

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590301

研究課題名(和文) エイズの細胞侵入蛋白を利用したガン細胞マスターシグナル分子の解明

研究課題名(英文) Identification of master molecules in signal transduction of canceled cells using TAT protein

研究代表者

水上 洋一 (MIZUKAMI, Yoichi)

山口大学・大学研究推進機構・教授

研究者番号：80274158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞レベルでがん化に関与するタンパク質を同定するために、TATタンパク質を用いたタンパク質導入法とミトコンドリア活性測定による新しいスクリーニング法を確立した。この手法を用いてエストロゲン非依存性乳がん細胞MCF-7より分離した3つのPeak A、B、Cについてミトコンドリア活性の測定を行ったところ、Peak Cにおいてミトコンドリア活性の低下が確認された。質量分析計による解析の結果、Peak Cに含まれるタンパク質をHistone H4と同定した。Peak AおよびPeak Bについてはタンパク質精製の途中で活性が消失した。今後抽出タンパク量を増やし、感度を上げる必要がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have established a new screening method based on protein introduction method using the TAT protein to identify the proteins involved in carcinogenesis at the cellular level. In three Peak were isolated from estrogen-dependent breast cancer cells MCF-7, and mitochondrial activity in the PeakC was decrease. Based on the analysis by mass spectrometry, a protein in the Peak C was identified as Histone H4, which may inhibit mitochondrial activity. The future is going examined whether to suppress how to mitochondrial activity is Histone H4. The activities were disappeared in PeakA and B during protein purification. Dephosphorylations of the proteins could be caused during the protein separation. Therefore, increases of protein contents and assay sensitivity would be requested for the next experiments.

研究分野：病態生理学

キーワード：がん 蛋白精製 エイズ

1. 研究開始当初の背景

(研究の学問的背景) 我が国の死因第1位であるがんは、染色体に様々な変異が発生し、細胞増殖や細胞死などのシグナル伝達分子活性が異常に上昇する(あるいは抑制される)ことが知られている。特定のシグナル伝達分子の活性化が下流のシグナルを制御しており、がん細胞の増殖に決定的な役割を果たしている。これらのマスターシグナル伝達分子の同定は、死因第1位であるがんの根本的に治療法として最も注目を集めている。最近では、次世代シーケンサーと Exon アレイと組み合わせてアミノ酸配列をコードしている部分の DNA 配列を全て解読する試みが盛んに行われている。例えば膵臓がん 10 例から解析した結果では、すべての症例で重要なシグナル伝達分子 20 種類にアミノ酸変異が検出されておりどの変異ががん細胞の増殖を直接的に制御しているのか不明である。がん細胞は、最初に遺伝子変異が発生し増殖が促され、増殖の促進が複製過程で様々な変異や欠失が引き起こされている。このため、遺伝子配列を比較してもがん増殖を制御する分子の同定は不可能である。

2. 研究の目的

申請者が開発した独自のシステムを駆使してモデル細胞として乳がん細胞のタンパク質を分離精製後、正常細胞に導入し、がん化のマスターシグナル伝達分子を解明するシステムを確立する。難治性乳がんの臨床分離細胞を用いて実際にがん化制御するマスター分子を同定する。質量分析計を用いて同定されたシグナル分子の翻訳後修飾を解明し、がん化のメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(細胞培養) モデル細胞として乳がん細胞株の MCF-7 を用いる。

(イオン交換カラムによる精製) 蛋白質の分離が最も効果的に行えるように pH、カラム流速、塩濃度を確立した条件設定で行う。

(フラクションの前処理と濃縮) イオン交換カラムで分離したフラクションのうち、500ul を限外ろ過カラムで濃縮した後、そのまま緩衝液を加え、3 回の遠心操作を繰り返し、脱塩を行う。

(HIV TAT 蛋白質導入ドメインの精製) HIV の TAT 配列の PTD (protein transduction domain 36bp 合成 DNA) の配列に His タグ配列を挿入した大腸菌発現ベクターを取得する。この発現ベクターを BL21 株で低温蛋白質誘導させ、蛋白を合成する。

(細胞インピーダンス測定によるアッセイ) これまでの確立した方法に従って細胞の増殖活性を測定する。

(ゲルろ過カラムによる精製) 活性のあるフラクションを電気泳動でバンドを確認し、バンドが離れている場合はゲルろ過カラム、近い場合は、疎水カラムを用いる。

(フラクション蛋白質の同定) これまでに確立した方法で蛋白質の同定を行う。

(難治性乳がんサンプルの分離培養) 臨床サンプルから転移や再発乳がんのサンプルを用いて、これまでに確立した技術で培養細胞を調整する。つまり、コラゲナーゼ B、D およびプロテアーゼ XIV を用いて細胞を分散し、コラーゲンコートしたシャーレで培養する。

4. 研究成果

陰イオン交換カラムによる抽出タンパク質の分離結果

エストロゲン依存性乳がん細胞 MCF-7 より抽出したタンパク質 24 mg を強陰イオン交換カラム HiTRAP HQ で分離し、分離したフラクションについて電気泳動後 CBB 染色を行い、バンドを検出した。その後、分離し

たフラクションの活性を細胞レベルで確認するために、エストロゲン非依存性乳がん細胞 HCC38 にタンパク質導入を行った。

エストロゲン依存性乳がん細胞より抽出したタンパク質 24 mg を強陰イオン交換カラム HiTRAP HQ にインジェクションし、塩濃度を上げる事でカラムに吸着させたタンパク質を溶出させた。各ゲルの左端に分子量マーカーを流し、その横に分離前のタンパク質を流している。後述のミトコンドリア活性の測定結果より 3 つの Peak A,B,C について検討を行った。

抽出タンパク質分離フラクション導入後のミトコンドリア活性

エストロゲン依存性乳がん細胞よりタンパク質を抽出し、陰イオン交換カラムを用いて分離を行った。分離したフラクション 20 番から 41 番について、エストロゲン非依存性乳がん細胞 HCC38 へタンパク質導入を行った。48 時間培養を行い、Hoechst と JC-1 を用いて細胞数とミトコンドリア活性を測定した。JC-1 によるミトコンドリア活性の測定の結果、ミトコンドリア活性の弱い上昇を確認した。この変化を引き起こした 26 番と 27 番のフラクションを Peak A とした。

Hoechst による核染色を用いて細胞数を測定した。ミトコンドリア活性測定の結果と細胞数の測定結果を利用して、細胞あたりのミトコンドリア活性の測定を行った。その結果、細胞あたりのミトコンドリア活性の弱い上昇を確認した。この変化を引き起こした 31~34 番のフラクションを Peak B とした。また細胞あたりのミトコンドリア活性の顕著な低下を確認し、この変化を引き起こした 37 番と 38 番のフラクションを Peak C とし

た。Peak A はトータルのミトコンドリア活性が上昇しており、細胞あたりのミトコンドリア活性は上昇していないことから、細胞数の増加が考えられる。Peak B は細胞あたりのミトコンドリア活性は上昇しているが、細胞数は増加していないため、これから細胞増殖を起こす段階であると考えられる。Peak C は細胞増殖を起こしているにもかかわらず、細胞あたりのミトコンドリア活性は大きく低下している。これは Warburg 効果である可能性があり、Peak C はがんに関与するタンパク質を含んでいる可能性がある。各フラクションの電気泳動の結果より、Peak A および Peak B はタンパク質がクルードであったため次にゲルろ過カラムによる分離を行った。Peak C は単一のバンドに分離されていたため、バンドを切り出し質量分析計によるタンパク質の同定を行った。

質量分析計による Peak C フラクションのタンパク質の同定

Peak C フラクションの電気泳動後、CBB 染色を行ったゲルよりバンドを切り出し、LC-MS 装置 QSTAR XL (AB sciex) で分析し、データベース Protein pilot (AB sciex) で解析を行い、ペプチドマスマッピングのデータを得た (Table.1)。その結果、Peak C フラクションに含まれるタンパク質を Histone H4 と同定した。

ゲル濾過カラムによる Peak A および Peak B の分離結果

Peak A の濃縮タンパク質 1.08 mg と Peak B の濃縮タンパク質 0.5 mg を、それぞれゲル濾過カラムを用いて分離した。溶出したフラクションについて電気泳動後、CBB 染色を

行いバンドを検出した。Peak A をゲル濾過カラムで分離したフラクションを電気泳動後、CBB 染色でバンドを検出した。Peak B 分離フラクションについても同様にバンドを検出した。

Peak A 分離フラクション導入後のミトコンドリア活性

Peak A フラクションを濃縮し、ゲルろ過カラムで分離を行った。分離したフラクション番号 3 番~14 番までのフラクションをエストロゲン非依存性乳がん細胞 HCC38 にタンパク質導入した。48 時間培養を行い、Hoechst と JC-1 を用いて細胞数とミトコンドリア活性を測定した。その結果、今回の測定ではミトコンドリア活性の上昇は検出されなかった。分離の途中でタンパク質の分解、もしくは脱リン酸化が起こり活性が消失した可能性がある。

Peak B 分離フラクション導入後のミトコンドリア活性

Peak B フラクションを濃縮し、ゲルろ過カラムで分離を行った。分離したフラクション番号 8 番~17 番までのフラクションをエストロゲン非依存性乳がん細胞 HCC38 にタンパク質導入した。48 時間培養を行い、Hoechst と JC-1 を用いて細胞数とミトコンドリア活性を測定した。その結果、今回の測定ではミトコンドリア活性の上昇は検出されなかった。分離の途中でタンパク質の分解、もしくは脱リン酸化が起こり活性が消失した可能性がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

- Okamoto, M. and Mizukami, Y., GPER negatively regulates TNFa-induced IL-6 production in human breast cancer cells via NF-kB pathway, *Endocrine J.*, (2016) [Epub ahead of print] 査読有
DOI:10.1507/endocrj.EJ15-0571
- Mimura, Y., Kelly, R.M., Unwin, L., Albrecht, S., Jefferis, R., Goodall, M., Yoichi Mizukami, Y., Mimura-Kimura, Y., Matsumoto, T., Ueoka, H., Pauline M Rudd, P.M., Enhanced sialylation of a human chimeric IgG1 variant produced in human and rodent cell lines, *J. Immunol Methods*, 428, 30-36 (2016). Epub 2015 Nov 26. 査読有
DOI:10.1016/j.jim
- Utada, K., Ishida, K., Tohyama, S., Urushima, Y., Mizukami, Y., Yamashita, A., Uchida, M., Matsumoto, M., The combination of insulin-like growth factor 1 and erythropoietin protects against ischemic spinal cord injury in rabbits, *J. Anesthesia*, 29, 741-748 (2015). Epub 2015 May 24 査読有
DOI:10.1007/s00540-015-2031-y
- 狩生徹、井上雄太郎、水上洋一、半導体マイクロチップ対応次世代シーケンサーを用いたがん関連遺伝子の解析、*山口医学* 63 (4) 253-256 (2014) 査読有
DOI:10.2342/ymj.63.253
- Akiyoshi Y., Izumi T., Oda Y., Mizukami Y., Tsuruta R., Maekawa T., Analysis of cerebrospinal fluid proteins reveals association of calbindin 1 concentrations with neurological outcome in patients resuscitated from cardiopulmonary

arrest: A proteomics based pilot study, *Bulletin of Yamaguchi Med.*, 61, 23-35 (2014) 査読有
URL: <http://www.lib.yamaguchi-u.ac.jp/yunoca/handle/A050061000301>

Nakashima, T., Ohkusa T., Yoshida M., Lee J.-K., Mizukami Y., Yano M., Alterations in cardiac β -catenin precede connexin gap junction remodeling in cardiomyocytes exposed to rapid electrical stimulation, *Am. J. Physiol. (Heart and Circulatory Physiology)*, 306, H1324-1333 (2014), Epub 2014 Mar 7. 査読有
DOI: 10.1093/eurheartj/ehz310.P4978

〔学会発表〕(計 16 件)

渡邊健司、坂口修一、山本滋、岡正朗、水上洋一、次世代シーケンサーを用いたエストロゲン受容体依存性乳がんの原因遺伝子変異の探索、山口大学医工学シンポジウム、2016.3.23、山口大学(山口県・宇部市)

渡邊健司、坂口修一、山本滋、岡正朗、水上洋一、次世代シーケンサーを用いた ER 高発現乳がんにおける体細胞変異の同定、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回生化学会総会、2015.12.1-4、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Kiran Pandey, Yoichi Mizukami, Kenji Watanabe, Shiti Sakaguti, and Hiroya Kadokawa, Deep Sequencing of Transcriptomes of Anterior Pituitary before and after Ovulation in Japanese Black Heifers、第 108 回日本繁殖生殖学会、2015.9.16-20、宮崎大学(宮崎県・宮崎市)

渡邊健司、坂口修一、山本滋、岡正朗、水上洋一、SOLiD5500 を用いた乳がんゲノムのエクソーム解析、第 56 回日本生化学会中国四国支部例会、2015.5.29-30、島根大学(島根県・松江市)

三村雄輔、水上洋一、三村由香、松本常男、高シアル化 IgG の作成とその ADCC 活性、第 56 回日本生化学会中国四国支部例会、2015.5.29-30、島根大学(島根県・松江市)

渡邊健司、坂口修一、坂井勇介、山本滋、岡正朗、水上洋一、次世代シーケンサーを用いた標的遺伝子の乳癌変異解析、山口大学生命医工学センター創設記念第 1 回シンポジウム、2014.12.26、山口大学(山口県・宇部市)

宇留島裕、泉友則、渡邊健司、濱野公一、水上洋一、エイズ侵入タンパク質を用いた乳癌発症因子のハイスループットスクリーニング、山口大学生命医工学センター創設記念第 1 回シンポジウム、2014.12.26、山口大学(山口県・宇部市)

坂井勇介、渡邊健司、吉田貢太、坂口修一、宇留島裕、村田智昭、山本滋、岡正朗、水上洋一、乳癌におけるミトコンドリア DNA 体細胞変異の網羅的探索と機能解析、山口大学生命医工学センター創設記念第 1 回シンポジウム、2014.12.26、山口大学(山口県・宇部市)

水上洋一、相原正宗、遠山卓、佐藤俊、井上雄太郎、山縣芳明、田村功、前川亮、緒方勤、嶋雄一、諸橋憲一郎、杉野法広、細胞膜女性ホルモン受容体変異発現細胞のトランスクリプトーム解析、山口大学生命医工学センター創設記念第 1 回シンポジウム、2014.12.26、山口大学(山口県・宇部市)

坂井勇介、渡邊健司、吉田貢太、坂口修一、宇留島裕、村田智昭、山本滋、岡正朗、水上洋一、次世代シーケンサーを用いた乳癌組織での mtDNA 変異の探索、第 37 回日本分子生物学会総会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

坂口修一、吉田貢太、渡邊健司、遠山卓、坂井勇介、水上洋一、次世代 DNA シーケンサー解析ソフトの違いによるバリア

ントの検出、第 36 回日本分子生物学会
総会、2013.12.3-6、神戸ポートアイラ
ンド（兵庫県・神戸市）

Yusuke Mimura, Ronan Kelly, Louise
Unwin, Simone Albrecht, Yoichi
Mizukami, Margaret Goodall, Tsuneco
Matsumoto, Roy Jefferis, Pauline M
Rudd, Increased sialylation of a
recombinant IgG mutant produced in
human embryonic kidney 293 (HEK293)
cells, 15th International congress of
Immunology, Aug 22-27 2013 ,
Milan(Italy) ,

水上洋一、Cancer Panel を用いた遺伝
子変異解析、Ion Torrent User Meeting
2013、2013.7.10、メルパルク大阪（大
阪府・大阪市）

井上雄太郎、遠山卓、狩生徹、山縣芳明、
前川亮、田村功、山野聖子、杉野法広、
水上洋一、次世代シーケンサーを用い
た子宮筋腫におけるガン関連遺伝子の
スクリーニング、第 35 回日本分子生物
学会総会、2012.12.11-14、福岡国際会
議場・マリンメッセ福岡（福岡県・福岡
市）

狩生徹、西岡弘子、畑中千春、坂口修一、
井上雄太郎、山本滋、岡正朗、水上洋一、
次世代 DNA シーケンサー SOLiD5500 を用
いた乳ガンでのエストロゲン受容体を
誘導する遺伝子変異の探索、第 35 回日
本分子生物学会総会、2012.12.11-14、
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福
岡県・福岡市）

水上洋一、相原正宗、遠山卓、佐藤俊、
井上雄太郎、山縣芳明、田村功、前川亮、
西岡弘子、緒方勤、嶋雄一、諸橋憲一郎、
杉野法広、子宮筋腫で検出されたエスト
ロゲン細胞膜受容体 GPR30/GPER の新規
SNP は細胞増殖を促進する、第 35 回日
本分子生物学会総会、2012.12.11-14、
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福
岡県・福岡市）

〔図書〕(計 1 件)

・ 水上洋一、渡邊健司、坂口修一、(株)
技術情報協会 編、次世代シーケンサーの現
状と問題点について（第 5 章 10 節 遺伝
子・DNA 利用も製品開発におけるガイドラ
インでは分からない規制・倫理対応と解析、
操作技術のトラブル対策）、2014 年、
566(166-170)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://gene.yamaguchi-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水上 洋一（MIZUKAMI , Yoichi）

山口大学・大学研究推進機構・教授

研究者番号：80274158

(2)研究分担者

高村 歩美（TAKAMURA , Ayumi）

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：90508368