

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670166

研究課題名(和文) 肺がん転移に関与するシアリルルイス抗原キャリアータンパク質の同定と診断法の開発

研究課題名(英文) Identification of sialyl Lewis antigen carrier proteins involved in the metastasis of lung cancer and development of diagnostic method to measure them

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：シアリルルイスX (sLeX) 抗原は肺がんの血行性転移に関与する。ヒト肺腺がん細胞ABC-1には分子量190kDaと分子量250kDa以上の二つのsLeXキャリアータンパクが存在する。ABC-1細胞膜と培養液からイムノアフィニティークロマトを用いてsLeXキャリアータンパクを精製し、質量分析によりタンパクXとYを同定した。siRNAを用いてABC-1上のタンパクXの発現をノックダウンして、細胞表面におけるシアリルルイスX抗原の発現変化がみられなかった。このことから、細胞表面のシアリルルイスX抗原キャリアータンパクはYであると推定された。タンパクYの発現抑制実験を進行中である。

研究成果の概要(英文)：The sialyl Lewis X (sLeX) antigen is involved in the hematogenous metastasis of lung cancer cells. A human lung adenocarcinoma cell line ABC-1 has two sLeX carrier proteins with molecular masses of 190 kDa and more than 250 kDa. We have purified the sLeX carrier proteins using an immunoaffinity chromatography from the plasma membrane and the conditioned medium of ABC-1, and have identified protein X and Y by means of mass spectrometry. When protein X was knocked down by siRNA, the cell surface expression level of sLeX was unchanged. This finding suggested that the sLeX carrier protein on the cell surface was protein Y. The expression inhibitory experiments of protein Y are under way.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 シアリルルイスX スルホルイスX 肺腺がん 血行性転移

### 1. 研究開始当初の背景

シアリル化糖鎖や硫酸化糖鎖は陰性荷電をもち、糖鎖レセプター(レクチン)の認識エピトープとしてはたらき、組織発生や炎症やがんの進展に関与する。がんの血行性転移はがん細胞の血管内皮細胞への接着で始まるが、血管内皮細胞上に発現するレクチンのE-セレクチンとがん細胞上に発現する糖鎖上のシアリルルイス抗原との相互作用(ローリング現象)がこのステップの初期に重要であることが知られている。研究代表者は、シアリル化と硫酸化が同一前駆体糖鎖を競合し、正常組織では硫酸化が優位でスルホルイス抗原が生合成されているが、がん化に伴いシアリル化が優位になってシアリルルイス抗原が発現するようになる(Ikeda et al, J Biol Chem 276, 38588, 2001)ことを見出した。

硫酸化糖鎖の生合成を担う糖鎖硫酸転移酵素は、ヒトでは7ファミリー、34種類存在している。このうちGal3STファミリー(Honke et al, Med Res Rev 22, 637-654, 2002)は研究代表者が発見したものであるが、糖脂質の硫酸化に働くCST(Gal3ST-1)(Honke et al, J Biochem 119, 421, 1996; Honke et al, J Biol Chem 272, 4864, 1997)をはじめ、4種類(Gal3ST-1 ~ Gal3ST-4)が存在する。Gal3ST-1以外は全て糖タンパク質糖鎖の硫酸化に働き、なかでもGal3ST-2(Honke et al, J Biol Chem 276, 267, 2001)はスルホルイス抗原の生合成に関わることを明らかにしてきた。

我々は、シアリルルイスX抗原を高発現しているヒト肺がん細胞株ABC-1にGal3ST-2の遺伝子を強制発現させると、がん細胞表面の糖鎖構造がシアリルルイスX抗原からスルホルイスX抗原にシフトし、これに伴い、肺がん細胞のE-セレクチンへの結合性が低下して、マウスモデルにおける肺への血行性転移が劇的に抑制されることを見出した。

糖タンパク質糖鎖の機能は、糖鎖だけを調べていても限界があり、糖タンパク質丸ごとで調べる必要がある。しかし、これまで、特定の糖鎖構造がどのタンパク質の上に表現されているかまで明らかにした研究は殆どない。これは、一般的に同一の糖鎖構造をもつ膜タンパク質が複数存在することと、細胞膜に局在する糖タンパク質が微量で、かつ膜タンパク質の精製と質量分析あるいはペプチドシーケンシングによる同定が非常に困難なためである。

ヒト肺がん細胞上で、シアリルルイスX抗原がどのタンパク質のどの部位に表現されているかを明らかにするためには、まず、シアリルルイスX抗原が載っているキャリアータンパク質を知る必要がある。シアリルルイスX抗原およびスルホルイスX抗原に対する単クローン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行うと、意外にも、これらユニ-

ク糖鎖構造を持つキャリアータンパク質の種類は非常に限定的であり、親細胞株ABC-1ではシアリルルイスX抗原が250 kDa以上と190 kDaのタンパク質の上に発現していた。一方、Gal3ST-2導入細胞ではシアリルルイスX抗原の発現が消失して、代わりにスルホルイスX抗原が170 kDaのタンパク質上に発現していた。190 kDaと170 kDaの見かけ上の分子量の違いはシアリル化と硫酸化の違いによると予想された。

### 2. 研究の目的

(1)ヒト肺がん細胞ABC-1からシアリルルイスX抗原キャリアータンパク質を精製して同定する。同定した分子の血行性転移への関与を明らかにする。

(2)シアリルルイスX抗原とキャリアータンパク質のペプチド部分を同時に検出する新規の肺がん診断法を開発する。

### 3. 研究の方法

(1)ABC-1細胞におけるシアリルルイスX抗原キャリアータンパク質の精製と同定

大量培養したABC-1細胞から膜画分を遠心分離し、界面活性剤Lubrol PX(1%)存在下で超音波処理を行い、膜タンパク質を可溶化した。膜タンパク質抽出液を、WGAレクチンアフィニティークロマトグラフィーにかけ、N-アセチルグルコサミン入り緩衝液で溶出した。この溶出液を、抗シアリルルイス抗原単クローン抗体CSLEX-1を固相化したイムノアフィニティークロマトグラフィーにかけ、シアリルルイス抗原キャリアータンパク質を高濃度NaCl入り緩衝液で溶出した。MonoQイオン交換クロマトグラフィーでさらに精製と濃縮を行った。

精製タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、分子サイズ190 kDaの部位のゲルを切り出した。切り出したゲル断片を破碎し、トリプシンでゲル内消化を行った後、ペプチド断片を抽出した。抽出したペプチド断片を超微量液体クロマトグラフィーで分離してMALDIサンプルプレートにスポットした。これをMALDI-TOF/TOF質量分析装置(アプライドバイオシステム社5800、現有設備)にかけ、MS/MS分析することにより、タンパク質(シアリルルイスX抗原キャリアータンパク質候補タンパク質)を同定した。

ABC-1細胞の膜タンパク質抽出液を、候補タンパク質に対する抗体を用いて吸収実験を行い、分子サイズ190 kDaのシアリルルイスX抗原キャリアータンパク質であるか否かを確認した。

(2)Gal3ST-2導入細胞におけるスルホルイス抗原キャリアータンパク質との同一性の検討

Gal3ST-2導入細胞の膜タンパク質抽出液を、シアリルルイスX抗原キャリアータンパ

ク質に対する抗体を用いて吸収実験を行い、Gal3ST-2 導入細胞における分子サイズ 170 kDa のスルホルイス X 抗原キャリアータンパク質が親細胞 ABC-1 のシアリルルイス X 抗原キャリアータンパク質と同じタンパク質であるか否かを確認した。

### (3)シアリルルイス抗原キャリアータンパク質の血行性転移への関与

siRNA テクノロジーを用いて、肺がん細胞 ABC-1 におけるシアリルルイス X 抗原キャリアータンパク質の発現をノックダウンした。キャリアータンパク質ノックダウン細胞表面におけるシアリルルイス抗原の発現変化をフローサイトメトリーで確認した。

### (4)シアリルルイス抗原とキャリアータンパク質を同時検出する肺がん診断法の開発

同定したシアリルルイス X 抗原キャリアータンパク質ペプチド部分に対する単クローン抗体と、シアリルルイス抗原に対する抗体の両者を用いるサンドイッチ ELISA 法を行った。具体的には、マイクロタイタープレートに抗キャリアータンパク質抗体をコートし、そこに標準あるいは試料溶液を反応させよく洗浄した後、酵素標識した抗シアリルルイス抗原抗体を反応させ、最後に酵素基質を添加して酵素反応を行い、実際にシアリルルイス抗原を発現しているキャリアータンパク質の量を定量した。

## 4. 研究成果

大量培養したヒト肺がん細胞 ABC-1 から膜タンパク質を可溶化し、WGA レクチンアフィニティークロマト、シアリルルイス X 抗原に対する抗体を固相化したイムノアフィニティークロマト、HiTrapQ 陰イオン交換クロマトに順次かけてシアリルルイス X 抗原キャリアータンパク質を精製した。精製タンパク質を SDS-PAGE につけ、分子量 190 kDa の部位を切り出し、トリプシンでゲル内消化を行った後、抽出したペプチド断片を nanoLC-MALDI-TOF/TOF 質量分析装置につけ、タンパク質 X を同定した。

Gal3ST-2 導入細胞の膜タンパク質抽出液を、同定したタンパク質 X に対する抗体を用いた吸収実験を行い、分子量 170 kDa のスルホルイス X 抗原キャリアータンパク質が親細胞 ABC-1 のシアリルルイス X 抗原キャリアータンパク質と同じタンパク質 X であることを確認した。

siRNA テクノロジーを用いて ABC-1 細胞におけるタンパク質 X の発現をノックダウンして、細胞表面におけるシアリルルイス X 抗原の発現変化を細胞免疫染色とフローサイトメトリーで調べたが変化がみられなかった。このことから、細胞表面のシアリルルイス X 抗原キャリアータンパク質はタンパク質 X とは異なるタンパク質であることが示唆された。このため、抗シアリルルイス X 抗体で認

識される分子量 250 kDa 以上の高分子量タンパク質が細胞表面のシアリルルイス X 抗原キャリアータンパク質である可能性が考えられた。

分子量 250 kDa 以上の高分子量タンパク質は細胞外に分泌されることがわかったので、ABC-1 細胞を無血清培地で 24 時間培養した後、培養液から WGA レクチンアフィニティークロマト、HiTrapQ 陰イオン交換クロマトに順次かけてシアリルルイス X 抗原キャリアータンパク質を精製した。精製タンパク質を SDS-PAGE につけ PVDF 膜にブロッティングし、250 kDa 以上の部位をトリプシン消化して抽出したペプチド断片を nanoLC-MALDI-TOF/TOF 質量分析装置につけ、タンパク質 Y を同定した。

このタンパク質 Y のペプチド部分に対する抗体は、抗シアリルルイス X 抗体および抗スルホルイス X 抗体と同様に細胞表面を染色するので、タンパク質 Y が目的のシアリルルイス X 抗原キャリアータンパク質と考えられた。タンパク質 Y の血行性転移への関与を調べるために、siRNA テクノロジーでタンパク質 Y のノックダウンを試みたが、タンパク質 Y の発現を長期に抑制すると細胞が死滅してしまいタンパク質 Y 欠損細胞を得ることができなかった。タンパク質 Y は生存に必須である可能性が考えられたので、誘導可能な Cas9 システムを構築して短期的に発現抑制を行う実験を進行中である。

タンパク質 X および Y のペプチド部分に対する単クローン抗体と、シアリルルイス抗原に対する抗体の両者を用いるサンドイッチ ELISA 法で検出可能であることを確認した。定量するためにスタンダードの作製が必要である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Ohkawa Y, Momota H, Kato A, Hashimoto N, Tsuda Y, Kotani N, Honke K, Suzumura A, Furukawa K, Ohmi Y, Natsume A, Wakabayashi T, Furukawa K: Ganglioside GD3 enhances invasiveness of gliomas by forming a complex with platelet-derived growth factor receptor alpha and Yes. *J Biol Chem* 2015; inpress  
DOI:jbc.M114.635755 査読有

Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N, Honke K: Each GPI-anchored protein species forms a specific lipid raft depending on its GPI attachment signal. *Glycoconj J* 2015; inpress. DOI:10.1007/s10719-015-9595-5 査読有

Miyagawa-Yamaguchi, A., Kotani, N., Honke, K.: Segregation of lipid rafts revealed by the EMARS method using

GPI-anchored HRP fusion proteins. Trends Glycosci. Glycotech. 2014; 26:59-69. DOI:10.4052/tigg.26.59 査読有

Li TSC, Yawata T, Honke K: Efficient siRNA delivery and tumor accumulation mediated by ionically cross-linked folic acid-poly(ethylene glycol)-chitosan oligosaccharide lactate nanoparticles: For the potential targeted ovarian cancer gene therapy. Eur J Pharm Sci 2014; 52:48-61. DOI:10.1016/j.ejps.2013.10.011 査読有

Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N, Honke K: Expressed glycosylphosphatidyl-inositol-anchored horseradish peroxidase identifies co-clustering molecules in individual lipid raft domains. PLoS ONE 2014; 9:e93054. DOI:10.1371/journal-pone.0093054 査読有

Honke, K.: Biosynthesis and biological function of sulfoglycolipids. Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. 2013; 89:129-138. DOI:10.2183/pjab.89.129 査読有

Kanekiyo K, Inamori K, Kitazume S, Sato K, Maeda J, Higuchi M, Kizuka Y, Korekane H, Matsuo I, Honke K, Taniguchi N: Loss of branched O-mannosyl glycans in astrocytes accelerates remyelination. J. Neurosci. 2013;33:10037-10047. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3137-12.2013 査読有

[学会発表](計1件)

本家孝一、山口亜利沙、小谷典弘: GPI-アンカー型 HRP 融合タンパク質がつくる脂質ラフトドメイン. 第 86 回日本生化学会大会、シンポジウム、平成 25 年 9 月 12 日、横浜、パシフィコ横浜

[図書](計7件)

Honke, K.: UDP-Gal:ceramide galactosyltransferase (UGT8). in "Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes 2nd Ed" (Eds. by Taniguchi, N., Honke, K. Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T.), Springer, pp 131-140, 2014.

Honke, K.: UDP-GalNAc: -1,3-N-acetyl-galactosaminyltransferase 1 (B3GALNT1). in "Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes 2nd Ed" (Eds. by Taniguchi, N., Honke, K. Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T.), Springer, pp 447-453, 2014.

Honke, K.: Globoside -1,3-N-acetyl-galactosaminyltransferase 1 (GBGT1). in "Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes 2nd Ed" (Eds. by Taniguchi, N., Honke, K. Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T.), Springer, pp. 455-461, 2014.

Honke, K.: Galactose-3-O-sulfotransferase-1-4 (GAL3ST1-4). in "Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes 2nd Ed" (Eds. by Taniguchi, N., Honke, K. Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T.), Springer, pp 1123-1134, 2014.

Elbein, A. D. and Honke, K.: Chapter 27. Complex carbohydrates: Glycoproteins. in "Medical Biochemistry 4th Ed" (Eds. by Baynes, J.W. and Dominiczak, M.H.), pp 353-368, Saunders Elsevier, 2014.

Elbein, A. D. and Honke, K.: Chapter 28. Complex lipids. in "Medical Biochemistry 4th Ed" (Eds. by Baynes, J.W. and Dominiczak, M. H.), pp 369-379, Saunders Elsevier, 2014.

Honke, K. and Kotani, N.: EMARS Method: A tool for molecular interactome. in "Glycoscience: Biology and Medicine" (Eds. by Taniguchi, N., Endo, T., Hart G.W., Seeberger, P.H., and Wong, C.-H.), Springer, pp 17-23, 2014.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

姜 松林 (JIANG, Songlin)  
高知大学・学内共同利用施設等・特任助教  
研究者番号: 80598540  
(H24-H25)