

学位論文 博士（理学）

分泌型タンパク質における  
糖鎖修飾の解析とその機能評価

2015 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

丹 羽 祐 貴

## 目次

第1章 序論.....	1
第1節 タンパク質の翻訳後修飾.....	1
第2節 糖鎖修飾.....	1
第3節 Cathepsin V.....	10
第4節 CCN1.....	14
第5節 R-spondin1.....	16
第6節 本研究の目的.....	18
第2章 Cathepsin V の <i>N</i> -glycosylation とその役割の解析.....	19
第1節 Cathepsin V の <i>N</i> -glycosylation の確認.....	19
第2節 Cathepsin V の <i>N</i> -glycosylation が機能に与える影響.....	26
第3節 まとめ.....	38
第2章の実験方法.....	39
第3章 CCN1 の <i>O</i> -fucosylation とその役割の解析.....	43
第1節 CCN1 の <i>O</i> -fucosylation の確認.....	43
第2節 CCN1 の <i>O</i> -fucosylation が機能に与える影響.....	50
第3節 Pofut2 による CCN1 の <i>O</i> -fucosylation が分泌に与える影響.....	56
第4節 まとめ.....	58
第3章の実験方法.....	59
第4章 R-spondin1 の <i>C</i> -mannosylation の役割と責任酵素の解析.....	63
第1節 R-spondin1 の <i>C</i> -mannosylation の確認.....	63
第2節 R-spondin1 の <i>C</i> -mannosylation が機能に与える影響.....	70
第3節 R-spondin1 の <i>C</i> -mannosylation を触媒する酵素の同定.....	81

第4節 DPY19L3の触媒する R-spondin1 の C-mannosylation が 分泌に与える影響.....	89
第5節 DPY19L3の触媒する R-spondin1 の C-mannosylation が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル増強活性に与える影響.....	93
第6節 まとめ.....	97
第4章の実験方法.....	98
第5章 総括.....	105
参考文献.....	111
謝辞	

## 第1章 序論

### 第1節 タンパク質の翻訳後修飾

タンパク質は生命の体などを構成する主成分の1つであり、その全容を理解することは様々な生命現象を考察する上で必須である。タンパク質は、ゲノム上に書かれた遺伝情報である遺伝子が転写、翻訳されて合成されたアミノ酸鎖である。2003年、WatsonとCrick、そしてWilkinsらがNature誌にDNAの二重螺旋構造を発表した1953年から50周年の年に、ヒトゲノムの解読完了が宣言された。ヒトゲノムの解読完了によりほぼ全ての遺伝子が理解され、コードされているタンパク質の一次構造、すなわちアミノ酸配列が理解された。ヒトゲノムの解読は新たな遺伝子やタンパク質の発見をもたらし、分子生物学や細胞生物学といった学問分野の発展に大きく寄与した。しかしタンパク質の全容を理解する上では、ゲノムの解読だけでは不十分であった。生体内に存在するタンパク質は、各タンパク質に適した立体構造をとることで初めて機能を有する。多くのタンパク質は正しい立体構造をとるために、様々な化学的修飾を受ける。この修飾のことを翻訳後修飾と呼ぶ。すなわち、多くのタンパク質は翻訳後修飾を受け正しく折り畳まれることで、初めて機能を有するようになる。つまりタンパク質の全容解明には、翻訳後修飾の理解が必須である。

翻訳後修飾には多数の種類が存在する。例えばリン酸化は、主に細胞内シグナル伝達の際に重要で、あるタンパク質が別のあるタンパク質をリン酸化し、さらにそのリン酸化されたタンパク質が別のタンパク質をリン酸化する、といったように連鎖的に起こる場合が多い[1-4]。また、ユビキチン化も代表的な翻訳後修飾の1つで、K48型ユビキチン化はタンパク質分解に関与し[5-7]、またK63型ユビキチン化はDNA修復に重要である[8]。このように、種々の細胞現象を分子レベルで理解するためには、翻訳後修飾を理解することが必要不可欠であり、翻訳後修飾の研究はより一層その重要性を増してきている。

### 第2節 糖鎖修飾

糖鎖修飾は翻訳後修飾の1種であり、ある特定のアミノ酸に糖鎖が付加する



修飾である。糖鎖は、核酸、タンパク質に続く第 3 の生命鎖と呼ばれ、第 1 の鎖である核酸、第 2 の鎖であるタンパク質を解析するだけでは分からない多くの生命現象が、第 3 の鎖である糖鎖を理解することで初めて理解出来る。このように、糖タンパク質の解析が生命現象を理解する上で非常に重要とされており、注目を集めている。

糖鎖修飾は主に、分泌型・膜貫通型タンパク質で起こる。分泌型・膜貫通型タンパク質の多くは、その N 末端に signal peptide と呼ばれる、長さ数十の疎水性アミノ酸が存在する。Signal peptide を有するタンパク質は、翻訳後速やかに小胞体(ER)膜を貫通し、signal peptide が切断されることで、続くアミノ酸は ER 内へと輸送される。ER に輸送されると同時に、あるいは輸送後、ER 内の酵素の働きにより糖鎖修飾が起こる[9-11]。糖鎖修飾されたタンパク質は、その後ゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体内でさらなる加工が起き[10]、その後細胞外へ分泌されたり細胞膜やリソソームへと輸送される(Fig. 1-1)。糖鎖修飾はタンパク質のフォールディング、安定性、分泌、自然免疫反応を活性化させる際の認識エピトープなどに関与している[12-15]。そのため個々のタンパク質について、糖鎖修飾の状態を解析し、その機能を理解することは、糖タンパク質を理解する上で非常に重要となってくる。

現在知られている糖鎖修飾には、N 型、O 型、C 型、そして GPI アンカー型の 4 種類がある(Fig. 1-2)。この内 GPI アンカー型は、糖鎖と脂質からなる糖脂質修飾である。GPI アンカー型では、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)が特定のタンパク質に結合し、さらに脂質部分を介して細胞膜に結合することで、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜につなぎとめる役割を持つという、他の糖鎖修飾にはない特殊な構造を持つ。本論文では、この特殊構造である GPI アンカー型を除いた、N 型糖鎖修飾(N-glycosylation)、O 型糖鎖修飾(O-glycosylation)、C 型糖修飾(C-mannosylation)について、それぞれ特定のタンパク質に焦点を当て研究を行った。

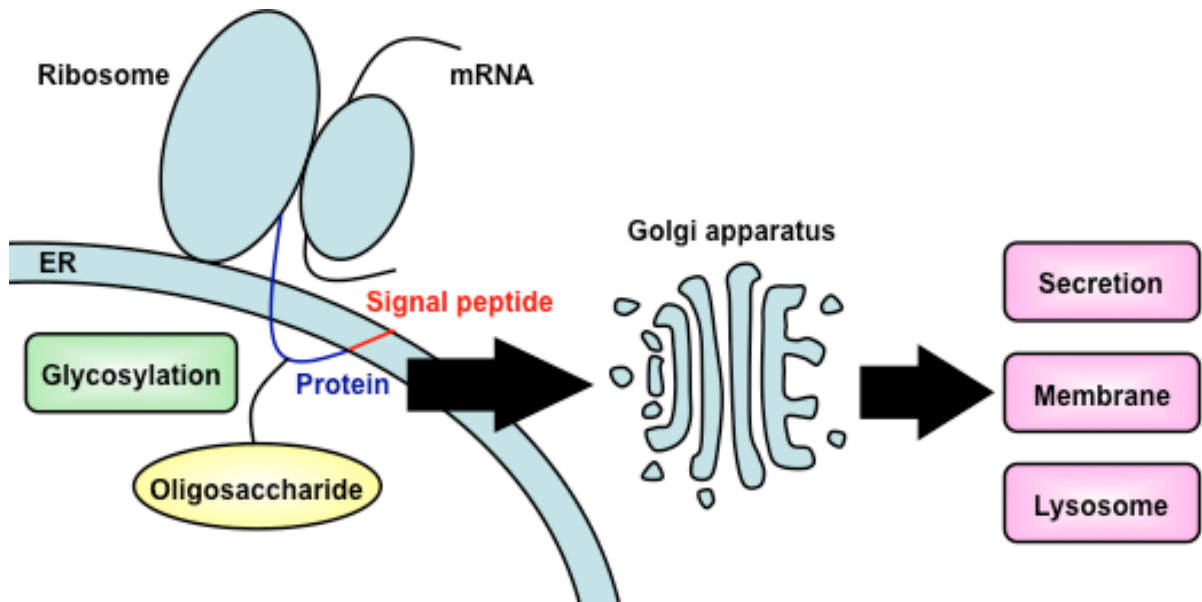


Fig. 1-1. Mechanism of protein glycosylation.

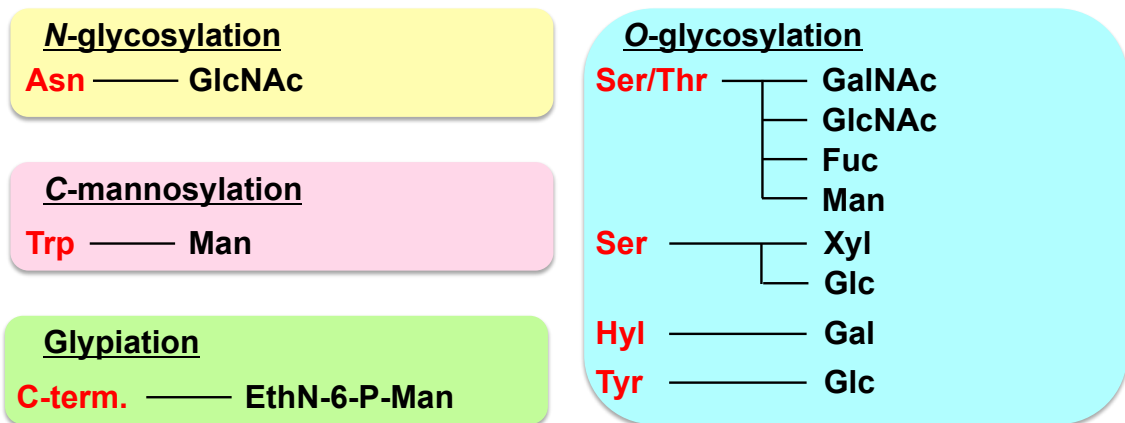


Fig. 1-2. Variation of protein glycosylation in vertebrate.

## 1) *N*-glycosylation

*N*-glycosylation は比較的良く解析された糖鎖修飾で、その修飾メカニズムや触媒する酵素についても解析が進んでいる。*N*-glycosylation では、30 を超える酵素が次々と働く事により、糖の付加、トリミングが行われ、成熟した糖鎖に成長していく (Fig. 1-3)[15-18]。 *N*-glycosylation はまず、細胞質中の UDP-GlcNAc から ER 膜上にあるドリコールリン酸(Dol-P)に GlcNAc-P が付加する事から始まる。その後、ER 膜上の細胞質側で GDP-Man から mannose が 5 糖付加する事で、Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol が作られる。次に、この Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol が ER 膜上を反転して ER 内腔を向き、さらに糖が付加し成熟していく [19-21]。この反転を起こす際に必要な酵素が flippase である RFT1 である [22]。反転し ER 内腔側を向いた Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol には、さらに Dol-P-Man から ALG3, ALG9, ALG12 により mannose が 4 糖付加し、続いて Dol-P-Glc から ALG6, ALG8, ALG10 により glucose が 3 糖付加する [22-28]。こうして Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol となり、この 14 糖の糖鎖前駆体 Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> が oligosaccharyltransferase (OST)によりタンパク質のアスパラギン(Asn)残基に転移する事で *N*-glycosylation が起こる [29,30]。さらにその後の ER またはゴルジ体内での酵素反応により、さらなる糖の付加やトリミングが行われ、より成熟した糖鎖が完成する [10]。

*N*-glycosylation はタンパク質の Asn 残基で起こるが、それはどの Asn 残基でも起こる訳ではない。*N*-glycosylation は、分泌型・膜貫通型タンパク質の内、そのアミノ酸配列中に Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa: Pro を除く任意のアミノ酸)のコンセンサス配列を持つ場合にのみ起こる [10]。しかし、コンセンサス配列を持つ全てのタンパク質が *N*-glycosylation されている訳ではなく、コンセンサス配列は *N*-glycosylation の必要条件であり、十分条件ではない。

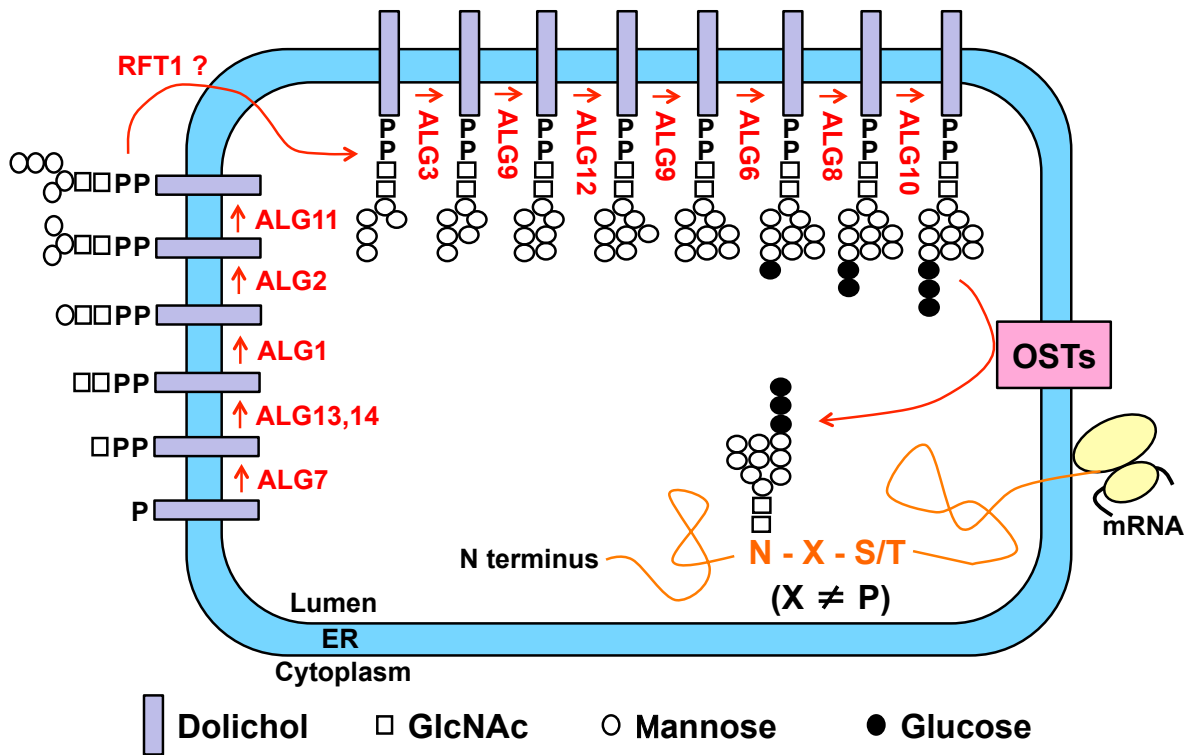


Fig. 1-3. Mechanism of N-glycosylation.

## 2) *O*-glycosylation

*O*-glycosylation も *N*-glycosylation と並び解析が進んでいる糖鎖修飾である。*N*-glycosylation では、Asn 残基に直接結合する糖は GlcNAc であるが、*O*-glycosylation では Ser/Thr 残基に直接結合する糖に様々な種類がある[10]。最も一般的なものは、GalNAc が結合するもの(*O*-GalNAcylation)で、ムチンを始めとした多くのタンパク質上で発見されている。その他にも mannose が結合するもの(*O*-mannosylation)や、glucose が結合するもの(*O*-glucosylation)、GlcNAc が結合するもの(*O*-GlcNAcylation)など、いくつかの種類が報告されているが、本論文では fucose が結合するもの(*O*-fucosylation)に焦点を当て研究を行ったため、以後詳細を述べる。

1975 年、Hallgren らがヒト尿中より Glc-Fuc の 2 糖で修飾されたスレオニンを発見したことで、*O*-fucosylation は発見された[31]。その後、epidermal growth factor (EGF)-like repeat を持つ複数のタンパク質で、*O*-fucosylation が次々と報告された[32-35]が、詳細な糖鎖の解析の結果、EGF-like repeat に結合する糖鎖は NeuAc- $\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6-Gal- $\beta$ 1,4 -GlcNAc- $\beta$ 1,3-Fuc から成る 4 糖であった[35]。最初に発見された Glc-Fuc の 2 糖が結合するタンパク質は長らく不明のままであったが、2001 年、Hofsteenge らが thrombospondin-1 において Glc-Fuc から成る 2 糖による *O*-fucosylation を発見した[36]。この発見により、thrombospondin type-1 repeat (TSR1)を持つタンパク質の Glc-Fuc の 2 糖による *O*-fucosylation が次々と報告された[37-39]。これらの発見から、EGF-like repeat と TSR1 における *O*-fucosylation が異なる糖鎖で修飾されることが示唆され、実際に各ドメインを修飾する酵素がそれぞれ同定されたことで、*O*-fucosylation には 2 つの異なる経路が存在することが示された。すなわち、EGF-like repeat の *O*-fucosylation を触媒する酵素が protein *O*-fucosyltransferase1 (Pofut1)であり、TSR1 の *O*-fucosylation を触媒する酵素が Pofut2 であることが同定された[40-42]。

*N*-glycosylation と同様、*O*-fucosylation にもコンセンサス配列が存在し、Pofut1 では EGF-like repeat 中の Cys-Xaa<sub>4-5</sub>-Ser/Thr-Cys、Pofut2 では TSR1 中の Cys-Xaa<sub>2-3</sub>-Ser/Thr-Cys-Xaa<sub>2</sub>-Gly の Ser/Thr に対し *O*-fucose が結合する[40-42]。そ

それぞれの *O*-fucose は、その後さらに順次酵素が働くことで最終的には、EGF-like repeat に対しては NeuAc- $\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6-Gal- $\beta$ 1,4 -GlcNAc- $\beta$ 1,3-Fuc の 4 糖が、TSR1 に対しては Glc- $\beta$ 1,3-Fuc の 2 糖が結合する(Fig. 1-4)[43]。

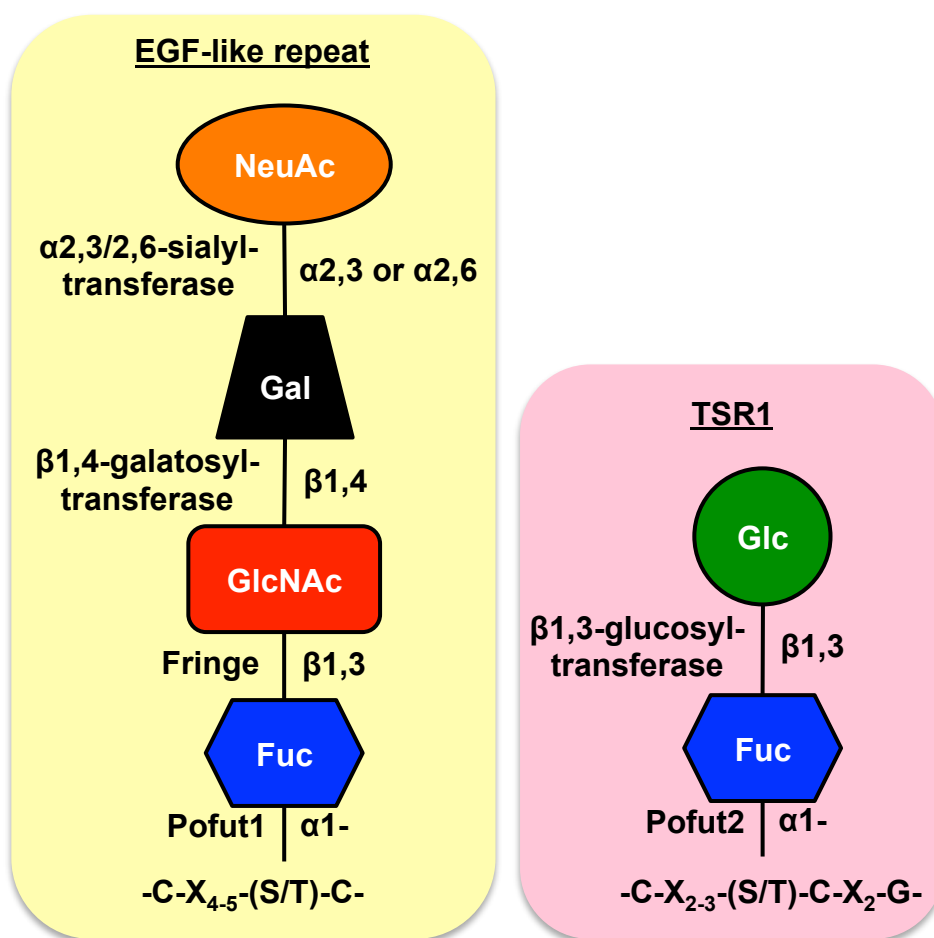


Fig. 1-4. Two independent *O*-fucosylation pathways.

### 3) C-mannosylation

1994年、Hofsteengeらは、ヒトRNase2の7番目のTrp残基のインドール環の2位の炭素を介して、炭素-炭素結合で単糖のhexoseが付く新規糖修飾を発見し[44]、その翌年にはその糖がmannoseであることを報告した(Fig. 1-5)[45]。新規糖修飾であったことから、その後もHofsteengeらによって様々な検討がなされた結果、C-mannosylationがヒト、マウス、ブタ、ハムスター、サルなど哺乳類動物の細胞では起こり、植物、昆虫、大腸菌などでは起こらないこと[46]、C-mannosylationのmannoseドナーがDol-P-Manであり、その反応がERを多く含む画分であるミクロソーム画分に存在する酵素の働きにより起こることが示された[47]。さらには、RNase2の7番目のTrp残基周辺のアミノ酸を変異させてC-mannosylationが起こるか否かを調べた結果から、C-mannosylationはTrp-Xaa-Xaa-Trpの最初のTrp残基で起こることが示され[48]、C-mannosylationのコンセンサス配列が提唱された。これらの結果から、現在C-mannosylationのメカニズムは次のように考えられている(Fig. 1-6)。まず、dolichol kinase (DOLK)によりdolicholがリン酸化され、Dol-Pが合成される。そこに、dolichol-phosphate mannosyltransferase (DPM)複合体により、GDP-ManからDol-Pにmannoseが転移され、Dol-P-Manが合成される。それが、flippaseによりER膜上で反転することで、Dol-P-Manが細胞質側からER内腔側を向く。最後に、Dol-P-ManからC-mannose転移酵素によりコンセンサス配列上のTrp残基にmannoseが転移する事で、C-mannosylationが完了する[49]。近年になり、線虫においてTSR1中のTrp残基に対するC-mannose転移酵素としてDpy19が報告された[50]が、他の生物種においては未だC-mannose転移酵素は同定されていない。

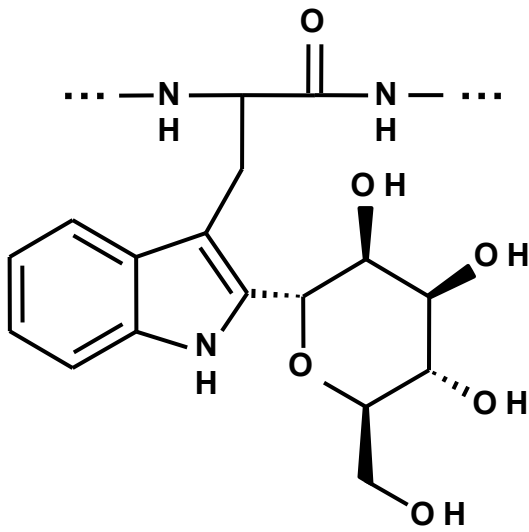


Fig. 1-5. Structure of C-mannosyltryptophan.

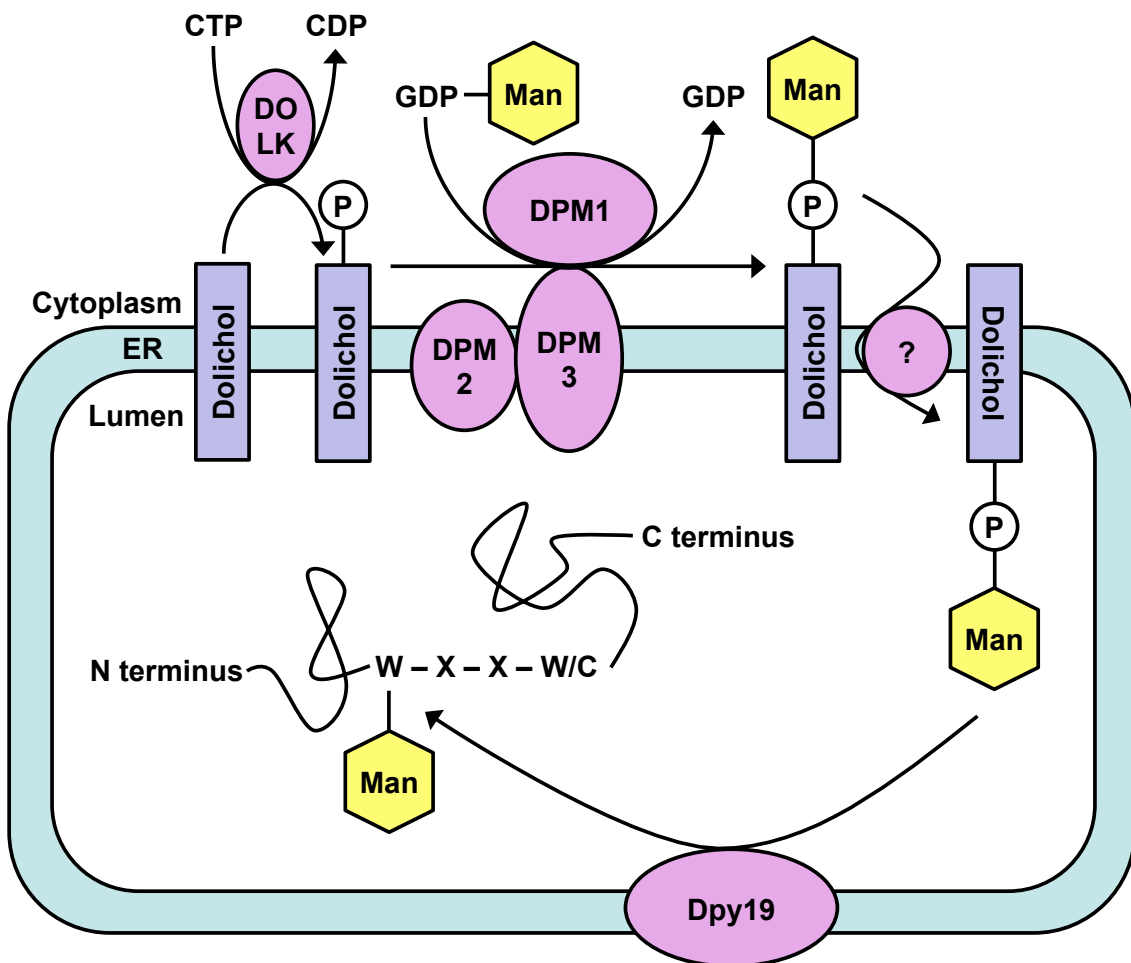


Fig. 1-6. Putative C-mannosylation pathway.



Krieg らは、1998 年に RNase2 の Trp<sup>7</sup> の C-mannosylation の解析から、C-mannosylation のコンセンサス配列として Trp-Xaa-Xaa-Trp を報告した[48]が、補体複合体構成因子である C6 や C7 タンパク質などにおいては、このコンセンサス配列に則らない Trp 残基においても C-mannosylation が報告されている[51]。Julenius は、2007 年までに C-mannosylation が報告されていたタンパク質にある、69 ヶ所の C-mannosylation site の周辺のアミノ酸を統計的に解析した結果、Trp-Xaa-Xaa-Cys 中の最初の Trp 残基でも高頻度に C-mannosylation が起こることを報告した[52]。そこで本論文においては、C-mannosylation の起こる必要条件を分泌型・膜貫通型タンパク質の内、Trp-Xaa-Xaa-Trp/Cys のコンセンサス配列を有することとした。

以上のように、各糖鎖修飾はそれぞれコンセンサス配列が提唱されており、十分に研究が進んでいるかのように思われる。しかし、実際にはこれらのコンセンサス配列を有していても、糖鎖修飾が起こらない場合もある。つまり、各タンパク質がどのような糖鎖修飾を受けているかは、実際に個々のタンパク質について解析する必要がある。また、糖鎖修飾は様々な機能を有していることから、個々のタンパク質について、その糖鎖修飾がどのように影響しているかは、それぞれについて詳細な解析を行う必要がある。そこで本論文では、1) cathepsin V の N-glycosylation とその役割の解析、2) CCN1 の O-fucosylation とその役割の解析、3) R-spondin1 の C-mannosylation の役割と責任酵素の解析、の 3 つのテーマについて研究を行った。次に、各タンパク質の詳細について述べる。

### 第 3 節 Cathepsin V

Cathepsin V (CTSV)は、cathepsin (CTS)ファミリーに属するシステインプロテアーゼの 1 種である[53,54]。CTS ファミリーは B, C, D, E, F, G, H, K, L, O, S, V, W, X の 14 種類が知られているが、その内 CTSD, CTSE, CTSG 以外の 11 種類はシステインプロテアーゼである。また、CTSE がエンドソーム、CTSG が細胞表面に存在する以外は全てリソソームに局在し、主にはリソソームにおけるタンパ

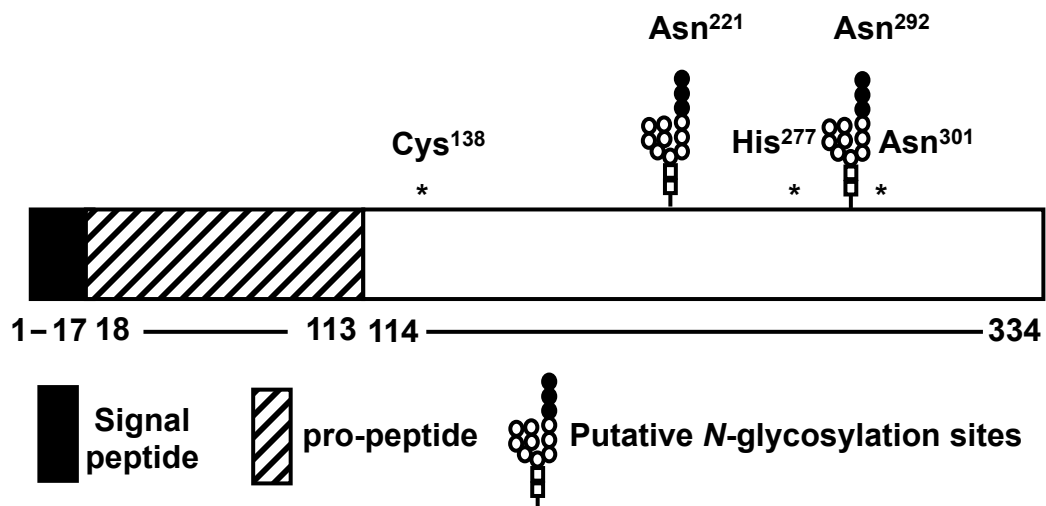
ク質分解に関与している[55-58]。一般に CTS 類は不活性な前駆体として合成され、N 末端側の pro-peptide が切断されることで活性型となる[57,59]。この切断は、リソソームへ輸送された後、酸性条件下にさらされることで自己活性化し、お互いに切断する場合と、別のプロテアーゼにより切断される場合の 2 通りがある。

CTS 類の中でも特に CTSE は、癌の悪性化との関与が 30 年以上も昔から指摘されている[58,60]。さらにその後の研究により、様々な CTS 類が過剰発現していることが、数多くの癌、例えば乳癌、肺癌、大腸癌、メラノーマなどで報告されている[61,62]。多くの臨床データと実験的なマウス癌モデルにより、CTS 類は癌の進行、浸潤のどちらにとっても重要な役割を果たしていることが示されている[61,63]。さらに、CTS 類の発現レベルと癌患者の予後不良には相関があり、CTS 類が癌の予後を予測するマーカーになりうることが示されている[64]。特に CTSE, CTSL は自身の酵素活性、もしくは uPA などの他のプロテアーゼを活性化することにより、細胞外マトリクスを分解し、癌細胞の遊走や浸潤を促進する[65,66]。

CTSV は初め、胸腺及び精巣での発現が確認され[53]、その後重症筋無力症、I 型糖尿病、神経変性疾患との関係が示されている[67,68]。癌では、乳癌や大腸癌において高発現が確認されている[53]。さらにヒト CTSV は、癌の悪性化と関与が知られるヒト CTSL と約 78%の相同性があることから、CTSV も同様に癌の悪性化に関わっていることが考えられる[53,54]。さらに、マウス CTSL とヒト CTSL の相同性と比較した結果、マウス CTSL とヒト CTSV との相同性の方が高く、またマウスには CTSV が存在していないことが分かった[69]。これらの事実から、CTSV は CTSL と同様の機能を持ち、CTSL にはない重要な機能を秘めている可能性が考えられている。

CTS 類において、*N*-glycosylation されていることが証明されているタンパク質はいくつかあるが、その内 *N*-glycosylation の役割が調べられているのはラットの CTSE のみである。ラット CTSE の *N*-glycosylation は、そのプロセッシング、細胞内局在、タンパク質の成熟に重要であることが示されている[70,71]。それ以外

の CTS 類、特にヒト CTS 類において *N*-glycosylation の役割が示されているものは無い。ヒト CTSV は、そのアミノ酸配列中に Asn<sup>221</sup> と Asn<sup>292</sup> の 2 ヶ所の *N*-glycosylation コンセンサス配列を有している(Fig. 1-7)。しかし、この 2 カ所が *N*-glycosylation されているか否かは示されておらず、その役割についても不明である。そこで本論文第 2 章では、CTSV が *N*-glycosylation されているか否かを解析し、さらにはその機能に与える影響を解析することとした。CTSV が癌や糖尿病などと関係があることが示唆されていることから、CTSV の *N*-glycosylation の解析が、新たな疾患治療法の開発につながることを期待される。



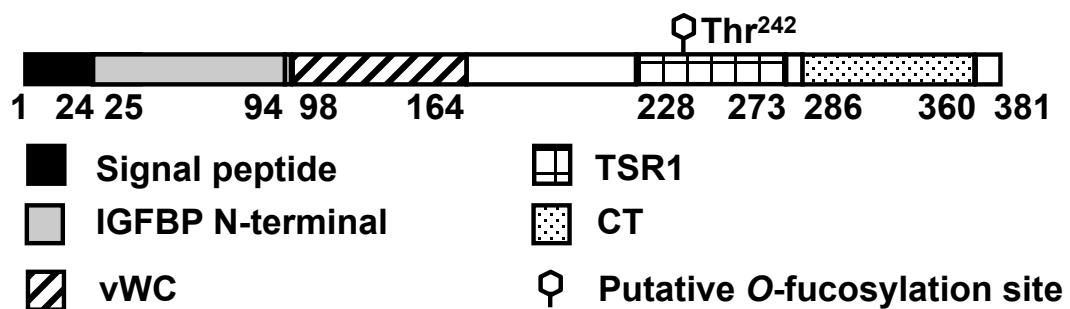
**Fig. 1-7. Schematic of human CTSV.**

A black box, a hatched bar, three asterisks, and two sugar chains denote the signal peptide, the pro-peptide, active sites, and putative *N*-glycosylation sites, respectively.

#### 第4節 CCN1

CCN1 は、別名 Cyr61 としても知られ、細胞外マトリクス(ECM)領域に存在するマトリセルラータンパク質であり、システインが豊富に含まれる分泌型タンパク質群、CCN ファミリーに属する[72]。CCN ファミリーは CCN1~CCN6 の 6 つから成り、N 末端に signal peptide を有し、続いて 4 つの機能ドメインを有している(Fig. 1-8)[72,73]。CCN1 のこれら 4 つの機能ドメインは、それぞれが integrin、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPGs)、TGF- $\beta$  などとの結合や、CCN タンパク質同士の多量体化などに関与している[74,75]。そのため、細胞増殖や細胞接着、遊走、浸潤、血管新生、細胞老化、アポトーシスなど非常に広範に渡る機能を有している[72,73,76]。CCN1 はこのような機能を有していることから、その異常な活性化が腫瘍形成や腫瘍成長といった、癌の悪性化に寄与していることが、乳癌や胃癌、膵臓癌などで報告されている[77-79]。これらの報告から、CCN1 は癌の治療標的や診断マーカーとしての応用が期待されている。

ヒト CCN1 は TSR1 ドメインを有し、またアミノ酸配列中の Thr<sup>242</sup> に Pofut2 による *O*-fucosylation のコンセンサス配列を有している(Fig. 1-8)。しかし、CCN1 の *O*-fucosylation は示されておらず、その役割についても明らかにされていない。そこで本論文第3章では、CCN1 が *O*-fucosylation されているか否かを解析し、その機能に与える影響を評価した。CCN1 が癌の治療標的や診断マーカーへと応用される可能性があることから、CCN1 の *O*-fucosylation の解析は、新たな癌治療法を開発する上で重要な知見を提供することが出来、さらには実際の治療法の開発につながる可能性も秘めている。



**Fig. 1-8. Schematic of human CCN1.**

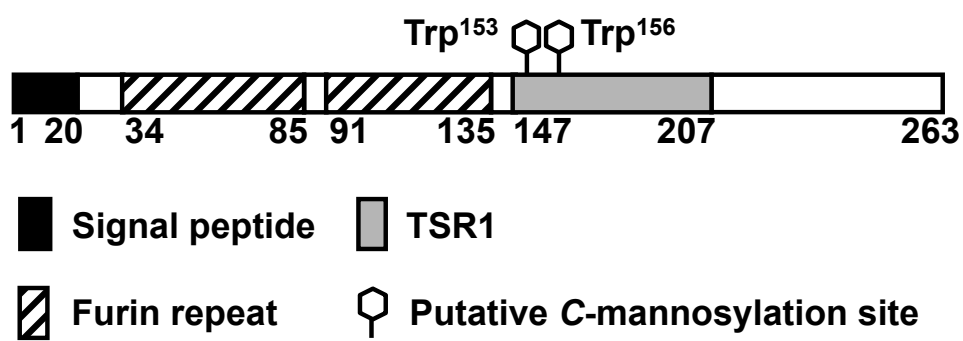
A black box, a gray box, a hatched bar, a checked bar, a dotted bar, and a hexagonal shape denote the signal peptide, the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) N-terminal domain, the von Willebrand factor type C repeat (vWC), the thrombospondin type-1 repeat (TSR1), the cysteine knot motif (CT), and the putative *O*-fucosylation site, respectively.

## 第5節 R-spondin1

R-spondin1 (Rspo1)は2004年、Kamataらによって発見、報告された[80]。ヒトにおいては、RspoはRspo1~Rspo4の4種類が存在し、そのアミノ酸配列は40~60%が保存されている。全てのRspoファミリータンパク質は、そのN末端にsignal peptide、その後2つのfurin repeatドメインと1つのTSR1ドメインを有する(Fig. 1-9)。Rspoは2つのfurin repeatを介し、zinc and ring finger protein 3 (ZNRFP3)とleucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors (LGR) 4~LGR6にそれぞれ結合することが報告されている[81-83]。ZNRFP3は通常、Wntの受容体であるfrizzledをユビキチン化し、プロテアソームによる分解を促すことで、Wntシグナルを減衰させるWntシグナルのアンタゴニストとして機能している。RspoはZNRFP3やLGR4~6と複合体を形成することにより、この複合体の細胞内への取り込み、分解を促進することで、ZNRFP3のユビキチンリガーゼ活性を阻害し、その結果Wntの受容体であるfrizzledの安定化を促進する[82-84]。よって、RspoはWnt協調的に働くことでWntシグナルを増強する、Wntアゴニスト活性が報告されている[85,86]。

一般にWntシグナルは、初期発生や形態形成の種々の段階において重要であり、Wntシグナルにより発現誘導される遺伝子には、mycやcyclin D1などがある。しかし、これらの異常活性化は癌に関与することが報告されており、そのためWntシグナルの異常な活性化は癌の原因となる[87,88]。特にRspoと癌との関連は、近年になり活発に議論されている[89-91]。

Rspo1は、そのアミノ酸配列中のTrp<sup>153</sup>とTrp<sup>156</sup>の2ヶ所にC-mannosylationのコンセンサス配列を有している(Fig. 1-9)。しかし、Rspo1のC-mannosylationは示されておらず、その役割も報告されていない。そこで本論文第4章では、Rspo1がC-mannosylationされているか否かを解析し、その機能に与える影響を評価した。Rspo1がWntシグナルのアゴニストであることから、Rspo1が癌の悪性化に関わっている可能性は高く、実際にRspoと癌の関与も示されつつある。つまりRspo1のC-mannosylationの解析は、将来の癌治療の標的になる可能性がある。



**Fig. 1-9. Schematic of human Rspo1.**

A black box, two hatched bars, a gray box, and two hexagonal shapes denote the signal peptide, furin repeats, the thrombospondin type-1 repeat (TSR1), and two putative C-mannosylation sites, respectively.



## 第 6 節 本研究の目的

核酸、タンパク質に続く第 3 の生命鎖である糖鎖は、タンパク質に様々な機能を付与しており、タンパク質の理解、ひいては生命の理解には糖鎖修飾のさらなる解析が必須である。近年の科学技術の発達により、レクチンや高感度な質量分析計等を用いた糖タンパク質の網羅的理解”グライコプロテオミクス解析”も進みつつある。しかし、微量タンパク質の検出や、小さな糖鎖の付加の検出、特に *O*-fucosylation や *C*-mannosylation の検出は、現在の技術だけでは未だ不十分であり、網羅的解析は困難である。また、タンパク質がどのような糖鎖修飾を受けているかは、コンセンサス配列からだけでは分からず、個々のタンパク質について個別に解析する必要がある。さらには、糖鎖修飾が有する多彩な機能が各タンパク質に与える影響に関しては、それぞれについて詳細な解析を行わなければ分からない。そこで本論文では、1) cathepsin V の *N*-glycosylation とその役割の解析、2) CCN1 の *O*-fucosylation とその役割の解析、3) R-spondin1 の *C*-mannosylation の役割と責任酵素の解析、の 3 つのテーマについて研究を行った。それぞれ *N* 型、*O* 型、*C* 型の 3 つの糖鎖修飾について研究を行うことで、糖鎖修飾全般についての理解を深めるだけでなく、各糖鎖修飾が持つ機能の類似点・相違点について考察を行う。また、今回着目する 3 つのタンパク質はどれも癌などの疾患の治療標的やバイオマーカーとして有望視されているものたちであり、各糖鎖修飾の機能に与える影響を評価することで、本研究成果が将来の治療法の開発につながることを期待出来る。

## 第2章 Cathepsin V の *N*-glycosylation とその役割の解析

糖鎖修飾の中でも最も良く研究がなされている *N*-glycosylation は、様々なタンパク質で起こることが報告され、その機能についても検討なされている。ヒト cathepsin ファミリータンパク質においても、cathepsin B や L などいくつかにおいて *N*-glycosylation の存在は示されているが、その機能を解析した例はない。特にヒト cathepsin V に関しては、*N*-glycosylation の報告もなく、機能解析もなされていない。そこで第2章では cathepsin V に着目し、cathepsin V が *N*-glycosylation されるか否か、*N*-glycosylation されている場合にはその機能に与える影響について評価した。

### 第1節 Cathepsin V の *N*-glycosylation の確認

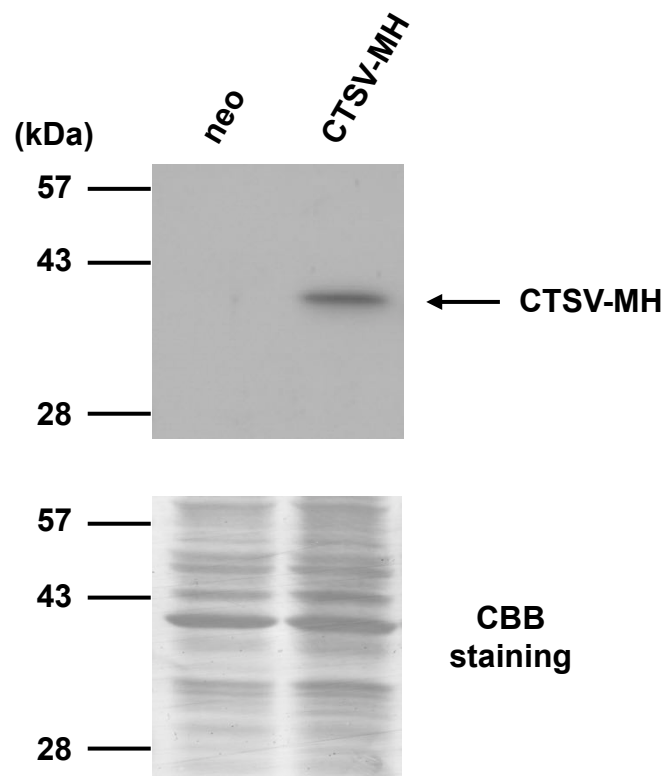
ヒト cathepsin V (CTSV) のアミノ酸配列をデータベースより取得し、その配列を解析したところ、CTSV の 221 番目及び 292 番目のアスパラギン残基が *N*-glycosylation のコンセンサス配列である Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa ≠ Pro) を満たしていた (Fig. 2-1)。*N*型糖鎖は多糖から構成され、1つの *N*型糖鎖でおよそ 2~3 kDa の質量がある。つまり、SDS-PAGE でタンパク質を分離した際、*N*-glycosylation の有無によりアクリルアミドゲル上でのタンパク質の移動度は変化する。一方、*N*-glycosylation の阻害剤として tunicamycin (TM) が知られている [92]。そこで、CTSV が *N*-glycosylation されているか否かを、TM を処理した際のアクリルアミドゲル上での CTSV タンパク質の移動度で評価した。

まず、CTSV の C 末端に myc 及び his<sub>6</sub> のタグを付加した CTSV-MH タンパク質の過剰発現細胞を樹立した (Fig. 2-2)。この過剰発現細胞に *N*-glycosylation 阻害剤である TM を処理したところ、CTSV タンパク質の低分子量方向へのシフトが観察された (Fig. 2-3)。以上のことから、CTSV の *N*-glycosylation が示唆された。

MNLSLVLAAF CLGIASAVPK FDQNLDTKWY QWKATHRRLY GANEEGWRRRA  
 VWEKNMKMIE LHNGEYSQ GK HGFTMAMNAF GDMTNEEFRQ MMGCFRNQKF  
 RKGKVFREPL FLDLPKSVDW RKKGYVTPVK NQKQCGSCWA FSATGALEGQ  
 MFRKTGKLVS LSEQNLVDCS RPQGNQGCNG GFMARAFQYV KENGGLDSEE  
 SYPYVAVDEI CKYRPENVA **NDT**GFTVVAP GKEKALMKAV ATVGPI SVAM  
 DAGHSSFQFY KSGIYFEPDC SSKNLDHGVL VVG YGFEGAN **S**NNSKYWLVK  
 NSWGPEWGSN GYVKIAKDN NHCGIATAAS YPNV

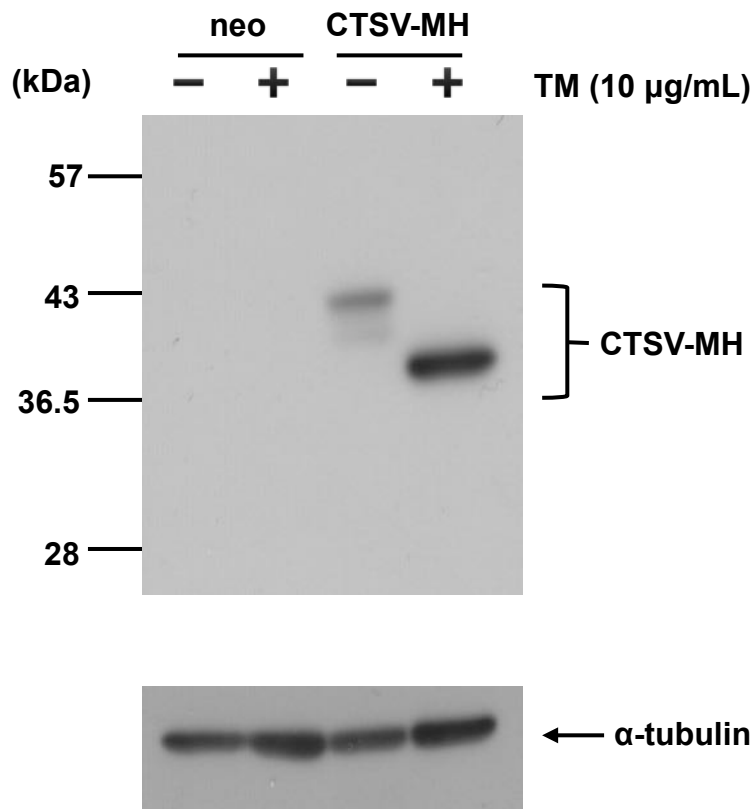
**Fig. 2-1. Amino acid sequence of human CTSV.**

*N*-glycosylation consensus sequences are indicated by underlines. The locations of two putative *N*-glycosylation sites (Asn<sup>221</sup> and Asn<sup>292</sup>) are indicated in red.



**Fig. 2-2. Establishment of a CTSV-overexpressing cell line, HT1080-CTSV-MH.**

Exponentially growing HT1080-neo and HT1080-CTSV-MH cells were lysed and each cell lysate was electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc antibody. The membrane after immunoblotting was visualized with CBB.

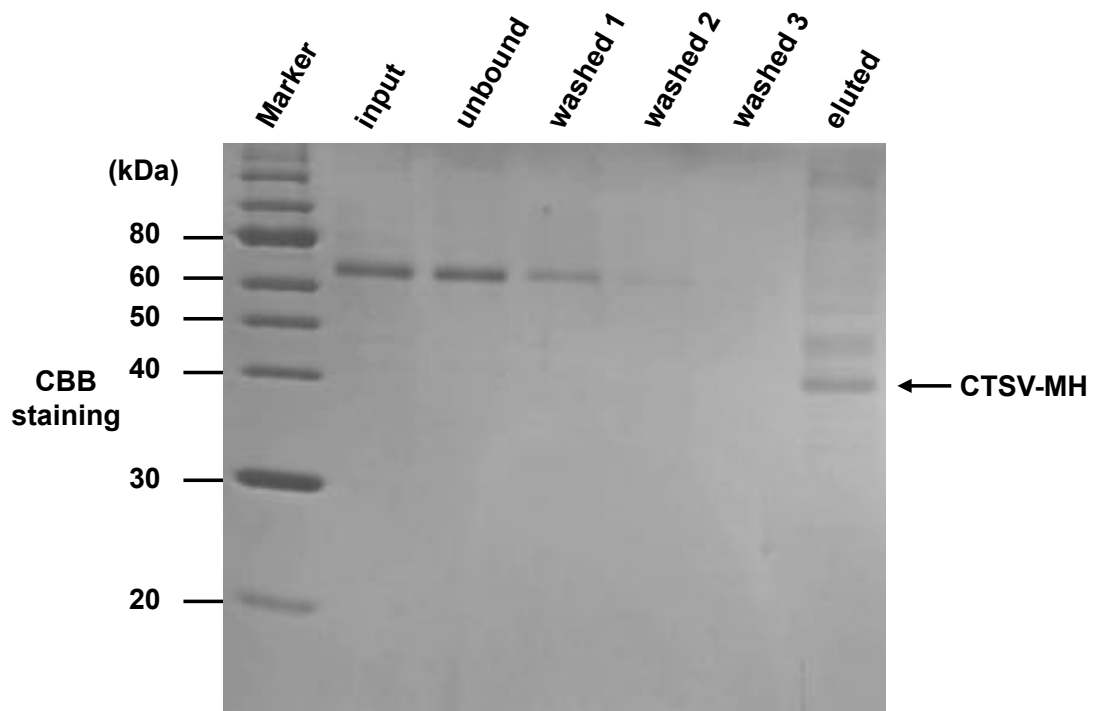


**Fig. 2-3. Human CTSV was *N*-glycosylated.**

HT1080-neo and HT1080-CTSV-MH cells were treated with or without 10  $\mu$ g/mL tunicamycin (TM) for 24 h. Cells were lysed, and each cell lysate was electrophoresed and immunoblotted with the indicated antibodies.

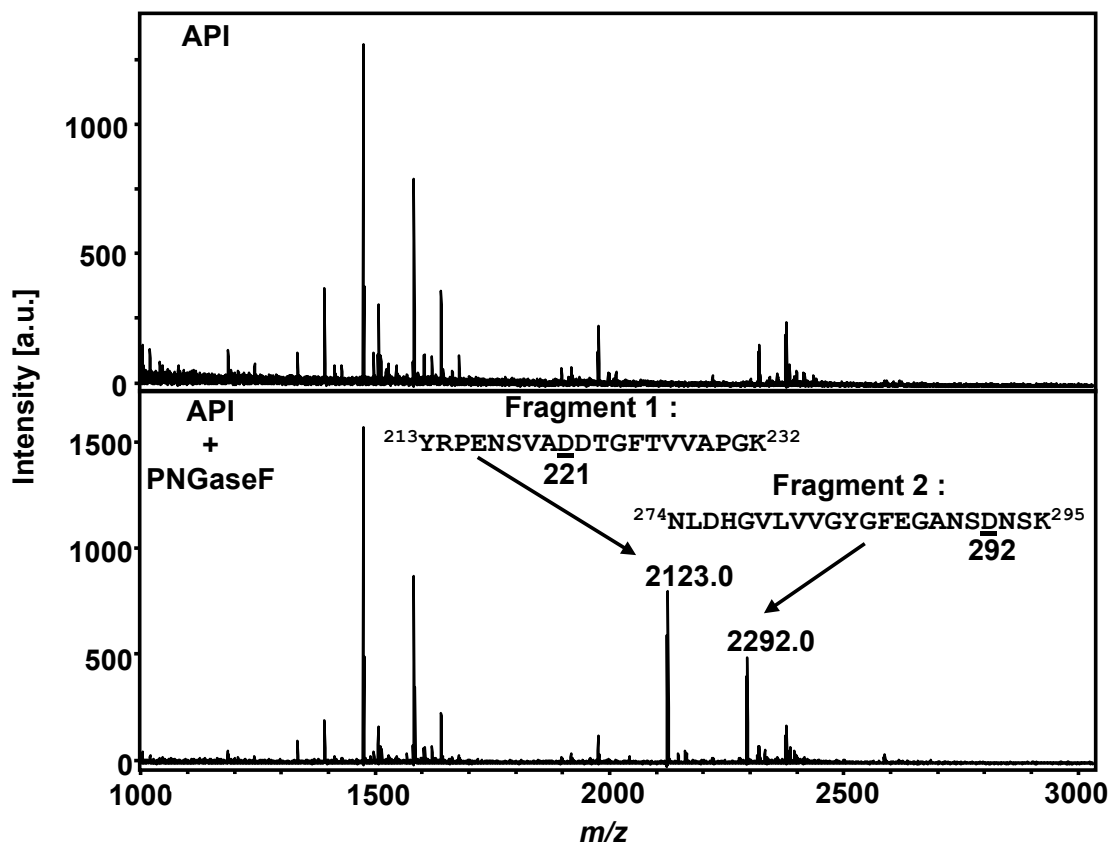
次に、CTSV が実際に *N*-glycosylation されているか否か、及び *N*-glycosylation されるアミノ酸の特定をするため、質量分析により解析した。まず、CTSV 過剰発現細胞を大量培養し、その培養上清より Ni-NTA agarose によるアフィニティー精製を行った。精製したサンプルを SDS-PAGE により分離し、CBB 染色を行った。その結果、約 40 kDa 付近に CTSV と考えられるバンドが確認された(Fig. 2-4)。そこで、精製サンプルに対し、*N*-glycosylation 選択的切断酵素である PNGase F を処理し、さらにプロテアーゼである *Achromobacter* protease I (API) を処理することで、ペプチド断片化を行った。これらペプチド断片に対し、MALDI-TOF MS 及び MS/MS 解析を行った。MALDI-TOF MS の結果より、PNGase F 未処理には確認されず、PNGase F 処理時に新たに現れたピークが 2 つ( $m/z$  2123.0 及び 2292.0) 確認された (Fig. 2-5)。さらにそれぞれのピークの  $m/z$  は、 $^{213}\text{YRPENSVADDTGFTVVAPGK}^{232}$  及び  $^{274}\text{NLDHGVLVVG YGFEGANS DNSK}^{295}$  の理論値(それぞれ  $m/z$  2123.0 及び 2292.0)と完全に一致した(Dは *N*-glycosylation された Asn 残基の *N*型糖鎖が PNGase F により切断され、Asp 残基へ変化したことを表す)。以上より、CTSV が 221 番目及び 292 番目の Asn 残基において *N*-glycosylation されていることが示唆された。

CTSV の Asn<sup>221</sup> 及び Asn<sup>292</sup> での *N*-glycosylation が示唆されたため、それぞれのペプチド断片の配列の確認及び *N*-glycosylation site の同定のため、MS/MS 解析を行った。その結果、Fig. 2-6 に示すそれぞれのペプチド断片由来の b-ions 及び y-ions が確認された。特に、221 番目及び 292 番目の Asn 残基は、PNGase F 処理により D 残基へと質量が変化したペプチド断片として検出された。以上より、CTSV 過剰発現細胞より精製した分泌された CTSV は、Asn<sup>221</sup> 及び Asn<sup>292</sup> の 2 ヶ所において *N*-glycosylation されていることが示された。



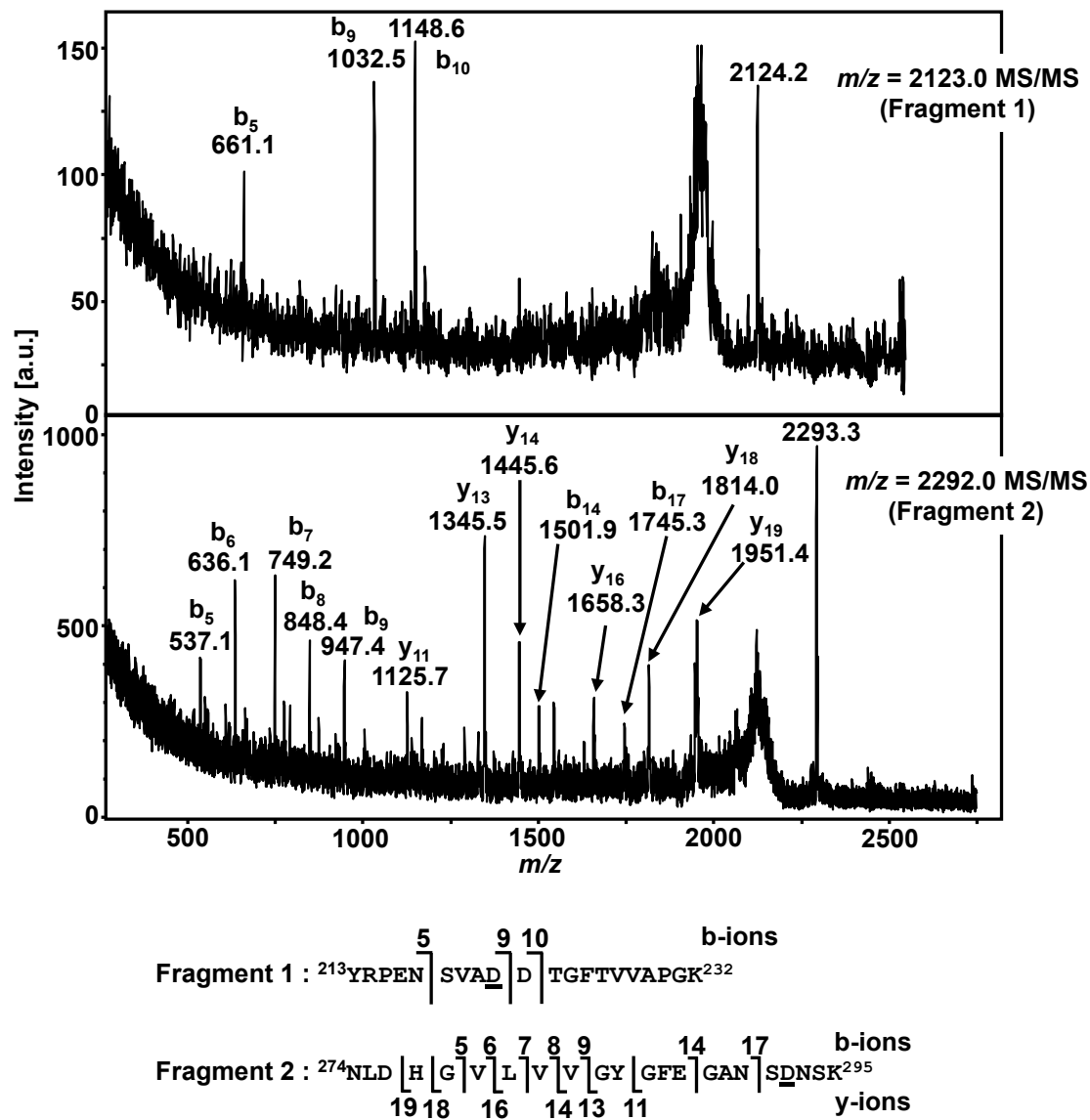
**Fig. 2-4. Purification of recombinant CTSV protein from the conditioned medium of HT1080-CTSV-MH cells.**

HT1080-CTSV-MH cells were cultured in serum-free DMEM for 24 h, before the cultured medium was collected. The obtained cultured medium was incubated with Ni-NTA agarose, and the bound proteins were eluted with 300 mM imidazole. The proteins were electrophoresed on an SDS-polyacrylamide gel, and detected by CBB staining.



**Fig. 2-5. Representative MALDI-TOF MS data for *N*-glycosylation of Asn<sup>221</sup> and Asn<sup>292</sup>.**

Purified cathepsin V was treated with (lower) or without (upper) PNGase F, and subjected to SDS-polyacrylamide gels. Samples were digested with API, and the resulting peptides were analyzed by MALDI-TOF MS. Fragments converting Asn<sup>221</sup> and Asn<sup>292</sup> with Asp by PNGase F had the expected masses of 2123.0 and 2292.0, respectively. Underlined “D”s indicate Asp residues converted from glycosylated Asn residues after treatment with PNGase F.



**Fig. 2-6. Representative MS/MS data for *N*-glycosylation of Asn<sup>221</sup> and Asn<sup>292</sup>.**

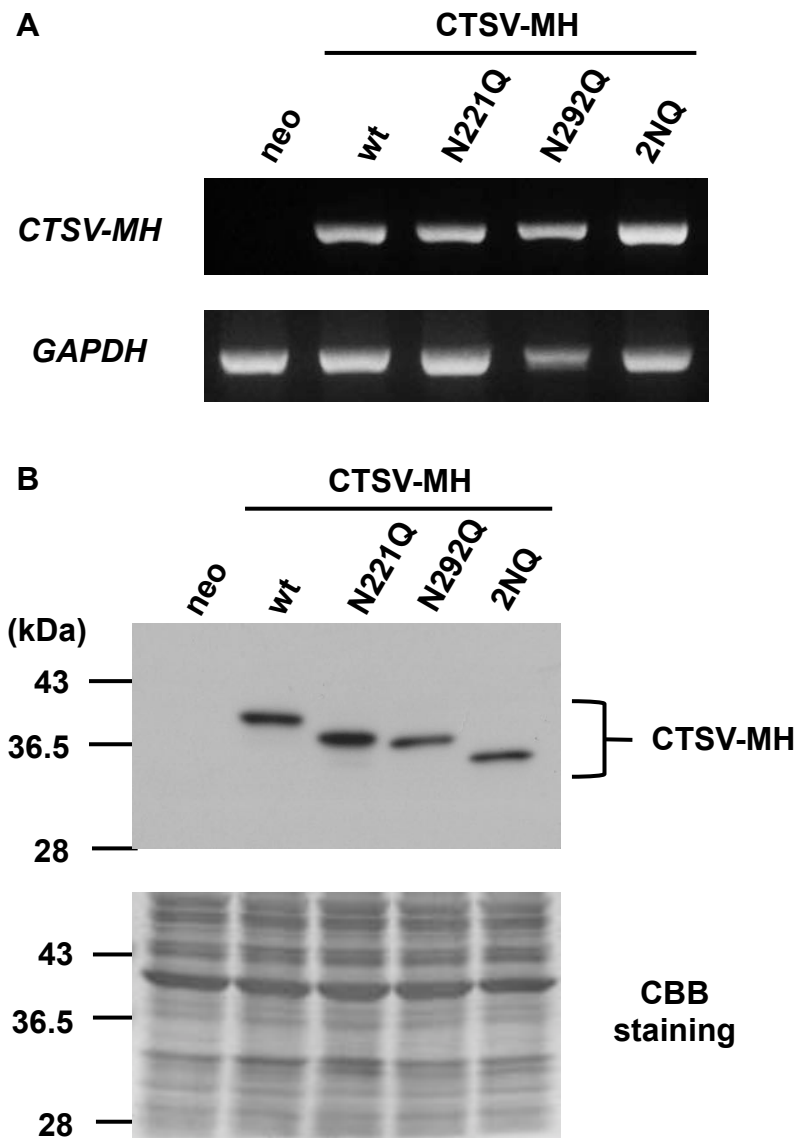
Fragment 1 (upper) and Fragment 2 (lower) (see Fig. 2-5) were analyzed by MS/MS. Observed peaks of these fragments are indicated b-ions and y-ions. Underlined “D”s indicate Asp residues converted from glycosylated Asn residues treated with PNGase F.



## 第2節 Cathepsin V の *N*-glycosylation が機能に与える影響

### 1) Cathepsin V 変異体の過剰発現細胞の樹立

第2章 第1節において、CTSV が Asn<sup>221</sup> と Asn<sup>292</sup> の2ヶ所で *N*-glycosylation されることを示した。そこで、CTSV の Asn<sup>221</sup> 及び Asn<sup>292</sup> をそれぞれグルタミン (Gln) に変異させ *N*-glycosylation が起こらなくした変異体(それぞれ N221Q 及び N292Q)と、2ヶ所共に Gln に変異させた変異体(2NQ)の CTSV 過剰発現細胞を樹立した(Fig. 2-7)。CTSV の発現量が、mRNA レベルで同程度である細胞株を選定し(Fig. 2-7 A)、以後の実験に用いることとした。CTSV のタンパク質レベルでの発現量は、野生型と各変異体では同程度であった(Fig. 2-7 B)。また、SDS-PAGE での CTSV タンパク質のバンドの移動度は、N221Q 及び N292Q では少し増加し、2NQ ではさらに増加した(Fig. 2-7 B)。以上のことから、分泌された CTSV と同様に、CTSV は細胞内においても Asn<sup>221</sup> 及び Asn<sup>292</sup> の2ヶ所で *N*-glycosylation されることが示された。また、N221Q 及び N292Q と 2NQ のタンパク質バンドの移動度の違いから、N221Q 及び N292Q では互いにもう一方の *N*-glycosylation は保持されていることが示唆された。



**Fig. 2-7. Establishment of mutant CTSV-overexpressing cell lines.**

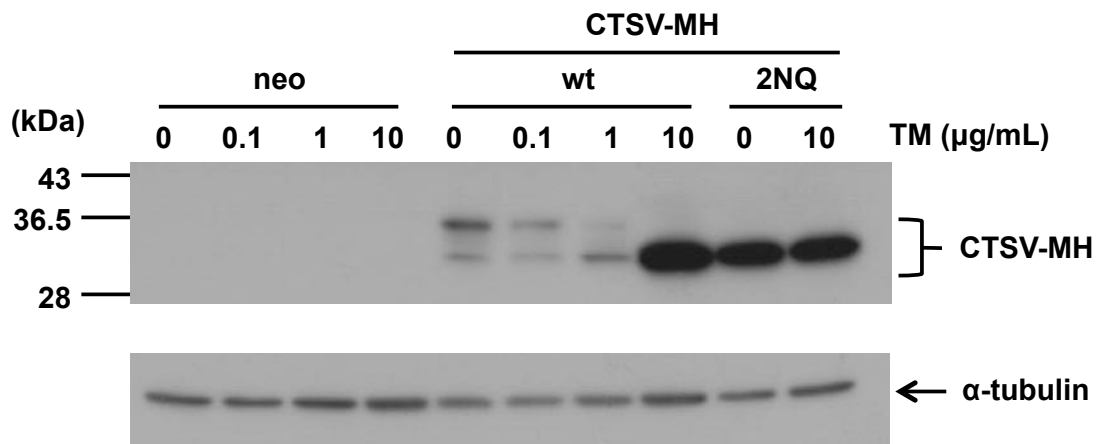
(A) Total RNAs were isolated from each cell line and semi-quantitative RT-PCR was performed.

(B) Each cell was lysed, and aliquots of the cell lysates were electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc antibody. The membrane after immunoblotting was visualized with CBB.

## 2) Cathepsin V の各変異体の *N*-glycosylation の確認

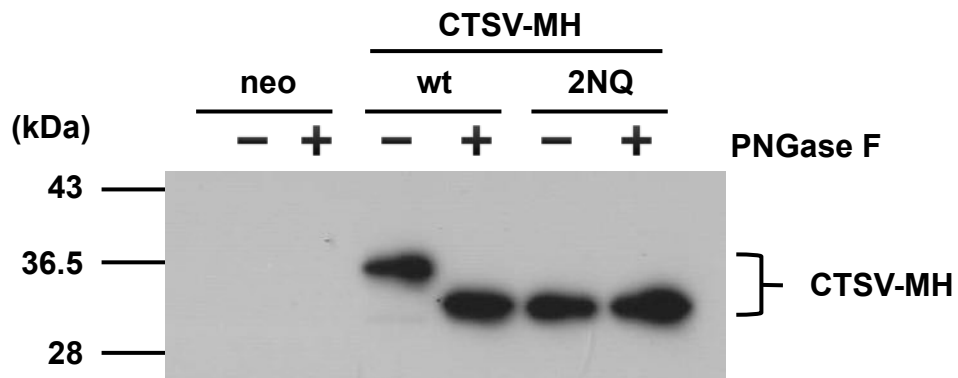
樹立した CTSV の各変異体に関して、それぞれの *N*-glycosylation を確認した。まず、野生型と 2NQ の CTSV 過剰発現細胞に対し、*N*-glycosylation 阻害剤である TM を処理し、western blotting を行った(Fig. 2-8)。その結果、2NQ では TM を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で処理しても CTSV タンパク質の移動度は変化しなかった。さらには、野生型に TM を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で処理した際の CTSV タンパク質の移動度は、2NQ のタンパク質の移動度と一致していた。以上の 2 点から、CTSV は Asn<sup>221</sup> 及び Asn<sup>292</sup> の 2 ヶ所以外には *N*-glycosylation されていないことが示された。これは、*N*-glycosylation 選択的切断酵素である PNGase F を処理した場合でも同様の結果が得られたことから支持された(Fig. 2-9)。

次に、N221Q 及び N292Q の各変異体が、互いにもう一方の *N*-glycosylation を保持しているか否かを確認した。野生型、N221Q 及び N292Q 変異体のそれぞれに対し、*N*-glycosylation 阻害剤の TM を処理したところ、野生型に TM を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で処理した際の CTSV タンパク質の移動度と N221Q 及び N292Q の各変異体に TM を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で処理した際の CTSV タンパク質の移動度は一致することが確認された(Fig. 2-10)。以上のことから、CTSV の N221Q 及び N292Q の各変異体は、互いにもう一方の *N*-glycosylation を保持していることが示された。これらの結果をまとめ、CTSV の野生型及び各変異体の *N*-glycosylation site をまとめた表を Table 2-1 として示した。



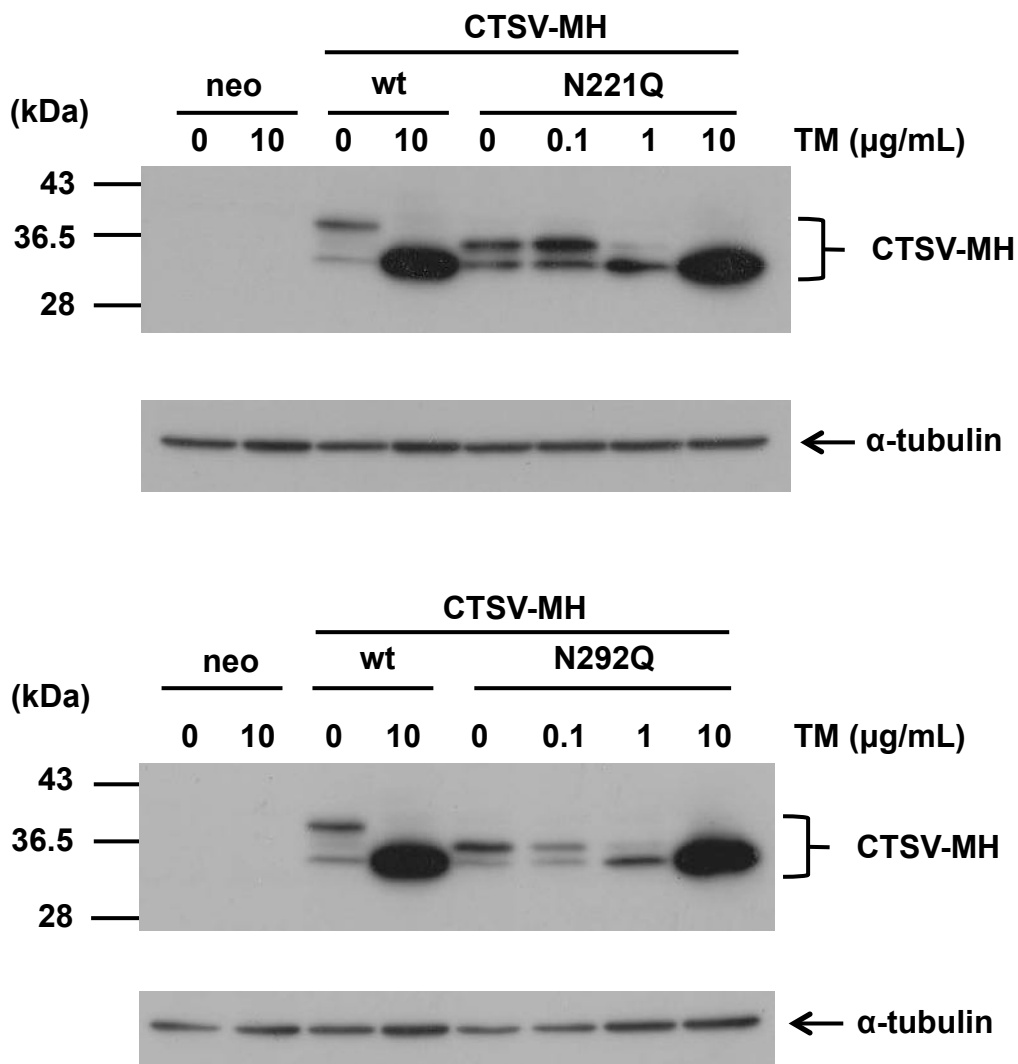
**Fig. 2-8. Inhibition of CTSV N-glycosylation by the treatment with TM.**

HT1080-neo, HT1080-CTSVMH, and HT1080-CTSVMH/2NQ-MH cells were treated with the indicated concentrations of TM for 24 h. Cells were lysed, and aliquots of the cell lysates were electrophoresed and immunoblotted with the indicated antibodies.



**Fig. 2-9. Deglycosylation of CTSV by PNGase F *in vitro*.**

HT1080-neo, HT1080-CTSVMH, and HT1080-CTSVMH/2NQ-MH cells were lysed, and aliquots of the cell lysates were treated with or without PNGase F for 3 h. Samples were electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc antibody.



**Fig. 2-10. CTSV was *N*-glycosylated at both Asn<sup>221</sup> and Asn<sup>292</sup>.**

HT1080-neo, HT1080-CTSV-MH, HT1080-CTSV/N221Q-MH (upper), and HT1080-CTSV/N292Q-MH (lower) cells were treated with the indicated concentrations of TM for 24 h. Cells were lysed, and aliquots of the cell lysates were electrophoresed and immunoblotted with the indicated antibodies.

**Table 2-1. *N*-glycosylation status of wild-type and each mutant CTSV.**

	Wild-type	N221Q	N292Q	2NQ
Asn <sup>221</sup>	○	×	○	×
Asn <sup>292</sup>	○	○	×	×

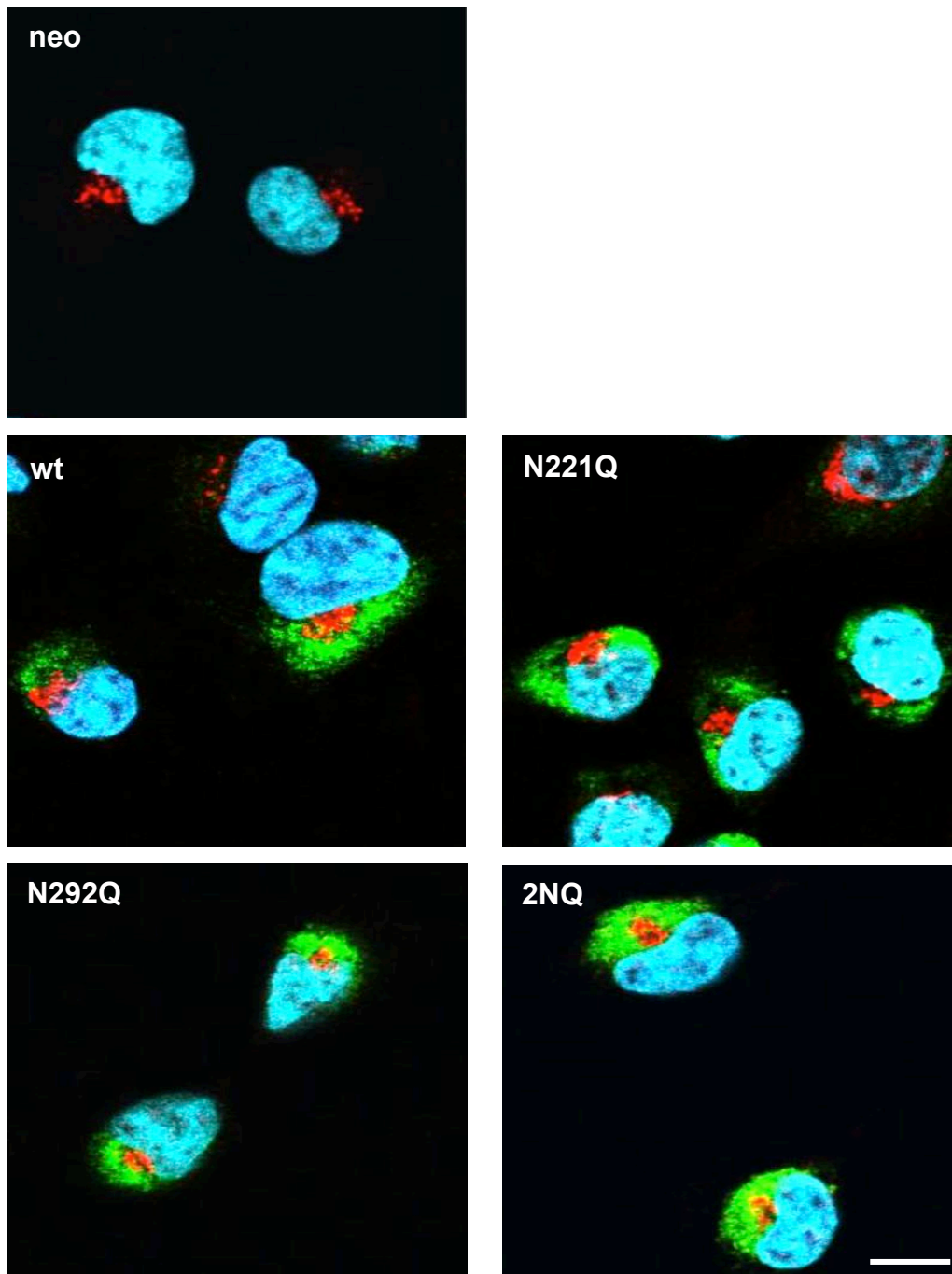
○ and × mean glycosylated and non-glycosylated site, respectively.

### 3) Cathepsin V の *N*-glycosylation が細胞内局在に与える影響

CTSV は、他の cathepsin ファミリーと同様に主にリソソームに局在し、タンパク質の分解に関与していることが示唆されている[57,58]。そこで、CTSV の細胞内局在に *N*-glycosylation が影響しているか否かを評価するため、免疫蛍光染色法を用いて CTSV の細胞内局在を確かめた。局在を確かめたオルガネラは、CTSV が局在すると考えられるリソソームと、リソソームに輸送される前のオルガネラであるゴルジ体について確かめた。

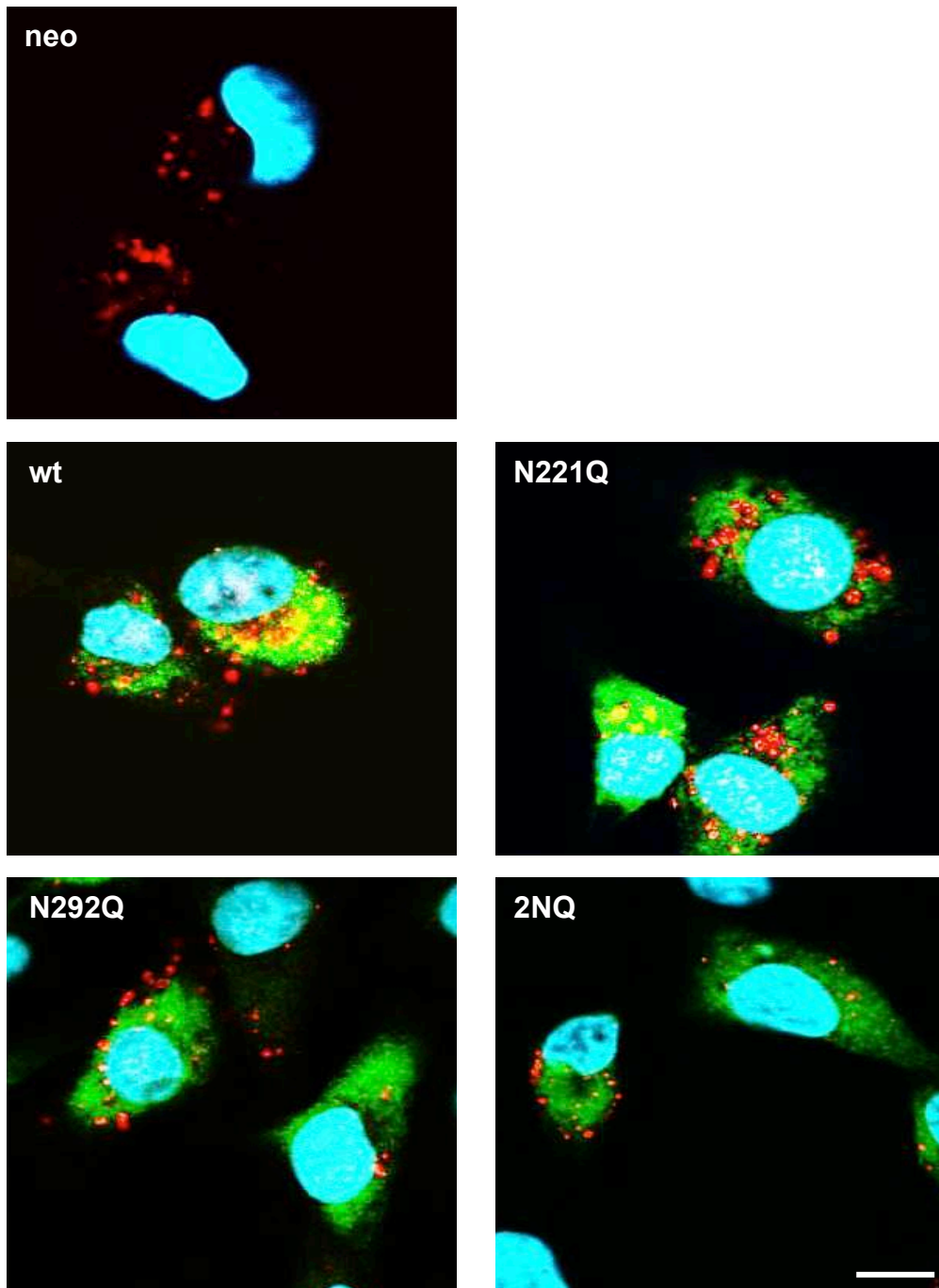
まず、抗 GRASP65 抗体(ゴルジ体マーカー)を用いてゴルジ体を赤に染色し、抗 myc 抗体を用いて CTSV を緑に染色した結果、野生型及び各変異体の全てにおいて両者は共染色されなかった(Fig. 2-11)。以上のことから、CTSV はゴルジ体には局在しないことが示された。

次に、リソソームの局在に与える影響を評価した。LysoTracker(リソソーム特異的染色試薬)を用いてリソソームを赤に染色し、抗 myc 抗体を用いて CTSV を緑に染色した結果、野生型 CTSV では両者が共染色され黄に染色されたドットが多数検出された(Fig. 2-12)。また N221Q 変異体 CTSV では、共染色された黄のドットは検出されたが、野生型と比較しその量は減少した(Fig. 2-12)。それに対し、N292Q 及び 2NQ 変異体 CTSV では、共染色された黄のドットはほとんど検出されなかった(Fig. 2-12)。以上のことから、CTSV の *N*-glycosylation、特に Asn<sup>292</sup> の *N*-glycosylation は CTSV のリソソームへの輸送に重要であることが示された。



**Fig. 2-11. Effect of *N*-glycosylation on Golgi apparatus localization of CTSV.**

Each cell was fixed and stained with Hoechst33258 (blue; nucleus), anti-c-myc antibody (green; CTSV-MH), and anti-GRASP65 antibody (red; Golgi apparatus). The samples were observed by fluorescence microscopy. Bar, 10  $\mu$ m.



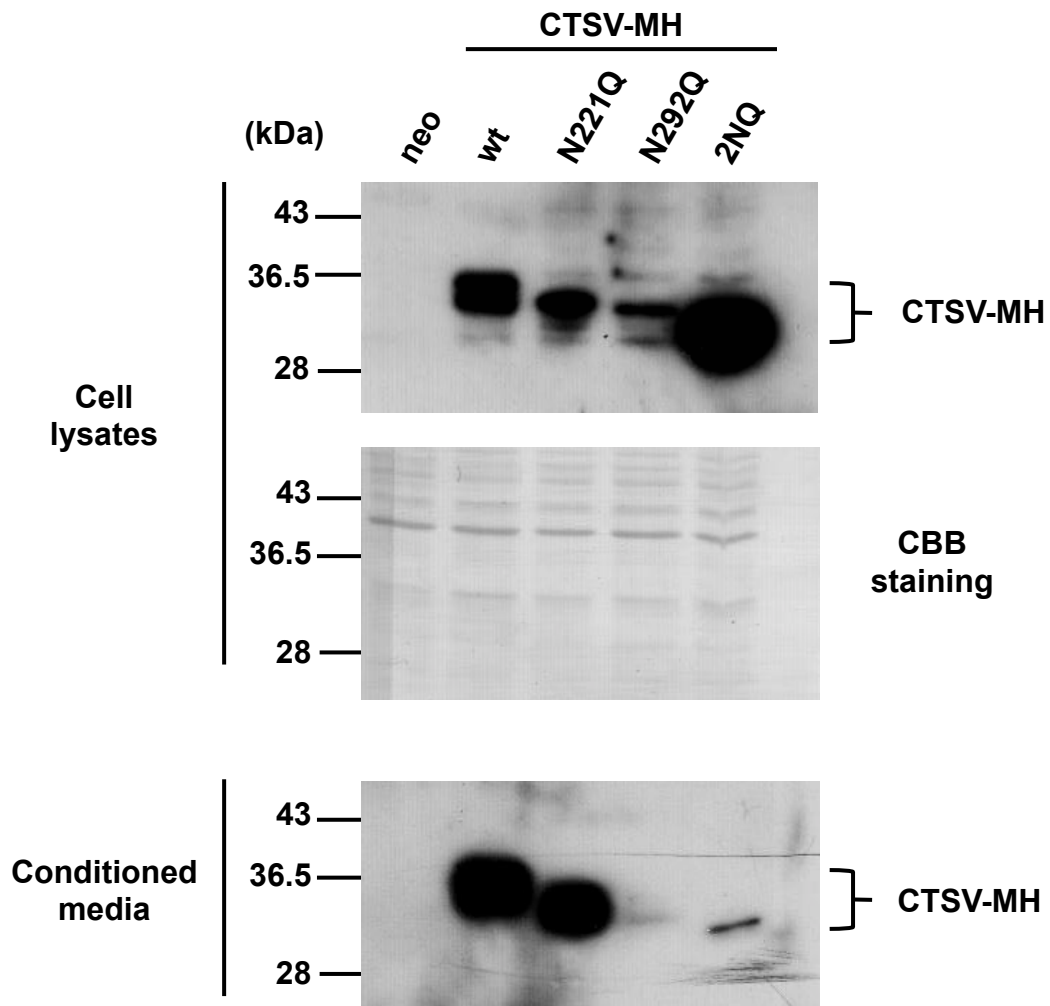
**Fig. 2-12. Effect of *N*-glycosylation on lysosome localization of CTSV.**

Each cell was cultured with LysoTracker (red; lysosome) and fixed. The samples were further stained with Hoechst33258 (blue; nucleus), and anti-c-myc antibody (green; CTSV-MH). The samples were observed by fluorescence microscopy. Bar, 10  $\mu$ m.



#### 4) Cathepsin V の *N*-glycosylation が分泌に与える影響

CTSV は分泌型タンパク質であり、細胞外へと分泌されることも知られている。そこで、CTSV の細胞外分泌に *N*-glycosylation が影響するか否かを評価するため、western blotting 法を用いて CTSV の細胞外分泌量を評価した。CTSV の野生型及び各変異体の過剰発現細胞を無血清培地で 24 時間培養し、24 時間での分泌量を比較したところ、野生型と比較し N221Q では同程度の分泌量であった(Fig. 2-13)。一方、N292Q 及び 2NQ では野生型と比較し、分泌量が顕著に抑制された(Fig. 2-13)。以上のことから、CTSV の *N*-glycosylation、特に Asn<sup>292</sup> の *N*-glycosylation は CTSV の分泌に重要であることが示された。

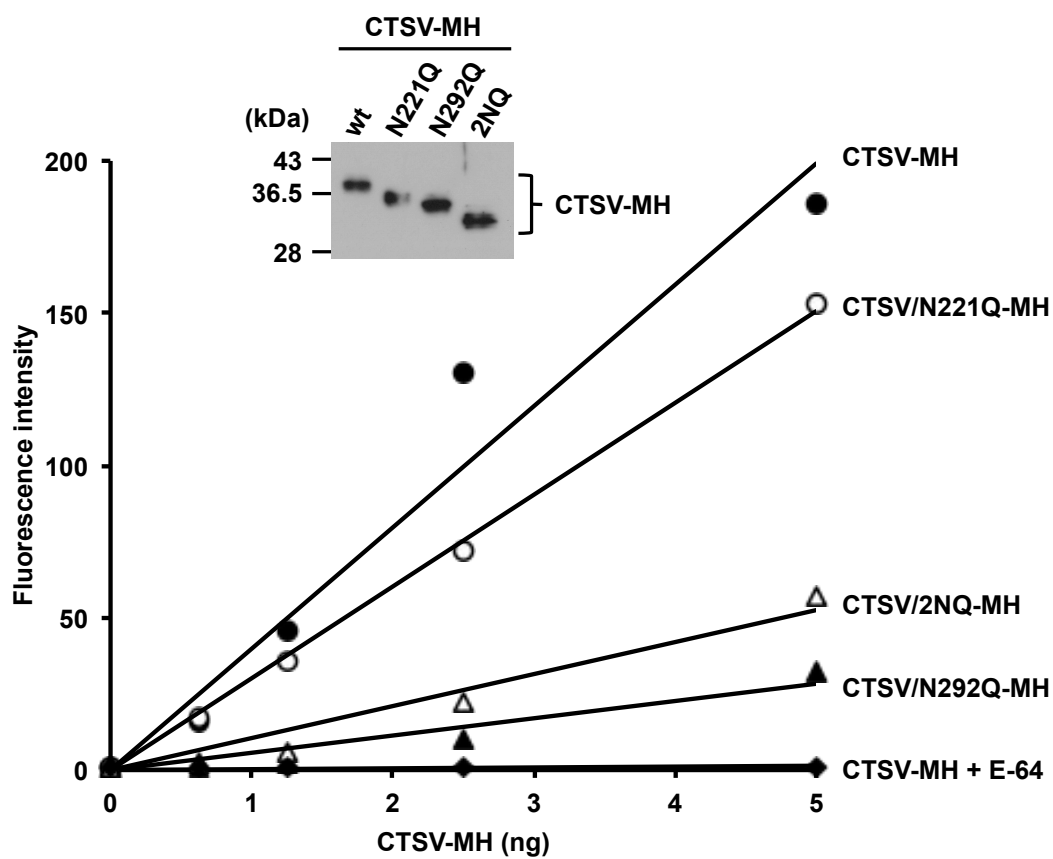


**Fig. 2-13. Effect of *N*-glycosylation on the secretion of CTSV.**

Each cell was cultured in serum-free DMEM for 24 h, before the cultured media and cell lysates were collected. Samples from the conditioned media and aliquots of the cell lysates were electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc antibody. The membrane after immunoblotting was visualized with CBB.

## 5) Cathepsin V の *N*-glycosylation が酵素活性に与える影響

CTSV はシステインプロテアーゼとしての酵素活性を有する[53,54]。そこで、CTSV の *N*-glycosylation が、酵素活性に与える影響を評価した。Brömme らの報告した CTSV の活性測定法を参考に、7-[(Cbz-L-Phe-L-Arg-)アミノ]-4-メチルクマリン (Z-FR-MCA)を基質として測定した[69]。野生型と各変異体の酵素活性の比較には、それぞれのリコンビナントタンパク質を各過剰発現細胞より精製し、タンパク質量を揃える必要がる。しかし、Fig. 2-13 に示したように、CTSV の N292Q や 2NQ は、野生型や N221Q と比較し分泌量が顕著に減少していた。そこで、N292Q や 2NQ 変異体の精製には、野生型や N221Q 変異体よりおよそ 5~10 倍程度多くの細胞培養上清を用いて精製を行った。Fig. 2-14 に示すように、野生型及び各変異体を同程度の濃度に精製した。そこで、このリコンビナントタンパク質を用いて、CTSV の酵素活性評価を行った。まず、酵素活性測定系の検証のため、システインプロテアーゼ阻害剤である E-64 を処理したサンプルをコントロールとして使用した[93]。その結果、野生型 CTSV を作用させた際に検出されていた蛍光は、E-64 を共処理することで検出されなくなったことから、確かに本系において CTSV の酵素活性が測定できていることが確認できた(Fig. 2-14)。次に、野生型と各変異体の酵素活性評価を行った。その結果、N221Q 変異体は野生型と比較し、およそ 7 割程度に活性が減少した(Fig. 2-14)。一方、N292Q 及び 2NQ 変異体は野生型と比較し、1 割~2 割程度にまで顕著に活性が減少した(Fig. 2-14)。以上のことから、CTSV の *N*-glycosylation、特に Asn<sup>292</sup> の *N*-glycosylation は CTSV の酵素活性に重要であることが示された。



**Fig. 2-14.** *N*-glycosylation at Asn<sup>292</sup> is required for the enzymatic activity of CTSV. Each cell was cultured in serum-free DMEM for 24 h, before the culture media were collected. The obtained cultured media were incubated with Ni-NTA agarose, and the bound proteins were eluted with 300 mM imidazole. Samples were dialyzed to assay buffer for 3 h. The amount of each protein was evaluated by western blotting using anti-c-myc antibody (inset). Recombinant proteins were incubated with 20  $\mu$ M substrate (Z-FR-MCA) for 1 h at 37°C, and methylcoumarylamide hydrolysis was monitored at excitation and emission wavelengths of 380 nm and 460 nm, respectively. Closed circles, opened circles, closed triangles, opened triangles, and closed diamonds indicate CTSV-MH, CTSV/N221Q-M, CTSV/N292Q-MH, CTSV/2NQ-MH, and CTSV-MH in the presence of 10  $\mu$ M E-64, respectively.

### 第3節 まとめ

第2章では、ヒト CTSV を過剰発現した細胞を用いて、CTSV の *N*-glycosylation について解析を行った。*N*-glycosylation 阻害剤である TM を用いた実験や、MALDI-TOF MS による解析の結果から、CTSV が Asn<sup>221</sup> と Asn<sup>292</sup> の 2 ヶ所で *N*-glycosylation されていることを初めて明らかにした。さらに、*N*-glycosylation が CTSV の機能に与える影響を評価した。*N*-glycosylation の起こる Asn 残基を Gln に変異させた NQ 変異体を用いた実験から、CTSV の *N*-glycosylation が CTSV の細胞内輸送、細胞外への分泌、酵素活性に重要であることを明らかにした。特に、細胞内輸送、分泌、酵素活性のいずれにおいても、N221Q は野生型とほぼ同等であったのに対し、N292Q では顕著に影響を受けた。つまり、CTSV の特に Asn<sup>292</sup> の *N*-glycosylation が CTSV の様々な機能を制御していると考えられる。

## 第2章の実験方法

### 1) 細胞培養

ヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞は、DMEM に 10% (v/v) FBS、100 units/mL penicillin G、100 mg/L kanamycin、600 mg/L L-glutamine、2.25 g/L NaHCO<sub>3</sub> を添加した培地を使用し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 2) Cathepsin V 過剰発現プラスミドの構築

CTSV 遺伝子は、HT1080 の cDNA ライブラリより増幅した。myc タグ及び his<sub>6</sub> タグの C 末端への導入は、適したプライマーを使用し PCR 法により行った。myc タグ及び his<sub>6</sub> タグの配列は、以下に示す通りである。

myc: GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

his<sub>6</sub>: CATCATCACCATCACCAT

CTSV-myc-his<sub>6</sub> (CTSV-MH) 遺伝子は、pCI-neo ベクター(Promega)にサブクローニングを行った。また、CTSV-MH の各変異体(N221Q, N292Q, N221Q/N292Q (2NQ)) の作製は、以下に示すプライマーを用いて PCR 法により行った。

N221Q: 5'-GAGAATTCTGTTGCTCAAGACACTGGC-3' (forward)

5'-GCCAGTGTCTTGAGCAACAGAATTCTC-3' (reverse)

N292Q: 5'-GGAGCAAATTCGCAAACAGCAAG-3' (forward)

5'-CTTGCTGTTTTGCGAATTTGCTCC-3' (reverse)

### 3) 過剰発現細胞の樹立

HT1080 細胞に各プラスミドを Lipofectamine LTX (LifeTechnologies)を用いて遺伝子導入し、400 µg/mL の G418(Roche Applied Sciences)で選択培養を行った。およそ 2 週間の選択培養後、限界希釈法を用いて各クローン細胞 (HT1080-CTSV-MH, HT1080-CTSV/N221Q-MH, HT1080-CTSV/N292Q-MH, HT1080-CTSV/2NQ-MH)を樹立した。

#### 4) Western blot

細胞に lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)を加え超音波処理を行うことで細胞を溶解した。細胞溶解液は Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 (Bio-Rad Laboratories)を用いてタンパク質濃度を定量し、各サンプル濃度を揃えた。各サンプルに5分の1量の loading buffer (350 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% glycerol, 0.012% bromophenol blue, 6% SDS, and 30% 2-mercaptoethanol)を加え、98°C、3分の熱処理後、SDS-PAGEによりタンパク質を分離した。タンパク質を PVDF 膜に転写後、5%スキムミルクでブロッキングを行った。1次抗体には、抗 c-myc 抗体(#sc-40; Santa Cruz Biotechnology)、あるいは抗  $\alpha$ -tubulin 抗体(#T5168; Sigma)を用いた。また、2次抗体には HRP 標識抗 mouse IgG 抗体 (Amersham Biosciences)を用い、発色には Immobilon Western (Millipore Corporation)を用いた。発光検出には、LAS4000 mini (GE healthcare)を使用した。

#### 5) Cathepsin V の細胞外からの精製

HT1080-CTSV-MH 細胞を大量培養し、無血清培地で 24 時間培養した。24 時間後、回収した培養上清に Ni-NTA agarose (Qiagen)を加え、CTSV-MH を Ni-NTA agarose に結合させた。Ni-NTA agarose に結合させた CTSV-MH は、PBS でビーズをよく洗浄後、300 mM の imidazole を添加した PBS で溶出を行った。精製の確認は、サンプルを SDS-PAGE で分離後、CBB R-250 で染色することで行った。

#### 6) MALDI TOF-MS 解析

精製したサンプルに対し 1% SDS を添加し、95°C で 5 分間熱処理を行うことで熱変性した。1% Triton X-100 溶液を用いて 10 倍に希釈後、PNGase F (Roche Diagnostics GmbH)を処理することで、*N* 糖鎖の切断を行った。*N* 糖鎖切断サンプル及び未切断サンプルの両方を SDS-PAGE により分離し、CBB 染色を行った。CBB 染色により、バンドの移動が確認されたタンパク質をゲルから切り出し、0.1 M Tris-HCl, pH 9.0 中、37°C で 12 時間、0.2  $\mu$ g の API を処理することで

ペプチド断片化を行った[94]。その後、Zip TipC18 $\mu$  (Millipore Corporation)を用いて脱塩化し、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid をマトリックスとして使用し、Ultraflex TOF/TOF MS (Bruker Daltonics)を用いて質量分析を行った。

## 7) RT-PCR

RNA は Trizol (LifeTechnologies)を用いて細胞より抽出した。1  $\mu$ g の RNA を使用し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いて逆転写を行った。PCR 増幅には rTaq DNA ポリメラーゼ(Takara Bio Inc.)を使用した。RT-PCR に用いたプライマー、サイクル数、アニーリング温度は Table 2-2 に示す。

**Table 2-2. The sequences of the primers, annealing temperature, and the number of cycles for RT-PCR**

Target gene	Primer sequence	Annealing temperature	Number of cycles
CTSV	5'-TATGTCAAGGAGAACGGAGG-3' (forward)	56°C	23
	5'-GTGATGGTGATGATGCAGATCCTCTTCTGAGATGAG-3' (reverse)		
GAPDH	5'-TGAAGGTCCGAGTCAACGGATTTGGT-3' (forward)	56°C	25
	5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (reverse)		

## 8) PNGase F 処理

細胞を 4)の手順に従い lysis buffer に溶解後、Ni-NTA agarose を用いて粗精製を行った。300 mM の imidazole を添加した PBS で溶出後、0.1% SDS、50 mM 2-mercaptoethanol を含む 50 mM phosphate buffer (pH 7.5)に透析した。透析したサンプルを 5 分間熱処理し、0.75% Triton X-100 を加え、さらに 2.5 units の PNGase F (Sigma)を加えて 37°C で 3 時間、N 型糖鎖の切断を行った。その後 4)の手順に従い western blot により検出した。

## 9) 免疫蛍光染色

各細胞はカバーガラス上で培養した。リソソーム局在の確認は、細胞を固定化前に、無血清培地中に 100 nM LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes)を加



えて2時間培養することで行った。細胞を固定化後、0.1% Triton X-100 を用いて膜透過処理を行い、2% BSA でブロッキングを行った。CTSV-MH の染色には1次抗体として抗 c-myc 抗体を使用し、2次抗体として Alexa Fluor488-conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes) を使用した。また、ゴルジ体局在の確認には、1次抗体として抗 GRASP65 抗体(#sc-30093; Santa Cruz Biotechnology)を用い、2次抗体として Alexa Fluor568-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes) を使用した。核染色には 2  $\mu$ g/mL Hoechst 33258 (Polysciences, Inc.) を用いた。

#### 10) Cathepsin V の酵素活性の測定

各 CTSV タンパク質を Ni-NTA agarose を用いて精製し、assay buffer (50 mM potassium phosphate, pH 6.5, 2.5 mM EDTA, and 2.5 mM dithiothreitol) に透析した。基質には 20  $\mu$ M の Z-FR-MCA (AnaSpec) を使用し、37°C、1時間での CTSV の加水分解活性を測定した。E-64 を加える場合は終濃度 10  $\mu$ M となるように加えた [93]。1時間後、380 nm で励起させた際の 460 nm の蛍光強度を測定した。

### 第3章 CCN1 の *O*-fucosylation とその役割の解析

*O*-glycosylation は、*N*-glycosylation と並び代表的な糖鎖修飾の 1 つである。一般的な *O*-glycosylation は、Ser もしくは Thr 残基に対し、GalNAc が結合しさらなる糖鎖の伸長が行われる。しかし、*O*-fucosylation は糖の起始部が GalNAc ではなく fucose であり、また明確なコンセンサス配列にのみ修飾が行われる、*O*-glycosylation の中でも特殊な修飾である。CCN1 タンパク質は *O*-fucosylation のコンセンサス配列を有していたが、未だその有無について解析はなされていなかった。第 3 章ではヒト CCN1 の *O*-fucosylation に着目し、CCN1 が *O*-fucosylation されているか否か、及びその機能に与える影響について評価した。

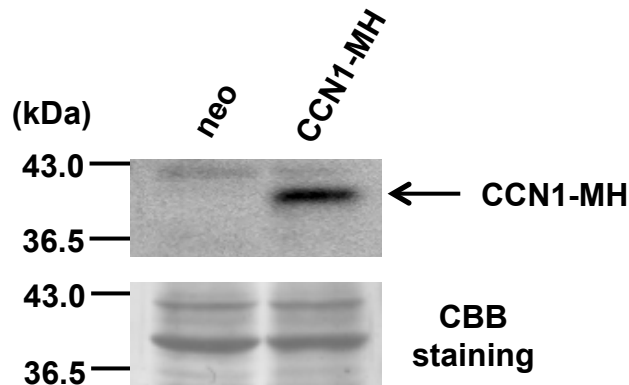
#### 第 1 節 CCN1 の *O*-fucosylation の確認

CCN1 は N 末端にシグナルペプチドを有する分泌型タンパク質で、シグナルペプチド以後に 4 つの機能ドメインを有するタンパク質である(Fig. 1-8)。この 4 つのドメインの内の 1 つである thrombospondin type-1 repeat (TSR1)では、Cys-Xaa<sub>2-3</sub>-(Ser/Thr)-Cys-Xaa<sub>2</sub>-Gly のコンセンサス配列を有する場合、Ser/Thr 残基において *O*-fucosylation が起こることが報告されている[42]。ヒト CCN1 のアミノ酸配列をデータベースより取得し、その配列を解析したところ、CCN1 の TSR1 中の 242 番目のスレオニン残基が上記の *O*-fucosylation のコンセンサス配列を満たしていた(Fig. 3-1)。そこで、ヒト CCN1 が *O*-fucosylation されているか否かを、質量分析により解析した。まず、CCN1 の C 末端に myc 及び his<sub>6</sub> のタグを付加した CCN1-MH タンパク質の過剰発現細胞を樹立した(Fig. 3-2)。ここで、CCN1 は、細胞膜表面にあるヘパラン硫酸との結合が報告されている[75]。今回樹立した CCN1 過剰発現細胞も、通常培養条件下では CCN1 を培養上清中に確認することは出来なかったが、ヘパリンを細胞に処理することで、細胞膜表面にヘパラン硫酸を介して結合していた CCN1 を競争的に遊離させることが出来た(Fig. 3-3)。

MSSRIARALA LVVTLHLHLTR LALSTCPAAC HCPLEAPKCA PGVGLVRDGC  
 GCKVCAKQL NEDCSKTQPC DHTKGLECNF GASSTALKGI CRAQSEGRPC  
 EYNSRIYQNG ESFQPNCKHQ CTCIDGAVGC IPLCPQELSL PNLGCPNPRL  
 VKVTGQCCEE WVCDEDSIKD PMEDQDGLLG KELGFDASEV ELTRNNELIA  
 VGKGSSLKRL PVFGMEPRIL YNPLQGQKCI VQTTSWSQCS **KTCGTGISTR**  
 VTNDNPECRL VKETRICEVR PCGQPVYSSL KKGKKCSKTK KSPEPVRFTY  
 AGCLSVKKYR PKYCGSCVDG RCCTPQLTRT VKMRFCEDG ETFSKNVMMI  
 QSCKCNYNCP HANEAAPPFY RLFNDIHKFR D

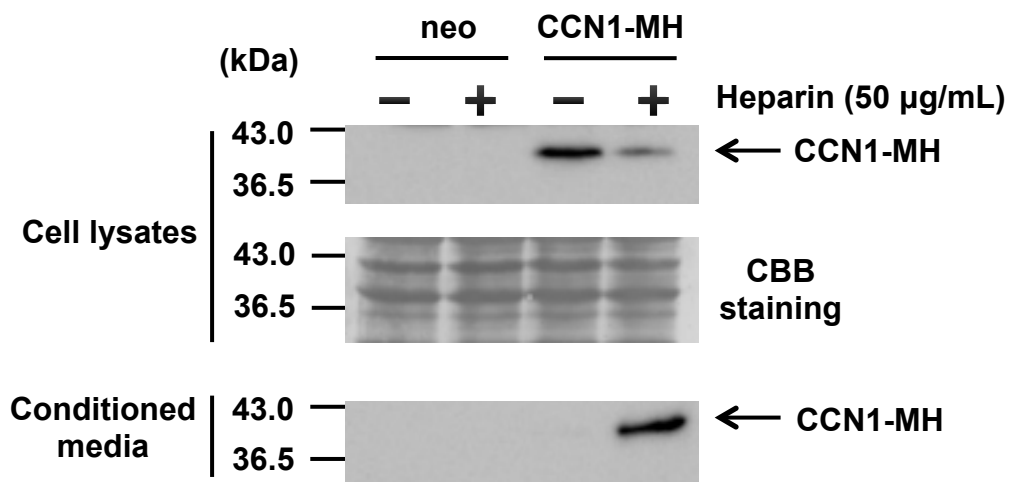
**Fig. 3-1. Amino acid sequence of human CCN1.**

*O*-fucosylation consensus sequence is indicated by underline. The location of putative *O*-fucosylation site (Thr<sup>242</sup>) are indicated in red.



**Fig. 3-2. Establishment of a CCN1-overexpressing cell line, HT1080-CCN1-MH.**

HT1080-neo and HT1080-CCN1-MH cells were lysed, and each cell lysate was electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc antibody. The membrane after immunoblotting was visualized with CBB.

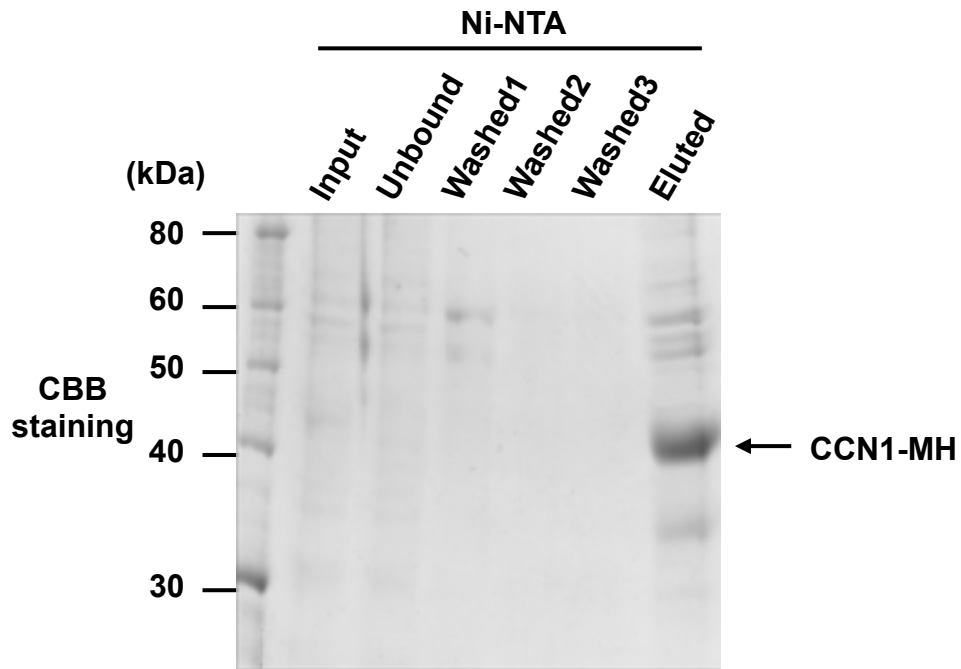


**Fig. 3-3. CCN1 bound to cell surface HSPGs.**

Each cell was cultured with or without 50 µg/mL heparin, and each cell lysate and conditioned media were electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc antibody. The membrane after immunoblotting was visualized with CBB.

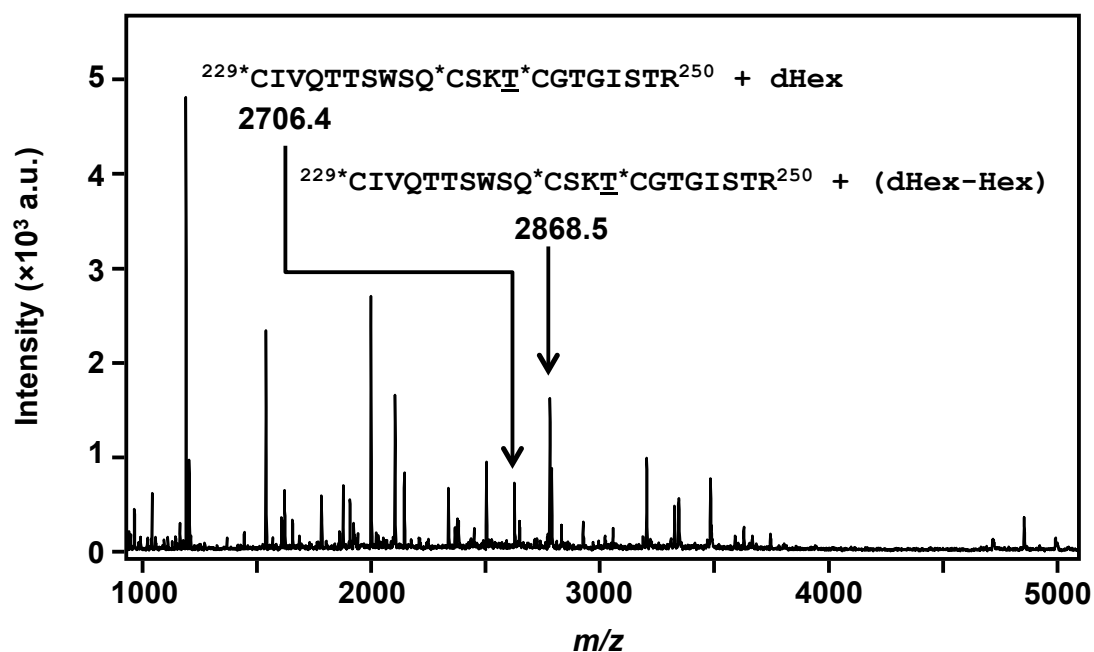
CCN1 が細胞膜表面のヘパラン硫酸に結合していたことから、CCN1 の精製にはヘパリンセファロースビーズを用いることとした。CCN1 過剰発現細胞を大量培養し、無血清培地下、ヘパリンセファロースビーズと 24 時間共培養することで、分泌された CCN1 をヘパリンセファロースビーズへと結合させた。24 時間後ビーズを回収し、ビーズの洗浄、溶出後、続いて Ni-NTA agarose によるアフィニティー精製を行った。精製したサンプルを SDS-PAGE により分離し、CBB 染色を行った。その結果、約 40 kDa 付近に CCN1 と考えられるバンドが確認された(Fig. 3-4)。そこで、精製サンプルに対しトリプシンを処理することで、ペプチド断片化を行った。これらペプチド断片に対し、MALDI-TOF MS 及び MS/MS 解析を行った。MALDI-TOF MS の結果から、 $m/z$  2706.4 及び 2868.5 に観測されたピークは、Thr<sup>242</sup> 残基を含むペプチド断片である <sup>229</sup>\*CIVQTTSWSQ\*CSKT\*CGTGISTR<sup>250</sup> に対し、fucose (dHex)及び fucose-glucose (dHex-Hex)が修飾されたペプチドの  $m/z$  の理論値と高度に一致した(Tは *O*-fucosylation が予想される Thr<sup>242</sup> を表し、\*Cはプロピオンアミド化されたシステインを表す。)(Fig. 3-5)。また、糖鎖修飾を受けていないペプチド断片( $m/z$  2560.4)は観測されなかった。以上のことより、分泌された全ての CCN1 は 242 番目の Thr 残基で *O*-fucosylation されていることが示唆された。また、dHex: dHex-Hex の比率は、MS スペクトルよりおよそ 1:2 であることが示された。

CCN1 の Thr<sup>242</sup> での *O*-fucosylation が示唆されたため、ペプチド断片の配列の確認及び *O*-fucosylation site の同定のため、MS/MS 解析を行った。その結果、Fig. 3-6 に示す y-ions が確認された。特に、y8 イオンまでは質量の増加は確認されず、y9 イオン以降で 146 Da (dHex)及び 308 Da (dHex-Hex)の質量増加が確認された。以上より、CCN1 過剰発現細胞より精製した分泌された CCN1 は、Thr<sup>242</sup> において *O*-fucosylation されていることが示された。



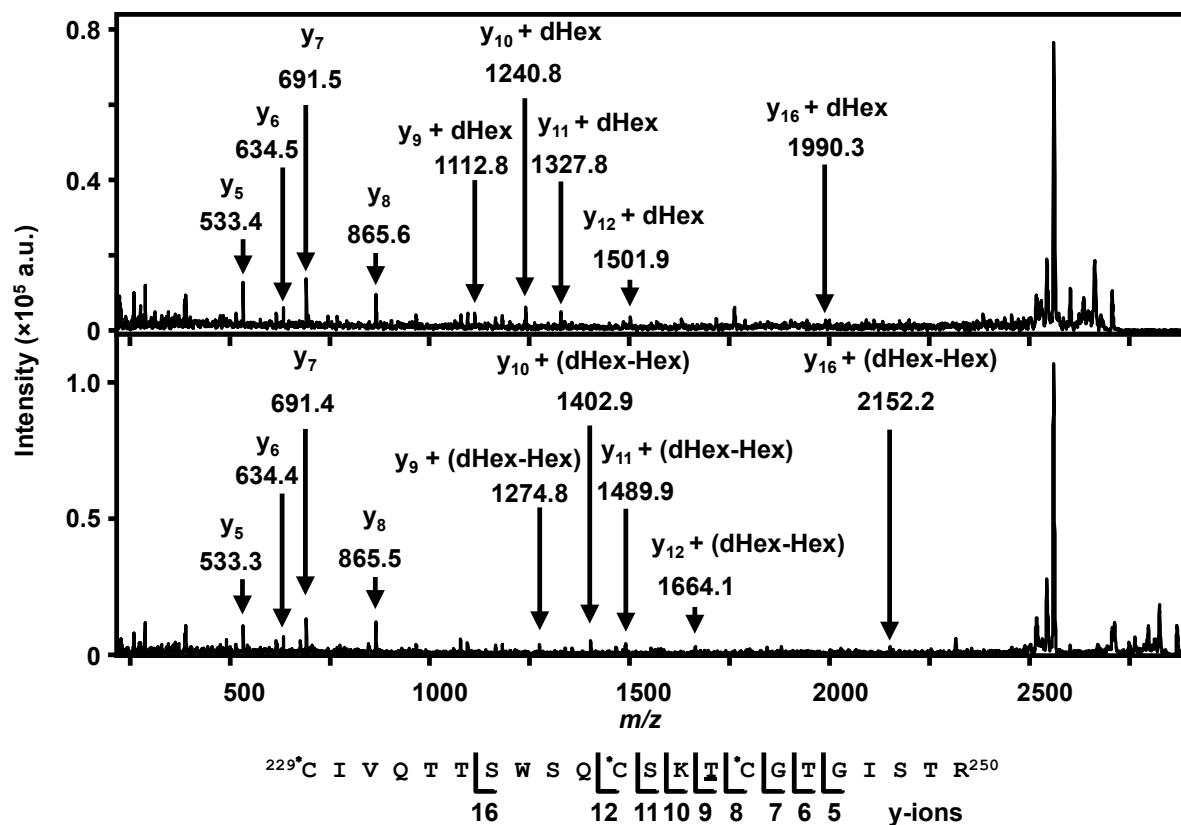
**Fig. 3-4. Purification of recombinant human CCN1 protein from the conditioned medium of HT1080-CCN1-MH cells.**

Cells were cultured with heparin sepharose beads for 24 h, and the beads were collected. The proteins bound to heparin were washed and eluted, and CCN1-MH was purified with Ni-NTA agarose. Samples were electrophoresed on an SDS-polyacrylamide gel and visualized with CBB.



**Fig. 3-5. Determination of *O*-fucosylation site within CCN1.**

Purified CCN1 was digested with trypsin, and the resulting peptides were analyzed by MALDI-TOF MS. The observed masses ( $m/z$  2706.4 and 2868.5) corresponded well to the expected masses of the trypsin-digested peptide  $^{229}\text{CIVQTTSWSQCSKTCGTGISTR}^{250}$ , which contains a putative *O*-fucosylation site ( $\text{Thr}^{242}$ ), modified by dHex and dHex-Hex. Putative *O*-fucosylation site ( $\text{Thr}^{242}$ ) is underlined and propionamide cysteine is indicated in \*C.



**Fig. 3-6. Determination of *O*-fucosylation site within CCN1.**

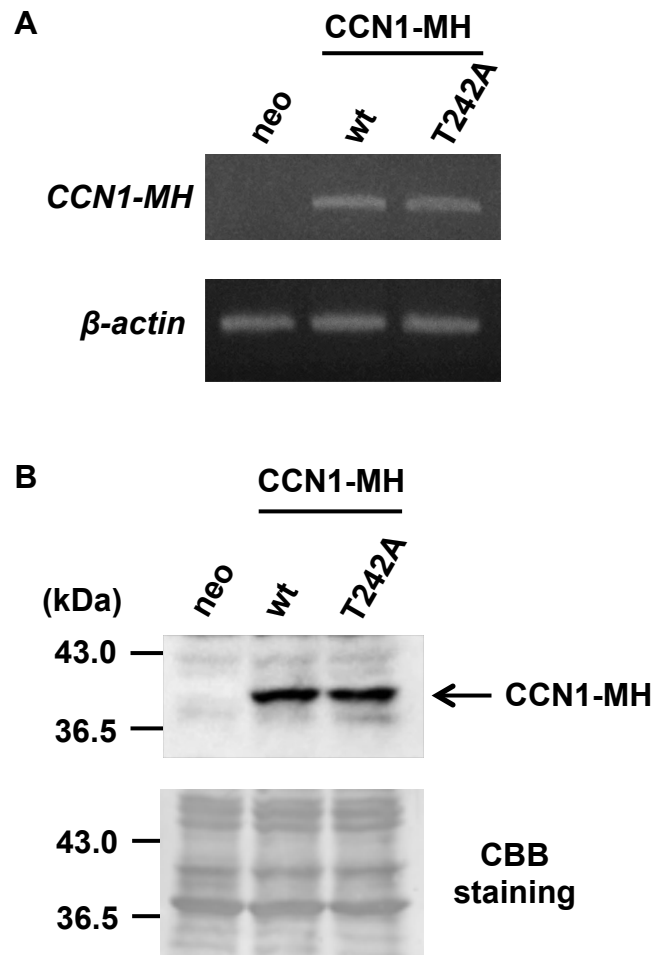
The peptides modified by dHex (upper) and dHex-Hex (lower) were analyzed by MS/MS. Observed peaks of these fragments are the indicated y-ions. Putative *O*-fucosylation site (Thr<sup>242</sup>) is underlined and propionamide cysteine is indicated in \*C.



## 第2節 CCN1 の *O*-fucosylation が機能に与える影響

### 1) CCN1 変異体の過剰発現細胞の樹立

第3章 第1節において、CCN1 が Thr<sup>242</sup> において *O*-fucosylation されることを示した。そこで、CCN1 の Thr<sup>242</sup> をアラニン(Ala)に変異させ *O*-fucosylation が起こらなくした変異体(T242A)の CCN1 過剰発現細胞を樹立した(Fig. 3-7)。CCN1 の発現量が mRNA レベルで同程度である細胞株を選定し(Fig. 3-7 A)、以後の実験に用いることとした。CCN1 のタンパク質レベルでの発現量は、野生型と T242A 変異体で同程度であった(Fig. 3-7 B)。



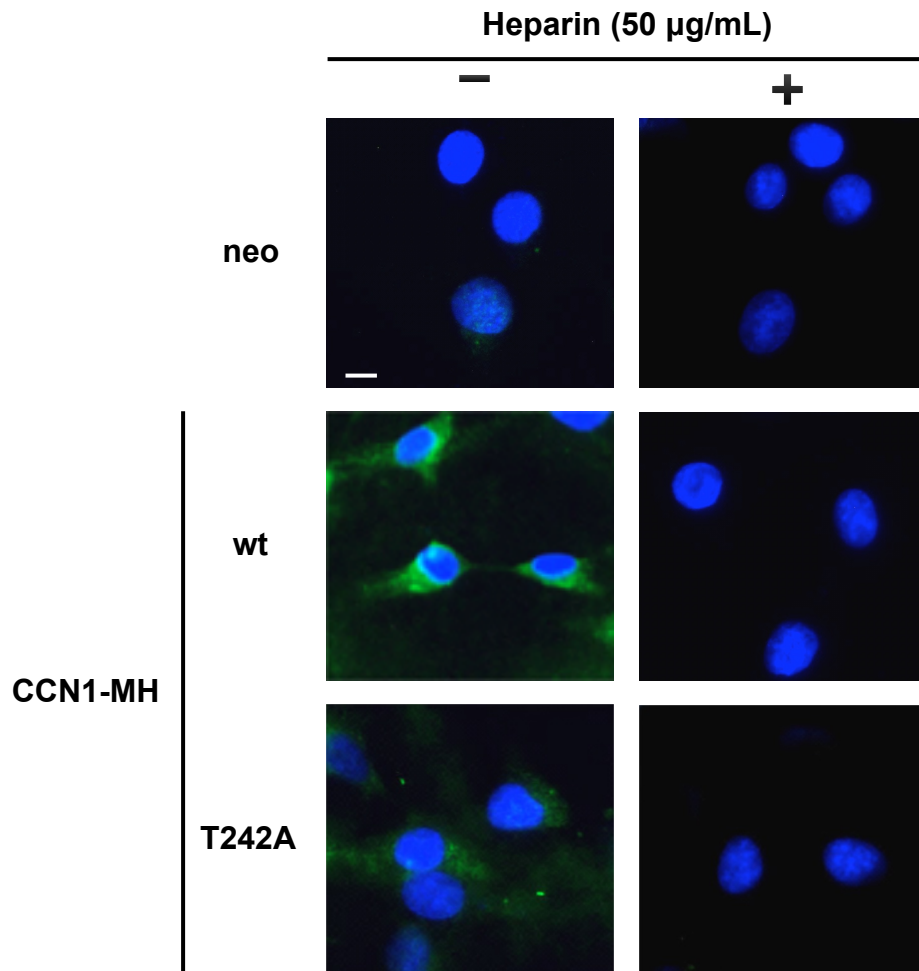
**Fig. 3-7. Establishment of an *O*-fucosylation-defective mutant CCN1-overexpressing HT1080 cell line, HT1080-CCN1/T242A-MH cell.**

(A) Total RNAs were isolated from each cell line and semi-quantitative RT-PCR was performed.

(B) Each cell was lysed, and aliquots of the cell lysates were electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc antibody. The membrane after immunoblotting was visualized with CBB.

## 2) CCN1 の *O*-fucosylation が細胞膜局在に与える影響

CCN1 は細胞外へと分泌され、細胞膜のヘパラン硫酸に結合して細胞膜に保持されていることが報告されている[75]。Fig. 3-3 において、ヘパリンを処理した際のみ分泌した CCN1 を検出できたことから、この報告は支持される。そこで、CCN1 の細胞膜局在に *O*-fucosylation が影響するか否かを評価するため、免疫蛍光染色法を用いて CCN1 の細胞膜局在を確かめた。各細胞を固定化後、Triton X-100 による細胞膜透過処理を行わずに、c-myc 抗体を用いて CCN1 を緑に染色した。細胞膜透過処理を行っていないため、抗体は細胞膜を透過できず、細胞外へと分泌され細胞膜上に結合した CCN1 のみが染色される。その結果、野生型 CCN1 は緑の蛍光シグナルが強く観察されたが、T242A 変異体ではその蛍光シグナルが顕著に減少した(Fig. 3-8)。またこの緑の蛍光シグナルは、細胞培養時にヘパリンを添加することで観察されなくなったことから、分泌された CCN1 は確かに細胞膜のヘパラン硫酸を介し結合していることが確認された(Fig. 3-8)。以上のことから、細胞外へと分泌された CCN1 は細胞膜上に保持されており、CCN1 の *O*-fucosylation は細胞膜局在に重要であることが示された。

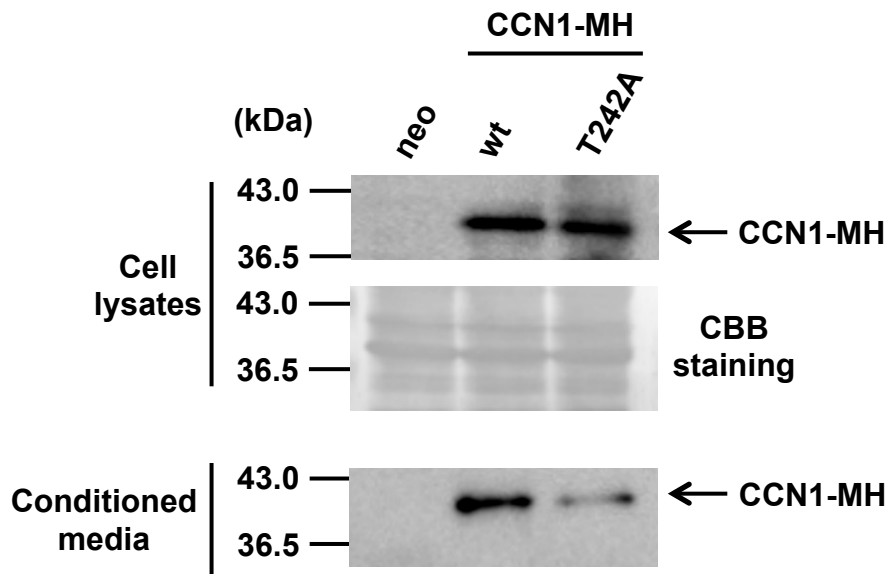


**Fig. 3-8. Effect of *O*-fucosylation on cellular membrane localization of CCN1.**

Each cell was cultured with or without 50  $\mu\text{g/mL}$  heparin. After 24 h, unpermeabilized cells were fixed and stained with Hoechst 33258 (blue) and anti-c-myc antibody (green). The samples were observed by fluorescence microscopy. Bar, 10  $\mu\text{m}$ .

### 3) CCN1 の *O*-fucosylation が分泌に与える影響

CCN1 の細胞膜局在に *O*-fucosylation が重要であったことから、CCN1 の *O*-fucosylation が細胞外への分泌を制御している可能性が示唆された。そこで、より定量的な評価を行うため、western blotting 法を用いて CCN1 の細胞外分泌量を評価した。CCN1 の野生型及び T242A 変異体の過剰発現細胞を、ヘパリン処理下、無血清培地で 24 時間培養し、24 時間での分泌量を比較したところ、野生型と比較し T242A 変異体ではおよそ 25%程度まで分泌量が減少した(Fig. 3-9)。以上のことから、CCN1 の *O*-fucosylation は、CCN1 の分泌に重要であることが示された。

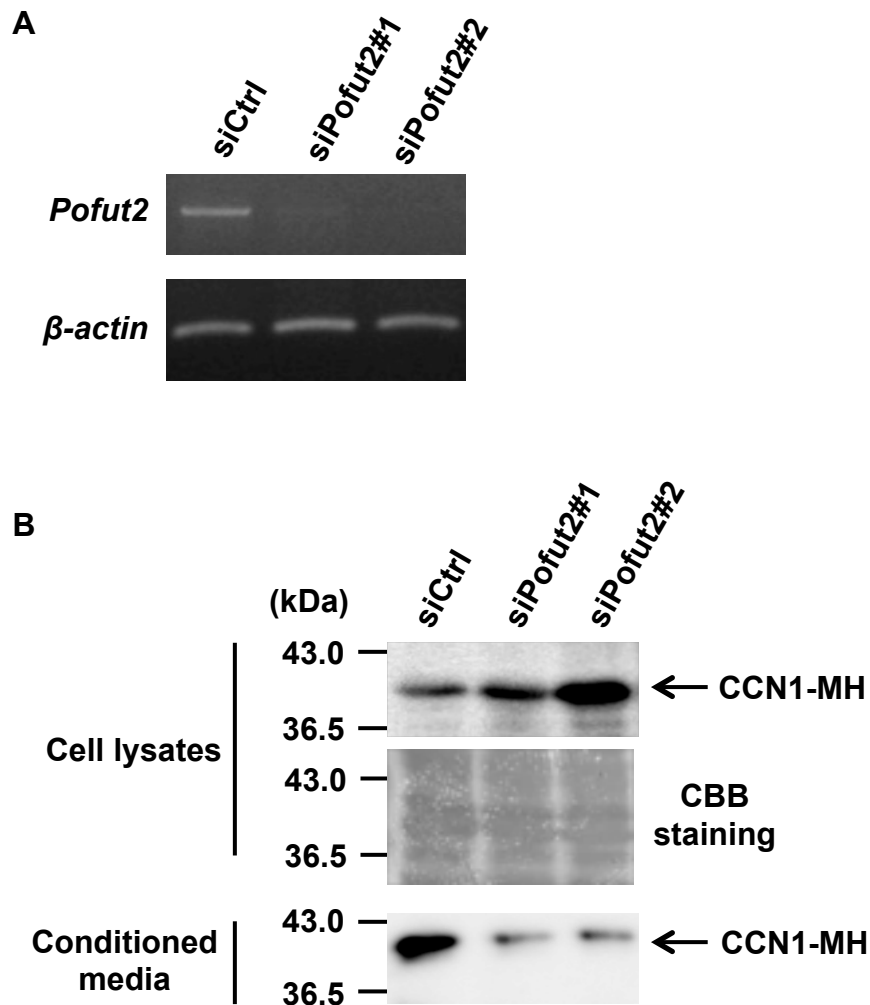


**Fig. 3-9. Effect of *O*-fucosylation on CCN1 secretion.**

Each cell was cultured with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparin. After 24 h, each cell lysate and conditioned media were collected, and the samples were electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc antibody. The membrane after immunoblotting was visualized with CBB.

### 第3節 Pofut2によるCCN1のO-fucosylationが分泌に与える影響

CCN1のO-fucosylationは、TSR1ドメイン中で起こることから、O-fucoseの転移酵素はPofut2であることが予想される。T242A変異体CCN1はその分泌が抑制されていたが(Fig. 3-9)、その結果はThrをAlaに変異させたことによる影響の可能性を否定できない。そこで、CCN1の野生型過剰発現細胞においてPofut2をノックダウンした際に、T242A変異体と同様に分泌量が減少するか否かを評価した。CCN1の野生型過剰発現細胞に対し、配列の異なる2種類のPofut2に対するsiRNA、あるいはsiCtrlを処理し、Pofut2をノックダウンした。mRNAレベルでPofut2がノックダウン出来ていることをRT-PCRで確認し(Fig. 3-10 A)、その条件下でwestern blotting法を用いてCCN1の細胞外分泌量を評価した。各siRNAを処理した細胞を、ヘパリン処理下、無血清培地で24時間培養し、24時間での分泌量を比較したところ、siCtrlを処理した細胞の分泌量と比較し、2種類のsiPofut2を処理した細胞では、どちらもおよそ20%程度まで分泌量が減少した(Fig. 3-10 B)。これは、T242A変異体の結果と一致した。以上のことから、CCN1のPofut2によるO-fucosylationは、CCN1の分泌に重要であることが示された。



**Fig. 3-10. Knockdown of Pofut2 decreased CCN1 secretion.**

(A) Knockdown of Pofut2 using siRNAs. HT1080-CCN1-MH cells were treated with the indicated siRNAs for 72 h. Total RNAs were isolated from each cell line, and semi-quantitative RT-PCR was performed to confirm the knockdown efficiency of each gene.

(B) Effect of knockdown of Pofut2 on CCN1 secretion. Each cell was cultured with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparin. After 24 h, each cell lysate and conditioned media were collected, and the samples were electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc antibody. The membrane after immunoblotting was visualized with CBB.



#### 第4節 まとめ

第3章では、ヒト CCN1 を過剰発現した細胞を用いて、CCN1 の *O*-fucosylation について解析を行った。CCN1 過剰発現細胞より精製したリコンビナントタンパク質の MALDI-TOF MS による解析から、分泌された全ての CCN1 は Thr<sup>242</sup> で *O*-fucosylation されることを初めて明らかにした。さらに、*O*-fucosylation が CCN1 の機能に与える影響を評価した。*O*-fucosylation の起こる Thr 残基を Ala に変異させた TA 変異体を用いた実験から、CCN1 の *O*-fucosylation が CCN1 の細胞膜局在、細胞外への分泌に重要であることを明らかにした。さらに、CCN1 の *O*-fucosylation された Thr<sup>242</sup> が TSR1 ドメイン中に存在し、Pofut2 による *O*-fucosylation が起こることが予想されたため、siRNA を用いて Pofut2 をノックダウンした。Pofut2 のノックダウンにおいても、CCN1 の分泌量は TA 変異体と同程度まで減少した。つまり、CCN1 の *O*-fucosylation は Pofut2 に触媒され、その Thr<sup>242</sup> における *O*-fucosylation が CCN1 の分泌を制御していると考えられる。

### 第3章の実験方法

#### 1) 細胞培養

ヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞は、DMEM に 10% (v/v) FBS、100 units/mL penicillin G、100 mg/L kanamycin、600 mg/L L-glutamine、2.25 g/L NaHCO<sub>3</sub> を添加した培地を使用し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

#### 2) CCN1 過剰発現プラスミドの構築

CCN1 遺伝子は、ヒト乳癌由来 MDA-MB-231 細胞の cDNA ライブラリより増幅した。myc タグ及び his<sub>6</sub> タグの C 末端への導入は、適したプライマーを使用し PCR 法により行った。myc タグ及び his<sub>6</sub> タグの配列は、以下に示す通りである。

myc: GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

his<sub>6</sub>: CATCATCACCATCACCAT

CCN1-myc-his<sub>6</sub> (CCN1-MH) 遺伝子は、pCI-neo ベクター(Promega)にサブクローニングを行った。また、CCN1-MH の変異体(T242A)の作製は、以下に示すプライマーを用いて PCR 法により行った。

T242A: 5'-GTCCCAGTGCTCAAAGGCCTGTGGAAGTGGTATC-3' (forward)

5'-GATACCAGTTCCACAGGCCTTTGAGCACTGGGAC-3' (reverse)

#### 3) 過剰発現細胞の樹立

HT1080 細胞に各プラスミドを Lipofectamine LTX (LifeTechnologies)を用いて遺伝子導入し、400 µg/mL の G418(Roche Applied Sciences)で選択培養を行った。およそ 2 週間の選択培養後、限界希釈法を用いて各クローン細胞 (HT1080-CCN1-MH, HT1080-CCN1/T242A-MH)を樹立した。

#### 4) Western blot

細胞に lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)を加え超

音波処理を行うことで細胞を溶解した。細胞溶解液は Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 (Bio-Rad Laboratories)を用いてタンパク質濃度を定量し、各サンプル濃度を揃えた。各サンプルに5分の1量の loading buffer (350 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% glycerol, 0.012% bromophenol blue, 6% SDS, and 30% 2-mercaptoethanol)を加え、98°C、3分の熱処理後、SDS-PAGEによりタンパク質を分離した。タンパク質を PVDF 膜に転写後、5%スキムミルクでブロッキングを行った。1次抗体には、抗 c-myc 抗体(#9E10, DSHB)を用いた。また、2次抗体には HRP 標識抗 mouse IgG 抗体(Amersham Biosciences)を用い、発色には Immobilon Western (Millipore Corporation)を用いた。発光検出には、LAS4000 mini (GE healthcare)を使用した。

#### 5) CCN1 の細胞外分泌の検出

各細胞に 50 µg/mL のヘパリンを処理し、無血清培地で 24 時間培養することで、細胞外へと分泌し細胞膜のヘパラン硫酸と結合した CCN1 を遊離させた。24 時間後、培養上清を回収し、4)に従い western blot を行うことで、分泌した CCN1 を検出した。

#### 6) CCN1 の細胞外からの精製

HT1080-CCN1-MH 細胞を大量培養し、無血清培地に 1% (v/v) heparin sepharose 6 fast flow (GE Healthcare)を添加し、24 時間培養した。24 時間後、回収した heparin sepharose を PBS でよく洗浄し、buffer A (900 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 20 mM imidazole)を用いて CCN1 を溶出した。これに Ni-NTA agarose (Qiagen)を加え、CCN1-MH を Ni-NTA agarose に結合させた。Ni-NTA agarose に結合させた CCN1-MH は、buffer A でビーズをよく洗浄後、500 mM の imidazole を添加した buffer A で溶出を行った。精製の確認は、サンプルを SDS-PAGE で分離後、CBB R-250 で染色することで行った。

## 7) MALDI TOF-MS 解析

精製したサンプルを SDS-PAGE により分離し、CBB 染色を行った。CBB 染色後、タンパク質バンドをゲルから切り出し、0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 中、37°C で 12 時間、0.05 µg の sequencing-grade TPCK-trypsin (Worthington Biochemical) を処理することでペプチド断片化を行い、続けて還元プロピオンアミド化を行った。その後、Zip TipC18µ (Millipore Corporation) を用いて脱塩化し、α-cyano-4-hydroxycinnamic acid をマトリックスとして使用し、ultrafleXtreme TOF/TOF MS (Bruker Daltonics) を用いて質量分析を行った。

## 8) RT-PCR

RNA は Trizol (LifeTechnologies) を用いて細胞より抽出した。2µg の RNA を使用し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写を行った。PCR 増幅には Quick Taq HS DyeMix (Toyobo) を使用した。RT-PCR に用いたプライマー、サイクル数、アニーリング温度は Table 3-1 に示す。

**Table 3-1. The sequences of the primers, annealing temperature, and the number of cycles for RT-PCR**

Target gene	Primer sequence	Annealing temperature	Number of cycles
CCN1	5'-ATGAGCTCCCGCATCGCCAGGGCGCTCGCCTTAG-3' (forward)	63°C	25
	5'-GTGATGGTGATGATGCAGATCCTCTTCTGAGATGAG-3' (reverse)		
Pofut2	5'-ATGGCGACACTCAGCTTCGTCTTCTGCTGCTG-3' (forward)	63°C	31
	5'-TCAGTAGGTGATCTCCAGTGGGTGGGTTGCTC-3' (reverse)		
β-actin	5'-CTTCTACAATGAGCTGCGTG-3' (forward)	58°C	20
	5'-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3' (reverse)		

## 9) 免疫蛍光染色

各細胞はカバーガラス上で培養した。細胞を固定化後、膜透過処理は行わずに、3% BSA でブロッキングを行った。CCN1-MH の染色には 1 次抗体として抗 c-myc 抗体を使用し、2 次抗体として Alexa Fluor488-conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes) を使用した。核染色には 2 µg/mL Hoechst 33258 (Polysciences,

Inc.)を用いた。

#### 10) Pofut2 のノックダウン

HT1080-CCN1-MH 細胞に対し、20 nM の siRNA を Lipofectamine RNAiMAX (LifeTechnologies)を用いて導入した。siRNA の導入効率は、8)の RT-PCR に従い確認を行った。使用した siRNA の配列を以下に示す。

siPofut2#1: GUACUACAGAGGAUGGUUUdTdT

siPofut2#2: CGUCAGAAAGGAAUAUGAAdTdT

siCtrl (#4611G)は Life Technologies より市販品を購入した。

## 第4章 R-spondin1 の C-mannosylation の役割と責任酵素の解析

C-mannosylation は、1994年に初めて報告された、比較的新しい糖修飾である。C-mannosylation は、特定のタンパク質中のトリプトファン残基のインドール環の2位の炭素を介し、単糖の mannose が C-C 結合で結合するという、N-glycosylation や O-glycosylation には無い特徴的な構造を有する(Fig. 1-5)。一方、C-mannosylation の機能に関しては、ほとんど報告されていない。R-spondin1 タンパク質は C-mannosylation のコンセンサス配列を有するが、C-mannosylation されているか否かについて解析はなされていなかった。第4章ではヒト R-spondin1 の C-mannosylation に着目し、R-spondin1 が C-mannosylation されているか否か、及びその機能に与える影響について評価した。

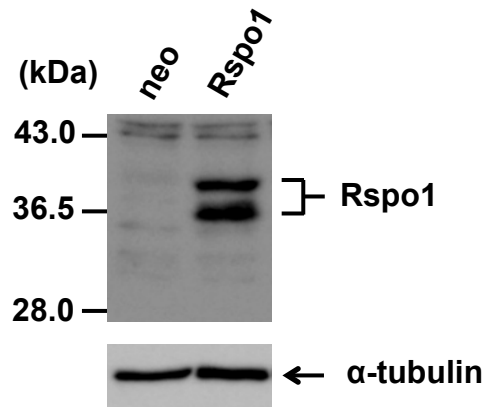
### 第1節 R-spondin1 の C-mannosylation の確認

ヒト R-spondin1 (Rspo1)のアミノ酸配列をデータベースより取得し、その配列を解析したところ、Rspo1 の TSR1 中の 153 番目及び 156 番目の Trp 残基が C-mannosylation のコンセンサス配列である Trp-Xaa-Xaa-Trp/Cys を満たしていた(Fig. 4-1)。そこで、ヒト Rspo1 が C-mannosylation されているか否かを、質量分析により解析した。まず、Rspo1 の C 末端に myc 及び his<sub>6</sub> のタグを付加した Rspo1-MH タンパク質の過剰発現細胞を樹立した(Fig. 4-2)。Rspo1 は、細胞膜表面にあるヘパラン硫酸との結合が報告されている[95]。今回樹立した Rspo1 過剰発現細胞も、通常培養条件下では Rspo1 を培養上清中に確認することは出来なかったが、ヘパリンを細胞に処理することで、細胞膜表面にヘパラン硫酸を介して結合していた Rspo1 を遊離させることが出来た(Fig. 4-3)。

MRLGLCVVAL VLSWTHLTIS SRGIKGRQR RISAEGSQAC AKGCELCSEV  
NGCLKCSPKL FILLERNDIR QVGVCLPSCP PGYFDARNPD MNKCIKCKIE  
HCEACFSHNF CTKCKEGLYL HKGRCYPACP EGSSAANGTM ECSSPAQCEM  
SEWSPWGPCS KKQQLCGFRR GSEERTRRVL HAPVGDHAAC SDTKETRRCT  
VRRVPCPEGQ KRRKGGQGRR ENANRNLARK ESKEAGAGSR RRGQQQQQQQ  
QGTVGPLTSA GPA

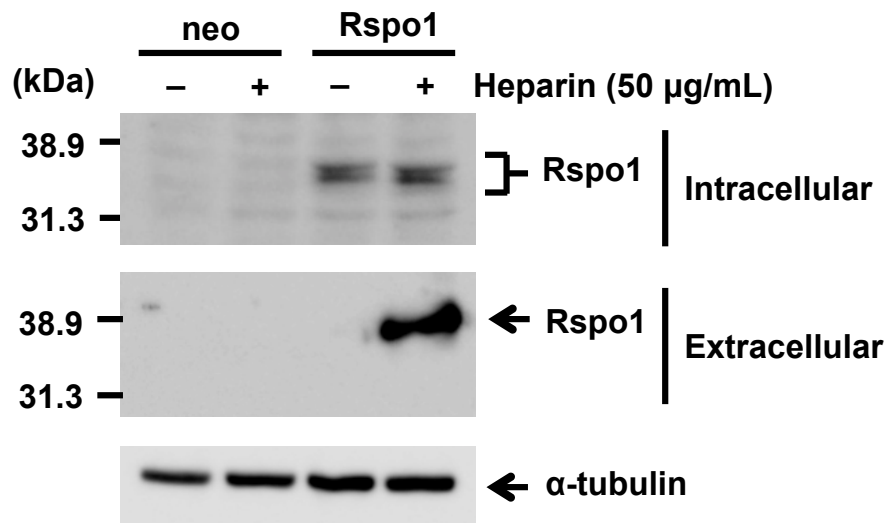
**Fig. 4-1. Amino acid sequence of human Rspo1.**

C-mannosylation consensus sequence is indicated by underline. The locations of two putative C-mannosylation sites (Trp<sup>153</sup> and Trp<sup>156</sup>) are indicated in red.



**Fig. 4-2. Establishment of an Rspo1-overexpressing cell line, HT1080-Rspo1-MH.**

HT1080-neo and HT1080-Rspo1-MH cells were lysed, and each cell lysate was electrophoresed and immunoblotted with the indicated antibodies.



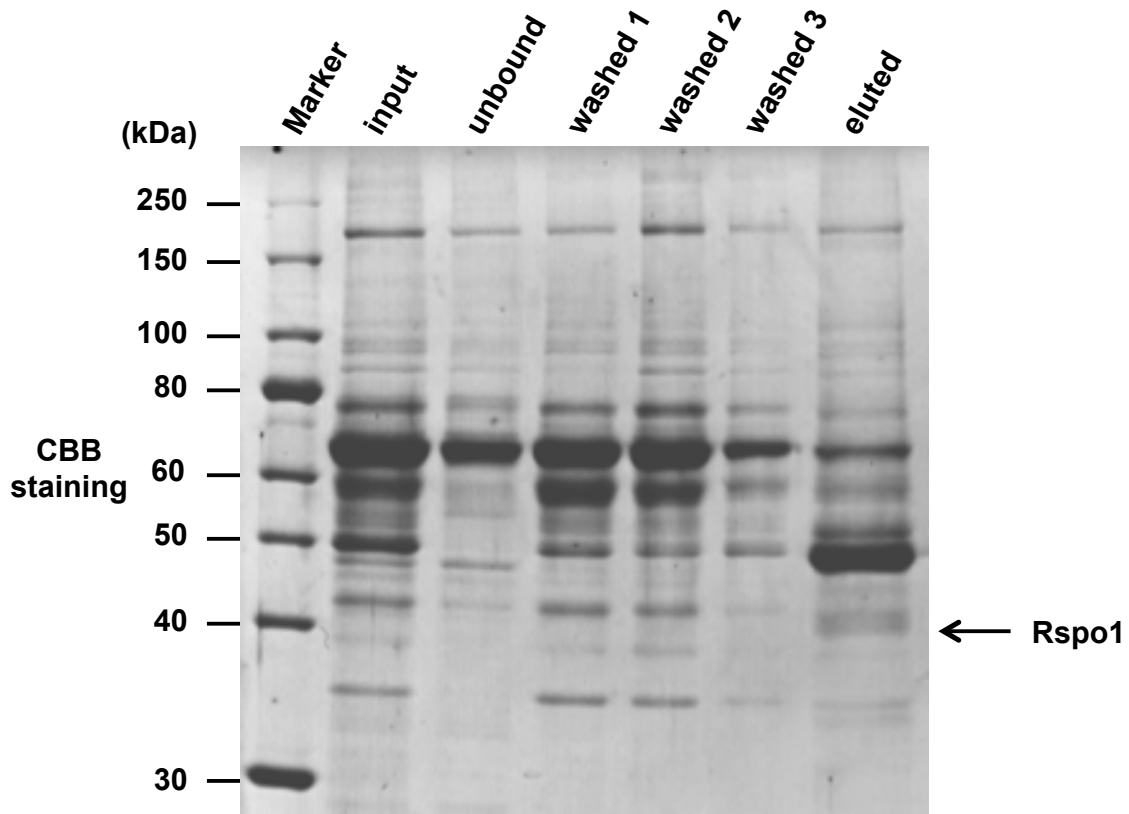
**Fig. 4-3. Rspo1 bound to cell surface HSPGs.**

Each cell line was cultured with or without 50  $\mu$ g/mL soluble heparin, and all lysates and conditioned media were electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc and anti- $\alpha$ -tubulin.



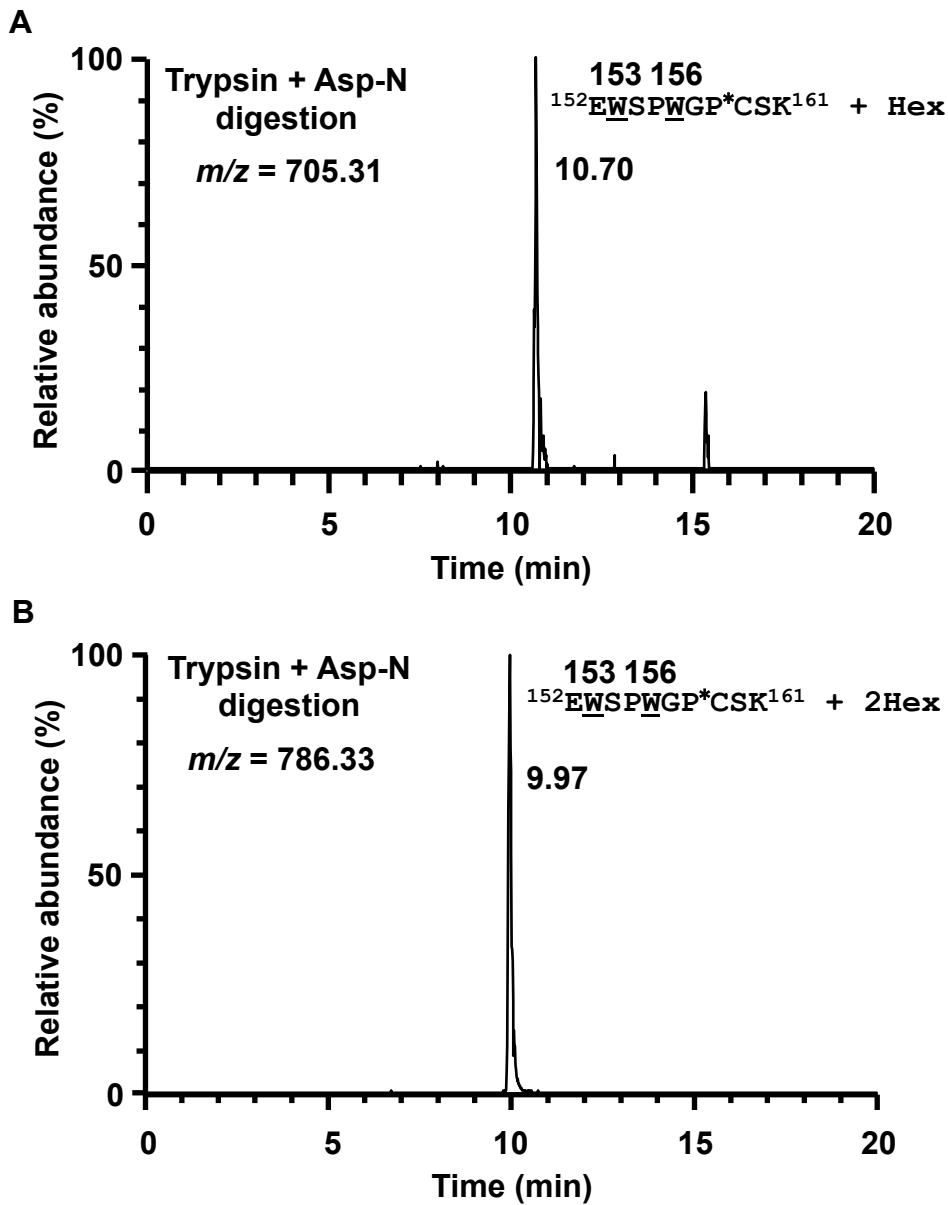
次に Rspo1 が C-mannosylation されているか否かを、質量分析により解析するため、Rspo1 過剰発現細胞を大量培養し、ヘパリンを添加した無血清培地で 24 時間培養することで、Rspo1 を培養上清中に遊離させた。遊離させた Rspo1 を、Ni-NTA agarose を用いてアフィニティー精製した。精製したサンプルを SDS-PAGE により分離し、CBB 染色を行った。その結果、約 38 kDa 付近に Rspo1 と考えられるバンドが確認された(Fig. 4-4)。そこで、精製サンプルに対しトリプシンと Asp-N を処理することで、ペプチド断片化を行った。これらペプチド断片に対し、LC-MS 及び MS/MS 解析を行った。Rspo1 をトリプシンと Asp-N でペプチド断片化すると、C-mannosylation が予想される Trp<sup>153</sup> 及び Trp<sup>156</sup> 残基を含むペプチド断片としては <sup>152</sup>EWSPWGPCSK<sup>161</sup> が得られる。この未修飾ペプチドの 2 価イオンの *m/z* は 624.27 であるが、LC-MS ではそのようなペプチド由来のピークは検出されなかった。一方、<sup>152</sup>EWSPWGPCSK<sup>161</sup> に対し 1 つ及び 2 つの mannose (Hex) が修飾されたペプチドの 2 価イオン(*m/z* 705.31 及び 786.33) がそれぞれ観測された(Fig. 4-5)。以上のことより、分泌された全ての Rspo1 は C-mannosylation されていることが示唆された。

Rspo1 の C-mannosylation が示唆されたため、ペプチド断片の配列の確認及び C-mannosylation site の同定のため、MS/MS 解析を行った。その結果、Fig. 4-6 に示す y-ions が確認された。まず、1 つの mannose の修飾が確認された *m/z* 705.31 のペプチド由来の MS/MS では、y8 イオンまでに mannose の修飾による 162 Da の増加が無いことが確認された(Fig. 4-6 A)。つまり、1 つの mannose は Trp<sup>156</sup> ではなく Trp<sup>153</sup> に結合していることが示された。次に、2 つの mannose の修飾が確認された *m/z* 786.33 のペプチド由来の MS/MS では、y7 及び y8 イオンで 1 つの mannose 分の質量の増加が確認され、C-mannosylation で特徴的に観測される cross-ring cleavage による -120 Da のピークも同時に観測された(Fig. 4-6 B)[39]。つまり、2 つの mannose は Trp<sup>153</sup> 及び Trp<sup>156</sup> に 1 つずつ結合していることが確認された。以上より、Rspo1 過剰発現細胞より精製した分泌された Rspo1 は、Trp<sup>153</sup> のみが C-mannosylation されたものと Trp<sup>153</sup> 及び Trp<sup>156</sup> の 2 ヶ所共に C-mannosylation されたものの 2 種類が存在することが示された。



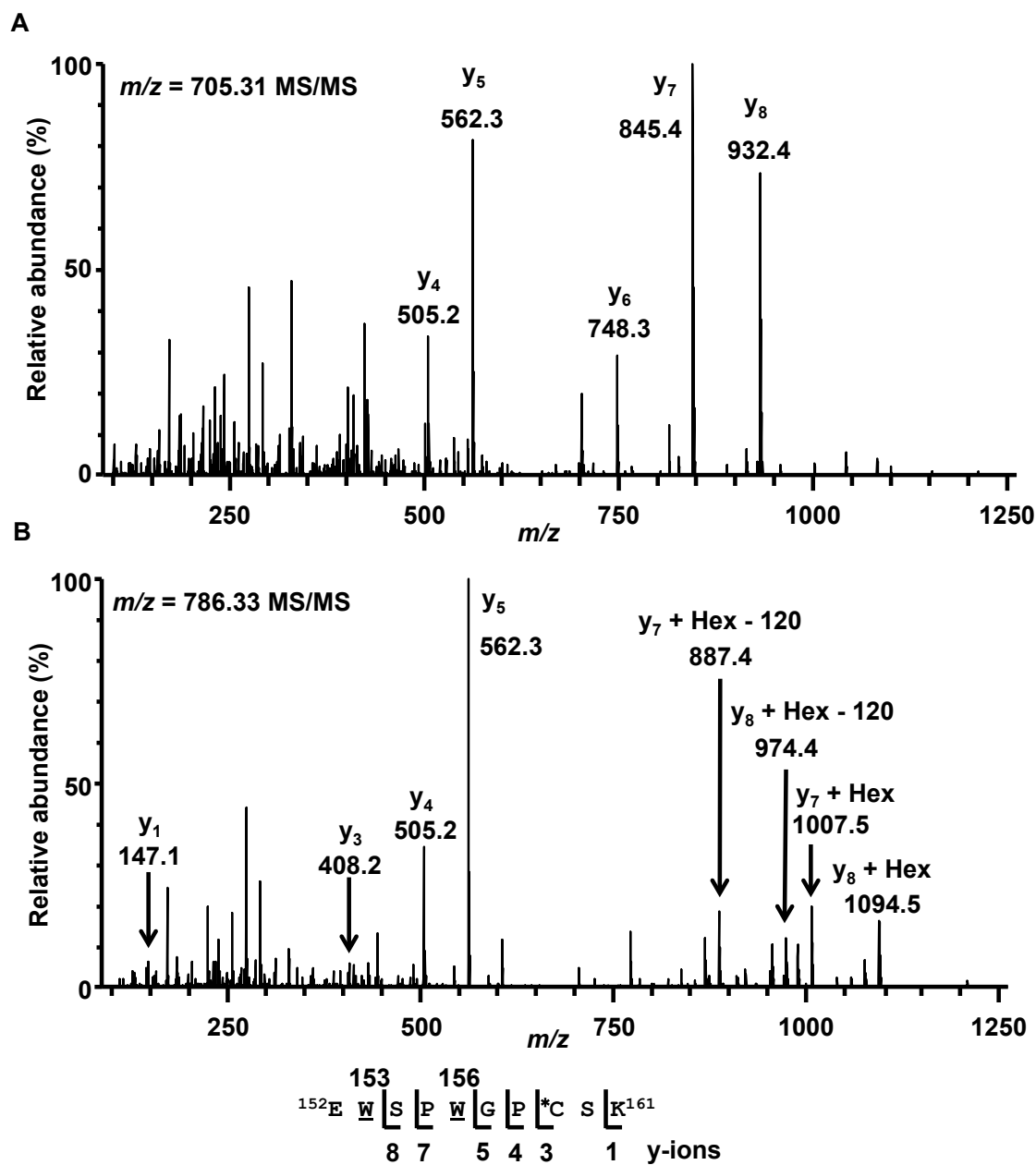
**Fig. 4-4. Purification of recombinant human Rspo1 protein from the conditioned medium of HT1080-Rspo1-MH cells.**

Cells were cultured with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparin for 24 h, and the conditioned medium was collected. Secreted Rspo1-MH was purified with Ni-NTA agarose, and samples were electrophoresed on an SDS-polyacrylamide gel. The gel was visualized with CBB staining.



**Fig. 4-5. Representative LC-MS data for C-mannosylation of Rsp1.**

Samples were digested with trypsin and Asp-N, and the resulting peptides were analyzed by LC-MS. The selected  $m/z$  (705.31 (A) and 786.33(B)) and the retention times were shown. Putative C-mannosylation sites are underlined. \*C indicates propionamide cysteine.



**Fig. 4-6. Representative LC-MS/MS data for C-mannosylation of Rsp1.**

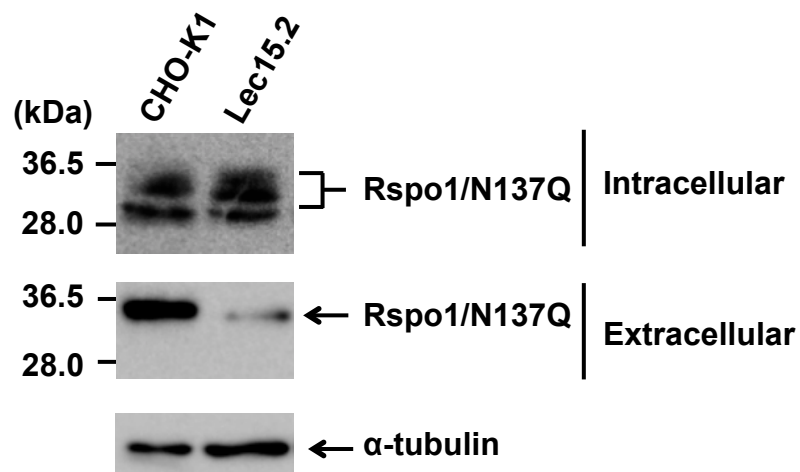
The selected ions were further analyzed by LC-MS/MS. Indicated y-ions were detected, and only Trp<sup>153</sup>- (A) and both Trp<sup>153</sup>- and Trp<sup>156</sup>- (B) C-mannosylated peptides were observed. Putative C-mannosylation sites are underlined. \*C indicates propionamide cysteine.

## 第2節 R-spondin1 の C-mannosylation が機能に与える影響

### 1) Lec15.2 細胞を用いた分泌への影響の検討

以前の報告から、punctin-1 において、C-mannosylation が分泌を制御していることが示されている[39]。そこで、Rspo1 の C-mannosylation も同様に分泌を制御していることが考えられた。C-mannosylation は、mannose ドナーとして Dol-P-Man を用いていることが報告されており、Dol-P-Man 合成活性の欠損した CHO-K1 細胞の亜株として Lec15.2 細胞が報告されている[47]。そこで、これら細胞を用いて C-mannosylation が Rspo1 の分泌に与える影響を評価した。

Dol-P-Man 合成活性の欠損は N-glycosylation への影響も報告されており[96]、また先行研究から Rspo1 の N-glycosylation が分泌を負に制御していることが示されている[97]。そこで、N-glycosylation の影響を除外するため、Rspo1 の Asn<sup>137</sup> をグルタミン(Gln)に変異させ N-glycosylation が起こらなくした変異体(N137Q)を用いた[97]。親株である CHO-K1 細胞、及びその亜株 Lec15.2 細胞に対し、Rspo1/N137Q を一過的に過剰発現し、その細胞外分泌量を western blotting 法を用いて評価した。その結果、Dol-P-Man 合成活性の欠損により C-mannosylation が起こらなくなった Lec15.2 細胞では、Rspo1/N137Q の分泌量が顕著に減少した (Fig. 4-7)。以上の結果から、Rspo1 の C-mannosylation が、Rspo1 の分泌に重要であることが示唆された。

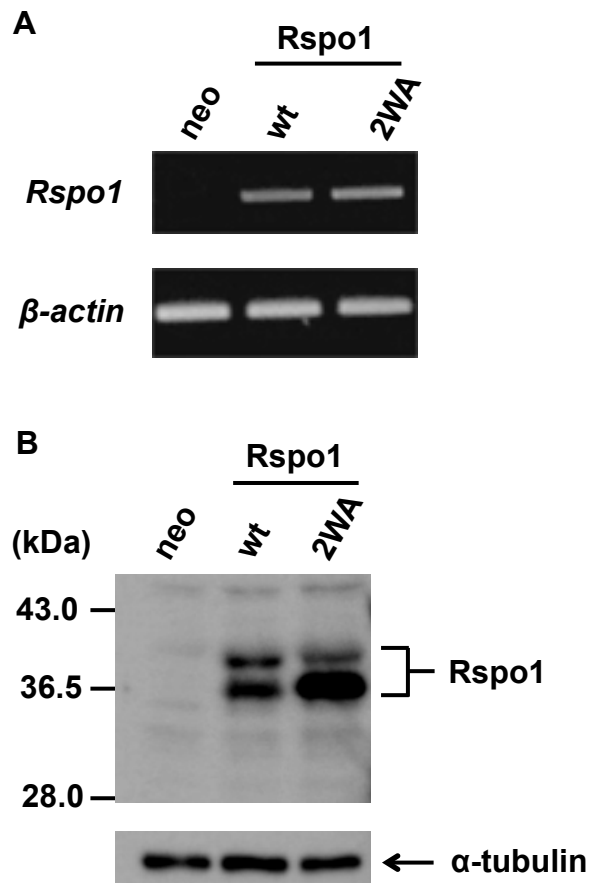


**Fig. 4-7. Effect of C-mannosylation on Rspo1 secretion using CHO-K1 and Lec15.2 cells.**

CHO-K1 and Lec15.2 cells were transiently transfected with pCI-neo-Rspo1/N137Q-MH vector for 6 h and then cultured in serum-free medium with 50  $\mu$ g/mL heparin for 18 h. The protein samples were electrophoresed and immunoblotted with anti-c-myc and anti- $\alpha$ -tubulin.

## 2) R-spondin1 変異体の過剰発現細胞の樹立

第 4 章 第 1 節において、Rspo1 が Trp<sup>153</sup> 及び Trp<sup>156</sup> の 2 ヶ所において C-mannosylation されることを示し、また第 4 章 第 2 節 1)において Rspo1 の分泌が C-mannosylation により制御されていることを示唆した。そこで、C-mannosylation の機能をより詳細に解析するため、Rspo1 変異体の過剰発現細胞を樹立した。前項で用いた Lec15.2 細胞は N-glycosylation への影響があることから、C-mannosylation 単独の機能解析には不向きであった。そこで、Rspo1 の Trp<sup>153</sup> 及び Trp<sup>156</sup> をアラニン(Ala)に変異させ C-mannosylation のみを起こらなくした変異体(W153A/W156A: 2WA)の Rspo1 過剰発現細胞を樹立した(Fig. 4-8)。RT-PCR により、Rspo1 の発現量が mRNA レベルで同程度である細胞株を選定し(Fig. 4-8 A)、以後の実験に用いることとした。



**Fig. 4-8. Establishment of a C-mannosylation-defective mutant Rspo1-overexpressing HT1080 cell line, HT1080-Rspo1/2WA-MH cell.**

(A) Total RNA was isolated from each cell line, and semi-quantitative RT-PCR was performed.

(B) Each cell was lysed, and aliquots of the cell lysates were electrophoresed and immunoblotted with the indicated antibodies.

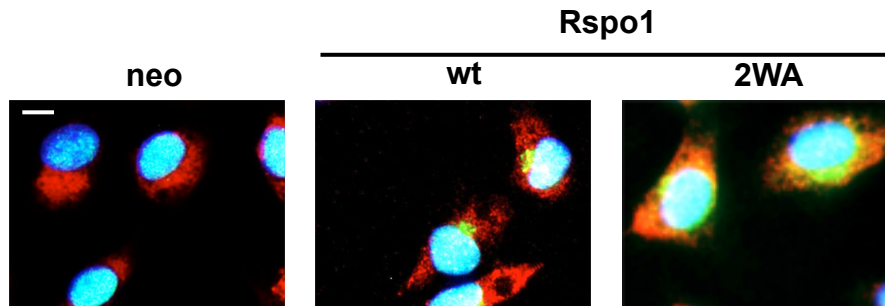


### 3) R-spondin1 の C-mannosylation が細胞内局在に与える影響

Rspo1 は分泌型タンパク質であることから、細胞内では小胞体(ER)あるいはゴルジ体に局在することが予想される。そこで、Rspo1 の細胞内局在に C-mannosylation が影響するか否かを評価するため、免疫蛍光染色法を用いて Rspo1 の細胞内局在を確かめた。

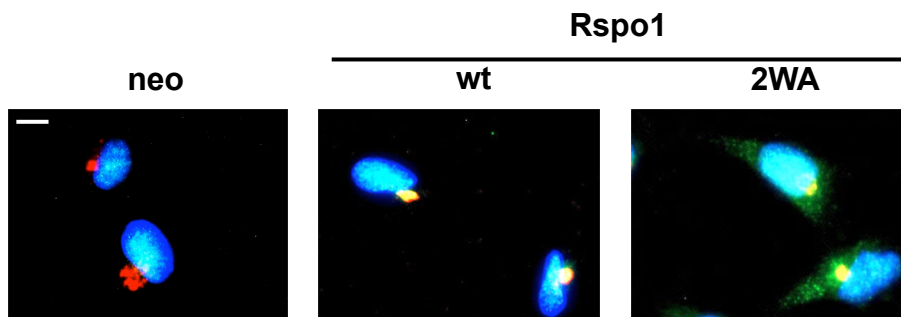
まず、抗 KDEL 抗体(ER マーカー)を用いて ER を赤に染色し、抗 myc 抗体を用いて Rspo1 を緑に染色した。その結果、野生型では両者は共染色されなかったのに対し、2WA 変異体では一部が共染色された(Fig. 4-9)。以上のことから、2WA 変異体 Rspo1 はその一部が ER に局在することが示された。

次に、ゴルジ体の局在に与える影響を評価した。抗 GRASP65 抗体(ゴルジ体マーカー)を用いてゴルジ体を赤に染色し、抗 myc 抗体を用いて Rspo1 を緑に染色した。その結果、野生型 Rspo1 は完全に共染色されたのに対し、2WA 変異体では一部が共染色され、残りは細胞全体に広がっている様子が観察された(Fig. 4-10)。2WA 変異体 Rspo1 のゴルジ体に局在していないタンパク質は、Fig. 4-9 の結果を踏まえると ER に局在しているものと考えられた。以上のことから、Rspo1 の C-mannosylation は ER からゴルジ体への輸送に重要であることが示された。



**Fig. 4-9. Effect of C-mannosylation on ER localization of Rspo1.**

Cells were fixed and stained with Hoechst 33258 (blue), anti-c-myc antibody (green), and anti-KDEL antibody (red). The samples were observed by fluorescence microscopy. Bar, 10  $\mu$ m.

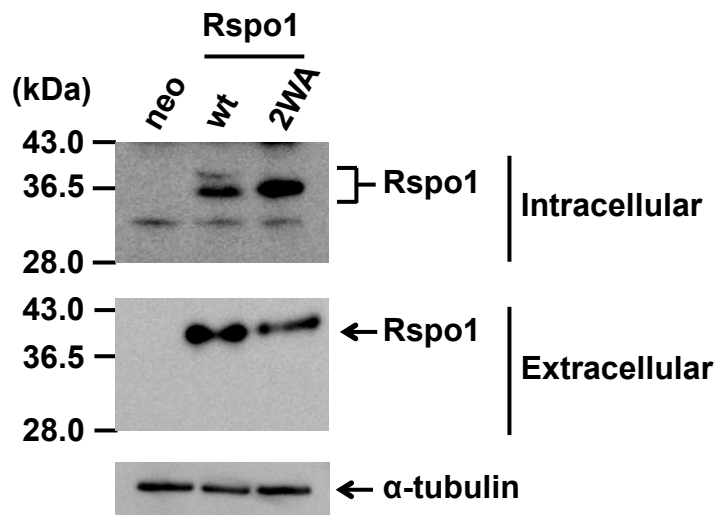


**Fig. 4-10. Effect of C-mannosylation on Golgi apparatus localization of Rspo1.**

Cells were fixed and stained with Hoechst 33258 (blue), anti-c-myc antibody (green), and anti-GRASP65 antibody (red). The samples were observed by fluorescence microscopy. Bar, 10  $\mu$ m.

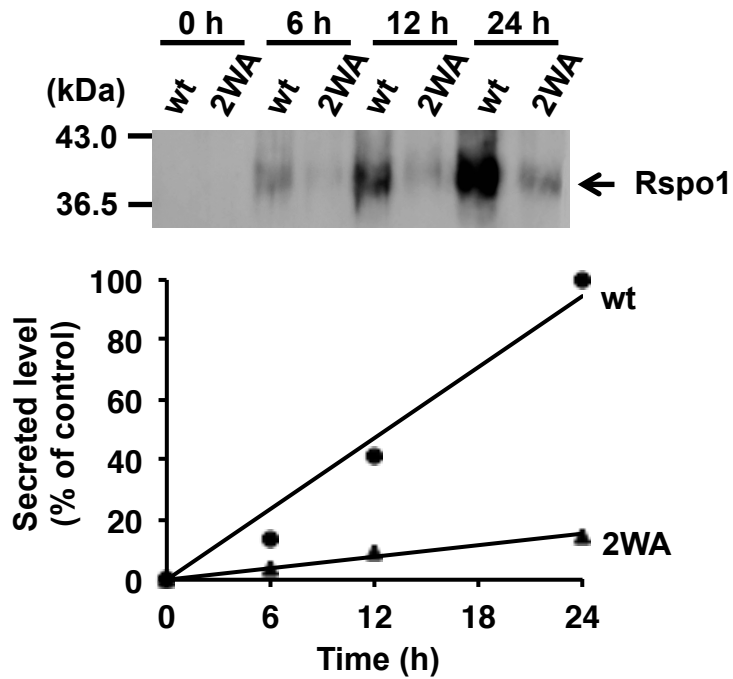
#### 4) R-spondin1 の C-mannosylation が分泌に与える影響

Rspo1 の ER からゴルジ体への輸送に C-mannosylation が重要であったことから、Rspo1 の C-mannosylation が細胞外への分泌を制御している可能性が考えられた。そこで、western blotting 法を用いて Rspo1 の細胞外分泌量を評価した。Rspo1 の野生型及び 2WA 変異体の過剰発現細胞を、ヘパリン処理下、無血清培地で 24 時間培養し、24 時間での分泌量を比較したところ、野生型と比較し 2WA ではおよそ 20%程度まで分泌量が減少した(Fig. 4-11)。また、Rspo1 の分泌速度に与える C-mannosylation の影響を評価するため、Rspo1 の分泌量を経時変化で評価した。その結果、野生型と比較し 2WA 変異体では、Rspo1 の分泌速度が顕著に減少した(Fig. 4-12)。以上のことから、Rspo1 の C-mannosylation は、Rspo1 の分泌速度に重要であることが示された。



**Fig. 4-11. Effect of C-mannosylation on Rspo1 secretion.**

Each cell was cultured with 50  $\mu\text{g/mL}$  heparin. After 24 h, each cell lysate and conditioned media were collected, and the samples were electrophoresed and immunoblotted with the indicated antibodies.

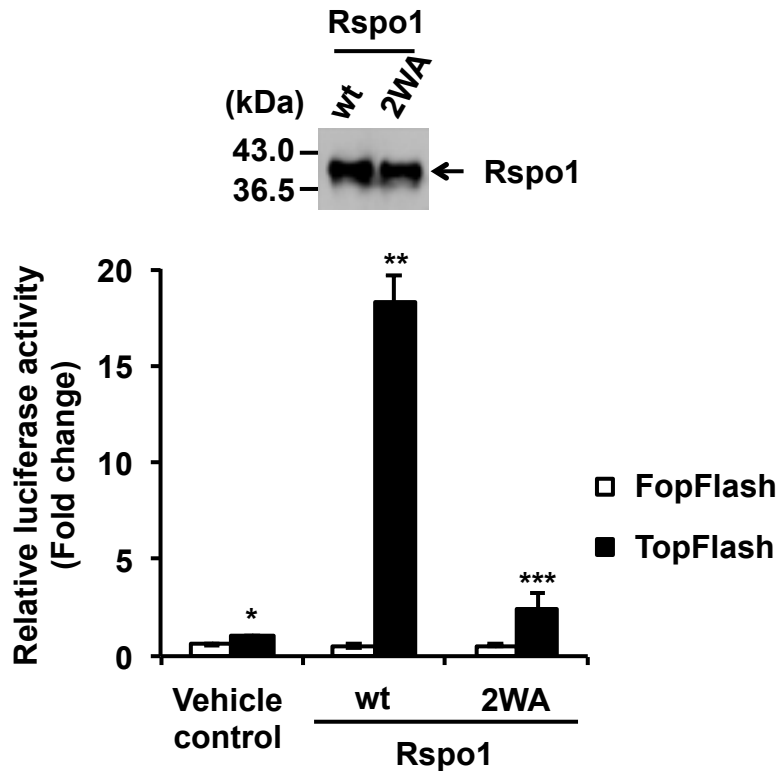


**Fig. 4-12. Effect of C-mannosylation on the kinetics of Rspo1 secretion.**

Cells were cultured with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparin, and conditioned media were collected at the indicated times, electrophoresed, and immunoblotted with anti-c-myc antibody. Protein bands were quantified by using ImageJ software. The amount of wild-type Rspo1 at 24 h was defined as 100%.

#### 5) R-spondin1 の C-mannosylation が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル増強活性に与える影響

Rspo1 は Wnt3a と協調的に働くことで、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを相乗的に増強する活性を有することが報告されている[85,86]。そこで、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルのレポーターである TopFlash を用いて、Rspo1 の C-mannosylation が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル増強活性に与える影響を評価した。Fig. 4-11 に示したように、2WA 変異体 Rspo1 は野生型と比較し、分泌量が顕著に減少していた。そこで、野生型と 2WA 変異体で等量の Rspo1 を用いて Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル増強活性に与える影響を評価するため、野生型及び 2WA 変異体の過剰発現細胞をそれぞれ大量培養し、各リコンビナントタンパク質を精製した。Fig. 4-13 に示すように、野生型と 2WA 変異体が同程度の濃度に精製出来た。そこで、このリコンビナント Rspo1 を用いて、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル増強活性に与える影響を評価した。TCF/LEF 応答配列の制御下にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーターベクターである TopFlash、あるいはその TCF/LEF 応答配列に変異を加えたレポーターベクターである FopFlash を 293T に遺伝子導入し、同時に Wnt3a 及び精製したリコンビナント Rspo1 を処理することで、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、Rspo1 の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル増強活性を評価した。その結果、野生型 Rspo1 の活性化量と比較し、2WA 変異体ではおよそ 15%程度の活性化であった(Fig. 4-13)。以上のことから、Rspo1 の C-mannosylation は Rspo1 の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル増強活性に重要であることが示された。



**Fig. 4-13. Effect of C-mannosylation on Rspo1-mediated enhancement of Wnt signaling.**

Recombinant Rspo1 and Rspo1/2WA were purified from each cell line, and the amounts of proteins were equalized by western blot (inset). 293T cells were transfected with TopFlash or FopFlash in the presence of 10% Wnt3a conditioned medium and treated with equal amounts of purified Rspo1. After 24 h, luciferase activities were measured and normalized to *Renilla* luciferase. Non-C-mannosylated Rspo1 slightly enhanced Wnt signaling activity. Data shown are means  $\pm$  s.d. \*,  $P < 0.05$  compared with FopFlash of vehicle control treatment. \*\*,  $P < 0.05$  compared with TopFlash of vehicle control treatment. \*\*\*,  $P < 0.05$  compared with TopFlash of vehicle control and wild-type Rspo1 treatments.

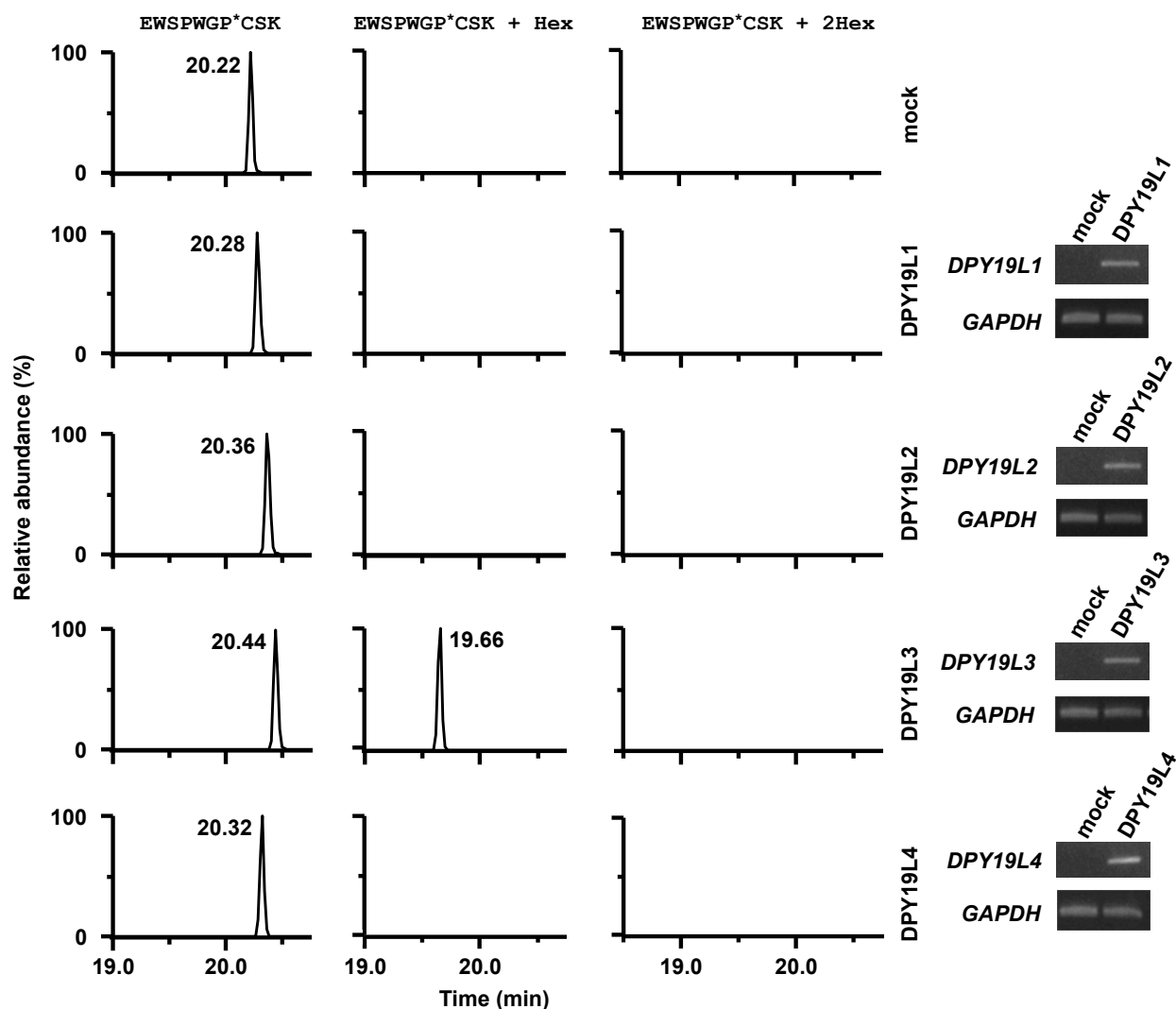
### 第3節 R-spondin1 の C-mannosylation を触媒する酵素の同定

#### 1) S2 細胞を用いた過剰発現実験による検証

近年、線虫において TSR1 ドメイン中のトリプトファン残基に対する C-mannose の転移酵素として、Dpy19 が同定された[50]。しかし、ヒトにおいては未だ C-mannose 転移酵素は同定されていない。線虫の Dpy19 のヒトホモログとしては、DPY19L1~L4 の 4 つのアイソフォームがある。つまり、ヒト Rspo1 の Trp<sup>153</sup> 及び Trp<sup>156</sup> の 2 つの C-mannosylation に関しても、ヒト DPY19L1~L4 のいずれかが触媒する可能性があった。そこで次に、Rspo1 の C-mannosylation を触媒する酵素の同定を試みた。

ショウジョウバエ胚由来の細胞である S2 細胞は、通常 C-mannosylation は起こらないことが報告されている[46]。しかし、S2 細胞に C-mannose 転移酵素を遺伝子導入することで、C-mannosylation を引き起こすことが出来、Buettner らが線虫の Dpy19 が C-mannose 転移酵素であると報告した際にも S2 細胞が用いられている[50]。そこで、S2 細胞にヒト DPY19L1~L4 をそれぞれ遺伝子導入し、抗生物質を用いてセレクションを行うことで、DPY19L1~L4 の各過剰発現細胞を得た。各過剰発現細胞の樹立は、RT-PCR により確認した(Fig. 4-14)。それらの細胞に、ヒト Rspo1 遺伝子を再導入し、その培養上清より Rspo1 を精製した。精製したサンプルは第4章 第1節の LC-MS と同様の方法で解析を行った。まず、DPY19L1~L4 のいずれも発現していない細胞(mock)より Rspo1 を精製し LC-MS 解析を行った結果、未修飾ペプチドのみが観測され、mannose の付加は確認されなかった(Fig. 4-14)。この結果、これまでの報告と一致し、S2 細胞では確かに C-mannosylation が起こらないことが確認された。次に、DPY19L1~L4 の各過剰発現細胞より精製した Rspo1 の LC-MS 解析を行った。その結果、いずれの細胞より精製した Rspo1 も未修飾ペプチドが観測された(Fig. 4-14)。加えて、DPY19L3 の過剰発現細胞より精製した Rspo1 のみ、1 つの mannose の付加が確認された(Fig. 4-14)。2 つの mannose 付加ペプチドに関しては、いずれの細胞より精製した Rspo1 でも検出されなかった(Fig. 4-14)。

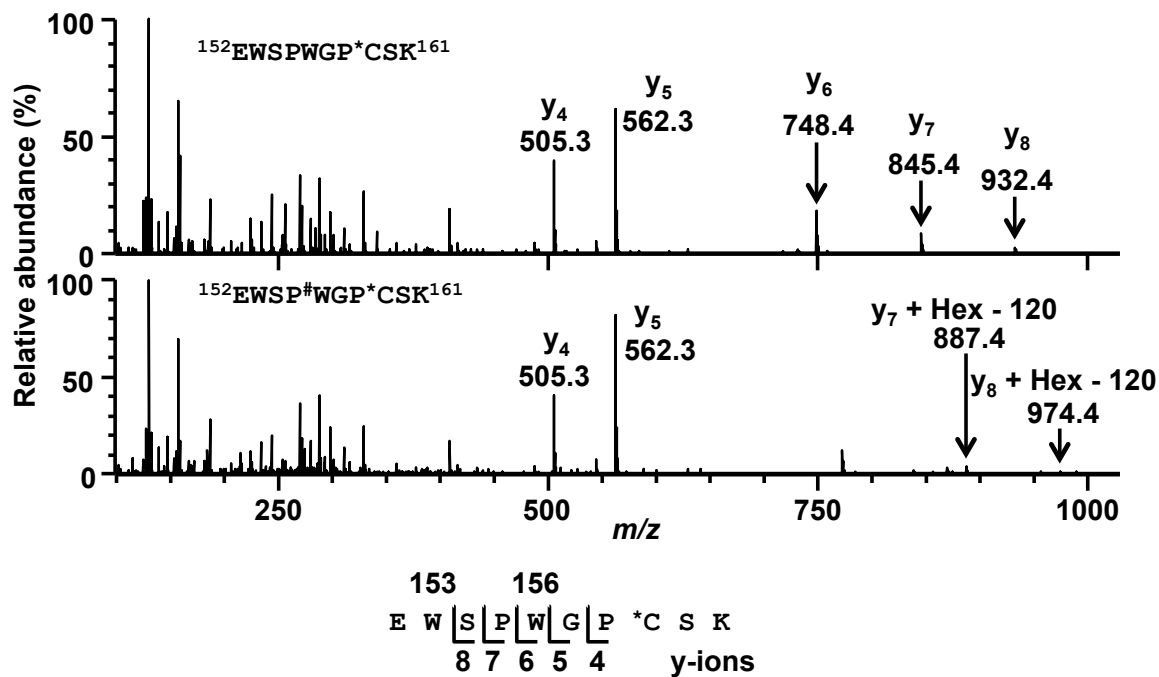




**Fig. 4-14. Identification of DPY19L3 as a C-mannosyltransferase of Rsp1.**

Human DPY19L1-L4- or empty vector (mock)-expressing *Drosophila* S2 cells were transiently transfected with pMT-Rsp1-MH, and protein expression was induced by 200  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> for 72 h. Rsp1-MH protein was purified by tandem affinity chromatography, heparin sepharose, and Ni-NTA agarose. The samples were digested with trypsin and Asp-N, and the resulting peptides were analyzed by LC-MS/MS. Mono-mannosylated peptide was observed only when the protein was synthesized in DPY19L3-expressing S2 cells. \*C indicates propionamide cysteine.

次に、1つの mannose 付加が Trp<sup>153</sup> 及び Trp<sup>156</sup> のどちらで起こっているかを同定するため、MS/MS 解析を行った。MS/MS 解析は、DPY19L3 の過剰発現細胞より精製した Rspo1 の未修飾ペプチド、及び1つの mannose の付加が確認されたペプチドに対し行った。その結果、Fig. 4-15 に示す y-ions が確認された。まず、y5 イオンまでに mannose の修飾による 162 Da の増加が無いことが確認された。また、未修飾ペプチドで観測された y6 イオンが1つの mannose の修飾ペプチドでは観測されなくなったこと、及び y7, y8 イオンでは mannose による 162 Da の増加から cross-ring cleavage による -120 Da を差し引いた、42 Da の増加のピークが観測されたことから、この1つの mannose は Trp<sup>156</sup> に結合していることが確認された(Fig. 4-15)。以上より、Rspo1 の Trp<sup>156</sup> に対する C-mannose 転移酵素として、DPY19L3 が同定された。



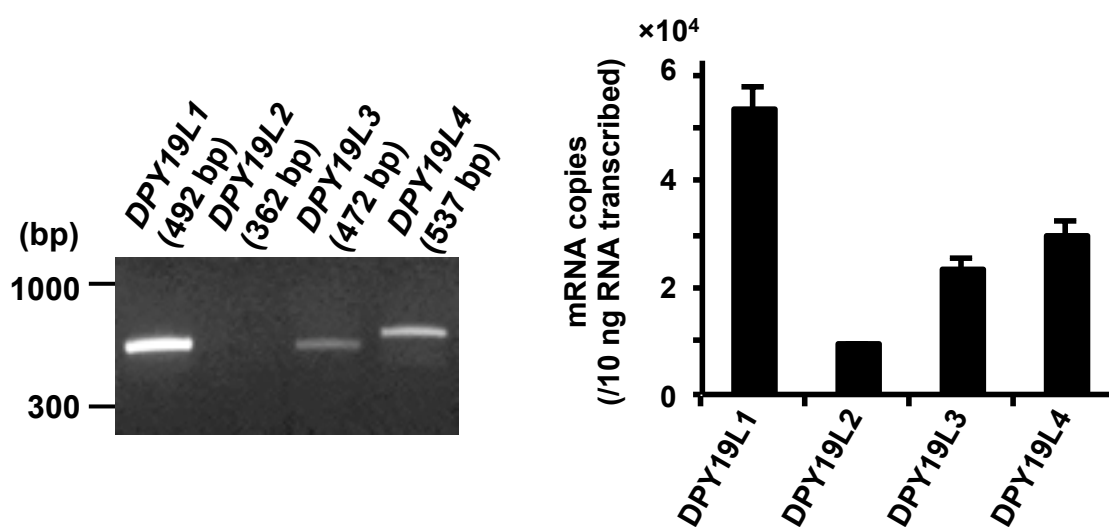
**Fig. 4-15. Identification of DPY19L3-mediated C-mannosylation site of Rsp01.**

Unmannosylated (upper) and mono-mannosylated peptides (lower) derived from DPY19L3-expressing S2 cells were further analyzed by LC-MS/MS. Indicated y-ions were detected, and signals resulting from the characteristic cross-ring cleavages were observed at the  $y_7$  and  $y_8$  ions in mono-mannosylated peptide. #W and \*C indicate C-mannosyltryptophan and propionamide cysteine, respectively.

## 2) siRNA を用いたノックダウン実験による検証

S2 細胞を用いることで Rspo1 の Trp<sup>156</sup> に対する C-mannose 転移酵素として、DPY19L3 が同定された。そこでヒト細胞においても、DPY19L3 が Rspo1 の Trp<sup>156</sup> に対する C-mannose 転移酵素として機能しているか否かを検証した。

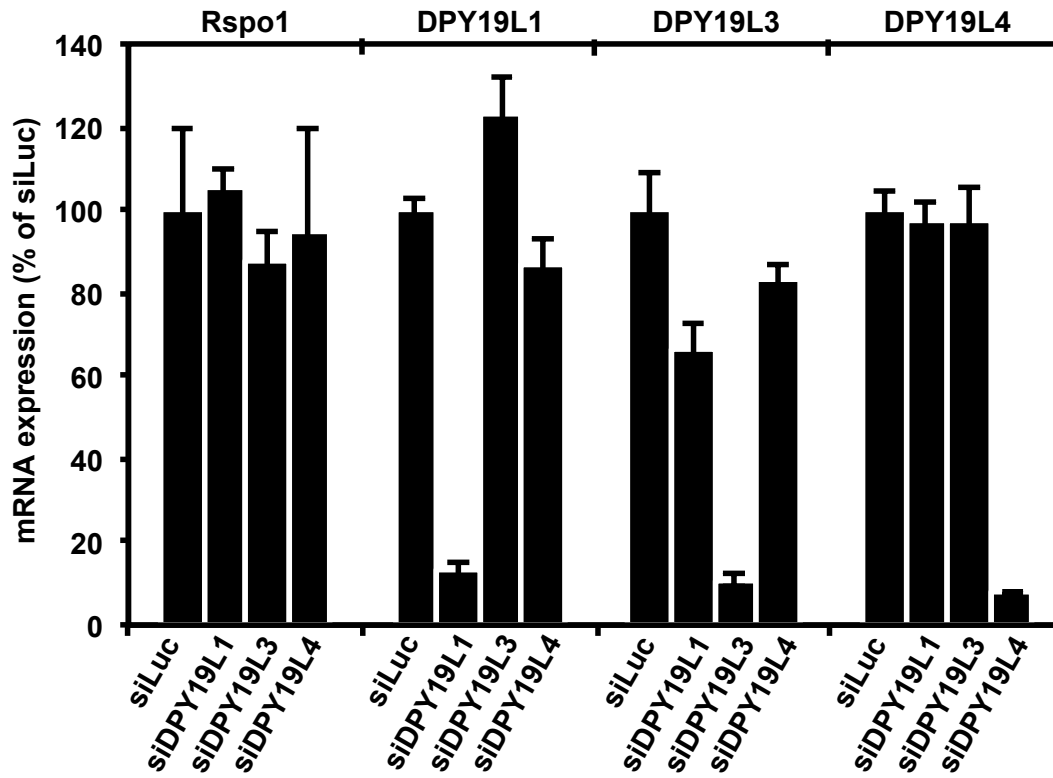
まず、今回樹立した Rspo1 過剰発現 HT1080 細胞における DPY19L1~L4 の mRNA 発現量を RT-PCR で比較した。その結果、DPY19L2 は、その他の DPY19 ファミリー遺伝子と比較し、発現量が低かった(Fig. 4-16)。また、過去の報告から、DPY19L2 は精巣特異的な発現が報告されている[98]。S2 細胞を用いた実験によっても、DPY19L2 は Rspo1 に対する C-mannose 転移酵素ではないことが示唆されており、これらのことを考慮した上で、以後の実験では DPY19L2 は実験対象から除外した。



**Fig. 4-16. Expression of DPY19 members in HT1080-Rspo1-MH cells.**

Total RNA was isolated from HT1080-Rspo1-MH cells, and semi-quantitative (left) and quantitative (right) RT-PCR was performed. Absolute copy number of mRNA transcript per 10 ng of total RNA was calculated by quantitative RT-PCR. DPY19L2 expression was lower versus the others.

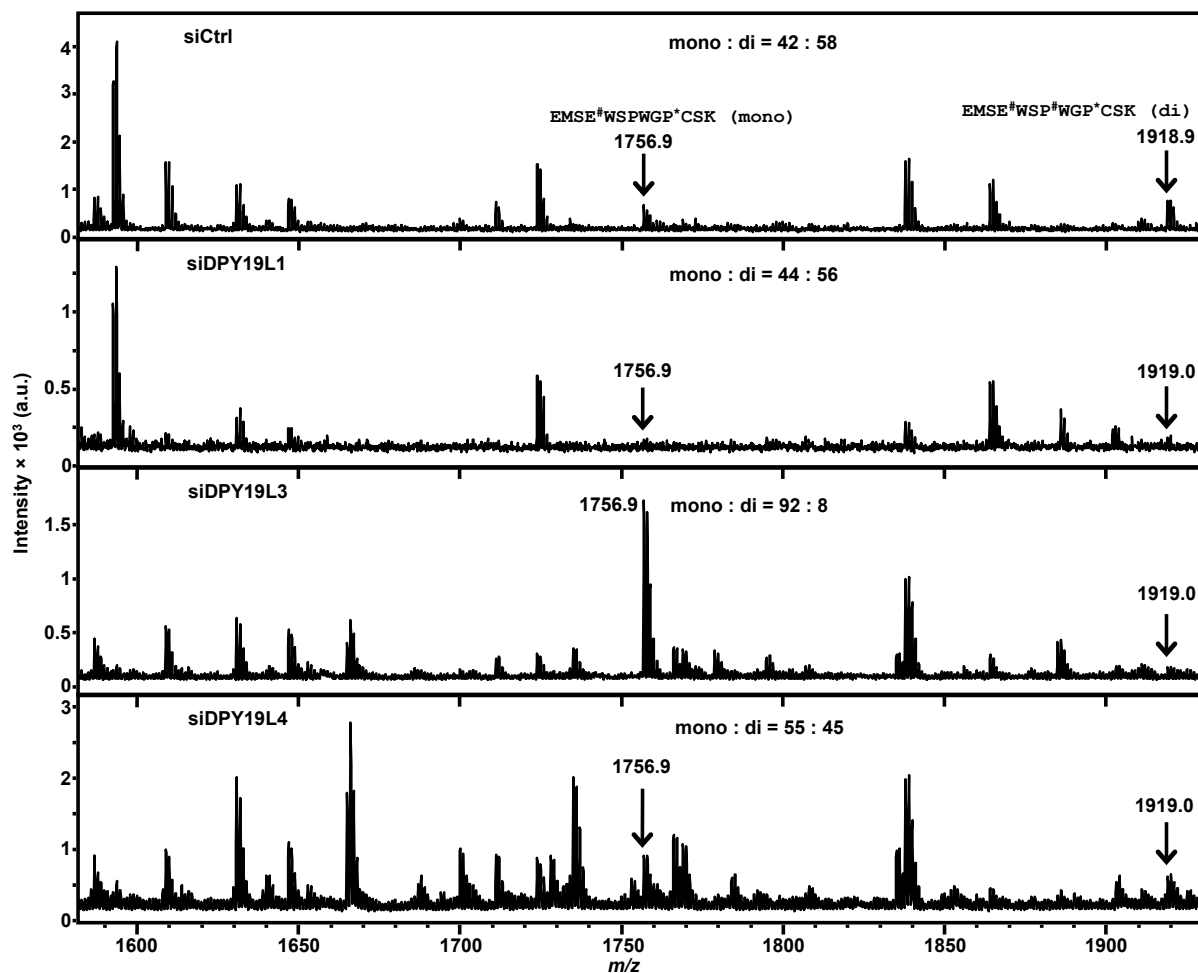
次に DPY19L1、DPY19L3、DPY19L4 をノックダウンした細胞の培養上清より Rspo1 を精製し MS 解析を行うことで、Trp<sup>156</sup> の C-mannosylation が減少するか否かを評価した。まず、各 siRNA を処理した細胞において、それぞれの遺伝子が特異的にノックダウン出来ているかを、RT-PCR により確認した。その結果、それぞれ標的とする遺伝子を特異的にノックダウンすることが出来た(Fig. 4-17)。その条件下において、各 siRNA を処理した細胞の培養上清より精製した Rspo1 の MALDI-TOF MS 解析を行った。第 4 章 第 1 節で LC-MS により確認された結果と同様、全てのサンプルにおいて Trp<sup>153</sup> のみが C-mannosylation されたペプチド(mono)と Trp<sup>153</sup> と Trp<sup>156</sup> の 2 ヶ所が C-mannosylation されたペプチド(di)の 2 種類のピークが観測された(Fig. 4-18)。またその 2 種類のピークを、ピーク面積により定量し比較した結果、siLuc 処理では mono: di は 42: 58 であったのに対し、siDPY19L1 及び siDPY19L4 処理では 44: 56、55: 45 と、大きく変化することは無かった(Fig. 4-18)。それに対し、siDPY19L3 処理では mono: di は 92: 8 と大きく変化し、Trp<sup>156</sup> が C-mannosylation されたペプチドが大きく減少した(Fig. 4-18)。以上のことから、ヒト細胞においても、DPY19L3 が Rspo1 の Trp<sup>156</sup> に対する C-mannose 転移酵素として機能していることが明らかとなった。



**Fig. 4-17. Knockdown of DPY19L1, DPY19L3, and DPY19L4.**

Total RNA was isolated from each cell line, and quantitative RT-PCR was performed.

Significant knockdown efficiency was observed for each siRNA against its target gene.



**Fig. 4-18. Identification of *C*-mannosyltransferase of *Rspo1* in human cells.**

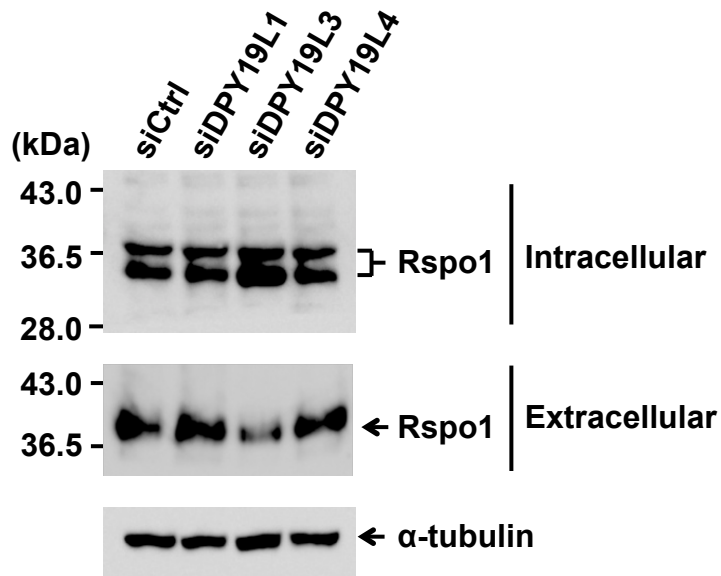
HT1080-*Rspo1*-MH cells were treated with the indicated siRNAs, and conditioned media were collected. Recombinant *Rspo1* was purified with Ni-NTA agarose, and the samples were digested with trypsin and Asp-N. The resulting peptides were analyzed by MALDI-TOF MS. siDPY19L3 changed the ratio of 2 peptides compared with siCtrl: the signal intensity from the di-mannosylated peptide at  $W^{153}$  and  $W^{156}$  ( $m/z$  1919.0) declined, although that of the mono-mannosylated peptide at  $W^{153}$  ( $m/z$  1756.9) increased. #W and \*C indicate *C*-mannosyltryptophan and propionamide cysteine, respectively. The ratio of mono-mannosylated: di-mannosylated *Rspo1* was calculated from each peak area.

#### 第4節 DPY19L3の触媒するR-spondin1のC-mannosylationが分泌に与える影響

第4章第2節1)及び4)において、Rspo1のC-mannosylationは分泌に重要であることを示した。また、第4章第3節では、Rspo1のTrp<sup>156</sup>のC-mannose転移酵素としてDPY19L3を同定した。そこで、DPY19L3によるRspo1のTrp<sup>156</sup>のC-mannosylationがRspo1の分泌に与える影響を評価した。

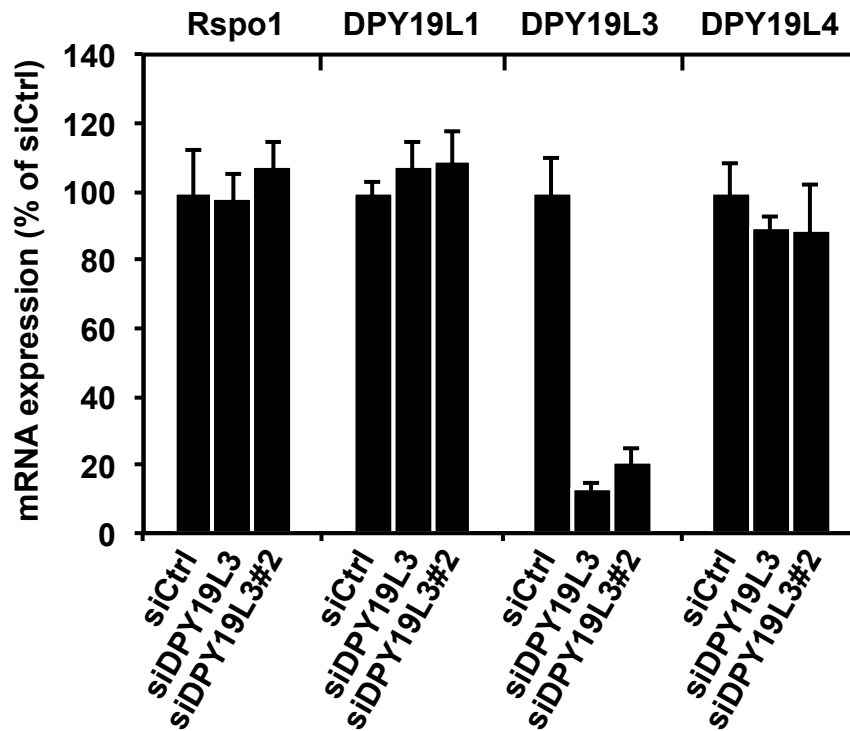
まず、Fig. 4-17で使用したsiRNAsを用いて各遺伝子をノックダウンし、Rspo1の分泌に与える影響を評価した。その結果、siLucと比較し、siDPY19L1及びsiDPY19L4の処理では分泌量に変化はなく、一方siDPY19L3の処理ではRspo1の分泌は顕著に減少した(Fig. 4-19)。さらにオフターゲット効果を考慮し、siDPY19L3とは別の配列を有する、DPY19L3に対するsiRNA(siDPY19L3#2)を追加し、同様の実験を行った。それぞれのsiRNAが、DPY19L3を特異的にノックダウン出来ているかをRT-PCRにより確認した結果、それぞれsiRNAはDPY19L3のみを効果的にノックダウンした(Fig. 4-20)。そこで、これらのsiRNAを処理した際のRspo1の分泌に与える影響を評価した。その結果、どちらのsiDPY19L3を処理した際でも、同様にRspo1の分泌は顕著に減少した(Fig. 4-21)。以上の結果から、DPY19L3によるRspo1のTrp<sup>156</sup>のC-mannosylationが、Rspo1の分泌に重要であることが示された。





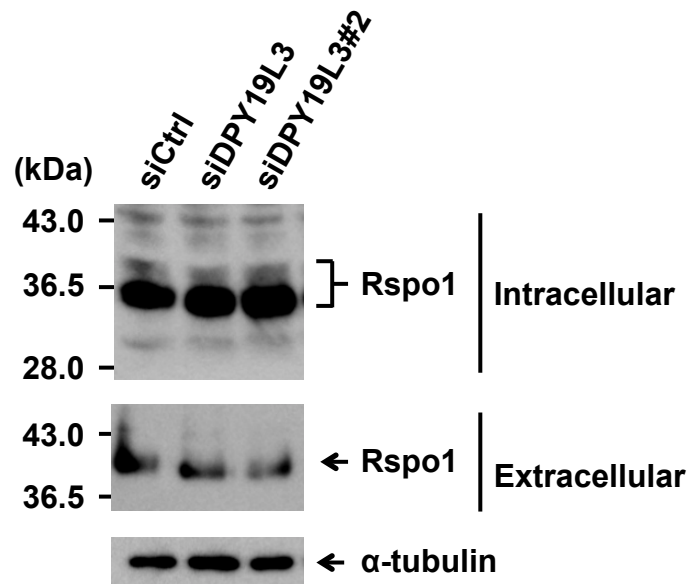
**Fig. 4-19. Effect of knockdown of DPY19L1, DPY19L3, or DPY19L4 on Rspo1 secretion.**

HT1080-Rspo1-MH cells were treated with the indicated siRNAs, and cell lysates and conditioned media were electrophoresed and immunoblotted with the indicated antibodies.



**Fig. 4-20. Knockdown of DPY19L3.**

HT1080-Rspo1-MH cells were treated with the indicated siRNAs. Total RNA was isolated from each cell line, and quantitative RT-PCR was performed. Significant knockdown efficiency was observed for each siRNA against its target gene.



**Fig. 4-21. Effect of knockdown of DPY19L3 on Rspo1 secretion.**

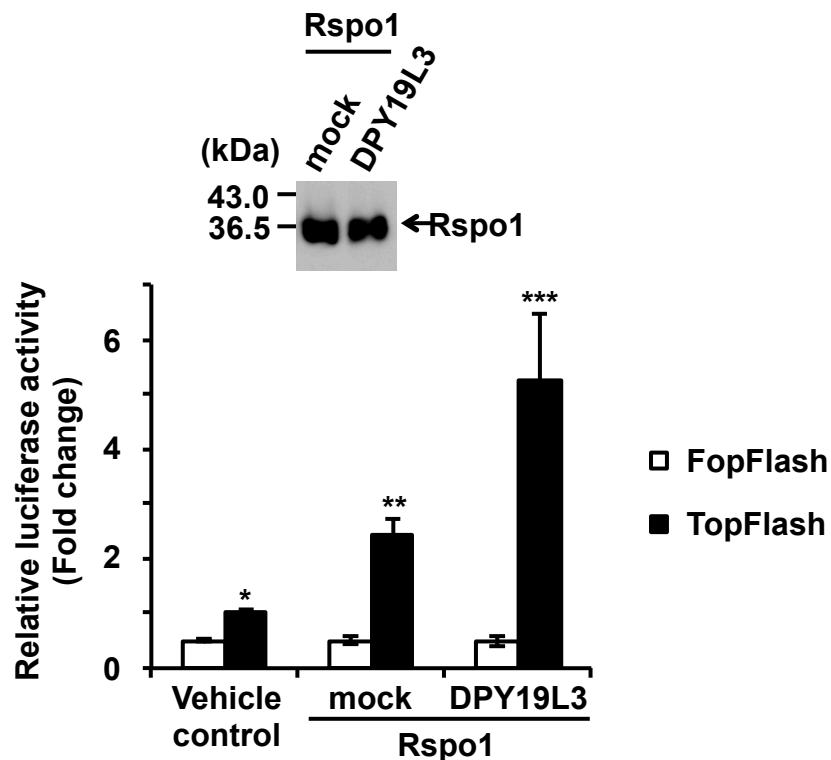
HT1080-Rspo1-MH cells were treated with the indicated siRNAs. Each cell line was cultured, and cell lysates and conditioned media were electrophoresed and immunoblotted with the indicated antibodies.

## 第5節 DPY19L3の触媒するR-spondin1のC-mannosylationがWnt/ $\beta$ -catenin シグナル増強活性に与える影響

第4章第2節5)において、C-mannosylationの起こらない変異体であるRspo1/2WAを用いることで、Rspo1のC-mannosylationはそのWnt/ $\beta$ -cateninシグナル増強活性に重要であることを示した。しかし、これは2ヶ所のTrpをAlaに変異させたことによる影響の可能性を否定できない。そこで、この可能性を除外するため、以下に示す2種類の方法で検討を行った。

### 1) S2細胞を用いた過剰発現実験による検証

第4章第3節1)で示したように、ショウジョウバエ胚由来であるS2細胞を用いることで、C-mannosylationの起こっていないRspo1を作製でき、またS2細胞にDPY19L3を導入することで、Trp<sup>156</sup>のみC-mannosylationされたRspo1を作製できる(Fig. 4-14, 4-15)。そこで、これらを精製し、等量のRspo1を用いることで、DPY19L3によるRspo1のTrp<sup>156</sup>のC-mannosylationがWnt/ $\beta$ -cateninシグナル増強活性に与える影響を評価した。第4章第2節5)と同様の方法で評価した結果、DPY19L3を過剰発現したS2細胞より精製したRspo1は、mockと比較し、有意に活性が増加した(Fig. 4-22)。以上のことから、DPY19L3によるRspo1のTrp<sup>156</sup>のC-mannosylationがWnt/ $\beta$ -cateninシグナル増強活性に重要であることが示された。

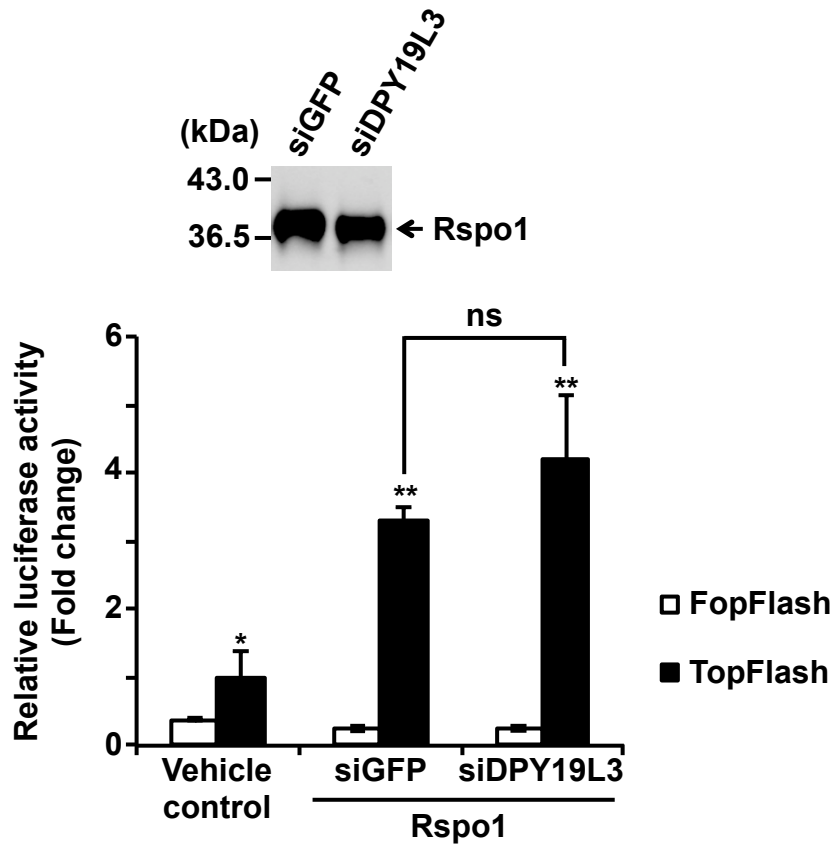


**Fig. 4-22. Effect of C-mannosylation of Rspo1 at W<sup>156</sup> on Wnt signaling enhancing activity.**

Recombinant Rspo1 proteins produced by mock- or DPY19L3-transfected S2 cells were purified, and the amounts of proteins were equalized by western blot (inset). 293T cells were transfected with TopFlash or FopFlash in the presence of 10% Wnt3a-conditioned medium and treated with equal amounts of purified Rspo1 proteins. After 24 h, luciferase activities were measured and normalized to *Renilla* luciferase. C-mannosylated Rspo1 at W<sup>156</sup> (produced by DPY19L3-expressing S2 cells) had increased activity compared with non-C-mannosylated Rspo1 (produced by mock-transfected S2 cells). Data shown are means  $\pm$  s.d. \*,  $P < 0.05$  compared with FopFlash of vehicle control treatment. \*\*,  $P < 0.05$  compared with TopFlash of vehicle control treatment. \*\*\*,  $P < 0.05$  compared with TopFlash of vehicle control and mock-produced Rspo1 treatments.

## 2) siRNA を用いたノックダウン実験による検証

第4章 第3節 2)で示したように、DPY19L3 に対する siRNA を処理した細胞の培養上清より精製した Rspo1 は、主に Trp<sup>153</sup> のみが C-mannosylation されている(Fig. 4-18)。そこで、各 siRNA を処理した細胞の培養上清より Rspo1 を精製し、等量の Rspo1 を用いることで、DPY19L3 による Rspo1 の Trp<sup>156</sup> の C-mannosylation が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル増強活性に与える影響を評価した。第4章 第2節 5)と同様の方法で評価した結果、DPY19L3 をノックダウンした細胞より精製した Rspo1 はコントロールと比較し、活性に変化はなかった(Fig. 4-23)。つまり、Trp<sup>153</sup> のみが C-mannosylation された Rspo1 は、2ヶ所共に C-mannosylation された Rspo1 と同等の活性を有していた。以上の結果と前項の結果を踏まえると、Rspo1 の Trp<sup>153</sup> と Trp<sup>156</sup> の2ヶ所の C-mannosylation の内、いずれか片方が C-mannosylation されていることが、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル増強活性に重要であることが示唆された。



**Fig. 4-23. Effect of C-mannosylation of Rspo1 at W<sup>153</sup> on Wnt signaling enhancing activity.**

HT1080-Rspo1-MH cells were treated with siGFP or siDPY19L3, and conditioned media from each cell was collected. Rspo1 proteins were purified from the conditioned media of siGFP- or siDPY19L3-treated cells, and the amounts of proteins were equalized by western blot (inset). 293T cells were transfected with TopFlash or FopFlash in the presence of 10% Wnt3a-conditioned medium and treated with equal amounts of purified Rspo1 proteins. After 24 h, luciferase activities were measured and normalized to *Renilla* luciferase. W<sup>153</sup>-C-mannosylated Rspo1 (produced by siDPY19L3-treated cells) had almost same activity compared with wild-type Rspo1 (produced by siGFP-treated cells). Data shown are means  $\pm$  s.d. \*,  $P < 0.05$  compared with FopFlash of vehicle control treatment. \*\*,  $P < 0.05$  compared with TopFlash of vehicle control treatment. ns, not significant.

## 第6節 まとめ

第4章では、ヒト Rspo1 を過剰発現した細胞を用いて、Rspo1 の C-mannosylation について解析を行った。Rspo1 過剰発現細胞より精製したリコンビナントタンパク質の LC-MS による解析から、分泌された全ての Rspo1 は、Trp<sup>153</sup>のみ、あるいは Trp<sup>153</sup>と Trp<sup>156</sup>の2ヶ所が C-mannosylation されることを初めて明らかにした。また、C-mannosylation が Rspo1 の機能に与える影響を評価した。C-mannosylation の起こる Trp<sup>153</sup>及び Trp<sup>156</sup>の2ヶ所の Trp 残基を Ala に変異させた 2WA 変異体を用いた実験や Lec15.2 細胞を用いた実験から、Rspo1 の C-mannosylation が、Rspo1 の細胞内輸送、細胞外への分泌、Wnt シグナルの増強活性に重要であることを明らかにした。さらに、線虫における C-mannose 転移酵素として Dpy19 が報告されたことから、そのヒトホモログである DPY19L1~L4 の中に Rspo1 の Trp<sup>153</sup>及び Trp<sup>156</sup>の C-mannose 転移酵素が存在するのではと考え、C-mannosylation の起こらない S2 細胞を用いて検討を行った。その結果、ヒト Rspo1 の Trp<sup>156</sup>に対する C-mannose 転移酵素として DPY19L3 を同定した。さらに、DPY19L3 をノックダウンした細胞の培養上清から精製した Rspo1 でも、Trp<sup>156</sup>の C-mannosylation の減少が MALDI-TOF MS で確認された。最後に、DPY19L3 をノックダウンした際の Rspo1 の分泌量を評価した結果、Rspo1 の分泌は 2WA 変異体と同様に減少した。つまり、Rspo1 の Trp<sup>156</sup>の C-mannosylation は DPY19L3 により触媒され、その C-mannosylation が Rspo1 の分泌を制御していることが考えられる。



## 第4章の実験方法

### 1) 細胞培養

ヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞及びヒト胎児腎臓上皮由来 293T 細胞は、DMEM に 10% (v/v) FBS、100 units/mL penicillin G、100 mg/L kanamycin、600 mg/L L-glutamine、2.25 g/L NaHCO<sub>3</sub> を添加した培地を使用し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-K1 細胞及びその亜株 Lec15.2 細胞は、Ham's F-12K に 5% (v/v) FBS、100 units/mL penicillin G、100 mg/L kanamycin、2.5 g/L NaHCO<sub>3</sub> を添加した培地を使用し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

ショウジョウバエ胚由来 S2 細胞は Schneider's *Drosophila* medium (Life Technologies) に 10% (v/v) 非働化 FBS、100 units/mL penicillin G、100 mg/L kanamycin を添加した培地を使用し、25°C で培養した。

### 2) 過剰発現プラスミドの構築

Rspol1 遺伝子は、ヒト前立腺癌由来 PC3 細胞の cDNA ライブラリより増幅した。myc タグ及び his<sub>6</sub> タグの C 末端への導入は、適したプライマーを使用し PCR 法により行った。myc タグ及び his<sub>6</sub> タグの配列は、以下に示す通りである。

myc: GAACAAAACATCATCTCAGAAGAGGATCTG

his<sub>6</sub>: CATCATCACCATCACCAT

Rspol1-myc-his<sub>6</sub> (Rspol1-MH) 遺伝子は、pCI-neo ベクター(Promega)にサブクローニングを行った。また、Rspol1-MH の変異体(W153A/W156A (2WA))の作製は、以下に示すプライマーを用いて PCR 法により行った。

W153A: 5'-GTGAAATGAGCGAGGCGTCTCCGTGGGGGC-3' (forward)

5'-GCCCCACGGAGACGCCTCGCTCATTTAC-3' (reverse)

W156A: 5'-GTCTCCGGCGGGGCCCTGC-3' (forward)

5'-GCAGGGCCCCGCCGGAGAC-3' (reverse)

S2 細胞への過剰発現用には、Rspol1-myc を PCR 増幅し、pMT-PURO (RIKEN

BioResource Center)にサブクローニングを行った[99]。

ヒト DPY19L1, DPY19L3, DPY19L4 遺伝子は、HT1080 細胞の cDNA ライブラリより増幅した。またヒト DPY19L2 遺伝子は、PC3 細胞の cDNA ライブラリより増幅した。それぞれの遺伝子の C 末端には myc タグを PCR により導入し、pIZ ベクター(LifeTechnologies)にサブクローニングを行った。

### 3) 過剰発現細胞の樹立

HT1080 細胞に各プラスミドを Lipofectamine LTX (LifeTechnologies)を用いて遺伝子導入し、400 µg/mL の G418(Roche Applied Sciences)で選択培養を行った。およそ 2 週間の選択培養後、限界希釈法を用いて各クローン細胞 (HT1080-Rspo1-MH, HT1080-Rspo1/2WA-MH)を樹立した。

### 4) Western blot

細胞に lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)を加え超音波処理を行うことで細胞を溶解した。細胞溶解液は Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 (Bio-Rad Laboratories)を用いてタンパク質濃度を定量し、各サンプル濃度を揃えた。各サンプルに 5 分の 1 量の loading buffer (350 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% glycerol, 0.012% bromophenol blue, 6% SDS, and 30% 2-mercaptoethanol)を加え、98°C、3 分の熱処理後、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。タンパク質を PVDF 膜に転写後、5%スキムミルクでブロッキングを行った。1 次抗体には、抗 c-myc 抗体(#C3956; sigma)あるいは抗  $\alpha$ -tubulin 抗体(#T5168; Sigma)を用いた。また、2 次抗体には HRP 標識抗 mouse IgG 抗体(Amersham Biosciences)あるいは HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体(Amersham Biosciences)を用い、発色には Immobilon Western (Millipore Corporation)を用いた。発光検出には、LAS4000 mini (GE healthcare)を使用した。

#### 5) Rspo1 の細胞外分泌の検出

各細胞に 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のヘパリンを処理し、無血清培地で 24 時間培養することで、細胞外へと分泌し細胞膜のヘパラン硫酸と結合した Rspo1 を遊離させた。24 時間後、培養上清を回収し、4)に従い western blot を行うことで、分泌した Rspo1 を検出した。

#### 6) Rspo1 の細胞外からの精製

HT1080-Rspo1-MH 細胞を大量培養し、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のヘパリンを添加した無血清培地で 24 時間培養した。24 時間後、回収した培養上清のタンパク質を硫酸沈殿により沈殿させ、PBS に再溶解した。ここに 8M の尿素を加え、さらに Ni-NTA agarose を加えて Rspo1-MH を Ni-NTA agarose に結合させた。結合後、Ni-NTA agarose を buffer A (900 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 20 mM imidazole) でビーズをよく洗浄後、500 mM の imidazole を添加した buffer A で溶出を行った。精製の確認は、サンプルを SDS-PAGE で分離後、CBB R-250 で染色することで行った。

#### 7) LC-MS 解析

精製したサンプルを SDS-PAGE により分離し、CBB 染色を行った。CBB 染色後、タンパク質バンドをゲルから切り出し、0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 中、37°C で 12 時間、0.05  $\mu\text{g}$  の Asp-N (sequencing grade, Roche) と trypsin (TPCK-treated, Worthington Biochem. Co.) を処理することでペプチド断片化を行い、続けて還元プロピオンアミド化を行った。このペプチド断片混合物を nano ESI spray column (NTCC analytical column, C18,  $\phi 75 \mu\text{m} \times 100 \text{mm}$ , 3  $\mu\text{m}$ , Nikkyo Technos Co., Ltd.) を用いて nanoflow LC (Easy nLC, Thermo Fisher Scientific) により分離し、続けて nanospray でイオン化して Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) で検出した。

#### 8) CHO-K1 細胞及び Lec15.2 細胞を用いた一過性過剰発現

CHO-K1 細胞及び Lec15.2 細胞に pCI-neo-Rspo1/N137Q-MH プラスミド[97]を Lipofectamine LTX を用いて遺伝子導入した。6 時間後、各細胞を PBS で洗浄し、50 µg/mL のヘパリンを添加した無血清培地で 18 時間培養することで、Rspo1/N137Q を細胞外へと分泌させた。遺伝子導入から 24 時間後、培養上清を回収し、4)に従い western blot を行うことで、分泌した Rspo1/N137Q を検出した。

#### 9) RT-PCR

RNA は Trizol (LifeTechnologies)を用いて細胞より抽出した。2 µg の RNA を使用し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いて逆転写を行った。PCR 増幅には Quick Taq HS DyeMix(Toyobo)を使用した。Semi-quantitative RT-PCR に用いたプライマー、サイクル数、アニーリング温度は Table 4-1 に示す。

**Table 4-1. The sequences of the primers, annealing temperature, and the number of cycles for semi-quantitative RT-PCR.**

Target gene	Primer sequence	Annealing temperature	Number of cycles
Rspo1	5'-CTCTGCTCTGAAGTCAACGG-3' (forward)	63°C	25
	5'-GTGATGGTGATGATGCAGATCCTCTTCTGAGATGAG-3' (reverse)		
DPY19L1	5'-GGCATCACTGATCTGCTCAA-3' (forward)	60°C	25
	5'-AAGGGAGTTTTCCAGCATT-3' (reverse)		
DPY19L2	5'-ATGAGAAAACAAGGAGTAAGCTCAAAGCGG-3' (forward)	60°C	25
	5'-CAATGAAAATTGCCACAAAGACAG-3' (reverse)		
DPY19L3	5'-AGTTCTGGCCAGGAATGATG-3' (forward)	60°C	25
	5'-ACGTAGGGAGGCAGGTTTCT-3' (reverse)		
DPY19L4	5'-GCCAATTGCTGCACTTACA-3' (forward)	60°C	25
	5'-GCAGGGATTCTTGACAGAGG-3' (reverse)		
β-actin	5'-CTTCTACAATGAGCTGCGTG-3' (forward)	58°C	20
	5'-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3' (reverse)		
GAPDH2	5'-GTCCTATGATGAAATTAAGGCCAAG-3' (forward)	60°C	25
	5'-GTCGTACCAAGAGATCAGCTTCAC-3' (reverse)		

また、quantitative RT-PCR は KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を使用し、ABI 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems)を用いて行った。Quantitative RT-PCR に用いたプライマー及びアニーリング温度を Table 4-2 に示す。

**Table 4-2. The sequences of the primers and annealing temperature for quantitative RT-PCR.**

Target gene	Primer sequence	Annealing temperature
Rspo1	5'-CTCTGCTCTGAAGTCAACGG-3' (forward)	63°C
	5'-CACTCGCTCATTTCACATTG-3' (reverse)	
DPY19L1	5'-GGCATCACTGATCTGCTCAA-3' (forward)	60°C
	5'-AAGGGAGTTTTCCAGCATT-3' (reverse)	
DPY19L2	5'-GAAAAGGCTTGGAGCTAGAGGTG-3' (forward)	60°C
	5'-GATGAGAGGTGAGAGAAATGACGA-3' (reverse)	
DPY19L3	5'-CCCTGAAATATGGGAGTTACTTCTG-3' (forward)	60°C
	5'-CACAGCCTTTCTTGAGTGTTAG-3' (reverse)	
DPY19L4	5'-GCCAAATTGCTGCACTTACA-3' (forward)	60°C
	5'-GCAGGGATTCTTGACAGAGG-3' (reverse)	
β-actin	5'-CTTCTACAATGAGCTGCGTG-3' (forward)	58°C
	5'-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3' (reverse)	

#### 10) 免疫蛍光染色

各細胞はカバーガラス上で培養した。細胞を固定化後、0.1% Triton X-100 を用いて膜透過処理を行い、3% BSA でブロッキングを行った。Rspo1-MH の染色には1次抗体として抗 c-myc 抗体(#sc-40; Santa Cruz Biotechnology あるいは#C3956; sigma)を使用した。ゴルジ体局在の確認には、1次抗体として抗 GRASP65 抗体(#sc-30093; Santa Cruz Biotechnology)を用いた。ER 局在の確認には、1次抗体として抗 KDEL 抗体(#ADI-SPA-827; Enzo Life Sciences)を用いた。各1次抗体に対する2次抗体として、Alexa Fluor488-conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes) あるいは Alexa Fluor568-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes)を使用した。核染色には2 μg/mL の Hoechst 33258 (Polysciences, Inc.)を用いた。

#### 11) Luciferase assay

Luciferase assay には、Rspo1 の過剰発現より精製したリコンビナントタンパク質を使用した。まず、各細胞を大量培養し、無血清培地に 1% (v/v) heparin sepharose 6 fast flow (GE Healthcare)を添加し、24 時間培養した。24 時間後、回収

した heparin sepharose を PBS でよく洗浄し、buffer A (900 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 20 mM imidazole)を用いて Rspo1 を溶出した。これに Ni-NTA agarose (Qiagen)を加え、Rspo1-MH を Ni-NTA agarose に結合させた。Ni-NTA agarose に結合させた Rspo1-MH は、buffer A でビーズを 3 回洗浄後、500 mM の imidazole を添加した buffer A で溶出を行った。これを VIVASPIN 500 (Sartrius)を用いて限外濾過を行うことで、タンパク質の濃縮と PBS へのバッファー交換を行った。タンパク質濃度は western blot を行うことで、調製した。

次に、293T 細胞に Super 8×TopFlash (Addgene plasmid 12456)あるいは Super 8×FopFlash (Addgene plasmid 12457)[100]と phRL-TK ベクター(Promega)を共発現させ、10% (v/v) Wnt3a conditioned medium[101]存在下、等量のリコンビナント Rspo1 を処理した。24 時間後細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

## 12) S2 細胞に発現させた Rspo1 の精製

S2 細胞に対し、pIZ (mock)、pIZ-DPY19L1 (DPY19L1)、pIZ-DPY19L2 (DPY19L2)、pIZ-DPY19L3 (DPY19L3)、pIZ-DPY19L4 (DPY19L4)を FuGENE HD Transfection Reagent (Promega)を用いて遺伝子導入した。その後 150 µg/mL の Zeocin (LifeTechnologies)で選択培養を行った。およそ 2 週間の選択培養により、各 DPY19 ファミリー遺伝子の過剰発現細胞を得た。

次にこれらの過剰発現細胞に対し、pMT-Rspo1-MH を同様に遺伝子導入し、6 時間後に無血清培地へと交換すると同時に、200 µM の CuSO<sub>4</sub> で Rspo1-MH の発現誘導を行った。72 時間後、各細胞の培養上清から 11)に示した方法に従って、Rspo1-MH タンパク質を精製した。その後の LC-MS 解析は、7)と同様の手法で行った。Luciferase assay は、同様の手法で精製した Rspo1 を用い、western blot でタンパク質濃度を調製後、11)に示した手法に従って行った。

## 13) DPY19 ファミリー遺伝子のノックダウン

HT1080-Rspo1-MH 細胞に対し、20 nM の siRNA を Lipofectamine RNAiMAX (LifeTechnologies)を用いて導入した。siRNA の導入効率は、9)の RT-PCR に従い

確認を行った。使用した siRNA の配列を以下に示す。

siLuc, CGUACGCGGAUACUUCGAdTdT

siDPY19L1, GCACUUCGGCCCAUUGUGAdTdT

siDPY19L3, GGAUAUGUAUAAUGCGAUAdTdT

siDPY19L3#2, GAAACUGCCUACAACUUAAdTdT

siDPY19L4, GGUGUGUACUCUGACAAUAdTdT

siGFP (#AM4626)は Applied Biosystems より市販品を購入した。

#### 14) DPY19 ファミリーノックダウン細胞からの Rspo1 の精製

13)の方法に従って DPY19 ファミリーをノックダウンした細胞を大量培養し、6)に示した方法に従って Rspo1 を精製した。精製したサンプルは次に示す方法で MALDI-TOF MS 解析した。

#### 15) MALDI-TOF MS

精製したサンプルを SDS-PAGE により分離し、CBB 染色を行った。CBB 染色後、タンパク質バンドをゲルから切り出し、0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 中、37°C で 12 時間、0.05 µg の sequencing-grade modified trypsin (Promega)と Asp-N (Roche Diagnostics)を処理することでペプチド断片化を行い、続けて還元プロピオンアミド化を行った。その後、Zip TipC18µ (Millipore Corporation)を用いて脱塩化し、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid をマトリックスとして使用し、ultrafleXtreme TOF/TOF MS (Bruker Daltonics)を用いて質量分析を行った。

## 第5章 総括

糖鎖は、様々なタンパク質に翻訳後修飾として結合することで、タンパク質のフォールディングや安定性、分泌など、様々な機能を制御している。つまり、タンパク質の機能を理解し、制御する上では、糖鎖修飾の機能解析は必要不可欠である。ヒトゲノムの解読完了に伴い、ポストゲノム研究としてプロテオミクス解析が盛んに行われるようになり、タンパク質の機能理解は進んでいる。その流れは糖タンパク質にも広がり、網羅的に糖タンパク質を解析するグライコプロテオミクス研究も進みつつある。しかし、糖タンパク質の解析技術の開発は発展途上である。特に、糖鎖修飾には *N* 型、*O* 型、*C* 型、GPI アンカー型と 4 種類が存在し、糖鎖を構成する糖も一様でない場合が多いことから、特定の糖鎖修飾に焦点を当てた解析を行うことで、初めて発見することが出来る場合も多い。そこで著者は、*N* 型、*O* 型、*C* 型の 3 つの糖鎖修飾に着目し、それぞれの糖鎖修飾の標的候補タンパク質について、糖鎖修飾の有無の解析とその機能に及ぼす影響について評価した。異なる 3 種類の糖鎖修飾について解析を行うことで、糖鎖修飾全般について理解を深め、糖鎖生物学の発展に貢献するだけでなく、各糖鎖修飾が持つ機能の類似点・相違点についての考察が期待された。本研究は、3 種類の分泌型タンパク質における、異なる 3 種類の糖鎖修飾の解析とその機能評価に関するものであり、研究結果を要約すると次のようになる。

- 1) ヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞にヒト CTSV を過剰発現させた過剰発現細胞を樹立し、*N*-glycosylation の有無についてその阻害剤である TM による解析を行った結果、CTSV の *N*-glycosylation が示唆された。また、精製した CTSV を MALDI-TOF MS, MS/MS 解析した結果、CTSV は Asn<sup>221</sup> と Asn<sup>292</sup> の 2 ヶ所で *N*-glycosylation されていることを明らかにした。
- 2) CTSV の Asn<sup>221</sup> 及び Asn<sup>292</sup> を Gln に変異させた N221Q、N292Q、及び 2NQ (N221Q/N292Q) 変異体の過剰発現細胞を樹立し、各変異体の *N*-glycosylation の有無について TM を用いた解析を行った結果、N221Q 及び N292Q 変異体



は、互いにもう一方の *N*-glycosylation は保持されていることが示された。つまり、それぞれの *N*-glycosylation は互いに干渉し合わないことが示唆された。また、2NQ 変異体過剰発現細胞に対し TM を処理しても、SDS-PAGE における CTSV タンパク質の移動度が変化しなかったことから、CTSV は Asn<sup>221</sup> 及び Asn<sup>292</sup> 以外に *N*-glycosylation されていないことが示された。

- 3) CTSV の各過剰発現細胞を用いて、CTSV の *N*-glycosylation がその機能に与える影響を評価した結果、CTSV の *N*-glycosylation はリソソームへの輸送、細胞外への分泌、さらには酵素活性に対し重要な役割を担っていることが示唆された。また、今回評価した CTSV のいずれの機能に対しても、CTSV の Asn<sup>221</sup> と Asn<sup>292</sup> の *N*-glycosylation の内、特に Asn<sup>292</sup> の *N*-glycosylation が各機能に対し大きく影響していたことから、Asn<sup>292</sup> の *N*-glycosylation が CTSV の機能発現に必須であることが示唆された。
- 4) HT1080 細胞にヒト CCN1 を過剰発現させた過剰発現細胞を樹立し、その過剰発現細胞の培養上清から精製した CCN1 の *O*-fucosylation の有無について MALDI-TOF MS, MS/MS 解析を行った結果、*O*-fucosylation されていないペプチド断片は検出されず、fucose 単糖、あるいは fucose-glucose 二糖で修飾されたペプチド断片が検出されたことから、分泌された全ての CCN1 は Thr<sup>242</sup> において *O*-fucosylation されていることを明らかにした。
- 5) CCN1 の Thr<sup>242</sup> を Ala に変異させた T242A 変異体の過剰発現細胞を樹立し、野生型過剰発現細胞と比較することで、CCN1 の *O*-fucosylation がその機能に与える影響を評価した結果、CCN1 の *O*-fucosylation が CCN1 の細胞外への分泌及び細胞外への分泌後のヘパラン硫酸を介した細胞膜局在に対し、重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、CCN1 の *O*-fucosylation を触媒する転移酵素と予測された Pofut2 のノックダウンを行った結果、Pofut2 ノックダウン時の CCN1 の分泌量は T242A 変異体と同程度まで減少したことから、Pofut2 による CCN1 の Thr<sup>242</sup> の *O*-fucosylation が分泌に重要であることが示された。
- 6) HT1080 細胞にヒト Rspo1 を過剰発現させた過剰発現細胞を樹立し、その過

剰発現細胞の培養上清から精製した Rspo1 の C-mannosylation の有無について LC-MS, MS/MS 解析を行った結果、C-mannosylation されていないペプチド断片は検出されず、Trp<sup>153</sup> のみ、あるいは Trp<sup>153</sup> 及び Trp<sup>156</sup> の 2 ヶ所で修飾されたペプチド断片が検出されたことから、分泌された全ての Rspo1 は C-mannosylation されていることを明らかにした。

- 7) Rspo1 の Trp<sup>153</sup> 及び Trp<sup>156</sup> を Ala に変異させた 2WA(W153A/W156A)変異体の過剰発現細胞を樹立し、野生型過剰発現細胞と比較することで、Rspo1 の C-mannosylation がその機能に与える影響を評価した結果、Rspo1 の C-mannosylation が Rspo1 のゴルジ体への輸送、細胞外への分泌、及び Wnt シグナル増強活性に対し、重要な役割を担っていることが示唆された。
- 8) ショウジョウバエ胚由来 S2 細胞を用いてヒト Rspo1 の C-mannosylation を触媒する転移酵素の同定を試みた結果、ヒト DPY19L3 が Trp<sup>156</sup> に対する C-mannose 転移酵素であることが示された。さらに、Rspo1 過剰発現 HT1080 細胞に対し DPY19L3 の siRNA を処理し、ノックダウンを行った細胞の培養上清より精製した Rspo1 の MALDI-TOF MS 解析の結果から、ヒト細胞においても DPY19L3 が Rspo1 の Trp<sup>156</sup> に対する C-mannose 転移酵素として機能していることが示された。
- 9) Rspo1 過剰発現 HT1080 細胞に対し、siRNA を用いて DPY19L3 をノックダウンした結果、Rspo1 の分泌量が顕著に減少した。
- 10) Rspo1 の Trp<sup>156</sup> の C-mannosylation を触媒する転移酵素と示された DPY19L3 のノックダウンを行った結果、DPY19L3 ノックダウン時の Rspo1 の分泌は 2WA 変異体と同様に減少したことから、DPY19L3 による Rspo1 の Trp<sup>156</sup> の C-mannosylation が分泌に重要であることが示された。

以上の結果から、本研究により発見した 3 種類のタンパク質に対するそれぞれ異なる糖鎖修飾について考察する。

まず、CTSV の N-glycosylation に関して、その N-glycosylation が分泌や酵素活性に影響することが示された。特に、CTSB や CTSL では、その酵素活性が癌の

悪性化に重要であることが示されており、これらを阻害することで癌の浸潤や遊走が抑えられる[65,66]。一方 CTSV は CTSL と約 78%の相同性があるタンパク質で、CTSV の高発現が乳癌や大腸癌で報告されている[53]。現在 CTSV と癌の悪性化に関して直接的な証明はなされていないが、これらの報告から、CTSV が特に乳癌や大腸癌において、癌の治療標的になる可能性があり、CTSV の機能が *N-glycosylation* により制御されていることは、癌の新たな治療法の開発につながる可能性がある。

また、CCN1 の *O-fucosylation* に関して、その *O-fucosylation* が分泌を制御していることが明らかとなった。CCN1 は 4 つの機能ドメインを有することから、実に多くの生理現象への関与が示されている。特に CCN1 の機能の内、血管新生や遊走、浸潤などは、癌の悪性化に密接に関わっている[72,73]。CCN1 は、細胞外へと分泌され、様々なレセプターと結合することで、これら様々な機能を発揮すると考えられ、CCN1 が機能を発揮する上で必須な CCN1 の分泌が *O-fucosylation* により制御されていることは興味深い。CCN1 の *O-fucosylation* を制御する *Pofut2* のノックアウトマウスは原腸胚形成の欠陥により胎生致死になることが報告されている[102]ことから、*O-fucosylation* の阻害による CCN1 の制御は副作用も生じやすく、現実的な方法ではないと考えられるが、CCN1 の *O-fucosylation* が分泌を促進していることから、*Pofut2* の発現量やフコシル化 CCN1 の発現量が、疾患治療のバイオマーカーになる可能性が考えられる。

本研究により、*Rspo1* の Trp<sup>156</sup> の *C-mannose* 転移酵素として、DPY19L3 を同定した。現在までの報告では、*C-mannose* 転移酵素を同定した例は Buettner らが報告した線虫における *Dpy19* のみであり[50]、ヒトにおける同定例としては今回が世界初である。特に本研究により、*Rspo1* の Trp<sup>156</sup> に対しては DPY19L3 のみが *C-mannose* 転移活性を示し、他の DPY19 ファミリータンパク質である DPY19L1、DPY19L2、DPY19L4 は活性を示さなかった。これは、DPY19L3 が *Rspo1* の Trp<sup>156</sup> を認識して *C-mannose* 転移活性を示したことを意味しており、DPY19 ファミリータンパク質に基質特異性があることを示唆するものである。*Dpy19* 遺伝子は、脊椎動物への進化の過程で DPY19L1、DPY19L3、DPY19L4

の 3 つに分かれたことが報告されており、さらに哺乳類への進化の過程で DPY19L1 が DPY19L1 と DPY19L2 の 2 つに分かれたことで、4 つのアイソフォームとなったことが報告されている[103]。つまり、哺乳類になるためには 4 つのアイソフォームが必要だったと理解出来る。本研究により、DPY19 ファミリータンパク質に基質特異性があることが示唆されたため、恐らく *O*-fucosylation のようにドメイン構造による違いやコンセンサス配列による違いが存在しているのではないかと考えられる。また、DPY19L2 は精巣特異的な発現が報告されている[98]。つまり、DPY19 ファミリータンパク質の発現に組織特異性があり、それぞれの組織で別のアイソフォームが機能している可能性も考えられる。特に、*C*-mannosylation のコンセンサス配列の提唱は、最初に *C*-mannosylation が発見された RNase2 による解析結果のみに依存しており[48]、また Julenius による *C*-mannosylation の周辺アミノ酸の解析も、その報告例の少なさから 69 ヶ所の解析のみに留まっている[52]。今後、これまでに *C*-mannosylation の報告があるタンパク質について、それぞれの *C*-mannose 転移酵素を同定することで、DPY19 ファミリータンパク質の基質特異性に関して、理解が深まることと考えられる。

本研究では、Rspo1 の Trp<sup>153</sup> に対する *C*-mannose 転移酵素は同定されなかった。つまり、Rspo1 の Trp<sup>153</sup> に対しては、DPY19 ファミリータンパク質ではない、未同定のタンパク質が行っていることが示唆され、DPY19 ファミリータンパク質以外に *C*-mannose 転移酵素が存在している可能性を示唆している。Buettner らは、線虫の Dpy19 の発見に際し、*C*-mannosylation の mannose ドナーが Dol-P-Man であることに着目し、*N*-glycosylation での *N* 型糖鎖ドナーである Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> の転移酵素と構造的類似性があると推測し、ホモロジー検索を行うことで同定に至った[50]。しかし、*C*-mannosylation と *N*-glycosylation ではドナーの糖の数も大きく異なり、転移酵素の構造的類似性に依存した本手法では、Dpy19 のみの発見に至ったと考えられる。今後、Rspo1 の Trp<sup>153</sup> に対する転移酵素を同定することで、*C*-mannosylation のさらなる理解につながると考えられる。

以上述べたように、本研究では 3 種類の糖鎖修飾について、その機能を解析

した。どの解析からも糖鎖修飾が分泌に重要であることが示され、分泌型タンパク質において、糖鎖修飾が主要な役割を担っていることが示された。さらに、*C*-mannosylation に関しては、これまでヒトにおいて同定されていなかった *C*-mannose 転移酵素を同定しただけでなく、未知の *C*-mannose 転移酵素の存在を示唆し、*C*-mannosylation の研究の発展に大きく寄与した。今後、糖鎖修飾の解析が発展することで、ますますその重要性が明らかとなり、生命の理解につながることを期待される。

## 参考文献

1. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. **Nature**, 410, 37-40 (2001)
2. Massague, J., Blain, S.W. & Lo, R.S. TGF  $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. **Cell**, 103, 295-309 (2000)
3. Schelessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, 103, 211-225 (2000)
4. Kolibaba, K.S. & Druker, B.J. Protein kinases and cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, 1333, F217-F248 (1997)
5. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. **Annu. Rev. Biochem.**, 67, 425-479 (1998)
6. Ciechanover, A., Finley, D. & Varshavsky, A. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. **Cell**, 37, 57-66 (1984)
7. Finley, D., Ciechanover, A. & Varshavsky, A. Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. **Cell**, 37, 43-55 (1984)
8. Bergink, S. & Jentsch, S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. **Nature**, 458, 461-467 (2009)
9. Harada, Y., Li, H., Li, H. & Lennarz, W.J. Oligosaccharyltransferase directly binds to ribosome at a location near the translocon-binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 106, 6945-6949 (2009)
10. Moremen, K.W., Tiemeyer, M. & Nairn, A.V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, 13, 448-462 (2012)
11. Reik, A., Krenn, E. & Kungl, A.J. Therapeutically targeting protein-glycan interactions. **Br. J. Pharmacol.**, 157, 686-694 (2009)
12. Dwek, R.A., Butters, T.D., Platt, F.M. & Zitzmann, N. Targeting glycosylation as a therapeutic approach. **Nature Rev. Drug Discov.**, 1, 65-75 (2002)
13. Ghosh, P., Dahms, N.M. & Kornfeld, S. Mannose 6-phosphate receptors: new

- twists in the tale. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, 4, 202-212 (2003)
14. Helenius, A. & Aebi, M. Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum. **Annu. Rev. Biochem.**, 73, 1019-1049 (2004)
  15. Ruddock, L.W. & Molinari, M. *N*-glycan processing in ER quality control. **J. Cell Sci.**, 119, 4373-4380 (2006)
  16. Maeda, Y. & Kinoshita, T. Dolichol-phosphate mannanose synthase: structure, function and regulation. **Biochim. Biophys. Acta**, 1780, 861-868 (2008)
  17. Lehrman, M.A. Oligosaccharide-based information in endoplasmic reticulum quality control and other biological systems. **J. Biol. Chem.**, 276, 8623-8626 (2001)
  18. Spiro, R.G. Glucose residues as key determinants in the biosynthesis and quality control of glycoproteins with *N*-linked oligosaccharides. **J. Biol. Chem.**, 275, 35657-35660 (2000)
  19. Snider, M.D. & Rogers, O.C. Transmembrane movement of oligosaccharide-lipids during glycoprotein synthesis. **Cell**, 36, 753-761 (1984)
  20. Hirschberg, C.B. & Snider, M.D. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. **Annu. Rev. Biochem.**, 56, 63-87 (1987)
  21. Lennarz, W.J. Protein glycosylation in the endoplasmic reticulum: current topological issues. **Biochemistry**, 26, 7205-7210 (1987)
  22. Helenius, J., Ng, D.T., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A. & Aebi, M. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. **Nature**, 415, 447-450 (2002)
  23. Aebi, M., Gassenhuber, J., Domdey, H. & te Heesen, S. Cloning and characterization of the *ALG3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Glycobiology**, 6, 439-444 (1996)
  24. Burda, P., te Heesen, S., Brachat, A., Wach, A., Dusterhoft, A. & Aebi, M. Stepwise assembly of the lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum

- of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the *ALG9* gene encoding a putative mannosyl transferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93, 7160–7165 (1996)
25. Burda, P., Jakob, C.A., Beinhauer, J., Hegemann, J.H. & Aebi, M. Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases. **Glycobiology**, 9, 617–625 (1999)
  26. Reiss, G., te Heesen, S., Zimmerman, J., Robbins, P.W. & Aebi, M. Isolation of the *ALG6* locus of *Saccharomyces cerevisiae* required for glucosylation in the N-linked glycosylation pathway. **Glycobiology**, 6, 493–498 (1996)
  27. Stagljar, I., te Heesen, S. & Aebi, M. New phenotype of mutations deficient in glucosylation of the lipid-linked oligosaccharide: cloning of the *ALG8* locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91, 5977–5981 (1994)
  28. Burda, P. & Aebi, M. The *ALG10* locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the  $\alpha$ -1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation. **Glycobiology**, 8, 455–462 (1998)
  29. Kelleher, D.J., Karaoglu, D., Mandon, E.C. & Gilmore, R. Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. **Mol. Cell**, 12, 101-111 (2003)
  30. Imperiali, B. & Hendrickson, T.L. Asparagine-linked glycosylation: specificity and function of oligosaccharyl transferase. **Bioorg. Med. Chem.**, 3, 1565-1578 (1995)
  31. Hallgren, P., Lundblad, A. & Svensson, S. A new type of carbohydrate-protein linkage in a glycopeptide from normal human urine. **J. Biol. Chem.**, 250, 5312-5314 (1975)
  32. Kentzer, E.J., Buko, A., Menon, G. & Sarin, V.K. Carbohydrate composition and presence of a fucose-protein linkage in recombinant human pro-urokinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 171, 401-406 (1990)
  33. Bjoern, S., Foster, D.C., Thim, L., Wiberg, F.C., Christensen, M., Komiyama, Y.,



- Pedersen, A.H. & Kisiel, W. Human plasma and recombinant factor VII. Characterization of *O*-glycosylations at serine residues 52 and 60 and effects of site-directed mutagenesis of serine 52 to alanine. **J. Biol. Chem.**, 266, 11051-11057 (1991)
34. Harris, R.J., Ling, V.T. & Spellman, M.W. *O*-linked fucose is present in the first epidermal growth factor domain of factor XII but not protein C. **J. Biol. Chem.**, 267, 5102-5107 (1992)
35. Harris, R.J., van Halbeek, H., Glushka, J., Basa, L.J., Ling, V.T., Smith, K.J. & Spellman, M.W. Identification and structural analysis of the tetrasaccharide NeuAc $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ *O*-linked to serine 61 of human factor IX. **Biochemistry**, 32, 6539-6547 (1993)
36. Hofsteenge, J., Huwiler, K.G., Macek, B., Hess, D., Lawler, J., Mosher, D.F. & Peter-Katalinic, J. *C*-mannosylation and *O*-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. **J. Biol. Chem.**, 276, 6485-6498 (2001)
37. Gonzalez de Peredo, A., Klein, D., Macek, B., Hess, D., Peter-Katalinic, J. & Hofsteenge, J. *C*-mannosylation and *O*-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats. **Mol. Cell. Proteomics**, 1, 11-18 (2002)
38. Ricketts, L.M., Dlugosz, M., Luther, K.B., Haltiwanger, R.S. & Majerus, E.M. *O*-fucosylation is required for ADAMTS13 secretion. **J. Biol. Chem.**, 282, 17014-17023 (2007)
39. Wang, L.W., Dlugosz, M., Somerville, R.P., Raed, M., Haltiwanger, R.S. & Apte, S.S. *O*-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats in ADAMTS-like-1/punctin-1 regulates secretion: implications for the ADAMTS superfamily. **J. Biol. Chem.**, 282, 17024-17031 (2007)
40. Wang, Y., Shao, L., Shi, S., Harris, R.J., Spellman, M.W., Stanley, P. & Haltiwanger, R.S. Modification of epidermal growth factor-like repeats with *O*-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein *O*-fucosyltransferase. **J. Biol. Chem.**, 276, 40338- 40345 (2001)

41. Luo, Y., Nita-Lazar, A. & Haltiwanger, R.S. Two distinct pathways for *O*-fucosylation of epidermal growth factor-like or thrombospondin type 1 repeats. **J. Biol. Chem.**, 281, 9385-9392 (2006)
42. Luo, Y., Koles, K., Vorndam, W., Haltiwanger, R.S. & Panin, V.M. Protein *O*-fucosyltransferase 2 adds *O*-fucose to thrombospondin type 1 repeats. **J. Biol. Chem.**, 281, 9393-9399 (2006)
43. Vasudevan, D. & Haltiwanger, R.S. Novel roles for *O*-linked glycans in protein folding. **Glycoconj. J.**, 31, 417-426 (2014)
44. Hofsteenge, J., Müller, D.R., de Beer, T., Löffler, A., Richter, W.J. & Vliegthart, J.F. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: *C*-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase U<sub>s</sub>. **Biochemistry**, 33, 13524-13530 (1994)
45. de Beer, T., Vliegthart, J.F., Löffler, A. & Hofsteenge, J. The hexopyranosyl residue that is *C*-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase U<sub>s</sub> is  $\alpha$ -mannopyranose. **Biochemistry**, 34, 11785-11789 (1995)
46. Krieg, J., Gläsner, W., Vicentini, A., Doucey, M.A., Löffler, A., Hess, D. & Hofsteenge, J. *C*-Mannosylation of human RNase 2 is an intracellular process performed by a variety of cultured cells. **J. Biol. Chem.**, 272, 26687-26692 (1997)
47. Doucey, M.A., Hess, D., Cacan, R. & Hofsteenge, J. Protein *C*-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor. **Mol. Biol. Cell**, 9, 291-300 (1998)
48. Krieg, J., Hartmann, S., Vicentini, A., Gläsner, W., Hess, D. & Hofsteenge, J. Recognition signal for *C*-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. **Mol. Biol. Cell**, 9, 301-309 (1998)
49. Anand, M., Rush, J.S., Ray, S., Doucey, M.A., Weik, J., Ware, F.E., Hofsteenge, J., Waechter, C.J. & Lehrman, M.A. Requirement of the Lec35 gene for all known classes of monosaccharide-P-dolichol-dependent glycosyltransferase reactions in mammals. **Mol. Biol. Cell**, 12, 487-501 (2001)

50. Buettner, F.F., Ashikov, A., Tiemann, B., Lehle, L. & Bakker, H. *C. elegans* DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. **Mol. Cell**, 50, 295-302 (2013)
51. Hofsteenge, J., Blommers, M., Hess, D., Furmanek, A. & Miroshnichenko, O. The four terminal components of the complement system are C-mannosylated on multiple tryptophan residues. **J. Biol. Chem.**, 274, 32786-32794 (1999)
52. Julenius, K. NetCGlyc 1.0: prediction of mammalian C-mannosylation sites. **Glycobiology**, 17, 868-876 (2007)
53. Santamaría, I., Velasco, G., Cazorla, M., Fueyo, A., Campo, E. & López-Otín, C. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. **Cancer Res.**, 58, 1624-1630 (1998)
54. Adachi, W., Kawamoto, S., Ohno, I., Nishida, K., Kinoshita, S., Matsubara, K. & Okubo, K. Isolation and characterization of human cathepsin V: a major proteinase in corneal epithelium. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 39, 1789-1796 (1998)
55. Finley, E.M. & Kornfeld, S. Subcellular localization and targeting of cathepsin E. **J. Biol. Chem.**, 269, 31259-31266 (1994)
56. Avril, L.E., Di Martino-Ferrer, M., Pignede, G., Séman, M. & Gauthier, F. Identification of the U-937 membrane-associated proteinase interacting with the V3 loop of HIV-1 gp120 as cathepsin G. **FEBS Lett.**, 345, 81-86 (1994)
57. Repnik, U., Stoka, V., Turk, V. & Turk, B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. **Biochim. Biophys. Acta**, 1824, 22-33 (2012)
58. Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B. & Turk, D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. **Biochim. Biophys. Acta**, 1824, 68-88 (2012)
59. Turk, V., Turk, B. & Turk, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. **EMBO J.**, 20, 4629-4633 (2001)
60. Sloane, B.F., Dunn, J.R. & Honn, K.V. Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. **Science**, 212, 1151-1153 (1981)

61. Gocheva, V. & Joyce, J.A. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. **Cell Cycle**, 6, 60-64 (2007)
62. Jedeszko, C. & Sloane, B.F. Cysteine cathepsins in human cancer. **Biol. Chem.**, 385, 1017-1027 (2004)
63. Mohamed, M.M. & Sloane, B.F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nature Rev. Cancer**, 6, 764-775 (2006)
64. Lah, T.T., Cercek, M., Blejec, A., Kos, J., Gorodetsky, E., Somers, R. & Daskal, I. Cathepsin B, a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: comparison with cathepsin D, cathepsin L, and other clinical indicators. **Clin. Cancer Res.**, 6, 578-584 (2000)
65. Krueger, S., Haeckel, C., Buehling, F. & Roessner, A. Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. **Cancer Res.**, 59, 6010-6014 (1999)
66. Krueger, S., Kellner, U., Buehling, F. & Roessner, A. Cathepsin L antisense oligonucleotides in a human osteosarcoma cell line: effects on the invasive phenotype. **Cancer Gene Ther.**, 8, 522-528 (2001)
67. Tolosa, E., Li, W., Yasuda, Y., Wienhold, W., Denzin, L.K., Lautwein, A., Driessen, C., Schnorrer, P., Weber, E., Stevanovic, S., Kurek, R., Melms, A. & Bromme, D. Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. **J. Clin. Invest.**, 112, 517-526 (2003)
68. Viken, M.K., Sollid, H.D., Joner, G., Dahl-Jørgensen, K., Rønningen, K.S., Undlien, D.E., Flatø, B., Selvaag, A.M., Førre, Ø., Kvien, T.K., Thorsby, E., Melms, A., Tolosa, E. & Lie, B.A. Polymorphisms in the cathepsin L2 (CTSL2) gene show association with type 1 diabetes and early-onset myasthenia gravis. **Hum. Immunol.**, 68, 748-755 (2007)
69. Brömme, D., Li, Z., Barnes, M. & Mehler, E. Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic

- characterization, and chromosomal localization. **Biochemistry**, 38, 2377-2385 (1999)
70. Tsukuba, T., Ikeda, S., Okamoto, K., Yasuda, Y., Sakai, E., Kadowaki, T., Sakai, H. & Yamamoto, K. Characterization of rat cathepsin E and mutants with changed active-site residues and lacking propeptides and N-glycosylation, expressed in human embryonic kidney 293T cells. **FEBS J.**, 273, 219-229 (2006)
71. Yasuda, Y., Ikeda, S., Sakai, H., Tsukuba, T., Okamoto, K., Nishishita, K., Akamine, A., Kato, Y. & Yamamoto, K. Role of N-glycosylation in cathepsin E. A comparative study of cathepsin E with distinct N-linked oligosaccharides and its nonglycosylated mutant. **Eur. J. Biochem.**, 266, 383-391 (1999)
72. Lau, L.F. CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein. **Cell. Mol. Life Sci.**, 68, 3149-3163 (2011)
73. Lau, L.F. & Lam, S.C. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. **Exp. Cell Res.**, 248, 44-57 (1999)
74. Leu, S.J., Liu, Y., Chen, N., Chen, C.C., Lam, S.C. & Lau, L.F. Identification of a novel integrin  $\alpha_6\beta_1$  binding site in the angiogenic inducer CCN1 (CYR61). **J. Biol. Chem.**, 278, 33801-33808 (2003)
75. Chen, N., Chen, C.C. & Lau, L.F. Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin  $\alpha_6\beta_1$  and cell surface heparan sulfate proteoglycans. **J. Biol. Chem.**, 275, 24953-24961 (2000)
76. Jun, J.I. & Lau, L.F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. **Nature Cell Biol.**, 12, 676-685 (2010)
77. O'Kelly, J., Chung, A., Lemp, N., Chumakova, K., Yin, D., Wang, H.J., Said, J., Gui, D., Miller, C.W., Karlan, B.Y. & Koeffler, H.P. Functional domains of CCN1 (Cyr61) regulate breast cancer progression. **Int. J. Oncol.**, 33, 59-67 (2008)
78. Lin, M.T., Zuon, C.Y., Chang, C.C., Chen, S.T., Chen, C.P., Lin, B.R., Wang, M.Y., Jeng, Y.M., Chang, K.J., Lee, P.H., Chen, W.J. & Kuo, M.L. Cyr61 induces

gastric cancer cell motility/invasion via activation of the integrin/nuclear factor- $\kappa$ B/cyclooxygenase-2 signaling pathway. **Clin. Cancer Res.**, 11, 5809-5820 (2005)

79. Haque, I., Mehta, S., Majumder, M., Dhar, K., De, A., McGregor, D., Van Veldhuizen, P.J., Banerjee, S.K. & Banerjee, S. Cyr61/CCN1 signaling is critical for epithelial-mesenchymal transition and stemness and promotes pancreatic carcinogenesis. **Mol. Cancer**, 10, 8 (2011)
80. Kamata, T., Katsube, K., Michikawa, M., Yamada, M., Takada, S. & Mizusawa, H. *R-spondin*, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in *Wnts* mutants. **Biochim. Biophys. Acta**, 1676, 51-62 (2004)
81. de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.K., Li, V.S., Teunissen, H., Kujala, P., Haegbarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., Stange, D.E., van Es, J.E., Guardavaccaro, D., Schasfoort, R.B., Mohri, Y., Nishimori, K., Mohammed, S., Heck, A.J. & Clevers, H. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. **Nature**, 476, 293-297 (2011)
82. Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y.L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C.M. & Niehrs, C. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/PCP signalling. **EMBO Rep.**, 12, 1055-1061 (2011)
83. Hao, H.X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., Mao, X., Ma, Q., Zamponi, R., Bouwmeester, T., Finan, P.M., Kirschner, M.W., Porter, J.A., Serluca, F.C. & Cong, F. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. **Nature**, 485, 195-200 (2012)
84. Zebisch, M., Xu, Y., Krastev, C., MacDonald, B.T., Chen, M., Gilbert, R.J., He, X. & Jones, E.Y. Structural and molecular basis of ZNRF3/RNF43 transmembrane ubiquitin ligase inhibition by the Wnt agonist R-spondin. **Nature Commun.**, 4,

2787 (2013)

85. Kim, K.A., Wagle, M., Tran, K., Zhan, X., Dixon, M.A., Liu, S., Gros, D., Korver, W., Yonkovich, S., Tomasevic, N., Binnerts, M. & Abo, A. R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. **Mol. Biol. Cell**, 19, 2588- 2596 (2008)
86. Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C. & Wu, W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. **Dev. Cell**, 7, 525-534 (2004)
87. Anastas, J.N. & Moon, R.T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Rev. Cancer**, 13, 11-26 (2013)
88. Niehrs, C. The complex world of WNT receptor signalling. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, 13, 767-779 (2012)
89. Gong, X., Yi, J., Carmon, K.S., Crumbley, C.A., Xiong, W., Thomas, A., Fan, X., Guo, S., An, Z., Chang, J.T. & Liu, Q.J. Aberrant RSPO3-LGR4 signaling in Keap1-deficient lung adenocarcinomas promotes tumor aggressiveness. **Oncogene**, 34, 4692-4701 (2015)
90. Ilmer, M., Boiles, A.R., Regel, I., Yokoi, K., Michalski, C.W., Wistuba, I.I., Rodriguez, J., Alt, E. & Vykoukal, J. RSPO2 enhances canonical Wnt signaling to confer stemness-associated traits to susceptible pancreatic cancer cells. **Cancer Res.**, 75, 1883-1896 (2015)
91. Shinmura, K., Kahyo, T., Kato, H., Igarashi, H., Matsuura, S., Nakamura, S., Kurachi, K., Nakamura, T., Ogawa, H., Funai, K., Tanahashi, M., Niwa, H. & Sugimura, H. RSPO fusion transcripts in colorectal cancer in Japanese population. **Mol. Biol. Rep.**, 41, 5375-5384 (2014)
92. Heifetz, A., Keenan, R.W. & Elbein, A.D. Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase. **Biochemistry**, 18, 2186-2192 (1979)
93. Barrett, A.J., Kembhavi, A.A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C.G., Tamai,

- M., & Hanada, K. *L-trans*-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. **Biochem. J.**, 201, 189-198 (1982)
94. Masaki, T., Tanabe, M., Nakamura, K. & Soejima, M. Studies on a new proteolytic enzyme from *Achromobacter lyticus* M497-1. I. Purification and some enzymatic properties. **Biochim. Biophys. Acta**, 660, 44-50 (1981)
95. Nam, J.S., Turcotte, T.J., Smith, P.F., Choi, S. & Yoon, J.K. Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate  $\beta$ -catenin-dependent gene expression. **J. Biol. Chem.**, 281, 13247-13257 (2006)
96. Lehrman, M.A. & Zeng, Y. Pleiotropic resistance to glycoprotein processing inhibitors in Chinese hamster ovary cells. The role of a novel mutation in the asparagine-linked glycosylation pathway. **J. Biol. Chem.**, 264, 1584-1593 (1989)
97. Tsuchiya, M., Niwa, Y. & Simizu, S. *N*-glycosylation of R-spondin1 at Asn<sup>137</sup> negatively regulates its secretion and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. **Oncol. Lett.**, in press (2016)
98. Dezső, Z., Nikolsky, Y., Sviridov, E., Shi, W., Serebriyskaya, T., Dosymbekov, D., Bugrim, A., Rakhmatulin, E., Brennan, R.J., Guryanov, A., Li, K., Blake, J., Samaha R.R. & Nikolskaya, T. A comprehensive functional analysis of tissue specificity of human gene expression. **BMC Biol.**, 6, 49 (2008)
99. Iwaki, T. & Castellino, F.J. A single plasmid transfection that offers a significant advantage associated with puromycin selection in *Drosophila* Schneider S2 cells expressing heterologous proteins. **Cytotechnology**, 57, 45-49 (2008)
100. Veeman, M.T., Slusarski, D.C., Kaykas, A., Louie, S.H. & Moon, R.T. Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. **Curr. Biol.**, 13, 680-685 (2003)
101. Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R. 3rd. & Nusse, R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. **Nature**, 423, 448-452 (2003)



102. Du, J., Takeuchi, H., Leonhard-Melief, C., Shroyer, K.R., Dlugosz, M., Haltiwanger, R.S. & Holdener, B.C. *O*-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats restricts epithelial to mesenchymal transition (EMT) and maintains epiblast pluripotency during mouse gastrulation. **Dev. Biol.**, 346, 25-38 (2010)
103. Carson, A.R., Cheung, J. & Scherer, S.W. Duplication and relocation of the functional *DPY19L2* gene within low copy repeats. **BMC Genomics**, 7, 45 (2006)

## 謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院 生物化学研究室在籍中に、同大学理工学部 清水史郎准教授の御指導のもとに行ったものであり、ここに心より御礼申し上げます。日頃から実験結果や論文執筆に関し討論を重ねていただいた御蔭で、適切に研究を遂行できました。

本論文の作成にあたり、慶應義塾大学理工学部 井本正哉教授、佐藤智典教授、藤本ゆかり教授に多くの貴重な御助言をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

タンパク質の糖鎖修飾の解析にあたり、質量分析を行っていただきました、国立研究開発法人理化学研究所環境科学研究センター生命分子解析ユニット 堂前直博士、鈴木健裕氏に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました、愛知医科大学医学部 梅澤一夫教授に深く感謝いたします。

本研究において、的確な御指摘、アドバイスをしてくださった、順天堂大学医学部 笹澤有紀子博士に心より御礼申し上げます。

日頃より実験の御指導、御助言を賜りました、生物化学研究室の先輩方、同輩、後輩に深く感謝いたします。皆様の支えにより、ここまで研究を遂行できました。

最後に、私の研究生生活を陰から支えてくれた、家族と友人に心から感謝いたします。