

## タンデムタグ含有 14-3-3 プロテオミクス解析による抗がん活性フシコクシン誘導体の作用機序の解明

(信州大農<sup>1</sup>) ○増田 遼馬<sup>1</sup>・伊賀上 祥汰<sup>1</sup>・喜井 勲<sup>1</sup>・大神田 淳子<sup>1</sup>

Proteomics analysis towards elucidation of the mechanism of action of the antitumor fusicoccin derivatives using tandem tagged 14-3-3 protein (<sup>1</sup> *Academic Assembly, Institute of Agriculture, Shinshu Univ.*) ○Ryoma Masuda,<sup>1</sup> Shota Igaue,<sup>1</sup> Isao Kii,<sup>1</sup> Junko Ohkanda<sup>1</sup>

Fusicoccin (FC) is a diterpene glucoside produced by plant pathogenic fungi. While FC is inactive, its semisynthetic derivative ISIR-042 exhibits significant cytotoxicity under hypoxic condition. The mechanism of action is thought to be based on the stabilization of binding of 14-3-3 and phosphoprotein(s), however, the details remain unknown. In this study, we performed immunoprecipitation of tandemly tagged 14-3-3 $\zeta$ , in which Flag and Strep-Tag II tags were consecutively introduced at the N-terminus, followed by proteomics analysis. As a result, 1,117 proteins were identified as the 14-3-3 $\zeta$ -binding proteins in HEK293 cells, and among them was the 150 kDa "Protein X" containing the consensus motifs suitable for the formation of ternary complex with ISIR-042. The details of biological evaluation as well as a hypothetical model of the mode of action will be discussed.

**Keywords :** Protein-protein Interactions; Fusicoccin; 14-3-3 Protein; Proteomics analysis; Tandem tag

フシコクシン(FC)は真菌が産出するジテルペン配糖体であり、植物の H<sup>+</sup>-ATPase と 14-3-3 の PPI 安定化剤として機能する。FC 誘導体である ISIR-042 は天然型 FC には見られないヒトがん細胞の細胞増殖抑制活性を示し、抗がん剤のリード化合物として期待されている。作用機序として 14-3-3 と何らかのリン酸化たんぱく質との相互作用の安定化によるものと考えられるが、詳細は不明である。本研究では、N 末端に Flag と Strep-Tag II-tag をタンデムに付与した 14-3-3 を用いた共免疫沈降とプロテオミクス解析により化合物によって亢進もしくは減弱する 14-3-3 の結合たんぱく質の網羅的解析を通じ ISIR-042 の作用機序を解明することを目的とした。14-3-3 $\zeta$  の共免疫沈降時に化合物を添加しプロテオミクス解析を行った結果、1,174 個の 14-3-3 相互作用たんぱく質が検出された。そのうち ISIR-042 添加時に 14-3-3 との相互作用が増強された 150 kDa のたんぱく質が mRNA の翻訳制御に関与していることがわかった。詳細な検証実験の結果、化合物が 14-3-3 との相互作用を安定化し、たんぱく質合成を阻害することを明らかにした。以上の結果より、mRNA 制御機構における 14-3-3 相互作用ががん増殖阻害に向けた分子標的となり得ることを明らかにした。

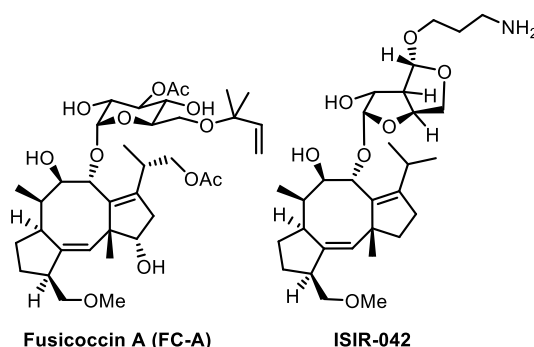


Fig. Chemical structures of FC and ISIR-042.