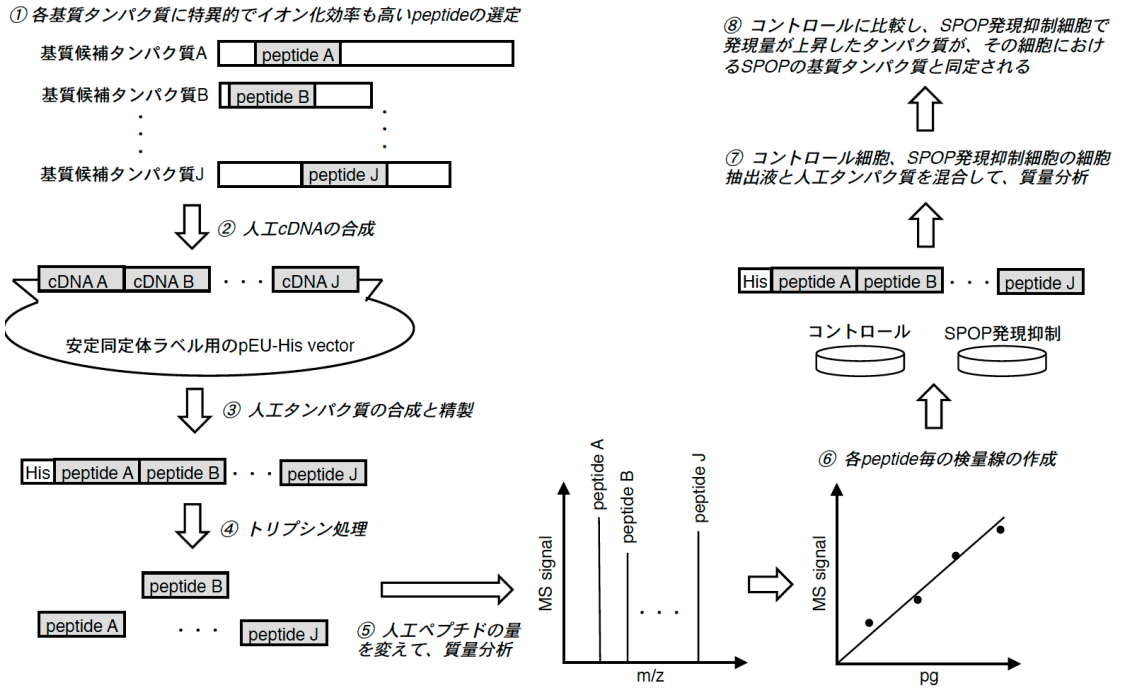
150　SPOPでユビキチン化される真の基質タンパク質の同定	前川　大志

【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



150. SPOP でユビキチン化される真の基質タンパク質の同定

前川　大志

愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 細胞増殖・腫瘍制御部門

Key words：SPOP，前立腺癌，質量分析，ユビキチン化基質タンパク質

緒　言

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へと導く。現在までに、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（dominant-negative 型変異）が報告され、アンドロゲン受容体（AR）、Brd2、Brd4 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発癌することが知られている［1，2］。更に近年、子宮体癌患者の SPOP には、前立腺癌患者の SPOP とは異なるアミノ酸にミスセンス変異が生じており、この SPOP 変異体は gain-of-function 型の変異となり、子宮体癌を発癌させていることも報告された［3］。興味深いことに、我々は最近、前立腺癌だけでなく、乳癌、髄芽腫、横紋筋肉腫の発癌過程にも SPOP の機能不全が深く関与することを見出した。しかしながら、AR をはじめとする前立腺癌の発症に関与する SPOP の既知基質タンパク質では上記の癌種の発癌機構は説明できない。即ち、各癌種の発癌過程に寄与する未知の SPOP の基質タンパク質を癌細胞毎に同定することは、SPOP 機能不全依存的な各癌種の発癌機構の理解に必須である。また、前立腺癌の発症において機能するとされている基質タンパク質は今までに 10 分子以上報告されているが、実際に SPOP 機能不全時に各基質タンパク質がどの程度蓄積するのか、という量的な情報は一切不明である。各癌種で発癌に関与する基質タンパク質は異なる可能性が高いので、SPOP／基質タンパク質を標的とした分子標的薬は、各癌種特異的な治療法に繋がる。我々は最近、基質結合ドメイン依存的に SPOP に結合する分子を愛媛大学プロテオサイエンスセンターが保有する human 20,000 protein array から網羅的にアルファスクリーンを用いてスクリーニングし、112 分子まで SPOP 基質候補タンパク質を絞り込むことに成功した。そこで本研究の目的は、この 112 分子の SPOP 基質候補タンパク質、及び 18 分子の SPOP 既知基質タンパク質に Q-conCAT 定量システムを構築、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である。本研究を遂行した結果、118 分子の SPOP 既知基質／基質候補タンパク質に関して、Q-conCAT 一斉絶対定量系の構築に成功した。

方　法

1. SPOP 既知基質/基質候補タンパク質の proteotypic peptide（PTP）の選択

愛媛大学プロテオサイエンスセンターが保有する human 20,000 protein array とアルファスクリーンを用いた網羅的なスクリーニングで見出した SPOP の基質候補タンパク質 112 分子と、human 20,000 protein array には含まれていなかった SPOP 既知基質タンパク質 18 分子の合計 130 分子に関して、FLAG-GST タグ付きリコンビナントタンパク質をセルフリーサイエンス社から購入した。次に、グルタチオンビーズで GST 精製を実施した。この際、10～14 分子を混合して、同時に精製を行った。グルタチオンビーズに結合させた状態で精製した SPOP 既知基質／基質候補タンパク質を質量分析に供して、実際にイオン化されることが担保され、且つ、各タンパク質に特異性の高い PTP の選択を試みた。

2. SPOP 既知基質／基質候補タンパク質由来 PTP をコードする人工遺伝子のクローニング

選択に成功した PTP に関して、約 30 本ずつタンデムに繋いだ人工遺伝子を設計し、IDT 社に合成を依頼した。合計で 7 本の人工遺伝子（Q1～Q7）を合成した。次に、Q-conCAT 構築の際の内部標準ペプチドである TIPS タグ（A-I-I-I-R）及び、精製用の His タグ（H-H-H-H-H-H）を N 末に付加した「His-TIPS-人工遺伝子」の cDNA 配列をコムギ無細胞合成系のベクターである pEU ベクターへクローニングした［4］。

3. SPOP 既知基質／基質候補タンパク質由来 PTP が繋がった人工タンパク質の合成と精製

His-TIPS タグを付加してクローニングした 7 種類の人工遺伝子（Q1～Q7）を、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て合成した。具体的には、セルフリーサイエンス社の WEPRO8240H expression kit を用いて、合成した。合成後は、定法に従い His 精製を実施した。

4. 精製人工タンパク質を用いた Q-conCAT の構築と細胞サンプルの測定

精製に成功した 7 種類の人工タンパク質を質量分析に供して、予想される PTP が検出されること、当該 PTP を用いて絶対定量用の検量線を作製できるかを検証した。更に、実際の測定サンプルとして、ヒト前立腺癌細胞株である C4-2 cells の細胞抽出液を用意した。具体的には、siRNA を用いて SPOP を発現抑制したサンプルと、その比較対象として control siRNA を処理したサンプルを質量分析に供し、構築した Q-conCAT を用いて、SPOP 発現抑制時の既知基質タンパク質の変動を調べた。併せて、基質候補タンパク質に量的な変動が見られるか検証した。

結果および考察

1. SPOP 既知基質／基質候補タンパク質の proteotypic peptide（PTP）の選択

SPOP の基質候補タンパク質 112 分子と、human 20,000 protein array には含まれていなかった SPOP 既知基質タンパク質 18 分子の合計 130 分子から、合計で 193 本の PTP の選択に成功した。これらの PTP は、FLAG-GST タグ付きリコンビナントタンパク質を実際に質量分析でイオン化して、検出されたペプチドであるので、Q-conCAT を作成する際に、イオン化されることが担保できていると考えられる。各タンパク質のアミノ酸配列からアルゴリズムを用いて PTP を予測するよりも非常に高い信頼性があるものと思われる。PTP 選択を試みた 130 分子のタンパク質のうち、12 個のタンパク質に関しては、特異的な PTP を選択することはできなかった。43 個のタンパク質に関しては 1 本の PTP を、75 個のタンパク質に関しては 2 本の PTP を選択できた。

2. SPOP 既知基質／基質候補タンパク質由来 PTP をコードする人工遺伝子のクローニング

選択に成功した PTP を約 30 本ずつタンデムに繋げ、N 末に His-TIPS タグ配列を付加した cDNA を pEU ベクターに組み込んだ。結果的に、7 本の人工遺伝子をクローニングした。便宜上、これらの人工遺伝子を Q1～Q7 と命名した。

3. SPOP 既知基質／基質候補タンパク質由来 PTP が繋がった人工タンパク質の合成と精製

定法に従い、WEPRO8240H expression kit を用いてコムギ無細胞タンパク質合成系で His-TIPS-Q1（-Q7）を合成し、His 精製を行った。その結果、図 1 に示すように人工タンパク質によっては、10,000 g ppt に強くアグリゲーションを起こす人工タンパク質もあったものの、Q1 から Q7 までに全ての人工タンパク質に関して、His 精製することができ、CBB 染色下で目視によりバンドが見えるレベルまで精製人工タンパク質を得ることに成功した。Q2 は図 1 の CBB 染色画像ではバンドが薄いが、実際のゲルではバンドは目視で確認できた。

4. 精製人工タンパク質を用いた Q-conCAT の構築と細胞サンプルの測定

合成及び、精製を行った 7 つの人工タンパク質を質量分析に供したところ、検出が予想された PTP を全て検出することに成功した。この結果は、最初に 130 分子一つ一つのリコンビナントタンパク質を実際に質量分析にかけて、イオン化して検出できるペプチドの中から PTP を選択した方法が非常に有効で正しかったことを強く支持する結果であると考えられる。今後、他のタンパク質の Q-conCAT を構築する際には同様の方法を取る予定である。実際に、内部標準ペプチドを用いて、検量線を作製できることも確認できた。次に、SPOP を発現抑制したヒト前立腺癌細胞株 C4-2 cells の 10,000 g sup の測定を試みた。その結果、今回の測定では、測定したい SPOP 既知基質／基質候補

タンパク質の PTP が検出することができなかった。実際に測定されたペプチドは細胞内での存在量が非常に多いメジャーなタンパク質由来のペプチドが大多数を占めており、これらのペプチドが夾雑物となり、測定したい SPOP 既知基質／基質候補タンパク質の PTP が検出できなかったと思われる。解決策として現在、測定サンプルを一度、SDS-PAGE 電気泳動に供し、分子量毎に分離後、上から 5～10 mm 毎にゲルを切り出し、その後、トリプシン消化して Q-conCAT と組み合わせて定量を試みる方法を検討している。

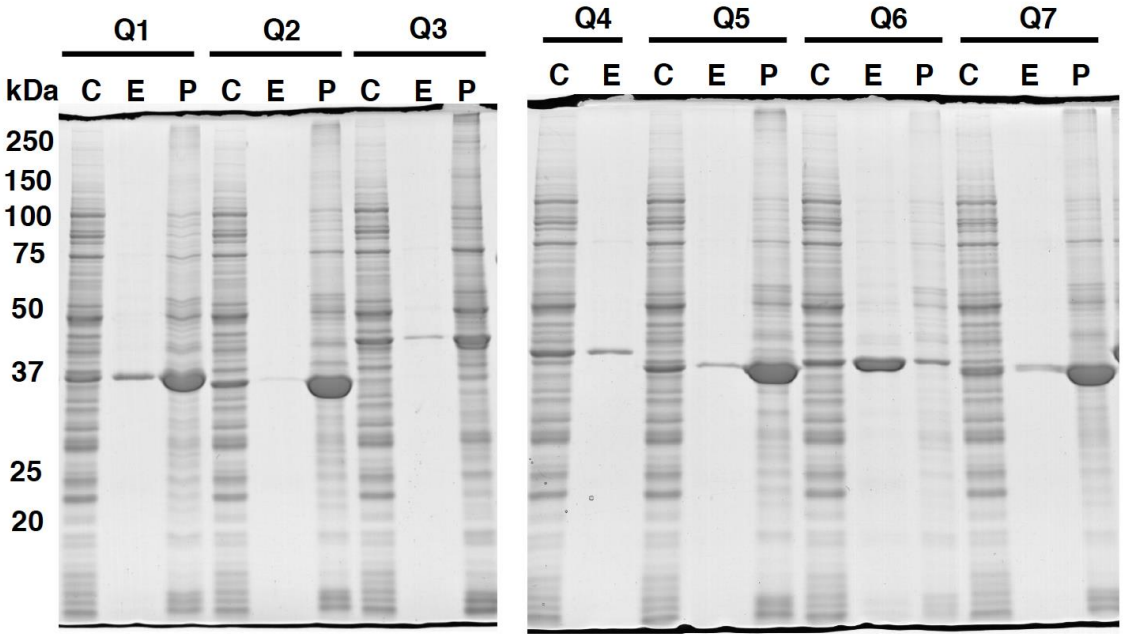


図 1. 人工タンパク質 7 種類の合成/精製結果（CBB 染色）
人工タンパク質 His-TIPS-Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、Q6、Q7 の合成結果と精製結果。
C：crude（10,000 g sup）、P：10,000 g ppt、E：elution（精製タンパク質）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、愛媛大学プロテオサイエンスセンター無細胞生命科学部門の澤崎達也教授と高橋宏隆講師、同センタープロテオ創薬科学部門の竹田浩之准教授である。質量分析は株式会社島津テクノリサーチとの共同研究で実施した。コムギ無細胞タンパク質合成系による安定同位体ラベル人工タンパク質の合成と精製において、愛媛大学学術支援センター（ADRES）の田中ゆき様から多大なる技術支援を賜りました。御礼申し上げます。

文　献

1） Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, White TA, Stojanov P, Van Allen E, Stransky N, Nickerson E, Chae SS, Boysen G, Auclair D, Onofrio RC, Park K, Kitabayashi N, MacDonald TY, Sheikh K, Vuong T, Guiducci C, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Saksena G, Voet D, Hussain WM, Ramos AH, Winckler W, Redman MC, Ardlie K, Tewari AK, Mosquera JM, Rupp N, Wild PJ, Moch H, Morrissey C, Nelson PS, Kantoff PW, Gabriel SB, Golub TR, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Rubin MA, Garraway LA. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. Nat Genet. 2012 May 20;44(6):685-9. doi: 10.1038/ng.2279. PMID: 22610119

2） Cuneo MJ, Mittag T. The ubiquitin ligase adaptor SPOP in cancer. FEBS J. 2019 Oct;286(20):3946-3958. doi: 10.1111/febs.15056. Epub 2019 Sep 18. Review. PMID: 31495053

3) Janouskova H, El Tekle G, Bellini E, Udeshi ND, Rinaldi A, Ulbricht A, Bernasocchi T, Civenni G, Losa M, Svinkina T, Bielski CM, Kryukov GV, Cascione L, Napoli S, Enchev RI, Mutch DG, Carney ME, Berchuck A, Winterhoff BJN, Broaddus RR, Schraml P, Moch H, Bertoni F, Catapano CV, Peter M, Carr SA, Garraway LA, Wild PJ, Theurillat JP. Opposing effects of cancer-type-specific SPOP mutants on BET protein degradation and sensitivity to BET inhibitors. Nat Med. 2017 Sep;23(9):1046-1054. doi: 10.1038/nm.4372. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28805821

4) Takemori N, Takemori A, Matsuoka K, Morishita R, Matsushita N, Aoshima M, Takeda H, Sawasaki T, Endo Y, Higashiyama S. High-throughput synthesis of stable isotope-labeled transmembrane proteins for targeted transmembrane proteomics using a wheat germ cell-free protein synthesis system. Mol Biosyst. 2015 Feb;11(2):361-5. doi: 10.1039/c4mb00556b. Epub 2014 Nov 28. PMID: 25431973