

がん関連タンパク質 AXL における C 型糖修飾の機能解析

慶應義塾大学 理工学部 応用化学科

森 研人

1. はじめに

タンパク質は生体内において転写・翻訳を介して生合成されるが、翻訳されたばかりのタンパク質は未成熟な状態であり、アミノ酸残基に様々な化学的修飾を受けることによって正常な構造や機能を獲得する。これを翻訳後修飾と呼ぶ。翻訳後修飾の中でも、タンパク質に糖鎖が付加する現象を糖鎖修飾と呼び、結合様式によって N 型、O 型、C 型、GPI アンカー型といったいくつかの種類が存在する。本研究ではその中でも特に未解明な点が多い C 型糖修飾に着目した。

C 型糖修飾はタンパク質中の Trp にマンノースが C-C 結合を介して結合するユニークな糖修飾である (Fig. 1)^[1]。C 型糖修飾されるタンパク質は現在 40 種程度が知られている。タンパク質が C 型糖修飾を受ける条件として、タンパク質の N 末端に疎水性アミノ酸を豊富に含むシグナルペプチドを有すること、コンセンサス配列として Trp-Xaa-Xaa-Trp/Cys (Xaa: 任意のアミノ酸) を持つことが過去に提唱されており、コンセンサス配列中の N 末端側の Trp にマンノースが付加する^[2]。C

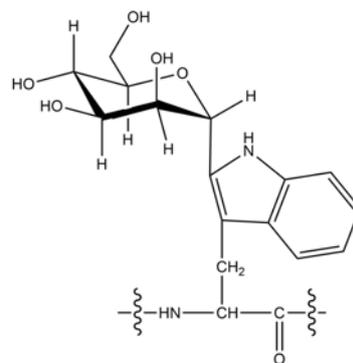


Fig. 1 C 型糖修飾の構造式

型糖修飾を触媒する C 型糖転移酵素は、まず線虫において Dpy19 が同定され、続いて哺乳類のホモログである DPY19L1 および DPY19L3 が C 型糖転移酵素としての活性を持つことが見いだされた^[3,4]。しかし、C 型糖修飾は他の糖鎖修飾と比較して基質タンパク質や生体内での機能、疾患との関わりなど未解明な点が多く残されている。

AXL は受容体型チロシンキナーゼの 1 種であり、リガンドである GAS6 による刺激、あるいはリガンド非依存的刺激によって活性化し、下流にあるシグナル伝達経路の活性化を介して細胞の生存、成長、増殖などの様々な細胞プロセスを制御している^[5,6]。AXL の異常な活性化や過剰発現は腫瘍の形成を誘導し、また AXL の過剰発現と種々のがんの予後不良との相関も報告されている^[6]。

AXL の 320 番目の Trp はコンセンサス配列を満たしており C 型糖修飾されることが予測されたが、修飾の有無についてはこれまで報告がなかった。そこで、AXL が C 型糖修飾されているかを確認し、修飾が確認された場合はその機能解析に取り組むこととした。

2. AXL の C 型糖修飾の検出

まず、AXL が C 型糖修飾されているか検証した。AXL の細胞外領域 (AXL-ECD) をヒト乳がん MDA-MB-231 細胞に過剰発現させ、培養上清より精製した AXL-ECD について質量分析を行った。その結果、C 型糖修飾が予測される Trp³²⁰ を含むペプチド断片においてヘキソースの付加が確認された。次に、該当するペプチド断片のどのアミノ酸残基にヘキソースが付

加しているか確かめるため MS/MS 解析を行ったところ、Trp³²⁰においてヘキソース付加が起きていることが確認された(Fig. 2)。これらの結果から、AXLの Trp³²⁰においてC型糖修飾が起きていることが示された。

さらに、MDA-MB-231細胞以外のがん細胞についてもAXLのC型糖修飾の有無を確かめた。ヒト非小細胞性肺癌由来PC-9およびH3122細胞、ヒト線維肉腫由来HT1080細胞を用いて同様に評価を行ったところ、MDA-MB-231細胞と同様にTrp³²⁰におけるC型糖修飾が確認された。これらの結果から、AXLは様々ながん細胞においてC型糖修飾されていることが示された。

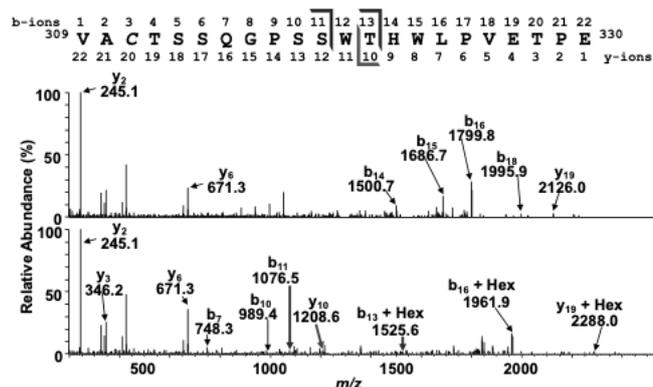


Fig. 2 AXLのC型糖修飾の検出

3. DPY19ファミリーのAXLにおけるC型糖修飾触媒活性の評価

AXLにおけるC型糖修飾が確認されたことから、次に糖転移酵素の同定を試みた。ショウジョウバエ胚由来S2細胞は内在的にC型糖転移活性を有していないことから、この細胞にAXL-ECDと糖転移酵素の候補を共導入し、精製したAXL-ECDについて質量分析を行うことでAXLを基質とするC型糖転移酵素を探索することとした。候補として、DPY19ファミリー(DPY19L1-DPY19L4)を選択した。ヒトDPY19ファミリータンパク質4種をそれぞれS2細胞に過剰発現させ、さらにAXL-ECDを発現させた。培養上清よりAXL-ECDを精製し、質量分析を行ったところ、すべての条件において未修飾のAXL-ECDのみが検出された。このことから、DPY19ファミリータンパク質はAXLにおけるC型糖転移酵素ではないことが示唆された。また、所属研究室における先行研究において、S2細胞を用いた同様の実験系を用いてDPY19ファミリーがC型糖修飾を触媒しないことを示した例が複数存在することから、AXLのC型糖修飾を触媒する未知の糖転移酵素の存在が強く示唆された。

4. AXLのC型糖修飾の機能解析

C型糖修飾がAXLの機能にどのような影響を及ぼすか明らかにするため、MDA-MB-231細胞を用いて機能解析を行った。MDA-MB-231細胞は内在的にAXLを高発現していることから、まずCRISPR/Cas9システムを用いてAXLを遺伝子ノックアウト(KO)した。さらに、AXL-KO細胞に対して野生型のAXL(wt)あるいはC型糖修飾されるTrp³²⁰をPheに変異させたC型糖修飾欠損型AXL(WF)を再発現させた。これらとMDA-MB-231細胞親株(Parent; Pt)と合わせた全4細胞を用いて、機能解析を行った。

まず、リガンドであるGAS6に対する応答を評価した。チャイニーズハムスター卵巣由来CHO-K1細胞にGAS6を過剰発現させ、その細胞の培養上清をMDA-MB-231細胞に処理した際のERKおよびAKTのリン酸化レベルの変化を評価した。その結果、AXL発現細胞であるPt, wt, WF細胞においてGAS6処理によるAKTのリン酸化が確認されたが、その程度はwt

と WF で差が見られなかった。このことから、AXL の C 型糖修飾は、GAS6 依存的な下流シグナル伝達の変化に影響を及ぼさないことが示唆された。

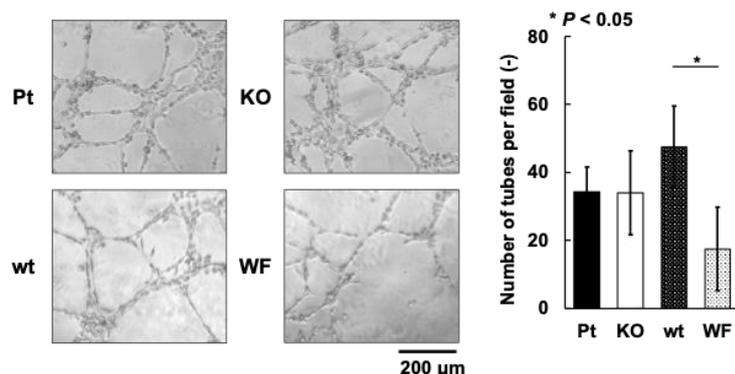


Fig. 3 AXL の C 型糖修飾が血管擬態形成に及ぼす影響

分子標的治療薬が実用化されている。しかし一部のがんでは血管新生の代わりに、がん細胞自身が血管様ネットワーク構造を形成し血液供給経路を構築する血管擬態 (Vasculogenic Mimicry; VM) と呼ばれる現象が報告されている^[7,8]。ヒト乳がん MDA-MB-231 細胞を用いた先行研究において、AXL の発現が VM 形成に重要であることが報告されている^[9]。VM を形成するがん細胞は、細胞外マトリックス成分からなる Matrigel 上に播種すると網目状ネットワーク構造を形成するため、*in vitro* で VM 形成能を評価することができる。そこで、MDA-MB-231 細胞を用いて AXL の C 型糖修飾と VM 形成能の関係を評価した。その結果、Pt, AXL-KO, wt, WF 細胞のうち WF 細胞でのみ VM 形成が抑制された(Fig. 3)。この結果から、AXL の C 型糖修飾の欠損が VM 形成を負に制御することが示唆された。

次に、血管擬態という現象に着目した。腫瘍が成長すると、腫瘍内部のがん細胞は栄養や酸素が不足した状態となる。そのため、がんは周辺の血管から新たな血管枝を伸ばす血管新生を誘導することによって、酸素や栄養を確保しようとする。がんの血管新生は主要な治療標的の 1 つであり、血管新生をターゲットとする分子

5. まとめ

質量分析によって AXL が MDA-MB-231 細胞を含む複数のがん細胞で C 型糖修飾を受けていることが示された。AXL の C 型糖修飾を触媒する酵素は未知の糖転移酵素であることが示唆された。また、MDA-MB-231 細胞を用いた機能解析によって、AXL の C 型糖修飾が VM 形成に影響を及ぼすことが示された。本研究で得られた知見が、AXL の C 型糖修飾をターゲットとするようながん治療等に应用されることが期待される。

謝辞

本研究遂行の上で、公益財団法人 天野工業技術研究所から多大なご支援をいただきました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- [1] Hofsteenge, J., Müller, D. R., de Beer, T., Löffler, A., Richter, W. J., Vliegthart, J. F. G., *Biochemistry*, 33, 13524-13530 (1994)
- [2] Krieg, J., Hartmann, S., Vicentini, A., Gläsner, W., Hess, D., Hofsteenge, J., *Molecular Biology of the Cell*, 9, 301-309 (1998)

- [3] Niwa, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., Simizu, S., *Molecular Biology of the Cell*, 27, 744-756 (2016)
- [4] Shcherbakova, A., Tiemann, B., Buettner, F. F. R., Bakker, H., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, 2574-2579 (2017)
- [5] O'Bryan, J. P., Frye, R. A., Cogswell, P. C., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., Espinosa, R., Le Beau, M. M., Earp, H. S., Liu, E. T., *Molecular and Cellular Biology*, 11, 5016-5031 (1991)
- [6] Feneuyrolles, C., Spenlinhauer, A., Guiet, L., Fauvel, B., Daydé-Cazals, B., Warnault, P., Chev e, G., Y., *Molecular Cancer Therapeutics*, 13, 2141-2148 (2014)
- [7] Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M. G., Pe'Er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S., Hendrix, M. J. C., *The American Journal of Pathology*, 155, 739-752 (1999)
- [8] Folberg, R., Hendrix, M. J. C., Maniotis, A. J., *The American Journal of Pathology*, 156, 361-381 (2000)
- [9] Lim, D., Cho, J. G., Yun, E., Lee, A., Ryu, H., Lee, Y. J., Yoon, S., Chang, W., Lee, M., Kwon, B. S., Kim, J., *Genes*, 12, 9 (2021)