

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22310140

研究課題名（和文） 難治性疾患に挑む化学生物学研究

研究課題名（英文） Chemical Biology on Cancer and Neurodegenerative disease

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）：

- 1) パーキンソン症:これまでまでに MPP+を添加させて形成される α -synuclein の凝集からなる斑点を阻害する化合物をスクリーニングして SO286 を見いだした. SO286 はオートリソソーム形成を促進することで α -synuclein の凝集が分解する. 現在 12 種類のタンパク質を SO286 結合タンパク質として同定した.
- 2) がん転移: A431 細胞では EGF による細胞遊走には Rac1 の活性化及び Rac1GEF である Tiam1 の発現上昇が必須であることを見出した. さらに Tiam1 は EGF 刺激によって転写が活性化することも見いだした.

研究成果の概要（英文）：

- 1) We showed that SO286 inhibited protein aggregation induced by MPP+ through lysosomal degradation pathway. We attempted to identify the target protein of SO286 responsible for the mechanism of SO286 inhibited the MPP+-induced dot formation and regulation of autophagy. Next, PC12D cell lysates were incubated for overnight with Biotin-SO286. The results, twelve protein bands that specifically co-precipitated with Biotin-SO286 were observed.
- 2) We report that 5-lipoxygenase (5-LOX) is activated and produces leukotriene C₄ (LTC₄) in the process of cell migration, and 5-LOX inhibitors suppressed cell migration. Next, we identified cysteinyl leukotoriene receptor 1 (CysLT1) antagonist also block cell migration. Furthermore, we found that 5-LOX inhibitors, CysLT1 antagonists, and the knockdown of CysLT1 inhibited the second wave of Rac1 activation and Tiam1 expression induced by EGF in A431 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：分子生物科学

キーワード：CysLT1 アンタゴニスト がん転移 オートファジー パーキンソン疾患

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病の細胞モデル系である神経毒 MPP⁺によって生じる斑点形成を阻害する化合物をスクリーニングしたところ SO286 がヒットした。SO286 による斑点形成阻害は、凝集タンパク質クリアランス活性によることが示唆されたがその機構は不明であった。A431 細胞を EGF 刺激によって細胞遊走を誘導すると 12 時間後に Rac1 が再び活性化されることを見いだした。

2. 研究の目的

SO286 による斑点形成阻害機構を明らかにする。また、EGF による 12 時間後の Rac1 活性化機構を明らかにする。

3. 研究の方法

SO286 による斑点形成阻害過程におけるオートファジーの関与を解析する。また、EGF による Rac1 の活性化における 5-リポキシゲナーゼの関与をケミカルバイオロジーの手法で明らかにする。

4. 研究成果

本申請課題では難治性疾患のうち「パーキンソン病」と「がん」に焦点を絞り、申請者らが開発した小分子化合物を用いて、その標的タンパク質の同定および作用機構解析を明らかにすることを目的とした。

1) パーキンソン症:これまでまでにパーキンソンモデル細胞系であるラット副髄腎質褐色細胞腫 PC12D 細胞内に MPP⁺を添加させると α -synuclein の凝集からなる斑点が形成されることを見だし、この斑点を阻害する

化合物をスクリーニングして SO286 を見いだした。この機構を解析した結果、SO286 を添加するとオートリソソーム形成が促進され α -synuclein の凝集が分解され、その結果細胞死が抑制されることを明らかにした。そこで SO286 の活性に影響を与えない部位にビオチンを付加したビオチン化 SO286 を用いた標的タンパク質の同定を試み、現在 12 種類のタンパク質を SO286 結合タンパク質として同定した。

2) がん転移:ヒト扁平上皮がん細胞 A431 細胞において EGF 依存的細胞遊走を 5-リポキシゲナーゼ阻害剤が抑制した。これまでに EGF による細胞遊走には Rac1 の活性化及び Rac1GEF である Tiam1 の発現上昇が必須であることが見出した。さらに Tiam1 は EGF 刺激によって転写が活性化する一方で、翻訳後修飾によってもその発現量が変化することも見いだした。

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 27 件) (査読: 全て有り)

1. 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)
2. Shinjo S, Tashiro E. Establishment of a new detection system for the dimerization of IRE1 α with BiFC method. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press
3. 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)

4. 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.* in press
5. Magi S, Tashiro E and Imoto M. A chemical genomic study identifying diversity in cell migration signaling in cancer cells. *Scientific Reports* 2: 823 (2012)
6. Kimura T, Kanagaki S, Matsui Y, Imoto M, Watanabe T, Shibasaki M. Synthesis and Assignment of the Absolute Configuration of an Indenotryptoline Bisindole Alkaloid, BE-54017. *Org. Lett.* 14: 4418-4421 (2012)
7. Ri M, Tashiro E, Oikawa D, Shinjo S, Tokuda M, Yokouchi Y, Narita T, Masaki A, Ito A, Ding J, Kusumoto S, Ishida T, Komatsu H, Shiotsu Y, Ueda R, Iwakaki T, Imoto M, Iida S. Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *Blood Cancer J.* e79 (2012)
8. Kobayashi H, Harada, H, Nakamura M, Futamura Y, Ito A, Yoshida M, Iemura S, Shin-ya K, Doi T, Takahashi T, Natsume T, Imoto M and Sakakibara Y. Comprehensive Predictions of Target Proteins Based on Protein-Chemical Interaction Using Virtual Screening and Experimental Verifications. *BMC Chemical Biology*, 12: 2 (2012)
9. Sasazawa Y, Kanagaki S, Tashiro E, Nogawa T, Muroi M, Kondoh Y, Osada H, Imoto M. Xanthohumol Impairs Autophagosome Maturation through Direct Inhibition of Valosin-Containing Protein. *ACS Chemical Biology*, 7, 892-900 (2012)
10. Yamamoto K, Makino M, Watanapokasin R, Tashiro E and Imoto M. Inostamycin enhanced TRAIL-induced apoptosis through DR5 up-regulation on the cell surface. *J. Antibiot.* 65:295-300 (2012)
11. Tashiro E and Imoto M. Target identification of bioactive compounds. *Bioorg. & Med. Chem.* 20: 1910-1921 (2012)
12. Yamamoto K, Tashiro E, Motohashi K, Seto H and Imoto M. Napyradiomycin A1, an inhibitor of mitochondrial complexes I and II. *J. Antibiot.* 65:211-214 (2012)
13. Kiga M, Tanzawa F, Iwasaki S, Inaba F, Fujiwara K, Iwadare H, Echigo T, Nakamura Y, Shibata T, Suzuki K, Yasumatsu, I, Nakayama A, Sasazawa Y, Tashiro E, Imoto M, S. Kurakata S. Antitumor effects of novel highly hydrophilic and non-ATP-competitive MEK1/2 inhibitor, SMK-17. *Anticancer Drugs*. 23: 119-130 (2012)
14. Kobayashi H, Ogura, Y, Sawada M, Nakayama T, Takano K, Minato Y, Takemoto Y, Tashiro E, Watanabe H & Imoto M. Involvement of 14-3-3 proteins in the second EGF-induced wave of Rac1 activation in the process of cell migration. *J. Biol. Chem.* 286: 39259-39268 (2011)
15. Yamada Y, Tashiro E, Taketani S, Imoto M and Kataoka T. Mycotrienin II, a translation inhibitor that prevents ICAM-1 expression induced by pro-inflammatory cytokines. *J. Antibiot.* 64: 361-366 (2011)
16. Kawamura T, Matsubara K, Otaka H, Tashiro E, Shindo, K, Yanagita R. C., Irie K and Imoto M. Generation of "Unnatural Natural Product" library and identification of a small molecule inhibitor of XIAP. *Bioorg. & Med. Chem.* 19: 4377-4385 (2011)
17. Sawada M, Kubo, S, Matsumura, K, Takemoto Y, Kobayashi H, Tashiro E, Kitahara T, Watanabe H and Imoto M. Synthesis and anti-migrative evaluation of moverastin derivatives. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 21: 1385-1389 (2011)
18. Yamamoto K, Tashiro E and Imoto M. Quinotrierixin Inhibits ER Stress-induced XBP1 mRNA Splicing through Inhibition of Protein Synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 284-288 (2011)
19. Kitagawa M, Misawa M, Ogawa S, Tashiro E and Imoto M. A New Convenient Cell-based Screening Method for Small Molecule Glycolytic Inhibitors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 367-369 (2011)
20. Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, Kobayashi H, Sato F, Kei-Ichi Ishikawa, Sato S, Imoto M, Hattori N: Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* 7: 42-53 (2011)
21. T. Ohtani, S. Tsukamoto, H. Kanda, K. Misawa, Y. Urakawa, T. Fujimaki, M. Imoto, Y. Takahashi, D. Takahashi[†], and K. Toshima. Total Synthesis of Incednam, the Aglycon of Incednine. *Org. Lett.*, 12: 5068-5071 (2010)
22. Kawamura T, Fujimaki T, Hamanaka N, Torii K, Kobayashi H, Takahashi Y, Igarashi M, Kinoshita N, Nishimura Y, Tashiro E, Imoto M. Isolation and structure elucidation of a novel androgen antagonist, arabilin, produced by *Streptomyces* sp. MK756-CF1. *J. Antibiot.*, 63: 601-605 (2010)

- 2 3. Kitagawa M, Ikeda S, Tashiro E, Soga T, Imoto M. : Metabolomic identification of the target of the filopodia protrusion inhibitor glucopiericidin A. *Chemistry and Biology*, 17: 989-998 (2010)
- 2 4. M. Shirai, M. Okuda, K. Motohashi, M. Imoto, K. Furihata, Y. Matsuo, A. Katsuta, Y. Shizuri, H. Seto, Terpenoids produced by actinomycetes: isolation, structural elucidation and biosynthesis of new diterpenes, gifhornenolones A and B from *Verrucosipora gifhornensis* YM28-088. *J. Antibiot.* 63: 245-250 (2010)
- 2 5. M. Urscher, JM. Przyborski, M. Imoto and M. Deponte. Distinct subcellular localization in the cytosol and apicoplast, unexpected dimerization and inhibition of *Plasmodium falciparum* glyoxalases. *Mol Microbiol.* 76: 92-103 (2010)
- 2 6. 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 7. Takeuchi M, Kimura S, Kuroda J, Ashihara E, Kawatani M, Osada H, Umezawa K, Yasui E, Imoto M., Tsuruo T, Yokota A, Tanaka R, Nagao T, Nakahata N, Fujiyama Y, Maekawa T.: Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl⁺ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in hypoxic environment. *Cell Death Diff.*, 17: 1211-1220 (2010)

[学会発表] (計 41 件)

1. 間木重行、笠松誠人、竹本靖、小林大貴、田代悦、井本正哉 「CysLT1 シグナルは Tiam1 の発現制御を介して EGF 刺激依存的細胞遊走を制御する」第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 20 日, 札幌
 2. 小林大貴、田代悦、井本正哉 「EGF 刺激によるがん細胞遊走における CysLT1 シグナリングの関与」第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2011 年 6 月 24 日, 東京
- その他、39 件

[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

()

研究者番号：