

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750389

研究課題名(和文)単極紡錘体を誘導する小分子の作用機構解析

研究課題名(英文)The mechanism of action of small molecule that induces monopolar spindle

研究代表者

紙透 伸治 (KAMISUKI, SHINJI)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：30553846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ピレノシンAは子宮頸がん細胞に対して単極紡錘体を誘導する。本研究では、ピレノシンAの作用メカニズムの解明を目的として研究を行った。ピレノシンAのアルキン誘導体を用いて細胞内の局在を解析した結果、ピレノシンAは中心体に局在していることが示唆された。このことからピレノシンAは中心体に存在するタンパク質に作用することが示唆された。さらに、ピレノシンAのアルキン誘導体を用いて、ピレノシンA結合タンパク質の探索を行った。その結果、enolase 1, elongation factor 1-alpha 1などのタンパク質が同定された。

研究成果の概要(英文)：Pyrenocine A induces monopolar spindle against HeLa cells. To reveal the mechanism of action, we analyzed the localization of pyrenocine A in a cell using pyrenocine A-alkyne derivative. As a result, the derivative was found to localize to centrosome, which suggested that pyrenocine A bound to proteins at centrosome. To identify target proteins of pyrenocine A, we purified pyrenocine A-binding proteins using pyrenocine A-alkyne derivatives. The obtained binding proteins were found to be enolase 1 and elongation factor 1-alpha 1 by LCMS/MS analysis.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：活性発現の分子機構 標的タンパク質 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

(1) ピレノシン A

我々の研究室では、主に真菌から天然有機化合物を単離し、小規模であるが新規物質を多く含む独自の化合物ライブラリーを構築している。これら化合物ライブラリーに対して各種生理活性試験を行ったところ、ピレノシン A¹ (図 1) は子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) の細胞増殖抑制活性を示した。さらに本化合物に対してライブセルイメージングの手法を用いた解析を行った結果、紡錘体形成に影響を与えることが明らかになった。

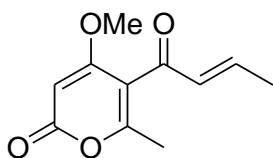


図 1 ピレノシン A の構造

(2) 単極紡錘体

細胞が分裂して 2 つに増殖する際、染色体を分配する紡錘体と呼ばれる構造を形成する。ピレノシン A 処理した細胞の微小管を抗

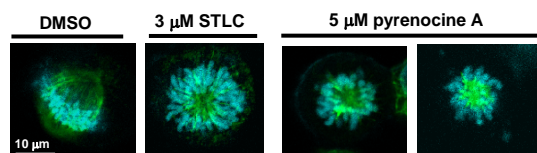


図 2 ピレノシン A, STLC 処理した細胞の免疫染色

チューブリン抗体により染色した結果、通常二つの極になる紡錘体が一つの極に形成されることが明らかになった (図 2)。このような形態は単極紡錘体と呼ばれ、単極紡錘体を誘導する化合物としては STLC やモノストール²が知られている。これらの化合物は、モータータンパク質 Eg5 を阻害することで単極紡錘体を誘導する。そこでピレノシン A の Eg5 に与える影響を調べた。Eg5 は ATPアーゼ活性を有し、単極紡錘体を引き起こす STLC やモノストールなどの Eg5 阻害剤は、

この酵素活性を阻害する。ピレノシン A による *in vitro* の Eg5 の ATP アーゼ活性の阻害効果を調べた。その結果、ピレノシン A は Eg5 の ATP アーゼ活性を阻害せず、他のタンパク質を標的としていることが示唆された。

2. 研究の目的

新規作用機構を有するピレノシン A の標的分子の同定を目的とする。ケミカルバイオロジー研究で用いられる手法を駆使することにより標的タンパク質を同定し、細胞内での作用機構解析を行う。得られた標的タンパク質は、細胞分裂期における紡錘体形成の制御に関わる新たなタンパク質となる可能性がある。

3. 研究の方法

まずピレノシン A のプローブとして、アルキン誘導体 (PyrA-alk) 及びビオチン誘導体 (PyrA-bio) を合成した (図 3)。PyrA-alk で処理した HeLa 細胞を抗チューブリン抗体により免疫染色し、単極紡錘体を誘導することを確認した。

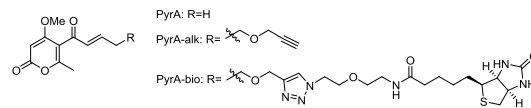


図 3 ピレノシン A アルキン誘導体 (PyrA-alk) 及びビオチン誘導体 (PyrA-bio) の構造

(1) 細胞内局在の解析

PyrA-alk で HeLa 細胞を処理し、固定化後、クリックケミストリーにより蛍光色素である Alexa を導入した。その後、共焦点顕微鏡により観察し、細胞内の局在を解析した。

(2) 標的タンパク質の探索

以下の二つの方法により結合タンパク質を探索した。

- ① HeLa 細胞の細胞破碎液と PyrA-bio を固定化した NeutrAvidin ビーズを混合し、ピ

レノシン A 結合タンパク質を精製した。

- ② HeLa 細胞を PyrA-alk で処理し、その細胞破砕液中のピレノシン A のアルキン部位に、クリックケミストリーによりアジド基が結合したビオチンを導入した。ビオチン化タンパク質を NeutrAvidin ビーズに用いて精製した。

精製したタンパク質を SDS-PAGE により分離後、銀染色あるいは CBB 染色、Streptavidin-HRP によりピレノシン A 結合タンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) 細胞内局在の解析

PyrA-alk は、リング状に観察される染色体の中心にドット状に集積することが示唆された。さらに、中心体に存在する γ チューブリンの抗体で免疫染色した結果、ピレノシン A アルキン体の局在と重なることが明らかになった (図 4)。以上の結果から、ピレノシン A は中心体に作用していることが示唆された。

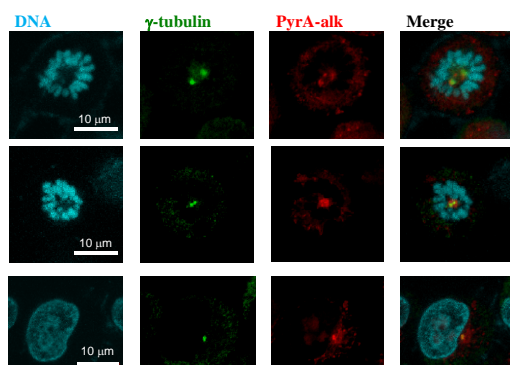


図 4 ピレノシン A アルキン誘導体と γ -チューブリン (中心体) の細胞内局在

この局在はこの化合物に特徴的であり、細胞分裂期では中心体は紡錘体極となるため、関連性が強く示唆された。

(2) 標的タンパク質の探索

①の方法で精製した PyrA-alk 結合タンパク質を SDS-PAGE により解析した (図 5)。

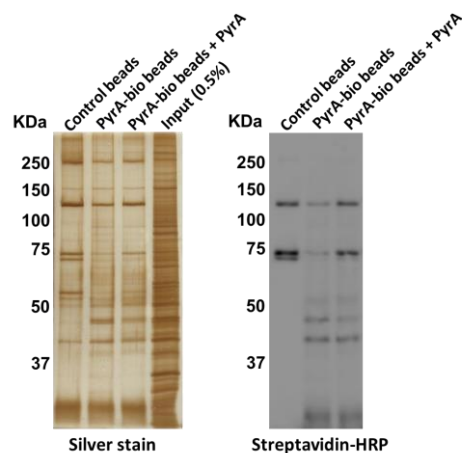


図 5 ピレノシン A 結合タンパク質の探索①

その結果、45 kDa 付近のタンパク質に結合することが示唆された。このタンパク質は Streptavidin-HRP で検出されることから、PyrA-bio と共有結合していることが示唆された。また、この結合は過剰なピレノシン A と競合することがわかった (図 5)。

方法②で結合タンパク質を精製した結果、①と同様に 45 kDa 付近のタンパク質が検出された。(図 6)。

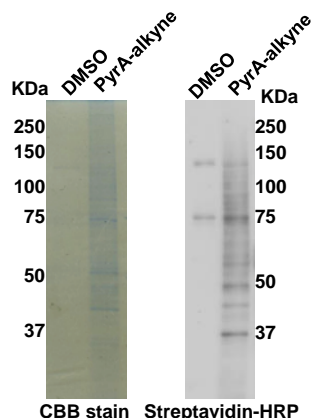


図 6 ピレノシン A 結合タンパク質の探索②

このタンパク質のバンドをトリプシン消化後、LC-MS/MS により解析した。その結果、このタンパク質は enolase 1, elongation factor 1-alpha 1 であることが示唆された。

<引用文献>

1. Sato, H., Konoma, K., Sakamura, S. *Agric. Biol. Chem.*, **1979**, *43*, 2409.
2. Mayer, T. U., Kapoor T. M., Haggarty, S.J., King, R. W., Schreiber, S.L., Mitchison, T.J. *Science* **1999**, *286*, 971.

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 3 件)

- (1) Takemoto, T., Kamisuki, S., Chia, P., Kuriyama, I., Mizushina, Y., Sugawara, F. Bioactive dihydronaphthoquinone derivatives from *Fusarium solani*. (査読付) *J. Nat. Prod.*, **77**(9), 1992-1996 (2014)
DOI: 10.1021/np500175j
- (2) Myobatake, Y., Takemoto, K., Kamisuki, S., Inoue, N., Takasaki, A., Takeuchi, T., Mizushina, Y., Sugawara, F. Cytotoxic alkylated hydroquinone, phenol and cyclohexenone derivatives from *Aspergillus violaceofuscus* Gasperini. (査読付) *J. Nat. Prod.*, **77**(5), 1236-1240 (2014)
DOI: 10.1021/np401017g
- (3) Mizushina Y., Suzuki-Fukudome, H., Takeuchi, T., Takemoto, K., Kuriyama, I., Yoshida, H., Kamisuki, S., Sugawara, F. Formosusin A, a novel specific inhibitor of mammalian DNA polymerase β from the fungus *Paecilomyces formosus*. (査読付) *Bioorg. Med. Chem.*, **22**(3), 1070-1076 (2014)
DOI:10.1016/j.bmc.2013.12.038

[学会発表] (計 3 件)

- ① 紙透伸治
細胞毒性をもつ小分子の作用機構解析
新学術領域研究 天然物ケミカルバイオロジー 地区ミニシンポジウム
2014年3月1日
理化学研究所 (埼玉県・和光市)
- ② 紙透伸治、明島佑典、九十田千子、東恒仁、知念拓実、竹本健二、志村聡美、松永朋子、佐原弘益、臼井健郎、松永幸大、

菅原二三男
単極紡錘体を誘導するピレノシンAの作用機構解析
日本農芸化学会
2014年3月29日
明治大学 (神奈川県・川崎市)

- ③ 紙透伸治、明島佑典、九十田千子、東恒仁、知念拓実、竹本健二、志村聡美、竹内論文、松永朋子、佐原弘益、臼井健郎、松永幸大、菅原二三男
単極紡錘体を誘導するピレノシンAの作用機構解析
日本ケミカルバイオロジー学会
2014年6月11日~2014年6月13日
大阪大学 (大阪府・豊中市)

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
紙透 伸治 (KAMISUKI, Shinji)
東京理科大学・理工学部・助教
研究者番号：30553846

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：