

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591013

研究課題名(和文)膵癌特異的なO結合型糖鎖の構造と癌形質への関与

研究課題名(英文)O-glycosylation by GalNAc-T3 in pancreatic cancer

研究代表者

谷内 恵介(TANIUCHI, Keisuke)

高知大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：50626869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「GalNAc-T3の基質タンパク質GNAT1に付加された膵癌特異的なO結合型糖鎖の構造解析」及び「GalNAc-T3により形成された糖鎖構造がGNAT1の機能にどのように影響し、細胞増殖を中心とした癌化・癌形質に関わるか」を明らかにすることを目的とし、以下の項目の実験を終了した。(1)膵癌細胞から抽出したGNAT1上のO結合型糖鎖の付加されているアミノ酸部位及びO結合型糖鎖の構造を明らかにした。(2)GNAT1と結合するタンパク質を同定し、GNAT1と複合体を形成することにより膵癌細胞の細胞増殖に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This project seeks to identify the formation of uncommon structure of glycoforms catalyzed by one of GalNAc-transferases GalNAcT-3 on the target glycoprotein GNAT1. The data provided here could provide important information to aid to improve the clinical outcome of pancreatic cancer patients. We determined the O-glycosylation sites and carbohydrate alterations on GNAT1 in pancreatic cancer cells. Furthermore, GNAT1-bound proteins were identified and these complexes were associated with cell proliferation in pancreatic cancer cells. These discovery based studies will provide insight into the manner in which GalNAcT-3 acts on the specific substrate proteins that are important to growth/survival of pancreatic cancer cells and contributes to disease process in epigenetic manner (formation of uncommon structure of glycoforms) that is based on its substrate specificities.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵臓学 O結合型糖鎖 膵臓がん 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

糖鎖の生合成は、正常組織では非常に多くの種類の糖転移酵素の発現や、酵素自身の基質特異性により緻密な制御のもとに行われている。リボソームで合成されたタンパク質のおよそ半数は粗面小胞体やゴルジ装置内腔の糖転移酵素によって、逐次的に何段階もの糖転移を受け、生理活性を持った成熟タンパク質となる。癌性変化に伴う O 結合型糖鎖の変化は糖鎖の伸長が停止した、いわゆる糖鎖不全的变化と正常な糖鎖に過剰な糖が結合する変化に大別される。膵癌において癌性変化に伴い構造が変化した糖鎖としては、O 結合型糖鎖 CA19-9 と CEA が知られており、膵癌関連糖鎖抗原として進行した膵癌患者の血中に頻度高く検出される。申請者は、糖転移酵素である GaINAc-T3 が膵癌で発現上昇し細胞増殖を亢進させること、そして GaINAc-T3 が G protein, alpha transducing activity polypeptide 1 (GNAT1) を基質としていることを見出した。GNAT1 への糖鎖修飾が癌化と相関している可能性が示唆されたため、GNAT1 上の膵癌特異的 O 結合型糖鎖構造の詳細解析を行う必要があると考えた。

2. 研究の目的

膵癌では O 結合型糖鎖の変化が癌化に関わっていることが示唆されており、糖鎖抗原である CA19-9 と CEA が膵癌腫瘍マーカーに用いられている。我々は O 結合型糖鎖の 1 つ目の単糖を基質タンパク質に付加する糖転移酵素である N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GaINAc-T) に着目し、GaINAc-T ファミリーの 1 つである GaINAc-T3 が膵癌細胞の増殖に関わっていることを示す実験データを得た。また、GaINAc-T3 は細胞増殖に関わる基質タンパク質 GNAT1 に膵癌特異的な O 結合型糖鎖を付加して細胞増殖に関与していることも明らかにした。本研究では、GNAT1 上の膵癌特異的な O 結合型糖鎖の構造解析を行い、その構造が細胞の増殖亢進については癌化にどのように関与するかについての知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗 GNAT1 抗体を作成し、膵癌細胞から内在性 GNAT1 を単離する。

(2) 質量分析計による GNAT1 上の O 結合型糖鎖を同定する。

精製した GNAT1 から O 結合型糖鎖の付加されたペプチド断片を得るため限定分解を行う。エンドペプチターゼである O-sialoglycoprotein endopeptidase (OSGE) は O 結合型糖鎖の付加されたアミノ酸部を切断し、O 結合型糖タンパク質を分解する。得られた膵癌細胞由来 GNAT1 ペプチド断片を用いて GNAT1 のどのアミノ酸に O 結合型糖鎖が付加され、どのような構造であるかを解析する。

(3) GaINAc-T3 依存的な GNAT1 への糖鎖付加の解析

GaINAc-T3 ノックダウン膵癌細胞由来 GNAT1 において、同定された GNAT1 への O 結合型糖鎖付加が抑制されるか調べる。本実験ではコントロールと GaINAc-T3 がノックダウンされた膵癌細胞間で、(2)で同定した付加部位への O 結合型糖鎖付加を定量的に比較する。安定同位体標識により代謝的に糖鎖を *in vivo* 標識し、それぞれの細胞株から GNAT1 を抽出し、質量分析器を用いて糖鎖付加の変動解析を定量的に行う。この結果、GaINAc-T3 依存的 GNAT1 糖鎖付加部位を明らかにするとともに、その部位に付加される糖鎖構造を *in vivo* で明らかにする。

(4) GaINAc-T3 依存的糖鎖修飾を介して GNAT1 と結合するタンパク質の同定

GNAT1 と結合するタンパク質を同定するため、GNAT1 を高発現している膵癌細胞株から抗 GNAT1 抗体にて GNAT1 の免疫沈降を行う。この場合、コントロール細胞及び GaINAc-T3 がノックダウンされた膵癌細胞の両方を用いる。サンプルを SDS 電気泳動し、ゲルを銀染色することで結合分子のバンドを検出する。バンドを比較し、GaINAc-T3 がノックダウンされた膵癌細胞には検出されずコントロール細胞でのみ検出されるバンドを切り出し、*in gel digestion* を行った後、得られたペプチドを質量分析器により解析する。さらに、GNAT1 と同定したタンパク質の細胞内局在を共焦点顕微鏡にて観察し、共局在するかを調べる。これらの結果から、GaINAc-T3 依存的糖鎖修飾を介して GNAT1 と結合するタンパク質候補を選択する。これらの中に細胞増殖因子が含まれていれば、細胞増殖メカニズムに関与している可能性があるため、引き続き colony formation assay、MTT assay、Mouse xenograft model などを用いて膵癌細胞増殖との関係を追及する。

4. 研究成果

免疫したラビット血清をアフィニティー精製により抗 GNAT1 抗体を精製した。この抗 GNAT1 抗体を用いて膵癌細胞株 S2-013 の細胞ライセートから免疫沈降を行い、ウエスタンブロット法にて GNAT1 が免疫沈降されていることを確認した。抗 GNAT1 抗体固定カラムを作製し、S2-013 ライセートから GNAT1 の精製を行った。OSGE を用いて酵素処理を行った結果、精製した GNAT1 はペプチド断片化し、GNAT1 には O 結合型糖鎖が付加されていることを確認できた。得られた S2-013 細胞由来 GNAT1 ペプチド断片を濃縮し、質量分析計による GNAT1 上の O 結合型糖鎖を解析した。GNAT1 のセリンやスレオニンに結合した O 結合型糖鎖は、比較的構造は単純であることを明らかにした。質量分析計の解析結果を検証するために、安定同位体標識により糖鎖を *in*

vivo 標識したコントロール S2-013 細胞及び GaINAc-T3 がノックダウンされた S2-013 細胞から抗 GNAT1 抗体を用いて免疫沈降を行った。質量分析器を用いて *in vivo* 標識された糖鎖付加部位の解析を行った結果、ノックダウンされた S2-013 細胞では認められない aINAc-T3 依存的 GNAT1 糖鎖付加部位を明らかにすることができた。

以上の結果から、GaINAc-T3 が GNAT1 に糖鎖付加する部位と GaINAc-T3 が GNAT1 に付加する糖鎖構造を明らかにすることができた。引き続き、GNAT1 の細胞増殖に関わるシグナル伝達経路を明らかにするために S2-013 細胞から抗 GNAT1 抗体を用いて免疫沈降を行った。ゲルを銀染色することで結合分子のバンドを検出した。GaINAc-T3 がノックダウンされた S2-013 細胞由来の銀染色では認めないバンドのみを質量分析計を用いて同定した。ウエスタンブロット法と S2-013 細胞を用いた免疫細胞染色を行った結果、同定したタンパク質が GNAT1 と細胞質において結合することを確認できた。現在、GNAT1 複合体が膵がん細胞を増殖させる機構において、今回同定した O 結合型糖鎖がどのような役割を担っているかを解析中である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

Taniuchi K, Furihata M, Hanazaki K, Iwasaki S, Tanaka K, Shimizu T, Saito M, Saibara T: Prdx1 promotes pancreatic cancer cell invasion by modulating p38 MAPK activity. *Pancreas* 44: 331-40, 2015. 査読有 DOI:10.1097/MPA0000000000000270

Shimizu T, Tanaka K, Shimizu S, Higashi Y, Yawata T, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Yuri K, Saito M: Possible inhibitory role of endogenous 2-arachidonoylglycerol as an endocannabinoid in (\pm)-epibatidine-induced activation of central adrenomedullary outflow in the rat. *Neuropharmacology* 95: 278-89, 2015. 査読有 DOI:10.1016/j.neuropharm.2015.03.034

Tanaka K, Shimizu T, Yanagita T, Nemoto T, Nakamura K, Taniuchi K, Dimitriadis F, Yokotani K, Saito M: Brain RVD-haemopressin, a haemoglobin-derived peptide, inhibits bombesin-induced central activation of adrenomedullary outflow in the rat. *Br J Pharmacol* 171:202-13, 2014. 査読有 DOI:10.1111/bph.12471

Tanaka K, Shimizu T, Higashi Y, Nakamura K, Taniuchi K, Dimitriadis F, Shimizu S,

Yokotani K, Saito M: Central bombesin possibly induces S-nitrosylation of cyclooxygenase-1 in pre-sympathetic neurons of rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Life Sci* 100:85-96, 2014. 査読有 DOI:10.1016/j.lfs.2014.01.079

Shimizu T, Tanaka K, Nakamura K, Taniuchi K, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Dimitriadis F, Shimizu S, Yokotani K, Saito M: Possible involvement of brain prostaglandin E2 and prostanoid EP3 receptors in prostaglandin E2 glycerol ester-induced activation of central sympathetic outflow in the rat. *Neuropharmacology* 82C:19-27, 2014. 査読有 DOI:10.1016/j.neuropharm.2014.03.005

Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Tanaka K, Shimizu T, Saito M, Saibara T: RUVBL1 directly binds actin filaments and induces formation of cell protrusions to promote pancreatic cancer cell invasion. *Int J Oncol* 44:1945-54, 2014. 査読有 DOI:10.3892/ijo.2014.2380

Shimizu S, Tsounapi P, Honda M, Dimitriadis F, Taniuchi K, Shimizu T, Inoue K, Saito M: Effect of an angiotensin II receptor blocker and a calcium channel blocker on hypertension associated penile dysfunction in a rat model. *Biomed Res*, 35: 215-21, 2014. 査読有

Taniuchi K, Furihata M, Hanazaki K, Saito M, Saibara T: IGF2BP3-mediated translation in cell protrusions promotes cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer. *Oncotarget*, 5: 6832-45, 2014. 査読有

Taniuchi K, Furihata M, Saibara T: KIF20A-mediated RNA granule transport system promotes the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Neoplasia* 16: 1082-93, 2014. 査読有 DOI:10.1016/j.neo.2014.10.007

Nakamura K, Shimizu T, Yanagita T, Nemoto T, Taniuchi K, Shimizu S, Dimitriadis F, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Saito, M: Angiotensin II acting on brain AT1 receptors induces adrenaline secretion and pressor responses in the rat. *Sci Rep* 4: 7248, 2014. 査読有 DOI:10.1038/srep07248

Taniuchi K, Yokotani K, Saibara T: BART inhibits pancreatic cancer cell invasion by Rac1 inactivation through direct binding to active Rac1. *Neoplasia* 14:440-50, 2012. 査読有

Shimizu T, Tanaka K, Nakamura K, Taniuchi K, Yokotani K: Brain phospholipase C, diacylglycerol lipase and monoacylglycerol lipase are involved in (\pm)-epibatidine-induced activation of central adrenomedullary outflow in rats. *Eur J Pharmacol* 691:93-102, 2012. 査読有
DOI:10.1016/j.ejphar.2012.07.017

Nakamura K, Shimizu T, Tanaka K, Taniuchi K, Yokotani K: Involvement of presynaptic voltage-dependent Kv3 channel in endothelin-1-induced inhibition of noradrenaline release from rat gastric sympathetic nerves. *Eur J Pharmacol* 694:98-103, 2012. 査読有
DOI:10.1016/j.ejphar.2012.08.002

Taniuchi K, Yokotani K, Saibara T: BART Inhibits Pancreatic Cancer Cell Invasion by PKC Inactivation through Binding to ANX7. *PLoS ONE* 7:e35674, 2012. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0035674

[学会発表](計 20 件)
(国際学会)

Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Shimizu S, Shimizu T, Saito M, Saibara T: Prdx1 promotes pancreatic cancer cell motility and invasion by modulating p38 MAPK activity. *United European Gastroenterology Week*. Vienna, Austria, 10.18-22, 2014.

Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Shimizu S, Shimizu T, Saito M, Saibara T: RUVBL1 directly binds actin filaments and induces formation of cell protrusions to promote pancreatic cancer cell invasion. *Asian Pacific Digestive Week*. Bali, Indonesia, 11.22-25, 2014.

Shimizu T, Tanaka K, Nakamura K, Taniuchi K, Shimizu S, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Yokotani K, Saito M: Inhibitory involvement of brain cannabinoid CB1 receptors in central activation of sympatho-adrenomedullary outflow induced by bombesin

microinjected into the rat hypothalamic paraventricular nucleus. 17th World congress of basic & clinical pharmacology. Cape Town, South Africa, 7.13-18, 2014.

Taniuchi K, Yokotani K, Saibara T: BART inhibits pancreatic cancer cell motility and invasion through Rac1 inactivation through direct binding to active forms of Rac1. Ninth American Association for Cancer Research-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research. Maui USA, 2.23-25, 2013.

Taniuchi K, Furihata M, Saito M, Saibara T: B0031 enhances pancreatic cancer cell motility and invasion through binding to ANXA2. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology & the Korean Pancreatobiliary Association. Seoul, Korea, 9.4-7, 2013.

(国内学会)

谷内恵介, 降幡睦夫: 細胞内ストレス顆粒に局在する CD24 の膵癌転移抑制機序の解析. 第 73 回日本癌学会総会. パシフィコ横浜, 横浜, 2014, 9. 25-27.

坪井麻記子, 谷内恵介, 降幡睦夫: RUVBL1 はアクチンとの結合を介して膵癌細胞の運動・浸潤を亢進させる. 第 73 回日本癌学会総会. パシフィコ横浜, 横浜, 2014, 9. 25-27.

清水 翔吾, Tsounapi Panagiota, 清水 孝洋, 谷内 恵介, 本田 正史, 井上 啓史, 武中 篤, 齊藤 源顕: 1 受容体遮断薬シロドシンによる前立腺血流量改善を介した前立腺肥大の抑制効果. 第 21 回日本排尿機能学会. シンポジウム, 岡山コンベンションセンター, 岡山, 2014, 9. 17-20.

谷内恵介: KIF20A が RNA 結合蛋白質を介して膵癌浸潤・転移を亢進させる機序. 第 44 回 日本膵臓学会大会. トピックスセッション, 仙台国際センター, 仙台, 2013, 7. 25-26.

谷内恵介: KIF20A 結合型 RNA 結合蛋白質を標的とした膵癌新規治療法の確立に向けて. 第 45 回 日本膵臓学会大会. シンポジウム, 北九州国際会議場, 北九州, 2014, 7. 11-12.

Shimizu S, Tsounapi P, Shimizu T, Tanaka K, Taniuchi K, Honda M, Inoue K, Takenaka

A, Tomita S, Saito M: The effect of the ATP sensitive potassium channel blocker, glibenclamide in the ischemia-reperfusion injury in the rat testis. 第33回日本アンドロロジー学会学術大会. 軽井沢プリンスホテルウエスト, 軽井沢, 2014,6.12-13.

清水 孝洋、田中 健二郎、中村 久美子、谷内 恵介、清水 翔吾、八幡 俊男、東 洋一郎、上羽 哲也、横谷 邦彦、齊藤 源顕: ラット視床下部室傍核投与ボンベシンによる中枢性交感神経-副腎髄質系賦活に対する脳内 CB1 受容体の抑制機能. 第55回日本心身医学会総会. 幕張メッセ, 千葉, 2014,6.6-7.

谷内恵介, 岩崎信二, 西原利治: KIF20A は RNA 結合蛋白質とメッセンジャーRNA の複合体を輸送することにより膀胱浸潤・転移を亢進させる. 第100回日本消化器病学会総会・シンポジウム, 東京国際フォーラム, 東京, 2014,4.23-26.

清水孝洋、田中健二郎、中村久美子、谷内恵介、清水翔吾、八幡俊男、東洋一郎、上羽哲也、横谷邦彦、齊藤源顕: ラット視床下部室傍核へ投与されたボンベシンによる中枢性交感神経系-副腎髄質系賦活に対し脳内カンナビノイド CB1 受容体は抑制性に関与する. 第87回日本薬理学会年会. 仙台国際センター他1会場, 仙台, 2014,3.19-21.

田中健二郎、清水孝洋、谷内恵介、中村久美子、横谷邦彦、齊藤源顕: ボンベシン脳室内投与により活性化したラット視床下部室傍核前交感神経性ニューロンにおけるヘモグロビンおよびヘモグロビン由来ペプチドの発現. 第87回日本薬理学会年会. 仙台国際センター他1会場, 仙台, 2014,3.19-21.

中村久美子、清水孝洋、田中健二郎、谷内恵介、齊藤源顕: 脳室内投与アンギオテンシン II は、アンギオテンシン AT1 受容体を介して血漿アドレナリン値を上昇させる. 第87回日本薬理学会年会. 仙台国際センター他1会場, 仙台, 2014,3.19-21.

清水孝洋、田中健二郎、柳田俊彦、根本隆行、中村久美子、谷内恵介、横谷邦彦、齊藤源顕: ヘモグロビン RVD-ヘモプレッシンは脳内カンナビノイド CB1 受容体を介してボンベシンによる中枢性副腎髄質系賦活を抑制する. 第66回日本自律神経学会総会. 愛知県産業労働センター名古屋, 2013,10.24-25.

Shimizu T, Kuriyama M, Nagashima R,

Tanaka K, Nakamura K, Taniuchi K, Yokotani K: Centrally administered prostaglandin E2-glycerol ester activates central sympathetic outflow by brain prostanoid EP3 receptor-mediated mechanisms in rats. 第86回日本薬理学会年会. 福岡国際会議場, 福岡, 2013,3.21-23.

谷内恵介, 横谷邦彦, 西原利治: BART は Rac1 活性を制御することにより膀胱細胞の形態を変化させ、膀胱細胞の遊走・浸潤を制御する. 第44回日本臨床分子形態学会総会・シンポジウム, かるぽーと高知, 2012,9.28-29.

田内亜紀, 降幡睦夫, 谷内恵介: B0031 による膀胱細胞の浸潤亢進機序の解析. 第71回日本癌学会総会. ホテルロイトン札幌他2会場, 札幌, 2012,9.19-21.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷内 恵介 (TANIUCHI, Keisuke)
高知大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 50626869

(2) 連携研究者

本家 孝一 (HONKE, Koichi)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 80190263

小谷 典弘 (KOTANI, Norihiro)
埼玉医科大学・医学部・生化学講座・准教授
研究者番号: 90342782