

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700375

研究課題名（和文）神経膠腫浸潤における腫瘍細胞と神経細胞の相互応答の分子基盤

研究課題名（英文）The molecular basis of interactions between cancer cells and neurons in glioma invasion

研究代表者

周尾 卓也（SHUO TAKUYA）

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：90399006

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経膠腫細胞の浸潤先端分子と神経細胞の表層分子との相互応答を解析することで、神経膠腫の治療標的探索へ向け糸口を得ようとした。研究期間内において、膜型メタロプロテアーゼ MT-MMP と脳特異的膜型 EGF ファミリー分子ニューログリカン C との作用点を明らかにした。また、標的基質の認識に影響を与える MT-MMP 修飾糖鎖の組成および結合部位を簡便かつ高感度に解析する新規の MALDI 質量分析法を確立した。

研究成果の概要（英文）：To understand the molecular basis of interactions between glioma and neurons, we investigated the role of MT-MMP/neuroglycan C axis. In this study, we found that a recombinant MT-MMP catalytic domain could actually cleave full-length neuroglycan C in two fragments. In addition, we developed a new MALDI-mass spectrometric technique to analyze glycopeptides in a highly sensitive manner, and then we used the method to evaluate glycosylation status of MT-MMP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学，神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳腫瘍，神経膠腫細胞，神経細胞，メタロプロテアーゼ，プロテオグリカン，糖鎖，質量分析，MALDI（マトリックス支援レーザー脱離イオン化法）

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は周囲の脳組織にしみ込むように広がる特有の性質のために根治が困難である。この状況を克服して新たな治療法を開発するためには、神経膠腫細胞の浸潤機構を詳細に理解することが必須である。

これまで神経膠腫浸潤の分子機構に関す

る研究は、腫瘍細胞が発現する分子とその刺激により惹起される腫瘍細胞内の情報伝達系を対象とし行われてきた。しかし、神経膠腫細胞が神経細胞の細胞体や樹状突起に沿って浸潤していく動態を説明する分子基盤は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経膠腫細胞の浸潤先端分子と神経細胞の表層分子との相互応答を解析することで、神経膠腫の治療標的探索へ向け糸口を得ることである。特に申請者らが新規に見出した膜型メタロプロテアーゼ MT-MMP/脳特異的膜型 EGF ファミリー分子ニューログリカン C (NGC) /受容体型チロシンキナーゼ ErbB 受容体経路の解析から神経膠腫浸潤の分子機構の一端を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 膜型メタロプロテアーゼ MT-MMP と脳特異的膜型 EGF ファミリー分子 NGC との相互作用を明らかにするために、MT-MMP 触媒領域の組換え酵素とラット脳から調製した NGC あるいは NGC 合成ペプチドを試験管内で混合し、エドマン分解法および質量分析で両分子の作用点を解析した。

(2) 膜型メタロプロテアーゼ MT1-MMP による標的基質の認識には、MT1-MMP を修飾する糖鎖の役割が重要であることが考えられた。そこで、MT-MMP に結合した糖鎖の詳細を明らかにするために、まず極微量タンパク質に付加された糖鎖を簡便に解析する質量分析の手法を確立し、次に実際に腫瘍細胞から回収した MT1-MMP の糖鎖解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 膜型メタロプロテアーゼ MT-MMP と脳特異的膜型 EGF ファミリー分子 NGC との作用点

ラット胎仔由来神経細胞の初代培養系では全長型 NGC は細胞層に、低分子量の可溶性 NGC は培養上清に回収されること、可溶性 NGC の遊離はメタロプロテアーゼ阻害剤により抑制されることが明らかになっていた。

そこで今回、ラット脳から精製した NGC に MT-MMP 触媒領域の組換え酵素を作用させると、NGC は二つのタンパク質断片に分断された。エドマン分解法および質量分析から MT-MMP による NGC の切断部位は、NGC の EGF 領域の N 末端側であることが判明した。また、合成ペプチドをもちいた解析から NGC の切断点はラット、マウス、ヒトで種を超えて保存されていることを確認した。

以上から、NGC は神経細胞において細胞膜貫通型として発現した後に、MT-MMP によって切断されることで EGF 領域を細胞膜表面に露出することが考えられた。今後は、細胞をもちいた実験系で、神経膠腫細胞の MT-MMP が神経細胞の NGC に作用すること、神経細胞表層に露出した NGC の EGF 領域が腫瘍細胞の ErbB 受容体を活性化することを解析する予定である。

(2) 膜型メタロプロテアーゼ MT1-MMP の糖鎖構造解析

MT1-MMP による標的基質の認識には、MT1-MMP を修飾する糖鎖の役割が重要であることが考えられた。そこで、MT1-MMP に結合した糖鎖の詳細を明らかにするために、まず

- ① 極微量タンパク質に付加された糖鎖を簡便に解析する質量分析の手法を確立し、次に
- ② 実際に腫瘍細胞から回収した MT1-MMP の糖鎖解析を実施した。

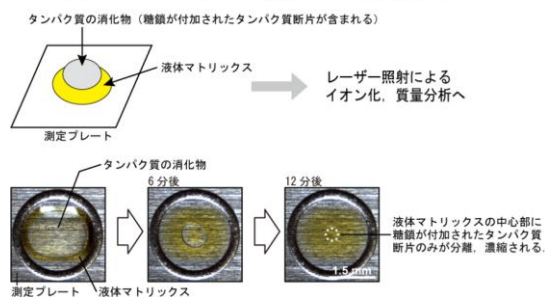
① 液体マトリックス 3AQ/CHCA を用いた新規の MALDI 質量分析法

タンパク質を修飾する糖鎖はタンパク質の機能を制御する役割を担っている。糖鎖の異常はさまざまな病気や病態の変化を引き起こすために、それぞれのタンパク質に対して加えられた固有な糖鎖の実体を明らかにすることは極めて重要である。

近年、タンパク質に付加された糖鎖を解析する手段として MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization;マトリックス支援レーザー脱離イオン化) 質量分析が不可欠となっている。MALDI 質量分析では、糖鎖の組成だけでなく、タンパク質との結合部位も同定することができる。しかし一方で、解析には、対象とするタンパク質の分解産物からあらかじめ単離した糖ペプチドを試料とする必要があり、技術的には困難が多いのが現状であった。

液体マトリックス 3AQ/CHCA を用いる新規の手法では、糖ペプチドが含まれるタンパク質の分解産物をそのまま直接にマトリックスの上に滴下する。その表面で試料中の水分が徐々に蒸発することで、中心部に親水性の糖ペプチドが濃縮され、周辺部にはその他の未修飾ペプチドが残る (図 1)。3-アミノキノリンと α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸からなる 3AQ/CHCA は真空中においても液状の性質を保つことから、質量分析計内でその中心部にレーザーを照射することにより糖ペプチドのみのイオン化が実現できる。

図 1. 液体マトリックスを用いた新規の MALDI 質量分析法



本法では、測定用のプレート上で試料となる糖ペプチドをタンパク質の分解産物から

分離・濃縮できるために、糖ペプチドの質量分析が容易になるとともに、高感度解析が可能となった。

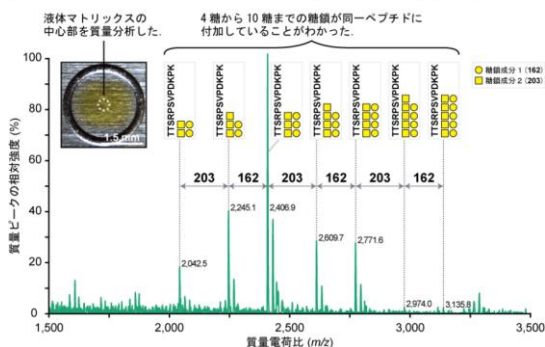
② がん細胞が発現する膜型メタロプロテアーゼ MT1-MMP の糖鎖

これまでに、MT1-MMP に付加した糖鎖が酵素の活性や安定性、代謝回転に関与することが報告されていたが、その糖鎖の組成や結合部位の詳細は不明であった。

質量分析に供する MT1-MMP はヒト線維肉腫株 HT1080 細胞の可溶化物から免疫沈降で回収し、SDS ポリアクリルアミドゲルで分画した。続いて、ゲル内でトリブシン消化し、その一部（糖ペプチドと未修飾ペプチドが含まれる水溶液）を 3AQ/CHCA の表面に滴下した。

マトリックスの中心部の質量分析からは、付加した単糖の数の相違一質量にして 162（ヘキソース）あるいは 203（N-アセチルヘキソサミン）の差異をもつ 7 つのイオンピークに相当する質量スペクトルを明確に検出することができた（図 2）。

図 2. がん細胞由来の MT1-MMP タンパク質に付加した糖鎖の多様性



多段階分析 (MSⁿ) が可能な質量分析計では特定のイオンを捕捉・断片化し、その内部構造を繰り返し解析することができるが、上述の 7 つのピークの場合は、MS² および MS³ の結果から同一の MT1-MMP ペプチド (²⁹⁹TTSRPSVPDKPK³¹⁰) に 4 糖から 10 糖までの糖鎖成分が付加した状態を反映していることが明らかとなっている。また、以前に推測されていたアミノ酸残基 (Thr²⁹⁹, Thr³⁰⁰, および Ser³⁰¹) に加え、新たな糖鎖付加部位 (Ser³⁰⁴) も同定することができている。

一方、マトリックス周辺部から未修飾ペプチドが多数検出され、全体で MT1-MMP アミノ酸配列の 50% 近くを特定することができた。

以上のように、3AQ/CHCA をマトリックスとした新規の手法では、細胞を出発材料として生化学的に回収したタンパク質においても糖鎖の詳細を調べることができ、これまでに精査が困難であった糖鎖の不均一性も把握できるようになった。特筆すべきことに、本方法は、膜タンパク質の分画で常用される SDS

ポリアクリルアミドゲルからの試料に適応でき、MT1-MMP の場合は数十ナノグラムのゲル内消化物で明瞭な質量スペクトルが得られている。

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 2 件)

① Shuo T, Koshikawa N, Hoshino D, Minegishi T, Ao-Kondo H, Oyama M, Sekiya S, Iwamoto S, Tanaka K, Seiki M
Detection of the heterogeneous O-glycosylation profile of MT1-MMP expressed in cancer cells by a simple MALDI-MS method
PLoS One 査読有 7 巻 2012 e43751
DOI: 10.1371/journal.pone.0043751

② Nagano M, Hoshino D, Koshiba S, Shuo T, Koshikawa N, Tomizawa T, Hayashi F, Tochio N, Harada T, Akizawa T, Watanabe S, Handa N, Shirouzu M, Kigawa T, Yokoyama S, Seiki M
ZF21 protein, a regulator of the disassembly of focal adhesions and cancer metastasis, contains a novel noncanonical pleckstrin homology domain
J Biol Chem 査読有 286 巻 2011 31598-31609
DOI: 10.1074/jbc.M110.199430

[学会発表] (計 5 件)

① 周尾卓也, 液体マトリックス 3AQ/CHCA を用いた新規 MALDI 質量分析法による膜型プロテアーゼ MT1-MMP の O-結合型糖鎖修飾の解析
第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 15 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)

② Takuya Shuo, Detection of the heterogeneous O-glycosylation of MT1-MMP expressed in cancer cells by a simple MALDI-MS method
19th International Mass Spectrometry Conference, 2012 年 9 月 16 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

③ 周尾卓也, Detection of the heterogeneous O-glycosylation of MT1-MMP expressed in cancer cells by a simple MALDI-MS method
第 12 回東京大学生命科学シンポジウム,

2012年6月30日, 東京大学 (東京都文京区)

- ④ Takuya Shuo, Glycan characterization of MT1-MMP, an invasion-promoting metalloproteinase, by MALDI-digital ion trap mass spectrometry
Seventh General Meeting of the International Proteolysis Society, 2011年10月19日, Hilton San Diego Resort and Spa (San Diego/USA)
- ⑤ 周尾卓也, MALDI 質量分析における液体マトリックス 3-AQ/CHCA を用いた細胞膜貫通型メタロプロテアーゼ MT1-MMP の O-結合型糖鎖修飾の解析
第59回質量分析総合討論会, 2011年9月14日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市)

[図書] (計1件)

周尾卓也, 清木元治, 鳥居薬品株式会社「感染・炎症・免疫」, 液体マトリックス MALDI 質量分析法による癌関連糖鎖修飾検出, 2013年, 第43巻第1号 59-62

[その他]

- ① 東京大学[広報・情報公開] 記者発表一覧
http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_240823_j.html
- ② 東京大学ク・ローハ・ル COE 研究成果一覧
<http://www.u-tokyo.ac.jp/fiw.st/coe/japanese/achievements/category1/base3/report03-03.html>
- ③ 東京大学医科学研究所 発表論文解説
http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/research/papers/post_42.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

周尾 卓也 (SHUO TAKUYA)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号: 90399006