

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11301

研究課題名(和文) TPD54に結合するタンパクの同定および、複合体形成による翻訳後修飾機構の解析

研究課題名(英文) Identification of novel intra-cellular proteins binding to TPD54 protein

研究代表者

椋代 義樹 (Mukudai, Yoshiki)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：50325099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、TPDファミリーを構成する一つのタンパクであるTPD54のエピジェネティックな発現制御機構、特に、翻訳後修飾、それに伴って変化する細胞内での局在の変化、さらには、これと複合体を形成する新規タンパクを検索することで、口腔癌細胞における新たな分子標的治療としての、分子生物学的な基礎的研究を行った。その結果、TPD54は扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤に關与するある分泌タンパクの分泌を細胞内での結合によって調整し、扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤能を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the epigenetic post-translational regulation system of gene expression of TPD54, a member of TPD52 protein family. As well, we identified a novel intra-cellular protein, which binds to TPD54. These findings suggest a novel role of TPD54 protein as a molecular target for cancer therapeutics. As a result, it was revealed that TPD54 regulates the secretion of a certain secretion protein, which is involved in proliferation and invasion of squamous cell carcinoma (OSCC) cells, by the intra-cellular interaction; thereby it is suggested that this interaction might regulate the ability of proliferation and invasion of OSCC cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：TPD52ファミリー TPD54 口腔癌 扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

Tumor Protein D (TPD) ファミリータンパクはこれまで 4 つのタンパク (TPD52、TPD53、TPD54、および、TPD55) が単離されているが、いずれも定常状態では細胞質に局在し、リン酸化されると細胞膜に移行し、種々のタンパクの細胞外分泌に関与していること (Nourse *et al.* Biochim. Biophys. Acta. 1998, Byrne *et al.* Tumour Biol. 2014)、さらには、N 末端領域にある coiled-coil domain を介して、ファミリー同志あるいは、他の細胞質内タンパクとホモ/ヘテロ二量体を形成して細胞内の局在が制御されていることが報告されている (Sathasivam *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 2001, Wilson *et al.* Genomics. 2001, Boutros *et al.* J Mol Biol. 2003, Cao *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 2006, Rubin *et al.* Cancer. Res. 2004)。申請者らは、*in vivo* Time-Of-Flight Mass Spectrometry (TOFMASS) を用いてヒト口腔扁平上皮癌において TPD54 が特異的に発現していることを見出し、このタンパクの扁平上皮癌細胞における増殖・浸潤・転移などにおける役割を検索した。その結果、TPD54 は、癌細胞の増殖およびマトリクス金属プロテアーゼ活性 (MMP) には全く影響を及ぼさないが、Talin 1 の発現を抑制することで、細胞外基質に対しての接着細胞および、細胞外基質依存性の細胞の移動・伸展を負に抑制していること、さらには、この制御系は Akt/PKB のリン酸化に依存していることを見出し、TPD54 は扁平上皮癌細胞の negative regulator で、同ファミリーに属する TPD52 および TPD53 の扁平上皮癌における転移および悪性化亢進作用を拮抗的に抑制していることを世界に先駆けて報告した (Mukudai *et al.* Cellular Oncol. 2013)。一方、TPD ファミリーの 4 つのタンパク (TPD52、TPD53、TPD54、TPD55) のうち TPD55 を除く 3 つが癌の増殖・浸潤・転移に重要な役割を果たし、

さらに、いずれも定常状態では細胞質に局在するが、リン酸化されると細胞膜に移行し、MAL2 や 14-3-3 などの種々の細胞質内タンパクと結合し、細胞外分泌 (オートクラインおよびパラクラインを含む) に関与していることが報告されている (Nourse *et al.* Biochim. Biophys. Acta. 1998)。しかしながら、これらのタンパクの正常細胞における生理的機能を始めとして、癌における生理学的もしくは病理学的意義などは、上に述べた以外はほとんど研究がなされておらず、なおかつ、我が国においては、申請者らのグループのみが研究を行っているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究計画では、申請者らのこれまでの研究をさらに発展させ、TPD52 ファミリーの中の、特に TPD54 を新たな口腔癌治療における分子標的として考え、同タンパクと結合する既知あるいは未知のタンパク質の検索をまず行う。続いて、口腔扁平上皮癌細胞および腺癌細胞においての、同タンパクのエピジェネティックな発現制御機構、特に、タンパクのリン酸化などの翻訳後修飾、それに伴って変化する細胞内での局在の変化を網羅的に解析を行う。

3. 研究の方法

本研究計画では、GFP エピトープタグを付与した TPD54 強制発現を活用する。まず、TPD54 に結合するタンパクの同定でし、同定されたタンパク強制発現、あるいはノックダウンと、GFP-TPD54 とその変異体とを併用して、TPD54 のエピジェネティックな制御機構の解析を行う。同時に、本研究計画は、本講座所属の大学院生の教育においても使用し、大学院生を研究代表者の補助者として使用し、基礎医学に関する研究方法、ならびに、研究遂行のための科学的理論構築や医学論文執筆の手順などを学習させる。

4. 研究成果

(1) TPD54 に結合するタンパクの同定
GFP-TPD54 遺伝子を恒常発現させた SAS 細胞 (GFP-TPD54-SAS 細胞) および、コントロールとして GFP を発現させた同細胞 (GFP-SAS 細胞) を用いて、GFP pull-down 免疫沈降法によって、GFP-TPD54 に結合するタンパクを単離した。免疫沈降したタンパクを MS 解析し、特異的タンパクを特定した。その結果、分子シャペロンである A. HSP 関連タンパク (シャペロンタンパク) と、B. 扁平上皮癌細胞の増殖に関与する分泌タンパクがクローニングされた。なお、上述の具体的なタンパク名は、本研究計画の最終結果を報告する論文 (現在作成中) によって明らかにするが、本報告書では、仮にタンパク A および B と表記することとする。

(2) *in vitro* での TPD54 タンパクのエピジェネティックな制御機構の解析

Pull-Down 法による二量体形成の検索

(1) で単離されたタンパクの cDNA を強制発現ベクターに組み込み、GFP-TPD54-SAS 細胞株にトランスフェクションし、Pull-Down アッセイを行うことで、実際に二量体が形成されるかを検索した。さらに、TPD ファミリータンパクは coiled-coil モチーフで他のタンパクと結合することが報告されている。そこで、TPD54 の coiled-coil 配列を欠損させた変異体を作成し、同じく Pull-Down 法にて二量体が形成されるかを検索した。同時に、TPD54 の翻訳後修飾の変化、および、細胞局在の変化を観察した。その結果、免疫沈降 Pull-Down アッセイによって、タンパク A および B とともに、GFP-TPD54 と結合することが明らかになった。また、通常 SAS 細胞においても、タンパク A および B は、内在性の TPD54 と結合し、二量体 (あるいはそれ以上の複合体) を形成することが明らかとなった。一方、TPD54 の coiled-coil 配列を欠損させた変異体を用いた免疫沈降 Pull-Down アッセイによって、タ

ンパク A は coiled-coil 配列非依存的に TPD54 に結合するが、タンパク B の coiled-coil 配列欠損 TPD54 に対する結合能は著しく減弱した。すなわち、分子シャペロン A は TPD54 の立体構造の維持に関与していることが示唆される一方で、分泌タンパク B は coiled-coil 配列を介して TPD54 に結合し、その分泌は TPD54 によって調節されていることが示唆された。そこで、本研究では、以降、分泌タンパク B の TPD54 による分泌調整、および、それによって惹起される扁平癌細胞の増殖・浸潤・転移に関する影響に関することに焦点を当てて行うことになった。

(3) 二量体形成に対する扁平癌細胞の増殖・浸潤・転移に関する影響の検索

GFP-TPD54-SAS 細胞、および、GFP-SAS 細胞、さらには、GFP-TPD54shRNA-SAS 細胞 (TPD54 ノックダウン SAS 細胞) を用いて、分泌タンパク B の分泌量を ELISA 法にて測定した。その結果、コントロール細胞と比較して、GFP-TPD54-SAS 細胞の分泌量は増加し、GFP-TPD54shRNA-SAS 細胞では減少した。このことは、分泌タンパク B は TPD54 との細胞内結合によってその分泌が何らかの機構で調節されていることを示している。

次に、通常 SAS 細胞に分泌タンパク B の強制発現ベクターあるいは、shRNA 発現ベクターをトランスフェクションすることによって、分泌タンパク B の分泌が扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤などにどのような変化が起こるかを *in vitro* にて検索した。その結果、分泌タンパク B を強制発現すると、SAS 細胞の増殖・浸潤能が増加するが、この細胞に TPD54shRNA を導入し TPD54 をノックダウンするとこの効果は打ち消された。一方、shRNA によって分泌タンパク B をノックダウンすると、SAS 細胞の増殖・浸潤能が減少するが、TPD54 強制発現によって逆の結果が得られた。この知見は、TPD54 によって分泌タンパク B の発現は

促進され、その結果として、扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤能が増強されることを示している。

以上の結果をまとめると、TPD54 は分泌タンパク B の分泌を細胞内での結合によって調整し、扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤能を制御していることが明らかとなった。このことは、TPD54 および TPD52 ファミリータンパクが口腔扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤能において重要な役割を果たしていることが示され、分子標的治療の対象になりうることが強く示唆された。

<引用文献>

1. Nourse CR, Mattei MG, Gunning P and Byrne JA. Cloning of a third member of the D52 gene family indicates alternative coding sequence usage in D52-like transcripts. *Biochim Biophys Acta* 1443: 155-168, 1998.
2. Byrne, J. A., Frost, S., Chen, Y. and Bright, R. K. Tumor protein D52 (TPD52) and cancer-oncogene understudy or understudied oncogene? *Tumour Biol.* 35 :7369-82, 2014.
3. Sathasivam, P. Bailey, A. M. Crossley, and M. Byrne, J. A. The role of the coiled-coil motif in interactions mediated by TPD52. *Biochem Biophys Res Commun.* 288: 56-61. 2001.
4. Wilson, S. H. Bailey, A. M. Nourse, C. R. Mattei, M. G. and Byrne, J. A. Identification of MAL2, a novel member of the mal proteolipid family, though interactions with TPD52-like proteins in the yeast two-hybrid system. *Genomics.* 76: 1-3. 2001.
5. Boutros, R. Bailey, A. M. Wilson, S. H. and Byrne, J. A. Alternative splicing as a mechanism for regulating 14-3-3

binding: interactions between hD53 (TPD52L1) and 14-3-3 proteins. *Mol Biol.* 332: 675-87. 2003.

6. Cao, Q. Chen, J. Zhu, L. Liu, Y. Zhou, Z. Sha, J. Wang, S. and Li, J. A testis-specific and testis developmentally regulated tumor protein D52 (TPD52)-like protein TPD52L3/hD55 interacts with TPD52 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 344: 798-806. 2006.
7. Rubin, M. A. Varambally, S. Beroukhim, R. Tomlins, S. A. Rhodes, D. R. Paris, P. L. Hofer, M. D. Storz-Schweizer, M. Kuefer, R. Fletcher, J. A. Hsi, B. L. Byrne, J. A. Pienta, K. J. Collins, C. Sellers, W. R. Chinnaiyan, A. M. Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. *Cancer Res.* 64: 3814-22. 2004.
8. Mukudai, Y., Kondo, S., Fujita, A., Yoshihama, Y., Shiota, T. and Shintani, S. Tumor protein D54 is a negative regulator of extracellular matrix-dependent migration and attachment in oral squamous cell carcinoma-derived cell lines. *Cell Oncol (Dordr).* 36, 233-245. 2013.

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. Ito C, *Mukudai Y, Itose M, Kato K, Motohashi H, Shimane T, Kondo S, Shiota T. Tumor Proteins D52 and D54 Have Opposite Effects on the Terminal Differentiation of Chondrocytes. **Biomed Res Int.** 2017:6014278. 2017. (査読あり)

原著論文)

DOI: 10.1155/2017/6014278

2. Kato K, Mukudai Y, Motohashi H, Ito C, Kamoshida S, Shimane T, Kondo S, Shirota I. Opposite effects of tumor protein D (TPD) 52 and TPD54 on oral squamous cell carcinoma cells. **Int J Oncol**. 50(5):1634-1646. 2017. (査読あり原著論文)

DOI: 10.3892/ijo.2017.3929

3. Motohashi H, Mukudai Y, Ito C, Kato K, Shimane T, Kondo S, Shirota I. Tumor protein D52 expression is post-transcriptionally regulated by T-cell intercellular antigen (TIA) 1 and TIA-related protein via mRNA stability. **Biochem J**. 474(10):1669-1687. 2017. (査読あり原著論文)

DOI: 10.1042/BCJ20160942

*; Corresponding Author

[学会発表](計 4件)

1. 椋代義樹、本橋宏美、代田達夫 TPD52 遺伝子発現は mRNA の安定性を介して負のフィードバックを受ける 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 06 日 神戸
2. Ito C, Mukudai Y, Itose M, Kato K, Motohashi H, Shimane T, Kondo S, Shirota I. Roles of TPD52 family genes on terminal differentiation of chondrocytes. 第 6 5 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 2017 年 11 月 19 日 東京
3. Mukudai Y, Motohashi H, Kato K, Ito C,

Kamoshida S, Shimane T, Kondo S, Shirota I. Tumor protein D52 expression is post-transcriptional regulated via mRNA stability. 第 6 5 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 2017 年 11 月 19 日 東京

4. Mukudai Y, Kato K, Motohashi H, Ito C, Kamoshida S, Shimane T, Kondo S, Shirota I. Opposite effects of TPD52 and TPD54 on oral squamous cell carcinoma cells. 22nd World Congress on Advances in Oncology and 20th International Symposium on Molecular Medicine 2017 年 10 月 07 日 ギリシア・アテネ

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

椋代義樹 (MUKUDAI, Yoshiki)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号: 50325099

(2)研究分担者

近藤誠二 (KONDO, Seiji)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号: 10432634

代田達夫 (SHIROTA, Tatsuo)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：60235760

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

加藤光佑 (KATO, Kosuke)

昭和大学・歯学部

伊藤千洋 (ITO, Chihiro)

同

本橋宏美 (MOTOHASHI, Hiromi)

同