

グルタチオン化プロテオミクスによるがん細胞 の酸化ストレス応答反応解析法の確立

新潟大学 医歯学系 小林 大樹

がんは2人に1人の割合で発症するとされ、今なおがんの死亡数と罹患数は増加し続けており、深刻な社会的問題となっている。がんの発症要因の一つに、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) 等の生体分子が引き起こす非特異的 DNA 損傷によって生じる変異蓄積が挙げられる。ROS の上昇は酸化ストレスを引き起こし細胞にとって有害であるが、がん細胞は酸化ストレスを回避するために細胞内のグルタチオン濃度を上昇させる機構を獲得することが示されている。一方、ROS はタンパク質の S-グルタチオン化を誘導し、様々なタンパク質の機能を変化させることで、細胞の表現型に影響を与えることが知られている。タンパク質の S-グルタチオン化は、酸化ストレス時においてレドックス制御に役割を果たし、また細胞内シグナル経路等を制御することが報告されているが、その詳細な生物学的あるいは医学的意義に関しては不明な点が多い。タンパク質の S-グルタチオン化の包括的な解析は、がん細胞の酸化ストレス耐性機構を理解する上で、極めて重要な情報を与えるが、現時点ではタンパク質 S-グルタチオン化を網羅的に解析する手法が存在しない。そこで本研究は、タンパク質 SH 基の選択的修飾法とチオールアフィニティー精製を組み合わせることで、タンパク質グルタチオン化を網羅的に解析できる技術を確立し、がん細胞の酸化ストレス応答反応をタンパク質グルタチオン化を指標に解析することを目的とした。さらに本研究で見出された本研究で見出されたグルタチオン化修飾を介したがんの発症の要因となり得る酸化ストレス耐性機構の分子作用機序を詳細に解析した。

酸化ストレスが発がんに関与することが知られている肺がんや肝がん培養細胞に過酸化水素を処理し、タンパク質グルタチオン化を誘導した。これらの細胞から抽出したタンパク質を、グルタチオン化選択的な還元処理を行い、チオールアフィニティー精製によって還元型チオール基を含有したタンパク質を濃縮した。LC-MS/MS によるショットガンプロテオーム解析によって包括的にグルタチオン化タンパク質を同定し、同定したシステイン含有ペプチドリストを Uniprot データベースに登録されたグルタチオン化修飾サイトと照合した結果、同定されたシステインの部位は既知のグルタチオン化修飾サイトを含む一方で、新規のグルタチオン化修飾部位が多数同定されていることが示唆された。得られた定量値を含むデータを用いて統計処理やインシリコ分子ネットワーク解析を行った結果、過酸化水素処理によってタンパク質翻訳関連因子のグルタチオン化が誘導されていることを見出した。特に、翻訳活性化因子であるがん関連分子である

translationally controlled tumor protein (TCTP)の2つのシステインのグルタチオン化が過酸化水素処理によって誘導され、TCTPのグルタチオン化を介してがん特異的な翻訳機能を制御していることが明らかとなった。以上の結果から、本研究で確立したタンパク質グルタチオン化の網羅的解析法は、がん細胞の酸化ストレス耐性機構の解明に貢献できると考えられた。