教育セミナー:プロテオミクス熊の巻 2015 総合論文

プロテオミクスデータの細胞生物学的な検証法

小林大樹*, 荒木令江

*E-mail: daikik@kumamoto-u.ac.jp

熊本大学大学院生命科学研究部腫瘍医学分野:860-8556 熊本県熊本市中央区本荘1-1-1

(受付 2016 年 4 月 20 日, 改訂 2016 年 5 月 27 日, 受理 2016 年 5 月 30 日)

プロテオミクスデータに基づいて抽出した生物学的に意義のある新規候補分子群に対して、どのような生物学的役割を 果たすのか検証することが最終的に求められる.siRNA/shRNAや低分子化合物などによる分子機能阻害,および発現プ ラスミドによる分子の過剰発現によって生じる細胞の表現型を,顕微鏡観察や各種アッセイ系によって評価していくこと が,一般的な細胞生物学的検証法として挙げられる.しかしながら,細胞生物学的実験手法は候補分子によって様々であ ることから,実はプロテオーム解析よりも時間がかかるステップとなっている.したがって、プロテオミクスデータに即 して細胞生物学的な検証を円滑に進めていくには、プロテオーム解析に用いたサンプルの調製と前処理,質量分析などの プロテオーム解析手法は勿論のこと, in-silico の Gene Ontology 解析や分子ネットワーク解析によって新規分子群を抽出 する過程が大変重要となってくる.本内容では神経系腫瘍の解析を通じて,我々がいかにしてプロテオミクスデータで同 定された新規候補分子群を細胞生物学的に検証したのか報告する.

1 序 論

近年の質量分析装置の高感度化,高精度化により,定量 的に同定されるタンパク質数が飛躍的に向上し,DNAマ イクロアレイに匹敵する10000以上の分子数の発現をプロ ファイルすることが可能になってきた¹⁾. これらのプロテ オーム解析によって得られた結果を解釈するためには,生 物学的に意味のある分子群を抽出し,これら分子群に対し て生物学的役割を検証していかなければならない. しかし ながら,細胞生物学的に検証していくための手法は候補分 子によって様々であるため,この生物学的な検証がうまく 進まないケースが見られ,プロテオーム解析よりも時間が かかる過程となっている.

一般的な細胞生物学的検証法として,siRNA/shRNA や 低分子化合物などによる分子機能阻害,および発現プラス ミドによる分子の過剰発現によって生じる細胞の表現型を, 顕微鏡観察や各種アッセイ系によって評価していくことな どが挙げられる (Fig. 1).そこで,新規分子をターゲット とした抗体や発現プラスミド,siRNA や阻害剤/活性化剤 等の低分子化合物を用意しなければならない.アッセイ系 等が確立していれば問題はないが,プロテオミクスで同定 された分子群はしばしば,機能が不明である,抗体情報に 乏しい等のアプローチの選択を困難にさせる場合がある. 論文等に掲載された過去の報告から,これらの問題を解決



Fig. 1 Workflow for the data mining of quantitative proteomics and the cellular biological validations

する方法を見出せればいいが,それだけでは見つけること のできない情報も多く存在する.したがって,プロテオミ クスデータに基づいて細胞生物学的な検証を進めていくに は、プロテオーム解析に用いたサンプルの調製と前処理, 質量分析などのプロテオーム解析手法,in-silicoのGene Ontology 解析²⁾ や分子ネットワーク解析による新規分子 群の抽出³⁾といったすべての過程が重要な鍵となってく る(Fig.1).本内容では神経系腫瘍の解析を通じて,我々 がいかにしてプロテオミクスデータで同定された新規候補 分子群を細胞生物学的に検証したのか報告する.

神経線維腫症1型(Neurofibromatosis type 1: NF1) 病態モデル細胞における神経分化異常に関わる Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルの検証

NF1⁴⁾ は、多発性神経線維腫、悪性末梢神経鞘腫 (Malignant peripheral nerve sheath tumor: MPNST), 学習 記憶障害などの、多彩な病態を示す遺伝性疾患である. そ の原因遺伝子産物である Neurofibromin は、Ras GTPase Activating Protein (Ras-GAP) 相同領域を有し、細胞内シ グナル伝達の重要な調節因子と考えられている^{5)~7)}. 近 年のマウスを用いた研究により、多発性神経線維腫は、細 胞ー細胞間および細胞-マトリックス間の相互的なシグ ナルの異常が形成の誘引と考えられている⁸⁾. これまでに、 Neurofibromin の発現低下に伴い活性化された Ras-MAP キ ナーゼ、PI3 キナーゼ -AKT シグナルを介した異常な細胞 増殖、分化、および生存が大きく関与していることを明ら かにしてきたが^{6),9),10)}、NF1病態の詳細なメカニズムの解 明には至っていない.

まず我々は、siRNA を用いて NF1 の発現を抑制した NF1 病態モデル PC12 細胞を作製した. PC12 細胞は、神 経成長因子(Nerve growth factor: NGF)の刺激により神 経突起を伸長させ、神経細胞様に分化することが特徴であ る.しかしながら、この病態モデル細胞は、NGFの刺激 による神経突起伸長が阻害され、神経細胞様の分化制御が 異常であることが表現型として観察された(Fig. 2A).そ こで、Neurofibrominの細胞内機能と NF1 病態との関連性 を明らかにするために、NF1 病態モデル PC12 細胞内で生 じる NGF による分化誘導への影響を融合プロテオミクス 法によって解析し、抽出されてきた NF1 病態関連新規責 任シグナル分子群の更なる細胞生物学的な検証を行った.

これら NF1 病態モデル細胞,およびコントロール細胞 からタンパク質および mRNA サンプルを NGF 刺激後経時 的に調製し,二次元電気泳動をベースとした 2D-DIGE に よるタンパク質発現と翻訳後修飾の解析,iTRAQ を用い た質量分析による網羅的なタンパク質発現解析,および DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析 を同時に行い,網羅的に全遺伝子・タンパク質発現および

翻訳後修飾情報を取得した. これら、オミクス解析により 得られるデータは、解析技術の特徴によって様々であり、 それらを組み合わせることによって、より豊富な情報源と して生物学的解析に応用可能となる. しかしながら, それ ぞれの解析から産出される莫大なデータにおいて,解析に 用いるデータベース、および各ソフトウェアから出力され るデータフォーマットの相違などが、複数のオミクス解析 で得られる情報の統合の障害となっている. そこで我々は, これら解析を融合的に行い、同一サンプル群を同時に解析 して得られたすべての情報を統合・一元化するデータマイ ニングプログラム iPEACH (integrated Protein Expression Analysis CHart) を開発した (Fig. 2B)³⁾. これによって得 られる一元化分子情報をもとに Gene Ontology 解析, 分子 ネットワーク解析等を介して,新規病態関連分子群を抽出 する一連の解析法を,融合プロテオミクス法として確立し, NF1 病態モデル細胞で異常な挙動を示す新規シグナル分 子群の抽出に応用した(Fig. 2B).

各手法により同定された総分子の内,3193分子がタン パク質(iTRAQ,あるいは2D-DIGE)とmRNA(DNA array)の両定量データを有しており,NGF刺激後継続的 (24から48時間,48から72時間,または24,48,72時 間)に変動しているタンパク質を抽出したところ,継続的 に発現増加するタンパク質は62,減少するタンパク質は 35 であった.これら合計97分子についてNGF刺激後の 各時間におけるmRNAとタンパク質の挙動をun-centered correlationの条件でクラスター解析したところ,興味深い 事にmRNAの24時間の挙動が、タンパク質の経時的変動 と近い距離にクラスターされたことから,mRNAの初期 変動がその後のタンパク質の発現変動に連動していること が示唆された³.

続いて,発現クラスター解析の結果に基づき,mRNA で上昇している分子群を始点、タンパク質レベルで上昇し ている分子を終点としたネットワーク解析を行い、特異的 に活性化した分子ネットワークの構築を行った. このネッ トワークにおいて最も特徴的にクラスターしていた転写 因子グルココルチコイド受容体 (Glucocorticoid receptor: GR) シグナルに着目し、ネットワークのさらなる絞り込 みを行った結果,NGF 刺激後に,mRNA レベルで24時 間後に発現上昇し、なおかつ継続的にタンパク質レベル で発現が増加しているアラキドン酸代謝酵素 COX-1と, 2D-DIGE 解析で挙動の異なる複数のタンパク質スポット が検出された分子モーター複合体因子 Dynein intermediate chain 2 (Dynein IC2) と、これらをつなげる存在である GRから構成される『Dynein IC2-GR-COX-1 シグナル』を 新規NF1 関連分子ネットワークとして抽出することに成 功した(Fig. 2B). NF1 の発現抑制によって異常に活性化 した本ネットワークは、Dynein IC2 を中心とした核輸送



Fig. 2 Identification of a novel molecular network related to the abnormal neuronal differentiation from integrated proteomic data of NF1 disease model

A. PC12 cells treated with *NF1* siRNA shows the phenotype of neurite outgrowth inhibition after 72 hours in response to nerve growth factor (NGF). B. Workflow of the integrated proteomics of NF1-disease model PC12 cells. PC12 cells were transfected with control siRNA or *NF1* siRNA and stimulated with NGF, and protein and mRNA samples were prepared from the cells. The protein and mRNA samples were subjected to 2D-DIGE and iTRAQ methods, and DNA microarray, respectively. After these analyses, an integrated chart from all data was generated using iPEACH to identify differentially expressed genes and proteins. To extract a novel NF1-related molecular network, the list of genes/proteins upregulated by the *NF1* siRNA treatment in PC12 cells was imported into KeyMolnet. The abnormal molecular network including dynein IC2, GR, and COX-1 was successfully constructed by Keymolnet network search. The "dynein IC2-GR-COX-1" signaling was highlighted by a red square.

モーター複合体の活性化により,GRが核へと移行し転写 因子として機能した結果,COX-1の転写が誘導されると いう仮説が考えられた.また,このシグナルの活性化は NF1の発現が抑制された細胞において神経系の分化異常 を引き起こしていることが推測された³⁾.

プロテオミクスデータの検証実験として, Dynein IC 特 異的抗体を用いた二次元ウエスタンブロットによって経時 的な発現変動の検証を行った結果, 興味深い事に, Dynein IC2 のアイソフォームである Dynein IC2-B から Dynein IC2-C への特異的なスプライシングと連動したリン酸化 Dynein IC2-B の発現低下, およびリン酸化 Dynein IC2-C の発現上昇が*NF1* 機能欠損細胞において顕著に起こって いることが判明した(Fig. 3). その Dynein 複合体の活性 化によって,NGF 刺激した NF1 発現抑制細胞の核内 GR の発現量(GR の活性)が有意に上昇していること,ま た,それに伴い継時的な転写および翻訳の活性化によって, COX-1 は発現上昇することが明らかとなった(Fig. 3).さ らに,NF1 の発現抑制により発現上昇した COX-1 の GR による発現制御は,GR のアンタゴニスト Mifepristone 処 理にて,顕著に減少し(Fig. 3),また,NF1 発現抑制によ る COX-1 の発現上昇が,Dynein IC2 のノックダウンによ り抑制されることを見出した.また,COX-1 の発現を抑 制すると,NF1 病態モデル細胞に特徴的な神経突起伸長 の抑制は改善することが判明した.以上の融合プロテオミ

Proteome Letters 2016; 1:40

クスの結果と検証実験から, NF1 の発現抑制に連動して, Dynein IC2, GR を介して発現が亢進する COX-1 の発現の 活性化シグナル "Dynein IC2-GR-COX-1 シグナル"は NF1 に関わる神経系分化異常病態を引き起こす要因の1つであ ることが考えられ, NF1 病態の新規治療ターゲットとし て有用であることが示唆された³⁾.

NF1 病態モデル細胞内における腫瘍形成に関わる分子 TCTP の検証

上記の解析によって得られた融合プロテオミクスの網 羅的分子変動情報(iPEACH データベース)は様々なシグ ナルのヒントを含有していた.すべての融合データから, NFI 発現抑制のみによって,すべての時間で誘導されてい るタンパク質群を抽出し,発現誘導タンパク質を端点とし た相互関係検索によって,病態モデル細胞内で一斉に活性 化する新規ネットワークの同定を試みた.その結果, Ras シグナル経路に関与する分子群,および抗アポトーシス機 能に関わる分子群が有意に含まれるネットワークが抽出 された. 特に mammalian target of rapamycin (mTOR) 経 路調節因子である Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) を中心とした新規ネットワークが注目され, こ れらが総合的に NF1 病態に関連すると考えられた.

TCTP は酵母からヒトにいたるまで, 真核生物種間で 構造および機能面において高度に保存されており, 多彩 な機能を示すタンパク質である¹¹⁾.特にアポトーシス抑 制, タンパク質合成,細胞分裂に関わる機能などの面から, TCTP は腫瘍との関連が示唆されている^{12),13)}.しかしなが ら, NF1 病態の主な腫瘍である神経線維腫と TCTP を関 連づける報告はないため, TCTP の NF1 腫瘍における発 現制御および機能について更なる検証を行った.

MPNST において TCTP の発現が最も顕著であったこ とから, MPNST 由来の培養細胞内に Ras を負に制御する NF1-GAP 領域を過剰発現させたところ, MAPK, PI3K-AKT 経路の活性低下と, それに伴う TCTP の発現減少を 認めた (Fig. 4A). さらに興味深い事に, TCTP の発現減 少は MEK, PI3K の阻害によっても, mTOR 経路の活性低



Fig. 3 Validation of the activation of novel NF1-related signaling "Dynein IC2-GR-COX-1"

Dynein IC2-GR-COX1 signaling identified by integrated proteomics of *NF1*-deficient PC12 cells, was validated by the indicated methods. These results demonstrated that the activation of "Dynein IC2-GR-COX-1" signaling caused the abnormal neuronal differentiation of NF1-disease model PC12 cells.



Fig. 4 Validation of the mechanism of TCTP upregulation by NF1-deficiency via Ras signaling

Ras (A), MAP kinase/PI3 kinase (B) and mTOR (C) were inhibited and the TCTP expression was down-regulated by all of the inhibitions.



Fig. 5 Functional validation of TCTP in NF1-associated tumors

A. The phenotypes of sNF96.2 MPNST cells treated with TCTP siRNA were observed using time-lapse microscope. The phenotypic changes with cell growth, apoptosis, and cytoskeleton were observed. B. Inhibition or activation of TCTP by siRNA or expression plasmid caused the decrease or increase of mTOR activity, respectively.

下に伴っても起こることが判明した(Fig. 4B). TCTPの mRNAの5'末端の配列にはオリゴピリミジン領域が存在 し^{14),15)}, TCTPはmTOR活性によって正に翻訳が制御さ れることが想定されることから,MPNST細胞のmTOR活 性のラパマイシンによる阻害がTCTPの発現に及ぼす影 響を検討した.その結果,ラパマイシン処理によりTCTP の発現は翻訳レベルで低下することが明らかとなった (Fig. 4C).以上の結果から,MPNST細胞内において*NF1* 機能の欠損が引き金となって生じる Ras-MAPK,および PI3K-AKT シグナルを介したmTORの活性化はTCTPの 発現上昇に寄与していることが判明した.

一方, MPNST 細胞内の TCTP の発現を siRNA により 抑制し、タイムラプス顕微鏡を用いて継時的に観察するこ とによって、NF1 腫瘍細胞内における TCTP の役割を検 証した、その結果、TCTPの発現抑制によって、MPNST 細胞の生存能は低下し、さらに細胞骨格異常および細 胞サイズの低下を引き起こしていることが観察された (Fig. 5A). TCTP は細胞サイズの調節に密接に関わってい る mTOR 経路を正に制御していることが報告されている ことから¹⁶⁾, TCTPのmTOR 経路の下流である Ribosomal protein S6 のリン酸化レベルへの寄与について検討したと ころ, TCTP 発現抑制は Ribosomal protein S6 のリン酸化 レベルを低下させることが明らかとなった (Fig. 5B). 以 上の結果から,TCTP は MPNST 細胞のサイズ,および mTOR 経路を正に制御し、細胞の増殖を促進しているこ とが明らかとなった.即ち,TCTPの発現上昇が引き金と なって生じる mTOR 経路の異常な活性化は NF1 の腫瘍化 を引き起こす要因の一つと考えられ,TCTPの機能やその シグナルの上流および下流の分子を標的とした治療戦略, 特にTCTP分解促進させる低分子化合物アーテスネート がNF1治療に有効であることが示唆された¹⁷⁾.

4 結 論

以上のように、我々は神経線維腫症1型(NF1)病態モ デル細胞における神経分化異常に関わる Dynein IC2-GR-COX-1 シグナル³⁾, および腫瘍形成に関わる TCTP を融 合プロテオミクスにより同定した¹⁷⁾.同定されたターゲッ ト分子のNF1病態における役割を,抽出された分子シグ ナルや生物学的背景を基づき,抗体, siRNA, 発現プラス ミド,および阻害剤を用いて,細胞生物学的に検証した. その結果,これら分子群が異常に活性化することで,NF1 病態を発症することが考えられた、このように、サンプル 調製、プロテオーム解析手法、新規分子群を抽出するため のマイニング、および細胞生物学的の検証ストラテジーと いったどの過程も生物学的に新規な分子機構を解明するた めには重要である. 最後に、これらの技術が高感度かつ高 精度になるにつれて、生物学的な発見に大きく寄与してい くと予想される一方で、これら一連の解析手順を慎重に、 且つ精巧に進めていくことが最も重要な成功の鍵と言える.

謝 辞

本研究は, 熊本大学大学院生命科学研究部腫瘍医学分野 の平山未央博士, 水口惣平博士, 長山慈氏, ライフサイエ ンス統合データベースセンターの河野信特任准教授, 京都 大学化学研究所バイオインフォマティクスセンター.の吉 沢明康博士の御指導,御協力で得られた成果であり,厚く 御礼申し上げます.また,本研究はJSPS 科研費 24700981, 26830079,の助成を受けたものです.

著者に開示すべき利益相反状態は無い.

文 献

- 1) Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, *et al.* Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. Mol Syst Biol. 2011;7:548.
- Kobayashi D, Kumagai J, Morikawa T, *et al.* An integrated approach of differential mass spectrometry and gene ontology analysis identified novel proteins regulating neuronal differentiation and survival. Mol Cell Proteomics. 2009;8:2350–2367.
- Hirayama M, Kobayashi D, Mizuguchi S, *et al.* Integrated proteomics identified novel activation of dynein IC2-GR-COX-1 signaling in neurofibromatosis type I (NF1) disease model cells. Mol Cell Proteomics. 2013;12:1377–1394.
- Stephens K, Riccardi VM, Rising M, *et al.* Linkage studies with chromosome 17 DNA markers in 45 neurofibromatosis 1 families. Genomics. 1987;1:353–357.
- 5) Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, *et al.* A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. Cell. 1990;62:193–201.
- 6) Yunoue S, Tokuo H, Fukunaga K, *et al.* Neurofibromatosis type I tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GTPase-activating protein function toward Ras. J Biol Chem. 2003;278:26958–26969.
- 7) Feng L, Yunoue S, Tokuo H, et al. PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. FEBS Lett.

2004;557:275-282.

- Carroll SL, Ratner N. How does the Schwann cell lineage form tumors in NF1? Glia. 2008;56:1590–1605.
- 9) Ozawa T, Araki N, Yunoue S, *et al.* The neurofibromatosis type 1 gene product neurofibromin enhances cell motility by regulating actin filament dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2cofilin pathway. J Biol Chem. 2005;280:39524–39533.
- 10) Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, et al. Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, CRMP-2. J Biol Chem. 2008;283:9399– 9413.
- 11) Bommer UA, Thiele BJ. The translationally controlled tumour protein (TCTP). Int J Biochem Cell Biol. 2004;36:379–385.
- 12) Tuynder M, Susini L, Prieur S, *et al.* Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:14976–14981.
- Telerman A, Amson R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. Nat Rev Cancer. 2009;9:206–216.
- 14) Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, et al. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. Nature, 2012;485:109–113.
- 15) Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, *et al.* The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. Nature. 2012;485:55–61.
- 16) Hsu YC, Chern JJ, Cai Y, *et al.* Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. Nature. 2007;445:785–788.
- 17) Kobayashi D, Hirayama M, Komohara Y, et al. Translationally controlled tumor protein is a novel biological target for neurofibromatosis type 1-associated tumors. J Biol Chem. 2014;289:26314–26326.

Cellular Biological Validations of Proteomics Data

Daiki Kobayashi*, Norie Araki

*E-mail: daikik@kumamoto-u.ac.jp

Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Honjo 1-1-1, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan

(Received: April 20, 2016; Revised: May 27, 2016; Accepted: May 30, 2016)

Cellular biological validations of novel candidate molecules which are extracted from proteomics data are needed to uncover their functions. For examples, the molecules are inhibited or activated to validate their biological functions by using siRNA/shRNA, antibodies, chemical compounds, or expression plasmids, followed by the observations with microscope and analyses using the various assay systems. However, it takes much effort to biologically validate the candidate molecules because the approaches depend on their various functions. Therefore, the precise processes to extract the novel molecules of biological interest using the gene ontology or network analyses, as well as the strict sample preparations and the reliable proteome data, need to facilitate their validations. In this paper, we explained how the novel candidates of interest, especially related to the neurofibromatosis type I (NF1) pathogenesis, were validated biologically.

Keywords: cellular biological validations; Dynein IC2-GR-COX-1 signaling; NF1; TCTP.