

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：82601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590056
 研究課題名（和文） グライコミクス技術による腫瘍関連糖タンパク質の探索と腫瘍マーカーへの応用
 研究課題名（英文） Glycomic approaches for the identification of tumor-associated glycoproteins as potential tumor markers
 研究代表者
 川崎 ナナ（KAWASAKI NANA）
 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長
 研究者番号：20186167

研究成果の概要（和文）：先に報告者らは、ヘテロ核リボ核酸タンパク質（hnRNP）が腫瘍マーカーとして知られるシアリルルイス x（sLe^x）の付加タンパク質であることを示唆する結果を得ている。本研究では、hnRNP ファミリーの一部は sLe^x とゴルジ体で共局在しており、それらの発現レベルは DNA 合成期から分裂準備期にかけて亢進していることを見出した。また、sLe^x の生合成は主にフコース転移酵素 VI が関与しており、この酵素の発現を抑制することにより、大腸癌細胞の増殖が抑制されることを見出した。これらの結果より、sLe^x と hnRNP は、大腸癌の増殖に関係している可能性があり、hnRNP は新しい腫瘍マーカーとして利用できる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Previously we suggested that heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) could be carrier proteins of sialyl Lewis x (sLe^x) glycoepitope which is widely used as a tumor marker. In this study we demonstrated that some hnRNPs were co-localized with sLe^x in Golgi apparatus, and their levels were up-regulated during S/G2 phases of the cell cycles. Furthermore, we found that expression of sLe^x was up-regulated by Fuc-T VI, and inhibition of Fuc-T VI expression suppressed the proliferation of colorectal cancer cell lines. These results suggested that sLe^x and hnRNP might be associated with the proliferation of colorectal cells and some hnRNPs could be used as novel tumor makers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	0	1,400,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,100,000	0	1,100,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：癌・糖鎖・グライコミクス・プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍マーカーとして臨床応用されている糖タンパク質には、共通する糖鎖癌抗原があ

ることが明らかにされているが、そのタンパク質のほとんどは同定されていない。

(2) シアリルルイス x (sLe^x)は、膵癌や大腸癌マーカーとして臨床応用されている代表的な糖鎖癌抗原であるが、癌との関連性が明らかにされている sLe^x 含有糖タンパク質は、MUC1 など一部の膜タンパク質に限定されている。

(3) 報告者は、大腸癌細胞株 T84 及び HT-29 のグライコミクスにより、sLe^x 含有糖タンパク質の同定を試み、ヘテロ核リボ核酸タンパク質 (hnRNP)A/B ファミリータンパク質の一部が候補タンパク質であることを見出した。

(4) これまで、細胞膜以外に sLe^x 含有タンパク質が存在することは知られていなかった。また、hnRNP A/B ファミリータンパク質である hnRNP A1 や hnRNP A2/B1 は、それぞれ大腸癌及び肺癌で増加することが知られていたが、それらの発現亢進と sLe^x 修飾との関連性は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、発癌と hnRNP A/B ファミリータンパク質の発現の関係、及び発癌と hnRNP A/B ファミリータンパク質の sLe^x 修飾の関係を検討し、新たな診断法の開発に役立てることを目的とする。

(1) 大腸癌細胞株 HT-29 を使って、sLe^x 抗原及び hnRNP A/B ファミリータンパク質の細胞内局在を解析し、発癌と hnRNP A/B ファミリータンパク質の sLe^x 修飾の関係を検討する。

(2) 大腸癌細胞株 HT-29 を使って、糖転移酵素フコシルトランスフェラーゼ (Fuc-T)III~VII の発現レベルを解析し、sLe^x の生合成に関与する主要な Fuc-T を明らかにする。また、Fuc-T の発現抑制を通じて、sLe^x 修飾と発癌との関係を検討する。

(3) 大腸癌細胞株 HT-29 を使って、異なる細胞周期間における関連タンパク質の発現レベルの推移を解析し、癌細胞における hnRNP A/B ファミリータンパク質の sLe^x 修飾の役割について推定する。

(4) 大腸癌細胞株 HT-29 を使って、代表的な hnRNP A/B ファミリータンパク質の 1 つである hnRNP A1 の LC/MS/MS を行い、主要な hnRNP A1 アイソフォームを明らかにし、発癌との関係を検討する。

(5) 大腸癌細胞株 HT-29 を使って、hnRNP A/B ファミリータンパク質における sLe^x 修飾の可能性を検証し、腫瘍マーカーとしての可能

性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光免疫染色

大腸癌細胞株 HT-29 をカバーガラス上で培養した後、冷 PBS(-)で洗浄し、-20°C に冷却したメタノールで固定した。1% BSA (IgG free)/5% ヤギ IgG を含む PBS(-)を用いて 30 分間室温でブロッキングした後、1% BSA (IgG free)を含む PBS(-)で希釈した 1 次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。PBS(-)で洗浄後、1% BSA (IgG free)を含む PBS(-)で希釈した 2 次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。PBS(-)で洗浄後、Heechst 33342 を用いて核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510(Carl Zeiss)により観察した。

(2) タンパク質の抽出とウエスタンブロットング解析

Schreiber ら(1989)の方法に基づきタンパク質を抽出した。すなわち、大腸癌細胞株 HT-29 に緩衝液 A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM 塩化カリウム, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, プロテアーゼ阻害剤)を加えて混和し、氷上で 15 分間静置した。10% NP-40 を加えて 10 秒間攪拌した後、1,500×g で 3 分間遠心し、上清を細胞質由来タンパク質として回収した。再び緩衝液 A を加えて混和した後、1,500×g で 1 分間遠心し、上清を同じチューブに回収した。この操作を繰り返した後、緩衝液 B (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM 塩化ナトリウム, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, プロテアーゼ阻害剤)を加えて 4°C で 15 分間振盪した。15,000×g で 15 分間遠心し、上清を核由来タンパク質として回収した。また、膜関連タンパク質は、ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit (Calbiochem)のプロトコールに準拠して抽出した。

Laemmli(1970)の方法に従って、抽出したタンパク質をポリアクリルアミドゲルで分離した(SDS-PAGE)。PVDF 膜へ電氣的に転写したのち、5% Blocking Reagent (GE ヘルスケア)を用いて一晩ブロッキングを行った。

PBS(-)-0.1% Tween 20 (PBS-T)で洗浄した後、CanGet Signal Solution 1 (TOYOBO)で希釈した 1 次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄した後、CanGet Signal Solution 2 で希釈した 2 次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄した後、ECL-Plus Western Blotting Detection Reagents (GE ヘルスケア)により検出し、Typhoon scanner により観察した。

(3) 2 次元電気泳動

抽出したタンパク質をエタノール沈殿法により脱塩し、膨潤用溶液(7 M 尿素, 2 M チオ

尿素, 2% CHAPS, BPB, 0.5% IPG buffer, 18 mM DTT)に溶解させた。試料溶液をストリップホルダーに添加し, Immobiline DryStrip (pH 3-11NL, pH 7-11NL) (IPG ストリップ)を設置した後, IPG カバー液で覆い, 膨潤及び1次元目等電点電気泳動に供した。泳動終了後, IPG ストリップを SDS 平衡化液(50 mM Tris-Cl, pH 8.8, 6 M 尿素, 30 %グリセロール, 2% SDS, BPB, 65 mM DTT または 135 mM モノヨード酢酸ナトリウム)に浸し各 15 分間反応させた後, 2次元目 SDS-PAGE を実施した。

(4) RNA 干渉による発現抑制解析

LipofectamineTM RNAiMAX 試薬(invitrogen)のプロトコールに準拠してリバーストランスフェクションを行った。すなわち, 24 ウェルプレート中で Stealth RNAiTM と LipofectamineTM RNAiMAX1 との複合体を形成させた。抗生物質不含の培地で細胞を希釈して各ウェルに加え, 37°C で 24 時間インキュベートした。

(5) 細胞周期の同調化

血清飢餓法を用いて細胞周期を同調させた。すなわち, 大腸癌細胞株 HT-29 を 6-ウェルプレートでウシ血清(FBS)を含む培地中で培養した。70%コンフルエントとなった状態で FBS を含まない培地に交換し, 37°C で 15 時間インキュベートすることで, 細胞周期を G0 期に同調化させた。再び FBS を含む培地に交換し, 0, 6, 15, 18, 21 時間毎に細胞を回収し, フローサイトメトリー解析により細胞周期を特定した。他方, 同調化させた細胞より RIPA 緩衝液を用いてタンパク質を抽出し, ウェスタンブロット解析に供した。

(6) タンパク質同定及びペプチドマッピング
タンパク質同定用試料は, ゲル内消化により調製した。すなわち, 2次元電気泳動により分離されたスポットを回収し, 50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いて脱色後, アセトニトリルを加えて脱水した。アセトニトリルを除去した後, 減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて, ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片にトリプシン溶液(5 µg/ml, 25 mM 重炭酸アンモニウム, 0.1%オクチルグルコシド)を加え, 37°C で 30 分間静置し, ゲル片にトリプシン溶液を染み込ませた。余分なトリプシン溶液を取り除き, 25 mM 重炭酸アンモニウムでゲル片を覆い, 37°C で一晩反応させた。トリプシン消化後, 抽出液 (50%アセトニトリル/1%トリフルオロ酢酸)を加え, 超音波処理を 10 分間行い, ペプチドを含む抽出液を回収した。この操作を繰り返し, Speed Vac を用いて濃縮した。他方, ペプチドマッピング用試料は, 溶液消化により調製した。2次元電気泳動に

より分離された hnRNP A1 の主要なスポットから, 最適化された方法に従ってタンパク質を回収した。プロテアーゼ消化の後, PepClean C18 Spin Columns (Thermo)を用いて精製し, Speed Vac を用いて濃縮した。液体クロマトグラフィー/他段階質量分析 (LC/MSⁿ) の条件は以下の通りである。

HPLC:

装置: Paradigm MS4 (Michrom BioResource)
カラム: L-column (化学物質評価機構, 0.075×150 mm, 3µ)
溶離液 A: 0.1% ギ酸を含む2% アセトニトリル水溶液
溶離液 B: 0.1% ギ酸を含む90% アセトニトリル水溶液
グラジエント: 2~65% B (180 min)
流速: 0.3 µl/min

MS:

装置: Finnigan LTQ (Thermo Fisher Scientific)
イオン源: nanoESI
キャピラリー温度: 200°C
キャピラリー電圧: 1.8 kV
スキャン範囲 (m/z) : 400-2000
衝突エネルギー: 35%

測定メソッド:

- ①single mass scan (FT 分解能 : 100000)
- ②data dependent MS/MS

(7) sLe^x 付加の確認

① ノイラミニダーゼ消化
タンパク質を抽出した後, SDS-PAGE で分離し, PVDF 膜へ電氣的に転写した。ブロッキング後, ノイラミニダーゼを含む消化緩衝液 (0.2 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液, pH 4.5)に浸し, 37°C で 20 時間インキュベートした。PBS-T による洗浄後, ウェスタンブロットティングの手法に準拠して抗原と抗体を反応させた。検出後, 画像解析ソフト ImageQuant TL (GE ヘルスケア) によりバンド部分のピーク強度を算出した。
② レクチンアフィニティークロマトグラフィー
α1-3 フコースと結合するヒドロキソランタケレクチン(AAL)による精製を以下の条件で行った。

HPLC

装置: ÄKTA purifier (GE ヘルスケア)
カラム: LA-AAL (J-オイルミルズ, 4.6×150 mm)
溶離液 A: 10 mM 酢酸アンモニウム, 150 mM 塩化ナトリウム
溶離液 B: 0.1 M フコース/溶離液 A
グラジエント: 0~100% B (ステップワイズ)

流速: 0.3 ml/min

4. 研究成果

(1) sLe^x含有タンパク質と hnRNP A/B ファミリータンパク質の細胞内局在

大腸癌細胞株 HT-29 細胞における sLe^x 抗原の細胞内局在を明らかにした。すなわち、腫瘍マーカー SLX として知られる抗 sLe^x 抗体を用いて、主な細胞小器官に局在するタンパク質との多重免疫蛍光染色を行ったところ、sLe^x 抗原はこれまで報告されていた細胞表面ではなく、主としてゴルジ体に存在することが明らかとなった (図 1)。

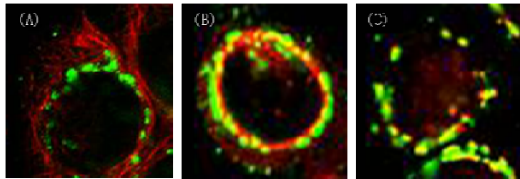


図1. 大腸癌細胞株 HT-29 において、sLe^x 抗原は主にゴルジ体に局在する。(A) 赤: α チューブリン (細胞骨格), 緑: sLe^x 抗原 (B) 赤: 核膜孔複合体タンパク質 (核膜), 緑: sLe^x 抗原 (C) 赤: GM130 (ゴルジ体), 緑: sLe^x 抗原

また、hnRNP A/B ファミリーである hnRNP A1 と hnRNP A2/B1, 及び hnRNP A3 を認識する抗体を用いて、sLe^x 抗原との多重免疫蛍光染色を行ったところ、hnRNP A/B ファミリーの一部は sLe^x 抗原とゴルジ体で共局在していることが示唆された (図 2)。

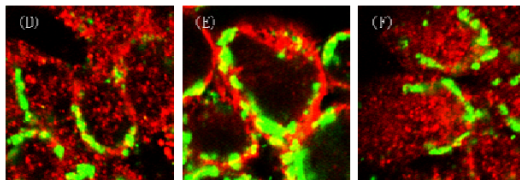


図2. 大腸癌細胞株 HT-29 において、hnRNP A/B ファミリータンパク質の一部は sLe^x 抗原とゴルジ体で共局在している。(D) 赤: hnRNP A1, 緑: sLe^x 抗原 (E) 赤: hnRNP A2/B1, 緑: sLe^x 抗原 (F) 赤: hnRNP A3, 緑: sLe^x 抗原

そこで、ZR-75-30 細胞 (乳癌細胞), BxPC-3 細胞及び Capan-1 細胞 (膵癌細胞), HepG2 細胞 (肝癌細胞), HL-60 細胞 (骨髄性白血病細胞), K562 細胞 (骨髄性白血病細胞), 乳腺上皮正常細胞, 気管支上皮正常細胞, 血管内皮細胞, 皮膚上皮細胞, 間葉系幹細胞等から核タンパク質/ゴルジ体タンパク質画分を抽出し、抗 sLe^x 抗体を用いたウエスタンブロット法を行ったところ、hnRNP A1, A2/B1, A3 の分子量に相当する位置に、sLe^x 含有糖タンパク質が確認された。

以上より、大腸癌細胞株 HT-29 において、ほとんど全ての sLe^x 抗原はゴルジ体に蓄積されており、hnRNP A1, A2/B1, A3 の一部がその

キャリアタンパク質候補であることが示唆された。

(2) Fuc-T III~VII の発現レベルに関する解析と細胞増殖能との関わり

sLe^x 生合成過程には、Fuc-T III~Fuc-T VII が関与することが知られているため、癌細胞と正常細胞における Fuc-T III~Fuc-T VII の発現レベルを比較した。大腸癌細胞株 HT-29 と胎児肺線維芽細胞株 TIG 1-20 より膜関連タンパク質を抽出し、抗 Fuc-T 抗体を用いたウエスタンブロットにより検出されたシグナル強度を、画像解析ソフト ImageQuant TL (GEヘルスケア)により数値化した。その結果、胎児肺線維芽細胞 TIG 1-20 と比べ、大腸癌細胞 HT-29 では、Fuc-T III と VI の発現レベルが亢進していた ($P < 0.01$) (図 3)。

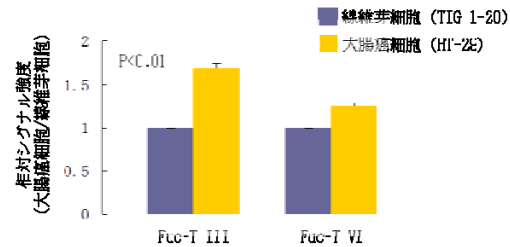


図3. 大腸癌細胞株 HT-29 では、Fuc-T III と Fuc-T VI の発現レベルが亢進している。

そこで、RNA 干渉法により大腸癌細胞株 HT-29 における両遺伝子をノックダウンした後、経時的に細胞を回収し、細胞増殖能の変化を MTT アッセイにより測定した。その結果、Fuc-T VI のノックダウンにより HT-29 の増殖能が有意 ($P < 0.05$) に低下することが明らかとなった (図 4)。

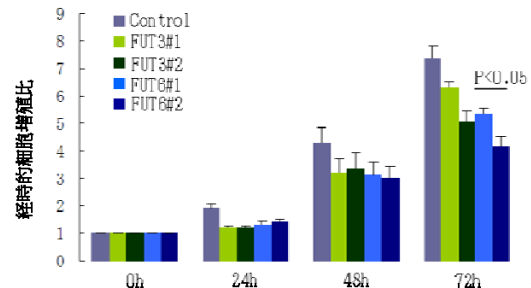


図4. 大腸癌細胞株 HT-29 において、Fuc-T VI は細胞増殖に関与している。

以上より、大腸癌細胞株 HT-29 で発現レベルが亢進している sLe^x 抗原の生合成には主として Fuc-T VI が関与しており、Fuc-T VI の発現は、癌細胞の増殖に関与していることが示唆された。

(3) 異なる細胞周期間における発現レベルの推移

抗 sLe^x 抗体に反応性を示す hnRNP A/B ファミリータンパク質が、細胞周期のどの段階で特異的に働くのかを確かめた。すなわち、大腸癌細胞 HT-29 の細胞周期を血清飢餓法により一度同調化させた後に進行を再開させ、経時的に細胞を回収した。回収した細胞より核タンパク質を抽出し、sLe^x 修飾された hnRNP A1 と hnRNP A3 の発現レベルをウェスタンブロットにより解析した。その結果、hnRNP A1, A3 共に分裂準備期 (G2 期) で最も発現レベルが亢進していた (図 5)。

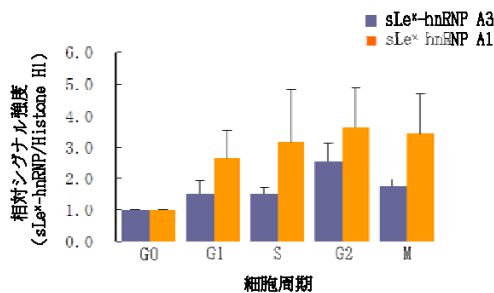


図5. sLe^x修飾されたhnRNP A1, A3の発現レベルは、S-G2期にかけて亢進する。

以上より、大腸癌細胞株 HT-29 では、sLe^x 修飾された hnRNP A/B ファミリータンパク質が G2 期において発現亢進されることにより、細胞分裂異常を引き起こし、過剰な細胞増殖能を獲得していると示唆された。

(4) hnRNP A1 アイソフォームの同定

hnRNP A/B ファミリータンパク質の中で、hnRNP A1 は最も発現量が多く、異なる 4 種類のアイソフォームが存在することが知られている。そこで、hnRNP A1 タンパク質のペプチドマッピングによる解析を行い、大腸癌細胞株 HT-29 で発現している主要なアイソフォームを明らかにした。まず、2 次元電気泳動で分離した核タンパク質から、hnRNP A1 の主要なスポットを同定した。同定したスポットを回収し、最適化された手法を用いてポリアクリルアミドゲルよりタンパク質を抽出し、Trypsin と Asp-N でプロテアーゼ消化した後、LC/MS 解析を行った。その結果、一部のアミノ酸配列が欠落したアイソフォーム A1-A に特異的なペプチドが同定された。

以上より、大腸癌細胞株 HT-29 で主に発現し、sLe^x 化している可能性がある hnRNP A1 は、アイソフォーム A1-A である可能性が高いことが示唆された。

(5) 抗シアリルルイス x 抗体の特異性の検証実験

大腸癌細胞株 HT-29 より抽出した核タンパク質をノイラミナーゼで消化し、抗 sLe^x 抗体と抗原との特異性を検証した。すなわち、タンパク質を PVDF 膜上に転写した後、膜上でノイラミナーゼを反応させ、抗体と抗原との親和性の変化をウェスタンブロット解析によって確認した。その結果、抗 sLe^x 抗体に反応し、hnRNP A/B ファミリーの分子量に相当するタンパク質の抗体への親和性は、ノイラミナーゼ消化後に著しく減衰した (図 6A)。この結果は、ノイラミナーゼ消化により末端シアル酸が遊離し、抗 sLe^x 抗体との親和性が低下したことを意味している (図 6B)。

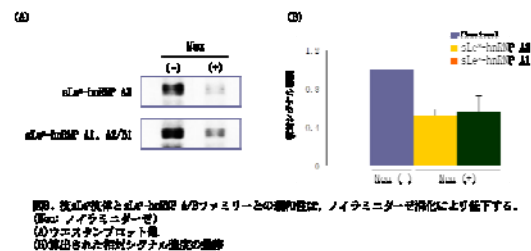


図6. 抗sLe^x抗体とsLe^x-hnRNP A/Bファミリーとの親和性は、ノイラミナーゼ消化により低下する。(Nase: ノイラミナーゼ)
(A) ウェスタンブロット像
(B) 抽出されたタンパク質のシグナル強度の推移

また、 α 1-3 フコースと結合するヒドロキシャルタンケレクチン(AAL)と hnRNP A/B ファミリーとの結合性を確認した。すなわち、大腸癌細胞株 HT-29 より抽出した核タンパク質を AAL カラムにより精製し、その結合画分をプロテアーゼで消化した後、LC/MS² 解析を行った。その結果、hnRNP A/B ファミリータンパク質が同定され、hnRNP A/B ファミリータンパク質の一部にフコースが結合している可能性が示唆された。

以上より、抗 sLe^x 抗体の特異性が確認され、hnRNP A/B ファミリータンパク質の一部が sLe^x 化されている可能性が引き続き示唆された。

以上の成果は、発癌と hnRNP A/B ファミリータンパク質の sLe^x 修飾の関係性を示す新たな知見である。今後、hnRNP A/B ファミリーにおける sLe^x 結合部位が同定されることにより、癌の早期診断または予後判定を可能にする新規マーカーの開発が可能になると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Seung-Yeol Park, Sung-Hyeon Lee, Keunsoo Kang, Nana Kawasaki, Satsuki

Itoh, Noritaka Hashii, Jin-Man Kim, Ji-Yeon Kim, Seon-Joo Yoon, and Jung Hoe Kim, The status of α 1-3/4 fucosylation at Asn 241 of β -haptoglobin is associated with colon cancer progression: A top-down and bottom-up combinatorial approach., Int. J. Cancer, 査読有, Vol.130, 2012, 2366-2376

②川崎ナナ、糖鎖関連医薬品の開発と分析化学、ぶんせき、査読有、421 巻、2010、17-22

③Hashii, N., Kawasaki, N., et al., Identification of glycoproteins carrying a target glycan-motif by liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry. Identification of Lewis x-glycoproteins in mouse kidney, J. Proteome Res., 査読有, Vol.8, 2009, 3415-3429

〔学会発表〕(計2件)

①川崎ナナ、橋井則貴、伊藤さつき、中澤志織、創薬におけるグライコムクスアプローチ、日本薬学会第131年会・創薬を加速する次世代プロテオミクスの多面的アプローチ、2011年3月28-31日、静岡

②Takakura, D., Kawasaki, N., et al, Role of nuclear sialyl lewis x-conjugated glycoproteins in the proliferation of cancer cell lines, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9日-12日, 横浜

〔図書〕特になし

〔産業財産権〕特になし

〔その他〕特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

川崎 ナナ (KAWASAKI NANA)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長

研究者番号：20186167