

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659213

研究課題名(和文)マラリアダイナミンを標的としたマラリア特效薬の開発

研究課題名(英文)Development of antimalarial drug targeting plasmodium falciparum dynamin

研究代表者

竹居 孝二 (Takei, Kohji)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40322226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroアクチン重合を指標にした小分子スクリーニングにより(N'-(4-(diethylamino)benzylidene)-4-methoxybenzohydrazide) (DBHA) によるダイナミン阻害効果を見いだした。さらに、ラッフル膜形成能、細胞遊走活性に対するDBHAの影響も調べ、解析結果を学術論文にまとめた。

熱帯熱マラリア原虫ダイナミンpfDyn1, pfDyn2を昆虫細胞に発現、精製し、マラリアダイナミンがGTPアーゼ活性と脂質膜変形能を持つことを明らかにした。GTPアーゼ活性を指標とした小分子スクリーニングにより、pfDyn2阻害候補物質を同定した。

研究成果の概要(英文)：By in vitro actin polymerization assay, we identified N'-(4-(diethylamino) benzylidene)-4-methoxybenzohydrazide (DBHA) as a dynamin inhibitor. Effects of DBHA on ruffle formation and cell migration were also examined, and the results on DBHA were published in a journal article.

Dynamin isoforms present in plasmodium falciparum, pfDyn1 and pfDyn2, were expressed in insect cells, and they were purified. Using these recombinant proteins, we demonstrated that both pfDyn1 and pfDyn2 have GTPase activity. It was also shown that pfDyn1 and pfDyn2 have an ability to deform lipid membranes. Furthermore, pfDyn2 inhibitor candidate molecules were determined by GTPase activity assay-based drug screening.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：マラリア アクチン ダイナミン コルタクチン 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

クロロキンをはじめとする抗マラリア薬に対する『耐性』が問題となっており、新規抗マラリア薬の開発が急務である。また、作用機序が十分解明されていない抗マラリア薬もあり、マラリア原虫の細胞生物学的解明も必要とされていた。

マラリア原虫のゲノムプロジェクトにより同定されたマラリアダイナミンは、機能不明であったが、ヒトダイナミンの知見から、栄養分摂取、アクチン制御、小胞輸送などマラリアの生存に重要な機能をもつことが予想された。

そこで本研究では、マラリアダイナミンの機能を解明するとともに、この分子をターゲットとする阻害剤の探索を開始した。

2. 研究の目的

- (1) マラリアダイナミンの機能解明
- (2) マラリアダイナミンをターゲットとする阻害剤探索

3. 研究の方法

- (1) マラリアダイナミンの機能解析
- (2) アクチン重合を指標としたダイナミン阻害剤スクリーニング
- (3) マラリアダイナミン GTPアーゼ活性を指標としたダイナミン阻害剤スクリーニング

4. 研究成果

- (1) マラリアダイナミンの機能解析
2種類のマラリアダイナミン(pfDyn1, pfDyn2)について、リコンビナントタンパクを昆虫細胞/ヴァキュロウイルス系で発現、生成した。

pfDyn1, pfDyn2 は共に GTPアーゼ活性を持ち、さらに、GTPアーゼ活性は塩濃度依存性に変化することを明らかにした。

リポゾームを用いて pfDyn2 による膜変形能を *in vitro* で解析した。その結果、pfDyn2 はフォスファチジルエタノラミン依存性に膜脂質を変形、凝集することが認められた。

- (2) アクチン重合を指標としたダイナミン阻害剤スクリーニング

ダイナミン阻害剤ダイナソアの構造類似体 181 種類について、*in vitro* アクチン重合を指標としてスクリーニングした。リーディング化合物であるダイナソア(既知のダイナミン阻害剤)よりも、強力なアクチン線維形成阻害作用を持つ分子

N'-[4-(dipropylamino)benzylidene]-2-hydroxybenzohydrazide (DBHA) を同定した。さらに、細胞における DBHA によるアクチンへの影響を、U2OS 細胞(骨肉腫細胞株)、H1299 細胞(ヒト非小細胞肺癌細胞株)のラッフル形成、仮足形成を指標に確認した。

- (3) マラリアダイナミン GTPアーゼ活性を指標としたダイナミン阻害剤スクリーニング

グ

ダイナソア類似体 121 種類をスクリーニングし、このうち、90%以上の阻害効果を示したものが2つ、50%以上の阻害効果を示したものが4つ、40%以上の阻害効果を示したものが5つヒットした。

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10件)

1. Yamada, H., Abe, T., Li, S.A., Tago, S., Huang, P., Watanabe, M., Ikeda, S., Ogo, N., Asai, A., Takei, K. (2013). N'-[4-(dipropylamino)benzylidene]-2-hydroxybenzohydrazide is a dynamin GTPase inhibitor that suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting actin polymerization. *Biochem Biophys Res Commun* 443, 511-517. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.118. 査読有
2. Yamada, H., Abe, T., Satoh, A., Okazaki, N., Tago, S., Kobayashi, K., Yoshida, Y., Oda, Y., Watanabe, M., Tomizawa, K., Matsui, H., and Takei, K. (2013). Stabilization of actin bundles by a dynamin 1/cortactin ring complex is necessary for growth cone filopodia. *J Neurosci* 33, 4514-4526. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2762-12.2013. 査読有
3. Hirata, T., Watanabe, M., Kaku, H., Kobayashi, Y., Yamada, H., Sakaguchi, M., Takei, K., Huh, N.H., Nasu, Y, Kumon, H. (2012). REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer. *Int J Oncol* 41: 559-564. doi: 10.3892/ijo.2012.1503. Epub 2012 May 31. 査読有
4. Ueki, H., Watanabe, M., Kaku, H., Huang, P., Li, S.A., Ochiai, K., Hirata, T., Noguchi, H., Yamada, H., Takei, K., Nasu, Y, Kashiwakura Y, and Kumon H. (2012). A novel gene expression system for detecting viable bladder cancer cells. *Int J Oncol* 41, 135-140. 査読有
5. Suzuki, M., Tanaka, H., Tanimura, A., Tanabe, K., Oe, N., Rai, S., Kon, S., Fukumoto, M., Takei, K., Abe, T., Matsumura, I., Kanakura, Y., and Watanabe, T. (2012). The clathrin assembly protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization in mice. *PLoS One* 7, e31854. doi: 10.1371/journal.pone.0031854. Epub 2012 Feb 21. 査読有
6. Ohashi, E., Tanabe, K., Henmi, Y., Mesaki, K., Kobayashi, Y., and Takei, K. (2011). Receptor sorting within endosomal trafficking pathway is

facilitated by dynamic actin filaments. PLoS One 6, e19942. doi: 10.1371/journal.pone.0019942. Epub 2011 May 20. 査読有

- Mesaki, K., Tanabe, K., Obayashi, M., Oe, N., and Takei, K. (2011). Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. PLoS One 6, e19764. doi: 10.1371/journal.pone.0019764. 査読有
- Ishida, N., Nakamura, Y., Tanabe, K., Li, S.A., and Takei, K. (2011). Dynamin 2 associates with microtubules at mitosis and regulates cell cycle progression. Cell Struct Funct 36, 145-154. 査読有
- Henmi, Y., Tanabe, K., and Takei, K. (2011). Disruption of microtubule network rescues aberrant actin comets in dynamin2-depleted cells. PLoS One 6, e28603. doi: 10.1371/journal.pone.0028603. Epub 2011 Dec 12. 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

- 竹居孝二、熱帯熱マラリア原虫ダイナミン GTPase の膜動態制御、第 83 回日本寄生虫学会大会、H.26.03.27~28、愛媛大学
- 山田浩司、熱帯熱マラリア原虫ダイナミン GTPase の膜動態制御と構造機能相関、「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」研究領域 CREST/さきがけ合同キックオフミーティング及び研究成果報告会、H.25.12.19~20、滋賀県守山市ラフォーレ琵琶湖
- 竹居孝二、ダイナミン GTPアーゼは生体膜とアクチン細胞骨格をメカニカルに制御する、「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」研究領域 CREST/さきがけ合同キックオフミーティング及び研究成果報告会、H.25.12.19~20、滋賀県守山市ラフォーレ琵琶湖
- 阿部匡史、N'-(4-(dipropylamino)benzylidene)-2-hydroxybenzohydrazide is a dynamin GTPase inhibitor and suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting actin polymerization、第 86 回日本生化学会大会、H.25.09.11~13、横浜市、パシフィコ横浜
- 竹居孝二、A novel mechanism of actin bundle formation supporting the formation of filopodia、第 65 回日本細胞生物学会大会、H.25.06.19~21、名古屋市ウインクあいち
- 山田浩司、Mechanochemical regulation of actin dynamics by a Dynamin 1 / Cortactin ring complex、第 5 回日本生物物理学会中国四国支部大会、H.25.05.25~26、香川県直島ベネッセハウス

- 竹居孝二、Dynamin GTPase / Cortactin ring complex is a mechanical device stabilizing actin bundles、第 38 回生体エネルギー研究会、H.24.12.22~24、岡山大学
- 岡崎奈奈、Dynamin を標的にした抗がん剤の開発、第 85 回日本生化学会大会、H.24.12.14~16、福岡国際会議場マリンメッセ福岡
- 山田浩司、Phosphorylation of cortactin by PKC is a key factor for filopodia formation of growth cones、第 85 回日本生化学会大会、H.24.12.14~16、福岡国際会議場マリンメッセ福岡
- 逸見祐次、ダイナミン 2 は微小管を介してアクチンコメットを制御する、第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会、H.24.05.18、岡山大学
- 田邊賢司、ホスファチジルイノシトール-4-キナーゼ II は初期エンドソームにおける選別輸送を制御する、第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会、H.24.05.18、岡山大学
- 竹居孝二、PKC phosphorylation of cortactin is implicated in the regulation of actin dynamics、第 51 回米国細胞生物学会、H.23.12.03~07、米国デンバー
- 竹居孝二、ダイナミン・コルタクチン複合体によるアクチン細胞骨格制御機構、第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、H.23.11.24~25、岡山大学
- 山田浩司、Phosphorylation of Cortactin by PKC alpha is involved in formation of filopodia of growth cones、第 84 回日本生化学会大会、H.23.09.21~24、国立京都国際会館
- 逸見祐次、Receptor Sorting Within Endosomal Trafficking Pathway Is Facilitated By Dynamic Actin Filaments、第 63 回日本細胞生物学会大会、H.23.06.27~29、北海道大学
- 田邊賢司、Phosphatidylinositol 4-kinase II alpha is required for receptor sorting at early endosomes、第 63 回日本細胞生物学会大会、H.23.06.27~29、北海道大学

〔図書〕(計 1 件)

- Takei, K. and Tanabe, K. (2012). Etiological role of dynamin in Charcot-Marie-Tooth disease. "Peripheral Neuropathy - Advances in Diagnostic and Therapeutic Approaches", InTech (Rijeka, Croatia), p3-20, ISBN 978-953-51-0066-9

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

- 名称：抗浸潤薬の新規スクリーニング法および抗浸潤剤

発明者：山田浩司、竹居孝二、道上宏之、
松井秀樹、浅井章良
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-137489
出願年月日：2012年6月19日

2. 名称：フルボキサミンを配合することを
特徴とする分子標的型抗癌剤（特に抗脳
腫瘍治療薬剤：第二医薬品用途）
発明者：道上宏之、林圭一郎、松井秀樹、
山田浩司、竹居孝二、宮地弘幸、浅井章
良
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-263317
出願年月日：2012年11月30日

取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹居 孝二 (TAKEI KOHJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40322226

(2) 研究分担者

山田 浩司 (YAMADA HIROSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教
授
研究者番号：80325092

(3) 連携研究者

()

研究者番号：