

博士論文

dynactin-associated protein の構造バリエーションにおける  
がん誘導活性に関する研究

2022 年 3 月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科

バイオサイエンス専攻

バイオ科学技術研究領域

尹 驍博

## 目次

目次 .....	2
第一章 序論.....	3
第二章 dynAP のスプライシングバリエントにおけるがん誘導活性の検討.....	8
2-1.緒言.....	8
2-2.方法.....	12
2-3.結果.....	18
2-4.考察.....	29
第三章 dynAP の糖鎖構造とがん誘導活性の関係性についての検討.....	31
3-1.緒言.....	31
3-2.方法.....	34
3-3.結果.....	42
3-4.考察.....	61
第四章 まとめ.....	63
参考文献.....	65
謝辞.....	75

## 第一章 序論

本研究は、出芽酵母を用いたヒトの遺伝子を対象とした、新規がん遺伝子の探索の成果に基づいて実施された。動物細胞における基本的な生命現象は、酵母においても程度の差こそあれ多くは保存されており、酵母の内在性遺伝子を欠損させた場合、それと遺伝的相互作用のある遺伝子を過剰発現させると、生育が停止することが知られている（synthetic dosage lethality と呼ばれる）[1]。特にがん遺伝子を酵母に発現させた場合、酵母の生育に関わる経路が干渉を受けることによって、高率で酵母の生育が停止する[2, 3]。この知見に基づいて種々のヒト遺伝子から、その野生株には影響がなく、特定の遺伝子の増殖に変化を与えるものを探索した。このような遺伝子から作られるタンパク質は、ヒト細胞内においても増殖に関与する可能性が高く、がん治療剤開発の有力な標的候補である。さらに、この系はヒト遺伝子の発現で誘導された生育停止の回復を表現型の指標とした阻害剤探索のシステムとしても有用である[4]。

そこで、欠損遺伝子を持つ酵母として、有糸分裂期の細胞において紡錘糸のキネトコアへの結合を監視する M 期チェックポイント分子である Mad2 の変異出芽酵母株 ( $\Delta$ Mad2 株) が利用された。この  $\Delta$ Mad2 株に発現させることで生育停止を引き起こすヒト遺伝子を探索した結果、計 10302 種のヒト完全長 cDNA から C18orf26 (chromosome 18 open reading frame 26) 遺伝子が同定された[5, 6]。この遺伝子産物は、ダイナクチンや p150<sup>Glued</sup> などのダイナクチン複合体と相互作用することが明らかになり、dynAP (dynactin-associated protein) と命名された[7]。ダイナクチンとダイニンモータータンパク質との相互作用は、微小管を介した細胞内小胞、オルガネラ、高分子複合体の移動と空間構成に必要である[8-10]。ダイナクチンは、様々な荷電粒子、ダイニン、微小管に結合する成分を含む大きなタンパク質複合体である。ダイナクチンとダイニンの相互作用は、細胞分裂時の紡錘体の位置決定においても重要な役割を果たす[11, 12]。

その後、dynAP の直接の相互作用分子として chaperonin-containing tailless complex polypeptide 1 (CCT) 複合体が報告された[13]。CCT 複合体は 8 種類の (CCT  $\alpha$ ~ $\theta$ ) 単量体から構成され、分子シャペロンとして機能し、チューブリンおよびアクチンタンパク質のフォールディングに必須であり、微小管を含む細胞骨格の構成を制御している。単量体の CCT  $\delta$  は p150<sup>Glued</sup> と相互作用し、

この相互作用が細胞表面突起の形成に必要である。dynAP や p150<sup>Glued</sup> を欠損させると、CCT  $\delta$  は細胞膜に局在しなくなることから、CCT  $\delta$ 、p150<sup>Glued</sup> と dynAP が細胞膜近くで結合し、細胞運動の増加に寄与しているものと考えられる (図 1) [14]。

一方、dynAP の過剰発現により、細胞の生存・増殖を促進する Akt の Ser473 のリン酸化の亢進が認められた [7]。逆に dynAP のノックダウンによってこのリン酸化は減少した。Akt の活性化は Hdm2 の発現亢進を通じて、がん抑制遺伝子産物である p53、p21 のレベルを低下させ、E-cadherin の発現を減少させて細胞増殖を促進することが、発がんのメカニズムの 1 つとして想定される [15-17]。

実際、dynAP とがんの関係は発現する組織・細胞の局在性からも示唆されている。40 種のヒト細胞株で dynAP の発現が検討され、19 種類で発現しており、3 種類のヒト正常細胞株では発現が認められなかった。特に腎細胞がん、前立腺がん、神経芽細胞腫などの多種のがん種由来の細胞株で dynAP が高発現していることが判明した [7]。一方、Human Protein Atlas (HPA) データベースの収載情報により、dynAP の組織における発現は食道や脾臓などの特定の正常ヒト組織でのみ見られたが、その生理的機能は未だ解明されていない [18]。マウスの dynAP オルソログにおいては肺、卵巣およびその他のいくつかの組織で発現していることが報告されているが、このような種間での dynAP の機能的差異も明らかではない [19]。

*in vitro* で dynAP をマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 で過剰発現させることで、細胞間の接着阻止機能の阻害により生じるフォーカス形成、足場非依存的増殖によりスフェロイド形成などの細胞がん化の特徴を示した。この結果から、dynAP の発現によって細胞は、増殖の接触阻止の解除やアノキスへの抵抗性を獲得することが示された。さらに、*in vivo* で dynAP はヌードマウスへ移植すると周りにゼリー状の粘膜構造を持つ腫瘍を形成した。形成された腫瘍は血管誘導性を持ち、細胞間の接着が緩んだ独特の構造が観察された。これらの結果から、dynAP の発現が血管新生関連因子の発現が誘導することが明らかとなった [20]。これらの結果をまとめると、dynAP はがん原遺伝子であり、さらにはがん転移に関与する可能性が強く示唆される。

dynAP は 210 アミノ酸からなる 2 型 (inside out) の 1 回膜貫通型タンパク質である。以下、この当初より研究されてきた dynAP を dynAPa と称す。C 末端側を細胞外に露出している、114-134aa が膜貫通ドメイン (transmembrane domain、TM)、173-210aa が Thr/Ser リッチドメイン (T/S rich domain) である。本研究において注目した点として、NCBI RefSeq スプライシングバリエント転写データベースに、ヒト dynAP 遺伝子には 3 つのスプライシングバリエントの可能性があると挙げられる[21]。dynAPa は Exon 1-2-3 から構成される (NCBI 番号 : NM\_173629.1)。さらに、アミノ酸配列から糖鎖修飾部位を予測した結果による、dynAPa の 75-77aa および 143-145aa に N 結合型糖鎖修飾部位のコンセンサス配列、C 末端側に 23 箇所潜在的な O 結合型糖鎖修飾部位が存在している (図 2)。本研究では、dynAP のスプライシングバリエントおよび糖鎖修飾に関して細胞がん化における影響を明らかにすることを目的とした。第 2 章では、dynAP の 3 種類スプライシングバリエントを作成した。多種類のヒトがん細胞でバリエントの有無を検討した。さらに、免疫染色による細胞内局在、*in vitro* でフォーカス形成能とスフェロイド形成能などによる、がん誘導活性を検討した。第 3 章では、dynAP の C 末端側の糖鎖特徴を解析した。C 末端の糖鎖変異体を作成し、C 末端の糖鎖は分子量の変化と細胞内局在に対する影響を検討した。同様に、*in vitro* で糖鎖修飾はがん誘導活性の関係性について検討した。第 4 章では全体のまとめを行った。

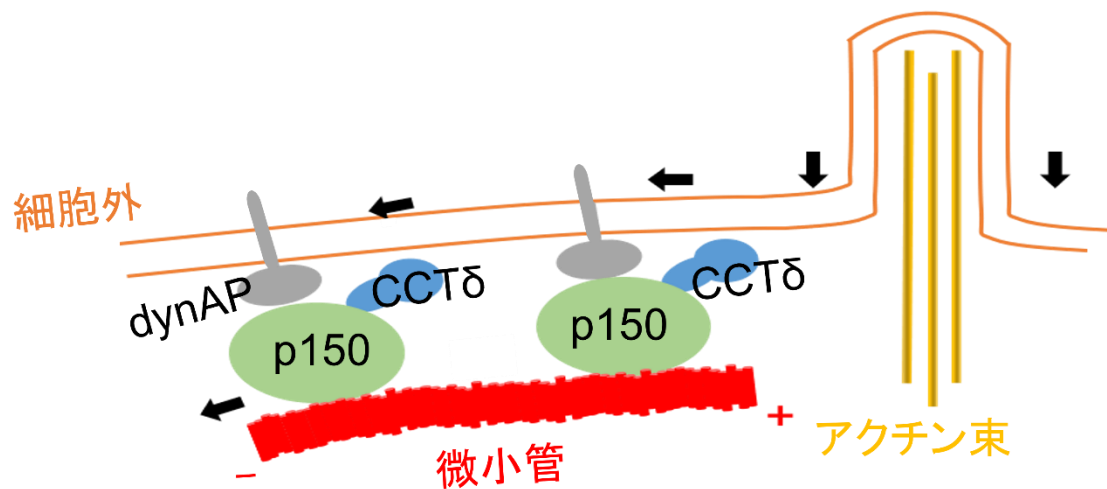


図 1. 野生型 dynAP は CCTδ と p150<sup>Glued</sup> との作用様式

CCTδ が細胞膜の近傍に局在するのは、ダイナクチン複合体と細胞膜の両方と結合する dynAP に関与する。CCTδ を発現させてダイナクチン複合体の成分である p150<sup>Glued</sup> を介し、微小管のマイナス端 (-) に輸送する。微小管依存的に細胞膜が内側に引き込まれる突起表現型を形成する。細胞膜がアクチン束を取り囲む引き込み繊維と、細胞膜の周辺に微小管が平行に走る滑らかな凹部の両方が形成される。

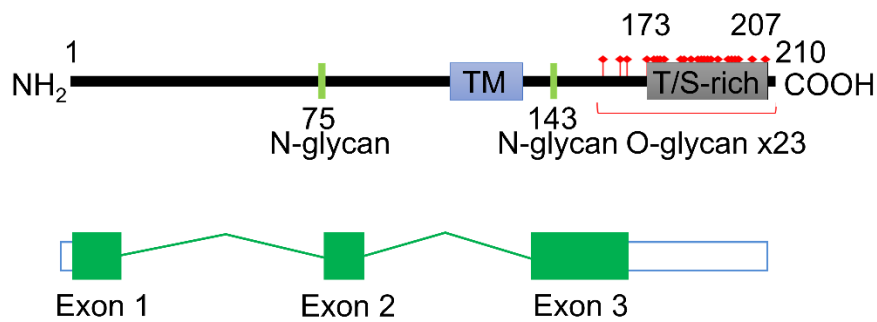


図 2. 野生型 dynAP の構造及び修飾部位の模式図

(上図) dynAP のアミノ酸配列から NetNglyc 1.0 (CBS) [22]と NetOglyc 3.1 (CBS) [23]を用いて修飾部位を予測した。緑色ボックス：N型糖鎖修飾部位のコンセンサス配列領域、そのアスパラギン残基の位置を番号で示す。赤色の線：O結合型糖鎖予測修飾部位。スレオニン/セリンリッチドメインのアミノ酸配列： $^{173}$ TMTTTSTVPASTATESTTSTATAATTSTEPITVAPT $^{207}$ 。

(下図) エキシソンの模式図。緑色ボックス：コード領域、白色ボックス：非コード領域、緑色ライン：イントロン。

## 第二章 dynAP のスプライシングバリエントにおけるがん誘導活性の検討

### 2-1. 緒言

選択的スプライシングは、mRNA の合成において前駆体転写物の選択的な除去および結合が起こることで、多様な遺伝子産物を作り出す[24]。これにより得られたタンパク質の分子多型をスプライシングバリエントと呼ぶ。選択的スプライシングはタンパク質構造の変化にとどまらず、機能においても大きな変化をもたらすことが知られている[25, 26]。

スプライシングバリエント間の発現バランスの崩壊または異常な選択的スプライシングバリエントの生成は、疾患の原因となりえる。それ故にヒト疾患に関連する異常なスプライシングバリエントの発見およびそれらの作用様式の理解は、関連疾患の診断および治療に重要な解決法を提供することが期待される。例えば、腫瘍抑制因子である AIMP2 は DNA が損傷する時、p53 と相互作用してアポトーシスを促進する。エキソン 2 を欠く AIMP2 のスプライシングバリエント (AIMP2-DX2) はアポトーシス活性を低下させ、ヒト肺癌細胞および患者の組織における高度に発現していることが報告されている[27]。heat shock proteins (HSP70s) の基質結合ドメイン (SBD) と DX2 のフレキシブル N 末端領域 (NFR) および GST-N 末端ドメイン (GST-N) の結合は、Siah1 によるユビキチン化から DX2 を保護する。AIMP2-DX2 と HSP70 のタンパク質間相互作用 (PPI) を阻害することは、がん治療の可能性がある[28, 29]。実際、抗がん化合物である BC-DXI-843 は DX2 を選択的に作用し、DX2 と HSP70 間の相互作用を妨げる可能性があることが報告されている[30]。

そのほかにも、多くの遺伝子のスプライシングバリエントが腫瘍形成、がん転移、薬剤耐性と密接に関係していることが知られている[31-34]。その故に、機能の明確でない dynAP バリエントを調べることは重要である。そこで、本研究では dynAP の機能を把握するためにスプライシングバリエントである dynAPb (Exon 0-1-3; NCBI 番号: NM\_001307955.1) と dynAPc (Exon 0-1-2-3; NCBI 番号: XM\_011525924.2) が dynAPa と同じように、がん由来する細胞株に発現し、がんタンパク質としての機能を有するか検証することを本章の目的とした。dynAPa、b および c の模式図 (図 3) とアミノ酸配列 (図 4) に示す。まず、6 種類のがん細胞において dynAPa、b および c の mRNA レベルの発現を



確認した。次に、マウス NIH3T3 細胞で dynAPa、b、c アイソフォームを過剰発現させ、*in vitro* でのフォーカス形成能、スフェロイド形成能、軟寒天中のコロニー形成能を検討し、細胞形質転換能について解析した。さらに、ヒト KMST-6 細胞を加えて、細胞内局在を検討した。その結果、3 種のスプライシングバリエントは同様の細胞内局在性を示したが、N 末端側のアミノ酸の違いにより異なるがん遺伝子活性を示すことが判明した。

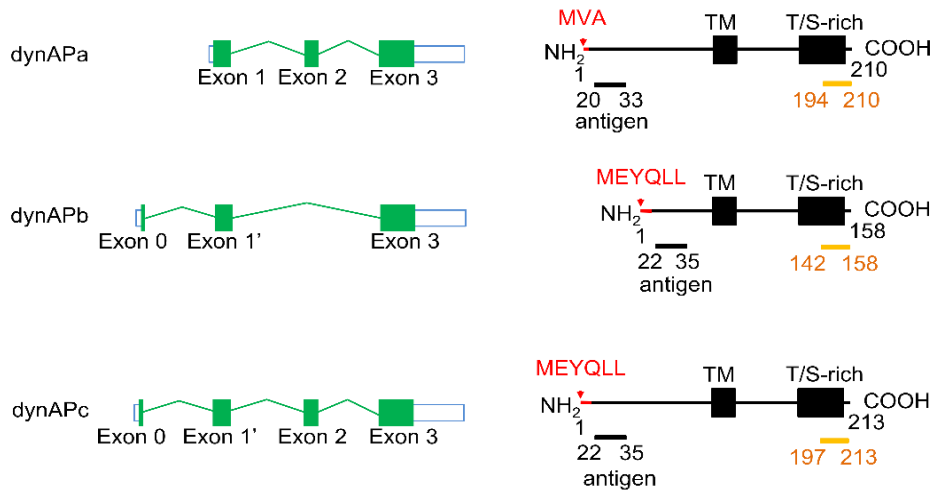


図 3. スプライシングバリエントの模式図

dynAPb は Exon 0、1'、3 を含むが、Exon 2 を欠く。dynAPb、c の N 末端の数アミノ酸が dynAPa (MVA) と異なり、MEYQLL である。ウサギ抗体作製に用いた抗原ペプチド (N-dynAP 抗体の認識部位: 20-33aa; C-dynAP の認識部位: 194-210aa) を示す。TM : 膜貫通ドメイン、T/S-rich : スレオニン/セリンリッチ領域、緑色ボックス : コード領域、白色ボックス : 非コード領域、緑色ライン : イントロン。

	1	10	20	30	40	50	
dynAPa	MVADI	KGNEQ	IEKYS	WREAC	DTGSS	RMDRK	HGKYI LNVEH SENQP PITHP NDQEA
dynAPb	MEYQLL**	*****	*****	*****	*****	*****	*****
dynAPc	MEYQLL**	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	N-antigen (20-33)						
	60	70	80	90	100	110	
	HSSIC	WCLPS	NDITS	DVSPN	LTGVC	VNPGI	LAHSR CLOQE SCNTQ VKEYC RNDWS
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	120	130	140	150	160		
	MWKVF	LACLL	ACVIM	TAIGV	LIICL	VNNKG	SANSS IVIQL STNDG ECVTV KPGTP
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	TM						
	170	180	190	200	210		
	SPACP	PTMTT	TSTVP	ASTAT	ESTTS	TATAA	TTSTE PITVA PTDHL
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	C-antigen (194-210)						

図 4. dynAP バリエントのアミノ酸配列

dynAPa のアミノ末端を 1 とする。\*記号：dynAPa と同じアミノ酸、-記号：dynAPb がないアミノ酸、赤色：N 末端付近の配列の相違部分、TM：膜貫通領域を表す。N-抗原、C-抗原はそれぞれ N-dynAP 抗体、C-dynAP 抗体の作製に使用した抗原ペプチド部位を示す。

## 2-2. 方法

### 2-2-1.細胞培養

マウス NIH3T3EGFP 細胞は DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium、ナカライテスク (株)) 培地で培養した。培地に 5% (v/v) FCS (IRON FORTIFIED BOVINE CALF SERUM、SAFC Biosciences, Inc., KS, USA) 、100 U/mL Penicilin-Streptomycin Mixed Solution (以下 P/S と省略する。ナカライテスク (株) ) を添加した。

ヒト腎細胞がん ACHN、Caki-1、乳がん MCF-7、前立腺がん PC-3、子宮頸がん HeLa、結腸がん DLD-1 とヒト線維芽細胞 KMST-6 細胞は RPMI1640 培地 (Sigma-Aldrich Co.LLC, MO, USA) で培養した。培地に 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum、SAFC Biosciences) 、および 100 U/mL P/S を添加した。細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターで培養した。

### 2-2-2. ヒトがん細胞株からの total RNA 精製

ACHN、Caki-1、MCF-7、PC-3、HeLa、DLD-1 細胞を RNeasy Mini kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) を用いて、製造者のプロトコールにしたがって Total RNA を単離した。Total RNA (ACHN 32  $\mu$ L (20  $\mu$ g 相当)、Caki-1 38  $\mu$ L (15  $\mu$ g 相当)、MCF-7 27  $\mu$ L (30  $\mu$ g 相当)、PC-3 28  $\mu$ L (30  $\mu$ g 相当)、HeLa 30  $\mu$ L (50  $\mu$ g 相当)、DLD-1 33  $\mu$ L (40  $\mu$ g 相当) を Recombinant DNaseI (タカラバイオ (株) ) を用いて DNase 処理した。3M CH<sub>3</sub>COOH 10  $\mu$ L、100% エタノール 250  $\mu$ L を加えて -80°C、20 分間静置した。12,000 rpm、4°C、10 分間で遠心して上清を捨て、70% エタノール 200  $\mu$ L を加えて洗浄し、12,000 rpm、4°C、5 分間で遠心して上清を捨てた。エタノールを風乾で蒸発させてから RNase free H<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L で沈殿を溶かして total RNA を精製した。

### 2-2-3. RT-PCR によるヒトがん細胞株での dynAPa-c mRNA の発現確認

精製した total RNA (1.0  $\mu$ g 相当) を ReverTraAce  $\alpha$ -<sup>®</sup> RT-PCR kit (東洋紡 (株) ) で cDNA 合成を行った。KOD FX Neo (東洋紡 (株) ) を用いて PCR を行った。dynAPa、b と c の mRNA を検出するために設計したプライマーセット (#1+#2、#0+#2 と #0+#10) は表 1 に示す。ポジティブコントロールとし

て、Control Primer F (G3PDH) と Control Primer R (G3PDH) のプライマーセットを使用した。プライマーセットは dynAP アイソフォームの結合部位は図 5A に示した。PCR 反応液を 94°C 2 分間を 1 サイクル、98°C 30 sec、62°C (dynAPc は 59°C) 30 sec、68°C 30 sec を 35 サイクル (dynAPa は 40 サイクル)、4°C ∞ の条件で PCR を行った。1.5%アガロースゲルでアガロース電気泳動を行った。。DNA マーカーは 1 Kb Plus DNA Ladder を使用した。

表 1. プライマーの配列

Primer	Sequence
#0	5'-tcaccaaaaaatggaataccaacttctag-3'
#1	5'-gaagatctagttgcagatatataaagggcaat-3'
#2	5'-acgcgtcgactataaatgatcggttaggtg-3'
#10	5'-ctgtgtgttacaggattctgactgtag-3'
Control Primer F (G3PDH)	5'-accacagtccatgccatcac-3'
Control Primer R (G3PDH)	5'-tccaccacctgttctgta-3'

#### 2-2-4. dynAP 抗体の作製

dynAPa の N-抗原 (20-33aa) と C-抗原 (194-210aa) をウサギに免疫し、すべての dynAP アイソフォームを認識できる 2 種類のポリクローナル抗体 (N-および C-抗体) を作製した。IgG はウサギの血清から抗原ペプチドに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。非免疫ウサギのコントロール IgG は、和光純薬 (株) から購入した。

#### 2-2-5. 一過性発現 KMST-6/pFLAG-CMV2-Bsd-dynAP の作製

dynAPa-c をコードする完全長 cDNA は pFLAG-CMV2-Bsd ベクター (blasticidin S deaminase 遺伝子を持つ pFLAG-CMV-2 (Sigma-Aldrich) の派生物) にサブクローニングし、N 末端 Flag タグ付き dynAPa-c を発現するプラスミドが得られた。6 well plate に Cover Glass をセットし、 $4 \times 10^4$  cells/ 2

mL/well になるように細胞を播種し、RPMI 1640 培地 (10% FBS 含有) で一晚培養した。翌日に常温の 100  $\mu$ L OPTI-MEM 培地、3  $\mu$ g の pFLAG-CMV2-Bsd-dynAPa-c プラスミド、9  $\mu$ L FuGENE HD (Promega Co., WI, USA) を 1.5 mL チューブに添加した。室温で 15 分間静置した後、6 well plate に添加し、1 日培養した。dynAPa-c の細胞内局在を解析した。

#### 2-2-6. NIH3T3EGFP/pMY-dynAP-IRES-EGFP 安定形質転換細胞の作製

pFLAG-CMV2-Bsd-dynAP プラスミドは KOD-Plus Mutagenesis Kit を用いて Flag タグを除去し、タグなしの pCMV2-Bsd-dynAP を作製した。レトロウイルスによる dynAP を発現するために、タグなしの pCMV2-Bsd-dynAP を EcoRI と XhoI で処理し、pMY-IRES-EGFP の MCS 上にある EcoR I  $\cdot$  Xho I site に組込み、pMY-dynAP-IRES-EGFP を作製した[20]。得られたプラスミドは、FuGENE 6 transfection reagent (Promega) を用いて、製造者の指示に従ってレトロウイルスのパッケージング細胞である Plat-E (Platinum-Ecotropic) に導入された[35]。48 時間後、ウイルスを含有する上清をセルロースアセテートタイプの 0.45  $\mu$ m メンブレンフィルターでろ過し、8  $\mu$ g/mL ポリブレン (Sigma-Aldrich) を添加した。その後、ウイルス/ポリブレン含有上清を NIH3T3EGFP 細胞に添加し、一晚インキュベートして遺伝子導入をした。得られた細胞は dynAP の発現、細胞内局在、および *in vitro* での細胞形質転換能をフォーカス形成アッセイ、軟寒天コロニー形成アッセイ、スフェロイド形成アッセイにより評価した。

#### 2-2-7. ウェスタンブロッティングによる dynAP バリエーションの解析

NIH3T3EGFP/pMY-dynAP-IRES-EGFP 細胞に Laemmli バッファー (使用直前に 2-ME と 5:1 で混合) [36]を加えて 95°C 5 分間加熱し 13200 rpm、25°C、5 分間を遠心してタンパク質を抽出した。Bradford 色素結合法に基づいた Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA) を用いて SpectraMax M2 (測定波長: 595 nm) でタンパク質の吸光度を測定し、検量線によるタンパク質の量を算出した。dynAP アイソフォームのタンパク質 10  $\mu$ g を 12% SDS-PAGE に供し、ウェスタンブロッティングを行った。SDS-PAGE

をニトロセルロース膜に転写した後、TBST (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) で調製した 5% Blocking one (ナカライテスク (株)) を用いて抗体を希釈した。一次抗体である N-dynAP 抗体 (1/1000) を細胞に添加して 1 h 反応させた。抗体を括弧内に示した割合で希釈して用いた。二次抗体である Anti-IgG (H+L chain) (Rabbit) pAb-HRP (1/5000、(株) 医学生物学研究所) を添加して 1 h 反応させた後、ニトロセルロース膜を Chemi-lumi One Super (ナカライテスク (株)) に浸し、ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Co., IL, USA) で現像した。コントロールは  $\beta$ -actin を使用した。ニトロセルロース膜に一次抗体である  $\beta$ -actin (1/1000、Santa Cruz Biotechnology) と二次抗体である Anti-Mouse IgG (H+L chain) HRP (1/5000、(株) 医学生物学研究所) を添加した。

#### 2-2-8. 細胞内局在の解析

ポリ-L-リジンコートしたカバースリップを細胞培養用プレートにセットし、 $4 \times 10^4$  cells/ 2 mL になるように細胞を播種して一晩培養した。細胞を 70% メタノールで 30 分間固定し、20% Blocking one in miliQ で 30 分間インキュベートした。TBST で調製した 5% Blocking one を用いて抗体を希釈した。一次抗体である N-dynAP 抗体 (1/1000)、C-dynAP 抗体 (1/1000)、Flag に対する Anti DDDDk-tag Affinity Purified Rabbit (1/1000、(株) 医学生物学研究所) とゴルジ体に対する Purified mouse Anti-GM130 (1/1500、BD Transduction Laboratories, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) を添加して 1 h 反応させた。抗体を括弧内に示した割合で希釈して用いた。その後、二次抗体を添加して 1 h 反応させた。二次抗体には、N/C-dynAP 抗体と FLAG 抗体に対する CF555 Goat Anti-Rabbi IgG (H+L) (1/1000、BIOTIUM Inc., CA, USA) と GM130 抗体に対する Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (H+L) (1/1000、Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) を用いた。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; ナカライテスク (株)) を含む封入剤である Fluoro-KEEPER Antifade Reagent (Non-Hardening Type) を 1 滴加えた後、Axioskop 2 plus microscope (Carl Zeiss AG, Thuringia, Germany) により細胞画像を取得した。

### 2-2-9. Flow cytometry による NIH3T3EGFP/pMY-dynAP-IRES-EGF における dynAP の発現の解析

細胞を 2.5g/L-Trypsin/1mmol/l-EDTA Solution (ナカライテスク (株)) で処理した後、 $3 \times 10^5$  個の細胞を 2 mL FACS バッファー (2% FBS in PBS (Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich)) でインキュベートした。FACS buffer で終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の一次抗体である C-dynAP 抗体または rabbit-IgG 抗体 (和光純薬 (株)) を作製し、10  $\mu\text{L}$  を細胞に添加して 1 h 反応させた。FACS buffer で終濃度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の二次抗体である R-PE (Goat anti-rabbit IgG R-Phycoerythrin, SouthernBiotech Associates Inc., AL, USA) を作成し、10  $\mu\text{L}$  を細胞に添加した。1 h 反応させた後、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI (Propidium Iodide, ナカライテスク (株)) を含む FACS バッファーを 600  $\mu\text{L}$  添加して SH800 セルソーター (SONY, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

### 2-2-10. 2次元培養下でのフォーカス形成アッセイ

6 well プレートに NIH3T3EGFP/pMY-dynAP-IRES-GFP 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/2 mL/well で播いて、15 日間培養した。その後、細胞を氷冷の 100%メタノールで 10 分間 固定し、0.5% crystal violet (ナカライテスク (株)) を含む 25% メタノールで 10 分間 染色した。乾燥した後、細胞コロニーの存在を確認した。

### 2-2-11. 3次元培養下での軟寒天コロニー形成アッセイ

0.6%と 0.3%の寒天 (ナカライテスク (株)) を作って、オートクレーブで溶かした。NIH3T3EGFP/ pMY-dynAP-IRES-GFP 細胞を DMEM 培地 (5% FCS、1% P/S) で終濃度を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように調製した。DMEM 培地 (10% FCS、1% P/S) を 0.6%の寒天に添加し、4 mL を 6 cm ディッシュに添加し、10 分間固定して bottom 層を作製した。DMEM 培地 (5% FCS、1% P/S) を含む 0.3% の寒天に  $2 \times 10^4$  個の細胞を懸濁し、2 mL を bottom 層の上に添加して細胞層を作製した。Top 層は bottom 層と同じように作って、細胞層の上に添加した。37°Cの CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 21 日間培養を行った。100  $\mu\text{L}$  以上のコロニーの数を Cell<sup>3</sup>iMager (SCREEN ホールディングス (株), Kyoto, Japan)



で計数した。

### 2-2-12. 3次元培養下でのスフェロイド形成アッセイ

dynAP バリエーションを発見する NIH3T3EGFP のスフェロイド形成は久能らの報告に従って検討した[20]。NIH3T3EGFP/ pMY-dynAP-IRES-GFP 細胞を PrimeSurface 96U U-bottom 96-well Ultralow Cell Adhesion Plate (住友ベークライト (株)) に 500 cells/ 100  $\mu$ L/well を播種し、14 日間培養した。このウェル形状により、単一で中央に位置するスフェロイドの形成が促進された。スフェロイド形成は、Cell*i*Mager を用いてスフェロイド面積を測定することにより定量化した。

### 2-2-13. 統計解析

データは Welch の補正を加えた Student の t-test で解析し、 $p < 0.05$  を統計的に有意とした。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. ヒト癌細胞株における dynAP mRNA の発現

プライマーセット#1-2は、ACHN, Caki-1, MCF-7, PC-3 ヒト癌細胞株で 650 bp の PCR 産物を生成したが、HeLa や DLD-1 細胞では認められなかった (図 5B)。この増殖断片のサイズは、dynAPa mRNA から予想されるサイズ 649 bp と一致する。プライマーセット#0-2 を用いた場合、500 bp と 650 bp の 2 つの産物が ACHN と Caki-1 細胞に高レベルで見られたが、MCF-7 細胞では低レベルであった (図 5C)。500 bp の産物は dynAPb から予想されるサイズ 497 bp と一致した。なお、#0 は dynAPb のエキソン 0 の位置に設計し、dynAPa 由来の断片は生成しないので 650 bp の産物は dynAPc に由来するものと考えられる。次に、プライマーセット#0-10 を用いて 320 bp の産物が ACHN と Caki-1 細胞で豊富に見られたが、MCF-7 細胞では低レベルであった (図 5D)。この増殖断片のサイズは、dynAPc mRNA から予想されるサイズ 319 bp と一致した。

### 2-3-2. Flow cytometry による dynAP の発現の解析

C-dynAP 抗体で NIH3T3EGFP/ pMY-dynAP-IRES-GFP 細胞を標識し、蛍光を発する細胞を計数することにより、dynAP の発現率を測定した (図 6)。Flow cytometry で細胞自身の GFP 蛍光と抗体由来の蛍光が一致しないことで確認した。NIH3T3EGFP/pMY-IRES-GFP は C-dynAP 抗体と結合しないことは、GFP で細胞を検出して確認した。NIH3T3EGFP 細胞に導入し dynAP は C-dynAP 抗体で 90%以上検出した。dynAP のバリエーションを導入した細胞において、細胞表面に C-dynAP 抗体と結合したことから、すべてのアイソフォームの C 末端領域が細胞外に露出していることが示唆された。

### 2-3-3. ウェスタンブロッティングによる dynAP タンパク質の発現解析

pMY-dynAP-IRES-GFP を導入した NIH3T3EGFP のタンパク質抽出液から、C-dynAP 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより dynAP タンパク質を検出した (図 7)。dynAPa-c の理論分子量はそれぞれ 22.5 kDa、17.1 kDa、23.0 kDa である。ウェスタンブロッティングの結果による、dynAPa は約 19kDa、dynAPb は 17kDa、dynAPc は 20kDa の理論値と一致するバンドが観察された。

同時に、dynAPa と b は 43 kDa、dynAPc は 40 kDa のバンドを検出した。以上の結果から、スプライシングバリエントで変化する N 末端領域は SDS-PAGE における分子量の異常に影響しないと考えられる。

#### 2-3-4. dynAPa-c の細胞内局在化

NIH3T3EGFP/pMY-dynAP-IRES-GFP 細胞における dynAP バリエントの細胞内局在を N-および C-dynAP 抗体で細胞を免疫染色することで調べた。N-dynAP 抗体により、dynAPa、b、c は標識され、赤色の蛍光を発色した。dynAPa、b、c は細胞膜に蛍光が強く、細胞膜に局在することが示された。加えて、GM130 抗体により緑蛍光を発するゴルジ体の領域では強い赤色の蛍光が共局在することが、dynAPa、b、c は細胞のゴルジ体も局在することが強く示唆された (図 8A)。C-dynAP 抗体を用いた場合も同様の結果が得られた (図 8B)。さらに、ヒト由来細胞株でもマ同様の結果が得られるか検討した。内在性 dynAP を発現していない KMST-6 細胞を用いて dynAP を一過性発現させた。この細胞における dynAP バリエントの細胞内局在を C-dynAP 抗体および FLAG 抗体で蛍光観察した。図 9A、B の結果により、ヒト細胞で dynAP バリエントの局在は細胞膜とゴルジ体であり、マウス由来細胞株での局在結果と一致することが観察された。以上の結果から、スプライシングバリエントの N 末端領域の違いは細胞内局在性に影響しないと考えられる。

#### 2-3-5. 細胞の形質転換

2次元培養でのフォーカス形成能、3次元培養での軟寒天コロニー形成とスフェロイド形成は、*in vitro* での細胞形質転換の特徴である[37]。そこで、dynAP バリエントを発現させた NIH3T3EGFP 細胞を用いて *in vitro* での細胞形質転換能をフォーカス形成により調べた。dynAPa は細胞間で接触して増殖でき、多くのフォーカスを形成した。dynAPb 細胞はフォーカスの形成が少なく、dynAPc はフォーカスをほとんど形成しなかった (図 10)。以上の結果から、dynAPb、c は細胞間接触を伴う増殖が起こりにくいものと考えられる。

軟寒天で直径 100  $\mu\text{m}$  以上のコロニーを数えたところ、対象でのコロニー数は 71 個であったのに対し、dynAPa 発現細胞のコロニーの数は 94 個、dynAPb

発現細胞のコロニー数は 83 個、dynAPc 発現細胞のコロニー数は 65 個であった (図 11)。以上の結果から、dynAPa は足場非依存的増殖したが、dynAPb、c は足場非依存性の増殖は起りにくく、コロニーの形成能を低下したと考えられる。

次に、スフェロイドを形成させ、面積を測定したところ、dynAPa 発現 NIH3T3EGFP 細胞は時間依存的に大きなスフェロイドを増殖させた。dynAPb 発現 NIH3T3EGFP 細胞によるスフェロイドの増殖は、コントロール細胞よりも速かったが、NIH3T3dynAPa 細胞よりもかなり遅かった。dynAPc 発現 NIH3T3EGFP 細胞のスフェロイドは、コントロール細胞と同程度の速度でしか増殖しなかった (図 12)。以上の結果から、dynAPa は細胞同士が付着し増殖したが、dynAPb、c は足場依存性を持ち、細胞間の凝集は弱くなったものと考えられる。

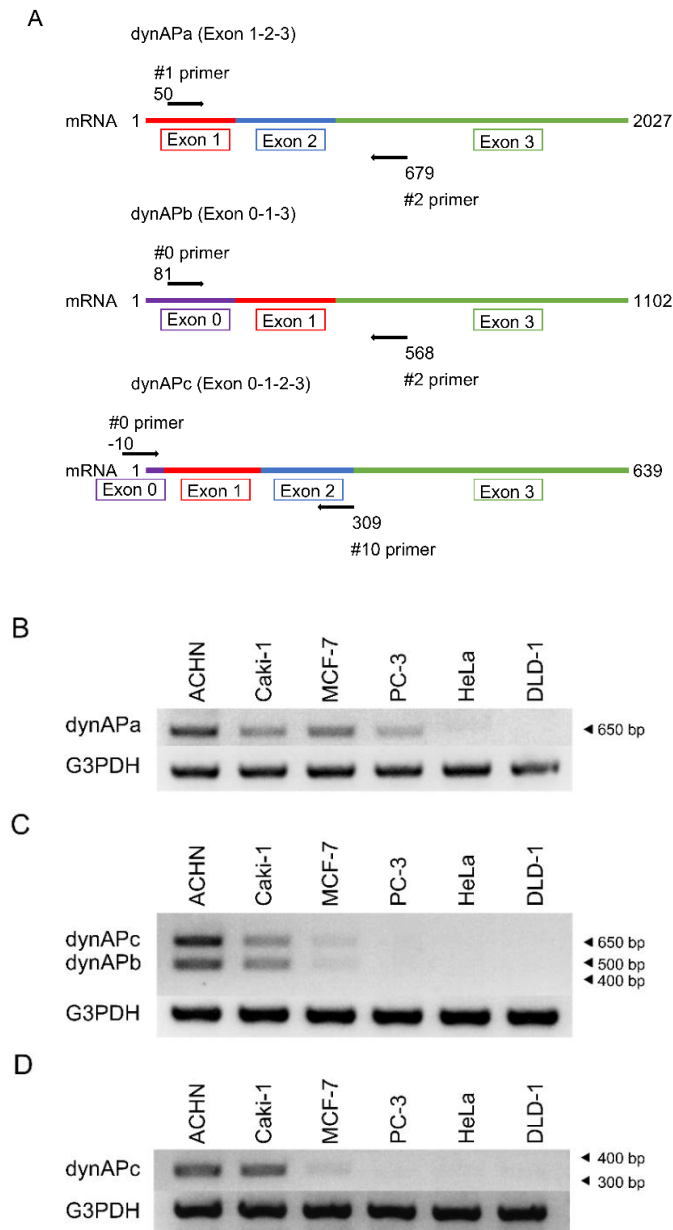


図 5. プライマーセットの模式図とがん細胞株における dynAP mRNA の発現

(A) プライマーセットの dynAP mRNA に結合領域と増幅の長さを示す。

(B) 6 種類のがん細胞をプライマーセット#1+#2 を用いて増幅した。(C) 6 種類のがん細胞をプライマーセット#0+#2 を用い増幅した。(D) 6 種類のがん細胞をプライマーセット#0+#10 を用い増幅した。G3PDH mRNA : ポジティブコントロール。

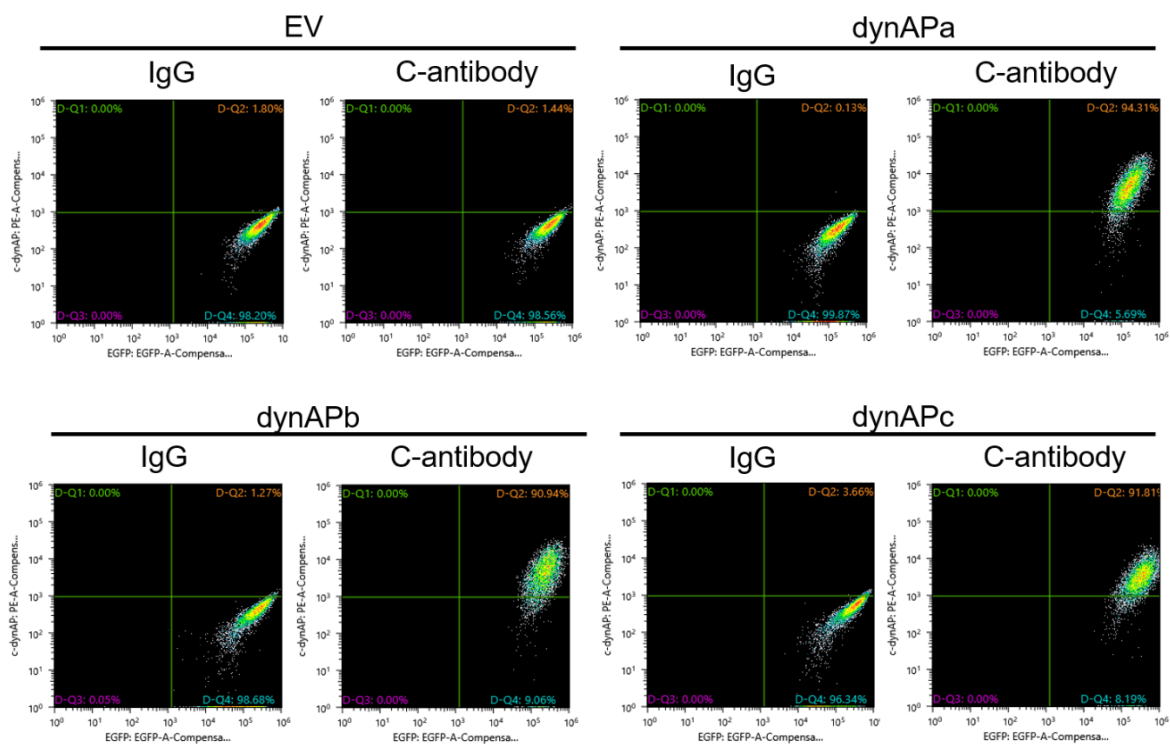


図 6. Flow cytometry による dynAP の発現の解析

縦軸は C-dynAP 抗体で標識された粒子（細胞）数を示す。横軸は GFP 蛍光による検出された粒子（細胞）数を示す。10<sup>3</sup> 以下場合、検出されないことを表す。IgG：ネガティブコントロール。

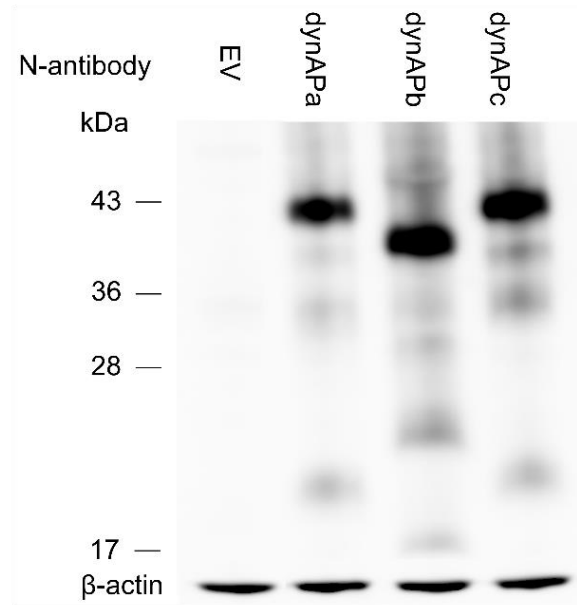


図 7. ウェスタンブロッティングによる dynAP タンパク質の発現解析

dynAPa、b、c の理論分子量はそれぞれ 22.5 kDa、17.1 kDa、23.0 kDa である。N-dynAP 抗体を用いて、dynAP バリエーションの特異的な分子量を WB により確認した。

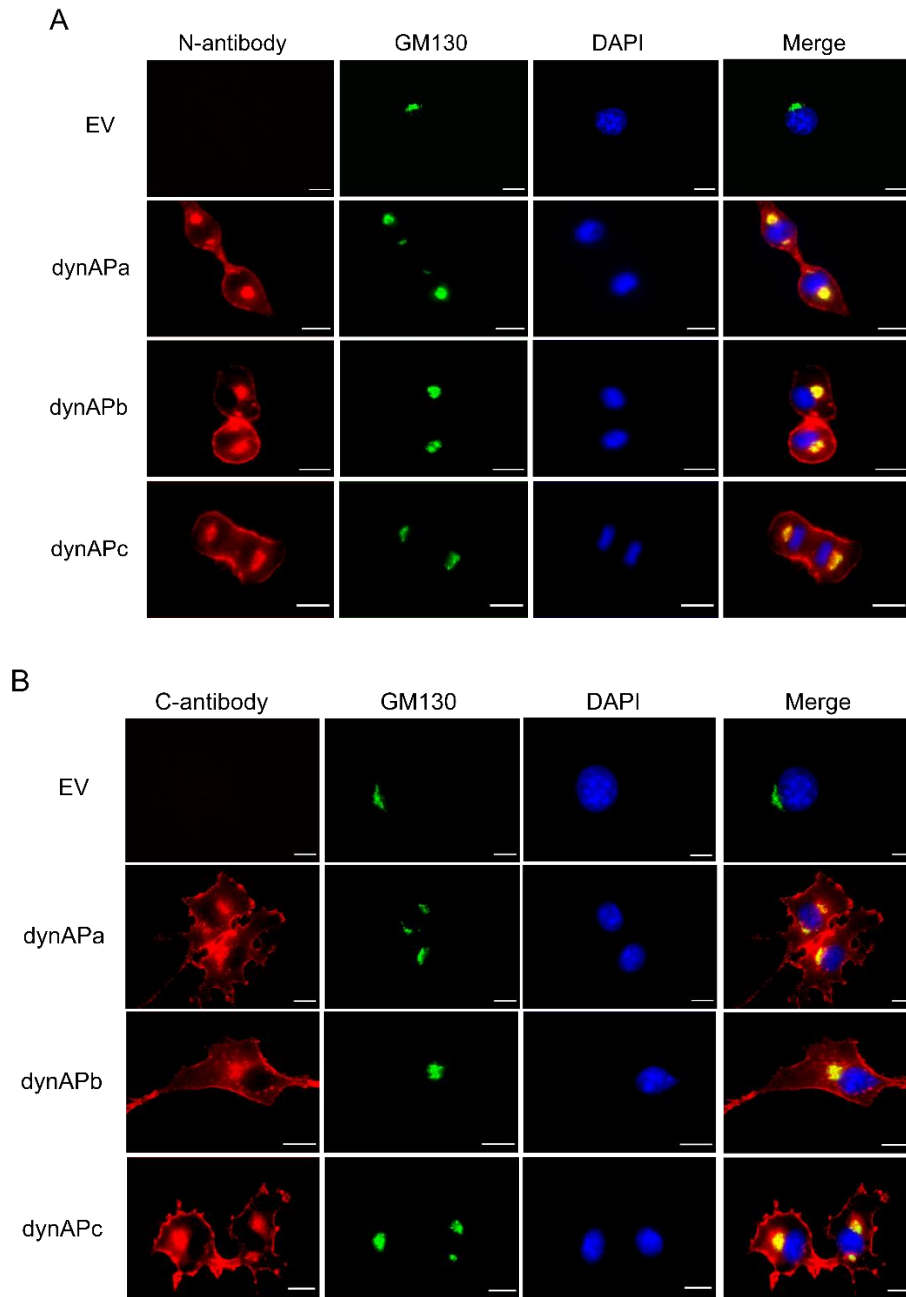


図 8. 間接免疫蛍光法による NIH3T3EGFP における dynAP の細胞内局在性の解析

(A) 赤色：N-dynAP 抗体で標識した dynAP を示す。(B) 赤色：C-dynAP 抗体で標識した dynAP、緑色：ゴルジマーカである GM130、青色：DAPI で標識した核を示す。



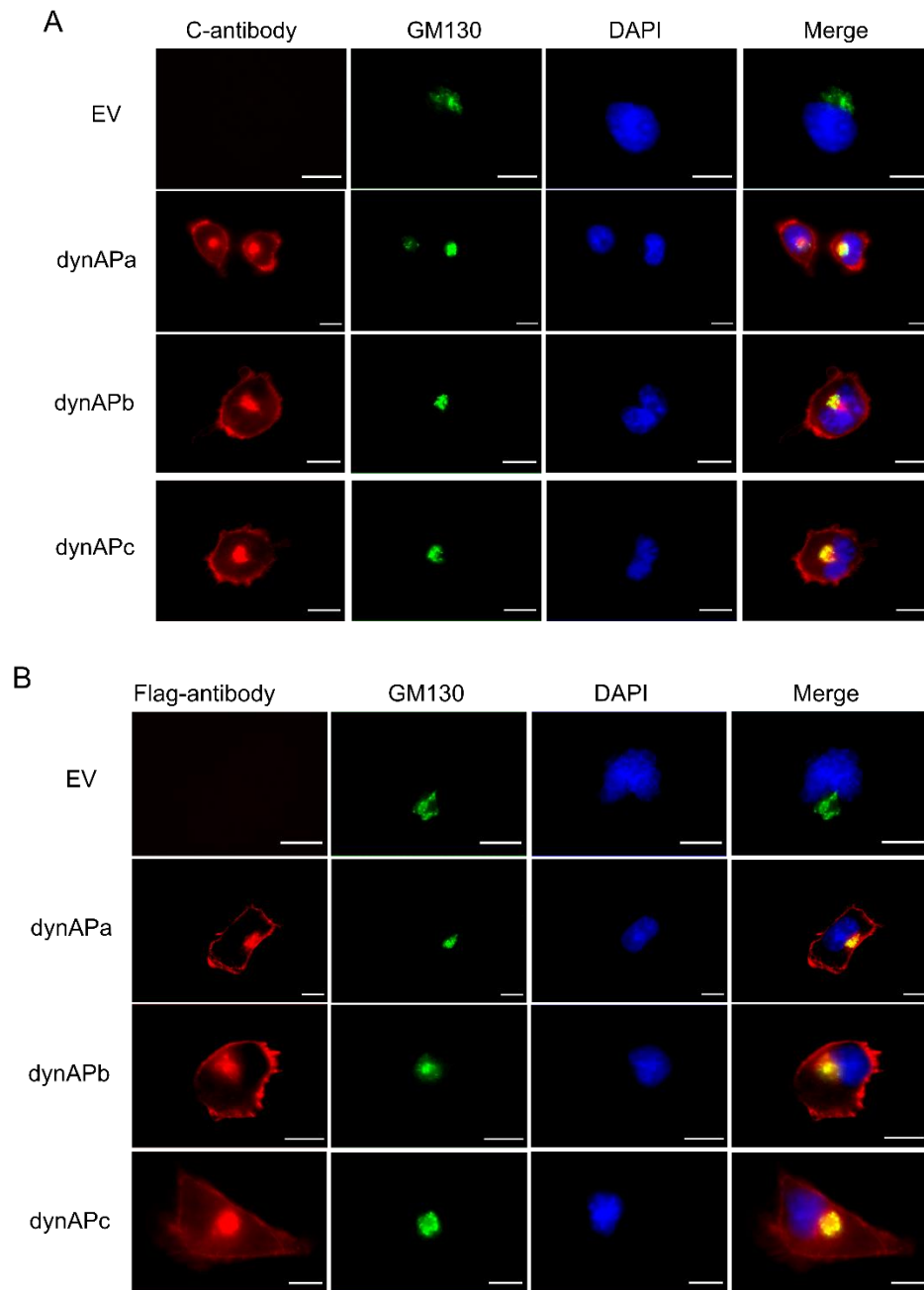


図 9. 間接免疫蛍光法による KMST-6 における dynAP の細胞内局在性の解析

(A) 赤色 : C-dynAP 抗体で標識した dynAP を示す。(B) 赤色 : FLAG 抗体で標識した dynAP、緑色 : ゴルジマーカーである GM130、青色 : DAPI で標識した核を示す。

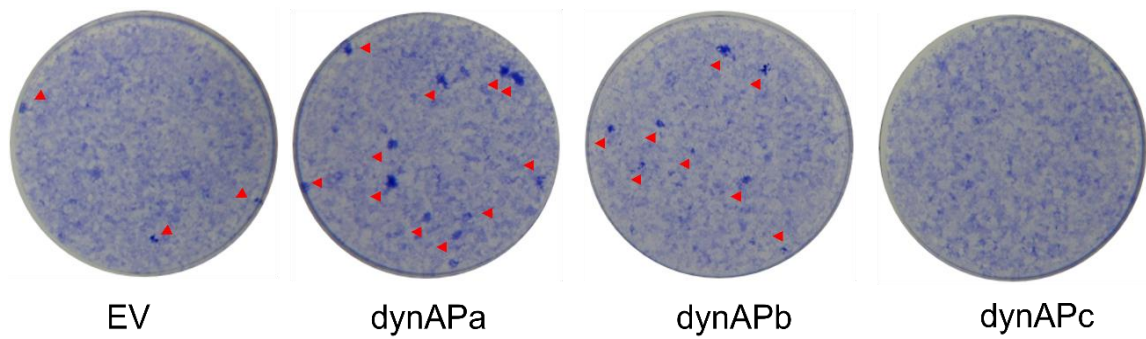


図 10. 2次元培養下でのフォーカス形成能の解析

NIH3T3EGFP/pMY-dynAP-IRES-GFP の安定形質転換細胞を  $1 \times 10^4$  cells/2mL/ well で播いて、14 日間培養した後に Crystal Violet で染色した。赤色の矢じり：形成したフォーカスを示す。

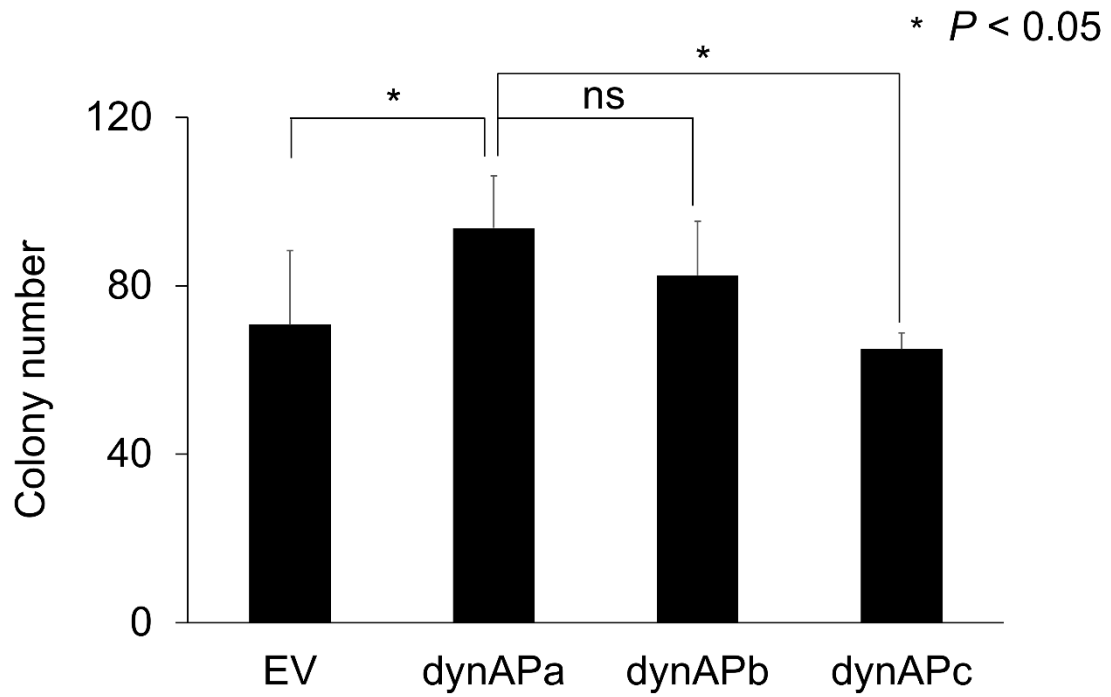


図 11. 3 次元培養下での軟寒天コロニー形成能の解析

NIH3T3EGFP/pMY-dynAP-IRES-GFP を 21 日間培養し、100  $\mu\text{m}$  以上のコロニー数を数えた。縦軸は 100  $\mu\text{m}$  以上のコロニー数を示している。n=4 で実験を行った。

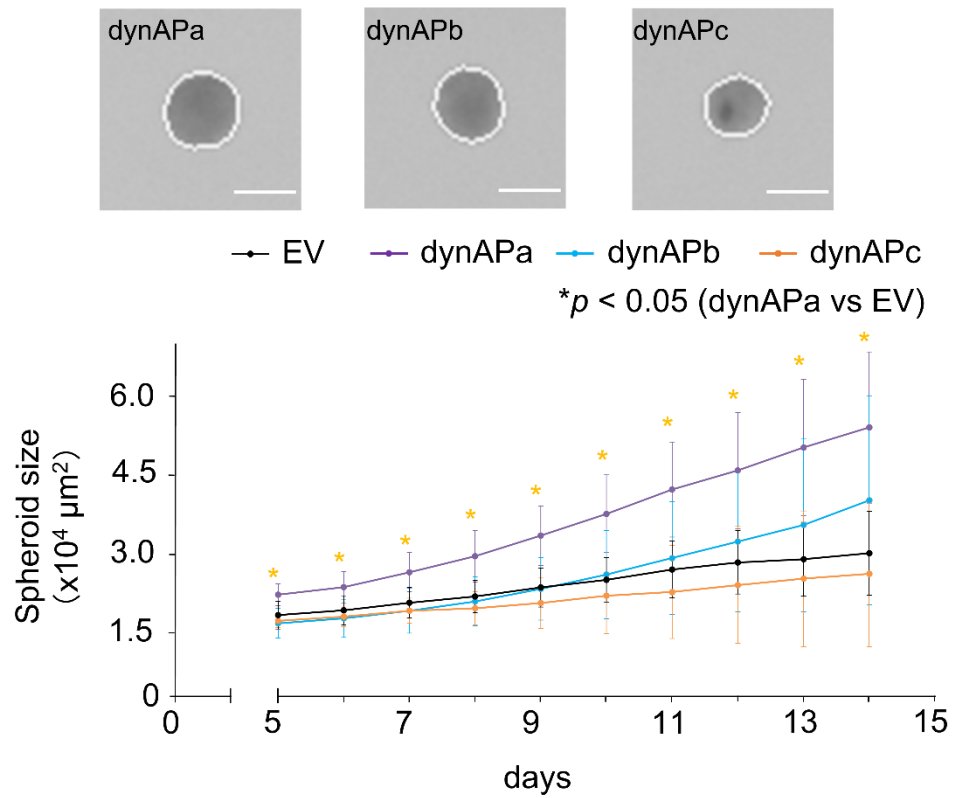


図 12. 3 次元培養下でのスフェロイド形成能の解析

縦軸はスフェロイド面積値、横軸は培養日数を示す。NIH3T3EGFP/pMY-dynAP-IRES-GFP 細胞を播種した後 5 日目から 14 日目までのスフェロイドの面積値を示す。n=10 で実験を行った。\*は p 値<0.05 を示す。

## 2-4. 考察

dynAP は Human Protein Atlas のデータベースで検索して、組織（正常・がん）と細胞株内で dynAP の RNA の発現解析が示されている。正常組織では HPA、GTEX、FANTOM5 dataset により、dynAP は食道で高発現し、細胞株である Karpas-707 とがん組織である頭頸部がんにおいて dynAP の RNA が高発現する。これらデータベースの遺伝子/タンパク質のデータは dynAPa と dynAPb に関する解析結果であるが、dynAPc の組織内発現は不明である。本研究は、6 種類のコロネクター細胞を用いて、3 つのスプライシングバリエントの RNA レベル発現を検討した。dynAPa は多くのがん細胞に発現した。dynAPb、c の発現は一致していたが、dynAPa と比較して発現する細胞種は少なく、また、RNA レベルの発現量が少なかった。一方で、同一のがん細胞で dynAP スプライシングバリエントは同時に存在する可能性が強く示唆された。がん細胞で dynAP スプライシングバリエントの相互作用は不明であるが、弱いバリエントが強いバリエントよりも多く発現すると、トータルのがん化能は減少するなど、3 種の dynAP バリエントは細胞内で総合的に、細胞のがん化に影響する可能性があることが考えられる。

分子量を検討した結果、dynAPb、c は dynAPa と同様に、理論値および修飾されたものと考えられる分子量の大きなバンドを検出した。dynAPa の C 末端には糖鎖修飾部位があり、次章に述べるように SDS-PAGE における dynAPa の異常な移動度は、C 末端の T/S-rich 領域の存在に起因する。dynAPb、c は dynAPa の C 末端と同一の配列なので、糖鎖修飾を同じ様式で受けている可能性が高い。

細胞内局在性を検討した結果、dynAPb、c は dynAPa と同様に細胞膜とゴルジ体に局在することが観察された。3 種のバリエントは膜貫通領域から C 末端までの配列が共通である。dynAPb は Exon 2 でコードされる 55 アミノ酸配列が欠失し、dynAPb、c は dynAPa と異なる MEYQLL 配列を N 末端に持つが、dynAPa との細胞内局在性が同じことは、これらの部位は細胞内局在性に対する影響を持たないと考えられる。

がん遺伝子活性に関しては、dynAPb は dynAPa に比べて活性低下した。dynAPc はがん遺伝子活性を失っていた。一方、dynAPa は 3 つのアイソフォ

ームの中で最も高い細胞形質転換能を示した。dynAPc は逆にがん遺伝子活性を完全に失っていたことは興味深い。N 末端側のドメインと Exon 2 が dynAP のがん遺伝子活性に大きな影響を及ぼすことが示唆された。シグナル伝達経路はスプライシング間と相互作用し、がん活性に影響することが報告されている [38]。polypyrimidine tract-binding protein (PTB) はスプライシング因子の負の調節因子であり、5'スプライシング部位の認識を阻害し、エキソンのインクルージョンによってスプライシングを回避することができる [39, 40]。PTB のような因子は dynAP のスプライシングバリエントと相互作用し、dynAPb、c のがん遺伝子活性を抑制する可能性がある。

エキソンの中に塩基配列の欠損とアミノ酸の置換は形質転換能に対する影響を検討できる [28]。dynAPa、dynAPc の N 末端アミノ酸配列の変異体の作製、がん遺伝子活性との相関の検討などを切り口として、dynAP バリエントによるがん化の分子メカニズムを明らかにすることが今後の課題と言える。

dynAPa の発現は mTORC2 の構成要素である、Rictor の mRNA レベル、タンパクレベルを亢進させ、mTORC2 は Akt の ser473 をリン酸化させる。活性化された Akt は FOXO3a をリン酸化し、転写因子である FOXO3a の核内移行を阻害して、アポトーシスの回避、細胞の生存を促進する [7]。dynAPb、c の構造は dynAPa との違いが、タンパク質の機能および特異性に影響を与えている可能性がある。仮説として、dynAPb、c は Rictor との相互作用が減弱し、Akt、FOXO3a のリン酸化が抑制されることで、細胞にアポトーシスを誘導する可能性がある。これは dynAPb、c 発現細胞の Spheroid 形成能が低減する要因かもしれない。

がん原遺伝子は正常時には細胞増殖制御に関与する。dynAP ががん原遺伝子であるならば、3つのスプライシングバリエントの中で唯一がん誘導性を示さない dynAPc は、むしろ正常細胞で中心的に機能している可能性がある。つまり、正常細胞で機能する dynAPc から、なんらかの変化により dynAPa、b へ発現動態が変化した場合に、がんが誘導されるのかもしれない。

### 第三章 dynAP の糖鎖構造とがん誘導活性の関係性についての検討

#### 3-1. 緒言

タンパク質は、新生鎖として合成された後に構造形成と共役して種々の翻訳後修飾を受ける。特に、真核生物においてほとんどの細胞表面のタンパク質は、糖鎖修飾されることにより活性型へと変換される。細胞に発現するタンパク質の 50%が糖鎖修飾を受けているとされている[41]。糖鎖修飾は細胞間接着、外部刺激からの細胞の保護、細胞増殖など多様な生命現象と密接に関係していることが知られている[42-44]。がん組織では、通常組織とは異なる糖鎖修飾が生じ、がんの増殖、浸潤や予後に密接に関係している事例がある[45-47]。このようながん特異的な糖鎖により修飾されたタンパク質を標的とする抗がん剤が開発されている。従って、がん遺伝子産物の糖鎖修飾の構造や機能を調べることは重要な課題と言える。しかしながら、これまで dynAP の糖鎖構造についてはほとんどが明らかになっていない。本章では、dynAP の C 末端領域に N 型糖鎖結合部位と O 型糖鎖結合部位に付着した糖の構造を解明し、糖鎖構造変異体を用いてがん遺伝子活性に対する影響を検討した。

糖鎖修飾は、大きく二種類に分類され、アスパラギン側鎖に付加される N 結合型糖鎖修飾とスレオニン/セリン側鎖ヒドロキシ基に付加される O 結合型糖鎖修飾の 2 つの様式に大別される。N 結合型糖鎖は、末端の構造によってオリゴマンノース型、複合型、ハイブリッド型に分類され、Asn-X-Ser/Thr (X : Pro 以外) のシークオンが知られている。細胞膜タンパク質の 3 分の 2 が N 型糖鎖修飾を受けているとも言われている[48]。dynAP のシークオンは細胞内 N 末端領域の 75 位と細胞外 C 末端領域の 143 位に存在する。dynAP の N 型糖鎖結合部位に N 型糖鎖修飾される可能性があるが、その詳細は不明である。O 結合型糖鎖は、2-3 分子の GalNAc や Gal、GlcNAc で構成される 8 種のコア構造に分類され、さらに様々な糖分子が付加されることで極めて多種多様な構造をとる[49]。上皮細胞に発現する糖タンパク質であるムチンは、分子量の 50%程度を O 型糖鎖が占める糖タンパク質である。膜貫通型のムチンは細胞内ドメインの Cys を介して EGFR など膜タンパク質とヘテロ二量体を形成し、活性化させることで増殖シグナルを亢進することが知られている[50, 51]。分泌型のムチンは細胞外に極めて親水性の高い粘膜層を形成する。これが、細菌

やウイルスの感染、細菌毒素などの外部刺激から細胞を保護する物理的なバリアの役割として機能している[52]。dynAP の C 末端領域に Thr および Ser に富む領域に存在し、O 型糖鎖修飾される可能性がある。

アミノ酸組成から計算される dynAP の分子量は 22.5 kDa であるが、SDS-PAGE では約 45 kDa のバンドとして観察され、見かけの分子量が一致しない[7]。界面活性剤の結合は TM タンパク質の立体構造を変化させ、見かけ分子量が一致しないことがある[53-55]。しかし、一般的に分子量のずれは理論値から 50%程度以内であり[53]、dynAP の見かけの分子量の大きな差を説明するには不十分である。糖鎖修飾以外には、分子量を大きく変化させる可能性としては、トランスグルタミナーゼによるグリコシレーションやタンパク質オリゴマー化 [56, 57]、スモイル化 [58]、ユビキチン化 [59] などの修飾が考えられる。

本章では、dynAP の糖鎖修飾部位の変異体を作製し (図 13)、分子量の比較による糖鎖修飾の有無を検討した。さらに、N/O 型糖鎖修飾の詳細な解析のために、HEK293F 細胞で発現させた可溶型 dynAP の C-末端領域に存在する糖鎖構造をドットプロット、質量分析で解析した。さらに、C 末端領域の O 型糖鎖は細胞内局在性と細胞形質転換能に対する影響を検討した。その結果、dynAP の C 末端のスレオニン/セリンリッチ領域は SDS-PAGE における分子量の異常的な移動度に関与した。シークオン領域にフコースが付加されている複合型 N 結合型糖鎖とスレオニン/セリンリッチ領域に core 1 型 O 結合型糖鎖が付加されている。O 結合型糖鎖がなくなった場合、dynAP は細胞膜に局在できず、がん遺伝子活性を失ったことがわかった。



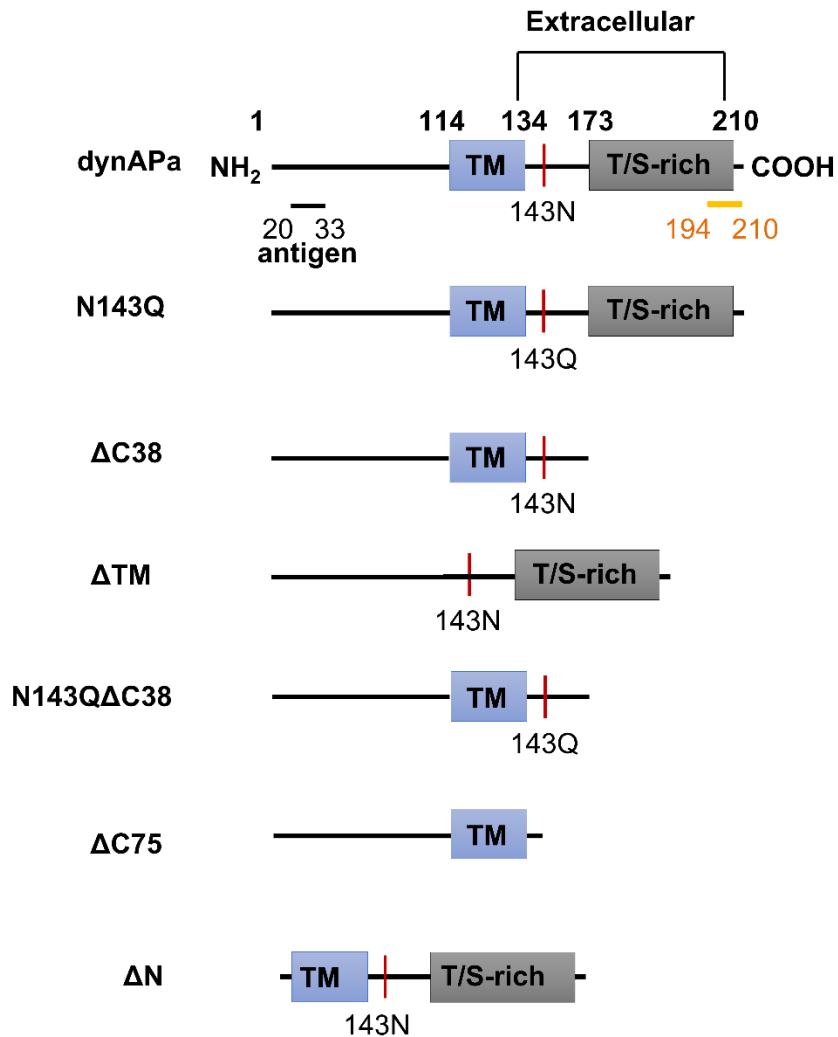


図 13. dynAP と糖鎖変異体の模式図

膜貫通ドメイン (TM)、N 型糖鎖結合部位 (143N)、スレオニン/セリンリッチ領域 (T/S-rich)、ウサギ抗体作製に用いた抗原ペプチド (N-dynAP 抗体の認識部位: 20-33aa; C-dynAP 抗体の認識部位: 194-210aa) を示す。

- dynAPa : 野生型 dynAP
- N143Q : C 末端の N 型糖鎖修飾部位欠損
- ΔC38 : C 末端の 38 aa (O 型糖鎖修飾部位を含む T/S rich) 欠損
- ΔTM : TM ドメイン (113 – 133 aa) 欠損
- ΔC38N143Q : N/O 型糖鎖修飾部位欠損
- ΔC75 : C 末端の 75 aa ( TM ドメイン以降の領域) 欠損
- ΔN : N 末端からの 110 aa ( TM 前の領域) 欠損

## 3-2. 方法

### 3-2-1. 細胞培養

NIH3T3-3-4 細胞は DMEM (5% (v/v) FCS、100 U/ mL P/S) 培地で培養した。ヒト HeLa 細胞および KMST-6 細胞は RPMI1640 (10% (v/v) FBS、100 U/mL P/S) 培地で培養した。ヒト胎児腎臓細胞 HEK293F (Fast growth variant、FreeStyle 293-F cell line) は無血清培地 (Gibco FreeStyle 293 Expression Medium; Thermo Fisher Scientific Inc) で培養した。非腫瘍原性ヒト乳腺上皮細胞 MCF10A は DMEM/Ham's F-12 (ナカライテスク (株)) で培養した。細胞は、37°C、5-8% CO<sub>2</sub> のインキュベーターで培養した。

### 3-2-2. プラスミドの構築

dynAPa の N 末端から 110 アミノ酸を欠損した変異体 (dynAP $\Delta$ N)、膜貫通領域を欠損した変異体 ( $\Delta$ TM)、143 番目のアミノ酸 Asn を Gln に置換した変異体 (dynAPN143Q)、C 末端 38 アミノ酸を欠損した変異体 (dynAP $\Delta$ C38)、C 末端 75 アミノ酸を欠損した変異体 (dynAP $\Delta$ C75)、dynAPN143Q と dynAP $\Delta$ C38 の二重変異体 (dynAP $\Delta$ C38N143Q) は、完全長の dynAP cDNA を鋳型として KOD-Plus Mutagenesis Kit を用いて PCR 法で作製した。dynAPa、N143Q、 $\Delta$ C38、 $\Delta$ C38N143Q の cDNA は pFLAG-CMV2-Bsd ベクターにサブクローニングし、N 末端 Flag タグ付き dynAP とその変異体を発現できる pFLAG-CMV2-Bsd-dynAP プラスミドを作製した。pFLAG-CMV2-Bsd-dynAP プラスミドは KOD-Plus Mutagenesis Kit を用いて Flag タグを除去し、タグなしの pCMV2-Bsd-dynAP を作製した。レトロウイルスによる dynAP を発現するために、タグなしの pCMV2-Bsd-dynAP を EcoRI と XhoI で処理し、pMY-IRES-EGFP の MCS 上にある EcoR I・Xho I site に組み込み、pMY-dynAP-IRES-EGFP を作製した。dynAPa、 $\Delta$ N、 $\Delta$ TM、 $\Delta$ C38、 $\Delta$ C75、の cDNA はレンチウイルスを介して、pLenti6.3/V5-DEST ベクター (Thermo Fisher Scientific Inc) にクローニングした。dynAP135-210 を分泌するために、IL2ss を介して、分泌型 dynAP135-210 (IL2ssHisdynAP135-210、IL2ssHisFcXadynAP135-210、IL2sdynAP135-210XaFc) と IL2ssHisFc (コントロール) が設計された。ここで、IL2ss は分泌のための IL2 のシグナルペプチド、His は精製のための 6-ヒ

スチジンタグ、dynAP135-210 は細胞外に露出する C 末端領域、Fc は免疫グロブリン G (IgG) 定数領域、Xa は Factor Xa プロテアーゼ認識配列 (Ile-Glu-Gly-Arg) である。IL2ssHisdynAP135-210 は dynAP135-210 の N 末端に His タグが付加された発現物である。IL2ssHisFcXadynAP135-210 は dynAP135-210 の N 末端に His タグ、Fc、Xa が付加された発現物である。IL2ssdynAP135-210XaFc は dynAP135-210 の C 末端に Xa を介して Fc が付加された発現物である。In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ (株)) を用いて pcDNA3.3-IL2ss に導入し、これら 3 種類の分泌型 dynAP135-210 を作製した。

### 3-2-3. MCF10A、NIH3T3 と HeLa に pLenti-dynAP の導入

pLenti6.3/V5-DEST—dynAPa、 $\Delta$ C38、 $\Delta$ C75、 $\Delta$ TM、 $\Delta$ N を MCF10A 細胞、pLenti6.3/V5-DEST—LacZ、dynAPa、 $\Delta$ C75 を NIH3T3 細胞、GFP 融合 dynAP を用いて作製した pLenti6.3/V5-DEST—dynAPa、 $\Delta$ C38、 $\Delta$ C75 を HeLa 細胞に導入するために、ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Thermo Fisher Scientific Inc) を使用した[21]。

MCF10A/pLenti6.3/V5-DEST—dynAP を用いてウエスタンブロッティングと細胞内局在解析を行った。NIH3T3/pLenti6.3/V5-DEST—dynAP を用いてフォーカス形成能を検討した。HeLa/pLenti6.3/V5-DEST—dynAP を用いて細胞内局在の解析を行った。

### 3-2-4. 一過性発現 NIH3T3/pCMV2-Bsd-dynAP の作製

pCMV2-Bsd/dynAPa、 $\Delta$ C38、N143Q、 $\Delta$ C38N143Q プラスミドをリポフェクション法 (X-treme GENE HP (ロシュ・ダイアグノスティックス (株))) で NIH3T3 細胞に一過性発現させた。ウエスタンブロッティング解析のために、導入 48 時間後にタンパク質を抽出した。

### 3-2-5. 一過性発現 KMST-6/pFLAG-CMV2-Bsd-dynAP の作製

6 well plate に  $4 \times 10^4$  cells/ 2 mL/well になるように KMST-6 細胞を播種し、RPMI 1640 培地 (10% FBS 含有) で一晩培養した。100  $\mu$ L OPTI-MEM 培地、3  $\mu$ g の pFLAG-CMV2-Bsd-dynAPa、 $\Delta$ C38、N143Q、 $\Delta$ C38N143Q プラスミド、

9  $\mu$ L FuGENE HD を 1.5 mL チューブに添加した。室温で 15 分間静置した後、6 well plate に添加し、1 日培養した。dynAPa-c の細胞内局在を免疫染色により解析した。

### 3-2-6. NIH3T3EGFP/pMY-dynAP-IRES-GFP の安定転換細胞の作製

pMY-dynAPa、 $\Delta$ C38、N143Q、 $\Delta$ C38N143Q-IRES-GFP プラスミドは、FuGENE 6 transfection reagent を用いて、製造者の指示に従ってレトロウイルスのパッケージング細胞である Plat-E に導入された。48 時間後、ウイルスを含有する上清をセルロースアセテートタイプの 0.45  $\mu$ m メンブレンフィルターでろ過し、8  $\mu$ g/mL ポリブレンを添加した。その後、ウイルス/ポリブレン含有上清を NIH3T3EGFP 細胞に添加し、一晚インキュベートして遺伝子導入をした。3 次元培養でのスフェロイド形成速度を検討した。

### 3-2-7. ウェスタンブロッティングによる dynAP およびその変異体の検出

MCF10A/pLenti6.3/V5-DEST—dynAPa、 $\Delta$ C38、 $\Delta$ C75、 $\Delta$ TM、 $\Delta$ N は 1% プロテアーゼ阻害剤（ナカライテスク（株））および 1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF、ナカライテスク（株））を含む CytoBuster™ Protein Extraction Reagent (Novogene Co., Ltd, Building, China) を添加した。細胞を破碎し、4°C、13000 rpm、20 分間を遠心してタンパク質を抽出した。SDS-PAGE をニトロセルロース膜に転写した。TBST で調製した 5% Blocking one を用いて抗体を希釈した。MCF10A/dynAP に一次抗体である N-dynAP 抗体 (1/2500) または C-dynAP 抗体 (1/1000) を添加して 1 h 反応させた。抗体を括弧内に示した割合で希釈して用いた。二次抗体である Goat Anti-Mouse Ig's HRP Conjugate (1/5000、Thermo Fisher Scientific Inc) を添加して 1 h 反応させた後、ニトロセルロース膜を Chemi-lumi One (ナカライテスク（株）) に浸し、Kodak X-OMAT LS Film (Sigma-Aldrich) に感光させて現像機 MA-1410 (TANAKA) で現像した。

NIH3T3/pCMV2-Bsd/dynAPa、 $\Delta$ C38、N143Q、 $\Delta$ C38N143Q 細胞に Laemmli バッファー（使用直前に 2-ME と 5:1 で混合）を加えて 95°C 5 分間加熱し、13200 rpm、25°C、5 分間を遠心してタンパク質を抽出した。Bio-Rad Protein

Assay を用いて SpectraMax M2 (測定波長: 595 nm) でタンパク質の吸光度を測定し、検量線によるタンパク質の量を算出した NIH3T3/dynAP は 5% Blocking one で希釈した一次抗体である N-dynAP 抗体 (1/1000) を添加して 1 h 反応させた。二次抗体である Anti-IgG (H+L chain) (Rabbit) pAb-HRP (1/5000) を添加して 1 h 反応させた後、ニトロセルロース膜を Chemi-lumi One Super に浸し、ImageQuant LAS4000 で現像した。

### 3-2-8. 分泌型 dynAP135-210 の作製

分泌型 dynAP135-210 の発現用プラスミドを FreeStyle 293 Expression System (Thermo Fisher Scientific Inc) を用いて HEK293F 細胞にトランスフェクションした。HEK293F 細胞は 10-14mL の無血清培地で培養した。培養上清中の発現タンパク質の存在は、抗 His 抗体 (Qiagen Inc) または Pierce 抗 Fc 抗体 (1/5000、Thermo Fisher Scientific Inc) による SDS-PAGE および Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色またはウエスタンブロッティングにより検出した。検出には ChemiDoc システム (Bio-Rad Laboratories Inc) が使用された。

### 3-2-9. dynAP135-210 の大量作製

dynAP135-210 を大量に生産するために、600 mL の EX-CELL VPRO 培地 (SAFC Biosciences)、30 mL の BD recharge CD (BD Biosciences, CA, USA)、および 600 mL の無血清培地で HEK293F/pcDNA3.3-IL2ssHisFcXadynAP135-210 細胞 ( $2 \times 10^6$  cells/mL) を 1.2 L まで大量培養した。

6 日間培養後、培養上清中の HisFcXadynAP135-210 を、製造元の指示に従い、5 mL rProtein A FF column (GE Healthcare) を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。HisFcXadynAP135-210 を 2M アルギニン緩衝液 (pH4.0) でカラムから溶出し、Vivaspin 20 UF10K (GE Healthcare) で濃縮した。タンパク質バッファーを 2mM  $\text{CaCl}_2$  を含む TBS (Tris-buffered saline) に置換し、精製 HisFcXadynAP135-210 を得た。

精製タンパク質 (2.5 mg/mL) を 100 g/mL Factor Xa プロテアーゼ (New

England Biolabs Inc., MA, USA. Cat. No. P8010L) で 4°C、15 時間処理し、得られた dynAP135-210 を 5 mL MabSelect SuRe column (GE Healthcare) と 1 mL HiTrap Benzamidine FF (high sub) column (GE Healthcare) で精製、フロースルー画分を採取した。MabSelect SuRe カラムを利用して遊離 Fc および未消化の HisFcXadynAP135-210 を除去し、Benzamidine FF カラムを利用して Factor Xa セリンプロテアーゼを除去した。Fc、Factor Xa、未消化の HisFcXadynAP135-210 を完全に除去するために、両方のカラム精製ステップを 2 回繰り返した。各画分中の dynAP135-210 の収率は、GlycoGel Stain Kit (Polysciences Inc., PA, USA) を用いて SDS-PAGE ゲルを染色することで見積もった。精製した dynAP135-210 タンパク質の濃度は、215nm と 225nm の吸光度 ( $[A_{215} - A_{225}] \times 144 \text{ mg/mL}$ ) に基づいて算出した。

### 3-2-10. dynAP135-210 の N 型糖鎖修飾のドットプロット解析

250  $\mu\text{g/mL}$  の dynAP135-210 溶液から 3 倍希釈していき、1.02  $\mu\text{g/ml}$  まで 6 種類の濃度のサンプルを調製した。サンプル (1  $\mu\text{L}$ ) をメタノールで湿潤した PVDF 膜上に滴下し、乾燥させた。PVDF 膜を 10% Blocking One-P と 0.1% Tween-20 を含む TBS に 1 時間浸漬し、0.1% Tween-20 を含む TBS で 5000 倍に希釈したレクチン溶液 ConA-HRP (HRP 結合コンカナバリン A、J-オイルミルス(株)) または WGA-HRP (小麦胚芽アグルチニン、J-オイルミルス(株)) と反応させた。ECL Prime Western Blotting Detection Kit と LAS4000 を用いてシグナルを検出した。

### 3-2-11. dynAP135-210 の糖分解酵素処理

dynAP135-210 の調製液に 1/10 体積の 10×変性バッファー (5% SDS、400 mM ジチオスレイトール (DTT) ) を添加した。この混合物を 100°C で 10 分間加熱処理し、終濃度 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) を加え、1% NP-40 に終濃度  $1.25 \times 10^4 \text{ units/mL}$  (pH7.5) のペプチド-N-グリコシダーゼ F または終濃度  $1.25 \times 10^3 \text{ units/mL}$  (pH7.5) のノイラミニダーゼと終濃度  $1 \times 10^6 \text{ units/mL}$  (pH7.5) の O-グリコシダーゼを加えて 37°C、24 時間反応させた。

### 3-2-12. dynAP135-210 の糖鎖の抽出

Bligh and Dyer 法 [60] を用いてタンパク質を除去した。試料に 2 倍体積の 100% メタノールと等体積の 100% クロロホルムを加えて 2 分間混合した。10 分間静置した後、1.25 倍体積の 100% クロロホルムを加えて vortex で 30 秒間混合した。さらに 1.25 倍体積の RO 水を加えて 30 秒間混合し、25°C で 3,000 rpm、10 分間遠心分離した。上層を回収し、真空濃縮機で 10~20  $\mu$ L 程度になるまで濃縮した。

### 3-2-13. N または O 結合型糖鎖の脱塩・精製

N-グリカン上のシアル酸を除去するために、サンプルに終濃度 0.8% となるようにトリフルオロ酢酸 (TFA) を加え、80°C で 40 分間加熱した。真空乾燥後、0.05% TFA 20  $\mu$ L に溶解し、抽出した N-グリカンを NuTip Carbon (Glygen Corp., MD, USA) で精製した。ZipTip C18 (Sigma-Aldrich) でサンプルを精製し、O-グリカンを回収した。

### 3-2-14. 3-AQ ラベル化法を用いた MS 測定

質量分析 (MS) 測定に先立ち、N-または O-糖鎖を 3-アミノキノリン (3-AQ) で既報に従って標識した [61, 62]。5 mg の  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシシナピン酸 ( $\alpha$ -CHCA) に 200  $\mu$ L の 50% ACN を加えて、5 分間の超音波処理を行い、15,000 rpm、4°C、5 分間遠心した。上清 150  $\mu$ L で 20 mg の 3-AQ を溶解した。これを 2 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ /50% ACN の溶液で 10 倍に希釈し、試料を加えた。JMS-S3000 Spiral-TOF instrument (日本電子 (株)) を用いて、すべての MS および MS/MS スペクトルは positive ion spiral mode で取得された。

### 3-2-15. HeLa、MCF10A、KMST 細胞に導入した dynAP の細胞内局在性の解析

HeLa/pLenti6.3/V5-DEST-dynAPa、 $\Delta$ C38、 $\Delta$ C75 細胞、MCF10A/pLenti6.3/V5-DEST-dynAPa、 $\Delta$ C75、 $\Delta$ N 細胞と KMST-6/pFLAG-CMV2-Bsd-dynAPa、 $\Delta$ C38、N143Q、 $\Delta$ C38N143Q 細胞細胞はポリ-L-リジンコートしたカバースリップ上で培養された。24 時間培養後、70%メタノール 1 ml 添加し、室温 30 分間

静置して細胞を固定した。HeLa/dynAP と MCF10A 細胞はブロッキング溶液（1% BSA、0.1% TritonX-100 を含む PBS 溶液）で 30 分間インキュベートした。ブロッキング溶液で希釈した一次抗体である GFP 融合 dynAP に対する anti-GFP（1/1000、ロシュ・ダイアグノスティクス（株））、ゴルジ体に対する Purified mouse Anti-GM130（1/600）、N/C-dynAP 抗体（1/1000）を添加して 1 h 反応させた。抗体を括弧内に示した割合で希釈して用いた。その後、二次抗体を添加して 1 h 反応させた。二次抗体には、GFP、N/C-dynAP 抗体に対する Cy3 Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG（1/5000、Thermo Fisher Scientific Inc）と GM130 抗体に対する Cy3-conjugated Affinipure Donkey Anti-Mouse IgG（H+L）（1/5000、BIOTIUM）を用いた。DAPI を含む PBS（-）を添加して 5 分間静置した。スライドグラスに 40%グリセロールを適量乗せ、Axioskop 2 plus microscope で蛍光観察した。KMST-6/dynAP 細胞を miliQ で調製した 20% Blocking one で 30 分間インキュベートした。TBST で調製した 5% Blocking one を用いて抗体を希釈した。一次抗体である Flag に対する Anti DDDDk-tag Affinity Purified Rabbit（1/1000）とゴルジ体に対する Purified mouse Anti-GM130（1/1500）を添加して 1 h 反応させた。その後、二次抗体を添加して 1 h 反応させた。二次抗体には、FLAG 抗体に対する CF555 Goat Anti-Rabbi IgG（H+L）（1/1000）と GM130 抗体に対する Alexa Fluor 488 goat anti-mouse（H+L）（1/1000）を用いた。DAPI を含む封入剤である Fluoro-KEEPER Antifade Reagent（Non-Hardening Type）を 1 滴加えた後、細胞画像を取得した。

### 3-2-16. 2次元培養下でのフォーカス形成アッセイ

6 well プレートに NIH3T3/pLenti6.3/V5-DEST—LacZ、dynAPa、 $\Delta$ C75 の細胞を  $5 \times 10^4$  cells/ 2 ml/well 播いて、15 日培養した。その後、細胞を氷冷の 100%メタノールで 10 分間 固定し、0.5% crystal violet を含む 25% メタノールで 10 分間 染色した。乾燥した後、細胞コロニーの存在を確認した。

### 3-2-17. 3次元培養下でのスフェロイド形成アッセイ

NIH3T3EGFP/ pMY-dynAPa、 $\Delta$ C38、N143Q、 $\Delta$ C38N143Q -IRES-GFP



細胞を PrimeSurface 96U U-bottom 96-well Ultralow Cell Adhesion Plate に 500 cells/ 100  $\mu$ L/well を播種し、14 日間培養した。スフェロイド形成は、Cell<sup>3i</sup>Mager を用いてスフェロイド面積を測定することにより定量化した。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. ウェスタンブロッティングによる dynAP タンパク質の発現解析

SDS-PAGE における分子量に影響する dynAP の構造部位を調べるために、内在性 dynAP を発現しない MCF10A 細胞で野生型 dynAPa、および変異型  $\Delta$ N、 $\Delta$ TM、 $\Delta$ C75 を発現させた。これらの形質転換細胞から得られた抽出液を N-dynAP 抗体または C-dynAP 抗体を用いてウェスタンブロッティングで解析した。dynAPa、 $\Delta$ TM、 $\Delta$ C75、 $\Delta$ N の理論分子量はそれぞれ 22.5 kDa、20 kDa、15 kDa、11 kDa である。図 14A に示すように、dynAPa は 42 kDa、 $\Delta$ N は 22 kDa と 36 kDa と理論値よりも大きな分子量を示された。一方、 $\Delta$ TM は 28 kDa、 $\Delta$ C75 は 19 kDa と理論値に近い分子量のバンドが検出された。以上の結果から、dynAP の C 末端は SDS-PAGE における異常的な移動度に関与することが示された。

SDS-PAGE における dynAP の分子量に対する糖鎖の影響を調べるために、C 末端の糖鎖修飾が予想される部位の変異体である N143Q、 $\Delta$ C38、 $\Delta$ C38N143Q を NIH3T3 細胞で発現させた。N-dynAP 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った結果を図 14B に示す。dynAPa は 43kDa の主要なバンドと 40kDa、36kDa、28kDa の比較的薄いバンドが検出された。N143Q のバンドパターンは dynAPa と同様であった。これは糖鎖修飾のための糖鎖などの翻訳後修飾前駆体が枯渇したために生じたものである可能性がある。 $\Delta$ C38 は 28 kDa のバンドを与え、分子量が顕著に減少していることが示された。 $\Delta$ C38N143Q のバンドパターンは  $\Delta$ C38 と同様であった。以上の結果から、dynAP のシークオンを失っても SDS-PAGE での見かけの分子量にほとんど影響を与えないことが観察された。dynAP のシークオンは N 型糖鎖修飾されていない可能性があるが、SDS-PAGE の解像度の低さを考慮すると、このシークオンが実際に N 型糖鎖修飾されているかどうかをウェスタンブロッティングで決定的に判断することはできない。

後述のように、C-末端断片の分泌型における NSS シークオンが N 型糖鎖修飾されていることを明らかにした。ウェスタンブロッティングの結果から、dynAP は部分的にあるいは全く N 型糖鎖修飾されておらず、分子量の異常な移動は主に C-末端の T/S-rich 領域の存在に起因していることが示唆された。

### 3-3-2. 分泌型 dynAP135-210 の作製

dynAP の C 末端領域の修飾をさらに調べるために、HEK293F 細胞の培養上清に分泌される可溶性 dynAP135-210 の発現を目的として、pcDNA3.3-IL2ss に HisdynAP135-210 を導入し、分泌型 dynAP135-210 を設計した。しかし、His タグを認識する抗体を用いたウエスタンブロッティングでは、培養液のタンパク質を検出できず、急速な分解による生産量の低下が示唆された（データの詳細は省略）。

これを受けて、pcDNA3.3-IL2ss に HisFcXadynAP135-210 と dynAP135-210XaFc を導入し、新たな分泌型 dynAP135-210 を構築した。HEK293F 細胞に導入して、3 日および 6 日目の各培養上清を回収した。抗 Fc 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、分泌型 dynAP135-210 の有無を検討した。図 15 に示すように、HisFcXadynAP135-210 および dynAP135-210XaFc の培養上清に 55 kDa のバンドが認められた。一方、ネガティブコントロールである HisFc は、30 kDa のバンドが認められた。6 日目の培養上清のタンパク質バンドは 3 日目の培養上清のより多くの生産物が検出された。HisFcXadynAP135-210 および dynAP135-210XaFc の分子量と HisFc の差である 25 kDa が、dynAP135-210 の分子量であることが示された。dynAP135-210 のタンパク質の理論値分子量は、7.5 kDa であるため、17.5 kDa の分子量差が翻訳後修飾に由来するものであることが推定された。

### 3-3-3. dynAP135-210 の作製

dynAP の C 末端に付加された糖鎖修飾構造を解析するために、分泌型 dynAP135-210 を Factor Xa プロテアーゼで Fc 領域を切断し、rProtein A で Fc を除去する必要がある。分泌型 dynAP135-210 の Factor Xa プロテアーゼ消化条件を調べたところ、HisFcXadynAP135-210 は効率的に切断された。質量比 (Factor Xa/Protein) は 1/5 の時、ほとんどの HisFcXa-dynAP135-210 が切断された。一方、dynAP135-210XaFc は抵抗性を示したため、このタンパク質は以降の実験に使用しなかった。HisFcXadynAP135-210 を Factor Xa プロテアーゼで消化した後、rProteinA Sepharose Fast Flow を用いて dynAP135-210 を精製し、遊離 Fc と未消化の HisFcXadynAP135-210 を捕捉した。図 16 に示

すように、SDS-PAGE とその後の糖タンパク質の染色により、素通り画分に dynAP135-210 が存在することが確認された。dynAP135-210 は SDS-PAGE で 37 kDa の分子量を示し、理論分子量 (7.5 kDa) よりもはるかに大きいことが確認された。

#### 3-3-4. ドットブロット解析による dynAP135-210 の N 結合型糖鎖の構造推定

分岐構造によって N 結合型糖鎖はオリゴマンノース型、複合型、ハイブリッド型の 3 つのタイプに分類される。dynAP135-210 の NSS シークオンが糖鎖修飾されているかどうか、また糖鎖修飾されている場合の N 型糖鎖の種類を調べるために、HRP と結合したレクチンを用いてドットブロット分析を行った。

麦芽由来アグルチニン (WGA) はシアル酸と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に高い親和性を持ち、複合型とハイブリッド型の N 結合型糖鎖を認識する。コンカナバリン A (ConA) は  $\alpha$ -D-マンノシルおよび  $\alpha$ -D-グルコシル残基を認識してオリゴマンノース型およびハイブリッド型の N 結合型糖鎖の両方に結合する [63, 64]。

図 17 に示すように、ネガティブコントロールであるウシ血清アルブミン (BSA) は N 結合型糖鎖を持たないので、染色像を与えない。オリゴマンノース型とハイブリッド型の N 結合型糖鎖の両方を持つオボアルブミン、複合型の N 結合型糖鎖のみを持つフェチュインをポジティブコントロールとして使用した [65, 66]。レクチンが糖鎖に対して反応しているかを確認するために、N 型糖鎖を切断するペプチド-N-グリコシダーゼ F 処理したオボアルブミンおよびフェチュインも用意した。

コンカナバリン A (ConA) はオボアルブミンのみと反応性を示し、GlcNAc-Asn を加水分解して N 型糖鎖を除去するペプチド-N-グリコシダーゼ F の処理により、その反応性が消失した。一方、フェチュインに対して全く反応しなかった。dynAP135-210 はペプチド-N-グリコシダーゼ F 未処理と処理に関わらず、コンカナバリン A (ConA) との反応性を示さなかった。このことから dynAP135-210 には複合型の N 結合型糖鎖が付加している可能性が示唆された。麦芽由来アグルチニン (WGA) はオボアルブミンとフェチュインの両方と反応性を示した。オボアルブミンはペプチド-N-グリコシダーゼ F 処理によって反応性が完全

に消失した。フェチュインはペプチド-N-グリコシダーゼ F 処理によって弱い反応性を示した。dynAP135-210 は麦芽由来アグルチニン (WGA) との反応性を示した。ペプチド-N-グリコシダーゼ F で処理すると、反応性結合が阻害されることが確認された。以上の結果による、コンカナバリン A (ConA) と麦芽由来アグルチニン (WGA) において dynAP135-210 はフェチュインとの反応傾向がほぼ同一であることから、dynAP135-210 に付加されている N 結合型糖鎖は複合型であることが推定された。

### 3-3-5. dynAP135-210 の N 結合型糖鎖の MS 解析

ペプチド-N-グリコシダーゼ F 処理で dynAP135-210 から N 結合型糖鎖を遊離させた。試料からタンパク質を取り除いた後に、TFA でシアル酸を遊離させた。脱塩・精製しおよび 3-AQ ラベル化後、質量分析装置を用いて MS スペクトルを測定した。

MS スペクトルを図 18 に示した。この図にラベル化された N 結合型糖鎖の分子量と一致する質量ピークの実測値、一部の対応する糖鎖構造の模式図を示した。スペクトルから、3-AQ ラベル化 N 結合型糖鎖の Na<sup>+</sup>付加体[M+3·AQ+Na]<sup>+</sup>d の誤差 15 ppm 以内のスペクトルを選別し、理論質量と実測質量を含めて表 2 にまとめた。[M+3·AQ+Na]<sup>+</sup>と一致する 22 種類の N 結合型糖鎖のスペクトルが検出された。また、質量電荷比から糖組成を推定したところ、その全てが複合型であり、1-3 分子のフコース付加体であることが推定された。

### 3-3-6. dynAP135-210 の N 結合型糖鎖の MS/MS 解析

糖鎖の MS/MS スペクトルからの構造解析は、グリコシド結合部位で切断するフラグメントイオンである A シリーズまたは X シリーズイオンが重要である[67]。このフラグメントイオンは、MS の衝突誘起解離 (Collision Induced Dissociation : CID) のエネルギーが高いほど生じやすい[68]。Spiral-TOF MS は CID energy が 20 keV と極めて高いため、A シリーズや X シリーズイオンを生じさせやすく、これらの情報を糖鎖の構造解析に利用できる。MS スペクトルの結果による 22 種類の N 結合型糖鎖に最も高いペクトル強度を示した [Hex5HexNAc4dHex1+3AQ+Na]<sup>+</sup> (m/z=1935.68) を TOF/TOF/Positive モード

で MS/MS 測定した。図 19 に示した MS/MS スペクトルを解析した結果、糖鎖のフラグメントイオンの理論値と一致するスペクトルを解析した。その結果から、複合型の分岐構造を含む Y<sub>6</sub>、B<sub>5</sub>、B<sub>4</sub> イオンと還元末端側の GlcNAc の開裂イオンである <sup>2,5</sup>A<sub>6</sub>、<sup>3,5</sup>A<sub>5</sub> イオンが検出された。フラグメントイオンとプリカーサーイオンを図 18 の左上に示した。B<sub>5</sub> イオン (m/z=1442.28) はプリカーサーイオンとの差は 493.40 である。還元末端の GlcNAc には少なくとも GlcNAc (m/z=221.09) と 3-AQ (m/z=126.06) が存在しており、それらとの差は、146.25 であった。これはフコースのフラグメント質量と等しい。また、B<sub>4</sub> イオンは、N 結合型糖鎖の分岐構造である Gal-GlcNAc とコア構造を構成する 3 つの Man のうち 2 分子を含むフラグメントイオンであった。以上のことから、[Hex5HexNAc4dHex1+3AQ+Na]<sup>+</sup> (m/z=1935.68) は、2 分岐複合型糖鎖であり、還元末端の GlcNAc に 1 分子フコースが付加されていることが示された。

### 3-3-7. dynAP135-210 の O 結合型糖鎖の MS 解析

ノイラミニダーゼ/O-グリコシダーゼ で dynAP135-210 を処理し、遊離した dynAP135-210 の O 結合型糖鎖を 3-AQ ラベル化法を用いて MS 解析を行った。

MS スペクトルの結果を図 20 に示した。dynAP135-210 に弱いシグナルであるが、m/z=532.22 が検出された。このシグナルは、[Gal-GalNAc+3AQ+Na]<sup>+</sup>=532.19 (理論値) とほぼ一致した。このことから、dynAP135-210 は core 1 型 O 結合型糖鎖が付加されていることが示唆された。

### 3-3-8. 細胞内局在

dynAP の C 末端は細胞内局在に対する影響を検討するために、GFP 融合 dynAPa、ΔC38、ΔC75 を HeLa 細胞に導入し、GFP 抗体を用いて蛍光観察した (図 21A)。dynAPa は細胞膜に局在することが確認された。加えて、dynAPa は細胞のゴルジ体も局在することが確認された。ΔC38 と ΔC75 はゴルジ体の領域では局在が観察されたが、細胞膜の領域にはほとんど見られなかった。GFP 融合タンパク質は、タグを付加していないタンパク質と局在が異なることが報告されている [69]。それを受けて、MCF10A 細胞に dynAPa、ΔC75、ΔN を導入し、N-/C-dynAP 抗体を用いて蛍光観察した (図 21B)。MCF10A 細胞に

導入した  $\Delta N$  はゴルジ体に局在せず、細胞質全体に蛍光シグナルが観察された。さらに、dynAPa、 $\Delta C75$  と同様に、HeLa 細胞で同じ局在性を示した。このような局在パターンは、野生型 dynAP や dynAP $\Delta N$  を完全に糖鎖修飾した状態で発現させた細胞では観察されなかった。さらに、内在性 dynAP を発現していない KMST-6 細胞に dynAPa、 $\Delta C38$ 、N143Q、 $\Delta C38N143Q$  を導入し、FLAG 抗体を用いて蛍光観察した (図 21C)。dynAPa と N143Q は細胞膜とゴルジ体に局在した。 $\Delta C38$  と  $\Delta C38N143Q$  はゴルジ体のみに局在した。以上の結果から、C 末端側の N 型糖鎖の結合部位の欠損は、細胞内局在に影響を与えないことが示唆された。

### 3-3-9. 細胞の形質転換能

pLenti6.3/V5-DEST—LacZ、dynAPa、 $\Delta C75$  を NIH3T3 細胞に導入し、2 次元培養でのフォーカス形成能による C 末端は形質転換に対する影響を検討した。図 22A に示すように、コントロール LacZ と比較して、dynAPa は細胞間で接触しても増殖でき、コロニーを形成した。 $\Delta C75$  は LacZ と同じく、接触阻害を受けて増殖が止まった。このことから、dynAP の C 末端領域は細胞の形質転換能に重要であることが示唆された。

dynAP の C 末端に潜在的な糖鎖付加部位の消失が、3 次元培養でのスフェロイド形成に影響するかどうかを検討した。図 22B に示すように、作製した NIH3T3EGFP/pMY-dynAPa、dynAP $\Delta C38$ 、N143Q、 $\Delta C38N143Q$ -IRES-GFP 細胞の播種後 4 日目からスフェロイド形成能を示した。dynAPa と N143Q はスフェロイドの増殖が見られ、増殖速度はほぼ一致した。一方、 $\Delta C38$  と  $\Delta C38N143Q$  はスフェロイドの形成を有意に減少させた。このことから、dynAP の C 末端の T/S 領域は細胞の形質転換能に重要であることが示唆された。

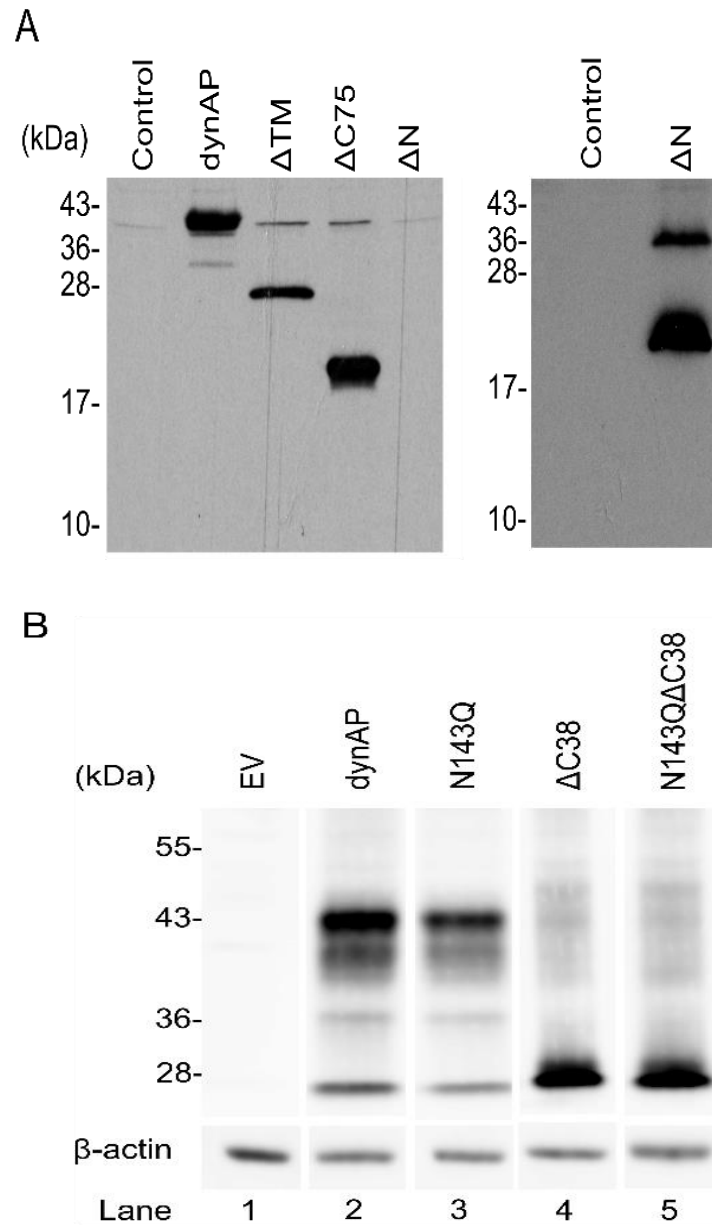


図 14. ウェスタンブロッティングによる dynAP タンパク質の発現解析

(A) dynAPa または変異体を発現させた MCF10A からタンパク質抽出液を調製し、N/C-dynAP 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。dynAPa、 $\Delta$ TM、 $\Delta$ C75、 $\Delta$ N の理論分子量：22.5 kDa、20 kDa、15 kDa、11 kDa である。Control：MCF10A 宿主細胞。(B) dynAPa または変異体を発現させた NIH3T3 細胞調製し、N-dynAP 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。EV：pCMV2-BSD ベクター。



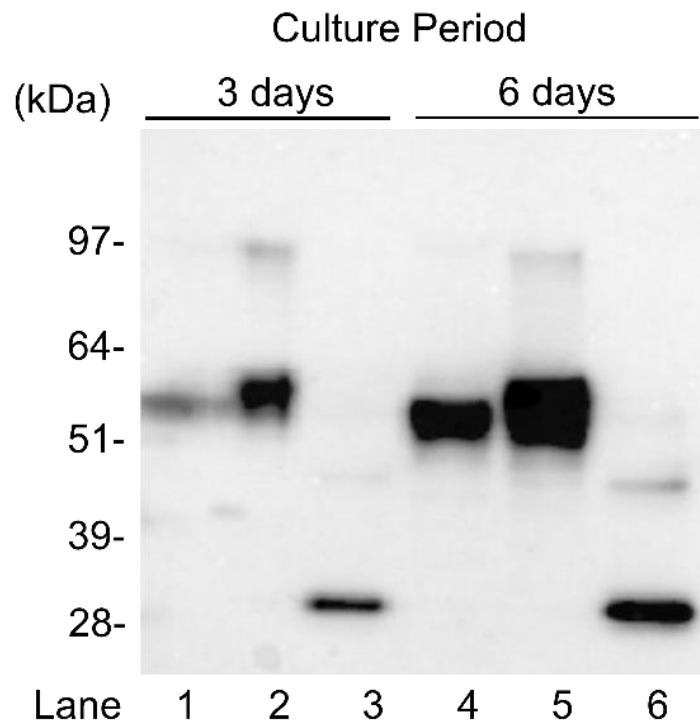


図 15. トランスフェクション分泌型 dynAP の確認

HisFcXadynAP135-210 と dynAP135-210XaFc 細胞を 3 日または 6 日間培養した。培養液中の生成物は、抗 Fc 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。レーン 1 と 4: HisFcXadynAP135-210、レーン 2 と 5: dynAP135-210XaFc、レーン 3 と 6: pcDNA3.3-IL2sHisFc を表す。

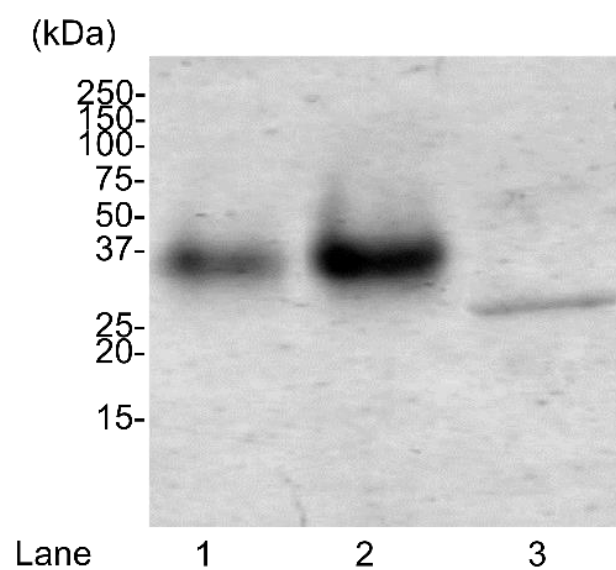


図 16. 分泌型 dynAP135-210 の糖鎖修飾の確認

SDS-PAGE 後、GlycoGel 染色による dynAP135-210 バンドを染色した。レーン 1 : 素通り画分 (20  $\mu$ L)、レーン 2 : 素通り画分 (40  $\mu$ L)、レーン 3 : Fc 断片のみを表す。

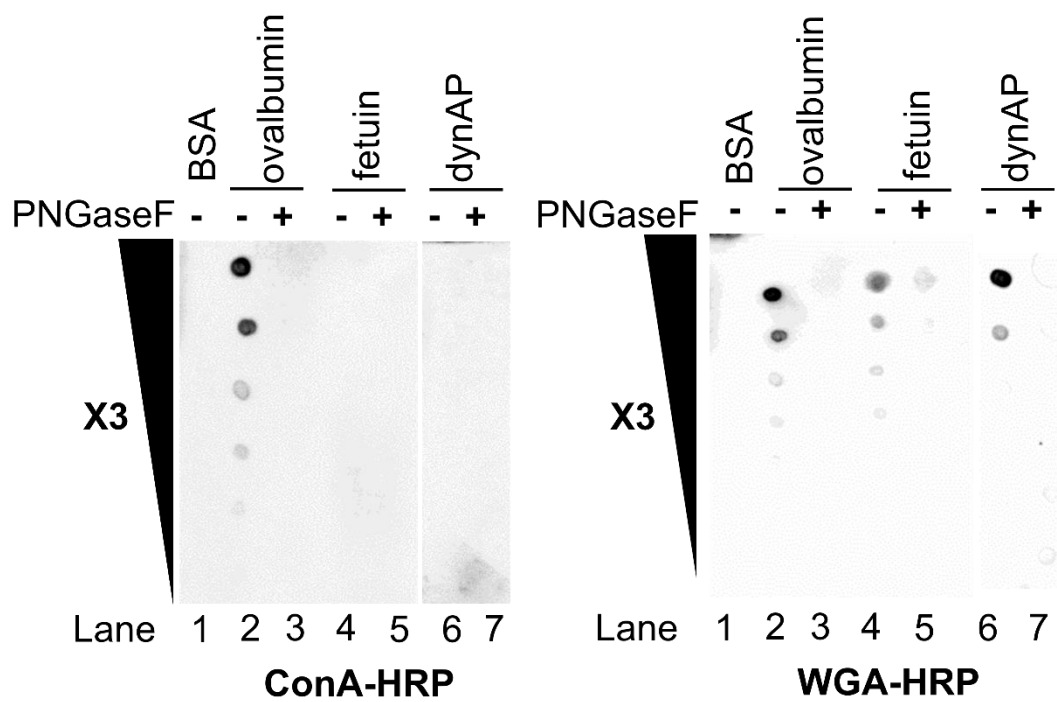


図 17. ドットブロット解析による dynAP135-210 の N 結合型糖鎖の構造推定

250 ng - 1.08 ng までのタンパク量の dynAP135-210 をレクチンと反応させ、検出した。ネガティブコントロール：BSA、ポジティブコントロール：オボアルブミンとフェチュイン。-：ペプチド-N-グリコシダーゼ F 未処理、+：ペプチド-N-グリコシダーゼ F 処理を表す。

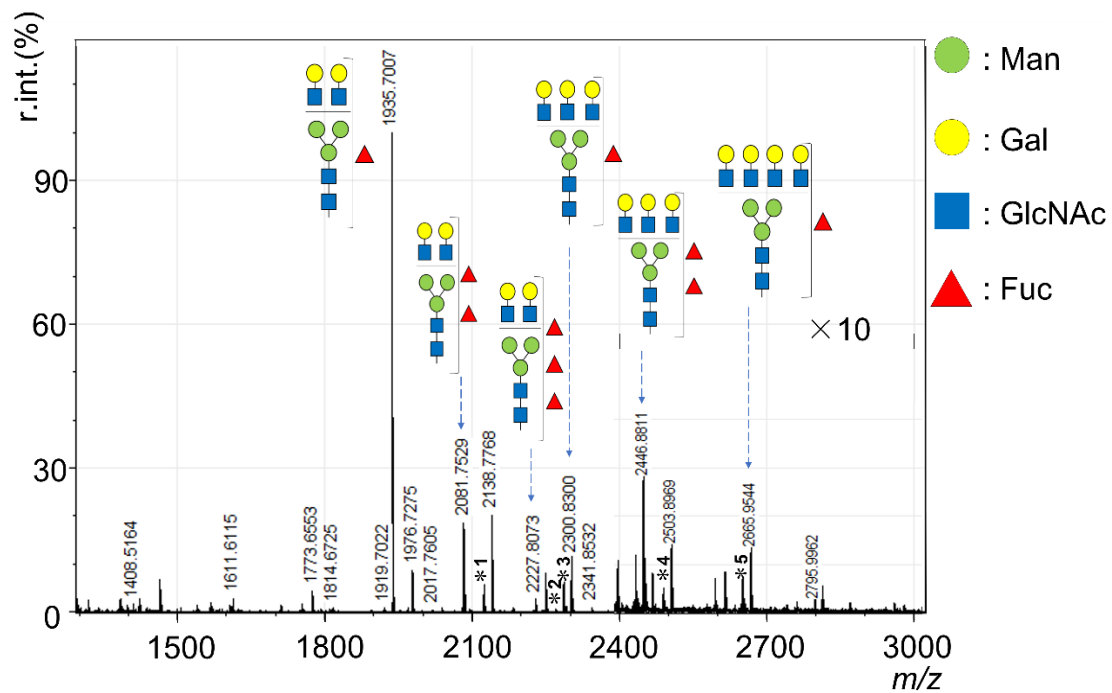


図 18. dynAP135-210 の N 結合型糖鎖の MS 解析

[M+3-AQ+Na]<sup>+</sup>の一部を糖鎖部分の模式図、実測値と共にスペクトル上に示した。\*1-5 の実測値：2122.7817、2268.8228、2284.8310、2487.8820、2649.9522。

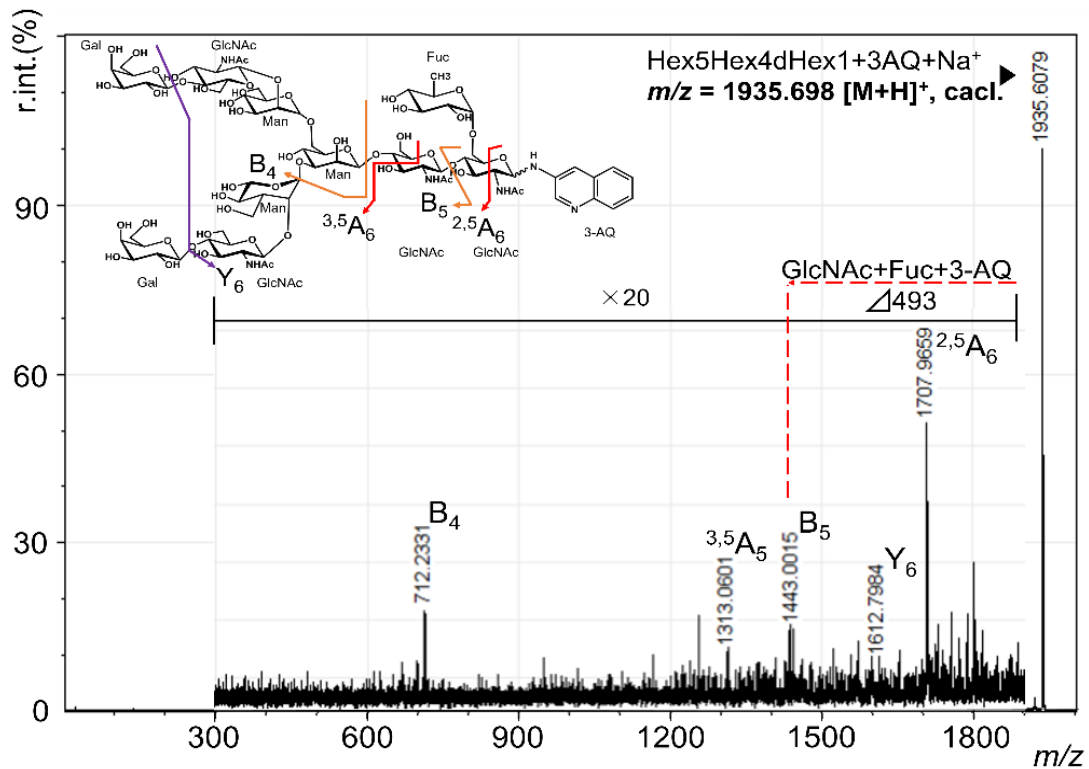


図 19. MS/MS による dynAP135-210 の N 結合型糖鎖の解析

1935.68 m/z をプリカーサーイオンとして Spiral-TOF MS を用いて TOF/TOF/Positive モードで MS/MS スペクトルを測定した。分岐構造は、一例として Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man で示した。

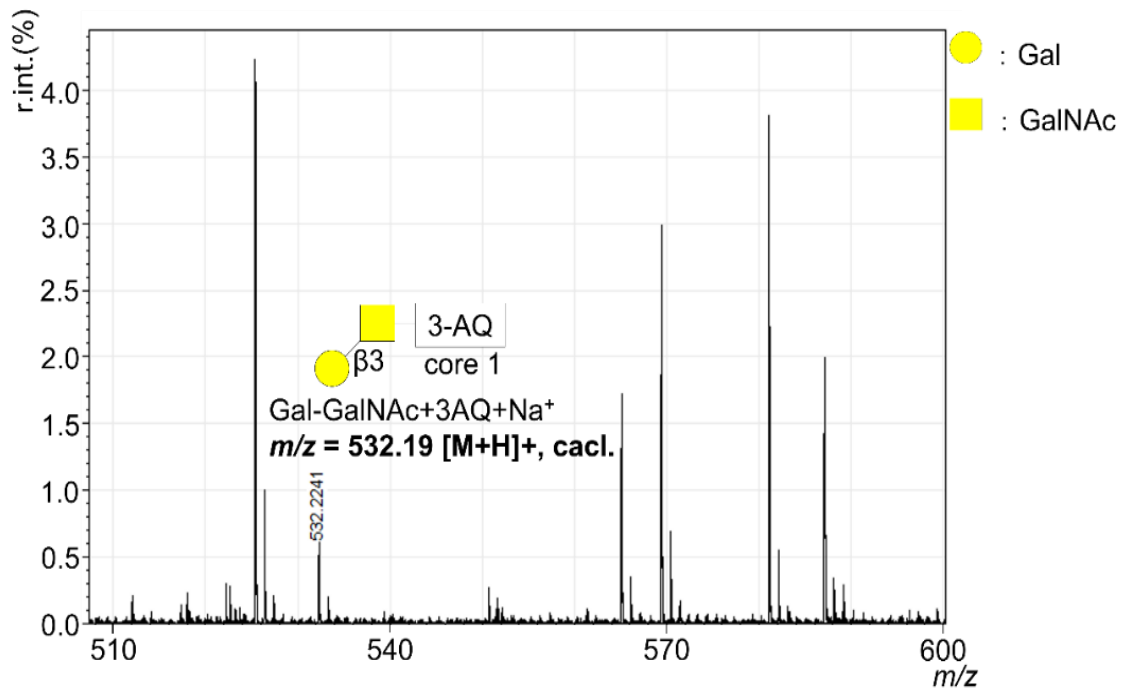
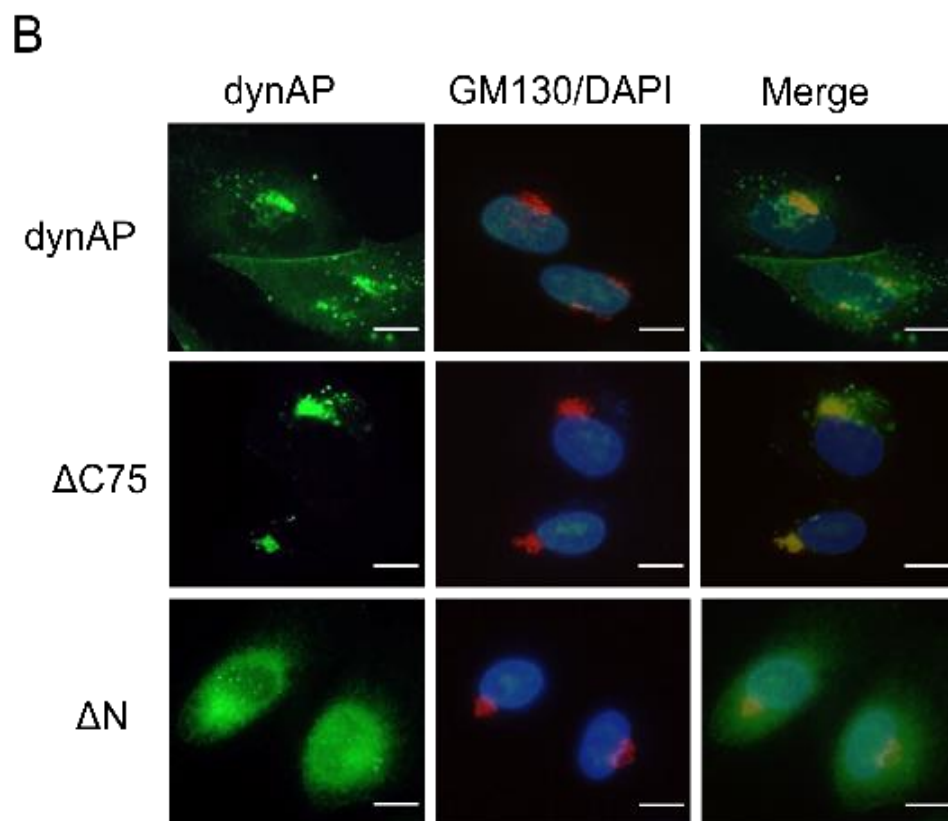
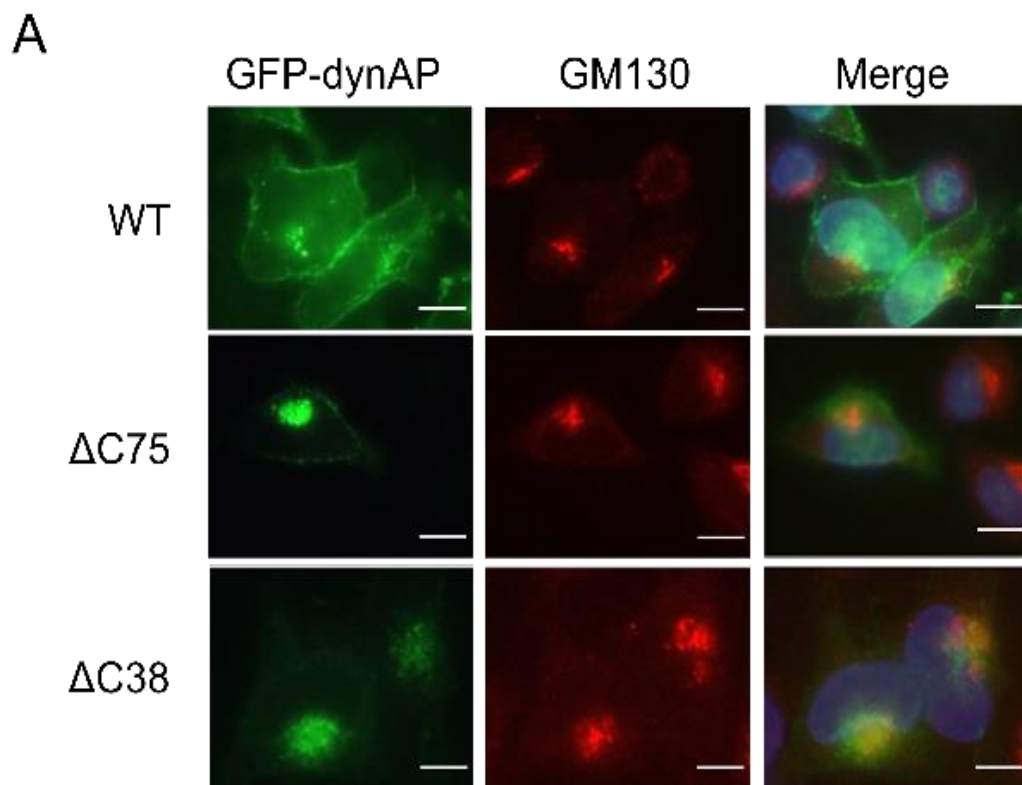


図 20. dynAP135-210 の O 結合型糖鎖の MS 解析

dynAP135-210 をノイラミナーゼ/O-グリコシダーゼで処理した。遊離した O 結合型糖鎖を 3-AQ ラベル化法を用いて MS で測定した。



C

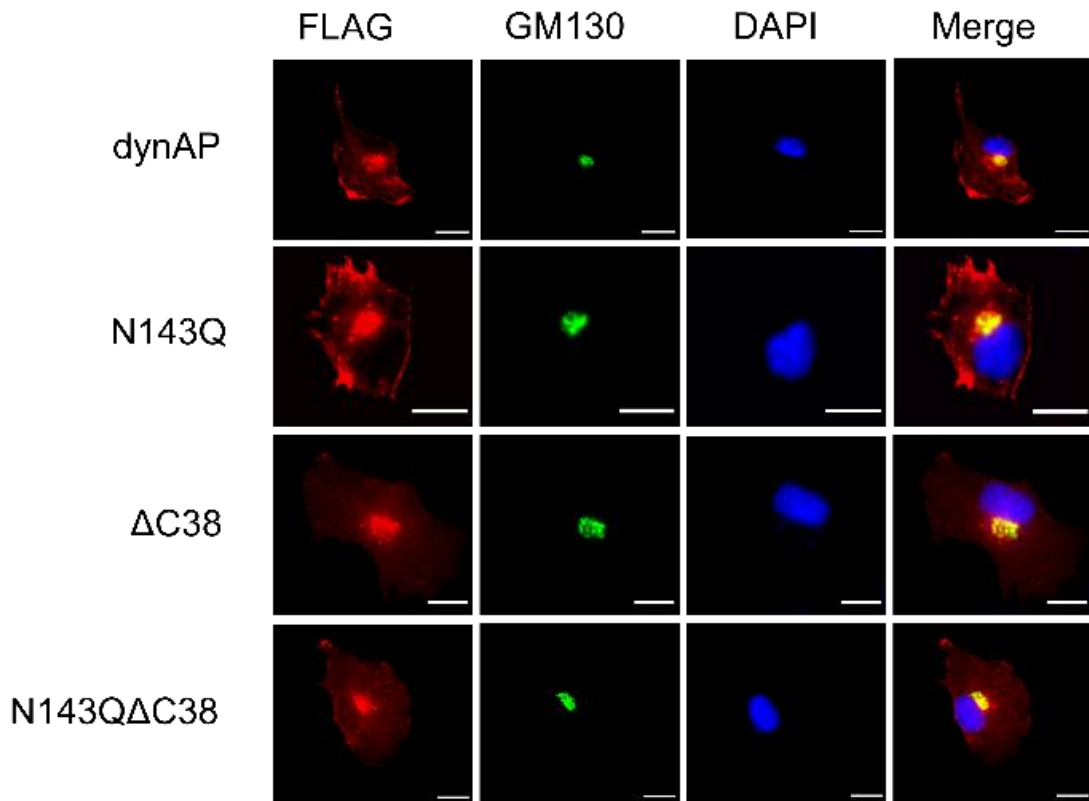


図 21. 間接免疫蛍光法による細胞内局在性の解析

(A) GFP 融合 dynAP とその変異体は HeLa 細胞で発現させた。緑色 : GFP 融合 dynAP、赤色 : ゴルジマーカーである GM130 を表す。(B) dynAP とその変異体は MCF10A 細胞で発現させた。緑色 : N-/C-dynAP 抗体で標識した dynAP、赤色 : ゴルジマーカーである GM130 を表す。(C) dynAP とその変異体は KMST-6 細胞で発現させた。赤色 : FLAG 抗体で標識した dynAP、緑色 : ゴルジマーカーである GM130、青色 : DAPI で標識した核を表す。



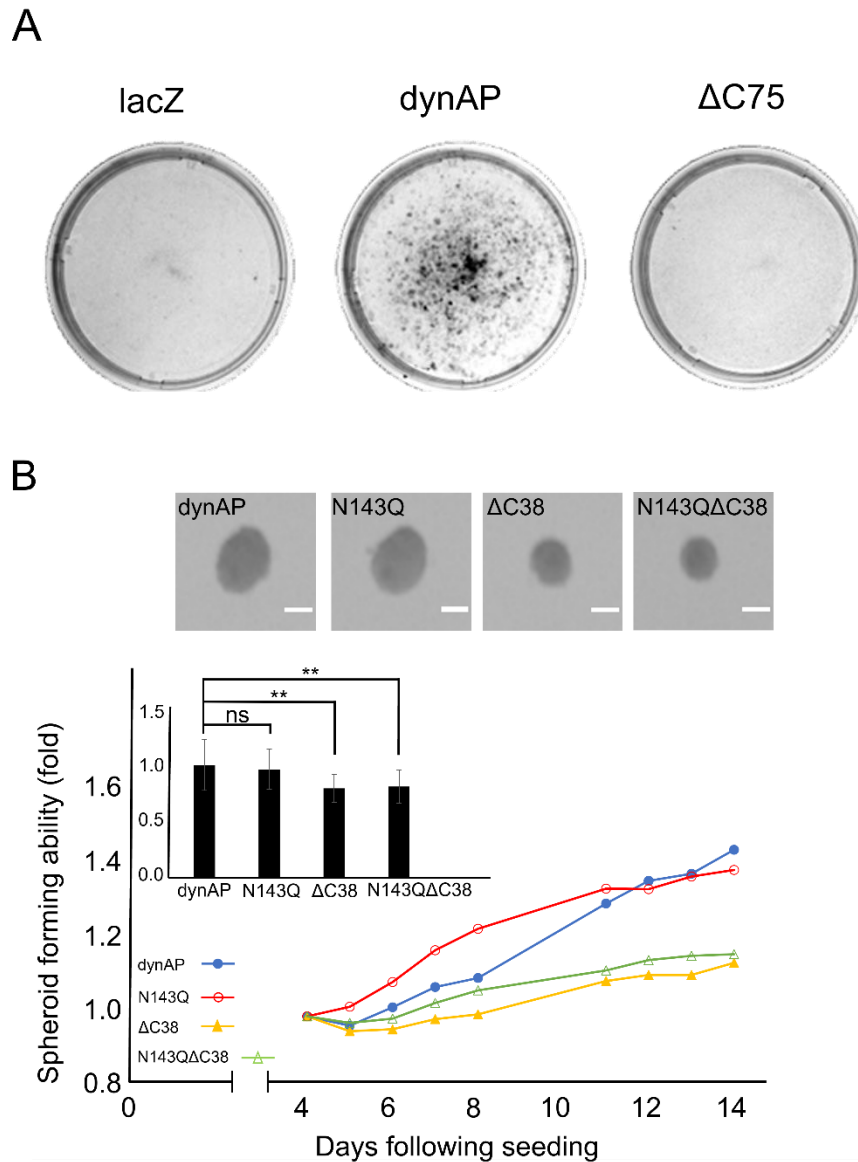
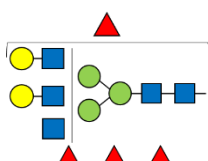
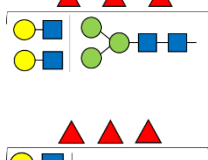
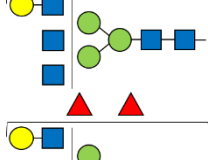
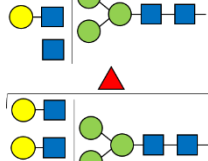
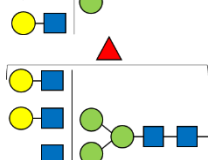
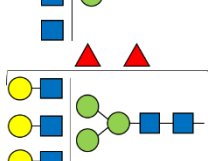
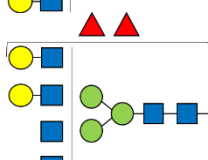
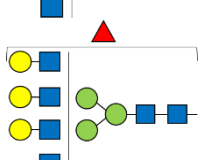
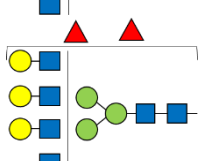
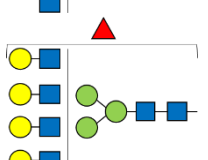



図 22. 細胞の形質転換能

(A) 2次元培養下でのフォーカス形成能の解析。細胞を  $5 \times 10^4$  cells/ 2 mL/well で播いて、15日培養した後に Crystal Violet で染色した。(B) 3次元培養下でのスフェロイド形成能の解析。播種後4日目の各スフェロイドの直径を1とし、相対的な直径の変化を示す。棒グラフは、播種後4日から14日までのスフェロイドの増殖速度を示している。エラーバーは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD; n = 16) を示す。\*\*は p 値<0.01。ns は有意ではない。スフェロイド画像のサイズバー=200  $\mu$ m。

表 2. dynAP135-210 の N 結合型糖鎖の構造とスペクトルの質量値

N-Glycans	模式図	実測値	理論値	誤差
		( <i>m/z</i> )	( <i>m/z</i> )	(ppm)
Hex3HexNAc3dHex1		1408.516	1408.513	2.4
Hex3HexNAc4dHex1		1611.612	1611.592	12
Hex4HexNAc4dHex1		1773.655	1773.645	5.7
Hex3HexNAc5dHex1		1814.673	1814.672	0.39
Hex4HexNAc4dHex2		1919.702	1919.703	0.48
Hex5HexNAc4dHex1		1935.701	1935.698	1.4
Hex4HexNAc5dHex1		1976.728	1976.725	1.4
Hex3HexNAc6dHex1		2017.761	2017.751	4.6
Hex5HexNAc4dHex2		2081.753	2081.756	1.4
Hex4HexNAc5dHex2		2122.782	2122.783	0.38

Hex5HexNAc5dHex1		2138.777	2138.777	0.27
Hex5HexNAc4dHex3		2227.807	2227.814	2.9
Hex5HexNAc4dHex3		2268.823	2268.840	7.7
Hex5HexNAc5dHex2		2284.831	2284.835	1.9
Hex6HexNAc5dHex1		2300.830	2300.830	0.11
Hex5HexNAc6dHex1		2341.853	2341.857	1.5
Hex6HexNAc5dHex2		2446.881	2446.888	2.9
Hex5HexNAc6dHex2		2487.882	2487.915	13
Hex6HexNAc6dHex1		2503.897	2503.910	5.1
Hex6HexNAc6dHex2		2649.952	2649.968	5.8
Hex7HexNAc6dHex1		2665.954	2665.962	3.0

Hex6HexNAc6dHex3		2795.996	2796.025	10
------------------	--	----------	----------	----

3-AQ ラベル化法により MS 測定で検出された質量誤差 15 ppm 以内の N 結合型糖鎖を示した。青四角 : GlcNAc、緑丸 : Man、黄丸 : Gal、赤三角 : Fuc

### 3-3. 考察

dynAP のアミノ酸配列から、dynAP は細胞外に露出する C 末端領域に N 型糖鎖修飾 (dynAP では NSS) のための潜在的なシークオン (NXS/T) を 1 つ含んでいる [70, 71]。O 型糖鎖修飾に関して、コンセンサスアミノ酸配列は知られておらず、Thr および Ser の密集した配列に対して連続して糖鎖修飾を受ける傾向がある。dynAP の C 末端領域には 23 個の T/S 残基が存在し、O-型糖鎖付加部位の可能性はある [23, 48]。

dynAP の C 末端側の N 型糖鎖修飾は SDS-PAGE での分子量変化により判断できなかった。糖タンパク質の統計的な解析から、シークオンの約 1/3 は糖鎖付加されておらず、NXS シークオン (dynAP の場合) は NXT シークオンよりも糖鎖付加の頻度が低いことが示されている [48, 72]。いくつかのタンパク質では、N 型糖鎖修飾は翻訳後修飾を介して行われる [73-76]。N 型糖鎖修飾は小胞体 (ER) の内腔側で行われ、オリゴ糖転移酵素 (OST) の作用により、ドリコールを結合したオリゴ糖がタンパク質の NXT/S シークオンの N に転移される。一般に、オリゴ糖は共翻訳されるので、OST は新生ポリペプチド鎖のシークオンを迅速に認識するはずである [72]。OST は成長中のペプチド鎖の立体構造の制限からシークオンを見逃してしまい、シークオンを隠蔽配列にしてしまう可能性がある。

レクチンを用いたドットプロットの解析により、C 末端の N 型糖鎖の分岐構造を検討した結果、dynAP135-210 に複合型の N 結合型糖鎖を持っていることが示唆された。複合型は、がん細胞において構造変化を示す糖鎖であり、細胞膜表面の受容体の代謝回転を遅延させる Galectin-3 のリガンドである poly-LacNAc [77] や、血管内皮へのがん細胞の接着を可能にする E/P-selectin リガンドであるシアリルルイス a/x (sLe<sup>a/x</sup>) 抗原を含むことが知られている [78, 79]。質量分析で N 型糖鎖には 22 種類の不均一性をもっていて、1-3 分子のフコース付加体であることも判明した。フコースは、N 結合型糖鎖の還元末端の GlcNAc へ結合していることがしばしば見られるが、非還元末端側の GlcNAc にも付加される場合がある。そのような構造の糖鎖は、ルイス (Le) 抗原と呼ばれている。sLe<sup>a/x</sup> 抗原はその一種である。

以上の N 型糖鎖の解析により、分泌型 dynAP の C 末端にある NSS シークオ

ンを OST が完全に認識することを明らかにした。分泌型 dynAP のシークオンは立体構造的な制限がないため、翻訳後でも OST に容易に認識される可能性がある。sLe<sup>a/x</sup> 抗原は複型糖鎖に含み、dynAP は細胞の接着能を獲得する可能性がある。本研究の限界として、内在性で膜局在型の dynAP が N 型糖鎖修飾されていることは明確には示すことができなかった。

C 末端のスレオニン/セリン領域に Core 1 の O 結合型糖鎖が検出された。Core 1 の O 型結合糖鎖は sLe<sup>a/x</sup> 抗原の生合成のための足場となりうる[80, 81]。この糖鎖抗原は、がん転移を促進するため、細胞表面の core 1 (Tn 抗原) の発現量が、がんの悪性の予後と相関することが報告されている[82]。

dynAP の TM を欠損した ΔTM と C 末端を欠損した ΔC75 は SDS-PAGE での分子量を大幅に減少した。そして、C 末端の欠損は胞膜に局在できず、形質転換能も失ったことを示す。C 末端の糖鎖結合部位の存在の解明により、C 末端の糖鎖変異体を作成した。N 型糖鎖結合部位を欠損した ΔN143Q、O 型糖鎖結合部位である Thr/Ser ドメインを欠損した ΔC38 と両変異を持つ ΔC38N143Q を用いて検討した結果により、O 型糖鎖修飾部位は dynAP を細胞膜へ輸送し、その局在は細胞形質転換能の決定に関連している可能性が示唆された。dynAP の O 型糖鎖修飾部位の制御は、dynAP を発現するがんの治療につながる可能性がある。

dynAP は、肝臓がん、胃がん、頭頸部がん、卵巣がんで高発現している。これらのがんでは、コア 1 型 O 型糖鎖修飾に中心的な役割を果たす C1GALT1 の発現が、通常、腫瘍形成の間にアップレギュレートされる[83]。これは、いくつかの癌細胞株における腫瘍形成中の dynAP 発現のアップレギュレーションと直接的または間接的に関連している可能性がある。臨床試験では、C1GALT1 阻害剤であるイトラコナゾールが、いくつかの癌患者において単剤または併用療法として有益な効果を有することが示されている[84]。C1GALT1 活性の抑制は、dynAP 依存性の癌組織の化学療法に可能性を持つ可能性がある。さらには、トランスグルタミナーゼを介した他のタンパク質との架橋、ユビキチン化、スモイル化など、他の修飾についてのさらなる研究も有益であると考えられる。

## 第四章 まとめ

本論文の第2章では、dynAPのスプライシングバリエントのがん化誘導活性に対する作用を検討した。dynAPのスプライシングバリエントはN末端領域に分子多型を生じさせる。このN末端領域は、細胞内ドメインに位置し、その欠損変異体はゴルジ体および細胞膜へ局在しなくなることから、細胞膜移行に関わるシグナル配列を含む、かつ／または全体の立体構造形成に重要な影響を与える領域と考えられる。3種類のスプライシングバリエントは、すべて同じく正常なゴルジ体および細胞膜への局在性を示した。一方、dynAPa に比べて dynAPb、c は細胞がん化活性が弱いことが明らかになった。第3章では、C末端領域の糖鎖修飾と dynAP のがん化誘導活性の関係性を検討した。C末端領域は細胞外ドメインを形成する。質量分析法による解析から、この領域に複合型 N 結合型糖鎖とコア 1 型 O 結合型糖鎖が検出された。糖鎖修飾部位に対する種々の変異体を利用して、細胞内局在性とがん遺伝子活性を検討した。その結果、O 結合型糖鎖修飾が、dynAP のみかけの分子量を大きく変化させ、細胞膜局在性およびがん化誘導活性に大きく影響することが明らかとなった。

今後の研究の方針として、N末端のスプライシングバリエントの構造変化とC末端の糖鎖修飾との相関性を総合的に検討する必要がある。タンパク質の構造変化は、選択的スプライシングによる転写翻訳過程に加え、糖鎖修飾をはじめとする翻訳後修飾過程でも生じうる。糖鎖修飾は、小胞体内で起こることから、細胞内輸送メカニズムと強い関係性がある。N結合型糖鎖はタンパク質に付加される過程で、フォールディングの選別機能に関与することが知られている[85]。正しく折りたたまれなかったタンパク質は、細胞内輸送の過程で選別されて最終的に分解されるため、正常な糖鎖修飾がタンパク質の正しいフォールディングを間接的に示しているといえる[86]。一方、タンパク質中のシグナルペプチド配列を予測する **signaIP 6.0** を用いても、dynAP はシグナルペプチド配列が検出されない。一部のタンパク質は、シグナルペプチドを持たないにもかかわらず、小胞体内に輸送されることが報告されている[87]。本研究で明らかにされた3つのバリエントの細胞内局在性は、これらが小胞体内で糖鎖修飾され、同時に正しくフォールディングされたことを示唆する。スプライシングバリエントの違いは、糖転移酵素の認識の変化をもたらすことが報告されている[88]。3種類のバリエント

の N 末端の違いが、N 結合型糖鎖のタイプやフコースの数や付加位置の変化をもたらし、dynAP タンパク質に構造の微視的不均一性を引き起こす可能性があるが、この問題に関しては明らかではない。さらに、3つのスプライシングバリエーション間での O 結合型糖鎖修飾の構造の違いもまた明らかではない。O 結合型糖鎖修飾は、発現とプロセッシング、シグナル伝達、タンパク質間相互作用に影響する[89-91]。例えば、膜タンパク質のシェディングは、細胞表面の受容体や接着分子の量を減少させ、それに伴って可溶性のデコイタンパク質が放出され、細胞の同族リガンドに対する応答性を低下させることがある。CADM1 (cell adhesion molecule 1)のエキシソンの欠損はシェディングしやすく、O 結合型糖鎖修飾は ADAM を介してシェディングを阻害することを示す。そのシェディング感受性は、選択的スプライシングと翻訳後の O 結合型糖鎖修飾の 2 つの異なる生合成経路で調節できることが示されている[92]。このような例からも、dynAP の選択的なスプライシングバリエーションの動態変化と O 型糖鎖修飾の関連性を探ることは意味があるだろう。

本研究で検証したスプライシングバリエーション dynAPb および c が、dynAPa と同様の糖鎖修飾様式を持ち、他の分子と相互作用するかに関して明らかではない。例えば、細胞内ドメインはダイナクチンや p150<sup>Glued</sup>、CCT $\delta$ との分子間相互作用に関わる領域である。スプライシングバリエーション、および糖鎖修飾の微視的な変化は、これらのタンパク質との相互作用の変化を引き起こし、がん誘導性の変化を結果としてもたらす可能性がある。今後、これらを詳細に検証することで、dynAP によるがん化メカニズム解明に寄与できるものと期待される。



## 参考文献

1. Measday, V. *et al.* Systematic yeast synthetic lethal and synthetic dosage lethal screens identify genes required for chromosome segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13956-13961, doi:10.1073/pnas.0503504102 (2005) .
2. 水上民夫, 久能樹, 佐々木隆造: “ヒト化酵母”技術による創薬ターゲットの同定と阻害剤開発. *日本臨床* **51**, S327-S333 (2012) .
3. Sekigawa, M. *et al.* Comprehensive screening of human genes with inhibitory effects on yeast growth and validation of a yeast cell-based system for screening chemicals. *Journal of biomolecular screening* **15**, 368-378 (2010) .
4. Tugendreich, S. *et al.* A streamlined process to phenotypically profile heterologous cDNAs in parallel using yeast cell-based assays. *Genome research* **11**, 1899-1912 (2001) .
5. Kops, G. J., Weaver, B. A. & Cleveland, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Reviews Cancer* **5**, 773-785 (2005) .
6. Pinsky, B. A. & Biggins, S. The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends in cell biology* **15**, 486-493 (2005) .
7. Kunoh, T. *et al.* A novel human dynactin-associated protein, dynAP, promotes activation of Akt, and ergosterol-related compounds induce dynAP-dependent apoptosis of human cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* **9**, 2934-2942 (2010) .
8. Schroer, T. A. DYNAMICTIN. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**, 759-779, doi:10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094623 (2004) .
9. Reck-Peterson, S. L., Redwine, W. B., Vale, R. D. & Carter, A. P. The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nature reviews Molecular cell biology* **19**, 382-398 (2018) .
10. Olenick, M. A. & Holzbaur, E. L. Dynein activators and adaptors at a glance. *Journal of cell science* **132**, jcs227132 (2019) .

11. Dwivedi, D. & Sharma, M. Multiple roles, multiple adaptors: Dynein during cell cycle. *Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules*, 13-30 (2018) .
12. Okumura, M., Natsume, T., Kanemaki, M. T. & Kiyomitsu, T. Dynein–Dynactin–NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble. *Elife* **7**, e36559 (2018) .
13. Sternlicht, H. *et al.* The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 9422-9426, doi:10.1073/pnas.90.20.9422 (1993) .
14. Echbarthi, M., Vallin, J. & Grantham, J. Interactions between monomeric CCT6 and p150Glued: a novel function for CCT6 at the cell periphery distinct from the protein folding activity of the molecular chaperone CCT. *Experimental cell research* **370**, 137-149 (2018) .
15. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274 (2007) .
16. Ashcroft, M. *et al.* Phosphorylation of HDM2 by Akt. *Oncogene* **21**, 1955-1962 (2002) .
17. Mayo, L. D. & Donner, D. B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 11598-11603 (2001) .
18. Fagerberg, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & cellular proteomics* **13**, 397-406 (2014) .
19. Yue, F. *et al.* A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* **515**, 355-364 (2014) .
20. Kunoh, T. *et al.* Human dynactin-associated protein transforms NIH3T3 cells to generate highly vascularized tumors with weak cell-cell interaction. *PloS one* **10**, e0135836 (2015) .
21. The National Center for Biotechnology Information RefSeq data base. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_173629.3,XM\\_011525923.3,XM\\_0](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_173629.3,XM_011525923.3,XM_0)

[11525924.3, XM 011525925.3, XM 017025709.1](#)

22. Bause, E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochemical Journal* **209**, 331-336 (1983) .
23. Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R. & Brunak, S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* **15**, 153-164 (2005) .
24. Schwerk, C. & Schulze-Osthoff, K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Molecular cell* **19**, 1-13 (2005) .
25. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. (2001) .
26. Stetefeld, J. & Ruegg, M. A. Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 515-521, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.07.001> (2005) .
27. Choi, J. W. *et al.* Cancer-associated splicing variant of tumor suppressor AIMP2/p38: pathological implication in tumorigenesis. *PLoS genetics* **7**, e1001351 (2011) .
28. Kim, S. & Kim, D. G. & Lim, S. Method for Screening Anticancer Agent Inhibiting Binding of AIMP2 - DX2 and HSP70. US 20190033295A1, 2019.
29. Lim, S. *et al.* Targeting the interaction of AIMP2-DX2 with HSP70 suppresses cancer development. *Nature chemical biology* **16**, 31-41 (2020) .
30. Sivaraman, A. *et al.* Synthesis and Structure–Activity Relationships of Arylsulfonamides as AIMP2-DX2 Inhibitors for the Development of a Novel Anticancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **63**, 5139-5158, doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01961 (2020) .
31. Oltean, S. & Bates, D. O. Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene* **33**, 5311-5318 (2014) .
32. Climente-González, H., Porta-Pardo, E., Godzik, A. & Eyraes, E. The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer. *Cell Rep* **20**, 2215-2226, doi:10.1016/j.celrep.2017.08.012 (2017) .

33. Siegfried, Z. & Karni, R. The role of alternative splicing in cancer drug resistance. *Current opinion in genetics & development* **48**, 16-21 (2018) .
34. Song, X., Zeng, Z., Wei, H. & Wang, Z. Alternative splicing in cancers: From aberrant regulation to new therapeutics. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **75**, 13-22, doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.09.018> (2018) .
35. Sridharan, R. *et al.* Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* **136**, 364-377 (2009) .
36. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**, 680-685 (1970) .
37. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011) .
38. Jewer, M., Findlay, S. D. & Postovit, L. M. Post-transcriptional regulation in cancer progression : Microenvironmental control of alternative splicing and translation. *J Cell Commun Signal* **6**, 233-248, doi:10.1007/s12079-012-0179-x (2012) .
39. Brosseau, J. P. *et al.* Tumor microenvironment-associated modifications of alternative splicing. *Rna* **20**, 189-201, doi:10.1261/rna.042168.113 (2014) .
40. Jin, W., McCutcheon, I. E., Fuller, G. N., Huang, E. S.-C. & Cote, G. J. Fibroblast Growth Factor Receptor-1  $\alpha$ -Exon Exclusion and Polypyrimidine Tract-binding Protein in Glioblastoma Multiforme Tumors. *Cancer Research* **60**, 1221-1224 (2000) .
41. Apweiler, R., Hermjakob, H. & Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects* **1473**, 4-8 (1999) .
42. Yoshimura, M., Ihara, Y., Matsuzawa, Y. & Taniguchi, N. Aberrant Glycosylation of E-cadherin Enhances Cell-Cell Binding to Suppress Metastasis \*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 13811-13815, doi:10.1074/jbc.271.23.13811 (1996) .
43. Linden, S K et al. "Mucins in the mucosal barrier to infection." Mucosal

- immunology vol. 1,3 (2008) : 183-97. doi:10.1038/mi.2008.5
44. Lau, K. S. *et al.* Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation. *Cell* **129**, 123-134, doi:10.1016/j.cell.2007.01.049 (2007) .
45. Zhang, Z. *et al.* Modification of glycosylation mediates the invasive properties of murine hepatocarcinoma cell lines to lymph nodes. *Plos one* **8**, e65218 (2013) .
46. Zhao, Y.-P. *et al.* Decreased core-fucosylation contributes to malignancy in gastric cancer. *PloS one* **9**, e94536 (2014) .
47. Häuselmann, I. & Borsig, L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Frontiers in oncology* **4**, 28 (2014) .
48. Steentoft, C. *et al.* Precision mapping of the human O - GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO journal* **32**, 1478-1488 (2013) .
49. Jentoft, N. Why are proteins O-glycosylated? *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 291-294, doi:[https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90014-3) (1990) .
50. Hang, H. C. & Bertozzi, C. R. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 5021-5034, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.085> (2005) .
51. Li, Y. *et al.* Heregulin Targets  $\gamma$ -Catenin to the Nucleolus by a Mechanism Dependent on the DF3/MUC1 Oncoprotein<sup>1</sup> 1 National Cancer Institute grant CA97098. Note: Y.L. and W.-h.Y. contributed equally to this work. *Molecular Cancer Research* **1**, 765-775 (2003) .
52. Dharmaraj, N. *et al.* Expression of the transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16, in normal endometrium and in endometriosis. *Hum Reprod* **29**, 1730-1738, doi:10.1093/humrep/deu146 (2014) .
53. Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. & Deber, C. M. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane

- proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 1760-1765 (2009) .
54. Rath, A., Cunningham, F. & Deber, C. M. Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 15668-15673 (2013) .
55. Rath, A. & Deber, C. M. Correction factors for membrane protein molecular weight readouts on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* **434**, 67-72 (2013) .
56. Ikura, K., Yokota, H., Sasaki, R. & Chiba, H. Determination of amino- and carboxyl-terminal sequences of guinea pig liver transglutaminase: evidence for amino-terminal processing. *Biochemistry* **28**, 2344-2348 (1989) .
57. Tatsukawa, H., Takeuchi, T., Shinoda, Y. & Hitomi, K. Identification and characterization of substrates crosslinked by transglutaminases in liver and kidney fibrosis. *Analytical biochemistry* **604**, 113629 (2020) .
58. Han, Z.-J., Feng, Y.-H., Gu, B.-H., Li, Y.-M. & Chen, H. The post-translational modification, SUMOylation, and cancer. *International journal of oncology* **52**, 1081-1094 (2018) .
59. Mansour, M. A. Ubiquitination: Friend and foe in cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology* **101**, 80-93 (2018) .
60. Eg, B. & Wj, D. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911-917 (1959) .
61. Kaneshiro, K., Fukuyama, Y., Iwamoto, S., Sekiya, S. & Tanaka, K. Highly Sensitive MALDI Analyses of Glycans by a New Aminoquinoline-Labeling Method Using 3-Aminoquinoline/ $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Liquid Matrix. *Analytical Chemistry* **83**, 3663-3667, doi:10.1021/ac103203v (2011) .
62. Rohmer, M. *et al.* 3-Aminoquinoline acting as matrix and derivatizing agent for MALDI MS analysis of oligosaccharides. *Analytical chemistry* **82**, 3719-3726 (2010) .
63. Goldstein, I. J., Reichert, C. M. & Misaki, A. INTERACTION OF

CONCAVALIN A WITH MODEL SUBSTRATES\*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **234**, 283-296, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1974.tb53040.x> (1974) .

64. Ardá, A. *et al.* Molecular Recognition of Complex-Type Biantennary N-Glycans by Protein Receptors: a Three-Dimensional View on Epitope Selection by NMR. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 2667-2675, doi:10.1021/ja3104928 (2013) .

65. Harvey, D. J., Wing, D. R., Küster, B. & Wilson, I. B. H. Composition of N-linked carbohydrates from ovalbumin and co-purified glycoproteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **11**, 564-571, doi:[https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(00\)00122-7](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(00)00122-7) (2000) .

66. Green, E. D., Adelt, G., Baenziger, J. U., Wilson, S. & Van Halbeek, H. The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **263**, 18253-18268 (1988) .

67. Domon, B. & Costello, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate journal* **5**, 397-409 (1988) .

68. Wührer, M., Catalina, M. I., Deelder, A. M. & Hokke, C. H. Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. *Journal of Chromatography B* **849**, 115-128, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.041> (2007) .

69. 実験医学別冊、目的別で選べるタンパク質発現プロトコール 羊土社

70. Marshall, R. Glycoproteins. *Annual review of biochemistry* **41**, 673-702 (1972) .

71. Spiro, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R-56R (2002) .

72. Kohda, D. Structural basis of protein Asn-glycosylation by Oligosaccharyltransferases. *Glycobiophysics*, 171-199 (2018) .

73. Ronnett, G. & Lane, M. D. Post-translational glycosylation-induced activation of aglycoinsulin receptor accumulated during tunicamycin treatment. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 4704-4707 (1981) .
74. Kolhekar, A. S., Quon, A. S., Berard, C. A., Mains, R. E. & Eipper, B. A. Post-translational N-glycosylation of a truncated form of a peptide processing enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 23012-23018 (1998) .
75. Duvet, S., Op De Beeck, A., Cocquerel, L., Wychowski, C., Cacan, R. and Dubuisson, J. (2002) Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 occurs posttranslationally in a mannosylphosphoryldolichol-deficient CHO mutant cell line. *Glycobiology* **12**, 95-101.
76. Bolt, G., Kristensen, C. & Steenstrup, T. D. Posttranslational N-glycosylation takes place during the normal processing of human coagulation factor VII. *Glycobiology* **15**, 541-547 (2005) .
77. Hirabayashi, J. *et al.* Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1572**, 232-254, doi:[https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00311-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00311-2) (2002) .
78. in *Essentials of Glycobiology* (eds A. Varki *et al.*) (Cold Spring Harbor Laboratory Press Copyright © 2009, The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California., 2009) .
79. Majuri, M.-L., Niemelä, R., Tiisala, S., Renkonen, O. & Renkonen, R. Expression and function of  $\alpha$ 2,3-sialyl- and  $\alpha$ ,3/1,4-fucosyltransferases in colon adenocarcinoma cell lines: Role in synthesis of E-selectin counter-receptors. *International Journal of Cancer* **63**, 551-559, doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.2910630416> (1995) .
80. Siddiqui, S. F. *et al.* Coexpression of  $\beta$ 1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase V Glycoprotein Substrates Defines Aggressive Breast Cancers with Poor Outcome. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **14**, 2517-2523, doi:10.1158/1055-9965.Epi-05-0464 (2005) .



81. Chen, S.-H., Dallas, M. R., Balzer, E. M. & Konstantopoulos, K. Mucin 16 is a functional selectin ligand on pancreatic cancer cells. *The FASEB Journal* **26**, 1349-1359, doi:<https://doi.org/10.1096/fj.11-195669> (2012) .
82. OHNO, S. *et al.* Expression of Tn and Sialyl-Tn Antigens in Endometrial Cancer: Its Relationship with Tumor-produced Cyclooxygenase-2, Tumor-infiltrated Lymphocytes and Patient Prognosis. *Anticancer Research* **26**, 4047-4053 (2006) .
83. Sun, X., Zhan, M., Sun, X., Liu, W. & Meng, X. C1GALT1 in health and disease. *Oncology letters* **22**, 1-15 (2021) .
84. Lin, M.-C. *et al.* C1GALT1 predicts poor prognosis and is a potential therapeutic target in head and neck cancer. *Oncogene* **37**, 5780-5793 (2018) .
85. Hosokawa, N., Kamiya, Y., Kamiya, D., Kato, K. & Nagata, K. Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 17061-17068 (2009).
86. PARODI, A. J. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochemical Journal* **348**, 1-13 (2000).
87. Hosomi, A. *et al.* The ER-associated protease Ste24 prevents N-terminal signal peptide-independent translocation into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 10406-10419 (2020).
88. Raman, J., Guan, Y., Perrine, C. L., Gerken, T. A. & Tabak, L. A. UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases: completion of the family tree. *Glycobiology* **22**, 768-777 (2012).
89. Takeuchi, H. Biochemical significance of regulation of protein stability by Oglucose glycans. *Seikagaku* **90**, 519-523 (2018).
90. Wopereis, S., Lefeber, D. J., Morava, E. & Wevers, R. A. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clinical chemistry* **52**, 574-600 (2006).

91. Iijima, H. *et al.* Expression and characterization of a very low density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked sugar region generated by alternative splicing. *The Journal of Biochemistry* **124**, 747-755 (1998).
92. Shirakabe, K. *et al.* Mechanistic insights into ectodomain shedding: susceptibility of CADM1 adhesion molecule is determined by alternative splicing and O-glycosylation. *Scientific reports* **7**, 1-12 (2017).

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻頂いた長浜バイオ大学の長谷川慎教授、水上民夫教授、佐々木隆造教授に厚く御礼申し上げます。また、数々の実験において直接的なご指導、数々のご助言を頂きました長浜バイオ大学・遺伝子科学研究室の技術員である細井美穂氏、土田美江氏に深く感謝申し上げます。加えて、今日に至るまでの研究活動においてご助力、ご助言を頂く機会がありました、長浜バイオ大学の白井 剛教授、河合 靖教授、中村 肇伸教授、和田 修一准教授、にもこの場を借りて御礼申し上げます。

最後に、公私に渡り様々な点でご援助、ご協力いただきました長浜バイオ大学・遺伝子科学研究室と蛋白質機能解析研究室の皆様にも深く感謝致します。