



分裂酵母モデル系における5-fluorouracil耐性遺伝子の単離

横井, 敦子

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 62(3/4):137-142

(Issue Date)

2002-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00317234>



分裂酵母モデル系における 5-fluorouracil 耐性遺伝子の単離

横 井 敦 子

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
(指導：久野高義教授)
連絡先：横井 敦子
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
〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1
電話 078(382)5441 FAX 078(382)5459

(平成14年1月28日受付)

要 約

5-fluorouracil (5-FU) 耐性に関連する遺伝子を分裂酵母モデル系において同定し、その解析を行った。すなわち、過剰発現により野生株に 5-FU 耐性を与える遺伝子を 2 種類単離した。ひとつは dUMP の生成に関与する glutamine amidotransferase (GLMase), carbamoylphosphate synthetase (CPSase), aspartate transcarbamoylase (ACTase) をコードする既知の遺伝子 *ura1⁺* であった。もうひとつは *S. cerevisiae* の FUR4 遺伝子と相同性の高い新規遺伝子であった。この新規遺伝子を *ffr2⁺* と名付けた。*ffr2⁺* 過剰発現による 5FU 耐性は培地中への uracil の添加により増強されたが、adenine の添加では変化がなかった。この結果から *ffr2⁺* 遺伝子が uracil の輸送に関与することが示唆された。その他、分裂酵母に薬剤耐性を与えるものとして既に報告されているいくつかの遺伝子について 5-FU 耐性への影響を検討した。その結果、プロテアソームのコンポーネントのひとつをコードする *pad1⁺* 遺伝子の過剰発現が 5-FU 耐性を与えることが明らかとなった。

緒 言

抗癌剤を用いた治療において、はじめから化学療法に反応しない、あるいは治療の過程において抗癌剤の有効性が減少し、次第に癌が進行するといったことは臨床的にしばしば認められ、化学療法における重大な

問題のひとつとなっている。この抗癌剤耐性という現象については現在さまざまな研究がなされており、MDR 遺伝子などの P-糖蛋白質の関与するもの、トポイソメラーゼの関与するもの、レドックス系の関与するもの、アルキル化剤に対するものなど多数の報告が散見される。

5-fluorouracil は現在、種々の悪性腫瘍の治療において多用される薬剤で、その薬理作用は thymidine を合成する過程において thymidylate synthase の働きを阻害することで DNA の合成を抑制し、腫瘍細胞の増殖をおさえるものである。5-FU に対する薬剤耐性の出現はしばしば認められ、治療上の問題となるが、その分子メカニズムについては不明なことが多い¹⁾²⁾。

本研究では分裂酵母モデル系を用い、過剰発現により野生株に 5-FU 耐性を与える遺伝子を 2 種類 (*ffr1⁺* および *ffr2⁺*) 単離し、その解析を行った。

方 法

1 材料

分裂酵母は HM123 (*h⁻leu1*), 大腸菌は DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169* (Φ 80*lacZ* Δ *M15*), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gryA96*, *thi-1*, *relA1*] 株を用いた。

培地は、YPD (1% yeast extract, 2% polypeptone, 1% dextrose, 0.9% agar), EMM³⁾, LB (0.5% yeast extract, 1% polypeptone, 0.5% NaCl) を用いた。5-FU はナカライテスク社製のものをを用いた。

キーワード：抗癌薬, 5-fluorouracil, 薬物耐性, トランスポーター, 分裂酵母

2 過剰発現により 5-FU 耐性を与える遺伝子のスクリーニング

分裂酵母野生株 HM123 を酢酸リチウム法により出芽酵母遺伝子 *LEU2* を選択マーカーとしてもつ分裂酵母の genomic library で形質転換し、約25,000コロニーを得た。レプリカ法により100 μ g/ml の 5-FU を含む YPD 培地上で生育可能な株が6個単離された。これらの 5-FU 耐性が形質転換に由来するものであることを確認したのち、プラスミドを単離した。これらのクローンの塩基配列を決定し、推定アミノ酸から相同性検索を行い、遺伝子を同定した。

結果及び考察

1 遺伝子クローニング

スクリーニングの結果、5-FU 耐性を与える遺伝子を6クローン単離した。アガロースゲル (0.8%) 電気泳動およびサザン解析により、これらは2種類の遺伝子に分類された。ひとつを *ffr1*⁺, 他方を *ffr2*⁺ と命名した。これらを更に短縮、サブクローニングし、シーケンスの決定を行った。YPD 培地、および 5-FU を含む YPD 培地上での生育を比較したところ、*ffr1*⁺ 遺伝子の過剰発現はより高濃度の 5-FU を含む培地上で生育が可能であった (図1)。相同性検索の結果、*ffr1*⁺ は既知の遺伝子 *ura1*⁺ と同一のものであることが明らかとなった。

ura1⁺ の遺伝子は UTP (uridine triphosphate) およびアルギニンの合成経路に関与する複数の酵素 GLNase (glutamine amidotransferase), CPSase (carbamoylphosphate synthetase) および ATCase

(aspartate transcarbamoylase) をコードすることが知られている。これらの酵素は酵母から哺乳動物まで広く存在するもので、その構造はよく保存されており、その働きは反応生成物である UTP のネガティブフィードバックによって調節されている⁴⁾。5-FU は dUMP から dTMP を合成する thymidylate synthase を拮抗的に阻害し細胞増殖の抑制をもたらす。*ffr1*⁺ にコードされている GLNase, CPSase, ATCase は dUMP の生成に関与し、UMP は更に uracil と反応し、UTP が合成され、GLNase, CPSase, ATCase は UTP によるネガティブフィードバックをうけている。*ffr1*⁺ 遺伝子を過剰発現した野生株が 5-FU に耐性を持つメカニズムとして、thymidylate synthase の本来の基質である細胞内 dUMP 濃度の上昇を引き起こし、その結果 thymidylate synthase による反応を促進することで 5-FU による阻害反応に拮抗していることが予測される。

2 *ffr2*⁺ 遺伝子は新規膜タンパク質をコードする。

ffr2⁺ 遺伝子は出芽酵母の uracil transporter をコードする FUR4 遺伝子と塩基配列において47.9%, コードする遺伝子産物はアミノ酸配列において、28%相同性をもつものであった (図2)。また、hydropathy analysis の結果、*ffr2*⁺ は9回膜貫通型の蛋白であり plasma membrane に存在する可能性が最も高いことがわかった。

また、完全合成培地である EMM 培地に 5-FU を加えた場合には、*ffr1*⁺ を多コピーで発現する形質転換株は発現しない株に比べてよく生育し、YPD 培地と同様に 5-FU 耐性を獲得するが、*ffr2*⁺ を多コピー

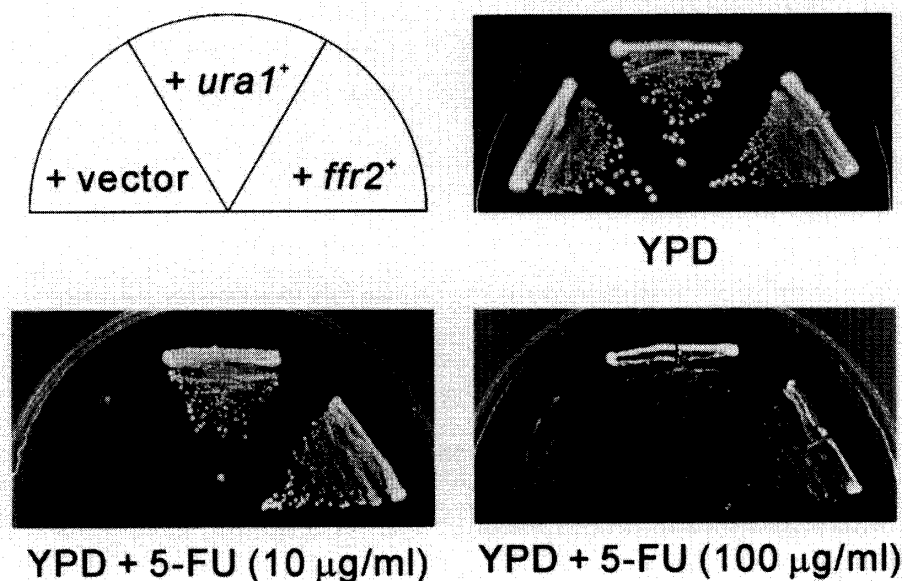


図1 *ura1*⁺ 遺伝子および *ffr2*⁺ 遺伝子の過剰発現による 5-FU 耐性
摂氏 30 度 で 3 日間培養した後の写真を示す。

Ffr2: 15 SEKNLDVGFGESSSDVPV---KGRFASFLKKLELSSGPEKENI-----DLR 58
 S+ N+ E+SS + V K +++SF KK+ ++I DL+
 Fur4: 43 SQSNITTEVYEASSFEKVSSEKPOYSFVKIYYEYVVVDKSLGVSILDSFMYNQDLK 102

Ffr2: 59 PTPDDRHRYSALDIYLVSCNGISASAFRTGTSYMEMGLSPKQALAAALAGNVFIAMPMT 118
 P +RR +S + Y W + + + + + + +GL+ Q + G F+ +
 Fur4: 103 PVEKERRVSWYNYCYFWLAECFNINTWQIAATGLQLGLNWWQCWITIWIYGFGVGAFFV 162

Ffr2: 119 LNGLFGSHYHIFAVQSRASFGYYFNTLIILLRFIAGLFYYGTNVYTGAECVQTILYAIF 178
 L GS YH+ F + SRASFG +F+ ++ R + + +Y Y A V +L +IF
 Fur4: 163 LASRVGSAYHLSFPISSRASFGIFFSLWPVINRVVMAIVWYSVQAYIAATPVSLMLKSIF 222

Ffr2: 179 KSFRSYKNRLPADAG---ITSDFLISYFVYVVISFPFHLIRPEYLQRFFLIKSIISTYIAC 235
 + + + + +P G T+ + +F++W S PF L+ P ++ F +K++ A
 Fur4: 223 G---KDLQDKIPDHFGSPNATTYEFMCFFIFWAASLPFLLVPHKIRHLFTVKAFLVPFAS 280

Ffr2: 236 FAMILFLLCNVGSVHVVDQPATVS---GRSWSVVMFCALNSSVAGFSTLAVNVNDFTRYVK 293
 F LI+ + + V G ++SW F+ +L +A FST+ +N DF+R+ K
 Fur4: 281 FGFLIWAIRRAHGRIALGSLTDVQPHGSAFSAFLRSLMGCMANFSTMVINAPDFSRSFSK 340

Ffr2: 294 HPKTP-YVQMLILPLVAASAPIGIVSGVASKIMYGTAMWDPLQIANNWT---SRGGRA 348
 +P + + Q++ +P + + + + IGI+ A +YG W PL + + ++G RA
 Fur4: 341 NPNSALWSQLVCIPFLFSITCLIGILVTAAGYEIYGINYWSPLDVLEKFLQTTYNGKTRA 400

Ffr2: 349 AAFFMGLTYLVSMIAQNISDNTVAAANDLLYFFPRYLDIRXXXXXXXXXXXXXPWKIL 408
 F + + V+ + NIS N+++ D+ FP++++I+R PW ++
 Fur4: 401 GVFLISFVFAVQLGTNISANSLSCGTDSMAIFPKFINIKR-GSLFCAAMALCIPWNLM 459

Ffr2: 409 QNGTAFLAFLGSLIFLGAAGIFVADKFKNHHKY-DIDEFYN---PSGIYRY-NKLGLENW 464
 + F L + +IFL AG+ +D F Y + Y+ Y Y N+ G+NW
 Fur4: 460 ATSSKFTMALSAIAIFLSSIAGVVCSDFVVRGGYIKLTHIYSHQKGSFYMYGNRFGINW 519

Ffr2: 465 RALIAFLCACVPLIPGMAMSIIN-PSITMPDGVHLYYIGYFSFMTAFLIYWGLNLVFP 522
 RAL A+LC P +PG + P+I + DG + LYY+ Y+ + +F Y L FP
 Fur4: 520 RALAAYLCGVAPCLPGFIAEVGAPAIKVSDBGAMKLYLSYVWVGGLSFSSYTALCYFFP 578

図2 ffr2⁺ 遺伝子と出芽酵母 FUR4 遺伝子の相同性
 +は性質のよく似たアミノ酸をーはギャップを示す。

で発現する形質転換株はほとんど 5-FU 耐性を獲得しないという結果を得た。

EMM 培地に 5-FU と同時に uracil を加えたところ加えない培地の10倍の 5-FU を含む培地で両者が生育可能であった(図3)。一方, adenine を加えたものでは変化がなかった。

dUMP の合成経路においては細胞内, 細胞外の両方の uracil が使われるが, 以上のように 5-FU を含む培地に uracil を加えることで生育に差が見られることから ffr2⁺ の遺伝子産物が細胞外 uracil の膜輸送に関与していることが示唆された。即ち, ffr2⁺ 遺伝子産物の高発現により, uracil の細胞外からの取り込みが増加し, その結果, 細胞内の uracil 濃度が増加することが予想される。この結果, 5-FU の利用が減少し, thymidylate synthase の阻害が弱くなることで細胞生育のための条件が改善され, より高い濃度の 5-FU を含む培地での生育が可能となったと考えられる。

ffr2⁺ 遺伝子産物が高い相同性を示す出芽酵母 FUR4

遺伝子産物が細胞膜上に存在する uracil permease であり, de novo 合成の際 pyrimidine pathway に加え, 細胞の必要とする UMP, UDP, UTP のために細胞外の uracil を運ぶこと⁵⁾⁶⁾や, ffr2⁺ が高い相同性を示す FUI1 が非常に高い選択性をもって uridine の輸送に関与していること⁶⁾⁷⁾, 更に hydropathy analysis の結果, ffr2⁺ が plasma membrane に親和性が高いことなどより, われわれの単離した ffr2⁺ のコードする蛋白も分裂酵母細胞において uracil の膜輸送に何らかの関係があると予測される。

3 既知の分裂酵母多剤耐性遺伝子の 5-FU 耐性に対する影響

次に, 分裂酵母において, 他の種々の薬剤に耐性を与えることが報告されている分裂酵母遺伝子 *pap1*⁺, *pad1*⁺, *pmd1*⁺ および *bfr1*⁺ を多コピーベクターに組み込んだもので野生株を形質転換し, それぞれの遺伝子を過剰発現させた株について 5-FU 耐性の有無を調べたところ, *pad1*⁺ 遺伝子を過剰発現した株のみが

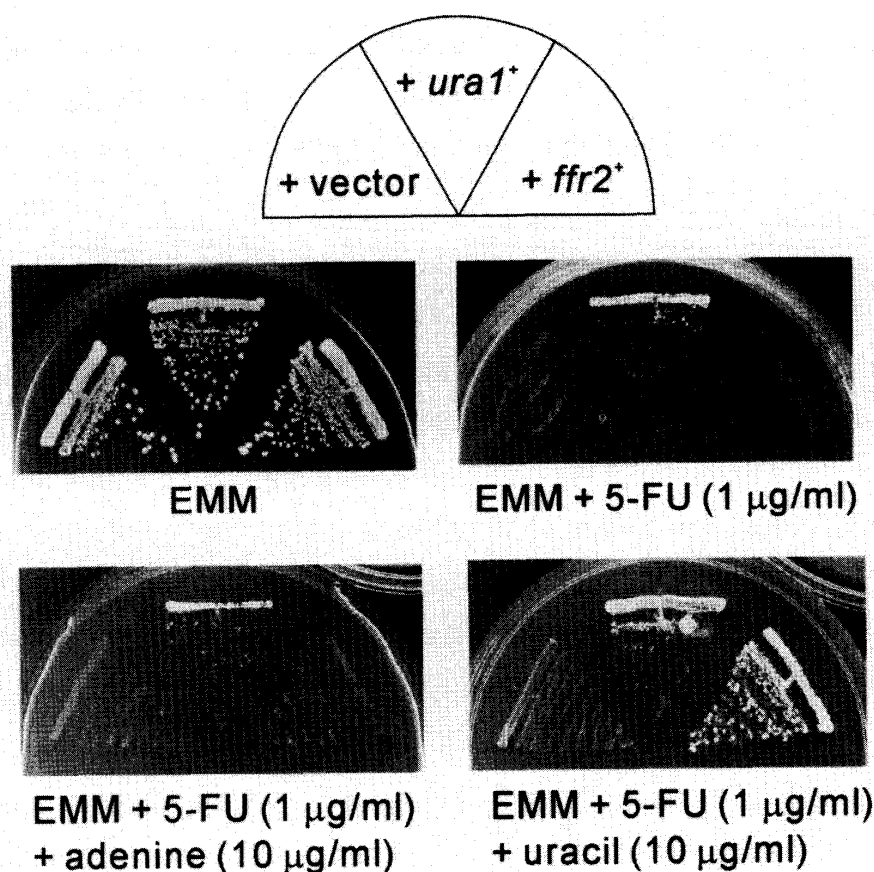


図3 *ffr2*⁺ 遺伝子の過剰発現による 5-FU 耐性には細胞外のウラシルの存在が必要である
摂氏 30 度で 3 日間培養した後の写真を示す。

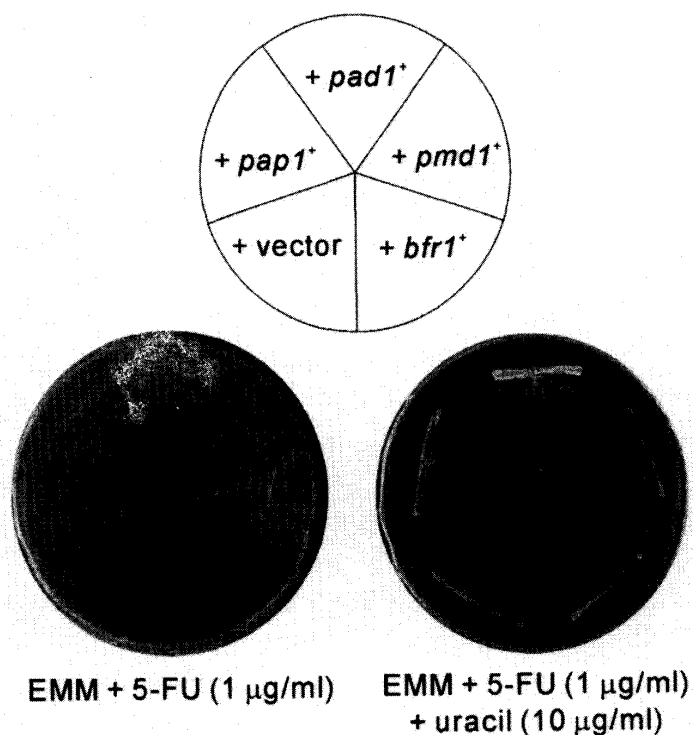


図4 *pad1*⁺ 遺伝子の過剰発現は 5-FU 耐性を付与する
摂氏 30 度で 3 日間培養した後の写真を示す。

野生株に 5-FU 耐性を与えることがわかった (図 4)。*pad1*⁺ は分裂酵母の必須遺伝子であり、薬剤耐性には *pap1*⁺ を介して関与するとされているが⁸⁾、今回の我々の実験において *pap1*⁺ が 5-FU 耐性を与えなかったことは *pad1*⁺ が *pap1*⁺ を介さない経路で 5-FU 耐性に関与している可能性を示唆するものである。一方、*pad1*⁺ 遺伝子産物は真核細胞の蛋白質分解においてきわめて重要な役割を果たしているプロテアソーム複合体のサブユニットであることが明らかにされている⁹⁾。このことは、抗癌剤耐性と蛋白質分解機構との間に何らかの関連が存在することを示唆しており、きわめて興味深い。また、消化器系の癌で高頻度に発現している MDR 多剤耐性遺伝子のホモログである *pmd1*⁺ 遺伝子および *bfr1*⁺ 遺伝子の高発現が 5-FU に対する耐性を与えなかった実験結果は、ヒトの癌治療においても MDR 多剤耐性遺伝子は 5-FU 耐性に関与しない可能性を強く示唆しており、興味深い。

本研究は、ヒトの細胞に極めて近い単細胞

真核生物である分裂酵母が 5-FU 耐性機構の解析においてモデル生物として有用であることを示した最初の知見である。今後は、本論文で明らかにされた種々の現象の分子機構を明らかにすることで抗癌剤耐性の克服に貢献していきたい。

また本稿を終えるにあたり、御指導を賜りました久野高義教授並びに研究室の皆様方に深謝致します。

文 献

- 1) Habara, K., Ajiki, T., Kamigaki, T., Nakamura, T., Kuroda, Y.: High expression of thymidylate synthase leads to resistance to 5-fluorouracil in biliary tract carcinoma in vitro. *Jpn J Cancer Res.*, 92: 1127-1132, 2001.
- 2) Fukushima, M., Fujioka, A., Uchida, J., Nakagawa, F., Takechi, T.: Thymidylate synthase (TS) and ribonucleotide reductase (RNR) may be involved in acquired resistance to 5-fluorouracil (5-FU) in human cancer xenografts in vivo. *Eur J Cancer.*, 37: 1681-1687, 2001.
- 3) Mitchison, J.M.: Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth. Cell Physiol.*, 4:131-165, 1970.
- 4) Lollier, M., Jaquet, L., Nedeva, T., Lacroute, F., Potier, S., Souciet, J.L.: As in *Saccharomyces cerevisiae*, aspartate transcarbamoylase is assembled on a multifunctional protein including a dihydroorotase-like cryptic domain in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.*, 28: 138-149, 1995.
- 5) Jund, R., Weber, E., Chevallier, M.: Primary structure of the uracil transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 171: 417-424, 1988.
- 6) Wagner, R., de-Montigny, J., de-wergifosse, P., Souciet, J.L., Potier, S.: The PRF *YBLO42* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a uridine permease. *FEMS Microbiology Letters* 159: 69-75, 1998.
- 7) Vickers, M.F., Yao, S.Y., Baldwin, S.A., Young, J.D., Cass, C.E.: Nucleoside Transport Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Demonstration of a transporter (FUI1) with high uridine selectivity in plasma membranes and a transporter (FUN26) with broad nucleoside selectivity in intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* 275: 25931-25938, 2000.
- 8) Shimanuki, M., Saka, Y., Yanagida, M., Toda, T.: A novel essential fission yeast gene *pad1⁺* positively regulates *pap1⁺* dependent transcription and is implicated in the maintenance of chromosome structure. *J. Cell Sci.* 108: 569-579, 1995.
- 9) Spataro, V., Toda, T., Craig, R., Seeger, M., Dubiel, W., Harris, A.L., Norbury, C.: Resistance to diverse drugs and ultraviolet light conferred by overexpression of a novel human 26 S proteasome subunit. *J. Biol. Chem.* 272: 30470-30475, 1997.

Isolation of 5-FU resistant gene using a fission yeast model system.

Atsuko Yokoi

Summary

The resistance to anti-tumor agents often become a problem during the treatment of malignant tumors. In particular, since 5-fluorouracil (5-FU) is frequently used in the clinical treatment, we experimentally evaluated 5-FU resistance using a fission yeast model system. This experimental system was used for the following reasons: fission yeast is an eukaryotic organism like human, in which genetic information is well preserved: the cell cycle of fission yeast is very short: and genetic analysis can be rapidly performed because the molecular genetic methods are well established.

It was previously reported that FUR, FCY, and FUI genes of *S. cerevisiae* develop resistance 5-FU. In the present study, we isolated 2 genes that showed resistance to 5-FU when overexpressed in the wild-type cells. As the result of homology search, one gene was identified as the known *ura1*⁺ gene, whereas the other was found to be a novel gene which is highly homologous to the FUR4 gene of *S. cerevisiae*. We also compared 5-FU resistant phenotypes of several genes, which were previously reported to develop resistance when overexpressed to various anti-tumor agents.