

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23701084

研究課題名（和文） がん細胞の薬剤耐性診断に向けた絶対定量プロテオーム解析基盤の構築

研究課題名（英文） Development of molecular diagnosis system of cancer drug resistance using absolute quantitative proteomics

研究代表者

武森 信暁 ( Takemori Nobuaki )

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・講師

研究者番号：40533047

研究成果の概要（和文）：

本研究では、コムギ無細胞タンパク質合成系と定量質量分析法を組み合わせ、がん細胞の薬剤耐性に関連するプロテオーム成分の変動を定量化するための分子診断システムを開発した。各種がん関連タンパク質の絶対量を測定するために、定量の内部標準となる安定同位体標識タンパク質をコムギ無細胞系により合成し、さらに合成したタンパク質のトリプシン消化物を用いてトリプル四重極型質量分析計によるマルチプルリアクションモニタリングアッセイを構築することに成功している。現在、微量生検試料を対象とする絶対定量解析の実現にむけて、定量解析基盤の高感度化を進めている。

研究成果の概要（英文）：

We have established a molecular diagnosis system for quantifying proteomic alterations of cancer drug resistance using wheat germ cell-free protein synthesis system and quantitative mass spectrometry. Stable isotope (SI) labeled recombinant proteins as an internal standard for protein quantification were *in vitro* synthesized using wheat cell-free synthesis system. We selected a set of digested peptides for each protein based on their ionization efficiency and established multiple reaction monitoring (MRM) assay using triple quadrupole mass spectrometer. We are currently constructing an absolute quantitative platform of human biopsy samples by combining MRM assay and synthesized SI-labeled protein library, which allows an accurate measurement of the absolute amount of targeted proteins from a limited amount of tissue samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：薬剤耐性、絶対定量プロテオミクス、定量MRM法、

小麦無細胞タンパク質合成系

### 1. 研究開始当初の背景

近年、質量分析法を技術基盤とする定量プロテオミクス分野では、同位体標識タンパク質を内部標準に用いるタンパク質の絶対定量法(Absolute SILAC 法や PSAQ 法)が提案され、その有効性が証明されている (Hanke S et al. J Proteome Res. 2008, Dupuis A et al. Proteomics 2008)。生体内タンパク質の発現量を絶対的に定量することの意義は極めて大きく、例えばバイオマーカー診断では、生検試料中のマーカータンパク質の絶対量を測ることにより疾患の進行状態が明らかになる。また発現変動を解析する際にも、相対定量解析に比べて定量データの信頼性が格段に向上し、相対定量では不可能であった多点測定などが可能となる。

これまでに開発された質量分析によるタンパク質の定量法は、①安定同位体で標識したアミノ酸を培地に添加し、培養細胞で発現したタンパク質を安定同位体で標識する SILAC 法や、②細胞から抽出したタンパク質を同位体標識試薬で修飾した後、解析をおこなう iCAT 法や iTRAQ 法が知られている。しかし、これらの方法はあくまで対照試料との比較定量解析に限定されており、さらに SILAC 法は培養細胞系にしか適用できない。現在の所、本研究で採用する濃度既知の安定同位体標識タンパク質を内部標準に用いる方法のみが、組織試料における発現タンパク質の絶対定量解析を可能にしている。このため、定量プロテオミクス分野において、高品質な安定同位体標識タンパク質のライブラリー構築が求められているが、従来のタンパ

ク質合成法では安定同位体標識タンパク質を大規模に合成することは極めて困難であることから実現していない。申請者のグループは、コムギ無細胞タンパク質合成技術を活用して、質量分析用の安定同位体標識タンパク質をハイスループットに合成することに成功している。無細胞合成系では任意のアミノ酸成分の高効率なラベル化が可能であり、従来の合成法では困難であった膜貫通型タンパク質も含む、プロテオームワイドなタンパク質合成を実現することができる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) がん関連タンパク質に特化した安定同位体標識タンパク質ライブラリー (Stable isotope labeled recombinant protein library: SIRPL) を新たに構築し、(2) ライブラリータンパク質を内部標準に用いた独自の高感度質量分析システムを確立することである。解析システムの高感度化は、培養系から微量生検試料へ段階的に進める。さらに、本開発システムによる抗がん剤耐性診断の実現に向けた情報基盤の整備もおこなう。

### 3. 研究の方法

#### (1) 安定同位体標識タンパク質ライブラリーの構築

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成技術を用いて、安定同位体標識タンパク質ライブラリー (OncoSIRPL) の作成を行う。同位体標識タンパク質の作成には、安定同位体で標識した L-アミノ酸リジン (L-Lys- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ ) とア

ルギニン (L-Arg-<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>) を使用する。全ての合成タンパク質は、内部標準用試料として -80 度で保存・管理を行う。ライブラリー化が終了した安定同位体標識タンパク質のトリプシン消化物を対象にして、MS 解析を行い、消化ペプチド断片のイオン化効率を測定し、各タンパク質に固有のペプチド配列 (Proteotypic Peptide: PTP) を決定する。さらに消化ペプチド試料を用いて、タンデム質量分析 (MS/MS) によるフラグメントイオン情報の収集を行う。以上の解析により得られた各種質量分析情報 (PTP 情報や、MS/MS 解析によるフラグメントプロファイルなど) に基づいてデータベースの構築を行う。

#### (2) 定量プロテオミクスによる培養細胞系の発現プロファイリング解析

*In vitro* でのモデル解析として、ヒト培養がん細胞を対象に、各種抗がん剤による耐性株と非耐性株のプロテオーム成分を比較定量解析する。新規の抗がん剤耐性関連タンパク質や耐性株に特異的な翻訳後タンパク質修飾の探索を、二次元ゲル電気泳動法やショットガンプロテオミクス法を用いて行い、培養系において抗がん剤耐性株のプロテオーム特性を明らかにし、耐性診断の標的分子を決定する。

#### (3) Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を利用したプロテオームプロファイリングシステムの構築

質量分析による微量診断技術の確立に向けて、培養系で行った大規模解析からモニタリングに最適な標的タンパク質を選択し、高感度 MRM 解析による絶対定量解析システムの構築を行う。最大 300 分子に対する MRM チャンネルを構築し、耐性マーカーを経時的にモニタリングする。解析に必須となる MRM チャンネ

ルの設定には独自に構築した PTP データベースを用いる。

#### 4. 研究成果

平成 23 年度は、OncoSIRPL 構築に向けて安定同位体標識タンパク質の合成基盤を確立した。イオン化効率の高いペプチド配列を連結した人工合成遺伝子 (QConCAT) による内部標準タンパク質合成法を導入し、各種がん関連タンパク質の大規模合成およびライブラリー化を現在進めている。今までに合成したタンパク質は 97% 以上の効率で安定同位体標識されており、質量分析計を用いた定量分析の内部標準に十分使用可能な品質であった。合成が終了したタンパク質に関しては、定量 MRM アッセイのチャンネル構築に必要となる MS/MS スペクトル情報の取得を終了している。また、耐性診断の標的分子を新たに探索することを目的として、ヒト培養膀胱がん細胞を対象に、シスプラチンおよびゲムシタビン耐性株と非耐性株のプロテオーム成分の比較定量解析をおこなった。二次元ゲル電気泳動と LC-MS による比較発現プロファイル解析により、耐性獲得に伴い発現量の変動するマーカータンパク質候補を複数検出することに成功している。

平成 24 年度は、OncoSIRPL から作成した MRM チャンネル情報とトリプル四重極型質量分析計を用いて、絶対定量解析に向けた MRM アッセイシステムを構築した。システム構築後に、安定同位体標識タンパク質のトリプシン消化物を対象として MRM 解析をおこない、設定した MRM チャンネルの有効性を検証した。その結果、がん関連タンパク質を標的として 1,000 種類以上のトリプシン消化ペプチドに関する MRM トランジション情報を取得することに成功している。また質量分析計のフロント LC によるペプチド分離作業を高速化する

ために、高圧型 LC システムと高速分離用カラムカートリッジを導入し、従来の 4 倍の流速 (1,200nl/min) によるハイスループット MRM 解析にも成功している。現在、スループット化した MRM システムを用いて、健常者の尿および血清試料を対象とした絶対定量プロテオーム解析を進めており、微量タンパク質成分 (ng/ml レベル) の高感度検出に成功している。さらなる高感度化を目的として、体液試料中に含まれる主要タンパク質成分の抗体カラムによる除去処理を現在検討している。今後は新たな耐性診断マーカー候補タンパク質の合成・ライブラリー化を進め、微量生検試料からのマーカー検出に向けて解析システムの最適化をおこなう予定である。

#### 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 1 件)

1. Miura N, Takemori N, Kikugawa T, Tanji N, Higashiyama S, Yokoyama M. Adseverin: a novel cisplatin-resistant marker in the human bladder cancer cell line HT1376 identified by quantitative proteomic analysis. *Mol Oncol.*, 6, 311-322, 2012, 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

1. 武森文子、武森信暁、東山繁樹 : SIRPLDB : 安定同位体標識リコンビナントタンパク質ライブラリーの定量プロテオーム解析への活用に向けた情報データベースの構築 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、マリンメッセ福岡、福岡

2. 武森信暁、武森文子、青島正人、田中ゆき、東山繁樹 : A high-throughput targeted approach for the absolute quantification of human and mouse proteome alterations. 第 85 回 日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日、マリンメッセ福岡、福岡

3. Takemori N. Accelerating quantitative proteomics research with wheat germ cell-free protein synthesis system. Protein Island Matsuyama International Symposium 2012、2012 年 9 月 25 日、松山全日空ホテル、愛媛

4. Takemori N, Takemori A, Higashiyama S. Absolute quantitative analysis of urinary proteome alterations using wheat germ cell free protein synthesis and MRM mass spectrometry. 11th HUPO World Congress, September 13, 2012, Hynes Convention Center, Boston, U.S.A

5. Takemori N, Takemori A, Matsuoka K, Matsushita N, Takeda H, Sawasaki T, Endo Y, Higashiyama S. SIRPL: Construction of a stable isotope-labeled recombinant protein library for the absolute quantitative analysis of mouse membrane proteome. The 60th American Society for Mass Spectrometry (ASMS) Conference, May 24, 2012, Vancouver Convention Center, Vancouver, Canada

6. 武森信暁、武森文子、松岡和弘、松下夏樹、澤崎達也、遠藤弥重太、東山繁樹 : 安定同位体標識リコンビナントタンパク質ライブラリーを用いたマウストランスメンブレンプロテオームの絶対定量測定、第 84 回日本生

化学会大会、2011年9月23日、国立京都国際会館、京都

7. Takemori N, Takemori A, Matsuoka K, Matsushita N, Sawasaki T, Endo Y, Higashiyama S. An absolute quantification method of mouse transmembrane proteome using a combination of wheat cell-free synthesis and MRM mass spectrometry. 10th HUP0 World Congress, September 6, 2011, PALEXPO, Geneva, Switzerland

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武森 信暁 (Takemori Nobuaki)

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・講師

研究者番号：40533047

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし