

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09123

研究課題名(和文)大腸がん特異的タンパク質代謝マーカーの探索・同定と臨床応用

研究課題名(英文) Identification and clinical application of the colon cancer-specific protein markers

研究代表者

渡部 祐司 (Watanabe, Yuji)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20210958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、ヒト大腸がん細胞の細胞増殖能と浸潤能に正の相関性を示す因子として見出しているKLHL5は、CUL3型ユビキチンE3リガーゼの基質受容体として機能することから、まず、KLHL5の標的基質を探索し、98種の候補タンパク質を同定した。次に98種候補タンパク質の一斉定量法として、KLHL5-基質人工タンパク質#2QconCAT・MRM法を確立した。大腸がん細胞株 HCT116およびSW480細胞を用いた解析から、KLHL5の標的基質タンパク質3種を同定した。現在、大腸がん特異的バイオマーカー候補分子をKLHL5標的基質タンパク質関連因子の定量プロテオミクス解析から探索している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに大腸がん領域では、化学療法に感受性及び毒性の指標となるバイオマーカーの開発が続けられているが、臨床応用可能な大腸がん特異的バイオマーカーは未だ見出されていない。我々のこれまでの研究並びに本研究において見出した大腸がん悪性化相関性因子KLHL5とその標的基質タンパク質関連因子が、新たな大腸がんバイオマーカーとなり得る可能性を示唆できた。大腸がん診断の新規マーカー分子の確立は、予後を予測し、切除可能な状態で発見することや、早期に化学療法を導入することに役立ち、社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：KLHL5, a substrate receptor of CUL3-based ubiquitin E3 ligase, shows positive correlation to the proliferation and invasiveness of colorectal cancer. We performed the screening of KLHL5-binding proteins by an AlphaScreen assay based on human 2000 protein array, and identified 98 proteins as KLHL5-substrate candidates. We further identified proteotypic peptides of 98 proteins by Mass analysis, constructed KLHL5-substrate protein #2 QconCAT, and then established a selective reaction monitoring system (KLHL5-substrate SRM) for simultaneous quantification of KLHL5-substrates. KLHL5-substrate SRM analysis revealed 3 proteins as KLHL5 target substrates in colorectal cancer cell lines, HCT116 and SW480 cells. We are currently identifying and characterizing KLHL5 target substrate-related factors as diagnostic markers of colorectal cancer.

研究分野：医学

キーワード：大腸癌 KLHL5 CUL3 ユビキチンリガーゼ バイオマーカー

1：研究開始当初の背景

大腸がん領域では、化学療法に感受性及び毒性の指標となるバイオマーカーの開発が続けられているが、新しいバイオマーカーはまだ臨床応用されるだけのエビデンスがない。そこで、大腸がんのリスク因子となりうる新規のマーカーを同定することは、予後を予測し、切除可能な状態で発見することや、早期に化学療法を導入することに役立つために必須である。

CUL3 型ユビキチン E3 リガーゼ(CUL3-UbE3)複合体は、CUL3 をプラットフォームタンパク質として E2 リガーゼの Rbx1 と基質受容体として機能する BTB ドメイン含有タンパク質(BTBP)からなり、多くの標的基質タンパク質をユビキチン化することで、分解または機能変換へと導く。この BTBP はヒトでは 183 種が見出されて、さらには 1 つの BTBP が複数の基質を標的とすることから多様性が生まれる。

我々は、ヒト消化器がん細胞株パネルを用いて、BTBP183 種の遺伝子発現プロファイリングを行うとともに、BTBP siRNA ライブラリーを作成、これを用いて各 BTBP ノックダウン下で、細胞増殖能と浸潤能を調べた。その結果、大腸がん細胞株において細胞増殖性と浸潤性共に顕著に抑制する 4 種の BTBP siRNA を見出した。さらに、外科切除により得られた大腸がん組織サンプルをこの 4 種の BTBP に対する特異抗体で免疫染色を施行した結果、1 つの BTBP KLHL5 が、大腸がんの悪性度と有意に正の相関性を示すことを見出した。

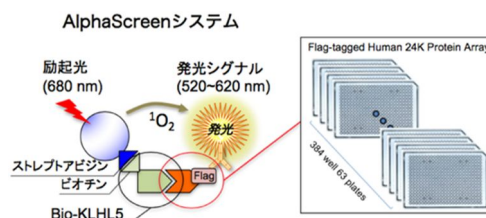
2：研究の目的

CUL3-UbE3 システムにおいて 1 つの基質受容体は複数の基質を標的とすることがよく知られていることから、KLHL5 が基質受容体として機能する CUL3-KLHL5 軸においても複数の基質を標的とすることが容易に想定できる。従って、大腸がんの悪性化で発現量が大きく増幅する KLHL5 は、大腸がん細胞のタンパク質代謝系を大きく変動させ、大腸がんの悪性化を特徴づける分子変動が観察され得る。この特徴的分子変動が診断マーカーとして利用可能と考えられる。よって、CUL3-KLHL5 軸の基質をまず同定し、その機能解析に基づくマーカー分子の探索・同定とその応用を本研究課題の目的とする。

3：研究の方法

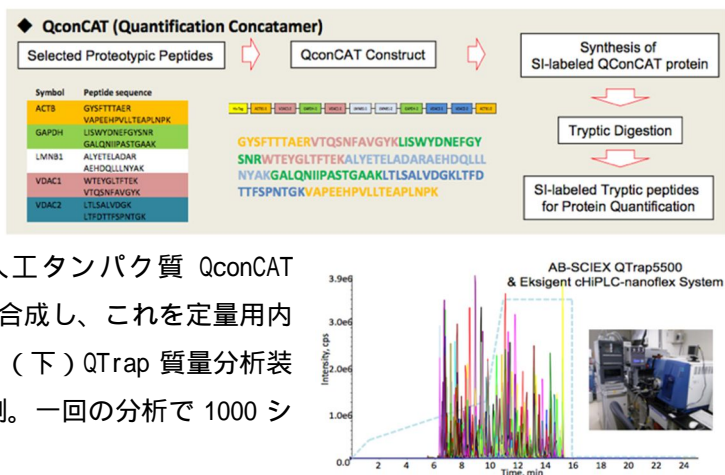
(1) KLHL5 の標的基質探索： KLHL5 の基質探索は次の方法にて行う。ビオチン化 KLHL5 リコンビナントタンパク質 (Bio-KLHL5) を、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成しこれをプローブとして用いて、愛媛大学プロテオサイエンスセンターが独自に開発したヒト Flag-タグ 24000 (FLAG-24K) タンパク質アレイを基盤とした AlphaScreen アッセイシステムで解析する

【図 1: KLHL5 の基質探索の概略図。Bio-KLHL5 をプローブとしてヒト 24K プロテインアレイ(384 プレート x63)を用いた AlphaScreen アッセイを行い、結合タンパク質を同定する。】



(2) KLHL5 標的基質の定量測定法の確立 : AlphaScreen アッセイで同定する全ての基質候補タンパク質を、質量分析により一度に定量解析できる Selective Reaction Monitoring (SRM)法を樹立する。まず、質量分析で検出可能な各基質候補タンパク質の質量分析イオン化ペプチドをあらかじめ同定し、1つのタンパク質について2種のイオン化ペプチドを繋ぎ合わせた人工タンパク質をコードする cDNA をデザイン、合成する。当該合成 cDNA を鋳型として小麦胚芽細胞タンパク質合成系で安定同位体標識人工タンパク質 QconCAT (Quantification Concatamer)を合成し、これを定量用内部標準タンパク質として用いる【図2】(Mol Biosyst. 2015)。

【図2 : 安定同位体標識した QconCAT を標準タンパク質とした SRM 質量分析法。(上) 基質候補タンパク質のイオン化ペプチドをあらかじめ同定し、1つのタンパク質について2種のイオン化ペプチドを繋ぎ合わせた人工タンパク質をコードする cDNA をデザイン、安定同位体標識人工タンパク質 QconCAT (Quantification Concatamer)を合成し、これを定量用内部標準タンパク質として用いる。(下) QTrap 質量分析装置を用いて行った SRM 解析の一例。一回の分析で 1000 シグナルを同時に検出できる。】



(3) KLHL5 標的基質の同定 : 大腸がん細胞株 HCT116 および SW480 細胞を用いて、siKLHL5 RNA 未処理、及び処理した細胞可溶性画分ならびに培養上清中の基質候補タンパク質量を、安定同位体標識人工タンパク質 QconCAT を内部標準タンパク質として SRM 法で比較定量解析する。KLHL5 遺伝子ノックダウン下で発現が上昇する基質候補分子を選別する。

(4) 大腸がん診断・予後予測マーカーの同定 : 大腸がん細胞株 HCT116 および SW480 細胞を用いて、同定した KLHL5 標的基質タンパク質遺伝子のノックダウン前、及びノックダウン後の細胞可溶性画分ならびに培養上清の定量プロテオミクス解析を行う。KLHL5 標的基質タンパク質遺伝子ノックダウン後に上昇する因子を大腸がん診断・予後予測マーカー候補として、大腸がん患者血液中の当該分子を定量解析し、有効性が判断できるものを検査診断マーカーとして開発へ進める。

4 : 研究成果

(1) KLHL5 の標的基質探索

KLHL5 の標的基質探索のために、まずビオチン化 KLHL5 リコンビナントタンパク質 (Bio-KLHL5) を、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成した (図-1)。これをプローブとし

て用いて、愛媛大学プロテオサイエンスセンターが独自に開発したヒト Flag- GST タグ 24000 (FLAG-24K) タンパク質アレイを基盤として AplhaScreen アッセイを行った。その結果、バックグラウンドの 10 倍のシグナルを超えるものを候補タンパク質として選別し、98 種を取得した。次に、これら候補タンパク質の His-タグ・リコンビナントタンパク質を、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて再度合成し、キレートカラムクロマトグラフィーにて精製後、トリプシン分解、質量分析を行うことにより、各候補タンパク質のプロテオタイプックペプチド (Proteotypic peptide : PTP) の同定を試みた。98 種の候補タンパク質のうち、複数の PTP を決めることができたものは 57 種、1 種類の PTP にとどまったものは 29 種、残り 12 種については有効な PTP を見出すには至らなかった。PTP の選定は【表 1】の条件を満たすものとした。そこで、PTP を決定することのできた 86 種について定量解析用の安定同位体標識内部標準タンパク質 QConCat の作成を進めることとした。

【図-1:合成 Bio-KLHL5 タンパク質の western blot。Avidin-HRPO で検出。1 : コントロール、2 : Bio-KLHL5】

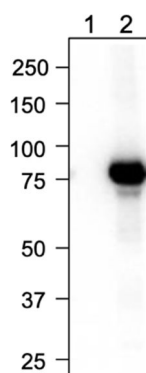


表 1 PTP選別条件	
1.	タンパク質同定結果において同定されたペプチド
2.	7-20残基のペプチド
3.	missed cleavage (MC)の数 = 0
4.	N末端もしくはC末端において、MCが生じたペプチドが同定ペプチドに含まれるものは除外
5.	N末端もしくはC末端にRR, RK, KR, KKの配列を有するペプチドは除外
6.	N末端もしくはC末端にRP, KPの配列を有するペプチドは除外
7.	メチオニンもしくはシステインを有するペプチドは除外
8.	他のタンパク質と配列を共有するペプチドは除外
9.	Uniprotに挙げられたシグナルペプチド領域、翻訳後修飾を含むペプチドは除外
10.	MSクロマトグラム及びMS/MSスペクトルより強度の高いペプチドを選択
PTP選別結果	
タンパク質同定結果より、PTPを2本選択できたタンパク質	: 57
タンパク質同定結果より、PTPを1本のみ選択できたタンパク質	: 29
タンパク質同定結果より、PTPを選択できなかったタンパク質	: 12

(2) KLHL5 の標的基質の定量解析 MRM の構築

定量解析用の安定同位体標識内部標準タンパク質 QConCat の作成は、得られた 86 種の PTP をタンデムに配列させた人工タンパク質をコードする cDNA をデザインし、人工合成した。人工タンパク質設計は、ProtScale - ExPASy (<https://web.expasy.org/protscale/>) を利用した hydrophathy profiling 情報に基づいた。小麦胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて His タグ KLHL5-基質人工タンパク質 QconCAT を翻訳合成し、これをキレートカラムにより分離・精製した。精製 KLHL5-基質人工タンパク質 QconCAT をトリプシン分解、質量分析を行うことにより、各 PTP の検出を再検証した。その結果、予想以上に検出できない PTP が多数存在した。これは、KLHL5-基質人工タンパク質 QconCAT のトリプシン分解効率が低い結果と判断されたことから、PTP 配列を組み替えること、PTP 間にスペーサー配列を導入することで対応し、KLHL5-基質人工タンパク質#2QconCAT のデザインを行なった。同様に KLHL5-基質人工タンパク質#2 をコードする cDNA をデザインし、人工合成後、これをもとに、小麦胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて His タグ KLHL5-基質人工タンパク質#2QconCAT を翻訳・合成した。得られた KLHL5-基質人

工タンパク質#2QconCAT を用いて、各 PTP の検出を再検証し、全ての PTP を検出するに至った。

(3) 大腸がん細胞株を用いた KLHL5 の標的基質の定量解析

大腸がん細胞株 HCT116 および SW480 細胞を用いて siKLHL5 RNA 処理を施し、KLHL5 遺伝子ノックダウン下で発現が上昇する基質候補分子を、細胞可溶性抽出画分および培養上清画分を用いて、KLHL5-基質人工タンパク質#2QconCAT を用いた MRM 法による定量解析を行った。その結果、siKLHL5 RNA 未処理および siKLHL5 RNA 処理サンプルの細胞可溶性抽出画分および培養上清画分の KLHL5-基質人工タンパク質#2QconCAT/MRM 比較定量解析から、HCT116 および SW480 細胞に共通して、3 種の基質候補タンパク質由来の 5 種の PTP を検出した。

(4) 大腸がん診断・予後予測マーカーの同定：

得られた 3 種の KLHL5 標的基質タンパク質遺伝子ノックダウン下で変動するタンパク質因子の同定に向けて、大腸がん細胞株 HCT116 および SW480 細胞を用いて、同定した KLHL5 標的基質タンパク質遺伝子のノックダウン前、及びノックダウン後の細胞可溶性画分ならびに培養上清を用いて、現在、定量プロテオミクス解析を行っている。

(5) 今後の課題：現在進めている KLHL5 標的基質タンパク質関連因子同定を急ぎ、それらの大腸がん診断・予後予測マーカーとしての有用性を、ヒト大腸がん患者血清を用いて検証する。

引用文献

Takemori N, Takemori A, Matsuoka K, Morishita R, Matsushita N, Aoshima M, Takeda H, Sawasaki T, Endo Y and Higashiyama S. High-throughput synthesis of stable isotope-labeled transmembrane proteins for targeted transmembrane proteomics using a wheat germ cell-free protein synthesis system. *Mol Biosyst.* 11(2):361-365. 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	東山 繁樹 (Higashiyama Shigeki) (60202272)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関