



Title	がん細胞が腫瘍微小環境に与える影響とそのメカニズムの解明
Author(s)	堀川, 芽衣
Description	配架番号 : 2727
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14980号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14980
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96903
Type	doctoral thesis
File Information	HORIKAWA_Mei.pdf



学 位 論 文

がん細胞が腫瘍微小環境に与える影響とそのメカニズムの解明

(Studies on the effect of cancer cells on the tumor
microenvironment and its mechanisms)

2022年3月

北海道大学

堀川 芽衣

学 位 論 文

がん細胞が腫瘍微小環境に与える影響とそのメカニズムの解析

(Studies on the effect of cancer cells on the tumor
microenvironment and its mechanisms)

2022年3月

北海道大学

堀川 芽衣

目 次

1. 発表論文目録および学会発表目録	1 頁
2. 要旨	2 頁
3. 略語表	5 頁
4. 緒言	7 頁
5. 第一章：腫瘍微小環境の酸性化に寄与する腫瘍関連酵素 CAIX の発現 および局在の制御に関する解析	
5.1 緒言	10 頁
5.2 方法	13 頁
5.3 結果	24 頁
5.4 考察	38 頁
6. 第二章：腫瘍微小環境の糖枯渇に起因する細胞間代謝協調に関する解析	
6.1 緒言	42 頁
6.2 方法	50 頁
6.3 結果	60 頁
6.4 考察	79 頁
7. 結論	83 頁
8. 謝辞	85 頁
9. 利益相反	85 頁
10. 引用文献	86 頁

1. 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Mei Horikawa, Hisataka Sabe, and Yasuhito Onodera
Dual roles of AMAP1 in the transcriptional regulation and intracellular trafficking of carbonic anhydrase IX
Translational Oncology
15(1), 101258 (2021)
2. Mei Horikawa, Hisataka Sabe, and Yasuhito Onodera
Strategies for all-at-once and stepwise selection of cells with multiple genetic manipulations
Biochemical and Biophysical Research Communications
582, 93-99 (2021)

2. 要 旨

【背景と目的】がん細胞では糖代謝が異常に亢進しており、それに伴い微小環境は糖が枯渇し酸性化する。腫瘍内の糖枯渇と酸性化は免疫逃避や薬剤・放射線への耐性を惹起し、がん治療の奏功を妨げる。一方、これらの厳しいストレスに対し、がん細胞は様々な応答を介して生存性を維持するが、そのメカニズムには不明な点が多い。本研究では、がん細胞の生存性を抑制すると同時に腫瘍微小環境を治療に望ましい条件に適正化する方法の導出を目的として、がん細胞の糖枯渇および酸性化への耐性メカニズムの解明を試みた。

糖代謝で生じた乳酸などの代謝産物は微小環境を酸性化する。がん細胞は様々な分子により内部 pH を維持するが、このうち Carbonic Anhydrase IX (CAIX) は細胞膜に局在する腫瘍特異的酵素であり、悪性度や予後不良のマーカーとして用いられる。CAIX が細胞内のアルカリ化に寄与することで、がん細胞は生存や増殖を続けながら細胞外をより酸性化する。CAIX の転写が HIF-1 に制御されることは知られているが、CAIX の局在制御に関する知見は得られていない。CAIX は細胞表面で機能することを考慮すると、その局在制御機構の解明は腫瘍微小環境の酸性化を是正するための方法論に繋がると期待される。以上の背景から、本研究では小胞輸送による CAIX の局在制御について解析した。

また、腫瘍内では血管からの距離の違いやがん細胞の糖代謝亢進により糖濃度の不均一性が生じ、深部ではしばしば糖が枯渇する。培養環境下での糖枯渇はがん細胞を短期間で死滅させることから、腫瘍内の糖欠乏細胞は何らかの仕組みにより生存すると推測される。他の細胞の代謝産物を利用して生存性を維持する「代謝協調」は、糖を含む種々の栄養素の欠乏に対する腫瘍全体の応答として近年注目されているが、メカニズムの全容は不明である。糖枯渇は免疫細胞の機能を減弱させることが知られており、薬剤や放射線の効果にも影響すると考えられている。上記と同様に、糖枯渇への応答機構の解明は、腫瘍の成長を抑制しながら微小環境を是正するための方法論の確立に必須である。以上の背景から、本研究では腫瘍内の糖枯渇が惹起する代謝協調の媒介因子を解析した。

上記の解析には、局所的な糖枯渇を培養系で再現する必要がある。そこで本研究では、細胞特異的に糖代謝を制御できる新たな実験系を確立した。これには 2 種類の遺伝子構築の導入を要するが、加えて種々の遺伝子の発現調節などを行う場合を想定すると、3 種類以上の遺伝子構築の導入が必要となる。それら全てが導入された細胞を高効率に選択するための手法が以降の解析に必須となると考え、ピューロマイシン耐性遺伝子 puromycin-N-acetyltransferase (PAC) に基づく「分割型薬剤耐性マーカー」の開発を試みた。

【材料・方法と結果】先行研究に基づき、 $\beta 1$ -integrin の輸送に関与する AMAP1 が CAIX の局在を制御する可能性を見出した。免疫沈降により AMAP1 が CAIX と同一の複合体に含まれること、siRNA による AMAP1 の発現抑制は CAIX の発現量を著明に減少させることを確認した。またビオチン標識試薬等を用いた解析から、AMAP1 の発現抑制は CAIX の細胞表面量を顕著に減少させることも確認した。阻害剤を用いた解析から、AMAP1 の発現抑制は CAIX のリソソームへの輸送とタンパク質分解を誘導することが示唆された。AMAP1 による CAIX の輸送制御には PRKD2 が関与すること、また予想外の結果として、AMAP1 は PIAS3 と HIF-1 α を介して CAIX の転写を促進することが示唆された。以上の結果は複数の乳癌細胞株を用いた解析や、乳癌患者の遺伝子発現データベースの解析により支持された。

「分割型薬剤耐性マーカー」は複数の異なる split-intein によるタンパク質間スプライシングを利用して確立した。異なる箇所 PAC を分割して split-intein を付加し、赤色または緑色の蛍光タンパク質をバイストロニックに発現するベクターに組み込み、対となる N 末側/C 末側断片を細胞に同時導入してピューロマイシンで選択した。選択後の細胞で、赤色・緑色蛍光タンパク質の同時発現効率と、異なるピューロマイシン濃度下での増殖率を解析した。分割点の違いにより、前者に差異は無く、後者には大きな差異が見られた。「最適分割点」は高濃度のピューロマイシン存在下で高い増殖率を示すものとした。以上を各 split-intein で解析し、各々の最適分割点を組み合わせて「多分割型 PAC 遺伝子」を作成した。これにより、最大 4 つの遺伝子構築について、全てが導入された細胞をピューロマイシン単独で選別することが可能となった。

細胞特異的な糖代謝制御は、哺乳類で代謝されない「グルコース前駆体」に特異的な輸送体と、その前駆体をグルコースに変換する代謝酵素を細胞に発現させることで可能となった。グルコース不含培地に当該前駆体を加えると、それらの輸送体・代謝酵素を発現する細胞のみが解糖系代謝を行う。このシステムを SIGHT (selective incorporation of glucose via hydrolysis after transport) と名付けた。これらの輸送体・代謝酵素を上述の新規薬剤マーカーを利用してがん細胞に高効率で発現させると、当該前駆体を含むグルコース不含培地で生存・増殖が維持された。SIGHT を発現しない親株細胞は、この条件下で死滅した。このシステムを用いて、単一の培養器具中で糖充足細胞と糖欠乏細胞を共存させると、後者の細胞も生存すること、すなわち「代謝協調」が再現できることを確認した。代謝産物解析から、後者の細胞では解糖系代謝が著しく抑制されるが、エネルギーや酸化還元状態は維持されることが示唆された。現在、糖充足状態の細胞に由来する (グルコース不含の) 馴化培地を用いて、糖欠乏状態の細胞が利用する代謝産物の同定を進めている。

【考察と結論】上述の結果から、AMAP1はPRKD2を介してCAIXと複合体を形成し、 $\beta 1$ -integrinと同時にCAIXの輸送を制御することが示唆された。また、AMAP1はPIAS3とHIF-1 α を介してCAIXの転写を制御することが示唆された。これらはいずれもCAIXのタンパク質発現量を正に制御し、腫瘍微小環境の改変に寄与することが示唆される。両者の間に何らかのフィードバックが働いているか否かは興味深く、今後解明すべき課題である。

新たな選択法により確立したSIGHT導入細胞は、糖濃度の不均一性に基づく代謝協調の再現に有用であった。代謝産物解析からは、代謝協調下の糖欠乏細胞は非常に特殊な状態であり、糖充足細胞に由来する何らかの物質を利用していることを裏付けている。馴化培地を用いた解析により、代謝協調を媒介する物質の候補を幾つか得られたが、全容の解明にはさらなる解析が必要である。SIGHTを導入した糖充足細胞、または糖欠乏状態の親株細胞における遺伝子発現の調節による代謝協調状態への影響の解析などが必要不可欠であるが、新たに開発した分割型薬剤耐性マーカーは非常に有用となると考えられる。

3. 略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ADC : antibody-drug conjugates
AMAP1 : a multidomain GTPase-activating protein
APH(4) : aminoglycoside 4-phosphotransferase
ASAP1 : ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1
BafA1 : Bafilomycin A1
BFP : blue fluorescent protein
CAIX : carbonic anhydrase IX
ECAR : Extracellular acidification rate
ECM : extracellular matrix
EMT : epithelial mesenchymal transition
Ext_C : C-terminal extein
Ext_N : N-terminal extein
FP : fluorescent protein
GFP : green fluorescent protein
GOI : gene of Interest
GSH : glutathione-SH
HIF-1 : hypoxia-inducible factor -1
HPH : hygromycin B phosphotransferase
HRE : hypoxia responsive element
Int_C : C-terminal intein
Int_N : N-terminal intein
IP : immunoprecipitation
IRES : internal ribosome entry site
LAMP1 : lysosomal-associated membrane protein 1
LPI : lysosomal protease inhibitor
MCS : multiple cloning site
MG : MG-132
MMP-14 : matrix metalloproteinase-14
NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NES : nuclear export signal
NLS : nuclear localization signal/sequence
PAC : puromycin-N-acetyltransferase

PAC_C : C- terminal part
PAC_N : N- terminal part
PCR : polymerase Chain Reaction
PD : pulldown
PD-L1 : programmed cell Death Ligand 1
PEI MAX : polyethylenimine "Max"
PIAS3 : protein inhibitor of activated STAT 3
pLV : plasmid lentiviral vector
pPB : PiggyBac transposon-based vector
PRKD2 : protein kinase D2
qPCR : real-time quantitative PCR
RFP : red fluorescent protein
ROS : reactive oxygen species
SIGHT : selective incorporation of glucose via hydrolysis after transport
SMDC : small molecule-drug conjugates
TCGA : the Cancer Genome Atlas
TR-F : time-resolved fluorescence
UPR : unfolded protein response
VHL : von Hippel-Lindau
VLP : virus-like particle
WPRE : woodchuck posttranscriptional regulatory element

4. 緒言

がん細胞は異常な増殖や強い生存性を保持し、それぞれの細胞において糖代謝が異常に亢進している。それに伴い、腫瘍微小環境における糖の消費が亢進して糖は枯渇し、また、糖代謝亢進によって乳酸などの酸性の代謝産物の蓄積も高まり、微小環境は酸性化する。微小環境の糖枯渇と酸性化などの厳しい環境は本来、細胞の生存を難しくさせる変化であるが、がん細胞はそのようなストレスにตอบสนองして、細胞内の pH を維持する機構や他の細胞の代謝産物を受け取り活用するような仕組みを利用することで、微小環境が悪化した状態でも生存や増殖を維持することができるようになる。結果として、微小環境の酸性化や糖枯渇がさらに進むが、このような微小環境の変化は免疫逃避や薬剤・放射線への耐性を惹起し、がん治療の奏功を妨げる。一方、これらの厳しいストレスに対するがん細胞の様々な応答について、そのメカニズムは未だ明らかになっていない点が多く存在する。本研究では、がん細胞が厳しい微小環境のもとで生存に有利な形質を獲得するメカニズムを解明することにより、がん細胞の生存性の抑制および腫瘍微小環境を治療に望ましい条件に適正化させることのできる新たな治療起点を見出すことを目的としている (Figure 4-1)。本論文では第一章において、がん細胞が微小環境の酸性化にตอบสนองして細胞内の pH を維持する機構について、第二章では糖が枯渇した微小環境において糖枯渇細胞が生存を維持するために行われる代謝協調について、それぞれ分子メカニズムの解明を試みた。

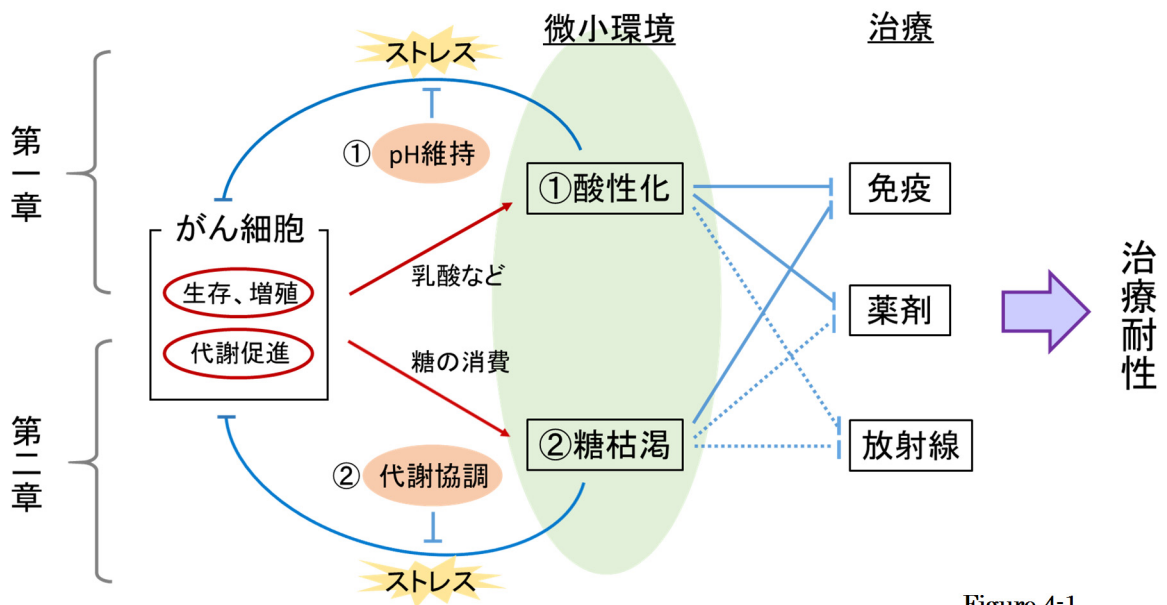


Figure 4-1

第一章では、糖代謝で生じた乳酸などの代謝産物による微小環境の酸性化に対して、がん細胞の内部 pH の維持に寄与する分子の制御メカニズムを解析した。がん細胞の内部 pH を維持する働きをする分子のうち、CAIX は腫瘍特異的な酵素であり、悪性度や予後不良のマーカーとして用いられる。CAIX は細胞表面に局在してはじめて、細胞内のアルカリ化に寄与する機能を発揮する。CAIX の発現が高いがん細胞ほどより大きな pH 勾配への対応が可能となり、生存や増殖を続けながら細胞外をより酸性化する。CAIX 等の働きによって作られた高い細胞内 pH と低い細胞外 pH は、代謝を含む細胞内機能の活性化や、細胞増殖の促進、アポトーシスの回避、飢餓応答、浸潤・転移や免疫逃避を促進し、がんの悪性度を高めることが報告されている (Huber et al., 2017 ; Webb et al., 2011)。CAIX の転写は HIF-1 に制御されることがよく知られている一方、CAIX の局在制御に関する知見はこれまでほとんど得られていない。細胞表面に発現する CAIX のみが pH 調節の機能を果たすことを考えると、その局在制御機構を解明することは、腫瘍微小環境の酸性化を是正するための起点を見出すことに繋がると期待される。以上より、第一章では小胞輸送系を介する CAIX の局在制御について解析した。

第二章では、がん細胞の糖代謝亢進に伴う微小環境の糖枯渇ストレスに対する応答について解析を行った。腫瘍内では腫瘍組織のがん細胞に栄養や酸素を供給する血管からの距離の違いやがん細胞の糖代謝亢進による糖の過剰消費により糖濃度の不均一性が生じ、深部ではしばしば糖が枯渇する。培養環境下での糖枯渇はがん細胞を短期間で死滅させることから、腫瘍内の糖欠乏細胞は糖の供給を直接受けられない状況でも生存性を保持する機構を獲得していると推測される。ここで着目したのが他の細胞の代謝産物を利用して生存性を維持する「代謝協調」である。代謝協調は糖を含む種々の栄養素の欠乏に対する腫瘍全体の応答として近年注目されているが、メカニズムの全容は不明である。また、糖枯渇は腫瘍内に遊走してくる免疫細胞へのエネルギー供給を低下させるなどして免疫機能を減弱させることが知られており、薬剤や放射線の効果にも影響すると考えられている。第一章と同様に、糖枯渇への応答機構の解明は、糖が欠乏した微小環境での生存能を獲得したがん細胞の増殖を阻害し、かつ微小環境自体を是正してがん治療の奏効率を向上させるために必須の知見であると考えられる。以上より、第二章では腫瘍内の糖枯渇が惹起する代謝協調の媒介因子を解析した。

代謝協調の解析を行うには、局所的な糖枯渇を培養系で再現する必要がある。そこで、細胞特異的に糖代謝を制御できる新たな実験系を確立した。第二章で詳しく説明するが、このためには細胞への 2 種類の遺伝子構築の導入を要する。これに加えて種々の遺伝子の発現調節などを行う場合を想定すると、3 種類

以上の遺伝子構築の導入が必要となる。それら全てが導入された細胞を高効率に選択するための手法が以降の解析を行う上で必須となると考え、ピューロマイシン耐性遺伝子 PAC (puromycin-N-acetyltransferase) に基づく「分割型薬剤耐性マーカー」の開発を試みた。

ここで確立した遺伝子導入細胞の selection system を用い、通常哺乳類細胞で利用されることがないグルコースの前駆体に着目し、前駆体を細胞内に取り込むことのできる transporter と、取り込まれた前駆体をグルコースに代謝することのできる特異的な酵素を発現する細胞の確立を試みた。この細胞を用いることにより、同一の培地で糖枯渴細胞と糖充足細胞を共培養でき、代謝協調が起こる状況を実験系で再現することができると考えた。

第一章および第二章を通して、がん細胞が本来生存することが難しくなるような微小環境の変化から受けるさまざまなストレスに応答し、生存性を維持するメカニズムの解析に取り組んだ。このメカニズムの解明により、がんの生存性を低下させるのみならず、微小環境の悪化によって誘導された治療を妨げる様々な形質を抑制するための標的点が得られれば、それを応用することで治療を奏功に導くことができると考える。本研究は、このような悪化した腫瘍微小環境を補整し治療の効果を向上させるための処置、いわば、がん治療の下地作りをする pre-treatment という新たな概念の創出にも繋がると期待している。

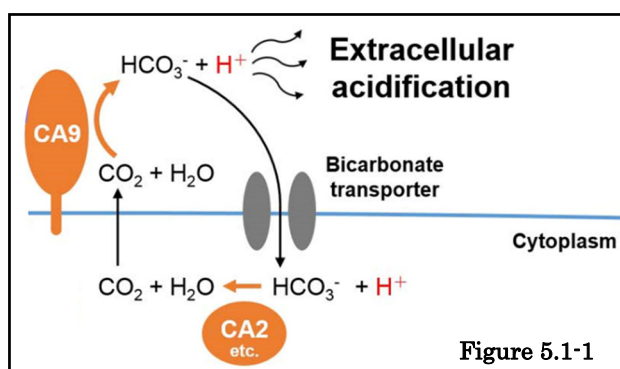
5. 第一章：腫瘍微小環境の酸性化に寄与する腫瘍関連酵素 CAIX の発現 および局在の制御に関する解析

5.1 緒言

がん細胞による糖代謝の結果生じた乳酸などの代謝産物が細胞外に排出されることにより腫瘍微小環境は酸性化し、がん細胞では細胞内部で生じた物質に加えて、細胞外からも酸性物質が流入するようになる (Parks et al., 2020 ; Swietach, 2019)。腫瘍組織が酸性化していることは古くから知られており、がん細胞内部も同様に酸性化していると考えられていた。しかしながら、pH の測定技術の発展に伴い、より正確に細胞内 pH を測定することができるようになると、周囲が酸性化した状態でもがん細胞内部の pH は、何らかの仕組みによって正常組織内の細胞よりもむしろ僅かながらアルカリ化していることがわかってきた。このようなアルカリ性の細胞内環境では、がん細胞の様々な細胞機能が活性化され、増殖やアポトーシス回避、飢餓応答、浸潤・転移能が亢進し、がんの悪性度を高めている。一方、細胞外の酸性化は、がん細胞の悪性度の亢進のみならず、免疫逃避や薬剤耐性などに寄与しており、結果としてがん治療の奏功を妨げることが報告されている (Flinck et al., 2018 ; Hao et al., 2018 ; Huber et al., 2017 ; Peppicelli et al., 2014 ; Webb et al., 2011)。

上記のようにがん細胞の内部は弱アルカリ性に保たれており、細胞内の酸性化はがん細胞においても多大なストレスとなる。したがって腫瘍微小環境が酸性化した状況において、がん細胞では内部 pH を維持するための応答経路が増強する。pH を制御する機能を持つ分子はさまざまなものが存在するが (Neri and Supuran, 2011 ; Parks et al., 2013)、なかでも Carbonic Anhydrase IX (CAIX) は、以降に述べるように、腫瘍関連酵素として近年着目されている分子である (Damaghi et al., 2013 ; Neri and Supuran, 2011 ; Swietach, 2019)。

CAIX は多くの組織・器官でがん細胞特異的に発現し、正常細胞にはほとんど発現しないことから、がん細胞特異的な治療を行うための標的分子として有用であると考えられている (Pastorek and Pastorekova, 2015 ; Supuran et al., 2018 ; Tafreshi et al., 2014)。

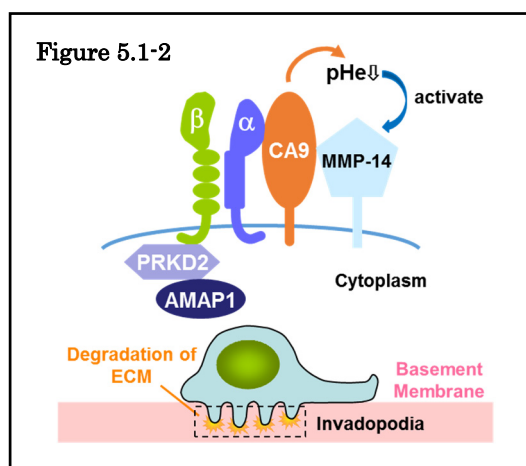


CAIX は細胞表面に局在し、その細胞外ドメインが触媒的および非触媒的に機能して pH 制御に寄与している (Figure 5.1-1) (Becker, 2020 ; Pastorekova and Gillies, 2019 ; Venkateswaran and Dedhar, 2020)。がん細胞の糖代謝亢進に

よって細胞外に排出される乳酸などの酸性の代謝産物に加え、CAIX のような細胞内 pH 制御に関わる分子の働きにより、がん細胞では細胞外 pH が酸性に傾き (extracellular acidification)、腫瘍微小環境の酸性化が促進されている。また、CAIX は pH 制御に加えて、がん細胞におけるシグナル伝達や上皮間葉転換 (EMT : Epithelial Mesenchymal Transition)、細胞遊走、浸潤、転移などがんの悪性度を規定する要素に寄与する働きをもつことが知られており、腫瘍の悪性度・予後不良を示すマーカーとしても用いられている (Debreova et al., 2019 ; Pastorekova and Gillies, 2019 ; Shin et al., 2011 ; Svastova et al., 2012 ; Swayampakula et al., 2017)。

CAIX の機能を阻害する戦略としては、細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体製剤や、阻害剤として作用する低分子化合物が開発されている (Mboge et al., 2015 ; Singh et al., 2018 ; Supuran et al., 2018)。CAIX の内在的な機能制御の様式については不明な点が多いが、転写制御については比較的解析が進んでおり、プロモーター領域には転写因子 hypoxia-inducible factor -1 (HIF-1) による制御を受ける hypoxia responsive element (HRE) を有することが報告されている (Kaluz et al., 2009 ; De Simone and Supuran, 2010)。CAIX はクラスリン依存的エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、細胞膜上に再輸送 (リサイクリング) されていることが知られているものの (Zatovicova et al., 2014)、輸送メカニズムはこれまで解析されていない。CAIX が細胞膜に表出するメカニズムを明らかにし、CAIX を阻害するための新たな標的点を見出すことができれば、酸性環境下のがん細胞の機能を停止させて生存や増殖を防ぐと共に、糖代謝の持続による微小環境の酸性化も改善できるかもしれない。このような新たな戦略を既存の化学療法や放射線療法と組み合わせることで、治療の奏効率を向上させることができると期待される。

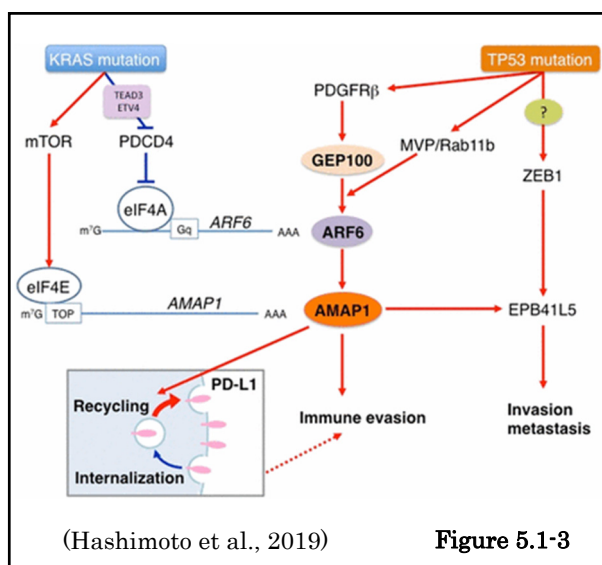
以上のような背景から、本研究では CAIX の局在制御の重要性に着目し、そのメカニズムの解明を目標とした。過去の報告から、高浸潤性乳癌の細胞株である MDA-MB-231 細胞において、CAIX は $\alpha 2\beta 1$ -integrin や MMP-14 と結合し、仮足 (psuedopodia) および浸潤仮足 (invadopodia) と呼ばれる細胞外マトリックス (ECM : extracellular matrix) を分解し浸潤・転移を促進する膜構造に局在することがわかっている (Figure 5.1-2) (Swayampakula et al., 2017)。CAIX



は細胞内をアルカリ化すると同時に細胞外の pH を酸性に傾け、MMP-14 を活

性化して細胞外マトリックスの分解を促すことで、がん細胞の浸潤性および転移性の獲得に大きく寄与していると考えられている。このような CAIX と複合体を形成する分子群と、所属教室で解析してきた小胞輸送制御因子である AMAP1 が相互作用する分子群がよく共通すること、さらに両者の細胞内局在や関与する機能も共通することから、AMAP1 が CAIX の制御に関わる可能性が示唆された。AMAP1 は small GTPase である ARF6 のエフェクター分子であり、両者は浸潤性乳癌細胞で非常に発現が上昇している。また、ARF6 と AMAP1 は共に invadopodia に集積して細胞外マトリックスの分解を促進し、浸潤能を亢進する (Hashimoto et al., 2004 ; Hashimoto et al., 2006 ; Onodera et al., 2005)。AMAP1 のタンパク質相互作用により、 β 1-integrin の細胞膜への recycling が促進されることがわかっており (Onodera et al., 2012)、このことはがん細胞が浸潤性を高めることに非常に重要な役割を果たしている (Moreno-Layseca et al., 2019 ; Onodera et al., 2013 ; Paul et al., 2015)。AMAP1 と β 1-integrin は PRKD2 というアダプタータンパク質を介して結合しており、膀胱癌細胞においては、また別のアダプタータンパク質の介在により PD-L1 と結合して細胞膜へのリサイクリングを制御していることもわかっている (Figure 5.1-3)

(Hashimoto et al., 2019, Onodera et al., 2012 ; Onodera et al., 2018)。以上に基づき、AMAP1 が CAIX と機能的および物理的に相互作用するという仮説を立て、さまざまな解析を行った。



(Hashimoto et al., 2019)

Figure 5.1-3

5.2 方法

(i) 細胞培養

実験に使用した細胞は全て American Type Culture Collection (ATCC) から入手した。培養液の組成は以下の表に示す通りである (Table 5.2-1)。

Table 5.2-1 Culture medium composition

Cell line	Culture medium	Histology	CO ₂
MDA-MB-231	DMEM (high glucose, SIGMA D5796) RPMI1640 (SIGMA R8758) 10% fetal calf serum (FCS, Hyclone) 5% NuSerum (Corning) 2 mM L-glutamine	Pleural effusion of a breast adenocarcinoma	7.5%
	equal volume		
BT549	DMEM (high glucose, SIGMA D5796) RPMI1640 (SIGMA R8758) 10% FCS (Hyclone) 5% NuSerum (Corning) 2 mM L-glutamine	Triple negative breast carcinoma (ductal, epithelial-like)	7.5%
MDA-MB-436	L-15 medium (Gibco, 11415064) 10% FCS (Hyclone) 10 µg/mL insulin (SIGMA 16634) 16 µg/mL glutathione (Nacalai 17050-14)	Pleural effusion of a breast adenocarcinoma	0%
293T	DMEM (high glucose, SIGMA D5796) 10% FCS (Hyclone)	Human embryonic kidney cell (epithelial)	5%

いずれの細胞も CO₂ incubator を使用し、加湿を行いながら 37 °C に保持して培養した。培養器具には使い捨てのプラスチック dish を使用した。細胞の継代は、数日ごとに、あるいは confluent になる手前で行った。トリプシン溶液 (Gibco 15090046、PBS-EDTA にて 1/10 希釈) により細胞を剥離し、遠心分離機で回収した後に適切な細胞数を培養 dish に播種し、適量の培地を加えた。必要に応じて数日ごとに培地交換を行った。

(ii) siRNA の合成および transfection

siRNA の調製は日本バイオサービスに外注した。化学合成したオリゴ RNA-DNA をアニーリングしたものを siRNA 二重鎖として使用した。

各 siRNA の配列は以下の表に示す通りである (Table 5.2-2)。

Table 5.2-2 Sequence of siRNA

Target	Sense/ Antisense	Sequence
Negative control	Sense	5'-GCGCGCUUUGUAGGAUUCGdTdT-3'
Negative control	Antisense	5'-CGAAUCCUACAAAGCGCGCdTdT-3'
AMAP1 #1	Sense	5'-GACCUGACAAAAGCCAUUAdTdT-3'
AMAP1 #1	Antisense	5'-UAAUGGCUUUUGUCAGGUCdTdT-3'
AMAP1 #2	Sense	5'-GCUACCCAGUGUGAAGAUCdTdT-3'
AMAP1 #2	Antisense	5'-GAUCUUCACACUGGGUAGCdTdT-3'
PRKD2 #1	Sense	5'-CUGCAAGUUUAAACUGUCACAAdTdT-3'
PRKD2 #1	Antisense	5'-UUGUGACAGUUAACUUGCAGdTdT-3'
PRKD2 #2	Sense	5'-GGAAAUUCCGCUGUCAGAAdTdT-3'
PRKD2 #2	Antisense	5'-UUCUGACAGCGGAAUUUCCdTdT-3'
CAIX #1	Sense	5'- ACCUGAAGUUAAGCCUAAAdTdT-3'
CAIX #1	Antisense	5'- UUUAGGCUUAACUUCAGGUdAdG-3'
CAIX #2	Sense	5'- GGCUGCUGGUGACAUCCUAdTdT-3'
CAIX #2	Antisense	5'- UAGGAUGUCACCAGCAGCCdAdG-3'
PIAS3 #1	Sense	5'- CAAACAGACAGGUGGAAAAdTdT-3'
PIAS3 #1	Antisense	5'- UUUUCCACCUGUCUGUUUGdGdC-3'
PIAS3 #2	Sense	5'- GGCCCUACCUGGAAGCAAAdTdT-3'
PIAS3 #2	Antisense	5'- UUUGCUUCCAGGUAGGGCCdGdG-3'

表中の dA, dG, dT, dC は DNA、その他は RNA を示す。

siRNA の導入には Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo) を使用し、dish 等の培養器具に細胞を播種すると同時に siRNA と試薬の複合体を添加する “reverse transfection” 法を用いた。詳細なプロトコールは以下の通りである (Table 5.2-3)。

Table 5.2-3 Protocol of siRNA reverse transfection

Number of cells	1.0-2.0 x 10 ⁵ cells/dish on 35 mm culture dish
Protocol	<ol style="list-style-type: none"> 1. For each dish to be transfected, prepare RNAi duplex LipofectamineTM RNAiMAX complexes as follows. <ol style="list-style-type: none"> a. Dilute 6 pmol RNAi duplex in 250 μL Opti-MEM[®] I Medium without serum in the dish. Mix gently. b. Mix LipofectamineTM RNAiMAX gently before use, then add 2.6 μL LipofectamineTM RNAiMAX to each dish containing the diluted RNAi molecules. Mix gently and incubate for 20 minutes at room temperature. 2. Dilute cells in complete growth medium without antibiotics so that 1200 μL contains the appropriate number of cells to give 30-50 % confluence 24 hours after plating. Use 1.0-2.0 x 10⁵ cells/dish for suspension cells. 3. To each well with RNAi duplex - LipofectamineTM RNAiMAX complexes, add 1200 μL of the diluted cells. This gives a final volume of about 1500 μL and a final RNA concentration of 10 nM. Mix gently by rocking the dish back and forth. 4. Incubate the cells 72 hours at 37 °C in a CO₂ incubator until cells are ready for assays.

特に記述の無い限り、種々の解析には transfection から 72 時間経過した細胞を使用した。

(iii) Western blotting

Western blotting のための細胞溶解・タンパク抽出については以下のように行った。細胞の培養液を捨てた後、4°Cで冷やした PBS で 2 回洗浄してから、protease inhibitor cocktail set I (Calbiochem) を 1/100 量添加した NP-40 lysis buffer (Table 5.2-4) を直接細胞に添加して scraper で掻き取り、1.5 mL tube に回収し、10 分間氷上で静置することにより細胞溶解を行った。

Table 5.2-4 The composition of NP40 lysis buffer

NP40 lysis buffer	
Component	Final conc.
NP-40	1.0 %
NaCl	150 mM
Tris-HCl [pH 7.4]	20 mM
EDTA	5 mM

上記の方法で得られた lysate は細胞の残屑を含んでいるため、Bioruptor UCD-250HSA (Cosmo Bio) を用いて sonication し (30 sec.×3 回、1 回毎に interval 30 sec.)、遠心分離機により不溶性の画分を沈降させたのち (15,000 x g, 10 min.)、上清を回収した。得られたタンパク抽出液は DC™ Protein Assay kit (Bio-Rad) を使用してタンパク濃度を測定し、western blotting するための sample に調整した。これらの sample は Bolt™ gels (免疫沈降の全ての blot および PIAS3、HIF-1α blots) (Thermo) または NuPage™ gels (CAIX、PRKD2 blots) (Thermo) を用いて電気泳動した後、Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) を用いて Immobilon-FL PVDF membrane (Millipore) 上に transfer した。membrane は BlockPRO Protein-Free Blocking Buffer (Visual Protein) に浸し 1 時間振盪して blocking を行ったのち、先の blocking buffer で希釈した一次抗体液に浸して一晩 4°C に静置し、目的のタンパクを標識した。一次抗体で標識された membrane は TBST (Tris-buffered saline containing Tween 20) を用いて 3 回洗浄した後、先の blocking buffer に 0.01% SDS を添加したもので希釈した二次抗体液に浸し室温で 1 時間振盪した。上記で使用した一次抗体および二次抗体は、それぞれ次頁の Table 5.2-5 と Table 5.2-6 に示す通りである。このようにして、目的のタンパクが標識された membrane は Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Bioscience) を用いて解析した。

Table 5.2-5 The list of primary antibodies for western blotting

Target	Host	Dilution	Obtained from
CAIX	Rabbit	1/500	Abcam ab108351
AMAP1/ASAP1	Mouse	1/20000~10000	Santa Cruz sc-81896
PRKD2	Mouse	1/500	Abnova H00025865-M01
PIAS3	Rabbit	1/1000	Cell Signaling Technology #9042
HIF-1 α	Mouse	1/1000	BD 610959
β -actin	Mouse	1/4000	Sigma A5441

Table 5.2-6 The list of secondary antibodies for western blotting

Fluorescent and target	Host	Dilution	Obtained from
DyLight® 800-conjugated anti-mouse IgG	Goat	1/20000	Thermo SA5-35521
Alexa fluor 680-conjugated anti-rabbit IgG	Goat	1/20000	Abcam ab186692

(iv) 免疫沈降

免疫沈降に用いる lysate は collagen I でコーティングされた dish に撒かれた MDA-MB-231 細胞を上記の western blotting 用の lysate と同様の方法で調製した (ただし、sonication の手順は省く)。PRKD2 を knock down した細胞の immunoprecipitation (IP) では CAIX タンパクの発現量をコントロールの細胞と一様にするため、lysis する 24 時間前に lysosomal protease inhibitor である NH₄Cl (12.5 mM) および leupeptin (0.5 mM) を添加した。また、PIAS3 と HIF-1 α の co-IP では、コントロールの siRNA もしくは AMAP1 の配列をターゲットした siRNA を transfection した細胞の HIF-1 α を安定化し発現量を一様にするため、proteasome inhibitor である MG-132 (10 μ M) で lysis する前にそれぞれ 30 分または 6 時間処理した。このようにして得られた lysate は anti-CAIX antibody (Abcam ab243660, 1:250) もしくは anti-PIAS3 antibody (Cell Signaling Technology #9042, 1:100) と、抗体が結合したタンパクを沈降させるためのビーズである Protein A Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare) と共に 4 °C で 2 時間穏やかに攪拌した。本実験ではコントロールとして、免疫されていないウサギの IgG 抗体を用いた。その後、遠心分離機を用いて Protein A beads を沈降させ、上清を取り除いてから 4 °C で冷やした NP-40 lysis buffer

で 3 回洗浄した。こうして精製された沈殿物と、このような一連の作業を行っていない total lysate は、Bolt™ gels (Thermo) を用いた電気泳動によりタンパク質を分子量に基づき分離し、Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) を用いて Immobilon-FL PVDF membrane (Millipore) 上に transfer した。さらに、western blotting の際と同様に一次抗体および二次抗体で標識し、Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Bioscience) により目的タンパク質を検出した。

(v) 細胞表面のタンパク質の labeling

MDA-MB-231 細胞を siRNA と transfection 試薬の complex と共に collagen I でコーティングされた 35 mm dish に播種した。72 時間後、細胞を 0.1 mM CaCl₂ と 1.0 mM MgCl₂ を含む 4 °C で冷やした PBS (PBS-CM) で 2 回洗浄し、冷やした biotin-labeling solution (0.5 mg/mL sulfo-NHS-SS-biotin in PBS-CM) を加え、氷上で 5 分毎に静かにゆすって 30 分間 incubate した。標識反応を完全に停止するため、biotin-labeling solution を取り除き、50 mM NH₄Cl を添加した PBS-CM で置き換えた。この状態でさらに 10 分間、氷上にて静置し、4°C で冷やした PBS で 2 度洗浄を行った。このようにして処理した細胞は western blotting の際と同様に protease inhibitor を添加した NP-40 buffer で lysis した。上記の処理でビオチン化された lysate に含まれるタンパク質は NeutrAvidin Agarose beads (Pierce) を用いて回収し、前述のように western blotting により解析した。

(vi) 免疫染色および顕微鏡像の撮影

CAIX と AMAP1 の共染色については、MDA-MB-231 細胞を collagen I でコーティングした glass bottom の dish に撒き、AMAP1 が局在する小胞小管構造を保持するため、培養液を捨て -20°C で冷やした methanol を注いで -20°C で 5 分間静置して細胞を固定した。また、CAIX と LAMP1 の共染色については、siRNA を transfection して 48 時間後の MDA-MB-231 細胞を collagen I でコーティングした glass bottom の dish に撒き、培地に DMSO もしくは lysosome inhibitor である Bafilomycin A1 (100 nM) を添加して 24 時間処理した。薬剤処理した細胞は 2 % paraformaldehyde を培地に直接加え 37 °C で 10 分間静置して細胞を固定した。PBS で 2 回洗浄を行い、-20 °C で冷やした methanol を注いで -20°C で 5 分間静置して二重固定した。その後、MAXblock™ Blocking Medium (ActiveMotif) を加えて室温で 1 時間静置して blocking し、PBS で 2 回洗浄した。さらに、一次抗体として CAIX (R&D Systems MAB2188, 1:100) および LAMP1 (Cell Signaling Technology #9091, 1:400)、AMAP1 (Onodera

et al., 2005, 1: 400) に対する抗体を 5 % BSA で希釈した抗体液を添加し、室温で 1 時間静置して目的のタンパクを標識した。これらの sample を PBS で 3 回洗浄したのち、二次抗体として Alexa fluor 568-conjugated anti-mouse IgG (Abcam ab175701, 1:400) および Alexa fluor 568-conjugated anti-mouse IgG (Abcam ab175701, 1:400) を 5 % BSA で希釈した抗体液を加え、室温で 1 時間静置した。PBS で 2 回洗浄したのち、Hoechst 33342 (Setareh Biotech #7074, 1:4000) を PBS で希釈した溶液を添加して室温で 10 分間静置し、核を染色した。核染色後、PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡を用いて細胞内の構造を観察した。

顕微鏡観察の詳細については以下の通りである。A1R confocal laser microscope system および NIS Elements Imaging software (Nikon) を装備した Nikon eclipse Ti 顕微鏡にて、細胞内の CAIX および LAMP1 の染色像を撮影した。Hoechst 33342 および Alexa fluor 488、Alexa fluor 568 で染色した構造は、それぞれ 400、488 および 561 nm の laser を使用して励起し、蛍光を 450/50、525/50 および 595/50 nm filter により検出した。また、CAIX と AMAP1 の染色像については Leica TCS SP8 confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems) を用いて撮像した。その際、Hoechst 33342 および Alexa fluor 488、Alexa fluor 568 で染色した構造は、それぞれ 405、488 および 552 nm の laser を用いて励起し、410-498、498-547 および 617-742 nm spectral detection により検出した。

(vii) Real-time quantitative PCR

Real-time quantitative PCR (qPCR) に用いる sample を調製するため、collagen I でコーティングした 96 well plate に 2.0×10^4 cells/well の密度で細胞を撒くと同時に、AMAP1 もしくは PIAS3 を標的とした siRNA、または negative control の siRNA を transfection した。細胞を撒いてから 72 時間後に Cell Amp™ Direct Probe RT-qPCR Kit (Takara) を用いて、lysate の回収と逆転写反応を行った。詳しい protocol は次頁の Table 5.2-7 および Table 5.2-8 に示す通りである。ここで得られた sample を使用して以下の qPCR 反応を行った。qPCR 用の蛍光 probe は、CA9 TaqMan® Gene Expression Assays/FAM-MGB (Hs00154208_m1)、HIF1A TaqMan® Gene Expression Assays/FAM-MGB (Hs00153153_m1)、ACTB TaqMan® Gene Expression Assays/VIC-MGB_PL (Hs99999903_m1) を使用した。FAM probe1 種類 (CA9 用 probe もしくは HIF1A 用 probe) と、VIC probe (ACTB 用 probe) を組み合わせて使用し、ACTB の mRNA 発現量を指標にして、CA9 および HIF1A の RNA 発現量を normalize した。qPCR 反応は LightCycler 96 System (Roche) を用いて行った。qPCR の protocol と cycle 条件の詳細は次々頁の Table 5.2-9 に示す。

Table 5.2-7 preparing lysate for qPCR**Lysis 溶液の準備**

マイクロ遠心 tube に以下に示す Lysis 溶液を氷上で調製する。

<1 反応あたり>

試薬	使用量
CellAmp Lysis Buffer II	48 μ L
<u>DNase I for Direct RNA Prep</u>	<u>2 μL</u>
Total	50 μ L

Lysate の調製【接着性の培養細胞を 96well plate で培養した場合】

1. 可能な限り培地を吸引除去する。
2. 各 well に Cell Amp Washing Buffer を 125 μ L 加えて洗浄する。
3. Cell Amp Washing Buffer を可能な限り吸引除去する。
4. 各 well に 50 μ L の Lysis 溶液を添加し、室温（25 $^{\circ}$ C前後）で 5 分間 incubate する。
5. Incubate 後、Stop Solution 2.5 μ L を添加して 5 回ピペッティングする。
6. Lysate をマイクロ遠心 tube に回収する。

Table 5.2-8 Protocol of Reverse transfection reaction

1. 下記に示す細胞 Lysate 以外の反応 Master Mix を氷上で調製し、反応 tube に 18 μ L ずつ分注する。

<1 反応あたり>

試薬	使用量
5 x Cell Amp Buffer II	4 μ L
PrimeScript RT Enzyme Mix	1 μ L
RT Primer Mix	1 μ L
(細胞 Lysate)	2 μ L)
<u>RNase Free H₂O</u>	<u>12 μL</u>
Total	20 μ L

2. 2 mL の細胞 Lysate を反応 tube に添加し、氷上に保持する。

3. 下記の温度で逆転写反応を行う。

37 $^{\circ}$ C	30 min. (逆転写反応)
85 $^{\circ}$ C	5 sec. (逆転写反応を熱失活させる)
4 $^{\circ}$ C	

Table 5.2-9 Protocol of qPCR and condition of thermal cycler

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

<1 反応あたり>

試薬	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix (2 x)	10.0 mL	1 x
Probe for CA9 or HIF1A	1.0 mL	
Negative control	1.0 mL	
逆転写反応液	3.2 mL	
滅菌精製水	4.8 mL	
Total	20 mL	

2. 反応を開始する。

< Cycle 条件 >

Hold (初期変性)

Cycle : 1

95 °C 30 sec.

2 step PCR

Cycles : 55

95 °C 5 sec.

60 °C 30 sec.

3. 反応終了後、増幅曲線を確認する。

(viii) Extracellular acidification および Intracellular acidification の測定

MDA-MB-231 細胞に (ii) で示した方法で siRNA を transfection し、60 時間後に trypsin-EDTA solution を用いて細胞を回収して、collagen I でコーティングした 96 well plate に 2.0×10^4 cells/well の濃度で撒いた。Culture plate に残留する CO₂ により測定に影響が出ること避けるため、培地を 10 % FCS を添加した L-15 培地に切り替え、CO₂ free の湿式 incubator 内で 37 °C、12 時間保持した。

Extracellular acidification に関しては、温めた respiration buffer (次頁 Table 5.2-10) で 2 回洗浄したのち、respiration buffer に溶解した Glycolysis Assay Reagent (Abcam) を加えた。試薬に含まれる pH 感受性 probe の蛍光寿命の変化を SpectraMax iD5 (Molecular Devices) の time-resolved fluorescence (TR-F) 測定モードを使用して 5 分毎に 4 時間測定した。測定のセッティングは次頁の Table 5.2-11 に示す。Extracellular acidification rate (ECAR) は assay 中

の蛍光寿命の推移を基準にして計算した。TR-F 値を測定した直後に、細胞数を基準として normalize を行うため Hoechst 33342 で細胞の核を染色した。350 nm の波長で励起し、450 nm の波長を検出して細胞数の指標とし、各 well における Hoechst 33342 の蛍光強度と TR-F 値との比をとり実験間の数値を比較できるよう補正した。いずれの実験でも sample を duplicate して行った。

Intracellular acidification については、培地に pHrodo Green reagent (Thermo) を加えて 1 時間 incubate し、温めた respiration buffer で細胞を 2 回洗浄したのち、さらに respiration buffer を添加して 3 時間 incubate した。555 nm での波長で励起し、590 nm の波長を検出して、その値を上記のように Hoechst 33342 染色に基づき細胞数で normalize した。

Table 5.2-10 Composition of respiration buffer

1.0 mM	K-Phosphate, pH 7.4
20 mM	D-glucose
70 mM	NaCl,
50 mM	KCl
0.8 mM	MgSO ₄
2.4 mM	CaCl ₂

Table 5.2-11 Measurement settings for ECAR assay

50 μs	measurement delay
250 μs	integration window
Excitation:	380 nm
Emmission:	615 nm emission
(37 °C incubation)	

(ix) 抗体を用いた細胞表面に発現する CAIX の検出

MDA-MB-231 細胞を collagen I でコーティングした 48 well plate に 3.0×10^4 cells/well の密度で撒くと同時に negative control または AMAP1 を標的とした siRNA を transfection し、72 時間後に 2% paraformaldehyde で固定した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、Odyssey Blocking Buffer (Li-cor) を用いて室温で 1 時間 blocking した。一次抗体として CAIX 抗体 (R&D Systems MAB2188, 1:200) もしくは Non-immune IgG_{2a} (MBL M076-3 1:400) を用い、室温で 1 時間静置して標識したのち、二次抗体の Dylight 800 4X PEG-conjugated anti-mouse IgG (Thermo SA5-35521 1:800) と、細胞透過性の核染色試薬 DRAQ5 (1:5,000) を添加し室温で 1 時間 incubate した。各々の染色は Odyssey Infrared Imaging

System を使用して 700 および 800 両方の channel で検出した。Non-immune mouse IgG_{2a} による染色を同様に測定し、抗体の非特異的な結合として上記の測定値から差し引き、得られた数値を細胞表面の CAIX 発現量とした。

(x) GST-pulldown assay

293T 細胞に Polyethylenimine “MAX” (Polysciences) を用いて GST 単独もしくは GST tag を付加した PIAS3 (GST-PIAS3)、HA tag を付加した AMAP1 (AMAP1-HA) をコードする plasmid DNA を transfection した。各細胞の Lysate を先に示した western blotting と同じ方法（ただし、sonication の step は除く）により調製した。GST 単独および GST-PIAS3 を含む lysate は Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare) と共に 4 °C で 2 時間穏やかに攪拌し、GST および GST-PIAS3 を捕捉した glutathione beads を 4 °C で冷やした NP-40 buffer で洗浄した。GST-pulldown assay は、glutathione beads 上の GST または GST-PIAS3 (5 µg 分) を、AMAP1-HA を発現させた 293T 細胞の lysate と共に 4 °C で 2 時間穏やかに攪拌しながら incubate した。この beads を 4 °C で冷やした NP-40 buffer で 4 回洗浄し、ビーズ上の結合タンパク質と total lysate を western blotting により解析した。

(xi) TCGA data の解析

乳癌患者 (n = 1075) の mRNA 発現量 (RSEM) および臨床データを TCGA (The Cancer Genome Atlas) より取得した。得られた sample は *ASAP1* (*AMAP1* をコードする遺伝子) あるいは *PIAS3* の mRNA 発現量を閾値として階層化した。閾値は上位 7.5、10、12.5、15、20、25、30、40、50% で設定した。*ASAP1* 発現量の上位 15 % に含まれる sample を *PIAS3* の発現量 (閾値は上記のもの) によってさらに階層化した。*CA9* 発現レベルの平均値をそれぞれのグループで計算した。統計的有意性は Brunner-Munzel 検定を用いて解析した。Brunner-Munzel 検定は、正規分布および等分散を仮定しない手法である。*ASAP1* および *PIAS3* の発現レベルと予後との相関性の解析では、*ASAP1* 発現の上位 15 % と *PIAS3* 発現の上位 25 % をそれぞれ “*ASAP1* - high” および “*PIAS3* - high” グループとして分類した。Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成し、生存率の有意差は log-rank 検定により解析した。

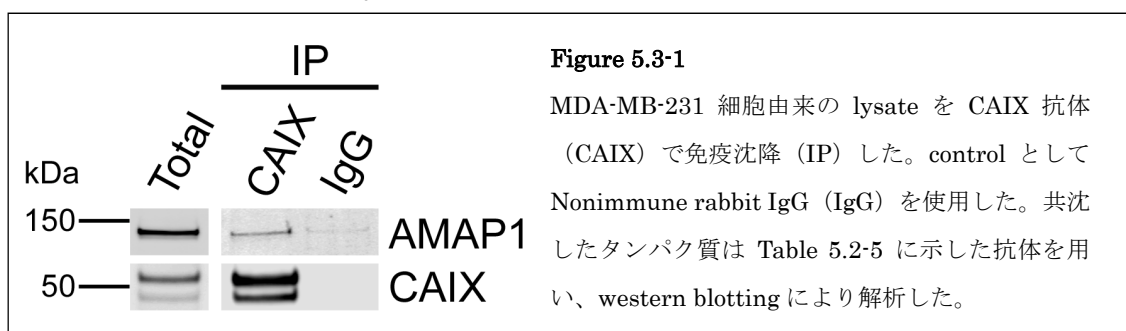
(xii) 統計解析

各 assay は独立した実験を 3 回以上行い、得られたデータ群の正規分布および等分散を確認した。グラフの表示は平均値 ± 標準誤差とし、特に表記のない限り、有意差の解析は t 検定により行った。

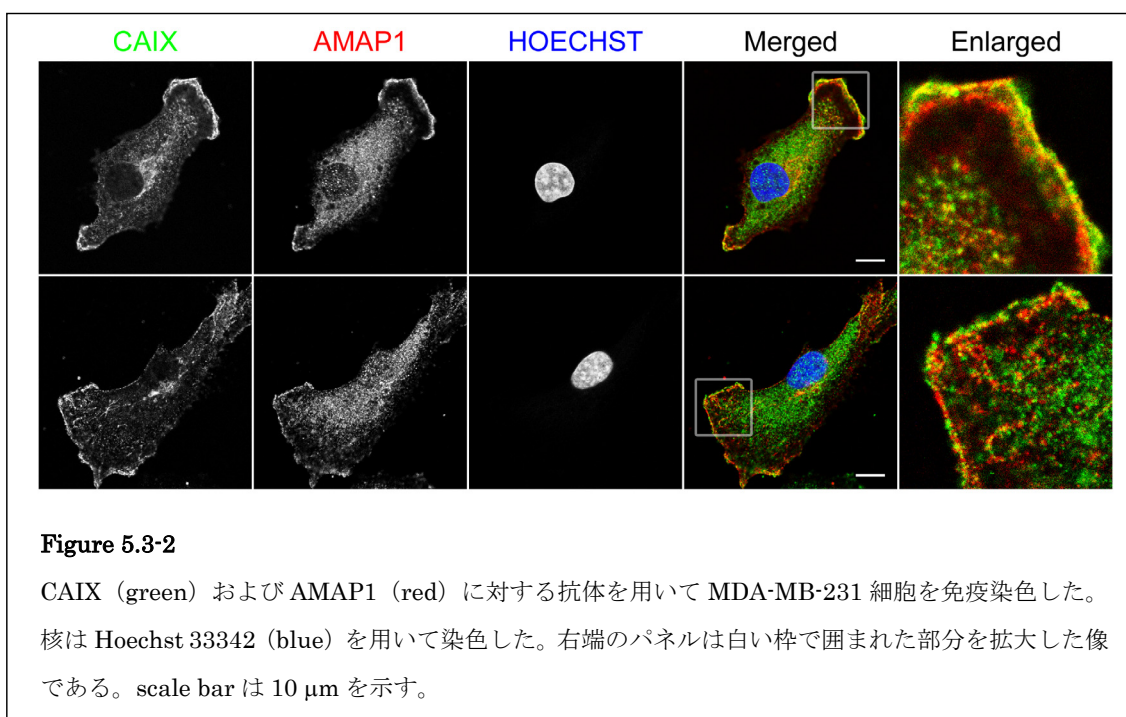
5.3 結果

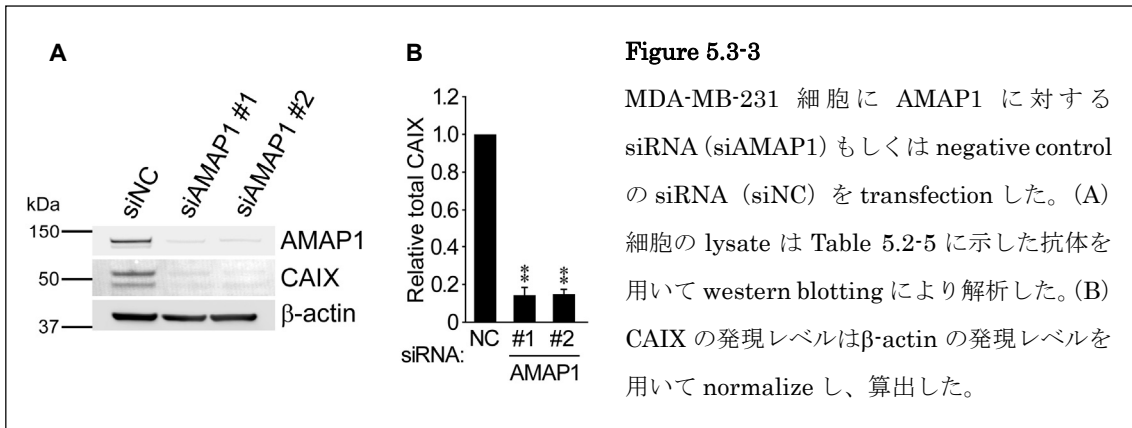
5.3.1 AMAP1 との相互作用を介した CAIX の発現および機能の制御

CAIX と AMAP1 の相互作用を解析するため、MDA-MB-231 細胞からタンパク質を抽出し、抗 CAIX 抗体を用いて免疫沈降を行った。得られた共沈タンパク質は AMAP1 を含んでいたことから (Figure 5.3-1)、これら 2 つのタンパクは複合体を形成し、物理的に相互作用していることが示された。また、いくつかの異なる種類の抗 CAIX 抗体を用いて同様の実験を行った場合にも、両者の共沈を確認することができた。

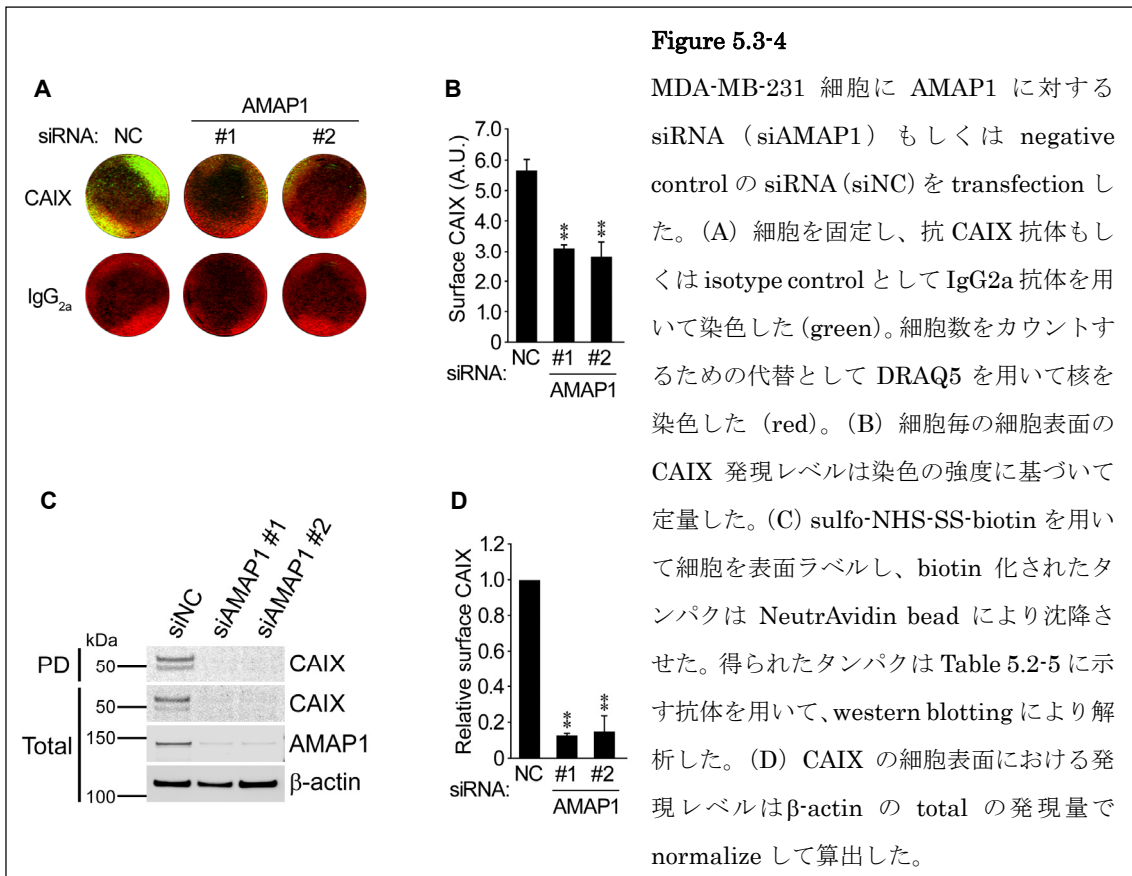


MDA-MB-231 細胞の免疫染色では、AMAP1 と CAIX が細胞の辺縁および小胞の表面に共局在していることが確認できた (Figure 5.3-2 上段)。場合によっては、これらのタンパクは管状小胞系に共局在しており (Figure 5.3-2 下段)、先行研究で明らかとなった AMAP1、PRKD2 および $\beta 1$ -integrin の共局在パターンと非常に類似していることが明らかとなった (Onodera et al., 2012)。

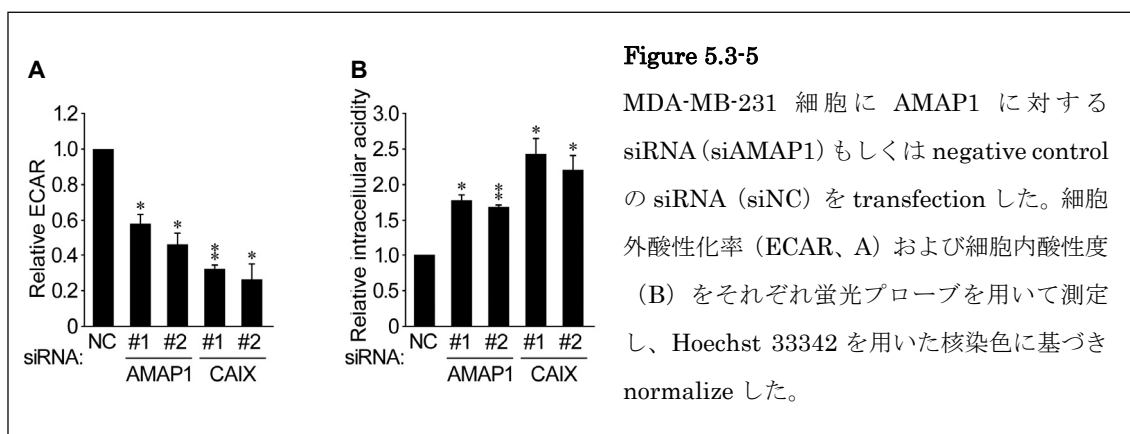




さらに興味深いことに、siRNA を用いて AMAP1 を knockdown すると、CAIX のタンパク質発現量が著明に減少することが明らかとなった。CAIX の発現量をβ-actin の発現量で normalize して定量すると、AMAP1 の knockdown により CAIX はおよそ 20%以下にまで減少することが示唆された (Figure 5.3-3 A, B)。また、AMAP1 knockdown による CAIX の細胞表面量の減少について、抗体を用いた細胞表面の標識による手法 (Figure 5.3-4 A, B) およびビオチン標識試薬を用いた生化学的手法 (Figure 5.3-4 C, D) の両方で確認した。

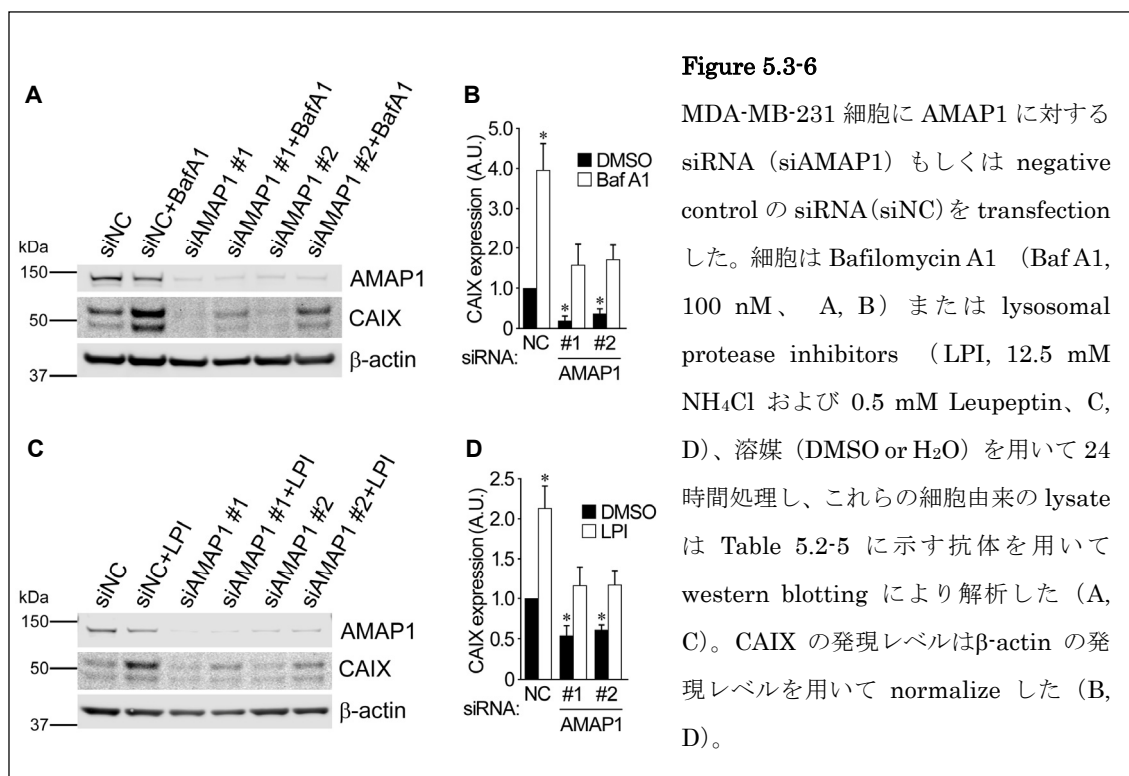


さらに、CAIX の機能制御における AMAP1 の関与の可能性についても検討した。過去の報告 (Mboge et al., 2019 ; McDonald et al., 2019) と同様に、siRNA により CAIX を knockdown すると、細胞外の酸性度が減少すること (Figure 5.3-5 A)、一方で細胞内の酸性度は上昇することを確認した (Figure 5.3-5 B)。同様に、これと比較すると程度は小さいもの、AMAP1 knockdown によっても同様の効果が得られた (Figure 5.3-5 A, B)。以上の結果より、AMAP1 は CAIX の表面発現量および総発現量の維持において必要不可欠な役割を果たしており、CAIX を介する pH 制御に大きく寄与していることが示唆された。



5.3.2 AMAP1 による CAIX の細胞内輸送の制御

AMAP1 は β 1-integrin および PD-L1 などの細胞表面タンパク質の細胞膜への recycling を制御している (Hashimoto et al., 2019 ; Onodera et al., 2012)。多くの膜タンパク質について、recycling を阻害すると lysosome による分解を受けることが知られている (Hsu et al., 2012 ; Onodera et al., 2013)。これらのことから、AMAP1 は β 1-integrin と共に CAIX の細胞膜への recycling も制御していること、そのため AMAP1 knockdown によって lysosome における CAIX の分解が誘導されるものと推測した。Bafilomycin A1 (V-ATPase inhibitor) または Leupeptin および NH_4Cl (lysosomal protease inhibitors) を用いて AMAP1 を knockdown した細胞を処理すると、CAIX の発現レベルが一部回復した (Figure 5.3-6 A-D)。一方で、Proteasome inhibitor である MG-132 を用いた場合は、そのような効果は得られなかった。また、これら 2 種類の lysosome inhibitor により、control の細胞でも CAIX の total のタンパクレベルが上昇していたことから (Figure 5.3-6 A-D)、CAIX は lysosome の分解を恒常的に受けることで、総タンパク質量が制御されていることが示唆された。



免疫蛍光染色の解析では、AMAP1 が knockdown された細胞においては、一貫して全体的な CAIX の染色強度が弱くなることが示された。また場合により、lysosome を示す LAMP-1 陽性の小胞構造における CAIX の蓄積が観察され、そのような現象は阻害剤により lysosome での分解を抑制した場合により顕著となった (Figure 5.3-7)、矢印)。このような染色パターンは control の細胞ではほとんど観察されなかったが、lysosome を阻害した細胞ではしばしば観察することができた。

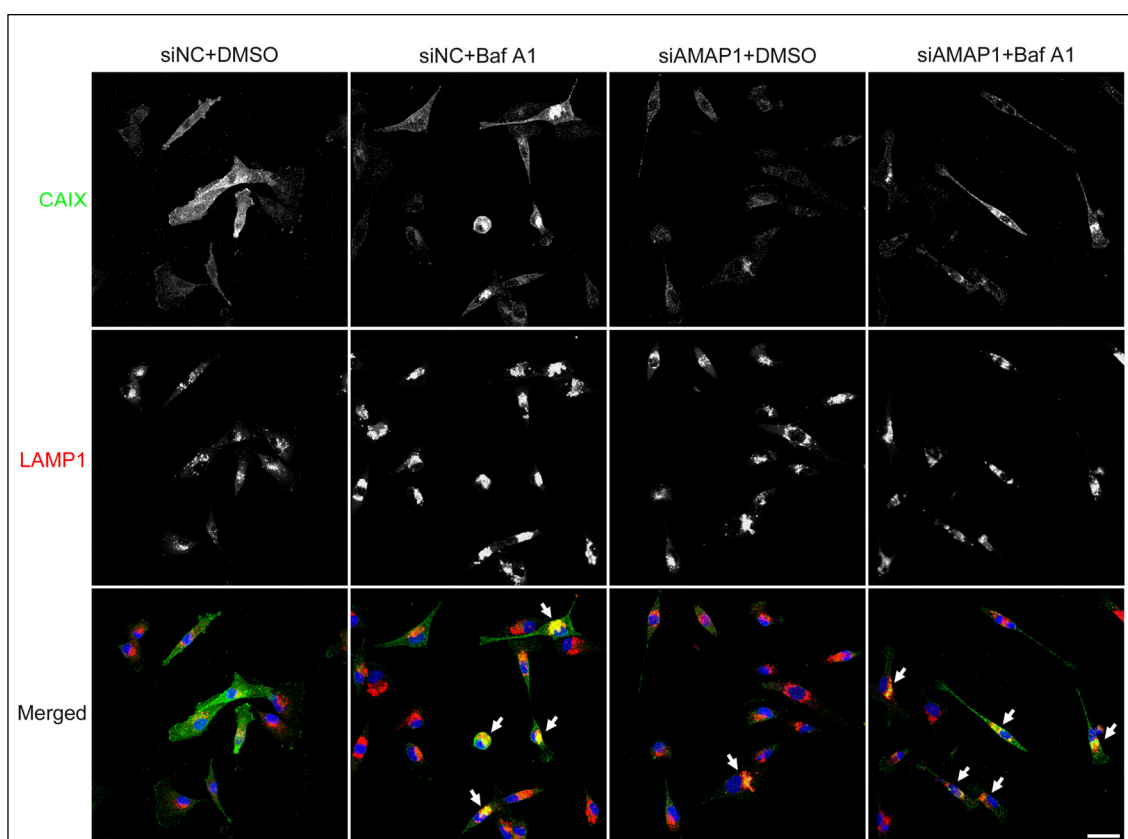
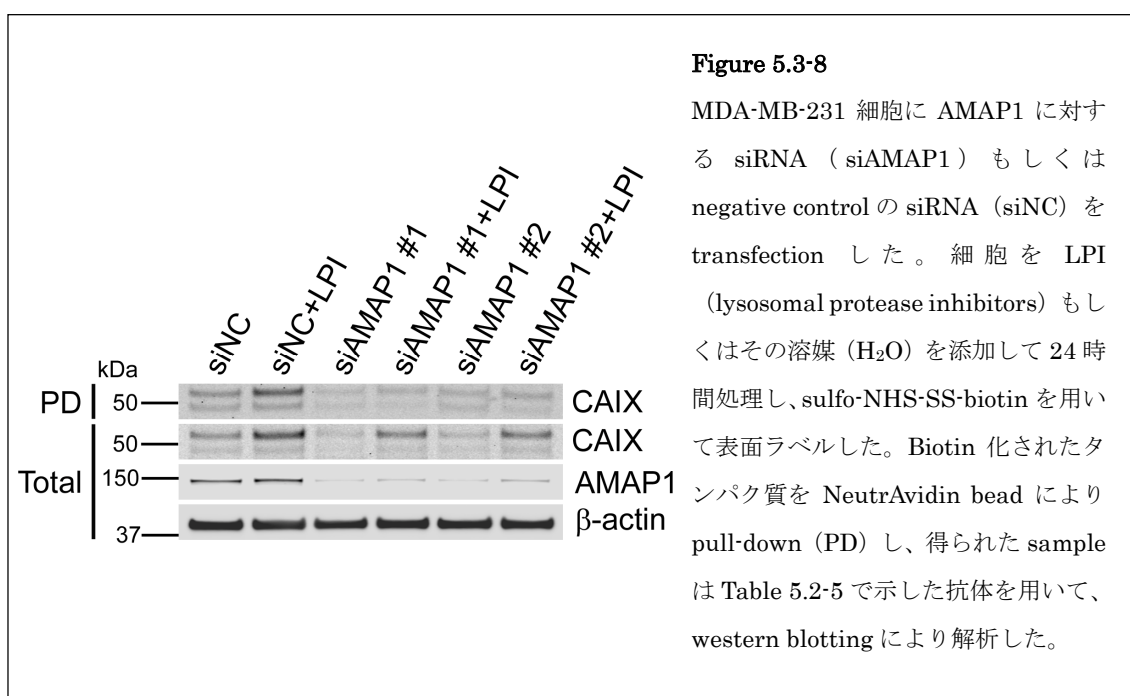


Figure 5.3-7

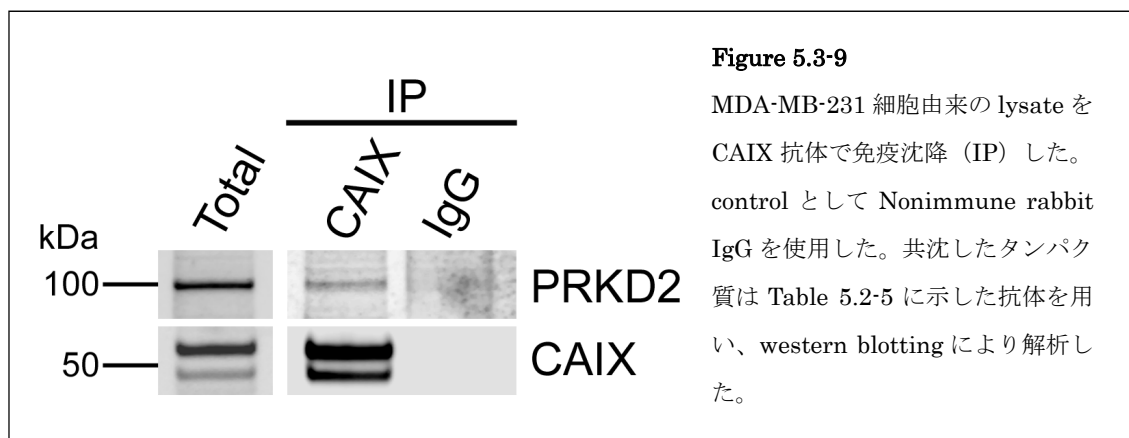
MDA-MB-231 細胞に AMAP1 に対する siRNA (siAMAP1) もしくは negative control の siRNA (siNC) を transfection した。細胞を Bafilomycin A1 (Baf A1) もしくはその溶媒 (DMSO) で処理し、抗 CAIX 抗体 (green) および抗 LAMP1 抗体 (red) を使用して免疫染色した。核は Hoechst 33342 で染色した。白い矢印は LAMP1 陽性の小胞における CAIX の蓄積を指し示している。Scale bar は 20 μm を表す。

興味深いことに、control の細胞では lysosome を阻害すると表面ラベルされた CAIX の量が顕著に増加していた (Figure 5.3-8)。このことは、lysosome での分解を免れた CAIX は、何らかの機構により細胞表面に輸送されることを示唆している。一方で、AMAP1 を knockdown すると、lysosome の阻害を行っても表面ラベルされた CAIX の量はほとんど増加しなかった (Figure 5.3-8)。以上の結果を踏まえると、lysosome や後期 endosome からの CAIX の細胞表面への recycling back の過程には、AMAP1 が介在していることが示唆される。

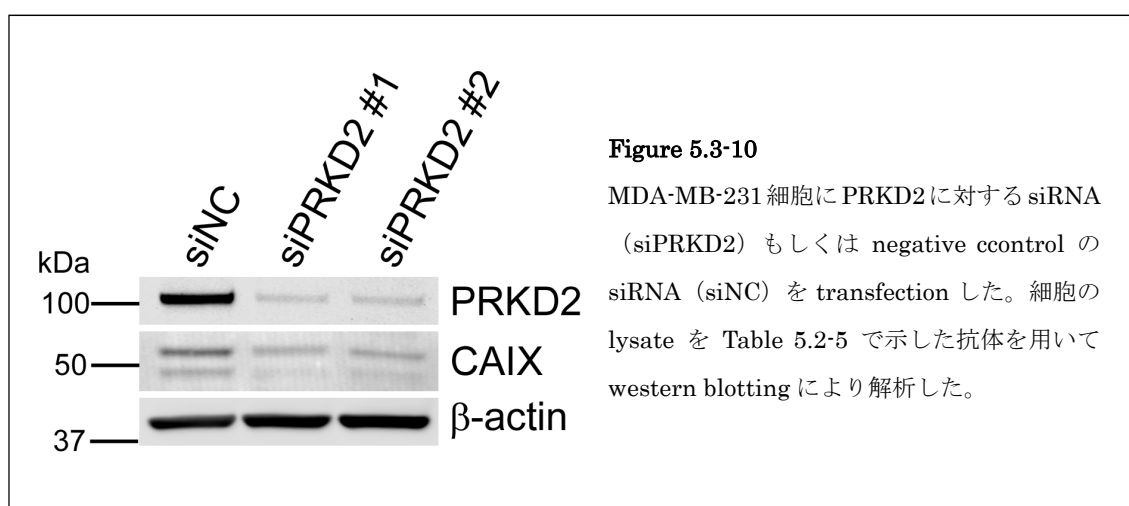


5.3-3 PRKD2 の介在による CAIX および AMAP1 間の相互作用

PRKD2 は $\beta 1$ -integrin の細胞内ドメインおよび AMAP1 の proline-rich 領域に結合して、両者を接続するアダプターとして機能している (Onodera et al., 2012)。このことから、PRKD2 が AMAP1 と CAIX との複合体形成に関与していると推測した。実際に、抗 CAIX 抗体を用いた免疫沈降により、CAIX を含むタンパク質複合体には PRKD2 も含まれることを確認できた (Figure 5.3-9)。



また、PRKD2 を knockdown した細胞では、AMAP1 を knockdown した細胞で観察されたのと同様に、CAIX の総タンパク質量が減少すること (Figure 5.3-10) を確認した。さらにこのとき、阻害剤を用いて lysosome によるタンパク質分解を抑制すると、CAIX の総タンパク質量が大部分回復することも確認できた (Figure 5.3-11 参照)。



続いて、AMAP1 と CAIX の相互作用が PRKD2 によって媒介されているか、検討を行った。異なる実験条件間での CAIX のタンパク質量を揃えるために、PRKD2 を knockdown した細胞には lysosome inhibitor (NH₄Cl および Leupeptin) を処理した。抗 CAIX 抗体を用いた免疫沈降により、PRKD2 の knockdown を行った細胞では、CAIX を含むタンパク質複合体から AMAP1 が完全に除外されることが確認され (Figure 5.3-11)、PRKD2 は AMAP1 と β 1-integrin を接続するアダプターとして、CAIX と AMAP1 の相互作用に寄与していることが示唆された。以上の結果から、CAIX の細胞膜への輸送は、AMAP1-PRKD2 経路を介して β 1-integrin と共に制御されていることが示唆された。

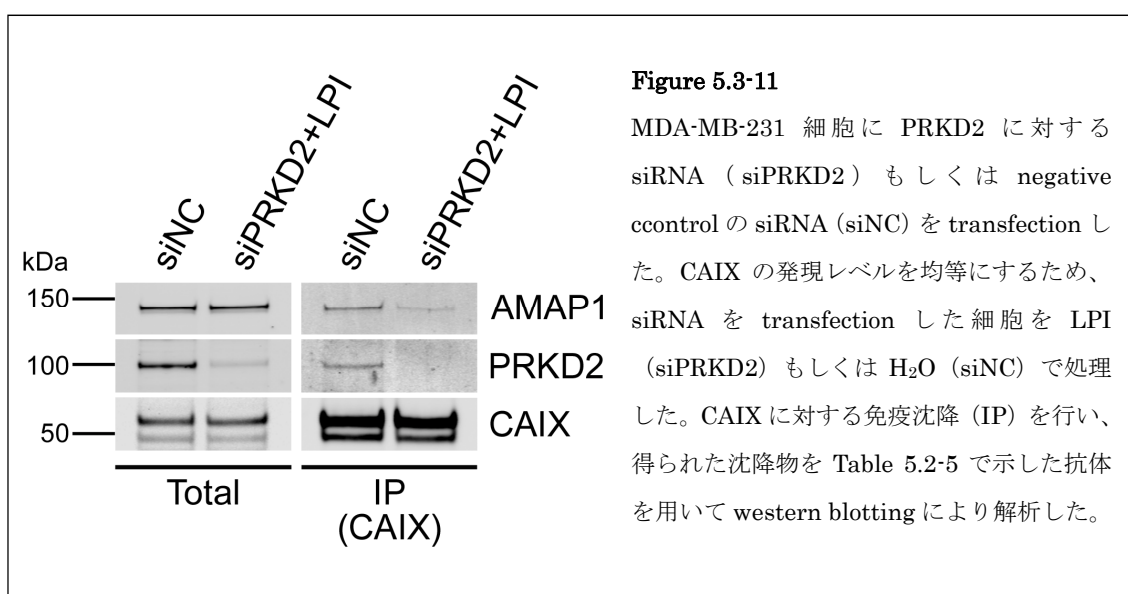
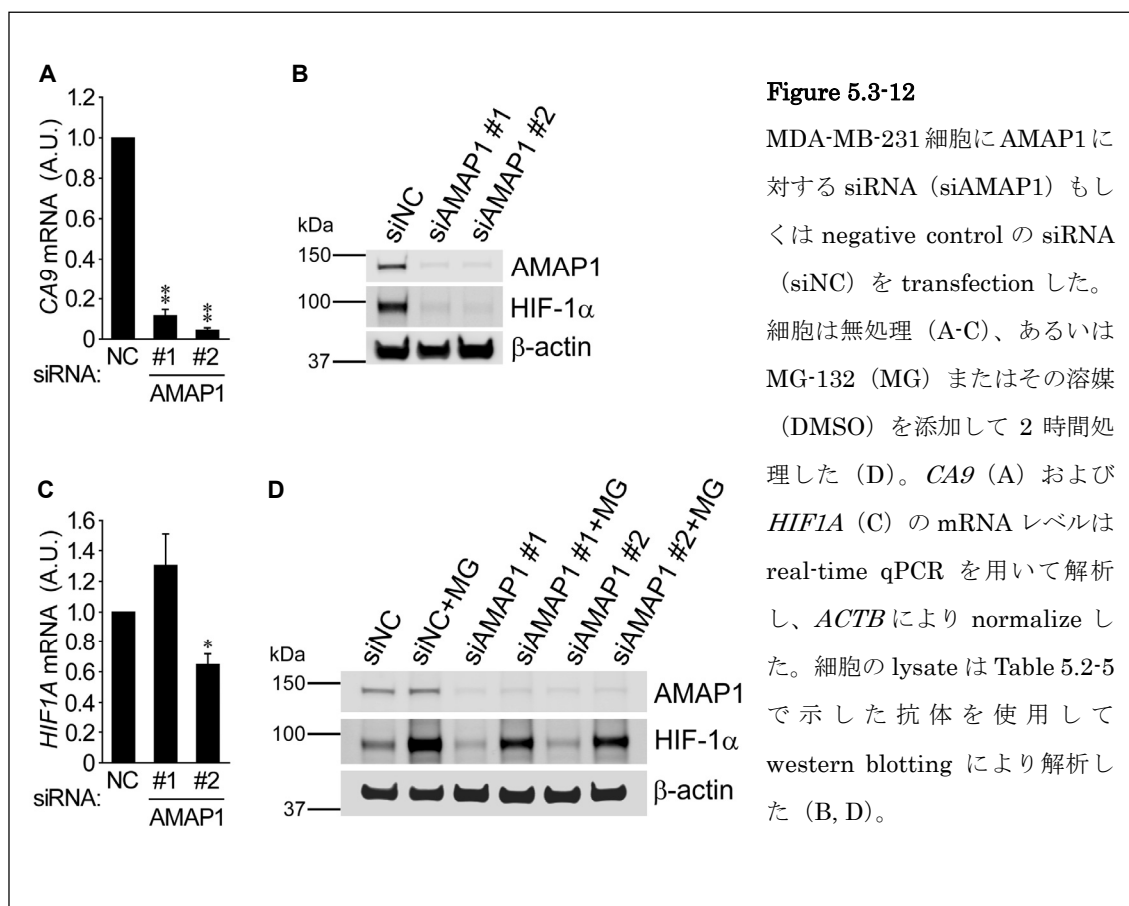


Figure 5.3-11

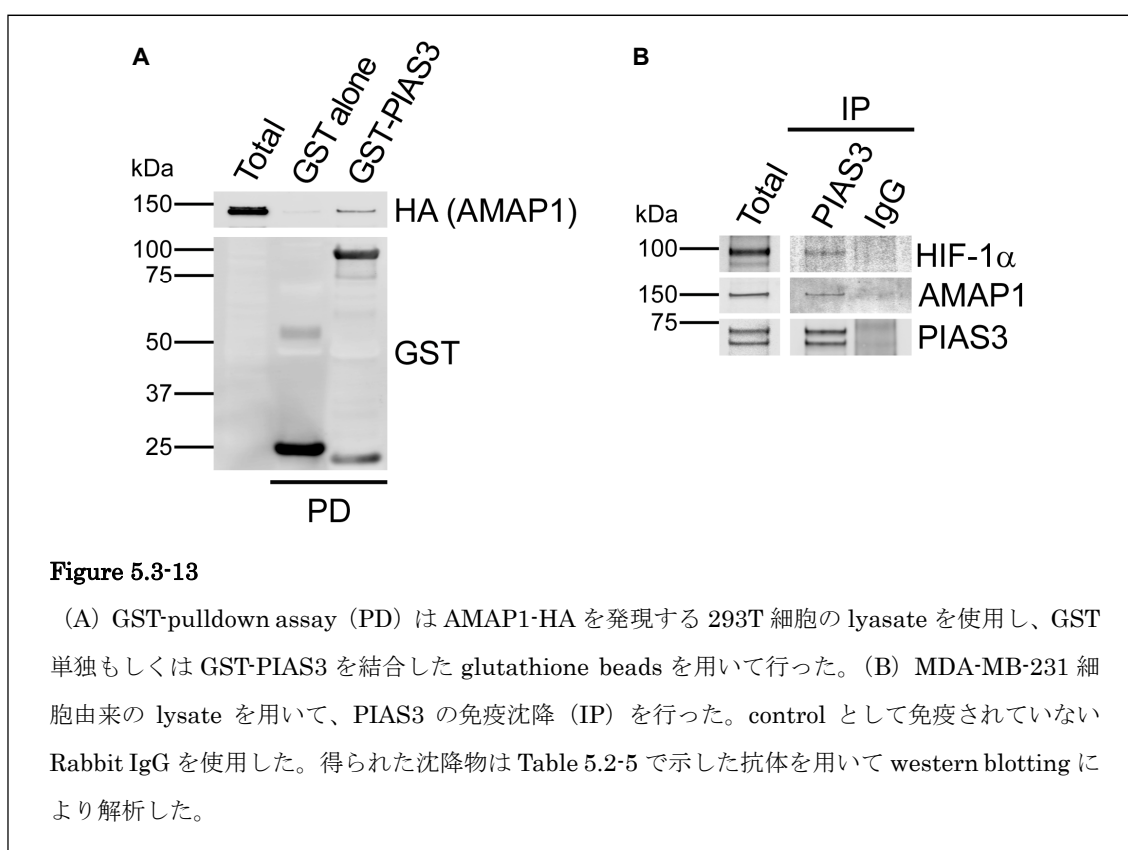
MDA-MB-231 細胞に PRKD2 に対する siRNA (siPRKD2) もしくは negative control の siRNA (siNC) を transfection した。CAIX の発現レベルを均等にするため、siRNA を transfection した細胞を LPI (siPRKD2) もしくは H₂O (siNC) で処理した。CAIX に対する免疫沈降 (IP) を行い、得られた沈降物を Table 5.2-5 で示した抗体を用いて western blotting により解析した。

5.3.4 AMAP1によるHIF-1 α を介したCA9の転写制御

AMAP1 knockdownによりCAIXタンパク質レベルが顕著に減少すること、lysosome阻害剤によるCAIX発現量の回復は部分的であることから、AMAP1 knockdownによるCA9の転写への影響についても検討した。qPCRを用いて定量すると、CA9のmRNAレベルはAMAP1 knockdownにより著明に減少することが明らかとなった (Figure 5.3-12 A)。HIF-1 α はCA9の転写制御において中心的な役割を担っている (Kaluz et al., 2009 ; De Simone and Supuran, 2010)。MDA-MB-231細胞を含むいくつかの乳癌細胞のcell lineでは、通常酸素条件においても腫瘍が分泌する代謝産物によってHIF-1 α が安定化されていることが知られている (Briggs et al., 2016)。興味深いことに、HIF-1 α のタンパク質レベルはAMAP1 knockdownにより顕著に減少した (Figure 5.3-12 B)。このときHIF1AのmRNAレベルには影響が見られなかったこと (Figure 5.3-12 C)、またHIF-1 α のタンパク質レベルはプロテアソーム阻害剤であるMG-132により大部分回復したことから (Figure 5.3-12 D)、タンパク質レベルの制御に影響が生じたことが示唆された。なおこのとき、HIF-1 α のタンパク質レベルはlysosomal protease inhibitorによって回復しないことも確認している。

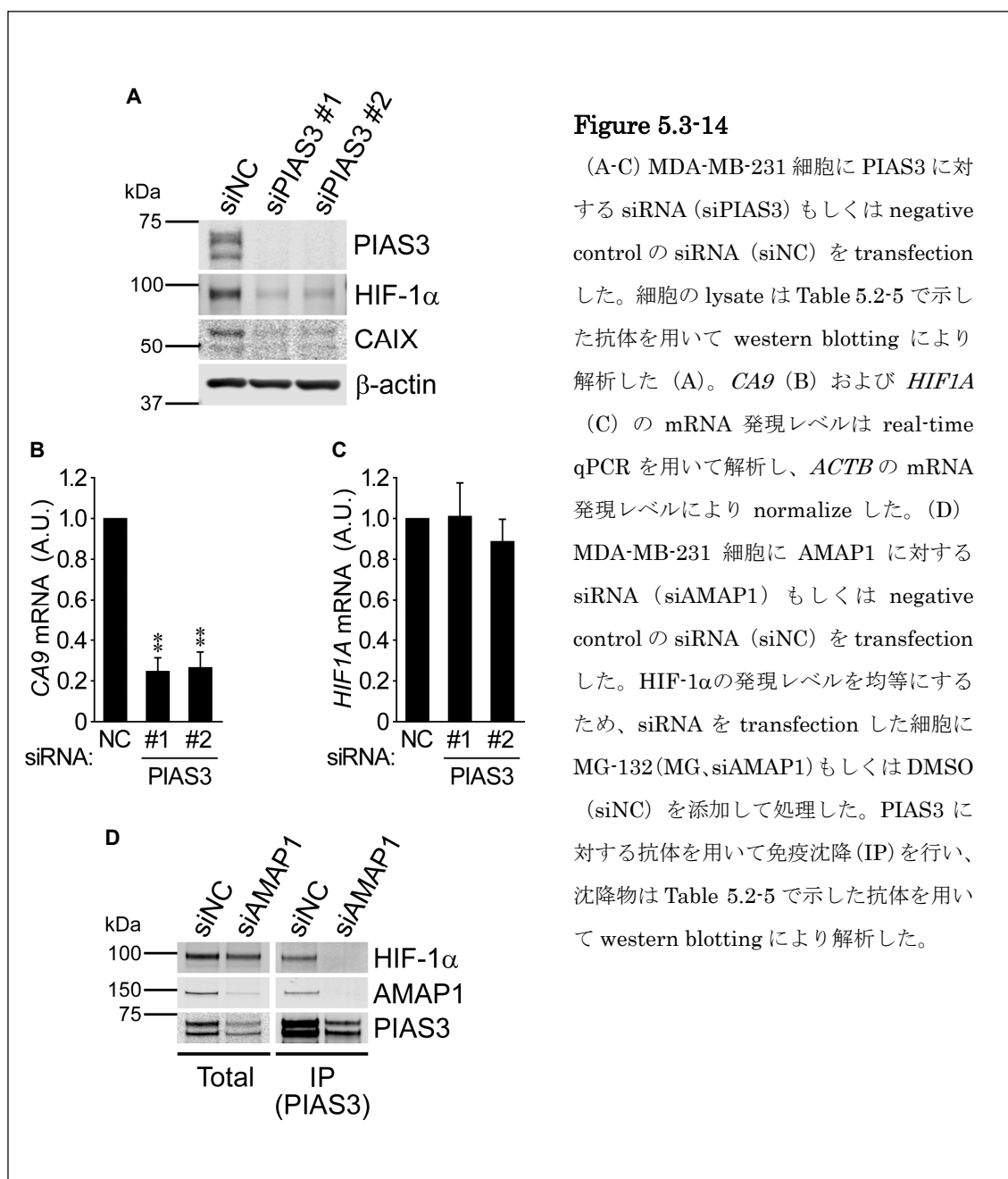


所属する研究グループではこれまでに、yeast two-hybrid system を用いた AMAP1 結合タンパク質の同定が行われており (Onodera et al., 2005)、そのようなタンパク質の 1 つとして得られた PIAS3 は、HIF-1 α と物理的に相互作用することで、HIF-1 α を VHL 非依存的なプロテアソームによる分解から保護することが報告されている (Nakagawa et al., 2016)。そこで *in vitro* pulldown assay により AMAP1 と PIAS3 との相互作用を検証したところ、実際に両者が結合することが確認された (Figure 5.3-13 A)。また、抗 PIAS3 抗体を用いた免疫沈降により、HIF-1 α と同様に、内在性の PIAS3 と AMAP1 との相互作用が MDA-MB-231 細胞において検出された (Figure 5.3-13 B)。

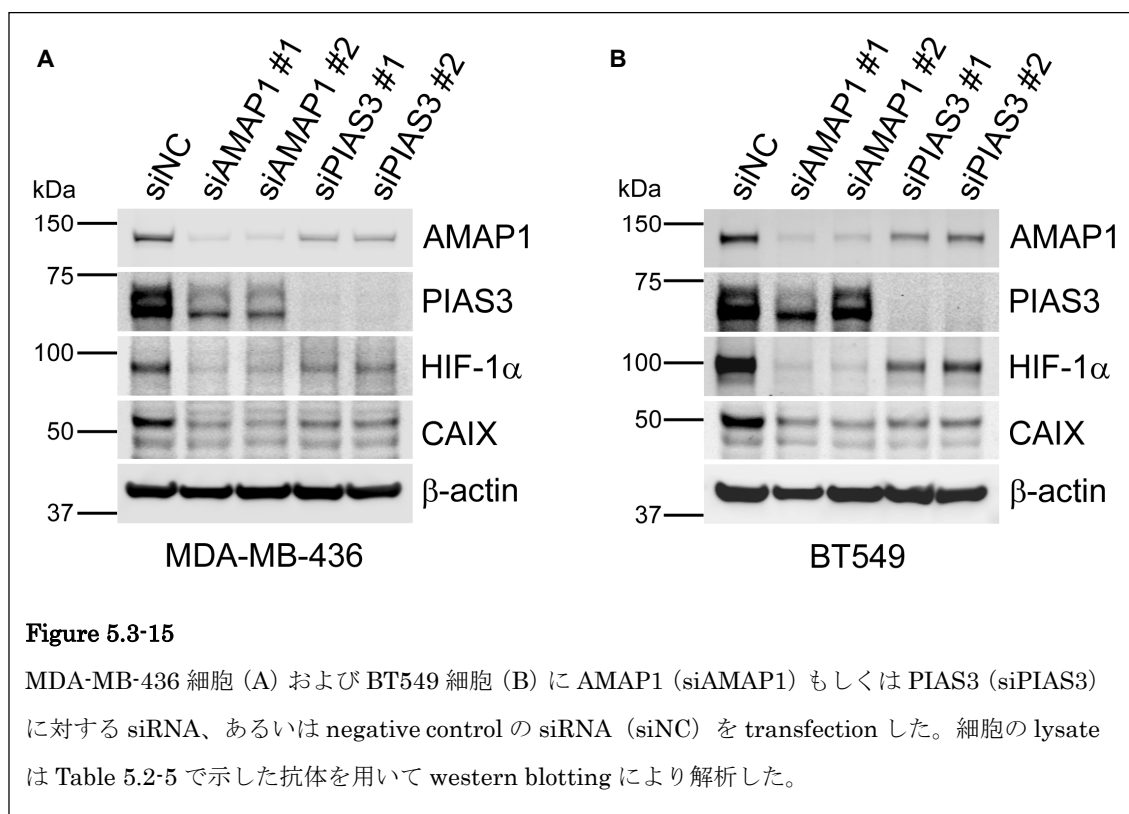


さらに、PIAS3 knockdown により、HIF-1 α および CAIX のタンパクレベルが減少することを確認した (Figure 5.3-14 A)。このとき CAIX タンパク質レベルの減少に関しては、mRNA レベルの減少を伴っていたものの (Figure 5.3-14 B)、*HIF1A* の mRNA については、PIAS3 knockdown によりほとんど影響を受けていなかった (Figure 5.3-14 C)。続いて、PIAS3 と HIF-1 α との相互作用において AMAP1 の存在が関与するか検討を行った。異なる実験条件間での HIF-1 α のタンパク質レベルを揃えるため、AMAP1 knockdown を行った細胞は MG-132

を添加して長時間 incubation した。この条件では、理由は明らかでないものの PIAS3 レベルが減少したが、HIF-1 α レベルは想定通りに維持することができた。PIAS3 の発現レベルの差異を考慮したとしても、AMAP1 を knockdown した細胞においては、HIF-1 α と PIAS3 の共沈は著明に減少していた (Figure 5.3-14 D)。これらの結果は、AMAP1-PIAS3 間の相互作用は PIAS3 が HIF-1 α に結合する際に重要な役割を担うことを示している。またそのようなメカニズムによって、AMAP1 は HIF-1 α の安定化や *CA9* の転写促進に寄与することを示唆している。



5.3.5 乳癌における AMAP1 および PIAS3 による協同的な CAIX 発現の促進
HIF-1 α および CAIX に対する AMAP1 と PIAS3 の共同的な働きが種々の乳がんにおいて共通した現象であるか検討するため、MDA-MB-436 や BT549 のような異なる高浸潤性乳癌細胞株を用いて解析を行った。これらの細胞株は浸潤性の低い細胞株と比較して AMAP1 のタンパク質レベルが高いことが知られている (Onodera et al., 2005)。またこれら 2 つの細胞株は、MDA-MB-231 細胞と同様に、通常酸素濃度の条件でも比較的高い HIF-1 α タンパクレベルを示すことが報告されている (Briggs et al., 2016)。MDA-MB-436 細胞と BT549 細胞のいずれにおいても、AMAP1 および PIAS3 の knockdown により、HIF-1 α と CAIX のタンパク質レベルが共に著明に減少した (Figure 5.3-15 A, B)。これらの結果は、MDA-MB-231 細胞で観察されたものと同様のメカニズムが、異なる乳癌細胞株においても確かに利用されていることを示唆している。



さらに、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを利用し、入手可能なヒトの乳癌サンプルの transcriptome dataset を解析した。*CA9* mRNA 発現レベルの平均値を *ASAP1* 高発現群、*PIAS3* 高発現群、あるいはいずれも高発現の群と、それ以外の群とで比較した。*ASAP1* 高発現群ではその他のサンプルと比べると *CA9* 発現レベルの平均値が比較的高い数値を示しており、閾値を上位 15% に設定した場合に両群間の差が最大となった (Figure 5.3-16 A)。一方、*PIAS3* 発現単独で階層化すると、それとは逆の傾向を示した (Figure 5.3-16 B)。しかしながら、興味深いことに *ASAP1* および *PIAS3* ともに高発現の群 (*ASAP1*: 上位 15%、*PIAS3*: 上位 12.5~50%) では *CA9* 発現レベルの平均値はより高くなっていった (Figure 5.3-16 C)。 *ACTB* 発現レベルの平均値はこれらすべての階層化においてほぼ一定の値を示していたことから、前述した傾向は *CA9* 特異的であることが示唆された (Figure 5.3-16 D)。

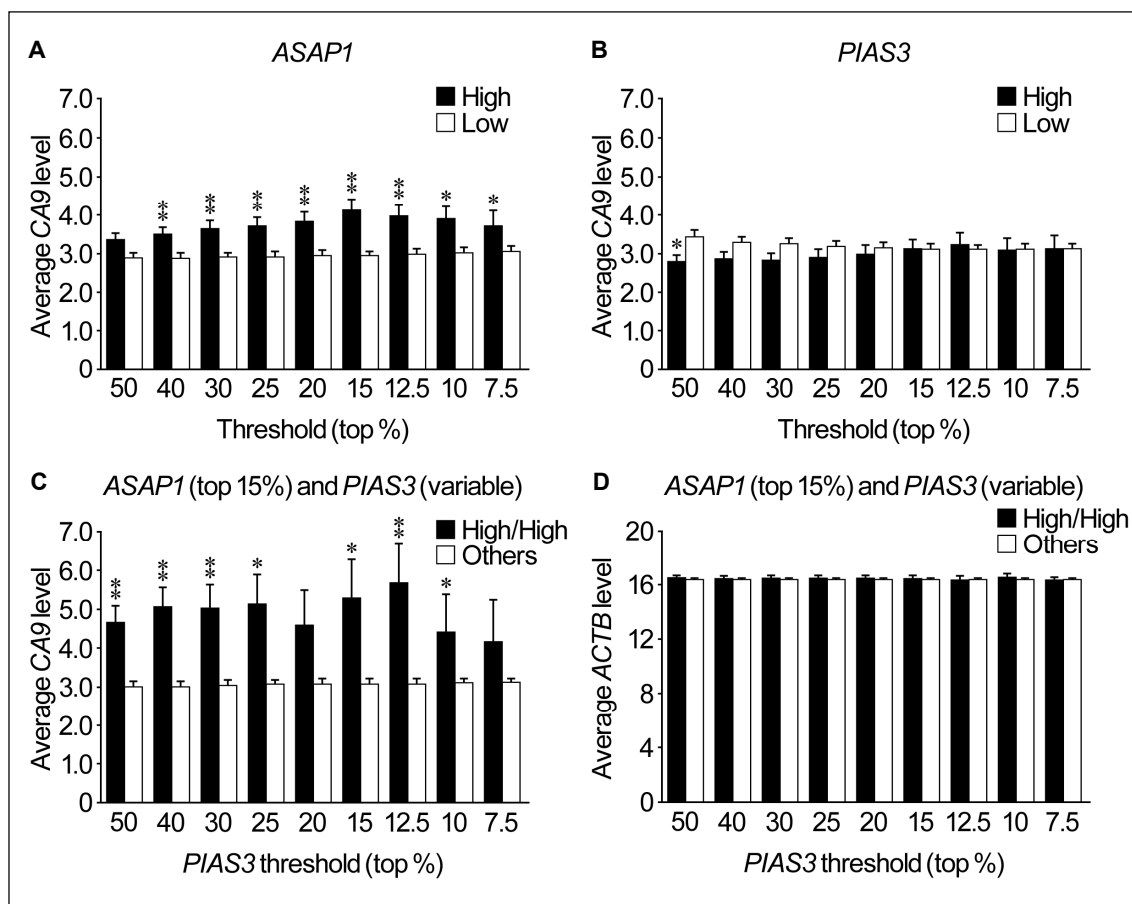
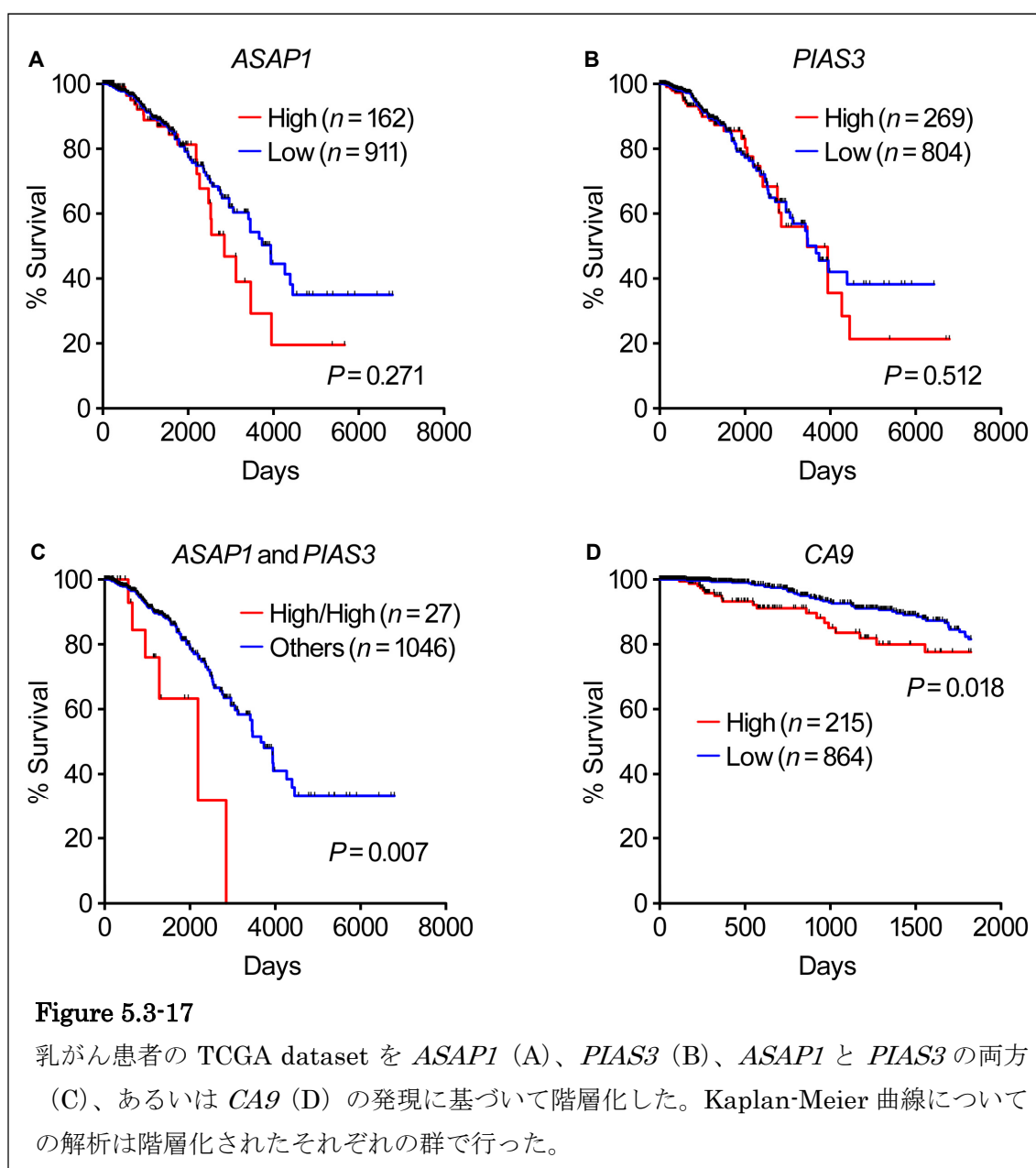


Figure 5.3-16

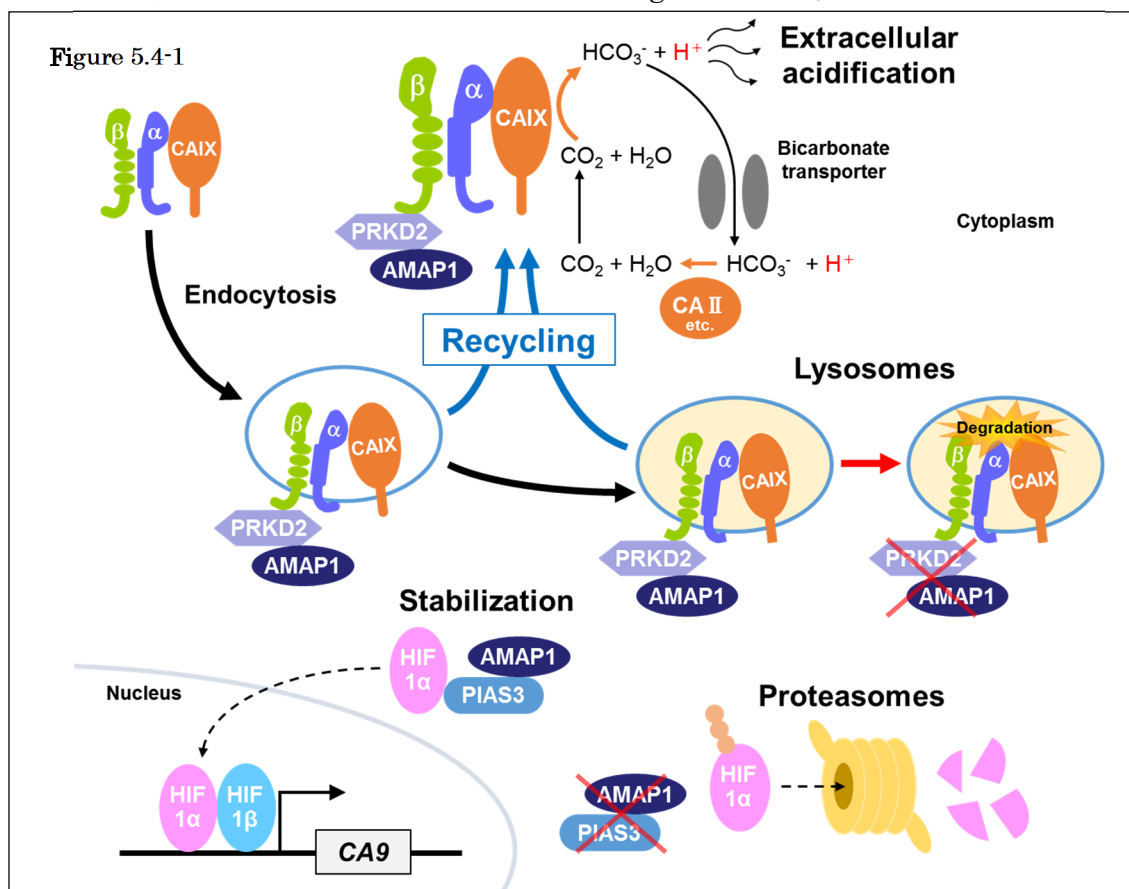
乳癌患者の TCGA dataset を *ASAP1* (A) もしくは *PIAS3* (B) あるいはその両方 (C、D) の発現に基づいて階層化した。*CA9* 発現レベル (A-C) および *ACTB* 発現レベル (D) の平均値の定量を階層化されたそれぞれの群で行った。

また、*ASAP1* 単独の高発現群（上位 15%）もしくは *PIAS3* 単独の高発現群（上位 25%）の患者における予後については、それらの発現が低い群と比較して統計的な違いは見られないものの (Figure 5.3-17 A, B)、*ASAP1* 高発現 (上位 15%) かつ *PIAS3* 高発現 (上位 25%) の群ではその他のサンプルと比較して著明に予後が悪化していた (Figure 5.3-17 C)。なお、過去の報告 (Chen et al., 2018) にあるように、*CA9* 単独の高発現群についても生存率に有意差が見られたものの、観察期間が 5 年程度の場合に限り、それ以降は差異が見られなかった (Figure 5.3-17D)。以上の結果から、*AMAP1* と *PIAS3* の協調的な作用は乳癌の予後に関連する決定的な因子であることが示された。

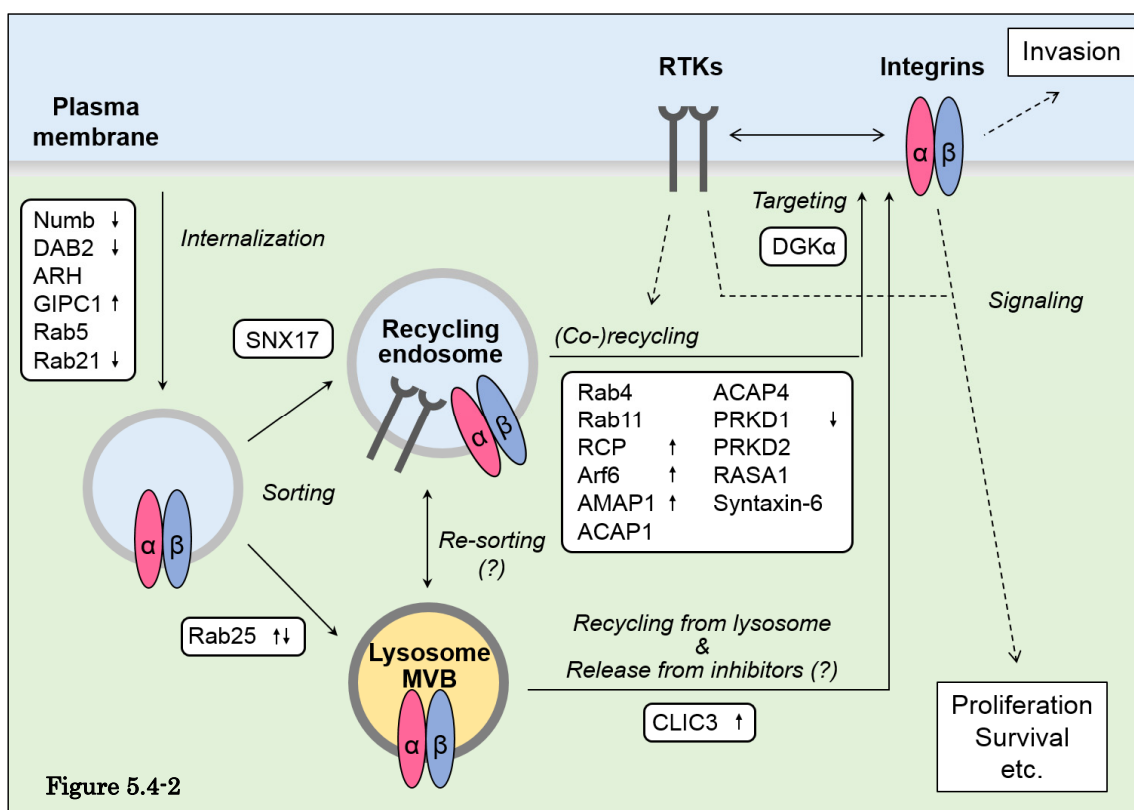


5.4 考察

CAIX の分子機能は主に炭酸脱水酵素としての触媒作用であると考えられていたが (Mboge et al., 2018 ; Supuran et al., 2018)、pH 制御を含む CAIX による多くの機能において、細胞外に表出している catalytic domain は必ずしも関わっておらず、同じく細胞外に表出する proteoglycan-like domain や、細胞膜上で相互作用するその他の膜タンパク質等を介する機能についても報告されている (Shin et al., 2011 ; Mboge et al., 2019 ; Jamali et al., 2015 ; Švastová et al., 2003 ; Mboge et al., 2021)。いずれにしても、これまで報告されてきた CAIX の役割は、専ら細胞表面におけるものであることを考慮すると、CAIX の機能において、細胞膜への局在は最も重要な制御の一つであると言える。一方で、CAIX の細胞内局在の制御メカニズムは、これまで詳細に研究されてこなかった。本研究では、CAIX の細胞表面レベルは、高浸潤性の癌細胞において $\beta 1$ -integrin の細胞表面への recycling を促進する AMAP1-PRKD2 経路 (Onodera et al., 2012 ; Onodera et al., 2018) により制御されることを新たに見出した。近年の研究から、CAIX は $\beta 1$ -integrin とタンパク質複合体を形成することが明らかとなった (Swayampakula et al., 2017)。これに加えて、本研究で見出した新たな知見を勘案すると、CAIX の輸送は AMAP1-PRKD2 経路を介して $\beta 1$ -integrin と共に制御されていることが示唆される (Figure 5.4-1)。



AMAP1 と PRKD2 のいずれかを knockdown した場合、CAIX の総タンパク質量が著明に減少し、lysosome におけるタンパク分解を阻害することにより発現量の一部が回復した (Figure 5.3-6, 5.3-11)。一方、control の細胞を同様に lysosomal inhibitor により処理した場合、総タンパク質量のみならず細胞表面の CAIX 発現量が明らかに増加していたことから (Figure 5.3-8)、CAIX の後期 endosome や lysosome への選別、およびそれらの細胞小器官からの細胞表面への recycling は、恒常的に行われていることが示唆された。実際に、MDCK 細胞においては CAIX を標的とする抗体である G250 がクラスリン依存的エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれること、また少なくともその一部は細胞表面に recycling されることが確認されている (Zatovicova et al., 2014)。AMAP1 を knockdown すると、このような lysosome を阻害した場合に起こる細胞表面での CAIX 発現レベルの上昇が著明に低減したことから (Figure 5.3-8)、AMAP1 経路は CAIX の recycling の過程に関与していることが強く示唆される。過去の報告では、lysosome からの Integrin の recycling は Rab25 および CLIC3 によって制御されることが示唆されている (Dozynkiewicz et al., 2012)。これらのタンパク質のみならず、Integrin の recycling に関わるその他のタンパク質群が (Hsu et al., 2020 ; Moreno-Layseca et al., 2019 ; Onodera et al., 2013 ; Paul et al., 2015) (Figure 5.4-2)、CAIX の細胞表面での発現量維持に関与するか否かについては、今後検証されるべきである。

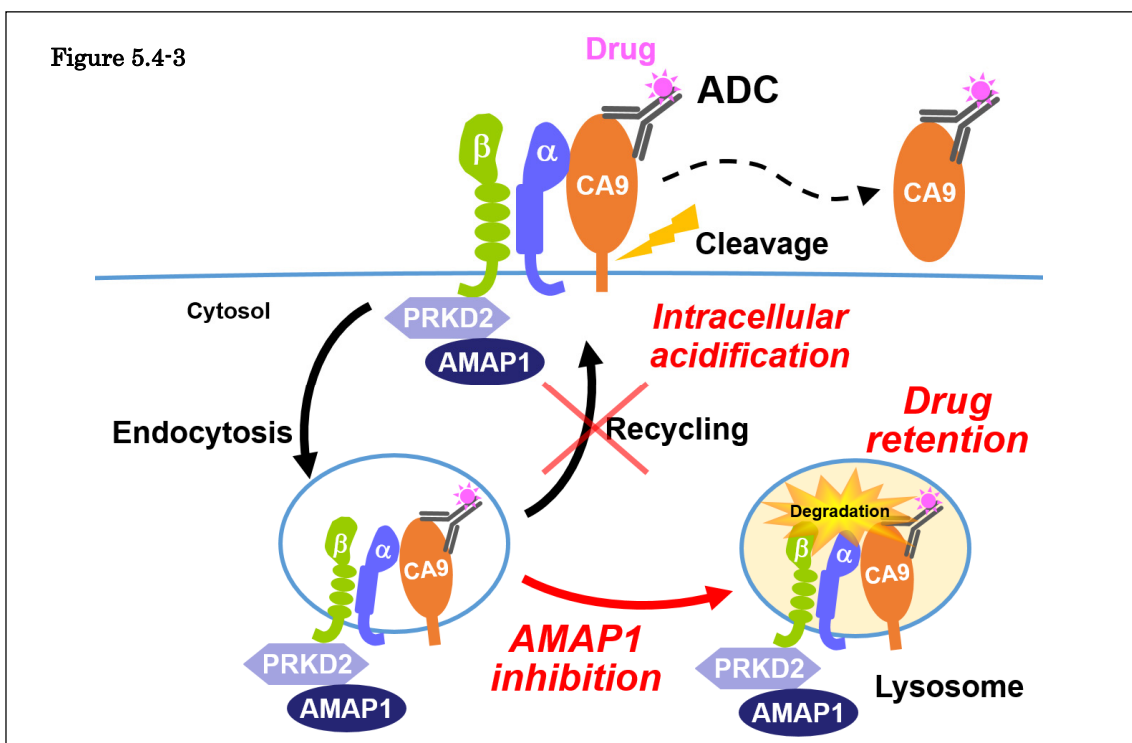


*CA9*の転写における *AMAP1* の影響についての検証では、*AMAP1* による *HIF-1α* タンパク質の安定化の制御という、当初は予想していなかった現象が見出された (Figure 5.3-12)。その他の実験結果も勘案すると、*PIAS3* は *AMAP1* と協調的に働くことにより *HIF-1α* を安定化し、その結果として *CAIX* 発現量の増加を誘導していることが示唆される。*CA9* の転写制御における *AMAP1* と *PIAS3* との協調的な作用は、TCGA データベースを利用した乳癌の解析によってもその可能性が支持された (Figure 5.3-16)。*PIAS3* は活性型 *STAT3* の inhibitor として知られており、しばしば、さまざまながんの悪性形質に対する suppressor のひとつとして記述される (Brantley et al., 2008 ; Dabir et al., 2014 ; Kluge et al., 2011 ; Wu et al., 2019)。興味深いことに、TCGA dataset の解析では *PIAS3* 発現自体は乳癌の予後との関連性が見られない一方、*ASAP1* の高発現と *PIAS3* の高発現が同時に発生する場合は、予後不良とよく相関することが明らかとなった (Figure 5.3-17)。*VHL* の欠失や *Oncometabolite* の蓄積など、他のメカニズムを介する *HIF-1α* の安定化によりがん細胞の悪性形質が誘導または増強されることは広く知られている (Masoud and Li, 2015 ; Schito and Semenza, 2016)。*ASAP1* 高発現/*PIAS3* 高発現の乳癌の予後不良は、部分的には *CAIX* が関与すると思われるが、それとは無関係の *HIF-1α* そのものによる影響を反映していると予想される。実際に、*CA9* 単独の高発現は乳癌の予後不良と相関するものの有意差が見られるのは比較的短期間に限定され、全体として *ASAP1* 高発現/*PIAS3* 高発現の場合ほど顕著な差は見られなかった (Figure 5.3-17)。このことは上記の予想と一致しており、今後検討すべき課題であると考えている。

AMAP1 による *CAIX* の輸送と転写の両側面における役割が相互にフィードバックするかどうかは、非常に重要なポイントである。*AMAP1-PIAS3* 間の協調的な作用は、*CAIX* の細胞内動態を「感知」しており、その状況を転写制御にフィードバックしているかもしれない。前述のように、*AMAP1* proline-rich 領域を用いた yeast two-hybrid screening では *PIAS3* が *AMAP1* の結合因子として特定されたが、このとき得られたその他の結合タンパク質群から、*AMAP1* は *CAIX* のみならず、細胞表面に局在するさまざまな代謝制御因子（たとえばトランスポーターなど）と直接的あるいは間接的に相互作用していることが推測される。興味深いことに、そのような *AMAP1* と関連する代謝制御因子の一部は *HIF-1* 経路により転写を制御されることが知られており、このことはそれらが *AMAP1* によっても *CAIX* のような二重制御を受け得ることを示唆する。*PIAS3* と *HIF-1α* の相互作用が *AMAP1* により調節される詳細な分子メカニズムは、今後の研究により解明しなければならない重要な課題である。また、転写と輸送の間の相互作用が細胞表面タンパクの制御において共通するメカニズム

であるかどうかは、非常に興味深い点である。

がん細胞に特異的かつ低酸素により誘導される CAIX の発現は、がん治療に利用するためにはむしろ都合がよく、非常に有望な標的であると言える。しかしながら、CAIX の非触媒的な役割は、それを効果的に阻害するためには多面的なアプローチが必要であり、これまで行われてきたような catalytic domain の標的に基づく酵素活性の阻害だけでは十分でないことを示唆している。CAIX を標的とする新たな戦略として、antibody-drug conjugates (ADC) や small molecule-drug conjugates (SMDC) のような、CAIX 標的剤への毒性物質の付加が近年盛んに研究されている (Cazzamalli et al., 2018 ; Mboge et al., 2015 ; Singh et al., 2018)。このような手段により癌細胞を攻撃する場合、標的とするタンパク質の細胞内動態が、その効果に多大な影響を与えることが知られている (Chalouni and Doll, 2018)。重要なことに、ヒト CAIX は細胞表面において切断を受けることが知られている (Takacova et al., 2019 ; Zatovicova et al., 2005)。たとえば細胞表面で ADC や SMDC とすでに結合している CAIX タンパク質がそのような切断を受ければ、細胞外ドメインごと ADC や SMDC を切り離すことによって、治療の効果を抑制してしまう可能性がある。したがって、CAIX の細胞内輸送機構の阻害は、これらのような治療モダリティの効果をさらに高めることにも利用できるかもしれない (Figure 5.4-3)。さらには、CAIX が介在するがん細胞の悪性形質の阻害や、本研究の目的としている「腫瘍微小環境の適正化」によって、新たな治療戦略となる可能性を秘めている。

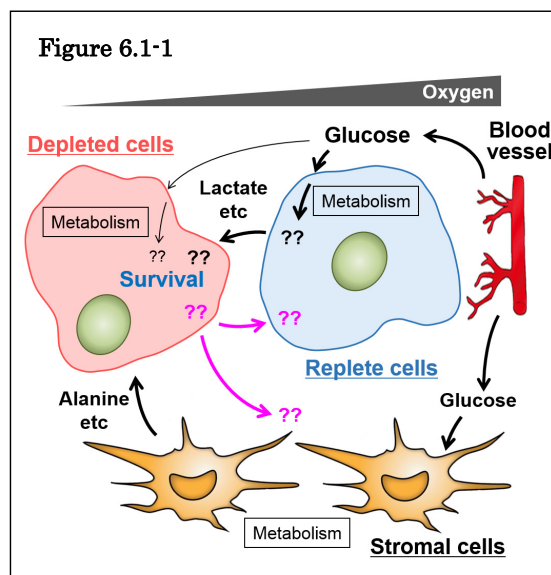


6. 第二章：腫瘍微小環境の糖枯渇に起因する細胞間代謝協調に関する解析

6.1 緒言

腫瘍内では血管からの距離の違いや周囲のがん細胞の糖代謝亢進によりそれぞれの細胞でグルコースへのアクセシビリティに差異が生じると考えられる。実際に、複数の先行研究で腫瘍深部において糖枯渇が起こることが示されている

(Walker-Samuel et al., 2013 など)。培養環境における糖枯渇は多くのがん細胞を数日のうちに死滅させることを考慮すると、腫瘍組織内の糖欠乏細胞は、グルコース以外の何らかの物質を利用して生存していると推測される。他の細胞に由来する代謝産物等の利用による生存性の維持は一般に「代謝協調」と呼ばれており、グルコースを含む種々の栄養素の欠乏に対する腫瘍の応答として、近年非常に注目されている (Gupta et al., 2017 など) (Figure 6.1-1)。



糖枯渇は免疫細胞の機能を著しく減弱させることが知られており、薬剤および放射線の効果にも影響を与えられている (Gupta et al., 2017 など)。したがって、酸性化への細胞応答と同様に、代謝協調を介した糖枯渇への応答に関する分子メカニズムの解明は、腫瘍の成長を抑制しながら微小環境を適正化するための方法論の導出において非常に大きな意義を持つと考えられる。以上の背景から、本研究では腫瘍内グルコース分布の不均一性を原因として、糖が充足している細胞由来の代謝産物を糖欠乏状態の細胞が受け取り生存を維持しているような「代謝協調」を想定し、そのメカニズムの解析を行うこととした。

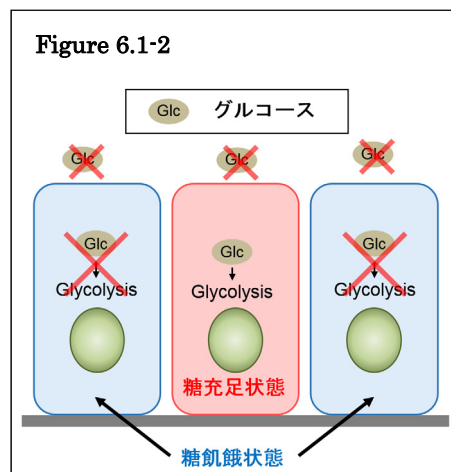
上記のような代謝協調の解析において大きな障壁となるのは、適切な *in vitro* 解析系が存在しないことである。従来のような二次元培養法では、局所的な糖枯渇を再現することはできない。また、種々の三次元培養法で形成した腫瘍塊は糖枯渇領域を生じるものの時空間的な規定はできない (後述)。グルコースの不均一性に基づく代謝協調状態を実験系で再現するための最も簡便な方法は、特定の細胞にのみ糖代謝を行わせることである。より具体的には、グルコースの取り込みを局所的に制御できれば、単一の培養系における糖充足細胞と糖欠乏細胞の共存が可能となり、代謝協調状態を再現できるものと予想される。グルコースの輸送体は GLUT ファミリーや SGLT ファミリーなどを含めると多数存在することが知られている (Table 5.2-8) (Keating and Martel, 2018)。

Table 5.2-8 List of glucose transporters

Family	Isoform	Gene name	Tissue distribution	Substrate specificity
GLUT	GLUT1	SLC2A1	Ubiquitous (brain, red blood cells, colon, placenta)	Glucose/galactose
	GLUT2	SLC2A2	Intestine, liver, kidney, beta cells	Glucose/fructose/galactose
	GLUT3 (GLUT14)	SLC2A3	Brain, testis, kidney, placenta	Glucose/galactose
	GLUT4	SLC2A4	Skeletal and cardiac muscle cells, adipose cells	Glucose
	GLUT5	SLC2A5	Intestine, kidney, muscle, brain, testis	Fructose
	GLUT6	SLC2A6	Brain, spleen	Glucose
	GLUT7	SLC2A7	Small intestine, colon, testis, prostate, liver	Fructose, glucose
	GLUT8	SLC2A8	Testis, brain, fat, liver, spleen	Glucose/fructose
	GLUT9	SLC2A9	Kidney, liver, placenta, colon	Fructose/glucose
	GLUT10	SLC2A10	Heart, lung	Glucose
	GLUT11	SLC2A11	Muscle, heart, placenta, kidney, pancreas, fat	Glucose
	GLUT12	SLC2A12	Heart, prostate	Glucose/fructose
SGLT	SGLT1	SLC5A1	Intestine, trachea, kidney, heart, brain, testis, prostate	Glucose/galactose
	SGLT2	SLC5A2	Kidney, brain, liver, thyroid, muscle, heart	Glucose
	SGLT3	SLC5A4	Intestine, testis, uterus, lung, brain, thyroid	Glucose
	SGLT4	SLC5A9	Intestine, kidney, liver, brain, lung, trachea, uterus, pancreas	Glucose
	SGLT5	SLC5A10	Kidney	Glucose/galactose
	SGLT6	SLC5A11	Kidney, brain, intestine	Glucose

(Keating and Martel, 2018)

理論上、これら全ての遺伝子の発現抑制を細胞特異的に行えば局所的な糖欠乏を誘導できるが、必要な労力や実現可能性を考慮すると最善な方法とは言えない。また、多くの代謝酵素が「内臓酵素」として代謝以外の役割を持つことを考慮すると (Boukouris et al., 2016 など)、解糖系酵素の阻害も不適切である。そこで本研究では、逆転の発想として、「特定の細胞にグルコースを発生させる」ことを考えた (Figure 6.1-2)。のちに詳述するが、特殊な遺伝子を複数導入することにより、通常ヒトの細胞では代謝することのできない「前駆体」からグルコースを生じさせることができると考えた。



しかしながら、この仕組みで糖代謝制御を行いつつ、さらに何らかの遺伝子の発現を制御する場合 (過剰発現やノックダウンなど) や、発光または蛍光タンパク質プローブなどを導入する場合を想定すると、さらに多くの遺伝子構築の導入が必要となり、以降の解析での実用性を考慮すると、多数の遺伝子構築の全てが導入された細胞を容易かつ高効率に選択するための手法の確立が必要不可欠であることに思い至った。そこで本研究では、上記の糖代謝制御法の開発と並行して、複数の遺伝子構築を導入した細胞を単一の薬剤によって選択できる「分割型薬剤マーカー遺伝子」の開発に着手した。以下に、分割型マーカーおよび細胞特異的な糖代謝制御法の意義および原理の詳細を述べる。

・分割型薬剤マーカー遺伝子の意義および原理

遺伝子構築をウイルスベクターやトランスポゾン、ゲノム編集等により細胞に導入し、それらをさまざまな実験に使用することは、現在の生物学関連の研究において、必要不可欠な技術である。この際、後に続く実験が精密であるほど、正しく遺伝子導入された細胞のみをより確実に選び出すことが求められる。本研究で行う細胞特異的な糖代謝の制御においても、「グルコース前駆体」のトランスポーターと代謝酵素を確実に同時発現させることが、より精度の高い解析を行うために不可欠である（後述）。

現在、遺伝子導入細胞を最も簡便に選択する方法として広く用いられている手法は、導入する構築自体に組み込まれた「マーカー遺伝子」の利用である。代表的なマーカー遺伝子としては蛍光タンパク質や特定の薬剤の代謝酵素などが挙げられる。前者の蛍光タンパク質マーカーでは、GFPやRFPなどの蛍光を利用し、セルソーターによって分離することで目的の細胞を選別する。この方法ではある強度以上の蛍光を示す細胞を選択することで、目的の遺伝子構築を十分に発現する細胞を選び出すことができるが、セルソーターは研究室によっては管理・保有の難しい装置であることや、選別の為に用いた蛍光波長域は後の解析で使用できなくなるという問題がある。

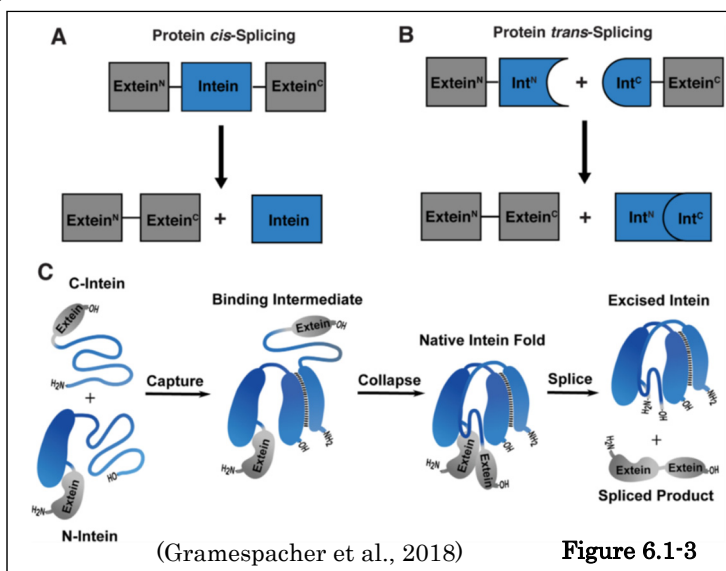
一方、後者の薬剤代謝酵素を用いた手法では、PuromycinやBlasticidin Sなどの細胞毒性を有する薬剤を細胞培養液に添加し、それらを代謝・無害化する酵素をマーカーとして発現する細胞のみが生存できることを利用して目的の細胞を選別する（Perez-Gonzalez et al., 1985 ; Vara et al., 1986）。こちらの方法は特別な装置を必要とせず、薬剤のみの使用で細胞の選別ができる点で優れている。しかし、薬剤による選別は蛍光タンパク質マーカーを用いる場合と比べて、遺伝子構築が導入されなかった細胞を排除するために比較的長い期間を要すること、細胞の種類により薬剤処理の際の適正な薬剤濃度・期間も異なり、実験ごとに処理条件の最適化が必要である点が欠点である（Nakatake et al., 2013）。また、導入したい遺伝子構築の数が増えるとそれだけ選別に必要な薬剤も増えるが、選別に適する薬剤の数に限りがある点や処理条件の決定がさらに複雑化することが問題となる。なお、このような多重選択については、蛍光タンパク質マーカーを用いた場合も、蛍光波長の選択数の制限や細胞の抽出手順が煩雑になること、偽陽性が生じやすくなることが課題である。

前述した selection 効率の問題に加え、使用する薬剤の種類によっては予期しない副次的な反応が起こることも報告されている。具体的には、selection 薬剤として Zeocin を用いるとき、処理が高濃度もしくは長期間になった場合に DNA ダメージや変異がしばしば引き起こされる（Trastoy et al., 2005; Tsukuda and Miyazaki, 2013）。その他にも、Neomycin/G418やHygromycin Bなどの

耐性遺伝子として用いられる aminoglycoside phosphotransferase 関連の酵素はプロテインキナーゼとして機能することを示唆する報告があり (Daigle et al., 1999; Smulian et al., 2007; Stogios et al., 2011)、それらの使用により selection された細胞の細胞内シグナリングが影響を受ける危険性がある。さらに、Puromycin 耐性遺伝子については活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 依存的にタンパク凝集を誘導する可能性が示されているが、安定発現細胞株ではそのような影響はみられない (Moran et al., 2009)。したがって、使用する薬剤を決定する上で、薬剤の種類をなるべく少なく抑えるだけでなく、実験上好ましくない影響を及ぼす薬剤を避けて適切な組み合わせを選択することが非常に重要である。

そこで本研究では、過去の報告から細胞への影響や選択効率の面で最も優れた薬剤マーカーであると考えられる「ピューロマイシン耐性酵素 (PAC: puromycin-N-acetyltransferase)」に着目し、Puromycin 単剤のみで複数の遺伝子構築を導入した細胞を同時あるいは段階的に selection することのできる新たな手法の確立を試みた。具体的には、PAC を活性のない2~4分割の断片として細胞に発現させ、それらが正しく結合して全長酵素として再構成してはじめて耐性を示すような仕組みの開発に取り組んだ。分割された PAC はタンパク質のトランススプライシングを介する複数の split-intein と呼ばれる分子により再構成されるよう設計した。

以下に、intein の特徴や機能について述べる。mRNA における intron と exon の対応と同様に、intein により分割されたタンパク質は extein と呼ばれ、N 末端側と C 末端側をそれぞれ N-extein および C-extein (Ext_N 、 Ext_C) と呼ぶ。両者を分断する intein が除去されると共に、 Ext_N および Ext_C



はペプチド結合により接続されて一つのタンパク質となる (Figure 6.1-3、Gramespacher, et al., 2018)。この反応は、cis-splicing と呼ばれる。また、場合によって intein は分割された “split-intein” として存在しており、N 末端側と C 末端側をそれぞれ N-intein および C-intein (Int_N 、 Int_C) と呼ぶ。両者が会合することで上記と同様の反応を起こすことが可能であり (Figure 6.1-3)、

これを *trans*-splicing と呼ぶ。種々の intein および split-intein が存在するが、その多くにおいて、Ext_C の 1 番目のアミノ酸はセリンもしくはシステインであることが望ましいとされている (Aranko et al., 2014; Carvajal-Vallejos et al., 2012; Dassa et al., 2009)。すなわち、*trans*-splicing によってタンパク質の分割・再構成を行う場合、セリンまたはシステインを分割点とする必要がある。

本研究では、幾つかの異なる split-intein により PAC をさまざまな部位で N 末端側および C 末端側に分割し (PAC_N、PAC_C)、各 split-intein において最適な PAC 切断部位を決定した。これらの「最適切断部位」において PAC を複数の断片に分割し、各断片を異なる Int_N/Int_C のペアによって接続することで、PAC の全長タンパク質を正しく再構成させることを試みた。PAC のアミノ酸配列に存在するセリンおよびシステイン残基は少数であり、分割点の候補が限られる。そこで本研究では、PAC の類似酵素のアミノ酸配列に含まれるセリン・システイン残基を検索し、それらに対応した位置にあるアミノ酸をセリン・システイン残基に置き換えた PAC 変異体を作成し、*trans*-splicing と再構成後の酵素活性を検討した。赤色または緑色の蛍光タンパク質を bicistronic に発現する vector にこれらの PAC-intein 断片を組み込んで細胞に安定導入して Puromycin にて selection したのち、両方の蛍光タンパク質を発現する割合をそれぞれの分割点について解析した。また、selection 後の細胞における、高濃度の Puromycin 濃度への耐性についても検討した。これらについて良好な結果を示す切断部位を組み合わせることができれば、3 つ以上の断片に分割した PAC を再構成して酵素活性をもたせることができると考えた。また、上記のようにして得た「多分割型 PAC 遺伝子」をウイルス様粒子 (VLP : virus-like particle) に組み込み、VLP による細胞外からのタンパク質導入を介して PAC 断片を再構成することができれば、複数の遺伝子構築を一つずつ導入し、その都度 Puromycin 選択を行うことができるような、stepwise selection に対応することも可能となると考え、そのような技術の開発も試みた。

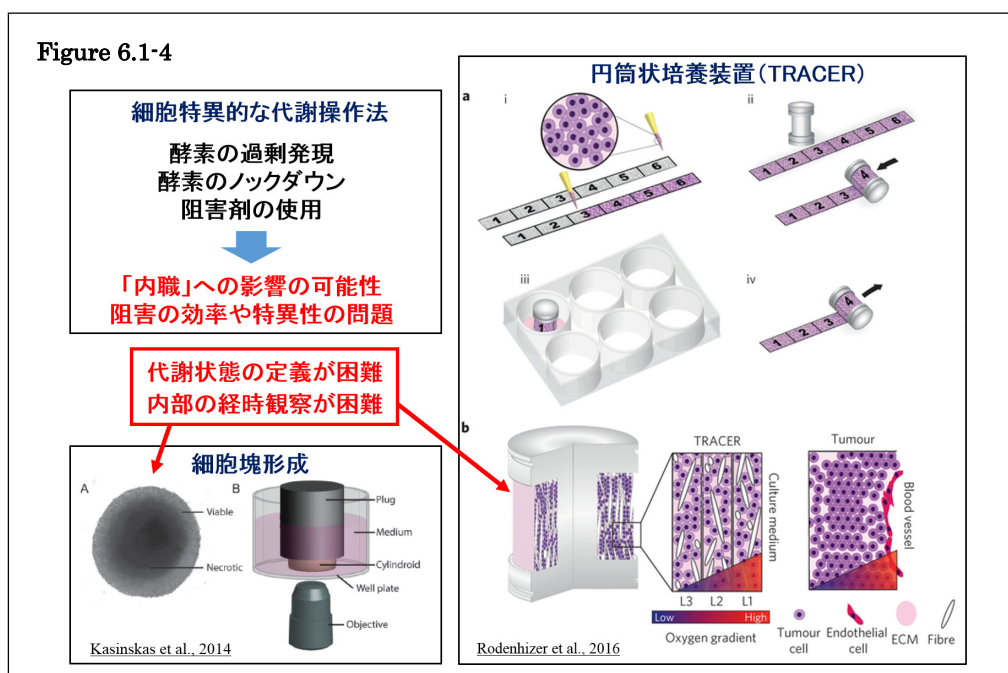
・細胞特異的な糖代謝制御法の意義および原理

がん細胞の代謝動態は、表現型や悪性度と密接に関連する (Onodera et al., 2014 ; Onodera et al., 2018)。腫瘍におけるがん細胞の遺伝的多様性は一般に “heterogeneity” と呼ばれ、がんの治療をするうえで重大な課題となる治療抵抗性を形成する大きな要因のひとつとして考えられているが (Dagogo-Jack and Shaw, 2018)、上記を勘案すると、腫瘍内に存在するがん細胞の代謝動態の違いもまた、“heterogeneity” の背景を成す重要な要素である。

多くのがん細胞では糖代謝が亢進しており、その結果として、第一章で述べたような微小環境の酸性化が起こる。それと同時に、血管からの距離の違いも相

まって、腫瘍内の一部の領域では糖が著しく減少する (Walker-Samuel et al., 2013 など)。すなわち、腫瘍内のグルコースへのアクセシビリティには不均一性が生じることとなるが、解糖系代謝はがんの悪性形質やそれに必要なシグナル伝達を直接的に制御することから (Keller et al., 2014 ; Onodera et al., 2014)、上記のような“heterogeneity”にも寄与すると考えられる。また、腫瘍内の糖枯渇は、免疫細胞の働きを抑制する。これは癌細胞との栄養素の奪い合いの結果であることから“metabolic competition”(「代謝競合」)と呼ばれており、治療抵抗性の要因として注目されている (Gupta et al., 2017 など)。

一方で、糖枯渇は本来、がん細胞自身にも非常に大きなストレスである。実際に、多くの癌細胞株は培養環境において糖枯渇により僅か数日のうちに死滅する。上述のように、腫瘍内部ではグルコースの分布が不均一であり、異なる代謝状態の細胞が存在している。そのような細胞の間で様々な代謝産物がやり取りされ、他方の生存性がサポートされるような状態は“metabolic cooperation”(代謝協調)と呼ばれており (Gupta et al., 2017 など、Figure 6.1-1 参照)、その意義やメカニズムについての解明が待たれている。本研究では、糖枯渇の耐性メカニズムとしての代謝協調に着目し、そのメカニズムの同定を目標とするが、そのような状態を実験系で再現することは困難である。上述のように、「細胞特異的な糖代謝の制御」は、従来のような内在遺伝子の発現抑制による方法では実現性が乏しい。三次元培養による細胞塊形成や特殊な培養器具により栄養素分布の不均一性を再現することはできるが (Kasinskas et al., 2014 ; Rodenhizer et al., 2016)、「充足」と「欠乏」の各状態を任意に設定できず、それを知るためには多大な労力を要する代謝産物解析が必須となる (Figure 6.1-4)。



その他の一般的な方法は、馴化培地を用いるものである。細胞を糖充足状態で培養し、その培地を回収して糖欠乏状態の細胞に与える、という方法であるが、そのような解析を行う際は、グルコースを（ほとんど）含まず、その中間代謝産物のみを含むような培地を用いるのが理想的である。まず細胞をグルコース含有培地で一定期間培養して、グルコース代謝が平衡状態に達した頃にグルコースを含まない培地に交換し、一定時間の培養により細胞内にのみ存在するグルコース由来の代謝産物を細胞外に放出させれば、その馴化培地は、理論上、上記のような状態になっていると考えられる。しかしこの場合、グルコース不含培地に切り替える段階で、細胞は糖枯渇に晒されることになる。そのため通常状態とは異なった代謝動態となり、馴化培地の成分に影響を及ぼすことが危惧され、本来得ようとしていた情報が失われる可能性が否定できない。

以上のような背景から、「特定の細胞の中にのみグルコースが存在する状態」を作り出すことが、本研究の目標達成において最も有効な手法であると考えた。具体的には、細胞内に取り込まれた後に特異的な酵素によってグルコースへと変換される「前駆体」と、その前駆体に特異的な輸送体と代謝酵素を発現した細胞を用いる新たな手法の開発に着手した (Figure 6.1-5)。これを用いることにより、上記のような従来の実験系の問題点を克服できると考えている。

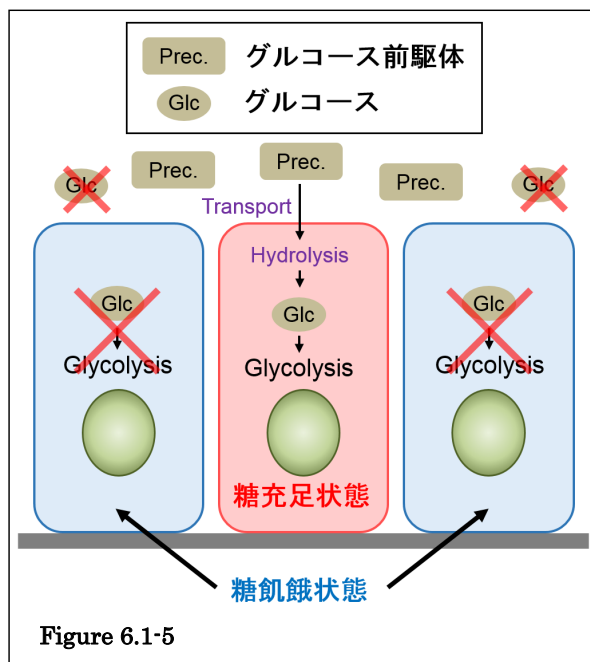
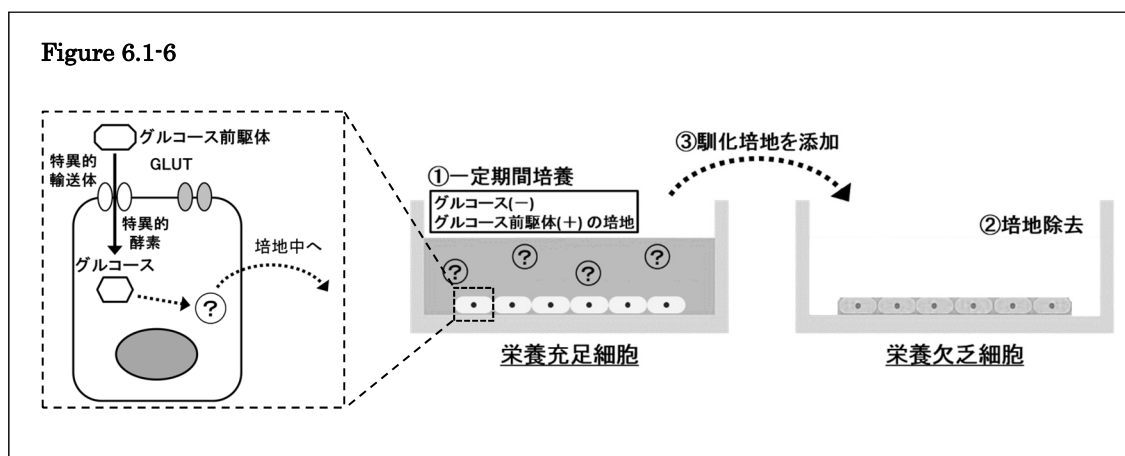


Figure 6.1-5

第一に、この実験系では、最初から糖充足細胞と糖欠乏細胞が定義された状態で両者を共存させることが可能である。「カルチャーインサート」などを用いることで、両者を共存状態から瞬時に分離でき、状態変化を伴うことなく種々の解析へと直ちに供することができるため、三次元培養や特殊器具による手法での問題が解決できる。がん細胞の性質保持において三次元培養は非常に有用であり、代謝解析も三次元環境で行うことが望ましいが (Onodera et al., 2014)、この実験法はあらゆる培養環境において適用可能である。

第二に、この実験系では、グルコースを含まず前駆体のみを含む培地でグルコース代謝を行わせながら、通常のグルコース代謝を継続しながら中間代謝産物を放出させることができる。「糖充足細胞」をこの実験系で一定期間培養した後の馴化培地にはグルコース自体は含まれないため、それをそのまま回収して

糖枯渇状態の細胞の培養に用いることで、グルコース以外の何らかの物質による生存性維持が開始される (Figure 6.1-6)。すなわち、従来の馴化培地を用いた手法の問題も、この手法によって解決することが可能である。以上のように、従来法では正確に捉えられなかった代謝産物を介した細胞間の「代謝協調」のメカニズムを、より明確にできる点が、本研究の最大の特徴である。



また、この解析法を確立することができれば、本研究での使用のみならず、培地中の代謝産物解析を行う他の研究にも役立てられる汎用性の高い技術となると予想される。なお、上記の手法は、安定同位体で標識された代謝産物解析（いわゆる「トレーサー解析」）にも適用化能である。グルコースと比べると高価ではあるが、安定同位体標識された「グルコース前駆体」も入手可能であり、それを用いれば共培養下の細胞内代謝産物を解析することによっても、代謝産物の授受を推測することができる。このような実験系についてはこれまで報告がなく、非常に新規性の高いものであると考えている。

6.2 方法

(i) 細胞培養

実験に使用した細胞は全て American Type Culture Collection (ATCC) から入手した。培養液の組成は以下の表に示す通りである (Table 6.2-1)。

Table 6.2-1 Culture medium composition

Cell line	Culture medium	Histology	CO ₂
MDA-MB-231	DMEM (high glucose, SIGMA D5796) RPMI1640 (SIGMA R8758) 10% fetal calf serum (FCS, Hyclone) 5% NuSerum (Corning) 2 mM L-glutamine	Pleural effusion of a breast adenocarcinoma	7.5%
293T	DMEM (high glucose, SIGMA D5796) 10% FCS (Hyclone)	Human embryonic kidney cell (epithelial)	5%

(ii) Plasmid DNA 構築

本実験の DNA 構築に利用した vector である PiggyBac transposon-based vector (pPB) および lentiviral vector については過去の報告をもとに設計した (Onodera et al., 2014 ; Onodera et al., 2018)。split-intein の配列をコードする cDNA は、コドン最適化したものを Int_C-linker-Int_N の並びで化学合成し、pBluescript II SK (-) vector に cloning した。linker には Int_N および Int_C の 5'-および 3'-末端を切断する 2 つの BsmBI site が含まれており、PAC 断片との接続に使用した。PAC fragment をコードする cDNA は Table 6.2-2 に記した primer を用いて PCR により増幅した。V5 tag および HA tag (Table 6.2-3 参照) の N-末端および C 末端への融合については、PAC の 5'- および 3'-terminal primer に含まれる BamHI および Sall site (終止コドンの前に設置) をそれぞれ用いた。PAC 断片と split-intein cDNA の接続については、各 PAC 断片に含まれる BbsI site と上述の BsmBI site を用いて行った。V5 tag および HA tag を付加した PAC_N-Int_N および Int_C-PAC_C fragment は pPB PGK vector の multiple cloning site (MCS) に挿入し、TagRFP もしくは EnvyGFP については internal ribosome entry site (IRES) の下流に挿入した。

Table 6.2-2 PCR primers for PAC fragments, pLV vectors, and VLP vectors

PCR	Split-inteins	Restriction sites	Direction	Sequence	Description
All PAC N-Fragments	All N-inteins	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAGACTTCGCAACCATGACCGAGTACAAAGCCCAACGG	5'-terminal primer, BamHI for cloning, BstI for V5-tag fusion
PAC N24	gp41-1 and Cragp N-inteins	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAACACTTACGACGAGCGGATCGGTACGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N37	gp41-1 N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N48	Cragp N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N54	gp41-1 N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N60	Cragp N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N80	gp41-1 and IMPDH-1 N-inteins	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N98	gp41-1 N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N100	gp41-1 and IMPDH-1 N-inteins	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N105	gp41-1 N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N108	gp41-1 N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N115	Cragp N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N126	gp41-1 N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N130	gp41-1 N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N140	gp41-1 and IMPDH-1 N-inteins	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N157	Cragp N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N162	gp41-1 N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
PAC N181	Cragp N-intein	EcoRI, BstI	Reverse	ATTGAATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	EcoRI for cloning, BstI for intein fusion
All PAC C-Fragments	All C-inteins	Sall, SpeI	Reverse	AATAGTATGTCGACGCGCGCCGGCTTGTGGG	3'-terminal primer, SpeI for cloning, Sall for HA-tag fusion
PAC C25AS	gp41-1 C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C25AC	Cragp C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C38DS	gp41-1 C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C49L C	Cragp C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C55TS	gp41-1 C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C61IC	Cragp C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C61	gp41-1 and IMPDH-1 C-inteins	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C99	gp41-1 C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C101	gp41-1 and IMPDH-1 C-inteins	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C106GS	gp41-1 C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C109WS	gp41-1 C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C116HC	Cragp C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C127TS	gp41-1 C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C131	gp41-1 C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C141	gp41-1 and IMPDH-1 C-inteins	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C158AC	Cragp C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C163	gp41-1 C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
PAC C182VC	Cragp C-intein	BamHI, BstI	Forward	ATTGGATTCGAAAGACTTAGCAGACCGGTGTGGGCGGTGG	BamHI for cloning, BstI for intein fusion
pLV Fragment	N/A	NarI, SfiI, ClaI	Forward	AATTTGTTGAAAGATTGAC	NarI for ligation to ClaI site of pLETP, SfiI and ClaI for insertion of PPB fragments
pLV Fragment	N/A	N/A	Reverse	AAATGTGATGTCGCCAACAAGCCG	Downstream of PPB, used for sequencing as well
PLCD1 PH domain	N/A	SacI	Forward	ATTGAAGCTCGCCACCAATGAGCTGGGGCGGGAC	SacI for ligation to NheI-Sall-HA-civ fragment
PLCD1 PH domain	N/A	BlnI	Reverse	AATCGTAGGCTGAGTGTGCTGCTTTCAGGAAGTTCTGGCAGC	BlnI for ligation to HIVgp fragment (PCR), SacI deletion
HIVgp fragment	N/A	BlnI	Forward	ATTCGTAAGGGCGGAGTTACCCCGTGGCCGGAAGGCGTATTAAGCGG	BlnI for ligation to PLCD1 PH
HIVgp fragment	N/A	SapI	Reverse	GGCTCTTCGCTCTATCTTGTCTTAAAGCTTGC	SapI for ligation to HIVgp fragment (SapI-BamHI)

dmito-EnvyGFP および tdTomato-mem、iRFP670-nuc、mTagBFP2-NES など、異なる細胞内部位に局在する蛍光タンパク質の遺伝子構築に関しては、それぞれの蛍光タンパク質の cDNA に、各種の輸送ペプチドをコードする DAN 断片を融合し (Table 6.2-3)、それぞれ pPB CEH vector の MCS に挿入した。PAC_{N80}-gp41-1-Int_N、gp41-1Int_C-PAC₈₀₋₁₄₀-IMPDH-1-Int_C、IMPDH-1-Int_N-PAC₁₄₁₋₁₅₇-Cfa_{GEP}-Int_N および Cfa_{GEP}-Int_C-PAC_{C158AC} は、V5 および HA tag は含まない状態で、それぞれ IRES の下流に組み込んだ。

Table 6.2-3 DNA fragments for epitope tags and targeting sequences

Name	Encoded peptides	Restriction sites	Sequence	Description
V5-tag	V5 epitope (KPIPNNLLGLDS)	NheI, BamHI	GCTAGCCACCATGGGTAAGCCTA TCCGTAACCGTCTCCTCGGTCTC GATTCTACGGGATCC	NheI for ligation to pPB vectors, BamHI for ligation to PAC _N -Int _N
HA-tag	HA epitope (YPYDVPDYA)	Sall, NotI	GTGCGACTACCCTTACGACGTGCC CGACTACGCCTAGCGGCCGC	Sall for ligation to Int _C -PAC _C , NotI for ligation to pPB vectors
dmito	double mitochondria-targeting sequences (SVLTPLLLRGLTGSARRLPV PRAKIHSL)	NheI, AgeI	GCTAGCATGTCCGTCCTGACGCC GCTGCTGCTGCGGGGCTTGACAG GCTCGGCCCGCGCGCTCCAGT GCCGCGCGCCAAGATCCATTCGT TGGGGGATCTGTCCGTCCTGACG CCGCTGCTGCTGCGGGGCTTGAC AGGCTCGGCCCGCGCGCTCCCA GTGCGCGCGCCAAGATCCATTC GTTGGGGGATCCACCGGT	NheI for ligation to pPB vectors, AgeI for ligation to EnvyGFP
mem	plasma membrane-targeting sequence (MLCCMRRTKQVEKNDEDQKI)	NheI, AgeI	GCTAGCGCCACCATGCTGTGCTG TATGAGAAGAACCAACAGGTTG AAAAGAATGATGAGGACAAAAGA TCGGACCGGT	NheI for ligation to pPB vectors, AgeI for ligation to tdTomato
nuc	nuclear localization sequence (RRRHSYENDGGQPHKRRK)	NheI, AgeI	GCTAGCGCCACCATGTCGCGGAG GCGGCACAGCTACGAGAACGATG GTGGACAACCTCACAAAAGGAGG AAGACGTCTCCACCGGT	NheI for ligation to pPB vectors, AgeI for ligation to iRFP
NES	nuclear export sequence (LPPLERLTLD)	HindIII, NotI	AAGCTTAACCTGCCCCCTGGA GCGCCTGACCCTGGACTAGCGGC CGC	HindIII for ligation to mTagBFP2, Not I for ligation to pPB vectors
NheI-Sall-HA-clv	HA epitope (YPYDVPDYA), HIV protease cleavage sequence (SQNYPIVQ)	BglII, NheI, Sall, SacI	AGATCTGCTAGCGTCCGACTATCC TTACGACGTGCCTGATTACGCCG GCGGCAGCCAGAACTACCCATC GTGCAGGAGCTC	BglII for ligation to pCAG HIVgp, SacI for ligation to PH-HIVgp

ウイルス作成用の lentiviral vector の構築は以下の通りである。pLETIP (Onodera et al., 2014) を ClaI および PflMI で切断し、EF1/HTLV promoter や MCS、woodchuck posttranscriptional regulatory element (WPRE) の一部を除去した。Table 6.2-2 に記載した primer を用いて pLETIP を template にした PCR を行い、SfiI および ClaI site、WPRE の一部を含む DNA 断片を増幅した。これを NarI (ClaI と接続可能) および PflMI site で切断した後、ClaI/PflMI site で切断された pLETIP vector に ligation して pLV (empty) vector を作成した。CEH promoter および前述の蛍光タンパク質、IRES、PAC-intein fragment を含む DNA 断片を前述した pPB vector から SfiI および ClaI site で切り出し、

SfiI/ClaI site で切断された pLV vector に ligation した。

VLP を生成するための plasmid DNA 構築は以下の通りに行った。NheI-SalI site や HA-tag、HIV-1 protease の cleavage site を含む DNA 断片 (A) は Table 6.2-4 に記載した oligo DNA の annealing により構築し、pEGFP-N1 vector の BglII-SacI site に cloning した。PLCD1 の PH domain をコードする DNA 断片は Table 6.2-2 に記載した primer を用いて MDA-MB-231 の first strand cDNA を template として PCR により増幅した。また、HIVgp の一部をコードする DNA 断片は Table 6.2-2 に記載した primer と pCAG-HIVgp を template として PCR で増幅した。これら 2 種類の DNA 断片はどちらも ClaI site で切断して互いを結合して 1 つの断片 (B) とし、これを blunt-ligation によって pBluescriptII SK (-) vector の EcoRV site に cloning した。BglII および SacI site で切り出した断片 A と、や SacI および SapI で切り出した断片 B、pCAG HIVgp 由来の SapI-BamHI 断片を互いに結合し、BglII および BamHI で切り開いた pCAG HIVgp vector に ligation して、pCAG HA-clv-PH-HIVgp を作成した。PAC_C-Int_C fragment は NheI および SalI により pPB vector から切り出し、NheI および SalI で切り開いた pCAG HA-clv-PH-HIVgp vector に ligation した。VLP を蛍光観察するため、EnvyGFP をコードする cDNA を SalI site に組み込み、pCAG PAC_C-Int_C-Envy-HA-clv-PH-HIVgp vector を作成した。

(iii) Lentivirus 粒子と VLP の作成および分離

Lentivirus は所属研究質における過去の報告に基づき作成した。293T 細胞を Poly-L-lysine でコーティングした 10 cm dish に 7.0×10^6 cells/dish の密度で撒き込み、24 時間後に pLV vector (6 μ g)、pCAG HIVgp (3 μ g) および VSV-G と HIV Rev をコードする plasmid vector (3 μ g) を PEI MAX (Polyethylenimine "Max") (Polysciences, Inc.) を用いて transfection した (Table 6.2-4)。同様に、PAC_C-Int_C を組み込んだ VLP の作成については、293T 細胞に pCAG PAC_C-Int_C-Envy-HA-clv-PH-HIVgp vector (6 μ g) を VSV-G のみをコードする vector (6 μ g) と共に PEI MAX を用いて transfection した。Transfection から 24 時間後に vector と PEI MAX を含む medium を fresh medium 6 mL に置き換え、さらに 48 時間 incubate した。その後、Lentiviruses もしくは VLP を含む medium を回収して遠心分離 (200 x g) により剥がれた細胞を沈殿させ、さらに 45 μ m pore のフィルターに通して浮遊物を除去した。このように精製した medium に HEPES-buffered PEG6000 solution (Table 6.2-5) を加えて攪拌し、4 °C で一晩静置した。これを 4 °C、3,000 x g にて 1 時間遠心分離し、Lentiviruses もしくは VLP を沈殿させた。上清を除去した後、沈殿した粒子は Tris-buffered solution に懸濁し、-80 °C で保存した。

Table 6.2-4 Protocol of plasmid transfection using PEI MAX

Number of cells	7.0 x 10 ⁶ cells/dish on 10 cm culture dish, plated 24 h before transfection
Protocol	<ol style="list-style-type: none"> 1. For each dish to be transfected, prepare plasmid DNA/PEI MAX complexes as follows. <ol style="list-style-type: none"> a. Dilute 12 µg plasmid DNA vectors in 600 µL Opti-MEM® I Medium without serum in a tube. Mix gently. b. Add 48 µL PEI MAX to each tube containing the diluted plasmid DNA vectors. Mix gently and incubate for 15 minutes at room temperature. 2. To cells plated on 10 cm culture dish, containing 5.5 mL fresh medium, add DNA/PEI MAX complexes. Mix gently by rocking the dish back and forth. 3. Incubate the cells for 24 hours at 37 °C in a CO₂ incubator. Then replace medium with fresh one.

Table 6.2-5 Composition of PEG solution

試薬	使用量	最終濃度
PEG6000	65 g	13%
5M NaCl	46.75 g	1.6M
MilliQ 水		
Total	500 mL	

※オートクレーブして室温で保存する。

(iv) 細胞への遺伝子構築の導入および selection

遺伝子構築の一過性発現は、PEI MAX を用いて 293T 細胞に plasmid DNA を transfection して行った。方法は Table 6.2-5 と同様であるが、試薬等の容量は 35 mm dish に合わせてスケールダウンした。PiggyBac transposon vector による遺伝子構築の安定発現は、MDA-MB-231 細胞を 24 well culture plate に 1.2 x 10⁵ cells/well の密度で撒き込み、細胞を撒いてから 24 時間後に pPB vector を高活性型 PiggyBac transposase をコードする vector と共に ViaFect Transfection Reagent (Promega, #E4982) を用いて transfection して行った (Table 6.2-6)。安定発現した細胞の selection については、transfection して 3 日後に 1.0 (単独の遺伝子構築または Intein-PAC の 2-split pairs の場合) も

しくは 0.5 (4-split pairs の場合) $\mu\text{g/mL}$ の Puromycin を添加した培地に置き換え 7 日間 selection を行った。Selection 後に生存した細胞の population は 0.25 (2-split pairs の場合) もしくは 0.125 (4-split pairs の場合) $\mu\text{g/mL}$ の puromycin を添加した medium で維持・増殖させた。2-step selection を行う場合は、MDA-MB-231 細胞の plasmid DNA を transfection してから 2 日後に 4 $\mu\text{g/mL}$ polybrene および 100 $\mu\text{g/mL}$ Symperonic® F108 を添加した fresh medium に置き換え、さらに PAC-intein-VLP を加えた。その 24 時間後、medium に 0.5 $\mu\text{g/mL}$ puromycin を添加し、selection を開始した。VLP および polybrene、Symperonic® F108、puromycin を含む medium は 3 日毎に fresh medium に交換し、この medium を用いて 7~10 日間 selection した。Lentivirus による二段階目の transfection は、VLP を用いた selection が完了した細胞の培地を 4 $\mu\text{g/mL}$ polybrene および 100 $\mu\text{g/mL}$ Symperonic® F108 を添加した fresh medium に置き換え、精製した Lentivirus を加えて行った。その 2 日後に 0.5 $\mu\text{g/mL}$ の Puromycin を添加し、7 日間 selection を行った。

Table 6.2-6 Protocol of plasmid transfection using ViaFect

Number of cells	1.2 x 10 ⁵ cells/dish on 24 well culture plate, plated 24 h before transfection
Protocol	<ol style="list-style-type: none"> 1. For each dish to be transfected, prepare plasmid DNA/ViaFect complexes as follows. <ol style="list-style-type: none"> a. Dilute 0.56 μg hyperactive PiggyBac transposase vector and 1.44 μg pPB vectors in 100 μL Opti-MEM® I Medium without serum in a tube. Mix gently. b. Add 4.0 μL ViaFect to each tube containing the diluted plasmid DNA vectors. Mix gently and incubate for 20 minutes at room temperature. 2. To cells plated in 24 well culture plate, add DNA/ViaFect complexes. Mix gently by rocking the dish back and forth. 3. Incubate the cells for 48-72 hours at 37 °C in a CO₂ incubator.

(v) 細胞の Lysate の調製および免疫沈降、Western blotting

細胞のタンパク抽出物は以下のように調製した。medium を捨て 4 °C で冷やした PBS で細胞を 2 回洗浄し、protease inhibitor cocktail set I (Calbiochem)

を 1/100 量添加した NP-40 lysis buffer (Table 5.2-4 参照) を直接加えて scraper によって掻きとり、1.5 mL tube に回収した。回収された溶液の可溶性の分画は遠心機を用いて分離し、得られた Lysate のタンパク濃度は DC™ Protein Assay kit (Bio-Rad) を使用して測定した。

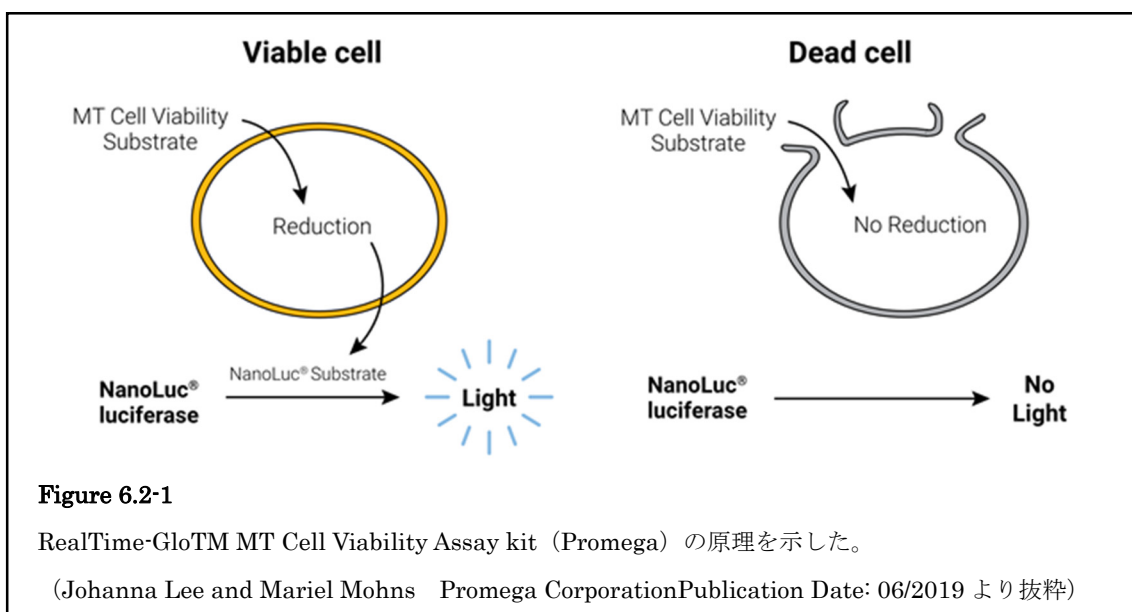
免疫沈降 (IP : immunoprecipitation) による full-length PAC の検出は、PAC-intein fragment を安定発現させた MDA-MB-231 細胞の Lysate を上記の方法で調製して行った。得られた細胞の Lysate は、Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare) と共に anti-HA antibody (MBL #M180-3) を用いて 4 °C で 2 時間穏やかに攪拌し、免疫沈降した。Protein G bead に捕捉された抗原と抗体の複合体は遠心機を用いて沈降させ、4 °C で冷やした NP-40 lysis buffer を使用して 3 回 washing した。

細胞の Lysate および IP sample は Bolt™ gel を使用して電気泳動により分離したのち Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) を用いて Immobilon-FL PVDF membrane (Millipore) に transfer した。タンパクを吸着させた membrane を BlockPRO Protein-Free Blocking Buffer (Visual Protein) を用いて室温で 1 時間振盪して blocking した後、一次抗体として V5 tag (Invitrogen #R960-25)、tRFP (Evrogen #AB234)、HA tag (MBL #M180-3)、GFP (Proteintech #50430-2-AP)、 β -actin (Sigma A5441) を使用して目的のタンパクを標識した。その後、membrane を Tween 20 を含む Tris-buffered saline で 3 回洗浄し、二次抗体として、DyLight® 800-conjugated anti-mouse IgG (Thermo SA5-35521) および Alexa fluor 680-conjugated anti-rabbit IgG (Abcam ab186692) をいずれか単独もしくは併用して室温で 1 時間 incubate した。IP sample については、biotin-conjugated anti-V5 tag antibody (MBL #M215-6) と DyLight® 800 Newtr Avidin (Thermo Fisher scientific #22853) のペアおよび DyLight® 680-conjugated anti-HA antibody (Invitrogen #26183-D680) を使用した。以上のように抗体を用いて目的のタンパクを標識した membrane は Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Bioscience) を用いて解析した。

(vi) 異なる Puromycin 濃度における細胞の Viability assay

Intein-PAC fragments を含む pPB の pair を transfection して安定発現させた細胞の生存性は RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay kit (Promega) (次頁 Figure 6.2-1) を用いて測定した。本キットは培地中で非細胞溶解性の NanoLuc ルシフェラーゼ反応を利用したもので、培地に加えた細胞透過性の MT Cell Viability Substrate が細胞で還元されることにより NanoLuc ルシフェラーゼの基質に変換される。この還元された基質が細胞外に出ると培地中に添加した NanoLuc ルシフェラーゼによる酵素反応が起こり発光する。代謝活

性を保持する細胞だけが基質を還元することができ、死細胞は基質を還元できないため、発光強度は生細胞数と比例する。前述した細胞を 96-well half area plate に撒き、24 時間後に培地を assay kit とさまざまな濃度の Puromycin (0 もしくは 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む fresh medium に置き換えた。培地交換をしてから 3 時間後に SpectraMax iD5 multimode microplate reader (Molecular Devices) を用いて発光を測定し、最初の測定から 12 および 24、48、60、72 時間後に繰り返し発光測定を行った。各 well の細胞数の相対変化を計算するため、それぞれの time point における各 well の発光強度を同一の well の最初の測定値を用いて normalize した。



(vii) 導入遺伝子の発現解析

pPB の pair を安定発現させた細胞を phenol red-free の medium を用いて 96 well plate に撒いた。24 時間後に Hoechst 33342 (Setareh Biotech #7074) を使用して細胞の核を染色し、ImageXpressMicro (Molecular Devices) を用いて自動撮影により蛍光像を撮影した。赤色および緑色の蛍光タンパク質 (RFP および GFP) の発現が陽性の細胞は MetaXpress software (Molecular Devices) でカウントした。細胞の総数は Hoechst 33342 の染色をもとにカウントし、RFP/GFP double-positive の細胞の割合を計算した。異なる 4 種類の蛍光タンパク質を発現する細胞は、2% formaldehyde を培地に直接添加し、37 °C で 10 分間 incubate することにより固定した。PBS で 2 回洗浄した後、Hoechst 33342 を用いて核を染色し、A1R confocal laser microscope system と NIS Elements Imaging software (Nikon) を搭載した Nikon eclipse Ti microscope を使用して撮像した。蛍光タンパク質の発現が陽性の細胞を手動でカウントした。

(viii) 細胞特異的な糖代謝制御システム (SIGHT) の構築

コドン最適化済みの Eluc (Nakajima et al., 2010)、Akaluc (Iwano et al., 2019)、CDT-2 変異体 (Lian et al., 2014) および GH1-1 (Kim et al., 2014) をコードする cDNA はそれぞれ化学合成した。Eluc には stop codon を含まず、gp41-1Int_C-PAC_{C81} の N 末端側に接続した (Eluc-gp41-1Int_C-PAC_{C81})。CDT2 と GH1-1 は、PAC_{N80}-gp41-1-Int_N、Eluc-gp41-1Int_C-PAC_{C81} を IRES 直下に組み込んだ pPB CEH MCS vector にそれぞれ cloning した。Akaluc は pPB CEH MCS IP (Onodera et al., 2018) の MCS に組み込んだ。

CDT2 および GH1-1 をコードする vector の pair と、Akaluc をコードする vector は、それぞれ (iv) に記述した方法で MDA-MB-231 細胞に安定導入した。これらをそれぞれ Puromycin で selection し、MDA-MB-231 (C/G EL-P) および MDA-MB231 (AL-P) を得た。

(ix) 糖充足状態および糖欠乏状態の細胞の共培養実験

CDT2、GH1-1 および Eluc を導入した MDA-MB-231 (C/G EL-P) 細胞および Akaluc のみを導入した MDA-MB231 (AL-P) 細胞を 24 well culture plate に 5.0×10^4 cells/well の密度でそれぞれ単独で撒き込んだ。共培養条件では各 well にそれぞれ 2.5×10^4 cells ずつ撒き込んだ。24 時間後に培地を 0 mM glucose もしくは 5.5 mM glucose、11 mM cellobiose (glucose は 0 mM) の培地にそれぞれ交換した。培地交換から 48 時間後に Eluc および Akaluc の基質として D-luciferin (0.0075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、WAKO 123-03943) および TokeOni (0.0075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、SIGMA 808350) を同時添加し、30 分後に各 well の発光強度を SpectraMax iD5 (Molecular Devices) にて測定した。Eluc および Akaluc の発光を特異的に検出するため、CWL 535 nm/BW 25 nm および CWL 700 nm/BW 60 nm のフィルターをそれぞれ使用した。

(x) 共培養下での代謝産物の解析

10 cm の culture dish に 4×10^6 cells/dish の parental MDA-MB-231 細胞を 4 枚撒いた。同時に、10 cm 用の culture insert に 3.2×10^6 cells/well の C/G EL-P MDA-MB-231 細胞を撒いた。10 cm dish に撒いた細胞は、24 時間後にグルコース不含培地で洗浄したのち、グルコース不含で 11 mM cellobiose を含む培地を 3 枚分に、5.5 mM グルコースを含む培地を 1 枚分に加えた。10 cm 用 insert に撒いた細胞は、24 時間後にグルコース不含培地で洗浄したのち、グルコース不含で 11 mM cellobiose を含む培地を加えて、同じ培地を加えた上記の 10 cm dish に重ねて共培養状態とした。18 時間後に各 dish 上の代謝産物を以下のようにして回収した。

培地を除去したのち、5% Mannitol 5 mL で細胞を 2 回洗浄し、500 μ L の細胞溶解液（メタノールに内部標準物質として 200 μ M MES および 200 μ M L-methionine sulfone を加えたもの）を加えて scraper で細胞をマイクロ遠心チューブに回収した。超純水 250 μ L を加えて氷水中で sonication（30 sec 2 回、30 sec インターバル）を行い、遠心分離後（4 $^{\circ}$ C、10,000 rpm、10 分）に上清を新しいチューブに移した。これにクロロホルム 500 μ L を加えて vortex で攪拌したのち、さらに遠心分離（4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm、15 分）を行い、水層を半分ずつ、2 本の 5 kDa cutoff filter に移した。溶液を遠心分離（4 $^{\circ}$ C、10,000 rpm、90 分）して filter を透過させ、溶液が filter 上に残っている場合はさらに遠心分離（4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm、15 分、複数回）を行い全量を透過させた。溶液は外部機関における代謝産物解析に用いるまで -80 度で保存した。

(xi) 馴化培地を用いた代謝産物の解析

馴化培地の作成のため、12 well plate に 2.0×10^5 cells/dish の cellobiose 代謝可能細胞 (C/G EL-P) を撒き、24 時間後に培地を捨て、グルコース不含の培地で一度穏やかに洗浄してから 0 mM glucose かつ 11 mM cellobiose を含む培地 1.5 mL に交換し、48 時間培養した培地を馴化培地として回収した。馴化培地用の細胞を撒いてから 48 時間後に Parental 細胞を 24well plate 上に 0.5×10^5 cells/well ずつ 500 μ L の培地と共に撒き、24 時間後に培地を馴化培地へ置き換えた。このとき、glucose 不含の培地で pre-incubate する群は細胞を撒いてから 18 時間後に 0 mM glucose の培地に交換し、6 時間経てから馴化培地に置き換えた。馴化培地への置き換え後、24 時間後および 48 時間後の培地をそれぞれ回収した。サンプルとして、①0 mM glucose かつ 11 mM cellobiose を含む fresh medium、②前述の medium で Parental 細胞を 24 時間培養後の培地、③C/G EL-P 細胞の馴化培地、④C/G EL-P 細胞の馴化培地で Parental 細胞を 24 時間培養後の培地、⑤C/G EL-P 細胞の馴化培地で Parental 細胞を 48 時間培養後の培地、⑥C/G EL-P 細胞の馴化培地で Parental 細胞 (pre-incubate 済み) を 24 時間培養後の培地、⑦C/G EL-P 細胞の馴化培地で Parental 細胞 pre-incubate 済み) を 48 時間培養後の培地の 7 種類を得た。以上のサンプルをヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (HMT) 株式会社が実施する basic scan により、培地中の代謝産物解析を行った。

6.3 結果

6.3.1 gp41-1 split-intein による PAC 切断部位の決定

過去の報告に基づいて、高効率で trans-splicing を行うことのできる split-intein として gp41-1、IMPDH-1 および Cfa_{GEP} intein を採用した (Aranko et al., 2014; Carvajal-Vallejos et al., 2012; Dassa et al., 2009; Stevens et al., 2017)。PAC のアミノ酸配列の中からこれらの split-intein の切断部位として利用できるアミノ酸配列を探した。上記のうち gp41-1 および IMPDH-1 split-intein では Ext_C の一番目のアミノ酸として serine が利用される一方、人工的に改変された intein である Cfa_{GEP} は cysteine が利用される (Aranko et al., 2014; Carvajal-Vallejos et al., 2012; Dassa et al., 2009; Stevens et al., 2017)。PAC のアミノ酸配列には少数の serine 残基しか存在しておらず (Ser81/99/101/131/141/163)、cysteine については C 末端に非常に近い位置 (Cys192) に一つしか存在していない (Figure 6.3-1)。より多くの切断部位の候補を得るため、PAC の homolog や進化的に関連があると思われる相同性の高い酵素のアミノ酸配列を解析し、PAC とは別の位置に serine および cysteine 残基が含まれるものがないか調べた (Table 6.3-1)。

MTEYKPTVRL ATRDDVPRAV RTLAAAFADY PATRHTVDPD RHIERVTELEQ 50
ELFLTRVGLD IGKVWVADDG AAVAVWTTPE SVEAGAVFAE IGPRMAELSG 100
SRLAAQQQME GLLAPHRPKE PAWFLATVGV SPDHQKGKLG SAVVLPGVEA 150
AERAGVPAFL ETSAPRNLPF YERLGFTVTA DVEVPEGPRT WCMTRKPGA 200

Figure 6.3-1

上記に PAC のアミノ酸配列を示した。各 split-intein による trans-splicing 反応に利用することのできるアミノ酸をそれぞれ異なる色でハイライトした。それぞれの split-intein とハイライト色との対応は、以下に示す通りである: gp41-1 もしくは IMPDH-1 (黄色)、Cfa_{GEP} (青色)、gp41-1 と Cfa_{GEP} の両方 (緑色)。ハイライトしたアミノ酸は、元からそのようになっている場合を除いて、serine (gp41-1、IMPDH-1 split-intein に関して) もしくは cysteine (Cfa_{GEP} split-intein に関して) に置き換えた。

Table 6.3-1 PAC-related enzymes containing extra serine or cysteine residues

Replacement	Sequence ID	Description	Note
A25S	AAK08635.1	puromycin N-acetyltransferase [Integration vector pINT]	Within top 100 of blastp search
A25S	WP 030878315.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces]	Within top 100 of blastp search
D38S	WP 031508074.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces megasporus]	Within top 100 of blastp search
D38S	WP 184730154.1	GNAT family N-acetyltransferase [Saccharopolyspora phatthalungensis]	Within top 100 of blastp search
D38S	MBB5158406.1	ribosomal protein S18 acetylase RimI-like enzyme [Saccharopolyspora phatthalungensis]	Within top 100 of blastp search
T55S	WP 125058166.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 100 of blastp search
T55S	WP 030021786.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces monomycini]	Within top 100 of blastp search
T55S	KG181444.1	puromycin N-acetyltransferase [Actinopolyspora erythraea]	Within top 100 of blastp search
T55S	WP 073791917.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. CB01580]	Within top 100 of blastp search
T55S	WP 084134033.1	GNAT family N-acetyltransferase [Actinopolyspora erythraea]	Within top 100 of blastp search
T55S	WP 184078370.1	GNAT family N-acetyltransferase [Nocardopsis mwathae]	Within top 100 of blastp search
T55S	WP 030422633.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [unclassified Streptomyces]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 125058166.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 030021786.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces monomycini]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 150237008.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces albofaciens]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 060731809.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces albus]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 053698356.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. NRRL F-5755]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 073796047.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. CB02923]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 093942945.1	GNAT family N-acetyltransferase [Actinoalloteichus hoggarensis]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 125046148.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces chrestomyceticus]	Within top 100 of blastp search
Q106S	TCP56410.1	acetyltransferase (GNAT) family protein [Tamaricibabians halophyticus]	Within top 100 of blastp search
Q106S	GCD36529.1	GCN5-like N-acetyltransferase [Streptomyces chrestomyceticus JCM 4735]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 132876082.1	GNAT family N-acetyltransferase [Tamaricibabians halophyticus]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 206504803.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces chrestomyceticus]	Within top 100 of blastp search
Q106S	RD150759.1	acetyltransferase (GNAT) family protein [Nocardia mexicana]	Within top 100 of blastp search
Q106S	WP 030422633.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [unclassified Streptomyces]	Within top 100 of blastp search
M109S	WP 031508074.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces megasporus]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 125058166.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 030021786.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces monomycini]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 150237008.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces albofaciens]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 060731809.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces albus]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 030304068.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 030373824.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 030636790.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 031190331.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 053698356.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. NRRL F-5755]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 125523118.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. WAC 06783]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 030645279.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 217196981.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces buecheerae]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 030662646.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 176164767.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces buecheerae]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 187063661.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces buecheerae]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 030590048.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 125531009.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. WAC 06725]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 003979985.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 125046148.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces chrestomyceticus]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 184078370.1	GNAT family N-acetyltransferase [Nocardopsis mwathae]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 053803439.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 100 of blastp search
T127S	GCD36529.1	GCN5-like N-acetyltransferase [Streptomyces chrestomyceticus JCM 4735]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 206504803.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces chrestomyceticus]	Within top 100 of blastp search
T127S	WP 030422633.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [unclassified Streptomyces]	Within top 100 of blastp search
A25C	WP 086697293.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces tricolor]	Within top 250 of blastp search
L49C	WP 029387106.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces leeuwenhoekii]	Within top 250 of blastp search
L49C	WP 044387135.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces cyaneogriseus]	Within top 250 of blastp search
L49C	NEY33268.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. PRKS01-65]	Within top 250 of blastp search
I61C	WP 073720790.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. T SR10281]	Within top 250 of blastp search
I61C	WP 092521686.1	MULTISPECIES: N-acetyltransferase [Actinopolyspora]	Within top 250 of blastp search
I61C	WP 179536905.1	GNAT family N-acetyltransferase [Actinopolyspora biskrensis]	Within top 250 of blastp search
I61C	WP 017974719.1	GNAT family N-acetyltransferase [Actinopolyspora halophila]	Within top 250 of blastp search
I61C	WP 003939539.1	GNAT family N-acetyltransferase [Rhodococcus ruber]	Within top 250 of blastp search
I61C	WP 054371977.1	GNAT family N-acetyltransferase [Rhodococcus rhodochrous]	Within top 250 of blastp search
I61C	WP 102031469.1	GNAT family N-acetyltransferase [Rhodococcus ruber]	Within top 250 of blastp search
I61C	WP 165041579.1	GNAT family N-acetyltransferase [Rhodococcus sp. 14C212]	Within top 250 of blastp search
H116C	AKG43093.1	acetyltransferase [Streptomyces xiamenensis]	Within top 250 of blastp search
H116C	WP 030725230.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces]	Within top 250 of blastp search
A158C	WP 150215046.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces venezuelae]	Within top 250 of blastp search
A158C	WP 150174255.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces venezuelae]	Within top 250 of blastp search
A158C	WP 150188589.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces venezuelae]	Within top 250 of blastp search
A158C	WP 055702479.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces]	Within top 250 of blastp search
A158C	WP 107097955.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces atrinuber]	Within top 250 of blastp search
A158C	WP 161236541.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [unclassified Streptomyces]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 033034068.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 030373824.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 030636790.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 031190331.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 053698356.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. NRRL F-5755]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 125523118.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. WAC 06783]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 030645279.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 030662646.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 030590048.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 125531009.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces sp. WAC 06725]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 003979985.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces]	Within top 250 of blastp search
V182C	WP 053803439.1	GNAT family N-acetyltransferase [Streptomyces rimosus]	Within top 250 of blastp search

これらの結果に基づき、アミノ酸配列の 1 番目を serine (gp41-1、IMPDH-1 split-intein に関して) もしくは cysteine (CfageP split-intein に関して) に置き換えた変異型 PAC_Cを作成した (Figure 6.3-1、ハイライトしたアミノ酸)。単独で完全な酵素活性を保持する可能性を考慮して、N 末端および C 末端に非常に近いところに位置するアミノ酸残基は切断部位の候補から除外した。ゲノムへの安定導入が可能な PiggyBac transposon に基づく pPB vector (Onodera et al., 2018) を改変して、安定導入の指標として RFP もしくは GFP を bicistronic に発現する (1 つの mRNA からの 2 種類の異なるタンパク質を発現する) vector を構築した (Figure 6.3-2 A)。細胞内での発現を解析するため、V5 および HA epitope tag をそれぞれ PAC_N-Int_N および Int_C-PAC_C に融合させて (Figure 6.3-2 B)、これらを上記の pPB vector に組み込んだ (Figure 6.3-2 A)。本論文ではこれ以降、N+数字および C+数字は、それぞれ PAC_N および PAC_C の切断部位 (最後および最初のアミノ酸の位置) を表す。

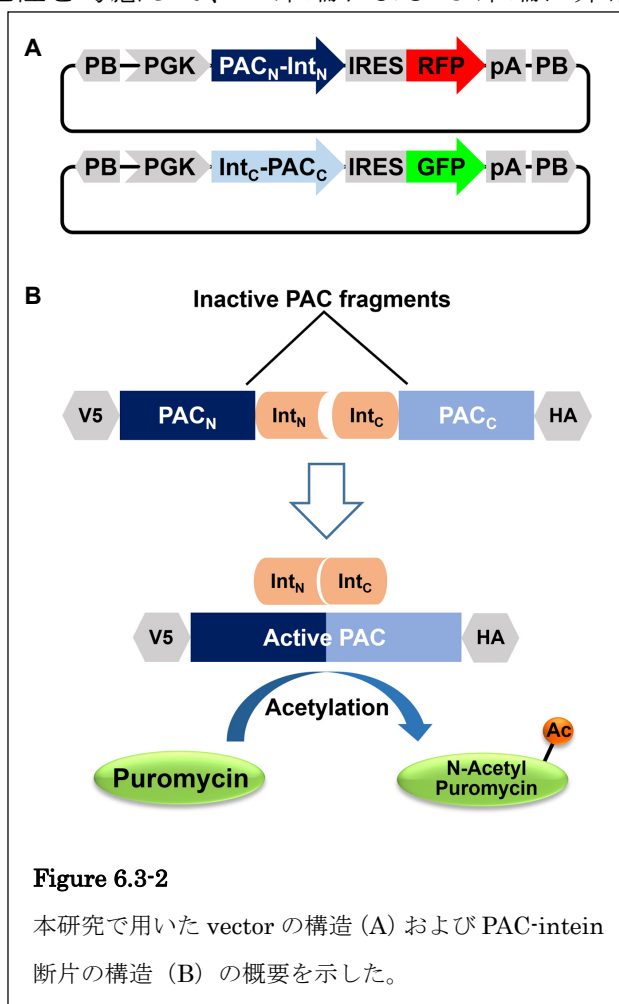
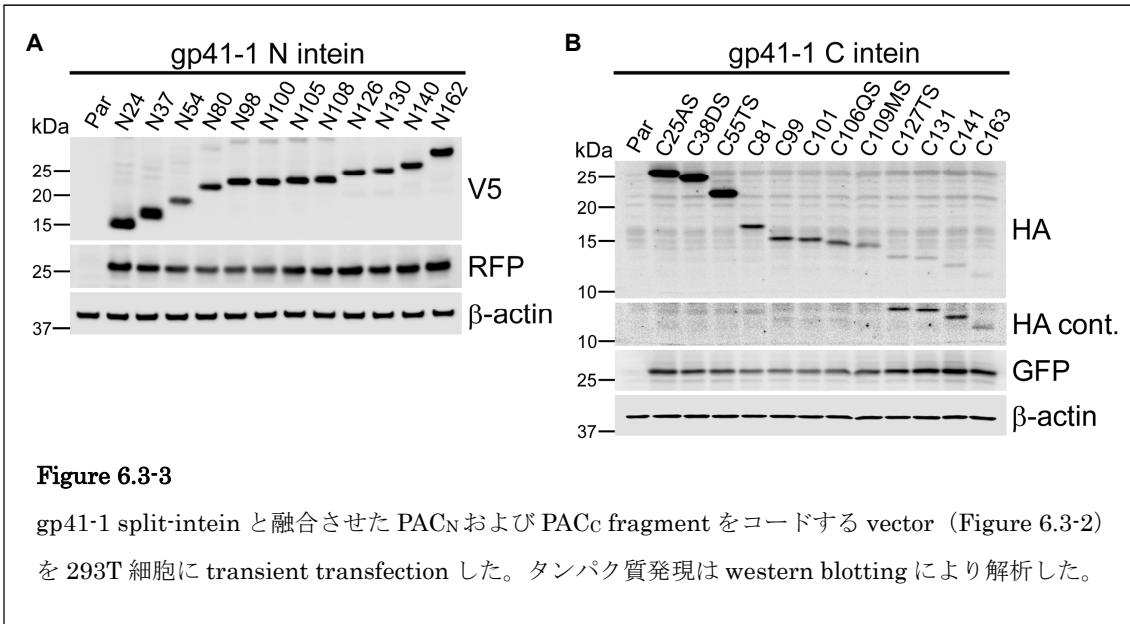


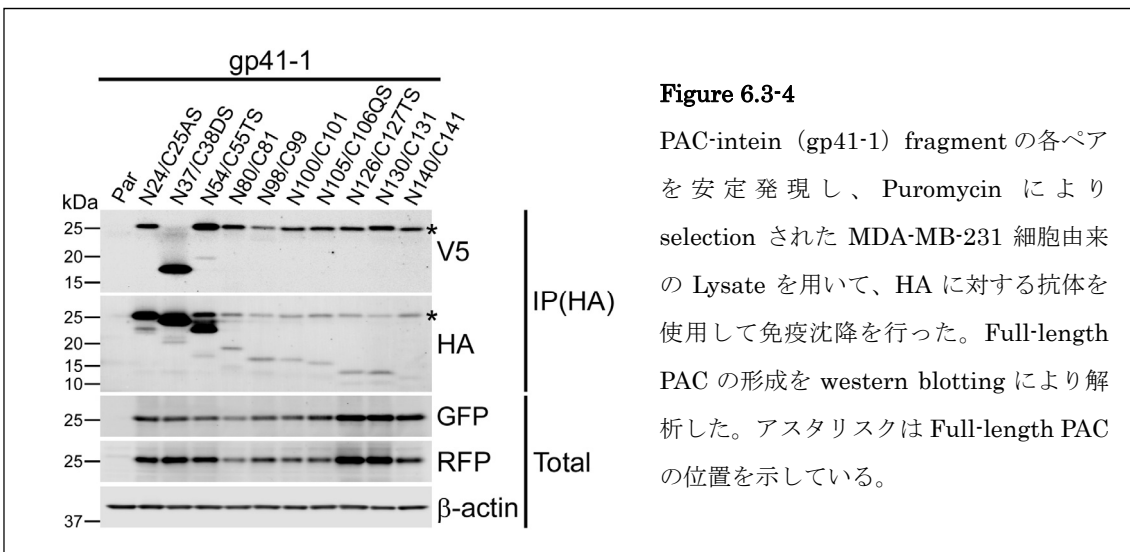
Figure 6.3-2

本研究で用いた vector の構造 (A) および PAC-intein 断片の構造 (B) の概要を示した。

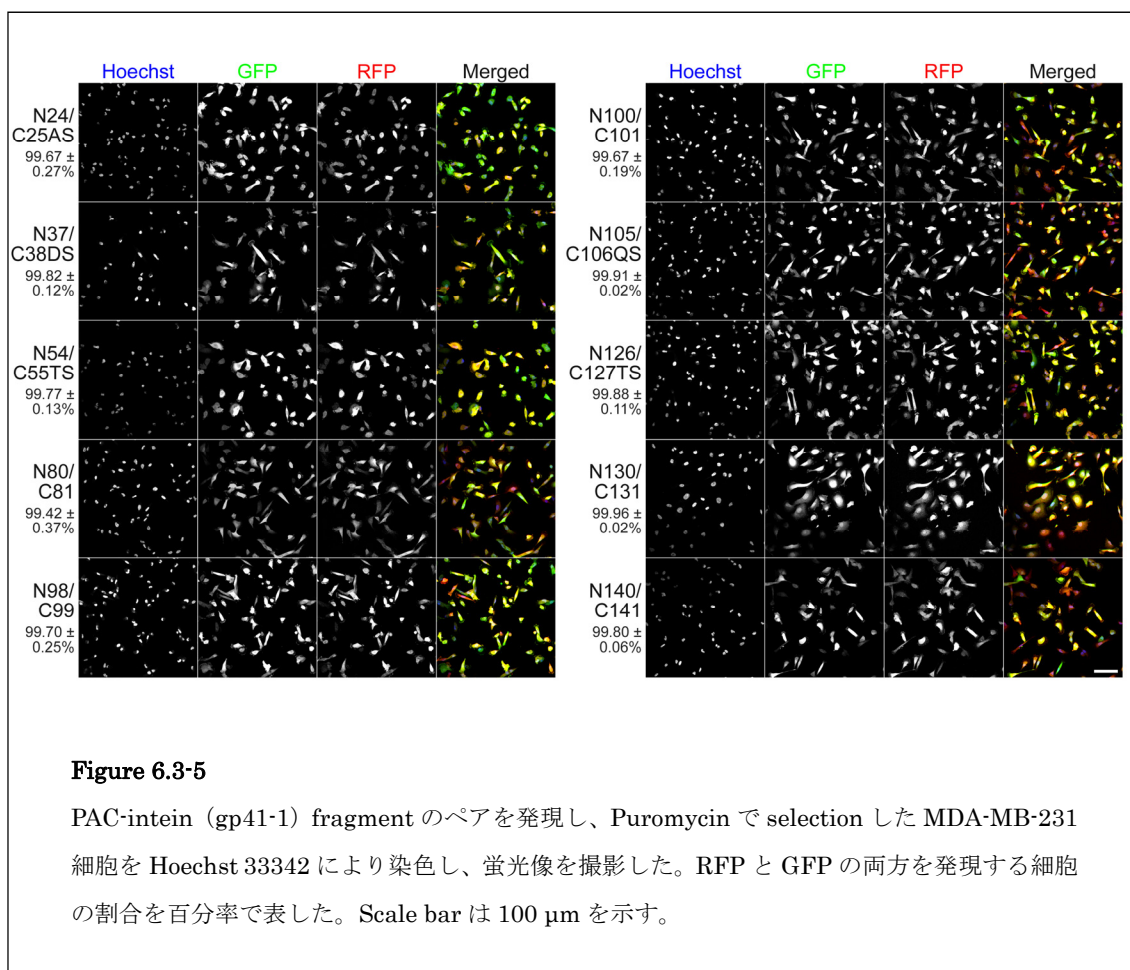
上記の vector を transient に transfection した細胞は、V5 tag を N 末端に付加した PAC_N (V5-PAC_N) と RFP、もしくは HA tag を C 末端に付加した PAC_C (PAC_C-HA) と GFP の共発現を、それぞれ示した (次頁 Figure 6.3-3)。いずれも予想通りの分子量を示したが、western blotting による PAC_C C127 および C131、C141、C163 の検出は非常に弱かった (次頁 Figure 6.3-3)。これはおそらく、それらの分子量が PDVF membrane で捉えるには非常に小さいためであると考えられる。また、それぞれの PAC-intein fragment 単体では、Puromycin に対する耐性を示さないことが確認された。



MDA-MB-231 細胞に、PAC_N および PAC_C plasmid のペアを PiggyBac transposase を発現する vector と共に transfection し、それらの細胞を 1.0 μg/mL の puromycin を添加して 7 日間 selection した。前述した 12 ペアのうち、N108/C109 および N162/C163 は、上記の条件では十分な耐性が示されなかった。Selection 後の細胞における Full-length PAC の再構成は HA に対する抗体を使用して免疫沈降したのち V5 に対する抗体を用いた western blotting で検出した (Figure 6.3-4)。Full-length PAC は、N37/C38 pair を除き、すべてのペアにおいて約 25 kDa の位置で観察された。N37/C38 pair についてはおそらく、PAC_N と PAC_C の間の共有結合に基づかない会合により Puromycin 耐性がもたらされたものと推測される。



本実験の目的における PAC の最適切断部位を決定するため、selection 後の MDA-MB-231 細胞を用いて、GFP/RFP の共発現の比率および growth/viability を解析した。非常に興味深いことに、PAC の切断部位に依らず、selection 後の細胞の 99%以上において GFP/RFP が共発現していることが確認された (Figure 6.3-5)。



一方で、**growth/viability** はそれぞれのペアで著明に異なる結果となった (Figure 6.3-6)。この観点から、**gp41-1 split-intein** による分割・再構成については、**N80/C81** および **N100/C101** が最も効率の良い分割点であると考えられた。また、**N140/C141** のペアについても、高濃度の **Puromycin (2.0 µg/mL)** を使用した場合の増殖が上記の2つよりも若干遅れるものの、それらとほぼ同等の効率を示すことが認められた (Figure 6.3-6)。以上の結果から、**gp41-1 split-intein** に関しては、**PAC** の最適切断部位として **N80/C81**、**N100/C101** および **N141/C141** の3つを選択することとした。

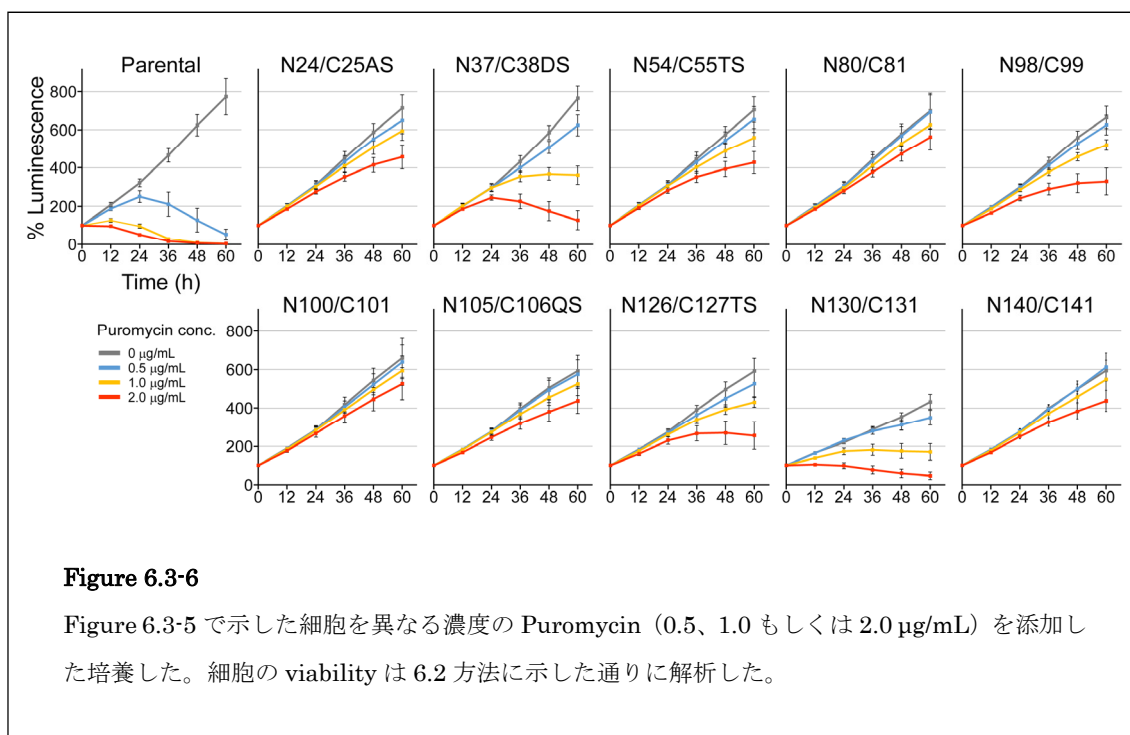
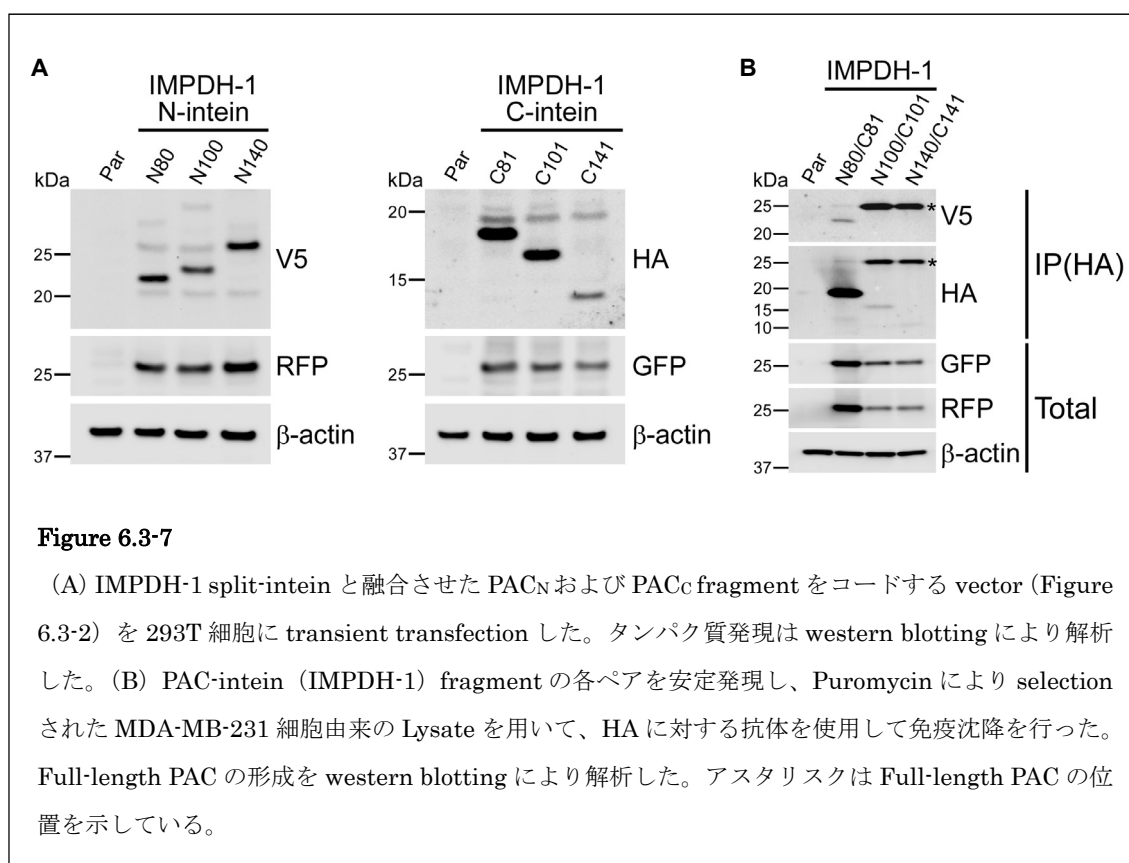


Figure 6.3-6

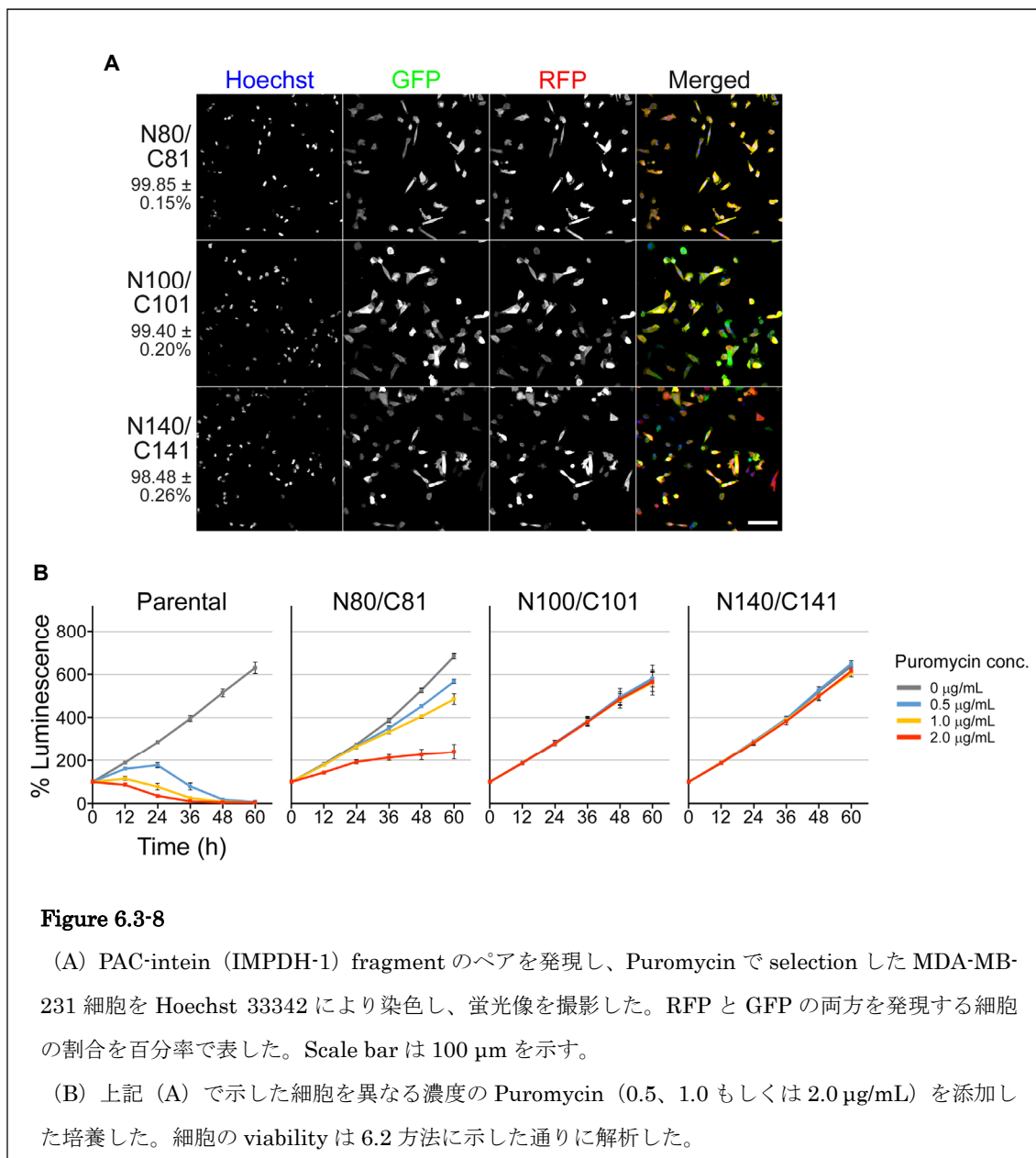
Figure 6.3-5 で示した細胞を異なる濃度の Puromycin (0.5、1.0 もしくは 2.0 µg/mL) を添加した培養した。細胞の **viability** は 6.2 方法に示した通りに解析した。

6.3.2 IMPDH-1 および Cfa_{GEP} split-intein による PAC 切断部位の決定

IMPDH-1 および gp41-1 split-intein はともに serine を接続部位として利用する事から、上記の結果に基づき、IMPDH-1 split-intein に対する PAC の切断部位の候補として N80/C81 および N100/C101、N140/C141 の解析を行った。IMPDH-1 split-intein と融合させた PAC fragment および RFP/GFP を bicistronic に発現する plasmid の transient transfection では、gp41-1 split-intein を用いた場合と同様の結果となることが実証された (Figure 6.3-7 A)。続いて、PiggyBac transposase を用いて PAC_N および PAC_C plasmid を安定導入し、前述の条件で Puromycin により selection した。いずれのペアも十分な Puromycin 耐性を示したが、Full-length PAC は N100/C101 および N140/C141 のペアでは観察されたものの、N80/C81 のペアでは観察されなかった (Figure 6.3-7 B)。これは gp41-1 split-intein における N37/C38 のペアと類似した傾向である。



上記とは対照的に、N80/C81 のペアを発現する細胞において、GFP/RFP 共発現の比率は N100/C101 および N140/C141 と比較してわずかながら高くなっていた (Figure 6.3-8 A)。一方、異なる Puromycin 濃度で selection された細胞の viability の解析では、N100/C101 および N140/C141 のペアで顕著な Puromycin 耐性が確認された (Figure 6.3-8 B)。以上の結果から、IMPDH-1 split-intein に対する PAC の最適切断部位として N100/C101 および N140/C141 を選択した。



続いて、Cfa_{GEP} split-intein と融合した PAC_N および PAC_C fragment を構築した。Cfa_{GEP} split-intein による共有結合の形成には Ext_C の 1 番目のアミノ酸が cysteine であることが望ましい (Stevens et al., 2017)。PAC の配列に存在している唯一の cysteine 残基は C 末端に非常に近い場所に位置するため (Figure 6.3-1 参照)、今回の検討からは除外した。したがって、Cfa_{GEP} split-intein に対する PAC_C fragment は全て、1 番目のアミノ酸が cysteine に置き換えられたものを使用した (Figure 6.3-1 参照)。6 つの異なる PAC-intein のペアの発現および trans-splicing 効率について、前述した方法により比較した。Transient transfection した PAC-intein のうち、分子量の小さい fragment (C158 および C182) は、その他の fragment のように western blotting によって効率的に検出することはできなかった (Figure 6.3-9 A)。一方、これらを stable transfection した場合は、どの PAC-intein のペアについても Puromycin selection 後に生存細胞を得ることができた。存在量は大きく異なるものの、Full-length PAC はすべてのペアで検出することができた (Figure 6.3-9 B)。

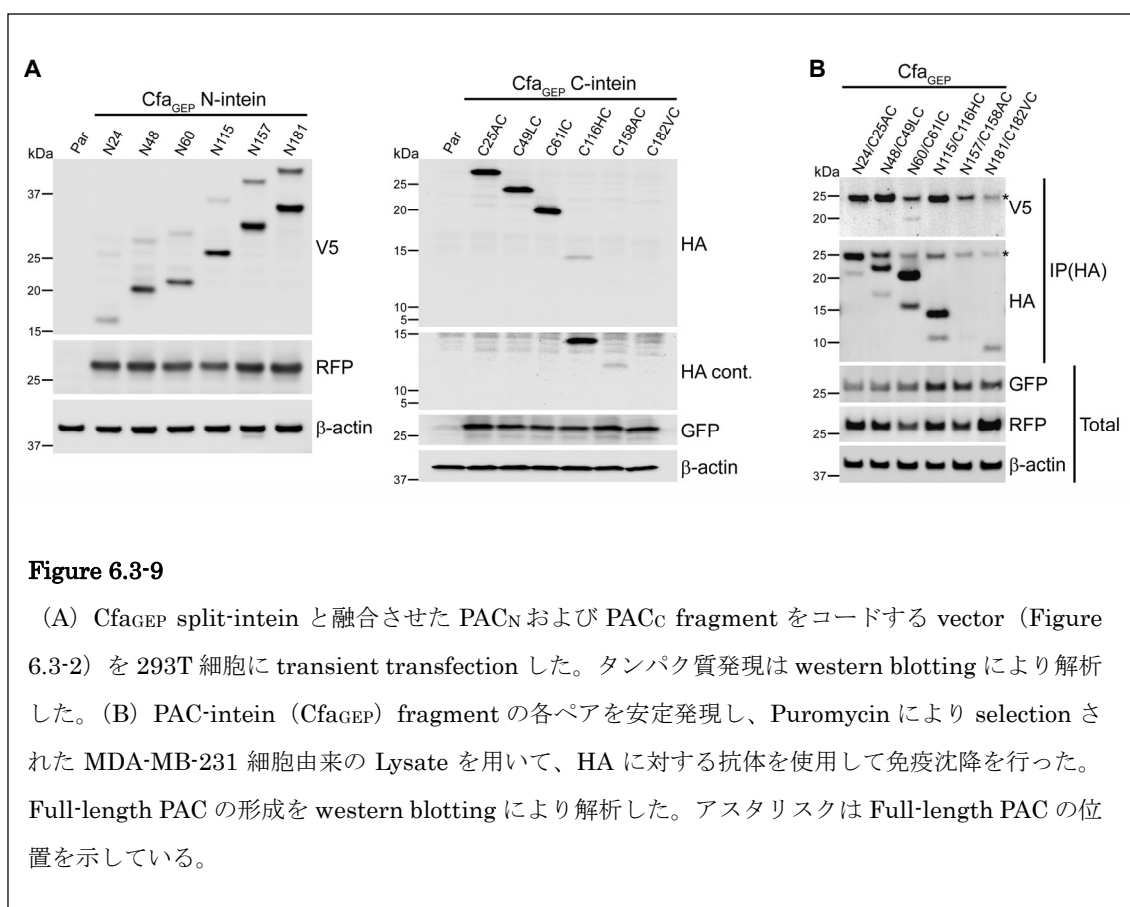
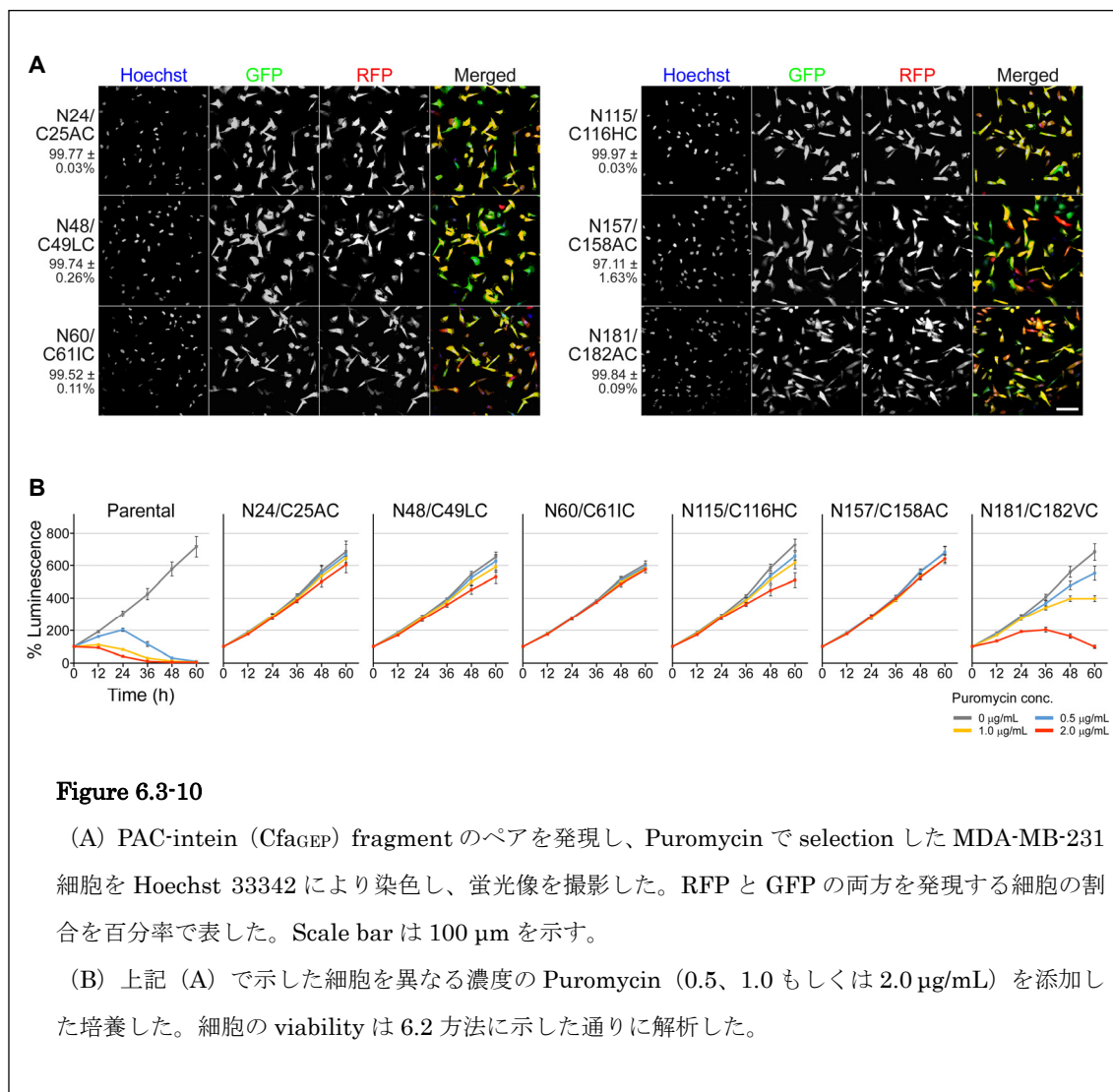


Figure 6.3-9

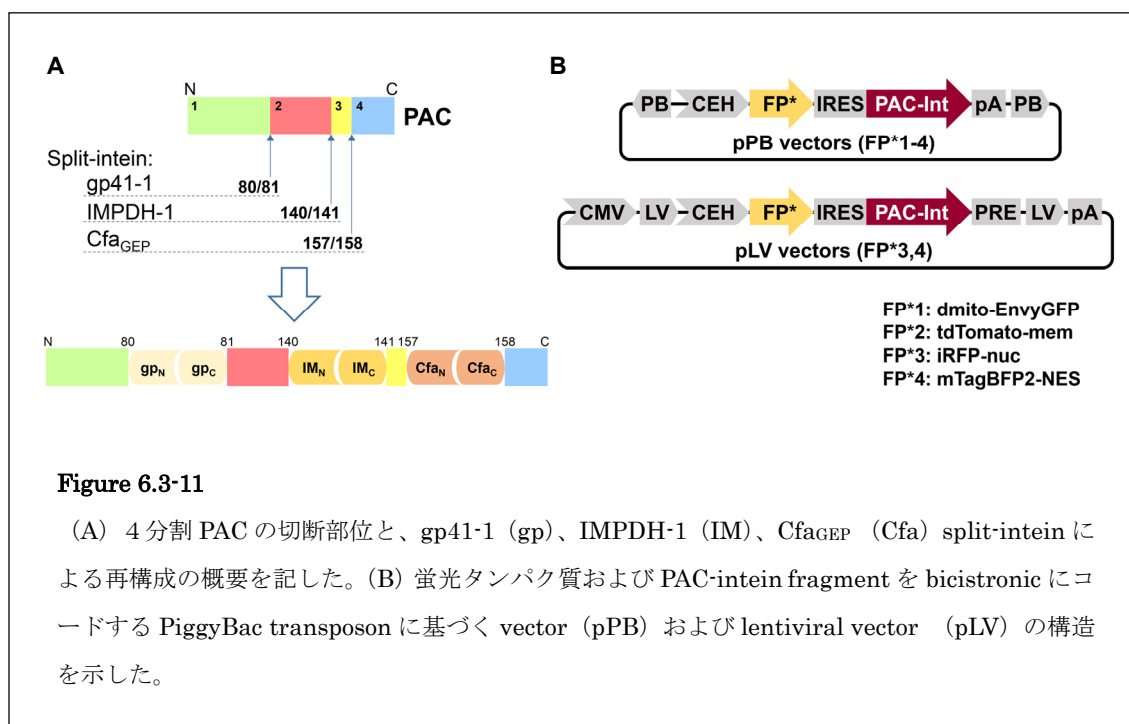
(A) Cfa_{GEP} split-intein と融合させた PAC_N および PAC_C fragment をコードする vector (Figure 6.3-2) を 293T 細胞に transient transfection した。タンパク質発現は western blotting により解析した。(B) PAC-intein (Cfa_{GEP}) fragment の各ペアを安定発現し、Puromycin により selection された MDA-MB-231 細胞由来の Lysate を用いて、HA に対する抗体を使用して免疫沈降を行った。Full-length PAC の形成を western blotting により解析した。アスタリスクは Full-length PAC の位置を示している。

6つの異なる PAC-intein のペアのうち、N157/C158 のペアについてはわずかに低い効率を示したものの、その他全てのペアにおいて、GFP/RFP の共発現率は99%以上であった (Figure 6.3-10 A)。また、N181/C182 以外のどのペアにおいても、高い Puromycin 濃度で十分な viability を示すことがわかった (Figure 6.3-10 B)。以上の結果を勘案して、Cfa_{GEP} split-intein に関しては、N181/C182 を除くすべての切断部位が十分に利用可能であると結論した。



6.3.3 4-in-1 PAC の同時および段階的な transfection/selection 方法の開発

上記の結果に基づき、PAC を 4 つに分割してそれぞれに異なる 3 種類の split-intein を付加し、Full-length の PAC を再構成できるか検討した (Figure 6.3-11 A)。3 つの切断部位は、それぞれの split-intein における最適切断部位の中から、互いの切断部位が接近し過ぎないように選び出した。4 種類の sorting signal peptide を付加した異なる波長の蛍光タンパク質を作成し、PAC-intein fragment を bicistronic に発現する PiggyBac vector の中に subcloning した (Figure 6.3-11 B)。



EnvyGFP-dmito (緑) および tdTomato-mem (赤)、iRFP-NLS (近赤外)、mTagBFP2-NES (青) にミトコンドリア、細胞膜、核および細胞質に局在させるための sorting signal を融合した。MDA-MB-231 細胞にこれら 4 つの plasmid を PiggyBac transposase を使用して同時に stable transfection し、前述した条件で Puromycin により selection した。ほぼすべて (95%以上) の生存細胞が 4 種類の蛍光タンパクを発現し、それぞれ適切な局在をしていた (次頁 Figure 6.3-12)。以上の結果から、このような “4-in-1 PAC” による selection system が実際に有用であることを実証できた。なお、同様の方法で 3-in-1 system も十分に機能することを確認した。

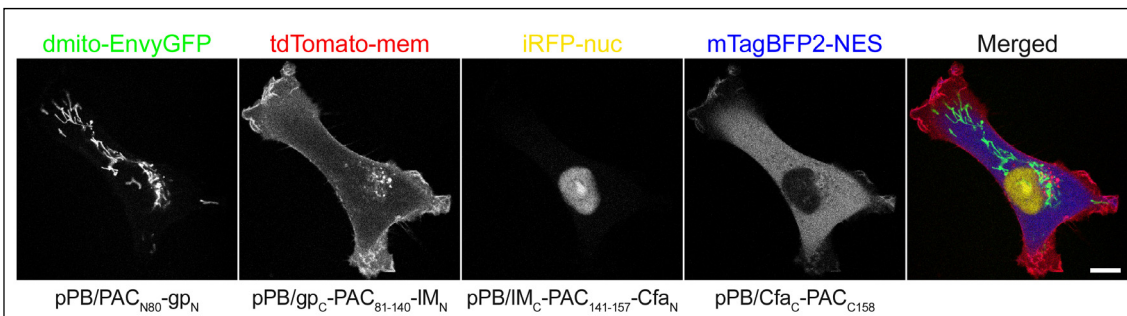


Figure 6.3-12

Figure 6.3-11 で示した 4 つの pPB vector を同時に transfection し、Puromycin で selection した MDA-MB-231 細胞の典型的な蛍光像を示した。Scale bar は 10 μ m を表す。

同時 transfection/selection system の最大の欠点は、組み合わせた遺伝子構築の一部に置き換えたいものがあつた場合に、transfection/selection をすべてやり直さなければならない点である。ゲノム編集や recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) のような時間と労力を要する方法で stable transfection を行う場合、段階的な transfection system が同時 transfection/selection よりも有用であると考えた。Puromycin 耐性の transient な誘導を実現するため、細胞に外部からタンパク質を導入することのできる HIV-1-gag-pol と VSV-G に基づく VLP の利用を検討した。HIV-1-gag-pol は PLC δ 1 の PH domain を組み込み細胞膜への効率的な targeting が行われるように改変し (Aoki et al., 2011)、GFP および HA-tag を融合した Intc-PAC_C fragment を統合した。HIV-1 のタンパク質から Intc-PAC_C fragment を分離するため、HIV-1 protease の cleavage site (clv) を導入した (Figure 6.3-13 A)。VLP を精製し、western blotting により Intc-PAC_C fragment が含まれることを確認した (Figure 6.3-13 B)。

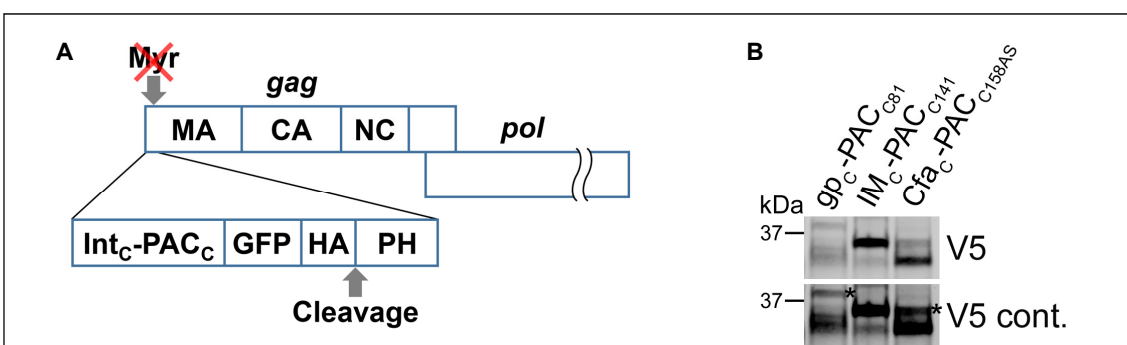
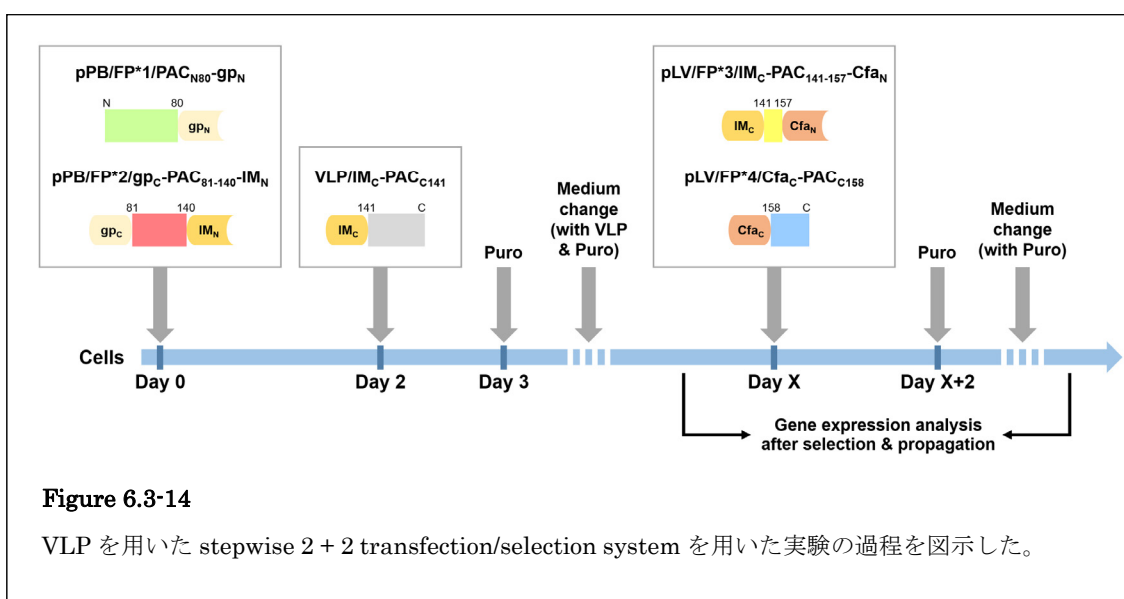


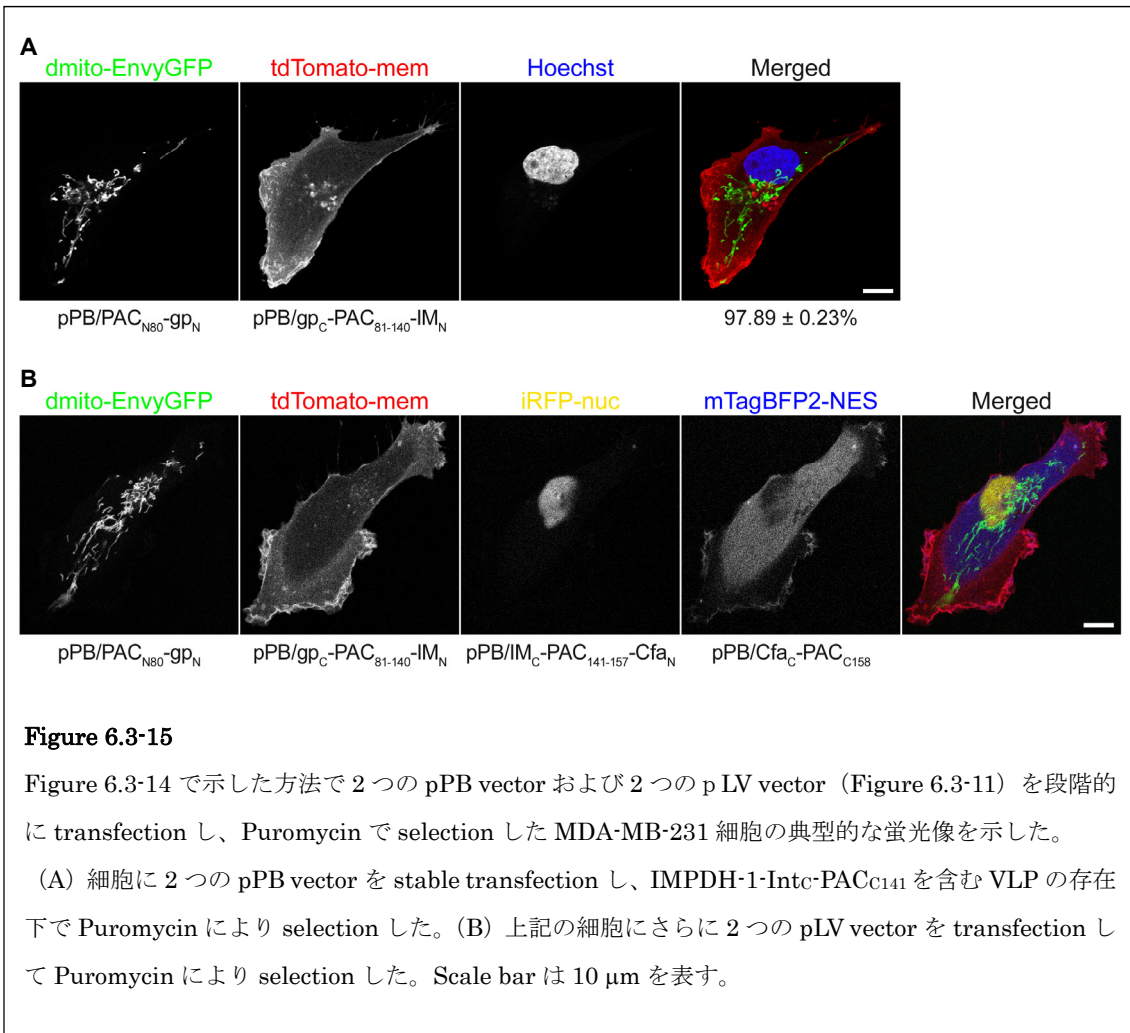
Figure 6.3-13

(A) PAC-intein をコードするように設計した HIV-1 gp の構造を示した。(B) 精製した VLP を western blotting により解析した。アスタリスクは full-length PAC-intein の位置を示している。

PAC_N-Int_N fragment を stable transfection した MDA-MB-231 細胞は、Int_C-PAC_C fragment を含む VLP が存在する場合のみ Puromycin 存在下で生存性を維持できることを実証した。そこで、前述の VLP のうち PAC-Intein fragment の生成効率が最も高かった IMPDH-1-Int_C-PAC_{C141} を含む VLP を用いて、stepwise 2+2 transfection/selection を試みた。PiggyBac transposase を用いて EnvyGFP-dmito/PAC_{N80}-gp41-1-Int_N および tdTomato-mem/gp41-1-Int_C-PAC₈₁₋₁₄₀-IMPDH-1-Int_N をコードする plasmid を stable transfection し、その後、VLP の存在下で Puromycin により selection を行った (Figure 6.3-14)。



VLP 存在下での Puromycin selection の後、97%以上の細胞が EnvyGFP-dmito および tdTomato-mem の同時発現を示しており (次頁 Figure 6.3-15 A)、第一段階の transfection/selection は非常に高い効率を示すことが実証された。つぎに、これらの細胞に mTagBFP2-NES/IMPDH-1-Int_C-PAC₁₄₁₋₁₅₇-Cfa_{GEP}-Int_N および iRFP-NLS/Cfa_{GEP}-Int_C-PAC_{C158} をコードする Lentivirus を transfection した (Figure 6.3-14)。Puromycin による selection の後、ほぼ全ての生存細胞が 4 種類の蛍光タンパクの同時発現を示しており (次頁 Figure 6.3-15 B)、段階的 transfection/selection の方法も、複数遺伝子導入細胞の selection において非常に有用であることが証明された。



6.3.4 代謝協調による糖欠乏細胞の生存性維持とそのメカニズムの解析

上記の方法により確立した selection system を用いて、通常哺乳類の細胞では代謝することができない glucose の「前駆体」である cellobiose を細胞内に取り込むことのできる transporter (*Neurospora crassa* CDT-2 変異体、Lian et al., 2014) と、cellobiose を glucose に加水分解する enzyme (*Neurospora crassa* GH1-1、Kim et al., 2014) を発現する MDA-MB-231 細胞 (C/G EL-P) を作成した (6.2 方法参照)。なお、これらの transporter と enzyme の遺伝情報については、XM_958780 および XM_011395456 に登録されているものを参考とした。

上記の細胞と、cellobiose を代謝することのできない parental の MDA-MB-231 細胞に pPB を用いて Akaluc を発現させたもの (AL-P) を共培養することにより、glucose を含まない培地中で AL-P 細胞の生存性が維持されるか、すなわち、「代謝協調」が生じるかかどうか、検証を行った。まず始めに、両者を 5.5 mM または 0 mM の glucose を含む培地で単独培養して生存性を解析した。いずれの細胞も 5.5 mM では正常に増殖し、0 mM では 48 時間後にほぼ全てが死滅した (Figure 6.3-16)。

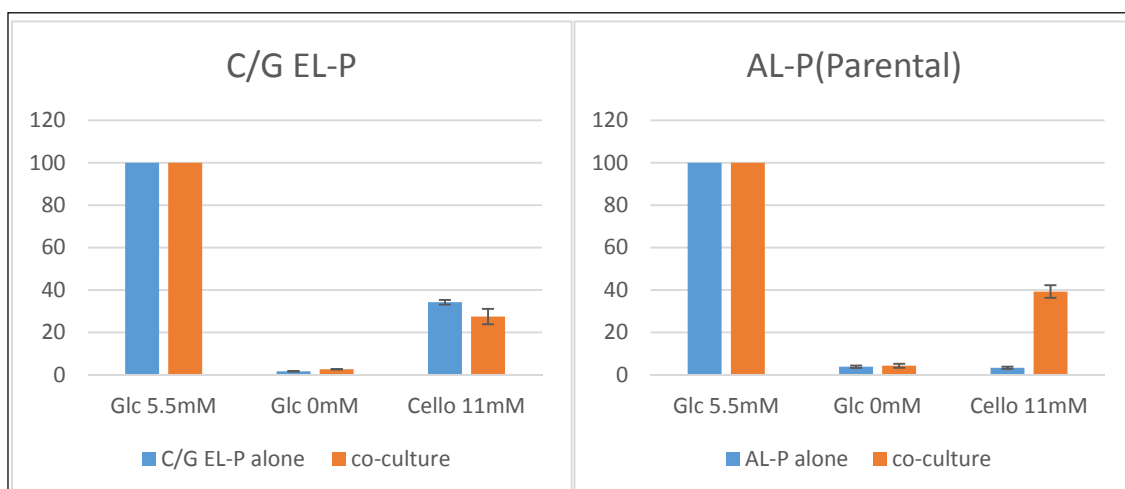


Figure 6.3-16

C/G ELP 細胞 (cellobiose 代謝可能) の単独培養および AL-P 細胞 (cellobiose 代謝不能) との共培養を行ったもの (左のパネル)、または、AL-P 細胞の単独培養および C/G ELP 細胞との共培養を行ったもの (右のパネル) に、5.5 mM あるいは 0 mM の glucose を含む培地、または 11 mM cellobiose を含む glucose 不含培地中でそれぞれ培養した。培地交換から 48 時間経過後のそれぞれの細胞の生存率を、生細胞における発光の検出により測定した。単独培養の生存率を青色の棒グラフ、共培養における生存率を橙色の棒グラフで表した。

C/G EL-P 細胞については glucose を全く含まず 11 mM cellobiose を含む培地中で、単独培養と AL-P 細胞との共培養のいずれにおいても、生存性を維持した。ただし、glucose 5.5 mM 培地よりも増殖速度は遅く、細胞数は 40%程度であった。これは、CDT-2/GH1-1 による cellobiose 代謝が律速となり、解糖系代謝が遅れているためであると考えられる。cellobiose 培地中では、共培養により C/G EL-P 細胞の生存率が大きく変化することはなかった (Figure 6.3-16)。一方で、AL-P 細胞については、cellobiose 培地中では 0 mM glucose 培地で培養した場合と同様の生存性の低下が確認され、この条件では単独で生存できないことを確認できた。C/G EL-P 細胞と共培養すると、cellobiose 培地中での生存性が著明に上昇した (Figure 6.3-16)。これらの結果から、糖欠乏状態の細胞は、糖充足状態の細胞が共存するとき、それらに由来する何らかの糖代謝産物を受け取ることによって生存性を支持していること、すなわち両者の間で「代謝協調」が成立することが確認できた。

さらに、上記の実験系を用いて、糖欠乏細胞が受け取る糖充足細胞の中間代謝産物の特定を試みた。予備的な結果ではあるが、糖代謝に関わる遺伝子の発現解析や、細胞中およびの代謝産物解析の結果から、糖枯渇状態の細胞では NADPH やグルタチオンの総量と、還元型の

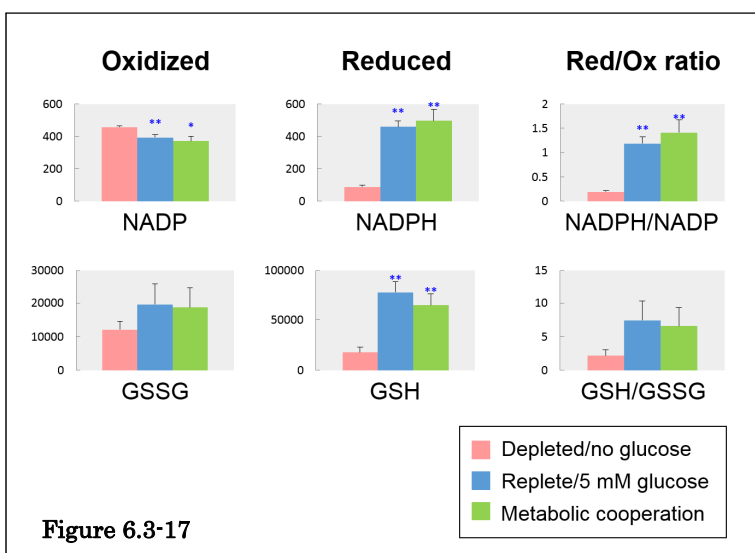


Figure 6.3-17

NADPH およびグルタチオンの量、還元型/酸化型 NADPH およびグルタチオンの比が顕著に減少していることが明らかとなった (Figure 6.3-17、赤色と青色の棒グラフを比較)。これらのことは、糖枯渇状態の細胞では酸化ストレスが亢進していることを示唆している。たいへん興味深いことに、自ら糖代謝を行えない細胞であっても、代謝協調状態においては、上記の物質量および物質比が糖充足状態とほぼ同様のレベルまで回復しており、酸化ストレスはほとんど解消されていることが示唆された (Figure 6.3-17、緑色と青色の棒グラフを比較)。

また、糖欠乏状態の細胞では、ストレス応答のひとつとしてシャペロン機能を持つ遺伝子の発現が異常に亢進していることや、タンパク質の糖鎖修飾に用いられる種々の物質の総量が顕著に減少していることが明らかとなった (Figure 6.3-18、赤色と青色の棒グラフを比較)。これらのことは、糖欠乏状態の細胞では糖鎖修飾が行えなくなり、タンパクの folding 異常も生じることで小胞体ストレス応答 (UPR : Unfolded Protein Response) が増強していることを示唆している。

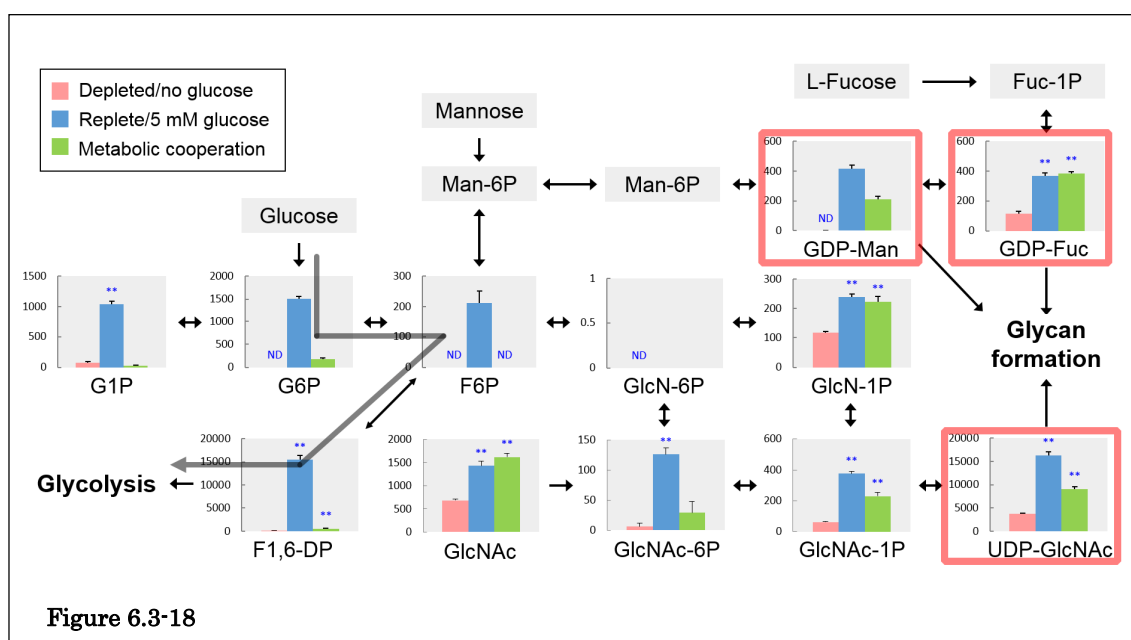


Figure 6.3-18

一方、代謝協調状態においては、自ら糖代謝を行えない細胞であっても、上記の物質がある程度は回復しており、小胞体ストレスも解消されていることが示唆された (Figure 6.3-18、緑色と色の棒グラフを比較)。このとき glucose-6-リン酸や fructose-6-リン酸、fructose-1,6-二リン酸などの解糖系の代謝産物量はほとんど全く回復していないことから、代謝協調下ではグルコース以外の物質によりこれらのストレスを解消していることが改めて裏付けられた。なお、上記の NADPH の還元に関与することがよく知られているペントースリン酸経路の代謝産物についても、代謝協調下ではほとんど回復していなかった (Figure 6.3-19)。

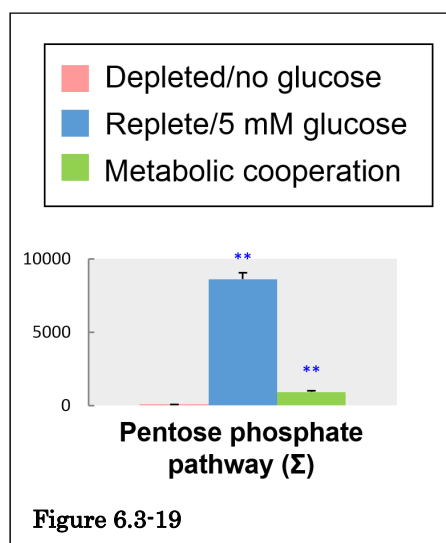
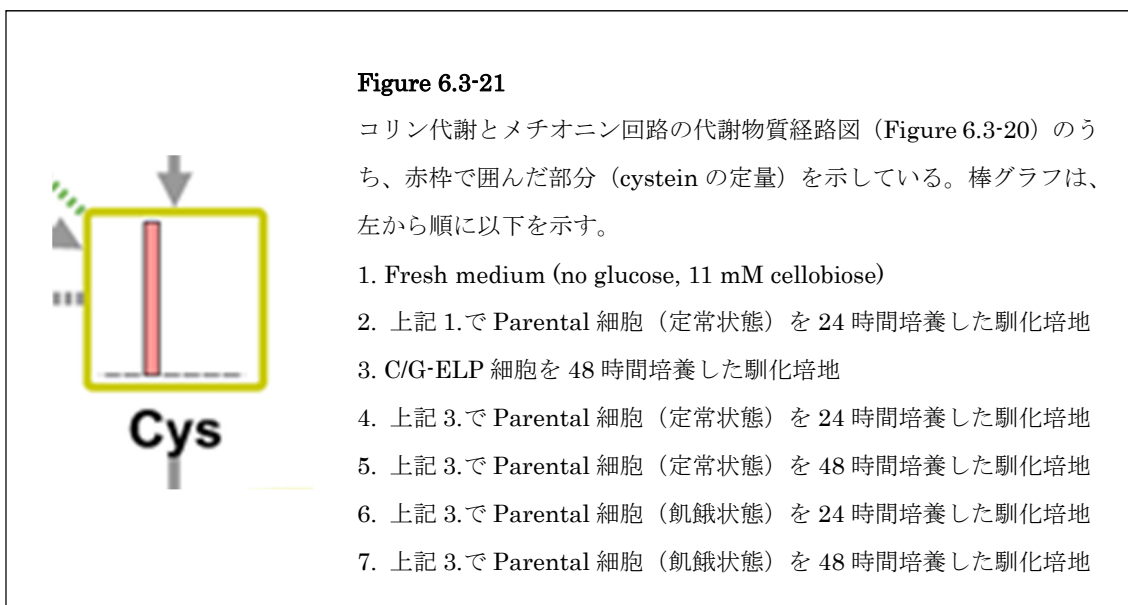


Figure 6.3-19

Figure 6.3-21 に示すように、いくつかのサンプルのうち 1 サンプルのみであったが、C/G-ELP 細胞の培養後の馴化培地において、還元型 cysteine の蓄積が顕著に見られた。用いた培地において、cystein は酸化され S-S 結合をした cystine として添加されており、還元型が自然に生じることはないため、細胞由来であると考えられる。また、その培地を用いた parental 細胞の培養では、還元型 cystein の蓄積は認められず、消費されるのみであった。培地中の cysteine は比較的酸化されやすい物質であるため、解析を行うまで還元状態を維持するのが困難である。また、代謝産物解析を行う際の処理過程においても酸化還元状態が大きく変化してしまうことが予測される。今後はその点を改善した解析方法を確立する必要があると考えている。複数回の実験のうち 1 回のみであったが、同条件下で保存および前処理したサンプルにおいて還元型 cysteine の量に大きな差が見られたことから、cysteine を介した酸化ストレスの解消について、現在解析を進めているところである。



6.4 考察

抗生剤を用いた遺伝子導入細胞の selection は特殊な機材や手順を要しないため、最も簡便で一般的な selection 方法である。抗生剤による selection の精度や簡易性を向上させることにより遺伝子操作をさらに容易にすることができ、すべての生物学的研究領域に求められるツールとなると考えられる。本研究では、まず始めに、単一の抗生剤を使用することで複数の遺伝子が導入された細胞を selection するシステムを確立した。4 つに断片化した PAC を 3 種類の異なる split-intein により再構成し、Puromycin 単剤を用いた同時あるいは段階的な multiselection system を開発した。

近年、Jillette らにより同様の方法で multi-split drug-resistant marker を確立したことが報告された (Jillette et al., 2019)。彼らは hygromycin-resistant marker である hygromycin B phosphotransferase (HPH) を 3 つあるいは 6 つに分割することによる selection 方法を確立した。前述した通り、HPH を含む aminoglycoside 4-phosphotransferase (APH(4)) enzyme は、APH(3') enzyme と非常によく似た構造を示しており、後者はタンパク質キナーゼ活性をもつことが知られている (Daigle et al., 1999)。実際、HPH を安定発現させるとキナーゼ活性を介して真菌である *Histoplasma capsulatum* の毒性に影響を与えることが報告されており (Smulian et al., 2007)、真核生物に selection marker として HPH を用いる際にも大きな懸念となると考えられる。抗生剤による selection に伴うこのような副次的な反応を避けるためにも、selection agent に関する選択肢をより多くもつことは、適切な実験結果を得るための一助となると考えられる。

Puromycin は長年の間、遺伝子構築を transfection された細胞を selection するための一般的な抗生剤として、広く用いられてきた (Perez-Gonzalez et al., 1985 ; Vara et al., 1986)。Puromycin は Hygromycin B や G418、Blasticidin S のようなタンパク合成を阻害するその他の薬剤よりも低い濃度で効果を発揮することができる (Nakatake et al., 2013)。Puromycin に対応する耐性酵素である PAC は、この酵素を transient に発現する細胞で ROS 依存性タンパクの凝集が起こること (Moran et al., 2009) を除き、哺乳類細胞において好ましくない副次的な影響を与える報告がほとんどみられない。勿論、未だに知られていない影響が存在する可能性を完全に否定できるものではないが、たとえば白血病細胞における PAC および Puromycin を用いた長期間の selection は細胞の代謝動態に変化を与えなかったことが報告されており (Johnson et al., 2014)、少なくとも本研究の目標としている代謝解析においては最も有用なものであると考えられる。

Puromycin による selection 後に生存していた細胞について、どの PAC-

intein のペアでも遺伝子の形質導入の効率はほぼ 100%に達していた。一方、Full-length PAC の再構成に関する解析では PAC の酵素活性が確認された場合でも PAC_Nおよび PAC_C fragment の間の共有結合の形成が不完全であるペアも存在することが示された (Figure 6.3-4, 6.3-7)。また、1.0 µg/mL の Puromycin 濃度で 7 日間 selection した後に生存した細胞を異なる濃度の Puromycin でさらに培養した際に、growth/viability はそれぞれの PAC-intein ペアの間で著しく異なることが確認された。これらの発見は、形質導入の効率自体のみでは、多分割型薬剤耐性マーカーを確立する上で重要となる最適切断部位の決定が難しいことを強く示唆するものである。

本研究ではさらに、PAC-intein fragment に基づく単一抗生剤による段階的な selection system を確立した。この目的において、細胞へのダメージやゲノムへの組み込みなどを避けるため、DNA/RNA の transient transfection や nonintegrating virus のような核酸に基づく方法ではなく、細胞内にタンパクを導入することのできる VLP を使用した。PAC-intein-VLP は容易に作成でき、後の使用のために冷凍保存することも可能であるため、コストや労力の面でも優れている。2-step 2+2 transfection の第一段階および第二段階の遺伝子構築導入について、効率はいずれも 95%以上を示すことを実証した。2+2 selection marker は、異なる 2 つの遺伝子座に対するゲノム編集にも有用であると予測している。Homology-directed repair (HDR) による一遺伝子座のゲノム編集の際に 2 つの異なる薬剤耐性マーカーを用いて selection することにより、両アレルが編集された細胞を効率的に分離できることが報告されている (Liu et al., 2017)。本研究で開発した 2-step 2+2 selection method は、これを Puromycin のみを用いて 2 度繰り返すことが可能であり、2 つの異なる遺伝子座に対する遺伝子導入細胞の確立において非常に有用であると考えられる。

PAC の切断部位の決定は、酵素の 3 次構造についての報告が存在しなかったため、ランダムな検索により行った。CfageP intein に対する切断部位の作成に関しては、PAC の構造および酵素活性に影響を与える可能性が懸念されたものの、必然的にいくつかのアミノ酸を cysteine に置き換えることとなった。そのような望ましくない影響をなるべく避けるため、PAC に関連する酵素のアミノ酸配列を参照した。そのような酵素のいくつかには PAC にはみられない位置に cycteine 残基が存在しており、該当する部位において cysteine への置換を行った。予想外なことに、そのような cysteine への置換はほとんどの場合で問題なく機能し、6 か所のうち 5 か所を効率的な切断部位として用いることができた。Palanisamy らは異なる薬剤耐性遺伝子に対してコンピューターシミュレーションによるアプローチで切断部位の候補を特定した (Palanisamy el al., 2019)。遺伝子配列情報が利用できさえすれば、本研究で行った単純な方法は、

コンピューターを用いたより複雑な方法と匹敵するレベルで、酵素の分割点を決定できるかもしれない。

本研究で開発した SIGHT (CDT-2 と GH1-1 を用いた細胞特異的糖代謝制御法) は、グルコースの不均一性に基づく代謝協調の成立に非常に有用であり、これまでにない精度で代謝解析を行うことが可能であった。細胞内代謝産物の解析においては、実験間のばらつきが非常に小さかったが、その点には方法の簡便さが大きく寄与しているものと考えている。糖枯渇細胞と糖充足細胞の代謝協調によって、酸化ストレスと小胞体ストレスが大部分解消することが明らかとなった。糖鎖修飾に関しては詳しい解析を現在進行中であるが、代謝産物解析においては、糖鎖の材料となる物質について分子量が同等であるためそれぞれ区別できないものも多く存在する。したがって、それらの物質の網羅的な解析には、別の技術を用いるか、既存技術の発展が必要とされる。

予備的ではあるが、遺伝子発現解析の結果を加味すると、糖枯渇状態ではヘキソサミン合成経路に関わる遺伝子発現が亢進していることが示唆された。細胞内の代謝産物の解析においても、代謝協調によりそれらが通常状態の細胞に匹敵するレベルまで回復していたため、ヘキソサミン合成経路に流入し得る何らかの物質が培地中に増加している可能性あるのではないかと推測している。馴化培地を用いた解析からそのような物質を特定することはできなかったが、たとえば糖鎖そのものや、それが部分的に分解されたものが取り込まれ、「サルベージ経路」によって利用されている可能性も考えられる。そのような物質は、代謝産物解析での特定が非常に困難である。糖鎖やその断片の解析に特化した解析を行う必要があると考えている。

また、その他の予備的な解析から、代謝協調によって本来は脆弱な性質をもつはずの栄養欠乏状態の細胞の生存が支持されるとき、代謝協調関係にある栄養充足細胞も含めた細胞群の治療抵抗性が増強されることを見出しつつある。乳癌においては、代謝不良の結果として生じる“中心壊死”が存在するとき、薬剤耐性が亢進することが知られているが (Maiorano et al., 2010)、上記の結果を勘案すると、壊死領域の周囲に存在する飢餓状態の細胞が代謝協調により生存し、腫瘍全体の薬剤耐性に寄与している可能性が想定される (次頁 Figure 6.4-1)。また、乳癌のみならず、その他の多くのがんにおいても、中心壊死の存在は、むしろ予後不良と相関することが知られている (Caruso et al., 2014)。中心壊死は腫瘍全体の増殖と代謝のバランスの制御が不十分なことを示しており、これまでは「増殖能が高いこと」が予後不良の背景にあると考えられてきたが、代謝協調によって浸潤性や幹細胞様性質などの悪性形質が変化することで、周囲組織への浸潤や遠隔部への転移が促進されるというモデルも想定され、今後解析すべき課題であると考えている。

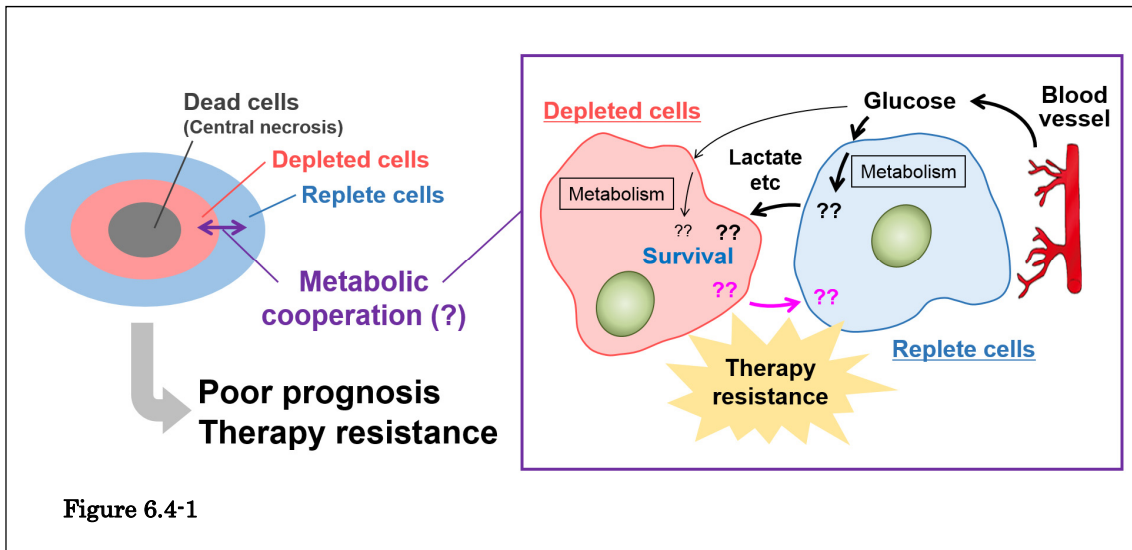


Figure 6.4-1

代謝協調がどの代謝経路のどの中間代謝物によってもたらされるのかを明らかにすることで、上記のような現象のメカニズムの解明にも展開できるとがんがえている。それにより、引いては新たな治療標的の発見や既存の治療プロトコールの改善、浸潤や転移などがんの根治を阻む問題の解決へと繋がるものと期待している。

7. 結 論

本研究で得られた新知見は以下のとおりである。

- CAIX の細胞表面での発現レベルは AMAP1-PRKD2 pathway を介して β 1-integrin と共に輸送が制御されている。
- AMAP1 経路が CAIX の細胞表面への recycling process を促進している。
- AMAP1 の発現を阻害することで、細胞外の酸性化を抑制することができる。
- PIAS3 は AMAP1 と共同することにより HIF-1 α を安定化し、CAIX 発現量の増加を誘導する。
- TCGA dataset の解析では PIAS3 発現自体は乳がんの予後に関与しないが、腫瘍内での AMAP1 の高発現と PIAS3 高発現が同時に発生する場合は予後の悪化と非常によく相関する。

- Puromycin 耐性遺伝子である PAC を単独では活性をもたない 4 つに断片化し、それらを split-intein を用いて再び酵素活性を示す Full-length PAC に再構成することができる。
- 本研究で見出されたどの切断部位のペアについても、Puromycin による selection 後に生存していた細胞の遺伝子の形質導入の効率はほぼ 100%を示す。
- split-intein により会合した 2 つの断片は必ずしも共有結合を伴わずに酵素活性を回復することができる。
- PAC fragment を含む遺伝子構築をすべて同時に transfection/selection する手法に加えて、細胞内にタンパクを導入することのできる VLP を使用することにより、段階的に selection を進める 2-step 2+2 selection method を確立することができる。

- グルコースの前駆体を用いた細胞特異的な糖代謝制御法は、代謝解析において非常に有用である。
- 糖枯渇細胞と糖充足細胞の共培養により、糖枯渇細胞の生存性が維持される。
- 共培養による糖枯渇細胞の生存性向上に伴い、NADPH や GSH などの還元状態や、糖鎖修飾を回復させる何らかの物質の増加が寄与している。
- 共培養による糖枯渇細胞の生存性向上の要因として、糖充足細胞由来の物質の授受が示唆される。

本研究（第一章）により、CAIXの輸送機構を阻害することは、CAIXの介在によって生じる微小環境の酸性化を抑制することにつながる可能性が見出された。AMAP1は輸送および転写の2つの側面からCAIXの発現量を制御していることが明らかとなったが、PIAS3とHIF-1 α の相互作用がAMAP1により調節されるメカニズムについては、さらなる研究により解明しなければならない課題である。このような転写と輸送の間の相互作用が、細胞表面タンパク質全般の制御に関して共通するかどうか興味深い課題であり、さらなる検証による解明が期待される。

本研究で開発した新たなselection systemにより、従来の手法と比較して、遺伝子導入細胞のselection効率を維持しながら、簡便性および迅速性を大きく向上させることができた。単一薬剤を用いたselectionは、薬剤耐性マーカーの併用による好ましくない副次的な反応を最小限に抑えることにも寄与し、安全性を両立した精度の高いselectionであると言える。このような手法により、後に続く実験においても、より正確な結果を得ることができるようになると期待される。今後の課題として、systemのさらなる微調整により、3-stepおよび4-stepのtransfection/selection法へと発展させられると考えている。

上記のselection systemを有効利用して、糖枯渇細胞と糖充足細胞の共培養系を確立することができた。両者の共存すなわち代謝協調において、前者のNADPHやGSHなどの還元状態を回復させる物質の候補としてcysteineが得られた。しかしながら、培地に含まれるcysteineの酸化還元状態は非常に変化しやすく、また、代謝産物解析を行う際の処理に使用される試薬や手順によっても影響を受け得ることから、これが代謝協調の媒介物質であるという確証には至っていない。今後は網羅的な解析ではなく、解析の対象物質を絞り、かつ物質の酸化還元状態を変化させない条件での解析方法の確立することが課題となる。腫瘍の深部に存在する糖欠乏状態の細胞が受け取り生存の維持に利用している物質が分かれば、その物質自体あるいはその物質の代謝経路を阻害することにより、それらの細胞の生存性を強く抑制することができると考えられる。また、そのような細胞は、微小環境の酸性化や糖枯渇により免疫や薬剤・放射線への耐性を得ると考えられてきたが、代謝協調そのものが、生存性を維持するのみならず、それらの治療耐性に直接的に寄与していることも想起された。したがって代謝協調を阻害することは、がん細胞の増殖をブロックするのみならず悪性形質を減弱する可能性が高く、がん治療の奏功率を改善することに大きく寄与できると期待される。

8. 謝 辞

本研究を進めるにあたり、所属教室である北海道大学大学院医学研究科生化学講座分子生物学教室・教授 佐邊壽孝先生および多大なるご指導を頂きました北海道大学大学院医学研究院医理工学グローバルセンター・准教授 小野寺康仁先生、生化学講座分子生物学教室の及川司先生、橋本あり先生、半田悠先生、秘書の小田綾恵さんに心から感謝申し上げます。

また、博士課程奨学助成を賜りました武田科学振興財団に厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部の解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社（HMT）より頂いた 2019 年度 HMT メタボロミクス先導研究助成により行いました。

9. 利益相反

本研究に関して、著者および共同研究者らに開示すべき利益相反はない。

10. 引用文献

- Aoki, T., Miyauchi, K., Urano, E., Ichikawa, R., and Komano, J. (2011). Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. *Gene Ther.* 18, 936–941.
- Aranko, A.S., Wlodawer, A., and Iwai, H. (2014). Nature's recipe for splitting inteins. *Protein Eng. Des. Sel.* 27, 263–271.
- Becker, H.M. (2020). Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *Br. J. Cancer* 122, 157–167.
- Boukouris, A.E., Zervopoulos, S.D., and Michelakis, E.D. (2016). Metabolic Enzymes Moonlighting in the Nucleus: Metabolic Regulation of Gene Transcription. *Trends Biochem. Sci.* 41, 712–730.
- Brantley, E.C., Nabors, L.B., Gillespie, G.Y., Choi, Y.H., Palmer, C.A., Harrison, K., Roarty, K., and Benveniste, E.N. (2008). Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: Implications for STAT-3 activation and gene expression. *Clin. Cancer Res.* 14, 4694–4704.
- Briggs, K.J.J., Koivunen, P., Cao, S., Backus, K.M.M., Olenchock, B.A.A., Patel, H., Zhang, Q., Signoretti, S., Gerfen, G.J.J., Richardson, A.L.L., et al. (2016). Paracrine Induction of HIF by Glutamate in Breast Cancer: EglN1 Senses Cysteine. *Cell* 166, 126–139.
- Caruso, R.A., Branca, G., Fedele, F., Irato, E., Finocchiaro, G., Parisi, A., and Ieni, A. (2014). Mechanisms of coagulative necrosis in malignant epithelial tumors (Review). *Oncol. Lett.* 8, 1397–1402.
- Carvajal-Vallejos, P., Palliss, R., Mootz, H.D., and Schmidt, S.R. (2012). Unprecedented rates and efficiencies revealed for new natural split inteins from metagenomic sources. *J. Biol. Chem.* 287, 28686–28696.
- Cazzamalli, S., Dal Corso, A., Widmayer, F., and Neri, D. (2018). Chemically

defined antibody- and small molecule-drug conjugates for in vivo tumor targeting applications: A comparative analysis. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 1617–1621.

Chalouni, C., and Doll, S. (2018). Fate of Antibody-Drug Conjugates in Cancer Cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37, 20.

Chen, Z., Ai, L., Mboge, M.Y., Tu, C., McKenna, R., Brown, K.D., Heldermon, C.D., and Frost, S.C. (2018). Differential expression and function of CAIX and CAXII in breast cancer: A comparison between tumorgraft models and cells. *PLoS One* 13, e0199476.

Dabir, S., Kluge, A., and Dowlati, A. (2009). The association and nuclear translocation of the PIAS3-STAT3 complex is ligand and time dependent. *Mol. Cancer Res.* 7, 1854–1860.

Dagogo-Jack, I., and Shaw, A.T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 81–94.

Daigle, D.M., McKay, G.A., Thompson, P.R., and Wright, G.D. (1999). Aminoglycoside antibiotic phosphotransferases are also serine protein kinases. *Chem. Biol.* 6, 11–18.

Damaghi, M., Wojtkowiak, J.W., and Gillies, R.J. (2013). pH sensing and regulation in cancer. *Front. Physiol.* 4 DEC, 370.

Dassa, B., London, N., Stoddard, B.L., Schueler-Furman, O., and Pietrokovski, S. (2009). Fractured genes: A novel genomic arrangement involving new split inteins and a new homing endonuclease family. *Nucleic Acids Res.* 37, 2560–2573.

Debreova, M., Csaderova, L., Burikova, M., Lukacikova, L., Kajanova, I., Sedlakova, O., Kery, M., Kopacek, J., Zatovicova, M., Bizik, J., et al. (2019). CAIX Regulates Invadopodia Formation through Both a pH-Dependent Mechanism and Interplay with Actin Regulatory Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2745.

Dozynkiewicz, M.A., Jamieson, N.B., MacPherson, I., Grindlay, J., VandenBerghe, P.V.E., VonThun, A., Morton, J.P., Gourley, C., Timpson, P., Nixon, C., et al. (2012). Rab25 and CLIC3 Collaborate to Promote Integrin Recycling from Late Endosomes/Lysosomes and Drive Cancer Progression. *Dev. Cell* 22, 131–145.

Flinck, M., Kramer, S.H., and Pedersen, S.F. (2018). Roles of pH in control of cell proliferation. *Acta Physiol.* 223, e13068.

Gramespacher, J.A., Stevens, A.J., Thompson, R.E., and Muir, T.W. (2018). Improved protein splicing using embedded split inteins. *Protein Sci.* 27, 614–619.

Gupta, S., Roy, A., and Dwarakanath, B.S. (2017). Metabolic cooperation and competition in the tumor microenvironment: Implications for therapy. *Front. Oncol.* 7, 68.

Hao, G., Xu, Z.P., and Li, L. (2018). Manipulating extracellular tumour pH: An effective target for cancer therapy. *RSC Adv.* 8, 22182–22192.

Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A., and Sabe, H. (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6647–6652.

Hashimoto, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Onodera, Y., and Sabe, H. (2006). Assays and properties of the ArfGAPs, AMAP1 and AMAP2, in Arf6 function. *Methods Enzymol.* 404, 216–231.

Hashimoto, S., Furukawa, S., Hashimoto, A., Tsutaho, A., Fukao, A., Sakamura, Y., Parajuli, G., Onodera, Y., Otsuka, Y., Handa, H., et al. (2019). ARF6 and AMAP1 are major targets of KRAS and TP53 mutations to promote invasion, PD-L1 dynamics, and immune evasion of pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 17450–17459.

Hsu, J.W., Bai, M., Li, K., Yang, J.S., Chu, N., Cole, P.A., Eck, M.J., Li, J., and Hsu, V.W. (2020). The protein kinase Akt acts as a coat adaptor in endocytic

recycling. *Nat. Cell Biol.* 22, 927–933.

Hsu, V.W., Bai, M., and Li, J. (2012). Getting active: Protein sorting in endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 323–328.

Huber, V., Camisaschi, C., Berzi, A., Ferro, S., Lugini, L., Triulzi, T., Tuccitto, A., Tagliabue, E., Castelli, C., and Rivoltini, L. (2017). Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Semin. Cancer Biol.* 43, 74–89.

Iwano, S., Sugiyama, M., Hama, H., Watakabe, A., Hasegawa, N., Kuchimaru, T., Tanaka, K.Z., Takahashi, M., Ishida, Y., Hata, J., et al. (2018). Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science* 359, 935–939.

Jamali, S., Klier, M., Ames, S., Felipe Barros, L., McKenna, R., Deitmer, J.W., and Becker, H.M. (2015). Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX facilitates lactate flux in human breast cancer cells by non-catalytic function. *Sci. Rep.* 5, 1–16.

Jillette, N., Du, M., Zhu, J.J., Cardoz, P., and Cheng, A.W. (2019). Split selectable markers. *Nat. Commun.* 10.

Johnson, C.H., Fisher, T.S., Hoang, L.T., Felding, B.H., Siuzdak, G., and O'Brien, P.J. (2014). Luciferase does not alter metabolism in cancer cells. *Metabolomics* 10, 354–360.

Kaluz, S., Kaluzová, M., Liao, S.Y., Lerman, M., and Stanbridge, E.J. (2009). Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1795, 162–172.

Kasinskas, R.W., Venkatasubramanian, R., and Forbes, N.S. (2014). Rapid uptake of glucose and lactate, and not hypoxia, induces apoptosis in three-dimensional tumor tissue culture. *Integr. Biol.* 6, 399–410.

Keating, E., and Martel, F. (2018). Antimetabolic Effects of Polyphenols in Breast Cancer Cells: Focus on Glucose Uptake and Metabolism. *Front. Nutr.* 5, 25.

Keller, K.E., Doctor, Z.M., Dwyer, Z.W., and Lee, Y.S. (2014). SAICAR induces protein kinase activity of PKM2 that is necessary for sustained proliferative signaling of cancer cells. *Mol. Cell* 53, 700–709.

Kim, H., Lee, W.H., Galazka, J.M., Cate, J.H.D., and Jin, Y.S. (2014). Analysis of cellodextrin transporters from *Neurospora crassa* in *Saccharomyces cerevisiae* for cellobiose fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1087–1094.

Kluge, A., Dabir, S., Vlassenbroeck, I., Eisenberg, R., and Dowlati, A. (2011). Protein inhibitor of activated STAT3 expression in lung cancer. *Mol. Oncol.* 5, 256–264.

Lian, J., Li, Y., Hamedirad, M., and Zhao, H. (2014). Directed evolution of a cellodextrin transporter for improved biofuel production under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 1521–1531.

Liu, Y., Han, X., Yuan, J., Geng, T., Chen, S., Hu, X., Cui, I.H., and Cui, H. (2017). Biallelic insertion of a transcriptional terminator via the CRISPR/Cas9 system efficiently silences expression of protein-coding and non-coding RNA genes. *J. Biol. Chem.* 292, 5624–5633.

Maiorano, E., Regan, M.M., Viale, G., Mastropasqua, M.G., Colleoni, M., Castiglione-Gertsch, M., Price, K.N., Gelber, R.D., Goldhirsch, A., and Coates, A.S. (2010). Prognostic and predictive impact of central necrosis and fibrosis in early breast cancer: Results from two International Breast Cancer Study Group randomized trials of chemoendocrine adjuvant therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 121, 211–218.

Masoud, G.N., and Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* 5, 378–389.

Mboge, M.Y., McKenna, R., and Frost, S.C. (2015). Advances in Anti-Cancer Drug Development Targeting Carbonic Anhydrase IX and XII. In *Topics in Anti-Cancer Research*, (BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS), pp. 3–42.

Mboge, M.Y., Chen, Z., Wolff, A., Mathias, J. V., Tu, C., Brown, K.D., Bozdog, M., Carta, F., Supuran, C.T., McKenna, R., et al. (2018). Selective inhibition of carbonic anhydrase IX over carbonic anhydrase XII in breast cancer cells using benzene sulfonamides: Disconnect between activity and growth inhibition. *PLoS One* 13, e0207417.

Mboge, M.Y., Chen, Z., Khokhar, D., Wolff, A., Ai, L., Heldermon, C.D., Bozdog, M., Carta, F., Supuran, C.T., Brown, K.D., et al. (2019). A non-catalytic function of carbonic anhydrase IX contributes to the glycolytic phenotype and pH regulation in human breast cancer cells. *Biochem. J.* 476, 1497–1513.

Mboge, M.Y., Combs, J., Singh, S., Andring, J., Wolff, A., Tu, C., Zhang, Z., McKenna, R., and Frost, S.C. (2021). Inhibition of Carbonic Anhydrase Using SLC-149: Support for a Noncatalytic Function of CAIX in Breast Cancer. *J. Med. Chem.* 64, 1713–1724.

McDonald, P.C., Chafe, S.C., Brown, W.S., Saberi, S., Swayampakula, M., Venkateswaran, G., Nemirovsky, O., Gillespie, J.A., Karasinska, J.M., Kalloger, S.E., et al. (2019). Regulation of pH by Carbonic Anhydrase 9 Mediates Survival of Pancreatic Cancer Cells With Activated KRAS in Response to Hypoxia. *Gastroenterology* 157, 823–837.

Moran, D.M., Shen, H., and Maki, C.G. (2009). Puromycin-based vectors promote a ROS-dependent recruitment of PML to nuclear inclusions enriched with HSP70 and proteasomes. *BMC Cell Biol.* 10, 32.

Moreno-Layseca, P., Icha, J., Hamidi, H., and Ivaska, J. (2019). Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat. Cell Biol.* 21, 122–132.

Nakagawa, K., Kohara, T., Uehata, Y., Miyakawa, Y., Sato-Ueshima, M., Okubo, N., Asaka, M., Takeda, H., and Kobayashi, M. (2016). PIAS3 enhances the transcriptional activity of HIF-1 α by increasing its protein stability.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 469, 470–476.

Nakajima, Y., Yamazaki, T., Nishii, S., Noguchi, T., Hoshino, H., Niwa, K., Viviani, V.R., and Ohmiya, Y. (2010). Enhanced Beetle Luciferase for High-Resolution Bioluminescence Imaging. *PLoS One* 5, e10011.

Nakatake, Y., Fujii, S., Masui, S., Sugimoto, T., Torikai-Nishikawa, S., Adachi, K., and Niwa, H. (2013). Kinetics of drug selection systems in mouse embryonic stem cells. *BMC Biotechnol.* 13, 64.

Neri, D., and Supuran, C.T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 767–777.

Onodera, Y., Hashimoto, S., Hashimoto, A., Morishige, M., Mazaki, Y., Yamada, A., Ogawa, E., Adachi, M., Sakurai, T., Manabe, T., et al. (2005). Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *EMBO J.* 24, 963–973.

Onodera, Y., Nam, J.M., Hashimoto, A., Norman, J.C., Shirato, H., Hashimoto, S., and Sabe, H. (2012). Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance β 1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. *J. Cell Biol.* 197, 983–996.

Onodera, Y., Nam, J.M., and Sabe, H. (2013). Intracellular trafficking of integrins in cancer cells. *Pharmacol. Ther.* 140, 1–9.

Onodera, Y., Nam, J.M., and Bissell, M.J. (2014). Increased sugar uptake promotes oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc pathways. *J. Clin. Invest.* 124, 367–384.

Onodera, Y., Nam, J.-M., Horikawa, M., Shirato, H., and Sabe, H. (2018). Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. *Nat. Commun.* 9, 2682.

Palanisamy, N., Degen, A., Morath, A., Ballestin Ballestin, J., Juraske, C.,

Öztürk, M.A., Sprenger, G.A., Youn, J.W., Schamel, W.W., and Di Ventura, B. (2019). Split intein-mediated selection of cells containing two plasmids using a single antibiotic. *Nat. Commun.* 10, 4967.

Parks, S.K., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2013). Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 13, 611–623.

Parks, S.K., Mueller-Klieser, W., and Pouyssegur, J. (2020). Lactate and Acidity in the Cancer Microenvironment. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 4, 141–158.
Pastorek, J., and Pastorekova, S. (2015). Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use. *Semin. Cancer Biol.* 31, 52–64.

Pastorekova, S., and Gillies, R.J. (2019). The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 38, 65–77.

Paul, N.R., Jacquemet, G., and Caswell, P.T. (2015). Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. *Curr. Biol.* 25, R1092–R1105.

Peppicelli, S., Bianchini, F., and Calorini, L. (2014). Extracellular acidity, a “reappreciated” trait of tumor environment driving malignancy: Perspectives in diagnosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 33, 823–832.

Perez-Gonzalez, J.A., Vara, J., and Jimenez, A. (1985). The mechanism of resistance to puromycin and to the puromycin-precursor O-demethyl-puromycin in *Streptomyces alboniger*. *J. Gen. Microbiol.* 131, 2877–2883.

Rodenhizer, D., Gaude, E., Cojocari, D., Mahadevan, R., Frezza, C., Wouters, B.G., and McGuigan, A.P. (2016). A three-dimensional engineered tumour for spatial snapshot analysis of cell metabolism and phenotype in hypoxic gradients. *Nat. Mater.* 15, 227–234.

Schito, L., and Semenza, G.L. (2016). Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends in Cancer* 2, 758–770.

Shin, H.J., Rho, S.B., Jung, D.C., Han, I.O., Oh, E.S., and Kim, J.Y. (2011). Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. *J. Cell Sci.* 124, 1077–1087.

De Simone, G., and Supuran, C.T. (2010). Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 404–409.

Singh, S., Lomelino, C., Mboge, M., Frost, S., and McKenna, R. (2018). Cancer Drug Development of Carbonic Anhydrase Inhibitors beyond the Active Site. *Molecules* 23, 1045.

Smulian, A.G., Gibbons, R.S., Demland, J.A., Spaulding, D.T., and Deepe, G.S. (2007). Expression of hygromycin phosphotransferase alters virulence of *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryot. Cell* 6, 2066–2071.

Stevens, A.J., Sekar, G., Shah, N.H., Mostafavi, A.Z., Cowburn, D., and Muir, T.W. (2017). A promiscuous split intein with expanded protein engineering applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 8538–8543.

Stogios, P.J., Shakya, T., Evdokimova, E., Savchenko, A., and Wright, G.D. (2011). Structure and function of APH(4)-Ia, a hygromycin B resistance enzyme. *J. Biol. Chem.* 286, 1966–1975.

Supuran, C.T., Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Carta, F., Monti, S.M., and De Simone, G. (2018). Inhibition of carbonic anhydrase IX targets primary tumors, metastases, and cancer stem cells: Three for the price of one. *Med. Res. Rev.* 38, 1799–1836.

Svastova, E., Witarski, W., Csaderova, L., Kosik, I., Skvarkova, L., Hulikova, A., Zatovicova, M., Barathova, M., Kopacek, J., Pastorek, J., et al. (2012). Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 287, 3392–3402.

Švastová, E., Žilka, N., Zat'ovičová, M., Gibadulinová, A., Čiampor, F., Pastorek, J., and Pastoreková, S. (2003). Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with β -catenin. *Exp. Cell Res.* 290, 332–345.

Swayampakula, M., McDonald, P.C., Vallejo, M., Coyaud, E., Chafe, S.C., Westerback, A., Venkateswaran, G., Shankar, J., Gao, G., Laurent, E.M.N., et al. (2017). The interactome of metabolic enzyme carbonic anhydrase IX reveals novel roles in tumor cell migration and invadopodia/MMP14-mediated invasion. *Oncogene* 36, 6244–6261.

Swietach, P. (2019). What is pH regulation, and why do cancer cells need it? *Cancer Metastasis Rev.* 38, 5–15.

Tafreshi, N.K., Lloyd, M.C., Bui, M.M., Gillies, R.J., and Morse, D.L. (2014). Carbonic anhydrase IX as an imaging and therapeutic target for tumors and metastases. *Subcell. Biochem.* 75, 221–254.

Takacova, M., Barathova, M., Zatovicova, M., Golias, T., Kajanova, I., Jelenska, L., Sedlakova, O., Svastova, E., Kopacek, J., and Pastorekova, S. (2019). Carbonic Anhydrase IX—Mouse versus Human. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 246.

Trastoy, M.O., Defais, M., and Larminat, F. (2005). Resistance to the antibiotic Zeocin by stable expression of the Sh ble gene does not fully suppress Zeocin-induced DNA cleavage in human cells. *Mutagenesis* 20, 111–114.

Tsukuda, M., and Miyazaki, K. (2013). DNA fragmentation caused by an overdose of Zeocin. *J. Biosci. Bioeng.* 116, 644–646.

Vara, J.A., Portela, A., Ortìn, J., and Jimènez, A. (1986). Expression in mammalian cells of a gene from *Streptomyces alboniger* conferring puromycin resistance. *Nucleic Acids Res.* 14, 4617–4624.

Venkateswaran, G., and Dedhar, S. (2020). Interplay of Carbonic Anhydrase IX With Amino Acid and Acid/Base Transporters in the Hypoxic Tumor

Microenvironment. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 1237.

Walker-Samuel, S., Ramasawmy, R., Torrealdea, F., Rega, M., Rajkumar, V., Johnson, S.P., Richardson, S., Gonçalves, M., Parkes, H.G., Årstad, E., et al. (2013). In vivo imaging of glucose uptake and metabolism in tumors. *Nat. Med.* 19, 1067–1072.

Webb, B.A., Chimenti, M., Jacobson, M.P., and Barber, D.L. (2011). Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 11, 671–677.

Wu, M., Song, D., Li, H., Yang, Y., Ma, X., Deng, S., Ren, C., and Shu, X. (2019). Negative regulators of STAT3 signaling pathway in cancers. *Cancer Manag. Res.* 11, 4957–4969.

Zatovicova, M., Sedlakova, O., Svastova, E., Ohradanova, A., Ciampor, F., Arribas, J., Pastorek, J., and Pastorekova, S. (2005). Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br. J. Cancer* 93, 1267–1276.

Zatovicova, M., Jelenska, L., Hulikova, A., Ditte, P., Ditte, Z., Csaderova, L., Svastova, E., Schmalix, W., Boettger, V., Bevan, P., et al. (2014). Monoclonal antibody G250 targeting CA IX: Binding specificity, internalization and therapeutic effects in a non-renal cancer model. *Int. J. Oncol.* 45, 2455–2467.