

**研究助成 2017 – がん領域 –**  
**研究成果報告書（最終） <概要>**

|              |                                   |
|--------------|-----------------------------------|
| <b>所 属</b>   | 大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野             |
| <b>氏 名</b>   | 樋野 展正                             |
| <b>研究テーマ</b> | ミスセンス変異集積領域に着目したがん特異的タンパク質間相互作用解析 |

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

**【研究の目的】**

本研究では、がんゲノム変異情報の95%以上を占める未活用データから創薬標的となるがん特異的タンパク質間相互作用を戦略的に見出すことを目指す。具体的には、がんゲノム情報とタンパク質立体構造情報を組み合わせて用いることにより変異が集中して見つかるタンパク質表面を「変異集積領域」として特定し、さらに、その領域を介して生じる相互作用を「細胞内光クロスリンク法」という独自手法を用いて集中的に解析する。これにより、がん変異により異常をきたすタンパク質間相互作用を特異的に見出す戦略を確立する。

**【研究手法・成果】**

我々は、肺腺がん・非小細胞性肺がん患者の15%以上に変異が見られる KEAP1 遺伝子に着目した。まず、遺伝子上のがん突然変異部位をデータベースから取得し、翻訳後のタンパク質立体構造上にプロットすることにより、その Kelch ドメイン上に変異が集積する領域を見出すことに成功した。そこで、この領域を介して相互作用する因子を独自の細胞内光クロスリンク法を用いて同定することを試みた。この手法は、細胞内に光クロスリンカーとして機能する人工アミノ酸を部位特異的に組み込んだ任意のタンパク質を発現させておき、細胞への光照射によってそのタンパク質と細胞内でダイレクトに結合する因子を捕捉・同定する手法である。これにより、KEAP1 の新規相互作用因子として RAB8a を含む複数の GTPase を同定することに成功した。さらに、結合親和性解析により、KEAP1 へのがん変異が実際に RAB8a との結合を阻害することも明らかとした。以上より、変異集積領域に着目した解析からがん変異に影響される新規タンパク質間相互作用を見出すという当初の目的は達成された。次いで、両者の機能的関連性について解析を進めた。RAB8a は小胞輸送に関わるタンパク質であり、様々な膜タンパク質やプロテアーゼを細胞辺縁へと輸送することでがんの遊走・浸潤に寄与することが知られている。まず、Transwell assay を用いて HeLa 細胞の遊走・浸潤過程における両者の寄与を調べたところ、KEAP1 の機能破壊により細胞の遊走・浸潤能が亢進し、その効果は RAB8a の機能破壊によりキャンセルされた。さらに、免疫染色により、内在性の KEAP1 と RAB8a が共局在すること、また、RAB8a 過剰発現時に観察されるメタロプロテアーゼ MT1-MMP の細胞辺縁への移動が KEAP1 過剰発現により抑制されることを示した。これらのことから、KEAP1 は RAB8a によるタンパク質輸送を制限することでがん細胞の遊走・浸潤を抑制する可能性が示された。

## 研究助成 2017 –がん領域–

## 研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

|   |   |                       |
|---|---|-----------------------|
| 所 | 属 | 大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野 |
| 氏 | 名 | 樋野 展正                 |

## 1. 論文発表実績

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、投稿中の論文はその旨を記載すること。なお学会のアブストラクトは含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

|   |  |
|---|--|
| 1 | Yanagisawa T, Kuratani M, Seki E, <u>Hino N</u> , Sakamoto K, Yokoyama S. "Structural Basis for Genetic-Code Expansion with Bulky Lysine Derivatives by an Engineered Pyrrolysyl-tRNA Synthetase" <b>Cell Chem. Biol.</b> pii: S2451-9456(19)30104-7. (2019) 査読あり  |
| 2 | Noguchi YT, Nakamura M, <u>Hino N</u> , Nogami J, Tsuji S, Sato T, Zhang L, Tsujikawa K, Tanaka T, Izawa K, Okada Y, Doi T, Kokubo H, Harada A, Uezumi A, Gessler M, Ohkawa Y, Fukada SI. "Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: HeyL requires Hes1 to bind diverse DNA sites" <b>Development</b> 146, dev163618, (2019) 査読あり |
| 3 | Shirakura K, Ishiba R, Kashio T, Funatsu R, Tanaka T, Fukada SI, Ishimoto K, <u>Hino N</u> , Kondoh M, Ago Y, Fujio Y, Yano K, Doi T, Aird WC, Okada Y. "The Robo4-TRAF7 complex suppresses endothelial hyperpermeability in inflammation" <b>J. Cell. Sci.</b> 2019 132, jcs220228, (2019) 査読あり   |
| 4 | Okuno H, Okuzono H, Hayase A, Kumagai F, Tanii S, <u>Hino N</u> , Okada Y, Tachibana K, Doi T, Ishimoto K. "Lipin-1 is a novel substrate of protein phosphatase PGAM5" <b>Biochem. Biophys. Res. Commun.</b> 509, 886-891, (2019) 査読あり   |
| 5 | Tanaka T, Izawa K, Maniwa Y, Okamura M, Okada A, Yamaguchi T, Shirakura K, Maekawa N, Matsui H, Ishimoto K, <u>Hino N</u> , Nakagawa O, Aird WC, Mizuguchi H, Kawabata K, Doi T, Okada Y. "ETV2-TET1/TET2 Complexes Induce Endothelial Cell-Specific Robo4 Expression via Promoter Demethylation" <b>Sci Rep.</b> 8, 5653, (2018) 査読あり                             |
| 6 | Shirakura K, Ishiba R, Kashio T, Sakai M, Fukushima Y, Yamamoto N, Manabe S, Shigesada N, Tanaka T, <u>Hino N</u> , Aird WC, Doi T, Okada Y. "Endothelial Robo4 regulates IL-6 production by endothelial cells and monocytes via a crosstalk mechanism in inflammation" <b>Biochem. Biophys. Res. Commun.</b> 495, 801-806, (2018) 査読あり                            |

| 2. 学会発表実績  |          |   |
|--|----------|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul> |          |   |
|  | 発表時期     | 発表学会名、発表者名、演題   |
| 1  | 2019年12月 | 第41回 日本分子生物学会年会、向山樹, 廣田康二, 鳴海良平, 山本紘義, 重松知沙, 山本真実, 足立淳, 土井健史, 樋野展正「細胞内光クロスリンク法を用いたがん特異的タンパク質間相互作用の効率的な解析系の確立」               |
| 2  | 2019年12月 | 第41回 日本分子生物学会年会、Jeremia Febrian, 喜多 絢海, 谷口 健悟, 和島 壮一, 齋藤 里緒, 高島 成二, 土井 健史, 樋野 展正「DNA 脱メチル化関連酵素 TET1 の活性調節機構の解析」             |
| 3  | 2019年6月  | 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会、樋野展正, 向山樹, 鳴海良平, 川端猛, 山本紘義, 重松知沙, 山本真実, 栗栖源嗣, 足立淳, 土井健史 「変異集積表面への光クロスリンカー導入によるがん特異的蛋白質間相互作用の同定」       |
| 4  | 2019年6月  | 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会、山本紘義, 向山樹, 鳴海良平, 重松知沙, 山本真実, 足立淳, 土井健史, 樋野展正 「細胞内光クロスリンク法を利用した新規肺がん治療標的の探索」                           |
| 5  | 2019年6月  | 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会、和島壮一, 喜多絢海, 谷口健吾, Jeremia Febrian, 齋藤里緒, 高島成二, 土井健史, 樋野展正「細胞内光クロスリンク法による DNA 脱メチル化酵素 TET1 の活性調節因子の探索」 |
| 6  | 2018年11月 | 第41回 日本分子生物学会年会、柳沢達男, 倉谷光央, 関英子, 樋野展正, 坂本健作, 横山茂之 「ピロリシル tRNA 合成酵素の構造生物学:様々な非天然型アミノ酸を割り当てる遺伝暗号拡張の構造基盤」                      |
| 7  | 2017年12月 | 第40回 日本分子生物学会年会、廣田康二, 樋野展正, 鳴海良平, 堀越亮太, 向山樹, 足立淳, 朝長毅, 土井健史「細胞内光クロスリンク法によるがん変異特異的タンパク質間相互作用解析」                              |
| 3. 投稿、発表予定   |          |   |
|  | 投稿/発表時期  | 雑誌名、学会名等  |
| 1  | 2020年3月  | 日本薬学会 第140回年会   |

|   |  |  |
|---|--|--|
| 2 |  |  |
| 3 |  |  |
| 4 |  |  |
|   |  |  |
|   |  |  |