

氏名（本籍） ^き木 ^{むら}村 ^あ亜^き希^こ子

学位の種類 博 士（薬 学）

学位記番号 薬 博 第 377 号

学位授与年月日 平成18年3月24日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科
 （博士課程）生命薬学専攻

学位論文題目

鉄の恒常性の維持に関わる酵母遺伝子群のシスプラチンによる
発現上昇とその意義

論文審査委員 (主査) 教授 永 沼 章
 教授 福 永 浩 司
 助教授 大 槻 純 男

論文内容要旨

シスプラチンは臨床において最も広く用いられている制がん剤の一つであるが、副作用やがん細胞の獲得耐性が本薬剤を用いた治療の大きな妨げとなっている。本研究ではモデル生物として出芽酵母を用いてシスプラチンに対する細胞応答とその機構の解明を試みた。出芽酵母は遺伝学的な検討を容易に行うことができ、各遺伝子の機能についての知見も豊富に蓄積されている。また、酵母遺伝子の多くはヒトなどの哺乳類と機能的に共通していることから、酵母を用いた研究で得られる知見はヒト蛋白質の機能を解明する上で有用な情報となる。

まず、シスプラチンにより発現が変動する酵母の遺伝子群を DNA マイクロアレイ分析により検索し、得られた結果を RT-PCR 法で確認したところ、シスプラチンによって鉄の恒常性維持に関与する少なくとも 15 種の遺伝子群の発現レベルが上昇することが明らかとなった。興味深いことに、これら遺伝子群は全てが鉄不足に応答して活性化される転写調節因子 Aft1 により発現が制御されているものであった。そこで、シスプラチンによる発現誘導が確認された遺伝子群の中でプロモーターに関する研究が比較的良くなされている遺伝子 *FET3* のプロモーターを用いてレポーターアッセイを行ったところ、シスプラチンによる転写誘導に *FET3* プロモーター中の Aft1 binding site の存在が不可欠であることが明らかとなった。また、シスプラチンによる *FET3* プロモーターの活性化に必要な Aft1 構造中の領域は、鉄のキレート剤 bathophenanthroline disulfonic acid disodium salt (BPS) により鉄の取り込みを阻害した際の活性化に必要な領域と一致した。そこで、鉄の細胞内への取り込みに対するシスプラチンの影響を検討したところ、シスプラチンが酵母細胞内への鉄の取り込みを抑制することが判明した。

次に、シスプラチン毒性と鉄との関係を検討したところ、過剰の鉄を培地中に添加することによってシスプラチンの毒性が著しく軽減されることがはじめて明らかとなった。なお、この培地中への鉄の添加は、細胞内へのシスプラチンの取り込みや DNA への結合量にはほとんど影響を与えなかった。

酵母は鉄の取り込み機構として、低親和性の二価鉄のトランスポーターである Fet4 を介した low affinity iron transport system と、Fet3 と Ftr1 の複合体による high affinity iron transport system を有し、これら因子は全て転写調節因子 Aft 1 により発現が制御されている。そこでこれら鉄の恒常性維持に働く因子の欠損酵母を用いてシスプラチン感受性に対する影響を検討したところ、*FET4* 欠損による影響は認められなかったものの、細胞内への鉄輸送能が低い *FET3* 欠損株、*FTR1* 欠損株または *AFT1* 欠損株がそれぞれシスプラチンに対して高い感受性を示した。また BPS によって細胞内への鉄の取り込みを阻害することによっても酵母のシスプラチン感受性が顕著に増加した。したがって Aft1 の制御下で働く high affinity iron transport system はシスプラチン毒性に対して防御的に作用し、このシステムが機能せず細胞内への鉄の供給が不足するとシスプラチンの毒性が増強されるものと考えられる。なお、シスプラチン以外の化合物の毒性に対する鉄添加または *AFT1* 欠損の影響を検討したところ、酸化ストレス誘導剤（過酸化水素、パラコート、メナジオン）、抗がん剤（アドリアマイシン、ペプロマイシン、5-フルオロウラシル、アクチノマイシン D）、DNA 障害剤（メチルメタンサルホン酸）といった今回検討した化合物

の中にはシスプラチンの場合と同様の結果となるものがなかったことから、本研究で認められた現象はシスプラチンに比較的特有のものであると考えられる。

鉄は細胞の生存に必須の元素であり、細胞内には鉄含有酵素が多く存在する。そこで次に鉄含有酵素であるアコニターゼ、スクシネートデヒドロゲナーゼおよび3-イソプロピルマレートデヒドロゲナーゼの活性に対するシスプラチンの影響を検討した。その結果、これら酵素の活性は細胞をシスプラチン処理することによって低下し、その活性低下は培地中に鉄を添加することによって認められなくなった。以上の結果から、シスプラチンによる鉄の取り込み抑制が鉄含有酵素の活性を低下させることによってシスプラチン毒性の増強に寄与している可能性が考えられる。しかし、細胞内への鉄輸送能の低い *AFT1* 欠損株や *FET3* 欠損株では、通常時の細胞内への鉄の取り込み量が正常細胞をシスプラチン処理した際よりも著しく低いのに関わらず、野性株とほぼ変わらない細胞増殖を示すことから、シスプラチンによる細胞内の鉄含有酵素活性の低下が細胞増殖抑制を引き起こしているわけではないと考えられる。しかし、鉄含有酵素活性の減少がシスプラチンの毒性の増強に関与している可能性は否定できない。

次にシスプラチンによる細胞内への鉄の取り込み阻害機構について検討した。High affinity iron transport system は欠損すると細胞内への鉄輸送能が低下することからシスプラチンがこの機構を阻害することによって、細胞内への鉄の取り込みを抑制している可能性が考えられる。そこで high affinity iron transport system の構成因子である Fet3 の鉄の酸化活性に対するシスプラチンの影響を検討したところ、シスプラチンが Fet3 の酵素活性を低下させることが明らかとなった。なお、Fet3 を含む膜画分をシスプラチンと反応させても Fet3 活性が認められなかったことから、シスプラチンは直接 Fet3 の活性を阻害するわけではないと思われる。何れにしろ、シスプラチンは Fet3 の活性を阻害することによって鉄の取り込みを抑制する可能性が考えられる。一方、シスプラチンが細胞内への銅の取り込みを抑制するとの報告がある。Fet3 は酵素活性に必須の因子として銅を含有しているが、シスプラチンが銅の取り込みを阻害することによって、Fet3 への銅の結合量が減少し、その結果として Fet3 の酵素活性が低下して細胞内への鉄の取り込み量が減少している可能性も考えられる。そこでシスプラチンによる Fet3 活性阻害に対する銅添加の影響を検討したところ、銅添加によってシスプラチンによる Fet3 活性阻害の抑制が認められた。また当研究室では、銅添加によりシスプラチンの毒性が軽減されることを明らかにしている。そこでこの銅添加によるシスプラチン毒性軽減効果と Fet3 の関係を検討したところ、Fet3 が欠損した酵母では銅による毒性軽減効果がほとんど認められなかった。

以上をまとめると、シスプラチンは細胞内への銅の取り込みを阻害するため、細胞をシスプラチン処理すると Fet3 への銅の供給量が減少して Fet3 の活性が低下すると考えられる。その結果として、high affinity iron transport system が機能しなくなるために細胞内への鉄の取り込みが減少し、それに応答して Aft1 が活性化されて、鉄の恒常性維持に関与する因子群の発現が上昇するものと考えられる。また、本研究により、細胞内への鉄の供給不足がシスプラチンの毒性を増強することが示唆され、鉄を十分に供給することによりシスプラチンの毒性が軽減されることも明らかとなった。

この鉄の取り込み量低下によるシスプラチン毒性の増強機構の解明は、シスプラチンの副作用や耐性獲得機構を明らかにするために重要な手がかりとなるものと思われる。

審査結果の要旨

シスプラチンは様々な悪性腫瘍に対して有効な制がん剤であるが、副作用やがん細胞の耐性獲得が本薬剤を用いた治療の妨げとなっている。本研究は、真核生物のモデルとして出芽酵母を用い、シスプラチンに対する細胞応答とその機構の解明を試みたものである。

本研究では、まず、シスプラチンにより発現が変動する酵母の遺伝子群を DNA マイクロアレイ分析により検索した。その結果、鉄の恒常性維持に関与する少なくとも 14 種の遺伝子群の発現レベルをシスプラチンが上昇させることが判明し、また、これら遺伝子は全てが鉄不足に应答して活性化される転写調節因子 Aft1 により発現が制御されているものであった。シスプラチンによる発現誘導が確認された遺伝子の中でプロモーターに関する研究が比較的良くなされている鉄取り込み因子 Fet3 の遺伝子プロモーターを用いてレポーターアッセイを行ったところ、シスプラチンによる転写誘導に *FET3* プロモーター中の Aft1 binding site の存在が不可欠であることが明らかとなった。また、シスプラチンによる *FET3* プロモーターの活性化に必要な Aft1 構造中の領域は、鉄の取り込み阻害剤による活性化に必要な領域と一致した。そこで、鉄の細胞内への取り込みに対するシスプラチンの影響を検討したところ、シスプラチンが酵母細胞内への鉄の取り込みを抑制することが判明した。さらに、過剰の鉄を培地中に添加することによってシスプラチンの毒性が著しく軽減されることも明らかとなった。また、細胞内への鉄輸送能が低い *FET3* 欠損株または *AFT1* 欠損株がシスプラチンに対して高感受性を示すことも確認された。したがって、シスプラチンによって鉄の取り込みが抑制され、それによってシスプラチンの毒性が増強されると考えられる。一方、鉄取り込み抑制に应答して Aft1 が活性化され、鉄の取り込みに関与する Fet3 などの遺伝子発現を促進すると思われる。シスプラチンが、酵母における鉄の特異的取り込み機構の主要な構成因子である Fet3 の活性を間接的に抑制することも明らかとなり、さらにその機構として、Fet3 の活性に必須の役割を果たす銅の細胞内への供給のシスプラチンによる阻害が示唆された。以上の結果から、シスプラチンは細胞内への銅の取り込みを阻害して Fet3 への銅の供給量を抑制することによって Fet3 の活性を低下させ、その結果として細胞内への鉄の取り込みが減少し、それに应答して Aft1 が活性化されて、鉄の恒常性維持に関与する因子群の発現が上昇するものと考えられる。

本論文はシスプラチンによる毒性発現機構とそれに対する細胞応答機構を解明する上で貴重な情報を提供するものであり、その学術的価値は極めて高い。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。