

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15497

研究課題名（和文）大腸がん細胞の増殖に寄与する新奇膜タンパク質TMEM180の分子機能解明

研究課題名（英文）Insight into the functional role of TMEM180, a newly identified membrane protein that contributes to colorectal cancer cell proliferation

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・研究員

研究者番号：80786137

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：大腸がんを高発現する新規腫瘍マーカーTMEM180の細胞内局在メカニズムの解明に取り組んだ。TMEM180は細胞内で一過性発現させると、ゴルジ体に局在することを明らかにした。N末端、C末端側をそれぞれ50残基まで10残基ずつ欠失させた変異体、リン酸化部位2箇所、ユビキチン化部位1箇所に変異を導入し、修飾が起きない変異体、ロイシン残基が連続している8箇所に対してロイシン残基をアラニン残基に変異させた変異体を作成したが、いずれもゴルジ体局在は変化せず、これらの領域はTMEM180の細胞内局在に直接関与しない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

新規腫瘍マーカータンパク質TMEM180に対する抗体の臨床試験が、既にスタートしている。しかし、TMEM180の細胞内における機能や意義についてはほとんど知見がない。本研究でTMEM180の細胞内局在メカニズムの解明に取り組み、ゴルジ体に局在することを明らかにした。また、その局在に関与しない領域を数多く見出した。今回得られた知見により、TMEM180タンパク質の機能解明を加速させることができる。

研究成果の概要（英文）：I tried to elucidate the subcellular localization mechanism of TMEM180, a novel tumor marker highly expressed in colorectal cancer. TMEM180 was found to localize to the Golgi apparatus when transiently expressed in cells. TMEM180 mutants were generated by deleting up to 50 residues from the N- and C-terminal side, 10 residues each, mutating two phosphorylation sites and one ubiquitination site so that no modification occurs, and mutating consecutive leucine residues to alanine residues, respectively, but none of these mutants showed any change in Golgi localization, indicating that these regions are not directly involved in the subcellular localization of TMEM180.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：膜タンパク質 大腸がん ゴルジ体 腫瘍マーカー

### 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。機能解析として、**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。また、**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、実際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ていた。しかしながら、他グループからの **TMEM180** に関する論文報告は 1 報もなく、我々が解明してきた以外に、実際にどのような機能を持っているのかは全く手がかりがなかった。

また機能解析と並行し、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ており、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。臨床応用を目指した開発が進行中であることから、さらなる **TMEM180** の機能解明が必須の状況であった。

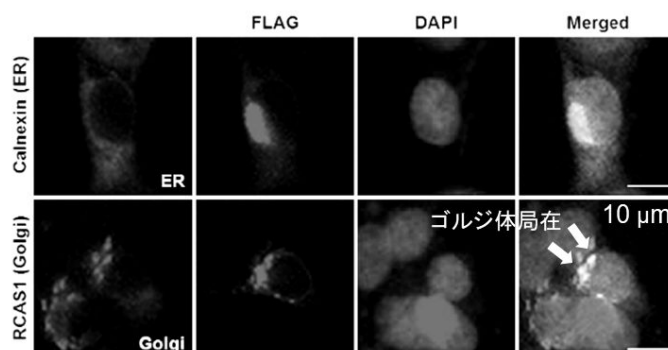
### 2. 研究の目的

**TMEM180** は背景で述べたように我々が独自に見出したこれまでに 1 報も論文報告がなかった新奇の分子であり、様々な公共データのメタ解析、網羅的解析を組み合わせたアプローチも含め、分子機能解明に取り組んできた。本研究の目的は、多角的なアプローチにより、**TMEM180** が生体内で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。

### 3. 研究の方法

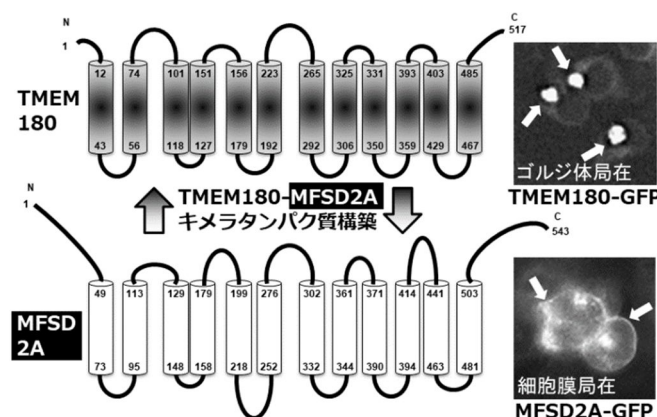
#### (1) 局在解析: **TMEM180** がどこで機能するのか

**TMEM180** を **HEK293T** 細胞に一過性発現させると、主にゴルジ体に局在することを見出していた(図1)。しかしがん細胞では **TMEM180** は細胞膜上に多く発現し、またエクソソームにも存在し細胞外に排出される。つまり、**TMEM180** は通常ゴルジ体に発現するが、がん細胞においては何らかの刺激を受け細胞膜上、あるいは小胞上へと移行すると考えられる。これまでに **N** 末端、**C** 末端側をそれぞれ 50 残基まで 10 残基ずつ欠失させた変異体を作製したが、ゴルジ体局在は変化せず、局在化シグナルの発見には至っていなかった。**TMEM180** は、予想される 2 次構造の類似性から **MFSD** (major facilitator superfamily domain-containing) ファミリー (**MFSD1-MFSD14** まで存在) の一つとして **MFSD13A** と別名がつけられている。**MFSD** ファミリーはトランスポーターであること以外機能の類似性はなく、アミノ酸配列類似性も 20% 以下である。これまでに、2 次構造予測から、**TMEM180** の 2 次構造がバクテリアの糖トランスポーター **MelB** と類似していることを見出していた。一方、同じ **MFSD** ファミリーの細胞膜上に発現するオメガ 3 脂肪酸トランスポーター **MFSD2A** も同様に 2 次構造が **MelB** と類似しているという報告がある (Quek et al., JBC 2016)。そこで、**TMEM180** と **MFSD2A** 間のアミノ酸配列相同性は 17% に過ぎな



HEK293T細胞に3xFLAG-TMEM180を一過性発現させ、抗FLAG抗体、抗Calnexin抗体(小胞体:上段)、抗RCAS1抗体(ゴルジ体:下段)による細胞免疫染色を行った

図1: **TMEM180**は主にゴルジ体に局在する



膜貫通領域を移植し、ゴルジ体局在に関わるアミノ酸を探索

図2: **TMEM180**と**MFSD2A**のキメラタンパク質作製

膜貫通領域を移植し、ゴルジ体局在に関わるアミノ酸を探索

いが、**TMEM180** に **MFSD2A** の膜貫通領域やループを移植したキメラタンパク質を作製し、**TMEM180** のどの領域が細胞膜局在、ゴルジ体局在に関与するかを決定する(図2)。これらにより、**TMEM180** の局在メカニズムを明らかにすることで、生体内での分子機能に迫る。

(2)機能解析：**TMEM180** と代謝との関連性の解析

大腸がん細胞株 **SW480** の **shRNA** による **TMEM180** 遺伝子ノックダウンした細胞株は、野生株と比較して優位に増殖が抑制されていることを見出していた。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を見出していた。そこで、両細胞株の網羅的比較解析を行うことで、**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検討する。細胞内シグナルの見地からリン酸化プロテオミクス解析、細胞内代謝の見地から、メタボロミクス解析、遺伝子発現変動の見地から、**RNA-seq** 解析に取り組む。

(3)形態学的解析：**Tmem180** ノックアウトマウスの解析

これまでに、**Tmem180** ノックアウトマウス **F0** 世代を作製しており、耐性致死および新生児致死でないことを明らかにしていた。**F2** 世代が作出できているので、野生型マウスおよびノックアウトマウスの形態学的な解析を進めることで、マウス **Tmem180** の生体内での分子機能に迫る。

4. 研究成果

**TMEM180** が細胞内のどこで機能するかを解明するため、**TMEM180-GFP** 融合タンパク質のアミノ酸変異体や欠失体を作製することによる細胞内局在解析に注力した。局在化シグナルを探索するため、**N** 末端、**C** 末端側をそれぞれ **50** 残基まで **10** 残基ずつ欠失させた変異体を作製したが、ゴルジ体局在は変化しなかった。翻訳後修飾に着目し、データベースからリン酸化部位 **2** 箇所、ユビキチン化部位 **1** 箇所に変異を導入し、修飾が起きない変異体を作製したが、ゴルジ体局在は変化しなかった。**TMEM180** にはロイシン残基が全体の **20%** 程度存在している。ロイシン残基が **2** つ続いたジロイシンモチーフと呼ばれる配列がタンパク質の細胞内局在に関与している例が知られている。そこで、**8** 箇所に対してロイシン残基をアラニン残基に変異させた変異体を作製したが、ゴルジ体局在は変化しなかった。オメガ **3** 脂肪酸の輸送にかかわり主に細胞膜に局在する **MFSD2A** と **TMEM180** は、アミノ酸配列相同性は **17%** にすぎないが、**2** 次構造が類似している。そこで、**TMEM180** のどの領域が細胞内局在に関与するかを突き止めるため、**12** 本のヘリックスの **1-6** 番目、または **7-12** 番目を **MFSD2A** の配列と置換した **MFSD2A-TMEM180** キメラタンパク質を作製した。興味深いことに、いずれのキメラタンパク質もゴルジ体局在であった。さらに、ヘリックスの **1-2** 番目、**3-4** 番目、**5-6** 番目、**7-8** 番目、**9-10** 番目、**11-12** 番目の **2** 本ずつ **MFSD2A** の配列と置換したキメラタンパク質、ヘリックスの **1-3** 番目、**4-6** 番目、**7-9** 番目、**10-12** 番目の **3** 本ずつ **MFSD2A** の配列と置換したキメラタンパク質、ヘリックスの **1-4** 番目、**3-6** 番目、**5-8** 番目、**7-10** 番目、**9-12** 番目の **4** 本ずつ **MFSD2A** の配列と置換したキメラタンパク質についても作製した。**HEK293T** 細胞に一過性発現させ、それぞれキメラタンパク質の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。しかし、**17** 種類の変異体いずれについてもゴルジ体局在は変化せず、これらの領域は **TMEM180** のゴルジ体局在に関与しないことを明らかにした。

大腸がん細胞株 **SW480** の **TMEM180** 遺伝子ノックダウン細胞株と野生型株の、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、一酸化窒素合成系に関わる遺伝子群に変動があることが見いだされ(図3)、**NOS2** や **NOS3**、**PDE2A** や **PDE5A** が **TMEM180** ノックダウン細胞で有意に低下していることが見いだされた。この結果は、**Translational Oncology** 誌に掲載された。

**F2** 世代 **Tmem180** ノックアウトマウスについて、野生型マウスとの比較解析を進めた。**10** 週齢のマウスについて血液生化学の比較を行ったが、雌雄とも差異はみられなかった。体重変化や形態変化に着目して **Tmem180** ノックアウトマウスの長期的な飼育と観察を行い、プレリミナリーではあるが、高週齢のオスノックアウトマウスにおいて、体重増加の傾向が見られており、肝臓に脂肪変性がみられる個体があることを見出した。

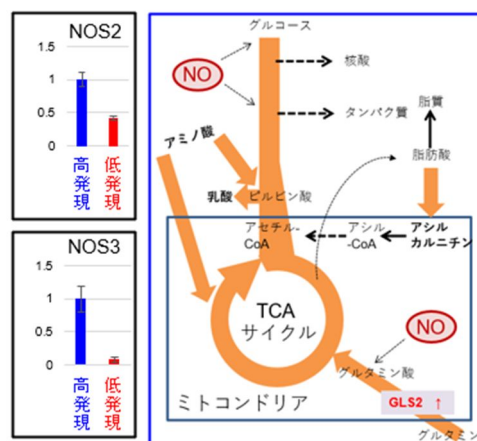


図3: **TMEM180** はがん細胞の増殖に代謝を通じて関与する

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

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2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、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

1. 発表者名 安西高廣、安永正浩
2. 発表標題 Analysis of the subcellular localization mechanism of novel tumor marker TMEM180 based on chimeric protein with MFSD2A
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------