

pH range の異なる固定化 pH 勾配ゲルストリップを  
用いた二次元電気泳動法による  
転移能の異なる腎細胞癌株の比較プロテオミクス

氏名 田中 寿幸

所属 山口大学医学系研究科

情報解析医学系専攻 プロテオーム・蛋白機能制御学分野

---

平成 25 年 10 月

## 目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	2
4. 方法	
4.1 細胞株	3
4.2 蛋白質の抽出	3
4.3 二次元電気泳動によるディファレンシャルディスプレイ	4
4.4 質量分析計による蛋白質の同定	4
4.5 Western blot 法	5
5. 結果	
5.1 二次元電気泳動像	6
5.2 質量分析計により同定された蛋白質	7
5.3 ヒト癌転移モデルにおける glyoxalase 1 (GLO1) の発現量	
5.3.1 GLO1 の総発現量	8
5.3.2 GLO1 アイソフォーム	9
5.4 他の転移モデルにおける GLO1 の総発現量	10
6. 考察	11
7. 結語	12
8. 謝辞	13
9. 参考文献	14

## pH range の異なる固定化 pH 勾配ゲルストリップを用いた二次元電気泳動法による転移能の異なる腎細胞癌株の比較プロテオミクス

プロテオーム・蛋白機能制御学分野 田中 寿幸

### 1. 要旨

Naito 等により、自然発生した腎細胞癌から樹立した株 SN12C を用いた転移モデルが樹立されており、各細胞の転移能の違い等の特徴がヌードマウスを使った実験により明らかになっている [1-3]。これまでに我々 [4] により二次元電気泳動 (pH range 3~10 の等電点電気泳動/SDS-PAGE) を用いた比較プロテオミクスによって SN12C の高転移株において ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCH-L1) の 2 つのアイソフォームが減少していることが報告されている。しかしながら、低転移株において転移能の違いによる蛋白質の発現量の変化は確認できなかった。そこで今回、pH range の異なる固定化 pH 勾配ゲルストリップを用いた二次元電気泳動法による転移能の異なる腎細胞癌株の比較プロテオミクスを行ったところ glyoxalase 1 (GLO1) が転移能に伴い変化する蛋白であることが分かった。また、転移能の異なるスキルス胃癌である OCUM 細胞株の転移モデルにおいても同様に変化がみられた。これらの結果から、GLO1 は SN12C 細胞株と OCUM 細胞株の転移モデルにおいて転移能の変化に関与する蛋白として推測される。



## 2. 研究の背景

癌はいまだ多くの先進諸国における主要な死亡原因である (World Cancer Report 2008; URL: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/index.php>)。転移は一連の複雑な過程から成る。これらの過程には、原発巣からの腫瘍細胞の離脱、周囲組織・基底膜への浸潤、血管新生、血液循環やリンパ系もしくは腹腔空間中への進入し遠隔標的臓器での腫瘍細胞の増殖などがある。これらの過程の背後にある特定の分子機序は不明のままであり、従って、腫瘍転移を防ぐ、又は抑えるための有効な方法を特定することが必要不可欠である。したがって、浸潤・転移のメカニズムの理解は重要である[5]。

Naito 等によってヒト腎細胞がん株の転移モデルである SN12C の細胞系は自然転移モデルとして報告がある[6]。SN12C (親株) は 43 歳男性の腎細胞癌を外科的切除の際に採取し、単層培養にて確立した細胞株である[1]。また、SN12C-clone 2 と SN12C-PM6 は親株と比較して高転移の株であり、SN12C-PM6 の方が特に高転移である[2,3]。一方、SN12C-clone 4 は親株より低転移株である[2]。Tanaka 等の二次元電気泳動 (pH range 3~10 の等電点電気泳動/SDS-PAGE) を用いた比較プロテオミクスにおいて、SN12C の高転移株において 8 つの蛋白質が高転移能獲得に関わる可能性がある分子として候補に挙げた。特に、UCH-L1 は高転移獲得に関わる可能性がある分子として報告した。しかしながら、低転移の細胞株において親株と比較し変化のある蛋白質を見つけることができなかった[4]。

## 3. 目的

今回、前回の二次元電気泳動において pH range 4~7 付近に多くの蛋白質が存在したことを踏まえ、pH range を絞った二次元電気泳動を行い、転移能の変化に伴い蛋白量が変化する蛋白を検索した。また、スキルス胃癌の転移モデルである OCUM の細胞系においても同様の変化が見られるかを確認した。



#### 4. 材料と方法

##### 4. 1 細胞株

ヒト腎細胞癌細胞株は九州大学医学研究院臨床医学部門外科学講座の内藤誠二教授より提供して頂いた。SN12C（親株）は43歳男性の腎細胞癌を外科的切除の際に採取し、単層培養にて確立した細胞株である[1]。親株であるSN12Cから限界希釈法で得た各クローンのうち親株より転移能が高い細胞株がSN12C-clone 2、親株より転移能が低い細胞株がSN12C-clone 4である[2]。SN12C-PM6は親株であるSN12Cを数匹のマウスの腎臓被膜下に移植し、肺に出来た転移巣から1つの転移巣を各マウスから選択し、培養して確立した細胞株のうち、親株よりも転移能が高い細胞株である[3]。SN12C-PM6はこれら4つの細胞株の中で最も転移能が高い。これら、ヒト腎細胞癌細胞株:SN12C（親株）と3種類の転移能の異なるクローン株を10%FBS添加RPMI1640（日水）で培養した。培養は37℃、CO<sub>2</sub> 5%、湿潤条件で行った。

ヒトスキルス胃癌細胞株の細胞系は大阪市立大学大学院医学研究科腫瘍外科学講座の八代正和准教授より提供して頂いた。我々は、OCUM-2M, OCUM-2D と OCUM-2MLN の3種類のスキルス胃癌細胞株を使用した。OCUM-2M は OCUM-2D と OCUM-2MLN に比べ低転移能で、OCUM-2D と OCUM-2MLN は高転移能を有する[7, 8]。スキルス胃癌の細胞株はFBS添加高グルコースDMEM（GIBCO）で培養した。培養は37℃、CO<sub>2</sub> 5%、湿潤条件で行った。

##### 4. 2 蛋白質の抽出

これら7種類の細胞株を氷上にて、蛋白抽出液（50 mM Tris-HCl, pH 7.5、165 mM sodium chloride、10 mM sodium fluoride、1 mM sodium vanadate、1 mM PMSF、10 mM EDTA、10 µg/ml aprotinin、10 µg/ml leupeptin、1% NP-40）に懸濁し、さらに4℃にて1時間攪拌した。攪拌した蛋白溶解液を4℃にて21,500 ×g、30分間遠心し、上清をサンプルとして用いた。蛋白質濃度をLowry法にて測定し、使用する

までサンプルは-80℃にて保存した[9-12]。

#### 4.3 二次元電気泳動によるディファレンシャルディスプレイ

80µg の蛋白質重量の各細胞株サンプルを総量 200µl になるように膨潤液(8 M urea、2% CHAPS、0.01% bromophenol blue、1.2% Destreak reagent (GE Healthcare) 、0.5% IPG buffer (GE Healthcare) ) に調製した。調製した各サンプルを pH3-10 の固相化 pH 勾配ストリップゲル (IPG) 11cm (Bio-Rad) を用いて二次元電気泳動の一次元目として等電点電気泳動を行い、二次元目として 5-20%プレキャストゲル (Bio-Rad) を用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行った[\*]。泳動後、蛍光染色剤である Flamingo™ (Bio-Rad)にて染色し、ProXPRESS 2D (PerkinElmer Inc.) を用いて撮影を行った。その後、Progenesis PG240 software (PerkinElmer Inc.) を用いてゲルイメージの各細胞株のサンプルから分離された蛋白質のスポットの発現強度を比較し、親株と比較して 1.5 倍以上特異的に発現が変化する蛋白質のスポットを選定した。その後、See Pico™ (Benebiosis co., Ltd) にてゲルを染め直し、スポットを可視化した。その後、親株と比較して 1.5 倍以上有意に変化 ( $p < 0.05$ ) したスポットをゲルより切り出した。親株とクローン株の比較には Student の  $t$  検定を用いた ( $n=5$ ) [13]。

#### 4.4 質量分析計による蛋白質の同定

See Pico™の色素を除去するために 60% methanol、50mM ammonium bicarbonate、5mM DTT を混合した液を用いて 3 回、各 15 分間、ゲル片を洗った。そして 50% acetonitrile、50 mM ammonium bicarbonate、5 mM DTT を用いて 2 回、各 10 分間、還元化を行った。そして、トリプシンが効率よくゲル内に浸透させるために 100% acetonitrile にて 2 回、各 30 分間、脱水操作を行い、Trypsin 溶液 (10 µg/ml sequencing grade modified trypsin (Promega, Madison, WI) in 30% acetonitrile、50 mM



ammonium bicarbonate、5 mM DTT) を加え 30°C、一晚、ゲル内 Trypsin 消化を行った。反応液を回収し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥したサンプルを 0.1% formic acid に溶き、21,500g、5 分間、遠心した上清を回収し、使用するまで-80°Cにて保存した。質量分析は Agilent 1100 LC/MSD Trap XCT (Agilent Technologies) を用いて行い、蛋白質の同定は Agilent Spectrum MILL MS proteomics workbench で行いデータベースは Swiss-Prot (<http://kr.expasy.org/sprot/>) を用いた[14]。

#### 4.5 Western blot 法

SDS-PAGE後にWestern blot法を行った場合には30 $\mu$ gのサンプルを用い、二次元電気泳動の後にWestern blot法を行った場合には40 $\mu$ gのサンプルを用いた。泳動後、PVDF膜 (Immobilon-P; Millipore) に転写し、5%スキムミルク添加Dulbecco's PBS (-)にて1時間ブロッキングを行った。一次抗体としてマウス抗GLO1ポリクローナル抗体を2,000倍に希釈し、4°C、一晚、反応させた。二次抗体としてHRP (horseradish peroxidase) 標識抗マウスIgG抗体を10,000倍に希釈し、1.5時間反応させECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を使用し検出した。検出したバンドをProgenesis PG240 software (PerkinElmer Inc.) を用いて定量化し比較した (n=5)。親株とクローン株を比較する場合にはStudentの *t* 検定を行った。



## 5.結果

### 5.1 二次元電気泳動像

以下に SN12C 細胞株の細胞系において pH range 3~10 と pH range 4~7 を選択した際に得られた代表的な二次元電気泳動像と親株に比べて 1.5 倍以上変化のあった蛋白質スポットを円で(図 1 左)、また拡大像を示す(図 1 右)。このスポットのみ低転移株と高転移株において転移能獲得に關与する可能性がある分子として同定された。

この蛋白質スポットは、我々の以前の報告にて高転移株において増加するスポットとして報告されたが、しかしながら、質量分析にて同定することができなかつたスポットである[4]。

今回、このスポットをゲルより切り出し、質量分析に供した。

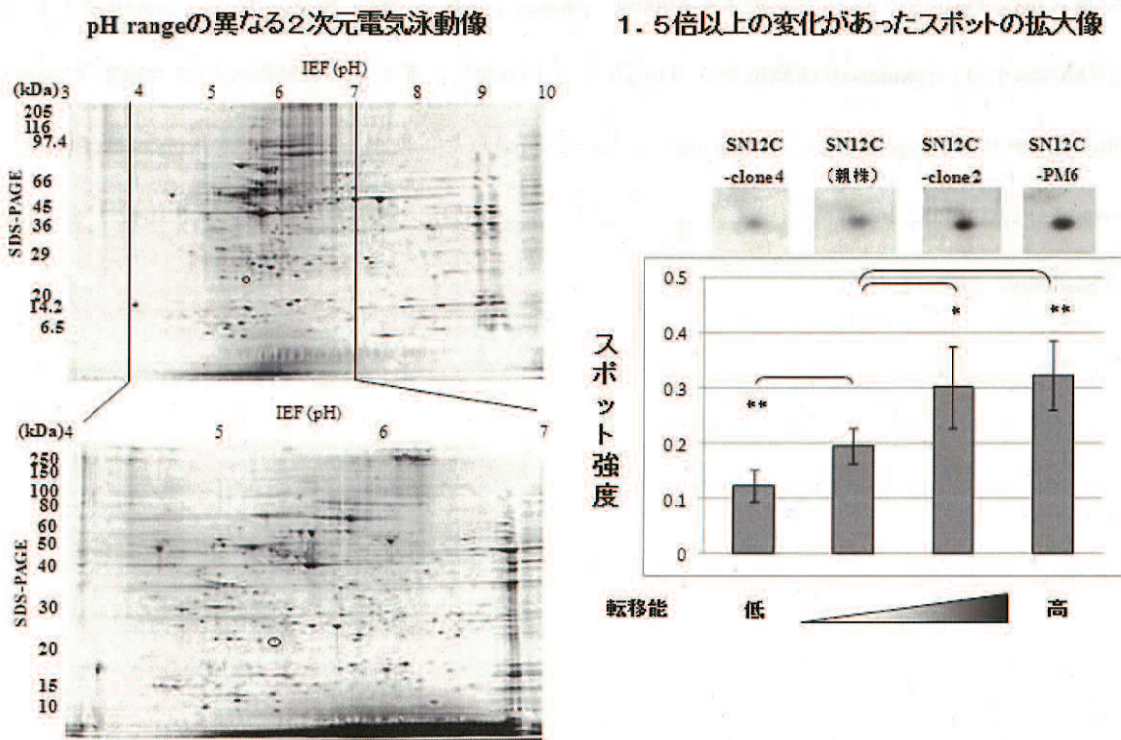


図 1. 左: 1次元目の pH range の異なる二次元電気泳動像。変化があったスポットを円で示してい

る。 (上: pH range 3~10 を選択した泳動像 下: pH range 4~7 を選択した泳動像) 右: 1.5 倍以上あったスポットの拡大像と強度 ※ mean±SD (n=5) \*=p<0.05、\*\*=p<0.01

## 5.2 質量分析計により同定された蛋白質

質量分析に供した蛋白質スポットは GLO1 と同定できた (表 1)。pH range を狭めることで広い range では同定が困難であったスポットも同定できることがあると分かった。

表 1. 質量分析計により同定された蛋白質

Accession No.	Theoretical pI	Theoretical Mr	Protein name	Distinct peptides	Sequence coverage (%)	MS/MS search score	低転移株		高転移株	
							clone4	clone2	PM6	
Q04760	5.12	20777.8	Glyoxalase 1 (GLO1)	4	25%	53.49	-	+	+	

※ \*=p<0.05、\*\*=p<0.01

※親株に比べ 1.5~2 倍以上変化のあったスポット=+ (親株より増加) or - (親株より減少)

### 5.3 ヒト癌転移モデルにおける glyoxalase 1 (GLO1) の発現量

#### 5.3.1 GLO1 の総発現量

同定した蛋白の総発現量を SN12C の親株と転移能の異なる 3 つのクローンについて Western blot 法を行い、Student の *t* 検定にて比較した (図 2)。

親株と 2 つの高転移株との間で GLO1 の増加は有意 (\*\*\*)  $p < 0.001$  ) であった。しかしながら、二次元電気泳動において見られた低転移において発現量の変化を見る事ができなかった。

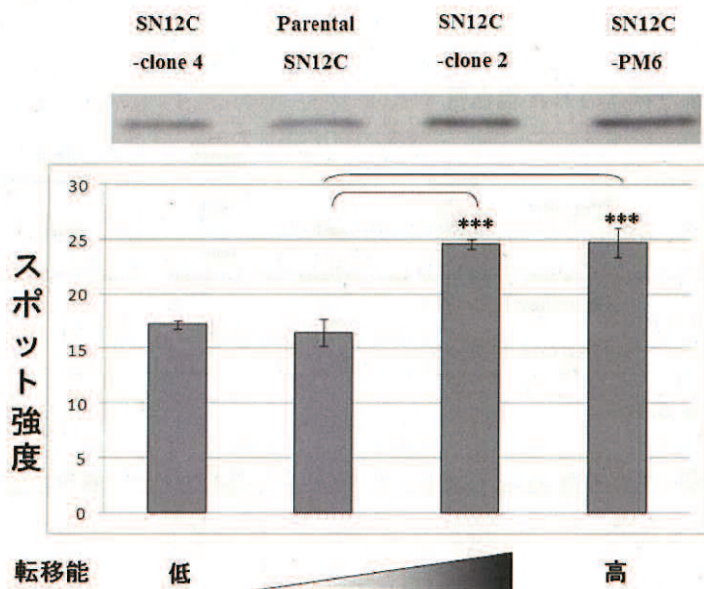


図 2. Western blot 法における SN12C の細胞系の GLO1 の総発現量比較

※ mean ± SD \*\*\* =  $p < 0.001$  (n=6)



### 5.3.2 GLO1 アイソフォーム

Western blot 法による GLO1 の総発現量の検討を踏まえ、アイソフォームの存在を疑い二次元電気泳動後に Western blot 法を行い、アイソフォームを確認した (図3)。

Western blot 法にて4つのアイソフォームが確認できた。そして、実際に質量分析にて同定できた GLO1 のスポットは3と4である。この Spot 4は二次元電気泳動によるディファレンシャルディスプレイにて有意に発現量の変化があったスポットと一致する。

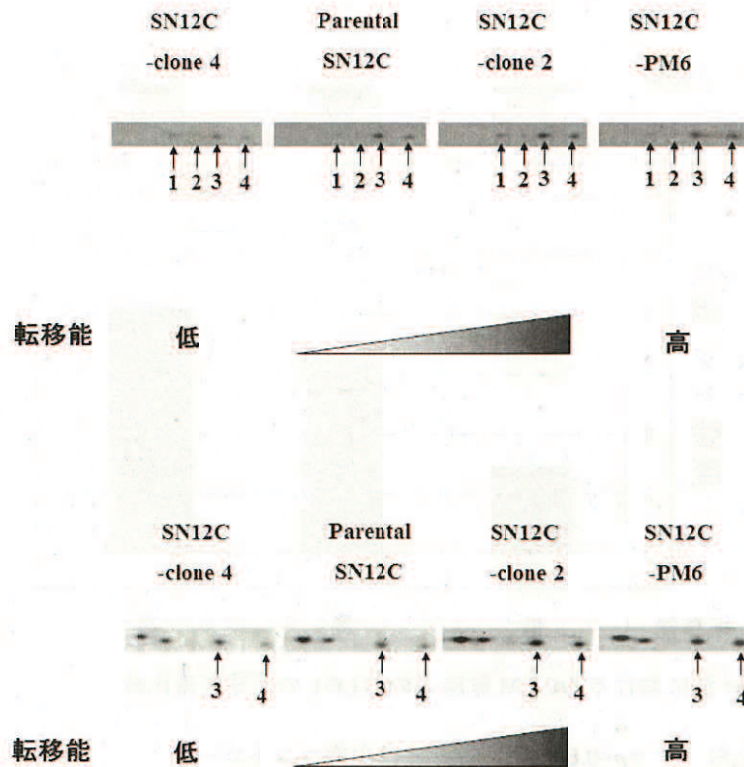


図3. 二次元電気泳動後に Western blot 法を行いアイソフォームの確認 (上: Western blot 法にて確認できた UCH-L1 下: Western blot 法にて確認できたスポットと一致する二次元電気泳動像)

#### 5.4 他の転移モデルにおける GLO1 の発現の検討

スキルス胃癌の転移モデルとして知られている OCUM の細胞株系において Western blot 法による GLO1 の総発現量の検討を行った (図 4)。OCUM 細胞系においても低転移株に比べ高転移株にて GLO1 の発現量が亢進していることが分かった。

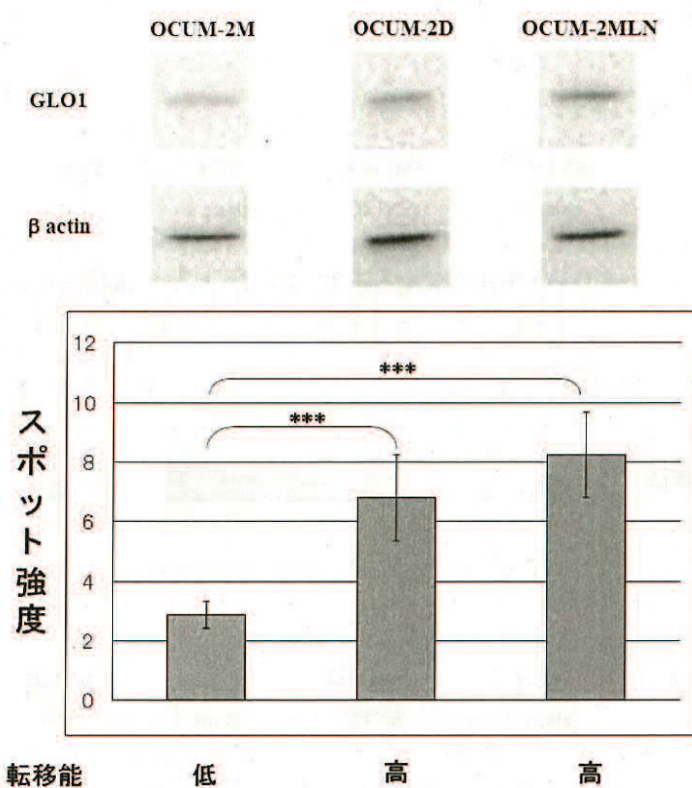


図 4. Western blot 法における OCUM 細胞系の GLO1 の総発現量比較

※ mean ± SD (n=5) \*\*\*= $p < 0.001$ 、β actin は内部コントロール

## 6. 考察

今回、前回の二次元電気泳動において pH range 4~7 付近に多くの蛋白質が存在したことを踏まえ [4]、pH range を絞った二次元電気泳動を行い、転移能の変化に伴い蛋白量が変化する蛋白を検索した。SN12C の細胞系において GLO1 のみ転移能の変化に伴い蛋白量が変化するスポットであった。Western blot 法による GLO1 の総量は高転移株にて優位に増加しており、アイソフォームのうち Spot 4 が転移能の変化に伴い蛋白量が変化した。OCUM 細胞系においても GLO1 が高転移株において優位に増加していた。

GLO1 は解糖系の副産物に関わる分子の一つで、メチルグリオキサールなどの反応性の  $\alpha$ -オキサロアルデヒドを分解する役割を果たしている [15]。また、GLO1 の活性はグルタチオンの細胞内濃度に比例する [15, 16]。GLO1 の発現量と自然発生した様々な癌において多くの報告がある [17-20]。また、GLO1 のアイソフォームに関して NO 反応性 GLO1 やリン酸化の翻訳後修飾の報告があるが [21-24]、優位に変化していたスポットの翻訳後修飾は分からなかった。Whan-Li 等 [17]によると、GLO1 が高発現した胃癌細胞株において *in vitro* と *in vivo* において転移能の亢進が見られたと報告している。メチルグリオキサールは長い間、天然抗癌剤とされており GLO1 インヒビターは抗癌剤として使用できる可能性があると考えられてきた [25, 26]。Santel 等 [25]によるとクルクミンは GLO1 のインヒビターで強い増殖性と浸潤性がある癌細胞に良く効いたと報告している。最近、GLO1 は methl-gerfelin (M-GFN) 結合蛋白として報告され、M-GFN は GLO1 の酵素活性を *in vitro* と *in situ* にてインヒビターとして働く [27]。また Imoto [28]が M-GFN が癌細胞株の浸潤を抑制すると報告している。これらの結果より、GLO1 の増加は SN12C の細胞系において、転移に有利に働くことが示唆される。さらに、GLO1 を抑制することが癌転移の治療ターゲットになる可能性が示唆された。しかし、どのようにして SN12C において高い転移能を与えているのか、メカニズムは以前、不明のままである。



## 7. 結語

本研究はpH range の異なる固定化pH勾配ゲルストリップを用いた二次元電気泳動法による転移能の異なる腎細胞癌株の比較プロテオミクスを行い、より詳細に転移に関与する可能性のある蛋白質の同定を試みたものである。今回、GLO1のみ高転移株で増加し、低転移株で低下する蛋白として同定された。また、GLO1の増加はスキルス胃癌の転移モデルであるOCUM細胞系の高転移株においても見られた。また、多くの報告がUCH-L1と腫瘍との関係を示唆している[23-26]。よって、GLO1が転移能獲得において何らかの役割を果たしていると考えられる。今後、転移能とGLO1、UCH-L1について機能を明らかにし、それぞれの蛋白質発現が変化するメカニズムの解明が必要である。

## 8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり御指導いただきましたプロテオーム・蛋白機能制御学分野の中村和行教授、蔵満保宏准教授をはじめとする教室員の皆様に心より御礼申し上げます。また、ヒト腎細胞癌細胞株を提供していただいた九州大学医学研究院臨床医学部門外科学講座の内藤誠二教授、ヒトスキルス胃癌細胞株を提供していただいた大阪市立大学大学院医学研究科腫瘍外科学講座の八代正和准教授に心より御礼申し上げます。

## 9. 参考文献

- [1] Naito, S., von Eschenbach, A. C., Giavazzi, R., Fidler, I. J., *Cancer Res.* 1986, 46, 4109-4115.
- [2] Naito, S., Walker S. M., von Eschenbach, A. C., Fidler, I. J., *Anticancer Res.* 1988, 8, 1163-1168.
- [3] Naito, S., Walker, S. M., Fidler, I. J., *Clin. Exp. Metastasis* 1989, 7, 381-389.
- [4] Tanaka, T., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M., Naito, S., Oka, M., Nakamura, K., *Electrophoresis* 2008, 29, 2651-2659.
- [5] Geiger, T. R., Peeper, D. S., *Biochim Biophys Acta - Reviews on Cancer* 2009, 1796, 293-308.
- [6] Fidler, I. J., *Cancer Res* 2006, 66, 987.
- [7] Yashiro, M., Chung, S. Y., Nishimura, S., Inoue, T., Sowa, M., *Clin Exp Metastasis*, 1996, 14, 43-54.  
1996
- [8] Fujihara, T., Sawada, T., Hirakawa, K., Chung, S. Y., Yashiro, M., Inoue, T., Sowa, M., *Clin Exp Metastasis* 1998, 16, 389-398.
- [9] Fukagawa, Y., Nishikawa, J., Kuramitsu, Y., Iwakiri, D., Takada, K., Imai, S., Satake, M., *et al. Electrophoresis* 2008, 29, 3192-3200.
- [10] Mori-Iwamoto, S., Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Taba, K., Fujimoto, M., Okita, K., Nakamura, K., Sakaida, I., *Mol Med Rep*, 2008, 1, 429-434.
- [11] Mori-Iwamoto, S., Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Mikuriya, K., Fujimoto, M., Maehara, S., Maehara, Y., *et al.*, 2007, *Int J Oncol*, 31, 1345-1350.
- [12] Hayashi, E., Kuramitsu, Y., Okada, F., Fujimoto, M., Zhang, X., Kobayashi, M., Iizuka, N., *et al.*, 2005, *Proteomics*, 5, 1024-1032.
- [13] Kuramitsu, Y., Miyamoto, H., Tanaka, T., Zhang, X., Fujimoto, M., Ueda, K., Tanaka, T., *et al.*, 2009, *Proteomics* 9, 5078-5089.



- [14] Tamesa, M., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M., Maeda, N., Nagashima, Y., Tanaka, T., Yamamoto, S., *et al.*, 2009, *Electrophoresis*, 30, 2168-2181.
- [15] Shinohara, M., Thornalley, P. J., Giardino, I., Beisswenger, P., Thorpe, S. R., Onorato, J., Brownlee, M., 1998, *J Clin. Invest.*, 101, 1142-1147.
- [16] Thornalley, P. J., *Biochem Soc Trans*, 2003, 31, 1343-1348.
- [17] Whan-Li, C., Ming-Ming, T., Chung-Ying, T., Ya-Hui, H., Cheng-Yi, C., Hsiang-Cheng, C., Aheng-Ming, W., *et al.*, 2012, *PLoS ONE* 7, e34352.
- [18] Wang, Y., Kuramitsu, Y., Ueno, T., Suzuki, N., Yoshino, S., Izuka, N., Akada, J., *et al.*, 2012, *Anticancer Res*, 32, 3219-3222.
- [19] Jones, M. B., Krutzsch, H., Shu, H., Zhao, Y., Fonseca-Sánchez, M. A., Rodríguez Cuevas, S., Mendoza-Hernández, G., Bautista-Piña, V., Arechaga Ocampo, E., Hidalgo Miranda, A., Quintanar Jurado, V., *et al.*, 2012, *Int J Oncol*, 41, 670-680.
- [20] Jones, M. B., Krutzsch, H., Shu, H., Zhao, Y., Liotta, L. A., Kohn, E. C., Petricoin III, E.F., 2001, *Proteomics*, 2, 76-84.
- [21] Mitsumoto, A., Kim, K. R., Oshima, G., Kunimoto, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nakagawa, Y., 1999, *Biochem J*, 344, 837-844.
- [22] de Hemptinne, V., Rondas, D., Vandekerckhove, J., Vancompernelle, K., 2007, *Biochem J*, 407, 121-128.
- [23] de Hemptinne, V., Rondas, D., Toepoel, M., Vancompernelle, K., 2009, *Mol. Cell biochem.* 325, 169-178.
- [24] Van Herreweghe, F., Mao, J., Chaplen, F. W., Grooten, J., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Vancompernelle, K., 2002, *Proc. Natl Acad Sci USA* 99: 949-954.

- [25] Santel, T., Pflug, G., Hemdan, N. Y. A., Schäfer, A., Hollenbach, M., Buchold, M., Hintersdorf, A., *et al.*, 2008, *PLoS ONE*, 3, e3508.
- [26] Tsuruo, T., Naito, M., Tomida, A., Fujita, N., Mashima, T., Sakamoto, H., Haga, N., 2003, *Cancer Science*, 94, 15-21.
- [27] Kawatani, M., OCUMura, H., Honda, K., Kanoh, N., Muroi, M., Dohmae, N., Takami, M., *et al.*, 2008, *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 11691-11696.
- [28] Imoto, M.: Isolation of novel GGPP synthase-inhibitor Gerfelin and evaluation of its activity. 2004, *Bunshi, Chobunshi, Chokozotai Rikogaku Heisei 15 Nendo Kenkyu Seika Hokokusho Gakujutsu Furonthia*, 597-656 (in Japanese).