モデル生物：酵母ゲノミクスを用いた drug discovery

春藤 久人¹⁾, 杉浦 麗子²⁾, 久野 高義³⁾

要約：ここ数年間各種生物のゲノムシーケンスプロジェクトが進行し、多くの生物種のゲノムの全構造が次々と明らかにされている。この成果を生かした遺伝子機能の網羅的解析により、生命現象を理解することを目的にしたいわゆるポストゲノム研究に入り、比較的早い時期に全塩基配列決定が終了した酵母、線虫、ショウジョウバエなどの生物は、高等生物のモデルとして、医学、薬学および生命科学の分野で大きな役割を果たすようになってきた。中でも酵母は、強力な遺伝学的解析と組み合わせた膨大なゲノミクス情報が得られ、酵母ホモログが存在するような高等動物の遺伝子機能解析に有力な情報を提供している。近年ゲノム創薬に酵母ゲノミクスを応用することにより、ハイスループットスクリーニングなどの網羅的な遺伝子機能解析により、薬物の作用様式や標的分子あるいは経路に関する新たな情報が蓄積しつつある。本稿では創薬研究における酵母ゲノミクスの活用について、具体的な例を挙げてモデル生物としての酵母の役割について述べたい。

1. はじめに

モデル生物として利用される実験酵母として、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) が代表的であるが、ともにすでに全遺伝子の塩基配列が明らかにされた単細胞真核生物である(1,2)。酵母のモデル生物として優れた点として、①約2時間に1回分裂し、培養や保存が容易かつ経済的に行える、②真核生物の基本的な細胞

機能を有しており、高等動物まで保存された機能タンパク質のホモログをコードする遺伝子を多く持っているので、多くの生命現象(細胞分裂やシグナル伝達)の解明において、モデル生物として大きな役割を果たして来た、③相同組換えにより、特定の遺伝子の破壊や置換が比較的容易に行える。合成致死変異やマルチコピーサプレッサー(過剰発現により表現型を相補する遺伝子)を利用した遺伝学的相互作用解析が徹底して行える、④網羅的な遺伝子機能解析がもっとも進んだモデル生物であり、変異体などの研究材料と機能情報が充実している、⑤②の延長であるが、ヒト遺伝病関連遺伝子の約4割の相同遺伝子が酵母に存在する、などが挙げられる。

特に出芽酵母では、酵母ゲノミクスと酵母遺伝学を組み合わせた、ハイスループットスクリーニングなどの網羅的な遺伝子機能解析により、薬物の作用様式や標的分子あるいは経路に関する新たな情報が次々と報告されている。具体的には、現在臨床で使用されている各種治療薬で処置した酵母あるいは酵母各遺伝子破壊株の、それぞれの遺伝子発現プロファイル変動の比較解析(3)、遺伝子破壊株の表現型のスクリーニングあるいは合成致死スクリーニングによる薬物ターゲットの作用様式および標的分子の同定(4-6)により、これまで作用(副作用)発現機構が不明であった薬物の、遺伝子レベルにおける分子機構が明らかになりつつある。本総説では、酵母ゲノミクスがどのようにゲノム創薬に応用されているか、具体的な例を挙げて drug discovery におけるモデル生物としての酵母の

キーワード：ゲノミクス、酵母、遺伝学、ゲノム創薬、drug discovery

¹⁾神戸大学医学部保健学科(〒654-0142 神戸市須磨区友が丘 7-10-2)

e-mail: shuntoh@ams.kobe-u.ac.jp

²⁾近畿大学薬学部分子医療薬科学研究室(〒577-8502 東大阪小若江 3-4-1)

e-mail: sugiurar@phar.kindai.ac.jp

³⁾神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻ゲノム科学講座分子薬理・薬理ゲノム学分野(〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1)

e-mail: tkuno@med.kobe-u.ac.jp

原稿受領日：2005年1月20日、編集委員会依頼原稿

Title: Yeast as a model system for drug discovery

Author: Hisato Shuntoh, Reiko Sugiura, Takayoshi Kuno

遺伝子Xは薬物Aの、遺伝子Yは薬物Bのそれぞれの標的である

図1 出芽酵母全遺伝子発現プロファイル解析による薬物ターゲットおよび作用機序の解明
出芽酵母遺伝子破壊株および薬物処理した野生株における発現遺伝子プロファイル変動を、マイクロアレイ法を用いて比較解析し、両者の相関により各種薬物の標的遺伝子を同定する。(文献25より改変)

役割について述べたい。

2. 酵母のゲノムと酵母ゲノミクス

出芽酵母はもっとも早く全塩基配列が決定された真核生物である。全長 12 Mb とヒトの約 300 分の 1 の大きさで、6,275 の遺伝子が存在する(1,7)。分裂酵母も全塩基配列が決定されており、全長 14 Mb で、遺伝子総数は 4,824 である(2)。特に出芽酵母では、さまざまなアプローチによる遺伝子の機能解析が進められており、①遺伝子配列情報、②さまざまな条件下での全遺伝子の発現プロファイル(8,9)、③プロテオーム解析および酵母 two-hybrid 解析によるタンパク質-タンパク質間相互作用の解析(10,11)、④全遺伝子破壊株の作製と表現型解析(12)および二重欠損破壊株の作製による遺伝学的相互作用解析(13)、⑤タンパク質の細胞内局在解析(14)、⑥メタボローム解析(15)、⑦ヒト遺伝病関連遺伝子の解析(16,17)などが

報告されている。詳細については総説(18,19)を参照されたい。これらの遺伝子機能情報の多くは代表的な酵母ゲノム情報データベース, SGD (*Saccharomyces genome database*)(20)(出芽酵母), CYGD (the MIPS comprehensive yeast genome database)(21)(出芽酵母), *Saccharomyces genome deletion project*(22)(出芽酵母)および Sanger Center の The *S. pombe* Genome Project(23)(分裂酵母)などから入手可能である。また、遺伝子破壊株のコレクションなどはいくつかの業者や機関から有料で購入できる(EUROSCARF のホームページ(24)参照)。これらの膨大な情報は、酵母遺伝子の解析のみならず、他の生物種で相同遺伝子の機能解析を行う際に、有力な情報を与えてくれる。

3. drug discovery におけるモデル生物としての酵母の役割

1) DNA マイクロアレイを用いた薬物作用の解析

出芽酵母全遺伝子 cDNA チップを用いた各種薬物のゲノム作用機序の解析法が考案されている。酵母遺伝子破壊株と薬物処置した酵母における発現遺伝子プロファイル変動を DNA マイクロアレイ法により比較解析し、相互の相関により薬物標的遺伝子を同定する方法である(25)。図1に示すように、薬物 A あるいは B で処置された酵母の発現遺伝子プロファイル変化と特定の遺伝子破壊株における発現遺伝子プロファイル変化を比較して、そのパターンが一致した場合、その遺伝子が標的遺伝子である(遺伝子 X は薬物 A の、遺伝子 Y は薬物 B の、それぞれの標的である)。さらに、薬物の標的遺伝子(primary target)破壊株をその薬物で処置した場合の発現遺伝子プロファイル変化は、secondary target を介した薬物の作用を見ており、未知の薬物標的分子あるいは経路の発見につながると期待される。その一例をあげる。Marton ら(3)は、免疫抑制薬であるシクロスポリン A あるいは FK506 を処置した酵母の発現遺伝子プロファイル変化を解析し、哺乳動物と同じく、両薬物が酵母の中でもカルシニューリンを標的にしていることを明らかにした。さらに、FK506 で処置した酵母の遺伝子発現変動と、カルシニューリン欠損株と野生株との間で見られる遺伝子発現の差との相関係数が、0.75 とやや低いことから、カルシニューリンを介さない経路もあることが示唆された。Gcn4 欠損株の発現遺伝子プロファイルによって、それらのほとんどは転写因子 Gcn4 を介していることが明らかになった。このことから、FK506 の副作用のあるものは Gcn4 経路を介することが示唆

図2 出芽酵母のDNA修復に関する各種遺伝子変異株のCisplatinとMitoxantroneに対する感受性プロファイル
Cisplatinに対して、DNA修復に関する遺伝子破壊株の多くのものが超感受性を示したが、Mitoxantroneに対しては、DNA二本鎖切断修復に関する遺伝子破壊株が特異的に超感受性を示した。それぞれの薬物において、酵母変異株の感受性レスポンスに特徴的なパターンが見られた。(文献4より改変)

されている。

2) 変異体あるいは遺伝子破壊株を用いた薬物ターゲットの同定

酵母では、DNA修復、細胞周期チェックポイントおよび細胞周期に関する遺伝子群の変異体の輝かしい蓄積がある。これらの一連の変異株を用いて薬物およびそのターゲットをスクリーニングした例を示す。出芽酵母のDNA修復に関する遺伝子群の変異株を用いて、化合物に対する感受性を野生株と比較することにより、ある化合物が抗癌薬の候補となりうるかどうかを解析したものである(4)。2種類の抗癌薬、クロスリンク薬であるCisplatinとtopoisomerase II阻害薬であるMitoxantroneに対する70種類の遺伝子変異株パネルの感受性を調べたところ、それぞれの薬物において、酵母変異株の感受性レスポンスに特徴的なパターンが得られた(図2)。このように作用機序が明らかにされている化合物に対する酵母変異株パネルの感受性パターンを解析することで、化合物ライブラリーの中から新規薬物をスクリーニングすることが可能である。

出芽酵母は約6,000の遺伝子を持ち、そのうち約1,000が必須遺伝子で、残りの約5,000は成育可能な遺伝子破壊株が得られる(12)。出芽酵母の遺伝子破壊

株に対する薬物効果のプロファイルから、薬物あるいは化合物の作用様式あるいはターゲットを同定する方法が開発されている。Parsonsら(5)は、4,700の遺伝子破壊株に対して、12種類の薬物の作用を調べ、647種類の超感受性株を単離し、それぞれの遺伝子破壊株の薬物感受性プロファイル(chemical-genetic interaction profile)を作製した。薬物を縦軸に、遺伝子を横軸にプロットし、chemical-genetic interaction profileを比較すると、それぞれの薬物と相互作用が示唆される遺伝子群はクラスターを形成した。たとえば、マイクロチューブル重合阻害薬であるbenomylのプロファイルは、細胞骨格、染色体の構造や有糸分裂に関する遺伝子との相互作用へのクラスターが見られた。一方、カルシニューリン阻害薬である、免疫抑制薬シクロスポリンAおよびFK506はともに非常によく似たchemical-genetic interaction profileを示し、細胞壁integrityあるいは液胞機能に関する遺伝子との相互作用が示唆された。このように、既知の標的分子に加えて、標的となる経路の成分も効率よく探索することが示された。

さらに、酵母遺伝子破壊株のchemical-genetic interaction profileとdeletion arrayによる遺伝子二重破壊株のプロファイル(genetic interaction profile)

図3 合成致死スクリーニングと薬物感受性スクリーニングの比較解析による薬物ターゲット遺伝子の解明

(a) 4,700種類の出芽酵母遺伝子破壊株をテスト化合物で処置する。(b) chemical-genetic interaction profile. テスト化合物に超感受性になる遺伝子破壊株のリストを作成する。(c) genetic interaction profile. 2種類の遺伝子破壊株より二重破壊株を作製し、合成致死(異なる2種類の遺伝子破壊により致死となる現象)となる遺伝子の組合せのリストを作成する。(d) テスト化合物の chemical-genetic interaction profile と genetic interaction profile のパターン的一致により、テスト化合物のターゲット遺伝子あるいは作用様式を同定する。図の場合、遺伝子4がテスト化合物の標的遺伝子である。(文献26より改変)

を比較することにより薬物の標的を同定した。図3にその概略を示す。その具体例として、免疫抑制薬シクロスポリン A および FK506 の chemical-genetic interaction profile とカルシニューリン遺伝子破壊株の genetic interaction profile した結果を示す(26)。これまでにカルシニューリンと合成致死となることが報告されている遺伝子, FKS1, CUP5, VPH2 以外に、新たに 35 個の遺伝子がカルシニューリンと合成致死になることが示唆された。ここに示したように、chemical-genetic interaction profile と genetic interaction profile を統合して解析する手法により、薬物あるいは化合物の作用点となる分子あるいはその経路を網羅的に見出すことが可能であり、薬物の作用様式を推定するための強力なツールとなるであろう。

3) バーコードタグによるヘテロ破壊株を用いた薬物ターゲットの同定とバリデーション

Giaever ら(27)は、haploinsufficiency という遺伝学的現象を応用して、薬物ターゲット遺伝子のヘテロ破壊株の種々の薬物感受性を解析した。その結果、薬物ターゲット遺伝子のコピー数が減少しているヘテロ破壊株は、その薬物に高い感受性をもつことを示した。Lum ら(6)は、このアプローチを応用して、バーコードタグによりシステマティックに遺伝子破壊を行って得られた、3,503 種類のヘテロ破壊株からなる mutant pool における種々の薬物の作用を検討した。mutant pool を薬物の存在下および非存在下で、G-0 から G-20 まで 20 世代培養する。G-0 および G-20 の細胞から抽出した DNA をテンプレートに、蛍光色素プライマーを用いて、バーコード配列を含む断片を PCR にて増幅する。これを DNA マイクロアレイ上でハイ

ブリダイゼーションして、薬物に対する細胞増殖のプロファイル (fitness profiling) を検出するものである。具体例を挙げると、ERG1 遺伝子は、エルゴステロール合成経路で働く酵素、スクワレンエポキシダーゼをコードし、抗真菌薬 terbinafine はこの酵素活性を抑制することが知られている。ERG1 のヘテロ破壊株は、78 種類の薬物のうち terbinafine 処置の場合のみ増殖が抑制され、ERG1 が terbinafine の標的であることが示された。このアプローチを用いて、临床上用いられている薬物を中心に、78 種類の薬物と化合物に対する mutant pool の fitness profiling を網羅的に調べたところ、多くの既知の薬物標的を検出できた。さらに一つの薬物に対して、複数の薬物標的が同定できた場合、その薬物が作用する複合体や経路についての情報も得られる。興味あることには、標的が既知である薬物の予想しないような標的候補遺伝子が得られた。その中で新たな作用機序の発見につながった2つの例を紹介したい。

molsidomine は冠動脈拡張薬として狭心症の治療に用いられており、肝臓での代謝物が NO 供与体となり、血管拡張作用を発揮すると考えられている。molsidomine について mutant pool の fitness profiling を行くと、ラノステロール合成酵素をコードする ERG7 が標的遺伝子であった(6)。ラノステロール合成酵素はエルゴステロール合成経路において高度に保存された必須の酵素である。さらに、ERG7 過剰発現が酵母に molsidomine 耐性を賦与すること、erg7 変異体あるいは molsidomine と他の ERG7 阻害薬の処置により、ERG7 の基質が細胞内に蓄積すること、および ERG7 の精製標品あるいは組換え体の酵素活性が、molsidomine の代謝物 SIN-1 により阻害されることから、ERG7 は molsidomine の標的であることが証明された。興味深いことに、約 20 年前にすでに、molsidomine は冠動脈拡張作用と別に、血中コレステロール値低下作用のあることが報告されていた。この成果は、長らく不明であった作用機序を解き明かしただけでなく、ラノステロール合成酵素が抗高脂血症治療薬の新たなターゲットである可能性を示しており、酵母ゲノミクスが druggable target の探索とバリデーションに威力を発揮した例である。

もう一つの例は、抗癌薬の 5-Fluorouracil (5FU) の新たな標的の発見である(6)。5FU は临床上広く使用されている抗癌薬で、チミジル酸合成酵素の競合的阻害により DNA 合成を抑制し細胞障害作用を発揮すると一般に考えられている。5FU について mutant pool の fitness profiling 解析を行った結果、標的候補

遺伝子として、既に報告のあるチミジル酸合成酵素をコードする CDC21 の他に、rRNA プロセッシングに関与するエクソゾームの成分やその他の rRNA プロセッシングに関与する分子が検出された。さらに、彼らは一連のエクソゾーム成分をコードする遺伝子破壊株を用いて、rRNA プロセッシングを解析し、エクソゾーム複合体が 5FU の標的であることを証明している。これまでに、5FU が RNA 代謝阻害により細胞増殖抑制を引き起こすことを示唆する報告が見られるが、この研究は、それを分子レベルで証明して、さらにエクソゾームが抗癌薬の新規ターゲットであることを示唆している。

これらの例のように、現在臨床的に用いられている薬物を対象にして、既知の薬物ターゲットのバリデーションのみならず、新たな薬物ターゲットの同定とバリデーション、および作用様式の発見が可能であり、既知の薬物の臨床適用拡大に繋がることは、製薬市場にとって朗報となる。

4. 今後の展望

酵母はこれまで多くの生命現象の解明においてモデル生物として大きな役割を果たしているが、本稿で述べたように、酵母ゲノミクスはゲノム創薬においても強力な手法となり得る。特に出芽酵母では、遺伝子機能に関する膨大な情報、各種の変異株および破壊株などがほとんど制限なく入手可能であり、このことは、創薬ターゲットが定められた後で、多様な方法により化合物のスクリーニングに容易に移行できることを意味している。今回は紹介しなかったが、我々の研究室ではシグナル伝達系を制御する薬物について分裂酵母を用いた drug discovery を行っている。ras シグナル伝達経路でよく知られているように、分裂酵母のシグナル伝達系は出芽酵母のものよりもヒトに近く、マップキナーゼ経路などにおける drug discovery においては、明らかに出芽酵母よりも優れている。企業との共同研究を行っているため、その現状を報告することは難しいが、近い将来に成果を公表できることを期待している。

酵母の研究分野においては、上記のような網羅的な手法によって得られた情報を参考として、一つ一つの遺伝子が織り成す生命現象を根源的に理解しようとする地道な作業はこれまで以上に重要な意義をもつであろう。そうした、酵母の個別の遺伝子の機能解明が進むことにより、さらに細胞システムを総合的に分子レベルで理解する研究が発展することが予想される。このような網羅的研究情報と個別的研究情報の相互フィ

ードバックにより, 酵母はモデル生物としてますます重要な役割を担うものと思われる。

文 献

- 1) Goffeau A, et al. Science. 1996;274:546-567.
- 2) Wood V, et al. Nature. 2002;415:871-880.
- 3) Marton MJ, et al. Nature Med. 1998;4:1293-1301.
- 4) Hartwell LH, et al. Science. 1997;278:1064-1068.
- 5) Parsons AB, et al. Nature Biotechnol. 2004;22:62-69.
- 6) Lum PY, et al. Cell. 2004;116:121-137.
- 7) Kumar A, et al. Nature Biotechnol. 2002;20:58-63.
- 8) Hughes TR, et al. Cell. 2000;102:109-126.
- 9) Giaever G, et al. Nature. 2002;418:387-391.
- 10) Gavin AC, et al. Nature. 2002;415:137-141.
- 11) Ho Y, et al. Nature. 2002;415:180-183.
- 12) Winzler EA, et al. Science. 1999;285:901-906.
- 13) Tong AHY, et al. Science. 2004;303:808-813.
- 14) Kumar A, et al. Genes Dev. 2002;16:707-719.
- 15) Allen J, et al. Nature Biotechnol. 2003;21:692-696.
- 16) Foury F. Gene. 1997;195:1-10.
- 17) Steinmetz LM, et al. Nature Genet. 2002;31:400-404.
- 18) Bader GD, et al. Trends Cell Biol. 2003;13:344-356.
- 19) Grunfelder B, et al. Nature Rev. Genet. 2002;3:653-661.
- 20) SGD: <http://www.yeastgenome.org/index.html>
- 21) CYGD: <http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/>
- 22) *Saccharomyces* genome deletion project: http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html
- 23) The *S. pombe* Genome Project: http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/
- 24) EUROSCARF: <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>
- 25) Lockhart DJ, et al. Nature Med. 1998;4:1235-1236.
- 26) Stockwell BR, Nature Biotechnol. 2004;22:37-38.
- 27) Giaever G, et al. Nature Genet. 1999;21:278-283.

著者プロフィール

春藤 久人 (しゅんとう ひさと)

神戸大学医学部保健学科 看護学専攻基礎看護学講座, 助教授, 医学博士。

1981 年神戸大学医学部卒。

研究テーマ: 酵母モデル系を用いた薬理学的研究。

趣味: 滝見物。

杉浦 麗子 (すぎうら れいこ)

近畿大学薬学部分子医療薬科学研究室, 教授, および神戸大学大学院医学系研究科 客員教授, 医学博士。

上記の現職, 職位以外の項目は, 平成 13 年, 薬理学会学術奨励賞受賞講演論文のプロフィール (119 巻 3 号 161 頁, 2002) を参照して下さい。

久野 高義 (くの たかよし)

神戸大学大学院医学系研究科 ゲノム科学講座分子薬理・薬理ゲノム学分野, 教授, 医学博士。

1979 年神戸大学医学部卒。 研究テーマ: 酵母モデル系を用いた薬理学研究。 趣味: 節約。