考察

出芽酵母に存在する 17 種類の脱ユビキチン化酵素のうち、Ubp2, Ubp4, Ubp6 および Ubp14 の欠損が酵母にアドリアマイシン耐性を与え、また、Ubp3, Ubp7 および Ubp13 の欠損が酵母のアドリアマイシン毒性を増強することが明らかとなった。

アドリアマイシン感受性に影響を与えることが明らかとなった脱ユビキチン化酵素は、Table 1 および Table 2

に示したように、様々な基質タンパク質の分解調節や活性調節を介して多様な経路において重要な役割を果たしている。したがって、各脱ユビキチン化酵素はそれぞれ異なる基質の制御を介してアドリアマイシン感受性決定機構に関与している可能性が考えられる。Ubp2/Ubp4、Ubp2/Ubp6 および Ubp4/Ubp14 の二重欠損酵母は、それぞれの単独欠損酵母に比べ、さらに高いアドリアマイシン耐性を示した。このことから、各脱ユビキチン化酵素はそれぞれ異なる機構でアドリアマイシン耐性に関与していると考えられる。

また、Ubp6/Ubp14 を同時に欠損させた場合には、アドリアマイシン感受性はほとんど変化せず、それぞれの脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性が認めらなくなった。Ubp6 欠損株で認められる表現型（翻訳阻害剤 anisomycin 高感受性）が、Ubp14 の同時欠損によって回復することが知られている。したがって、Ubp6 と Ubp14 は互いの機能に影響を与え合いながら、アドリアマイシン耐性獲得機構に関わっている可能性も否定できない。

脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得に細胞内ユビキチンレベルの低下が関わっている可能性が考えられたが、ポリユビキチ

ンである Ubi4 の高発現は Ubp2 および Ubp6 の欠損によるアドリアマイシン耐性に影響を与えなかった。したがって、少なくとも Ubp2 および Ubp6 の欠損によるアドリアマイシン耐性獲得機構に、細胞内ユビキチン量の減少は関与していないと考えられる。

また、アドリアマイシン耐性を示す脱ユビキチン化酵素欠損酵母は酸化ストレス誘導物質である過酸化水素とパラコートに対し耐性を示さなかった。したがって、各脱ユビキチン化酵素欠損酵母が全ての酸化ストレス誘導物質に対して耐性を示すわけではないことから、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得に細胞内抗酸化機構の亢進は関与していないと考えられる。さらに各脱ユビキチン化酵素欠損酵母は、アドリアマイシンと同じく DNA 傷害作用を持つ制癌剤であるシスプラチンおよびブレオマイシンに対して耐性を示さないことから、脱ユビキチン化酵素欠損による耐性獲得は、アドリアマイシンに比較的特異的な現象であると考えられる。

細胞外へのアドリアマイシン排出促進がアドリアマイシン耐性の獲得に関与することが知られているが、各脱ユビキチン化酵素欠損酵母の細胞内アドリアマイシン蓄積量は wild type に比べ減少することはなかった。この

結果から、脱ユビキチン化酵素の欠損は細胞内アドリアマイシン蓄積量を低下させることなく酵母にアドリアマイシン耐性を与えると考えられる。脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得機構は、既知のアドリアマイシン耐性獲得機構とは異なり、これまで知られていない全く新しい耐性獲得機構である可能性が考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

晴山聖子、廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章：酵母におけるアドリアマイシン耐性獲得機構における脱ユビキチン化酵素の関与. 第46回日本薬学会東北支部大会, 2007

- E. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

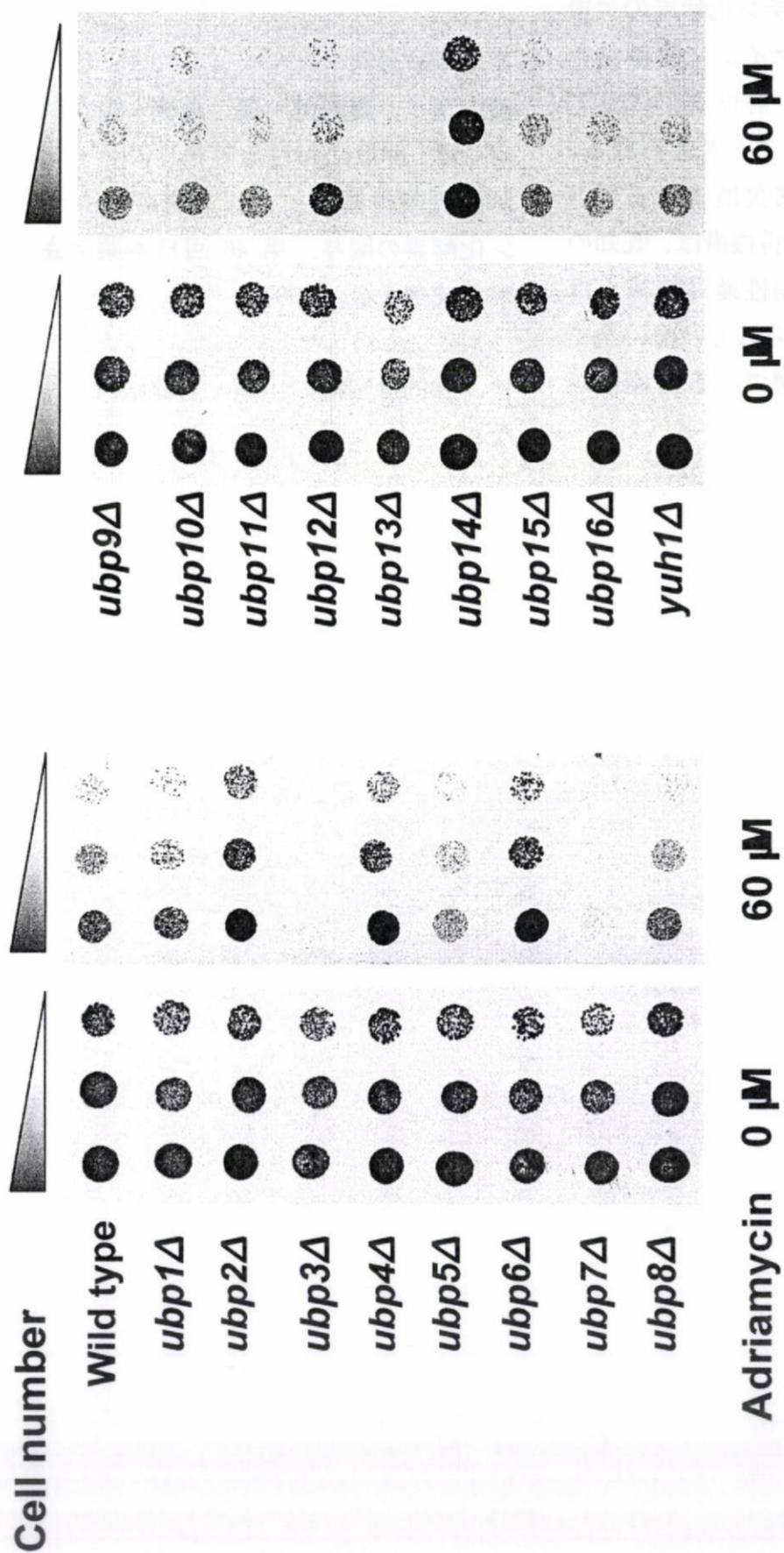


Fig. 2-1. 脱ユビキチン化酵素の欠損がアドリアマイシン感受性に与える影響

各脱ユビキチン化酵素欠損株をSD培地に 1×10^7 , 2×10^6 , 4×10^5 cells/mL となるように懸濁し、アドリアマイシンを含む寒天培地に5 μsスポットした(final : 5×10^4 , 1×10^4 , 2×10^3 , cells/spot)。その後、30°Cで48時間培養し、観察した。

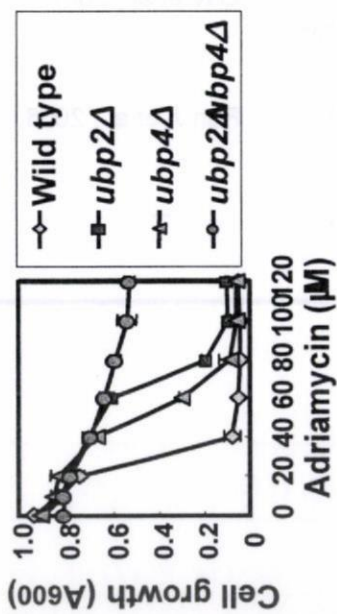
Table 1. 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える脱ユビキチン化酵素

	細胞内局在	細胞内における働き	参考文献
<i>UBP2</i>	細胞質	<ul style="list-style-type: none"> ・ K63を介したポリユビキチン鎖の脱ユビキチン化 	Kee Y. et al., 2006
<i>UBP4</i>	エンドソーム膜	<ul style="list-style-type: none"> ・ DNA修復やキナーゼの活性化 ・ MVB (multivesicular body) pathwayにおける脱ユビキチン化 	Amerik A. et al., 2000 Dupre S. et al., 2001
<i>UBP6</i>	プロテアソームと複合体を形成	<ul style="list-style-type: none"> ・ K48に形成されたポリユビキチン鎖の脱ユビキチン化 ・ プロテアソームによるタンパク質分解の制御 	Russell NS. et al., 2004
<i>UBP14</i>	細胞質	<ul style="list-style-type: none"> ・ ポリユビキチン鎖の切断 ・ K29に形成されたポリユビキチン鎖の脱ユビキチン化 	Russell NS. et al., 2004

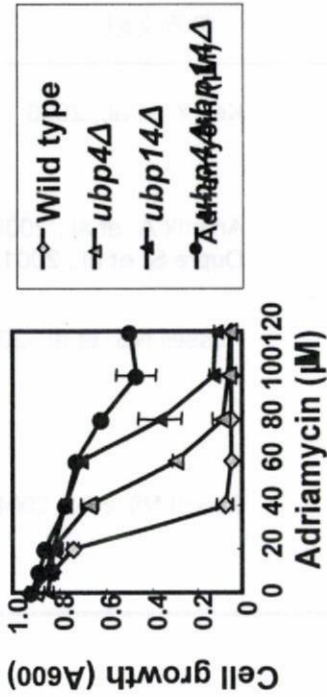
Table 2. 欠損により酵母にアドリアマイシン高感受性を与える脱ユビキチン化酵素

	細胞内局在	細胞内における働き	参考文献
<i>UBP3</i>	細胞質	<ul style="list-style-type: none"> ・ 小胞体-ゴルジ体間の輸送 ・ クロマチンのサイレンシングの抑制 	Li K. et al., 2007
<i>UBP7</i>	細胞質	<ul style="list-style-type: none"> ・ Rsp5依存的なMVBによるCps1の輸送阻害 	Ren J. et al., 2006
<i>UBP13</i>	不明	不明	—

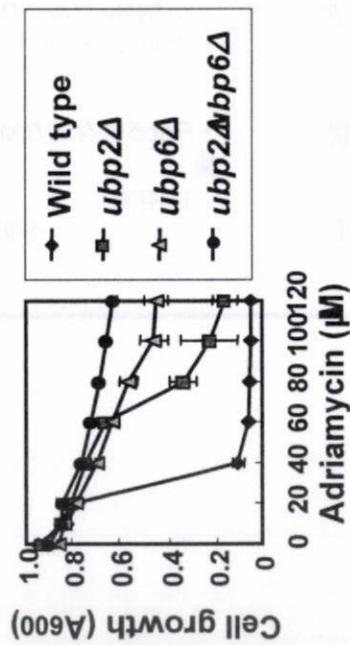
A. Ubp2とUbp4の関係



Ubp4とUbp14の関係



Ubp2とUbp6の関係



B.

Ubp6とUbp14の関係

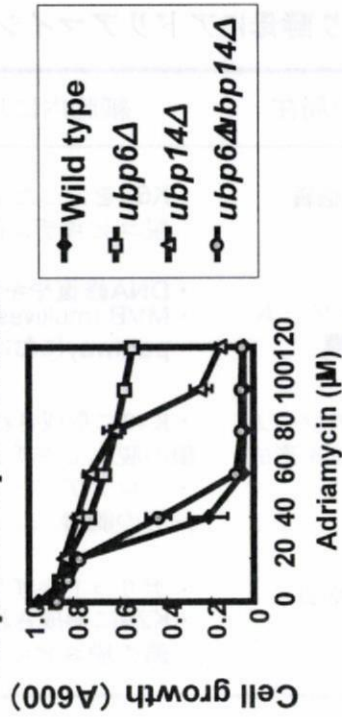
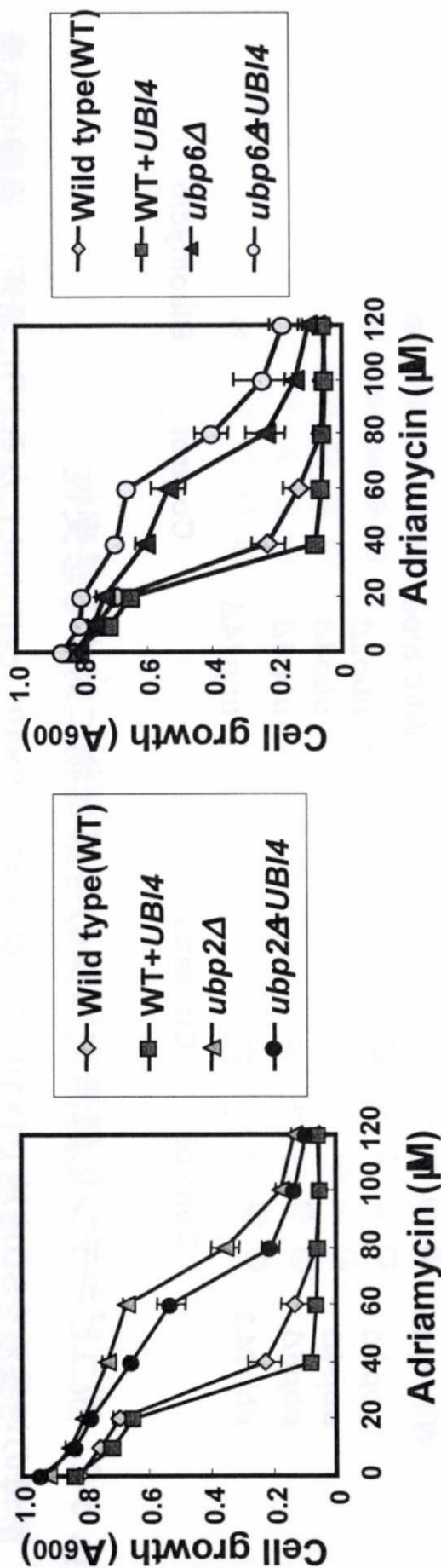


Fig. 2-2. アドリアマイシン耐性獲得機構における各脱ユビキチン化酵素の相互関係

各酵母をSD培地で一晚培養後、 1×10^4 /180 μ LとなるようにSD培地で希釈した。96-well plateに各濃度(0~120 μ M)のアドリアマイシン溶液を20mLずつ添加した後、さらに各酵母の希釈液を180 μ Lずつ加え、30°Cで48時間培養した。その後、600 nmにおける吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。

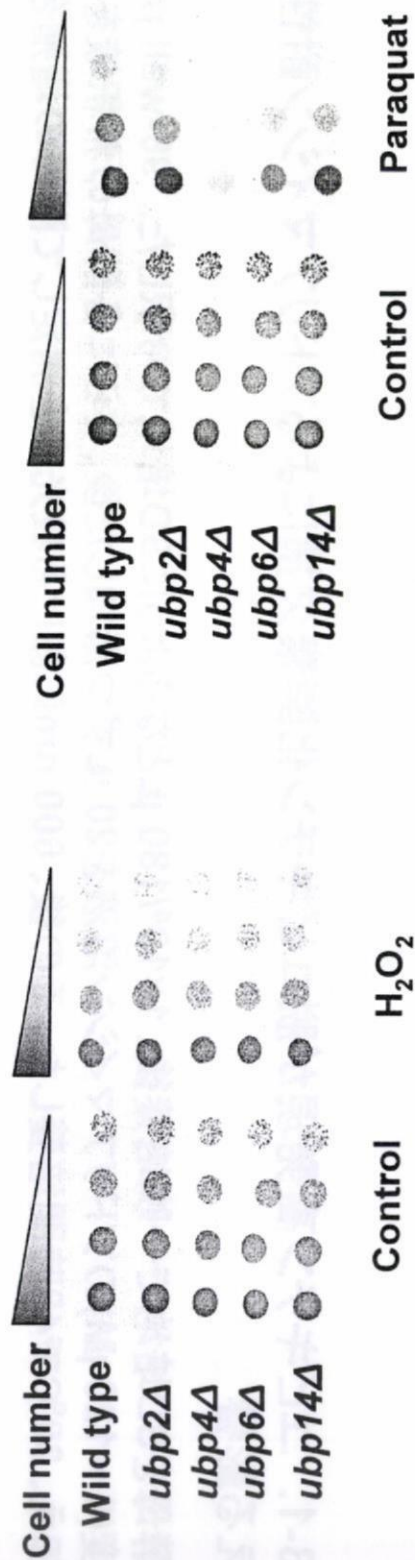


Ubi4 : Polyubiquitin

Fig. 3-1. ユビキチン高発現が脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得機構に与える影響

各酵母をSD培地で一晚培養後、 $1 \times 10^4 / 180 \mu\text{M}$ となるようにSD培地で希釈した。96-well plateに各濃度(0~120 μM)のアドリアマイシン溶液を20 μL ずつ添加した後、さらに各酵母の希釈液を180 μL ずつ加え、30°Cで48時間培養した。その後、600 nmにおける吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。

A. 脱ユビキチン化酵素の欠損が酸化ストレス誘発物質に対する感受性に与える影響



B. 脱ユビキチン化酵素の欠損がDNA傷害剤に対する感受性に与える影響

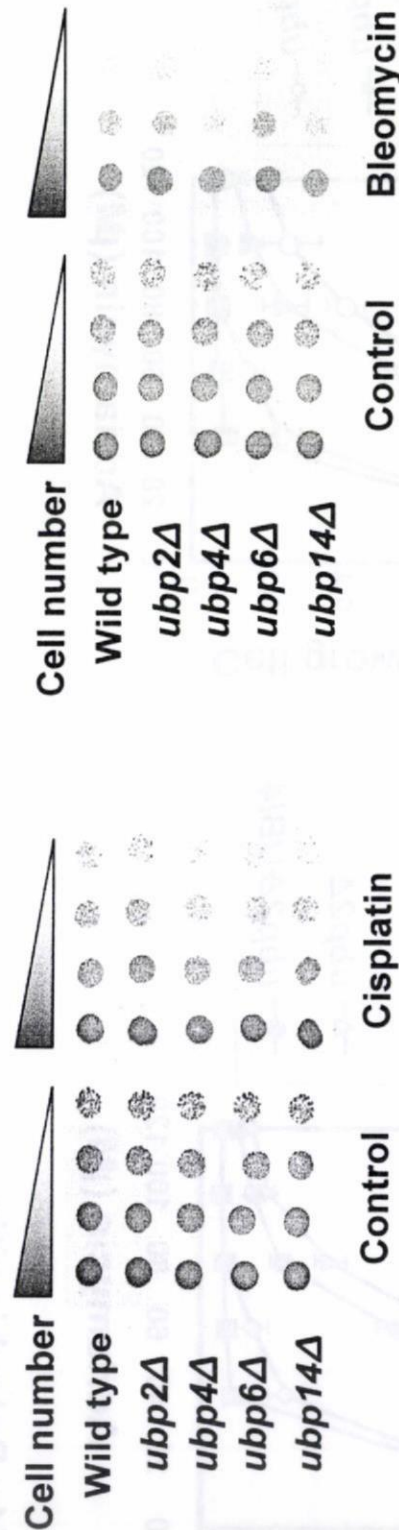


Fig. 3-2. 脱ユビキチン化酵素欠損株の各薬毒物に対する感受性

酵母の培養液をSD培地で 1×10^7 , 2×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 cells/mLになるように希釈し、過酸化水素(0.5 mM)、パラコート(0.5 mM)、シスプラチン(200 μ M)、ブレオマイシン(10 μ g/mL)を含むSD寒天培地に5 μ Lスポットした (final : 5×10^4 , 1×10^4 , 2×10^3 , 4×10^2 cells/spot)。その後、30°Cで48時間培養し、観察した。

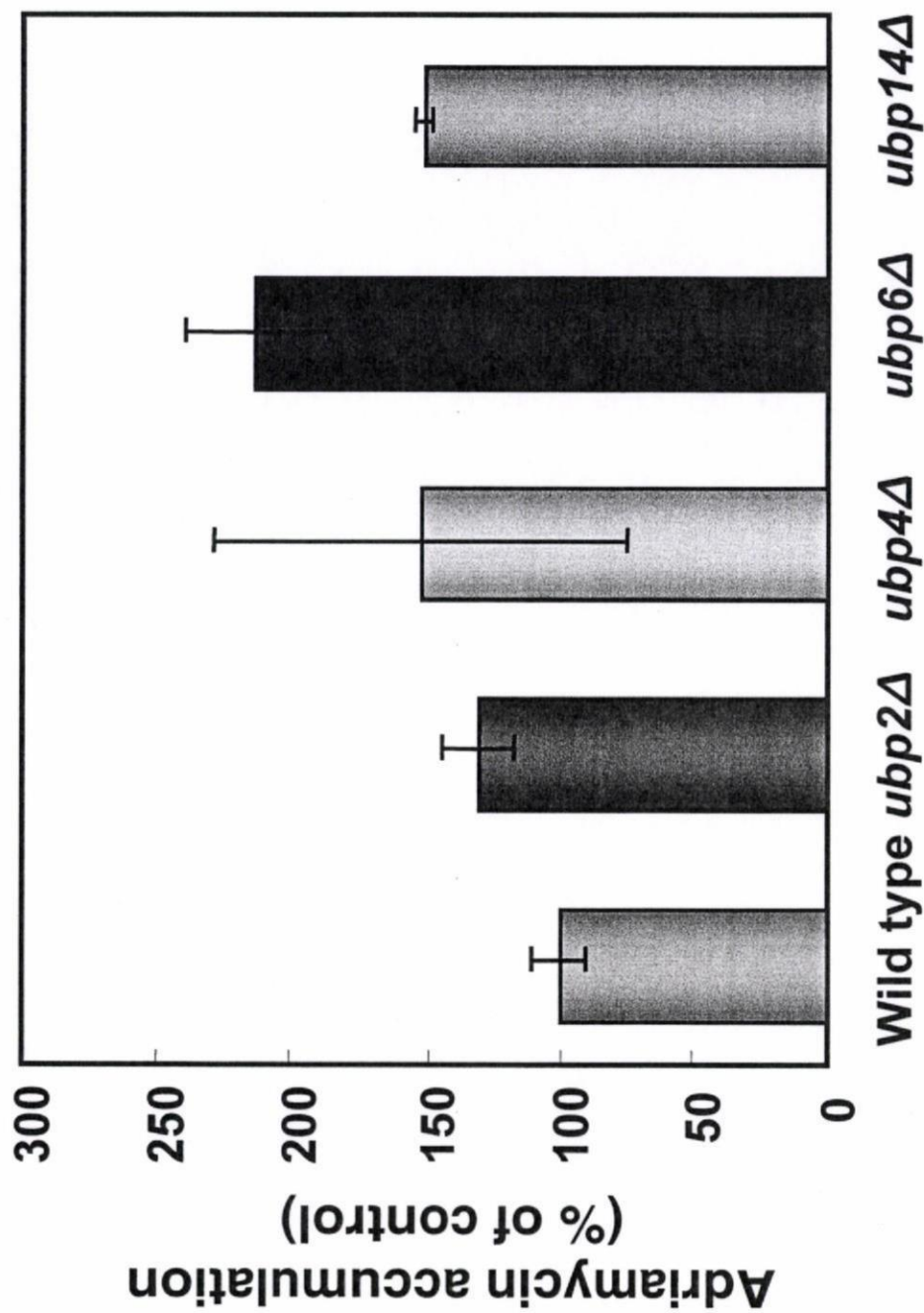


Fig. 3-3 脱ユビキチン化酵素の欠損が細胞内アドリアマイシン蓄積量に与える影響

酵母を80 μ Mのアドリアマイシン存在下で1時間培養後、洗浄し、200 μ LのPBSに再懸濁した。この懸濁液の蛍光強度をfluorescent plate reader (Spectra Max Gemini XS, Molecular devices) (励起波長:472 nm, 吸収波長:590 nm)を用いて測定した。

別添5 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表