

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590062
 研究課題名（和文）癌細胞の糖鎖のガラクトシル化を制御する転写因子ネットワークの解明
 研究課題名（英文）Study on the network of transcription factors that regulate the galactosylation of N-glycans in cancer cells
 研究代表者
 佐藤 武史（SATO TAKESHI）
 長岡技術科学大学工学部・助教
 研究者番号：30291131

研究成果の概要：本研究では細胞の癌化に伴う細胞膜糖タンパク質糖鎖のガラクトシル化の変化の有無、及び β -1,4-GalT II 及び V 遺伝子の転写制御機構を解析した。本研究から、細胞の癌化に伴う糖鎖のガラクトシル化、及びこのガラクトシル化機構に関わる糖鎖遺伝子の転写制御機構の一端が初めて明らかになった。また、転写因子の発現を制御することで癌細胞の糖鎖のガラクトシル化を制御し、癌細胞の悪性形質を抑制できる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：癌、糖タンパク質、糖鎖、ガラクトシル化、転写因子

1. 研究開始当初の背景

細胞膜糖タンパク質に結合した N-型糖鎖は細胞の癌化に伴って著しく構造が変化し、癌細胞の腫瘍形成や転移に関わっている。研究代表者の佐藤は、癌の腫瘍形成や転移に関わる糖鎖抗原が発現する高分岐 N-型糖鎖のガラクトシル化機構に着目して研究を進め、ヒト乳癌細胞から既知の β -1,4-ガラクトース転移酵素 (β -1,4-GalT) とアミノ酸配列で 37%の相同性をもつ新奇の β -1,4-GalT V の遺伝子クローニングに成功した [Sato, T., et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 442.]. 時期を同じくして、この遺伝子の他に新たに 4 つの β -1,4-GalT 遺伝子がク

ローニングされ、既知の β -1,4-GalT との相同性から β -1,4-GalT II, III, IV, VI と命名された。研究代表者らは酵素の *in vitro* の基質特異性の解析から、これらすべての β -1,4-GalT は N-型糖鎖をガラクトシル化できることを見出した [Guo, S. *, Sato, T. *, et al. (2001) *Glycobiology* 11, 813. *Both authors contributed equally to this study.]. さらに、NIH3T3 マウス繊維芽細胞とこの細胞を悪性形質転換した MTA_g 細胞を用いて、細胞の癌化に伴う β -1,4-GalT 遺伝子の発現動態を解析した結果、細胞の癌化によって β -1,4-GalT V 遺伝子の発現は増大し、反対に β -1,4-GalT II 遺伝子の発現は激減する

ことを見出した [Shirane, K. Sato, T., (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 434.; Sato, T., et al. (1999) *Recent Res. Dev. Cancer* 1, 105.; Sato, T., et al. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 1019.]. さらに、 β -1,4-GalT V 遺伝子の転写制御機構を解析し、転写因子 Sp1 で制御されていることを明らかにした [Sato, T. and Furukawa, K. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 39574.]. その後、癌細胞に β -1,4-GalT V 遺伝子のアンチセンス、あるいは β -1,4-GalT II 遺伝子を導入して細胞膜糖タンパク質糖鎖のガラクトシル化を変化させると、癌細胞の増殖速度や造腫瘍能を抑制できることを見出した。従って、癌細胞の悪性形質の発現にとって鍵となるこれら 2 つの酵素の遺伝子発現を転写因子によって同時に制御することができれば、効率よい癌の治療法の開発に繋がるのが期待される。そこで、 β -1,4-GalT II 及び V 遺伝子の転写制御機構を解析し、癌細胞における糖鎖のガラクトシル化を制御する転写ネットワークの解明が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

マウス繊維芽細胞（正常細胞）とこれに由来する癌細胞を用いて、細胞の癌化に伴う細胞膜糖タンパク質糖鎖のガラクトシル化について解析する。また、マウス β -1,4-GalT II 及び V 遺伝子の転写制御機構を解析し、両遺伝子の発現を制御する転写因子を同定する。さらに、同定した転写因子とヒト β -1,4-GalT V 遺伝子の発現を制御する転写因子 Sp1 や Ets-1 との関係、転写因子間の相互作用を含めて解析し、癌細胞における糖鎖のガラクトシル化を制御する転写因子ネットワークを解明して、本研究の医薬分野への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞の癌化に伴う糖鎖のガラクトシル化の解析

正常細胞として NIH3T3 細胞を、一方、癌細胞として NIH3T3 細胞をポリオーマウイルスのミドル T 抗原遺伝子で形質転換した MTA_g 細胞をそれぞれ培養した。これらの細胞から細胞膜糖タンパク質を調製し、これをアセトンで脱脂後、凍結乾燥を行ない、試料タンパク質とした。この試料を、研究代表者らが確立した糖鎖構造を簡便に調べるレクチンブロット法 [佐藤武史、古川清 (1996) 「細胞工学」実験プロトコルシリーズ グリコバイオロジー実験プロトコル, 38-41; 佐藤武史、古川清 (2000) 基礎生化学実験法 第 5 巻 脂質・糖質・複合糖質, 172-177] を用いることで、細胞の癌化に伴う糖鎖のガラクトシル化の変化を解析した。

(2) β -1,4-GalT II 及び V 遺伝子のプロモーター領域の解析

マウスのゲノム DNA ライブラリーから、PCR 法やプラークハイブリダイゼーション法により β -1,4-GalT II 及び V 遺伝子の 5' -上流域の単離を試みた。次に、単離した 5' -上流域から制限酵素を用いて様々な長さの 5' -上流域を作製し、これらをルシフェラーゼ遺伝子上流に繋ぎ、レポータープラスミドを構築した。これらを様々なマウス由来細胞に導入・発現し、2 日後に細胞を集めた。細胞をリン酸緩衝液で 3 回洗浄した後に、ルシフェラーゼ活性測定用緩衝液中で可溶化した。ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性を測定し、 β -1,4-GalT II 遺伝子のプロモーター領域の同定を行なった。さらに、同定したプロモーター領域の塩基配列を基に、どのような転写因子が結合するかをコンピューターソフトウェアによって予測した。

(3) β -1,4-GalT II 遺伝子のプロモーター領域と相互作用する分子の単離と同定

同定したプロモーター領域をビオチン化し、これを NIH3T3 細胞の細胞溶解液と振盪した。この混合物からストレプトアビジン結合磁性ビーズを用いて、プロモーター領域と相互作用する分子を単離した。単離した分子を含むタンパク質溶液を試料とし、SDS-PAGE を行なった。各分子をゲルから切り出し、トリプシン消化の後に精製し、MALDI-TOF 質量分析によりタンパク質を同定した。

(4) 細胞の癌化に伴う遺伝子の発現動態の解析

(3) で同定した分子の細胞の癌化に伴う変化の有無について、NIH3T3 細胞と MTA_g 細胞から全 RNA を抽出し、RT-PCR により解析した。

(5) 転写因子の発現制御による癌細胞の悪性形質の解析

Sp1 をノックダウンするために、ヒト Sp1 遺伝子に対する siRNA 配列を含む siRNA 発現プラスミドを作製した。これを A549 ヒト肺癌細胞に導入し、ハイグロマイシン B 存在下で培養し、安定発現株を樹立した。対照細胞として、ネガティブコントロールプラスミドを導入した A549 細胞を樹立した。樹立した対照細胞と Sp1 ノックダウン細胞の細胞膜糖タンパク質の糖鎖修飾の変化の有無をレクチンブロットにより解析した。さらに、樹立した Sp1 ノックダウン細胞の増殖速度や、軟寒天中における細胞増殖について解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞の癌化に伴う糖鎖のガラクトシル化の解析

NIH3T3 細胞と MTA_g 細胞から細胞膜糖タンパク質を調製し、 β -1,4-ガラクトース残基と結合する RCA-I を用いてレクチンプロットにより糖鎖のガラクトシル化の変化の有無を解析した。その結果、RCA-I との結合性は MTA_g 細胞では NIH3T3 細胞に比べて、主に 80-90 K、120 K 及び 130-140 K 付近の糖タンパク質で増大する傾向が見られた。しかし、転写膜を予め硫酸で処理して糖鎖末端に結合したシアル酸を除去した場合には、NIH3T3 細胞と MTA_g 細胞では RCA-I との結合性に有意な差は見られなかった。次に、NIH3T3 細胞と MTA_g 細胞における β -1,4-GalT の活性を測定した。その結果、両細胞における β -1,4-GalT の活性に有意な変化は見られなかった。これらの結果から、細胞の癌化に伴って N-型糖鎖のガラクトシル化は変化しないと考えられ、硫酸処理していない転写膜に見られた RCA-I の増大は、糖鎖のシアル化の変化が影響している可能性が考えられた。今後は、細胞の癌化に伴う糖鎖のシアル化の変化の有無についても解析していく必要がある。

(2) β -1,4-GalT II 及び V 遺伝子のプロモーター領域の解析

DNA データベースに登録されている塩基配列を元にプライマーを作製し、PCR 法によってマウスゲノム DNA から β -1,4-GalT II 遺伝子の 5' -上流領域約 2.3 kb を単離した。次に、ルシフェラーゼ遺伝子に 5' -上流領域を繋いで、レポータープラスミドを作製した。このプラスミドを種々のマウス線維芽細胞に導入してプロモーター活性を測定すると、NIH3T3 細胞で高い活性が検出された。一方、このプラスミドを MTA_g に導入すると、プロモーター活性は NIH3T3 に比べて約 1/10 に低下した。次に、様々な長さの 5' -上流領域を繋いだレポータープラスミドを作製し、NIH3T3 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行なった。その結果、プロモーター活性は開始コドンから -247 ~ -1 に検出され、この領域には様々な転写因子が結合する部位が存在していた。

同様に、DNA データベースに登録されている塩基配列を元にプライマーを複数作製し、PCR 法によってマウスゲノム DNA から β -1,4-GalT V 遺伝子の 5' -上流領域の単離を試みた。しかし、この増幅する領域の GC 含量が高いためか、目的とする大きさの遺伝子断片を得ることができなかった。そこで、 β -1,4-GalT V 遺伝子の開始コドンを含む遺伝子断片をプローブとして、プラークハイブリダイゼーション法によるマウスゲノム DNA ライブラリーのスクリーニングを試みたが、 β -1,4-GalT V 遺伝子の 5' -上流領域は単離することができなかった。そこで、DNA データベースに登録のある塩基配列から

β -1,4-GalT V 遺伝子の 5' -上流領域約 1kb に相当する配列を探し出し、コンピューターソフトウェアを用いて転写因子の結合部位を解析した。その結果、ヒト β -1,4-GalT V 遺伝子の場合と同様に、Sp1 を初めとする複数の転写因子が結合する配列をマウス β -1,4-GalT V 遺伝子の 5' -上流領域に見出した。 β -1,4-GalT V 遺伝子がマウスの様々な臓器で発現していることを考え合わせると (Nakamura, N., Yamakawa, N., Sato, T., *et al.* (2001) *J. Neurochem.*, 76, 29.)、この遺伝子はハウスキーピング遺伝子の転写を制御する Sp1 で制御されている可能性が高いと考えられる。

(3) β -1,4-GalT II 遺伝子のプロモーター領域と相互作用する分子の単離と同定

β -1,4-GalT II 遺伝子のプロモーター領域と相互作用する分子を、ビオチン化したプロモーター領域を用いたアフィニティー精製により複数単離した。MALDI-TOF 質量分析により、分子量 28 K の分子は splicing factor、分子量 32 K の分子は CH-rich interacting match of PLAG1、分子量 33 K の分子は hnRNP A2/B、及び分子量 58 K の分子は novel zinc finger protein と同定した。この他にも幾つか分子を単離したが、精製されたタンパク質の量が少なかったため質量分析で同定するに至らなかった。同定した分子の中で、splicing factor と hnRNP A2/B1 は RNA のスプライシングに関わる分子であるが、CH-rich interacting match of PLAG1 と novel zinc finger protein は分子内に zinc フィンガーモチーフを有する分子であり、 β -1,4-GalT II 遺伝子の発現を制御している可能性が考えられる。

(4) 細胞の癌化に伴う遺伝子の発現動態の解析

NIH3T3 細胞と MTA_g 細胞を用いて細胞の癌化に伴う novel zinc finger protein 遺伝子の発現動態を解析したが、細胞の癌化に伴う遺伝子発現の変化は見られなかった。細胞の癌化に伴う遺伝子発現の変化は見られなかったが、癌細胞では転写因子同士の相互作用が正常細胞とは異なる可能性が考えられる。今後、 β -1,4-GalT V 遺伝子の発現を制御する転写因子である Sp1 や Ets-1 との関係も含めて転写因子間の相互作用を解析していく必要がある。

(5) 転写因子の発現制御による癌細胞の悪性形質の解析

樹立した対照細胞と Sp1 ノックダウン細胞から細胞膜糖タンパク質を調製し、レクチンプロットにより糖鎖のガラクトシル化の変化の有無を解析した。その結果、RCA-I との

結合性は Sp1 ノックダウン細胞において 85-100 K と 120 K の糖タンパク質で、Sp1 のノックダウン率に応じて低下した。次に、樹立した細胞の *in vitro* における増殖活性を MTT アッセイによって測定すると、Sp1 ノックダウン細胞では対照細胞に比べて 30-40% の増殖抑制が見られた。軟寒天中での足場非依存的な細胞増殖は、*in vivo* での造腫瘍能とよく相関することが知られている。そこで、対照細胞と Sp1 ノックダウン細胞の軟寒天中での細胞増殖について解析した。その結果、Sp1 ノックダウン細胞では対照細胞に比べて形成されるコロニーの数が有意に減少することが判明した。

本研究から、細胞の癌化に伴う糖鎖のガラクトシル化、及びこのガラクトシル化機構に関わる糖鎖遺伝子の転写制御機構の一端が初めて明らかになった。また、転写因子の発現を制御することで癌細胞の糖鎖のガラクトシル化を制御し、癌細胞の悪性形質を抑制できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kumagai, T., Tanaka, M., Yokoyama, M., Sato, T., Shinkai, T., and Furukawa, K. (2009) Early lethality of β -1,4-galactosyltransferase V-mutant mice by growth retardation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2), 456-459.
- ② Sato, T., Takahashi, M., and Furukawa, K. (2008) β -1,4-Galactosyltransferase III is involved in biosynthesis of highly branched N-linked oligosaccharides in WI38 human lung embryonic fibroblasts. *Res. Commun. in Biochem. Cell and Molec. Biol.* 12 (1-2), 61-71.
- ③ Sato, T., and Furukawa, K. (2007) Sequential action of Ets-1 and Sp1 in the activation of the human β -1,4-galactosyltransferase V gene involved in abnormal glycosylation characteristic of cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 282 (38) 27702-27712.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 佐藤武史、古川清、転写因子 Sp1 の発現制御による A549 ヒト肺癌細胞の腫瘍形成の抑制、日本薬学会第 129 年会、2009. 3. 28、京都。

- ② 佐藤武史、古川清、マウス β -1,4-ガラクトース転移酵素 II 遺伝子の発現を制御する転写因子の単離、BMB2008 (第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会合同大会)、2008. 12. 11、神戸。
- ③ 佐藤武史、古川清、転写因子 Sp1 のノックダウンがヒト肺癌細胞の N-型糖鎖修飾と増殖に与える影響、第 28 回日本糖質学会年会、2008. 8. 18、つくば。
- ④ Takeshi Sato, Kiyoshi Furukawa、Knockdown of transcription factor Sp1 results in inhibition of A549 human lung carcinoma cell growth、24th International Carbohydrate Symposium、2008. 7. 31、Oslo, Norway.
- ⑤ Takeshi Sato, Kiyoshi Furukawa、Suppression of A549 human lung carcinoma cell growth by knockdown of transcription factor Sp1、6th International Symposium on Glycosyltransferases (GlycoT2008)、2008. 5. 19、Atlanta, USA.
- ⑥ 佐藤武史、古川清、転写因子 Ets-1 と Sp1 による β -1,4-ガラクトース転移酵素 V 遺伝子の発現制御、BMB2007 (第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会)、2007. 12. 14、横浜。
- ⑦ 佐藤武史、古川清、マウス β -1,4-ガラクトース転移酵素 II 遺伝子の転写制御機構の解析、第 27 回日本糖質学会年会、2007. 8. 3、博多。

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 武史 (SATO TAKESHI)
長岡技術科学大学・工学部・助教
研究者番号：30291131

(2) 研究分担者

古川 清 (FURUKAWA KIYOSHI)
長岡技術科学大学・工学部・教授
研究者番号：10190133

(3) 連携研究者

なし