

# 博士論文（要約）

大腸がん細胞で高発現する新奇膜タンパク質

TMEM180 の構造機能解析および

抗 TMEM180 抗体の解析と改変

安西 高廣

## 目次

目次 .....	1
略語表 .....	5
<b>第 1 章 序論</b> .....	<b>7</b>
1.1 大腸がんの治療 .....	7
1.2 分子標的薬 .....	7
1.2.1 Bevacizumab (ベバシズマブ) .....	7
1.2.2 Ramucirumab (ラムシルマブ) .....	8
1.2.3 Cetuximab (セツキシマブ) .....	8
1.2.4 Panitumumab (パニツムマブ) .....	8
1.2.5 Afibercept (アフリベルセプト) .....	9
1.2.6 Regorafenib (レゴラフェニブ) .....	9
1.3 研究の目的 .....	9
<b>第 2 章 抗 TMEM180 ラット IgM 抗体の解析および改変</b> .....	<b>11</b>
2.1 はじめに .....	11
2.2 材料と方法 .....	11
2.2.1 IgM 抗体の高純度精製法の確立 .....	11
2.2.2 抗体遺伝子のクローニング .....	11
2.2.3 ヒトキメラ化抗体への改変 .....	11
2.2.4 細胞培養 .....	11
2.2.5 トランスフェクション .....	11
2.3 結果と考察 .....	11

2.3.1	IgM 抗体の高純度精製法の確立 .....	11
2.3.2	抗体遺伝子のクローニング .....	11
2.3.3	ヒトキメラ化抗体への改変 .....	11
2.3.4	現状と今後の展望 .....	11
<b>第 3 章 ヒト TMEM180 の大腸がん細胞における発現・機能解析 .....</b>		<b>12</b>
3.1	はじめに .....	12
3.2	材料と方法 .....	12
3.2.1	細胞培養 .....	12
3.2.2	細胞免疫染色 .....	12
3.2.3	リアルタイム PCR .....	13
3.2.4	TMEM180 ノックダウン細胞 (KD 細胞) 作製 .....	13
3.2.5	TMEM180 KD 細胞増殖能比較 .....	13
3.2.6	リン酸化プロテオミクス .....	14
3.2.7	メタボロミクス .....	14
3.3	結果と考察 .....	14
3.3.1	公共データのメタ解析 (既存の大腸がんマーカーと比較) .....	14
3.3.2	TMEM180 の大腸がん細胞における発現解析 .....	15
3.3.3	網羅的オミクス解析 .....	16
3.3.4	現状と今後の展望 .....	16
<b>第 4 章 ヒト TMEM180 タンパク質のトポロジーおよび局在解析 .....</b>		<b>17</b>
4.1	はじめに .....	17
4.2	材料と方法 .....	17

4.2.1	細胞および細胞培養 .....	17
4.2.2	Plasmid construction.....	17
4.2.3	トランスフェクション.....	19
4.2.4	細胞免疫染色.....	19
4.2.5	生細胞染色 .....	19
4.2.6	in silico 解析.....	19
4.2.7	ホモロジーモデリング.....	20
4.3	結果と考察 .....	20
4.3.1	ヒト TMEM180 のトポロジーの in silico 解析.....	20
4.3.2	ヒト TMEM180 のホモロジーモデルの構築.....	21
4.3.3	ホモロジーモデルを基にした TMEM180 の配列解析.....	21
4.3.4	ヒト TMEM180 のトポロジー解析.....	22
4.3.5	TMEM180 の細胞内局在解析.....	23
4.3.6	現状と今後の展望.....	23
<b>第5章</b>	<b>マウス Tmem180 の解析.....</b>	<b>24</b>
5.1	はじめに.....	24
5.2	材料と方法 .....	24
5.2.1	Tmem180 ノックアウト(Tmem180-KO)マウス作製.....	24
5.2.2	マウス臓器重量測定 .....	24
5.2.3	マウス血液の生化学検査 .....	24
5.2.4	メタボロミクス解析 .....	24

5.2.5	マイクロアレイデータの取得 .....	24
5.2.6	マウス初期胚の RNA-seq データ .....	24
5.2.7	細胞および細胞培養 .....	24
5.2.8	Tmem180 の発現解析 .....	24
5.3	結果と考察 .....	24
5.3.1	ヒト TMEM180 とマウスの TMEM180 のアミノ酸配列比較 .....	24
5.3.2	Tmem180-KO マウスの解析 .....	24
5.3.3	Tmem180-KO マウスの妊孕性解析 .....	24
5.3.4	野生型マウスと Tmem180-KO マウスの臓器重量比較 .....	24
5.3.5	野生型マウスと Tmem180-KO マウスの血液生化学検査 .....	24
5.3.6	野生型マウスと Tmem180-KO マウスのメタボロミクス解析 .....	24
5.3.7	初期胚におけるマウス Tmem180 の発現解析 .....	24
5.3.8	現状と今後の展望 .....	24
<b>第 6 章</b>	<b>総括 .....</b>	<b>25</b>
	<b>図表 .....</b>	<b>26</b>
	<b>参考文献 .....</b>	<b>47</b>
	<b>謝辞 .....</b>	<b>56</b>
	<b>論文目録 .....</b>	<b>58</b>

## 略語表

ADCC : antibody dependent cellular cytotoxicity

AcGFP : aequorea coerulescens green fluorescent protein

BRAF : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

cDNA : complementary DNA

CDR : complementarity determining region

CE-TOFMS : capillary electrophoresis-time of flight mass spectrometry

CTCF : CCCTC-binding factor

EGF : epidermal growth factor

EGFR : epidermal growth factor receptor

EpCAM : epithelial cell adhesion molecule

FBS : fetal bovine serum

GOT/AST : glutamic oxaloacetic transaminase / aspartate transaminase

GPT/ALT : glutamic pyruvic transaminase / alanine transaminase

HDL : high density lipoprotein

HIF-1 : hypoxia inducible factor-1

Ig : immunoglobulin

IRES : internal ribosome entry site

JAK : janus kinase

KD : knockdown

KO : knockout

LC-TOFMS : liquid chromatography-time of flight mass spectrometry

LGR5 : leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MFSD13A : major facilitator superfamily domain containing 13A

MOI : multiplicity of infection

mRFP : monomeric red fluorescent protein

PBS : phosphate buffered saline

PDX : patient derived xenograft

PFA : paraformaldehyde

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PIGF : placental growth factor

qRT-PCR : quantitative real-time PCR

SBP : streptavidin-binding peptide

SDS : sodium dodecyl sulfate

shRNA : short hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

SNP : single nucleotide polymorphism

STAT : signal transducers and activators of transcription

TM : transmembrane

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor

# 第1章 序論

## 1.1 大腸がんの治療

大腸がんは大腸にできるがんであり、そのうち結腸にできるがんは結腸がん、直腸にできるがんは直腸がんと呼ばれている。大腸がんは日本において罹患数1位、死亡数2位のがん[1] (Figure1-1A) であり、主な治療法は大腸の内側からがんを切除する内視鏡治療、がんを手術で切除する外科治療、電離放射線を照射して再発を抑える放射線治療、がん細胞に障害を与える薬剤を用いる薬物療法がある[2] (Figure1-1B)。薬物療法には「補助化学療法」(根治切除が行われた患者さんに対する再発抑制を目的)と「切除不能進行・再発大腸がんに対する化学療法」(手術による治癒が難しく、がんを小さくして手術可能にする、がんの進行を抑え延命、症状の改善を目的)がある[2]。近年、大腸がんによく発現している分子に対する分子標的薬が「切除不能進行・再発大腸がんに対する化学療法」における併用剤として用いられるようになり、治療成績の向上に寄与している[3] (Figure1-1B)。

## 1.2 分子標的薬

従来の低分子抗がん剤は、代謝拮抗、DNAの複製阻害、微小管阻害などによってがん細胞の増殖抑制を狙うが、正常細胞でも分裂増殖が速い細胞には作用してしまい、少なからず副作用が問題となっていた。分子標的薬は、標的とする分子の機能を阻害することで分子が発現した細胞の増殖を阻害し、死滅させるための薬剤であり、がん細胞によく発現している分子がターゲットであれば、副作用が少ない薬剤となることが期待され、現在では広く臨床応用されている[4]。以下に現在大腸がんの薬物療法に用いられている分子標的薬について述べる (Figure1-1C)。

### 1.2.1 Bevacizumab (ベバシズマブ)

血管内皮増殖因子VEGF (vascular endothelial growth factor) は多くのがん細胞で発現亢進しており、がん細胞の浸潤や転移、再発に関与している[5]。ベバシズマブ[6]はマウス抗ヒトVEGF抗体をヒト化したモノクローナル抗体で、VEGFに結合することでVEGFのVEGF受容体への結合を阻害する。これによりVEGFのシグナル伝達を阻害し、腫瘍血管新生を抑制することで抗腫瘍効果が得られる。



### 1.2.2 Ramucirumab (ラムシルマブ)

血管内皮増殖因子受容体 VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) は受容体型チロシンキナーゼであり、血管内皮細胞に発現し、VEGF をリガンドとして 2 量体化し、細胞内シグナル伝達に直接関与している[7]。ラムシルマブ[8]は VEGFR2 に対するヒトモノクローナル抗体である。VEGFR2 にラムシルマブが結合することにより、VEGFR2 のリガンドである VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D が VEGFR2 に結合するのを阻害する。これにより VEGFR2 のシグナル伝達が抑制され、血管内皮細胞の増殖阻害が起こることによって抗腫瘍効果が得られる。

### 1.2.3 Cetuximab (セツキシマブ)

上皮成長因子受容体 EGFR (epidermal growth factor receptor) は受容体型チロシンキナーゼであり、細胞膜表面上に発現する。上皮成長因子 EGF (epidermal growth factor) が EGFR に結合すると、EGFR は 2 量体化し、MAPK 経路、PI3K/AKT 経路、JAK/STAT 経路などのシグナル経路が活性化され、細胞増殖が起こる[9]。セツキシマブ[10]はマウス抗ヒト EGFR 抗体をヒトキメラ化した IgG1 モノクローナル抗体で、EGFR の EGF 結合部位に結合し、EGF が結合するのを阻害し、EGFR の 2 量体化、シグナル伝達を阻害することでがん細胞の増殖、転移などが抑制され、抗腫瘍効果が得られる。

### 1.2.4 Panitumumab (パニツムマブ)

パニツムマブ[11]はセツキシマブと同様に EGFR をターゲットとするヒトモノクローナル抗体である。作用機序はセツキシマブと同様であるが、パニツムマブはセツキシマブより EGFR に対する親和性が高く[12]、完全ヒト抗体のため、ヒトマウスキメラ化抗体のセツキシマブより副作用が少ないと考えられる[13]。一方、パニツムマブは IgG2 であり、IgG1 であるセツキシマブのような ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) 活性が得られないという差異もある[14]。

### 1.2.5 Aflibercept (アフリベルセプト)

アフリベルセプト[15]は、VEGFR1のIg様ドメイン2とヒトVEGFR2のIg様ドメイン3を融合し、さらにそれをヒトIgG1の定常領域(Fcドメイン)に融合することにより作製された二量体の糖タンパク質である。VEGFRに結合することで、VEGF-A、VEGF-BおよびVEGFファミリーに属する胎盤増殖因子(PlGF)との結合を阻害、腫瘍血管の新生を阻害することで抗腫瘍効果が得られる[16]。

### 1.2.6 Regorafenib (レゴラフェニブ)

レゴラフェニブ[17]は、腫瘍血管新生(VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、TIE2)、腫瘍微小環境(PDGFR、FGFR)および腫瘍形成(KIT、RET、RAF-1、BRAF)に関わる複数のキナーゼを阻害する作用を持つマルチキナーゼ阻害剤である。特に、腫瘍血管の新生を阻害することで抗腫瘍効果が得られると考えられている。前述の生物製剤とは異なり、低分子化合物であるため、経口で投与される[18]。標準治療後の切除不能進行・再発大腸がん患者に対する第3相試験(CORRECT試験)では90%以上の患者さんに何らかの副作用が見られており[19]、副作用対策が投与のための課題である。

## 1.3 研究の目的

大腸がんの分子標的薬として、前述の薬剤が既に臨床の現場で用いられている[2,3](Figure1-1B,C)。しかし、これらの薬のターゲットであるVEGFやVEGFR、EGFRは正常細胞でも発現しており、副作用の問題が依然として残っている。また、EGFRの下流のRAS遺伝子に変異がある患者さんには、抗EGFR抗体薬投与による利益(延命効果、腫瘍縮小)が得られない可能性が高い[20]とされており、このような既存の抗体医薬が不応答の患者さんにも効果のある抗体医薬開発が常に強く望まれている。これらの問題解決のためには、正常組織では発現が低く、大腸がん特異的に高発現している分子を発見し、その分子に対する抗体医薬を新規に開発することが必要である。大腸がん手術標本において正常粘膜部分と腫瘍部分をそれぞれレーザーマイクロダイセクション法で回収し、正常と腫瘍の比較を行うことが従来の方法であった[21]。しかしこの場合、正常粘膜部分を狙って回収したとしても、必ず血球系細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞が混じるため、真に大腸がん特異的な分子を探索できるとは限らない。そこで当研究室で

は、便中に生きたまま剥離されている正常粘膜上皮細胞[22]を利用することを着想した。健常者の内視鏡検査後に大腸内腔を生理食塩水で洗浄し、洗浄液を回収、抗 EpCAM 抗体付加ビーズを用い、100%ピュアな正常大腸粘膜剥離細胞を回収する事に成功した。この正常細胞と大腸がん細胞との間での網羅的発現解析と qRT-PCR、in situ hybridization を行うことで、真に大腸がん細胞で特異的に高発現する膜タンパク質を数種発見した[23] (Figure1-2)。その1つとして見出したのが機能未知の分子である TMEM180 である[24] (Figure1-3)。TMEM180 が大腸がん細胞由来のエクソソーム上にも分泌して出てくることを見出し、エクソソームをラットに免疫することによって、抗 TMEM180 ラット IgM モノクローナル抗体の樹立に成功した[24]。

本研究では、樹立した抗 TMEM180 抗体を含む IgM 抗体の精製法の確立、および抗 TMEM180 ラット IgM モノクローナル抗体の遺伝子解析とヒトキメラ化抗体への改変を行うこと(第2章)で抗 TMEM180 抗体の臨床応用に向けた基礎研究を、また TMEM180 は別名 MFSD13A (major facilitator superfamily domain-containing 13A) とも呼ばれるものの、詳細は不明であり、これまで1報も報告のない機能未知分子であることから、TMEM180 の大腸がん細胞における発現解析(第3章)、ヒト TMEM180 構造機能解析と局在解析(第4章)、ノックアウトマウスを含めたマウス *Tmem180* の機能解析(第5章)を行うことで、TMEM180 ががん細胞においてどのような分子機能を有しているのかを明らかにすることを目的とした。

## 第 2 章 抗 TMEM180 ラット IgM 抗体の解析および改変

5 年以内に出版予定

## 第3章 ヒト TMEM180 の大腸がん細胞における発現・機能解析

### 3.1 はじめに

TMEM180 は、健常者の大腸粘膜剥離細胞と大腸がん細胞株との比較により、大腸がん細胞で高発現する分子として見出されてきた[24]。しかし、これまでに TMEM180 に関する報告は一つもなく、機能は全く未知であった。そこで本章では、ヒト TMEM180 の大腸がん細胞における種々の発現機能解析を行うこととした。まず、機能の手がかりを得るため、公共データベースを用いたメタ解析を行った。次に TMEM180 のプロモーター領域の解析を行った。さらに、TMEM180 遺伝子をノックダウンした大腸がん細胞株を樹立し、増殖能の検討と、発現解析、網羅的オミクス解析を行った。

### 3.2 材料と方法

#### 3.2.1 細胞培養

実験で使用した SW480、DLD-1 は、国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野にて保管されていたものを用いた。D-MEM low glucose (Wako) に 10% FBS (Thermo Fisher Scientific) および 1% penicillin–streptomycin–amphotericin B suspension (Wako) を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養を行った。低酸素環境下での培養は、BIONIX2 hypoxic cell culture kit (Sugiyamagen) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub> 下で行った。

#### 3.2.2 細胞免疫染色

スライドチャンバーを PBS で洗浄し、4% PFA/PBS (Wako) で 15 分間固定化した。PBS で洗浄し、0.1% Triton X-100/PBS を添加して 10 分膜透過処理を行い、PBS で洗浄した後、5% スキムミルク/PBS で室温 1 時間または 4°C オーバーナイトでブロッキングを行った。R-Phycoerythrin Labeling Kit-SH (Dojindo) で標識した抗 TMEM180 抗体を 5% スキムミルク/PBS で終濃度 1 µg/mL に希釈し染色を行った。細胞核は DAPI (2 µg/mL, Thermo Fisher Scientific) により染色し、BZ-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence) により観察した。

### 3.2.3 リアルタイム PCR

RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を調製した。total RNA は nano drop (Thermo Fisher Scientific) で定量し、1 µg を ReverTra Ace qPCR RT キット (TOYOBO) を用いて cDNA 合成した。合成した cDNA は TaqMan プローブおよび TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific) と混合し、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System を用いて定量 PCR を行った。内部標準は GAPDH もしくはヒトβアクチン遺伝子の発現を用いて行った。データは検量線法を用いて解析した。

### 3.2.4 TMEM180 ノックダウン細胞 (KD 細胞) 作製

24 時間後に細胞密度が 50-80%になるように 96 ウェルプレートに細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。24 時間後に培地を除去し、Hexadimethrine bromide (最終濃度 8 µg/mL) を含む培地を添加した。Mission Lentiviral Transduction Particles (Sigma) を MOI が 1 になるように添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。24 時間後に培地を除去し、新しい培地を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。さらに 24 時間後に 1 µg/mL 濃度の puromycin 添加培地で数日間培養し、shRNA 発現ベクターが導入された細胞をセレクトした。導入細胞をストックするとともに、限界希釈法にてシングルセル化を行った。得られたシングルクローンは total RNA を抽出し、TaqMan プローブを用いた qRT-PCR により mRNA の発現低下を確認したものを KD 細胞株として樹立した。

### 3.2.5 TMEM180 KD 細胞増殖能比較

96 ウェルプレートに 250 cells/ウェルで SW480 細胞および SW480 KD 細胞を播種し、2 日目、4 日目、6 日目の培養上清を Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いた WST-8 アッセイにより比較した。足場非依存的な増殖能比較は、96 ウェル U 底低吸着プレート (Corning) に 125 cells/ウェルで SW480 細胞および SW480 KD 細胞を播種し、1200 rpm で 3 分遠心して U 底に細胞を集めた後、0、24、48、72、96 時間後に顕微鏡観察を行い、細胞増殖を比較した。

### 3.2.6 リン酸化プロテオミクス

細胞培養した培地を除去し、PBS を添加して細胞をセルスクレーパーではがし、遠心回収して PBS で洗浄した後、SDS サンプルバッファーで可溶化したサンプルを 95℃で 5 分間ボイルし、送付まで-20℃にて凍結した。サンプルは 1 細胞株につき 3 つ、それぞれ BCA アッセイにて定量し 1 本当たり 12 mg 以上 Genomine 社に送付した。同社にてリン酸化タンパク質の濃縮、2 次元電気泳動、スポット定量、スポットの PMF 分析が実施された。

### 3.2.7 メタボロミクス

細胞培養した培地を除去し、マンニトールで洗浄した後、標準物質を溶解したメタノールもしくはエタノールを添加してセルスクレーパーではがし、サンプルは 1 細胞株につき 1 測定分 3 つ、計 6 サンプルずつ調製し、送付まで-20℃にて凍結した。凍結状態でヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社にサンプルを送付した。同社にて CE-TOFMS および LC-TOFMS の測定、定量、主成分分析まで行われた。データは主成分分析の結果に基づき、寄与率の大きい因子について MetaboAnalyst[35]を用いてエンリッチメント解析を行った。解析に用いた上位 30 因子および寄与率は Table3-1 に記載した。

## 3.3 結果と考察

### 3.3.1 公共データのメタ解析（既存の大腸がんマーカーと比較）

#### 3.3.1.1 GeneChip データの解析

DNA マイクロアレイは遺伝子発現用の網羅的解析が行える手法である。GeneChip は Affimetrix 社（現在は Thermo Fisher Scientific 社）が開発した DNA マイクロアレイであり、アレイ間の変動が少なく、マイクロアレイのスタンダードとされている[36]。公共データベース Gene Expression Omnibus (GEO)に登録されている GeneChip データを、並列で可視化できるプラットフォームが、ライフサイエンス統合データベースセンター（DBCLS）が開発した RefEx[37]である。本解析では RefEx を活用し、TMEM180 と既存の大腸がんマーカー（EGFR、CD44、LGR5、EpCAM）の正常組織での遺伝子発現を比較した。TMEM180 や LGR5 は、他のマーカーと比較すると低いことがわかった（Figure3-1A）。大腸がん治療用の抗体医薬として既

に使用されている抗 EGFR 抗体のターゲットである EGFR との発現を脳、血液、結合組織、生殖器、筋肉、消化器、肝臓、肺、尿、外分泌/内分泌について比較解析したところ、いずれにおいても TMEM180 の発現は EGFR より低いことが示唆された (Figure3-1B)。正常組織における遺伝子発現解析の結果、抗 TMEM180 抗体は、抗 EGFR 抗体と比較すると正常組織への集積が少なく、がん特異性が高いため、副作用がより低い抗体医薬になりうる可能性が示唆された。

### 3.3.1.2 The Cancer Genome Atlas (TCGA) データの解析

The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://www.cancer.gov/tcga>) はさまざまな組織のがんゲノム情報や、変異情報、RNA-seq データなどの情報が集められているアメリカの研究プロジェクトである。この TCGA のデータ解析をサポートするプラットフォームの一つが、アラバマ大学のグループが公開している UALCAN である[38]。UALCAN を用いて TCGA データを取得し、大腸がん組織における正常部と腫瘍部の TMEM180 および既存の大腸がんマーカーの遺伝子発現の Student's t-test を用いた比較解析を行った。TMEM180、LGR5、CD44 で大腸がんの正常部と比較して腫瘍部での発現が有意に高いことがわかった (Figure3-2A,B)。これらの遺伝子発現量を比較すると、LGR5 や CD44、EpCAM と比較して、TMEM180 や EGFR は発現量が高くないことがわかった (Figure3-2B)。これらのことから、TMEM180 は腫瘍特異性が高い分子であるにも関わらず、従来の外科手術検体からのがん部分と正常組織部分の網羅的発現解析だけでは見出だせなかった分子であることを明らかにした。

### 3.3.2 TMEM180 の大腸がん細胞における発現解析

TMEM180は大腸がん細胞で高発現している分子であり、がん細胞の生存において重要な機能を持っていると考えられた。そこで、がん微小環境において見られる低酸素環境に着目し、TMEM180のエクソン1の上流3000 bpの塩基配列解析を行ったところ、低酸素に応答するエレメントであるHypoxia responsive element (ACGTGまたはGCGTG) [39,40]様の配列が10か所存在していることを発見した (Figure3-3A)。実際に大腸がん細胞を低酸素環境下に曝露させると、TMEM180の発現が亢進することを見出した (Figure3-3B,C,D)。このことから、TMEM180は大腸がん細胞において、低酸素環境下で発現亢進する分子であることを証明した。



### 3.3.3 網羅的オミクス解析

5年以内に出版予定

### 3.3.4 現状と今後の展望

5年以内に出版予定

## 第4章 ヒト TMEM180 タンパク質のトポロジーおよび局在解析

### 4.1 はじめに

TMEM180 は glycoside–pentoside–hexuronide (GPH) cation symporter family (Transporter Classification Database, <http://www.tcdb.org/>) [46]に分類されている。このファミリーは、一価のカチオン ( $H^+$ または  $Na^+$ ) と共役した糖類の輸送を触媒することが知られている[46]。TMEM180 はこのファミリーに属する複数回膜貫通型タンパク質であると登録されているものの、機能や基質など詳細は全く不明である。タンパク質のデータベース UniProtKB (Q14CX5) において、TMEM180 は 11 回膜貫通型タンパク質であると予想されているが、トポロジーを含め、立体構造情報についてわかっていることはほとんどない。本章では、TMEM180 の分子機能解明に向け、TMEM180 タンパク質分子に着目し、どのようなトポロジーを持ち、また細胞内でどのように局在しているのかを明らかにすることを目的とした。

### 4.2 材料と方法

#### 4.2.1 細胞および細胞培養

国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野にて保管されていた HEK293T 細胞を用いた。D-MEM low glucose (Wako) に 10% FBS (Thermo Fisher Scientific) および 1% penicillin–streptomycin–amphotericin B suspension (Wako) を添加し、37°C、5%  $CO_2$  下で培養を行った。

#### 4.2.2 Plasmid construction

pcDNA3.3-hTMEM180 プラスミドは、ヒト TMEM180 遺伝子は pCMV-TMEM180 プラスミド (OriGene) より制限酵素サイトを付加して増幅し、pcDNA3.3-TOPO (Thermo Fisher Scientific) ベクターに組み込んで作製した。N 末端に 3xFLAG タグ、C 末端に FLAG タグ、または N 末端に HA タグを組み込んだコンストラクトは、オーバーラップ PCR により各タグを付加し、pcDNA3.3-hTMEM180 ベクターの EcoR1/BamH1 サイトに In-Fusion cloning technology (Clontech) で組み込んで作製した。FLAG タグ挿入コンストラクトはインバース PCR または

オーバーラップ PCR、および In-Fusion cloning technology により作製した。pEFh ベクター、pEFh-SBP ベクター[47]は横浜市立大学の山下暁朗准教授に供与していただいた。pEFh ベクターの EcoR1 サイトに IRES 配列および puromycin 配列を組みこんで pEFh\_IRESpuro3 ベクターを構築した。小胞体可視化ベクターは、まず N 末端側にカルレティキュリン 17 残基 (UniProtKB:P27797) および C 末端側に KDEL シグナル 4 残基を付加した mRFP 断片を調製した。さらにこの断片を EcoR1 で制限酵素処理し、あらかじめ EcoR1 で制限酵素処理、脱リン酸化処理を行った pEFh\_IRESpuro3 ベクターに、リン酸化およびライゲーションすることで pEFh\_ERtarget\_mRFP\_IRESpuro3 を作製した。ゴルジ体可視化ベクターは、まず DLD-1 細胞の cDNA より、SMARTer RACE 5'/3' Kit (Clontech) を用いて B4GALT1 (UniProtKB:P15291) を増幅し、pANT ベクター (ニッポンジーン) にクローニングした。これをテンプレートにし、B4GALT1 の N 末端 (91 残基) 断片と mRFP 断片をオーバーラップ PCR で連結した。さらにこの断片を EcoR1 で制限酵素処理し、あらかじめ EcoR1 で制限酵素処理、脱リン酸化処理を行った pEFh\_IRESpuro3 ベクターに、リン酸化およびライゲーションすることで pEFh\_Golgitarget\_mRFP\_IRESpuro3 を作製した。細胞膜可視化ベクターは、まず N 末端側に Lyn17 残基[48]を付加した mRFP 断片を調製した。さらにこの断片を EcoR1 で制限酵素処理し、あらかじめ EcoR1 で制限酵素処理、脱リン酸化処理を行った pEFh\_IRESpuro3 ベクターに、リン酸化およびライゲーションすることで pEFh\_Membranetarget\_mRFP\_IRESpuro3 を作製した。pEFh\_SBP\_AcGFP ベクターは、まず、AcGFP の末端に His8 タグを付加した。pEFh\_SBP ベクターを EcoR1 で制限酵素処理し、増幅した AcGFP-His8 を In-Fusion cloning technology により組むことで作製した。pEFh\_TM180\_SBP\_AcGFP ベクターは pEFh\_SBP\_AcGFP ベクターの SBP-AcGFP-His8 部分を増幅し、pANT ベクター (ニッポンジーン) にクローニングした。これを Xba1/Bgl2 で制限酵素処理した。TM180 の N 端に Xba1 サイトと kozak 配列、C 端にスロンビンサイトを付加し、両者を In-Fusion で連結して pANT\_TM180\_SBP\_AcGFP ベクターを作製した。pEFh ベクターの EcoR1 サイトを EcoRV に改変したベクターを構築し、EcoRV で制限酵素処理した pEFh 改変ベクターに、pANT\_TM180\_SBP\_AcGFP ベクターの TM180-SBP-AcGFP 部分を組み込んで、pEFh\_TM180\_SBP\_AcGFP ベクターを作製した。全てのプラスミドは DNA シーケンスによりインサート部分の配列を確認し、実験に用いた。プライマーリストは Table4-1 に記載した。

#### 4.2.3 トランスフェクション

HEK293T 細胞をスライドチャンバーまたはフィルムディッシュに播種し、70-80%コンフルエントまで培養した。各プラスミドは Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific) を用いて試薬のマニュアルの通りにトランスフェクションを行った。その後 36-48 時間程度培養した。

#### 4.2.4 細胞免疫染色

スライドチャンバーを PBS で洗浄し、4% PFA/PBS (Wako) で 15 分固定化した。PBS で洗浄し、膜透過処理を行う場合は 0.1% Triton X-100/PBS を添加し、行わない場合は PBS を添加して 10 分静置した。PBS で洗浄し、5%スキムミルク/PBS で室温 1 時間または 4°C オーバーナイトでブロッキングを行った。その後 1 次抗体 : anti-TMEM180 rabbit pAb (1:200, Sino Biological) 、 anti-FLAG mouse mAb (1:200, clone M2, Sigma-Aldrich) 、 anti-FLAG mouse mAb (1:200, clone M5, Sigma-Aldrich) 、 anti-HA rabbit pAb (1:200, MBL) 、 anti-RCAS1 rabbit pAb (1:200, CST) 、 anti-Calnexin rabbit pAb (1:200, CST) をそれぞれ添加した。PBS で洗浄し、2 次抗体 : Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse IgG goat mAb (1:200, Thermo Fisher Scientific) 、 Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG goat mAb (1:200, Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ添加して染色した。細胞核は DAPI (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Thermo Fisher Scientific) により染色し、BZ-X710 蛍光顕微鏡 (Keyence) により観察した。

#### 4.2.5 生細胞染色

蛍光タンパク質融合発現ベクターをトランスフェクションしたフィルムディッシュの細胞を PBS で洗浄し、細胞核は Hoechst33342 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Thermo Fisher Scientific) により染色し、BZ-9000 または BZ-X710 蛍光顕微鏡 (Keyence) により観察した。

#### 4.2.6 in silico 解析

ヒト TMEM180 の全長のアミノ酸配列は UniProtKB (Q14CX5) より取得した。膜貫通領域は、MEMSAT-SVM[49]、PRODIV-TMHMM[50]、TMHMM[51]、MemBrain[52]、Phobius[53]、Philius[54]、

TMpred[55]、DAS-TMfilter[56]、HMMTOP[57]、CCTOP[58]、SOSUI[59]、Scampi[60]、Scampi-MSA[60]、PRO-TMHMM[61]のプログラムを用いて予測した。

#### 4.2.7 ホモロジーモデリング

ヒト TMEM180 の全長のアミノ酸配列は UniProtKB (Q14CX5) [42]より取得した。2次構造予測は DELTA-FORTE [62]および HHPred [63]を用いて行った。ホモロジーモデル構築には、サルモネラ菌由来のメリビオーストランスポーターMelB の PDB データ (PDBID:4M64) の A 鎖をテンプレート構造とし、膜タンパク質のホモロジーモデリングに特化したモデリングプログラム MEDELLER [64]を用いた。配列比較には異なる 6 種の TMEM180 (human、bovine、mouse、chicken、frog、zebrafish) のアミノ酸配列 (UniProtKB entry numbers Q14CX5、Q58CT4、Q6PDE8、Q5ZKJ5、B1H1F7、Q5PRC2) を使用し、シーケンスアラインメントには Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [65]を用いた。機能や構造に重要だと考えられる進化的に保存されたアミノ酸残基の同定には、ConSurf Server (<http://consurf.tau.ac.il/>) [66]を用いた。表面電荷は PyMOL[67]の APBS tool を用いて計算を行った。立体構造モデルは PyMOL version 1.3[67]を用いて表示した。

### 4.3 結果と考察

#### 4.3.1 ヒト TMEM180 のトポロジーの in silico 解析

細胞膜上における TMEM180 のトポロジーを検討するに当たり、まず in silico の解析を行った。ヒト TMEM180 のアミノ酸配列 (UniProtKB:Q14CX5) を用いて、14 種類の膜貫通領域予測プログラムにて解析を行ったところ、8回から 12回までの膜貫通領域が予測された (Figure4-1A)。最も多い 12 回の膜貫通領域に対応して番号を振ると、完全に一致している膜貫通領域は TM1、TM9、TM12 であり、1 つを除き一致している膜貫通領域は TM3、TM5、TM6 であった (Figure4-1A,B)。最大 12 回膜貫通のうち、6 つしか精度よく予測されていないことが明らかとなった。そこで、より高次構造の情報を加味したトポロジーの予測を行うに当たり、ホモロジーモデルを構築することとした。

#### 4.3.2 ヒト TMEM180 のホモロジーモデルの構築

ホモロジーモデル構築に当たり、PSI-BLAST[68]を用いて、TMEM180 に相同性の高い配列（30%以上の相同性のあるもの）を探索したが、ホモロジーの高いものは一つ存在せず、1次配列からテンプレートを決定することができなかった。そこで、2次構造予測を行うこととした。HHpred と DELTA-FORTE というプログラムを用いて2次構造予測を行うと、両者ともバクテリアの持つメリビオーストランスポーターである MelB のサルモネラ由来の結晶構造（PDBID:4M64）[69]がトップスコアで得られたことから、MelB をテンプレートとし、膜タンパク質に特化したモデリングプログラム MEDELLER を用いて、ホモロジーモデルの構築を行った（Figure4-2A）。

#### 4.3.3 ホモロジーモデルを基にした TMEM180 の配列解析

TMEM180 ホモロジーモデル構築のテンプレートとしたメリビオーストランスポーターMelB は、ガラクトースの一つであるメリビオースをカチオンと共役して輸送する共輸送体であることが報告されている[69,70]。TMEM180 がどのようなトランスポーターであるか、MelB との構造の類似性に着目したアミノ酸配列解析を行った。ヒト TMEM180 とサルモネラ MelB のアミノ酸配列相同性は19%しかないにも関わらず、興味深いことに、MelB のカチオン結合サイト（Asp55、Asn58、Asp59、Thr121、Asp124）が TMEM180 の構造上の類似した部位（Asn63、Asn66、Asp67、Thr139、Asp142）に位置していることがわかった（Figure4-2A,B）。さらに、この残基が種を超えて保存されていることもわかった（Figure4-2B）。次に、ヒト、ウシ、マウス、ニワトリ、カエル、ゼブラフィッシュ TMEM180 のアミノ酸配列から、アミノ酸が保存されている残基をマゼンタ、類似している残基をピンクでホモロジーモデル上にマッピングすると、ループ部分には保存性がなく、中心のコアの部分はアミノ酸残基の保存性が高いことがわかった（Figure4-2C）。ヒト TMEM180 とサルモネラメリビオーストランスポーターMelB のアミノ酸配列をより詳細に解析したところ、MelB のカチオン結合に関わるアミノ酸は TMEM180 でもほぼ完全に一致しているにも関わらず、MelB の基質であるメリビオース結合に関わるアミノ酸は全く保存されていないことが明らかとなった（Figure4-3）。これらのことから、TMEM180 は MelB のようなカチオンシンポーターであるが、メリビオースのようなガラクトースは基質ではないであろうということが示唆された。

また、ヒト TMEM180 の疎水性度について、ホモロジーモデルにマッピングした (Figure4-4A)。構造の表面には目立った疎水性度が高い、もしくは親水性度の高いクラスターは見いだせなかったが (Figure4-4A)、基質結合部位と予想される構造内部のアミノ酸残基の近傍に、疎水性度の高いポケットが見いだされた (Figure4-4B)。この結果から、何らかの疎水性の高い基質がこのポケットに結合し、構造変化によって基質を取り込み、もしくは排出する可能性が示唆された。さらに、表面電荷についても同様にホモロジーモデルにマッピングした (Figure4-4C)。基質の取り込み口、もしくは排出口付近に、酸性度の高いクラスターが見いだされ (Figure4-4D)、構造の外側に塩基性度の高いクラスターが見いだされた (Figure4-4E)。この結果から、TMEM180 と相互作用するパートナータンパク質が存在する可能性が推測され、構造安定化もしくは基質の輸送に寄与することも考えられることから、このパートナータンパク質の探索も機能解明のためには重要である。

#### 4.3.4 ヒト TMEM180 のトポロジー解析

##### 4.3.4.1 N 末端および C 末端のトポロジー解析

TMEM180はホモロジーモデル構築により、12回膜貫通型タンパク質と予想された。そこでこのモデルが正しいかを実験的に検証し、トポロジーを決定することにした。まず、N末端側またはC末端側にFLAGタグを付加した融合タンパク質3xFLAG-TMEM180、TMEM180-FLAGを発現するプラスミドを構築した。これらをHEK293T細胞に一過性発現させ、タグ抗体による細胞免疫染色を行った。3xFLAG-TMEM180を発現させたHEK293T細胞についてTritonX-100を用いて細胞膜透過処理を行った場合、抗FLAG抗体 (M5) により、細胞膜および細胞質内のオルガネラ膜が染色された。透過処理を行わない場合は細胞膜のみが染色された (Figure4-4A,B)。同様に、TMEM180-FLAGを発現させて同様の解析を行ったところ、抗FLAG抗体 (M2) により、細胞膜および細胞質内のオルガネラ膜が染色された。透過処理を行わない場合は細胞膜のみが染色された (Figure4-4C,D)。これらのことから、TMEM180のN末端側、C末端側はともに細胞外に露出しており、同方向を向いていることから、偶数回膜貫通型のトポロジーをもつことが示唆された。

#### 4.3.4.2 ヒト TMEM180 全長のトポロジー解析

次に、ホモロジーモデルを基に、ループと予想される部位に FLAG タグを挿入し、膜透過処理の有無によって、FLAG タグを挿入した部位が細胞内に位置するか、細胞外に位置するかの同定を試みた (Figure4-5A)。79FLAG、153FLAG、236FLAG、329FLAG、398FLAG は膜透過処理の有無に関わらず挿入した FLAG タグが検出されたが、46FLAG、123FLAG、188FLAG、298FLAG、357FLAG、445FLAG は膜透過処理を行ったときのみ挿入した FLAG タグが検出された (Figure4-5A,B)。このことから、TMEM180 は 12 回膜貫通型タンパク質であり、ホモロジーモデルのトポロジーは正確であることが示された。

#### 4.3.5 TMEM180 の細胞内局在解析

5 年以内 to 出版予定

#### 4.3.6 現状と今後の展望

5 年以内 to 出版予定



## 第5章 マウス Tmem180 の解析

5年以内に出版予定

## 第6章 総括

当研究室で見出した大腸がん細胞で高発現する分子 TMEM180 に関して、抗 TMEM180 抗体の解析と改変、TMEM180 の分子機能解明を目指し、次のような成果を得た。

5 年以内に出版予定

最も重要な今後の課題は、TMEM180 が何の基質を輸送するのかを突き止めることである。網羅的オミクス解析に加え、阻害剤ライブラリや電気生理学を用いた基質探索に着手しつつあり、より詳細な TMEM180 の分子機能解明につながることを期待している。阻害剤ライブラリを用いた解析では、阻害剤ライブラリを利用し、大腸がん細胞株 SW480 および、すでに樹立している SW480 の TMEM180 ノックダウン細胞株の両者に添加して増殖および形態観察を進めている。電気生理学を用いた基質探索では、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた系を検討している。この卵母細胞はチャンネルやトランスポーターなどをほとんど発現しておらず、RNA をインジェクションしてターゲットタンパク質を膜上に発現、基質が発現したタンパク質を取り込んだ時に流れる電流を計測する手法である。基質候補となる物質を外液に流し、電流が流れれば、その物質が基質である可能性が高くなる。このような実験系を組み合わせ、TMEM180 の基質を決定し、機能解明につなげていきたい。また樹立した抗 TMEM180 抗体が近い将来、がん治療薬、診断薬として臨床応用されることも期待している。

最後に、本研究の進め方について述べる。機能未知分子の機能解明は、既報がないため手がかかりが全くなく、何から手を付けるべきか困難を極めた。本研究の第3章、第4章、第5章の特徴は、あらゆる公共データを駆使し、メタ解析を行うことで手がかりが得られたことである。さらに第4章では、構造生物学の知識を駆使し、2次構造や3次構造から分子機能を類推することができた。ヒトゲノムの解読が2003年に完了し、TMEM180 がタンパク質として UniProtKB に登録されたのが2006年であるが、まだ分かったことはほんのわずかにすぎない。2020年現在でも TMEM180 のような機能未知分子は多く存在している。本研究のような公共データを駆使して手がかりを得るアプローチは、機能未知分子の機能解明において着実な一歩を踏み出すために必須となると考えており、今後の参考になることを期待している。

**図表**

**A**

	1位	2位	3位	4位	5位
罹患数 2014年	大腸	胃	肺	乳房	前立腺
死亡数 2017年	肺	大腸	胃	膵臓	肝臓

**B**

大腸がんの治療	内容
内視鏡治療	大腸の内側からがんを切除
外科治療	がんを手術で切除
放射線治療	電離放射線を照射して再発を抑制
薬物療法	薬剤を投与してがん細胞に障害を与える →「補助化学療法（再発抑制）」 →「切除不能進行・再発大腸がんに対する化学療法」 低分子薬と分子標的薬との併用

**C**

医薬品名	剤型	標的分子
ベバシズマブ	ヒト化 IgG1	血管内皮増殖因子 VEGF
ラムシルマブ	ヒト IgG1	血管内皮増殖因子受容体 VEGFR2
セツキシマブ	マウスヒトキメラ化 IgG1	上皮成長因子受容体 EGFR
パニツムマブ	ヒト IgG2	上皮成長因子受容体 EGFR
アフリベルセプト	VEGFR1、2のIgドメインとヒトIgG1Fcとの融合	血管内皮増殖因子受容体 VEGFR1、VEGFR2
レゴラフェニブ	低分子	VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、TIE2、PDGFR、FGFR、KIT、RET、RAF-1、BRAFなどのキナーゼ

**Figure1-1 日本における大腸がんの罹患数・死亡数および大腸がんの治療法、薬物療法に用いられる分子標的薬**

**A, 日本における大腸がんの罹患数（上段）と死亡数（下段）。**

**B, 現在行われている大腸がんの治療法。**

**C, 大腸がんの治療に現在用いられている分子標的薬とその標的分子。**

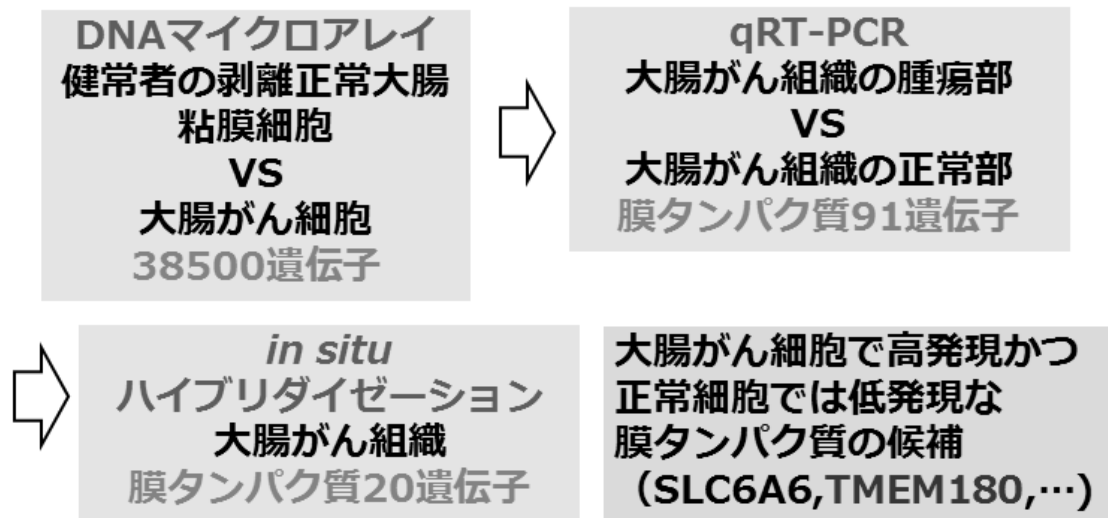
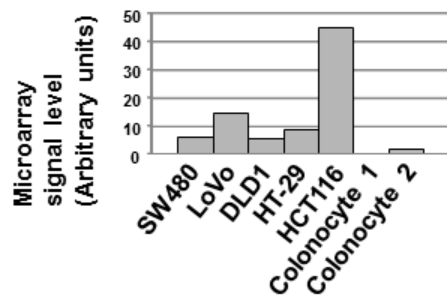


Figure1-2 真に大腸がん細胞に特異的な膜タンパク質分子の探索

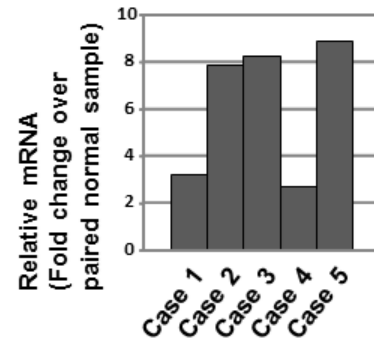
真に大腸がん細胞に特異的な膜タンパク質分子の探索の手順についてまとめた。

M. Yasunaga, Y. Matsumura, Role of SLC6A6 in promoting the survival and multidrug resistance of colorectal cancer, Sci. Rep. 4:4854 (2014)より図を文字に改変して表記。

## マイクロアレイ(がん細胞vs剥離正常細胞)



## qRT-PCR



## *in situ* ハイブリダイゼーション

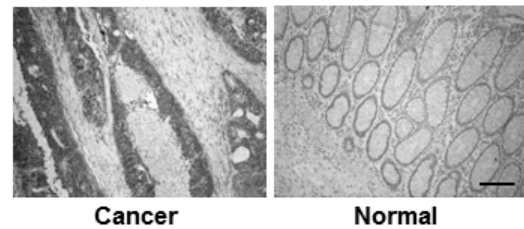
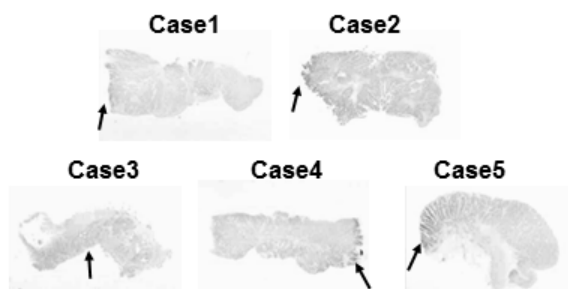


Figure1-3 大腸がん細胞に特異的な膜タンパク質分子TMEM180の発見

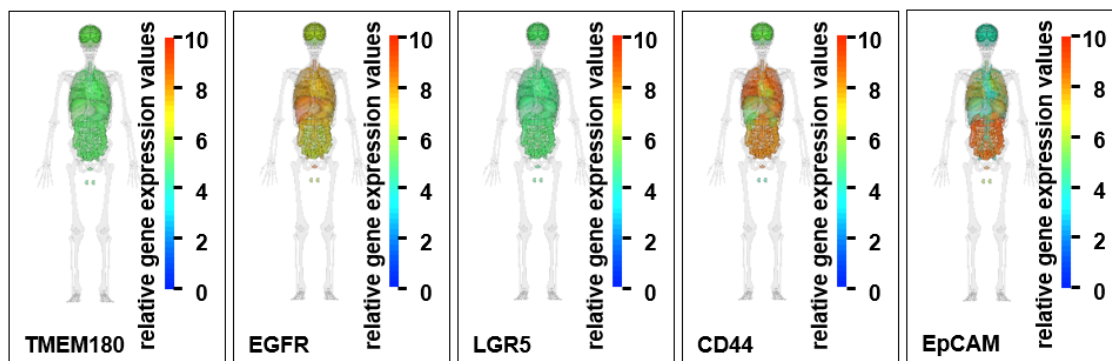
Figure1-2に示した手順で発見したTMEM180のデータについてまとめた。

M. Yasunaga, S. Saijou, S. Hanaoka, T. Anzai, R. Tsumura, Y. Matsumura, Significant antitumor effect of an antibody against TMEM180, a new colorectal cancer-specific molecule, *Cancer Sci.* 110 (2019) 761–770.より図を抜粋して表記。

**Figure2-1,2,3,4,5,6 および Table2-1,2**

5年以内に出版予定

A



B

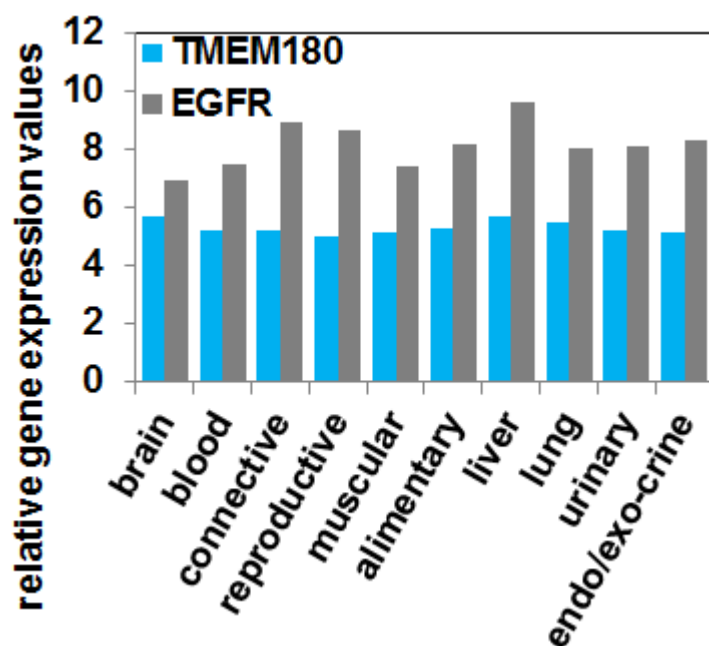
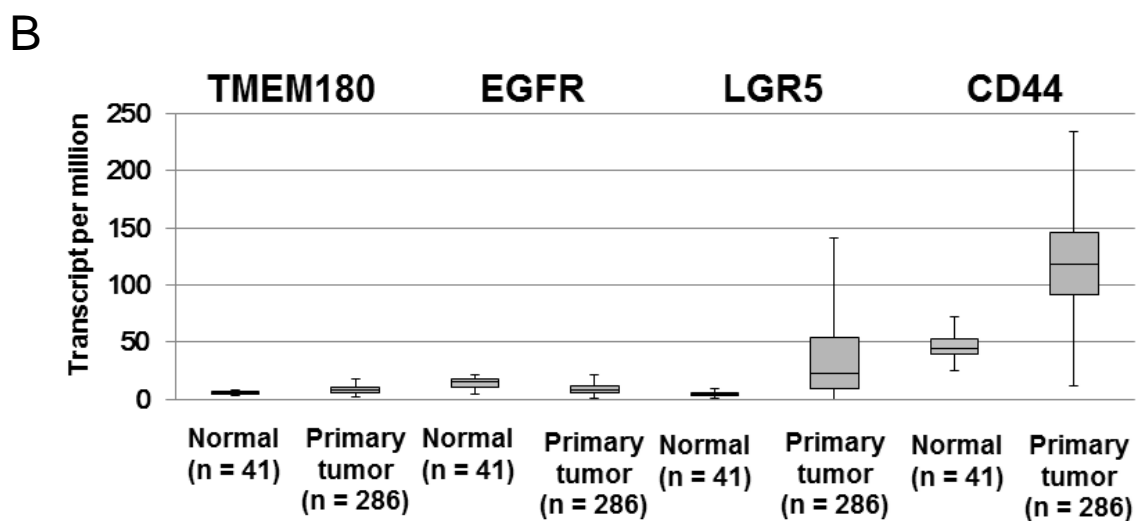
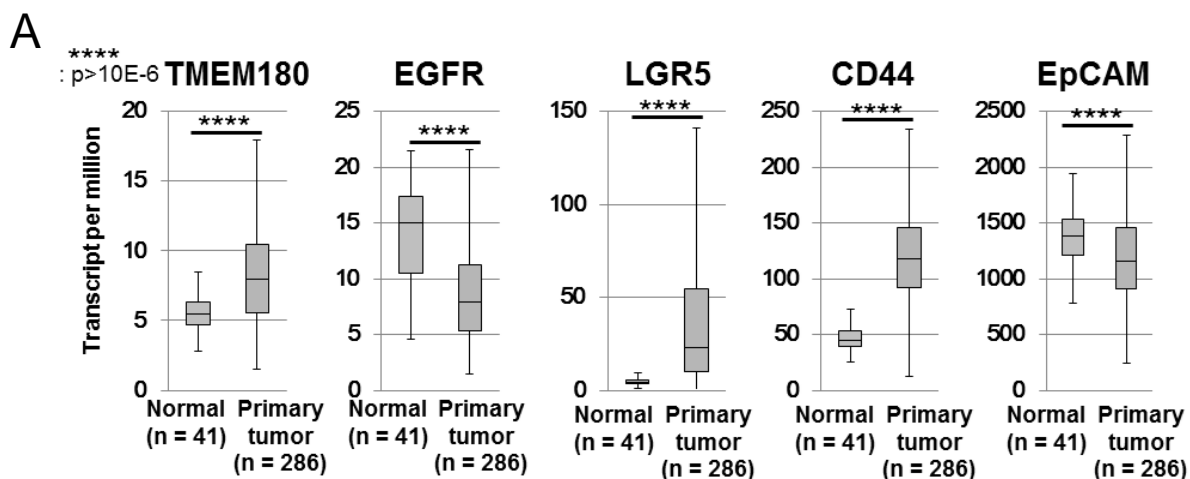


Figure3-1 正常組織における TMEM180 と既存の大腸がんマーカーの遺伝子発現比較

A, TMEM180、EGFR、LGR5、CD44、EpCAMの正常組織における遺伝子発現をRefExを用いて取得し、BodyParts3D (<http://lifesciencedb.jp/bp3d/info/index.html>) で表示。

B, TMEM180 (水色) とEGFR (グレー) の脳、血液、結合組織、生殖器、筋肉、消化器、肝臓、肺、尿、外分泌/内分泌におけるTMEM180およびEGFRの遺伝子発現をRefExを用いてデータを取得しグラフ化。

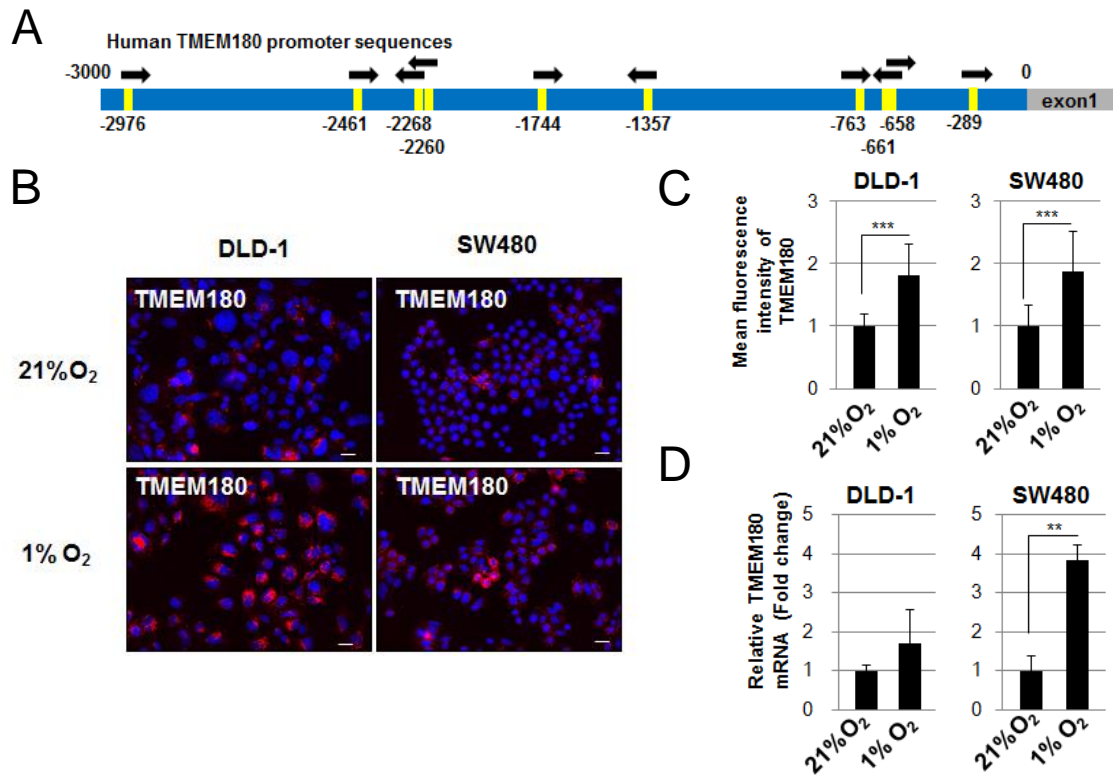


**Figure3-2 大腸がんの正常部および腫瘍部におけるTMEM180と既存の大腸がんマーカーの遺伝子発現比較**

**A,** TCGAにおける大腸がんのTMEM180、EGFR、LGR5、CD44、EpCAMの正常部（41例、Normal）および腫瘍部（286例、Primary tumor）の遺伝子発現データをUALCANを用いて取得し、グラフ化。統計解析はStudent's t-testを用いた。

**B,** Aのデータのうち、TMEM180、EGFR、LGR5、CD44の遺伝子発現データを発現量の縦軸を揃えて比較した。





**Figure3-3 TMEM180は低酸素環境下で発現亢進する**

**A,** ヒトTMEM180のエクソン1の上流3000bpにおける、10か所のHypoxia responsive element様配列（黄色）の模式図。矢印は配列の向きを表す。

**B,** 21%O<sub>2</sub> (上段) および1%O<sub>2</sub> (下段) で培養したDLD-1 (左) およびSW480細胞 (右) の抗TMEM180-PE標識抗体による免疫染色。青はDAPI (核) を表す。

**C,** BにおけるTMEM180の染色領域の21%O<sub>2</sub>を1としたときの蛍光強度の定量比較。統計解析はStudent's t-testを用いた。\*\*\*P<0.001。

**D,** 21%O<sub>2</sub> および1%O<sub>2</sub> で培養したDLD-1 およびSW480細胞から調製したmRNAのqRT-PCRによるTMEM180遺伝子の発現量比較。21%O<sub>2</sub>を1とし、内部標準としてβアクチン遺伝子を用いた。統計解析はStudent's t-testを用いた。\*\*P<0.01。

**Figure3-4,5,6およびTable3-1**

5年以内に出版予定

A

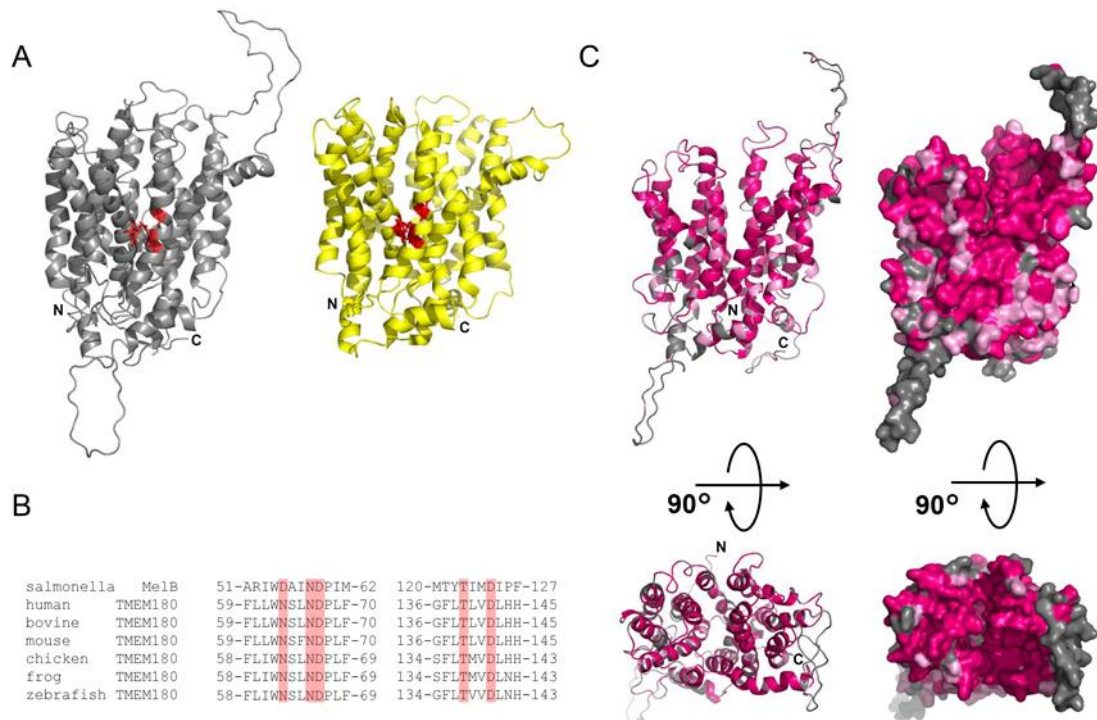
Program	No. of TM	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7	TM8	TM9	TM10	TM11	TM12
MEMSAT-SVM	12	17-41	51-72	100-118	126-145	165-180	192-212	265-295	304-326	331-354	358-381	406-422	465-485
PRODIV-TMHMM	12	12-32	60-80	101-121	124-144	160-180	193-213	267-287	300-321	331-351	364-384	405-425	476-496
UniProt	11	9-29	52-72	101-123	127-149	164-184	194-214	266-288	306-326	332-354		401-421	466-486
TMHMM	10	15-37		101-123	127-149	162-184	189-211	266-288	303-325	332-354		406-428	468-490
MemBrain	10	11-24		110-118	126-138		194-206		305-313	332-351	358-364	420-430	466-485
		28-40											
Phobius	10	12-38	50-74	95-117	123-141	162-184	190-214	266-287	299-317	329-352			468-486
Philius	10	9-33	51-73	94-117	123-143	162-183	191-213	265-282	299-320	332-353			466-486
TMpred	10	11-38	50-73	106-128		164-183	194-214	265-284	299-324	329-352		397-431	466-486
	9	13-38	50-74	106-125		164-184	194-214		299-324	329-352		397-431	466-486
DAS-TMfilter	9	21-45		107-131		164-183		266-290	299-323	330-352	357-381	402-426	467-491
HMMTOP	9	8-29		106-133		164-179	196-211	267-282	299-314	337-352		416-431	466-481
CCTOP	9	15-38		101-120	123-141	164-183	194-211		299-314	331-352			467-486
SOSUI	9	14-36	46-68		114-136	165-185	182-214			331-353		390-412	466-488
													414-436
Scampi	9	18-37		101-120	123-142	164-183	194-213			323-342	345-364	415-434	468-487
Scampi-MSA	9	18-37		101-120	123-142	164-183	194-213			323-342	345-364	415-434	471-490
PRO-TMHMM	8	10-30	51-71	100-120	123-143	164-184	189-209			330-350			466-486

B

Figure4-1 ヒトTMEM180の膜貫通領域の予測

A, 14種類の膜貫通領域予測プログラムとデータベースから推測されたヒトTMEM180の膜貫通領域を表にした。最も多く予測された12か所の膜貫通領域に、各予測された膜貫通領域のアミノ酸残基番号を示した。全てのプログラムで完全に一致した領域 (TM1、TM9、TM12) を濃いグレー、1つを除いて一致した領域 (TM3、TM5、TM6) を薄いグレーで表示した。

B, Aの結果の模式図。



**Figure4-2 ヒトTMEM180のホモロジーモデルとモデルに基づくアミノ酸配列解析**

**A,** ヒトTMEM180ホモロジーモデル（左、グレー）およびサルモネラMelBの結晶構造（右、黄色、PDBID:4M64）。MelBのカチオン結合部位およびTMEM180でカチオン結合サイトと予想されるアミノ酸を赤で表示した。

**B,** サルモネラMelBおよび、ヒト、ウシ、マウス、ニワトリ、カエル、ゼブラフィッシュのTMEM180の2次構造予測に基づくアミノ酸配列アラインメントのうち、カチオン結合部位の近傍を表記した。赤で示したアミノ酸がカチオン結合部位と予想される保存されたアミノ酸。

**C,** ヒト、ウシ、マウス、ニワトリ、カエル、ゼブラフィッシュのTMEM180のアミノ酸保存性のヒトTMEM180ホモロジーモデル上へのマッピング。各種で相同なアミノ酸をマゼンタ、類似のアミノ酸をピンク、それ以外のアミノ酸をグレーで示した。左がリボンモデル、右が表面モデル。

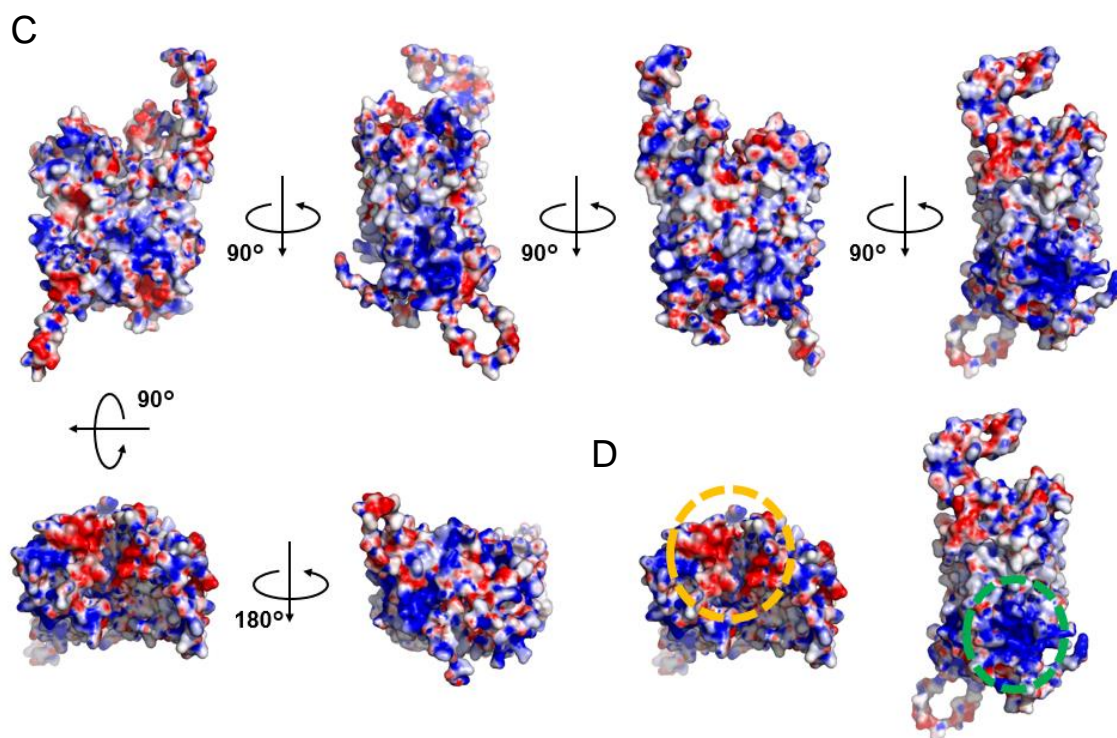
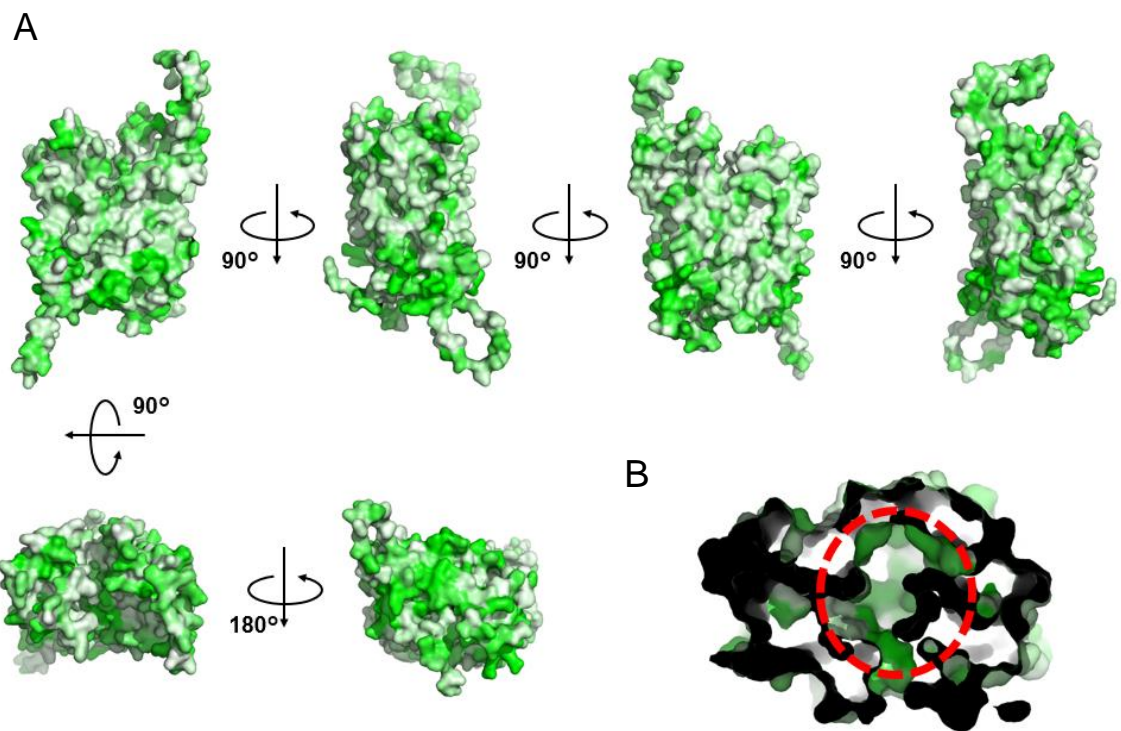
```

human TMEM180 1 MGLQQPQAWLLGLPTAVVYGSALFPTTILHNVFLLYVDTFVSVYKINRMFVWGETVFLWNSLNDPLFGWLSDRQFLSSQPRSGAGLSSRAVVLARVQ
salmonella MeIB 1 -----MSISMTRKLSYGFAGFKDFAIGIVVMYLMYYYTDVVGLSVGLVGTFLVARIWDAINDPIMGWIVNATRS-----RW-GKFKP
Asp19 Asp55 Asp59 Asn66 Asn63 Asp67
human TMEM180 101 ALGWHGPLLALSFLAFWVFWAP----AGLQFLLCCLCYDGFLLVDLHHBALLADLALSADRTHLNFYCSLPSAAGSLSV----FASYAFWNKEDFSS
salmonella MeIB 79 WILIGTLTNSLVFLFLFSAHLFEGTAQVVFVCTYILWQMTYTIMDIPFWSLVPTITLDKREREQLVPPFFASLAGFVTAGITLFPVSYVGGADRGF
Thr139 Asp142 Asp58
Thr121 Asp124 Arg149
Tyr120 Trp128
human TMEM180 192 FRAPCVTLAVSSGLFLGATQLRRRVEAARKDPGCSGLVVD SGLCGEELLVGSEADSITLGRYLRQLARHRNFLWFVSMDLVQVFHCHFNSNFFFLFL
salmonella MeIB 179 FQMFTLVLIAFFIASTIVTLRNVHEVYSSDNGVT-----AGRPHLT LKTIVGLIYKNDQLSCLLGMALAYNIASNIINGFAIYYF
human TMEM180 292 EHLISDHISLSTGSILLGLS--YVAPHNNLYFLSLCRRMGVYAVVRGLFLLKGLSLML---LAGPDHLSLLCLPIASNRVPTGTCCKLITLVVTDLVD
salmonella MeIB 259 TYVIGDADL--FPYYSYAGA-ANLLTLIVFFRLVRMLSRRI LWAGASVMPVLS CAGLFAMALADIHNAALIVAAGIFLNIQTALFWVLQVIMVADTV
Trp342
human TMEM180 388 EDLVLNHRKQAASALLFGMVALVTKPGQTFAPLLGTWLLCFYTGHDLFQQS LITPVGSAHPWEPPAPAPAQAAPT LRQGC FYLLVLVPI TCALLQLFTW-
salmonella MeIB 355 YGEFKLNIRC--ESIAYSVQTMVVKGSFAFAFFIALVLGLIGYTPNV-----AQSAQTLQGMQFIMIVLFPVLFPMMTLVLYF
Lys412 Lys377
human TMEM180 487 SQFTLHGRRLHMVKAQRQLNSQAQTL DVKVV 517
salmonella MeIB 431 RYYRLNGDMLRKIQIHLL----- 448

```

Figure4-3 ヒトTMEM180とサルモネラMeIBの2次構造予測に基づくアミノ酸配列解析

カチオン結合部位を赤、カチオン結合とメリビオース結合の両方に関わる部位を紫、MeIBのメリビオース結合部位を青で示した。各アミノ酸を3文字表記および残基番号を示した。



**Figure4-4 TMEM180の疎水性度および表面電荷**

**A, ヒトTMEM180の疎水性度のホモロジーモデルへのマッピング。緑になるほど疎水性度が強い。**

**B, 基質結合部位と予想される部位の近傍に発見した疎水性ポケットを赤い破線で囲った。**

**C, ヒト TMEM180 の表面電荷のホモロジーモデルへのマッピング。青になるほど塩基性が高く、赤になるほど酸性度が高い。**

**D, 基質の取り込み口、もしくは排出口近傍の酸性残基クラスターをオレンジの破線で囲った。**

**E, 構造の外側に位置する塩基性残基クラスターを緑の破線で囲った。**



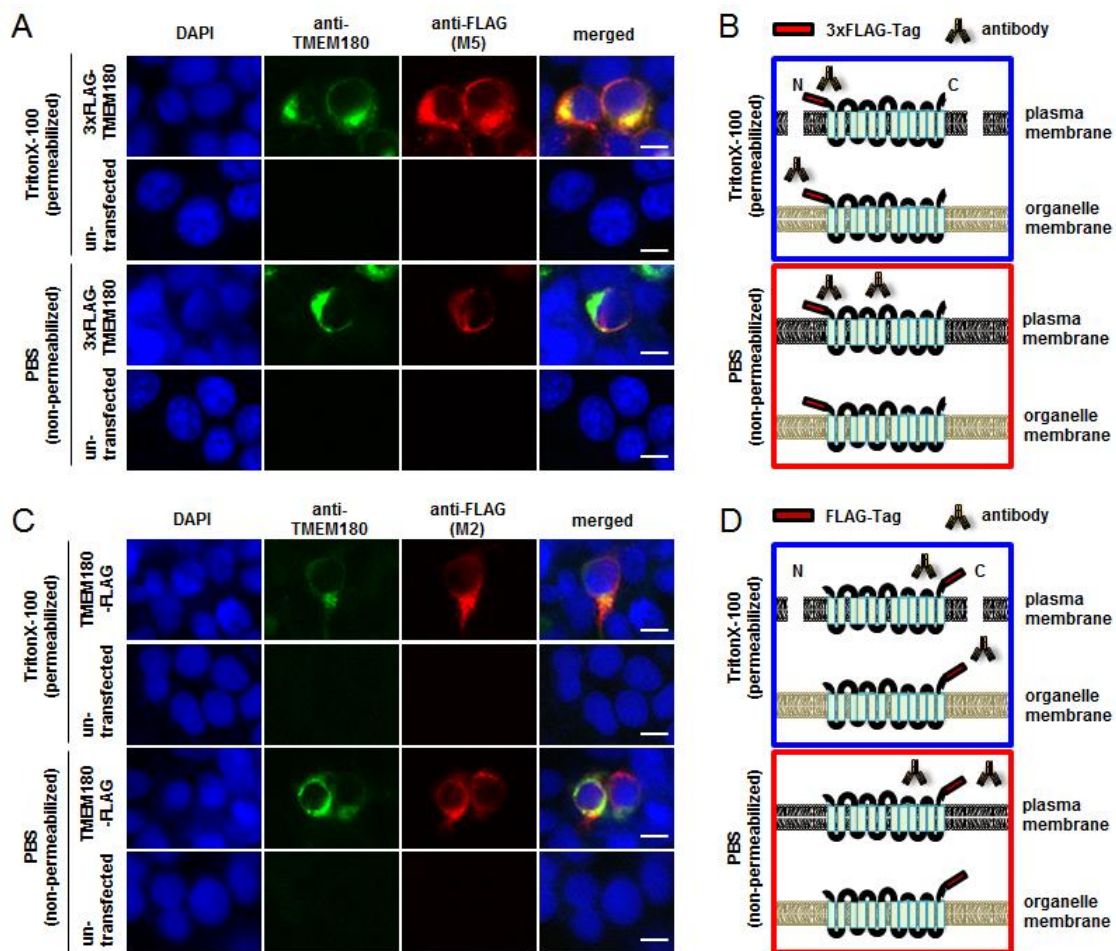


Figure4-5 ヒトTMEM180のN末端およびC末端のトポロジー決定

A, N末端側に3xFLAGタグを付加した3xFLAG-TMEM180を一過性発現させたHEK293T細胞の、抗TMEM180抗体（検出用2次抗体：緑）、抗FLAG抗体（検出用2次抗体：赤）による細胞免疫染色。上段がTritonX-100による膜透過処理、下段（PBS）は膜透過処理を行わずに染色。スケールバーは10  $\mu$ m。

B, Aの模式図。

C, C末端側にFLAGタグを付加したTMEM180-FLAGを一過性発現させたHEK293T細胞の、抗TMEM180抗体（検出用2次抗体：緑）、抗FLAG抗体（検出用2次抗体：赤）による細胞免疫染色。上段がTritonX-100による膜透過処理、下段（PBS）は膜透過処理を行わずに染色。スケールバーは10  $\mu$ m。





## Figure4-7,8

5年以内に出版予定

**Table4-1 プラスミド構築用プライマーセット**

Primer	Sequence (5'-3')	plasmid
pc3.3_kozac180_IF_Fw	CTTGAATTCGCCACCATGGGGCTGGGTCAG	pcDNA3.3-hTMEM180
180stop_BamH1_pc3.3_Rv	CGAACCCCTTGGATCCTCACACCATCTTAAC	
F_BamH1_180_Fw	AAGGACGACGATGACAAGGGATCCATGGGGCTGGGTCAGC	3xFLAG-TMEM180
3Flag_1_45_Fw	ATGGACTACAAGGACCACGATGGTACTACAAGGACCACGACATC	
3Flag_25_69_Fw	GACTACAAGGACCACGACATCGACTATAAGGACGACGATGACAAG	
Xba1_EcoR1_kozac_F_Fw	CAGCCTCCGGACTCTAGAGAATTCGCCACCATG	
180stop_Xho1_Rv	CGAACCGCGGGCCCTCTAGCTCGAGTCACACCATCT	
Xba1_EcoR1_kozac_180_Fw	CAGCCTCCGGACTCTAGAGAATTCGCCACCATGGGGCTGGGTCAG	hTMEM180-FLAG
180_BamH1_F_Fw	GGATGTTAAGATGGTGGGATCCATGGACTACAAGGACCAC	
180_BamH1_F_Rv	GTGGTCCTTGTAGTCCATGGATCCCACCATCTTAACATCC	
Fstop_Xho1_Rv	CGAACCGCGGGCCCTCTAGCTCGAGTCACTTGTCATCGTCGTCCT	
pc3.3_BamH1_Fw	ggatccAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAG	HA-hTMEM180
pc3.3_EcoR1_kozac_Rv	GGTGGCGAATTCAAGGGTTCGATCCTCTAG	
pc3.3_HAoverlap_Rv	ATCGTATGGGTACATGGTGGCGAATTCAAG	
HA_Rv	AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACAT	

47FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGAACAAAATGGCCTTCT GGGTCGGA	HA-47FLAG- hTMEM180
47FLAG_Rv	TCATCGTCGTCCTTATAGTCGAGGAACTGCCGGTCA CTGAGCCA	
79FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGAGCTCCCAGCCCCGGT CAGGCGCC	HA-79FLAG- hTMEM180
79FLAG_Rv	TCATCGTCGTCCTTATAGTCGCCAGCTGGGGCCCAG GGCACCCA	
123FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGCTGCAGTTCTTGCTGT GCCTGTGC	HA-123FLAG -hTMEM180
123FLAG_Rv	TCATCGTCGTCCTTATAGTCGGCCAGGTCGGCCAGC AAGGCATG	
154FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGCTCTCAGCCCACGACC GCACCCAC	HA-154FLAG -hTMEM180
154FLAG_Rv	TCATCGTCGTCCTTATAGTCGGCCAGGTCGGCCAGC AAGGCATG	
188FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGTTCTCCTCCTTCCGCG CTTTCTGC	HA-188FLAG -hTMEM180
188FLAG_Rv2	TCATCGTCGTCCTTATAGTCATCCTCCTTGTTCCAAAA GGC	
236FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGCTGTGTGGAGAGGAGC TGCTTGTG	HA-236FLAG -hTMEM180
236FLAG_Rv	TCATCGTCGTCCTTATAGTCGCCGCTATCCACAACCA GGCCTGA	
298FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGATCTCCCTTTCCACGG GCTCCATC	HA-298FLAG -hTMEM180
298FLAG_Rv	TCATCGTCGTCCTTATAGTCATGGTCGGACAACAGAT GCTCCAG	
329FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGGGCGTCTACGCGGTGG TGCGGGGG	HA-329FLAG -hTMEM180
329FLAG_Rv	TCATCGTCGTCCTTATAGTCCCAGCGCCGGCACAGG GACAGGAA	
357FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGAGCCTGCTGTGCCTCT TCATTGCC	HA-357FLAG -hTMEM180

357FLAG_Rv	TCATCGTCGTCCTTATAGTCGAGGTGGTCCGGGCCG GCCAACA	
398FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGGCCTCGGCACTCCTCT TTGGCATG	HA-398FLAG
398FLAG_Rv	TCATCGTCGTCCTTATAGTCTGCCTGCTTGCGGTGGT TCAGCAC	-hTMEM180
445FLAG_Fw	ATAAGGACGACGATGACAAGAGTGCCCATCCCTGGC CAGAGCCC	HA-445FLAG
445FLAG_Rv	TCATCGTCGTCCTTATAGTCCCCACAGGGGTTATGA GGGACTG	-hTMEM180
pEFh_IRESpuro 3_Fw	CCACCACCACCAGAATTCgcccctctccctccc	pEFh_IRES
pEFh_IRESpuro 3_Rv	TTGATTGTCGATGATATCTCAGGCACCGGGCTT	puro3
ERtarget_mRFP _Fw	GTTGCTGCTCGGCCTCCTCGGCCTGGCCGTCGCCAT GGCCTCCTC	pEFh_ERtarget_mRFP_
ERtarget_mRFP _Rv	GGCGAATTCTTACAGCTCGTCCTTGGCGCCGGTGA GTGGCGGCC	IRESpuro3
ERtarget_mRFP _Fw2	CCAGAATTCgccaccatgctgctatccgtgccgttgctgctcggc	
EcoR1_B4GALT 1_Fw	gccaattgccaccATGAGGCTTCGGGAGCCGCTCC	
B4GALT1_mRF P_Fw	cctccttaggcgctccATGGCCTCCTCCGAGGAC	pEFh_Golgitarget_mRFP_
B4GALT1_mRF P_Rv	GTCCTCGGAGGAGGCCATGGAGGCGCCTAGAGGAG G	IRESpuro3
Target_mRFP_ Rv	GGGCGAATTCTTAGGCGCCGGTGGAGTGGCG	
Memtarget_mR FP_Fw	CGCAAGGACAACCTGAACGACGACGGCGTGGACAT GGCCTCCTCC	pEFh_Membranetarget_
Memtarget_mR FP_Fw2	CAGAATTCgccaccatgGGCTGCATCAAGAGCAAGCGCA AGGACA	mRFP_IRES
Target_mRFP_ Rv	GGGCGAATTCTTAGGCGCCGGTGGAGTGGCG	puro3

pEFh_SBP_Ac GFPFw	ATATCAGCTGAATTC ATGGTGAGCAAGGGC	pEFh_SBP_ AcGFP
pEFh_SBP_Ac GFPRv	GATGAATTTCTAGAATTCTCAGTGATGATG	
SBP_Fw	ATGGATGAGAAAACCACAGGA	pEFh_TMEM 180_SBP_ AcGFP
His8stop_Rv	TCAGTGATGATGATGGTGGTG	
pANT_Xba1_ko zac_B_Fw	GCCTGCAGGTCTGACTCTAGAgccaccATGGGGCTGGG TCAGC	
pANT_B_Th_Nh e_Rv1	TCTGCTAGCGCTGCCGCGCGGCACCAGCACCATCTT AACATC	
pANT_Th_Nhe_ Bgl2_Rv2	GGTTTTCTCATCCATAGATCTGCTAGCGCTGCCGCG CGGCAC	
pEFh_B_Xba1_ Fw	CCACCACCACCAGAttctagagccaccATG	
pEFh_His8stop_ Rv	TTGATTGTCGATGATTCAGTGATGATGATG	

**Figure5-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11およびTable5-1**

5年以内に出版予定

## 参考文献

- [1] 国立がん研究センターがん情報サービス 最新がん統計:2019年10月04日  
[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html)
- [2] 国立がん研究センターがん情報サービス 大腸がん（結腸がん・直腸がん）  
<https://ganjoho.jp/public/cancer/colon/treatment.html>
- [3] 大腸癌研究会 大腸癌治療ガイドライン 医師用 2019年版  
[http://www.jscrr.jp/guideline/2019/index\\_guide.html](http://www.jscrr.jp/guideline/2019/index_guide.html)
- [4] V.T. DeVita, E. Chu, A history of cancer chemotherapy, *Cancer Res.* 68 (2008) 8643–8653. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6611.
- [5] N. Ferrara, H.P. Gerber, J. LeCouter, The biology of VEGF and its receptors, *Nat. Med.* 9 (2003) 669–676. doi:10.1038/nm0603-669.
- [6] 医薬品医療機器総合機構 アバスチン点滴静注用 100mg/4mL/アバスチン点滴静注用 400mg/16mL インタビューフォーム  
[https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/450045\\_4291413A1022\\_1\\_017\\_1F.pdf](https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/450045_4291413A1022_1_017_1F.pdf)
- [7] M. Shibuya, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies, *Genes and Cancer.* 2 (2011) 1097–1105. doi:10.1177/1947601911423031.
- [8] 医薬品医療機器総合機構 サイラムザ点滴静注液 100mg/サイラムザ点滴静注液 500mg インタビューフォーム  
[https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/530471\\_4291429A1023\\_2\\_1F.pdf](https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/530471_4291429A1023_2_1F.pdf)
- [9] A. Gschwind, O.M. Fischer, A. Ullrich, The discovery of receptor tyrosine kinases: Targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer.* 4 (2004) 361–370. doi:10.1038/nrc1360.
- [10] 医薬品医療機器総合機構 アービタックス注射液 100mg インタビューフォーム  
[https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/380079\\_4291415A1021\\_1\\_012\\_1F.pdf](https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/380079_4291415A1021_1_012_1F.pdf)



- [11] 医薬品医療機器総合機構 ベクティビックス点滴静注 100mg/ベクティビックス点滴静注 400mg インタビューフォーム  
[https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/400256\\_4291417A1020\\_1\\_011\\_1F.pdf](https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/400256_4291417A1020_1_011_1F.pdf)
- [12] B.B. Yang, P. Lum, A. Chen, R. Arends, L. Roskos, B. Smith, J.J. Prez Ruixo, Pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives on the clinical drug development of panitumumab, *Clin. Pharmacokinet.* 49 (2010) 729–740. doi:10.2165/11535970-000000000-00000.
- [13] T.J. Price, M. Peeters, T.W. Kim, J. Li, S. Cascinu, P. Ruff, A.S. Suresh, A. Thomas, S. Tjulandin, K. Zhang, S. Murugappan, R. Sidhu, Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): A randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study, *Lancet Oncol.* 15 (2014) 569–579. doi:10.1016/S1470-2045(14)70118-4.
- [14] Y. Inoue, S. Hazama, S. Iwamoto, Y. Miyake, C. Matsuda, R. Tsunedomi, N. Okayama, Y. Hinoda, T. Yamasaki, Y. Suehiro, S. Yoshino, J. Sakamoto, H. Mishima, M. Oka, FcyR and EGFR Polymorphisms as Predictive Markers of Cetuximab Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer, *Mol. Diagnosis Ther.* 18 (2014) 541–548. doi:10.1007/s40291-014-0103-6.
- [15] 医薬品医療機器総合機構 ザルトラップ点滴静注 100mg/ザルトラップ点滴静注 200mg インタビューフォーム  
[https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/780069\\_4291436A1023\\_1\\_004\\_1F.pdf](https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/780069_4291436A1023_1_004_1F.pdf)
- [16] A. Gaya, V. Tse, A preclinical and clinical review of aflibercept for the management of cancer, *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 484–493. doi:10.1016/j.ctrv.2011.12.008.
- [17] 医薬品医療機器総合機構 スチバーガ錠 40mg インタビューフォーム  
[https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/630004\\_4291029F1028\\_1\\_001\\_1F.pdf](https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/630004_4291029F1028_1_001_1F.pdf)
- [18] S.M. Wilhelm, J. Dumas, L. Adnane, M. Lynch, C.A. Carter, G. Schütz, K.H. Thierauch, D. Zopf, Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity, *Int. J. Cancer.* 129 (2011) 245–255. doi:10.1002/ijc.25864.

- [19] A. Grothey, E. Van Cutsem, A. Sobrero, S. Siena, A. Falcone, M. Ychou, Y. Humblet, O. Bouché, L. Mineur, C. Barone, A. Adenis, J. Tabernero, T. Yoshino, H.J. Lenz, R.M. Goldberg, D.J. Sargent, F. Cihon, L. Cupit, A. Wagner, D. Laurent, Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial, *Lancet*. 381 (2013) 303–312. doi:10.1016/S0140-6736(12)61900-X.
- [20] 日本臨床腫瘍学会 大腸がん患者における RAS 遺伝子 (KRAS/NRAS 遺伝子) 変異の測定に関するガイダンス第 2 版 2014 年 4 月  
[https://www.jsmo.or.jp/about/doc/RAS\\_guidance\\_coi.pdf](https://www.jsmo.or.jp/about/doc/RAS_guidance_coi.pdf)
- [21] Y. Sugiyama, B. Farrow, C. Murillo, J. Li, H. Watanabe, K. Sugiyama, B.M. Evers, Analysis of differential gene expression patterns in colon cancer and cancer stroma using microdissected tissues, *Gastroenterology*. 128 (2005) 480–486. doi:10.1053/j.gastro.2004.11.010.
- [22] T. Yamao, Y. Matsumura, Y. Shimada, Y. Moriya, K-I. Sugihara, T. Akasu, S. Fujita, T. Kakizoe, Abnormal expression of CD44 variants in the exfoliated cells in the feces of patients with colorectal cancer, *Gastroenterology*. 114 (1998) 1196–1205. doi:10.1016/S0016-5085(98)70425-1.
- [23] M. Yasunaga, Y. Matsumura, Role of SLC6A6 in promoting the survival and multidrug resistance of colorectal cancer, *Sci. Rep.* 4:4852 (2014). doi:10.1038/srep04852.
- [24] M. Yasunaga, S. Saijou, S. Hanaoka, T. Anzai, R. Tsumura, Y. Matsumura, Significant antitumor effect of an antibody against TMEM180, a new colorectal cancer - specific molecule, *Cancer Sci.* 110 (2019) 761–770. doi:10.1111/cas.13907.
- [25] G. Köhler, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*. 256 (1975) 495–497. doi:10.1038/256495a0.
- [26] G. Vidarsson, G. Dekkers, T. Rispen, IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions, *Front. Immunol.* 5 (2014). doi:10.3389/fimmu.2014.00520.

- [27] A.C. Grodzki, E. Berenstein, Antibody purification: affinity chromatography - protein A and protein G Sepharose., *Methods Mol. Biol.* 588 (2010) 33–41. doi:10.1007/978-1-59745-324-0\_5.
- [28] A.A. Shukla, J. Thömmes, Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins, *Trends Biotechnol.* 28 (2010) 253–261. doi:10.1016/j.tibtech.2010.02.001.
- [29] M.R. Ehrenstein, C.A. Notley, The importance of natural IgM: Scavenger, protector and regulator, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 778–786. doi:10.1038/nri2849.
- [30] A. Nethery, R.L. Raison, S.B. Easterbrook-Smith, Single-step purification of immunoglobulin M on C1q-Sepharose., *J. Immunol. Methods.* 126 (1990) 57–60. doi:10.1016/0022-1759(90)90011-j.
- [31] J.R. Nevens, A.K. Mallia, M.W. Wendt, P.K. Smith, Affinity chromatographic purification of immunoglobulin M antibodies utilizing immobilized mannan binding protein., *J. Chromatogr.* 597 (1992) 247–56. doi:10.1016/0021-9673(92)80117-d.
- [32] S.H. Mahassni, D.G. Klapper, R.G. Hiskey, Purification of a murine IgM monoclonal antibody, *Hybridoma.* 28 (2009) 189–197. doi:10.1089/hyb.2008.0087.
- [33] P. Gagnon, S.M.A. Latiff, C. Cai, W. Lau, C.L. Lim, H.T. Gan, IgM Purification with Hydroxyapatite - BioProcess InternationalBioProcess International, <https://bioprocessintl.com/upstream-processing/biochemicals-raw-materials/igm-purification-with-hydroxyapatite-349783/>
- [34] S. Gautam, K.C. Loh, Immunoglobulin-M purification - challenges and perspectives, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 840–849. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.001.
- [35] J. Xia, N. Psychogios, N. Young, D.S. Wishart, MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) W652–W660. doi:10.1093/nar/gkp356.
- [36] L. Shi, L.H. Reid, W.D. Jones, R. Shippy, J.A. Warrington, S.C. Baker, P.J. Collins, F. De Longueville, E.S. Kawasaki, K.Y. Lee, Y. Luo, Y.A. Sun, J.C. Willey, R.A. Setterquist, G.M.

Fischer, W. Tong, Y.P. Dragan, D.J. Dix, F.W. Frueh, F.M. Goodsaid, D. Herman, R. V. Jensen, C.D. Johnson, E.K. Lobenhofer, R.K. Puri, U. Scherf, J. Thierry-Mieg, C. Wang, M. Wilson, P.K. Wolber, L. Zhang, W. Slikker, S. Amur, W. Bao, C.C. Barbacioru, A.B. Lucas, V. Bertholet, C. Boysen, B. Bromley, D. Brown, A. Brunner, R. Canales, X.M. Cao, T.A. Cebula, J.J. Chen, J. Cheng, T.M. Chu, E. Chudin, J. Corson, J.C. Corton, L.J. Croner, C. Davies, T.S. Davison, G. Delenstarr, X. Deng, D. Dorris, A.C. Eklund, X.H. Fan, H. Fang, S. Fulmer-Smentek, J.C. Fuscoe, K. Gallagher, W. Ge, L. Guo, X. Guo, J. Hager, P.K. Haje, J. Han, T. Han, H.C. Harbottle, S.C. Harris, E. Hatchwell, C.A. Hauser, S. Hester, H. Hong, P. Hurban, S.A. Jackson, H. Ji, C.R. Knight, W.P. Kuo, J.E. LeClerc, S. Levy, Q.Z. Li, C. Liu, Y. Liu, M.J. Lombardi, Y. Ma, S.R. Magnuson, B. Maqsoodi, T. McDaniel, N. Mei, O. Myklebost, B. Ning, N. Novoradovskaya, M.S. Orr, T.W. Osborn, A. Papallo, T.A. Patterson, R.G. Perkins, E.H. Peters, R. Peterson, K.L. Philips, P.S. Pine, L. Pusztai, F. Qian, H. Ren, M. Rosen, B.A. Rosenzweig, R.R. Samaha, M. Schena, G.P. Schroth, S. Shchegrova, D.D. Smith, F. Staedtler, Z. Su, H. Sun, Z. Szallasi, Z. Tezak, D. Thierry-Mieg, K.L. Thompson, I. Tikhonova, Y. Turpaz, B. Vallanat, C. Van, S.J. Walker, S.J. Wang, Y. Wang, R. Wolfinger, A. Wong, J. Wu, C. Xiao, Q. Xie, J. Xu, W. Yang, L. Zhang, S. Zhong, Y. Zong, The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1151–1161. doi:10.1038/nbt1239.

[37] H. Ono, O. Ogasawara, K. Okubo, H. Bono, RefEx, a reference gene expression dataset as a web tool for the functional analysis of genes, *Sci. Data.* 4 (2017). doi:10.1038/sdata.2017.105.

[38] D.S. Chandrashekar, B. Bashel, S.A.H. Balasubramanya, C.J. Creighton, I. Ponce-Rodriguez, B.V.S.K. Chakravarthi, S. Varambally, UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses, *Neoplasia (United States)*. 19 (2017) 649–658. doi:10.1016/j.neo.2017.05.002.

[39] Q. Ke, M. Costa, Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), *Mol. Pharmacol.* 70 (2006) 1469–1480. doi:10.1124/mol.106.027029.

[40] P.H. Maxwell, M.S. Wlesener, G.W. Chang, S.C. Clifford, E.C. Vaux, M.E. Cockman, C.C. Wykoff, C.W. Pugh, E.R. Maher, P.J. Ratcliffe, The tumour suppressor protein VHL targets

hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, *Nature*. 399 (1999) 271–275. doi:10.1038/20459.

[41] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*. 411 (2001) 494–498. doi:10.1038/35078107.

[42] UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) D506–D515. doi:10.1093/nar/gky1049.

[43] G.L. Semenza, B.H. Jiang, S.W. Leung, R. Passantino, J.P. Concordat, P. Maire, A. Giallongo, Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 32529–32537. doi:10.1074/jbc.271.51.32529.

[44] B. Altenberg, K.O. Greulich, Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes, *Genomics*. 84 (2004) 1014–1020. doi:10.1016/j.ygeno.2004.08.010.

[45] R.J. De Berardinis, N.S. Chandel, Fundamentals of cancer metabolism, *Sci. Adv.* 2 (2016). doi:10.1126/sciadv.1600200.

[46] M.H. Saier, V.S. Reddy, B. V. Tsu, M.S. Ahmed, C. Li, G. Moreno-Hagelsieb, The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) D372–D379. doi:10.1093/nar/gkv1103.

[47] 山下 暁朗 (横浜市立大学医学部) 日本 RNA 学会 技術セミナー HEK293T 細胞を用いたリコンビナントタンパク質精製

<https://www.rnaj.org/component/k2/item/295-protein-purification-hek293>

[48] L. Hakanpaa, T. Sipila, V.-M. Leppanen, P. Gautam, H. Nurmi, G. Jacquemet, L. Eklund, J. Ivaska, K. Alitalo, P. Saharinen, Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin  $\beta 1$  activation., *Nat. Commun.* 6 (2015) 5962. doi:10.1038/ncomms6962.

[49] T. Nugent, D.T. Jones, Transmembrane protein topology prediction using support vector machines, *BMC Bioinformatics*. 10 (2009) 159. doi:10.1186/1471-2105-10-159.

- [50] H. Viklund, A. Elofsson, Best alpha-helical transmembrane protein topology predictions are achieved using hidden Markov models and evolutionary information., *Protein Sci.* 13 (2004) 1908–17. doi:10.1110/ps.04625404.
- [51] E.L. Sonnhammer, G. von Heijne, A. Krogh, A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences., *Proceedings. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 6 (1998) 175–82.
- [52] H. Shen, J.J. Chou, MemBrain: Improving the Accuracy of Predicting Transmembrane Helices, *PLoS One.* 3 (2008) e2399. doi:10.1371/journal.pone.0002399.
- [53] L. Kall, A. Krogh, E.L.L. Sonnhammer, Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W429–W432. doi:10.1093/nar/gkm256.
- [54] S.M. Reynolds, L. Käll, M.E. Riffle, J.A. Bilmes, W.S. Noble, Transmembrane topology and signal peptide prediction using dynamic bayesian networks., *PLoS Comput. Biol.* 4 (2008) e1000213. doi:10.1371/journal.pcbi.1000213.
- [55] K. Hofmann, W. Stoffel, TMbase - A database of membrane spanning protein segments, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 374 (1993) 166.
- [56] M. Cserzo, F. Eisenhaber, B. Eisenhaber, I. Simon, TM or not TM: transmembrane protein prediction with low false positive rate using DAS-TMfilter, *Bioinformatics.* 20 (2004) 136–137. doi:10.1093/bioinformatics/btg394.
- [57] G.E. Tusnady, I. Simon, The HMMTOP transmembrane topology prediction server, *Bioinformatics.* 17 (2001) 849–850. doi:10.1093/bioinformatics/17.9.849.
- [58] L. Dobson, I. Reményi, G.E. Tusnady, CCTOP: a Consensus Constrained TOPology prediction web server., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) W408–12. doi:10.1093/nar/gkv451.
- [59] T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, S. Mitaku, SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins, *Bioinformatics.* 14 (1998) 378–379. doi:10.1093/bioinformatics/14.4.378.

- [60] A. Bernsel, H. Viklund, J. Falk, E. Lindahl, G. von Heijne, A. Elofsson, Prediction of membrane-protein topology from first principles, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 7177–7181. doi:10.1073/pnas.0711151105.
- [61] H. Viklund, A. Elofsson, Best alpha-helical transmembrane protein topology predictions are achieved using hidden Markov models and evolutionary information., *Protein Sci.* 13 (2004) 1908–17. doi:10.1110/ps.04625404.
- [62] K. Tomii, T. Hirokawa, C. Motono, Protein structure prediction using a variety of profile libraries and 3D verification, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 61 (2005) 114–121. doi:10.1002/prot.20727.
- [63] A. Hildebrand, M. Remmert, A. Biegert, J. Söding, Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred., *Proteins.* 77 Suppl 9 (2009) 128–32. doi:10.1002/prot.22499.
- [64] S. Kelm, J. Shi, C.M. Deane, MEDELLER: homology-based coordinate generation for membrane proteins., *Bioinformatics.* 26 (2010) 2833–40. doi:10.1093/bioinformatics/btq554.
- [65] F. Sievers, D.G. Higgins, Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences, *Protein Sci.* 27 (2018) 135–145. doi:10.1002/pro.3290.
- [66] H. Ashkenazy, S. Abadi, E. Martz, O. Chay, I. Mayrose, T. Pupko, N. Ben-Tal, ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules., *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) W344–50. doi:10.1093/nar/gkw408.
- [67] L. Schrodinger, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1 (2010)
- [68] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389.
- [69] A.S. Ethayathulla, M.S. Yousef, A. Amin, G. Leblanc, H.R. Kaback, L. Guan, Structure-based mechanism for Na<sup>+</sup>/melibiose symport by MelB, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3009. doi:10.1038/ncomms4009.

- [70] P. Hariharan, L. Guan, Thermodynamic cooperativity of cosubstrate binding and cation selectivity of *Salmonella typhimurium* MelB., *J. Gen. Physiol.* 149 (2017) 1029–1039. doi:10.1085/jgp.201711788.
- [71] S. Shao, R.S. Hegde, Membrane Protein Insertion at the Endoplasmic Reticulum, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27 (2011) 25–56. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154125.
- [72] C. Wu, C. Orozco, J. Boyer, M. Leglise, J. Goodale, S. Batalov, C.L. Hodge, J. Haase, J. Janes, J.W. Huss, A.I. Su, BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources, *Genome Biol.* 10 (2009) R130. doi:10.1186/gb-2009-10-11-r130.
- [73] A.I. Su, T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K.A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M.P. Cooke, J.R. Walker, J.B. Hogenesch, A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 6062–6067. doi:10.1073/pnas.0400782101.
- [74] S.L. Dunwoodie, The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo, *Dev. Cell.* 17 (2009) 755–773. doi:10.1016/j.devcel.2009.11.008.
- [75] M.C. Simon, B. Keith, The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 285–296. doi:10.1038/nrm2354.
- [76] P.L. Stern, Oncofetal Antigen, in: *Encycl. Cancer*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011: pp. 2610–2613. doi:10.1007/978-3-642-16483-5\_4219.
- [77] S. Mei, J. Ke, J. Tian, P. Ying, N. Yang, X. Wang, D. Zou, X. Peng, Y. Yang, Y. Zhu, Y. Gong, R. Zhong, J. Chang, X. Miao, A functional variant in the boundary of a topological association domain is associated with pancreatic cancer risk, *Mol. Carcinog.* 58 (2019) 1855–1862. doi:10.1002/mc.23077.



## 謝辞

本研究は国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野にて行いました。国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野分野長/東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻客員教授の松村保広先生には、日頃の研究および本論文の作成においてご指導いただき、TMEM180 に関する基礎研究が不自由なく推進できる環境を提供していただきました。また社会人博士として進学の機会をいただきました。深く感謝いたします。国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野ユニット長/東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻客員教授の安永正浩先生には、実験手法やデータの解釈などの確なご指導をいただき、深く感謝いたします。

本論文審査の副査をお引き受けくださった東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 山本一夫教授、久恒辰博准教授、永田晋治准教授、国立がん研究センター研究所青木一教副所長には貴重なご助言を多数いただきました。深く感謝いたします。

国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野/株式会社凜研究所の西條信史博士、花岡慎悟博士には具体的な実験手技や抗体に関する知見など多くのご助言をいただきました。深く感謝いたします。

研究活動において多大なご支援、ご指導をいただきました、古賀宣勝博士、高島大輝博士、洲上弥史博士、津村遼博士、生内寿文博士、秘書の中山円さん、嶋田真美子さんをはじめ国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野の皆さまに深く感謝いたします。

第 5 章のノックアウトマウスの作製、掛け合わせ、各種サンプル採取は、公益財団法人実験動物中央研究所の後藤元人先生、江崎陽子先生に行っていただきました。また、胚盤胞での発現解析は東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 青木不学教授との共同研究として行っております。諸先生方に厚く御礼申し上げます。

pEFhベクターを供与していただきました横浜市立大学大学院医学研究科 山下暁朗准教授に厚く御礼申し上げます。

バイオインフォマティクスの解析法だけでなく、研究生活におきましていつも暖かくご助言いただきました大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構データサイエンス共同利用基盤施設 ライフサイエンス統合データベースセンター 坊農秀雅特任准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は、文部科学省科研費 若手研究（19K16730）の助成を受けて行われました。また、文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォームの病理形態解析支援事業、分子プロファイリング支援の分子探索支援化合物のサポートをいただいています。

最後に、長い学生生活をいつも応援してくれた祖母、両親、弟、妹に心より感謝します。そして2度目の博士課程を誰よりもサポートしてくれた妻、そして生まれてきたばかりの息子に心より感謝します。

## 論文目録

- 1, Takahiro Anzai and Yasuhiro Matsumura. Topological analysis of TMEM180, a newly identified membrane protein that is highly expressed in colorectal cancer cells  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2019 Dec;520(3):566-572 doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.070
  
- 2, Masahiro Yasunaga, Shinji Saijou, Shingo Hanaoka, Takahiro Anzai, Ryo Tsumura and Yasuhiro Matsumura. Significant antitumor effect of an antibody against TMEM180, a new colorectal cancer-specific molecule  
*Cancer Sci.*, 2019 Feb;110(2):761-770 doi: 10.1111/cas.13097