

# 出芽酵母非必須遺伝子破壊株の形態情報に基づく薬剤作用標的の探索

2006年3月 先端生命科学専攻 学生証番号 46515

生命応答システム分野 岡 さとみ

指導教官 大矢 禎一 教授

キーワード 薬剤 出芽酵母 非必須遺伝子 表現型

## 序論：

細胞内において薬剤が作用する標的タンパク質を同定することは、その薬理作用の分子機構を解明する上で極めて重要であるが、一般的にはそれほど容易なことではない。しかしながら薬剤とその標的タンパク質の関係は多くの真核生物で保存されていることから、たとえば酵母において標的タンパク質を同定できれば、ヒトなどの動物細胞における薬剤の標的タンパク質の同定にも有意義な情報を提供することができると考えられる。これまで出芽酵母では、二倍体のヘテロ遺伝子破壊株を用いて、薬剤による生育阻害を指標にして標的タンパク質をスクリーニングする方法 (Lum *et al.*, 2004, Giaever *et al.*, 2004) が提案されてきたが、作用点探索のための指標はあくまでも「生育の阻害」ひとつしかなかった。そこで本研究では注目する観点の数を増やし、より信頼性の高い、簡便なスクリーニング方法を確立することを目的とした。そのために、本研究室が共同で開発した CalMorph という酵母細胞の顕微鏡画像解析プログラム (Ohtani *et al.*, 2004) を用いることにし、そこから得られる定量的な 501 の表現型パラメータ情報から、薬剤の標的タンパク質の新しい探索方法を提案した。

## 結果：

### <前提>

まず薬剤標的探索の新しいストラテジーを構築するにあたり、以下の2つの前提をおくこととした。

- 1) 薬剤処理によって表れる形態変化は、薬剤の標的タンパク質の機能を欠損させることによって引き起こされる。
- 2) 薬剤の影響を受けているパラメータでは、濃度依存的に異常性が増加する。

前提の1) が成り立つ場合には、以下の A と C が、前提の1) と2) から以下の B が導かれる。

A 薬剤で処理された細胞は、薬剤の標的タンパク質の遺伝子欠損株と同様の形態を示す。

B 薬剤による効果が完全ではない場合には、薬剤で処理された細胞より、薬剤の標的タンパク質の遺伝子欠損株の細胞の方がより顕著な形態変化を示す。

C 薬剤で処理した細胞が異常性を示す表現型パラメータのほぼ全てにおいて、薬剤の標的タンパク質の遺伝子欠損株は異常性を示す。

### <ストラテジー>

以上の前提をもとに、定量的な 501 の表現型パラメータを指標にした薬剤標的探索のストラテ

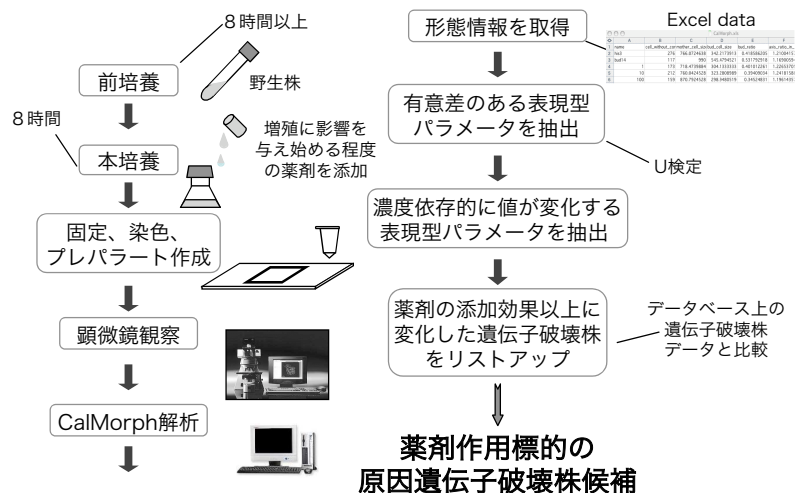


図1 薬剤標的探索の新規ストラテジー

ジーを考えた (図 1)。

#### <検証実験>

作用標的がすでにわかっているHU (hydroxyurea: リボヌクレオシド 2リン酸レダクターゼ複合体に結合して不活性化する。) とLAT-A (Latrunculin A: 単量体アクチンに結合してアクチンの重合を阻害する。) を用いて、このストラテジーの検証を行った。いずれの薬剤の場合にも増殖に影響を与え始める比較的低濃度の薬剤で酵母細胞を処理し、CalMorphで形態情報を取得した。

**HUを用いた実験結果:** U 検定により 501パラメータ中 25 の表現型パラメータで有意差が検出され、そのうち 24 パラメータで形態が濃度依存的に変化した。更に、その 24 パラメータで薬剤処理細胞よりも顕著な異常値を示した変異株をデータベースより抽出したところ、HU の標的タンパク質リボヌクレオチドレダクターゼ複合体の変異である *rnr4* 変異株が全ての表現型パラメータにおいて異常性を示した。この結果は今回のストラテジーが極めて有効であることを示している。

**LAT-Aを用いた実験結果:** 出芽酵母のアクチンをコードする *ACT1* は必須遺伝子であり、非必須遺伝子 4,718 の遺伝子破壊株の表現型データベースにはそれに対応する *act1* 変異株の情報はない。U 検定により 501パラメータ中 29 パラメータで LAT-A で処理したときに有意な差が検出され、そのうち 8 パラメータで濃度依存的な変化を示したが、その 8 つに共通に異常性を示す非必須遺伝子の遺伝子破壊株は存在しなかった。そこで、LAT-A との結合が示唆されているアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換したアクチン変異株の *ts* アレルから形態情報を取得し、薬剤を作用した細胞との形態比較を行った。すると、

それらの *act1* 変異株でアレル特異的に LAT-A で処理した野生株細胞と同様の形態変化が見られた。特に、*act1-112* 株は 8パラメータ全てで LAT-A 存在下で培養した野生細胞よりも異常性を示した (図 2)。このように薬剤のターゲットが必須遺伝子の場合でも、*ts* 株という部分欠損変異株を用いることでこのストラテジーの有効性を示すことが出来た。

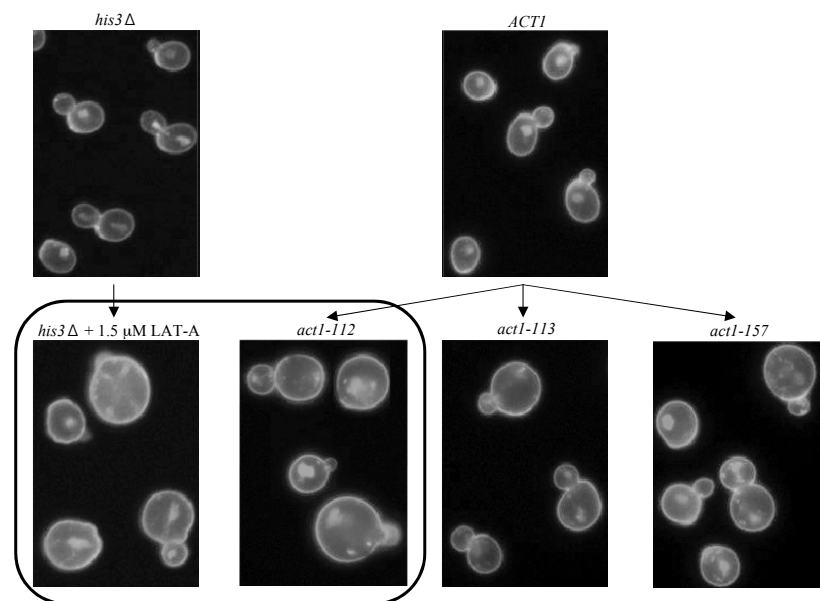


図 2 LAT-A処理した野生株細胞と *ACT1 ts* 株の形態  
LAT-Aで処理された野生株細胞と *act1-112* の形態に類似性が見られた。

#### まとめ:

標的タンパク質がわかっている HU と LAT-A を用いて、薬剤存在下で培養した細胞とコントロール細胞の定量的形態情報を統計学的に比較し、それぞれ薬剤の影響を受ける表現型 (表現型パラメータ) を明らかにした。さらに出芽酵母の非必須遺伝子破壊株の網羅的な形態情報や必須遺伝子の部分欠損変異株の情報から、同様の表現型変化を示す変異株を選定することで薬剤の細胞内での標的タンパク質や標的部位を推定する方法の有効性を示すことが出来た。