

【目的】 SPOP (speckle-type POZ protein) は、Cullin-3 (CUL3) 型ユビキチン (Ub) -E3 複合体の基質認識受容体であり、標的基質タンパク質と結合し、基質タンパク質を Ub 化することで、基質タンパク質を分解に導く。前立腺癌患者の約 15%において SPOP の基質結合ドメインに点変異が存在し、アンドロゲン受容体等の基質タンパク質との結合能を失い、oncogenic な基質タンパク質が蓄積することで前立腺癌が発症するとされている。我々は最近、前立腺癌だけでなく、乳癌、髄芽腫、横紋筋肉腫の発癌にも SPOP の機能不全が関与することを見出したが、前立腺癌を含めた各癌種の発癌過程に寄与する SPOP の標的基質タンパク質の全貌は不明な点が多く残されている。そこで本研究では、SPOP の既知基質タンパク質及び、我々が独自に見出してきた SPOP 基質候補タンパク質に Q-conCAT 一斉絶対定量系システムを構築、適用することで、各種癌細胞における SPOP の真の基質タンパク質を細胞毎に同定することを目的として、実験を実施した。

【方法】 SPOP の既知基質タンパク質を含む 130 分子の SPOP 既知基質/基質候補タンパク質に関して、各タンパク質に特異的で、実際にイオン化し得る proteotypic peptide (PTP) の選択を試みた。次に、選択できた PTP に関して、約 30 ペプチドをタンデムに繋いだ人工タンパク質をコードする人工遺伝子を Q-conCAT 内部標準ペプチド His-TIPS タグを N 末端に付加し、pEU ベクターに組み込んだ (合計 7 種類)。コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、安定同位体ラベルした 7 個の当該人工タンパク質を合成し、His 精製を実施し、質量分析により当該人工タンパク質の量と各ペプチドのシグナル強度の検量線を作成し、SPOP 基質候補タンパク質毎の一斉定量法 (Q-conCAT 定量システム) を確立した。本定量系を用いて、SPOP を人為的に制御した各種癌細胞の細胞抽出液中の基質タンパク質の定量を試みた。

【結果】 PTP を選択できた 118 分子の SPOP 既知基質/基質候補タンパク質由来の PTP をコードする人工タンパク質 7 種類の合成と精製は良好で、この 118 分子の SPOP 既知基質/基質候補タンパク質に関して、Q-conCAT 定量システムの構築に成功した。一方で、SPOP を人為的に制御した各種癌細胞の細胞抽出液中の基質タンパク質の定量に関しては、定量サンプルの調整方法に検討が必要であることが分かった。

Q-conCAT システムを用いた SPOP の基質タンパク質の絶対定量法

