

癌のプログレッションに関与する蛋白質の発現プロテオミクスによる同定と機能プロテオミクスによるプログレッション機構の解析

藏満 保宏¹⁾、林 英子^{1), 2)}、岡田 太³⁾、藤本 正憲¹⁾、中村 和行¹⁾

1) 山口大学大学院 医学系研究科 プロテオーム・蛋白質機能制御学、
2) 山口大学大学院 医学系研究科 特殊専門領域腫瘍病態学、3) 山形大学大学院 医学系研究科 生体分子機能学

1. はじめに

2001年にヒトゲノムプロジェクトが完了しヒト全遺伝子が解明されて以来、ゲノム創薬や遺伝子診断等が盛んに行われている。現在、次期の研究としてプロテオームの研究が盛んである。プロテオームとは、全ての遺伝子の転写を経て翻訳された蛋白質の総称である。プロテオミクスとは、網羅的にタンパク質を分離同定して疾患、環境、薬物などに対し特異的に変動するタンパク質を特定し、それらタンパク質が『いつ、どこで、どれくらい、どうやって働くか』を解析、データベース化して医療等に応用することである。具体的には、その多くの研究が発現プロテオミクスを用いたものである。発現プロテオミクスとは生体あるいは細胞のさまざまな状態、例えば生体であれば疾患、細胞であればいろいろな刺激によって各組織や細胞内小器官のタンパク質の発現の増減を網羅的に解析することである。発現プロテオミクスにより、タンパク質が『いつ、どこで、どれくらい働くか』が明らかとなりうる。発現プロテオミクスの研究の次のステップは機能プロテオミクスである。機能プロテオミクスとは全ゲノムの転写、翻訳産物である全タンパク質の機能を網羅的に解析することであり、機能プロテオミクスの研究によってタンパク質が『どうやって働くか』が明らかとなりうる。実際、癌などの疾患に関連するタンパク質を同定してデータベースから情報を得ても、その大多数のタンパク質の機能が未知の場合が多々ある。機能プロテオミクスについても、発現プロテオミクス同様、これまで多くの研究が行われてきた。まず、翻訳後修飾の検出の研究である。一般にタンパク質は翻訳された後に、リン酸化やグリコシル化などいろいろな修飾を受けて機能を発揮することが知られている。これまで、翻訳後修飾の解析として、質量分析、二次元電気泳動、翻訳後修飾ペプチド特異的染色、抗翻訳後修飾タンパク質抗体に

よるウェスタンブロットなどが使われている。特に翻訳後修飾ペプチド特異的染色と質量分析の技術の発達によってよりハイスループットな研究が可能となってきた。機能プロテオミクスのもう一つの重要な解析は、タンパク質-タンパク質相互作用の解析である。タンパク質は複雑な生体システムの中で単独で機能するよりも、ネットワークを形成して働いている場合が圧倒的に多いため、タンパク質-タンパク質相互作用の解析によるネットワーク解析が最もタンパク質の機能解析に貢献する研究手法であると考えられる。タンパク質間相互作用ネットワークが明らかになれば、将来癌などの疾患発症のメカニズム、治療法開発へとつながる可能性が高い。

癌は致死的な疾患で、わが国における死亡原因の一位である。癌は非常に恐ろしい疾患であるが、高造腫瘍能、高浸潤能、高転移能を有する等のプログレッションを抑制できれば克服でき得る疾患である。同一細胞由来の2種類のマウス線維肉腫細胞株のうち自然退縮する退縮型QR-32細胞とそのクローンで造腫瘍能と転移能を獲得した悪性進展型QRsP細胞が樹立されており、悪性進展型は退縮型QR-32細胞から炎症反応を伴ってさらなる悪性化を獲得した細胞株である。悪性進展型QRsP-11の細胞内で発現が変動する蛋白質のプログレッションにおける役割を明らかにしたいと考えている。

2. 材料と方法

(1) 退縮型 QR32と悪性進展型 QRsP-11の細胞質内蛋白質と核内蛋白質の発現比較

1) 退縮型 QR32と悪性進展型 QRsP-11の細胞内蛋白質ならびに核内蛋白質をそれぞれ、NP-40を含む溶解緩衝液を用いて抽出し等量の蛋白質サンプルを二次元電気泳動を用いて展開した後に、ゲルをCBB R-250もしくは蛍光染色 Flamingo Gel Stain を用いて染色して蛍光

イメージングシステム ProXPRESS を用いて画像を取り込み、退縮型 QR32 と悪性進展型 QRsP-11 の細胞内蛋白質の発現を比較して差のあるスポットを切り出して、質量分析計 LC-MS/MS とシーケンス同定プログラム Spectrum mill を用いて蛋白質を同定した。

2) 同定された蛋白質の特異抗体を用いてのウェスタンブロットングにより、その蛋白質の退縮型 QR32 と悪性進展型 QRsP-11 の細胞内での発現の差を確認した。

(2) 悪性進展型 QRsP-11 に特異的に高発現もしくは低発現する細胞内蛋白質のプログレッションにおける機能解析

1) 悪性進展型 QRsP-11 において発現に増減のある蛋白質のプログレッションの過程での機能解析を、システイン-タグとの融合蛋白質を作製してマレイミド基板に貼り付けて、結合してくる蛋白質を同定することで機能解析を行うために、5つのシステインからなるシステイン-タグを C 末端部に、また融合蛋白質をニックルビーズを用いて精製するために6つのヒスチジンからなるヒスチジン-タグを N 末端部に導入した形で、大腸菌内でモデルタンパク質として HSP70 と GFP を発現できるようにプラスミドベクターを設計し構築した。

2) 融合蛋白質発現用大腸菌にこのプラスミドを導入し、融合蛋白質を誘導発現させた後、粗抽出し、ニックルビーズにて発現融合蛋白質を精製後に再抽出した。

3) ニックルビーズから抽出した融合蛋白質溶液を濃縮カラムを用いて濃縮した後に、Lowry 法にて蛋白濃度を定量し、7 mg/ml の蛋白質と PEG300 を 1:1 に混合した溶液をマレイミド基板に 8 μ l ずつスポットングした後に一晩静置して固定した。翌日に基板ごと PBS にて 3 回、TBS-Tween にて 3 回洗浄して使用に備えた。

4) ヒト血清を、固定化された融合蛋白質と反応させ、反応後に基板ごと洗浄し、蛍光ラベルした抗ヒト二次抗体と反応させた後に洗浄し、蛍光スキャナーで撮影して実際にマレイミド基板チップが有効であるかを確認した。

3. 結果

1) 退縮型 QR32 と悪性進展型 QRsP-11 の細胞質内蛋白質の二次元電気泳動による Differential Display の

結果、退縮型 QR32 と比較して悪性進展型 QRsP-11 の細胞内での calreticulin precursor、tropomyosin 1 α chain、annexin A5、heat shock protein (HSP) 90- α 、HSP90- β 、phosphatidylethanolamine binding protein、peroxiredoxin 2 の発現が增強し、acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 Family member E と hepatoma-derived growth factor の発現が減弱していることが明らかとなった。また、QR32 と QRsP-11 の核内蛋白質の二次元電気泳動による Differential Display の結果、退縮型 QR32 と比較して悪性進展型 QRsP-11 において有意差をもって発現が增強しているスポットが 2 個、逆に減弱しているスポットが 5 個確認できたが、まだ質量分析による蛋白質の同定はできていない。

2) モデルタンパク質として大腸菌内で発現させた 5 つのシステインからなるシステイン-タグを C 末端部に、6 つのヒスチジンからなるヒスチジン-タグを N 末端部に導入した HSP70 と GFP の融合蛋白質を固定化したマレイミド基板を作製し、ヒト血清中の抗 HSP70 抗体との反応を確認したところ、蛍光スキャナーで確認できた。

4. まとめ

1) 二次元電気泳動と質量分析を用いた発現プロテオミクスによって、退縮型 QR32 と比較して悪性進展型 QRsP-11 の細胞質内での calreticulin precursor、tropomyosin 1 α chain、annexin A5、heat shock protein (HSP)90- α 、HSP90- β 、phosphatidylethanolamine binding protein、peroxiredoxin 2 の発現增強と acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 Family member E と hepatoma-derived growth factor の発現減弱が明らかとなった。また、蛋白質同定はできていないものの核内蛋白質の発現の違いも確認することができた。

2) 一方、同定された蛋白質が癌のプログレッションにおいてどんな役割を果たしているかを解析する機能プロテオミクスのツールとしてマレイミド基板に共有結合するシステイン残基の繰り返し配列(システイン-タグ)を C 末端部に付加した標的蛋白質をマレイミド基板に貼り付けたプロテインチップを開発した。標的蛋白質に細胞溶解液や組織溶解液を反応させて、標的蛋白質に結合する蛋白質を非常に簡便に分離・同定することが期待できるようになった。