

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19310146
 研究課題名（和文） ケミカルジェネティクスによる細胞運動制御機構解析
 研究課題名（英文） Studies on regulatory mechanism for cell migration based on chemical genetics
 研究代表者
 井本 正哉（IMOTO MASAYA）
 慶應義塾大学・理工学部・教授
 研究者番号：60213253

研究成果の概要（和文）：新規がん細胞遊走阻害物質 UTKO1 の EGF 刺激によるヒト扁平上皮癌 A431 細胞の細胞遊走の阻害作用は、UTKO1 が 14-3-3ζ に結合してその機能を阻害した結果、Rac1 活性化を抑制することにより引き起こされることを見いだした。つぎに 14-3-3ζ が UTKO1 の標的であることを裏付けること及び A431 細胞の遊走における 14-3-3ζ の役割を明らかにすることを試みた。その結果 EGF 刺激が誘導する A431 細胞の遊走においては、14-3-3ζ による Tiam1 及び βPix の一方、もしくは両方の GEF 活性の調節が重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： UTKO1 was synthesized as a derivative of moverastin by Prof. Watanabe (Univ. Tokyo). We explored the mode of action of UTKO1 by using a chemical genetic approach. We found that UTKO1 inhibited EGF-induced cell migration by inhibiting Rac1 activation. To identify the molecular target of UTKO1, biotinylated UTKO1 was synthesized by Prof. Watanabe, and was used as the probe to obtain a target protein of UTKO1. As a result, 14-3-3ζ was identified as the functional target protein of UTKO1, because siRNA-mediated silencing of 14-3-3ζ expression suppressed both EGF-induced cell migration and Rac1 activation. These results suggest that 14-3-3ζ would act upstream of Rac1 activation in the process of EGF-induced cell migration, and UTKO1 inhibited cell migration possibly due to the abrogation of 14-3-3ζ function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学
キーワード：遺伝子、癌、シグナル伝達、

1. 研究開始当初の背景

ある種の癌細胞は非常に細胞の運動能力が高く、このことが癌の転移に密接に関与することが知られている。しかし、癌細胞の運動機能を制御する細胞内情報伝達経路については不明な点が多く、このメカニズム解析に有用なバイオプローブの開発が注目を集めているが、このようなバイオプローブそれ自身が癌転移を克服する新しいタイプの制癌剤のリード化合物としても期待される。

2. 研究の目的

申請者がカビの一種であるアスペルギルス属 F7220 株から癌細胞の遊走を阻害する新規化合物モベラスチンを発見した。さらに活性の強い細胞運動阻害物質の取得を目的に東京大学の渡邊らによりモベラスチンの類縁化合物が化学合成され、UTKO-1 を得た。そこで UTKO-1 が未だ不明な点が多い細胞運動の制御機構を解明するための有用なバイオプローブになると考え、UTKO-1 の細胞運動阻害機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではヒト扁平上皮癌 A431 細胞の細胞運動を阻害する小分子化合物 UTKO-1 を用いたケミカルジェネティクスの手法で細胞運動機構の解析を目的とする。具体的には、UTKO-1 のビオチン標識化合物を用いて UTKO-1 の結合タンパク質を同定し、次に siRNA によるノックダウン実験によって UTKO-1 の機能的標的タンパク質を特定する。

4. 研究成果

UTKO-1 が様々ながん細胞に対して強力ながん細胞遊走阻害活性を示すことを見いだした。さらに申請者らは UTKO-1 がラメリポディア形成制御する G タンパク質 Rac1 の活性化の上流に作用することを明らかにした。一方、UTKO-1 のビオチン標識体を用いて UTKO-1 の結合タンパク質をがん細胞から回収したところ、14-3-3z が同定された。14-3-3z はアダプタータンパク質として知られており、実際に siRNA を用いて 14-3-3z をノックダウンしたところ、細胞遊走、ラメリポディア形成および Rac1 の活性化が阻害されたことから 14-3-3z が UTKO-1 の標的タンパク質であることが示唆された

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 17 件) (全て査読あり)

1. G. Hamanaka, M. Matsumoto, M. Imoto and H. Kaneko: Mesenchyme cells can function to induce epithelial cell proliferation in starfish embryos. *Developmental Dynamics*, 293: 818-827, 2010
2. M. Takeuchi, S. Kimura, J. Kuroda, E. Ashihara, M. Kawatani, H. Osada, K. Umezawa, E. Yasui, M. Imoto, T. Tsuruo, A. Yokota, R. Tanaka, R. Nagao, T. Nakahata, Y. Fujiyama and T. Maekawa: Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl⁺ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in hypoxic environment. *Cell Death Diff.*, in press
3. M. Kanai, S. Iba, R. Okada, E. Tashiro and M. Imoto: Oligomycin induced the proteasomal degradation of cyclin D1 protein. *J. Antibiot.* 62: 425-429 (2009)
4. Y. Sasazawa, Y. Futamura, E. Tashiro and M. Imoto: V-ATPase inhibitors overcome Bcl-xL-mediated chemoresistance through restoration of a caspase-independent apoptotic pathway. *Cancer Science*, 100: 1460-1467. (2009)
5. N. Nagamine, T. Shirakawa, Y. Minato, K. Torii, H. Kobayashi, M. Imoto, Y. Sakakibara. Integrating statistical predictions and experimental verifications for enhancing protein-chemical interaction predictions in virtual screening. *PLoS Comput Biol.* :e1000397. (2009)
6. M. Kanai, E. Tashiro, H. Maruki, Y. Minato and M. Imoto: Transcriptional regulation of human fibroblast growth factor receptor 1 by E2F-1. *Gene*, 438: 49-53 (2009)
7. M. Kawatani, H. Okumura, K Honda, N. Kanoh, M. Muroi, N. Dohmae, M. Takami, M. Kitagawa, Y. Futamura, M. Imoto, and H. Osada : The identification of an osteoclastogenesis inhibitor through the inhibition of glyoxalase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

- 105: 11691-11696 (2008)
8. T. Kawamura, E. Tashiro, K. Yamamoto, K. Shindo and M. Imoto: SAR Study of a Novel Triene-ansamycin Group Compound, Quinotrierixin, and Related Compounds, as Inhibitors of ER Stress-induced XBP1 Activation. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Biological Activities and SAR Study. *J. Antibiot.* 61: 303-311 (2008)
 9. T. Kawamura, E. Tashiro, K. Shindo and M. Imoto: SAR Study of a Novel Triene-ansamycin Group Compound, Quinotrierixin, and Related Compounds, as Inhibitors of ER Stress-induced XBP1 Activation. II. Structure Elucidation. *J. Antibiot.* 61: 312-317 (2008)
 10. Y. Futamura, R. Sawa, Y. Umezawa, M. Igarashi, H. Nakamura, K. Hasegawa, M. Yamasaki, E. Tashiro, Y. Takahashi, Y. Akamatsu, and M. Imoto: Discovery of Incednine as a Potent Modulator of the Anti-apoptotic Function of Bcl-xL from Microbial Origin. *J. Am. Chem. Soc.*, 130: 1822-1823 (2008)
 11. Y. Minato, Y. Nihei, Y. Kodama, E. Tashiro, M. Kanai and M. Imoto: Identification and characterization of mouse type II platelet-derived growth factor receptor a transcript. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72: 759-766 (2008)
 12. K. Uno, T. Tanabe, T. Ogamino, R. Okada, M. Imoto and S. Nishiyama: Synthesis and antitumor activity of combretastatin D-4. *Heterocycles* 75: 291-296 (2008)
 13. E. Tashiro, N. Hironiwa, M. Kitagawa, Y. Futamura, M. Imoto: Trierixin, a Novel Inhibitor of ER stress-induced XBP1 Activation from *Streptomyces* sp. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, and Biological activities. *J. Antibiot.* 60: 547-553 (2007)
 14. Y. Futamura, E. Tashiro, N. Hironiwa, J. Kohno, M. Nishio, K. Shindo and M. Imoto: Trierixin, a Novel Inhibitor of ER Stress-induced XBP1 Activation from *Streptomyces* sp. II. Structure Elucidation *J. Antibiot.* 60: 582-585 (2007)
 15. Y. Minato, E. Tashiro, M. Kanai, Y. Nihei, Y. Kodama and M. Imoto: Transcriptional regulation of a new variant of human platelet-derived growth factor receptor a transcript

- by E2F-1. *Gene*, 403: 89-97 (2007)
16. E. Tashiro, A. Tsuchiya, and M. Imoto: Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Science* 98:629-635 (2007)
 17. A. Tsuchiya, E. Tashiro, M. Yoshida and M. Imoto: Involvement of PP2A nuclear accumulation and subsequent inactivation of AP-1 in leptomycin B-inhibited cyclin D1 expression. *Oncogene* 26:1522-1532 (2007)

[学会発表] (計 4 件)

1. 発表者名: 高野圭
発表標題: Studies on the mechanism for inhibition of tumor cell migration by UTKO1
学会等名: 第 32 回日本分子生物学会年会
発表年月日: 2009 年 12 月 12 日
発表会場: 横浜
2. 発表者名: 間木重行
発表標題: Studies on the Regulatory Mechanism for Cell Migration Based on Chemical Genomics
学会等名: 第 32 回日本分子生物学会年会
発表年月日: 2009 年 12 月 10 日
発表場所: 横浜
3. 発表者名: 小林大貴
発表標題: Studies on the mechanism for inhibition of tumor cell migration by UTKO1
学会等名: 第 68 回日本癌学会学術総会
発表年月日: 2009 年 10 月 2 日
発表場所: 横浜
4. 発表者名: 間木重行
発表標題: ケミカルバイオロジーによる細胞遊走シグナル伝達機構の解析
学会等名: 日本ケミカルバイオロジー学会第 4 回年会
発表年月日: 2009 年 5 月 19 日
発表場所: 神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井本 正哉 (IMOTO MASAYA)

慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：60213253

(2)研究分担者

田代 悦 (TASHIRO ETSU)
慶應義塾大学・理工学部・講師
研究者番号：00365446

(3)連携研究者

該当なし