

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16730

研究課題名（和文）大腸がん細胞で高発現する新奇オーファントランスポーターTMEM180の機能解明

研究課題名（英文）Functional elucidation of the novel orphan transporter TMEM180, which is highly expressed in colorectal cancer cells.

研究代表者

安西 高廣（Anzai, Takahiro）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・特任研究員

研究者番号：80786137

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、大腸がん細胞で高発現する機能未知の新奇トランスポーターTMEM180の分子機能解明を目的としている。TMEM180のトポロジーに着目した解析を進め、ループと予想される部位にタグを挿入した改変TMEM180を複数作製、それぞれHEK293T細胞での一過性発現を行い、膜透過処理の有無を組み合わせた細胞免疫染色を行うことで、タグを挿入したループ部分が膜のどちら側に存在するかを決定、12回膜貫通型タンパク質であることを証明した。TMEM180遺伝子発現を抑制した大腸がん細胞株SW480を用いた生化学的解析を進め、TMEM180が代謝を通して大腸がん細胞の増殖に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが真に大腸がん細胞で高発現する分子の1つとして見出したTMEM180は、これまで論文報告がなく、機能が全くわからない新奇の分子であった。本研究において、TMEM180が12回膜貫通型タンパク質であることを実験的に証明し、大腸がん細胞の増殖に代謝を通して寄与していることを見出すことができた。本成果は、TMEM180が生体内でどのようにがんと関係しているかを明らかにするための重要な手がかりの一つとなった。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the molecular function of the novel orphan transporter TMEM180, which is highly expressed in colon cancer cells. As an analysis focusing on the topology of TMEM180, several modified TMEM180 expression vectors with FLAG tags inserted at the predicted loop sites were constructed, each transiently expressed in HEK293T cells, and cell immunostaining was performed with and without membrane permeabilization treatment. From these results, we confirmed that TMEM180 is a 12-transmembrane protein. Furthermore, biochemical analysis using the TMEM180 knockdown colon cancer cell line SW480 revealed that TMEM180 contributes to colon cancer cell growth via metabolism.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん トランスポーター 代謝 腫瘍マーカー 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

TMEM180は、大腸がん細胞と健常者の大腸剥離細胞との網羅的遺伝子発現解析とqRT-PCR、*in situ* hybridizationにより、真に大腸がん細胞で特異的に高発現する分子の1つとして我々が見出した機能未知分子である。抗TMEM180モノクローナル抗体の樹立とヒト化抗体への改変にも成功し、大腸がん細胞を移植したマウスへの抗体投与により、著明な抗腫瘍効果が見られることを示していた。機能解析としては、TMEM180のエクソン1の上流に、低酸素環境で活性化される低酸素誘導因子HIF-1に応答するhypoxia responsive element様配列が10か所存在することを発見し、実際にがん細胞を低酸素状態に暴露させると、顕著にTMEM180の発現上昇が見られたことから、TMEM180は低酸素環境下で発現亢進する分子であることを証明していた。しかし、TMEM180が大腸がん細胞の生存や増殖において何らかの役割を担っていることは予想できるものの、他グループからの論文報告は1報もなく、実際にどのような機能を持っているのかは全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が独自に見出したこれまでに1報も論文報告がない新奇の分子であるTMEM180が、がん細胞においてどのような役割を果たしているのか、その分子機能を明らかにすることである。また機能はもちろん、トポロジーやシグナル配列の有無すら全く未知の分子であることから、これらの知見を得ることで、最終的にはTMEM180が関与するがんの本態解明につなげることを目指す。

3. 研究の方法

(1)網羅的解析：TMEM180が関与する生物学的プロセスの絞り込み

TMEM180は公共データベース(UniProtKB)上でトランスポーターであると予想されているものの、実験的なエビデンスは存在せず、また相同なタンパク質や既知のモチーフが一切存在しないために、機能が推定できない新奇な機能未知タンパク質である。既に樹立したTMEM180遺伝子ノックダウン細胞株のフェノタイプ解析を行う。また次世代シーケンス解析やメタボロミクス解析を行うことで、TMEM180が関与する生物学的プロセスの絞り込みを行う。個体レベルの解析として、個体レベルの解析として、TMEM180ノックアウトマウスF2世代を樹立し、各種血液生化学検査を行うとともに、臓器などの形態学的な解析と、mRNA発現解析を行う。

(2)生理学的解析：TMEM180がトランスポーターであることの証明と基質探索

TMEM180がトランスポーターであることを、電気生理学的測定を行って証明する。具体的には、アフリカツメガエル卵母細胞にTMEM180のcRNAをマイクロインジェクションし、ガラスキャピラリー電極を卵母細胞に2本挿しして電圧を与えることで、イオン電流測定を行う。比較対象として水、もしくは先に構築したホモロジーモデル構造を基に、カチオン結合サイトのアラニン置換変異体cRNAをインジェクションに用いる。電流値が観測できれば、トランスポーターの証明となる。測定系が確立できれば、基質候補を外液として流すことで、基質探索を行うことができる。

(3)生化学的解析：TMEM180タンパク質の基礎データ取得

TMEM180のN末端、C末端、ループと予想される部位の欠失変異体を複数作製し、細胞内局在変化を調べることで、移行シグナルや局在化シグナル配列を有するかについての手がかりを得る。細胞レベルの生化学的解析として、TMEM180-GFP融合タンパク質の安定発現株を作製、蛍光顕微鏡によるライブセルタイムラプスイメージングを行うことで、細胞内局在変化を詳細に追跡する方法を確立し、細胞周期や低酸素、低栄養などの細胞外の環境変化とTMEM180の関係について検討する。

4. 研究成果

(1)網羅的解析

大腸がん細胞株SW480のshRNAによりTMEM180遺伝子をノックダウン(KD)した細胞株は、野生株(WT)と比較して優位に増殖が抑制されていることがわかった(図1)。また足場非依存的な増殖に関しても、抑制されていることがわかった。そこで、両細胞株の網羅的比較解析を行い、TMEM180がどのようなメカニズムでがん細胞の増殖に寄与しているかを調べた。リン酸化プロテオミクス解析を行ったが、両者にほとんど差は見られず、TMEM180はリン酸化シグナルに影響しないことが示唆された。メタボロミクス解析を行ったところ、糖代謝やTCAサイクルに変動があることが示唆された。これらの結果から、TMEM180は代謝を通じて大腸

がん細胞の増殖に寄与していることが明らかとなった。さらに次世代シーケンスによる解析を行ったところ、一酸化窒素生成系に関わる遺伝子群に変動があることが見いだされ、NOS2 や NOS3、PDE2A や PDE5A が TMEM180-KD 細胞で有意に低下していることが見いだされた。個体レベルの解析について、ノックアウトマウス F2 世代の樹立に成功し、胎生致死、新生児致死ではないことを明らかにした。つまり、Tmem180 は発生において必須ではないことがわかった。10 週齢においては野生型マウスと明確な差異は認められず、妊孕性にも問題がないことを明らかにした。

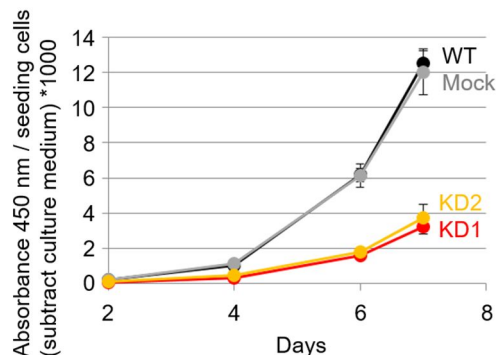


図 1: TMEM180 遺伝子ノックダウン細胞の増殖

(2)生理学的解析

TMEM180 の卵母細胞での発現ベクターを構築した。アフリカツメガエル卵母細胞へインジェクションを行い、発現と電気生理学的解析の予備検討を行ったが、TMEM180 の細胞膜上での発現が確認できなかった。細胞での一過性発現における局在解析の結果、主に細胞内に集積していることを見出しており、何らかの刺激、もしくはパートナータンパク質がないと細胞膜上へ移行しない可能性が考えられた。

(3)生化学的解析

TMEM180 のホモロジーモデルを構築し、共輸送体のもつカチオン結合サイトが種を超えて保存されていることを発見した。ホモロジーモデルを参考に、ループと予想される部位に FLAG タグを挿入した改変 TMEM180 発現ベクターを複数作製し、それぞれ HEK293T 細胞での一過性発現を行い、膜透過処理の有無を組み合わせた細胞免疫染色を行うことにより、ループ部分の膜の内外の配向を決定、12 回膜貫通型タンパク質であることを証明した。また、N、C 末端側ともに細胞外に露出していることを明らかにすると同時に、カチオンシンポーターとして機能する可能性を見出した。

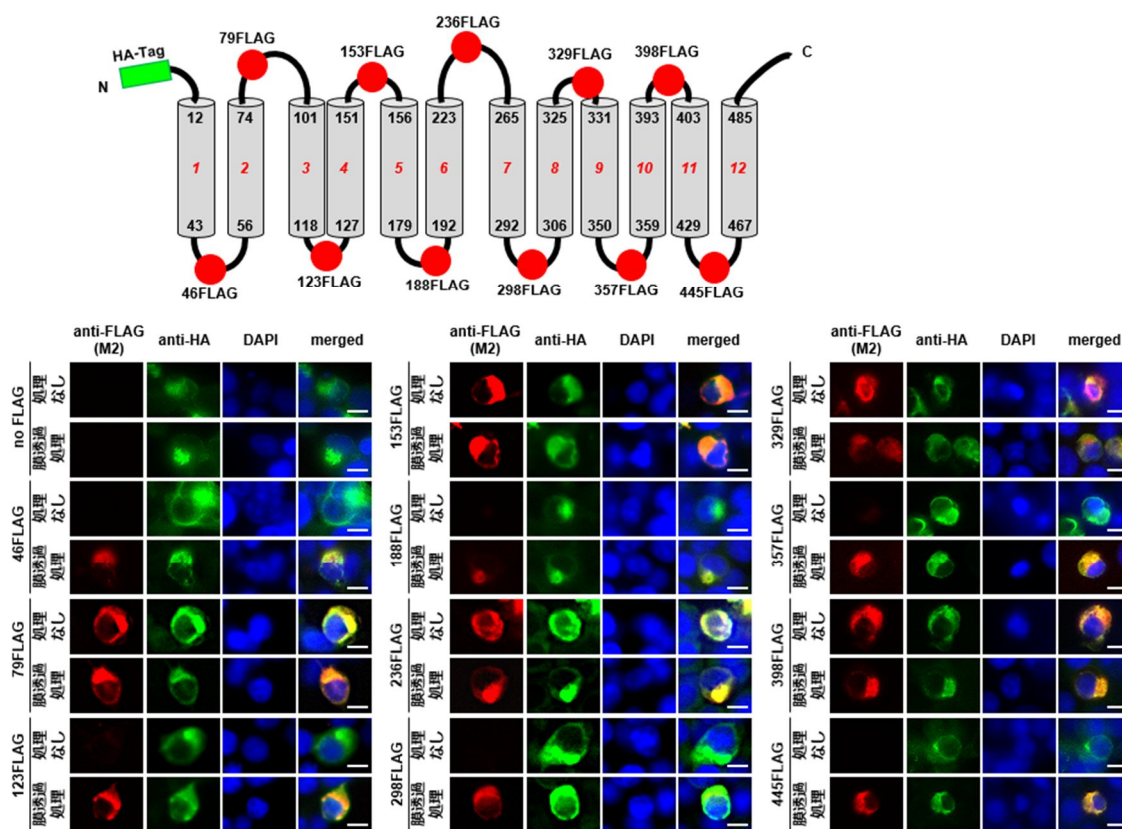


図 2: TMEM180 のトポロジーモデルと細胞免疫染色によるループ部位の局在解析

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 2件）

1. 著者名 Anzai Takahiro, Matsumura Yasuhiro	4. 巻 520
2. 論文標題 Topological analysis of TMEM180, a newly identified membrane protein that is highly expressed in colorectal cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 566 ~ 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.070	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 -

1. 著者名 Anzai Takahiro, Saijou Shinji, Ohnuki Yoshitsugu, Kurosawa Hiroshi, Yasunaga Masahiro, Matsumura Yasuhiro	4. 巻 14
2. 論文標題 TMEM180 contributes to SW480 human colorectal cancer cell proliferation through intra-cellular metabolic pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101186 ~ 101186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2021.101186	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安西 高廣、安永 正浩、西條 信史、花岡 慎悟、津村 遼、松村 保広
2. 発表標題 Insight into the functional role of TMEM180, a new colorectal cancer specific multi-pass membrane protein
3. 学会等名 第19回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安西 高廣、松村 保広
2. 発表標題 Structural and functional analysis of TMEM180, a new membrane protein highly expressed in colorectal cancer cells
3. 学会等名 2019年度文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Anzai, Yasuhiro Matsumura
2. 発表標題 Functional and structural analysis of a novel membrane protein TMEM180, which is highly expressed in colorectal cancer cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安西 高廣、松村 保広
2. 発表標題 大腸がん細胞で高発現する膜タンパク質TMEM180のトポロジー解析
3. 学会等名 第9回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安西 高廣、西條 信史、安永 正浩、松村 保広
2. 発表標題 TMEM180は大腸がん細胞の増殖に代謝を通して寄与する
3. 学会等名 2020年度文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiro Anzai, Masahiro Yasunaga, Yasuhiro Matsumura
2. 発表標題 TMEM180 is involved in proliferation of colorectal cancer cell line SW480 through metabolic pathways.
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安西高廣、松村保広、安永正浩
2. 発表標題 Analysis of the subcellular localization of TMEM180, which is highly expressed in colorectal cancer cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------