

令和元年5月29日現在

機関番号：72609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09404

研究課題名(和文)膵癌に特徴的な生体内切断で活性化される分泌・膜蛋白質を同定するペプチドミクス

研究課題名(英文)Peptidomics for studying limited proteolysis in pancreatic cancer

研究代表者

佐々木 一樹 (Sasaki, Kazuki)

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・部長(移行)

研究者番号：80260313

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)：本研究では、質量分析・ペプチドミクスの手法を用い、膵腺癌細胞株2種類、膵腺癌の発生母地とされる膵管上皮の樹立細胞株が無血清培養上清に放出するペプチドのプロファイリングを行い、得られた配列を前駆体タンパク質上にマッピングすることで膜タンパク質のプロセッシング部位の特定を進めた。膜タンパク質アミロイドタンパク質の細胞外、細胞膜内での特異的切断部位が追認され、このアプローチの有効性が示された。また、細胞外領域の切断現象自体が知られていないか、あるいは切断部位が特定されていなかった細胞接着因子、受容体型チロシンキナーゼなどの膜タンパク質も特定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質のプロセッシング部位を特定することは、新規生理活性ペプチドの生成部位の手がかりを提供するだけでなく、抗体医薬の設計に必要な基盤情報の提供にも役立つ。従来は部位の特定は、個別的な生化学・分子生物学的な研究で実施されてきた。しかし、本研究では、質量分析法の進歩で可能となったペプチドミクスの手法を活用することで、膜タンパク質のプロセッシング部位をトランスフェクションなどを介することなく、そのままの形で特定できるようになったことが大きな進歩である。深達度の高い解析で、治療の標的となる分子の特定が期待される。

研究成果の概要(英文)：We used mass spectrometry-based profiling of endogenous peptides released in medium by cultured pancreatic cancer cell lines and immortalized pancreatic duct cell lines in order to identify specific, extracellular proteolytic processing sites of secretory or transmembrane proteins. Sequenced peptides were aligned on each parent precursor to generate proteolytic processing maps. Some known processing sites such as peptide hormone processing or transmembrane protein ectodomain shedding were recapitulated by this peptidomic profiling. In-depth analysis of endogenous peptides would highlight more transmembrane proteins regulated by ectodomain shedding. Accumulated profiling information can be used for identifying transmembrane proteins that could be a potential target for treating pancreatic cancer.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膵腺癌 ペプチド 限定分解 質量分析

1. 研究開始当初の背景

生体内で特定のアミノ酸残基で切断されて活性型へと変換されるタンパク質が存在する。よく知られた事例としては、消化酵素・血液凝固系・アポトーシスのカスパーゼカスケード、前駆体からのペプチドホルモンの生成などがあげられる。また、膜貫通型タンパク質も特異的に切断されて、細胞の内外で新たなシグナル伝達分子として機能する事例が知られつつあり、これまで想定されていた以上に一般性の高い現象であると考えられる。

2000年に、我々は膵癌の分泌ペプチドが腫瘍マーカー候補になると考え、培養細胞の上清中のペプチドをプロファイリングする研究を開始した。細胞株、初代培養など約100種類を解析し、膵腺癌にのみ見いだされるペプチドを同定した(Sasaki et al. Cancer Res, 2002)。なお、ペプチドとは通常のゲル電気泳動では分離や検出が難しい分子量1万未満の小さなタンパク質を指す。その後、ペプチドの一斉解析技術を確立した。膵内分泌腫瘍株の分泌タンパク質の特異的な切断部位を体系的に決定して、ペプチドホルモン7種類の新規発見に成功している(Sasaki et al. Mol Cell Proteomics, 2013)。

より広範な応用を目指し、ラット心臓線維芽細胞の培養上清を解析すると、切断が知られていなかった分泌・膜タンパク質の特異的な切断位置が35か所特定された(Tsuchiya et al. J Proteome Res 2015)。過去の生化学的な実験で実証されて周知の切断部位も多数追認されたので、実験系の妥当性は確保された。

我々は、ここで当初の膵癌研究にたちかえり、癌化にともなって切断が亢進する分泌タンパク質・膜タンパク質とその切断部位を正確に決定し、診断や治療の分子ツールの開発に役立つ情報を提供したいと考えた。上記研究で培養細胞から同定できたペプチドホルモンは、生体内でも同じ位置で切断されて生成し、受容体と共に創薬の重要な標的の一つである。

2. 研究の目的

生体内で切断されて活性化する分泌・膜タンパク質は治療薬・診断薬のよい標的となる。本研究は、我々が提案し世界をリードしているペプチドミクス手法を用い、膵腺癌を対象に、そのようなタンパク質とその切断部位を特定することを研究の目的としている。最終的には、膵管上皮と比較して、膵腺癌で発現が上昇し、細胞外領域でも切断も亢進している膜タンパク質の特定を目的としている。このような膜タンパク質は抗体医薬のよい標的となりうる。

我々は、分泌タンパク質の切断部位をペプチドミクスで解析し、創薬標的となるペプチドホルモンの発見に世界で初めて成功し、この分野の基礎と応用で最先端に位置している。特異的な切断で活性化され、膵癌を特徴づけるタンパク質が発見されると、創薬に有用な情報を提供すると期待される。なお、細胞株をはじめとする培養細胞も、正常組織と同じようにプロセッシングがなされることはこれまでの研究で確認できており、分泌タンパク質・膜タンパク質を同定する材料として現状では最善の試料であるため、培養上清を出発材料とする。

膜タンパク質・分泌タンパク質の特異的な切断

- タンパク質を活性化させる機序の一つ -

膵癌細胞・周辺正常細胞(含む膵管上皮細胞)に発現し、特異的切断を受ける膜・分泌タンパク質とその部位の特定

膵癌の病態と関連する膜・分泌タンパク質の選択

診断薬・治療薬開発の分子情報の提供

* 論文発表

* 公的データベース訂正の提案

1) 新規生理活性ペプチド生成の予測

実際に発見済

1) プロテアーゼ阻害剤のデザイン

2) 診断薬プローブ開発のための基礎情報

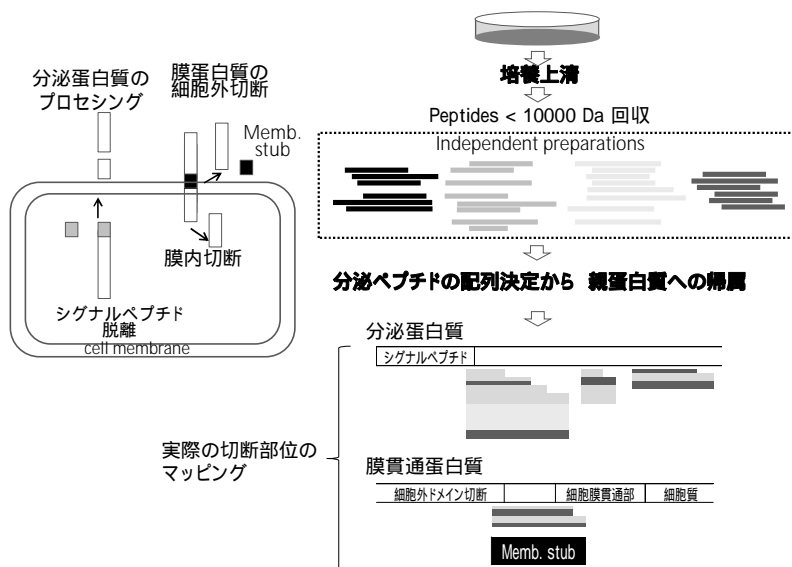
3. 研究の方法

本研究は、培養上清に放出されるペプチドをプロファイリングするために以下の手順を用いた。

- 1) 日本で樹立され継代数の少ない膵癌培養株2種類および膵管上皮細胞1種類より培養上清を回収
- 2) 上清を固相抽出して、タンパク質・ペプチド分画を回収
- 3) ゲルろ過クロマトグラフィーで分子量1万未満の分画を単離
- 4) 質量分析用に試料調製を実施
- 5) ナノ流速液体クロマトグラフィーで分離したペプチドを、オンライン接続したタンデム質量分析計に導入

- 6) 配列の特定、特定された配列は親タンパク質配列上にマッピング
- 7) マッピング情報からプロセシング部位を特定する
- 8) 膵癌細胞株のデータと膵管上皮細胞のデータとを比較し、プロファイリングの傾向について解析

以上の流れの概略を下記に示している。RNA-sequencing でのリード数の向上のように、精度の高いデータは、より深達度の高い分析を可能にできる。



4. 研究成果

膵腺癌培養株、膵管上皮細胞株ともに、分泌顆粒をもたず恒常的な分泌を伴う系である。このような恒常的分泌では、分泌顆粒からの急速な細胞外放出は見込めない。条件培地の回収までに 24 時間のような長時間をかけることは、細胞内からの存在量の多いタンパク質からの漏出が顕著となり、分泌成分の特定がマスクされるようになる。そこで、本研究では最大でも 6 時間で条件培地の回収を実施した。

本研究では、これまでの質量分析の分野では困難であった分子量 3,000 Da 以上 10,000 未満のペプチドの配列特定の課題に取り組み、培養上清に放出されるこの分子量領域のプロファイルを取得することで、分泌タンパク質または膜タンパク質のプロセシング部位の特定が可能になることを示しつつある。

膵腺癌が培養上清に放出するペプチドを対象として、液体クロマトグラフィ・タンデム質量分析を活用するペプチドミクスの手法を用い、膵腺癌の分泌タンパク質または膜タンパク質が特定位置でプロセシングされる部位の同定を進めた。日本で樹立されて継代数の少ない膵腺癌細胞株 2 種類、膵腺癌の発生母地とされる膵管上皮の樹立細胞株 1 種類を用い、無血清培養上清に放出されるペプチドのプロファイリングを進めた。膵腺癌での分泌が既知の生理活性ペプチドであるエンドセリンの活性分子型や、膜タンパク質アミロイド タンパク質の細胞外、細胞膜内での特異的切断部位が特定され、このアプローチの有効性が示された。また、細胞外領域の切断現象自体が知られていないか、あるいは切断部位が特定されていなかった細胞接着因子、受容体型チロシンキナーゼなどの膜タンパク質も特定された。いくつかのタンパク質については、膵管上皮細胞よりも発現が亢進している傾向が認められたが、今後は、遺伝的背景が同一の系での比較を進めていく計画である。より深達度の高い解析を進めることにより、膵癌の診断や治療の標的となる膜タンパク質とその切断部位が特定されることが期待される。

<引用文献>

1. Takashi Tsuchiya, Tsukada Osaki, Naoto Minamino, [Kazuki Sasaki](#). Peptidomics for studying limited proteolysis. *Journal of Proteome Research* 14:4921-31, 2015.
2. [Kazuki Sasaki](#), Tsukasa Osaki, Naoto Minamino. Large-scale identification of endogenous secretory peptides using electron transfer dissociation mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* 12:700-9, 2013
3. [Kazuki Sasaki](#), Kae Sato, Yasuto Akiyama, Kazuyoshi Yanagihara, Masaaki Oka, Ken Yamaguchi. Peptidomics-based approach reveals the secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Research* 62:4894-8, 2002

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Kazuki Sasaki, Takashi Tsuchiya, Tsukasa Osaki. Isolation of Endogenous Peptides from cultured Cell Conditioned Media for Mass Spectrometry. *Methods in Molecular Biology* 1719:51-58, 2018
doi: 10.1007/978-1-4939-7537-2_3
2. Takashi Tsuchiya, Hiroshi Iwakura, Naoto Minamino, Kenji Kangawa, Kazuki Sasaki. Endogenous peptide profile for elucidating biosynthetic processing of the ghrelin precursor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 490:1142-1146, 2017
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.155
3. Cherl Namkoong, Koji Toshinai, Zaved Waise, Hideyuki Sakoda, Kazuki Sasaki, Yoichi Ueta, Min-Seon Kim, Naoto Minamino, Masamitsu Nakazato. NERP-2 regulates gastric acid secretion and gastric emptying via the orexin pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 485:409-13, 2017.
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.064
4. Soon Gang Choi, Qian Wang, Jingjing Jia, Maria Chikina, Hanna Pincas, Georgia Dolios, Kazuki Sasaki, Rong Wang, Naoto Minamino, Stephen R. J. Salton and Stuart C. Sealfon. Characterization of gonadotrope secretoproteome identifies neurosecretory protein VGF-derived peptide suppression of follicle-stimulating hormone gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 291:21322-34, 2016.
doi: 10.1074/jbc.M116.740365
5. 佐々木一樹 ペプチドミクスを活用した生理活性ペプチドの発見 *生化学* 第 89 巻第 6 号 pp.894-898, 2017 年

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.sasaki-institute.org/peptidomics/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。