HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	正常上皮細胞と変異細胞間の相互作用に関与する分子探索の研究
Author(s)	林, 隆史
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13363号
Issue Date	2018-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13363
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71817
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_HAYASHI.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

正常上皮細胞と変異細胞間の相互作用に関与する分子探索の研究

北海道大学大学院 総合化学院 総合化学専攻

分子医化学講座 分子腫瘍研究室

林　隆史

目次

目次......2
表目次......4
図目次......4
1　要旨......6
2　第 1 章　序論......8
3　第 2 章　リン酸化タンパク質の網羅的解析によるシグナル分子の探索......12
3.1　試験方法及び試験材料......15
3.1.1　分析の概略......15
3.1.2　細胞......17
3.1.3　MDCK 細胞の安定同位体ラベル化......17
3.1.4　タンパク質抽出及びペプチド分画......17
3.1.5　リン酸化ペプチドの精製......18
3.1.6　データ解析......19
3.2　SILAC 法によるリン酸化ペプチド解析の結果......20
3.2.1　リン酸化ペプチド解析結果の概観......20
3.2.2　正常細胞と変異細胞との共培養にて変動するリン酸化ペプチドの探索......25
3.2.3　AHNAK2 の発現量及びリン酸化修飾の変動に関する検証......34
3.2.4　混合培養下におけるリン酸化 AHNAK2 の変動に関する検証......36
3.2.5　リン酸化ペプチドの精製法の再検討......38
3.3　本章の小括......41
4　第 3 章　SILAC 分析による分泌タンパク質の探索......42
4.1　試験方法及び試験材料......43
4.1.1　分析の概略......43
4.1.2　細胞......44
4.1.3　MDCK 細胞の SILAC ラベル......44
4.1.4　LC-MS/MS Analysis......44
4.1.5　データ解析......45
4.2　SILAC 法による分泌タンパク質の解析結果......45
4.2.1　正常細胞と変異細胞との混合培養で変動する分泌タンパク質......45

4.2.2 ADAMDEC1 のタンパク質発現変動の確認 50
4.2.3 ADAMDEC1 の遺伝子発現変動の確認 52
4.2.4 ADAMDEC1 遺伝子発現における NF-κB 経路の関与 55
4.2.5 変異細胞の離脱における ADAMDEC1 の役割 57
4.2.6 ADAMDEC1 が filamin に及ぼす影響 60
4.3 本章の小括 62
5 第 4 章　混合培養に適した新規分子解析法の検討 64
5.1 試験方法及び結果 65
5.1.1 試験の概略 65
5.1.2 細胞 69
5.1.3 Diaminopimelic acid の分析 69
5.1.4 各種細胞の増殖率の比較 71
5.1.5 安定同位体 D-Lisine 添加による MDCK-Lyr 細胞のラベル化 72
5.1.6 MDCK-lyr 及び DMCK-DDC 細胞の MDCK 細胞に対する発現タンパク質の比較 75
5.1.7 MDCK-Lyr 及び MDCK-RasV12-DDC を用いた細胞競合現象の確認 79
5.1.8 混合培養における細胞選択的ラベル化の確認 80
5.2 本章の小括 84
6 第 5 章　総括 87
7 謝辞 90

表目次

表 3.1-1 ペプチド分画における HPLC の各種設定条件............................. 18
表 3.1-2 SILAC 分析における LC-MS/MS の各種条件設定 19
表 3.2-1 混合培養において変動するリン酸化ペプチドの一覧 31
表 3.2-2 検討したリン酸化精製法の一覧.. 38
表 3.2-3 リン酸化精製法によるリン酸化ペプチド回収率.......................... 40
表 4.1-1 MS conditions for LC-MS/MS analysis... 45
表 4.2-1 The list of the significantly upregulated or downregulated proteins in the mix-culture of normal and RasV12 cells... 49
表 5.1-1 iTRAQ 分析に用いた Orbitrap Fusion の各種設定条件................. 76

図目次

図 3.1-1 リン酸化ペプチド解析の概略... 16
図 3.2-1 ペプチド同定数とリン酸化ペプチドの割合 21
図 3.2-2 リン酸化アミノ酸の分布状況... 21
図 3.2-3 同定ペプチドの SILAC 比の分布 23
図 3.2-4 リン酸化ペプチドの SILAC 比の分布 24
図 3.2-5 Ras 変異細胞との混合培養におけるリン酸化ペプチドの変動 ... 26
図 3.2-6 Src 変異細胞との混合培養におけるリン酸化ペプチドの変動.... 27
図 3.2-7 Ras 変異細胞との混合培養におけるリン酸化ペプチドの変動 (2).. 29
図 3.2-8 Src 変異細胞との混合培養におけるリン酸化ペプチドの変動 (2).. 30
図 3.2-9 AHNAK2 リン酸化ペプチドの同定及び定量 32
図 3.2-10 AHNAK2 由来のリン酸化および非リン酸化ペプチドの SILAC 定量.. 35
図 3.2-11 単独培養あるいは混合培養における AHNAK2 のリン酸化........ 37
図 4.1-1 SILAC-based analyses for soluble proteins enriched in the co-culture of normal and RasV12-transformed epithelial cells 43
図 4.2-1 Ratio distribution of two SILAC analysis... 46
図 4.2-2 Scatter plot of Medium/Heavy ratio from two SILAC analyses 48
図 4.2-3 Expression of ADAMDEC1 is increased in the co-culture of normal and RasV12-transfoemed cells 51
図 4.2-4 Western blot of ADAMDEC1 in conditioned media........................... 52
図 4.2-5 ADAMDEC1 secreted by normal epithelial cells plays a positive role in apical extrusion of RasV12-transformed cells. 54
図 4.2-6 The NF-κB pathway is not activated in normal epithelial cells

neighboring RasV12-transformed cells... 55
図 4.2-7 The NF-κB inhibitor CAPE suppresses apical extrusion of RasV12-transformed cells. 56
図 4.2-8 The metalloproteinase activity of ADAMDEC1 is dispensable for the regulation of apical extrusion.. 59
図 4.2-9 Knockdown of ADAMDEC1 suppresses filamin accumulation in normal cells at the interface with RasV12-transformed cells. 61
図 5.1-1 アミノ酸前駆物質による細胞のラベル化..................................... 66
図 5.1-2 CTAP 法を用いた正常細胞と変異細胞との相互作用に関与する分子の探索... 68
図 5.1-3 HPLC analysis of 2,6-Diaminopimelic acid 70
図 5.1-4 MDCK-DDC 細胞の増殖に対する混合 DAP の影響 71
図 5.1-5 MDCK-Lyr, MDCK-DDC 及び MDCK-Ras-DDC の細胞増殖率... 72
図 5.1-6 安定同位体 D-Lysine による MDCK-Lyr 細胞のラベル化............ 74
図 5.1-7 Lyr あるいは DDC 発現による MDCK 細胞への影響.................. 78
図 5.1-8 CTAP 細胞による細胞競合現象の確認.. 80
図 5.1-9 CTAP による細胞選択的ラベル化効率の確認............................... 83

1　要旨

上皮組織において変異細胞が出現すると，それを取り囲む周辺の正常細胞との間に新たな相互作用が生じる。すなわち，自らの生存空間の確保や生存競争が生じ，どちらかがもう一方を細胞死へと誘導したり，あるいは存在領域からの排除を行ったりする現象がみられる。この現象は，それぞれが単独で生存している場合には起こらない細胞非自律的な現象であり，細胞競合と呼ばれている。この細胞競合によって敗者となった細胞は組織より排除され，勝者はその生存空間を確保することになる。例を挙げると，正常上皮細胞の中に RasV12 変異をもつ形質転換細胞が生じると，変異細胞は頭頂側に押し出され，上皮層から離脱していく現象が観察されている。この現象において filamin タンパク質は重要な働きをすることがこれまでの研究で示されている。すなわち, 正常細胞による変異細胞の頭頂側への離脱現象には, 正常細胞内の変異細胞境界面に filamin が集積することが重要である。このような重要な分子の存在がいくつか明らかになっているが，部分的あるいは局所的な知見でありパスウェイ全体としては未だ不明な点が多い。この作用機序を解明するためには，未だ明らかになっていない多くの関与分子を見出し，それらを検証しながらパスウェイ全体にあてはめていかなければならない。そこで本研究では，正常細胞と変異細胞との相互作用に関連する分子を網羅的に探索することを目的とした。

本学位論文は全 5 章から構成されている。第一章では，全般の序論として研究の背景と目的を述べている。第 2 章では，リン酸化タンパク質の網羅的解析によるシグナル分子の探索について述べている。正常細胞と変異細胞との相互作用に反応して変化するリン酸化タンパク質を, SILAC 法を応用した解析により探索した。その結果，正常細胞と変異細胞との混合培養条件下で多く存在しているリン酸化ペプチドを見出し，その配列は AHNAK2 タンパク質由来のものであった。AHNAK2 はこれまで詳細に調べられていない，機能未知のタンパク質である。本研究で検出されたリン酸化部位を認識する抗体を作製し，免疫染色にて変動を確認したところ，変異細胞に隣接する正常細胞において染色され，しかも単独培養条件下では見られない強い蛍光強度を示した。AHNAK2 は隣接する細胞に反応してリン酸化状態を変化させることから，細胞競合現象への何らかの関与が示唆される。

第3章では，分泌タンパク質の網羅的解析について述べている。第2章と同様に，SILAC法を応用した解析を用い，正常細胞と変異細胞との混合培養条件下で分泌が変動するタンパク質を解析した。その結果，混合培養下で最も増加する分泌タンパク質としてADAMDEC1を見出した。ADAMDEC1はADAMファミリーに属するメタロプロテアーゼであるが，あまり研究されていない機能未知のタンパク質である。shRNAによるノックダウン細胞を使った実験より，変異細胞との混合培養条件下で正常細胞側から遺伝子レベルで発現が上昇していることが明らかになった。さらにADAMDEC1は，filaminの集積にも影響を与える上流分子であることも明らかになった。

第4章では，混合培養条件下で実施可能な，新しいタンパク質の網羅的解析法CTAPの確立について述べている。第2章，第3章の結果より，SILAC法を応用することで，混合培養という特殊な条件下でも関連分子を見出すことが可能であった。しかし，混合培養下において変化を呈する細胞を見分けることが出来ないという大きな弱点が存在する。CTAP (cell type‑specific labeling using amino acid precursors)法は近年報告された，混合培養下で実施可能な新しいタンパク質解析法であり，アミノ酸前駆物質と，その変換酵素との組み合わせにより，混合培養中で特定の細胞に対し，選択的に安定同位体ラベルを導入できる画期的な手法である。第4章では，CTAP法確立に向けた様々な基礎検討実験について述べており，現時点での混合培養下での細胞選択的ラベル効率について評価した。この手法が正常細胞と変異細胞との相互作用に関与する分子探索に実用化されると，作用機序の研究が飛躍的に進むものと考えている。

第5章では，本論文の総括を述べている。

本研究を通じて，変異細胞が正常細胞に取り囲まれた場合にみられる現象について，２つの関与分子候補を見出すことができた。これらは，この現象に関与することをあらかじめ予想することが困難な，機能未知のタンパク質である。本研究を通じて見出した知見により，作用機序解明の研究に新たな突破口が開いていくものと考えられる。

がん細胞は，正常な細胞の中のいくつかの遺伝子に変異が生じて発生すると言われている。その変異遺伝子の数が徐々に増大していき，その過程で細胞機能に関わる非常に重要な遺伝子に変異が生じることにより，前がん段階の細胞から悪性度の高い細胞へと進行していく。このような一連の変異遺伝子の蓄積過程は「多段階発がん」モデルとして広く知られている[1] 。

上皮組織においても同様に，癌はある一つの細胞に遺伝子変異が起こることで発生するが，この癌発生初期において変異が生じた形質転換細胞（Transformed cell)と，それを取り囲む周辺の正常細胞との間に新たな相互作用が生じる。すなわち，自らの生存空間の確保や生存競争が生じ，どちらかがもう一方を細胞死へと誘導したり，あるいは存在領域からの排除を行ったりする現象がみられる。この現象は，それぞれが単独で生存している場合には起こらない細胞非自律的な現象であり，細胞競合と呼ばれている。この細胞競合によって敗者となった細胞は組織より排除され，勝者はその生存空間を確保することになる[2, 3]。例を挙げると，正常上皮細胞の中に RasV12 変異をもつ形質転換細胞が生じると，変異細胞は頭頂側に押し出され，上皮層から離脱していく[4, 5]。このような，特に正常細胞が勝者となり変異細胞を排除する機構は，免疫細胞を介さずに正常上皮細胞自身がもつ防御機構として考えられることから，EDAC (Epithelial Defense Against Cancer)と名付けられた[6]。これはがんの超初期に起こっている現象と想定されるため，EDAC の研究を通して癌の早期診断や予防，治療へとつながることが期待される。

変異細胞が正常細胞に取り囲まれた際に生じる細胞競合現象において，いくつかの分子の関与がこれまでの研究により明らかになっている。例えば filamin や vimentin は，変異細胞を取り囲む

1 Fearon, Eric R., and Bert Vogelstein. "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell 61.5 (1990): 759-767.

2 Maruyama, Takeshi, and Yasuyuki Fujita. "Cell competition in mammals—novel homeostatic machinery for embryonic development and cancer prevention." Current opinion in cell biology 48 (2017): 106-112.

3 Vincent, Jean-Paul, Alexander G. Fletcher, and L. ALberto Baena-Lopez. "Mechanisms and mechanics of cell competition in epithelia." Nature reviews Molecular cell biology 14.9 (2013): 581.

4 Hogan, Catherine, et al. "Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells." Nature cell biology 11.4 (2009): 460.

5 Kon, Shunsuke, et al. "Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes." Nature cell biology 19.5 (2017): 530.

6 Kajita, Mihoko, et al. "Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells." Nature communications 5 (2014): 4428.

正常細胞において，変異細胞との境界面に集積し，これら骨格系タンパク質の収縮により変異細胞を apical 側へと押し出すことが知られている。一方で変異細胞側における分子変化には，EPLIN の境界面への集積，代謝変化，エンドサイトーシスの亢進などが知られている。これらは全て単一細胞での培養ではみられず，細胞非自律的に制御された分子作用機序が働いているものである。残念ながら，これらの情報だけでは EDAC メカニズムの全容を説明するには不十分であり，さらに詳細で多面的なアプローチによる分子解析が求められている。

一般的に，細胞間相互作用の解析においては隣接する細胞の変化を捉える分子メカニズムの解明が重要である。この検知機構は，細胞接着面で生じる直接的なものから，細胞外分泌因子や gap 結合などを介した伝達因子の連絡によるものが考えられる。次に，変異細胞の検知から細胞死や排除などといったフェノタイプ発現へと繋がるシグナル伝達機構を明らかにすることも重要である。このため，タンパク質リン酸化を中心とした翻訳語修飾の解析は必須となる。リン酸化などの細胞内シグナル伝達機構とは別に，分泌タンパク質による細胞間シグナル伝達の関与も重要である。細胞内シグナル伝達によりタンパク質の分泌が誘導され，パラクライン的あるいはオートクライン的に現象が拡散・増強される事例は枚挙に遑がない。以上より，細胞競合現象において分泌タンパク質の解析は，変異細胞の検知以外にも変異細胞の排除エフェクター因子という側面も考えられるため，最も重要な解析対象である。以上の理由から，本研究では主に分泌タンパク質とリン酸化タンパク質の網羅的解析を行い，EDAC に関与する分子候補を探索することとした。すなわち，正常細胞と変異細胞が共存したとき，どの様な分泌タンパク質が変動し，あるいはタンパク質リン酸化がどのように変動するのかを，定量的質量分析法を用いて探索する。本研究で用いる解析手法は，SILAC(Stable isotope labeling by amino acid in cell culture)法[7]による分子スクリーニングを用いる。この解析にて，正常細胞と変異細胞の相互作用によって特異的に量的あるいは質的に変動する蛋白質群を網羅的に同定する。同定された分子の中から，細胞競合に関与が示唆される候補を選び出し，機能解析へと進める。

さて，本研究中で用いる分子スクリーニング法は SILAC 法であるが，SILAC 解析を混合培養と

---

[7] Ong, Shao-En, et al. "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." Molecular & cellular proteomics 1.5 (2002): 376-386.

いう特殊な条件化での解析に用いた場合，得られる情報には限りがある。すなわち，SILAC 法は２つの培養間でのタンパク質を比較する手法であるため，混合培養全体での平均された分子変動を捉えることは可能であるが，混合培養中の複数の細胞種の中から分子変動を呈する細胞群を見分けることはできない。一般的に，混合状態の細胞を解析する場合には，これまでは主にフローサイトメーターを用いたセルソーティングで細胞を分離分取し，解析に用いてきた。しかしこの手法では，組織化された細胞同士の接着を分離しなければならず，また流路の高速移動によるソーティング操作も含まれるため，細胞に与える機械的ストレス刺激は決して少なくはない。さらにプロテオミクス解析の場合は多くの細胞数が必要となるため，ソーティングにより解析に必要なサンプルを確保することは現実的には極めて難しい。このような理由により，セルソーティングによる分子変動解析は，主として遺伝子解析の分野で利用されている。近年，多種の細胞が引き起こす複雑な生命現象の解析の必要性が高まり，それに伴い新しい細胞特異的なプロテオミクス解析法が報告されている[8, 9]。例えば BONCAT (bioorthogonal labeling of amino acids in cell culture) を改変した Cell-specific BONCAT[10]や，SORT (Stochastic orthogonal recoding of translation) [11]では，変異 tRNA 合成酵素等を特定の細胞に発現させることで非天然アミノ酸を細胞選択的にタンパク質に導入し，混合培養下での細胞種間におけるタンパク質合成の違いを解析可能にした。また，penicillin G acylase 発現細胞で puromycin 類似物質が新規合成タンパク質に結合することを利用した OP-Puro (O-propargyl-puromycin labeling)[12]も，混合培養下での細胞種間タンパク質合成の違いを解析可能にする手法である。しかしこれらの手法は，タンパク質に非天然のアミノ酸が導入されることによる弊害が懸念されるため，細胞内の全タンパク質の置換や，タンパク質置換状態での長期培養には用いられていない。よってこれらの分析法は，短期間において一時的に新規に合成

[8] Ramberger, E., & Dittmar, G. (2017). Tissue specific labeling in proteomics. Proteomes, 5(3), 17.

[9] Stone, S. E., Glenn, W. S., Hamblin, G. D., & Tirrell, D. A. (2017). Cell-selective proteomics for biological discovery. Current opinion in chemical biology, 36, 50-57.

[10] Ngo, J. T., Champion, J. A., Mahdavi, A., Tanrikulu, I. C., Beatty, K. E., Connor, R. E., ... & Tirrell, D. A. (2009). Cell-selective metabolic labeling of proteins. nature CHeMICaL BIOLOGY, 5(10), 715.

[11] Elliott, T. S., Townsley, F. M., Bianco, A., Ernst, R. J., Sachdeva, A., Elsässer, S. J., ... & Lilley, K. S. (2014). Proteome labeling and protein identification in specific tissues and at specific developmental stages in an animal. Nature biotechnology, 32(5), 465.

[12] Barrett, R. M., Liu, H. W., Jin, H., Goodman, R. H., & Cohen, M. S. (2016). Cell-specific profiling of nascent proteomes using orthogonal enzyme-mediated puromycin incorporation. ACS chemical biology, 11(6), 1532-1536.

されるタンパク質を解析することに限られており，タンパク質の細胞局在変動解析や相互作用解析，翻訳語修飾の解析などに用いることには適していない。一方で，これらの手法とは異なるアプローチで，混合培養条件下で網羅的タンパク質解析を細胞選択的に実施可能な方法も報告されている。CTAP 法[13] (cell type specific labeling with amino acid precursors)は，リジン前駆物質とそのリジン変換酵素のセットを利用して，混合培養下で特定の細胞のみを安定同位体リジンに置換するというものである。この手法で合成されたタンパク質は，天然型アミノ酸とほぼ同じ構造と性質をもつ，安定同位体置換型リジンでラベルされたタンパク質になり，SILAC 解析と全く同じ分析手法で実験が可能である。CTAP 法は，SILAC 法と同様にタンパク質置換状態での長期培養も可能であり，翻訳語修飾の解析などにも適応可能である。この CTAP 法を使って癌細胞と間質細胞間との相互作用に関与する分泌タンパク質やリン酸化タンパク質の網羅的解析も報告されており[14]，その中では分泌タンパク質やリン酸化タンパク質の変動解析が行われていることから，細胞競合現象のプロテオミクス解析においても有用なツールとなる可能性がある。よって本研究では，CTAP 法を細胞競合に応用することを目指し，分析システムの確立のための各種基礎検討を行った。

細胞競合現象のような，性質の異なる細胞混合培養のためのプロテオミクス解析は技術的な課題が多くあるが，これを克服することは複雑な生命現象の解明へと繋がる。本研究では既存の解析法を効果的に用い，混合培養条件にて特異的に変動する分泌タンパク質とリン酸化タンパク質を見出した。また，さらに高度な解析を行うため，新規解析法の確立を試みた。本研究を通じて行ったこれらの試みは，より詳細な EDAC 機構の理解のみならず，混合培養におけるタンパク質探索法の課題点や可能性を示すものとなるだろう。

---

[13] Gauthier, Nicholas P., et al. "Cell-selective labeling using amino acid precursors for proteomic studies of multicellular environments." nAture methods 10.8 (2013): 768.

[14] Tape, C. J., Ling, S., Dimitriadi, M., McMahon, K. M., Worboys, J. D., Leong, H. S., ... & Jørgensen, C. (2016). Oncogenic KRAS regulates tumor cell signaling via stromal reciprocation. Cell, 165(4), 910-920.

3　第２章　リン酸化タンパク質の網羅的解析によるシグナル分子の探索

タンパク質は，リン酸化あるいは脱リン酸化により局所的な極性が変化し，それにより立体構造や相互作用分子に変動が生じる。このことを利用した細胞内情報伝達機構は，細胞増殖や細胞死，代謝調節，分化，運動性といった様々な生命現象の制御に関わっている。ゆえに，タンパク質の可逆的リン酸化は，様々な細胞機能の調節に関わる翻訳語修飾として非常に重要であり，細胞内シグナル伝達研究では必須の解析対象である。

タンパク質のリン酸化を網羅的に解析する手法は，抗リン酸化抗体と電気泳動を用いた方法が行われてきた。例えば，抗リン酸化抗体で免疫沈降したタンパク質を電気泳動で分離し，ゲル上で変動を捉えた後にタンパク質をゲルより取り出し，タンパク質を同定するという手法である。この手法では，特に抗チロシンリン酸化抗体を用いて多くのシグナル分子の研究が行われ，様々な細胞内伝達機構が明らかになった。しかしこの手法は，優れた抗リン酸化抗体が必要であり，しばしば特異性の問題が生じる。また電気泳動による解析では分離能や感度が悪く，網羅性と検出力の向上が課題であった。また，免疫沈降によるリン酸化タンパク質のプロファイリングでは，多重リン酸化タンパク質中のリン酸化部位の変動を捉えることは極めて困難であり，またリン酸化部位の決定も難しい。

近年，質量分析器の発達により，新しいアプローチでのリン酸化解析が広く行われるようになった。この手法は，タンパク質を酵素消化によりペプチド断片化し，リン酸化ペプチドをアフィニティーカラムで精製濃縮した後に，LC-MS にてリン酸化ペプチドの定量と配列決定を行う手法である。この方法では，リン酸化ペプチドを直接解析するため，ペプチド配列とリン酸化修飾部位を同時に同定できるという利点がある。また，多次元 HPLC を用いることにより多くのリン酸化ペプチドを高度に分離し，複雑なリン酸化ペプチド群を網羅的に解析することが可能である。このような手法を用いて，近年では数ミリグラムのタンパク質溶液を材料に，一万種類を超えるリン酸化ペプチドの網羅的解析が報告されるようになった。

リン酸化ペプチドを濃縮するアフィニティ精製法は様々なものが存在する。その多くは，鉄やガリウム，チタンといった金属イオンを固定化したアフィニティ担体を用いて，負電荷のリン

酸基をもったペプチドを捕捉するものである。この手法は簡便で多くのリン酸化ペプチドを回収することが可能であるが，非特異的吸着による非リン酸化ペプチドの混入が大きな問題である。よってこの手法は精製手法の最適化が必要であるが，担体の種類の多さに加え，プロトコールの多様化が重なり，手法の標準化が進んでいないのが現状である。また，天然に存在するリン酸化修飾はセリン部位のリン酸化が圧倒的に多く，シグナル伝達研究において最もよく研究されてきたチロシン部位のリン酸化は極めて少ない。このことから，金属カラムを用いたリン酸化ペプチドの濃縮では，同定されるリン酸化ペプチドの多くがセリンリン酸化ペプチドであり，チロシン部位がリン酸化されたペプチドの検出数は極めて少ない。そこで，質量分析に供するサンプルの前処理として，抗チロシンリン酸化抗体を用いたペプチド濃縮を用い，シグナル伝達に直結する分子を同定することも行われている。このアプローチの課題は，抗チロシンリン酸化抗体の種類により同定されるリン酸化ペプチドに違いが生じることと，効率的に同定するためには極めて多量の抗体が必要になることである。

リン酸化プロテオミクスの課題点は，精製ステップ以外にも質量分析による分析手法においても多く残っている。最も懸念されることは，リン酸化部位の位置を決定することである。リン酸化修飾部位を決めるためには，クオリティの高い MS/MS フラグメントイオンの観察が不可欠であるが，リン酸化修飾によりイオン化効率が低下することもあり，必ずしもクオリティの高いデータは取得できない。フラグメントイオンが満足に得られなくても，プレカーサーイオンとフラグメントイオンの精密質量情報の組み合わせをもってリン酸化修飾ペプチド同定は可能である。しかし，同定配列内に複数のセリン，スレオニン，チロシンが存在すると，部位を特定できない。このことは，データ解析の作業を非常に困難させる最も大きな要因の一つとなっている。また，分析装置面では，フラグメントイオンを得るための分子開裂機構も複数存在し，得られるデータも違ってくる。このように，MS 装置側のメソッドも多様であるため，トータルとしてリン酸化解析のバリエーションは非常に多くなっている。

以上のことから考えても，質量分析器を用いたショットガン分析によるリン酸化ペプチドの分析が始まってから十数年が経過したが，依然として課題が多く残る分析分野である。この分野は

現在でもチャレンジングな領域であると言われており[15]，現在でもなお新しい手法が発表され続けている。例えば，がん遺伝子である Src の SH2 ドメインを人為的に変異誘導し，リン酸化チロシンに強く結合する分子が開発された[16]。この組換えタンパク質を利用したチロシンリン酸化ペプチドの濃縮を用いたリン酸化ペプチドの網羅的解析が報告され，高い回収能を示している[17]。こういった技術開発や手法の改良が今後も継続的におこなわれるものと考えられる。

今回の分子解析に私が選んだ手法は，タンパク質ライゼートを消化後に塩基性条件下での逆相クロマトグラフィーによるペプチド分画を行い，続いて各フラクションをチタニアカラムでアフィニティ精製し，リン酸化ペプチドを濃縮するという方法である。高 pH での逆相クロマトグラフィーによるペプチド分画は回収率が高く，高い分離能を有するために分画効率が高いことから，イオン交換 HPLC による分画法に比べて近年多く使用されている方法である。また，チタニアカラムによるリン酸化精製法は非リン酸化ペプチドの混入が比較的少ないとされている方法の一つである。全体を通して，作業ステップの多さに加え分画数も多いことから，非常に手間のかかる分析法となっているが，何より多くのリン酸化ペプチドが同定されると見込まれる。また，この解析に供するサンプルは，正常細胞と変異細胞の単独培養と混合培養を SILAC 法を用いてラベル化することにより，混合培養においてのみ特異的に変動するリン酸化修飾タンパク質候補を比較定量により選別した。

---

[15] Solari, Fiorella A., et al. "Why phosphoproteomics is still a challenge." Molecular BioSystems 11.6 (2015): 1487-1493.

[16] Kaneko, Tomonori, et al. "Superbinder SH2 domains act as antagonists of cell signaling." Sci. Signal. 5.243 (2012): ra68-ra68.

[17] Bian, Yangyang, et al. "Ultra-deep tyrosine phosphoproteomics enabled by a phosphotyrosine superbinder." Nature chemical biology 12.11 (2016): 959.

3.1　試験方法及び試験材料

3.1.1　分析の概略

初めに，SILAC ラベルした細胞を 4 種類用意する。正常 MDCK 細胞を Heavy と Medium，変異細胞を Heavy と Medium にそれぞれぞれラベルし，Heavy ラベルの細胞を混合して培養する。Medium ラベルの細胞は，それぞれ単独で培養する。細胞を播種後にディッシュ上で単層形成を行い，テトラサイクリンで形質転換を誘導し，変異細胞を出現させる。6 時間あるいは 10 時間の培養を経て細胞を回収しタンパク質を抽出する。抽出したタンパク質をトリプシン消化した後，ペプチドを分画する。分画したペプチドフラクションごとにリン酸化ペプチドを精製し，LC-MS/MS にて分析する。分析後にペプチド配列を同定及び定量し，混合培養条件下で変動するリン酸化ペプチドを選別する（図 3.1-1)。図中には正常細胞と Ras 変異細胞との混合培養条件について示したが，Src 変異細胞を用いた混合培養についても，Ras 変異細胞と同様に実施する。

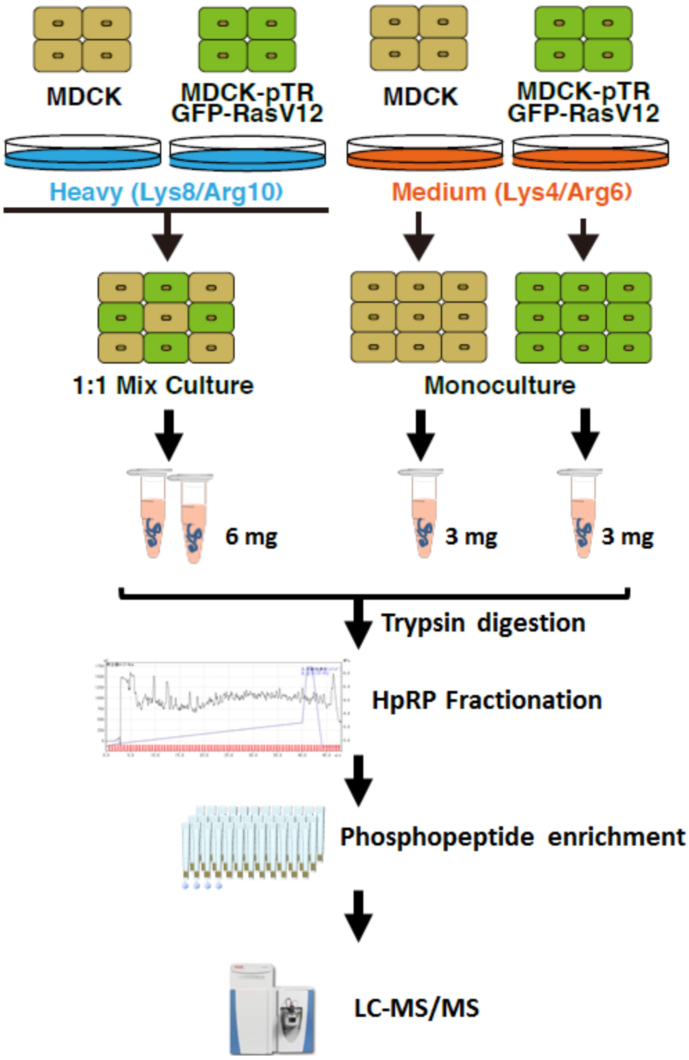


図 3.1-1　　　　　リン酸化ペプチド解析の概略

リン酸化ペプチド解析の概略を示した. SILAC ラベルした細胞よりタンパク質を抽出し, トリプシン消化した後にペプチド分画を行い, その後リン酸化ペプチド精製を行う. 精製したリン酸化ペプチドを LC-MS/MS にて分析する.

3.1.2　細胞

本試験で用いる細胞は以下の通りである

1) MDCK

2)MDCK-pTR-GFP-RasV12

3) MDCK-pTR-GFP-cSrcY527F

3.1.3　MDCK 細胞の安定同位体ラベル化

SILAC 培地は，DMEM minus L-Lysine and L-Arginine (Cambridge Isotope Laboratories) に 10% dialyzed FCS 及び 1% penicillin/streptomycin (Gibco)を加えたものを使用した。この培地に，SILAC heavy 用には 50 µg ml-1 となるように U-^{13}C6-^{15}N2 -L-lysine (Lys8) 及び U-^{13}C6-^{15}N4-L-arginine (Arg10)を加えた。SILAC medium 用には 50 µg ml-1 となるように U-^{2}H4-L-lysine (Lys4) 及び U-^{13}C6-L-arginine (Arg6)を加えた。さらに，アルギニン - プロリン変換を防ぐ目的で，Medium 用及び Heavy 用の培地に，L-proline (Sigma-Aldrich)を 200 µg ml-1 になるように加えた。

MDCK 細胞及びテトラサイクリン誘導性 RasV12 発現 MDCK 細胞, テトラサイクリン誘導性 v-src 発現 MDCK 細胞を，前述の SILAC 培地にて 5 継代培養し，細胞内タンパク質のリジン及びアルギニンを全て安定同位体ラベル化した。

次に，直径 10 ㎝の培養プレートに安定同位体ラベル化細胞を播種し，12 時間培養して単層形成させた。播種する細胞は，Medium ラベルした MDCK 細胞と RasV12 変異細胞 (あるいは Src 変異細胞）をそれぞれ 1 プレート培養し，Heavy ラベルした MDCK 細胞と RasV12 変異細胞を 1:1 で混合したものを 2 プレート培養した。次に，テトラサイクリンを加えて 6 時間（あるいは 10 時間）培養し，変異タンパク質を発現誘導した。培養後に培地を除き，PBS で軽く洗浄した後に-80℃にて保存した。

3.1.4　タンパク質抽出及びペプチド分画

凍結状態の培養プレートに 10% TCA 溶液を加え，セルスクレーパーで細胞を回収した。遠心

操作によりタンパク質を回収し，冷アセトンにてタンパク質ペレットを洗浄後に可溶化バッファー（50mM Tris-HCl pH8.5, 10% Sodium Deoxycholate）にて溶解した。プロテインアッセイ（Pierce BCA assay kit）にてタンパク質濃度を測定後に，3mg 相当量の MDCK 細胞の単独培養（Medium ラベル），3mg 相当量の MDCK-RasV12 細胞の単独培養（Medium ラベル），6mg 相当量の MDCK 細胞と RasV12 細胞の混合培養（Heavy ラベル）を混合し，あわせて 12mg のタンパク質を用意した。混合したタンパク質溶液を 5mM DTT 溶液で還元し，50mM iodoacetamide 溶液にてアルキル化したあと，トリプシン溶液にてペプチド化し， High pH Reversed phase chromatography (HpRP)[18] にてペプチドを分画した。条件は，表 3.1-1 の通りである

Time (min)	Flow (mL/min)	%B
0	1	5
2	1	8
40	1	32
41	300	95
42	300	95
44	300	5

Column: Xbridge C18 (4.6 × 250mm, 5µm, Waters)

Fractionation: 30-second/fraction

Mobile phase A: 20mM Ammonium formate pH 10

Mobile phase B: 20mM Ammonium formate pH 10 in 80% acetonitrile

表 3.1-1 ペプチド分画における HPLC の各種設定条件

3.1.5 リン酸化ペプチドの精製

分画したフラクションを分配混合した後，それぞれの画分についてリン酸化精製を行った。リン酸化精製は，Titansphere Phos-TiO Kit (GL サイエンス)を用いた。手順はキット添付のプロトコールに従ったが，リン酸化精製前に Phos-TiO チップカラムを 100℃で 3 日間インキュベートし，乾燥処理を行った後に使用した。リン酸化ペプチドを精製後，StageTip C18 にて脱塩精製し，遠心

[18] Gilar, Martin, et al. "Two‐dimensional separation of peptides using RP‐RP‐HPLC system with different pH in first and second separation dimensions." Journal of separation science 28.14 (2005): 1694-1703.

エバポレーターにて乾燥後に 0.1% TFA 溶液にサンプルを溶解し，全量を LC-MS にて分析した。LC-MS を表 3.1-2 に示した。

MS condition (Q Exactive, Thermo Fisher)

Property	parameter
Ion Source Property	Nano Spray Ionization
	Spray Voltage : 1800 (V), positive
	Ion Transfer Tube Temp : 250°C
MS Scan Property	Orbitrap, resolution = 70,000
	Scan Range : 400 - 1500
	RF Lens (%) : 60
MS2 Scan Property	Activation=HCD, HCD Collision Energy=35 (%)
	Detector type : Orbitrap
Data dependent decision property	Data dependent mode : Top 10
	Charge State : 2 - 7
	Dynamic Exclusion : Exclude after 1 time, 60 sec duration
	Intensity Threshold : 5.0×10^3

HPLC condition

Time (min)	Flow (nL/min)	%B
0	300	4
3	300	4
111	300	35
112	300	90
114	300	90
115	300	4
120	300	4

Separation column: Packed tip column (75-µm i.d., 12-cm long, 3-µm C18, Nikkyo Technos)
Trap column: C18 Acclaim PepMap precolumn (Thermo Fisher Scientific)
mobile phase A: 0.1% formic acid
mobile phase B: 0.1% formic acid-acetonitrile

表 3.1-2　　SILAC 分析における LC-MS/MS の各種条件設定

3.1.6　データ解析

LC-MS にて得られたデータは，Proteome Discoverer 2.2 にて解析した。ペプチド配列の同定は Mascot にて行い，検索に用いたデータベースは Uniprot proteome database (UP000002254)を用いた。

3.2　SILAC 法によるリン酸化ペプチド解析の結果

3.2.1　リン酸化ペプチド解析結果の概観

初めに，今回得られたリン酸化解析の概観を評価する。この評価に用いるデータは，False discovery rate (FDR)による Confidence level (FDR < 1%)，Mascot ion score が 30 以上のものについて行った。

解析の結果，RasV12 発現誘導後 6 時間のサンプルからは 14,289 種類のペプチドが同定され，そのうちの 5,032 種類はリン酸化タンパク質であった。同様に，RasV12 発現誘導後 10 時間のサンプルは 20,687 種類のペプチドが同定され，その中に 7,419 種類のリン酸化ペプチドが含まれていた。Src 変異発現誘導後 6 時間のサンプルでは 7,195 種類中 4,767 がリン酸化ペプチド，Src 変異発現誘導後 10 時間のサンプルからは 9,369 種類中 6,090 がリン酸化ペプチドであった（図 3.2-1）。

次に，同定されたリン酸化ペプチド中のリン酸化アミノ酸の種類について調べたところ，約 9 割がリン酸化セリン，約 1 割がリン酸化スレオニンであり，チロシンがリン酸化されたペプチドの割合は 1%程度であった（図 3.2-2）。細胞内でのリン酸化タンパク質においては，そのほとんどがセリンのリン酸化であると言われており[19, 20]，今回の結果はその存在割合を反映したものであると考えられる。

---

[19] Hunter, Tony, and Bartholomew M. Sefton. "Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine." Proceedings of the National Academy of Sciences 77.3 (1980): 1311-1315.

[20] Hornbeck, Peter V., et al. "PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations." *Nucleic acids research* 43.D1 (2014): D512-D520.

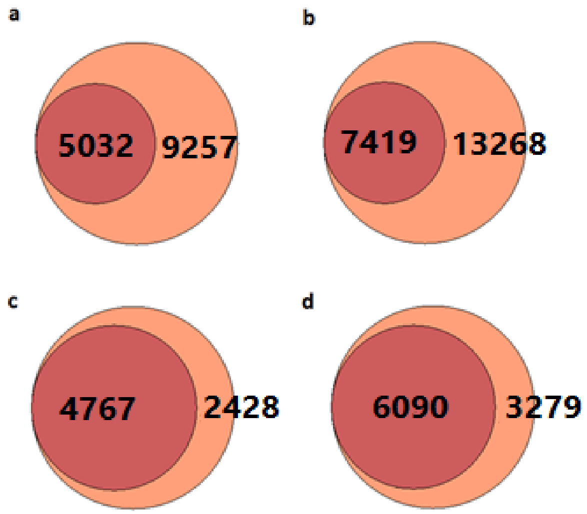
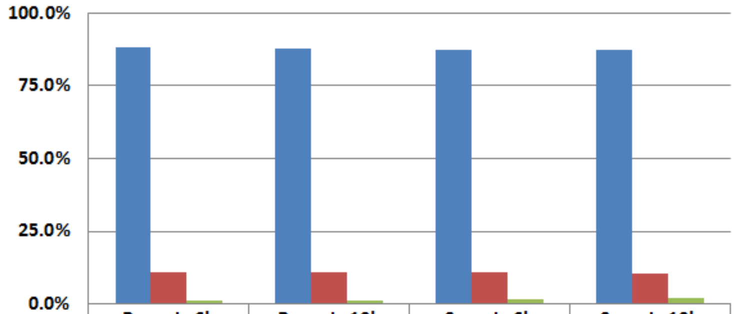


図 3.2-1　　　　　ペプチド同定数とリン酸化ペプチドの割合

4 つの SILAC 分析にて得られたペプチドと，その中に含まれるリン酸化ペプチドの種類を示した． **a**. 正常細胞と Ras 変異細胞との混合培養 6 時間のサンプルについて，リン酸化ペプチドの割合は 35.2%であった． **b**. 正常細胞と Ras 変異細胞との混合培養 10 時間のサンプルについて，リン酸化ペプチドの割合は 35.9%であった． **c**. 正常細胞と Src 変異細胞との混合培養 6 時間のサンプルについて，リン酸化ペプチドの割合は 66.3%であった． **d**. 正常細胞と Src 変異細胞との混合培養 10 時間のサンプルについて，リン酸化ペプチドの割合は 65.0%であった．



	Ras-mix 6h	Ras-mix 10h	Src-mix 6h	Src-mix 10h
Phosphoserine	88.3%	87.8%	87.4%	87.5%
Phosphothreonine	10.7%	11.1%	10.8%	10.3%
phosphotyrosine	1.0%	1.1%	1.8%	2.2%

図 3.2-2　　　　　リン酸化アミノ酸の分布状況

本分析にて得られたリン酸化ペプチドについて，リン酸化サイトのアミノ酸の割合を示した．いずれのサンプルにおいても，セリンのリン酸化ペプチドが多く，チロシンがリン酸化されているペプチドの割合は 1%程度であった．

次に，同定されたペプチドの定量状態とリン酸化ペプチドのレシオ値の分布を調べた。まず，同定されたペプチドの中から信頼度の高いもの（Mascot Score > 30）を抽出し，SILAC 定量値の分布状況をヒストグラムにて確認した。その結果，いずれのサンプルにおいても SILAC 定量値がゼロ値に集中する単峰性の分布を示しており，同定されたペプチドの大部分は変異細胞との混合培養において変化を示さないものであった（図 3.2-3）。さらに，リン酸化ペプチドのみの SILAC 比の分布状況もヒストグラムにて表した（図 3.2-4）。その結果，リン酸化ペプチドにおいても定量値がゼロ値付近に集中する単峰性の分布を示しており，同定ペプチド全体の分布結果と明確な差異は認められなかった。

いずれのサンプルにおいても SILAC ペアが検出できていないペプチドピークが一定以上存在するため，レシオ値分布のヒストグラム上の両端が高い値となっている。このことは，混合培養においてリン酸化が起こる，あるいは脱リン酸化が起こるということを反映しているものも存在しているが，大部分は MS1 シグナル値の検出限界以下による定量値欠損や，複雑な混合物の分析であることによる SILAC pair peak の取り違えといったことで起こっていると思われる。このことから，混合培養下における変動ペプチドの抽出解析の際には，さらに厳しい抽出基準を設けることにした。

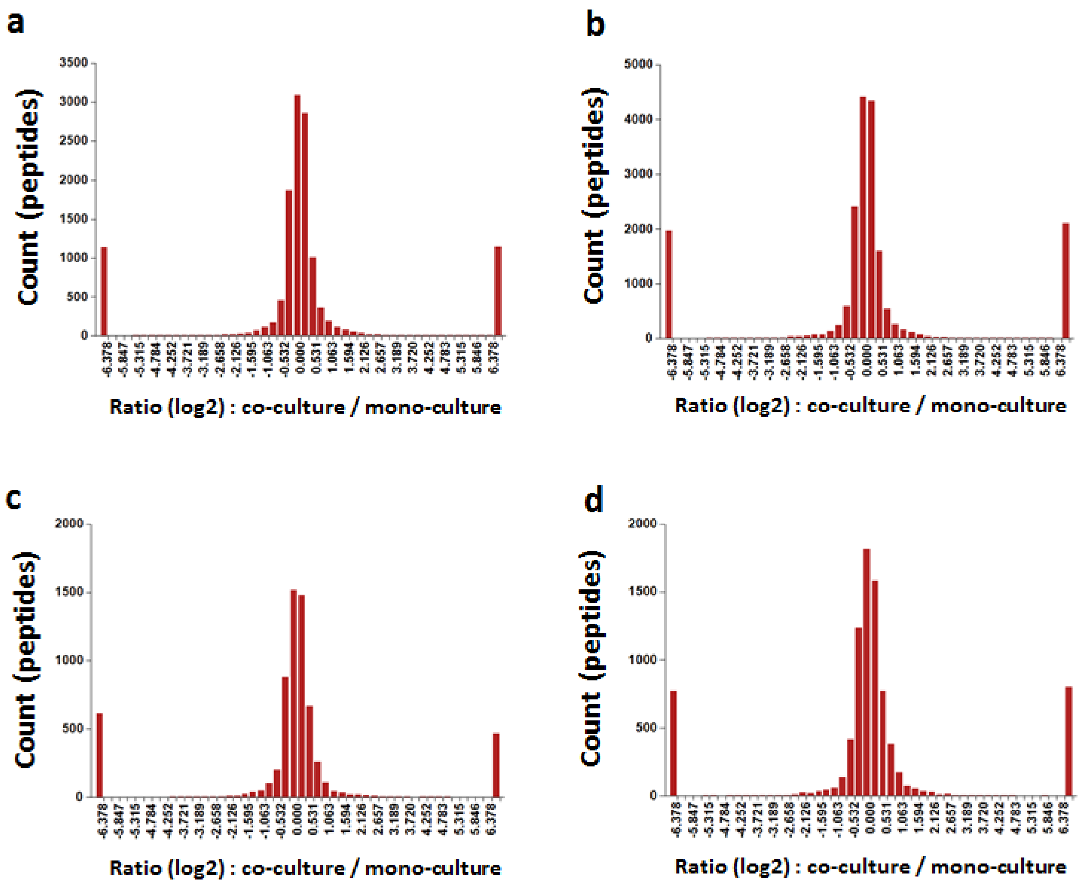


図 3.2-3　　　　　同定ペプチドの SILAC 比の分布

４つの SILAC 分析にて得られたペプチドの SILAC ratio の分布状況を示した．グラフは，SILAC 変動値（log2 ratio)ごとのペプチド本数 Count (Peptides)をヒストグラムにて表した．いずれのサンプルにおいても分布状況に大きな違いは見られなかった．　**a**．正常細胞と Ras 変異細胞との混合培養 6 時間のサンプル　**b**．正常細胞と Ras 変異細胞との混合培養 10 時間のサンプル　**c**．正常細胞と Src 変異細胞との混合培養 6 時間のサンプル　**d**．正常細胞と Src 変異細胞との混合培養 10 時間のサンプル．

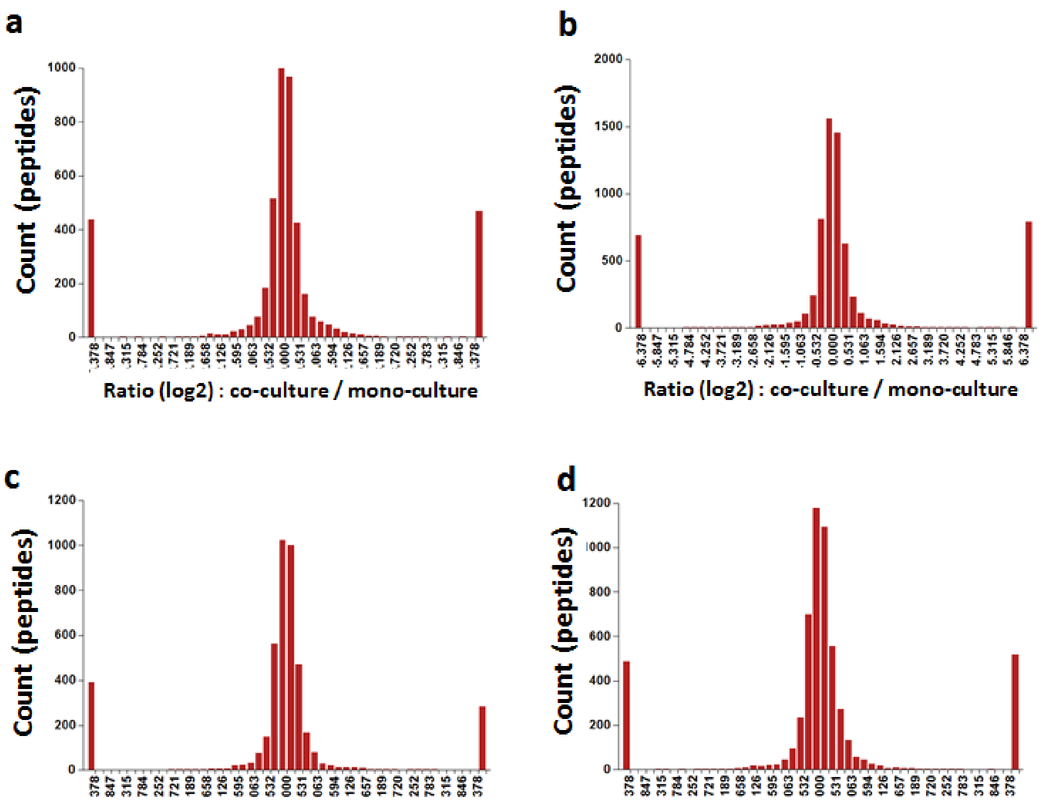


図 3.2-4　　　　　リン酸化ペプチドの SILAC 比の分布

4 つの SILAC 分析にて得られたリン酸化ペプチドの SILAC ratio の分布状況を示した．グラフは，SILAC 変動値（log2 ratio)ごとのペプチド本数 Count (Peptides)をヒストグラムにて表した．いずれのサンプルにおいても分布状況に大きな違いは見られなかった． **a.** 正常細胞と Ras 変異細胞との混合培養 6 時間のサンプル **b.** 正常細胞と Ras 変異細胞との混合培養 10 時間のサンプル **c.** 正常細胞と Src 変異細胞との混合培養 6 時間のサンプル **d.** 正常細胞と Src 変異細胞との混合培養 10 時間のサンプル

3.2.2　正常細胞と変異細胞との共培養にて変動するリン酸化ペプチドの探索

本分析では 4 つのサンプルの SILAC 分析を行ったが，それぞれの条件において変動を示すリン酸化ペプチドは合計すると 2000 種類を超える数になる。この中から，確実にリン酸化が変動し，かつ重要なリン酸化ペプチドを抽出しなければならない。正常細胞と変異細胞との相互作用によって重要な役割を担うものであれば，培養時間 6 時間あるいは 10 時間でも同様な変化を呈していることを前提として考えた。また，正常細胞と Ras 変異細胞との混合培養でみられる現象と，正常細胞と Src 変異細胞との混合培養でみられる現象には一部共通したものがある。すなわち，上皮様培養層から頭頂側への離脱現象である。これらのことから，全サンプルにおいて共通して変動を示すリン酸化ペプチドを抽出し，細胞競合に関連性の高いリン酸化変異を捉えることを狙った。また，膨大な変動リストの中から確実にリン酸化変動を示すものを抽出するため，ペプチド同定の際に得られるスコア（Mascot ion score）及び MS/MS カウント数（Peptide Spectrum Match, PSM)の閾値を高く設定し，データクオリティの高いものを選び出した。

まず，サンプル間で共通して変動するものを探索するため，Ras 変異細胞との混合培養のサンプル（RasV12 6h, RasV12 10h）及び vSrc 変異細胞の混合培養サンプル（Src 6h, Src 10h）のレシオプロット図を作成した（図 3.2-5～8）。データのフィルタリングは，まず初めの試みとして PSM 値が 3 以上，Mascot ion score が 20 以上で行った。このデータ解析の結果，6 時間培養と 10 時間培養の間で共通して 2 倍以上増加するリン酸化ペプチドは，RasV12 変異細胞の場合 452 個，Src 変異細胞の場合は 414 個であった。一方，6 時間培養と 10 時間培養の間で共通して 2 倍以上減少するリン酸化ペプチドは，RasV12 変異細胞の場合 330 個，Src 変異細胞の場合は 391 個であった（図 3.2-5, 図 3.2-6）。

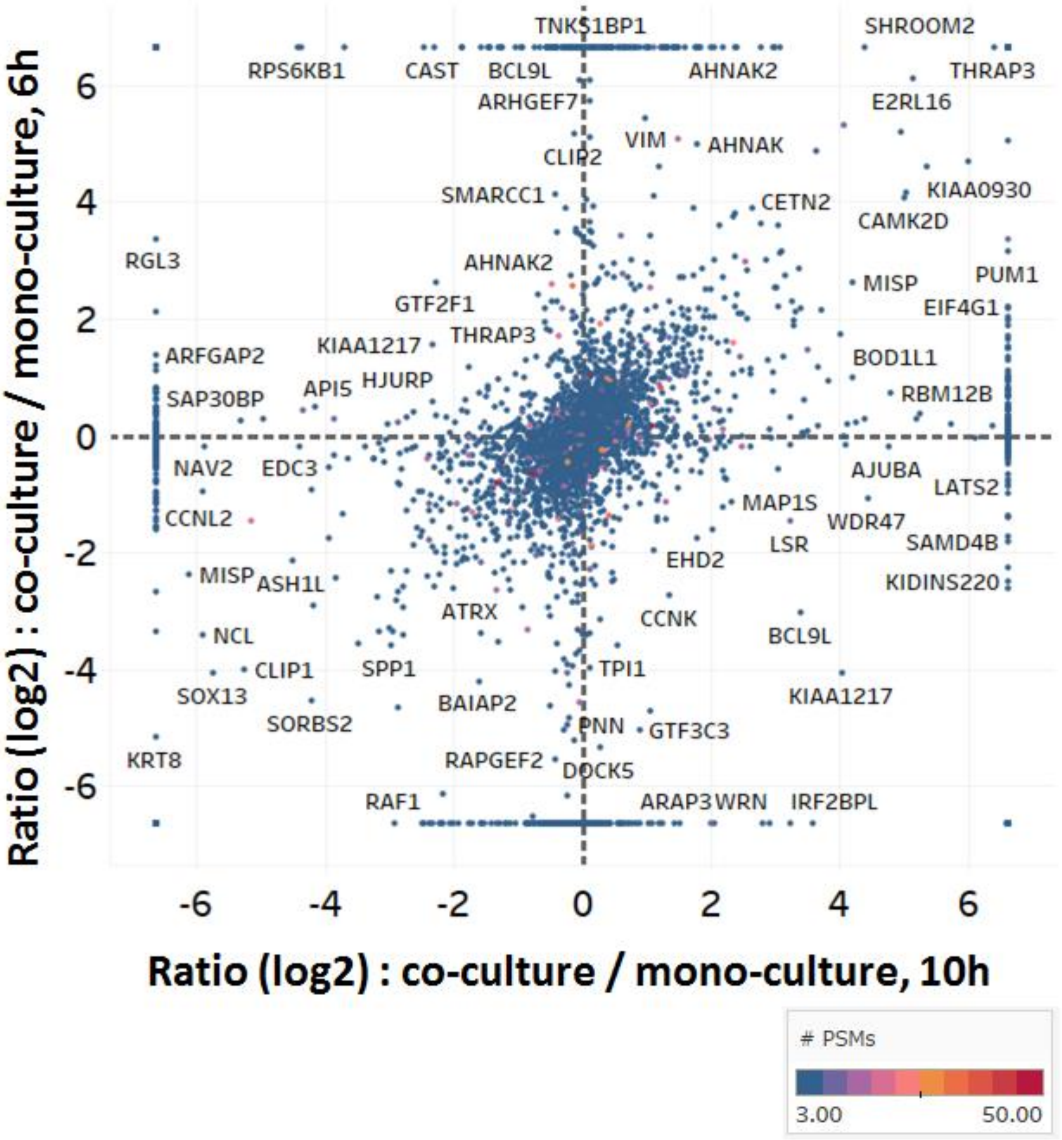


図 3.2-5　　　　Ras 変異細胞との混合培養におけるリン酸化ペプチドの変動

正常細胞と Ras 変異細胞との混合培養において見いだされたリン酸化ペプチドをプロットした．各ドットはリン酸化ペプチドを表し，その由来となったタンパク質の gene symbol を記載した．縦軸は混合培養 6 時間における SILAC レシオ値 (log2 fold change)を表し，横軸は混合培養 10 時間のレシオ値を表した．プロットに用いたリン酸化ペプチドは，PSM > 3 及び Mascot ion score > 20 の条件で抽出した．各ドットは PSM の数によって色分けした．

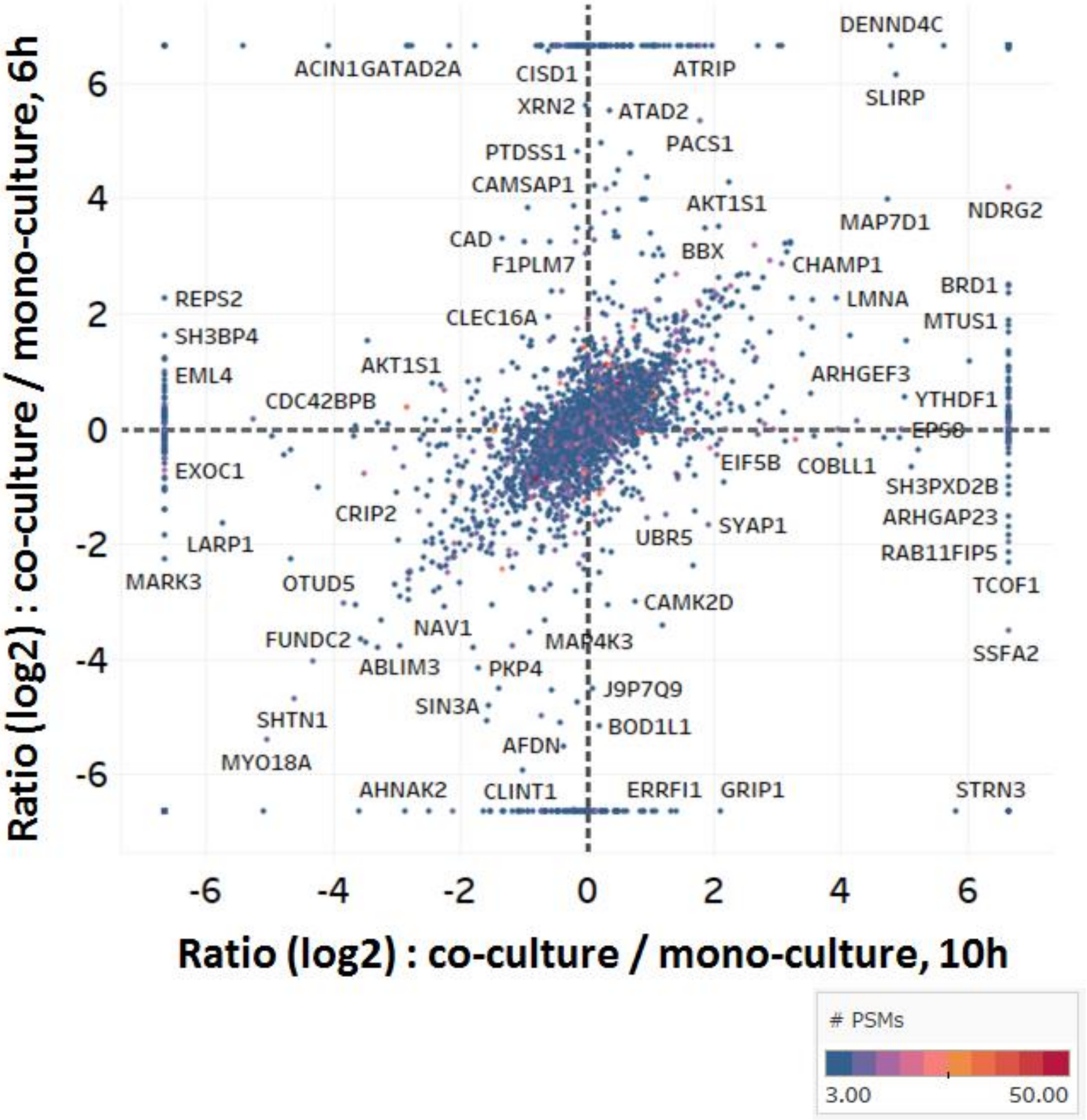


図 3.2-6　　　　　Src 変異細胞との混合培養におけるリン酸化ペプチドの変動

正常細胞と Src 変異細胞との混合培養において見いだされたリン酸化ペプチドをプロットした．縦軸は混合培養 6 時間における SILAC レシオ値 (log2 fold change)を表し，横軸は混合培養 10 時間のレシオ値を表した．プロットに用いたリン酸化ペプチドは，PSM > 3 及び Mascot ion score > 20 の条件で抽出した．

次に，さらに確実な候補ペプチドを選別するため，データのフィルタリングを，PSM 値 15 以上，Mascot ion scor 40 以上で行った（図 3.2-7，図 3.2-8）。6 時間培養と 10 時間培養の間で共通して 2 倍以上増加するリン酸化ペプチドは，RasV12 変異細胞の場合 7 個，Src 変異細胞の場合は 6 個であった。　一方，6 時間培養と 10 時間培養の間で共通して 2 倍以上減少するリン酸化ペプチドは，RasV12 変異細胞の場合 6 個，Src 変異細胞の場合は 3 個であった。これらのペプチドについて，表 3.2-1 に一覧を示した。

この中で，全ての条件において共通して変動を示すものは，FKMPSFGASTPSK であった。このペプチドはリン酸化位置も同定されており，ペプチド配列中 5 番目のセリンがリン酸化されているものであった。このリン酸化ペプチドは，Ras 変異細胞との共培養において，培養後 6 時間で 7.9 倍，10 時間で 5.8 倍に上昇しており，一方 Src 変異細胞との共培養においても培養後 6 時間で 4.1 倍，10 時間で 2.9 倍に上昇していた。

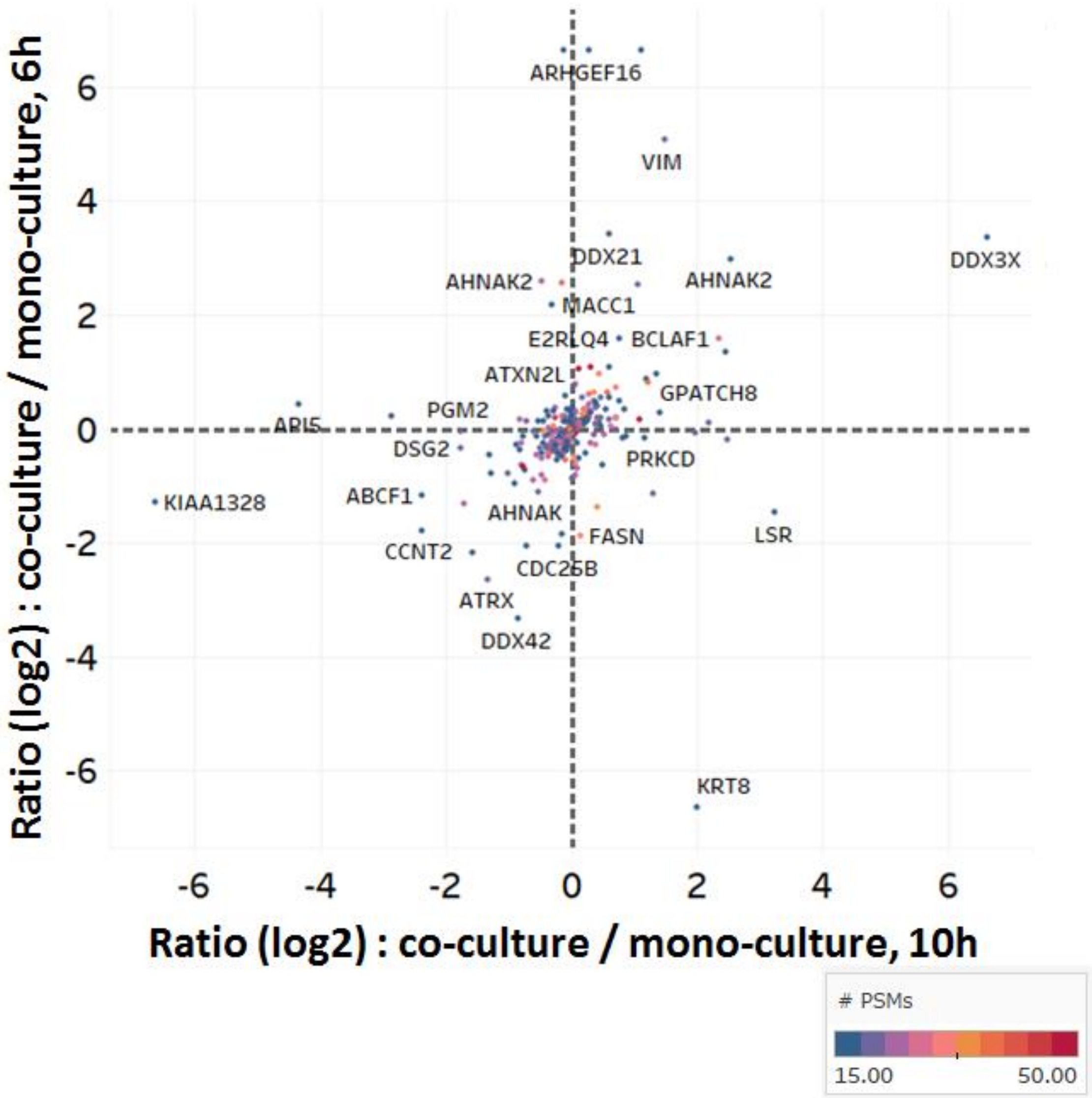


図 3.2-7　　Ras 変異細胞との混合培養におけるリン酸化ペプチドの変動 (2)

正常細胞と Ras 変異細胞との混合培養において見いだされたリン酸化ペプチドをプロットした．縦軸は混合培養 6 時間における SILAC レシオ値 (log2 fold change)を表し，横軸は混合培養 10 時間のレシオ値を表した．プロットに用いたリン酸化ペプチドは，PSM > 15 及び Mascot ion score > 40 の条件で抽出した．

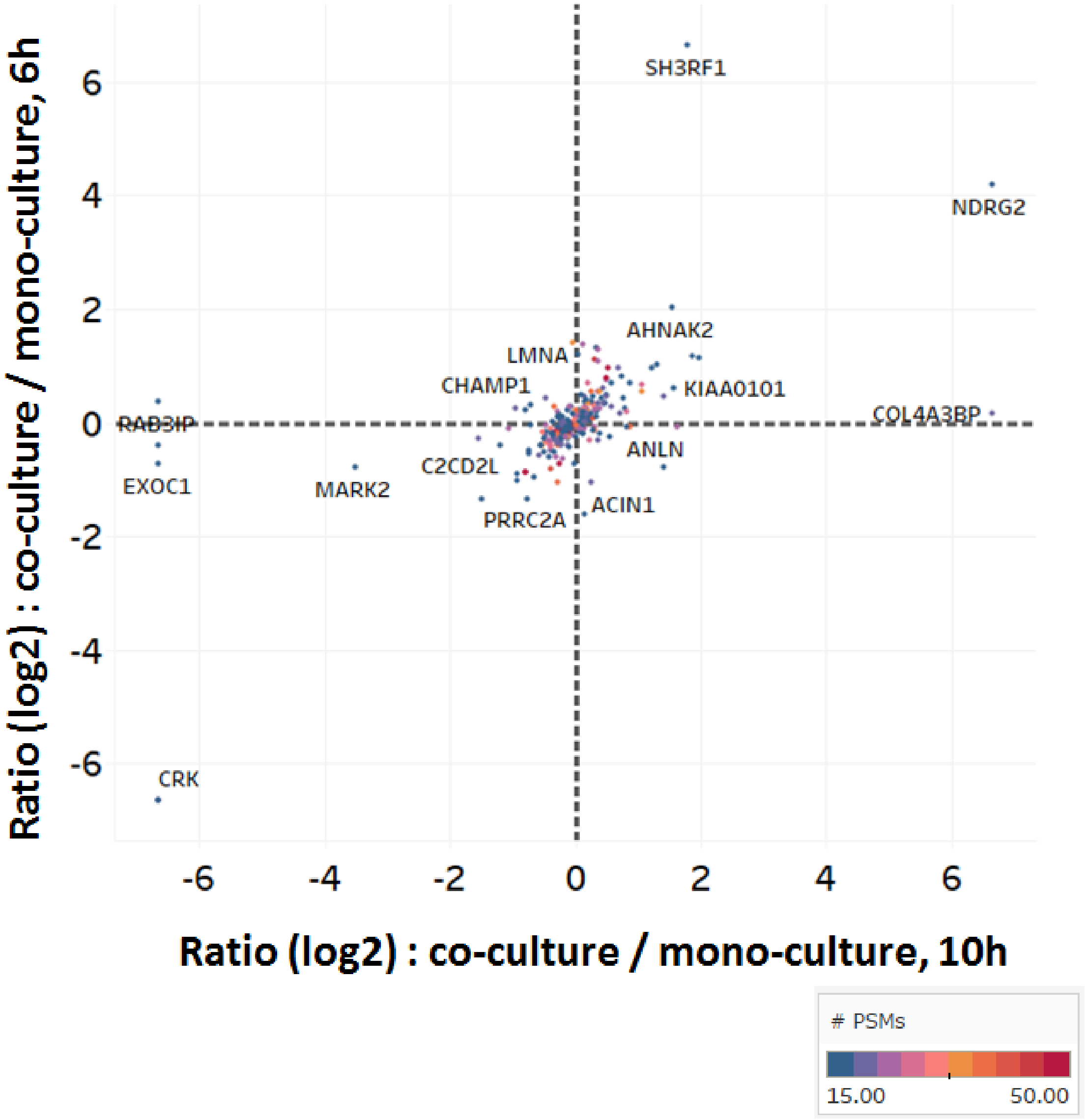


図 3.2-8　Src 変異細胞との混合培養におけるリン酸化ペプチドの変動 (2)

正常細胞と Src 変異細胞との混合培養において見いだされたリン酸化ペプチドをプロットした．縦軸は混合培養 6 時間における SILAC レシオ値 (log2 fold change)を表し，横軸は混合培養 10 時間のレシオ値を表した．プロットに用いたリン酸化ペプチドは，PSM > 15 及び Mascot ion score > 40 の条件で抽出した．

a

Gene Name	Protein Name	PSMs	Ratio (log2): 10h	Ratio (log2): 6h	Mascot score	Annotated Sequence	Modifications
ABCF1	ATP binding cassette subfamily F member 1	16	−2.37	−1.17	79	[K].KLSVPASDEEDEVPAPIPR.[G]	2xPhospho [S3; S7]
ATRX	ATRX, chromatin remodeler	20	−1.32	−2.64	44	[K].ATSSSNPSSPAPDWYKDFVTDADAEILEHSGK.[M]	2xPhospho [S/Y/T]
CCNT2	Cyclin T2	17	−2.39	−1.78	46	[K].HVQSQSASSSSVTSPIK.[M]	1xPhospho [S/T]
CTNND1	Catenin delta 1	23	−1.72	−1.31	52	[R].FHPEPYGLEDDQRSMGYDDLDYGMMSDYGTAR.[R]	1xPhospho [Y/S]
KIAA1328	KIAA1328	15	−6.64	−1.29	40	[R].VTAASVSMESLKGAGDSVDDQNFCR.[G]	1xCarbamidomethyl [C24]; 2xPhospho [T/S]
SPAG9	Sperm associated antigen 9	16	−1.58	−2.18	45	[R].SASQSSLDKLDQELKEQQK.[E]	1xPhospho [S]
AHNAK2	Uncharacterized protein	18	2.53	2.99	63	[K].FKMPSFGASTPSK.[DS]	1xPhospho [S5]; 1xOxidation [M3]
BCLAF1	BCL2 associated transcription factor 1	27	2.36	1.58	70	[K].GRAEGEWEDQEALDYFSDKESGK.[Q]	1xPhospho [S17]
DDX3X	DEAD-box helicase 3, X-linked	17	6.64	3.36	40	[K].DSSGWSSSKDKDAYSSFGSR.[S]	1xPhospho [S]
PLEC	Plectin	15	1.12	6.64	103	[R].RGSFDATGSGFSMTFSSSSYSSSGYGR.[R]	1xPhospho [T/S]
SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1	20	1.05	2.52	83	[K].SKSEEAHAEDSVMDHHFR.[K]	1xPhospho [S]
SSFA2	Sperm specific antigen 2	16	2.47	1.34	99	[R].IGSMSSVTSNKETDSPPPLTR.[S]	3xPhospho [S6; T/S]
VIM	Uncharacterized protein	20	1.48	5.08	109	[R].LLQDSVDFSLADAINTEFK.[N]	1xPhospho [S]

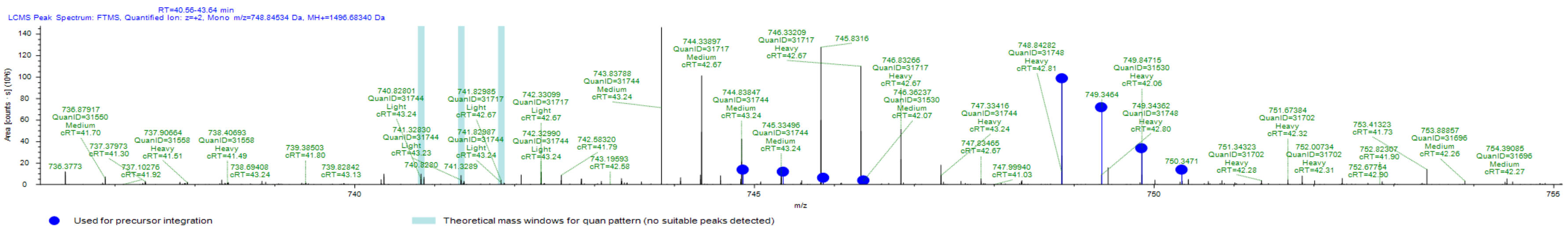
b

Gene Name	Protein Name	PSMs	Ratio (log2): 10h	Ratio (log2): 6h	Mascot score	Annotated Sequence	Modifications
CRK	CRK proto-oncogene, adaptor protein	17	−6.64	−6.64	50	[R].HGVFLVRDSSTSPGDYVLSVSENSR.[V]	1xPhospho [S/Y/T]
SRRM2	Serine/arginine repetitive matrix 2	20	−6.64	−6.64	49	[R].RSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSGSSSSDSEGSSLPTQPEVALK.[F	1xPhospho [S]
TJP2	Tight junction protein ZO-2	17	−1.48	−1.34	54	[R].DQLRDSSPPPAFKPEPPKAK.[T]	1xPhospho [S]
AHNAK2	Uncharacterized protein	15	1.54	2.03	68	[K].FKMPSFGASTPSK.[DS]	1xPhospho [S5]; 1xOxidation [M3]
LMNA	Uncharacterized protein	17	1.87	1.17	70	[R].SYRSVGGSGGGSFGDSLVTR.[S]	1xPhospho [S/Y]
NDRG2	NDRG family member 2	18	6.64	4.19	43	[R].SRTASLTSAASIDGNR.[S]	2xPhospho [S/T]
SH3RF1	SH3 domain containing ring finger 1	15	1.79	6.64	66	[K].KRHSFTSLTMASK.[S]	1xPhospho [S4]
TNS1	Tensin 1	17	1.98	1.15	99	[R].SQSFPESEPQLPPAPAR.[G]	1xPhospho [S]
ZNF280C	Zinc finger protein 280C	16	1.29	1.03	43	[K].GTNTSSSPHKTGTPFLR.[S]	1xPhospho [T/S]

表 3.2-1　　混合培養において変動するリン酸化ペプチドの一覧

正常細胞との混合培養条件において変動を示すリン酸化ペプチドの一覧を示した．リン酸化ペプチドは，PSM > 15 及び Mascot ion score > 40 の条，かつ SILAC Ratio が 2 倍以上あるいは 0.5 倍以下の変動を示すものを抽出した．この基準で抽出されたものの中から，Ras 変異細胞あるいは Src 変異細胞との 6 時間及び 10 時間の培養時間において，全てのサンプルセットで共通するものを一覧にした. Annotated Sequence 中の赤字は，SILAC ラベルされたアミノ酸を表している．また，Modification については，修飾アミノ酸と修飾位置の特定情報を示している．

a



b

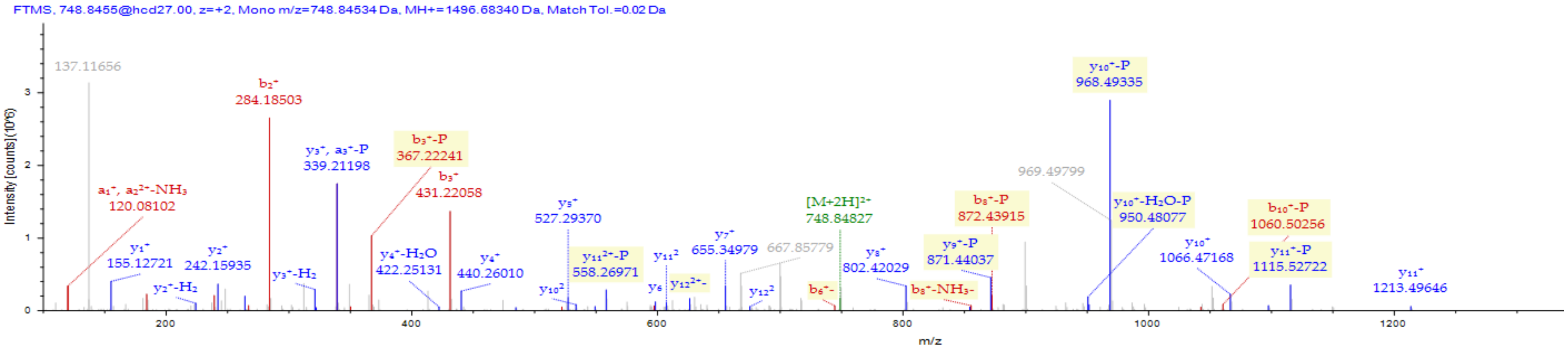


図 3.2-9　AHNAK2 リン酸化ペプチドの同定及び定量

SILAC 分析にて見いだされた AHNAK2 由来リン酸化ペプチドの，代表的な Precursor ion 及び Product ion のスペクトルを示した. **a.** Precursor ion スペクトル.　● は検出された SILAC ラベルペプチドを表し，Heavy ラベル由来の Precursor signal は Medium ラベルよりも高いことが分かる. **b**. AHNAK2 の部分配列 FKMP[pS]FGASTPSK の Product ion スペクトル. ペプチド由来のフラグメントは FKMP[pS]FGASTPSK のものと一致しており，リン酸化セリンを含むフラグメントイオンも検出されている.

リン酸化ペプチド FKMPSFGASTPSK は AHNAK2（AHNAK nucleoprotein 2）タンパク質由来の配列である。AHNAK2 は，1,648 アミノ酸からなり， N 末に PDZ ドメインを持つタンパク質である。今回見いだされたリン酸化サイトは，繰り返し配列の中に存在するため，FKMPSFGASTPSK 配列は合計 6 個存在している（S564, S732, S914, S1096, S1264, S1446）。なお，ヒト AHNAK2 は 5,795 アミノ酸からなる巨大なタンパク質であり，イヌと同じく N 末に PDZ ドメインを持つタンパク質である。しかし，その機能は不明であり，研究は進んでいない。AHNAK2 は AHNAK という類似遺伝子として見出されたタンパク質である。AHNAK2 より先に見つかった AHNAK についてもタンパク質の機能に関する研究はあまり進んでおらず，現在のところ機能未知のタンパク質であると言える[21]。AHNAK2 と同様に，AHNAK も約 700kDa の巨大タンパク質である。これまでに報告されている AHNAK の機能には様々なものがあり，情報にまとまりがない。また近年，癌や癌の転移に関連を示唆するデータが，特に網羅解析の結果より報告されている。AHNAK2 も腎明細胞癌や膵癌で発現が上昇しているタンパク質として報告がある[22, 23]。このような数少ない断片的情報はいくつか存在するが，現在のところ AHNAK 及び AHNAK2 の機能は依然として不明である。

今回見いだされたリン酸化配列 FKMPSFGASTPSK に相当する配列は，ヒトでは FKMPSFGVSAPGK に相当する。このリン酸化部位の配列はマウス，イヌ，クジラなど，多くの種間で保存されている。ヒトにおいても，このリン酸化部位は繰り返し配列中に存在し，その数は 12 個にも及ぶ。繰り返し配列の中にリン酸化部位があるものは，そのリン酸化状態の変動によりタンパク質の立体構造を大きく変えることが予想され，ホモあるいはヘテロ結合分子の会合・乖離の制御への関与が示唆される[24]。あるいは，複数のリン酸化サイトがあるため，シグナルのオン・オフの制御のみならず，可変量的なコントロールを担えるものかもしれない。いずれにせよ，興

[21] Davis, T. A., B. Loos, and A-M. Engelbrecht. "AHNAK: the giant jack of all trades." Cellular signalling 26.12 (2014): 2683-2693.

[22] Wang, Minglei, et al. "AHNAK2 is a Novel Prognostic Marker and Oncogenic Protein for Clear Cell Renal Cell Carcinoma." Theranostics 7.5 (2017): 1100.

[23] Smith, Alex, et al. "Identification of candidate biomarkers and cancer genes AHNAK2 and EPPK1 in pancreatic cancer." Brit J Med Med Rep 18 (2016): 1-8.

[24] Nishi, Hafumi, Kosuke Hashimoto, and Anna R. Panchenko. "Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function." Structure 19.12 (2011): 1807-1815.

味深いタンパク質であることから，このタンパク質についてさらに調べることにした。

3.2.3　AHNAK2 の発現量及びリン酸化修飾の変動に関する検証

これまでの結果より，正常細胞と変異細胞の混合培養条件下においてリン酸化 AHNAK2 の上昇が見いだされた。しかしこの変化は，AHNAK2 のリン酸化修飾が亢進したものか，あるいは AHNAK2 のタンパク質発現が変動したものかは不明である。さて，今回の解析では，特に Ras 変異細胞での結果においてリン酸化精製効率が低かったことより，非リン酸化ペプチドも多く存在することを述べた（本章 3.2.1）。そこで，AHNAK2 の検出ペプチドを確認すると，リン酸化修飾を含まない AHNAK2 由来ペプチドも多く含まれていることが分かった。そこで，この情報を利用し，AHNAK2 タンパク質の発現量に変動があるかどうかを調べた。

今回検出されたリン酸化ペプチド FKMP[pS]FGASTPSK の前後配列より非リン酸化ペプチドが検出されていたため，これらのペプチドの Heavy 及び Medium の量比を確認した。確認のために用いたペプチド配列を図 3.2-10 a に示した。網羅的解析により見いだされたリン酸化部位を含むペプチドの定量は，トリプシン切断パターンの違う 3 種類のものを用いた（peptide3, peptide4, peptide5）。リン酸化サイトの N 末側に存在するペプチド（peptide1）と，C 末側に存在するペプチド(peptide2）を非リン酸ペプチドの定量として用いた。それぞれのペプチドの Heavy/medium SILAC ratio を図 3.2-10 b に示した。Heavy は正常細胞と ras 変異細胞との混合培養由来のもので，Medium は単独培養由来のものである。混合培養の時間は，6 時間及び 10 時間の 2 種類であった。この結果，2 つの非リン酸化ペプチドはいずれも Heavy / Medium 値が 0.9 であり，変化を示さなかった。一方，リン酸化サイトを含む 3 つのペプチドは，いずれも Heavy / Medium 値は高い値を示した。この結果より，今回見つかった AHNAK2 のセリンリン酸化修飾は，タンパク質発現変動による変化ではなく，リン酸化状態の変化であることが示唆された。

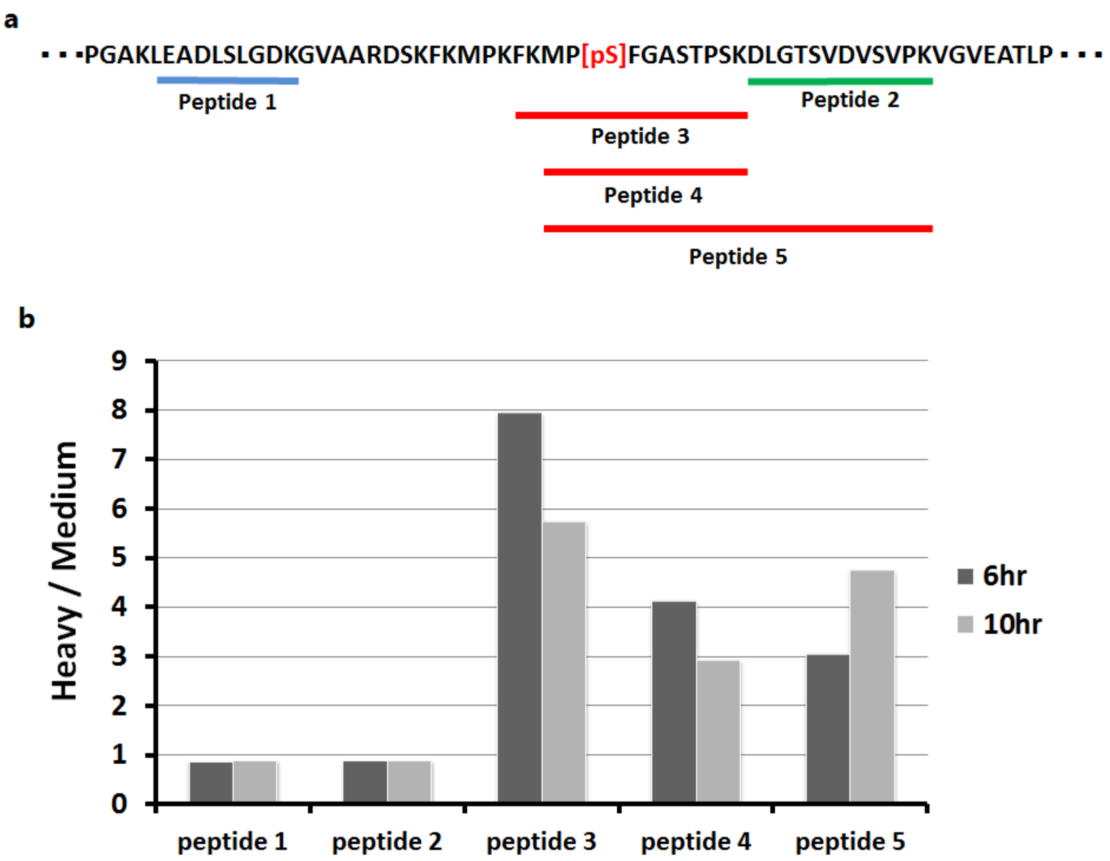


図 3.2-10　　AHNAK2 由来のリン酸化および非リン酸化ペプチドの SILAC 定量

AHNAK2 由来のリン酸化及び非リン酸化ペプチドの SILAC ratio を確認した. **a**. 検証した AHNAK2 ペプチドを示した．リン酸化サイトを含むペプチドは次の通りである． peptide3; FKMP[pS]FGASTPSK, peptide4; MP[pS]FGASTPSK, peptide5; MP[pS]FGASTPSKDLGTSVDVSVPK 非リン酸化ペプチドは，次の通りである． peptide1; LEADLSLGDK, peptide2; DLGTSVDVSVPK **b**. 各ペプチドの SILAC ratio を示した．Heavy は MDCK 細胞と Ras 変異細胞との混合培養条件，Medium は MDCK 細胞及び ras 変異細胞の単独培養条件のものである．テトラサイクリン添加後 6 時間及び 10 時間のものをそれぞれ表示した．非リン酸化ペプチドである peptide1 及び peptide2 は Heavy/medium がいずれの場合においても約 0.9 であり，差異を示さなかった．一方，3 種類のリン酸化ペプチドはいずれも高い値を示し，混合培養条件下で上昇していることを示している．

3.2.4　混合培養下におけるリン酸化 AHNAK2 の変動に関する検証

SILAC を用いたリン酸化プロテオミクス解析により，細胞競合においてリン酸化 AHNAK2 が増加していることが示唆された。このことを確認するため，リン酸化 AHNAK2 に対する抗体を作製し，免疫染色を行った。抗体は FKMP[pS]FGAST を抗原として作製したものを用い，テトラサイクリン刺激による Ras 変異タンパク質を発現誘導後 6 時間の細胞を染色した（図 3.2-11）。MDCK あるいは MDCK-RasV12 の単独培養においては，リン酸化 AHNAK2 の染色は極めて弱いが，MDCK と MDCK-RasV12 の混合培養条件下において AHNAK2 のリン酸化が強く発現誘導されている。また，AHNAK2 のリン酸化は変異細胞と隣接している正常細胞にて亢進しており，この現象は変異細胞内ではみられない。この結果より，SILAC によるリン酸化解析で示唆されたリン酸化 AHNAK2 が，正常細胞と変異細胞との混合培養にて増えていることが確認された。

リン酸化タンパク質の変動が確認されたことにより，今後 AHNAK2 についてさらに研究を進めることになる。正常細胞が変異細胞を排除する際に，正常細胞内の AHNAK2 がどのような役割を担っているのか，大変興味深い。

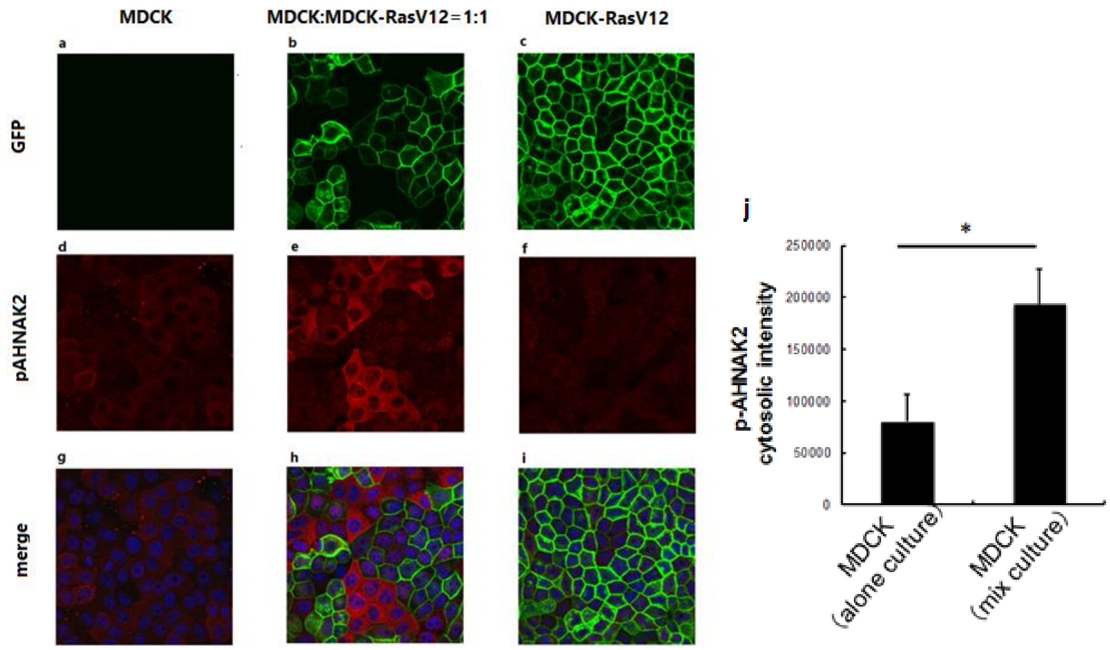


図 3.2-11　　　　単独培養あるいは混合培養における AHNAK2 のリン酸化

抗リン酸化 AHNAK2 抗体を用いて，各種培養条件下での AHNAK2 のリン酸化を確認した．**a**, d, g は MDCK 細胞単独の培養．b, e, f は MDCK と MDCK-pTR-GFP-RasV12 の混合培養．**c**, f, i は MDCK-pTR-GFP-RasV12 の単独培養. a, b, c は GFP の蛍光像. d, e, f は抗リン酸化 AHNAK2 抗体による免疫染色像. g, h, i は前述の画像に加え、核染色像（Hoechist3342)を合成した画像.

細胞を播種後 12 時間培養し，その後テトラサイクリン (2μg/ml)を加えて培養した. 6 時間後に 4% PFA で固定し，染色を行った．青は Hoechist33342，緑は GFP，赤はリン酸化 AHNAK2 (anti- FKMP[pS]FGAST)

j. MDCK 細胞単独培養と，MDCK-pTR-GFP-RasV12 と混合培養した MDCK 細胞におけるリン酸化 AHNAK2 の定量を行った. 10 視野に含まれる MDCK 細胞の細胞質の p-AHNAK2 の蛍光強度を測定し, データは 4 回の独立した実験から得られた平均値±SD で表した．(*: $p<0.05$)

3.2.5　リン酸化ペプチドの精製法の再検討

前述の分析において, SILAC 分析は可能であったが, リン酸化ペプチドの濃縮率が低いことと, リン酸化ペプチドの回収量にバッチ間の差がみられたことが課題として考えられた。今回用いたリン酸化精製のカラムは，9 割以上のリン酸化ペプチドの精製効率があるとされていたが，実際は 35%～65%程度の精製率であった。また，RasV12 サンプルの場合と Src サンプルの場合で，精製率に大きな差がみられた。このカラムは吸湿により性能が低下することが懸念されているが, 恐らく購入ロットや保管方法によって吸湿の程度が違い, 結果に差が生じた可能性が考えられる。また今回の分析においては，吸湿している場合も考慮し，100℃で 3 日間の乾燥を行い，その後精製に用いたが，吸湿の程度が大きい場合には十分に性能が回復しなかったのかもしれない。いずれにせよ，リン酸化精製の手法について改めて見直すことにし，現在行われていて入手可能なものを選別し，その性能を比較した。

検討に用いた方法を，表 3.2-2 にまとめた。前項で示した変異細胞との混合培養におけるリン酸化ペプチド探索に用いた手法は Method A である。この製品に用いられているカラムに充填されている担体を用いて，キットを使用せずに他の手法で行ったものが Method B, C 及び D である。その他のものについては，キットあるいは手順書付きの製品であったため，手法についてはその手順に従った。

Method	beads or kit
A	Titansphere TiO kit (column type)
B	Titansphere TiO beads (10 µm)
C	Titansphere TiO beads (10 µm)
D	Titansphere TiO beads (10 mm), baked 500℃, 2hr
E	PolyMAC beads (Tymora Analytical)
F	Phos-select (IMAC-Fe, SIGMA)
G	Ti-IMAC and TiO2 magnetic beads mixture (ReSyn Bioscience)

表 3.2-2　　　検討したリン酸化精製法の一覧

リン酸化精製法の検討を行ったものの一覧を示した. Method A, E, F, G は精製キットであり，指定の手順に従って実施した.

Method B は，Binding buffer として 6% TFA / 80% Acetonitrile 溶液を用い，Elution buffer には 5% ammonia solution を用いた。Method C は，Binding buffer として 2M Lactic acid /50% Acetonitrile 溶液を用い, Elution buffer には 5% ammonia solution を用いた。Method D は, 使用前に Beads を 500 ℃にて 2 時間インキュベートし，室温に戻したあと直ちに使用した。この場合の Binding buffer は 2M Lactic acid /50% Acetonitrile 溶液で，Elution buffer には 5% ammonia solution を用いた[25]。

本検討にはマウス全脳ライゼートより得られたタンパク質を検討用に用いた。各手法に用いた量は 1～5 mg であり，分析後に用いたタンパク質の量でペプチド本数を補正し評価した。また，本検討ではペプチド分画は行わず，トリプシン消化サンプルより直接リン酸化精製し，ワンショットの LC-MS 分析で行った。質量分析の条件は前述の通りである。

本検討において同定されたペプチドの数について，表 3.2-3 にまとめた。ペプチド本数はタンパク質サンプル 1mg あたりの本数で表した。分析の結果，最も多くのリン酸化ペプチドが回収されたのは Method D であり，その数は 1mg あたり 787 種類であった。次いで多かったのは，Method G の 754 種類であった。一方，非リン酸化ペプチドの非特異的回収については，Method D が最も低く，その数は 1mg あたり 21 種類であり，リン酸化ペプチドの割合は同定数ベースで 97%と極めて特異的にリン酸化ペプチドを濃縮していた。一方，リン酸化ペプチドの回収が比較的多かった Method G に関しては，非特異的な非リン酸化ペプチドの回収数も多く，579 種類であり，リン酸化ペプチドの割合は 57%であった。この結果より，リン酸化濃縮における回収率と特異性において Method D が最も優れており，リン酸化ペプチドを効果的に濃縮精製することが可能な手法であると言える。Method D に関しては，再現実験も行っており（表 3.2-3, D-2），一回目の分析と同様に，リン酸化ペプチドの割合が 97%であった。

---

[25] Sugiyama, Naoyuki, et al. "Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications." Molecular & cellular proteomics 6.6 (2007): 1103-1109.

Method	non-phosphopeptide	phosphopeptide	total peptide	phosphopeptide enrichment rate
A	916	516	1432	36%
B	583	341	924	37%
C	783	198	981	20%
D	21	787	807	97%
E	0	0	0	-
F	13	2	15	13%
G	579	754	1333	57%
D-2	21	645	666	97%

表 3.2-3　　リン酸化精製法によるリン酸化ペプチド回収率

7種類のリン酸化精製法について検討した。ペプチドの数については，タンパク質1㎎あたりのペプチド数で表した． phosphopeptide enrichment rateは，検出されたペプチドの本数（total peptide）に対するリン酸化ペプチド（phosphopeptide）の割合で表した．検討した中ではMethod Dが特にリン酸化ペプチド精製率と回収本数に優れていた. Method Dについては，再現実験を行い，リン酸化ペプチド精製率の再現性を確認した（D-2）．

本研究に用いた方法は，Method Dに基づいて製品化されたものである。しかし，今回の検討結果によると，オリジナルの手法と製品版とに違いがあることが示唆された。この手法の本来の有効性を改めて確認すると共に，同様の分析を行う際は原著論文の手法に準じて行うか，あるいは製品版の品質に関して注意を払うべきである。

3.3 本章の小括

様々な生命現象の分子メカニズムを明らかにする際には分子シグナル伝達機構の研究は不可欠である。分子シグナル伝達に関わる分子は多様であるが，その中でもタンパク質リン酸化はシグナル伝達研究の中心的な地位を確立している。本章では, 正常細胞が隣接する変異細胞を認識し，相互作用が誘発される際にどのようなタンパク質のリン酸化が変化するのかを網羅的に探索するため，SILAC によるリン酸化プロテオミクス解析を実施した。リン酸化変動を解析する時間的ポイントは，テトラサイクリンにより変異タンパク質の発現を誘導刺激してから，6 時間後及び 10 時間後という，比較的初期段階での変化を捉えることを試みた。2 種類の変異細胞と 2 種類の発現誘導時間の組み合わせの分析セットの合計 4 種類の解析結果を総合し，データ抽出により確実にリン酸化が変化しているものを絞り込んだ。その結果，AHNAK2 タンパク質由来のペプチド FKMP[pS]FGASTPSK が見いだされた。この AHNAK2 は機能未知のタンパク質であり，これまでほとんど研究されていないものであった。このリン酸化サイトを認識する抗体を作製し，正常細胞と Ras 変異細胞の混合培養条件下で免疫染色を行ったところ，正常細胞あるいは Ras 変異細胞を単独で培養した場合に比べ，混合条件下で培養した際に強く染色されることが確認された。また，染色は正常細胞側で強く染まり，Ras 変異細胞においては染色されなかったことより，AHNAK2 は変異細胞を取り囲む正常細胞においてリン酸化が亢進するタンパク質であることが明らかになった。AHNAK2 のリン酸化が Ras 変異細胞の認識及び排除に関し，どのよう役割を担うものなのか，今後の解析が期待される。

このように，SILAC を用いたリン酸化プロテオミクス解析により，作用機序が十分に明らかになっていない現象に対し，主観や事前情報に影響されることなく注目に値する分子を見出すことが可能である。このようなアンバイアスな解析手法により，予期しない作用機序の研究へと展開されることが期待できる。

4　第 3 章　SILAC 分析による分泌タンパク質の探索

多細胞生物は，それぞれの細胞同士が様々な手段を使って相互に情報を交換し，この細胞間の相互作用によって集団組織を維持している。この際に用いられる情報交換手段は，大きく分けて接触性のものと非接触性のものに分けられる。接触型の細胞間相互作用は，細胞表面の特定の分子同士による結合あるいは分離によって引き起こされるシグナル伝達が代表的なものである。あるいは，ギャップ結合のように，細胞同士に小さな通路ができ，ここを水溶性低分子，イオン等が行き来して情報伝達を行うこともよく知られている。一方，非接触型の細胞間相互作用は分泌物質を介した情報伝達である。分泌物質としては，カルシウムイオンなどの低分子物質や，タンパク質などの高分子物質，あるいは様々な物質を含む分泌小胞などの大きな塊のものまである。このような物質を放出する情報伝達の特徴は，離れた細胞へ情報を届けることが可能であることや，一度に多数の細胞に情報を届けることが可能であることにある。特に，エクソソームなどの分泌小胞は，生体内においての血中安定性が高く，小胞内に含まれるタンパク質や核酸などが標的部位まで届きやすいという利点がある[26]。このことは診断においても有利な点であり，エクソソームは様々な疾患領域におけるバイオマーカー探索の材料として注目されている。

正常細胞と変異細胞との間で生じる細胞競合現象においては，それらの直接的な細胞間相互作用が関連すると言われているが，液性因子等を介した非接触型の情報伝達に関する報告は少ない。ショウジョウバエにおいては，可溶性因子である dSPARC が遺伝子発現レベルで loser 細胞側において発現誘導されること，さらにはこの因子が loser 細胞での細胞死を抑えるように働くことが報告されている[27]。また，哺乳類の細胞競合においても液性因子に関する研究はほとんど報告されていない[28]。今回，正常細胞と変異細胞との細胞競合において，どのようなタンパク質が分泌され，それが細胞競合現象とどのような関わりをもっているのかを調べるため，SILAC 法による分子探索を実施した。

---

[26] Simpson, Richard J., et al. "Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential." Expert review of proteomics 6.3 (2009): 267-283.

[27] Portela, Marta, et al. "Drosophila SPARC is a self-protective signal expressed by loser cells during cell competition." Developmental cell 19.4 (2010): 562-573.

[28] Meyer, S. N., et al. "An ancient defense system eliminates unfit cells from developing tissues during cell competition." Science 346.6214 (2014): 1258236.

4.1　試験方法及び試験材料

4.1.1　分析の概略

分析の概略を図 4.1-1 に示した。初めに，SILAC ラベルした細胞を 4 種類用意する。正常 MDCK 細胞を Heavy と Medium，変異細胞を Heavy と Medium にそれぞれラベルし，Medium ラベルの細胞を混合して培養する。一方，Heavy ラベルの細胞は，それぞれ単独で培養する。細胞を播種後にディッシュ上で単層形成を行った後，テトラサイクリンで形質転換を誘導して変異細胞を出現させる。テトラサイクリンを添加して変異タンパク質の発現を誘導し，12 時間後に培地を無血清培地に交換する。12 時間後の培養上清を回収し，3 種類の培養上清を混合する。培養上清を濃縮した後，タンパク質を SDS-PAGE にて分画し，ゲル内消化によりペプチドを回収した後 LC-MS/MS にて分析する。

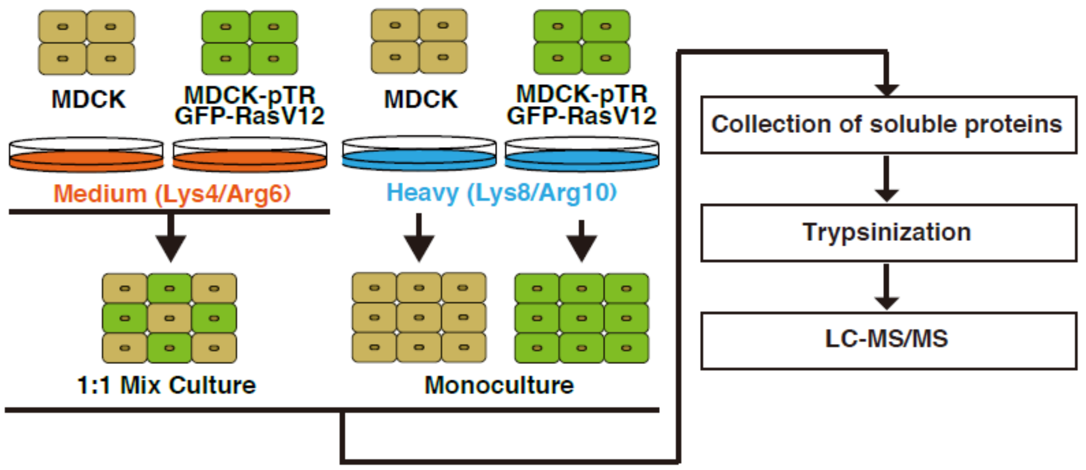


図 4.1-1　　SILAC-based analyses for soluble proteins enriched in the co-culture of normal and RasV12-transformed epithelial cells

A scheme for the SILAC-based analyses. MDCK and MDCK-pTR GFP-RasV12 cells were labeled with medium (Lys4/Arg6) or heavy (Lys8/Arg10) lysine and arginine. Medium-labeled normal MDCK cells were mixed with medium-labeled RasV12 cells at a ratio of 1:1 (1:1 Mix Culture), whereas heavy-labeled MDCK or RasV12 cells were cultured separately (Monoculture). At 24 h after tetracycline addition, the culture media were collected, followed by trypsin digestion. Peptides were analyzed by quantitative mass spectrometry using LC-MS/MS.

4.1.2 細胞

本試験で用いる細胞は以下の通りである

1) MDCK
2) MDCK-pTR-GFP-RasV12

4.1.3 MDCK 細胞の SILAC ラベル

本分析で行う細胞の SILAC ラベル化は，リン酸化解析で実施した手法（3.1.3 項）に準じて実施した。次に，直径 10 ㎝の培養プレートに安定同位体ラベル化細胞を播種し，12 時間培養してディッシュ上に単層形成させた。播種する細胞は，Medium ラベルした MDCK 細胞と RasV12 変異細胞 をそれぞれ 1 プレート培養し，Heavy ラベルした MDCK 細胞と RasV12 変異細胞を 1:1 で混合したものを 2 プレート培養した。次に，テトラサイクリンを加えて 12 時間培養し，変異タンパク質を発現誘導した。続いてテトラサイクリン含有の無血清培地に交換し，さらに 12 時間培養した。この 3 種類の培養で得られた培地上清を回収して混合し，限外ろ過にて 150 µl 程度に濃縮した。このタンパク質溶液を使って，以降のサンプル調整を 2 回実施して分析した（Analysis 1, Analysis 2）。次に SDS-PAGE にて電気泳動し，蛍光染色（Flamingo stain, Bio-Rad）を行った後にゲルレーンを上から下まで 16 分画（Analysis 1)，あるいは 18 分画（Analysis 2）して切り出した。切り出したゲル片を DTT（10 mM, 55°C, 45min）及び Iodoacetamide (55 mM, room temerature，暗所 30 min）で還元アルキル化し，ゲル内トリプシン消化を行った。トリプシン消化条件は，消化バッファーは 100 mM Ammonium Bicarbonate で，Trypsin (Agilent)は最終濃度 2µg ml^{-1} にて 37°C で 16 時間消化した。消化後にペプチドを回収し，StageTip[29]にて精製した後に LC-MS にて分析した。

4.1.4 LC-MS/MS Analysis

2 回の分析のうち，Analysis 1 については本論文 3.1.5 項で実施した LC-MS 手法に準じて実施した。Analysis 2 については，質量分析装置 Orbitrap Fusion にて実施し，その条件は以下の通りであ

[29] Rappsilber, Juri, Yasushi Ishihama, and Matthias Mann. "Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics." Analytical chemistry 75.3 (2003): 663-670.

る（表 4.1-1）。Analysi2 2 の HPLC 条件は，本論文 3.1.5 項に準じた。

Property	parameter
Ion Source Property	Nano Spray Ionization
	Spray Voltage：1800 (V), positive
	Ion Transfer Tube Temp：250°C
MS Scan Property	Orbitrap, resolution = 120000
	Scan Range：400 - 1500
	RF Lens (%)：60
MS2 Scan Property	Activation=HCD, HCD Collision Energy=35 (%)
	Detector type：Ion Trap
Data dependent decision property	Data dependent mode：Top Speed
	Charge State：2 - 7
	Dynamic Exclusion：Exclude after 1 time, 60 sec duration
	Intensity Threshold：5.0×10^3

表 4.1-1　　MS conditions for LC-MS/MS analysis

4.1.5　データ解析

LC-MS にて得られたデータは，Proteome Discoverer 1.4 にて解析した。ペプチド配列の同定は Mascot にて行い, 検索に用いたデータベースは Uniprot proteome database (UP000002254)を用いた。タンパク質同定基準は，Decoy database 検索による FDR 計算で 1%未満となる条件とし，さらに確実なもののみをリスト化するために，Mascot スコア>20 と 5 本以上の SILAC ペプチドをもつものという基準を設けた。

4.2　SILAC 法による分泌タンパク質の解析結果

4.2.1　正常細胞と変異細胞との混合培養で変動する分泌タンパク質

解析の結果，Analysis 1 では 2,393 個，Analysis 2 では 2,819 個のタンパク質が同定され，これらの中で両方の解析において検出された再現性のあるタンパク質は 2,271 個であった。同定されたタンパク質の SILAC 比の分布を図 4.2-1 に示した。Analysis 1 及び Analysis 2 共に M:H ratio (Log2 ratio)はゼロ付近を中心に単峰性の分布を示していた。また，ペプチド分析とは違い，一つのタンパク質より複数の異なる SILAC ペプチドを定量に用いているため，リン酸化ペプチドの解析でみられたような極端な値を示すものは生じない。以上のことから，今回の比較分析は信頼性の高い

候補が選別されているものと考えられる。

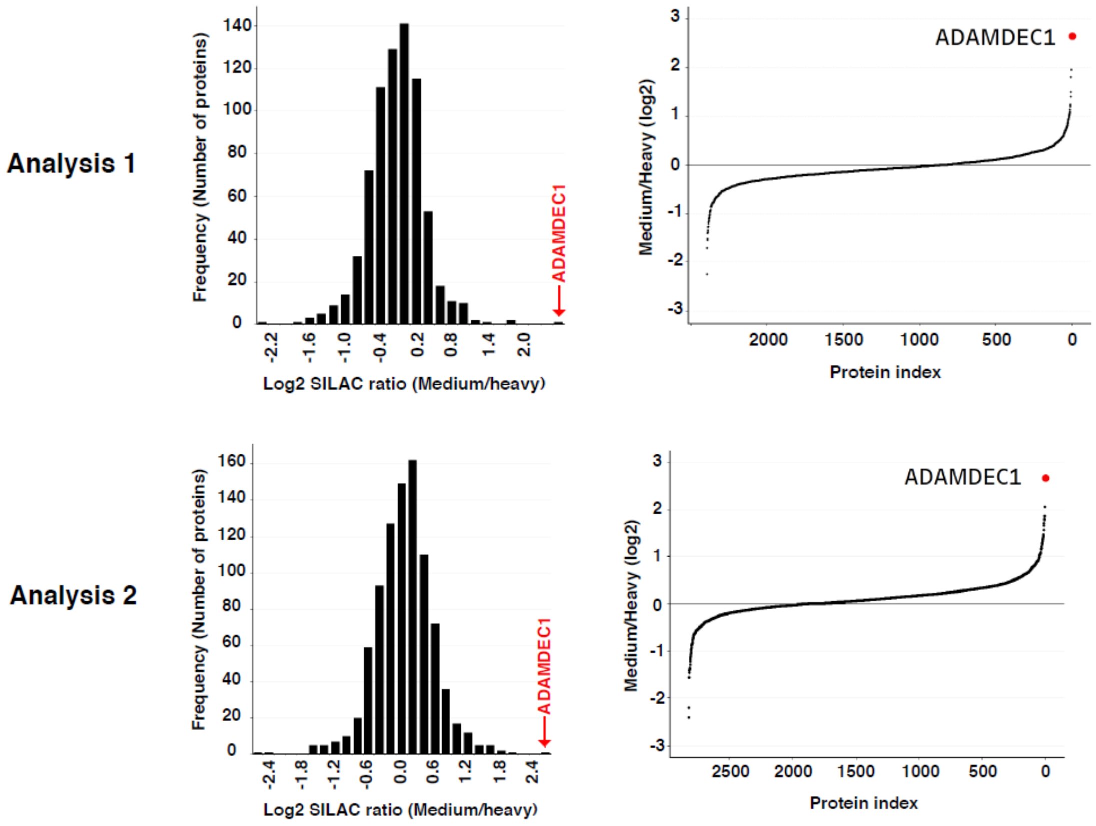


図 4.2-1　　Ratio distribution of two SILAC analysis

次に，これらの結果を 2D Scatter Plot にて表し，2 回の分析で共通して混合培養下で分泌が促進しているものを抽出した。SILAC レシオの 2D scatter plot は図 4.2-2 に示した。また，2 つの分析において，共に 2 倍以上あるいは半分以下に減少するタンパク質を表 4.2-1 に示した。これらの結果より，培地中で最も特徴的に変化するタンパク質は ADAM-like, decysin 1 (ADAMDEC1)であった。

ADAMDEC1 は，ADAM（a disintegrin and metalloproteinase）ファミリーに属する分泌型のメタロプロテアーゼである[30], [31]。N 末にシグナルペプチド配列を持ち，続いてプロドメイン，カタリ

[30] Lund, Jacob, et al. "ADAMDEC1 is a metzincin metalloprotease with dampened proteolytic activity." Journal of Biological Chemistry 288.29 (2013): 21367-21375.
[31] Balakrishnan, Lavanya, et al. "Proteomic analysis of human osteoarthritis synovial fluid." Clinical proteomics 11.1 (2014):

ティックドメイン，さらに不完全なディスインテグリンドメインを持つが，膜貫通領域や細胞質尾部は持たない[32]。さらに，プロテアーゼ活性に必要な ADAM コンセンサス配列を持ち，インビトロにおいて α2-macroglobulin を消化するメタロプロテアーゼ活性を有している。ヒトでは，単球由来マクロファージと大腸に多く発現していることが報告されている[33]。しかし，その生理的機能のほとんどが明らかになっていないタンパク質である。

次に，ADAMDEC1 について，正常細胞と変異細胞の相互作用における発現変動の有無についての検証や，その相互作用における関与について検証した。

6.

[32] Bates, Elizabeth E., Wolf H. Fridman, and Chris G. Mueller. "The ADAMDEC1 (decysin) gene structure: evolution by duplication in a metalloprotease gene cluster on chromosome 8p12." Immunogenetics 54.2 (2002): 96-105.

[33] Fritsche, Jana, et al. "Inverse regulation of the ADAM‐family members, decysin and MADDAM/ADAM19 during monocyte differentiation." Immunology 110.4 (2003): 450-457.

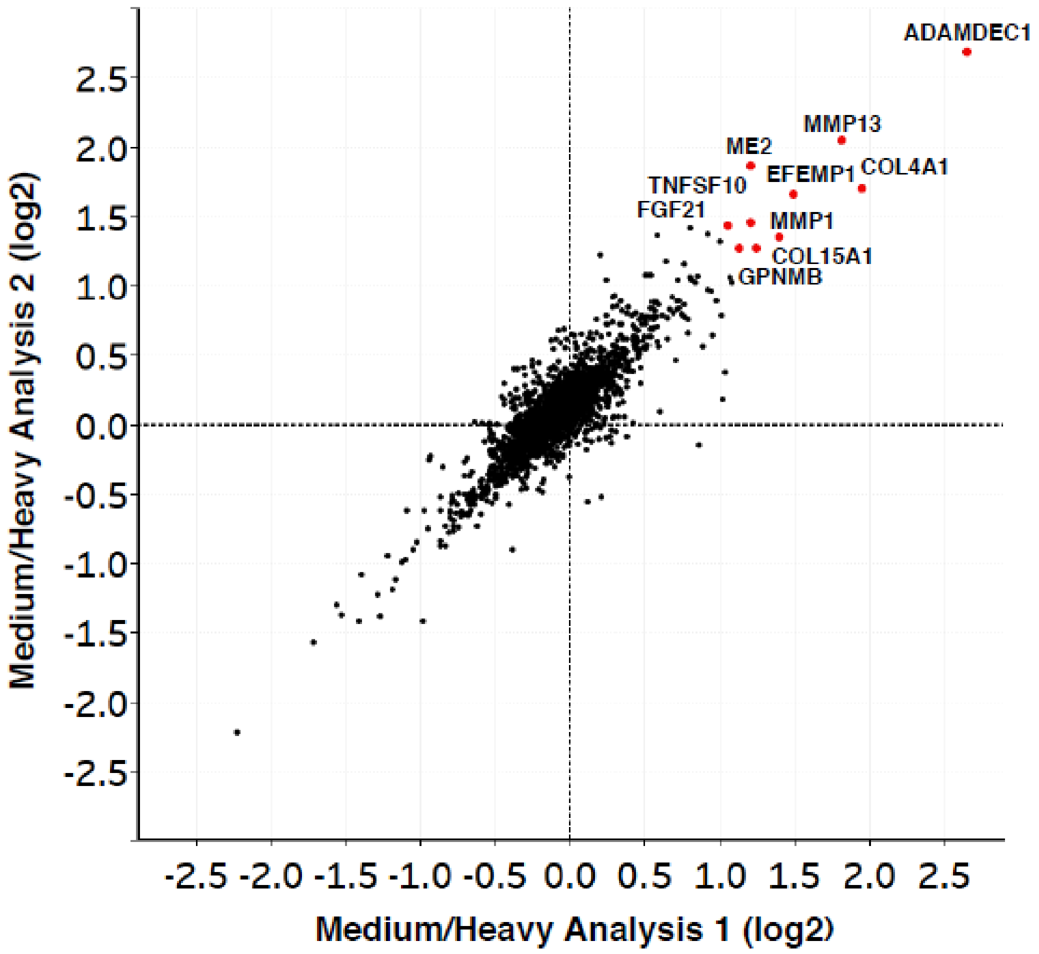


図 4.2-2 Scatter plot of Medium/Heavy ratio from two SILAC analyses

From two SILAC analyses, Medium/Heavy ratio was determined for 2,272 proteins. Log2-transformed M:H SILAC ratio from two independent analyses is shown. Red dots denote top ten proteins.

gene name	protein name	Medium/Heavy (Analysis 1)	Medium/Heavy (Analysis 2)	SILAC Peptides (Analysis 1)	SILAC Peptides (Analysis 2)
ADAMDEC1	ADAM like decysin 1	6.3	6.4	83	119
MMP13	Matrix metalloproteinase	3.5	4.1	80	104
COL4A1	Collagen type IV alpha 1 chain	3.9	3.3	34	35
EFEMP1	EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1	2.8	3.2	10	25
ME2	Malic enzyme	2.3	3.6	5	5
MMP1	Matrix metalloproteinase	2.6	2.5	6	15
TNFSF10	Tumor necrosis factor superfamily member 10	2.3	2.7	11	10
FGF21	Fibroblast growth factor	2.1	2.7	12	17
COL15A1	Collagen type XV alpha 1 chain	2.4	2.4	7	12
GPNMB	Glycoprotein nmb	2.2	2.4	16	14
STC2	Stanniocalcin 2	2.0	2.5	8	15
SHMT2	Serine hydroxymethyltransferase	2.1	2.1	11	16
L7N0L3	Histone H4	2.1	2.0	45	48
MUC5B	Mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming	-2.2	-2.2	128	185
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-2.3	-2.3	141	168
SLIT2	Slit guidance ligand 2	-2.6	-2.1	23	26
CEMIP	Cell migration inducing hyaluronan binding protein	-2.4	-2.3	99	145
IL18R1	Interleukin 18 receptor 1	-2.4	-2.6	8	16
MYH10	Myosin heavy chain 10	-2.7	-2.7	6	15
SERPINF2	Serpin family F member 2	-2.9	-2.5	5	10
E2RFE1	Integrin beta	-2.9	-2.6	88	113
AFP	Alpha-fetoprotein	-3.3	-3.0	12	20
ERAP1	Aminopeptidase	-4.7	-4.7	207	176

表 4.2-1 The list of the significantly upregulated or downregulated proteins in the mix-culture of normal and RasV12 cells.

4.2.2　ADAMDEC1 のタンパク質発現変動の確認

SILAC による分子スクリーニングの結果，正常細胞と変異細胞との共培養条件において ADAMDEC1 の培地中での変動が示唆された。このことを確認するため，定量的質量分析法である MS1 scan filtering 法[34]と Western blotting 法により ADAMDEC1 の比較定量を行った。

MS1 scan filtering 法で用いるサンプルは SILAC ラベルを行わず，それぞれの培養条件から得られた培養上清を独立してサンプル調整し，測定まで行った。培養上清から質量分析まで行うサンプル調整は，SILAC 法での調整法に準じた。サンプル調整終了後，質量分析の前に ADAMDEC1 由来の配列を元に合成した安定同位体ラベルペプチド（SLNSPEQEDF[^{13}C9,^{15}N]LQAEK)を LC-MS 測定時の内部標準物質として全てのサンプルに加えた。測定は Orbitrap Fusion を用いた LC-MS にて行い，SILAC 法で行った Data Dependent Aquisition mode で行った。得られたデータは，まず Proteome discoverer 2.2 にてタンパク質同定を行い，その同定結果を Skyline Software (ver 3.7)に取り込み，ペプチド同定情報（m/z, charge state, retention time)を利用して MS1 から特定イオンのクロマトグラムを抽出した。MS1 クロマトグラムの抽出は３つの Precursor isotope を抽出してエリア値を合計し，内部標準ペプチドも同様に行い，クロマトグラムを作成した（図 4.2-3　）。内部標準ペプチドのエリア値を用いて定量誤差を補正し，各サンプルの ADAMDEC1 の値とした。各サンプル間の比較は，MDCK 単独培養を１としたときの相対値で表した（図 4.2-3）。この結果，SILAC の培養条件ではなく通常の培養条件下においても，ADAMDEC1 は MDCK あるいは RasV12 変異細胞の単独培養時に比べて混合培養条件下において培養上清中に２倍以上存在することが示された。

ADAMDEC1 の発現量は，Western blotting を用いても確認した。用いた抗体は Dr. Lund より供与していただいたもので[35]，希釈率 1:250 にて使用した（図 4.2-4）。この結果より，ADAMDEC1 タ

---

[34] Schilling, Birgit, et al. "Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in Skyline application to protein acetylation and phosphorylation." Molecular & Cellular Proteomics 11.5 (2012): 202-214.

[35] Lund, Jacob, et al. "Monoclonal antibodies targeting the disintegrin-like domain of ADAMDEC1 modulates the proteolytic activity and enables quantification of ADAMDEC1 protein in human plasma." Mabs. Vol. 10. No. 1. Taylor & Francis, 2018.

ンパク質の変動は，質量分析以外の手法でも確認されたことになる。

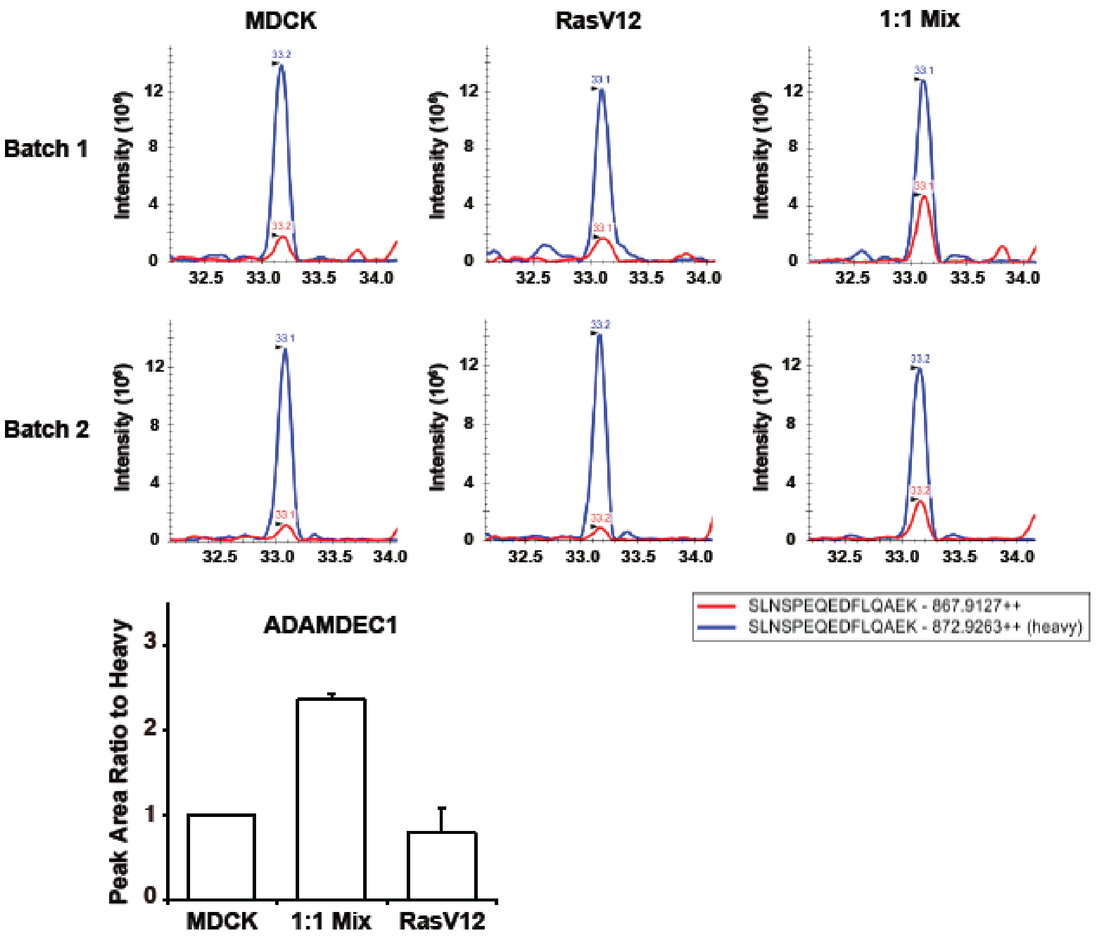


図 4.2-3　　Expression of ADAMDEC1 is increased in the co-culture of normal and RasV12-transfoemed cells

MS1 full-scan filtering analysis of ADAMDEC1 in 1:1 co-culture or mono-culture of normal and RasV12-transformed cells. MS1 ion chromatograms of ADAMDEC1 peptide (SLNSPEQEDFLQAEK, in red) or its corresponding heavy internal standard (SLNSPEQEDF[$^{13}C9$,^{15}N]LQAEK, in blue) were extracted using skyline software. The level of ADAMDEC1 was normalized to heavy internal standard peak area. Values are expressed as ratios relative to MDCK. Data are mean ± SD from two independent experiments.

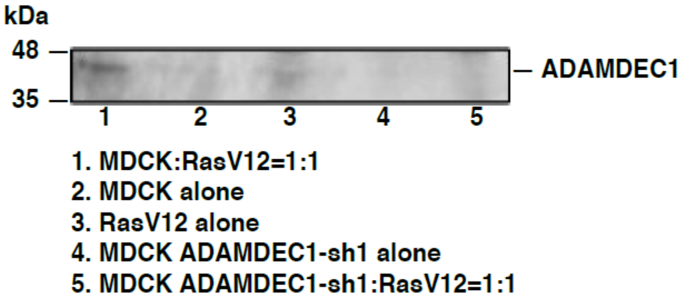


図 4.2-4　Western blot of ADAMDEC1 in conditioned media

Analysis of ADAMDEC1 expression in conditioned media by western blotting. Conditioned media from the indicated culture conditions were examined by western blotting with anti-human ADAMDEC1 antibody.

4.2.3　ADAMDEC1 の遺伝子発現変動の確認

混合培養条件で ADAMDEC1 のタンパク質の増加が確認されたが，この ADAMDEC1 の誘導が遺伝子発現レベルで調節されているかを調べるため，quantitative real time PCR (qPCR)を行った。その結果，ADAMDEC1 の mRNA は単独培養よりも混合培養において２倍以上に増加しており，遺伝子発現レベルで調節されていることが示唆された (図 4.2-5 a)。次に，ADAMDEC1 の発現レベルの上昇が正常細胞側あるいは変異細胞側のどちらかで起こるのかを確認するため，MDCK 細胞の ADAMDEC1-shRNA 安定発現株を 2 系統樹立し(ADAMDEC1-sh1, ADAMDEC1-sh2)，各種の解析を行った。まず，樹立したノックダウン細胞株の ADAMDEC1 の遺伝子発現を確認したところ，ADAMDEC1-sh1 は検出限界以下まで遺伝子発現を抑えていたが，ADAMDEC1-sh2 の遺伝子発現量の抑制は半分以下であった（図 4.2-5 b）。この ADAMDEC1-sh1 を用いて Ras 変異細胞との混合合培養を行ったところ, 単独培養条件化での発現が低く, さらに混合培養条件下でも mRNA の増加は見られなかった。また，培養上清中の ADAMDEC1 タンパク質の発現上昇も確認できなかった（図 4.2-4）。このことより，ADAMDEC1 は正常細胞側で発現する遺伝子であり，混合培養条件下において遺伝子発現が上昇していることが示唆された。さらに，RasV12 細胞と ADAMDEC1-sh 細胞の混合培養条件下では, 通常の MDCK 細胞での場合と比べて変異細胞の apical

側への脱離現象は半分程度に減少していた。以上のことより，ADAMDEC1 は正常細胞側で分泌され，隣接する変異細胞の排除機構に関連することを示唆している。

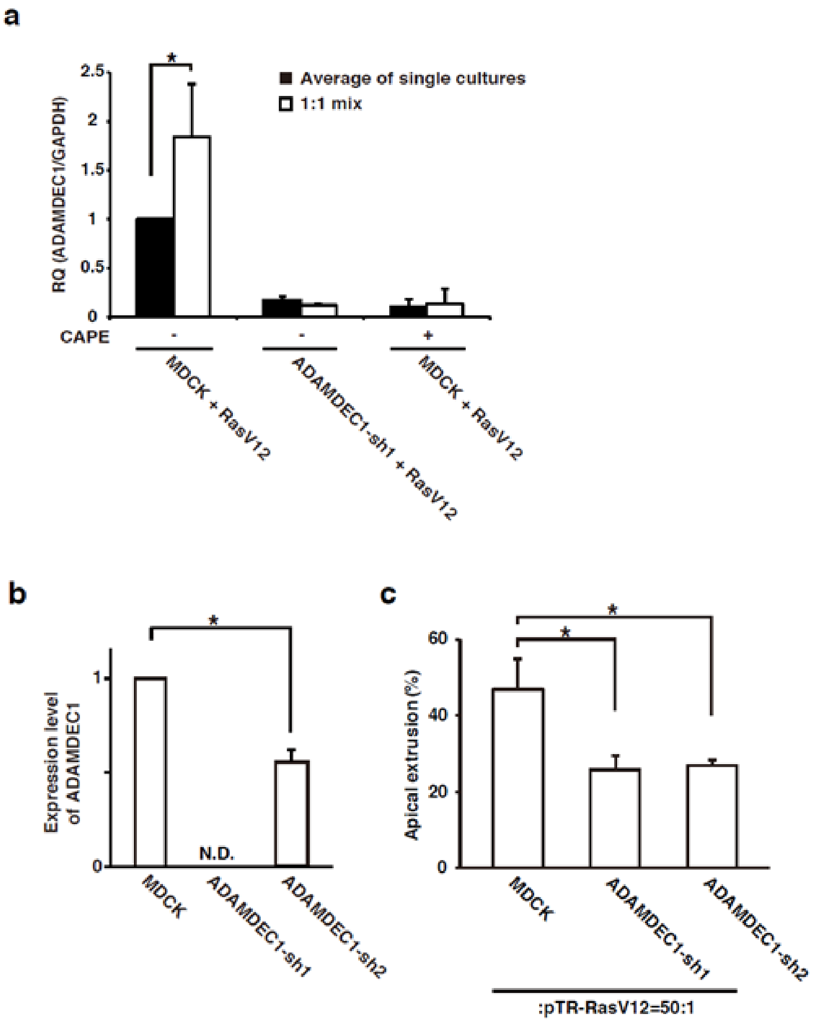


図 4.2-5　　　　ADAMDEC1 secreted by normal epithelial cells plays a positive role in apical extrusion of RasV12-transformed cells.

(a) Quantitative real-time PCR analysis of ADAMDEC1 expression. MDCK-pTR GFP-RasV12 cells and MDCK cells or MDCK ADAMDEC1-shRNA1 cells were cultured separately or co-cultured at a ratio of 1:1 in the absence or presence of the NF-κB inhibitor CAPE. The relative mRNA level of ADAMDEC1 was measured by quantitative real-time PCR with GAPDH mRNA as internal control. Average values from single culture of RasV12 cells and MDCK cells (or MDCK ADAMDEC1-shRNA1 cells) are shown as black bars. Values are expressed as ratios relative to average of single cultures of MDCK and RasV12 cells. Data are mean ± SD from eight (left), three (middle), or five (right) independent experiments. *P<0.05, unpaired Student's t-test. (b) Quantitative real-time PCR analyses for ADAMDEC1 expression in MDCK cells stably expressing ADAMDEC1-shRNA1 or -shRNA2. Values are expressed as ratios relative to MDCK. Data are mean ± SD from two independent experiments. *P<0.05, unpaired Student's t-test. N.D.; not detected. (c) Effect of ADAMDEC1-knockdown on apical extrusion of RasV12 cells. MDCK-pTR GFP-RasV12 cells were co-cultured with MDCK cells or MDCK ADAMDEC1-shRNA1 or -shRNA2 cells, and at 24 h after tetracycline addition, apical extrusion of RasV12 cells was quantified. Data are mean ±SD from three independent experiments. *P<0.005, two-tailed Student's t-test.

4.2.4 ADAMDEC1 遺伝子発現における NF-κB 経路の関与

これまでの結果より，ADAMDEC1 は，混合培養条件にて遺伝子レベルで発現が誘導されることが示唆されたが，その発現誘導のメカニズムは不明である。そこで，ADAMDEC1 の遺伝子発現の上流因子を調べるため，UCSC Genome Browser にて ADAMDEC1 のプロモーター領域の解析を行った（図 4.2-6）。その結果，ADAMDEC1 の発現調節領域には，NF-κB, EBF-1, CTCF といった多くの因子の調節を受けていることが示唆された。

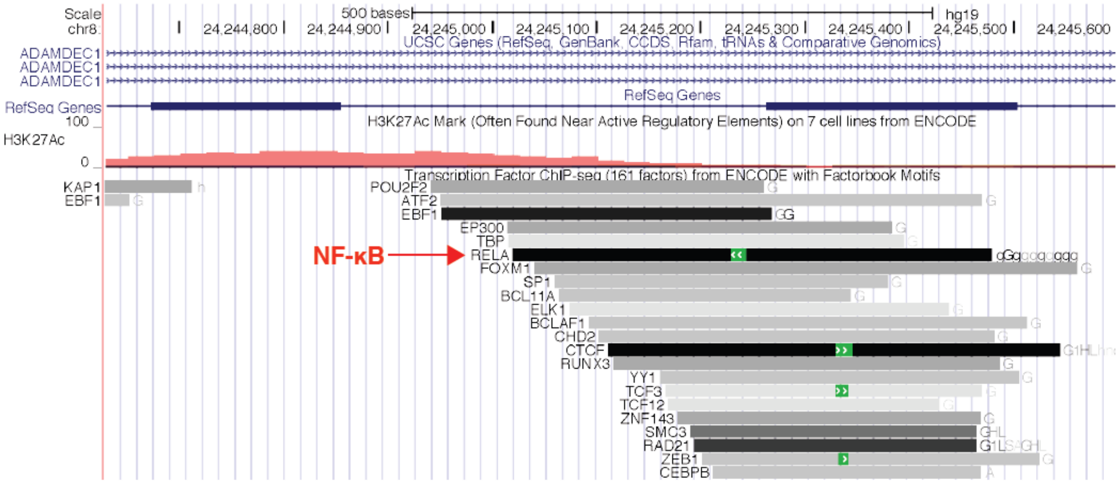


図 4.2-6 The NF-κB pathway is not activated in normal epithelial cells neighboring RasV12-transformed cells.

Database analysis in the promoter regions of human ADAMDEC1 using UCSC Genome Browser. The arrow indicates the potential binding sequence for NF-κB/RelA.

ショウジョウバエにおける細胞競合に関しては，これまでに NF-κB が関与しているといった報告がある[36]。そこで，多くの ADAMDEC1 の発現調節因子の中から NF-κB に注目し，MDCK 細胞における発現調節に関与するかどうかを調べた。まず，既知の NF-κB inhibitor である CAPE（25 μM, Santa Cruz Biotechnology）により，ADAMIDEC1 の遺伝子発現がどのような影響を受けるのかを確認したところ，ADAMIDEC1-sh1 と同程度に ADAMIDEC1 の遺伝子発現を抑制し，混合培養

[36] Meyer, S. N., et al. "An ancient defense system eliminates unfit cells from developing tissues during cell competition." Science 346.6214 (2014): 1258236.

条件下での発現誘導も抑制した（図 4.2-5 a)。さらに，正常細胞と変異細胞の混合培養において，異常細胞の Apical 側への離脱現象が CAPE 添加により強く抑えられた (図 4.2-7 a, b)。

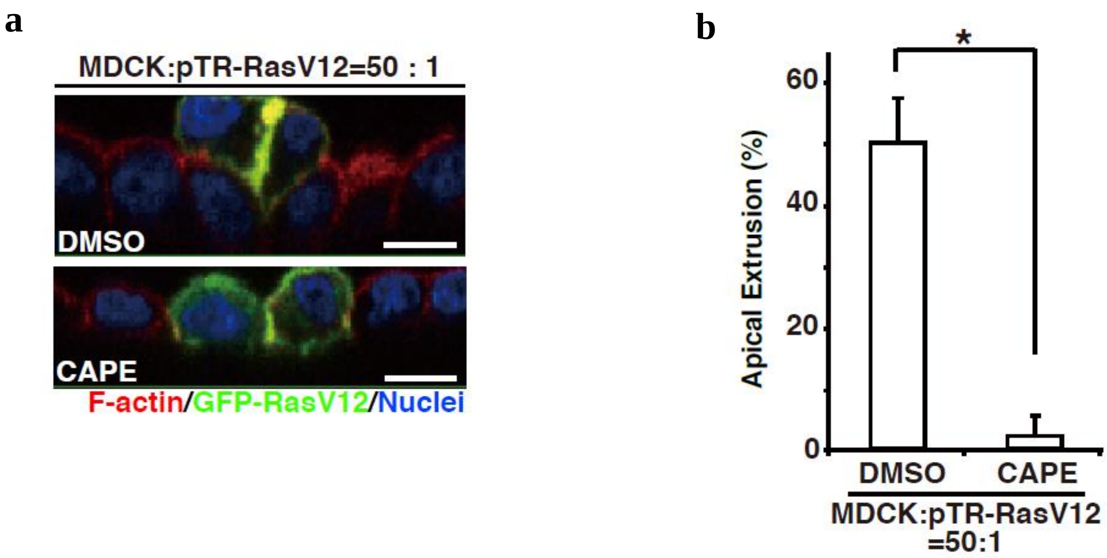


図 4.2-7　The NF-κB inhibitor CAPE suppresses apical extrusion of RasV12-transformed cells.

(a, b) Effect of CAPE on apical extrusion of RasV12-transformed cells. MDCK and MDCK-pTR GFP-RasV12 cells were co-cultured in the presence or absence of CAPE. Cells were fixed after 24 h incubation with tetracycline and stained with Alexa-Fluor-568-phalloidin (red) and Hoechst (blue). (a) Confocal microscopic immunofluorescence images of xz sections. Scale bars, 10 μm. (b) Quantification of apical extrusion of RasV12 cells. Data are mean ± SD from three independent experiments. *P<0.005, two-tailed Student's t-test.

次に，変異細胞の周りを取り囲む正常細胞における NF-κB 活性化の状況を確認するため，p65 による免疫染色を行った。MDCK 細胞と，MDCK-Ras 変異細胞との混合培養において，MDCK 細胞内あるいは Ras 変異細胞内の p65 の局在は単独培養時と変わらず，p65 の核移行は観察されなかった（図 4.2-7, a）。また，蛍光強度を定量しても，同様に混合培養下での p65 の核移行に変化はなかった（図 4.2-7, b）。この結果より，変異細胞との混合培養条件下において ADAMDEC1 の発現が誘導される正常細胞において NF-κB 経路の活性化は起こっていない。このことは，NF-κB パスウェイは ADAMDEC1 の発現や変異細胞の Apical extrusion に必要であるが，NF-κB 経路以外

に加え，別のパスウェイからの制御も受けていることを示すものと考えられる。ADAMDEC1 の発現調節因子については，今後さらに研究が必要である。

4.2.5 変異細胞の離脱における ADAMDEC1 の役割

正常細胞と変異細胞との混合培養において，変異細胞は非自律的に頭頂側へと離脱するが，この現象に ADAMDEC1 タンパク質がどのように関与しているのかを検証した。

検証のために，recombinant ADANDEC1 を作製した。ヒト ADAMDEC1 はメタロプロテアーゼ活性を持つ酵素であり，ADAM consensus sequence の中にある 353 番目のグルタミン酸 (E353)が活性に重要であることが報告されている[37]。イヌ ADAMIDEC1 も Protease active site があり，その中に存在する ADAM consensus sequence の E353 は保存されていた (図 4.2-8 a)。そこで，E353A の変異をもつ ADAMDEC1 も作製し，プロテアーゼ活性との関連性についても検証を行った。

正常型及び E353A 変異型の ADAMIDEC1 を精製し，そのプロテアーゼ活性を測定した。基質として, ヒトプラズマより精製した α2-macroglobulinα (α2M)を用い, 基質濃度 0.9 µg mL-1 に対し, 酵素濃度 100 μg mL-1 を加えて 37℃で 65 時間反応させた。反応後に SDS-PAGE を行い，α2M より切断される約 85 kDa の断片のバンドを検出することで評価した。その結果，正常型の ADAMDEC1 では 85kDa 付近に 2 本の α2M の消化断片が検出されたが，E353A の変異型では見られなかった（図 4.2-8 b）。このことより，ADAMDEC1 はイヌ由来の配列においても酵素活性を持つことと，酵素活性には種間で保存されたコンセンサス配列が重要であることが確認された。

この 2 つのタンパク質を用いて，ADAMDEC1 タンパク質が変異細胞の apical extrusion を誘発するかどうかを調べた。前述の通り，ADAMDEC1 ノックダウン MDCK 細胞と RasV12 変異細胞とを混合培養すると，正常 MDCK 細胞との混合培養でみられる変異細胞の Apicak 側への離脱現

---

[37] Lund, Jacob, et al. "ADAMDEC1 is a metzincin metalloprotease with dampened proteolytic activity." Journal of Biological Chemistry 288.29 (2013): 21367-21375.

象は抑制される。この培養系において精製 ADAMDEC1 を添加すると，抑制されていた離脱現象が部分的に回復することが確認された（図 4.2-8 c）。また，プロテアーゼ活性のない変異型 ADAMDEC1 を加えても，同程度に離脱現象が回復した (図 4.2-8 c)。さらに，ADAMDEC1 control-shRNA（Luciferase-shRNA）を発現する MDCK 細胞を用いた系でも，正常型 ADAMDEC1 あるいは E335A 変異型 ADAMDEC1 を加えても変化はなかった (図 4.2-8 d)。以上のことより，ADAMDEC1 はプロテアーゼを介さない別の作用機序で apical extrusion を誘導することが示唆された。

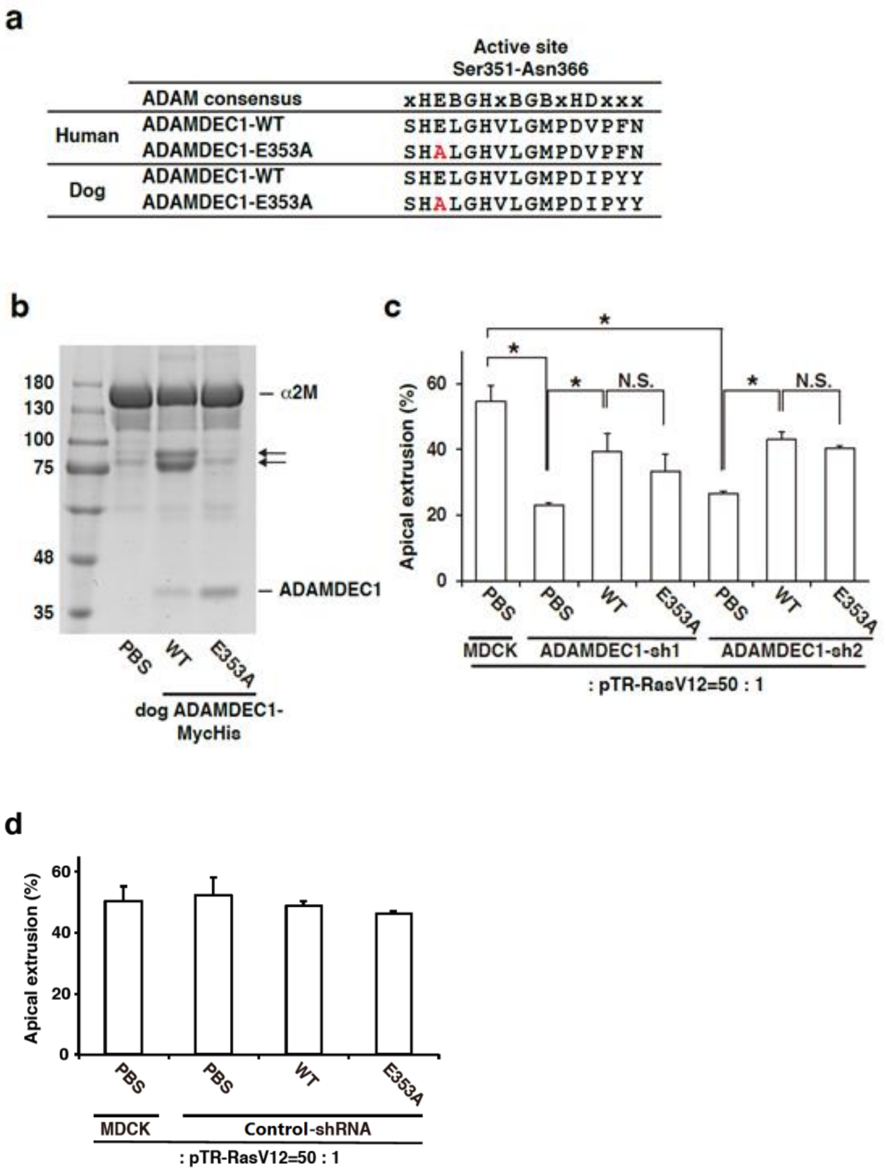


図 4.2-8 The metalloproteinase activity of ADAMDEC1 is dispensable for the regulation of apical extrusion

(a) The amino acid sequence alignment of the predicted active site (Ser351-Asn366) in human and dog ADAMDEC1. Red letters indicate E353A substitution. X: less conserved residue; B: bulky hydrophobic residue. (b) In vitro proteolytic activity assay for ADAMDEC1-WT and -E353A. The substrate α2M protein was incubated with ADAMDEC1-WT or -E353A, followed by SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue protein staining. The arrows indicate cleaved α2M. (c, d) Effect of addition of ADAMDEC1-WT or -E353A on apical extrusion of RasV12-transformed cells surrounded by ADAMDEC1-knockdown cells or control-shRNA cells. MDCK-pTR GFP-RasV12 cells were cultured with MDCK, MDCK ADAMDEC1-shRNA1, -shRNA2 or scramble shRNA cells in the absence or presence of ADAMDEC1-WT or -E353A recombinant proteins, and apical extrusion of RasV12 cells was quantified after 24 h of tetracycline addition. Data are mean ± SD from two independent experiments. *$P<0.05$, unpaired Student’s t-test. N.S.; not significant.

4.2.6 ADAMDEC1 が filamin に及ぼす影響

細胞競合において，filamin は極めて重要なタンパク質である。アクチン結合タンパク質である filamin は，RasV12 変異細胞と接触している正常 MDCK 細胞において，その境界面に集積し，Vimentin の束化を促進することにより細胞の排除を引き起こす[38]。またその反対側の，排除される変異細胞においては，アクチン結合タンパク質である EPLIN (Epithelial protein lost in neoplasm) が境界面に集合し，II 型ミオシンやプロテインキナーゼ A が活性化されることにより上皮組織からの離脱が促進される[39]。この filamin や EPLIN の集積に対する ADAMDEC1 タンパク質の関与を検証した。Ras 変異細胞を取り囲む正常 MDCK 細胞には，変異細胞周辺に filamin の集積が確認されるが，ADAMDEC1-sh1 細胞が取り囲む場合には，filamin の変異細胞の境界周辺への集積は抑えられた。(図 4.2-9 a) このときの filamin の蛍光強度を定量したところ，ADAMDEC1-sh1 細胞に取り囲まれた場合，MDCK 細胞の場合と比べて filamin の蛍光強度は約半分に減少していた（図 4.2-9 b）。この結果は，ADAMIDEC1 は filamin の境界面への集積を制御する上流因子であることを示唆するものである。さらに変異細胞側においても, ADAMDEC1-sh1 細胞で取り囲まれた場合には, 正常 MDCK 細胞で誘発される EPLIN の集積は抑えられた（図 4.2-9 c, ）。

---

38 Kajita, Mihoko, et al. "Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells." Nature communications 5 (2014): 4428.

39 Ohoka, Atsuko, et al. "EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells." J Cell Sci 128.4 (2015): 781-789.

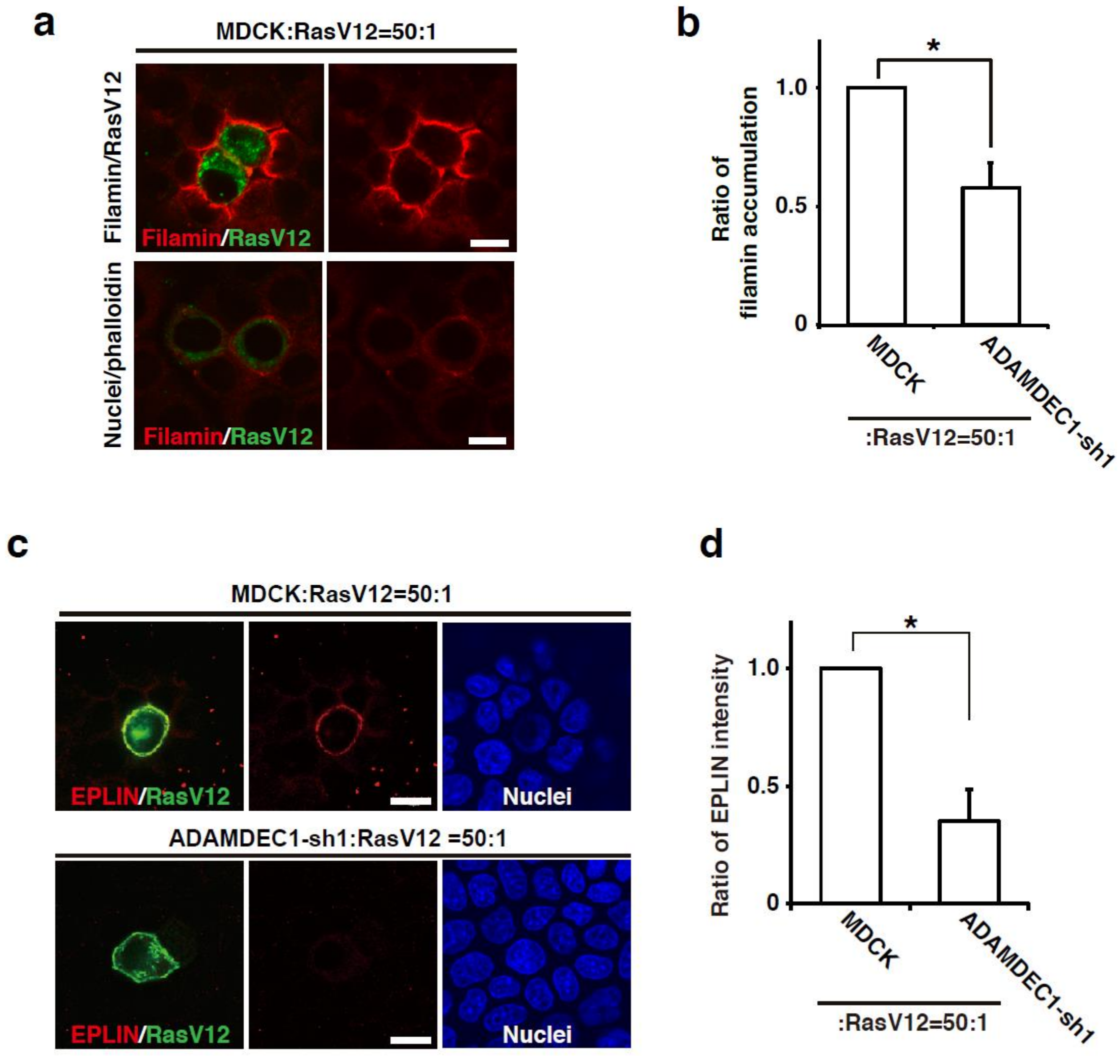


図 4.2-9 Knockdown of ADAMDEC1 suppresses filamin accumulation in normal cells at the interface with RasV12-transformed cells.

(a, b) MDCK-pTR GFP-RasV12 cells were co-cultured with MDCK or MDCK ADAMDEC1-shRNA1 cells. Cells were fixed after 16 h incubation with tetracycline and stained with anti-filamin antibody (red). (a) Confocal microscopic immunofluorescence images of filamin. Scale bars, 10 μm. (b) Quantification of the filamin accumulation. Data are mean ± SD from five independent experiments. (c, d) MDCK-pTR GFP-RasV12 cells were co-cultured with MDCK or MDCK ADAMDEC1-shRNA1 cells. Cells were fixed after 24 h incubation with tetracycline and stained with anti-EPLIN antibody (red) and Hoechst (blue). (c) Confocal microscopic immunofluorescence images of EPLIN. Scale bars, 10 μm. (d) Quantification of the EPLIN intensity. Data are mean ± SD from three independent experiments. Values are expressed as a ratio relative to MDCK: RasV12 = 50:1. *P<0.05, two-tailed Student’s t-test.

4.3　本章の小括

正常細胞と変異細胞との間に生じる細胞競合現象において関与する液性因子の探索のため，SILAC 法を用いて分泌タンパク質の網羅的解析を行った。その結果，正常細胞と変異細胞との混合培養条件下で最も増加する分泌タンパク質として ADAMDEC1 を見出した。ADAMDEC1 のタンパク質の増加は，定量的質量分析及び Western blotting によって確認された。ADAMDEC1 ノックダウン細胞を用いた解析により，混合培養条件下において ADAMDEC1 は正常細胞側において遺伝子レベルで発現が上昇していることが明らかになった。また，正常細胞における Filamin の集積及び変異細胞における EPLIN の集積につながる上流因子であることも明らかになった。以上より，ADAMDEC1 は正常細胞が変異細胞を排除することを促進する EDAC 制御因子であることが示唆された。

プロモーター領域の解析により，ADAMDEC1 は様々な転写因子の制御配列をもつものであった。これまでの報告より，ショウジョウバエにおいて NF-κB パスウェイが細胞競合に関与が示唆されているため，転写因子に関しては NF-κB について検証することにした。しかし，NF-κB の阻害剤である CAPE 添加にて ADAMDEC1 の発現は抑制されるものの，細胞競合において正常細胞側で NF-κB の活性化はみられないことから，EDAC プロセスにおける ADAMDEC1 の発現誘導は NF-κB とは異なる経路が働いているものと考えられる。しかし残念ながら，本研究ではその詳細を解明するには至らなかった。ADAMDEC1 の発現制御に関しては，多プロモーター領域の解析からも多くの転写因子の関与が示唆され，複雑な制御機構が働くものかもしれない。

ADAMDEC1 はメタロプロテアーゼであるが，プロテアーゼ活性のない変異タンパク質を用いた実験により，EDAC 制御にはそのプロテアーゼ活性は寄与しないことが明らかになった。他の ADAM protein family においては，メタロプロテアーゼ活性とは違った働きが報告されているものもある。例えば，ADAM22 は Lgl1 とリガンド-レセプター複合体を形成することで AMPA 受容体を介したシナプス伝達を増強することが報告されている[40]。このような受容体に対するリガンド

[40] Fukata, Yuko, et al. "Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission." Science 313.5794 (2006): 1792-1795.

としての役割をもつ可能性も含め，ADAMDEC1 の EDAC 制御における分子作用機序のさらなる研究が必要であると考えられる。

5　　第４章　混合培養に適した新規分子解析法の検討

高等生物の生体内には多種多様な細胞が存在し，その相互作用により高度で複雑な生命現象が生じる。そのメカニズムを解明する手段として，特に分子メカニズムを研究するインビトロの実験系においては，単一の培養細胞で構築したモデルで解析を行い，そこで得られた知見から複雑な生命体の現象メカニズムを類推するという手法が多く用いられてきた。しかし，単一の培養細胞で得られた知見を基に，器官や生体レベルでの複雑な現象を明らかにすることには限界があり，異なる細胞を直接触れ合わせた高度な実験系の需要が高まっている。

複雑な細胞集団に存在するそれぞれの細胞において，どのような分子が変動するのかを解析するためには，培養後にそれぞれの細胞を単離する必要がある。しかし，その手法や回収量には限界があり，特に多量な試料が必要で，量的・質的にも変化しやすいタンパク質を取り扱うプロテオミクス解析は困難であった。

本研究では，主に単一細胞の培養系で用いられてきた SILAC 法を応用し，分泌タンパク質やリン酸化タンパク質の変動を解析し，EDAC に関与する分子の探索を行った（第 2 章，第 3 章）。これらの解析から正常細胞と変異細胞との相互作用に関連する分泌タンパク質として ADAMDEC1 を同定した。さらに，リン酸化の変動する分子としては，AHNAK2 をはじめとする多くの分子を同定した。しかしながら，SILAC 法による解析は，異なる培養間での比較は可能だが，同じ培養容器内の異種細胞間での比較は不可能である。よって SILAC 解析で見いだされた細胞競合に関連する候補分子は，正常細胞側での変化なのか，あるいは変異細胞側での変化なのかを分析データのみで判別することはできない。

近年，異なる細胞を混合した培養において，タンパク質変動を解析する新しい分析法がいくつか開発された[41]。今回は，その中から CTAP 法 を選択して実験系の確立を試み，正常細胞と変異細胞との混合培養系に用いて変動分子を同定することを目指した。

---

[41] Stone, Shannon E., et al. "Cell-selective proteomics for biological discovery." Current opinion in chemical biology 36 (2017): 50-57.

5.1 試験方法及び結果

5.1.1 試験の概略

CTAP は，アミノ酸前駆物質を加えることでタンパク質をラベルする技術である。置き換えるアミノ酸はリジンであるが，必須アミノ酸であるリジンは他の物質から細胞内で合成することはできない。そのため CTAP 法では，哺乳類には存在しないリジン合成酵素を用い，特定の前駆物質からリジンを細胞内で変換し，タンパク質に取り込ませることを行う。

この技術で用いられる酵素は，それぞれ異なる前駆物質からリジンを作り出す 2 種類の酵素である。一つは Lysine Racemase であり，D-Lysine を L-Lysine へと変換する酵素である。Lysine Racemase (Lyr)を発現する細胞は L-Lysine の代わりに D-Lysine を供給することで生存し増殖することができる。また，D-Lysine は重水素体が販売されているため，例えば d4-D-Lysine を Lysine Racemase 発現細胞に添加すると，d4-L-Lysine としてタンパク質合成に使われ，安定同位体ラベル化が起こる（図 5.1-1）。もう一つの酵素は Daminopimerate decarboxylase (DDC)であり，meso-2,6-Diaminopimeric acid (DAP)を L-Lysine に変換する酵素である。この酵素を発現する細胞は, L-Lysine の代わりに DAP を添加することで生存することが可能である（図 5.1-1）。Lyr 発現細胞と DDC 発現細胞を L-Lysine の代わりに d4-D-Lysine と DAP を加えた培地中で混合培養すると，Lyr 発現細胞のみが安定同位体ラベルされる。

CTAP 法は近年改良され，主にリジン合成酵素を最適化することにより選択的ラベル化効率の向上と長期間の混合培養が可能になった[42]。改良型 CTAP 法では，Lysine Racemase はミラビリス変形菌由来の配列を基に，リーダー配列を除去し，C 末端に小胞残留シグナル配列の KDEL 配列を付け加えたもの（$Lyr^{M37\text{-}KDEL}$）が用いられる。Diaminopimerate decarboxylase は，結核菌由来の配列に，C 末端に KDEL 配列を付け加えたもの（$DDC^{M.tub\text{-}KDEL}$）が用いられる。KDEL 配列を付け加えたことにより培地中への酵素分泌が抑制されるため，培地中での酵素によるリジン変換反応を防ぎ，細胞特異的なラベル効率の向上が期待できるとされている。

---

42 Tape, Christopher J., et al. "Cell-specific labeling enzymes for analysis of cell–cell communication in continuous co-culture." Molecular & Cellular Proteomics 13.7 (2014): 1866-1876.

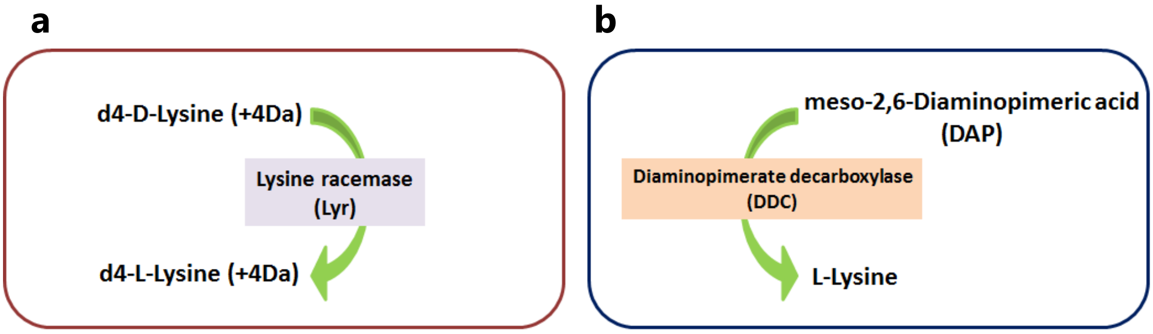


図 5.1-1　　アミノ酸前駆物質による細胞のラベル化

CTAP に利用されるリジン前駆物質と，それをリジンへと変換する酵素を示した。それぞれの酵素は哺乳類細胞には存在しないものであり， これら２種類の酵素を発現する細胞は混合培養中でも前駆物質選択的にリジンへと変換することが可能である. **a**. D-Lysine をリジン前駆物質として利用する場合，細胞に Lysine racemase (Lyr）を発現させることで L-Lysine へと変換され, タンパク質合成に利用される．このとき, D-Lysine を安定同位体 D-Lysine (例えば d4-D-Lysine)を添加すると, タンパク質の安定同位体ラベルが可能になる． **b**. meso-2,6-Diaminpopimeric acid (DAP)をアミノ酸前駆物資として使用する場合, 細胞に Diaminopimerate decarboxylase (DDC)を発現させることで L-Lysine へと変換され, タンパク質合成に利用される．なお，現在入手可能な DAP の安定同位体はない.

CTAP 法を用いた正常細胞と変異細胞との相互作用に関与する分子の探索研究の概略を示した（図 5.1-2）。CTAP による培養は２種類行い，一つは正常細胞と変異細胞との混合培養を行う。もう一つは正常細胞のみ，あるいは変異細胞のみを行う。異なる細胞の混合培養では d4-D-Lysine を用い，同一種の細胞の単独培養では d8-D-Lysine を用いる。この２つの培養から得られたサンプルを混合し，混合培養と単独培養において違いの生じる分子を見出す。正常細胞の変動を比較したい場合は，正常細胞に Lyr を発現させることが必要であり，変異細胞側での変動を見たい場合には変異細胞に Lyr を発現させなければならない。このように CTAP を用いる場合には，どちらか一方側の細胞に着目した分析になる。正常細胞側に着目した実験概略を（図 5.1-2）に示した。この場合, MDCK-Lyr と MDCK-Ras-DDC を混合培養し, 培地には d4-D-Lysine と DAP を加える。もう一方では MDCK-Lyr と MDCK-DDC を d8-D-Lysine と DAP を加えた培地で培養する。変異細

胞を誘導してから数時間後にタンパク質を回収し，SILAC 法と同様の分析法にて変動タンパク質を解析する。d4 ラベルされたタンパク質と d8 ラベルされたタンパク質を比較定量することにより，変異細胞との相互作用によって変動する分子を見分ける。

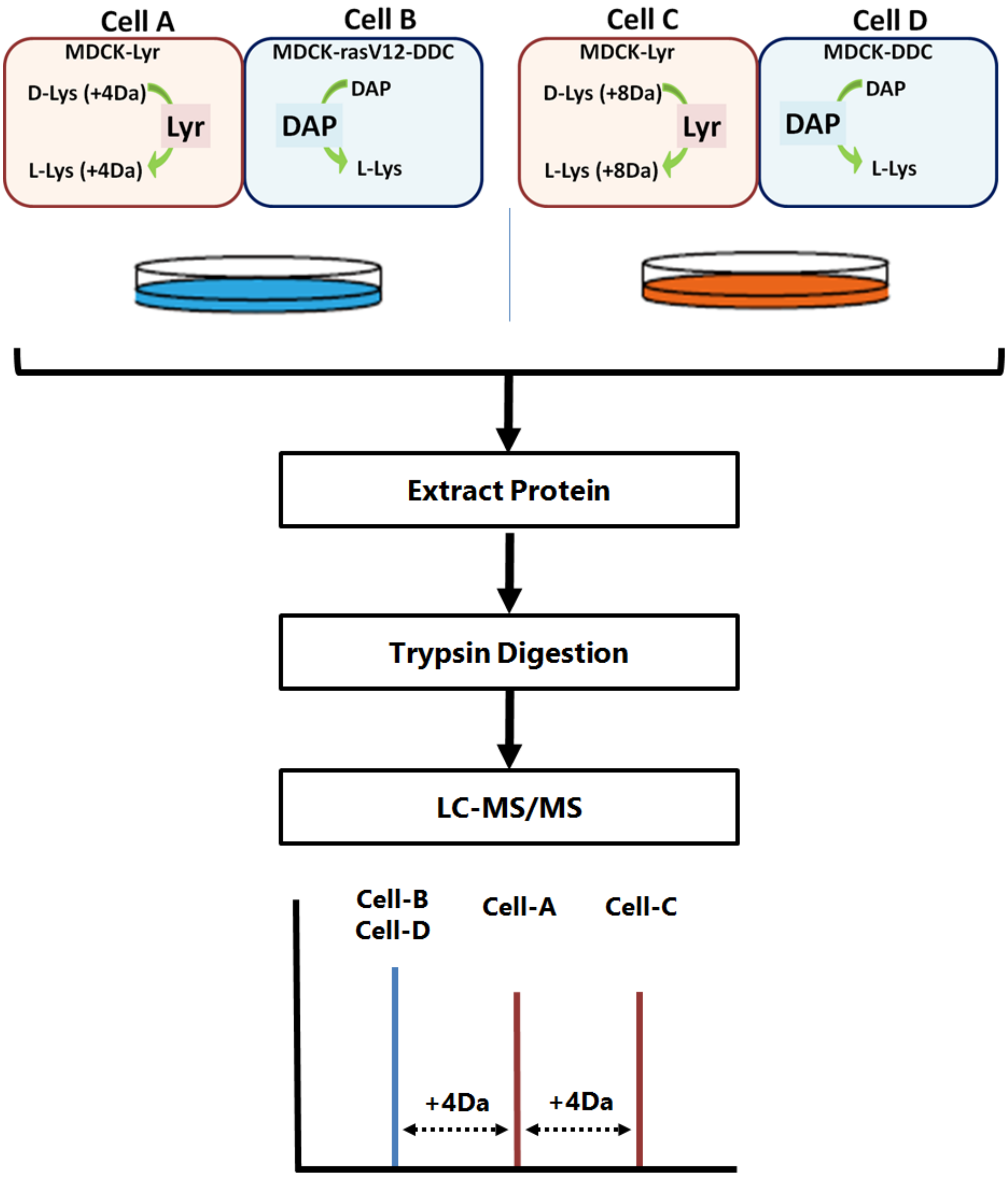


図 5.1-2　　CTAP 法を用いた正常細胞と変異細胞との相互作用に関与する分子の探索

CTAP 法を用いた正常細胞と変異細胞との相互作用に関与する分子探索の概略を示した．この図では，正常細胞側における変化分子のみを探索する場合を示した．MDCK-Lyr と MDCK-Ras-DDC を混合培養し，培地には d4-D-Lysine と DAP を加える．もう一方では MDCK-Lyr と MDCK-DDC を d8-D-Lysine と DAP を加えた培地で培養する．その後，SILAC 法と同様の分析法にて変動タンパク質を解析する．d4 ラベルされたタンパク質と d8 ラベルされたタンパク質を比較定量することにより，変異細胞との相互作用によって変動する分子を見分ける．

5.1.2　細胞

本試験で用いる細胞は以下の通りである

1) MDCK, MDCK-Lyr
2) MDCK-DDC
3) MDCK-pTR-GFP-RasV12-DDC (#9)

5.1.3　Diaminopimelic acid の分析

本分析に用いるジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ(Diaminopimelate decarboxylase)は meso-2.6-Diaminopimelic acid を L-Lysine に変換する酵素である。meso-2.6-Diaminopimelic acid は高額な試薬であるが，この試薬を長期間培養に用いるため多量に使用しなければならず，実験コストの上昇が懸念された。このため，安価な LL-, DD-及びメソ異性体の混合物である 2,6-Diaminopimelic acid を代用することを試みた。まず初めに，異性体混合物 2,6-Diaminopimelic acid 中の meso-2.6-Diaminopimelic acid の含有率を測定した。

LL-, DD-及びメソ異性体の混合物である 2,6-Diaminopimelic acid (33240, sigma)，及び meso-2.6-Diaminopimelic acid (07036, sigma)をミリ Q 水にて溶かし，1mg/ml 溶液をそれぞれ作製した。この溶液を HPLC 分析し，2,6-Diaminopimelic acid に含まれる LL-，DD-，meso-の含有比率をクロマトグラムの面積値より求めた。HPLC 分析は，Sumichiral OA-5000 カラム（4.6mm id X 150mm, 5μm, Sumika Chemical Analysis Service)を用い，2 mM CuSO4 (H2O : 2-propanol = 95:5)を流速 1 ml/min で送液するアイソクラティック分析にて行った[43]。分析量には 50μg を用い，検出は 254 nm の吸光度で測定した。

HPLC 分析のピーク面積より，2,6-Diaminopimelic acid 中の meso-2.6-Diaminopimelic acid 含有率は約 52％であった。この値により，2,6-Diaminopimelic acid に含まれる meso-2.6-Diaminopimelic acid の量を換算して今後の各種培養実験に用いることとする（図 5.1-3）。

[43] https://www.scas.co.jp/insrtuments-products-synthesis/hplc-column/sumichiral-database/pdf/G-28.pdf

a
b

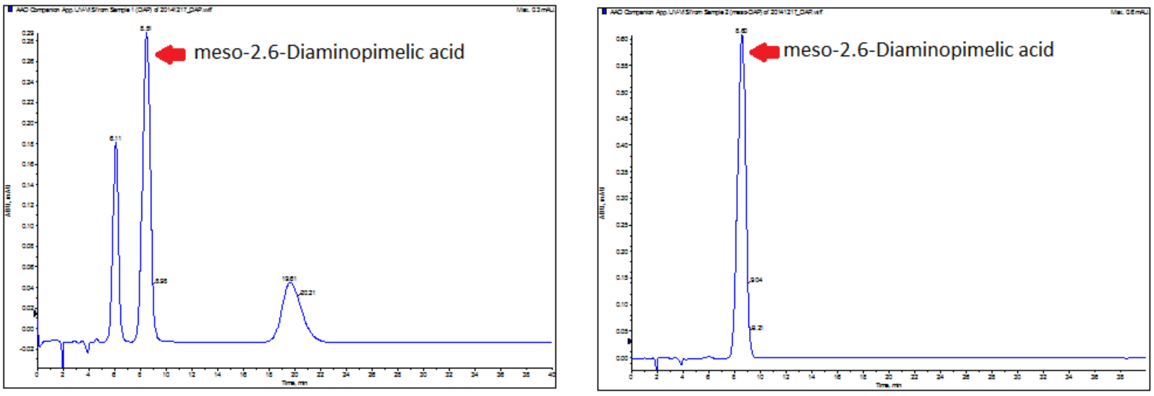


図 5.1-3　　　　　HPLC analysis of 2,6-Diaminopimelic acid

2,6-Diaminopimelic acid に含まれる meso-2,6-diaminopimelic acid の量を定量するため，HPLC を用いた異性体分離分析を行った． **a**. 2,6-diaminopimelic acid **b**. meso-2,6-diaminopimelic acid

2,6-diaminopimelic acid の分析から 3 本のピークが検出されたことより，2,6-diaminopimelic acid には 3 種類の既知異性体が含まれ，本分析にて分離が可能であることが示唆された．標準品の分析結果と照合の結果より，約 8 分に溶出されるピークが meso-2,6-diaminopimelic acid であり（赤矢印），このエリア値を元に含有量を算出した．

次に，混合 DAP を用いて MDCK-DDC 細胞が培養可能であることを確認した。SILAC medium に L-Arginine, Dialized FBS を加えたものに，meso-DAP 濃度を 5 mM, 10 mM, 25 mM の各濃度で 72 時間培養した細胞の数を測定した。混合 DAP を用いた場合は，meso-DAP 含有率より濃度を計算した。しかし，溶解度が限界に達したため，meso-DAP 含有濃度 25 mM の培地を混合ＤＡＰ試薬より作製することは出来なかった。5 mM 及び 10 mM においては，混合 DAP を用いた培地では細胞数が若干少ない傾向がみられたが，細胞の形態などに違いは観察されなかった（図 5.1-4）。これらの結果及びコスト面も考慮し，CTAP 解析には混合 DAP 試薬を用いることとした。

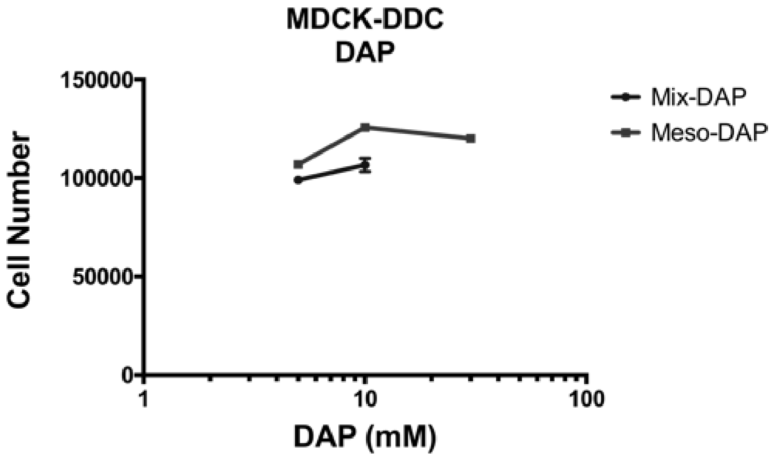


図 5.1-4　　　　　MDCK-DDC 細胞の増殖に対する混合 DAP の影響

MDCK-DDC 細胞の増殖あるいは維持に対する meso-2,6-diaminopimelic acid (Meso-DAP)あるいは 2,6-diaminopimelic acid (Mix-DAP)の影響を確認した. meso-2,6-diaminopimelic acid を含む 2,6-diaminopimelic acid を用いても MDCK-DDC 細胞は増殖することが可能であることが示唆された. データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±SD で表した.

5.1.4　各種細胞の増殖率の比較

本分析に用いる各細胞株の増殖率に違いが生じると，タンパク質発現を比較する上で問題が生じる。つまり，培養終了後に混合状態のままタンパク質を抽出するため，培養期間中に細胞数に違いが生じるとタンパク質発現の変動を捉えることが困難になるためである。そこで，各種細胞の増殖率を比較検討した。

培養条件は, DDC 発現細胞（MDCK-DDC 及び MDCK-Ras-DDC）は SILAC medium に L-Arginine, Dialized FBS，及び DAP を加えたものを培地として用いた。一方，Lyr 発現細胞（MDCK-Lyr）は，ILAC medium に L-Arginine, Dialized FBS，及び D-Lysine を加えたものを培地として用いた。DAP 及び D-Lysine の添加濃度は 10 mM に統一し，6 well plate に 1.5 x 10^5 cell/well となるように細胞を播種した。

播種後 24, 48, 72 時間後に細胞を固定し，核染色を行った後に Cell insight にて細胞数をカウントした（図 5.1-5）。各細胞は，それぞれの培地において培養すると継時的に細胞数の増加が認め

られたことより，L-Lysine 除去培地で持続的に生存し増殖することが確認された。また，細胞間での増殖率に顕著な違いはみられなかった。

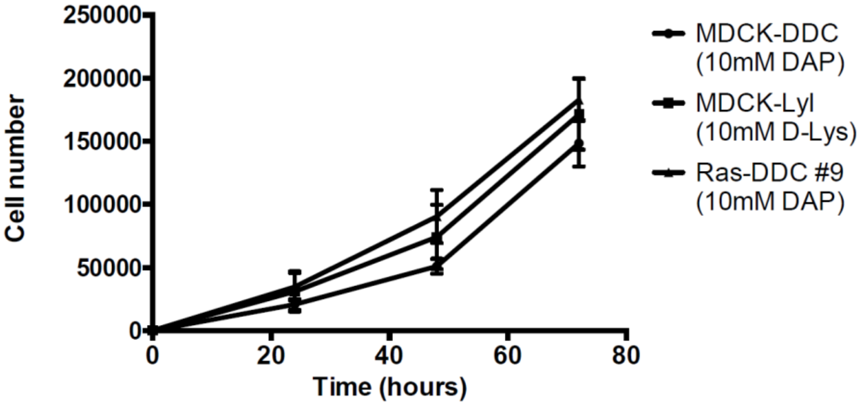


図 5.1-5　　　MDCK-Lyr, MDCK-DDC 及び MDCK-Ras-DDC の細胞増殖率

MDCK-DDC 細胞，MDCK-Lyr 細胞及び MDCK-Ras-DDC 細胞の細胞増殖における差異を検証した．各種細胞とも，それぞれの培地条件で時間依存的に細胞数の増加が確認された．また，細胞間での増殖率の違いも顕著なものではなく，有意な差は認められなかった．

MDCK-DDC 細胞（MDCK-DDC)及び MDCK-Ras-DDC 細胞（Ras-DDC #9)は 10mM DAP を添加した SILAC 培地にて培養した. MDCK-Lyr 細胞（MDCK-Lyr）は，10mM D-Lysine を添加した SILAC 培地にて培養した．データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±SD で表した．

5.1.5　安定同位体 D-Lisine 添加による MDCK-Lyr 細胞のラベル化

MDCK-Lyr 細胞は L-Lysine を含まない培地に D-Lysine を添加することで増殖可能であるが，D-Lysine が細胞増殖に使われていれば，安定同位体 D-Lysine を用いたタンパク質の断定同位体ラベル化が可能である。このことを確認するため，実際に安定同位体ラベル D-Lysine を用いて置換実験を行った。L-Lysine を含まない培地に重水素ラベルされた D-Lysine（d4-D-Lysine)を添加し，数日間継代培養ごとに一部の細胞を回収してタンパク質を回収した。方法は，トリプシン消化後に LC-MS/MS 分析を行い, 各ペプチドの Precursor ion のマスクロマトグラムのエリア値を測定し，同一配列のペプチドの d0-Lysine 含有ペプチド（d0-peptide）と d4-lysine 含有ペプチド（d4-peptide）

のエリア値を用いて計算した。置換率は,

Area (d4-peptide) ÷ [Area(d0-peptide) + Area(d4-peptide)]

により計算した。

分析の結果，MDCK-Lyr 細胞を L-Lysine 除去培地に d4-D-Lysine を加えた培地で培養すると，培養時間の経過と共に細胞内のタンパク質の Lysine が d4-L-Lysine に置換されることが確認された（図 5.1-6 a）。また，継代を重ねるごとに D4 ラベルリジンに置換が進み，5 継代目には置換率の分布は，中央値で 99.8%を示した。一方，正常型の MDCK 細胞を，Lysine 除去培地に d4-L-Lysine あるいは d8-L-Lysine を加えて培養する一般的な SILAC ラベルでの置換率を計算した（図 5.1-6 b, c）。d4-L-lysine を用いた置換での 5 継代目の置換率は，中央値で 99.9％となっていた。d8-L-Lysine を用いた場合は，5 継代目での置換率は 96.3％であった。このことから，CTAP 法によるアミノ酸置換率は, SILAC 法と同程度の置換効率があるものと示唆された。また, SILAC 法による d8-Lysine の置換率が，他の 2 つに比べて若干低い結果となった。再現性は未確認であり原因も不明であるが，今後 d8-L-Lysine をつかった SILAC 実験の際には置換率低下に留意することとする。

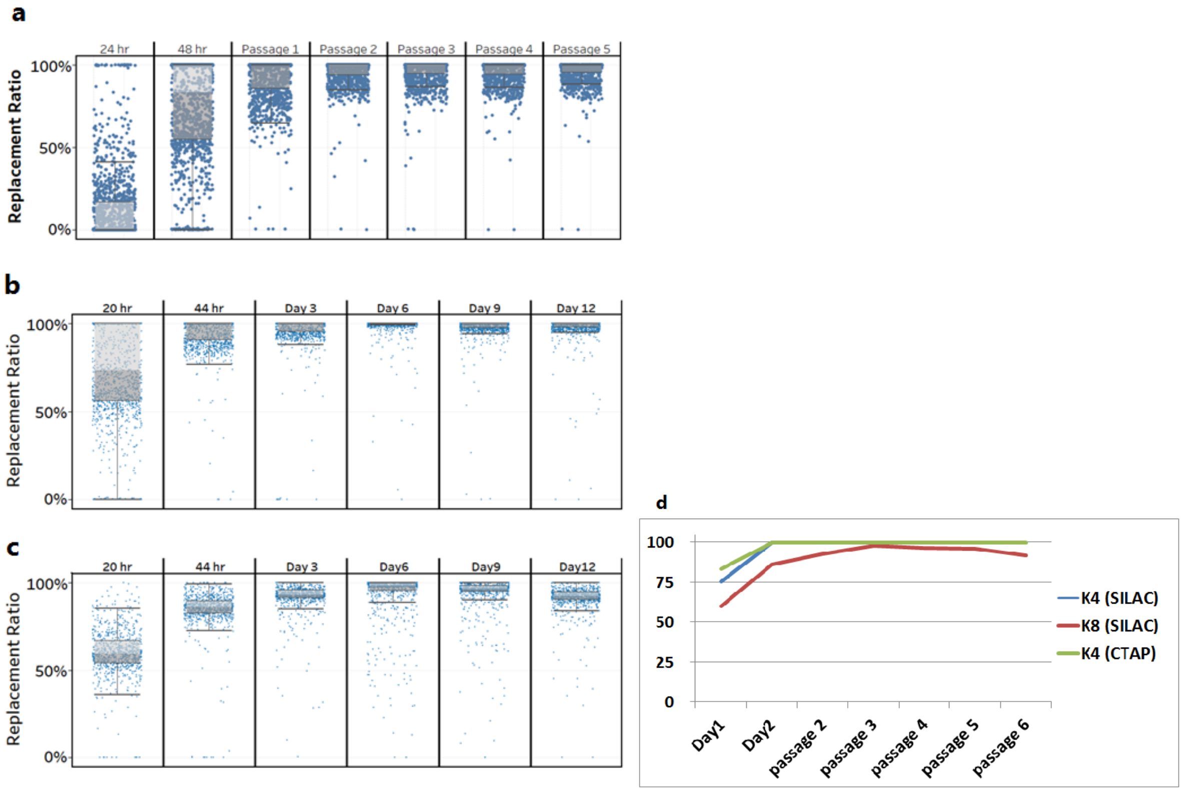


図 5.1-6　　安定同位体 D-Lysine による MDCK-Lyr 細胞のラベル化

安定同位体 D-Lysine を用いた MDCK-Lyr 細胞のラベル化を検討した． **a**. Lysine 除去培地に d4-D-Lysine を添加した培地を用い，MDCK-Lyr 細胞を培養した．一定の培養時間の経過ごとに細胞を回収し，細胞内タンパク質をトリプシン消化し，LC-MS により Lysine を含むペプチドを同定し同位体存在量を定量した．培養時間を経るにつれて細胞内タンパク質が安定同位体ラベルされていることが確認された． **b, c**. MDCK 細胞を SILAC 法でラベル化した際の，アミノ酸置換率の継時的変化を示した. d4-L-Lysine でラベルした場合と(**b**)，d8-L-Lysine でラベル化した場合(**c**)でラベル化効率に差がみられ，d8-L-Lysine のラベル達成率が若干低かった． **d**. 各ラベル効率の中央値の推移をグラフ化した. K4 は d4-L-lysine，K8 は d8-L-lysine を表す. SILAC ラベル法による K4 と CTAP ラベル法による K4 は高い置換率を達成したが，SILAC ラベル法による K8 は若干低い値であり，継時的にも低下する傾向がみられた.

a, **b**, **c** の dot は個別のタンパク質を表し，データの分散を 4 分位範囲による箱ひげ図で表した．また，本分析において繰り返し実験は実施していない.

5.1.6 MDCK-lyr 及び DMCK-DDC 細胞の MDCK 細胞に対する発現タンパク質の比較

MDCK 細胞に lysine racemase (Lyr)あるいは，Diaminopimelate decarboxylase (DDC)を発現させることにより，細胞内のタンパク質発現にどのような影響が生じるかを確認するため，iTRAQ を用いた発現変動解析を行った。

MDCK 細胞は，SILAC に準じた培養条件で行った。すなわち，SILAC medium に Dialized FCS, L-Arginine, L-Lysine, L-Proline を加えた培地にて培養した。MDCK-Lyr 細胞は，CTAP 培養の培地（SILAC medium に Dialized FCS, L-Arginine, D-Lysine, L-Proline）にて培養した。同様に，MDCK-DDC 細胞も CTAP 培養の培地（SILAC medium に Dialized FCS, L-Arginine, DAP, L-Proline）にて培養した。培養後に細胞を回収し，総タンパク質を抽出した。BCA プロテインアッセイにてタンパク質を定量後，各細胞抽出タンパク質溶液より 100 µg 相当量のタンパク質を用い，DTT 溶液で還元後に iodoacetamide 溶液でアルキル化し，トリプシンにて消化した。消化後のペプチドを 4-plex iTRAQ 試薬（AB Sciex）にてラベルした。各サンプルとラベル試薬との組み合わせは以下の通りである。

MDCK: iTRAQ-115

MDCK-Lyr: iTRAQ-116

MDCK-DDC: iTRAQ-117

ラベル後のサンプルを全て混合し，合計 300 µg 相当量のペプチド溶液とした。次に，HPLC によるペプチド分画を行った。分画には hSAX chromatography[44] (Hydrophilic Strong Anion Exchange chromatography）にて行い，15 画分のペプチド溶液を得た。次に，これらのペプチド画分を LC-MS/MS にて分析した。MS 分析は Orbitrap Fusion を用い，Synchronous Precursor Selection を利用した SPS -MS3 にてデータを取得した[45]。Orbitrap Fusion の設定は以下の通りである（表 5.1-1）。

---

[44] Ritorto, Maria Stella, et al. "Hydrophilic strong anion exchange (hSAX) chromatography for highly orthogonal peptide separation of complex proteomes." Journal of proteome research 12.6 (2013): 2449-2457.

[45] McAlister, Graeme C., et al. "MultiNotch MS3 enables accurate, sensitive, and multiplexed detection of differential expression across cancer cell line proteomes." Analytical chemistry 86.14 (2014): 7150-7158.

Ion Source Properties	**Nano Spray Ionization**
	Spray Voltage: 1800 (V), positive
	Ion Transfer Tube Temp: 250℃
MS Scan Properties	**Orbitrap, resolution: 120000**
	Scan Range: 400 - 1500
	RF Lens (%): 60
MS2 Scan Properties	**Quadrupole Isolation Window (m/z): 2**
	Activation: CID, CID Collision Energy: 35 (%)
	Detector type: Ion Trap, scan rate: rapid
Data dependent decision properties (MS2)	**Data dependent mode: Top Speed**
	Charge State: 2 - 7
	Dynamic Exclusion: Exclude after 1 time, 70 sec duration
	Intensity Threshold: 5.0e3
MS3 Scan Properties	**Synchronous Precursor Selection, Number of precursor: 10**
	Activation: HCD, HCD Collision Energy: 65 (%)
	Detector type: Orbitrap, Resolution: 60000
	Scan range (m/z): 100-500
Data dependent decision properties (MS3)	**Data dependent mode: Top N**
	Precursor selection range (m/z): 400-2000
	Isobaric Tag Loss Exclusion Properties: iTRAQ

表 5.1-1　　　　iTRAQ 分析に用いた Orbitrap Fusion の各種設定条件

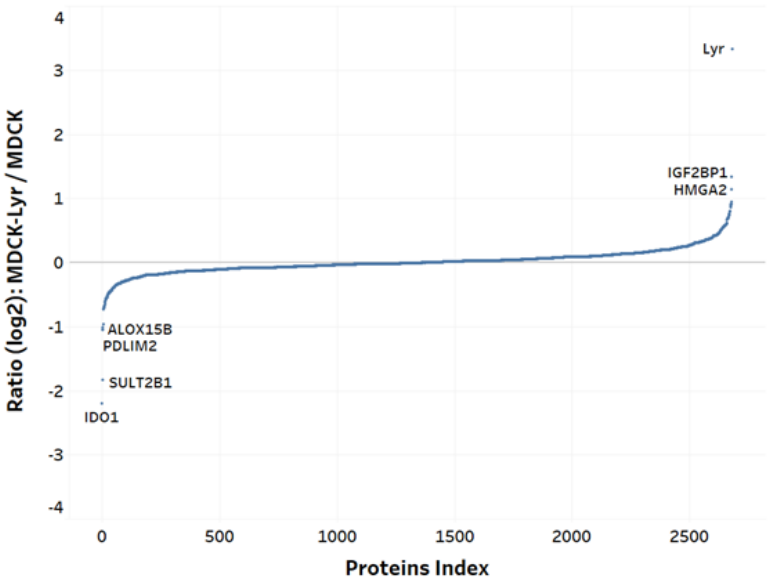
データ解析は Proteome discoverer 2.1 を用い，タンパク質同定は Mascot を使い，イヌ Uniprot proteome データベースに対して検索を行った。

iTRAQ 試薬を用いたことで，3 種類の細胞の相対定量が一度の分析で終了した。タンパク質の変動は，iTRAQ レポーターイオンの強度比を用いて相対的に比較定量することにより得られる。合計 2055 個のタンパク質が同定され，それぞれの変動について Scatter Plot 図にて表した（図 5.1-7）。MDCK-lyr 細胞で 2 倍以上発現が上昇しているものは 3 個，2 分の 1 以下に減少しているものは 5 個，また MDCK-DDC 細胞で発現が上昇しているものは 9 個，減少しているものは 7 個であった。MDCK 細胞と比較して最も発現が高いタンパク質は，MDCK-Lyr 細胞では Lysine Racemase (Lyr）であり，MDCK-DDC 細胞では Diaminopimerate decarboxylase（DDC）であった。しかも，この 2 つのタンパク質のタンパク質は他のタンパク質の変動よりも際立った高い値を示していた。DDC あるいは Lyr に比べて変動率は低いが，他に変動するタンパク質も数個確認された。これらのタンパク質の変動が，リジン除去培地にリジン前駆物質を加えた培地という特殊な条件によるものか，あるいは DDC もしくは Lyr タンパク質が発現したことによる影響なのかは分からない。少なくとも，リジン欠乏によるアミノ酸枯渇刺激で影響を受けたと考えられるタンパク質発現量の変化は確認できなかった。変動タンパク質の中で，COX2 の上昇と ALOX15B の減少がみられ

た。この 2 つのタンパク質はアラキドン酸代謝に関わる酵素であるため，これは何らかの脂質代謝に変化を示すものかもしれない。しかし，今回の分析のサンプルは 1 ロットであり，データの再現性あるいは検証実験は行っていないため，これらのタンパク質の変動が有意なものかも不明である。よって，これらのタンパク質の変動を議論するには，さらに検証が必要である。

変動率と変動タンパク質の少なさから，CTAP 解析用の細胞株は親株の MDCK 細胞と大差ないものと考えられる。また，今回の解析で得られた情報は，競合培養による変動因子の探索の際に，バックグラウンドでの発現変動リストとして利用することが可能で，これは偽陽性タンパク質候補を低減させることに対して有用である。

a



b

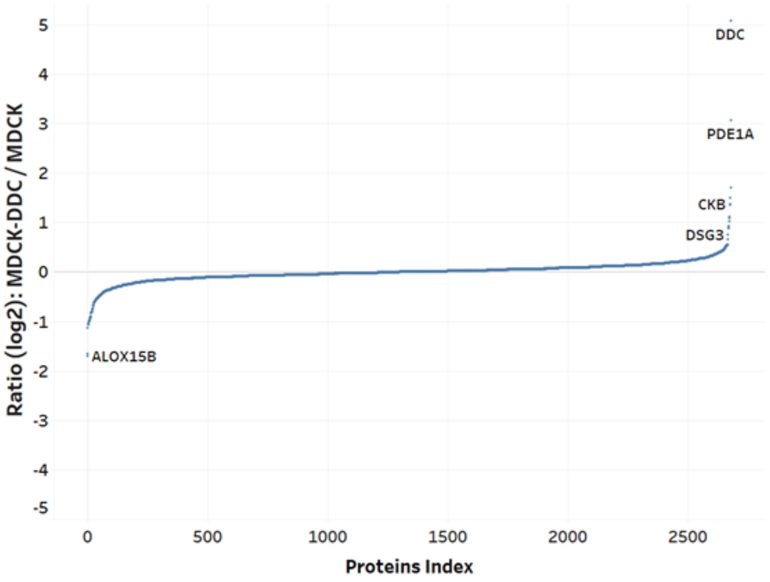


図 5.1-7　　　　　Lyr あるいは DDC 発現による MDCK 細胞への影響

CTAP 解析のために新たに樹立した細胞株の特性や，CTAP 培養条件による影響の程度を調べるため，タンパク質の発現量解析を行った．SILAC 培養における MDCK 細胞と比べ，CTAP 培養下での MDCK-Lyr (**a**)，あるいは MDCK-DDC (**b**) において顕著に変動するタンパク質は Lyr 及び DDC であった．その他，変動するタンパク質がいくつか検出された．本分析においては，繰り返し実験は実施していない．

5.1.7　MDCK-Lyr 及び MDCK-RasV12-DDC を用いた細胞競合現象の確認

正常 MDCK 細胞と，MDCK-rasV12 細胞を混合培養すると，変異 ras タンパク質の発現誘導に伴い，正常 MDCK 細胞層から変異 ras 発現が追い出されるような細胞競合現象が生じることが知られている。今回作製した，MDCK-lyr 細胞と，MDCK-rasV12-DDC 細胞との間でも，この細胞競合現象が保存されているかどうかを確認した。GFP を発現させた変異 Ras 発現細胞の apical extrusion を共焦点顕微鏡で観察したところ，MDCK-rasV12-DDC 細胞 (clone #9)でも細胞競合現象が確認された（図 5.1-8 a）。この apical extrusion の割合を定量したところ，MDCK 細胞と MDCK-Ras 細胞との相互作用においては 55.2% であったのに対し，MDCK-Ras 細胞を MDCK-Lyr 細胞が取り囲む場合の離脱は 52.3%であった（図 5.1-8 b）。これは，MDCK 細胞と同様に，MDCK-Lyr 細胞も隣接する変異細胞を認識し, 頭頂側に排除する機構が保存されていることを示唆するものである。また，MDCK-Ras-DDC 細胞を MDCK-Lyr 細胞が取り囲む場合は 55.7%であった（図 5.1-8 b）。このことから，これまで知られていた MDCK 細胞と MDCK-Ras 変異細胞との間に生じる細胞競合現象が, MDCK-Lyr 細胞と MDCK-Ras-DDC 細胞との間でも同程度に起こることが確認された。この結果より，MDCK-lyr 細胞と MDCK-rasV12-DDC 細胞を用いて細胞競合関連因子を探索することは可能であると考えられる。

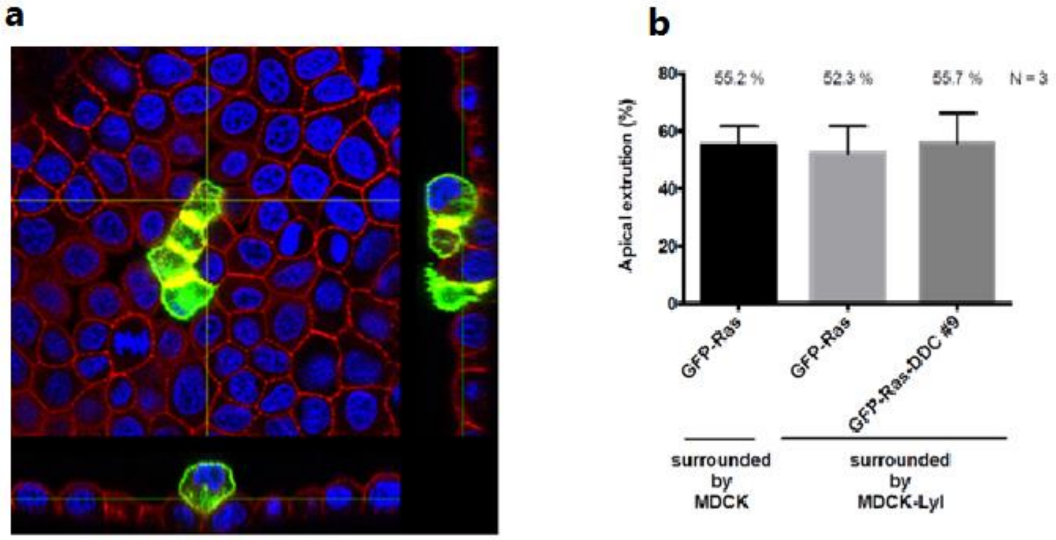


図 5.1-8　　　　CTAP 細胞による細胞競合現象の確認

a. CTAP の培養条件下において，正常細胞と変異細胞との相互作用の程度を確認した. MDCK-Ras-DDC 細胞を MDCK-Lyr 細胞が取り囲んだ際に，MDCK-Ras-DDC 細胞の上皮様細胞層から頭頂側への離脱が確認された. MDCK-Ras-DDC が発現する GFP を緑色，核を青色，F-actin を赤で表示した. **b**. 頭頂側へ離脱する変異細胞の割合を検証した。MDCK 細胞が MDCK-Ras 細胞 (GFP-Ras)を取り囲む際に離脱する変異細胞の数は 55.2% であったのに対し，MDCK-Ras 細胞を MDCK-Lyr 細胞が取り囲む場合の離脱は 52.3%，MDCK-Ras-DDC 細胞 (GFP-Ras-DDC-#9)を MDCK-Lyr 細胞が取り囲む場合は 55.7%であった. データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±SD を表す.

5.1.8　混合培養における細胞選択的ラベル化の確認

MDCK-DDC 細胞あるいは MDCK-rasV12-DDC 細胞は，DAP を含む L-Lysine 除去培地で増殖維持が可能であった。また，MDCK-lyr 細胞は，D-Lysine を含む L-Lysine 除去培地で増殖可能であり，その際に重水素 D-Lysine を用いることで細胞内タンパク質のラベル化が可能であることを示した。次に，これらの 2 種類の培養を混合条件で行った場合，安定同位体ラベルが細胞選択的となるかどうかを検証した。このことを検証するために，各細胞に選択的に発現しているタンパク質のラベル状況を分析した。MDCK-Lyr 細胞と MDCK-Ras-DDC 細胞を混合培養したとき，Lyr

(Lysine Racemase)はMDCK-Lyr細胞にのみ発現しており，MDCK-Ras-DDC細胞では作られない。同様に，MDCK-Ras-DDC 細胞特異的に発現しているタンパク質は，Ras，DDC (diaminopimerate decarboxylase), GFPの3種類である。MDCK-Lyr混合培養DDC発現細胞がDAPからのみL-Lysineを合成し，そのL-Lysineのみを使って細胞内タンパク質を作る状況になっていれば，DDCタンパク質はLightラベル（d0-lysine)のみとなっているはずである。また同様に，LyrはMDCK-Lyr細胞より産生されているLysine RacemaseによりD-lysine由来のL-Lysineのみを使って作られている状況であれば，Mediumラベル(d4-lysine)あるいはHeavyラベル（d8-lysine）となっているはずである。まとめると，Lyrは安定同位体ラベル産物のみ，Ras，DDC，GFPは非ラベル産物のみとなれば，細胞選択的ラベル化が達成されていることになる。

細胞選択的ラベルの検証実験は，以下の通り実施した。まず，MDCK-Lyr細胞はd4-D-Lysineを含むL-Lysine除去培地にて5継代培養し，細胞内のタンパク質を安定同位体ラベルした。次に，MDCK-Lyr細胞とMDCK-rasV12-DDC細胞を同じ個数で播種し，モノレイヤー形成培養を経てテトラサイクリンによるRas変異タンパク質の誘導を行った。この培養はd4-D-LysineとDAPを添加したL-Lysine除去培地にて行った。誘導開始から12時間後より無結成培地に交換し，その後の12時間の培養期間中に分泌されるタンパク質及び細胞を回収した。回収したタンパク質はトリプシン消化後にLC-MSにて分析した。LC-MSによる分析は，SILAC分析の条件に準じた。細胞選択的に発現している4つのタンパク質（Lyr，DDC，GFP，RAS）のラベル状況から，細胞選択的ラベル状況を検証した。抽出したタンパク質は通常の方法で還元アルキル化後にトリプシン消化し，LC-MS/MSにて解析した。

分析の結を図 5.1-9に示した。まず，LyrタンパクMDCK-Lyrにのみ発現するタンパク質で，MDCK-Ras-DDCには発現していない。よって，MDCK-Lyr細胞内のタンパク質はLyrによって変換されたd4-L-Lysineのみを用いて合成されるはずである。しかし，Lyrタンパク質の約40%程度は安定同位体を含まないものであった（図 5.1-9 a）。また逆に，DDC, RAS, CFPはMDCK-Lyr には発現していないタンパク質であるため，これらのタンパク質は安定同位体ラベルされることはないはずである。しかし，これらのタンパク質由来のペプチドには20～30%程度の安定同位体リジンが含まれていた（図 5.1-9 b, c, d）。同様の実験をd8-D-Lysineを用いて行ったが，同

様の結果であった。以上より，本実験での安定同位体による細胞のラベル化は，細胞選択性が低いものであると言える。この状況では，当初計画した正常細胞と変異細胞との相互作用により変動するタンパク質の探索は不可能であると判断した。

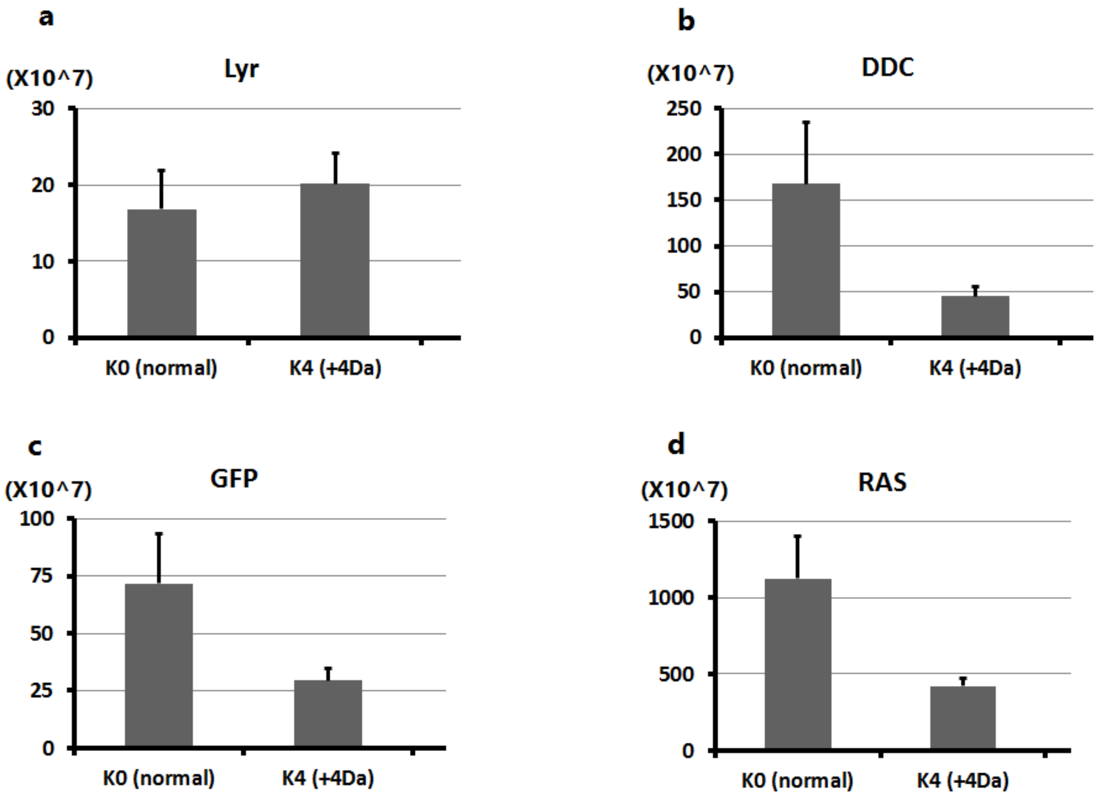


図 5.1-9　　CTAP による細胞選択的ラベル化効率の確認

CTAP 培養条件による細胞選択的ラベルの確認を行った. Lysine を含まない培地に d4-D-Lysine 及び DAP を添加し，MDCK-Lyr 及び MDCK-Ras-DDC を混合して播種した. 12 時間後に tetracycline を加え，その 12 時間後に無結成培地に交換してから 12 時間後に細胞を回収した. K0 (normal)は通常のリジンを含むペプチド，K4 (+4Da)は d4-リジンを含むペプチドである. 定量は，LC-MS にて得られたペプチドのマスクロマトグラムのエリア値を用いた. データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±SD を表す.

a. Lyr (lysine racemase) 由来ペプチド CIGVTNNQELK **b**. DDC (diaminopimelate decarboxylase)由来のペプチド DVVGEFGPEK **c**. GFP (green fluorescent protein)由来のペプチド GEELFTGCCPILVELDGDVNGHK **d**. RAS 由来のペプチド TGEGFLCVFAINNTK

a. K4 (+4Da)の値が細胞選択的ラベル，K0(normal)が非選択的ラベルの量を表す. **b**, **c**, **d** K0 (normal)が細胞選択的ラベル，K4 (+4Da)が非選択的ラベルの量を表す.

5.2　本章の小括

形質の異なる細胞同士が組織の中で共存すると，何らかの相互作用が生じる。その際に，どのような分子が関与し，その分子作用機序がどのようになっているのかを明らかにすることは高次機能の解明には重要である。タンパク質解析においては，質量分析器の発達により網羅的な解析が多く行われるようになったが，従来のアプローチでは形質の異なる細胞集団の特定細胞の変化を捉えることは不可能である。そのため近年，細胞選択的な解析手法がいくつか開発され，細胞集団の中の特定の細胞内での変化を捉えることが可能になった。その中でも CTAP 法に着目し，正常細胞と変異細胞の混合培養系に応用することで変動分子を同定することを目指した。

細胞競合現象が確認されている MDCK 細胞の実験系を元に，CTAP に必要な酵素を発現する細胞株を樹立した。樹立した細胞は，リジン前駆物質により細胞の特性が維持されること，および安定同位体ラベルのリジン前駆物質により細胞内タンパク質のリジンが安定同位体リジンに置き換わることを確認した。これらの検討の結果，細胞選択的ラベルが達成できれば混合培養条件下での分子スクリーニングが可能になると判断した。

そこで，実際に異種細胞の混合培養における CTAP 解析を実施したが，細胞選択的なラベル効率が悪く，既報通りの結果が得られなかった。この結果より，網羅的タンパク質変動解析には適さないと判断し，正常細胞と変異細胞の混合培養条件下での変動分子を同定することは行わなかった。その原因について考察したい。

細胞選択的ラベルが上手くいかない原因は，大別して２つの理由があると思われる。一つは細胞間でのアミノ酸の移動に関することである。細胞間でのアミノ酸の移動経路は，細胞接着面における Gap junction を通って移動することが考えられる[46]。しかし Gap Junction を通って大量のアミノ酸（リジン）が流通しているのかについては不明であり，また CTAP の原著論文にも 1 週間の長期培養での懸念点としてのみ考察されている。また，Gap Junction の阻害剤を添加することも防止策として考えられるが，Gap Junction 阻害の他への影響を考慮すると，阻害剤の利用は好まし

[46] Hervé, Jean-Claude, and Mickaël Derangeon. "Gap-junction-mediated cell-to-cell communication." Cell and tissue research 352.1 (2013): 21-31.

くない。また, Gap Junction 以外の経路としては培地中へのアミノ酸放出と取り込みの経路である。アミノ酸を輸送するトランスポーターは，選択的あるいは非選択的も含め，多くのトランスポーターが知られており[47]，双方向輸送である。このため，アミノ酸トランスポーターの阻害剤は，アミノ酸枯渇による増殖阻害や細胞機能維持低下を引き起こすため，細胞選択的ラベル率向上のための手段としては使えない。また，トランスポーター経路以外にも，分泌小胞中に含まれるアミノ酸も培地への漏出経路の一つである。培地中にどの程度のリジンが放出されているのかについては，DL-Lysine 分析を質量分析装置を使った検出により判定可能と考えられるため，今後の改善策については細胞選択的ラベル率低下の原因がアミノ酸漏出によるものかどうか判断することが必要である。

もう一つの原因はアミノ酸変換酵素の細胞外への分泌に関する懸念である。アミノ酸前駆体変換酵素は細胞内においてのみ働かなければならない。すなわち，Lyr や DDC が培地中に放出されると，培地中でリジンが産生されて両方の細胞に取り込まれる。このことを防ぐため，Lyr 及び DDC には KDEL 配列をもたせ，細胞内に留まらせるよう試みていた。今回のラベル実験において，培養上清画分についても LC-MS によるタンパク質分析を行ったところ，培養上清画分において Lyr 及び DDC の存在が確認された。これについてはさらに検証が必要であるが，このことが細胞選択ラベル効率低下の原因として，現在最も可能性が高いと推察される。

これまで，CTAP 法を用いて解析された事例は極めて少ない。これまでに CTAP 法によって解析された論文は 3 報で，それに使われた細胞は，C3H10T1/2 (mouse embryo fibroblast), MDA-MB-231 (Human Breast Adenocarcinoma), HEK293T(Human Embryonic Kidney), 3T3(mouse embryo fibroblast), PDA (Human Pancreatic ductal adenocarcinoma), PSC (Human Pancreatic Stellate) 細胞である。この事例で汎用性の高さを議論することは難しいが, 少なくとも今回行った MDCK 細胞では, 何らかの原因により細胞選択的ラベルを達成することができなかった事例となった。CTAP 法は, 遺伝子発現細胞株を準備しなければならないが，細胞間の相互作用分子をスクリーニングするには原理的に優れた方法であるため，今後の技術発展に期待したい。

---

[47]金井好克：多選択性アミノ酸
トランスポーター ファミリー：LAT ファミリー. 蛋白質 核酸 酵素 46：629

6　　第５章　総括

上皮組織において変異細胞が出現すると，それを取り囲む周辺の正常細胞との間に新たな相互作用が生じる。すなわち，自らの生存空間の確保や生存競争が生じ，どちらかがもう一方を細胞死へと誘導したり，あるいは存在領域からの排除を行ったりする現象がみられる。この現象は，それぞれが単独で生存している場合には起こらない細胞非自律的な現象であり，細胞競合と呼ばれている。この細胞競合によって敗者となった細胞は組織より排除され，勝者はその生存空間を確保することになる。例を挙げると，正常上皮細胞の中に RasV12 変異をもつ形質転換細胞が生じると，変異細胞は頭頂側に押し出され，上皮層から離脱していく。この現象の分子作用機序については。これまでにいくつかの研究が行われてきたが，多くは断片的あるいは局所的であり，まだ不明な点が多く残っている。この作用機序を明らかにするためには，まだ明らかになっていない多くの関与分子を見出し，それらを検証しながらつなぎ合わせなければならない。そこで本研究では，正常細胞と変異細胞との相互作用に関連する分子を探索するため，リン酸化タンパク質と分泌タンパク質の網羅的解析を行った。SILAC 法を応用した手法により，正常細胞と変異細胞について，単独培養状態と，混合培養状態を比較することが可能になった。その結果，リン酸化タンパク質の解析からは AHNAK2 が見いだされ, 分泌タンパク質の解析からは ADAMDEC1 が見いだされた。共に，その機能がほとんど調べられていない新規性の高いタンパク質であった。AHNAK2 においては，そのリン酸化部位特異的抗体を用いた免疫染色により，変異細胞に隣接する正常細胞内でリン酸化が亢進することが確認され，今後は詳細な機能解析研究へと進むことが期待されている。また，ADAMDEC1 については，shRNA によるノックダウン細胞を使った実験より，変異細胞との混合培養条件下で正常細胞側から遺伝子レベルで発現が上昇していることが明らかになった。さらに，ADAMDEC1 は filamin や EPLIN の集積にも影響を与える上流分子であることも明らかになった。これらの結果より，EDAC の分子作用機序の一面が明らかになったものと言える。このように，本研究で用いた SILAC 法を応用した分子解析は，混合培養という特殊な条件下でも関連分子を見出すことが可能であり，その結果，全く事前に予期できないような分子との関連性を発見できる魅力的な方法である。この種の網羅解析技術を高め，効果的に用いる

ことで，今後も作用機序解明の研究に新たな突破口が開いていくものと考える。

本研究では一定の成果を得ることができた SILAC 法ではあるが，しかしながら混合培養に対して理想的な解析法とは言い難い。すなわち，混合培養下において変化を呈する細胞を見分けることが出来ないためである。そこで，近年報告された，混合培養下で実施可能な新しいタンパク質解析法である CTAP 法を構築し，その実用性を評価した。CTAP 法は，細胞を直接アミノ酸でラベルするのではなく，アミノ酸前駆物質を用いてラベルする。前駆物質の変換酵素をもつ細胞だけが生き残り，ラベルされるという細胞選択的な方法であり，まさに混合培養系においては画期的な手法である。この手法を EDAC メカニズム解明に応用するため，解析系の構築を行った。注意深く事前の検討実験を行い，混合培養下での細胞選択的ラベル実験をおこなったが，細胞非選択的なラベルが一定の割合で生じていることが判明したために探索分析を中断した。残念ながら，本研究では CTAP 法が上手くいかなかった原因を解明することは出来なかったが，この新規手法は混合培養下での分子探索に極めて魅力的な方法であるため，確立に向けた努力は継続すべきと考える。

現在の日本において，国民の死亡率第一位の疾患は悪性新生物，いわゆる「がん」である。がんへの有効的な対策は，早期に発見し，早く治療を開始することだと言われている。しかし，早期発見に関しては現在も非常に困難なケースが多い。その一因は，がんの有効な診断法の不足である。特に，血液や尿といった比較的容易に生体より採取可能な検体から判別可能な，分子マーカー開発が進んでいない。このことを解決するため，多くのバイオマーカー探索研究が行われているが，実際に有用性を証明できた新規診断マーカーは極めて少なく，マーカー探索研究に対しても新しいアプローチが必要であると思われる。本研究を通じて，変異細胞を取り囲む正常細胞において誘導され，分泌されるタンパク質と，リン酸化が亢進するタンパク質を見出すことができた。正常細胞集団の中から変異細胞が発生するという状況は，がんのステージに例えると極めて初期の段階にあると言える。この現象において変動する分子を見出すことはがん発生初期を捉えることが可能な分子マーカーになる可能性があると考えられる。一方で，近年では早期治療のみならず，がんの予防に対する注目も高まっている。実際に近年では，がん遺伝子の変異による診断に基づき，癌発症前に予防的な外科手術を施す事例がある。さらには，ウイルス感染とがん

発症の関連性の高いものについてはワクチン接種による感染防止及び発癌予防が行われるようになった。さて，本研究は正常細胞が変異細胞を取り囲み排除するという防御機構に関するものである。正常細胞による変異細胞の検知と排除機能を制御することができれば，新たな早期治療やがん予防へと発展するかもしれない。このようなことから，今後 EDAC 機構に関する研究が増々重要になってくるだろう。

7　謝辞

本研究にあたり，研究の機会を与えてくださり，また終始情熱をもってご指導頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子腫瘍分野　藤田恭之　教授に，心底より感謝申し上げます。

本研究にあたり，多くのご助言とご支援を賜りました，北海道大学遺伝子病医学研究所分子腫瘍分野の皆様に，厚く御礼申し上げます。

また，このような素晴らしい学びの機会をご許可くださった，大塚製薬株式会社基盤技術研究所　菱垣晴次　所長に深く感謝いたします。さらに，日頃の研究業務を支えてくださった質量分析グループメンバーに厚く御礼申し上げます。

最後に，この研究へと導いてくださった故　森　豊樹　博士に深い感謝の意を捧げます。