

長田抗生物質研究室 Antibiotics Laboratory

主任研究員 長田 裕之
OSADA, Hiroyuki

微生物が生産する生物活性小分子は化学的・生物学的な多様性に富んでいる。当研究室では、真核細胞の分化・増殖・アポトーシスを制御する新しい小分子を探索し、その化学生物学的研究を行っている。微生物二次代謝産物の生合成研究・メタボローム解析、小分子固定化技術を応用したタンパク質と小分子の相互作用研究、構造活性相関研究、並びにプロテオーム研究を行っている。阻害剤の細胞内分子標的を解明し、化合物ライブラリー(NPDepo)を構築することによって、小分子を生命科学研究のバイオプローブとして役立てると共に、医薬・農薬として有用な薬剤創製のための基礎研究を目的としている。

1. 新規バイオプローブ探索の微生物学的・化学的研究

(1) サイトトリエン生合成経路の解明 (植木)

サイトトリエンの生産株 *Streptomyces* sp. RK95-74 の培養液より、トリエン系物質の探索を行ったところ、サイトトリエン生合成中間体や類縁体を取得することができ、そのうち幾つかは新規物質であった。また、サイトトリエン生産菌のゲノム解析が、横浜研究所・ゲノム科学総合研究センター(豊田敦上級研究員)との共同で、ほぼ終了した。長さは約 10.2 メガ塩基対で、ポリケチド合成酵素(PKS)や非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)など二次代謝産物の生合成遺伝子群が数多くあるように思われた。これまでに同定したサイトトリエン生合成遺伝子群と、ゲノム解析、代謝産物の構造から、サイトトリエンの生合成経路を予想した。

(2) 放線菌代謝産物の系統的取得とデータベース作成 (植木、野川¹、齋藤²、浦本³、高木⁴、杉本⁵、貝塚⁵、荒蒔⁶)

放線菌が作り出す多種多様な代謝産物を効率よく系統的に取得する方法を構築した。当研究室で分離された有用代謝産物生産放線菌 10 株を CDY 培地を用いて培養し、得られた微生物抽出物をこの方法を用いて分画を行った。得られた画分は全て LC/MS により分析し、データベースを作成し、これをフラクションライブラリーとした。分析結果を基に画分の中から、さらに代謝産物の精製を行う画分を選び出し、それらの中に含まれる幾つかの代謝産物の構造を決定した。また、ライブラリーをスクリーニングや化合物アレイに利用しやすいように一定濃度に溶解して、整理した。

(3) 血管新生・細胞周期・アポトーシスを制御する新規バイオプローブの探索研究 (掛谷⁷、近藤、森¹、青野⁶、辻田⁸、一宮⁴)

血管新生・細胞周期・アポトーシスを制御するバイオプローブの開発を目的とした探索研究を、マウス温度感受性 *cdc2* 変異株乳癌細胞 FT210、VEGF-Luc/HT1080 細胞などを用いて行い、精製対象株となる微生物代謝産物を見出し、活性物質の単離・精製を検討した。また、アポトーシス阻害蛋白質 XIAP 機能抑制物質の探索を *in vitro* 探索系、およびマイクロアレイ法を用いて行った。

(4) リペロマイシン A 生合成遺伝子クラスターの解析及び遺伝子改変による新規生体機能分子の創製 (高橋、植木)

リペロマイシン A は、放線菌 (*Streptomyces reveromyceticus*) が生産するポリケチド化合物であり、破骨細胞選択的にアポトーシスを誘導する。本研究では、遺伝子機能改変による新規生体機能分子の創製を目指して、リペロマイシン A 生産に関わる生合成遺伝子群の取得を開始した。生産培地を用いた場合のみ特異的に発現する遺伝子群の解析と横浜研究所・ゲノム科学総合研究センター(豊田敦上級研究員)との共同研究により得られたゲノムドラフトシーケンス情報を統合することにより、リペロマイシン A 生合成遺伝子クラスター候補を取得することに成功した。遺伝子配列情報から、リペロマイシン A はプロピオン酸ユニットが長く合成され、生合成過程で切断されることが予想された。さらに詳細な代謝産物の解析から、遺伝子情報を示唆する新規生合成中間体(リペロマイシン A2)が得られた。

(5) トリプロスタチン類の生合成研究 (加藤⁹、鈴木⁹、高木⁴、浦本³)

A. fumigatus BM939 株が生産するトリプロスタチン(TPS)類はトリプトファンとプロリンから成るジケトピペラジン化合物である。候補生合成遺伝子クラスター中に含まれる NRPS(非リボソーム型ペプチド合成酵素)遺伝子の欠失により TPS 生産が欠損することから、本生合成遺伝子クラスターが *A. fumigatus* において TPS 生合成を担っていることが明らかになった。また、TPS-A 生産に関わる他の遺伝子についてもノックアウトにより同定し、異宿主発現させた組換えタンパク質を用いて機能解析を行った。その結果、1) NRPS によるジペプチド brevianamide F 生成、2) ジメチルアリルトリプトファン合成酵素によるプレニル化、3) チトクローム P450 酸化酵素によるインドール環 6 位の水酸化、4) メチル基転移酵素によるメチル化、を経て TPS-A が生合成されることが示された。

(6) 天然化合物バンクおよび化合物データベースの構築 (斎藤、今野⁴、富木⁷、田中¹⁰)

ケミカルバイオロジー研究の基盤を構築する目的で、放線菌が生産する二次代謝化合物を中心とした天然化合物を収集して、保管管理、配付するためのシステム(天然化合物バンク)を構築している。これまでに、研究室において精製した代謝産物の他にも、理研内外の研究者から寄託された天然化合物および合成化合物を含め、約 22,000 化合物を保管している。また、これらの化合物情報を収録した化合物データベースシステム(天然化合物エンサイクロペディア)の整備を進めており、部分構造検索など多様な検索エンジンが利用可能となった。

(7) アポトーシスを制御する新規バイオプローブの探索研究(清水、辻田⁸)

アポトーシス阻害蛋白質 XIAP 機能抑制物質の探索、および caspase-3 経路を直接活性化する薬剤の探索を *in vitro* 探索系、およびマイクロアレイ法を用いて行った。その結果、*in vitro* における caspase-3 経路の活性化剤として enniatin 類を同定した。また、様々な enniatin 類を試験した結果、*in vitro* の caspase-3 経路活性化能と細胞毒性が一致していた。

2. バイオプローブの分子標的解明

(1) ヒト白血病細胞分化誘導物質の探索(川谷¹、青野⁶、南谷¹¹)

ヒト白血病細胞に対する分化誘導物質を取得するため、細胞表現型をベースとしたスクリーニングを行った。その結果、化合物ライブラリー(NPDepo)からいくつかの活性物質を見出した。

(2) 抗腫瘍活性物質 BNS-22 の細胞内標的分子の同定(川谷¹、高山¹²)

前年度に引き続き、京都大学医学部木村晋也博士らと共同で、抗腫瘍活性物質 BNS-22 の作用解析を行った。その結果、BNS-22 は細胞内で DNA topoisomerase II を標的とし、その catalytic inhibitor として作用することを明らかにした。

(3) プロテオミックスを用いた阻害剤の作用解析(室井、野田⁵、近藤⁴、仲田⁵、風見¹³、西澤⁶)

阻害剤の作用標的を明らかにするために、蛍光標識 2 次元ディファレンスゲル電気泳動によるプロテオミックスを用いて、タンパク質発現に及ぼす薬剤の作用解析を行った。酵母薬剤感受性株の解析に加え HeLa 細胞を用いた薬剤プロテオームデータベースの構築を開始した。現在までに 18 化合物についてプロファイルを取得し、階層型クラスター法をもちいて分類した。

(4) メチルゲルフェリンとグリオキサラーゼの共結晶構造解析(奥村⁹、川谷¹)

真菌由来化合物ゲルフェリンのメチルエステル体であるメチルゲルフェリン(M-GFN)がグリオキサラーゼ I(GLO1)を標的とすることがこれまでに明らかにされている。そこで M-GFN の阻害機構の詳細を明らかにするために M-GFN と GLO1 の複合体の X 線結晶構造解析を行い、1.7Å 分解能での構造を得た。この構造モデルでは、M-GFN は GLO1 の基質ポケットに結合し、M-GFN の有する二つの水酸基が GLO1 の活性部位に存在する垂鉛イオンに配位していた。これまでに報告された GSH 誘導体型阻害剤と GLO1 の複合体構造では、阻害剤の GSH 部が GLO1 のアミノ酸残基と水素結合を形成しているのに対し、M-GFN では GSH 部に相当する領域において疎水性相互作用を主とした相互作用をしていた。すなわち既存の GSH 誘導体型 GLO1 阻害剤とは異なる結合様式をとっていることが明らかとなった。

(5) プレオマイシン結合タンパク質 Shble とプレオマイシン誘導体の共結晶構造解析(奥村⁹、宮崎⁸、清水)

プレオマイシン結合タンパク質 Shble とプレオマイシン誘導体の相互作用様式の詳細を明らかにするために、Shble と bleomycin A6 の共結晶構造解析を行った。その結果 1.6Å 分解能の共結晶構造が得られた。明らかになったリガンド結合様式により、種々のプレオマイシン誘導体の結合能に対する構造的な説明ができた。

(6) 天然化合物バンクの化合物ライブラリーを用いた化合物アレイの構築(近藤、本田⁴、雨宮⁴、浅見⁵)

天然化合物バンクに保管されている天然化合物及び天然化合物誘導体を光親和型アレイ基板に固定した化合物アレイ「NPDepoArray」を作製した。約 6700 化合物を搭載した NPDepoArray が完成し、タンパク質のリガンドスクリーニングに用いた。

(7) 化合物アレイを用いた各種タンパク質に対するリガンド探索(近藤、本田⁴、雨宮⁴、浅見⁵、齊藤⁹)

化合物アレイ「NPDepoArray」を用いて、各種タンパク質に対するリガンドスクリーニングを行い、解析したタンパク質にアレイ上で結合する化合物を得た。

(8) 光親和型低分子アフィニティー樹脂を用いた各種生理活性有機化合物に対する結合タンパク質探索(本田⁴、近藤)

市販の活性基付きセファロースビーズ及び磁気ビーズを用いて光親和型ビーズを作製し、生理活性を持つ化合物を固定化した光親和型化合物ビーズを作製した。

(9) 光親和型低分子マイクロアレイと表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング法との融合技術の改良(齊藤⁹、河合¹³、高山¹²、須藤、近藤)

前年に引き続き、光親和型低分子マイクロアレイと表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング法との融合技術を更に高感度化するために、マイクロアレイ基板表面の処理条件(リンカーの種類と組成)の最適化を行った。新規に合成したリンカーを用い、p38 MAP kinase と p62 の結合部位を決定する事が出来た。

(10) ホスラクトマイシン類縁体による白血病細胞の分化誘導(清水、盛崎⁹)

PP2A 特異的阻害剤であるホスラクトマイシンの誘導体に白血病細胞に対する分化誘導活性を見出していたので、結合タンパク質同定のために、様々なリンカーの合成を行った。

(11) 低分子化合物 タンパク質相互作用の網羅的解析法の確立(清水、宮崎⁸、一宮⁴)

官能基非依存的固定化法による低分子マイクロアレイを用いて、標的タンパク質の網羅的スクリーニング法の確立を試み、これまでに、ヒト培養細胞に RFP 融合目的遺伝子を一過的に発現させ、得られた細胞抽出物をアレイと反応させることにより、低分子化合物 標的タンパク質間の相互作用を検出する系を確立した。さらに、遺伝子発現ライブラリーを充実させるとともに化合物をスクリーニングした。

3. 新たな分子標的の開拓と機能解析

(1) PIK1 のポロボックス領域(PBD)依存結合阻害物質を用いた、PBD の分裂期における役割の解析(渡邊、森¹、真田⁵、関根¹⁴)

ポロ関連リン酸化酵素(Polo like kinase 1; Plk1)が C 端側に有するポロボックス領域(PBD)はリン酸化した他のタンパク質

と結合する領域である。PBD 依存結合を阻害する小分子があれば、PIk1 の細胞分裂期における様々な役割の中で PBD 依存結合がどのような役割を担うのかをケミカルバイオロジー的に解析することが可能となり、またがん細胞に高発現しその増殖に重要な PIk1 の新たな阻害剤のリードともなりうる。そこで PBD 依存的結合を阻害する物質の探索系を構築し、得られた阻害剤を用いて PBD 依存的結合が分裂期における染色体の速やかな整列に重要であることを明らかにした。また PBD 結合阻害活性を生産するカビ株を見出した。

(2) エイズウイルス (HIV-1) アクセサリータンパク質 Vpr 阻害剤の探索と作用解析 (渡邊、Ong^{*15})

すでにエイズウイルスがコードするタンパク質 Vpr の細胞増殖抑制作用を阻害する物質を出芽酵母を用いて探索する系を構築していたが、この系を応用しハイスループット探索系を構築した。探索系によって得られた物質についてその作用機作を解析した。

(3) シグナル伝達における p38 の機能解析 (須藤、河合^{*13}、齊藤^{*9})

昨年度に引き続き p62 内の p38 結合領域を詳細に同定するために、表面プラズモン共鳴法 (SPR) による解析を行った。その結果、p62 の 173-182 残基が直接結合することを明らかにした。さらに、p38 シグナル伝達系における p62 の機能を明らかとすることを目的とし、siRNA による p62 のノックダウン (KD) を行った。p38 を活性化させる様々な刺激で処理し、p38 のリン酸化を p62 KD 細胞とコントロール細胞間で比較した。その結果、アニソマイシン、浸透圧刺激、UV 刺激では p62 の有無によって差異は観察されなかったが、TNF- α 、IL-1 β など、p62 がその構成因子のひとつである特異的レセプター複合体を介したサイトカイン刺激では、p62 KD 細胞における p38 のリン酸化は顕著に減弱していた。このことから、p62 がサイトカイン刺激特異的な p38 シグナル伝達を制御している可能性が示唆された。一方、これまでに、サイトカイン刺激によって産生された特定の mRNA の安定性維持に p38 が関与していることが明らかとなっている。そこで、IL-1 β 刺激によって産生される IL-8 mRNA の安定性に対する p62 の機能を検討することとした。その結果、p62 KD 細胞における IL-8 mRNA の安定性はコントロール細胞と比較して明らかに減少していた。これらのことから、p62 はサイトカイン刺激による p38 シグナル伝達系の特異的制御に重要な役割を果たしているものと考えられる。

(4) マウスにおける p38 の機能解析 (須藤)

p38 +/- マウスをモデルとして、カイニン酸により誘導されるてんかん発作と神経損傷における p38 の機能を、千葉大学粕谷博士と検討した。p38 +/- マウスにおいては、カイニン酸による致死率および発作が、有意に減少していた。また、カイニン酸刺激によるカルシウム流入に続くカルシウム-カルモジュリンキナーゼ のリン酸化も顕著に抑制されていた。以上のことから、p38 情報伝達経路が、てんかん発作および神経興奮に重要な役割があることが明らかになった。

(5) がん細胞の転移に関連する分子標的の機能解析 (清水、高木^{*13})

マトリックスメタロプロテアーゼの阻害因子である RECK タンパク質による MMP-9 抑制効果について詳細に検討した。その結果、RECK 過剰発現により MMP-9 は mRNA 量が減少していた。様々な検討を行った結果、MMP-9 遺伝子の上流にある AP-1 サイトが RECK による MMP-9 の mRNA 転写抑制活性に必要であることが示唆された。

(6) ヘパラーゼの活性化機構の解析 (清水、Lai^{*12})

がん細胞の転移・浸潤に関与するヘパラーゼの機能解析を行った。ヒト・ヘパラーゼに結合する分子を同定する目的でヒト・ヘパラーゼを精製するとき一緒に精製されるタンパク質の取得を試みた。その結果、がんの転移・浸潤に関与していると考えられている MMP-1 が、ヘパラーゼ結合タンパク質として同定された。

^{*1} 協力研究員, ^{*2} 特定協力研究員, ^{*3} 嘱託, ^{*4} 特定協力技術員, ^{*5} 業務委託, ^{*6} 研修生 (東洋大大学院), ^{*7} 客員研究員, ^{*8} 委託研究生, ^{*9} 基礎科学特別研究員, ^{*10} 研修生 (奈良先端大), ^{*11} 研修生 (東京理科大学), ^{*12} 研修生 (埼大大学院), ^{*13} ジュニア・リサーチ・アソシエイト, ^{*14} 研修生, ^{*15} 研修生 (アジア連携大学院、マレーシア科学大学)

Small molecules produced by microorganisms have diversity in chemical structures and biological activities. The Antibiotics Laboratory is focusing on the isolation of new compounds that regulate the mammalian cell function from microbial metabolites. Cellular factors involved in proliferation, differentiation and apoptosis in mammalian cells are molecular targets to be inhibited by the chemical compounds. The compounds isolated from microorganisms are deposited in the newly established Natural Products Depository RIKEN (NPDepo), which makes chemical libraries. The laboratory is also devoted to the cloning of biosynthetic gene clusters of microbial secondary metabolites, the investigation of the molecular interaction between small molecules and their binding proteins, and proteomic analyses of drug targets. The research will provide the biochemical tools to investigate the complex biochemical processes of the mammalian cell functions and also establish the foundation for developing new medicines such as antitumor agents.

1. Microbiological and chemical approach for the exploitation of novel bioprobes

(1) Cloning and characterization of cytotrienin biosynthetic genes

Several triene metabolites were isolated from the culture broth of a cytotrienin producer, *Streptomyces* sp. RK95-74. Based on some instrumental analyses, they were found to be biosynthetic intermediates and derivatives of cytotrienins. On the other hand, genome analysis of cytotrienin producer was almost completed in collaboration with A. TOYODA at RIKEN GSC. It came to be clear that the genome was approximately 10.2 mega base long, and a lot of genes for secondary metabolite biosynthesis were found. According to the genome analysis, structures of cytotrienin derivatives, and cytotrienin biosynthetic gene cluster, the biosynthetic pathway of cytotrienin was proposed.

(2) Systematic analysis and purification of actinomycete metabolites and construction of metabolite database

We have developed a novel method to separate and isolate a wide variety of metabolites systematically and efficiently. This method was applied to extracts of 10 *Streptomyces* strains, which were found to produce useful bioactive metabolites in Antibiotics lab. It gave a number of fractions and all of them were analyzed on an LC/MS. The obtained fractions with the LC/MS data were used to construct the fraction library, and we have also purified and identified some metabolites from the library. The library was arranged for high throughput screenings to check for several biological activities.

(3) Screening of cell cycle inhibitors, angiogenesis inhibitors and apoptosis regulating compounds

Screening for identifying novel cell cycle inhibitors and angiogenesis inhibitors by tsFT210 cells (temperature-sensitive *cdc2* mutant cells of mouse carcinoma FM3A), and VEGF-Luc/HT1080 cells (human fibrosarcoma harboring a VEGF-Luc reporter gene). Apoptosis regulating compounds have been screened using cell-free systems and small molecule microarrays.

(4) Analysis of reveromycin A biosynthetic gene cluster and genetic engineering for the production of new bioactive derivatives

Reveromycin A, which is a polyketide compound produced by *Streptomyces reveromyceticus*, inhibits bone resorption by inducing apoptosis specifically in osteoclasts. To obtain new bioactive derivatives of reveromycin A, our attempts were focused on the cloning of reveromycin A biosynthetic gene cluster. Based on the information from mRNA expression pattern and genome shotgun sequencing data, the polyketide biosynthetic gene cluster responsible for reveromycin A biosynthesis was cloned from *S. reveromyceticus* genome. The sequence analysis revealed the additional polyketide starter module that incorporates methylmalonyl CoA. This suggests that reveromycin A is biosynthesized with additional propionate unit. The carbon unit is speculated to be excised by an unknown enzyme. Interestingly, the reveromycin derivative (reveromycin A2) supporting the DNA sequence information was isolated from the secondary metabolites of *S. reveromyceticus*.

(5) Studies on tryprostatin biosynthesis

TPSs produced by *A. fumigatus* BM939 are mammalian cell cycle inhibitors. Deletion mutants of NRPS (non-ribosomal peptide synthetase) gene in the candidate gene cluster produced no TPS, indicating that the gene cluster is involved in TPS biosynthesis. Other genes responsible for the biosynthesis leading to TPS-A in *A. fumigatus* were also identified by gene-knockout and characterized by using recombinant proteins. Based on the results, we propose the following biosynthetic pathway: brevianamide F synthesis by NRPS, prenylation by dimethylallyltryptophan synthase to yield TPS-B, followed by monooxidation by cytochrome P450 and methylation by *O*-methyltransferase, resulting in TPS-A production.

(6) System construction of a chemical bank "RIKEN Natural Products Depository" and a chemical database "RIKEN Natural Products Encyclopedia"

We constructed a system to collect, store and distribute natural compounds including the secondary metabolites from Actinomycetes, and set up the chemical bank "RIKEN Natural Products Depository". At present we store approximately 22,000 kinds of compounds, which are composed of the metabolites purified in our laboratory, and the deposited compounds from researchers in RIKEN, other Institutes or Universities. We also prepared the chemical database "RIKEN Natural Products Encyclopedia" which records chemical information of the stored compounds. In this system, we can search for compounds by a sub-structure search engine.

(7) Screening of apoptosis regulating compounds

We screened XIAP inhibitors or caspase-3-cascade activators by an in vitro enzyme assay and a chemical microarray. We obtained enniatins as caspase-3-cascade activators. By the results from several enniatin derivatives, caspase-3-cascade activating activity was correlated with cytotoxicity in human tumor cell lines.

2. Chemical biology on the molecular targets of bioprobes

(1) Cell-based screening for differentiation inducer of human leukemia cells

We performed cell-based screening to obtain new differentiation inducers of human leukemia cells. As a result, we found several active compounds from our chemical library (NPDepo).

(2) Target identification of anti-tumor agent BNS-22

As last year, we investigated the action mechanism of anti-tumor agent BNS-22 on human tumor cells. As a result, we demonstrated that BNS-22 targets DNA topoisomerase II, and acts as its catalytic inhibitor.

(3) Proteomics-based analysis of the target of inhibitors

To determine the target molecules of inhibitors, proteome analysis of inhibitor-treated cells was done by 2D-DIGE. We started analyzing effects of inhibitors on HeLa cells in addition to drug-hypersensitive mutant of yeast, and the profiles were compared between 18 specific inhibitors using the clustering method.

(4) X-ray crystallography of the protein complexed with the bioprobe

To investigate the interaction between the methyl-gerfelin (M-GFN) and its target protein Glyoxalase I (GLO1), the crystallization of GLO1 complexed with M-GFN was carried out and its structure was analyzed. The complexed structure revealed that M-GFN is bound in the substrate pocket by coordinate bonding with zinc ion as catalytic metal. In the structures of GLO1 complexed with the inhibitor derivatized with GSH previously reported, GSH moiety of inhibitors interacted with residues by hydrogen bond. On the other hand, M-GFN interacts with residues by hydrophobic interaction at the region.

(5) X-ray crystallography of Bleomycin binding protein complexed with the bleomycin derivative

To investigate the interactions between the *Shble* and bleomycin derivatives by X-ray crystallography, *Shble* complexed with bleomycin A6 was co-crystallized. This crystal diffracts to 1.6Å resolution. The analyzed protein structure led us to understand the interactions between *Shble* and various bleomycin derivatives

(6) Development of chemical array using a chemical library in a chemical bank "RIKEN Natural Products Depository"

We have developed a chemical array "NPDepoArray" carrying approximately 6700 of natural compounds and its derivatives immobilized onto glass slides in a manner of photo-cross-linking. The NPDepoArray was used for protein ligand screening.

(7) Protein ligand screening using chemical array

Small molecule ligands for a variety of proteins were screened by using chemical array, we identified chemical compounds bound to the proteins on arrays.

(8) Screening of molecular targets for bioactive small molecules by using photo-cross-linked small molecule affinity beads

In order to identify the target proteins of bioactive small molecules, we made small molecule affinity beads using sepharose and magnetic beads coupled with the photo-cross-linker.

(9) Improvement for the SPR imaging platform

In continuation of our efforts to improve the sensitivity of our SPR imaging technology, we examined the length and nature of thiol terminated photo-cross-linker which connects a small molecule to the Au surface. The new synthesized linker enabled us to identify the binding site of p62 to p38 MAP kinase

(10) Differentiation of phoslactomycin derivative-treated leukemia cells

We found that the derivative of phoslactomycin (PLM), a PP2A inhibitor, induced differentiation in human leukemia HL-60 cells. To identify the molecular target of the PLM derivative, we synthesized several linker parts of affinity beads.

(11) Development of a novel method for detection of small-molecule compound-protein interactions

We established a novel method for detection of small-molecule compound-protein interactions on array slide. After transient transfection with vector encoded RFP-fused protein of interest, cell lysates were incubated with array slide, and some interactions were observed on slides. We have cloned more than 100 genes of interest, and continued to search novel ligands.

3. Mining and functional analysis of novel molecular targets.

(1) Screening for inhibitors of Plk1 Polo box domain dependent recognition

We developed a high-throughput screening system to identify inhibitors of PBD-dependent binding and screened a chemical library. We isolated a compound that inhibited PBD-dependent binding *in vitro* and *in vivo*. Using this compound, we found that the predominant role of PBD-dependent binding is smooth chromosome congression at metaphase. We also identified several fungal strains that produce compound(s) with PBD inhibitory activity.

(2) High throughput screening of inhibitors of HIV-1 Vpr protein

HIV-1 viral protein R (Vpr) is one of the HIV-1 encoded proteins that have important roles in viral pathogenesis. We have already established a screening system for Vpr inhibitors using budding yeast cells. In this fiscal year, we have applied this system to high throughput screening system. Using this system, we identified several Vpr inhibitors and analyzed the mechanism with which the compounds inhibit the action of Vpr.

(3) Functional analyses of p38 α in cell signaling

To understand the physiological importance of the interaction between p38 and p62 in bone remodeling, we first attempted to identify the direct binding domain of p62 to p38 by SPR. We mapped a domain corresponding to 173-182 of p62 for direct binding to p38. Furthermore, we showed that knockdown of p62 expression by siRNA led to impaired p38 phosphorylation only when HeLa cells were stimulated by cytokine. The critical role of p62 in cytokine dependent p38 signaling pathway was further confirmed by measuring IL-8 mRNA. Cytokine mRNA is often stabilized via p38 pathway. In the absence of p62,

IL-8 mRNA induced by IL-1 β became more fragile. These data show that p62 specifically regulates cytokine dependent p38 signaling pathway.

(4) Functional analyses of p38 α in mice

To elucidate the physiological relevance of p38 α in kainate-induced epilepsy and neuronal damages, we performed histochemical and biochemical characterization of p38 α ^{+/-} mice. And we showed that p38 α deficiency reduced mortality rate and seizure score. The finding suggests that p38 α plays an important role in epileptic seizure and excitotoxicity

(5) Studies of tumor cell invasion-related proteins

RECK, a MMP inhibitory protein, has been known to inhibit MMP-9 secretion, however, we showed that the level of MMP-9 mRNA was decreased in RECK-overexpressed cells. We succeeded in identifying an AP-1 site, that was responsible for the suppression of MMP-9 transcription by RECK.

(6) Activation mechanism of heparanase

Heparanase is capable of specifically degrading heparan sulfate, and this activity is associated with the metastatic potential of tumor cells. To clarify the activation mechanism of heparanase, we tried to identify the heparanase-binding protein. We identified MMP-1, which was known to be a metastasis-promoting molecule, as a heparanase-binding protein in extracellular space.

Staff

Head

Dr. Hiroyuki OSADA

Members

Dr. Nobumoto WATANABE

Dr. Tatsuhiko SUDO

Dr. Makoto MUROI

Dr. Tamio SAITO

Dr. Masashi UEKI

Dr. Siro SIMIZU

Dr. Yasumitsu KONDOH

Dr. Shunji TAKAHASHI

Dr. Makoto KAWATANI *2

Dr. Akiko SAITO *1

Dr. Naoki KATO *1

Dr. Mihoko MORI *2

Dr. Toshihiko NOGAWA *2

Dr. Hideo OKUMURA *1

Dr. Hirokazu SUZUKI*1

Dr. Daiki MORISAKI*1

*1 Special Postdoctoral Fellow *2 Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Masakazu URAMOTO (Auditing and Compliance Office)

Visiting Members

Ms. Aya ASAMI (Science Service Co., Inc.)

Ms. Kaori HONDA

Mr. Tomoyuki AMEMIYA

Ms. Harumi ICHIMIYA

Ms. Kazue NODA (Science Service Co., Inc.)

Ms. Toshie KAIZUKA (Science Service Co., Inc.)

Ms. Hisae KONDO

Mr. Hideaki KONNO

Mr. Isao MIYAZAKI (Taiho Pharmaceutical Co.,Ltd.)

Ms. Yuko NAKATA (Science Service Co., Inc.)

Ms. Yumiko SUGIMOTO (Science Service Co., Inc.)

Mr. Hiroshi TAKAGI

Mr. Kazuhiko TSUJITA (Godo Shusei Co.,Ltd.)

Ms. Emiko SANADA (Assort Co. Ltd.)

Mr. Minoru NAKANO (Staff Japan Co.)

Ms. Atsuko SHIMANO (Tempstaff Co. Ltd.)

Ms. Mariko UENO (Science Service Co., Inc.)

Mr. Hiroshi KAMIYAMA (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

Ms. Sayaka KAZAMI (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

Mr. Satoshi TAKAGI (Grad. Sch. Sci. Eng.,Saitama Univ)
Ms. Kayoko KAWAI (Grad. Sch. Sci. Eng.,Saitama Univ)
Ms. Naoko MORITA
Ms. Haruna UENO

Trainee

Ms. Harumi AONO (Grad. Eng.,Toyo Univ)
Ms. Kanako ARAMAKI (Grad. Eng.,Toyo Univ)
Mr. Ngit Shin LAI (Grad. Sch. Sci. Eng.,Saitama Univ.)
Ms. Minako NISHIZAWA (Grad. Eng.,Toyo Univ)
Mr. Hiroshi TAKAYAMA (Grad. Sch. Sci. Eng.,Saitama Univ)
Ms. Tomomi SEKINE (Fac. Tokyo Denki Univ.)
Mr. Eugene ONG (Univ. Sains Malaysia)
Mr. Takeshi NANYA (Fac. Tokyo Univ. of Science)
Mr. Akihiro KAWADA (Grad. Sch. Sci. Eng.,Saitama Univ.)
Mr. Ken-ichi TANAKA (Nara Inst. of Science and Technology)