

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11142

研究課題名(和文) 前立腺がん細胞におけるCUL3システム破綻の解明と新規治療標的の創出

研究課題名(英文) The identification of CUL3-SPOP and CUL3-PLZF target substrates for therapeutic targets in prostate cancer cells

研究代表者

菊川 忠彦 (Kikugawa, Tadahiko)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70444734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺がん発症の分子機序ならびに新たな治療標的分子の解明にむけて、CUL3型E3Ubリガーゼ複合体CUL3-SPOPならびにCUL3-PLZFの基質全容の解明を試みた。2万タンパク質アレイ/AlphaScreen解析から、CUL3-SPOPの基質候補分子として前立腺がん細胞において発現の認められる124分子を同定し、101分子の一斉定量解析法としてSPOP基質QconCAT/SRM法を確立した。また、CUL3-PLZFの基質候補分子の探索・同定は、CUL3-SPOPの基質探索の方法に準じて進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、前立腺において、がん発症抑制に関与するCUL3-SPOPシステムとCUL3-PLZF複合体を解明し、これらが標的とする基質分子の全容及びその生体機能を明らかにすることで、前立腺がん細胞ではこれまで全く明らかにされていないCUL3依存的ながん抑制機構、ならびに、その基質でありがん治療標的になりうる分子を解明することが可能となる。新たな前立腺がんの治療戦略の開発が可能となり、臨床応用に向け弾みがつくものと大いに期待でき、その意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Prostate cancer (PC) is among the most common adult male malignancies. Accordingly, the establishment of successful therapy for PC is one of the most important medical issues in aging society. SPOP and PLZF serve as substrate receptors in CUL3-based ubiquitin-E3 ligase complexes, and their genes have been reported to be commonly mutated in PC. Whole features of CUL3-SPOP and CUL3-PLZF target substrates, however, are still unclear. Therefore, we identified their substrates by using a newly developed human 20K protein array/AlphaScreen system combined with mass analysis. We identified 124 molecules expressed in PC as substrates for CUL3-SPOP, and established a simultaneous quantification method for 101 molecules of them based on the SPOP-substrate QconCAT/selective reaction monitoring (SRM). We are also still undergoing the identification of CUL3-PLZF target substrates with the same strategy. Our findings would be useful for the establishment of novel therapeutic targets for PC.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺がん ユビキチンリガーゼ SPOP 質量分析法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺がんは、世界的に男性の2番目に多いがんであり、毎年250,000人以上が死亡している。また、進行の遅い前立腺がんの過剰治療も相当な病的状態を引き起こしている。前立腺がんの一般的な遺伝的变化には、NKX3.1(8p21)およびPTEN(10q23)の欠失、アンドロゲン受容体(AR)遺伝子の獲得、およびETSファミリー転写因子遺伝子とアンドロゲン応答性プロモーターとの融合がある。最近では、前立腺がんと正常組織のエキソーム配列決定から、頻発する新規変異が多数の遺伝子に同定された。中でも、最も変異の頻度が高かった遺伝子としてSPOPが同定されている。また、複数の独立したコホートにわたって腫瘍の6~15%にSPOPの基質結合部位に変異が見られた。

SPOPはCUL3型E3Ubリガーゼ複合体の構成成分であり、基質特異性を決定する重要な機能を担う。前立腺がんにおいて、SPOP変異によるCUL3-SPOPの機能不全は、標的とする基質のタンパク質寿命や機能変換を損なうことになる。すなわち、基質タンパク質の機能制御破綻が前立腺がんの引き金となるわけである。これまでに、CUL3-SPOPの基質として、AR、ステロイド受容体コファクター3(SRC-3)やCi/Gli, MacroH2A, Daxxなどが報告されている。さらにわれわれは、酸化ストレス応答転写因子であるNrf2(Nrf2は活性酸素種などの酸化ストレスや、親電子性物質によって活性化する転写因子であり、様々な局面で細胞を保護することが知られている)がSPOPの新たな標的基質になることを突き止めており(未発表)、SPOP機能の全貌解明に向けて、更なる解析が必要である。また、前立腺でのCUL3システムは、CUL3-SPOPのみならず、CUL3-PLZFなど、複数のがん抑制システムを構築している。よって、CUL3-SPOPならびにCUL3-PLZFの新規基質探索と基質機能の解明は、前立腺がん発症の分子機序解明ならびに新たな治療法開発に極めて重要と考えられる。

### 2. 研究の目的

前立腺がんと正常組織のエキソーム配列決定から、前立腺がんの約15%にSPOP変異が認められ、この変異が前立腺がんの新しい分子サブタイプの特徴となっている。SPOPはCullin3(CUL3)型E3ユビキチン(Ub)リガーゼ複合体の構成成分であり、基質特異性を決定する重要な機能を担う。最近申請らは、CUL3-SPOPのみならずCUL3-PLZFが、前立腺がんのがん抑制システムとして機能していることを見出しており、さらにそれらの新規の基質を複数同定している。本研究では、SPOPならびにPLZFの基質全容の解明とその機能解析を通して、CUL3システムによる前立腺細胞の機能制御機構と、その破綻によるがん化の分子機構を明らかにすることを目的とする。本研究を通して、前立腺がん治療の新たな標的分子を創出し、治療戦略の幅を広げることを目指す。

### 3. 研究の方法

研究は以下の4項目に沿って進める。

(1) CUL3-SPOPならびにCUL3-PLZFの基質探索・同定: ヒト前立腺癌細胞株の中で、悪性度が高いアンドロゲン非依存性細胞株DU145とPC3細胞を用いて、免疫沈降/質量分析法により、SPOPやPLZFに結合するタンパク質群を同定する。さらに、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プロテインアレイを基盤としたAlphaScreenシステムによるプロテイン・インタラクトーム解析により基質候補タンパク質を探索・同定する。これらの方法により同定するCUL3-SPOPならびにCUL3-PLZFの基質候補タンパク質が真の基質であるかどうかを一斉定量する技術基盤を開発し、検証する。

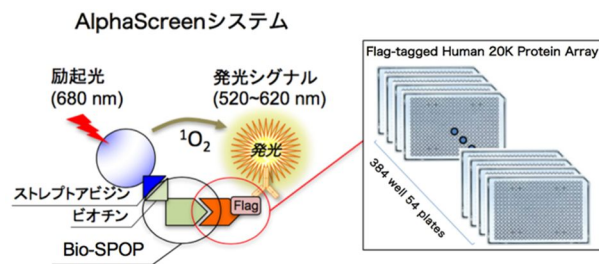
(2) 当該基質タンパク質の機能解析: ヒト前立腺癌細胞株(アンドロゲン非依存性細胞株DU145とPC3細胞及びアンドロゲン依存性細胞株LNCap, C4-2細胞)を用いて、当該基質遺伝子をそれぞれ遺伝子ノックダウン、およびノックアウトし、がん細胞特性に及ぼす影響を培養細胞レベルでまず評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) CUL3-SPOP ならびに CUL3-PLZF の基質探索・同定

SPOP の基質全容の解明を目指し、アンドロゲン非依存性で悪性度が高い DU145 と PC3 細胞を用いて、SPOP に FLAG タグを導入した遺伝子プラスミドを作成・導入し、過剰発現 DU145 と PC3 細胞を作成した。この細胞を可溶化し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降後、電気泳動、ゲル内トリプシン消化を施し、質量分析を行った。その結果、DU145/FLAG-SPOP と PC3/FLAG-SPOP 細胞それぞれの抗 FLAG 抗体免疫沈降物から双方ともに約 1000 種のタンパク質を検出した。これと並行して、愛媛大学プロテオサイエンスセンターで独自に開発・作成したヒト 2 万タンパク質アレイを基盤に、ビオチン化 SPOP リコンビナントタンパク質を作成、これをプローブとして AlphaScreen を施行した(図 1)。また、AlphaScreen 法により約 200 種のタンパク質を検出した。

図 1 : AlphaScreen システムの概略図。図に示す様にビオチン(Bio)-SPOP がドナービーズに、FLAG-タグ基質がアクセプタービーズに結合する。この Bio-SPOP と FLAG-基質が相互作用し、2 つのビーズが近接した状態では、680nm で励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーが周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換する。



本免疫沈降/質量分析法により同定されたタンパク質約 1000 種と AlphaScreen 法により検出した約 200 種のタンパク質を比較解析し、まず双方で検出されたものを抽出した。さらにこの中から、パブリックデータベース The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>)を用いて、ヒト前立腺癌組織で発現が確認できる分子 124 種を基質候補分子として選別した。選別できた基質候補分子には、これまでに SPOP 基質として報告のある AR, ERG, DRK, DAXX, BRD2, BRD4 等が含まれていた。次に、この 124 分子全てを GST タグ・リコンビナントタンパク質として小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成し(図 2)、グルタチオンビーズを用いて精製後、トリプシン分解・質量分析に供した。124 種の各タンパク質トリプシン分解物の質量分析を行い、検出可能なペプチド(プロテオタイプックペプチド:PTP)の決定を試みた。その結果、101 分子について特異的な PTP を決定できたが、残り 23 分子については、トリプシン分解物からはシグナルを検出できなかった。この残り 23 分子については、キモトリプシン分解物解析から PTP の決定を進めることとした。次に、PTP を決定できた 101 分子について、その PTP をタンデムに繋ぎ合わせた人工タンパク質をコードする cDNA をデザインし、これを合成した。これを鋳型としてコムギ胚芽細胞タンパク質合成系で $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -Lys 及び $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ -Arg を用いた安定同位体標識人工タンパク質 QconCAT (Quantification Concatamer)を合成した(図 3、4)。101 分子の特異的な PTP を含む安定同位体標識人工タンパク質 QconCAT は、アミノ酸数 400~500 個のサイズで SPOP 基質 QconCAT #1~#7 として合成し、内部標準タンパク質として用いた。図 4 には SPOP 基質 QconCAT #1 のアミノ酸配列と合成・精製 QconCAT #1 の電気泳動図を示した。

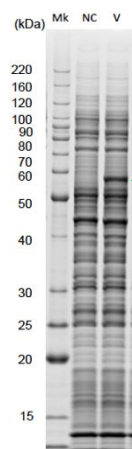


図 2 : SPOP 基質候補分子 124 分子全てを GST タグ・リコンビナントタンパク質として小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成した。右図はその一例の電気泳動図。NC: 合成反応前の小麦胚芽抽出液、V: 合成反応後の小麦胚芽抽出液。60 kDa 付近に目的のタンパク質が検出されている(矢印)。

図3: 本法により検出した既知の SPOP 基質タンパク質 AR、ERG、DRK、DAXX、BRD2、BRD4 の PTP リストと PTP をタンデムに繋ぎ合わせた人工タンパク質設計。

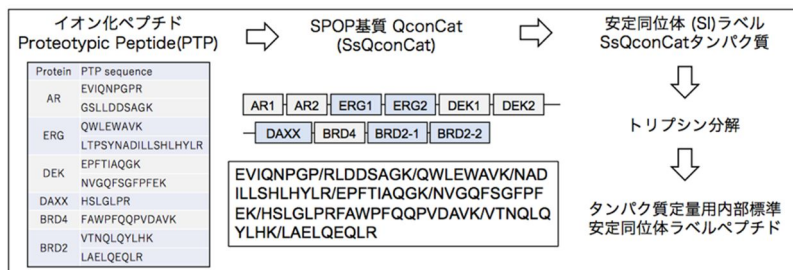
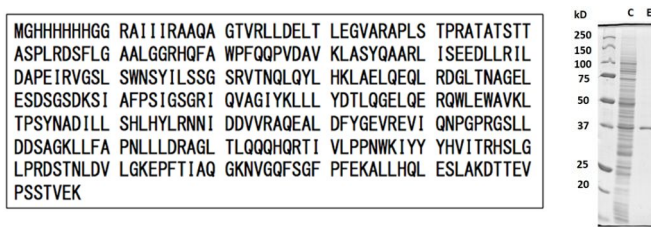


図4: 本法により検出した SPOP 新規基質候補 10 分子の PTP を、タンデムに繋ぎ合わせた<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Lys 及び<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>4</sub>-Arg 安定同位体標識人工タンパク質 QconCAT の一例 (SPOP 基質 QconCAT #1)。



左図は SPOP 基質 QconCAT #1 のアミノ酸配列。アミノ末端 MGHHHHHHHHGG RAIIRAAQAGTVR 配列はキレートセアフィニティー用の His タグ並びに QconCAT タンパク質の濃度測定のためのペプチドタグ AIIIIR (Mol Biosyst, 11, 361-5, 2015) 挿入配列を示す。右図は人工タンパク質 QconCAT #1 の電気泳動図。C: 精製前、E: 精製後の票品。

本 SPOP 基質 QconCAT #1~#7 のトリプシン分解並びに質量分析において、目的とする全ての PTP の検出をまず確認した。これを絶対定量用標準タンパク質として、また、ヒト前立腺癌培養細胞株 PC-3 並びに C4-2 細胞の可用性画分を試料として、101 の基質分子の定量を四重極質量分析系を用いた選択的モニタリング反応 (SRM)により定量解析を行なった。しかし、アンドロゲン受容体を含む 101 の基質候補分子のどのシグナルも検出限界レベルであり、優位なシグナルを得ることはできなかった。問題点として、細胞可用性画分における全基質候補分子の含量がきわめて低く、また夾雑物が多すぎる事が考えられる。現在これらの点を改良しているところである。

一方、PLZF の基質候補タンパク質の探索同定も、SPOP と同様に、PLZF に FLAG タグを導入した遺伝子プラスミドを作成・導入し、過剰発現 DU145 と PC3 細胞を作成した。この細胞を可溶化し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降後、電気泳動、ゲル内トリプシン消化を施し、質量分析を行った。その結果、DU145/FLAG-PLZF と PC3/FLAG-PLZF 細胞それぞれの抗 FLAG 抗体免疫沈降物から約 800 種程度のタンパク質を検出した。これと並行して、AlphaScreen 用にビオチン化 PLZF の作成を試みた。しかし、合成リコンビナント PLZF は不溶化が著しく AlphaScreen 用ブロープの合成には至らなかった。現在、不溶化を解消するための GST-PLZF 等の融合タンパク質の作成を進めており、今後ヒト 2 万タンパク質アレイを用いた基質候補スクリーニングを行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe R, Maekawa M, Hieda M, Taguchi T, Miura N, Kikugawa T, Saika T, Higashiyama S.	4. 巻 31
2. 論文標題 SPOP is essential for DNA-protein cross-link repair in prostate cancer cells: SPOP-dependent removal of topoisomerase 2A from the topoisomerase 2A-DNA cleavage complex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 478-490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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	雑賀 隆史  (Saika Takashi)  (10314676)	愛媛大学・医学系研究科・教授   (16301)	
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)	