

平成 22 年 6 月 20 日現在

機関番号：94308

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ～2009

課題番号：19310132

研究課題名 (和文) 高性能 RFHR・2D・PAGE のヒトプロテオミクス～抗癌剤抵抗性蛋白を探る

研究課題名 (英文) Human proteomics by the high-powered RFHR 2D PAGE for detection of protein changes resistant to anticancer agents

研究代表者

和田 明 (WADA AKIRA)

株式会社吉田生物研究所・バイオ情報研究部門・部門長

研究者番号：80025387

研究成果の概要 (和文)：われわれが開発した RFHR 2D PAGE は分離する蛋白質に等電点の限界を持たないため、塩基性蛋白を高い定量性をもって分離できる。本研究は RFHR 法を用いて大腸癌組織由来の DLD-1 細胞株において抗癌剤 5FU 抵抗性の獲得に伴って変動する 8 蛋白質を同定した。さらにヒトリボソーム蛋白の stoichiometry を行った結果、各リボソーム顆粒は全 79 種のリボソーム蛋白のうち平均 63 種しか持っていないことが判った。

研究成果の概要 (英文)：RFHR 2D PAGE which we improved has no pI limitation of analyzed proteins, and has high separation ability for basic proteins. The RFHR method was applied for identification of proteins in DLD-1 cells derived from colon cancer tissues. Eight proteins which changed in accompanying with acquisition of resistance against anticancer reagent 5FU were identified. Furthermore, stoichiometry of human ribosomal proteins was carried out, The results showed that one ribosomal particle has only 63 protein molecules among total 79 ribosomal proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
平成 20 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
平成 21 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：大腸癌、胃癌、リボソーム、抗癌剤抵抗性、RFHR 法、プロテオーム、塩基性蛋白質

1. 研究開始当初の背景

(1) 等電点 IPG 法の限界

現在プロテオミクスに最も良く使用される二次元電気泳動法は等電点 IPG 法であるが、この方法には二つの深刻な弱点があることが判ってきた。一つは塩基性蛋白質を十分に分離できないことである。例えば大腸菌の 3700 の遺伝子のうち塩基性蛋白質遺伝子は 850 を数えるから、5 分の 1 を超える蛋白質を研究の対象外に置かねばならない。もう一つの弱点はひとつの蛋白質が二次元ゲル上で複数のスポットに分裂することである。そのためスポットのインフレが起こり、同定が煩雑になるだけでなく、事実上各蛋白質量の定量が不可能になる。これらの弱点が等電点法の原理そのものから由来するため、これを克服するためには、泳動の原理を異にする方法を確認しなければならぬ。

(2) RFHR 二次元電気泳動法の可能性

RFHR 法は大部分が塩基性のリボソーム蛋白質を分離解析するためにわれわれによって開発され、多くの生物種のリボソーム蛋白質の同定に役立ってきた。IPG 法の二つの弱点とは無縁であるため IPG 法に代わる新しいプロテオミクスのツールとして有用であると考えられる。実際に大腸菌に適用した結果、750 個のスポットを検出し、そのうち 568 個を同定することができた。

(3) 抗癌剤抵抗性蛋白質の同定の重要性

IPG 法の弱点を反映してプロテオミクスにおいて塩基性蛋白質のデータが不足している。今回取り上げた 5FU が DNA, RNA 合成との密接な関係のもとで使用される抗癌剤であることから、核酸親和性の強い塩基性蛋白質の挙動はとくに重要である。

2. 研究の目的

(1) 抗癌剤 5FU 抵抗性蛋白質の同定

5FU は有効な抗癌剤の一つであるが、抗癌剤の例にもれず、癌細胞が抵抗性を獲得してくる。したがってその薬効を高めるには抵抗性に伴って生ずる蛋白質発現における変化を明らかにすることが重要である。とくに立ち遅れている塩基性蛋白質の挙動を把握するために RFHR 法を駆使して変化する蛋白質の同定を試みる。対象とする癌は大腸癌と胃癌であり、それぞれ確立された組織培養株 DLD-1 と NUGC を用いる。

(2) ヒトリボソーム蛋白質の分離と定量

ヒトの塩基性蛋白質の主要なものはヒストンとリボソーム蛋白質である。これら主要蛋白質の分離定量はとくに重要である。とくにリボソーム蛋白質は種類が多く二次元ゲル上の

分布域も広いいため他の塩基性蛋白質の標準スポットとして有用であり、その泳動位置と蛋白質量の決定方法を確認しておかねばならない。ところがヒトリボソーム蛋白質の二次元電気泳動の情報は極めて貧弱であり、大部分はラットや酵母などの真核生物のリボソーム蛋白質との一次配列のホモロジーに依存した間接的な情報であって、直接ヒトリボソーム蛋白質を解析した研究は極めて少ない。とくに二次元泳動法によるコピー数決定の例はない。この空白を埋めるために RFHR 2D PAGE によるリボソーム蛋白質の Stoichiometry に取り組む。

(3) RFHR 2D PAGE の性能の向上

以上の目的を達成するために、RFHR 法のさらなる改良に取り組む。RFHR 法は等電点電気泳動を採用しないため、その一次元泳動は濃縮を伴わない。したがって一次元方向の分離能は IPG 法に劣る。これを改善するため、水冷型の装置を開発し、低温での泳動と泳動時間の短縮を可能にしたが、細部に亘るシステムを確認しなければならぬ。とくにスポにスポットが密集する中性～弱酸性領域の分離に水冷型は有効である。

3. 研究の方法

大腸癌由来の DLD-1 細胞株と胃癌由来の NUGC 細胞株およびそれらの 5FU 抵抗性細胞株を用いた。CO₂ 下 37 °C 培養収穫した後 Major, J. J. (1994 in Cell Biology) の方法で分画し、酢酸法で蛋白質を調製した。次いで蛋白質を RFHR 法に適用し、塩基性蛋白質は標準型で、中性～酸性蛋白質は水冷型で泳動分離した。CBB で染脱色した二次元ゲルを BioRad GS-800 Calibrated Densitometer でスキャンし、スポットの蛋白質量を定量した。元株と 5FU 抵抗株を比較して蛋白質量が 2 倍以上または 2 分の 1 以下に変動したスポットを検出した。変化した蛋白質の同定を Bruker Ultraflex の MALDI-TOF MS で行った。

4. 研究成果

(1) 大腸癌由来 DLD-1 細胞株において

抗癌剤 5FU 抵抗性獲得に伴って変動する塩基性蛋白質の同定

上記のように DLD-1 細胞破碎後分画し、全成分を合して酢酸法にかけ、全蛋白質を調製した。全蛋白質を RFHR 法で分離した結果 5 種の塩基性蛋白質が 5FU 抵抗性獲得に伴って増加した。変化した塩基性蛋白質は

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G, Mitochondrial transcription factor A, HistoneH2B, H4, ribosomal protein L3 であ

る。(S. Tanaka et al. *International J. Oncology* 2008)

(2) 大腸癌由来 DLD-1 細胞株において抗癌剤 5FU 抵抗性獲得に伴って変動するリボソーム顆粒中のリボソーム蛋白の同定
上記のように細胞を破碎後分画して得た粗リボソーム画分から酢酸法で蛋白質を調製し、RFHR 法で調べた。リボソーム蛋白のいくつかは遊離した状態で機能することが知られているが、リボソーム顆粒に結合するものに限った場合にも L15 と L37 が減少した。全蛋白中の L15 と L37 に変化が見られないことから、これらリボソーム蛋白は 5FU 抵抗性獲得に伴って一部分遊離すると考えられる。

リボソーム蛋白以外に prohibitin が増加した。

Prohibitin はリボソームに結合せず独立に大きな構造をとっていると考えられる (K. Kimura et al. 投稿中)。

(3) 胃癌由来 NUGC 細胞株において抗癌剤 5FU 抵抗性獲得に伴って変動する塩基性蛋白質の同定

細胞を破碎後、まず核と細胞膜画分を分画して蛋白質を調製し、RFHR 法で分析した。その結果、5FU 抵抗性獲得に伴って7種の蛋白スポットが変動した。この実験は現在継続中である。

(4) ヒトリボソーム蛋白の定量的研究
DLD-1 のリボソーム蛋白の stoichiometry を行い、ヒトリボソーム顆粒の構成蛋白のコピー数(顆粒当たりの分子数)をほぼ決定した。これはヒトリボソームにとって初めての試みである。現在のところ79種の全リボソーム蛋白のうち73種を同定し、コピー数を求めた。その結果、コピー数が0.6以上1.3未満が51個(70%)、0.6未満が16個、1.3以上が6個であった。リボソーム蛋白の平均コピー数は0.8であるから、各リボソーム顆粒は全79種のリボソーム蛋白のうち平均して63個のリボソーム蛋白しか持っていないことになる。したがって各顆粒を構成しているリボソーム蛋白から見れば、リボソーム顆粒の構造は極めて不均一である。現在未同定のリボソーム蛋白の主なものは中性～酸性領域に分布する P0、P1、P2 であり、これらは強固な複合体を形成して泳動ゲルには入れないためであると思われる。現在その打開策を検討している。この実験は継続中である。

(5) RFHR 法の改良

原核生物の蛋白質に適用していた段階と異なり、ヒト・真核生物ではより難溶性の蛋白質が多く、定量性を維持する努力が必要になった。そのためとくに0次元における添加し

た蛋白質をロスなくゲルに泳動させるために10M尿素や各種可溶化剤の使用などを行った。またゲル中の尿素も7Mから8Mに変更した。加えてRFHR法の従来からの課題である中性～酸性領域の分離能の向上を目指して、室温下風冷の標準型に加えて温度制御を徹底させた水冷型を考案し、その泳動条件を確立した。改善されたRFHR法はDLD-1とStaphylococcus aureusのリボソームに適用された(Masami Ueta, Chieko Wada and Akira Wada. *Genes to Cells*. (2010) 15, 43-58)

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10件)

Takayuki Kato, Hideji Yoshida, Tomoko Miyata, Yasushi Maki, Akira Wada and Keiichi Namba. Structure of 100S ribosome in the hibernation stage revealed by electron microscopy. *Structure* (2010) 18, 719-724.

Masami Ueta, Chieko Wada and Akira Wada. Formation of 100S ribosome in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog SaHPF. *Genes to Cells* (2010) 15, 43-58

Yoko Doniwa, Minoru Ueda, Masami Ueta, Akira Wada, Koh-ichi Kadowaki and Nobuhiro Tsutsumi. The involvement of a PPR protein of the P Subfamily in partial RNA editing of an Arabidopsis mitochondrial transcript. *Genes* (2010) 454, 39-46

Akiko Sato, Takumi Watanabe, Yasushi Maki, Masami Ueta, Hideji Yoshida, Yutaka Ito, Akira Wada and Masaki Mishima. Solution structure of the *E. coli* ribosome hibernation promoting factor HPF : Implication for the relationship between structure and function. *B. B. R. C.* (2009) 389, 580-589.

Satoru Tanaka, Akiko Sakai, Kousei Kimura, Hideji Yoshida, Hideo Fushitani, Akihiko Ogata, Akiko Miyamoto, Masakazu Fukushima, Akira Wada and Nobuhiko Tanigawa. Proteomic analysis of the basic proteins in 5-fluorouracil resistance of human colon cancer cell line using the RFHR 2D PAGE. *International J. Oncology* (2009) 33, 361-370.

Hideji Yoshida, Masami Ueta and Akira Wada. Activities of *Escherichia coli* ribosomes in IF3 and RMF change to prepare 100S ribosome formation on entering the stationary growth phase. *Genes to Cells* (2009) 14, 271-280.

Masami Ueta, Ryousuke L. Ohniwa, Hideji Yoshida, Yasushi Maki and Akira Wada. Role of HPF (Hibernation Promoting Factor) in translational activity in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* (2008) 143 425-433.

[学会発表] (計17件)

Hideji Yoshida, Takayuki Kato, Yasushi Maki, Shou Furuike, Masami Ueta, Akiko Sakai, Akira Wada and Keiichi Namba. Structural analysis of 100S ribosome by cryoEM : tRNA binding. 第32回日本分子生物学会年会 2009 12 10, パシフィコ横浜

Masami Ueta, Chieko Wada and Akira Wada. Formation of 100S ribosome by HPF (hibernation promoting factor) homolog in *Staphylococcus aureus*. 第32回日本分子生物学会年会 2009 12 10, パシフィコ横浜

上田雅美、和田千恵子、吉田秀司、牧泰史、和田明 増殖段階に依存する *Staphylococcus aureus* リボソームの構造変化 第11回日本RNA学会年会 2009 07 27 新潟市朱鷺メッセ

上田雅美、和田千恵子、和田明 バクテリアの翻訳活性におけるリボソーム結合蛋白質 第31回日本分子生物学会年会 2008 12 11. 神戸ポートアイランド国際会議場

佐藤明子、永井義崇、渡辺拓実、上田雅美、牧泰史、伊藤隆、和田明、三島正規 大腸菌リボソームの休眠を促進する蛋白質 HPF の構造解析 第31回日本分子生物学会年会 2008 12 11. 神戸ポートアイランド国際会議場

和田千恵子、白石慧、竹安邦夫、和田明、上田雅美 生物種に広く保存されている JmjC ドメインを持つ大腸菌蛋白質 (YcfD) 機能解析 第31回日本分子生物学会年会 2008 12 11. 神戸ポートアイランド国際会議場

上田雅美、吉田秀司、牧泰史、和田千恵子、和田明 バクテリア蛋白質合成における HPF (hibernation promoting factor) の機能解析 第10回日本RNA学会年会 2008 07 23 札幌市札幌コンベンションセンター

吉田秀司、上田雅美、牧泰史、境晶子、和田明 100SリボソームとIF3の関係 第30回日本分子生物学会年会 2007 12 14. パシフィコ横浜

上田雅美、大庭良介、吉田秀司、牧泰史、和田千恵子、和田明 Hibernation promoting factor HPF は 100S ribosome 形成を促進し polyU 存在下 phenylalanine の取り込みを阻害する 第30回日本分子生物学会年会 2007 12 14. パシフィコ横浜

上田雅美、大庭良介、吉田秀司、牧泰史、和田千恵子、和田明 Hibernation promoting factor HPF の翻訳における役割と系統解析 第9回日本RNA学会年会 2007 07 30 名古屋市名古屋国際会議場

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
www.yoshidabio.co.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 明 (WADA AKIRA)

株式会社吉田生物研究所 (バイオ情報研究部門) 部門長

研究者番号：80025387

(2)研究分担者

和田千恵子 (WADA CHIEKO)
株式会社吉田生物研究所 (バイオ情報研究
部門) 室長
研究者番号 : 10175698

上田雅美 (UETA MASAMI)
株式会社吉田生物研究所 (バイオ情報研究
部門) 研究員
研究者番号 : 30512511

境 晶子 (SAKAI AKIKO)
大阪医科大学・医学部 助教
研究者番号 : 31225750

吉田秀司 (YOSHIDA HIDEJI)
大阪医科大学・医学部 準教授
研究者番号 : 60288735

牧 泰史 (MAKI YASUSHI)
大阪医科大学・医学部 講師
研究者番号 : 60401733

谷川允信 (TANIGAWA NOBUHIKO)
大阪医科大学・医学部 教授
研究者番号:00111956

古谷栄助 (FURUYA EISUKE)
大阪医科大学・医学部 教授
研究者番号:00028523

(3)連携研究者

吉田秀司 (YOSHIDA HIDEJI)
大阪医科大学・医学部 準教授
研究者番号 : 60288735

牧 泰史 (MAKI YASUSHI)
大阪医科大学・医学部 講師
研究者番号 : 60401733

谷川允信 (TANIGAWA NOBUHIKO)
大阪医科大学・医学部 教授
研究者番号:00111956

古谷栄助 (FURUYA EISUKE)
大阪医科大学・医学部 教授
研究者番号:00028523