

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560419

研究課題名(和文)化学発生物学によるホヤ脊索管形成機構解析

研究課題名(英文)Studies on Ciona notochord tubulogenesis by chemical biology approach

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞遊走阻害剤UTK01はホヤの脊索管形成を阻害したことから、UTK01の標的タンパク質を同定することで脊索管形成分子機構を明らかにすることにした。まず、ビオチン標識化したUTK01と脊索管形成期におけるホヤ抽出液を混合しアビジンビーズでプルダウンすることでUTK01標的タンパク質を同定し、そしてその直接結合を大腸菌より精製した同タンパク質を用い確認した。さらに同タンパク質をモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドによりロックダウンしたところ、脊索管形成がUTK01同様に阻害されたことから、実際に同タンパク質がホヤ脊索管形成に関与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of Ciona notochord tubulogenesis by identifying the target protein of UTK01, a cell migration inhibitor. Avidin beads pull down assay using biotin labeled UTK01 and the lysate prepared by the larvae during notochord tubulogenesis identified the target protein of UTK01, and we confirmed this direct interaction using the protein purified from E.Coli. Furthermore, knockdown of target protein using morpholino antisense oligonucleotide inhibited notochord tubulogenesis as seen in UTK01 treatment, suggests the involvement of target in notochord tubulogenesis.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ホヤ 脊索管形成

### 1. 研究開始当初の背景

発生のモデル生物であるカタコウレイボヤでは、全ゲノムの解読に基づく遺伝子情報の蓄積が目まじしいが、形態形成の分子メカニズムの多くは未だ解明されていない。一方、申請者は東京大学・農学部の渡邊教授により化学合成されたがん細胞遊走阻害物質 UTKO1 が脊索の管形成が特異的に阻害されることを見出した。この UTKO1 のがん細胞遊走阻害の標的タンパク質が 14-3-3 $\alpha$ であったことから、UTKO1 のホヤの脊索の管形成阻害の標的タンパク質もホヤ 14-3-3 ホモログであると考えられた。ホヤには 4 種類の 14-3-3 ホモログが知られており、申請者らの予備的な実験からビオチン標識した UTKO1 を用いて UTKO1 がホヤ 14-3-3 にも結合するとの結果を得た。

### 2. 研究の目的

脊索の管形成を阻害した UTKO1 の標的タンパク質がどの 14-3-3 アイソフォームであるかを詳細に検証する。さらに 14-3-3 はアダプタータンパクであるので、14-3-3 タンパク質によって制御されるホヤの脊索管形成にかかわるクライアントタンパク質の同定を行い、ホヤ脊索管形成の制御の分子メカニズム解明の突破口を開く

### 3. 研究の方法

標的タンパク質を同定するために Biotin 標識した UTKO1 を作製することにした。UTKO1 のどの部位がホヤ脊索管形成阻害活性に寄与しないのか調べるために UTKO1 誘導体の構造活性相関試験を行った結果、UTKO1 の 11 位炭素のアルデヒド基は阻害活性に寄与しないことがわかったため、この部位に Biotin 標識することにした。

### 4. 研究成果

UTKO1 は脊索管形成に関与するタンパク質を阻害したと考えられたので、UTKO1 の標的タンパク質を同定することで脊索管形成の分子機構を解明することにした。ここで UTKO1 はヒトにおいて 14-3-3 タンパク質を標的とすることでがん細胞遊走を阻害していた。そこでホヤにおいても UTKO1 は 14-3-3 を標的としているのか調べるために、大腸菌より精製した GST 融合型の 4 つの 14-3-3 アイソフォームタンパク質 ( $\epsilon\alpha$ ,  $\epsilon\beta$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ) と Biotin-UTKO1 を混合し Avidin beads でプルダウンしたところ、UTKO1 は 14-3-3  $\epsilon\alpha$  と強く結合していることがわかった。以上より、UTKO1 の標的タンパク質である 14-3-3  $\epsilon\alpha$  がホヤ脊索管形成の分子機構に関与する可能性を示唆した。次に、14-3-3  $\epsilon\alpha$  のクライアントタンパク質の同定を試みた。現在までに 4 種類 GST-14-3-3  $\epsilon\alpha$  を用いてプルダウンした

結果、少なくとも 4 種類のタンパク質を同定できた。

### 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 12 件)

1. Krajarng A, Imoto M, Tashiro E, Fujimaki T, Shinjo S, Watanapokasin R. Apoptosis induction associated with the ER stress response through up-regulation of JNK in HeLa cells by gambogic acid. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15:26, (2015) 査読有り
2. Kiga M, Nakayama A, Shikata Y, Sasazawa Y, Murakami R, Nakanishi T, Tashiro E, Imoto M. SMK-17, a MEK1/2-specific inhibitor, selectively induces apoptosis in  $\beta$ -catenin-mutated tumors. *Scientific Report*. 5: 8155 (2015) 査読有り
3. Yoshimaru T, Komatsu M, Tashiro E, Imoto M, Osada H, Miyoshi M, Honda J, Sasa M, and Katagiri T. Xanthohumol suppresses oestrogen-signalling in breast cancer through the specific inhibition of BIG3-PHB2 interaction. *Scientific Report*. 4: 7335 (2014) 査読有り
4. Fujimaki T, Saiki S, Tashiro E, Yamada D, Kitagawa M, Hattori N and Imoto M. Identification of licopyranocoumarin and glycyrrulol from herbal medicines as neuroprotective compounds for Parkinson's disease. *PLoS One*. Jun 24;9(6):e100395 (2014) 査読有り
5. Magi S, Saeki Y, Kasamatsu M, Tashiro E, Imoto M. Chemical genomic-based pathway analyses for epidermal growth factor-mediated signaling in migrating cancer cells. *PLoS One*. 9 (5): e96776 (2014) 査読有り
6. Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S. Neovessel formation promotes liver fibrosis via providing latent transforming growth factor-. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1443: 950-956 (2014) 査読有り
7. Magi S, Takemoto Y, Kobayashi H, Kasamatsu M, Akita T, Tanaka A, Takano K, Tashiro E, Igarashi Y, Imoto M. 5-Lipoxygenase and CysLT1 regulate EGF induced cell migration

- through Tiam1 upregulation and Rac1 activation. *Cancer Science* 105:: 290-296 (2014) 査読有り
8. Sakata K, Eda S, Lee E, Hara M, Imoto M, Kojima S. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- type I receptor. *Scientific Reports* 3: 3243 (2013) 査読有り
  9. Ichige M, Fukuda E, Miida S, Hattan J, Misawa N, Saito S, Fujimaki T, Imoto M, Shindo K. Novel isoflavone glucosides in Groundnut (*Apios americana* Medik) and their antiandrogenic activities. *J. Agric. Food Chem.* 61: 2183-2187 (2013) 査読有り
  10. Shinjo S, Tashiro E, Imoto M. Establishment of a new detection system for the dimerization of IRE1 with BiFC method. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 1333-1336 (2013) 査読有り
  11. Shinjo S, Mizotani Y, Tashiro E, Imoto M. A Comparative Analysis of the Expression Patterns of UPR-Target Genes caused by UPR-inducing Compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 729-735 (2013) 査読有り
  12. Magi S, Shitara T, Takemoto Y, Sawada M, Kitagawa M, Tashiro E, Takahashi Y, Imoto M. Novel derivatives of aclacinomycin A block cancer cell migration through inhibition of farnesyl transferase. *J. Antibiot.* 66: 165-170 (2013) 査読有り

〔学会発表〕(計 32 件)

- 1) 溝谷優治、伊藤俊、堀田耕司、田代悦、岡浩太郎、井本正哉「カタユレイボヤにおける薬剤の毒性評価系の構築」日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 27 日 岡山大学 津島キャンパス (岡山県岡山市)
- 2) M. Imoto. "Chemistry and biology of natural products that modulate cellular responses" SIBM Natural Products 2015. 2015 年 1 月 12 日 San Diego, CA USA
- 3) 溝谷優治、堀田耕司、岡浩太郎、柴小菊、稲葉一男、鈴木麻友、田代悦、井本正哉「ケミカルジェネティクスによるホヤ脊索管形成機構の解析」第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日国立京都国際会館 (京都府京都市)
- 4) Yuki Shikata, Shuhei Kanagaki, Yukiko Sasazawa, Etsu Tashiro, Tetsuro Yoshimaru, Masato Komatsu, Toyomasa Katagiri, Masaya Imoto.

- "Antitumor activity of xanthohumol, an inhibitor of valosin-containing protein." AACR-NCI-EORTC International Conference, 2013 年 10 月 22 日. ボストン (米国)
- 5) Masaya Imoto "Chemistry and biology of Xanthohumol, an inhibitor of Valosin-Containing Protein." EMBO Workshop 【AAA+ proteins: from mechanism and disease to targets】 2013 年 9 月 18 日 Neuss / Germany

その他 28 件

〔図書〕(計 4 件)

- 1) 井本正哉: ビッグデータを利用した標的同定の実例 「生物活性分子のケミカルバイオロジー-標的同定と作用機構」 15 化学同人 79-85 (2015)
- 2) 井本正哉, 川谷誠: 分子標的同定の実例 「生物活性分子のケミカルバイオロジー-標的同定と作用機構」 カレントレビュー19 化学同人 26-33 (2015)
- 3) 北川光洋, 田代悦, 井本正哉: オートファジーに挑むケミカルバイオロジー 「天然物化学とケミカルバイオロジーの挑戦」 *化学工業* 65 (4): 22-27 (2014)
- 4) 田代悦, 井本正哉: 最新がん薬物療法学-がん薬物療法の最新知見-II がんの新規治療を目指した基礎研究 新しいがん薬物療法への革新技術「EMT を標的としたがん治療」 日本臨床 72 巻 増刊号 2 90-96 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.bio.keio.ac.jp/labs/imoto/>

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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

堀田 耕司 (HOTTA KOUJI)  
慶應義塾大学・理工学部・専任講師  
研究者番号：80407147

岡 浩太郎 (OKA KOUTARO)  
慶應義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号：10276412