

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23632

研究課題名(和文) 癌細胞特異的なWFDC2結合タンパク質の同定と機能解析

研究課題名(英文) Analysis of cancer cell-specific WFDC2-binding protein

研究代表者

武居 俊樹 (Takei, Toshiki)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：00844771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、種々の癌種におけるバイオマーカーとしての利用が進むWAP four-disulfide core domain protein 2 (WFDC2)が病態に影響を与えるメカニズムの解明を目指し、WFDC2と相互作用する結合タンパク質の同定を試みた。結合タンパク質の単離に用いるビオチン修飾WFDC2の化学合成を行った結果、セグメント縮合法を用いることで効率良く得ることに成功した。しかし、得られた修飾WFDC2を用いて種々の癌細胞株抽出液から結合タンパク質の単離を試みたが、再現性良く特定の結合タンパク質候補を見出すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、8対のSS結合を有するWFDC2を効率良く合成することのできる条件を確立することに成功した。WFDC2の生理的機能は未だ明らかにされておらず、化学合成により純度の高いWFDC2の供給が可能になったことは学術上意義深い。WFDC2結合タンパク質を見出すことはできなかったが、化学合成WFDC2を用いた基礎研究の積み重ねにより癌との関連性が明らかになれば、新たな治療薬の開発等を通して社会に貢献することができると考える。

研究成果の概要(英文)：WAP four-disulfide core domain protein 2 (WFDC2) is known as biomarker for cancers and utilized for diagnosis in clinical level. This study focused on the identification of unknown WFDC2-binding protein to elucidate the relationship with cancer progression. Biotin-modified WFDC2 was efficiently synthesized by using the solid-phase peptide synthesis and native chemical ligation (NCL) method. However, specific candidate protein could not be isolated reproducibly from cancer cells using the biotin-modified WFDC2.

研究分野：ペプチド合成化学

キーワード：WFDC2 HE4 タンパク質合成 癌細胞 プロテオミクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

WAP four-disulfide core domain protein 2 (WFDC2) は、種々の癌種に対するバイオマーカーとして有用性が着目されている分泌性の糖タンパク質であり、いくつかの癌種では既に臨床レベルで利用が進められている。また、我々の研究グループでは尿中に分泌される WFDC2 の断片化を定量的に解析することで、初期の肺腺癌の診断に利用できることを明らかにしている。しかし、バイオマーカーとしての応用が進展する一方で、WFDC2 がどのようなメカニズムで病態に影響を与えるかについての直接的な知見はなく、また癌細胞における組織分布やその局在についても論拠に乏しいのが現状である。近年では、癌細胞株に WFDC2 を添加することでその増殖能が亢進することが報告されており、生化学的・医学的見地から WFDC2 結合タンパク質の同定が強く望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究では前項の研究背景を基に、化学合成法を駆使することで種々の修飾を有する WFDC2 を調製し、癌細胞における結合タンパク質の局在を明らかにする、また結合タンパク質の単離・同定を通じて病態との関連性を理解することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) WFDC2 の化学合成

ペプチド固相合成法は、ペプチド鎖を固相担体上で1残基ずつ伸長する合成手法であり、簡便かつ短時間に望む合成ペプチドを得ることが可能である。しかし、50 残基を超える鎖長のペプチドやタンパク質の合成では、固相担体上での反応効率が低下することで合成が困難となる。そこで100 残基を超えるようなタンパク質の合成では、全長をいくつかのセグメントに分割したペプチド断片を別途合成した後、それらを化学選択的に縮合する戦略が取られる。

WFDC2 は分子内に8つのSS結合を有する全長97残基のタンパク質であり、全長配列を二分割したペプチドセグメントをペプチド固相合成法により調製した後、セグメント縮合法の一種である native chemical ligation (NCL) 法を用いることで全長の合成を試みる。続いてグルタチオンを用いた酸化還元条件にてSS結合を形成させることでリフォールディングし、適切な立体構造の形成が可能か評価する。また、得られた合成条件を基にN末端にビオチン修飾を導入した WFDC2 および蛍光基を導入した WFDC2 を順次合成する。

#### (2) 蛍光標識 WFDC2 を用いた細胞局在の調査

別途調製した蛍光標識 EGF をポジティブコントロールとし、(1)にて調製した蛍光標識 WFDC2 を用いて癌細胞株における結合タンパク質の局在調査を行う。

#### (3) ビオチン修飾 WFDC2 を用いた結合タンパク質の単離

ビオチン修飾 WFDC2 を用いて結合タンパク質を癌細胞抽出液からタンパク質間相互作用によって単離し、プロテオミクス解析によって結合タンパク質を同定する。

### 4. 研究成果

#### (1) WFDC2 の化学合成

まずは、修飾のない WFDC2 の合成を試みることで合成経路の最適化を行った。97 残基からなる全長配列を以下に示す箇所で2つのセグメントに分割し、N末端及びC末端セグメントを別途ペプチド固相合成法によって調製した (Fig. 1)。また、鍵中間体であるN末端のペプチドチオエステルセグメントは *N*-alkylcysteine (NAC) 法により調製した。

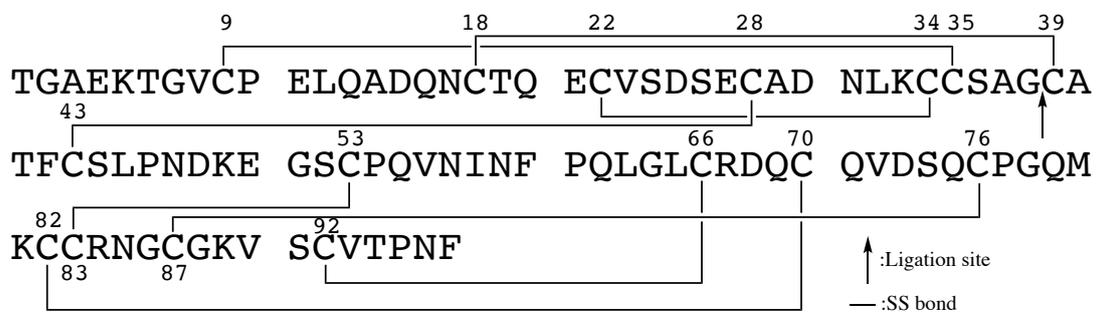


Figure 1. WFDC2 のアミノ酸配列と縮合部位.

得られた2つのセグメントをNCL法により縮合したところ、望む全長配列を効率良く得ることに成功した。続いて、グルタチオンを用いたフォールディングを行うことでSS結合形成を試みた。その結果、WFDC2は逆相HPLC上でシャープな単一生成物へと収束し、質量分析によっても8対のSS結合が形成されていることを確認した(Fig. 2)。また、糖鎖のないリコンビナントWFDC2とのCDスペクトルの比較およびWFDC2に対する抗体反応によっても合成の成功を確認した。修飾のないWFDC2を効率良く調製する合成法を確立したため、N末端にビオチンを有するWFDC2及び蛍光色素であるローダミンを有するWFDC2を別途合成し、続く解析に使用する修飾WFDC2を得ることに成功した。

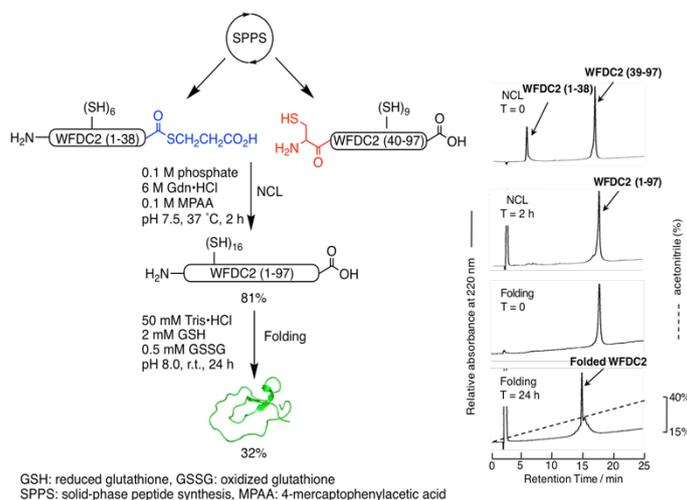


Figure 2. WFDC2の合成とHPLCプロファイル.

### (2) 蛍光標識WFDC2を用いた細胞局在

WFDC2結合タンパク質の細胞局在を調査するため、(1)によって得られたローダミン標識WFDC2および別途調製したローダミン修飾EGFを用いて、A549培養細胞株に対する添加実験を行った。

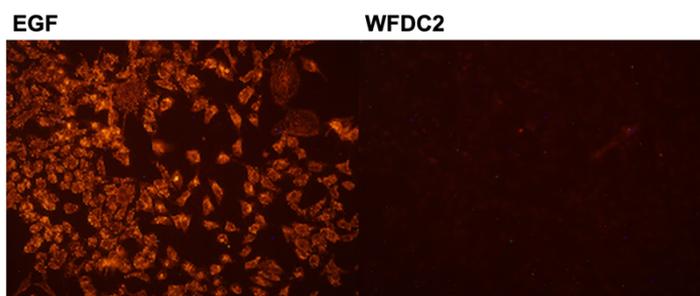


Figure 3. A549細胞を用いたWFDC2の局在調査.

その結果、ポジティブコントロールであるEGFと比較して明確な蛍光は観測されなかったが、細胞全体から弱い蛍光が観測された。エンドサイトーシスによる経路も考えられるが、ローダミン標識WFDC2が細胞内に取り込まれている可能性が示唆された。

### (3) ビオチン修飾WFDC2を用いた結合タンパク質の単離

無血清培地中で培養したA549細胞にTritonX-100を含む緩衝溶液を添加して細胞破碎し、得られた上清にビオチン修飾WFDC2を添加することで親和性による単離を試みた。ストレプトアビジンが結合したビーズを用いてビオチン修飾WFDC2を回収後、SDS-PAGEによる分離と銀染色による発色を行った。コントロールと比較して特異なバンドをin-gel消化によって断片化しプロテオミクス解析に供したところ、酸化還元酵素の一つであるペルオキシレドキシシンが検出された。しかし、再現性の取得および更なる結合タンパク質候補を探索するため複数回単離を試みたが、再現性の得られる結合タンパク質候補は見出せなかった。そこで、細胞抽出液に含まれるタンパク質の量的問題を解決するため、正常マウスの肺組織を用いた検討も試みたが、同様に再現性良く結合タンパク質候補を見出すには至らなかった。

### (4) 総括

本研究課題では、再現性良く特定の結合タンパク質候補を見出すことは出来なかったが、化学合成によって8対のSS結合を有するWFDC2を効率良く合成する経路を確立することに成功した。この成果は、化学合成上非常に意義深いと考えている。WFDC2はそのフォールディングモチーフからプロテアーゼインヒビター様の生理活性を持つことが推測されており、実際にin vitroでは種々のプロテアーゼに対してインヒビター活性を示すことが数多く報告されている。しかし近年では、インヒビター活性を否定した報告がなされており、実際に申請者も合成およびリコンビナントWFDC2でのインヒビター活性を測定したところ、その活性は認められなかった。

このように、癌との関連が深いWFDC2ではあるが、その活性や機能についての詳細はまだ明らかではない。本研究課題における成果が、今後のWFDC2研究の発展の一助になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 T. Takei, T. Ando, T. Takao, Y. Ohnishi, G. Kurisu, M. Iwaoka, H. Hojo	4. 巻 56
2. 論文標題 Chemical synthesis of ferredoxin with 4 selenocysteine residues using a segment condensation method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 14239-14242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0cc06252a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 H. Hojo, T. Takei, Y. Asahina, N. Okumura, T. Takao, M. So, I. Suetake, T. Sato, A. Kawamoto, Y. Hirabayashi	4. 巻 60
2. 論文標題 Total Synthesis and Structural Characterization of Caveolin-1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202100826	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------