

## 学 位 論 文 要 旨

定量プロテオミクスとバイオインフォマティクスのアプローチによる薬剤のタンパク質複合体への影響解析手法の開発

Novel Approach for Detecting the Effects of a Drug on Protein Complexes by Quantitative Proteomics and Bioinformatic Approaches

応用生命科学専攻 応用生物化学大講座

黒川 奈月

タンパク質は遺伝子発現、細胞増殖、代謝プロセス、翻訳、転写、mRNA スプライシング、シグナル伝達等のほぼ全ての細胞機能において重要な役割を果たす。この際、細胞内においてタンパク質は単独ではなく、互いに相互作用し、複合体を形成することで機能する。さらに、タンパク質複合体間では細胞内でお互いにネットワークを構成し、細胞機能を制御している。疾患治療に用いられる薬剤は、特定のタンパク質複合体あるいは複合体間のネットワークに影響を与えることによって薬理作用を発揮すると考えられるが、薬剤のこれらへの影響を解析する方法論は確立されていない。

本研究は、薬剤がタンパク質複合体あるいはそれらのネットワークへ与える影響を解析するための新しい方法論の確立を目的とした。そのために、タンパク質複合体の構成タンパク質間の相互作用状態を保持したまま分離する高速液体イオン交換クロマトグラフィー (Ion-Exchange Chromatography; IEC) 法と、質量分析法によるタンパク質定量法の一つである **stable isotope labeling using amino acids in cell culture (SILAC)- LC-MS/MS** を組み合わせた新しいタンパク質解析法を考案し、この方法の有効性を薬剤としてのサリドマイドが与えるタンパク質複合体への影響を解析することで検証した。

サリドマイドは鎮静・催眠薬としての西ドイツでの上市直後に、催奇形性が原因で市場撤退したが、その後の研究結果から優れた抗癌活性が認められ、現在は多発性骨髄腫の治療薬として使われている。また肝細胞癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌等の癌に対しても、細胞増殖、血管新生を阻害し、癌の浸潤と転移を抑制する効果が認められ治療薬としての利用拡大が期待されている。しか

し、その有用性にもかかわらず、薬剤の薬効と副作用の関係を明らかにする作用機序の詳細のほとんどは未解明である。

本研究では、このサリドマイドの影響を調べる実験対象としてヒト肝癌由来細胞株である HepG2 を用いた。HepG2 細胞は、従来から数多くの *in vitro* 実験において汎用されており、加えて、先行研究において肝癌へのサリドマイドの有効性が報告されている。本研究でタンパク質の比較定量に用いる SILAC 法は、細胞の代謝を利用して細胞内タンパク質に安定同位体標識したアミノ酸を取り込ませ、そのアミノ酸に由来するペプチド質量の差を利用して、タンパク質を定量的かつ網羅的に解析するプロテオミクスの研究において広く使われている。タンパク質複合体の分離に用いた IEC は、本来は電荷状態の違いによってタンパク質を分離する方法である。本研究では、解析対象であるタンパク質複合体の形成を維持したまま分離することを目的とし、移動相中の有機溶媒含有を最低限にし、酢酸アンモニウム濃度勾配を用いた、タンパク質間の物理的相互作用が失われない穏やかな溶出条件を用いた。この条件下では、一つのタンパク質複合体に含まれる構成タンパク質は同じ挙動で溶出されるとの原理に基づき、IEC で分離したフラクション全てについて、SILAC-LC-MS/MS によりフラクション中に含まれるタンパク質の定量データを取得した。

次に、サリドマイドの影響により変動したタンパク質複合体の探索を目的に、SILAC-LC-MS/MS データを階層的クラスタリング解析に供した。IEC で分離された各フラクションにおいて、コントロール (DMSO 処理) に対するタンパク質の量変動が同一方向 (増加、又は減少) であるもの、及び溶出パターンに高い類似性があるものを同じクラスターとして分類し、タンパク質複合体を抽出した。その結果、HepG2 細胞内でサリドマイドの影響により変動したと考えられる 135 種類のタンパク質複合体を特定した。

さらに、これら 135 種類のタンパク質複合体とサリドマイドの既知作用機序との関連性及びサリドマイドの未知の作用機序を解析するために、タンパク質複合体の構成分子について、分子パスウェイ・ネットワーク解析、及び Gene ontology (GO) 解析を行った。その結果、135 種類の中から、複数のサリドマイド既知相互作用タンパク質を含むタンパク質複合体を 12 種類特定した。それらの構成分子から形成される分子パスウェイ、及びそれらの分子が分類される GO を調べ、サリドマイド作用機序との関連が見られる細胞機能を推定した。これらの解析によって、NRF2 酸化ストレス応答系や DNA 損傷応答等、これまでに報告されている知見と一致するものに加え、mRNA スプライシング機構や AHR シグナル伝達系等の既報にはない新規のものを見いだした。さらに、これらの細胞機能について、ネットワーク解析、及び先行研究と比較した結果、これらの細胞機能はサリドマイドの影響を受けている新たな細胞機能であると結論付けた。以上より、本研究で検証した方法論は、他の薬剤の作用機序解析にも適用可能であると考えられる。本研究が薬剤のタンパク質複合体への作用機序の解明を通して、主作用及び副作用の分子メカニズムを解明し、また標的疾患の病態メカニズムを解明する一助となることが期待される。