

CDCP1細胞外ドメインを介した
癌の浸潤・転移機構に関する研究

防衛大学校理工学研究科後期課程

物質・基礎科学系専攻 高エネルギー・物質工学教育研究分野

澤山 忠司

平成31年3月

目 次

1. 序 論

2. 略語一覧

3. 試薬と実験方法

3-1. 試薬と材料

3-1-1. 試薬および消耗品

3-1-2. 使用した細胞株および大腸菌株

3-1-3. プラスミドベクター

3-1-4. 抗 体

3-1-5. PCR 用プライマー

3-1-6. 使用したキット

3-1-7. 試薬の組成

3-2. 実験方法

3-2-1. CDCP1 変異体発現プラスミドの構築

3-2-2. Polymerase chain reaction (PCR)法

3-2-3. 制限酵素処理

3-2-4. アガロースゲル電気泳動

3-2-5. アガロースゲルからの DNA 断片の抽出

3-2-6. 各種発現プラスミドのライゲーション

3-2-7. 大腸菌の形質転換

3-2-8. 各種発現プラスミドの調製

3-2-9. 遺伝子の塩基配列解析

3-2-10. 細胞培養

3-2-11. 癌細胞株への発現プラスミドの導入

- 3-2-12. siRNA 処理による CDCP1 発現抑制
- 3-2-13. 細胞抽出液の回収
- 3-2-14. MBP 融合 CUB ドメインタンパク質の調製
- 3-2-15. タンパク質濃度の測定
- 3-2-16. 免疫沈降
- 3-2-17. SDS-PAGE
- 3-2-18. ウェスタンブロットティング(WB)
- 3-2-19. 細胞免疫染色
- 3-2-20. 足場非依存性能の検定(soft-agar assay)
- 3-2-21. 細胞運動能の検定(wound healing assay, transwell migration assay)
- 3-2-22. 標準偏差、有意差検定

4. 結 果

- 4-1. 細胞外ドメインを介した CDCP1 同種多量体形成による癌転移能の制御
 - 4-1-1. CDCP1 の細胞外ドメインを介した同種多量体の形成
 - 4-1-2. CDCP1 細胞外ドメインによる足場非依存性能と細胞運動能の制御
- 4-2. CDCP1 細胞外ドメイン内の同種多量体形成部位の探索
- 4-3. rMBP-CUB2 ドメインによる細胞内 CDCP1 シグナルの制御を介した癌転移能の制御
 - 4-3-1. rMBP-CUB2 の添加による同種多量体形成の阻害
 - 4-3-2. rMBP-CUB2 の添加による CDCP1 シグナルの制御
 - 4-3-3. rMBP-CUB2 の添加による足場非依存性能と細胞運動能の制御
- 4-4. CDCP1 細胞外 CUB ドメインによる集団的細胞運動(Collective cell migration)の制御
 - 4-4-1. CDCP1 細胞外ドメインによる細胞－細胞間接着の制御
 - 4-4-2. CUB ドメインによる細胞－細胞間接着を介した細胞運動能の制御

4-4-3. BxPC3 細胞株の細胞－細胞間接着による CDCP1 細胞内シグナルの制御

5. 考 察

5-1. CDCP1 の細胞外ドメインによる同種多量体形成

5-2. CDCP1 の同種多量体を介した CDCP1 細胞内シグナルの制御

5-2-1. CDCP1 の同種多量体形成による SFK の活性化

5-2-2. CDCP1 細胞外ドメインによる細胞内 CDCP1 シグナルの制御機構

5-3. CDCP1 細胞外ドメインの癌浸潤・転移における役割

5-4. CDCP1 細胞外ドメインによる細胞外環境の認識と癌の浸潤・転移

5-5. CDCP1 細胞外ドメインによる Collective cell migration の制御

5-6. CDCP1 細胞外ドメイン癌治療標的としての可能性

6. 結 言

7. 謝 辞

8. 参考文献等

9. 図 表

10. 実 績

10-1. 論文実績

10-2. 発表実績(国際学会)

10-3. 発表実績(国内学会)

1. 序 論

癌は昭和 56 年より常に日本人の死因の第 1 位となっており[1]、今後も癌による死亡者数の割合は増加していくことが予想されている。よって、癌の治療を困難にしている転移機構の解明は重要な課題となっている。癌の転移機構には大きく三つの段階が存在する(図 1)。それは、①細胞運動と細胞外基質(ECM)の分解によって癌細胞が基底膜から離脱し、周辺組織、特に血管やリンパ管などへと入り込む「浸潤」と、②癌細胞の血液やリンパ液中での移動に重要な、浮遊状態でも生存できる「足場非依存性能」および、③癌細胞が新しい組織へ再浸潤して増殖することによる「転移巣形成」である[2-5]。この中でも、「足場非依存性能」の研究は遅れており、これまでに、癌細胞の足場非依存性能に関与する因子として、Nf-kB[6]、TrkB[7]、FAK[8]、CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) [9]が報告されている。正常細胞では、接着因子である Integrin を介した PI3K/AKT および Ras/ERK シグナルによって細胞の生存が制御されており[10-13]、細胞接着を喪失するとこれらシグナルが遮断されて、アポトーシスによる細胞死であるアノイキスを引き起こす[14, 15]。一方癌細胞は、アノイキスから逃れる機能を獲得することで足場の無い状態でも生存することが出来るが、その機能を獲得する機構は明らかではない(図 2)。近年、足場非依存性能を持ち、血管内を浮遊状態で移動する癌細胞である、循環腫瘍細胞(CTC)が発見され、血液中の数は極めて少ないものの、その数の増加と転移性癌患者における悪性度との相関が示唆された [16, 17]。そのため CTC は、癌転移における足場非依存性能が臨床研究においても重要視されることとなった。この様に現在、足場非依存性能の制御機構の解明は、癌の転移機構を理解する上で重要な鍵となっており、新規癌治療法の開発にも有用であると考えられている。

CDCP1 は、癌細胞の浮遊培養時に Src family kinase (SFK)の Src homology 2

(SH2)ドメインに結合するリン酸化タンパク質として同定された[9]。siRNA 法による CDCP1 の発現抑制は、癌細胞のアノキスを引き起こすことから、CDCP1 はアノキス抵抗性と相関のある足場非依存性能に関与する重要な因子であることが明らかとなっている[9, 18]。また、癌細胞の運動能や浸潤能への関与が報告されたことから[19, 20]、CDCP1 が癌浸潤および転移機構に重要な役割を担う因子の一つであることが示唆されている。興味深いことに、CDCP1 はヒト正常細胞における発現がほとんど無いが [21]、多くのヒト癌細胞において CDCP1 の発現上昇とリン酸化の増強が確認されている[21-24]。さらに、CDCP1 の発現が生命予後不良と相関することから[19, 24, 25]、CDCP1 が臨床研究においても注目すべき重要な因子であることが指摘されている。

CDCP1 は、836 個のアミノ酸で構成された I 型膜貫通タンパク質である(図 3)。N 末端側から、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインで構成されている。細胞外ドメインには、Complement sub-components C1s/C1r、Urchin embryonic growth factor および Bone morphogenic protein 1 の 3 種類のタンパク質のアミノ酸配列とそれぞれ相同性が見られる、約 110 残基の構造モチーフである CUB ドメインが三つ存在する。膜貫通ドメインは、細胞膜に存在する部分を指す。細胞内ドメインには、Src homology 3 (SH3)ドメインが結合するプロリンリッチ配列(PRR)や SFK によりリン酸化される 734 番目と 762 番目のチロシン残基(Y734, Y762)が存在する[26]。また、細胞外ドメインには N 型糖鎖修飾可能部位であるアスパラギン残基が 14 カ所存在しており、CDCP1 タンパク質の分子量は、理論上 90 kDa であるが、糖鎖修飾によって実際は 135 kDa の位置に SDS-PAGE 後の WB で検出されることが分かっている[27]。

CDCP1 による癌の転移機構に関する研究は、細胞内ドメインを介したシグナル伝達系の研究が進んでいる(図 4)。癌細胞が浮遊すると CDCP1 細胞内ドメイ

ンに存在する 734 番目のチロシン残基(Y734)が SFK によってリン酸化され、そのリン酸化チロシン残基(p-Y734)に SFK が Src homology 2(SH2)ドメインを介して結合すると、CDCP1 の 762 番目のチロシン残基(Y762)が SFK によりリン酸化される。その後、細胞質に存在する PKC δ がリン酸化チロシン残基(p-Y762)に結合し、SFK が PKC δ の 311 番目のチロシン残基(Y311)をリン酸化することにより、細胞膜近傍で SFK-CDCP1-PKC δ 複合体が形成され、下流にシグナルを伝えることが報告されている[9]。この CDCP1 下流シグナルを阻害すると細胞レベルでは、足場非依存性能や細胞運動能が抑制され[21]、実験動物レベルでは、癌転移の一つである腹膜播種が抑制されたため[28]、CDCP1 細胞内ドメインを介したシグナル伝達が癌の転移機構の一端を担っていることが示されてきた。

CDCP1 細胞外ドメインは、細胞内ドメインに比べて癌の転移機構に関する報告の数が少なく(図 5)、プラスミンやセリンプロテアーゼにより CDCP1 細胞外ドメインが 368 番目のアルギニン残基(R)と 369 番目のリシン残基(K)の間で切断されると、AKT 依存的なアポトーシスの阻害や初期の転移巣形成を促進することが示唆されているだけである[29-32]。細胞外ドメインを持ち、シグナル伝達に関与する膜貫通タンパク質には上皮増殖因子受容体(EGFR)がある。EGFR は、上皮増殖因子を介して同種複合体を形成し細胞内へとシグナルを伝達する[33-35]。CDCP1 は、タンパク質-タンパク質間相互作用に関与することが推定されている CUB ドメインを細胞外ドメインに保有しているため[26, 36, 37]、細胞外ドメインを介して同種多量体を形成して細胞内へシグナルを伝達する可能性が考えられる。近年、CDCP1 の細胞外ドメインの切断が 2 量体形成と細胞運動に関与している可能性が報告されている[38]。しかし、CDCP1 の 2 量体形成に関与する領域や CDCP1 切断が細胞運動をどの様に制御しているかは明らかになっていない。よって、CDCP1 細胞外ドメインによる足場非依存性および細胞

運動能の制御機構を明らかにすることは、癌の転移機構を理解し、新規治療法を開発する上で重要であると考えられる。

本研究では、癌の転移・浸潤に重要な役割を担っていると考えられる CDCP1 の細胞外ドメインに着目し、①CDCP1 細胞外ドメインが同種多量体形成部位であることの検証、②癌転移の特性である足場非依存性能及び細胞運動能に寄与している CDCP1 細胞外ドメイン内の機能制御部位の同定、③足場非依存性および細胞運動能に対する CDCP1 細胞外ドメインを介した機能制御機構の解析をおこなった。

2. 略語一覧

AcOH : acetic acid

Amp : ampicillin

APS : ammonium peroxodisulfate (ammonium persulfate)

BPB : bromophenol blue

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediamine tetra acetic acid

EGTA : ethyleneglycol tetra acetic acid

EtBr : ethidium bromide

EtOH : ethanol

FBS : fetal bovine serum

HEPES : 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

HRP : horseradish peroxidase

IPTG : isopropyl- β - thio galactopyranoside

MeOH : methanol

MilliQ 水 : Direct-Q[®] 3UV (Merck Millipore) で作製した超純水

PBS : phosphate buffered saline

P&S : penicillin ・ streptomycin

RPMI1640 : Roswell Park Memorial Institute 1640 培地

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : SDS- polyacrylamide gel electrophoresis

TBS : tris buffered saline

TBS-T : tris buffered saline with 0.05% Tween-20

TEMED : *N,N,N,N'*-tetramethylethylenediamine

Tris : tris- (hydroxymethyl) aminomethane

Triton X-100 : 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol,
t-Octylphenoxy polyethoxyethanol, Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

3. 試薬と実験方法

3-1. 試薬と材料

3-1-1. 試薬および消耗品

試薬および消耗品の製造元、号級およびカタログナンバー(Cat#)を以下に示す。

試薬

- ・塩酸 (関東化学株式会社・特級試薬・Cat# 18078-00-44)
- ・酢酸 (関東化学株式会社・試薬特級・Cat# 017-00256)
- ・アンピシリンナトリウム (和光純薬工業株式会社・生化学用・Na 塩・Cat# 014-23302)
- ・トリプシン-EDTA 溶液 (nacalai tesque・Cat# 32777-44)
- ・グリシン (和光純薬工業株式会社・Cat# 073-00737)

- ・グリセロール (和光純薬工業株式会社・Cat# 075-00611)
- ・ブロモフェノールブルー (和光純薬工業株式会社・試薬特級・Cat# 029-02912)
- ・プロテインラダー3色タイプ (MIXELL・Cat#MXL-1020)
- ・ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(nacalai tesque・Cat# 09367-34)
- ・1-ブタノール (和光純薬工業株式会社・試薬特級・Cat#026-03326)
- ・2-プロパノール (Sigma-Aldrich・特級試薬・Cat# 15-2320-5)
- ・40%(w/v)アクリルアミドビス混合溶液 (nacalai tesque・電気泳動用特級試薬・Cat# 06121-95)
- ・ペルオキシ二硫酸アンモニウム (和光純薬工業株式会社・電気泳動用・Cat# 016-08021)
- ・Albumin Standard (Thermo Fisher Scientific・Cat# 23209)
- ・Bact-agar (三光純薬株式会社・Cat# 214010)
- ・Blasticidin (Invitrogen・Cat# ant-bl)
- ・Blocking One (nacalai tesque・ブロッキング用・Cat# 03953-95)
- ・DTT (和光純薬工業株式会社・SH 基酸化防止用・Cat# 041-08976)
- ・EDTA (和光純薬工業株式会社・Cat# 345-01865・2Na 塩)
- ・EGTA (和光純薬工業株式会社・Cat# 342-01314)
- ・EtBr (和光純薬工業株式会社・生化学用・Cat# 598-14541)
- ・Ex taq (タカラバイオ株式会社・Cat#RR001)
- ・EtOH (和光純薬工業株式会社・試薬特級 Cat# 17065-1283)
- ・FBS (Gibco・Cat# 26140-079)
- ・G418 Sulfate (Calbiochem・Cat# 345810)
- ・glucose (和光純薬工業株式会社・試薬特級・Cat#045-31162)
- ・HEPES (和光純薬工業株式会社・Cat# 346-01373)
- ・LB broth EZMix™ Powder (Sigma-Aldrich・Cat# L7658)
- ・Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen・Cat# 11668-019)

- MeOH (和光純薬工業株式会社・試薬特級・Cat# 19-2410-8)
- MgCl₂ (Sigma-Aldrich・Cat# 7786-30-3)
- NaCl (和光純薬工業株式会社・Cat# 191-01665)
- NaF (和光純薬工業株式会社・Cat# 194-01971)
- NaOH (和光純薬工業株式会社・Cat# 198-13765)
- Na₃VO₄ (和光純薬工業株式会社・試薬特級・Cat# 198-09752)
- PBS tablets (Sigma-Aldrich・Cat# P4417)
- Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards (Bio-Rad・Cat#1610374)
- protease Inhibitor Cocktail Set III (和光純薬工業株式会社・Cat# 163-26061)
- RPMI1640 (Sigma-Aldrich・Car# R8758)
- SDS (和光純薬工業株式会社・試薬一級・Cat# 196-14045)
- SlowFade Gold antifade reagent (Invitrogen・Cat# S36936)
- Stealth siRNA of human CDCP1 (Thermo Fisher Scientific・Custom order)
- TBS Tablets pH7.6 (タカラバイオ株式会社・Cat# T9141)
- TBS with Tween20 Tablets (タカラバイオ株式会社・Cat# T9142)
- TEMED (和光純薬工業株式会社・電気泳動用・Cat# 205-06313)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich・Cat# T9284)
- Trizma base (Sigma-Aldrich・試験研究用・Cat# T1503-1GK)
- Ultra Pure Agarose (Invitrogen・Cat# 16500-500)
- Western Lightning Plus-ECL, Enhanced ChemiluminescenceSubstrate (PerkinElmer Cat# NEL-105001EA)
- X-Gal (タカラバイオ株式会社・Cat# 9031)
- XL-DNA Ladder 1K plus (Aproscience・Cat#KE-2610)
- β-メルカプトエタノール (和光純薬工業株式会社・電気泳動用・Cat# 135-14352)

消耗品

- ・ろ紙 (MACHEREY-NAGEL・MN218B・Cat#742111)
- ・10 cm dish (Thermo Fisher Scientific・Cat#150350)
- ・6 well dish (Thermo Fisher Scientific・Cat#110675)
- ・24 well dish (Thermo Fisher Scientific・Cat#142475)
- ・microscope cover glass 12mm circle (Fisherbrand・Cat# 12-545-80)
- ・PVDF 膜 (MERCK MILLIPORE・Cat#IPVH00010)

3-1-2. 使用した細胞株および大腸菌株

使用した細胞株

- ・A549 細胞株：ヒト肺胞基底上皮腺がん由来の細胞株 (ATCC® CCL185™)
- ・A549 miCDCP1 細胞株：miRNA system により CDCP1 mRNA 発現を恒常的に抑制した A549 細胞株
- ・BxPC3 細胞株：ヒト膵臓腺がん細胞由来の細胞株(ATCC® CRL1687™)

使用した大腸菌株

- ・大腸菌 BL21 株：MBP 融合タンパク質の大腸菌発現用
- ・大腸菌 DH5 α 株：細胞発現および大腸菌発現用プラスミドの選択および調製用

3-1-3. プラスミドベクター

- ・pcDNA3.1：遺伝子組換えタンパク質の細胞発現用プラスミドベクター
- ・CDCP1 変異体発現プラスミド：CDCP1res-F/pcDNA3.1：C 末端 HA 標識付野生型 CDCP1 発現用プラスミド、CDCP1res-HA/pcDNA3.1：C 末端 HA 標識付野生型 CDCP1 発現用プラスミド、 Δ ECD-F/pcDNA3.1：C 末端 FLAG 標識付細胞外ドメイン欠失型 CDCP1 発現用プラスミド、 Δ CUB2res-F/pcDNA3.1：C 末端 FLAG 標識付 CUB2 ドメインを欠失した CDCP1 発現用プラスミド、Y734Fres-F/

pcDNA3.1:C 末端 FLAG 標識付(Y734→F734)変異型 CDCP1 発現用プラスミド、
CUB123res-F/pcDNA3.1 : C 末端 FLAG 標識付 C 末端から CUB1 ドメインまでの
領域を欠失した CDCP1 発現用プラスミド、 Δ CUB123res-F/pcDNA3.1 : C 末端 F
LAG 標識付 CUB1-3 ドメインを欠失した CDCP1 発現用プラスミド。

- ・ pMAL-c5x vector : MBP 融合蛋白質の大腸菌発現用プラスミドベクター
- ・ CDCP1 細胞外 CUB ドメイン発現プラスミド : rMBP/pMAL-c5x : マルトース結合タンパク質発現用プラスミド rMBP-CUB2/pMAL-c5x : MBP 融合 CUB2 ドメイン発現用プラスミド、rMBP-CUB3/pMAL-c5x : MBP 融合 CUB3 ドメイン発現用プラスミド

3-1-4. 抗体

本研究で使用した 1 次抗体、2 次抗体と抗体標識ビーズおよび染色用試薬を、
使用時の濃度、購入先およびカタログナンバー(Cat#)とともに以下に示す。

「1 次抗体」

- ・ 抗 FLAG-HRP マウス抗体(1:4000) (Monoclonal anti-FLAG M2 Peroxidase(HRP) antibody ; Sigma-Aldrich • Cat# A8592)
- ・ 抗 FLAG M2 FITC マウス抗体(1:600) (Monoclonal anti-FLAG M2 FITC antibody ; Sigma-Aldrich • Cat# F4049)
- ・ 抗 tubulin マウス抗体(1:10,000)(monoclonal anti- α Tubulin ; Sigma-Aldrich • Cat# T5168)
- ・ 抗 Src ウサギ抗体(1:4000) (c-Src(SRC2) ; Santa Cruz Biotechnology • Cat# sc-18)
- ・ 抗 p-Src(Tyr416)ウサギ抗体(1:2000) (Phospho-Src Family (Tyr416) Antibody ; Cell Signaling Technology • Cat# 2101)
- ・ 抗 PKC δ ウサギ抗体(1:4000) (PKC δ (C-20) ; Santa Cruz Biotechnology • Cat# sc-937)
- ・ 抗 p-PKC δ (Tyr311)ウサギ抗体(1:2000) (Phospho-PKC δ (Tyr311) Antibody ; Cell Signaling Technology • Cat# 2055)
- ・ 抗 CDCP1 ヤギ抗体(1:4000) (anti-CDCP1 ; Abcam • Cat# ab1377)
- ・ 抗 HA ウサギ抗体(1:4000) (HA-probe(Y-11) ; Santa Cruz Biotechnology • Cat#

sc-805)

- ・抗 MBP マウス抗体(1:10,000) (anti-MBP ; New England BioLabs ・ Cat# E8032S)

「2 次抗体」

- ・ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体(1:4000) (Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep ; GE Healthcare ・ Cat# NA931V)
- ・ペルオキシダーゼ標識抗ラビット IgG 抗体(1:4000) (Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey ; GE Healthcare ・ Cat# NA934V)
- ・ペルオキシダーゼ標識抗ヤギ IgG 抗体(1:4000) (Anti-goat IgG, HRP-Linked Whole Ab mouse ; Santa Cruz Biotechnology ・ Cat# sc-2354)
- ・Alexa546 抗ウサギ IgG 蛍光色素抗体(1:300) (Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG(H+L) ; Life Technologies ・ Cat# A11010)
- ・Alexa488 抗マウス IgG 蛍光色素抗体(1:300) (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG(H+L) ; Life Technologies ・ Cat# A11001)

「抗体標識ビーズ」

- ・抗 FLAG M2 アフィニティーゲル (Anti-FLAG M2 Affinity Gel ; Sigma-Aldrich ・ Cat# A2220)

「細胞染色用蛍光試薬」

- ・phalloidin546(1:40)(Thermo Fischer Scientific ・ Cat#A22283) : アクチン染色用
- ・DAPI(1 µg/mL)(タカラバイオ株式会社 ・ Cat# PK-CA707-40011) : 核染色用
- ・TOTO3 iodide(1:10,000)(Thermo Fischer Scientific ・ Cat#T3604) : 核染色用

3-1-5. PCR 用プライマー

本研究で使用した PCR 用プライマーの配列を表 1 に示す。

3-1-6. 使用したキット

本研究で使用した試薬キットを以下に示す。

- ・BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific ・ Cat# 23225) : タンパク質定量キット
- ・BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequence kit (Thermo Fisher Scientific ・ Cat#4336935) : DNA シークエンスキット

- KOD -plus- mutagenesis kit(Toyobo • Cat#SMK-101) : Inverse RCR 法に基づく部位特異的変異導入キット
- NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure(タカラバイオ株式会社 • Cat#740615.250) : PRC 産物精製キット
- pMAL[™] protein fusion & purification system(New England Biolabs • Cat#E8200S) : マルトース結合タンパク質 (MBP) のアフィニティクロマトグラフィーを利用したタンパク質の精製キット
- PureLink[™] HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit(Thermo Fisher Scientific • Cat#K210015) : プラスミド大量精製キット

3-1-7. 試薬の組成

本研究で使用した試薬の調製方法を以下に示す。また、組成を表 2 に示す。

SDS-PAGE 電気泳動用試薬

- 2 M Tris-HCl (pH8.8)溶液

242.2 g の Trizma base を 800 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから HCl で pH を 8.8 に調整し、超純水(milliQ 水)で 1 L にメスアップした。

- 10% SDS 溶液

10 g の SDS を 80 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、超純水(milliQ 水)で 100 mL にメスアップした。

- 4× Lower Gel buffer

2 M Tris-HCl (pH8.8)溶液 750 mL と 10% SDS 溶液 40 mL を混合し、超純水(milliQ 水)で 1 L にメスアップした。

- 4× Upper Gel buffer

1 M Tris-HCl (pH6.8)溶液 100 mL と 10% SDS 溶液 8 mL を混合し、超純水(milliQ 水)で 200 mL にメスアップした。

- Laemmli buffer

30 g の Trizma base と 144 g の Glycine、5 g の SDS を 800 mL の超純水(milliQ

水)に溶解させてから、超純水(milliQ 水)で 5 L にメスアップした。

- 1.0% BPB

1 g の BPB を 80 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、超純水(milliQ 水)で 100 mL にメスアップした。

- 4× Sample buffer

1 M Tris-HCl (pH6.8)溶液 4 mL に 0.8 g の SDS を溶解させてから、4 mL の Glycerol を溶解させた。さらに 0.4 mL の 1.0% BPB 溶液を加えて、超純水(milliQ 水)で 10 mL にメスアップした。使用前に β -メルカプトエタノールを 40% (v/v)、または DTT を最終濃度 0.4 M になるように加えた。

WB 用試薬

- Blotting buffer

15 g の Trizma base と 72 g の Glycine を 800 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、250 mL の MeOH を加えて、超純水(milliQ 水)で 5 L にメスアップした。

- PBS

PBS tablets 1 個を 150 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させ、超純水(milliQ 水)で 200 mL にメスアップした。

- TBS

TBS tablets 2 個を 800 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させ、超純水(milliQ 水)で 1 L にメスアップした。

- TBS-Tween20

TBS with Tween20 Tablets 2 個を 800 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させ、超純水(milliQ 水)で 1 L にメスアップした。

- 10N NaOH

200 g の NaOH を 400 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、超純水(milliQ 水)で 500 mL にメスアップした。

・0.5 M EDTA (pH8.0)

93.05 g の EDTA を 400 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから 10N NaOH で pH を 8.0 に調整し、超純水(milliQ 水)で 500 mL にメスアップしてから、121°C、20 分間オートクレーブ処理した。

・10× TAE

48.4 g の Trizma base を 800 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、11.4 mL の AcOH と 20 mL の 0.5 M EDTA(pH8.0)を加えて、超純水(milliQ 水)で 1 L にメスアップした。

細胞実験用試薬

・細胞培養用培地(10% FBS, P&S(+))

500 mL の RPMI1640 に 50 mL の FBS および 5 mL のペニシリン/ストレプトマイシン溶液を混合して調製した。

・細胞培養用培地(10% FBS, P&S(-))

500 mL の RPMI1640 に 50 mL の FBS を混合して調製した。

・トリプシン-EDTA 溶液

500 mL の PBS に 50 mL のトリプシン-EDTA 溶液を混合して調製した。45 mL に分注して凍結保存し、使用中は 4°C 冷蔵庫で保存した。

・PLC Lysis buffer

11.9155 g の HEPES と 8.766 g の NaCl、142.815 mg の MgCl₂、380.35 mg の EGTA、4.2 g の NaF を 700 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、100 mL の Glycerol と 10 mL の Triton X-100 を混合させ、超純水(milliQ 水)で 1 L にメスアップした。

使用時は Na_3VO_4 を終濃度 1 mM、プロテアーゼインヒビターを 100 倍希釈となるように加えた。

・10 mM Na_3VO_4

92 mg の Na_3VO_4 を 40 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、10N NaOH で pH を 10 に調整し、超純水(milliQ 水)で 50 mL にメスアップした。

大腸菌実験用試薬

・LB 液体培地

8.24 g の LB broth EZMix™ Powder を 400 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、121°C、20 分間オートクレーブ処理した。

・LB 寒天培地

8.24 g の LB broth EZMix™ Powder と 6.0 g の Bacto-agar を 400 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、121°C、20 分間オートクレーブ処理した。50°C 程度まで冷却後、抗生物質(Amp:終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を加え、10 cm dish に 5 mm 程度の厚さになるように流し込み、室温で空冷して固めた。LB 寒天培地はアルミ箱で遮光したあと、4°C 冷蔵庫で保存した。・Amp ストック溶液

1.0 g のアンピシリンナトリウムを 10 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、0.22 μm の滅菌フィルターにより、ろ過滅菌したものを使用した。(使用時は 1,000 倍に希釈した。)

・EtBr ストック溶液

50 mg の EtBr を 5 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させた。(使用時は 20,000 倍に希釈した。)

・IPTG ストック溶液

2.38 g の IPTG を 10 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させ、0.22 μm の滅菌フィル

ターにより、ろ過滅菌した。(使用時は 0.3 mM になるように希釈した。)

・カラムバッファー

5.85 g の NaCl を 400 mL の超純水(milliQ 水)に溶解させてから、10 mL の 1.0 M Tris-HCl(pH7.4)と 20 mL の 0.5 M EDTA(pH8.0)を加えて、超純水(milliQ 水)で 500 mL にメスアップした。各 MBP 融合タンパク質をアミロースレジンから溶出させる際は、このバッファー50 mL にさらにマルトースを 1.7115 g を加えた。

3-2. 実験方法

3-2-1. CDCP1 変異体発現プラスミドの構築

CDCP1res-F/pcDNA3.1 とは、CDCP1 遺伝子の開始コドン(ATG)のアデニン(A)を 1 番目として、97 番目から 120 番目までの塩基配列(GCTCTGCCACGAGAAAGCAACATT)を、アミノ酸配列に変化のない塩基(下線)に置換した配列(GCTTTACCAAGGGAATCCAATATC)と交換することにより、CDCP1 siRNA による発現抑制の影響を受けないようにした CDCP1 の発現プラスミドのことであり、C 末端に FLAG 標識が付加されている[19]。この CDCP1res-F/pcDNA3.1 を鋳型として、細胞外ドメインを欠失させた Δ ECD-F/pcDNA3.1、細胞外 CUB2 ドメインを欠失させた Δ CUB2res-F/pcDNA3.1、CUB1 ドメインより上流部位を欠失させた CUB123res-F/pcDNA3.1、CUB1 から CUB 3 までを欠落させた Δ CUB123res-F/pcDNA3.1 を構築した。具体的には、表 1 に記載したプライマー(No.1-8)を用い、KOD -Plus- mutagenesis kit (Toyobo)により pcDNA3.1 ベクターを含む CDCP1 変異体の DNA 断片を増幅した後、鋳型である CDCP1res-F/pcDNA3.1 を *DpnI* によって切断した。その後、アガロースゲル電気泳動により pcDNA3.1 ベクターを含む CDCP1 変異体の DNA 断片を分離、回収して、ライゲーションによって各 CDCP1 変異体の発現プラスミドを作製し

た(図 6)。

マルトース結合タンパク質(MBP)を標識として付加した CDCP1 の細胞外 CUB2 および CUB3 ドメインタンパク質を作製するために、大腸菌発現用 pMal-c5x ベクターを使用した。まず、CDCP1res-F/pcDNA3.1 を鋳型として CUB2 および CUB3 ドメインの DNA 断片を、表 1 に記載のプライマー(No.9-12)を用いて EX-Taq (タカラバイオ株式会社)による PCR で増幅した。その後、増幅された PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離、回収し、精製した PCR 産物と pMal-c5x を制限酵素の *NdeI* と *EcoRI* で 37°C、120 分間処理し、再度アガロースゲル電気泳動により分離、回収した。制限酵素処理した PCR 産物と pMal-c5x ベクター を DNA ligation kit Ligation high Ver.2 (Toyobo)を用いて、4°Cで一晩ライゲーションし CUB2 ドメインを発現させる rMBP-CUB2/ pMal-c5x と CUB3 ドメインを発現させる rMBP-CUB3/ pMal-c5x の大腸菌発現プラスミドを作製した(図 7)。

3-2-2. Polymerase chain reaction (PCR)法

鋳型 DNA; 50 ng、10×buffer; 5 μL、25 mM MgCl₂; 4 μL、2.5 mM dNTPs; 4 μL、Forward と Reverse プライマー; 各 1 μL (10 pmol)、DNA ポリメラーゼ; 1 μL に超純水(Milli-Q 水)を加えて全量を 50 μL とし、PCR 反応液として使用した。

実験別 PCR の条件は以下の通りである。

- ・ CDCP1 変異体の発現プラスミド構築のための PCR 条件

95°C 1 分

98°C 50 秒	} 30 サイクル
58°C 50 秒	
68°C 6 分 30 秒	

4°C 保持

・ MBP 融合 CUB2 および CUB3 ドメインタンパク質の大腸菌発現プラスミド

構築のための PCR 条件

95°C 1 分

95°C 30 秒 }
57°C 1 分 } 35 サイクル
72°C 2 分 }

4°C 保持

・ 塩基配列解析のための PCR 条件

95°C 1 分

96°C 10 秒 }
50°C 10 秒 } 25 サイクル
60°C 4 分 }

4°C 保持

3-2-3. 制限酵素処理

1.5 mL チューブに、1 μg のベクターあるいは PCR 産物と反応用の 10 \times buffer 5 μL を入れて総容量が 48 μL となるように超純水(Milli-Q 水)を入れた。その後、適宜制限酵素を 1 μL ずつ加え、37°C で 2 時間インキュベートした。最後に、65°C で 15 分間インキュベートして制限酵素を失活させた。

3-2-4. アガロースゲル電気泳動

10 \times TAE 緩衝液 20 mL と超純水 (Milli-Q 水)180 mL、アガロース 2 g を加え、この溶液を 121°C で 20 分間オートクレーブし、溶液が固まらない程度まで冷却した。10 mg/mL の EtBr を 10 μL 加えてよく混合し、アガロースゲル作製の

小ゲルカセットに 20 mL 流し込み、コームを差し込んでから室温で 30 分間静置して固めることで 1%アガロースゲルとした。

アガロースゲル電気泳動の際には、Mupid-2x 電気泳動槽 (Advance) に 1×TAE 緩衝液 350 mL を満たし、1%アガロースゲルを泳動槽に入れて固定した。その後、DNA サイズマーカーXL-DNA Ladder 1K plus (Aproscience) と DNA 試料を 1%アガロースゲルの試料レーンに入れ、100V で 30 分間通電した。泳動された DNA 断片は、myECL Imager (Thermo Fisher Scientific) の紫外線波長 306 nm により確認した。

3-2-5. アガロースゲルからの DNA 断片の抽出

目的 DNA 断片を myECL Imager (Thermo Fisher Scientific) の波長 306 nm で観察しながら、1%アガロースゲルからカッターで切り取り抽出した後、FastGene Gel/PCR Extraction kit (Nippon genetics) を使用して DNA 断片を精製した。

3-2-6. 各種発現プラスミドのライゲーション

DNA ligation kit Ligation high Ver.2を用いて以下の条件でライゲーションをおこなった。ベクター(50 ng)と挿入するDNA断片(1.0 ng)を含む溶液10 μ L を用意し、Enzyme Solution (Ligation high Ver.2)を10 μ L添加してよく混合した。ライゲーション反応は、pcDNA3.1ベクター場合は、16°Cで1時間、pMal-c5xベクターの場合は、4°Cで一晩インキュベートしておこなった。

3-2-7. 大腸菌の形質転換

ライゲーションしたプラスミド溶液1 μ Lを、大腸菌コンピテントセルDH5 α 50 μ Lに加え、氷上で10分置きに緩やかにピペッティングをして30分間静置した。

この溶液に、42°C、45秒間のヒートショック処理をおこない、直ちに氷上戻して2分間静置した。その溶液に、LB液体培地150 μ Lを加えて37°Cで30分間インキュベートした後、全ての溶液をAmp入りLB寒天培地に播いた。その後、37°Cで12時間インキュベートして目的の発現プラスミドを保持するAmp耐性コロニーを得た。

3-2-8. 各種発現プラスミドの調製

目的の発現プラスミドを保持する DH5 α 大腸菌株を、Amp 入りの LB 液体培地 5 mL に植菌し、37°C で一晚、160 rpm で振盪培養した。培養液を 1.5 mL チューブに取り、4°C、20,630 \times g で 1 分間の遠心分離を繰り返し、大腸菌ペレットを得た。発現プラスミドは、NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure (Machery-Nagel) のプロトコールに従って精製し回収した。発現プラスミドの大量精製には、大腸菌培養液 200 mL を用いて得られた大腸菌ペレットを、PureLink[™] HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) のプロトコールに従って処理し、プラスミドを精製し回収した。

3-2-9. 遺伝子の塩基配列解析

目的遺伝子の塩基配列の解析には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence kit (Applied Biosystems) を使用した。BigDye Sequencing Buffer 2 μ L、シークエンスプライマー(表1) 3.2 pmol、プラスミドDNA 500 ng とシークエンスキットに含まれるプレミックス酵素溶液 1 μ L を混合させ、超純水 (Milli-Q 水) を加えて全量を 10 μ L として PCR をおこなった。PCR 後に、125 mM EDTA を 2.5 μ L と EtOH を 40 μ L 加えて攪拌し、室温、遮光状態で 20 分間インキュベートした。その後、溶液を 20,630 \times g で 15 分間遠心分離して上清を取り除いた後、DNA ペレットに 100 μ L

の70% エタノールを加えて洗浄し、再度同様の遠心分離をおこなった。DNAペレットは、乾燥させた後、20 μ LのHi-Diホルムアミド溶液に溶解させ、この溶液をABI PRISM®310 Genetic Analyzer (Life Technologies) による塩基配列解析に使用した。

3-2-10. 細胞培養

細胞凍結保存液であるセルバンカー(タカラバイオ株式会社) 1 mL 中に保存されていた BxPC3 細胞株および A549 細胞株は、37°Cの恒温水槽で素早く解凍し、RPMI1640 細胞培養液(10% FBS, P&S(+))が 9 mL 入った 15 mL チューブ中に加えた。次に 600 \times g で 1 分間遠心分離し、細胞培養液を吸引除去して新しい細胞培養液(10% FBS, P&S(+))10 mL を入れ、穏やかに細胞を懸濁した。この細胞懸濁液を 10 cm dish に全て移し、CO₂ インキュベーター(37°C、5 % CO₂)で一晩培養し、顕微鏡で細胞に異常がないか確認した。

細胞を継代する際は、細胞培養液を吸引した後に滅菌 PBS を 2 mL 加えて洗浄後に再度吸引し、0.2%のトリプシン-EDTA 溶液を 2 mL 加えて CO₂ インキュベーター(37°C、5 % CO₂)に 3 分間静置した。細胞が剥がれたことを顕微鏡で確認した後、細胞培養液(10% FBS, P&S(+))を 5 mL 加え、15 mL チューブに回収、420 \times g で 1 分間遠心分離して細胞を沈殿させて、細胞培養液を吸引し、新しい 10 mL の細胞培養液(10% FBS,P&S(+))に懸濁し、その細胞懸濁液 1 mL を、細胞培養液(10% FBS,P&S(+)) 9 mL を入れた 10 cm dish に加えて混合し、CO₂ インキュベーター(37°C、5 % CO₂)で培養した。

細胞を凍結保存する際は、継代と同じ方法で 15 mL チューブに回収した細胞を、細胞凍結保存液セルバンカー1 mL で懸濁し、凍結保存用 1.5 mL セラムチューブに入れて-80°C超低温フリーザーに保管した。

既に確立されている A549 miCDCP1 細胞株の培養では、blasticidin を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になる様に RPMI1640 細胞培養液に添加し、2 日おきに細胞培養液を交換することによって、恒常的な CDCP1 の発現抑制細胞株を維持した。各 CDCP1 変異体プラスミドを導入した A549 miCDCP1 細胞株は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の blasticidin に加えて、さらに 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の G418 Sulfate を細胞培養液に添加し、2 日おきに細胞培養液を交換しながら 20 日間培養し、恒常的に CDCP1 変異体を発現する細胞株を選択した。BxPC3 細胞株では、各 CDCP1 変異体プラスミドを導入した後、1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の G418 Sulfate を細胞培養液に添加し、2 日おきに細胞培養液を交換しながら 30 日間培養し、恒常的に CDCP1 変異体を発現する細胞株を選択した。これら CDCP1 変異体を恒常的に発現させた各細胞株は、soft-agar assay、wound healing assay 及び transwell migration assay に使用した。

3-2-11. 癌細胞株への発現プラスミドの導入

10 cm dish に 1×10^6 個の A549 miCDCP1 細胞株を撒き、12 時間 CO_2 インキュベーター (37°C、5 % CO_2) で培養した。その後、1.5 mL マイクロチューブに、lipofectamine 2000 を 5 μL と Opti-MEM を 250 μL 入れた lipofectamine 2000 溶液と、別の 1.5 mL マイクロチューブに各プラスミド(CDCP1res-F: 5 μg 、CDCP1res-HA: 5 μg 、 Δ ECD-F: 1 μg 、 Δ CUB2res-F: 5 μg)と Opti-MEM 250 μL を入れたプラスミド溶液を共に穏やかに攪拌した後、室温で 10 分間静置した。次に、後者のプラスミド溶液を前者の lipofectamine 2000 溶液内に加えて穏やかに混合し、室温でさらに 20 分間静置してプラスミド導入液とした。最後に、A549 miCDCP1 細胞株の細胞培養液を除去し、2 mL の PBS で洗浄した後、抗生物質無添加の新しい細胞培養液(10% FBS,P&S(-))10 mL を加え、上述のプラスミド導入液を添加し、 CO_2 インキュベーター (37°C、5 % CO_2) で培養した。

3-2-12. siRNA 処理による CDCP1 の発現抑制

35 mm dish に細胞培養液(10% FBS,P&S(-))を 2.0 mL 加え、細胞を 3.0×10^5 個播いた。二つの 1.5 mL チューブに、各々 250 μ L の Opti-mem を分取し、一方には 5 μ L の Lipofectamine 2000 を、もう一方には終濃度 50 nM の CDCP1 siRNA を混合して 10 分間静置した。その後、後者の CDCP1 siRNA の入った溶液を前者の Lipofectamine 2000 の入った溶液に移してピペッティングにより混合し、20 分間静置した。この 500 μ L の混合溶液を細胞培養液中に添加し、CO₂ インキュベータ(37°C、5 % CO₂)で 48 時間培養した。

3-2-13. 細胞抽出液の回収

10 cm dish で培養している細胞の培地を吸引除去し、PBS を 2 mL 加えて洗浄した後、再度吸引した。ここに PLC buffer を 80 μ L 加えて細胞を溶解しつつ、スクレーパーで細胞を剥がして、1.5 mL チューブに細胞溶解液を回収した。1 分間振とう器で細胞溶解液を懸濁した後、4°C、 $15,490 \times g$ で 15 分間遠心分離して、上清を回収し細胞抽出液とした。

3-2-14. MBP 融合 CUB ドメインタンパク質の調製

MBP 融合 CUB ドメインタンパク質を発現する大腸菌を 200 mL の LB 液体培地に入れ、37°Cで一晩、 $160 \times rpm$ で振盪培養した。大腸菌は、4°C、 $1,120 \times g$ で 15 分間遠心分離して上清を捨て、10 mL のカラムバッファーに懸濁した。その後、Handy Sonic (SEIKO UR-20P)を用いて氷中で 10 秒間の超音波破碎を 3 回おこなった後、4°C、 $20,000 \times g$ で 20 分間遠心分離し、上清を回収した。その上清を pMAL™ protein fusion & purification system (New England BioLabs)のプロトコールに従って処理し、各 MBP 融合 CUB ドメインタンパク質を精製した。

3-2-15. タンパク質濃度の測定

各実験で用いたタンパク質の濃度は、BCA Protein Assay kit を用いて測定した。iMark™ microplate Reader (Bio-Rad)によって各濃度未知の試料を 570 nm の吸光度で測定し、BSA を用いた Standard 溶液の吸光度による検量線と比較することでタンパク質の濃度を決定した。

3-2-16. 免疫沈降

総タンパク質量 350 μg の細胞ライセート 350 μL の入った 1.5 mL チューブに抗 FLAG M2 アフィニティーゲル(抗体ゲル)を 20 μL 加え、氷上で 10 分毎に緩やかに攪拌して 60 分間、抗体と反応させた。次に、90 \times g で 1 分間の遠心分離により抗体ゲルを沈殿させ、上清を吸引除去した後に抗体ゲルを 500 μL の PLC buffer で 3 回洗浄した。その後、抗体ゲルに 10 μL の 4 \times Sample buffer を加えて 100 $^{\circ}\text{C}$ 、3 分間インキュベートして抗体に結合したタンパク質群を遊離した。最後に、20,630 \times g で 2 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 mL チューブに回収して免疫沈降後の試料とした。

3-2-17. SDS-PAGE

SDS-PAGE 用の変性ポリアクリルアミドゲルは、タンパク質を分離するためのランニングゲルのアクリルアミド濃度を 8%または 10%、タンパク質を濃縮させるためのスタッキングゲルのアクリルアミド濃度を 3%として作製した。具体的には、ランニングゲル溶液を、2.5 mL の 4 \times Lower Gel buffer、2.0 mL の 40% アクリルアミド溶液、5.4 mL の蒸留水、100 μL の 10% APS、6 μL の TEMED を混合して調製し、ゲルの面積が縦 6 cm \times 横 9 cm になるようにゲル板(ゲル厚 1 mm)に流し込んだ。その上から飽和ブタノール水溶液 1 mL を重層し 30 分間静

置してランニングゲルを作った。次に、飽和ブタノール水溶液を除去してゲル板の上部にコームを差し込み、500 μ L の 4×Upper Gel buffer、150 μ L の 40% アクリルアミド溶液、1.33 mL の蒸留水、20 μ L の 10% APS、2 μ L の TEMED を混合して調製したスタッキングゲル溶液をランニングゲル上に重層して 30 分間静置し、スタッキングゲルを作った。コームを抜いてスタッキングゲル内のウェルを洗浄し、その中に試料を添加し、電気泳動をおこなった。試料の電気泳動による分離条件は、色素付分子質量マーカースの分離が確認されるまで、電圧を 120 V で泳動し、その後、電圧を 200 V に変更した。そして、試料に含まれている BPB 色素がゲルの下端から 5 mm の位置まで泳動された時に通電を止めた。色素付分子質量マーカースには、プロテインラダー3 色タイプ(MIXELL)または、Precision Plus Protein™ Dual Color Standards(BioRad)を使用した。

3-2-18. ウェスタンブロッティング(WB)

Poly vinylidene di-fluoride (PVDF)膜 (Millipore)を MeOH に十分浸した後、この PVDF 膜と MN128B 号ろ紙(MACHERY-NAGEL)を Blotting buffer に浸し、転写装置 (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell) (Bio-Rad)下側の陽極板に、ろ紙(3 枚)、PVDF 膜、アクリルアミドゲル、ろ紙(3 枚)の順に重ね、上に陰極板を乗せてタンパク質の PVDF 膜への転写をおこなった。ゲル 1 枚あたり 54 mA で 90 分間通電し、色素付分子質量マーカースが転写されていることを確認して PVDF 膜を blotting buffer の入った容器に移した。

タンパク質が転写された PVDF 膜を、Blocking One 溶液(nacalai tesque) で 1 時間ブロッキングした後、Blocking One 溶液を除去して 5% Blocking One/TBS-T 溶液に任意の希釈率の 1 次抗体を加え、室温で 1 時間振とうした。次に、1 次抗体溶液を除き、TBS-T で 10 分間×3 回洗浄し、各種 1 次抗体に対応する HRP 付の

2次抗体を 1:4,000 の希釈倍率で 5% Blocking One/TBS-T 溶液に 加えて PVDF 膜を浸し、室温で 30 分間振とうした。2 次抗体溶液を除き、PVDF 膜を TBS-T で 10 分間×2 回洗浄して、TBS で 10 分間の洗浄を 1 回おこなった。この PVDF 膜を化学発光による WB 検出用試薬 Western Lightning™ Plus-ECL に 1 分間浸し、余分な試薬を除いた後、myECL Imager (Thermo Fisher Scientific) を用いて、10 分から 15 分の間で WB のバンドを検出した。WB によるバンドの解析は、myImage Analysis Ver. 2.0 を使用し、WB バンドのシグナル強度は、NIH imageJ 1.50i を使用して数値化した。

タンパク質間相互作用を検証するための Far-WB では、rMBP、r-MBP-CUB2、rMBP-CUB3 の各組換えタンパク質 3 μ g を bait protein として、PVDF 膜上に滴下してドット状に吸着させた。この PVDF 膜を Blocking One に浸し、室温で 1 時間ブロッキングした後、Blocking One を除去し、prey protein として CDCP1res-F または Δ ECD-F を発現させた A549 miCDCP1 細胞抽出 TBS-T 溶液 5 μ g/mL を加え、室温で 1 時間振とうしてタンパク質を結合させた。以降は、上述と同様の方法で WB をおこなった。

3-2-19. 細胞免疫染色

接着細胞では、24 well dish に 70% EtOH で洗浄した 12 mm カバーガラス (Fisherbrand) を入れたものを、浮遊細胞では、浮遊培養用 6 well dish を用い、それぞれに RPMI1640 培地(10% FBS,P&S(+))2 mL に A549 miCDCP1 細胞株 1×10^5 個を加えて CO₂ インキュベーター(37°C、5 %)で一晩培養した。続いて、lipofectamin 2000 を用いて各変異体プラスミド(CDCP1res-HA 0.6 μ g、CDCP1res-F 0.6 μ g、 Δ ECD-F 0.2 μ g)を上述の細胞に導入した。18 時間後に、接着細胞では 24 well dish 中の培地を吸引除去し、浮遊細胞では、細胞を 15 mL チューブに移

して 420×g で 3 分間遠心分離してから培地を吸引除去した。これ以降の操作は接着、浮遊細胞ともに共通となり、1 mL の PBS で洗浄して 4 % パラホルムアルデヒド 500 μL 中に 10 分間静置して細胞を固定した。500 μL の PBS で洗浄した後、1 mL の 0.25 % Triton X-100/PBS を加え、10 分間静置した。この溶液を吸引除去し、500 μL の Blocking One 溶液を添加して 40 分間ブロッキングをおこなった。溶液を除いた後、50 倍希釈した Blocking One 溶液を含む 1 次抗体 Blocking One/PBS 溶液(抗 FLAG M2 FITC 抗体, 1:600、抗 HA ウサギ抗体, 1:300, 抗 CDCP1 ヤギ抗体, 1:500) を 300 μl 添加し、1 時間後に 1 mL の PBS で 3 回洗浄した。次に、Alexa Fluor 標識 2 次抗体 Blocking One/PBS 溶液 (全て 1:800) 300 μL に必要に応じて核染色試薬(TOTO3, 1:10,000)、細胞質染色試薬(Phalloidin, 1:40)を添加して 30 分間静置し、1 mL の PBS で 3 回洗浄した。

染色細胞の観察用スライドガラスの作製は、接着細胞では、蛍光顕微鏡用スライドガラスの上に、退色防止剤 Slowfade Gold antifade reagent を 5 μL 滴下し、12 mm カバーガラスに接着した細胞がスライドガラス面に重なる様に置いた。浮遊細胞では、50 μL の Slowfade Gold antifade reagent を 15 ml チューブ内に直接入れ、スライドガラスに 5 μL 滴下して、新しい 12 mm カバーガラスを上からかぶせた。カバーガラスの周囲には、透明なマニキュアを塗って乾燥を防ぎ、オールインワン共焦点顕微鏡 FLUOVIEW FV10i (OLYMPUS) を用いて観察と画像撮影をおこなった。

3-2-20. 足場非依存性能の検定(soft-agar assay)

0.5%の Ultra Pure™ Agarose (Invitrogen) を含んだ RPMI1640(10% FBS,P&S(+)) 培地を電子レンジで加熱して agarose を完全に溶かし、6 well dish に 2 mL 入れて、固まるまで室温で静置して basal agar とした。次に、500 μL の RPMI1640 培地懸

濁液(A549 細胞株, 6×10^3 個/mL, BxPC3 細胞株, 6×10^5 個/mL)と 37°Cで保温した 1 mL の 0.5% basal agar を混合し、最終濃度 0.33% の細胞入り agar 1.5 mL を top agar として basal agar の上に重層した。CDCP1 変異体を恒常的に発現させた細胞株には、800 μ g/mL 濃度の G418 Sulfate 加えた RPMI1640 培地 1 mL を、A549 および BxPC3 細胞株には、RPMI1640 培地 1 mL を top agar の上加え、2 日間おきに培地交換しつつ、CO₂ インキュベーター(37°C、5 % CO₂)で 30 日間培養した。その後、この 6 well dish を CCD デジタルカメラで撮影し、径が 0.5 mm 以上の細胞塊として形成されたコロニーの数を well 毎に測定して足場非依存性能を測定した。

rMBP-CUB2 および rMBP-CUB3 を使用した実験では、top agar 上の RPMI1640 培地 1 mL 中に、さらに各 rMBP-CUB 融合タンパク質を 40 μ g/mL の濃度となるように添加した。

3-2-21. 細胞運動能の検定(wound healing assay, transwell migration assay)

Wound healing assay

RPMI1640(10% FBS,P&S(+))培地 2 mL の入った 6 well dish の各 well に A549 細胞株では 1×10^6 個、BxPC3 細胞株では 5×10^4 個の細胞を入れ、6well dish の底面が細胞で満たされるまで 3 日間培養した。その後、ピペットチップで底面の細胞に幅 600 μ m の傷をつけ、2 mL の PBS で洗浄して細胞デブリを取り除いた。細胞は、CO₂ インキュベーター(37°C、5 % CO₂)で培養した。培養中、細胞は傷をつけてできた隙間の両側から、その隙間をうめるように移動することになる。細胞の運動距離の測定には、細胞に傷をつけた時間(0 h)と、A549 細胞株では 24 時間後(24 h)、BxPC3 細胞株では 14 時間後(14 h)において、位相差画像を蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X710) で撮影した画像を使用した。各画像におけ

る細胞の移動位置は、隙間なく移動した細胞群の先端と、その細胞群のうち最も移動しなかった細胞の中央位置とした。細胞の移動距離は、蛍光顕微鏡のスケールバーを用いて 0 時間の時の移動位置から 14 時間後または 24 時間後の移動位置を引くことで算出した。

rMBP-CUB2 および rMBP-CUB3 を使用した実験では、培地中に各 rMBP-CUB 融合タンパク質を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加えた。

Transwell migration assay

24 well dish 上に Cell culture insert (8 μm pore size) をセットして、RPMI1640 P&S(+) 培地 500 μL を入れ、CDCP1 siRNA 処理により各変異体 CDCP1 のみを発現させた BxPC3 細胞株を 3×10^3 個播いた。Insert 下の 24 well dish には、RPMI1640 (FBS P&S(+)) 培地を 1 mL 入れた。この細胞を CO_2 インキュベーター (37°C 、5 % CO_2) で 12 時間培養し、Cell culture insert 膜の上部に残った細胞を綿棒で取り除き、径 8 μm の穴を通過して Cell culture insert 膜の下部(裏側)に接着した細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。500 μL の PBS で 3 回洗浄した後、ギムザ試薬で細胞を 7 分間染色し、スライドガラスの上に裏側に細胞がついた Cell culture insert 膜を乗せ、倒立顕微鏡下、倍率 200 倍で顕鏡観察の範囲をランダムに 5 カ所選出し、染色された細胞を計数した。

3-2-22. 標準偏差、有意差検定

各実験で得られたデータは、Microsoft Excel の関数を用い、標準偏差を STDEV.P で計算して求めた。有意差検定は P 値を T.TEST で計算して求め、p 値が 0.05 未満である場合を有意差ありと判断した。

4. 結 果

4-1. 細胞外ドメインを介した CDCP1 同種多量体形成による癌転移能の制御

4-1-1. CDCP1 の細胞外ドメインを介した同種多量体の形成

膜貫通タンパク質の中には上皮増殖因子受容体 EGFR や膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1(MT1-MMP)のように同種多量体を形成して細胞機能に関与する例が報告されている[33-35, 39]。CDCP1 は膜貫通型タンパク質であり、その細胞外ドメインには、タンパク質-タンパク質間相互作用に関与すると推定されている三つの CUB ドメインが存在している(図 3)[26, 36, 37]。

そこで、CDCP1 が細胞外ドメインを介して同種多量体を形成するか、検証をおこなった。本実験では miRNA system により、恒常的に内在性 CDCP1 の発現を抑制させた A549 miCDCP1 細胞株を使用した[9]。抗 CDCP1 ヤギ抗体による WBにおいて、A549 細胞株で見られた 135 kDa の内在性 CDCP1 が A549 miCDCP1 細胞で約 30%まで発現が抑制されていることを確認した。そこに CDCP1 変異体(図 8 A)を発現させると抗 FLAG-HRP 抗体および抗 HA ウサギ抗体により CDCP1res-F と CDCP1res-HA が 135 kDa、 Δ ECD-F が 20 kDa の位置にバンドが確認され、抗 CDCP1 ヤギ抗体においても同じ位置に、各 CDCP1 変異体のバンドが確認できた(図 8 B)。よって、各 CDCP1 変異体が miRNA system の影響を受けず発現していることが確認できた。次に、CDCP1 細胞外ドメインによる同種多量体形成を免疫沈降で検証した。CDCP1res-F と CDCP1res-HA、または Δ ECD-F と CDCP1res-HA の各組み合わせ(図 9-1A)で各 CDCP1 変異体タンパク質を A549 miCDCP1 細胞に発現させた(図 9-1 B Whole cell)。抗 FLAG M2 アフィニティーゲルを用いて、FLAG 標識付 CDCP1 変異体に対する免疫沈降をおこなったところ(図 9-1 B, IP: FLAG)、CDCP1res-F と CDCP1res-HA を同時に発現させた細胞では、抗 FLAG M2 アフィニティーゲルによる CDCP1res-F の免疫沈降によって、

CDCP1res-HA が共沈降されたことを示す 135 kDa の CDCP1 バンドが確認された (図 9-1 B, IP: HA)。一方、 Δ ECD-F と CDCP1res-HA を同時に発現させた細胞の免疫沈降では、CDCP1res-HA の共沈降バンドは検出されたが、CDCP1res-F の時と比較するとバンドシグナルが弱かった(図 9-1 B, IP: HA)。また、 Δ ECD-F の FLAG 抗体による WB において、20 kDa のバンド以外に 40 kDa のバンドが検出された(図 9-1 B, Δ ECD-F)。このバンドが Δ ECD-F であるかを検証するため、CDCP1 抗体による WB をおこなったが、40 kDa のバンドは検出されなかった(図 9-1, C)。次に、CDCP1res-F および Δ ECD-F による CDCP1res-HA の共沈降量を比較するために、NIH ImageJ を用いて WB におけるバンドのシグナル強度を数値化した (表 3-1)。共沈降した CDCP1res-HA の数値を免疫沈降後の FLAG 標識付 CDCP1 変異体の数値で除して、免疫沈降量に対する共沈降量を相対値で示すと、CDCP1res-F に対する CDCP1res-HA の共沈降量の相対値を 1 としたときに、細胞外ドメイン欠失変異体の Δ ECD-F おける相対値は、 0.16 ± 0.17 となり、減少していることが分かった(図 9-2)。

次に、各 CDCP1 変異体の細胞免疫染色による共局在の観察により同種多量体形成を細胞レベルで検証しようと考えた。CDCP1res-F を緑色で、CDCP1res-HA を赤色で染色した細胞では、いずれのタンパク質も細胞膜辺縁部に局在することが確認され(図 10-1 a, b)、細胞膜辺縁部で共局在を示す黄色の染色像が観察された(図 10-1 c)。一方、 Δ ECD-F を緑色で、CDCP1res-HA を赤色で染色した細胞では、細胞内と細胞膜辺縁部の両方に局在することが確認され (図 10-1 d, e)、細胞膜辺縁部における共局在の染色像は少なく、細胞内での共局在の染色像が多く観察された(図 10-1 f)。よって、FV10-ASW software を用いて、細胞における各 CDCP1 変異体の共局在領域の画像ドットを白点に変換し(図 10-3 A)、この領域が取得画像全体に占める割合(%)を計算して共局在量の検証をした。

CDCP1res-F と CDCP1res-HA を同時に発現させた細胞では、白点領域の割合が $6.89 \pm 1.95\%$ であったのに対し、 Δ ECD-F と CDCP1res-HA を同時に発現させた細胞では、 $1.63 \pm 0.76\%$ と減少していた(図 10-3 B)。免疫沈降における共沈降量の相対値の算出と同条件にするため、各 CDCP1 変異体のみの染色領域を白点領域に変換し(図 10-2 A)、同様に取得画像全体に占める割合(%)を測定した。CDCP1res-F と CDCP1res-HA の同時発現では、各々 $10.76 \pm 1.99\%$ 、 $11.74 \pm 4.87\%$ 、 Δ ECD-F と CDCP1res-HA では、各々 $8.19 \pm 3.60\%$ 、 $9.46 \pm 2.28\%$ であり(図 10-2 B)、同一細胞内における各 CDCP1 変異体単独の染色割合には大きな差は見られなかった。

これらの数値を用いて、免疫沈降における共沈降量の相対値を算出したのと同様の方法で、CDCP1res-F あるいは Δ ECD-F の染色割合に対する CDCP1res-HA との共局在の染色割合で相対値を求めると、CDCP1res-F に対する CDCP1res-HA の相対値を 1 とすると、 Δ ECD-F では、 0.33 ± 0.12 となり、免疫沈降における共沈降量の相対値と同様に細胞外ドメイン欠失体である Δ ECD-F において、共局在が相対的に減少していることが確認された(図 10-4)。

免疫沈降と細胞免疫染色の二つの結果から、CDCP1 の細胞外ドメインが CDCP1 同種多量体形成に関与していることが示された。

4-1-2. CDCP1 細胞外ドメインによる足場非依存性能と細胞運動能の制御

次に、CDCP1 の細胞外ドメインがこれまで報告のあった CDCP1 を介した癌転移能の制御に影響を及ぼすのかを検討するため、足場非依存性能と細胞運動能の実験をおこなった。足場非依存性能を検証できる soft-agar assay では、各 CDCP1 変異体で agar 内に形成されるコロニー数に差が見られた(図 11 A)。そこで、さらに詳しく調べるために 3 回の独立した実験をおこなった。A549 肺癌細

細胞株において形成された細胞コロニー数は、 34.3 ± 6.02 個であり、CDCP1 の発現を抑制させた A549 miCDCP1 細胞株では 11.7 ± 1.89 個と有意差を持って減少した。そこに CDCP1res-F を発現させると 34.0 ± 2.12 個とコロニー形成が回復し、これまでの報告と同様の結果が得られた[9, 19]。一方、細胞外ドメインを欠失させた Δ ECD-F では、コロニー形成数は 4.0 ± 0.82 個と有意差を持って減少しており、足場非依存性能は回復しなかった(図 11 B)。

同様に、細胞運動能を検証する wound healing assay をおこなった(図 12-1)。A549 細胞株では細胞運動距離が $415.0 \pm 59.2 \mu\text{m}$ となり、CDCP1 発現を抑制すると、 $266.4 \pm 22.1 \mu\text{m}$ と優位に減少した (図 12-2 A549, mock)。この運動距離の抑制は、CDCP1res-F によって、 $364.9 \pm 12.3 \mu\text{m}$ まで回復した(図 12-2 CDCP1res-F)。しかし、細胞外ドメインを欠失させた Δ ECD-F では、Soft -agar assay の時と同様に、 $271.8 \pm 10.4 \mu\text{m}$ と、細胞運動能は回復しなかった(図 12-2 Δ ECD-F)。

これら実験結果から、CDCP1 細胞外ドメインが、癌細胞の足場非依存性能および細胞運動能の制御に関与することが示唆された。

4-2. CDCP1 細胞外ドメイン内の同種多量体形成部位の探索

CDCP1 の細胞外ドメインが同種多量体形成に関与することが示されたことから、次に、CDCP1 の細胞外ドメイン内に存在する CUB1, 2, 3 ドメインが同種多量体形成に関与すると推定し、以下の実験をおこなった。まず、Maltose Binding Protein (MBP) を融合させた CUB1、CUB2 および CUB3 ドメインタンパク質 (rMBP-CUB1, rMBP-CUB2, rMBP-CUB3) の調製を試みた(図 13 A)。しかし、rMBP-CUB1 は不溶性画分に産生され調製することが出来なかったため、rMBP-CUB2 および rMBP-CUB3 を使用した。抗 MBP マウス抗体による WB により、rMBP は 42 kDa に、調製した rMBP-CUB2 および rMBP-CUB3 は、各 CUB

ドメインの理論値である 14 kDa および 15 kDa を加算した 56kDa と 57 kDa にバンドが検出された(図 13 B)。これら精製した MBP 融合組換えタンパク質(rMBP, rMBP-CUB2, rMBP-CUB3)を bait protein とし、A549 細胞株に強発現させた CDCP1res-F または Δ ECD-F を含む細胞ライセートを prey protein として Far-WB をおこなった。各 MBP 融合組換えタンパク質の PVDF 膜へのプロットは、抗 MBP マウス抗体による WB で確認した(図 13 C : rMBP proteins)。各 MBP 融合組換えタンパク質と FLAG 標識付 CDCP1 変異体との結合を抗 FLAG マウス抗体による WB で検出すると、rMBP-CUB2, rMBP-CUB3 の両方で CDCP1res-F との結合を示すドット状のバンドが検出され、特に rMBP-CUB2 との結合量が多く観察された(図 13 C CDCP1res-F)。 Δ ECD-F では、rMBP, rMBP-CUB2, rMBP-CUB3 のいずれにおいても抗 FLAG-HRP 抗体によるドットのバンドは検出されず、細胞外ドメインが CDCP1 の同種複合体形成に必要なことを示唆する結果となった(図 13 C Δ ECD-F)。

各 MBP 融合組換えタンパク質に対する CDCP1res-F の結合量を定量するため、NIH ImageJ により WB のバンドのシグナル強度を数値化した(表 3-2)。これら数値を元に、結合した CDCP1res-F の数値を各 MBP 融合組換えタンパク質の数値で除して、CDCP1res-F の結合量を相対値で算出した。その結果、rMBP に対する CDCP1res-F の相対値を 1 とすると、rMBP-CUB2 は 8.15 ± 5.96 、rMBP-CUB3 は 2.14 ± 1.45 となり、rMBP-CUB2 の方が CDCP1res-F との結合量が多いことが示された。

rMBP-CUB2 が CDCP1 と結合する主要なドメインである可能性が示されたため、細胞膜上での CDCP1 との結合を検証した。CDCP1res-HA を A549 miCDCP1 細胞に発現させ、rMBP, rMBP-CUB2, rMBP-CUB3 を添加して培養し、抗 HA ウサギ抗体および抗 MBP マウス抗体による免疫染色で細胞局在を観察した。その

結果、rMBP-CUB2 は、細胞膜上において局在し(図 14-1 e)、CDCP1res-HA との共局在も確認された(図 14-1 f)。一方、rMBP や rMBP-CUB3 では、rMBP-CUB2 と比較して CDCP1res-HA の発現自体に変化は見られなかったが(図 14-1 a, d, g)、共に細胞膜上の局在は観察されなかった(図 14-1 b, h)。共局在に関しては、rMBP では確認されず(図 14-1 c)、rMBP-CUB3 では、細胞内で一部確認された(図 14-1 i)。これら観察された画像データを、CDCP1 変異体の細胞免疫染色の時と同様に FV10-ASW software を用い、各 MBP 融合組換えタンパク質と CDCP1res-HA の共局在領域を白点領域に変換し、取得画像全体に占める割合(%)にして結合量を解析した。まず、CDCP1res-HA の局在領域を白点領域で表示し(図 14-2 A)、取得画像全体に占める割合を求めると、rMBP, rMBP-CUB2, rMBP-CUB3 添加時にそれぞれ $8.57 \pm 0.25\%$ 、 $7.49 \pm 0.94\%$ 、 $7.96 \pm 0.51\%$ となり、CDCP1res-HA の細胞膜上での局在に差は見られなかった(図 14-2 B)。このとき各 rMBP と CDCP1res-HA の共局在領域が全画像に占める割合を求めると、rMBP では $0.17 \pm 0.08\%$ 、rMBP-CUB2 では $3.32 \pm 0.46\%$ 、rMBP-CUB3 では $0.78 \pm 0.39\%$ であった(図 14-3 B)。これらの数値から、rMBP-CUB2 が CDCP1res-HA と最も多く結合していることが分かった。

上の結果から、CUB2 ドメインの CDCP1 との結合をさらに検証するため、FLAG 標識付 CUB2 ドメイン欠失変異体(Δ CUB2res-F)を作製し(図 15 A)免疫沈降をおこなった。 Δ CUB2res-F は、抗 CDCP1 ヤギ抗体による WB において CUB2 ドメインが欠失した 14 kDa 分を引いた 121 kDa の位置にバンドが確認されると共に、抗 FLAG-HRP 抗体においても確認された(図 15 B)。免疫沈降において、新規の Δ CUB2res-F では、 Δ ECD-F と同様に CDCP1res-HA のバンドが、CDCP1res-F と比較して減少していた(図 16-1, IP: HA)。そこで、図 9-2 と同様にバンドのシグナル強度を数値化し(表 3-3)、CDCP1-res-F に対する CDCP1res-HA

の相対値を 1 としたときに、 Δ ECD-F および Δ CUB2res-は、 0.11 ± 0.10 、 0.33 ± 0.24 となり、同程度に減少していた(図 16-2)。

これら rMBP-CUB2 による Far-WB と細胞免疫染色および CUB2 ドメイン欠失体による免疫沈降の結果から、CUB2 ドメインが CDCP1 の同種多量体形成に必要な部位であることが示された。

4-3. rMBP-CUB2 ドメインによる細胞内 CDCP1 シグナルの制御を介した癌転移能の制御

4-3-1. rMBP-CUB2 の添加による同種多量体形成の阻害

CDCP1 細胞外ドメインに存在する CUB2 ドメインが、細胞膜での CDCP1 の同種多量体形成に必要な部位であることが示されたので、rMBP-CUB2 が CDCP1 同種多量体形成を阻害できるのかを検証した。A549 miCDCP1 細胞株に CDCP1res-F と CDCP1res-HA を同時に発現させ、そこに rMBP-CUB2 または rMBP-CUB3 を、 $0 \mu\text{g/mL}$ 、 $5 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ と濃度を変えて添加し、抗 FLAG M2 アフィニティーゲルによる免疫沈降をおこなった。rMBP-CUB2 において、添加濃度が $10 \mu\text{g/mL}$ の時、CDCP1res-HA バンドのシグナル強度が、添加しない条件と比較して減少していた(図 17 IP: FLAG rMBP-CUB2)。rMBP-CUB3 では、添加濃度に関わらず変化は見られなかった (図 17 IP: FLAG rMBP-CUB3)。この結果は、外部から添加した rMBP-CUB2 によって、CDCP1 の同種多量体形成を阻害できることを示唆している。

予備実験において、rMBP-CUB2 の添加濃度が $50 \mu\text{g/mL}$ の時に細胞毒性が確認されたため、本研究では $10 \mu\text{g/mL}$ までの添加濃度で実験をおこなった。また、同実験条件では、rMBP-CUB2、rMBP-CUB3 添加による CDCP1res-F および CDCP1res-HA の発現量 (図 17 Whole cell)や細胞毒性 (図 18) に影響が無いことも確認した。

4-3-2. rMBP-CUB2 の添加による CDCP1 シグナルの制御

これまでに、CDCP1 の細胞外ドメインを介した同種多量体形成が足場非依存性能および細胞運動能に関与することを示してきた(図 11, 12)。これら二つの機能は、CDCP1 細胞内ドメインを介した SFK-CDCP1-PKC δ シグナルによることが報告されている[9, 19, 40]。よって、rMBP-CUB2 による同種多量体形成の阻害が、SFK-CDCP1-PKC δ シグナルに関与すると推定し、SFK および PKC δ に対する抗体とリン酸化抗体による WB で検証をおこなった(図 19-1 A)。SFK および PKC δ のリン酸化抗体(p-SFK Y416, p-PKC δ Y311)は、それぞれ SFK の活性化と PKC δ へのシグナル伝達の指標となる抗体である。各バンドのシグナル強度を NIH ImageJ で数値化し、A549 細胞株のリン酸化バンドの数値を総タンパク質量バンドの数値で割った値を 1 として rMBP、rMBP-CUB2 および rMBP-CUB3 添加後の相対値を算出した。SFK では、それぞれ 1.11 ± 0.16 、 0.46 ± 0.23 、 1.08 ± 0.18 となり、rMBP-CUB2 添加により SFK のリン酸化が抑制されていた。PKC δ においても、 1.21 ± 0.20 、 0.52 ± 0.03 、 0.94 ± 0.17 となり、SFK と同様に rMBP-CUB2 添加で抑制されていた(図 19-1 B)。同様の結果は、BxPC3 細胞株を用いた実験においても観察された(図 19-2)。

この結果から、rMBP-CUB2 による CDCP1 の同種多量体形成の阻害が、SFK の活性化とそれに伴った細胞内 SFK-CDCP1-PKC δ シグナルに影響を及ぼすことを示唆している。

4-3-3. rMBP-CUB2 の添加による足場非依存性能と細胞運動能の制御

細胞外での rMBP-CUB2 の添加が細胞内の SFK-CDCP1-PKC δ シグナルに影響を及ぼしたため、最後に、rMBP-CUB2 の添加による足場非依存性能や細胞運動能に対する影響を調べた。足場非依存性能への影響を soft-agar assay で検証した

ところ(図 20 A)、コントロールである A549 細胞株のコロニー数は 28.0 ± 2.5 個(図 20 B mock)となり、rMBP-CUB2 の添加では、コロニー数が 5.0 ± 2.2 個と足場非依存性能が抑制されていた(図 20 B rMBP-CUB2)。rMBP および rMBP-CUB3 では、それぞれ 25.3 ± 2.6 個と 19.3 ± 5.2 個であり mock と変わらなかった(図 20 B rMBP, rMBP-CUB3)。また、細胞運動能を検証する wound healing assay でも mock, rMBP, rMBP-CUB2, rMBP-CUB3 において移動距離が、それぞれ $467.6 \pm 42.6 \mu\text{m}$, $437.2 \pm 51.9 \mu\text{m}$, $288.3 \pm 11.0 \mu\text{m}$, $424.0 \pm 19.8 \mu\text{m}$ であり、soft-agar assay と同様に rMBP-CUB2 添加時に抑制されていた(図 21 A)。同様の結果は、異なる細胞株の BxPC3 においても観察された(図 21 B)。これらの結果は、rMBP-CUB2 が足場非依存性能と細胞運動能に関与していることを示唆している。

これまでの全ての実験結果から、CDCP1 の細胞外 CUB2 ドメインが、CDCP1 の同種多量体形成に関与し、SFK の活性化調節を介した SFK-CDCP1-PKC δ シグナルを制御して、癌の浸潤・転移に関わる足場非依存性能や細胞運動能を制御することが示された。また、rMBP-CUB2 が、足場非依存性能や細胞運動能を抑制したことから、CDCP1 の CUB2 ドメインが癌転移治療における標的となる可能性が示唆された。

4-4. CDCP1 細胞外 CUB ドメインによる集団的細胞運動(Collective cell migration)の制御

4-4-1. CDCP1 細胞外ドメインによる細胞-細胞間接着の制御

CDCP1 siRNA により CDCP1 発現を抑制したところ、BxPC3 膵癌細胞株において、CDCP1 siRNA 処理で細胞-細胞間接着が著しく抑制されていることを発見した(図 22)。また、BxPC3 細胞株に存在する内在性 CDCP1 の局在を免疫染色法により検証したところ、CDCP1 は主に細胞-細胞間接着部位の広範な領域に

局在が確認された(図 23)。このように、CDCP1 の局在と細胞-細胞間接着の有無に相関がみられたことから、CDCP1 が癌細胞の細胞-細胞間接着に関与している可能性を考えた。また、この細胞-細胞間接着には、タンパク質-タンパク質間結合に関与する CUB ドメインが関与すると推定し[26, 36, 37]、その可能性について検証をおこなった。CDCP1 siRNA 処理をおこない、図 24 に示す各 CDCP1 変異体(CDCP1res-F、Y734Fres-F、CUB123res-F、 Δ CUB123res-F、 Δ ECD-F)のみを発現する BxPC3 細胞株を用い、細胞-細胞間接着の回復実験をおこなった。結果、CUB ドメインを含む CDCP1 変異体(CDCP1res-F、Y734Fres-F、CUB123res-F)では、細胞-細胞間接着が回復し(図 25 rescue)、CUB ドメインを欠失した CDCP1 変異体(Δ CUB123res-F、 Δ ECD-F)では回復しなかった(図 25 not-rescue)。興味深いことに、CDCP1 のリン酸とその細胞内シグナルを抑制する変異体(Y734Fres-F)でも、細胞-細胞間接着が回復することが分かった。これらの結果から、BxPC3 細胞株において、CDCP1 の CUB ドメインが細胞-細胞間接着の形成に関与することが示唆された。また、その際に CDCP1 のリン酸化は、関係ないことが示された。

4-4-2. CUB ドメインによる細胞-細胞間接着を介した細胞運動能の制御

近年、癌細胞において細胞接着を保持して細胞運動する、集団的細胞運動が注目されている[41-47]。よって、CDCP1 の CUB ドメインによる細胞-細胞間接着が細胞運動能の制御に影響するかを検証するため、transwell migration assay をおこなった。BxPC3 細胞株では、運動した細胞数が 172 ± 36 個となり(図 26 A, mock siRNA-), CDCP1 siRNA により CDCP1 発現を抑制した BxPC3 細胞では、細胞数が 35 ± 15 個となった(図 26 A, mock siRNA+)。ここで、細胞-細胞間接着できる CDCP1res-F および CUB123res-F では、それぞれ 166 ± 29 個と 175 ± 24

個と細胞運動能を回復したが、細胞－細胞間接着できない Δ ECD-F と Δ CUB123res-F では、それぞれ 25 ± 12 個と 29 ± 13 個と細胞運動能は回復しなかった(図 26 A)。また、CDCP1 のリン酸化を抑制してその細胞内シグナルを遮断する変異体(Y734Fres-F)では、これまでの報告と同様に細胞運動能の回復は見られなかった[9, 19]。これらの結果は、BxPC3 細胞株の細胞運動能の制御が、細胞外 CUB ドメインによる細胞－細胞間接着と CDCP1 細胞内シグナルが関与することを示唆している。

4-4-3. BxPC3 細胞株の細胞－細胞間接着による CDCP1 細胞内シグナルの制御

CDCP1 がリン酸化されない Y734Fres-F に着目すると、細胞－細胞間接着はするが、transwell migration assay における細胞数は、 30 ± 17 個となり、細胞運動能は抑制されていた(図 26 A, Y734Fres-F)。このことから、BxPC3 細胞株は、これまでの報告同様に SFK－CDCP1－PKC δ シグナルを介して運動能を制御していると考えられた。よって、抗 p-PKC δ (Tyr311)ウサギ抗体による WB によって CDCP1 下流シグナルの検出をおこなった。結果、細胞－細胞間接着ができない Δ CUB123res-F では、CDCP1 発現を抑制した場合と比較して、PKC δ のリン酸化が減少し、細胞－細胞間接着する CDCP1res-F および CUB123res-F では、変化が見られなかった(図 26 B)。

これまでの結果から、BxPC3 細胞株では、CDCP1 の CUB ドメインが、細胞－細胞間接着を制御して、集団的細胞運動 (Collective cell migration) に関与していることが示唆され、その運動能には、SFK－CDCP1－PKC δ シグナルが必要であることが示された。

5. 考 察

5-1. CDCP1 の細胞外ドメインによる同種多量体形成

CDCP1 は、膜貫通型タンパク質であることから、細胞外ドメインにおいて同種多量体形成する可能性が考えられた。抗 FLAG M2 アフィニティーゲルを用いた免疫沈降において、CDCP1res-HA の共沈降量を示すバンドの相対値は、CDCP1res-F と比較して、 Δ ECD-F で約 20%まで減少していたが(図 9-1、IP:FLAG, HA、図 9-2)、結合自体は残っていた。 Δ ECD-F で検出された共沈降バンドは、膜貫通ドメインを介して CDCP1 同士が結合をすとの報告があることから[48]、残存している共沈降バンドは、この結合が反映されているものと考えられる。しかし、膜貫通型タンパク質の結合では、細胞膜の難溶解性が常に問題となっていること、また、細胞外ドメインのない CDCP1 では、足場非依存性能や細胞運動能が抑制されていること(図 11, 12)から考慮すると、CDCP1 細胞外ドメインが、主要な同種多量体形成領域であると考えられる。また、図 9-1(B)における Δ ECD-F の FLAG 抗体による WB において、理論上 Δ ECD-F が 2 量体を形成する位置と思われる 40 kDa にバンドが確認された。しかしながら、図 9-1(C)に示す様に FLAG 抗体による WB で見られた 40 kDa のバンドが CDCP1 抗体による WB では検出されなかったことおよび図 8 や図 16-1 で 40 kDa のバンドが検出されないことから、FLAG 抗体が反応した原因については特定できないが、図 9-1(B)で見られた 40 kDa のバンドは、 Δ ECD-F ではないと判断した。

CDCP1 細胞外ドメイン内には、タンパク質-タンパク質結合に関与すると推定されている CUB ドメインが[26, 36, 37]、3 個(CUB1, CUB2, CUB3)存在している [26, 27]。本研究の Far-WB により CUB2 ドメインが主として CDCP1 と結合し、CUB3 ドメインも CUB2 ドメインの結合量に比べて少ないが結合することが確認された(図 13 C)。これは、以前の CUB2 と CUB3 両ドメインからなる組換

えタンパク質が、CDCP1 と結合するとした報告と合致しており [38]、CDCP1 の CUB2 および CUB3 ドメインは、対で一つの機能をする可能性が考えられた。しかし、CDCP1 変異体発現細胞への CUB2 あるいは CUB3 ドメイン添加による CDCP1 同士の結合阻害は、CUB2 ドメインで見られ、CUB3 ドメインでは確認されなかったこと(図 17)、また、CUB2 ドメインのみが有意に CDCP1 と細胞表面で結合していること (図 14-3)、さらに、CUB2 ドメインを欠失させた Δ CUB2res-F の免疫沈降の結果が Δ ECD-F 同様であったこと(図 16)、などから、CDCP1 の同種多量体形成には、CUB3 ドメインではなく CUB2 ドメインが主要な結合部位であると考えている。

一方、CUB1 ドメインの同種多量体形成への関与については、本研究で検証することは出来なかった。しかし、CDCP1 からの CUB1 ドメインの切断が CDCP1 の 2 量体形成を促進する可能性を示唆する報告があることや[38]、CUB1 ドメインが癌患者の尿から検出されることなどから [49]、CUB1 ドメインは CDCP1 の切断によって細胞外に放出されている可能性が高い。よって、CUB1 ドメインが CDCP1 の同種多量体形成部位である可能性は低いと考えている。rMBP-CUB1 が作製出来れば、CDCP1 との結合実験や CDCP1 同士の結合に対する阻害実験をおこない、同種多量体形成への関与の検証など、CUB1 ドメインの機能解析ができるのではないかと考えている。

CUB ドメインは、一つの領域として定義されているが、その機能に関するアミノ酸配列やモチーフに関する詳細は報告されていない。そこで、CDCP1 の CUB ドメインの機能部位を調べるために、Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (EMBL-EBI) ソフトウェアを用いてのアミノ酸配列の相同性を調べた。意外なことに、各 CUB ドメイン間でアミノ酸配列の相同性は低く、CUB2 と CUB3 ドメイン間に至っては、最も低い 14.06%であった(図 27 A)。それでも、

CUB ドメイン間に相似する配列がいくつか見られ、CUB1 から CUB3 までの全てのドメイン間において共通するアミノ酸配列として、「WXXXVP」が存在した(図 27 B)。しかし、様々な構造配列のデータベースによって、このアミノ酸配列に対するモチーフ検索をしたが、機能配列としては存在していなかった。CUB ドメインタンパク質の添加による結合阻害実験では、rMBP-CUB2 と rMBP-CUB3 で、細胞機能への影響が異なっていたことから(図 17)、CUB2 と CUB3 ドメイン間のアミノ酸配列の相同性のない部分に(図 27)、各 CUB ドメインの異なる機能モチーフが存在していることが推測される。よって、各 CUB ドメインの機能を調べるためには、CUB ドメインの立体構造解析が必要であると考えている。実際に、スカラベジンやオリクチンは、アミノ酸配列から機能配列が検出されていないが、タンパク質の立体構造解析から類似構造のタンパク質を発見して、機能を同定することに成功している [50-53]。本研究では、CDCP1 の CUB2 ドメインが、癌の浸潤・転移機構に重要であることを示したので、各 CUB ドメインの機能が明らかとなれば、さらにその理解が深まる可能性が高く、引き続き詳細な研究が重要になると考えている。

5-2. CDCP1 の同種多量体を介した CDCP1 細胞内シグナルの制御

CDCP1 は、図 4 に示すように細胞内ドメインを介して SFK-CDCP1-PKC δ シグナルを下流に伝達することにより癌細胞の足場非依存性や細胞運動能を制御していることが知られている[9, 18, 19, 23]。しかしながら、このシグナル中の SFK 活性化機構や下流へのシグナル増強機構に関しては明らかになっていなかった。本研究において、CDCP1 細胞外ドメインによる同種多量体形成が、SFK の活性化および CDCP1 下流のシグナル因子である PKC δ のリン酸化に関与することが示唆された。そこで、これら二つの制御機構について考察をおこなった。

5-2-1. CDCP1 の同種多量体形成による SFK の活性化

SFK 活性の増強が多くのがんで報告されていることから[54-56]、その活性化機構の解明は、重要な課題となっている。CDCP1 も SFK によりリン酸化され、そのリン酸化 CDCP1 に SFK が結合することによって、下流にシグナルを伝達することから[9]、SFK の活性化機構は鍵となっている。CDCP1 の細胞内ドメインには、SFK の SH3 ドメインが結合する PRR である P-R-Q-P 配列が存在することが分かっている[26, 27]。この PRR は、血小板の凝集に関与する糖タンパク質 (GPVI) や、メタロプロテアーゼの 1 種である ADAM に存在し、不活性型 SFK が結合していることが報告されている[57, 58]、そのため、CDCP1 でも細胞内ドメインのリン酸化の有無に関わらず、不活性型 SFK が結合していることが推定された。しかし、CDCP1 を介した SFK の活性化機構は明らかになっていなかった。一般的な SFK の活性化機構は(図 28)、不活性型 SFK の C 末端側 527 番目のリン酸化チロシン(p-Y527)の脱リン酸化を介した、SH2 ドメインの開放による SFK 自身の構造変化によって起こることが知られている [59, 60]。それとは別に、リン酸化した p130Cas の様な特異的なエフェクター因子が、不活性型 SFK の SH2 あるいは SH3 ドメインに強制的に結合し、SFK の構造を変化させて、活性化型にすることも報告されている[61]。本研究において、rMBP-CUB2 による CDCP1 の同種多量体形成の抑制と (図 17)、SFK の活性化の抑制が相関することから(図 19-1)、CDCP1 細胞外ドメイン内の CUB2 ドメインを介した同種多量体形成が SFK の活性化に関与することが示された。CDCP1 は、SFK の SH2 ドメインに結合するリン酸化タンパク質として同定されていることから[9]、CDCP1 は、エフェクター因子として機能している可能性が考えられる。しかし、CDCP1 がどの様にエフェクター因子として機能するかは、分かっていない。本研究から、CDCP1 の細胞外ドメインを介して CDCP1 の細胞内ドメインの PRR を介して結

合している不活性型の SFK と、別のリン酸化 CDCP1 が結合し、同種多量体を形成して凝集することにより、リン酸化 CDCP1 がエフェクター因子として、近傍に存在する不活性型 SFK の SH2 ドメインに特異的に結合し、活性化するという機構が考えられる。

一方で、SFK の SH2 および SH3 ドメインはリン酸化チロシンを含む一定の配列に結合することから、CDCP1 が SFK 活性化のエフェクター因子として機能するためには、p130Cas と同様にリン酸化されていなければならない。本研究では、CDCP1 をリン酸化するための最初の SFK 活性化機構は明らかにすることはできなかった。しかしながら、肺癌細胞、膵臓癌細胞および胃癌細胞等において、接着状態から浮遊状態に環境変化した時に SFK の活性化と CDCP1 のリン酸化が増強されていること[9, 21, 40]、癌細胞が浮遊すると、SFK が細胞膜のラフトに局在すること[62]、また CDCP1 も同様にラフトに局在するとの報告があることなどから[20]、癌細胞は浮遊して足場を失うことにより、ラフト上で最初の SFK 活性化が起こることが推測される。その時の活性化には、前述した一般的な活性化機構による可能性が考えられる。癌細胞における SFK 活性化機構、特に初期の SFK 活性化機構については、さらに詳細な研究が必要である。

5-2-2. CDCP1 細胞外ドメインによる細胞内 CDCP1 シグナルの制御機構

肺癌、胃癌、乳癌、膵臓癌など多くの癌で SFK による CDCP1 のリン酸化とその下流因子である PKC δ のリン酸化の増強が報告されているが[9, 21, 40, 63]、この CDCP1 の細胞内ドメインを介した SFK-CDCP1-PKC δ シグナルの増強機構に関しては明らかになっていなかった。本研究では、癌細胞への rMBP-CUB2 添加による CDCP1 の同種多量体形成の阻害が、CDCP1 細胞内シグナルの下流に位置する PKC δ の Y311 のリン酸化を抑制することを確認した(図 17, 図 19)。

これは、CDCP1 の同種多量体形成が、SFK-CDCP1-PKC δ シグナル伝達の制御に重要な役割を担っていることを示唆している。上皮増殖因子受容体 (EGFR) や、ニューロトロフィン受容体 (Trk)、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) などは、リガンドとの結合により同種複合体を形成し、お互いのキナーゼドメインによって相互にリン酸化して結合因子を局所的に集約し、下流へとシグナルを伝えている[33-35, 64-67]。CDCP1 の場合も、自身はキナーゼとしての機能は持たないが、CDCP1 に結合した SFK による CDCP1 細胞内ドメインの Y762 のリン酸化とそのリン酸化部位への PKC δ の結合、および SFK による PKC δ の Y311 のリン酸化によって、PKC δ 下流へのシグナルの伝達が起こるとされており (図 4)、そのためには、CDCP1、SFK および PKC δ が局所的に集約すると考えられている。よって、PKC δ が結合したリン酸化 CDCP1 と別の活性型 SFK が結合した CDCP1 が、CDCP1 細胞外ドメイン内の CUB2 ドメインを介して結合することにより、CDCP1 下流の PKC δ にシグナルを伝達していると考えられる。また、CUB2 ドメインによる同種多量体形成は、PKC δ を局所に多数集約させることを可能にすると推定され、前述した SFK 活性化の促進と集約された PKC δ の効率的なリン酸化という相乗効果により、SFK-CDCP1-PKC δ シグナルが増強されていると考えられる。

リン酸化シグナルの増強には、他にシグナル関連因子の発現量の増加が鍵となる。CDCP1 は、正常細胞でほとんど発現しておらず、癌細胞での発現上昇が多数報告されている[9, 21-23, 40]。これは、癌細胞が CDCP1 の同種多量体を形成しやすいことを示しており、CDCP1 の細胞外ドメインによる同種多量体形成を介した SFK-CDCP1-PKC δ シグナルを増強しやすい環境が整っていると考えられる。

以上を総合すると、癌細胞では、CDCP1 の発現上昇が CDCP1 の同種多量体形成を容易にしていることが予想され、リン酸化 CDCP1 による SFK の活性化と PKC δ の集約が同種多量体形成によって効率よく起こり、足場非依存性や細胞運動能に関わるシグナルを伝えることが考えられる。SFK-CDCP1-PKC δ シグナルから下流のシグナルについては、今後の研究が必要である。

5-3. CDCP1 細胞外ドメインの癌浸潤・転移における役割

CDCP1 の細胞内ドメインを介したシグナルは、癌転移の特性である足場非依存性を制御し、癌の浸潤に関与する細胞運動能や細胞外基質分解能に関与することも報告されている[9, 18-20, 24, 40]。近年では、CDCP1 と PKC δ の結合を抑制することで SFK-CDCP1-PKC δ シグナルを遮断し、癌の浸潤・転移を抑制できる可能性が見出されている[28]。この様に、CDCP1 の細胞内ドメインおよびそれを介したシグナルについて、研究が進んでいるが、CDCP1 細胞外ドメインを介した CDCP1 機能の制御は未解明であった。本研究において、CDCP1 細胞外ドメイン内の CUB2 ドメインの癌細胞への添加により、CDCP1 の足場非依存性能および細胞運動能が抑制される結果を得た(図 20, 21)。この抑制には、CDCP1 同種多量体形成の阻害による SFK 活性化の抑制を伴った SFK-CDCP1-PKC δ シグナルの制御が関与していた(図 19)。これは、CDCP1 の細胞外ドメインに存在する CUB2 ドメインが細胞内シグナルを制御し、癌の浸潤・転移に機能することを示唆している。

細胞外ドメインから細胞内シグナルを制御する機構の例として、EGFR やヒト上皮細胞増殖因子受容体である HER2 および HER3 のリガンドを介した 2 量体形成からの自己リン酸化がある[34, 35, 68]。しかし、CDCP1 のリガンドは、現在のところまだ発見されておらず、リガンド非依存的に細胞外ドメインを介

して同種多量体形成をしていると考えられる。細胞外ドメインを介して同種多量体形成する因子を調べたところ、癌細胞が浸潤する際に重要な機能を果たす細胞外基質分解酵素である、膜型マトリックスメタロプロテアーゼ MT1-MMP が存在した。MT1-MMP は、その細胞外ドメインに存在するヘモペキシン(PEX)ドメインを介して同種 2 量体を形成し、基底膜成分である Type IV コラーゲンの分解酵素である MMP-2 を活性化する。その活性化機構は 2 量体の中にある一つの MT1-MMP に不活性型 MMP-2 が結合し、別の MT1-MMP が不活性型 MMP-2 を切断して活性型 MMP-2 にすることである[69]。これにより、MT1-MMP は、癌の浸潤において重要な役割を担っている。CDCP1 の細胞外ドメインによる同種多量体形成においても、類似の機構を介した癌の浸潤・転移に対する役割が存在すると考えている。

これまでの CDCP1 細胞外ドメインを介した細胞機能の制御機構をまとめると、図 29 に示すように、①の細胞内ドメイン内の PRR に不活性型 SFK が結合した CDCP1 と、②の別のリン酸化された CDCP1 が細胞外ドメイン内の CUB2 ドメインを介して結合することにより、リン酸化 CDCP1 の pY734 を含むアミノ酸配列部位(HVpYAV)が不活性型の SFK の SH2 ドメインに結合して SFK を活性化する。次に、③の PKC δ が結合している CDCP1 に、CUB2 ドメインを介して②で示した活性型 SFK が結合した CDCP1 が結合することにより PKC δ がリン酸化され、SFK-CDCP1-PKC δ シグナルとして、下流にシグナルを伝えるということが推定される。これら制御機構は、全て CDCP1 の細胞外ドメインを介しており、細胞外ドメインによる細胞内シグナルの制御が足場非依存性能や細胞運動能による癌の浸潤・転移を制御していると考えられる。これまで CDCP1 は、同種 2 量体形成することが示唆されていたが[38, 48]、この制御機構を想定すると、CDCP1 は同種多量体形成において、3 量体以上の多量体を形成しているのでは

ないかと推測している。CDCP1 が何量体を形成しているかを明らかにするためには、Native-PAGE あるいは、クロマトグラフィー等により明らかにする必要があると考えている。

5-4. CDCP1 細胞外ドメインによる細胞外環境の認識と癌の浸潤・転移

SFK-CDCP1-PKC δ シグナルは、足場を喪失した癌細胞で増強されることから[9, 21, 40]、CDCP1 の細胞外ドメインは、細胞外からシグナル因子を受け取るのではなく、癌細胞の外環境の変化を感知することによって、癌細胞内の CDCP1 シグナルを制御し、足場非依存性能や細胞運動能といった癌の浸潤・転移に関わる機能を制御していると考えられる。細胞外環境の認識に関わる細胞接着因子の一つである Integrin は、細胞外ドメインで細胞外基質と結合することで細胞外環境を認識する。そして細胞内へ生存、増殖および細胞運動等に関与する様々なシグナルを伝達する[70]。一方、浮遊状態になると細胞外環境の変化に応じてシグナル分子複合体を解体し、シグナルを遮断する[71]。CDCP1 の強制発現が、細胞浮遊の促進に関与するとの報告もあることから[72]、CDCP1 の細胞外ドメインが細胞接着に関わる因子との相互作用によって細胞外環境を認識し、足場非依存性能や細胞運動能といった機能を制御している可能性もある。よって、CDCP1 細胞外ドメインによる細胞外環境の認識機構および細胞外ドメイン結合タンパク質の同定については、さらなる研究が必要である。

5-5. CDCP1 細胞外ドメインによる Collective cell migration の制御

膀胱癌細胞株 BxPC3 において、集団で細胞移動をおこなう Collective cell migration に CDCP1 の CUB1 から CUB3 ドメインのいずれかが必要であることを見出した。また、その細胞運動能にはこれまで同様に CDCP1 を介したシグナル

が必要であるが(図 26)、細胞集団で移動する際の細胞-細胞間接着には CDCP1 を介したシグナルが必要ないことを発見した(図 25)。この結果は、CDCP1 の細胞外ドメインが SFK-CDCP1-PKC δ シグナルの制御とは別の機能を持っている可能性を示唆している。本研究で示した CDCP1 の同種多量体形成とは別に、CDCP1 は、N-cadherin、MT1-MMP、Integrin といった異種の膜貫通タンパク質と結合することが報告されている[31, 61, 73]。つまり、CDCP1 は CUB ドメインを介して細胞-細胞間や細胞-細胞外基質間などに作用する異種の膜貫通タンパク質との間で複合体を形成して機能している可能性がある。そのため、CDCP1 細胞外 CUB ドメインによる同種および異種の複合体形成の解析と、その複合体による癌の浸潤・転移に対する作用機序に関する研究は、癌細胞における CDCP1 の細胞外ドメインの役割を解析する上で重要であると考えられる。

5-6. CDCP1 細胞外ドメイン癌治療標的としての可能性

これまでに、癌細胞の細胞内シグナルを制御して癌に対抗する方法として、細胞内のキナーゼ阻害剤や細胞内外に作用する中和抗体などの開発がなされてきた[74, 75]。本研究から、CDCP1 が高発現している癌細胞において、これまでの細胞内における CDCP1 と PKC δ の結合を阻害する低分子薬剤の開発以外に、細胞外ドメイン内の CUB2 ドメインを標的とした同種多量体形成を阻害する中和抗体等を開発することも、癌の特性である足場非依存性能および細胞運動能を制御し、癌の浸潤・転移を抑制する治療のために重要であることを示唆することが出来た。さらに、CDCP1 が異種の膜貫通タンパク質と結合して機能を発揮する可能性もあることから、CDCP1 細胞外ドメインと結合する異種の膜貫通タンパク質を同定し、その結合部位を阻害する方法を確立することも、新たな癌転移治療薬の開発に貢献すると考えられる。

6. 結 言

これまで、膜貫通タンパク質である CDCP1 の癌転移における役割は、CDCP1 細胞内ドメインを介した SFK-CDCP1-PKC δ シグナルに関して詳細な研究が進められていたが、CDCP1 の細胞外ドメインに関する研究は進んでいなかった。本研究によって、CDCP1 の細胞外ドメイン内に存在する CUB2 ドメインが、主要な CDCP1 同種多量体形成部位である可能性を示し、CDCP1 細胞外ドメインによる同種多量体形成が、癌細胞の SFK 活性化と SFK-CDCP1-PKC δ シグナルの増強に重要な役割を担う可能性を示唆することができた。このように、CDCP1 細胞外ドメインが癌細胞の足場非依存性能および細胞運動能に必要な細胞内 SFK-CDCP1-PKC δ シグナルを制御する役割を担うという新たな制御機構を提唱することができた。また、rMBP-CUB2 が CDCP1 同種多量体形成を抑制して足場非依存性能および細胞運動能を制御している可能性があることから、CDCP1 の CUB2 ドメインを標的とした同種多量体形成の阻害によって、肺癌や膵癌といった CDCP1 を高発現している癌細胞の転移を抑制できる可能性を示すことができた。さらに膵癌細胞株 BxPC3 では、CDCP1 の細胞外 CUB ドメインが、同種多量体形成による SFK-CDCP1-PKC δ シグナルの制御だけではなく、リン酸化 CDCP1 に非依存的な細胞-細胞間接着の制御に関与し、近年注目されている新しい癌細胞運動の様式である集団的細胞運動能の制御に関与している可能性も示すことができた。

本研究は、CDCP1 の細胞外 CUB ドメインが、同種多量体を形成し、細胞内の SFK-CDCP1-PKC δ シグナルを制御する可能性を初めて示したものであり、CDCP1 細胞外 CUB ドメインによる足場非依存性能や細胞運動能を介した癌の浸潤・転移機構の一端を明らかにしたものである。

7. 謝 辞

本研究の遂行および博士論文の執筆にあたり、終始熱心な御指導と御鞭撻を頂きました、防衛大学校応用科学群応用化学科ゲノム生物学教育研究分野の上北尚正准教授に深く感謝の意を表します。

要所において適切な御指摘と御助言を下されました、同生物化学教育研究分野の山田雅巳教授、同細胞分子生物学教育研究分野の市村徹教授に、感謝いたします。また、発表や試験の場において貴重な御意見を賜った、金沢大学医薬保健研究域医学系の清木元治特任教授に心より感謝の意を表します。

防衛大学校理工学研究科前期課程第54期樋渡祥平学生には、大腸菌や遺伝子関連の実験方法等について、助力して頂きました。感謝いたします。

8. 参考文献等

- [1] 厚生労働省「平成 28 年人口動態統計月報年計(概数)の概況」
- [2] Kochanek DM, Ghouse SM, Karbowiczek MM and Markiewski MM, (2018) Complementing Cancer Metastasis. *Frontiers in Immunology*, **9**, 1629
- [3] Hanahan D and Weinberg RA, (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell*, **100**, 57-70
- [4] Albritton JL and Miller JS, (2017) 3D bioprinting: improving in vitro models of metastasis with heterogeneous tumor microenvironments. *Disease Models & Mechanisms*, **10**, 3-14
- [5] Jianga WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler M, Prince M, Thompson SK, Zollo M, Spano D, Dhawan P and et al, (2015) Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology* **35**, S244–S275
- [6] Huan Y, Wu D, Zhou D, Sun B and Li G, (2015) DBC1 promotes anoikis resistance of gastric cancer cells by regulating NF- κ B activity. *Oncology reports*, **34**, 843-849
- [7] Yuan Y, Ye HQ and Ren QC, (2018) Proliferative role of BDNF/TrkB signaling is associated with anoikis resistance in cervical cancer. *Oncology reports*, **40**, 621-634
- [8] Xu LH, Yang X, Bradham CA, Brenner DA, Baldwin AS Jr, Craven RJ and Cance WG, (2000) The Focal Adhesion Kinase Suppresses Transformation-associated, Anchorage-independent Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 30597-30604
- [9] Uekita T, Jia L, Narisawa-Saito M, Yokota J, Kiyono T and Sakai R, (2007) CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Molecular and Cellular Biology*. **27**, 7649-7660
- [10] Moreno-Layseca P, Streuli CH, (2014) Signalling pathways linking integrins with

cell cycle progression. *Matrix Biology*, **34**, 144-153

[11] Chiarugi P, (2008) From Anchorage Dependent Proliferation to Survival: lessons from Redox Signalling. *IUBMB Life*, **60**, 301-307

[12] Moro L, Dolce L, Cabodi S, Bergatto E, Boeri Erba E, Smeriglio M, Turco E, Retta SF, Giuffrida MG, Venturino M and et al, (2002) Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 9405-9414

[13] Sittewelle M and Monsoro-Burq AH, (2018) AKT signaling displays multifaceted functions in neural crest development. *Developmental Biology*, **S0012-1606**, 30660-30667

[14] Chiarugi P and Giannoni E, (2008) Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical Pharmacology*, **76**, 1352-1364

[15] Michel JB, (2003) Anoikis in the Cardiovascular System Known and Unknown Extracellular Mediators. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vasclar Biology*, **23**, 2146-2154

[16] Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, and et al, (2014) Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell*. **158**, 1110-1122

[17] Paterlini-Brechot P, (2014) Circulating tumor cells: who is the killer? *Cancer Microenvironment*. **7**, 161-176

[18] Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Hashiguchi A, Abe H, Sakamoto M and Sakai R, (2013) Suppression of autophagy by CUB domain-containing protein 1 signaling is essential for anchorage-independent survival of lung cancer cells. *Cancer Science*. **104**, 865-870

- [19] Miyazawa Y, Uekita T, Hiraoka N, Fujii S, Kosuge T, Kanai Y, Nojima Y and Sakai R, (2010) CUB domain-containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation. *Cancer Research*. **70**, 5136-5146
- [20] Miyazawa Y, Uekita T, Ito Y, Seiki M, Yamaguchi H and Sakai R, (2013) CDCP1 Regulates the Function of MT1-MMP and Invadopodia-Mediated Invasion of Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*, **11**, 628-637
- [21] Wong CH, Baehner FL, Spassov DS, Ahuja D, Wang D, Hann B, Blair J, Shokat K, Welm AL and Moasser MM, (2009) Phosphorylation of the SRC epithelial substrate Trask is tightly regulated in normal epithelia but widespread in many human epithelial cancers. *Clinical Cancer Research*. **15**, 2311-2322
- [22] Hooper JD, Zijlstra A, Aimes RT, Liang H, Claassen GF, Tarin D, Testa JE and Quigley JP, (2003) Subtractive immunization using highly metastatic human tumor cells identifies SIMA135/CDCP1, a 135 kDa cell surface phosphorylated glycoprotein antigen. *Oncogene*. **22**, 1783-1794
- [23] Liu H, Ong SE, Badu-Nkansah K, Schindler J, White FM and Hynes RO, (2011) CUB-domain-containing protein 1 (CDCP1) activates Src to promote melanoma metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**, 1379-1384
- [24] Ikeda J, Oda T, Inoue M, Uekita T, Sakai R, Okumura M, Aozasa K and Morii E, (2009) Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung. *Cancer Science*. **100**, 429-433
- [25] Razorenova OV, Finger EC, Colavitti R, Chernikova SB, Boiko AD, Chan CK,

Krieg A, Bedogni B, LaGory E, Weissman IL and et al, (2011) VHL loss in renal cell carcinoma leads to up-regulation of CUB domain-containing protein 1 to stimulate PKCd-driven migration. *PANS*, **108**, 1931-1936

[26] Uekita T and Sakai R, (2011) Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis. *Cancer Science*, **102**, 1943-1948

[27] Wortmann A1, He Y, Deryugina EI, Quigley JP, Hooper JD, (2009) The cell surface glycoprotein CDCP1 in cancer--insights, opportunities, and challenges.

IUBMB Life, **7**, 723-730

[28] Nakashima K, Uekita T, Yano S, Kikuchi JI, Nakanishi R, Sakamoto N, Fukumoto K, Nomoto A, Kawamoto K, Shibahara T et al, (2017) Novel small molecule inhibiting CDCP1-PKC δ pathway reduces tumor metastasis and proliferation. *Cancer Science*, **108**, 1049-1057

[29] Casar B, He Y, Iconomou M, Hooper JD, Quigley JP and Deryugina EI, (2012) Blocking of CDCP1 cleavage in vivo prevents Akt-dependent survival and inhibits metastatic colonization through PARP1-mediated apoptosis of cancer cells. *Oncogene*, **31**, 3924-3938

[30] Deryugina EI and Quigley JP, (2012) Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. *The Journal of Biomedicine and Biotechnology*, ID 564259

[31] Casar B, Rimann I, Kato H, Shattil SJ, Quigley JP and Deryugina EI, (2014) In vivo cleaved CDCP1 promotes early tumor dissemination via complexing with activated β 1 integrin and induction of FAK/PI3K/Akt motility signaling. *Oncogene*. **33**, 255-268

[32] He Y, Wortmann A, Burke LJ, Reid JC, Adams MN, Abdul-Jabbar I, Quigley JP, Leduc R, Kirchhofer D, Hooper JD. (2010) Proteolysis-induced N-terminal ectodomain

shedding of the integral membrane glycoprotein CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) is accompanied by tyrosine phosphorylation of its C-terminal domain and recruitment of Src and PKCdelta. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**, 26162-26173

[33] Jutten B and Rouschop KM, (2014) EGFR signaling and autophagy dependence for growth, survival and therapy resistance. *Cell Cycle*. **13**, 42-51

[34] Purba ER, Saita EI and Maruyama IN, (2017) Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The “Rotation Model”. *Cells*, **6**, 13

[35] Di Domenico M and Giordano A, (2017) Signal transduction growth factors: the effective governance of transcription and cellular adhesion in cancer invasion. *Oncotarget*, **8**, 36869-36884

[36] Bork P and Beckmann G, (1993) The cub domain a widespread module in developmentally regulated proteins. *The Journal of Molecular Biology*. **231**, 539-545

[37] Gu C, Limberg BJ, Whitaker GB, Perman B, Leahy DJ, Rosenbaum JS, Ginty DD, Kolodkin AL, (2002) Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 18069-18076

[38] Wright HJ, Arulmoli J, Motazed M, Nelson LJ, Heinemann FS, Flanagan LA, Razorenova OV, (2016) CDCP1 cleavage is necessary for homodimerization-induced migration of triple-negative breast cancer. *Oncogene*, **35**, 4762-4772

[39] Shiomi T and Okada Y, (2003) MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis*, **22**, 145-152

[40] Uekita T, Tanaka M, Takigahira M, Miyazawa Y, Nakanishi Y, Kanai Y, Yanagihara K, Sakai R, (2008) CUB-domain-containing protein 1 regulates peritoneal

dissemination of gastric scirrhous carcinoma. *The American Journal of Pathology*. **176**, 1729-1739

[41] Campbell K and Casanova J, (2016) A common framework for EMT and collective cell migration. *The Company of Biologists Ltd*. **143**, 4291-4300

[42] Lintz M, Munoz A and Reinhart-King CA. (2017) The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. *The Journal of Biomechanical Engineering*. **139**, 021005-1

[43] Yamaguchi N, Mizutani T, Kawabata K and Haga H, (2015) Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin β 1 and PI3K. *SCIENTIFIC REPORTS*. 5-7656

[44] Elisha Y, Kalchenko V, Kuznetsov Y and Geiger B, (2018) Dual role of E-cadherin in the regulation of invasive collective migration of mammary carcinoma cells. *SCIENTIFIC REPORTS*. 8-4986

[45] Friedl P and Gilmour D, (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Molecular Cell Biology*, **10**, 445–457

[46] Friedl P and Wolf K, (2008) Tube Travel: The Role of Proteases in Individual and Collective Cancer Cell Invasion. *Cancer research*, **68**, 7247-7249

[47] Barriga EH, Franze K, Charras G and Mayor R, (2018) Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration in vivo. *Nature*, **554**, 523-527

[48] Kollmorgen G1, Bossenmaier B, Niederfellner G, Häring HU, Lammers R, (2012) Structural requirements for cub domain containing protein 1 (CDCP1) and Src dependent cell transformation. *PLOS one*, **12**, e53050

[49] Yang L, Dutta SM, Troyer DA, Lin JB, Lance RA, Nyalwidhe JO, Drake RR and

- Semmes OJ, (2015) Dysregulated expression of cell surface glycoprotein CDCP1 in prostate cancer. *Oncotarget*, **6**, 43743-43758
- [50] Tomie T, Ishibashi J, Furukawa S, Kobayashi S, Sawahata R, Asaoka A, Tagawa M, Yamakawa M, (2003) Scarabaecin, a novel cysteine-containing antifungal peptide from the rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**, 261-266
- [51] Suetake T, Tsuda S, Kawabata S, Miura K, Iwanaga S, Hikichi K, Nitta K, Kawano K, (2000) Chitin-binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin-binding structural motif. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 17929-17932
- [52] Hemmi H, Ishibashi J, Tomie T, Yamakawa M, (2003) Structural basis for new pattern of conserved amino acid residues related to chitin-binding in the antifungal peptide from the coconut rhinoceros beetle *Oryctes rhinoceros*. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 22820-22827
- [53] Horita S, Ishibashi J, Nagata K, Miyakawa T, Yamakawa M, Tanokura M, (2010) Isolation, cDNA cloning, and structure-based functional characterization of oryctin, a hemolymph protein from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*, as a novel serine protease inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 30150-30158
- [54] Egan C, Pang A, Durda D, Cheng HC, Wang JH and Fujita DJ, (1999) Activation of Src in human breast tumor cell lines: elevated levels of phosphotyrosine phosphatase activity that preferentially recognizes the Src carboxy terminal negative regulatory tyrosine 530. *Oncogene*. **18**, 1227-1237
- [55] Bolen JB, Veillette A, Schwartz AM, DeSeau V and Rosen N, (1987) Activation of pp60c-src protein kinase activity in human colon carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **84**, 2251-2255

- [56] Lutz MP, Esser IB, Flossmann-Kast BB, Vogelmann R, Lührs H, Friess H, Büchler MW and Adler G, (1998) Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **243**, 503-508
- [57] Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC, Watson SP, (2002) Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 21561-21566
- [58] Kang Q, Cao Y, Zolkiewska A, (2000) Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochemical Journal*, **352**, 883-892
- [59] Varkaris A, Katsiampoura AD, Araujo JC, Gallick GE and Corn PG, (2014) Src signaling pathways in prostate cancer. *Cancer Metastasis Review*. **33**, 595-606
- [60] Liu W, Kovacevic Z, Peng Z, Jin R, Wang P, Yue F, Zheng M, Huang ML, Jansson PJ, Richardson V and et al, (2015) The molecular effect of metastasis suppressors on Src signaling and tumorigenesis: new therapeutic targets. *Oncotarget*. **6**, 35522-35541
- [61] Nojima Y, Morino N, Mimura T, Hamasaki K, Furuya H, Sakai S, Sato T, Tachibana K, Morimoto C, Yazaki Y and et al, (1995) Integrin-mediated Cell Adhesion Promotes Tyrosine Phosphorylation of p130 Cas, a Src Homology 3-containing Molecule Having Multiple Src Homology 2-binding Motifs. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**, 15398-15402
- [62] Maza PK, Suzuki E, (2016) Histoplasma capsulatum-Induced Cytokine Secretion in Lung Epithelial Cells Is Dependent on Host Integrins, Src-Family Kinase Activation, and Membrane Raft Recruitment. *Frontiers in Microbiology*, **7**, article 580

- [63] Leroy C, Shen Q, Strande V, Meyer R, McLaughlin ME, Lezan E, Bentires-Alj M, Voshol H, Bonenfant D and Alex Gaither L, (2015) CUB-domain-containing protein 1 overexpression in solid cancers promotes cancer cell growth by activating Src family kinases. *Oncogene*, **34**, 5593-5598
- [64] Endang R. Purba, Ei-ichiro Saita and Ichiro N. Maruyama, (2017) Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The “Rotation Model”. *Cells*, **6**, 13
- [65] Marina Di Domenico and Antonio Giordano, (2017) Signal transduction growth factors: the effective governance of transcription and cellular adhesion in cancer invasion. *Oncotarget*, **8**, 36869-36884
- [66] Ibáñez CF, Ilag LL, Murray-Rust J, Persson H, (1993) An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin. *EMBO J*, **6**, 2281-2293
- [67] Eger G, Papadopoulos N, Lennartsson J, Heldin CH, (2014) NR4A1 promotes PDGF-BB-induced cell colony formation in soft agar. *PLOS one*, **9**, e109047
- [68] Alajati A, Guccini I, Pinton S, Garcia-Escudero R, Bernasocchi T, Sarti M, Montani E, Rinaldi A, Catapano C, Bertoni F, Alimonti A, (2015) Interaction of CDCP1 with HER2 enhances HER2-driven tumorigenesis and promotes trastuzumab resistance in breast cancer. *Cell Reports*, **11**, 564-576
- [69] Mori H, Tomari T, Koshikawa N, Kajita M, Itoh Y, Sato H, Tojo H, Yana I and Seiki M, (2002) CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *The EMBO J*. **21**, 3949-3959
- [70] Giancotti FG, Ruoslahti E, (1999) Integrin signaling. *Science*, **285**, 1028-1032

- [71] Ruoslahti E, (1997) Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. *Kidney International*, **51**, 1413-1417
- [72] Spassov DS, Ahuja D, Wong CH, Moasser MM, (2011) The structural features of Trask that mediate its anti-adhesive functions. *PLoS One*. **6**, e19154
- [73] Miura S, Hamada S, Masamune A, Satoh K, Shimosegawa T, (2014) CUB-domain containing protein 1 represses the epithelial phenotype of pancreatic cancer cell. *Experimental Cell Research*. **321**, 2019-218
- [74] Fulton MD, Hanold LE, Ruan Z, Patel S, Beedle AM, Kannan N, Kennedy EJ, (2018) Conformationally constrained peptides target the allosteric kinase dimer interface and inhibit EGFR activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **26**, 1167-1173
- [75] Guo T, Zhao L, Zhang Y, Liu G, Yao Y and Li H, (2016) A monoclonal antibody targeting the dimer interface of epidermal growth factor receptor (EGFR). *Immunology Letters*, **180**, 39-45

9. 図表

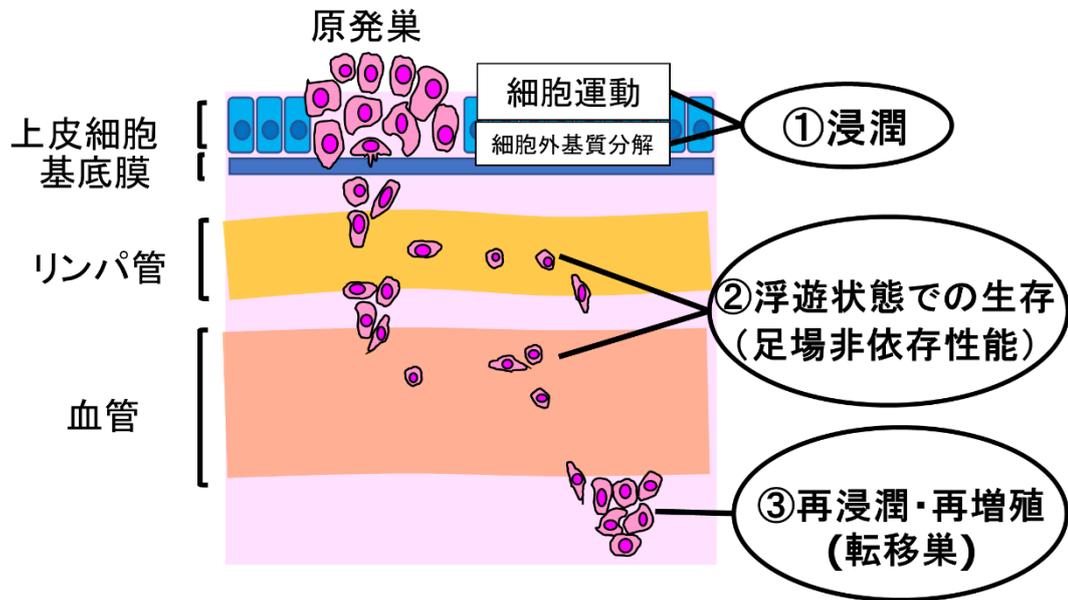


図1 癌転移の模式図

癌細胞は発生からの異常増殖により原発巣を形成する。その後、細胞運動と基底膜や細胞外基質の分解によって、周辺組織への移動やリンパ管内や血管内への移行である「浸潤」が起こる(①)。次に癌細胞は、リンパ液・血液中へと移行して浮遊状態でも細胞死を起こさない「足場非依存性能」によって全身に移動し(②)、リンパ管内や血管内から離脱して、新しい組織または臓器で「再浸潤・再増殖」することで転移巣を形成する(③)。これら一連の過程を癌転移という。

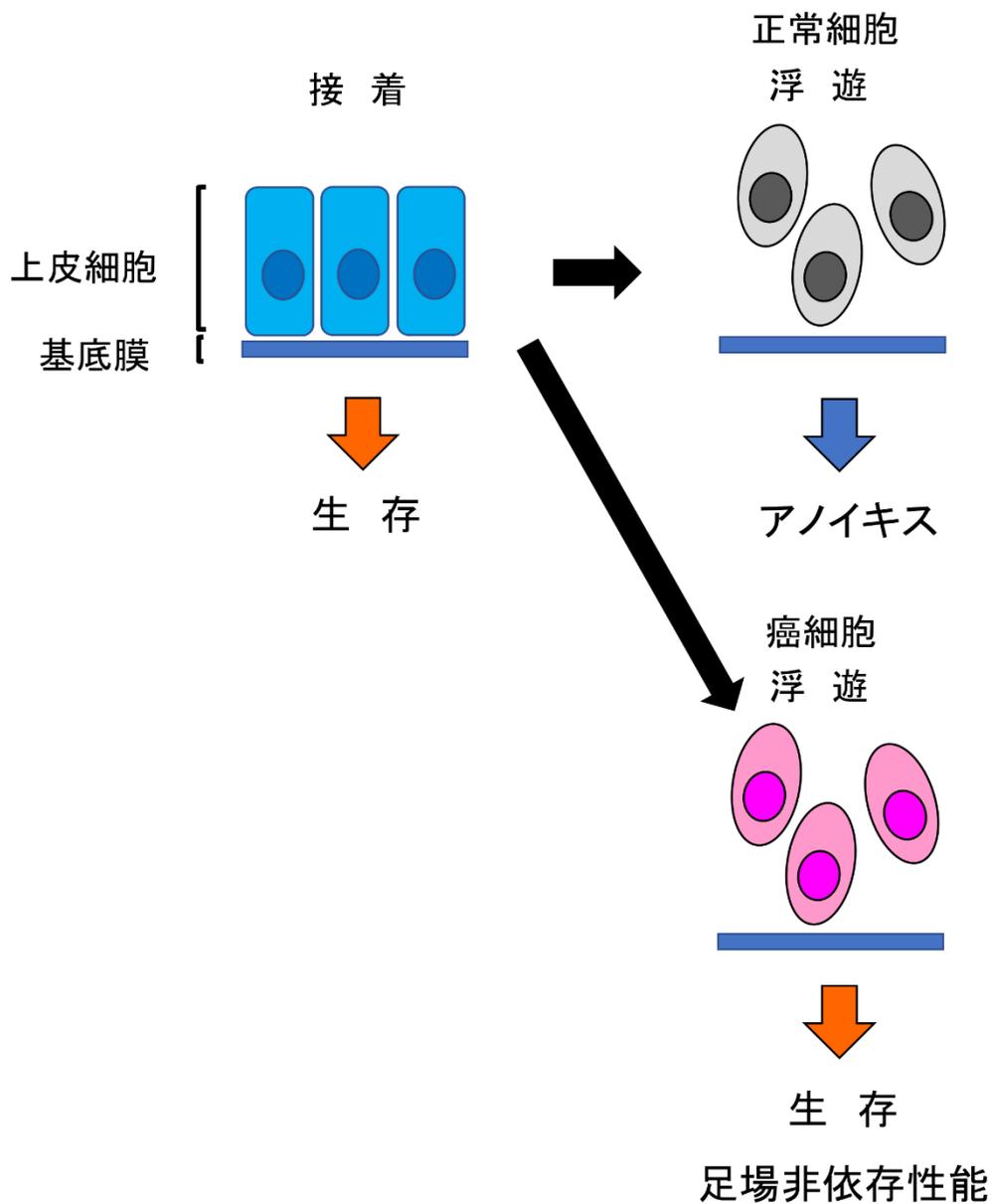


図2 癌細胞の足場非依存性能

正常細胞は細胞外基質との接着によって生存シグナルを形成している。この接着が剥がれると、生存シグナルが破綻して細胞はアノイクスと呼ばれる細胞死をおこす。癌細胞は、この接着が剥がれても細胞死を起こすこと無く生存することが出来る「足場非依存性能」を持っている。

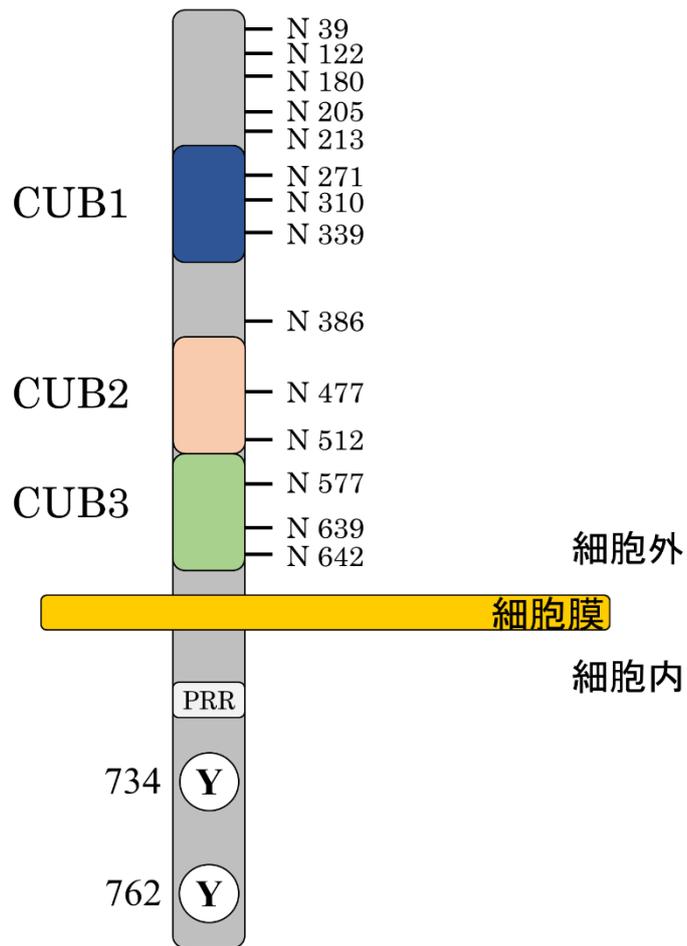


図3 CDCP1 の模式図

CDCP1 は I 型の膜貫通タンパク質である。細胞外ドメインには、タンパク質-タンパク質間結合への関与が推定されている三つの CUB ドメイン(CUB1, CUB2, CUB3)と糖鎖修飾に関与するアスパラギン残基(N)が存在し、膜貫通ドメインを経て、細胞内ドメインには、Src homology domain-3 (SH3)ドメインと特異的に結合する、プロリンリッチな領域(PRR)と、SFK によりリン酸化される二つのチロシン残基 (Y734, Y762)が存在する。

CUB1-2: CUB1-3 ドメイン、各数字は N 末端側のメチオニン残基からのシグナルペプチド(29 残基分)を除いた 30 残基からのアミノ酸番号を示す。

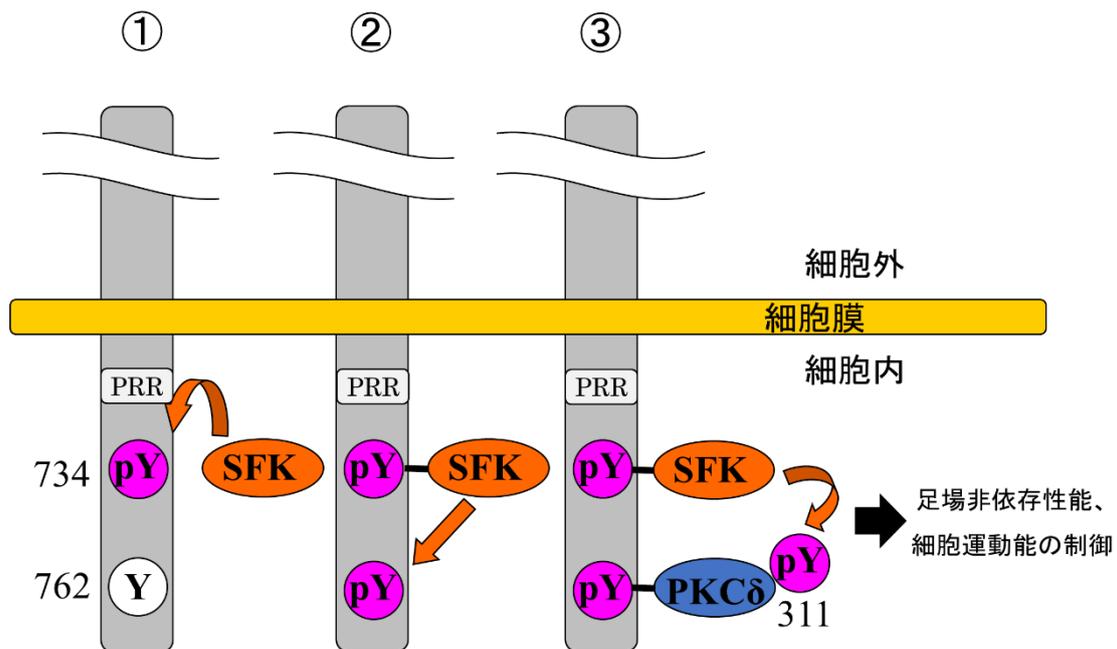


図4 CDCP1 細胞内シグナル伝達の模式図

CDCP1 細胞内シグナル伝達経路の模式図を示す。①CDCP1 は SFK により 734 番目のチロシンをリン酸化する。②この部位に SFK が結合して、CDCP1 の 762 番目のチロシンをリン酸化する。③ここに PKC δ が結合し、既に CDCP1 に結合している SFK により PKC δ の 311 番目のチロシンがリン酸化することにより、下流へのシグナルが伝達される。これら SFK-CDCP1-PKC δ 複合体からなるチロシンリン酸化を介した CDCP1 細胞内シグナルによって、足場非依存性能や細胞運動能といった癌転移に関与する機能を制御する。CDCP1 の細胞外ドメインについては省略して表記している。PRR: プロリンリッチ領域、Y: チロシン残基、pY: リン酸化チロシン残基。

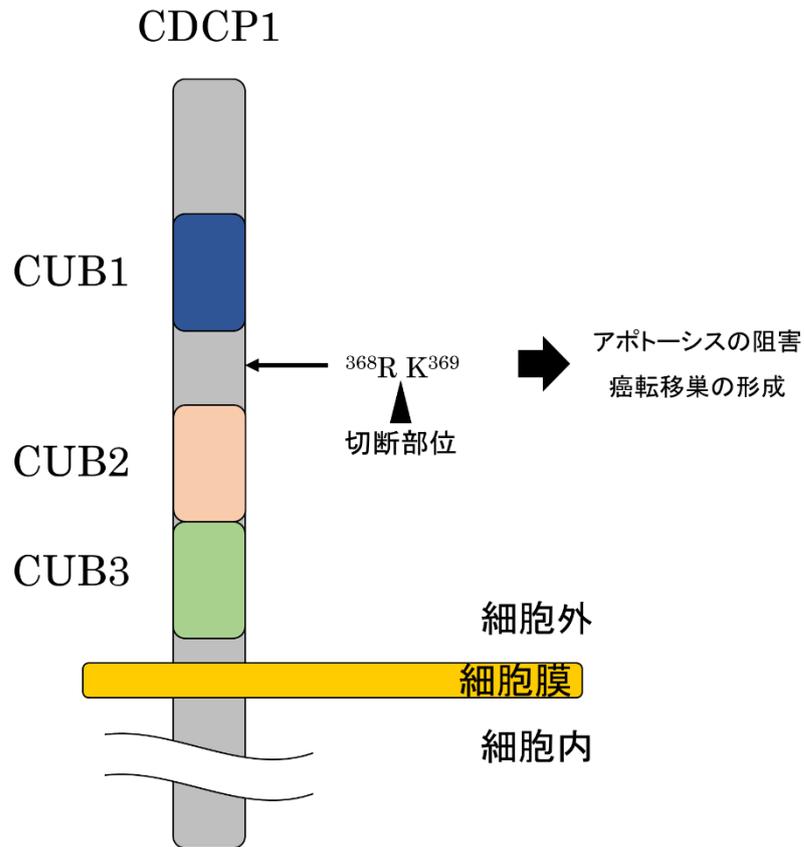


図5 CDCP1 細胞外ドメインを介した機能制御の模式図

CDCP1 細胞外ドメインは、プラスミンあるいはセリンプロテアーゼによって 368 番目のアミノ酸であるアルギニン残基(R)と 369 番目のリシン残基(K)の間で切断される。切断後は、AKT 依存的な生存シグナルを介したアポトーシス阻害や初期の癌転移巣形成に関与する。CDCP1 の細胞内ドメインについては省略して表記している。CUB1-3: CUB1-3 ドメイン、R: アルギニン残基、K: リシン残基、各数字は N 末端側のメチオニン残基からのシグナルペプチド(29 残基分)を除いた 30 残基からのアミノ酸番号を示す。

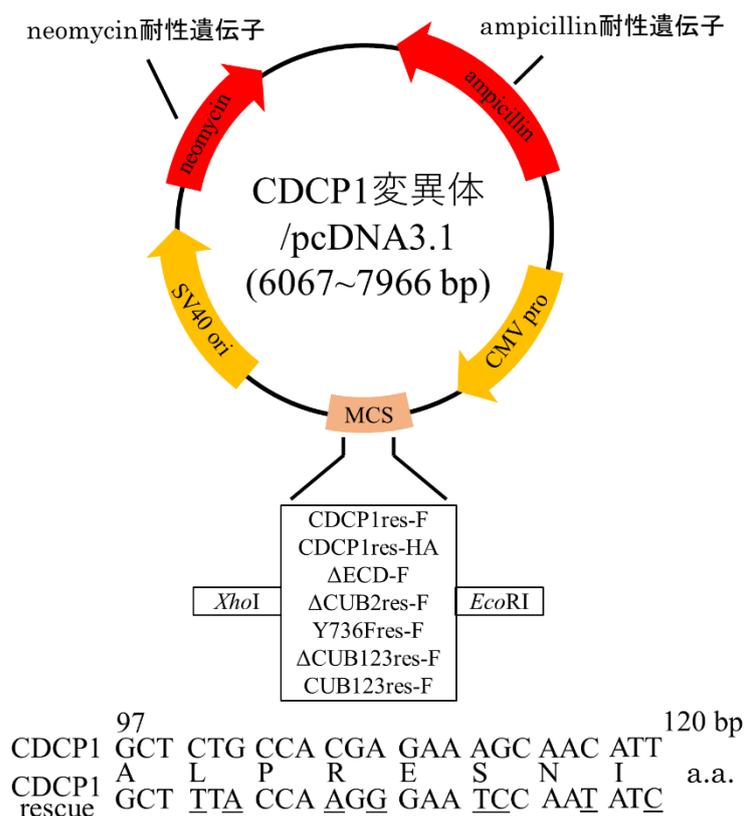


図6 各変異体 CDCP1 プラスミドの構成

各変異体 CDCP1 タンパク質を発現させるために、各 PCR 産物を pcDNA3.1 に挿入したときのプラスミドマップ。各 PCR 産物およびプラスミドを *EcoRI* と *XhoI* で切断したのち、ライゲーションすることで各 PCR 産物をベクターに挿入した。各 CDCP1 変異体には、miRNA system によって発現抑制がかからないように塩基を置換した(下線)、rescue 配列を組み込んでいる。数字は、シグナルペプチドを含んだ N 末端側からの塩基の数を表している。neomycin: プラスミドを導入した細胞をセレクションするために使用したネオマイシン耐性遺伝子領域、ampicillin: プラスミドを導入した大腸菌をセレクションするために使用したアンピシリン耐性遺伝子領域、CMV pro: CMV プロモーター領域、MCS: マルチクローニングサイト、SV40 ori: SV40 オリジン領域

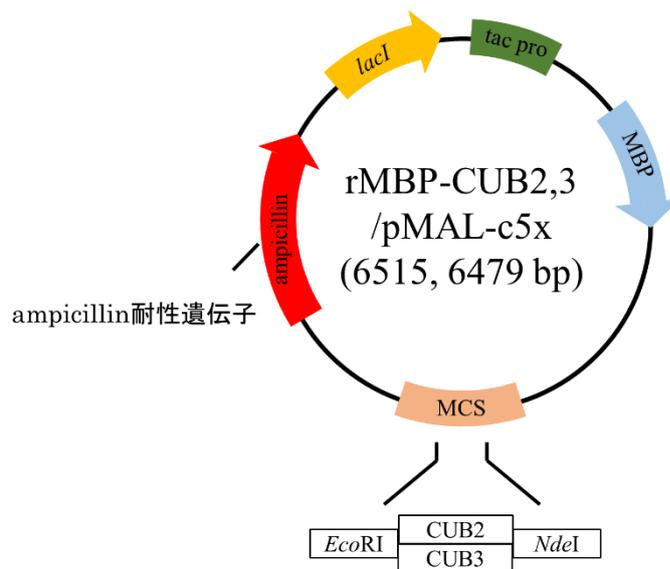


図7 各 rMBP 発現プラスミドの構成

各 MBP 融合組換えタンパク質を発現させるために、各 PCR 産物を p-Mal c5x に挿入したときのプラスミドマップを示す。各 PCR 産物およびプラスミドを *NdeI* と *EcoRI* で切断したのち、ライゲーションすることで各 PCR 産物をベクターに挿入した。

lacI: ラクトースオペロンのリプレッサーをコードする遺伝子、*tac pro*: taq プロモーター領域、MBP: maltose binding protein をコードする遺伝子、MCS: マルチクローニングサイト、ampicillin: プラスミドを導入した大腸菌をセレクションするために使用したアンピシリン耐性遺伝子領域

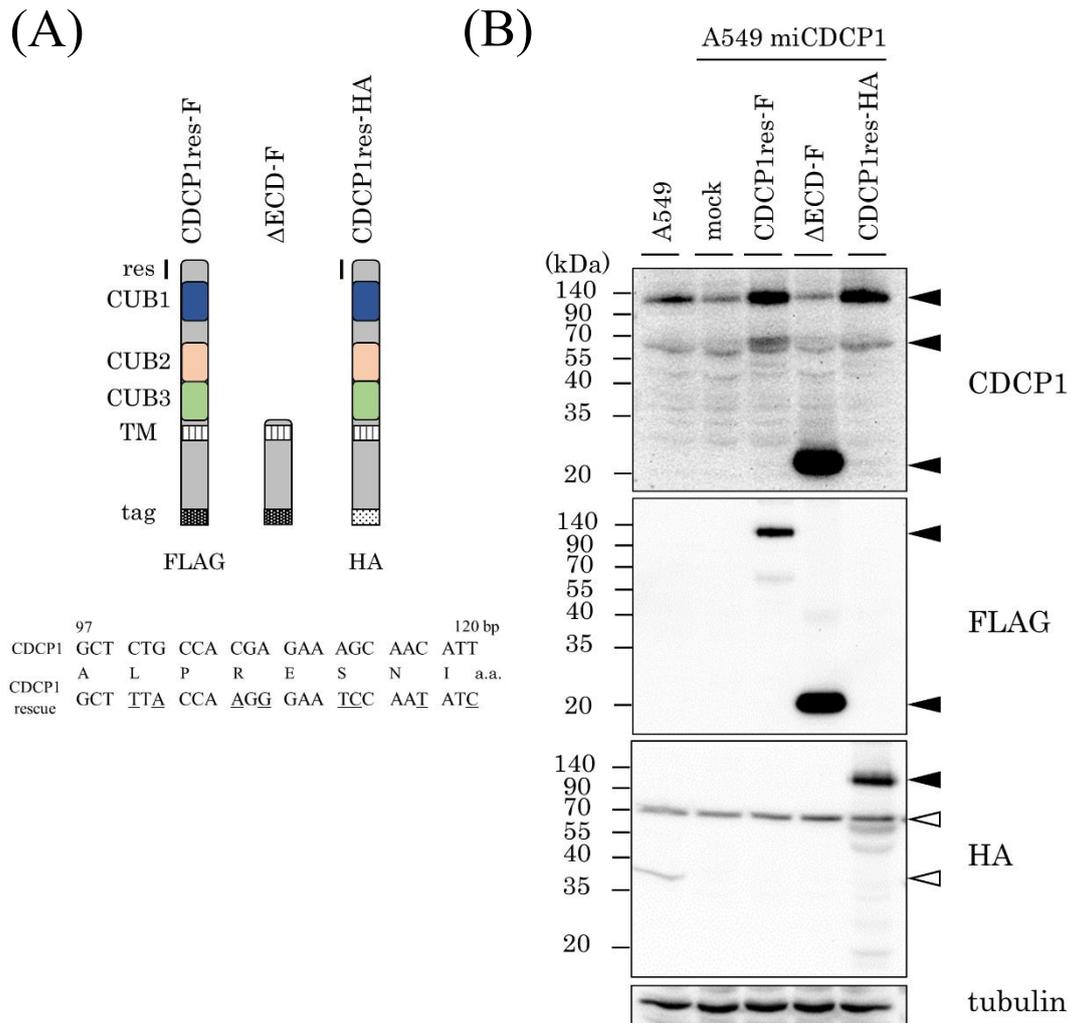


図8 各 CDCP1 変異体タンパク質の発現

(A)作製した各 CDCP1 変異体の模式図

C 末端側に FLAG 標識を付加した全長の CDCP1 (CDCP1res-F)、同様に FLAG 標識を付加し、細胞外ドメインを欠失させた CDCP1 (Δ ECD-F)、CDCP1res-F と同様に、C 末端側に HA タグを付加した全長の CDCP1 (CDCP1res-HA)。各変異体は、シグナルペプチドを含んだ N 末端側からの 97~120 bp の範囲において、miRNA system によって発現抑制がかからないように塩基を置換した(下線)rescue 配列を含んでいる。CUB1-3: CUB1-3 ドメイン、TM: 膜貫通ドメイン、res: rescue 配列、bp: 塩基対、a.a.: アミノ酸。

(B)A549 細胞株および A549 miCDCP1 細胞と各 CDCP1 変異体の発現

A549 細胞株および A549 miCDCP1 細胞、A549 miCDCP1 細胞に各 CDCP1 変異体を発現させた細胞から回収したタンパク質を、抗 CDCP1 ヤギ抗体、抗 FLAG-HRP 抗体および抗 HA ウサギ抗体で WB した。総タンパク質量の指標として、抗チューブリンマウス抗体で WB した。左端に分子量マーカーに基づく数値を示した。

▲: CDCP1 および CDCP1 変異体、◁: 非特異的バンド

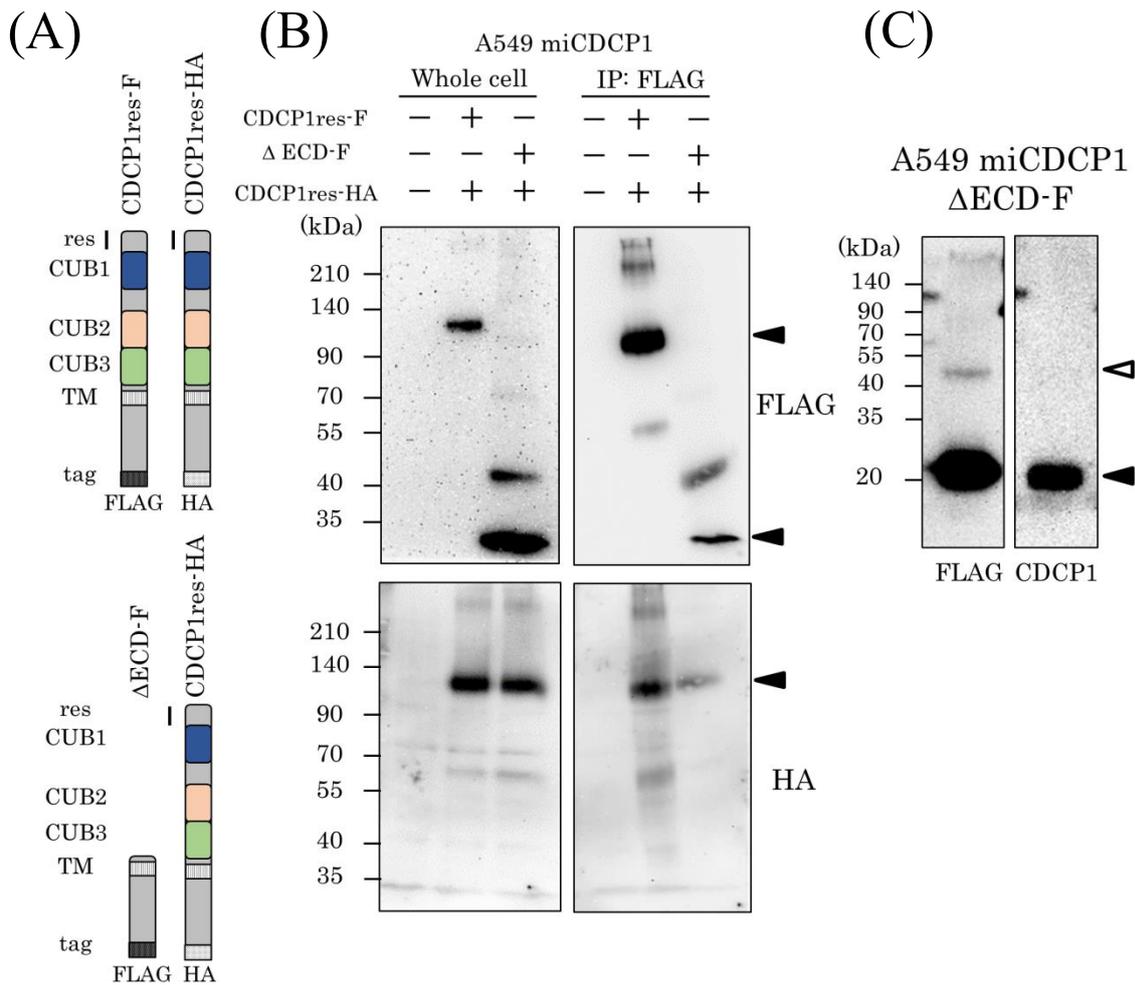


図 9-1 CDCP1 細胞外ドメインによる同種多量体形成

(A)発現させた各 CDCP1 変異体の組み合わせの模式図

上から CDCP1res-F と HA-標識付野生型 CDCP1(CDCP1res-HA)の組み合わせ、または、 Δ ECD-F と CDCP1res-HA の組み合わせで A549 miCDCP1 細胞に同時に発現させた。

TM: 膜貫通ドメイン、res: rescue 配列、CUB1-3: CUB ドメイン 1-3

(B)抗 FLAG M2 アフィニティーゲルによる免疫沈降の WB

A549 miCDCP1 細胞に CDCP1res-F と CDCP1res-HA または Δ ECD-F と CDCP1res-HA を同時に発現させ、抗 FLAG M2 アフィニティーゲルで免疫沈降した。インプットである whole cell を左側に、免疫沈降(IP)後を右側に示す。上が抗 FLAG-HRP 抗体、下が抗 HA ウサギ抗体による WB の結果である。左端に分子量マーカーに基づく数値を示した。

◀: CDCP1 変異体

(C) Δ ECD-F の WB における 40 kDa のバンドの検証

A549 miCDCP1 細胞に Δ ECD-F を発現させた細胞から回収したタンパク質を抗 FLAG-HRP 抗体および抗 CDCP1 ヤギ抗体で WB した。40 kDa のバンドは CDCP1 抗体では検出されなかった。左端に分子量マーカーに基づく数値を示した。

◀: CDCP1 変異体、 ◁: 40 kDa のバンド

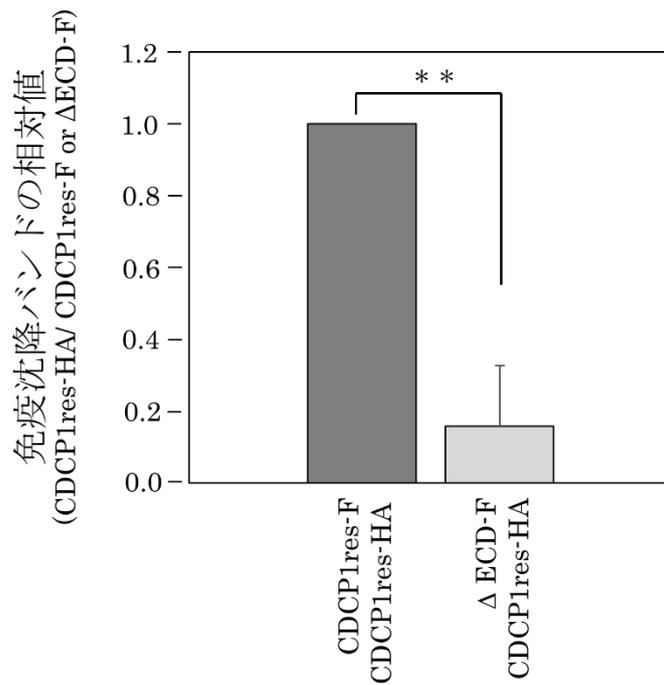


図 9-2 免疫沈降により結合した CDCP1res-HA 相対値のグラフ

抗 FLAG M2 アフィニティーゲルによる免疫沈降後の、CDCP1res-F に対する CDCP1res-HA の共沈降量を 1 としたときの、 Δ ECD-F に対する CDCP1res-HA の共沈降量を相対値で比較した棒グラフ。縦軸は相対値を、横軸は A549 miCDCP1 細胞に発現させた CDCP1 変異体を示す。エラーバーは標準偏差を示す。**P<0.01、n=3

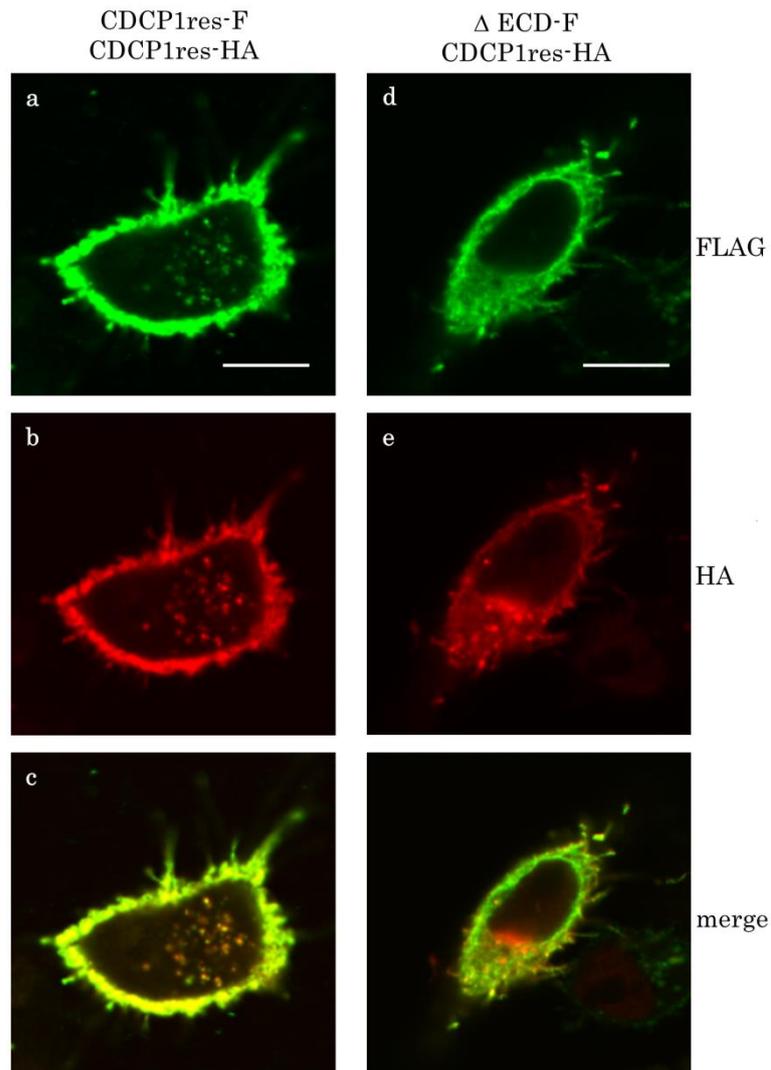


図 10-1 発現させた各 CDCP1 変異体の細胞での局在

A549 miCDCP1 に CDCP1res-FLAG と CDCP1res-HA または Δ ECD-F と CDCP1res-HA を発現させ、抗 FLAG M2 FITC 抗体および抗 HA ウサギ抗体を用いて免疫染色をおこなった(a, b, d, e)。それぞれの画像を合成した画像を merge に示した(c, f)。スケールバー：10 μ m、緑：FLAG、赤：HA

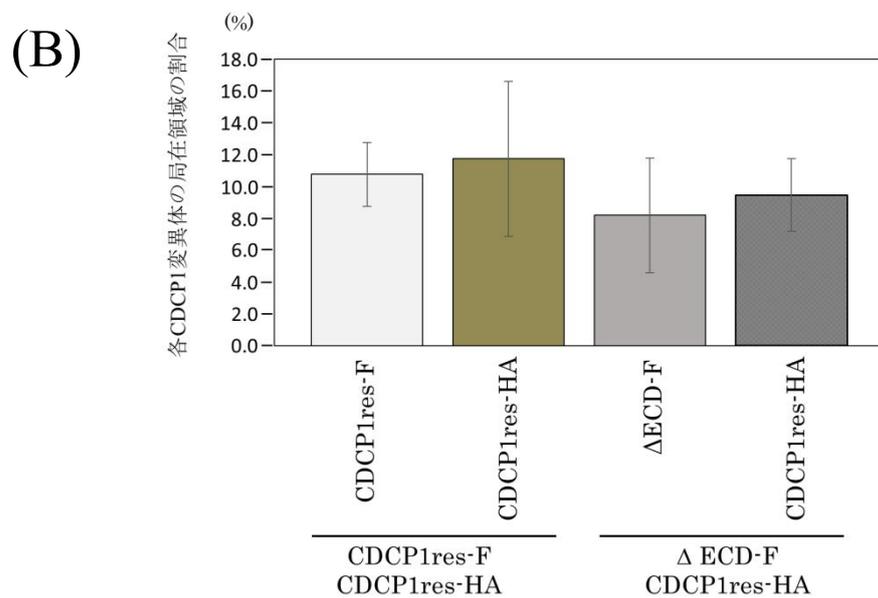
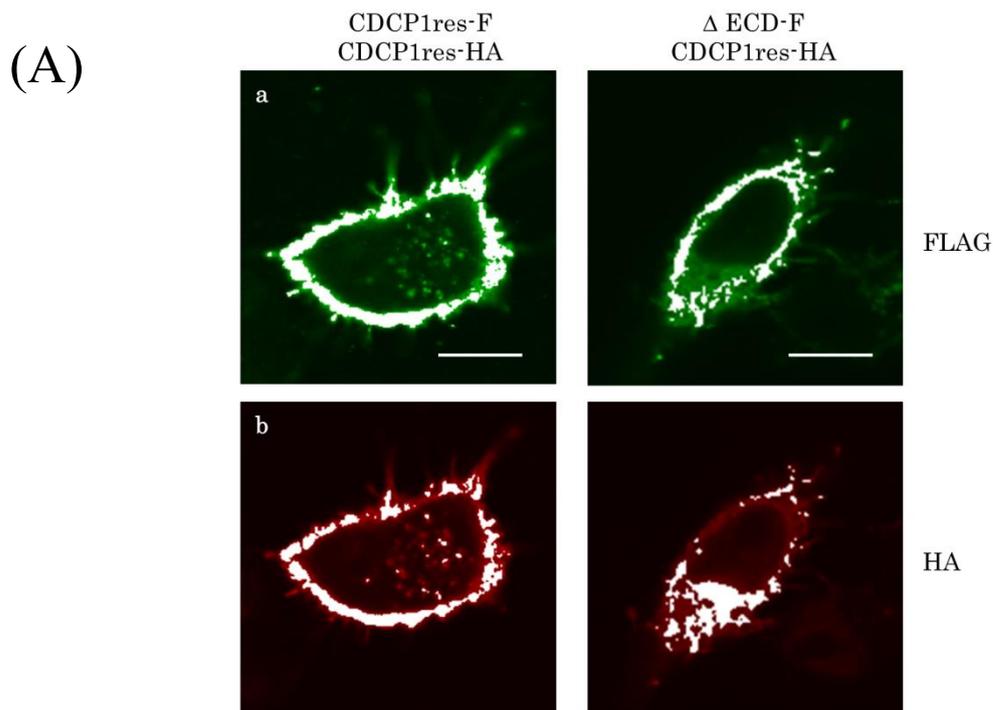


図 10-2 各 CDCP1 変異体の細胞局在の割合

(A)各 CDCP1 変異体の細胞局在

各 CDCP1 変異体の染色領域を白点で示した。スケールバー：10 μ m

(B)各 CDCP1 変異体の染色領域が全染色領域に占める割合

白点で示された染色領域が、全染色領域に占める割合を、FV10-ASW software を用いて算出したものを棒グラフで示した。縦軸は共局在の割合を、横軸は A549 miCDCP1 細胞に発現させた CDCP1 変異体を示す。n=3

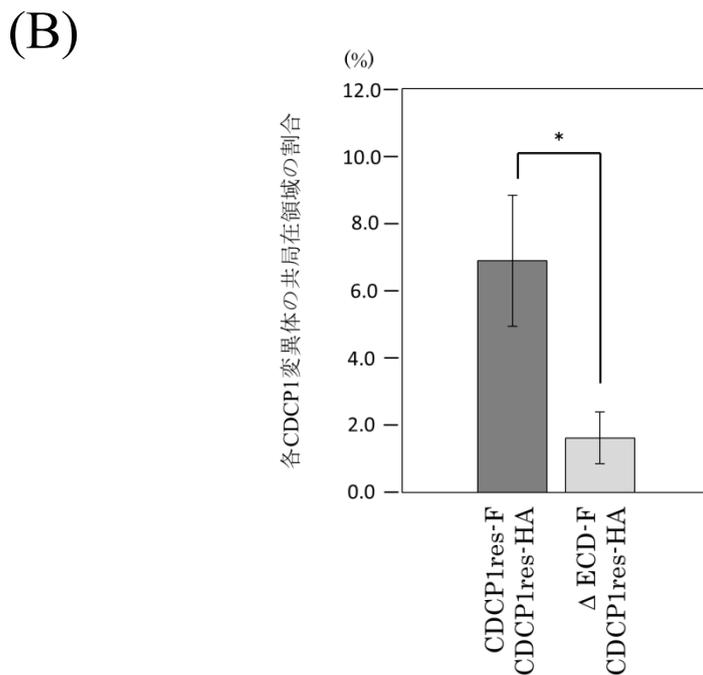
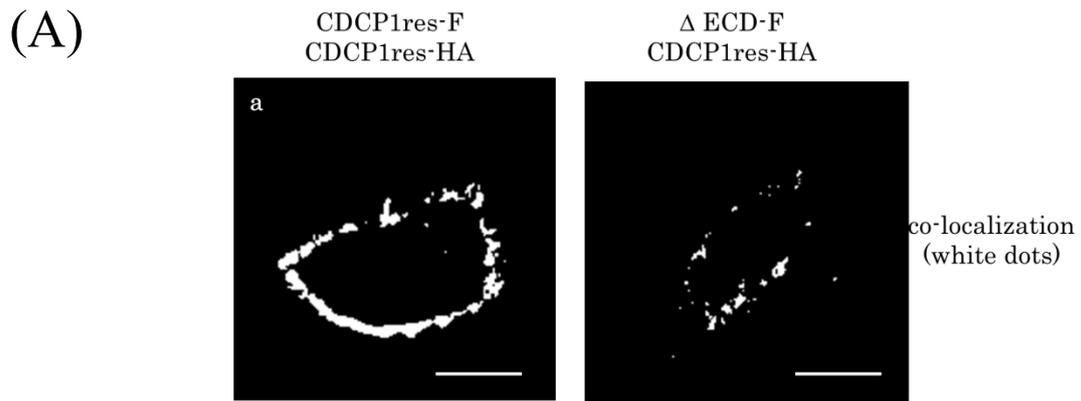


図 10-3 各 CDCP1 変異体の共局在領域が全画像に占める割合

(A)各 CDCP1 変異体の共局在領域

CDCP1res-HA と CDCP1res-F または Δ ECD-F が共局在している領域を FV10-ASW software を用いて画像上に白点で示した。スケールバー：10 μm

(B)白色で示された共局在領域が、染色画像の全体に占める割合を、FV10-ASW software で算出した棒グラフ。縦軸は共局在領域の画像全体に対する割合を、横軸は A549 miCDCP1 細胞に発現させた CDCP1 変異体を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。*P<0.05、n=3

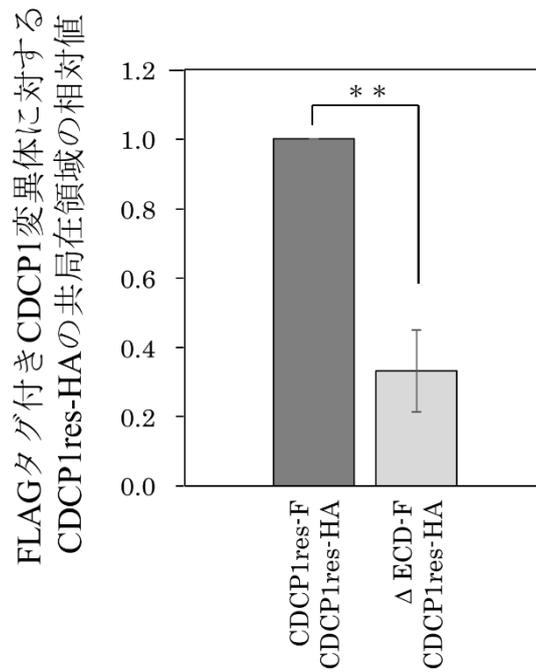
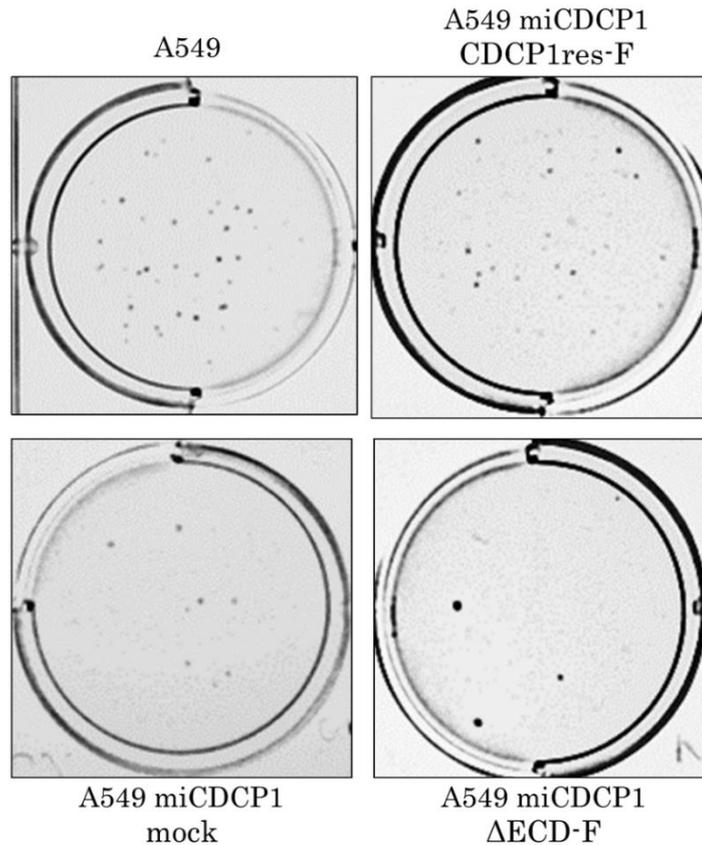


図 10-4 FLAG 標識付 CDCP1 変異体に対する CDCP1res-HA の共局在

FLAG 標識付 CDCP1 変異体の細胞内における染色領域に対する、CDCP1res-HA との共局在領域を、CDCP1res-F と CDCP1res-HA での場合を 1 としたときの相対値を棒グラフで示した。縦軸は共局在の相対値を、横軸は A549 miCDCP1 細胞に発現させた CDCP1 変異体を示す。エラーバーは標準偏差を示す。**P<0.01、n=3

(A)



(B)

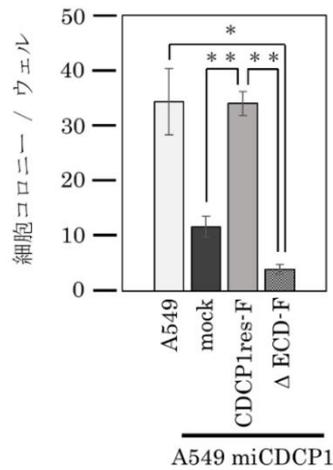


図 11 CDCP1 細胞外ドメインの欠失による足場非依存性への影響

(A)A549 細胞株および A549 miCDCP1 細胞に各 CDCP1 変異体を発現させたときの soft-agar assay によるコロニー形成を示す画像。黒く点状に見えるものが形成された細胞コロニーを示す。

(B)コロニー数を計上したものを棒グラフ。縦軸はコロニー数を、横軸は A549 miCDCP1 細胞に発現させた CDCP1 変異体を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

*P<0.05、**P<0.01、n=3

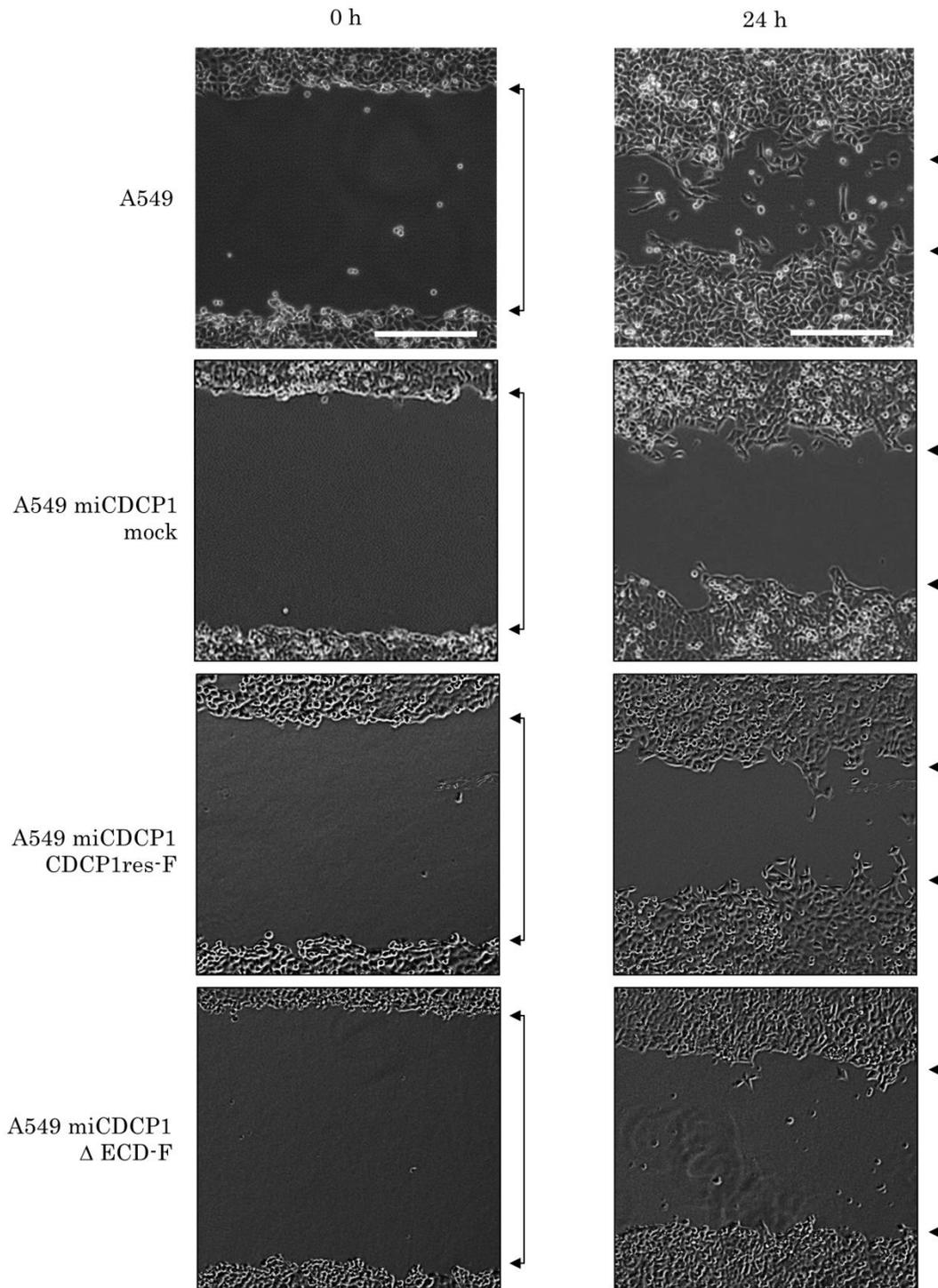


図 12-1 CDCP1 変異体発現細胞の wound healing assay における細胞間隔の画像

各細胞の傷を付けた時間(0 h)と 24 時間後(24 h)における位相差顕微鏡画像。移動した細胞の測定位置は、最も移動した細胞の位置と最も移動しなかった細胞の位置の中間位置と定めた。各時間における計測した傷の幅を黒矢印で示す。スケールバー：500 μm

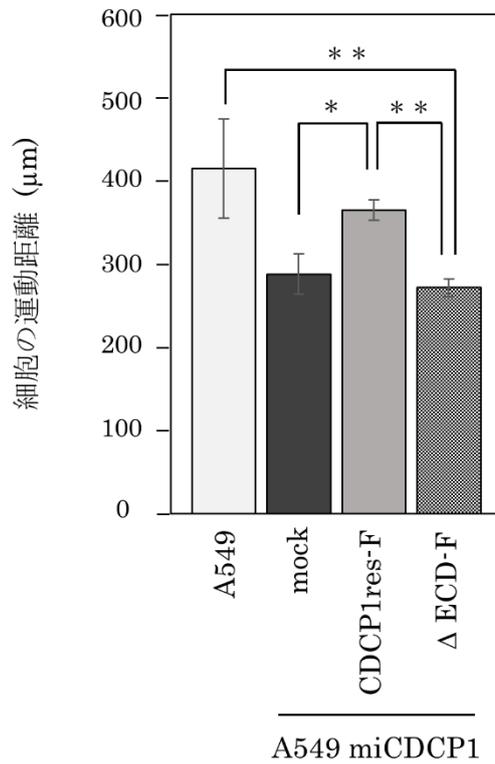


図 12-2 CDCP1 変異体発現細胞の移動距離を示すグラフ

細胞の運動距離は、図 10-1 における細胞の写真の様に、0 h の時の傷の幅から、24 h 後の傷の幅を引くことで算出した。各細胞における移動距離を棒グラフで示し、縦軸は移動距離(μm)を、横軸は A549 miCDCP1 細胞に発現させた CDCP1 変異体を示す。エラーバーは標準偏差を示す。*P<0.05、**P<0.01、n=3

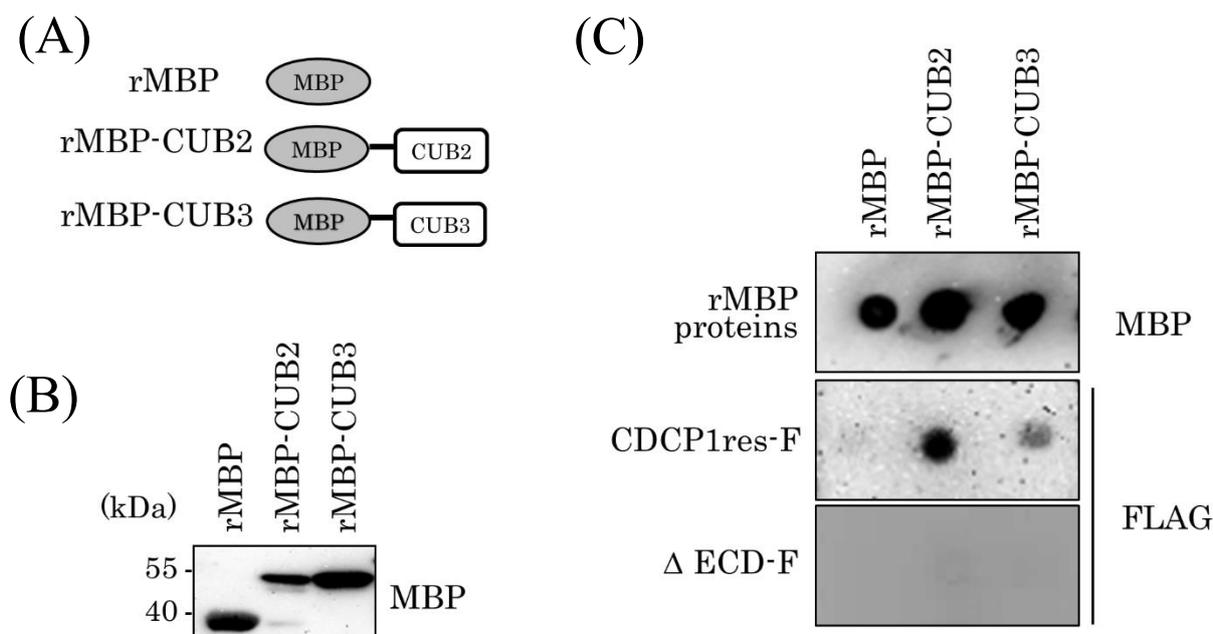


図 13 細胞外 CUB2、CUB3 ドメインによる CDCP1 変異体との結合実験

(A)組換えタンパク質の模式図

MBP に各 CUB ドメインが融合させた組換えタンパク質の模式図

(B)組換えタンパク質の発現確認 WB

大腸菌から回収して精製した各組換えタンパク質の抗 MBP マウス抗体(MBP)による WB。左端に分子量マーカーに基づく数値を示した。MBP タンパク質(rMBP)の理論値は 42 kDa であり、rMBP-CUB2 および rMBP-CUB3 の理論値は、それぞれ 56 kDa および 57 kDa である。

(C)組換えタンパク質と CDCP1 変異体タンパク質を用いた Far-WB

rMBP proteins: ドット状にブロットした各組換えタンパク質(rMBP, rMBP-CUB2, rMBP-CUB3)を抗 MBP マウス抗体(MBP)によって WB した。CDCP1res-F: ドット状にブロットした各組換えタンパク質に CDCP1res-F を発現させた A549 細胞のライセートを振りかけ、抗 FLAG-HRP 抗体(FLAG)によって WB したもの。ΔECD-F: ドット状にブロットした各組換えタンパク質に ΔECD-F を発現させた A549 細胞のライセートを振りかけ、抗 FLAG-HRP 抗体(FLAG)によって WB したもの。

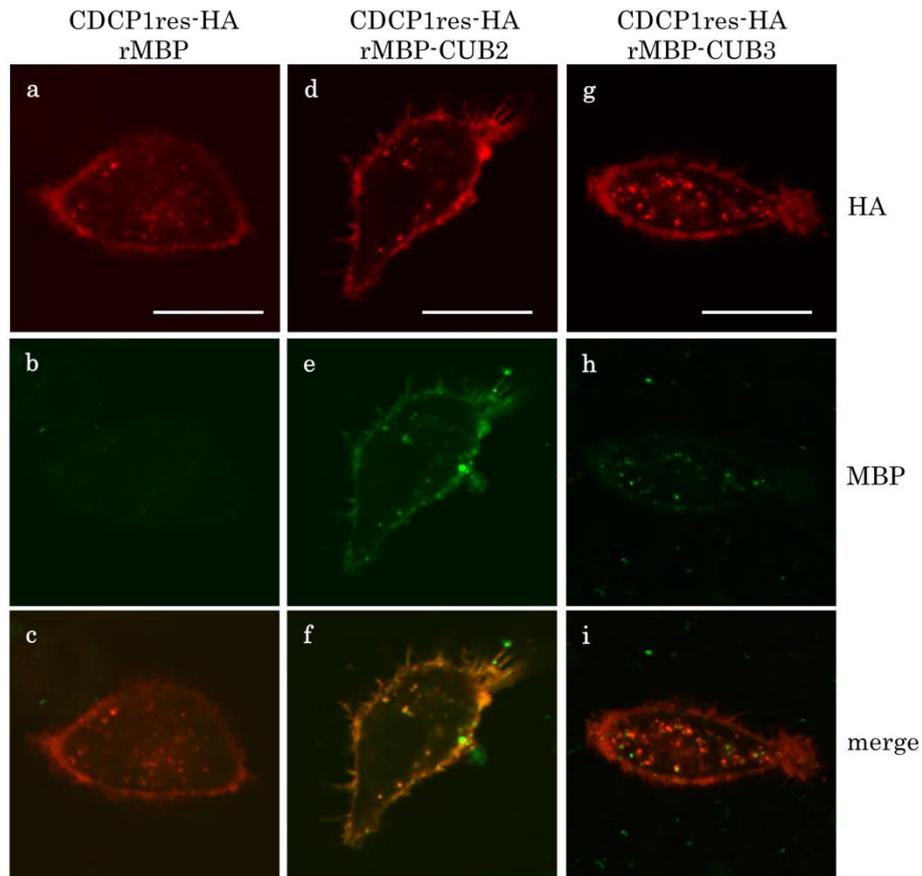
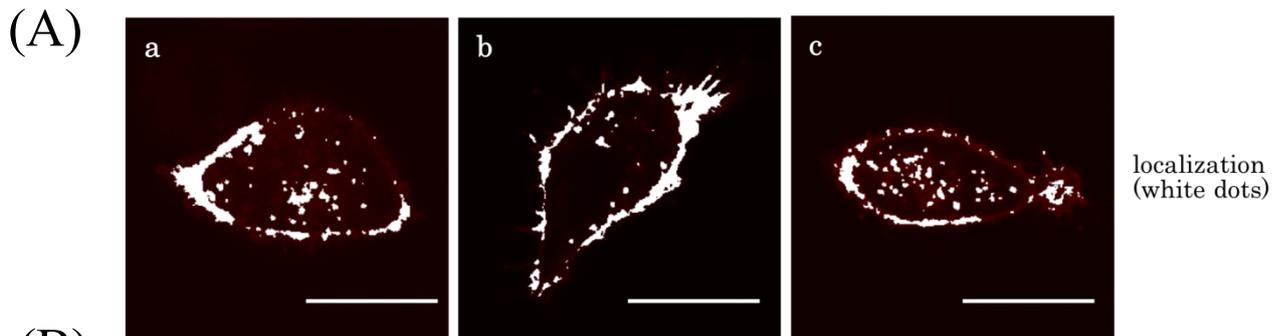


図 14-1 CDCP1res-HA と rMBP, rMBP-CUB2, rMBP-CUB3 の細胞局在

A549 miCDCP1 細胞に CDCP1res-HA を発現させるとともに、各 rMBP を添加し、抗 HA ウサギ抗体および抗 MBP マウス抗体を用いて免疫染色をおこなった。(a, b) rMBP を加えてそれぞれ染色した画像、(d, e) rMBP-CUB2 を加えて染色した画像、(g, h) rMBP-CUB3 を加えて染色した画像を示した。それぞれの染色画像を合成した画像を merge に示した。スケールバー：10 μm



(B)

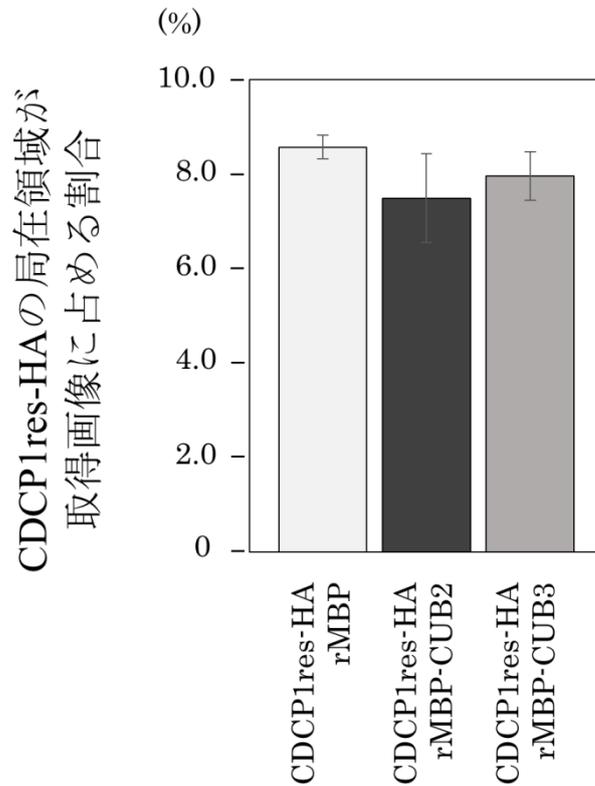


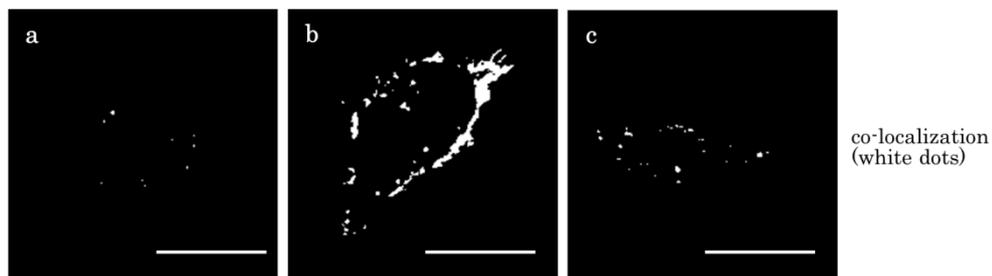
図 14-2 CDCP1res-HA の細胞局在領域が画像全体に占める割合

(A)A549 miCDCP1 細胞に CDCP1res-HA を発現させ、抗 HA ウサギ抗体を用いて免疫染色をおこなったときの、局在領域を白点で示した。スケールバー：10 μ m

(B)局在領域が全染色領域に占める割合

白点で示された局在領域が、全染色領域に占める割合を棒グラフで示した。縦軸は割合を、横軸は A549 miCDCP1 に CDCP1res-HA を発現させ、各組換えタンパク質を添加した細胞を示す。n=3

(A)



(B)

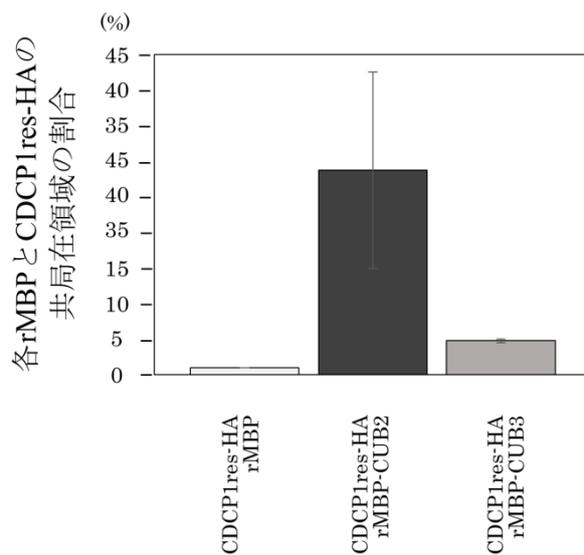


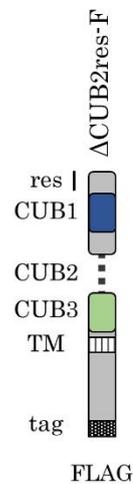
図 14-3 各 rMBP と CDCP1res-HA の共局在領域が画像全体に占める割合

(A)A549 miCDCP1 細胞に CDCP1res-HA を発現させるとともに各 rMBP を添加し、抗 HA ウサギ抗体および抗 MBP マウス抗体を用いて免疫染色をおこなったときの、共局在領域を白点で示した。スケールバー：10 μ m

(B)共局在領域が全染色領域に占める割合

白点で示された局在領域が、全染色領域に占める割合を棒グラフで示した。縦軸は割合を、横軸は A549 miCDCP1 に CDCP1res-HA を発現させ、各組換えタンパク質を添加した細胞を示す。エラーバーは標準偏差を示す。n=3

(A)



(B)

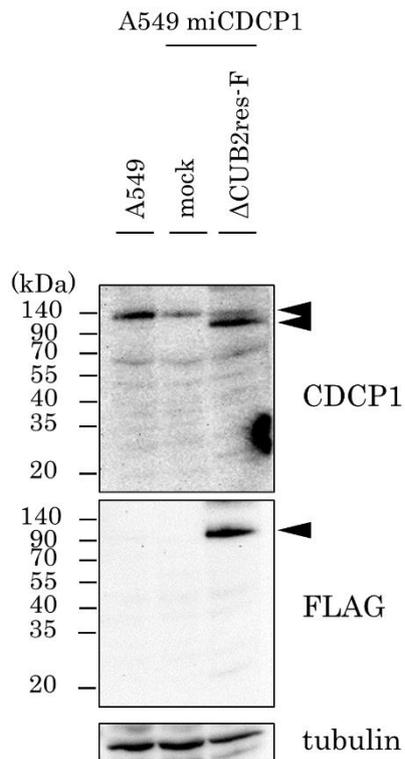


図 15 CUB2 ドメイン欠失変異体(Δ CUB2res-F)の発現

(A)作製した各 CDCP1 変異体の模式図

miRNA による発現抑制がかからない rescue 配列を含み、C 末端側に FLAG 標識を付加し、CUB2 ドメインを欠失させた CDCP1 (Δ CUB2res-F)。CUB1-3: CUB1-3 ドメイン、TM: 膜貫通ドメイン、res: rescue 配列。

(B)A549 細胞株および A549 miCDCP1 細胞と Δ CUB2res-F の発現

A549 細胞株および A549 miCDCP1 細胞、A549 miCDCP1 細胞に Δ CUB2res-F 変異体を発現させた細胞から回収したタンパク質を、抗 CDCP1 ヤギ抗体、抗 FLAG-HRP 抗体で WB した。総タンパク質量の指標として、抗チューブリンマウス抗体で WB した。左端に分子量マーカーに基づく数値を示した。

◀: CDCP1 および CDCP1 変異体、

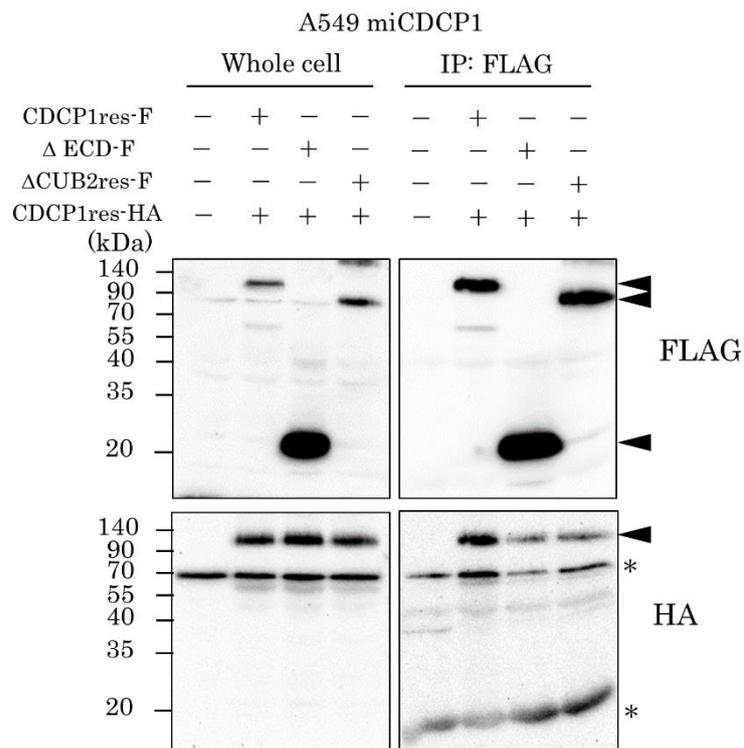


図 16-1 免疫沈降による ΔCUB2res-F を介した同種多量体形成の検討

A549 miCDCP1 細胞に CDCP1res-F と CDCP1res-HA または ΔECD-F と CDCP1res-HA、ΔCUB2res-F と CDCP1res-HA を同時に発現させ、抗 FLAG M2 アフィニティーゲルで免疫沈降した。インプットである whole cell を左側に、免疫沈降(IP)後を右側に示す。上が抗 FLAG-HRP 抗体、下が抗 HA ウサギ抗体による WB。左端に分子量マーカーに基づく数値を示した。

◄: CDCP1 変異体、*: 非特異的バンド

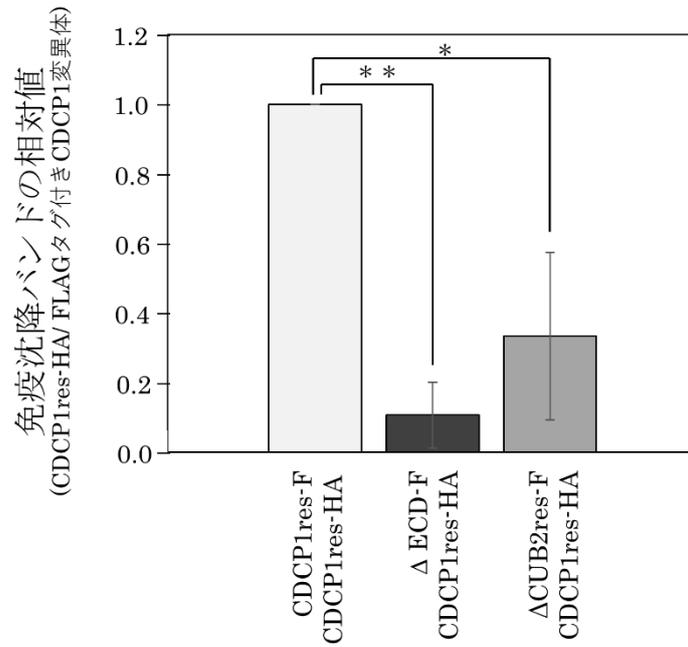


図 16-2 免疫沈降された CDCP1res-HA 相対値のグラフ

抗 FLAG M2 アフィニティーゲルによる免疫沈降後の、CDCP1res-F に対する CDCP1res-HA の共沈降量を 1 としたときの、 Δ ECD-F および Δ CUB2res-F に対する CDCP1res-HA の共沈降量を相対値で比較した棒グラフ。縦軸は相対値を、横軸は A549 miCDCP1 細胞に発現させた CDCP1 変異体を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、 $n = 3$

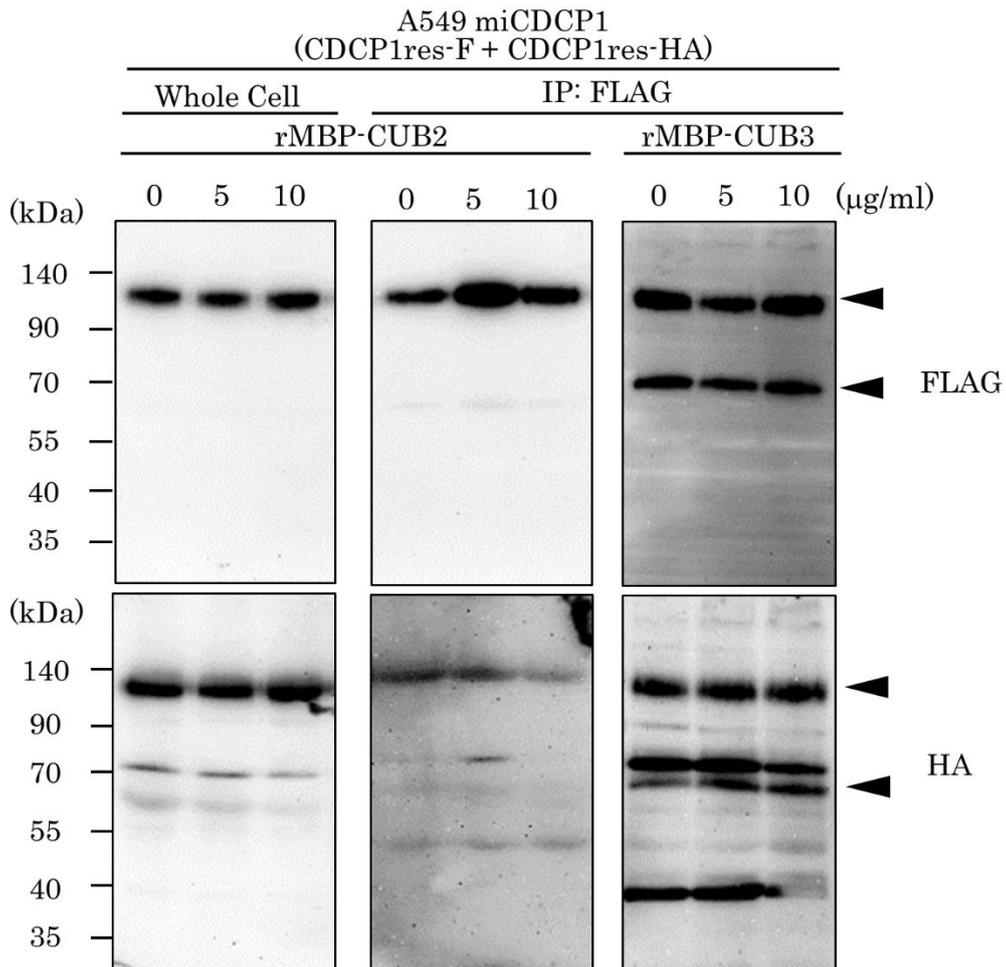


図 17 rMBP-CUB2 による CDCP1 多量体形成の阻害

A549 miCDCP1 に CDCP1res-FLAG と CDCP1res-HA を同時に発現させ、rMBP-CUB2 または rMBP-CUB3 タンパク質を加えて培養した。その後、回収した細胞ライセートを抗 FLAG M2 アフィニティーゲルで免疫沈降し、抗 FLAG-HRP 抗体および抗 HA ウサギ抗体を用いて WB した。左端に分子量マーカーに基づく数値を示した。n=3

▲ : CDCP1 変異体

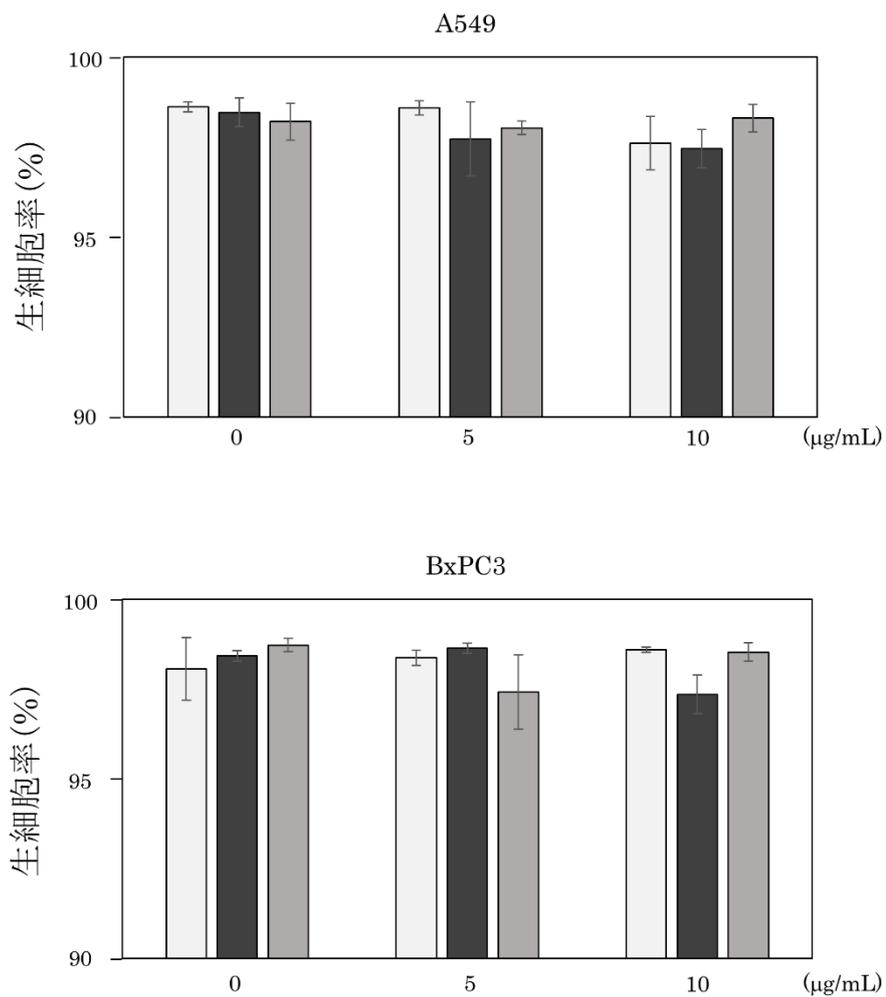
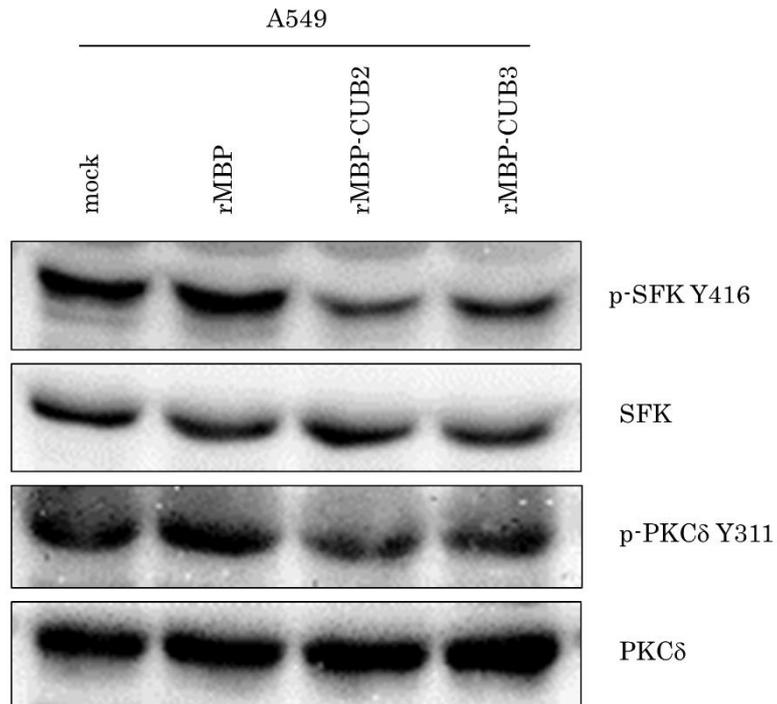


図 18 各 rMBP の添加による生細胞への影響

A549 および BxPC3 細胞株に各 rMBP タンパク質を加えたときの、細胞死への影響を示したグラフ。縦軸は計数した細胞のなかの生細胞の割合(%)を、横軸は添加した組換えタンパク質の最終濃度を示す。n=3

□: rMBP、■: rMBP-CUB2、■: rMBP-CUB3

(A)



(B)

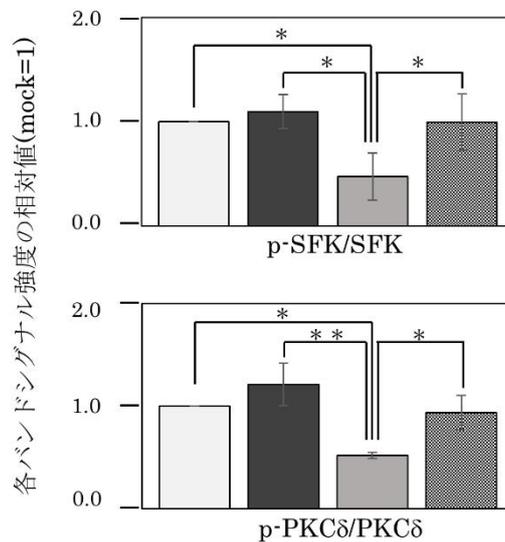


図 19-1 A549 細胞での各 rMBP による SFK および PKCδ のリン酸化への影響
(A)各 rMBP を加えたときの SFK および PKCδ の WB

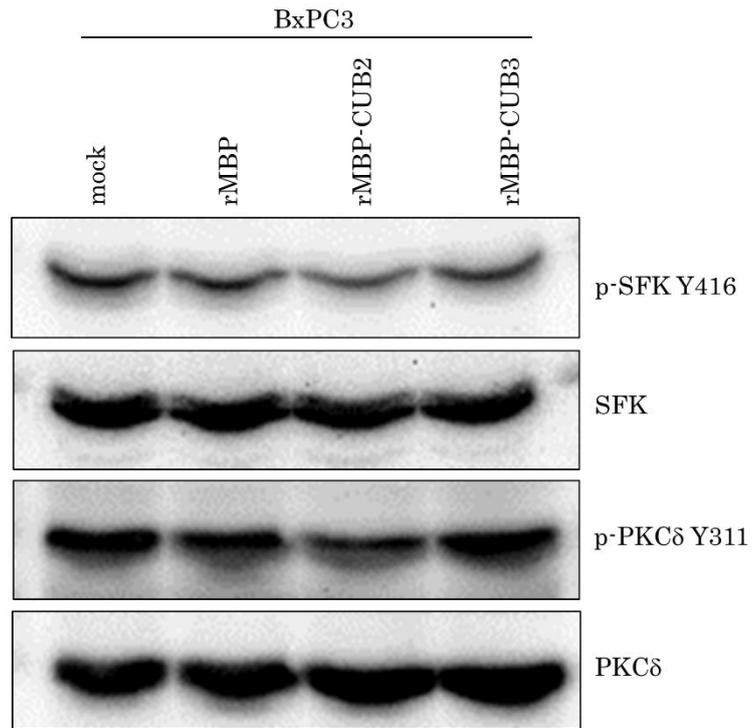
各 rMBP タンパク質を加え、回収した A549 細胞のライセートを各抗体で WB した。

(B)各 WB におけるバンド強度の比較

NIH ImageJ を用いて SFK バンド強度に対するリン酸化 SFK バンド強度比、および PKCδ バンドに対するリン酸化 PKCδ バンド強度比を、mock の値を 1 として相対値で比較したものを棒グラフに示す。縦軸は相対値を、横軸は添加した組換えタンパク質を示す。

*P<0.05、**P<0.01、n=3

(A)



(B)

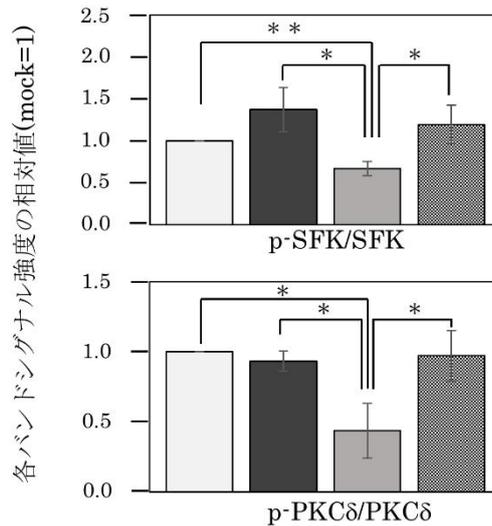


図 19-2 BxPC3 細胞での各 rMBP による SFK および PKCδ のリン酸化への影響
(A) 各 rMBP を加えたときの WB

各 rMBP タンパク質を加え、回収した BxPC3 細胞のライセートを各抗体で WB した。

(B) 各 WB におけるバンド強度の比較

NIH ImageJ を用いて SFK バンド強度に対するリン酸化 SFK バンド強度比、および PKCδ バンドに対するリン酸化 PKCδ バンド強度比を、mock の値を 1 として相対値で比較したものを棒グラフに示す。縦軸は相対値を、横軸は添加した組換えタンパク質を示す。

*P<0.05、**P<0.01、n=3

p-SFK/SFK : (control : 1.0, rMBP: 1.37 ± 0.26 , r-MBP-CUB2: 0.67 ± 0.08 , rMBP-CUB3: 1.19 ± 0.23)

p-PKC δ /PKC δ : (control : 1.0, rMBP: 0.93 ± 0.07 , r-MBP-CUB2: 0.44 ± 0.20 , rMBP-CUB3: 0.97 ± 0.18)

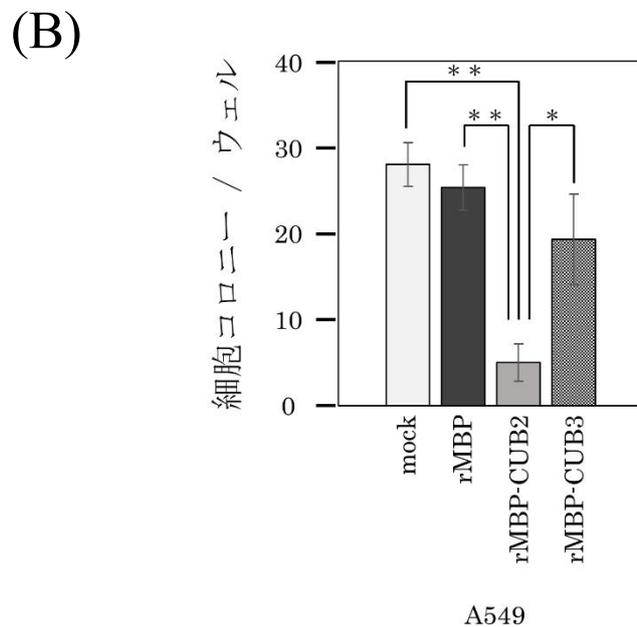
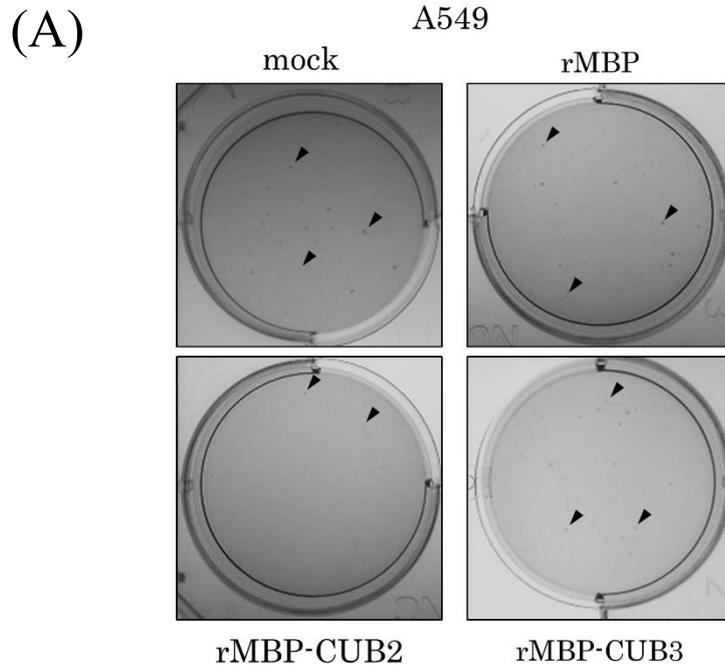


図 20 各 rMBP タンパク質による足場非依存性への影響

(A)A549 細胞株に各 rMBP タンパク質を加えたときの soft-agar assay によるコロニー形成を示す写真。 ◀ : 計数したコロニーの例

(B))コロニー数を計上したものを棒グラフに示す。縦軸はコロニー数を、横軸は添加した組換えタンパク質を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。 **P<0.01、 *P<0.05、 n=3

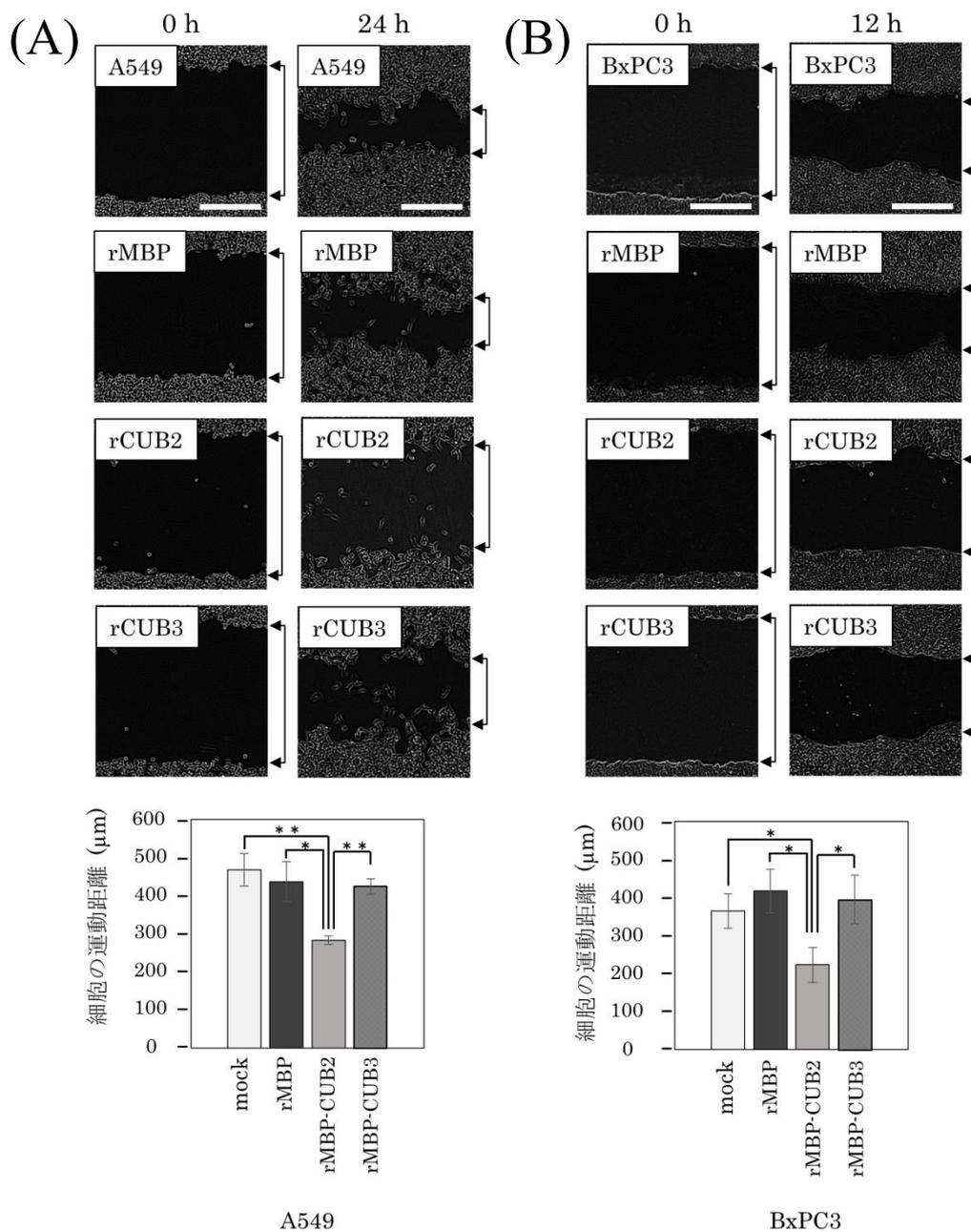


図 21 rMBP-CUB2 による細胞運動能の検討

(A)A549 細胞株の wound healing assay における細胞運動能への影響

各 rMBP タンパク質を終濃度 10 μg/mL で添加したときの、各細胞の傷を付けた時間 (0 h) と 24 時間後(24 h)の細胞の画像を示す。黒矢印は書く時間において計測した傷の幅を示す。各細胞における移動距離を棒グラフに示す。縦軸は移動距離(μm)を、横軸は添加した組換えタンパク質を示す。スケールバー：500 μm

エラーバーは標準偏差を示す。*P<0.05、**P<0.01

(B)BxPC3 細胞株の wound healing assay における細胞間隔を示す画像

A549 細胞株における結果に準ずる。n=3

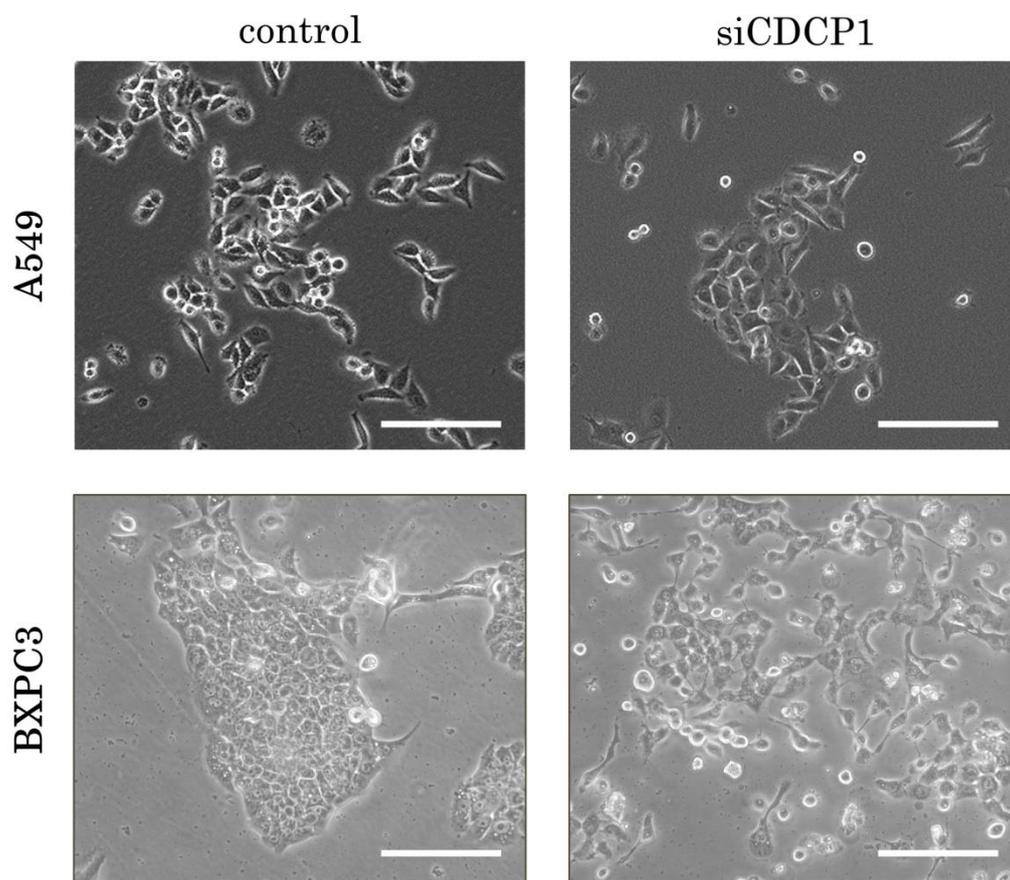


図 22 各細胞株の CDCP1siRNA 処理による細胞間接着への影響
 A549 および BxPC3 細胞株の control と CDCP1 siRNA 処理をした際の細胞の画像を示す。スケールバー：100 μ m

BxPC3

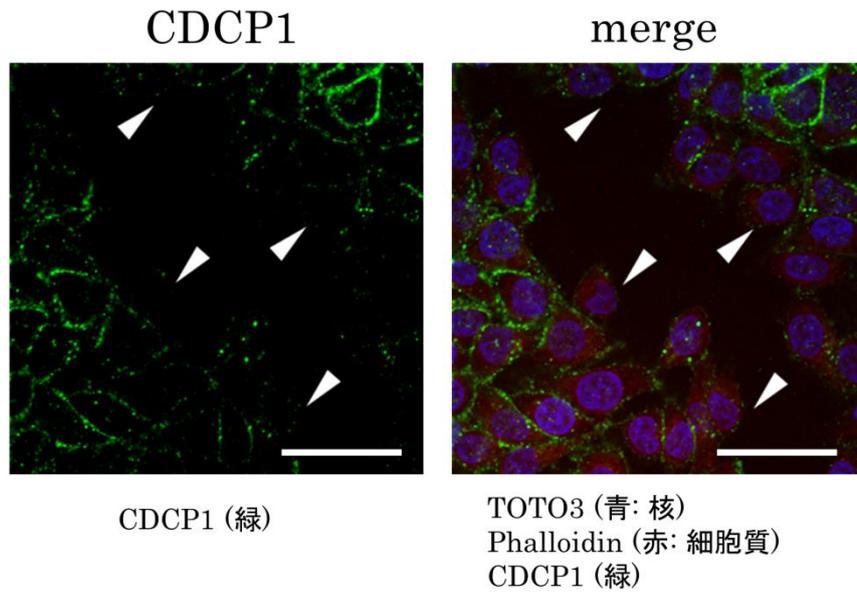


図 23 wound healing assay 時の CDCP1 局在

BxPC3 細胞株の wound healing assay 時に傷を付けたときの免疫染色画像を示す。スケールバー：30 μ m

緑: CDCP1、青: 核、赤: 細胞質、 \blacktriangleleft : CDCP1 細胞-細胞間非接着部位を示す。

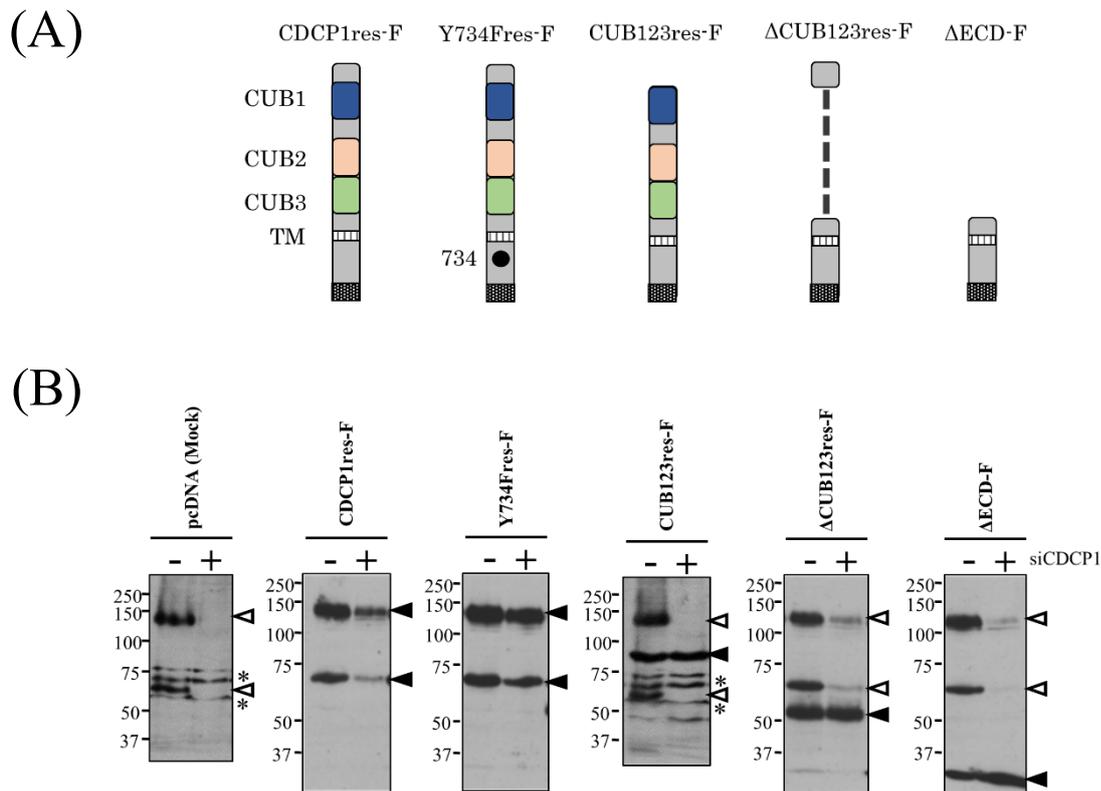


図 24 CDCP1 変異体模式図と発現確認 WB

(A)CDCP1 の各変異体模式図

左から、FLAG 標識付野生型 CDCP1(CDCP1res-F)、細胞内にある 734 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体(Y734Fres-F)、N 末端側から CUB1 ドメインまでを欠失させた変異体(CUB123res-F)、CUB1 から CUB3 ドメインを欠失させた変異体(ΔCUB123res-F)、細胞外ドメインを欠失させた変異体(ΔECD-F)を示す。

TM: 膜貫通ドメイン、F: FLAG 標識、●: 置換したアミノ酸部位、Y: チロシン残基

(B)各変異体の発現確認 WB

各 CDCP1 変異体を発現させたときの細胞ライセートを、CDCP1 ヤギ抗体を用いて WB した。各サンプルの左端に分子量マーカーに基づく数値を示した(kDa)。

◀: CDCP1 変異体、◁: エンドジナス CDCP1、*:非特異的バンド

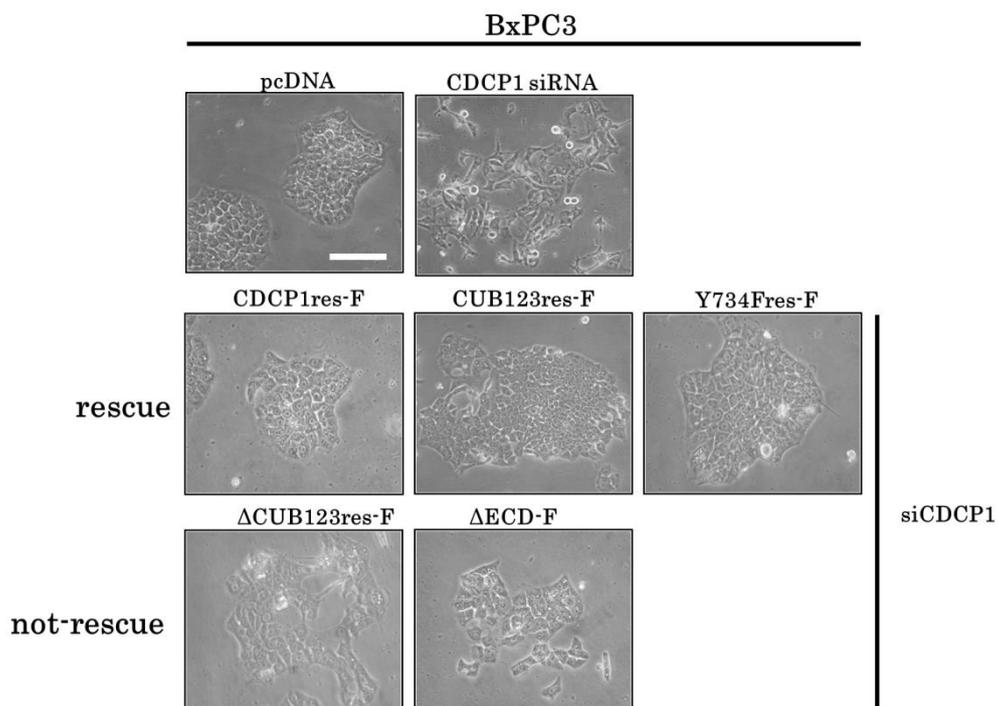


図 25 各 CDCP1 変異体を発現させたときの細胞-細胞間接着への影響
 BxPC3 細胞株に各 CDCP1 変異体を発現させた際の細胞の画像
 rescue: 細胞-細胞間接着がレスキューされた細胞、not-rescue: 細胞-細胞間接着がレスキューされなかった細胞
 スケールバー: 100 μ m

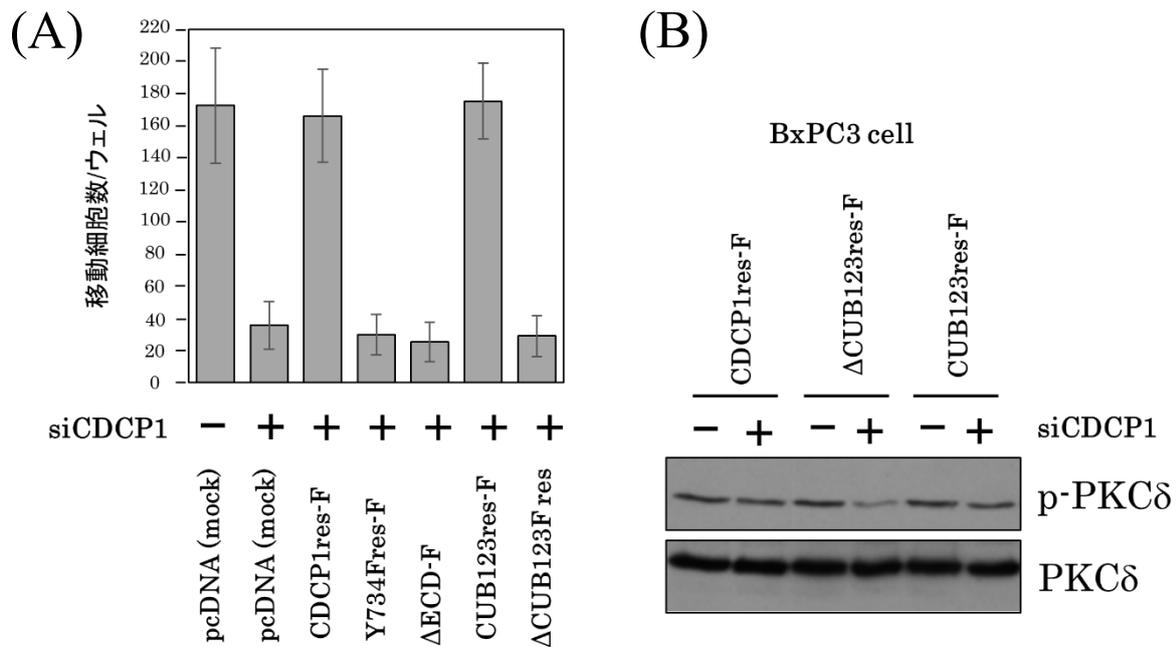


図 26 CDCP1 細胞外 CUB ドメインによる細胞-細胞間接着および細胞運動能の制御

(A) BxPC3 細胞株における各 CDCP1 変異体による細胞運動能への影響

BxPC3 細胞株の trans well migration assay における chamber を通過した細胞数を棒グラフに示す。縦軸は通過した細胞数を、横軸は BxPC3 細胞に発現させた CDCP1 変異体を示す。エラーバーは標準偏差を示す。n=3

(B) BxPC3 細胞株における各 CDCP1 変異体による PKCδ のリン酸化への影響

BxPC3 細胞株の CDCP1 発現を siRNA で抑制し、各変異体 CDCP1 を発現させたときの細胞ライセートを各抗体で WB した。

(A)

	CUB1	CUB2	CUB3
CUB1	100%	—	—
CUB2	14.84%	100%	—
CUB3	15.63%	14.06%	100%

(B)

CUB1	221	CIIESVFEGEGSATLMSANYPEGFP-----EDELMTWQFVVP	AHLRASVSFLNFNLS	272
CUB2	417	CTDHRYCQ-----RKSYSLQVPSDILHLPVELHDFS	WKLLEPKDRLSLVLVPAQKLO	468
		* . : . * . * . * . : * : * . : *		
CUB1	273	NC--ERK-EERVEYYPGSTTNPEVFKLEDKQPGNMAG-----NFNLSLQ----	GCDQD	319
CUB2	469	QHTHEKPCNTSFSYLVASAIPSQDL-YFGSFCPGGSIKQIQVKQNISVTLRTFAPSFQQE		527
		: * : : . * : : : . : : . * . * : : : : . : *		
CUB1	320	AQSPGILRLQFQVLVQHPQNESNKIYVVD	348	
CUB2	528	ASRQGLT-VSFIPYFKEE-----	544	
		* . * : : * . : .		

CUB2	417	-----CTDHRYCQRKSYSLQVPSDILHLPVELHDFS	WKLLEPKDRLSLVLVPAQKLO	468
CUB3	545	GVFTVTPDTRKSKVYLRTPNWDRG-----LPSLTSVSNWISVPRDQVACLTFEKE---		593
		. . : * : . : . . . * . . * : : * : * : : : . .		
CUB2	469	QHTHEKPCNTSFSYLVAS-----AIPSQDLYFG-----SFCPGGSIKQI		507
CUB3	594	--RSGVVCQTGRAFMIIQEQRTRAEEIFSLDEDVLPKPSFHHSFWVNISNCSPTSQKQL		651
		* : * . : : : * * * * * * :		
CUB2	508	QVKQNISVTLRTRTFAPSFQQEASRQGLTVSFIPYFKEE	544	
CUB3	652	DLLFS--VTLT-----	660	
		:: . * * *		

CUB1	221	CIIESVFEGEGSATLMSANYPEGFP	EDELMTWQFVVP	AHLRASVSFLNFNLS	NCKERKEER	280
CUB3	545	GVFTVTPDTRKSKVYLRTPNWDRGLPSLTSVSNWISVPRDQVACLTFEKE	RSVVCQTGRA			604
		:: . : . : . . . * : * : . * : * . : : * : * * . * : : * : :				
CUB1	281	VEYYPGSTTNPEVFKLEDKQ---PGNMAGNFNLSLQGCDDAQSPGILRLQFQVLVQHP				337
CUB3	605	FMIIQEQRTRAEEIFSLDEDVLPKPSFHHSFWVNISNCSPTSQ--KQLDLLFSVTLT--				660
		. * * : * : * : . * . * : . . . * . : * * * * :				
CUB1	338	QNESNKIYVVD	348			
CUB3		-----				

図 27 CDCP1 細胞外 CUB ドメイン間のアミノ酸配列の同一性

各 CUB ドメインのアミノ酸の同一性を Clustal Omega (EMBL EBI)を用いて比較した。

(A)各 CUB ドメインのアミノ酸同一性

各 CUB ドメイン間における相同するアミノ酸の比率を計算した結果を示す。

(B)Clustal Omega による同一性の検索結果

数字は各 CUB ドメインの CDCP1 におけるアミノ酸番号を示す。アスタリスク(*)は相同することを、コロン(:)は PAM250 マトリックスにおける値が 0.5 より高いことを、ピリオド(.)は 0.5 以下であることをそれぞれ示す。PAM250 の値が大きいほど相似するアミノ酸であることを示す。赤枠は、各 CUB ドメインに共通して見られる配列を示す。

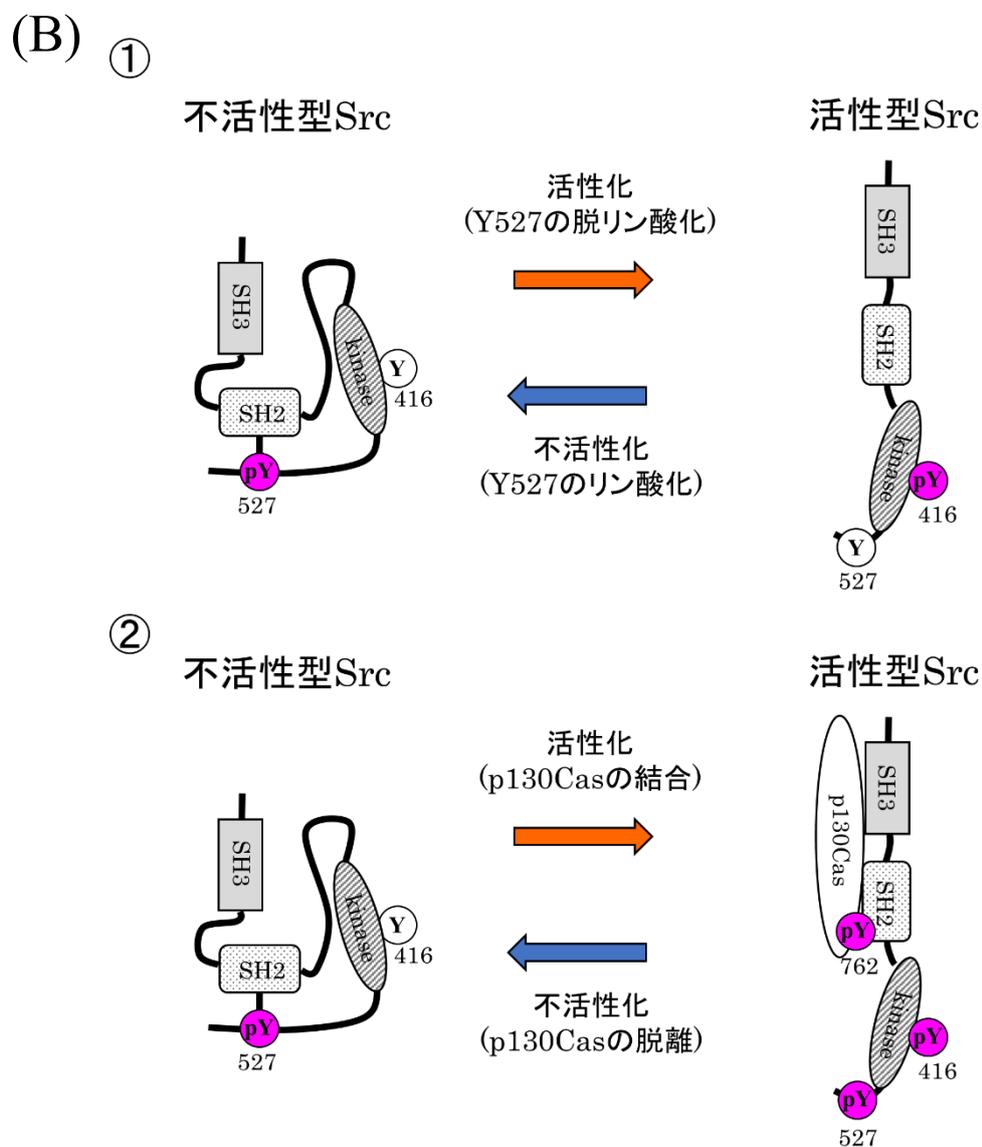
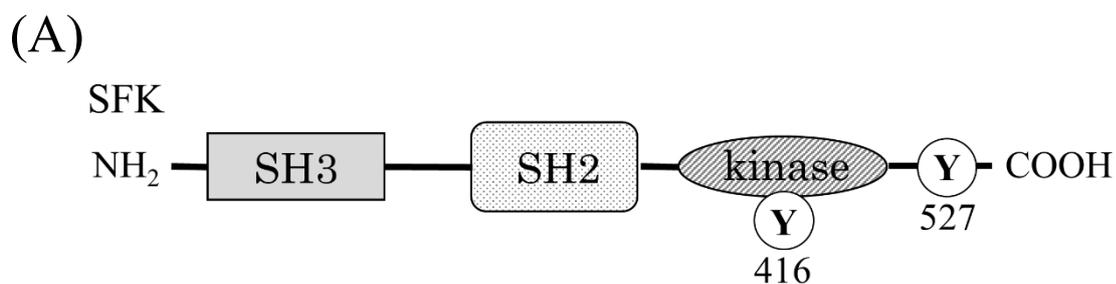


図 28 Src とその活性化機構の模式図

(A)SFK の模式図

SFK は N 末端側に、細胞膜に結合するための脂質修飾部位を持ち、順に、SH3 ドメイン、SH2 ドメイン、キナーゼドメインが存在する。また、リン酸化を受ける二つのチロシン残基(Y416, Y527)が存在する。

(B) SFK 活性化機構の模式図

SFK の活性化機構は Src によるものが研究されている。Src は、C 末端側のチロシンが C-terminus Src kinase (Csk) によるリン酸化を受け、このリン酸化チロシン残基(pY527)を介した、自身の SH2 ドメインとの分子内結合によって不活性型の構造をとる(不活性型 Src)。Src の活性化には、①pY527 のチロシンフォスファターゼによる脱リン酸化による活性化と、②p130Cas の pY762 を介した Src の SH3 ドメインへの結合による、立体構造の変化を介した活性化機構の 2 種類が存在する。SH3: Src homology-3 ドメイン、SH2: Src homology-2 ドメイン、kinase: キナーゼドメイン、Y: チロシン残基、pY: リン酸化チロシン残基、各数字は CDCP1 のアミノ酸番号を示す。

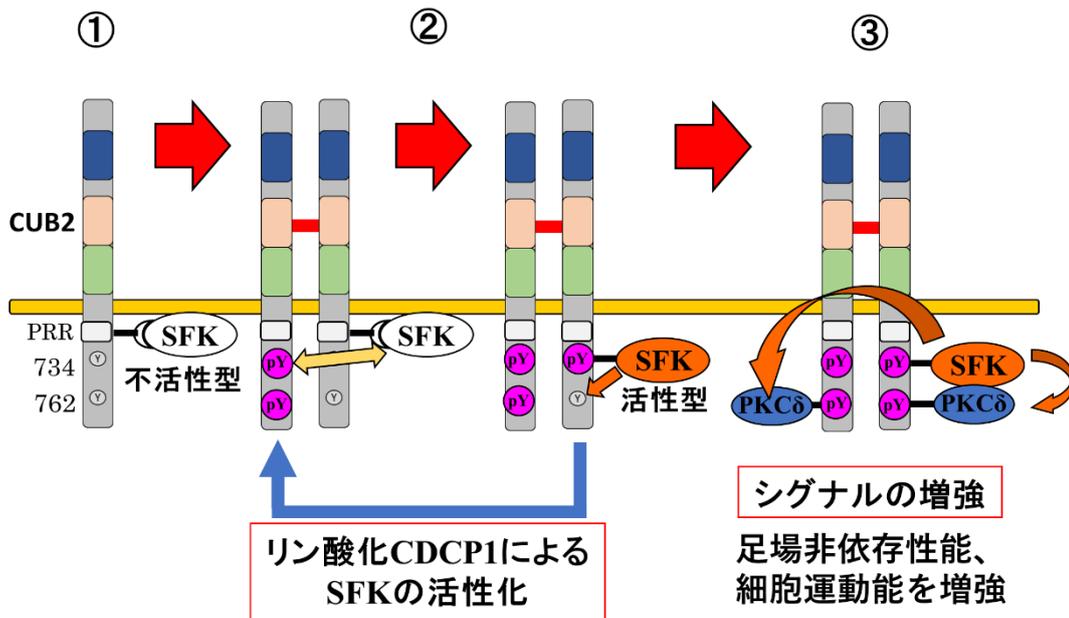


図 29 CDCP1 細胞外ドメインを介したシグナル制御機構の模式図

本研究によって考えられた、CDCP1 シグナルの制御機構の模式図を示す。

①単量体である CDCP1 の細胞内ドメイン内の PRR に不活性型 SFK が結合し、②別のリン酸化された CDCP1 が細胞外ドメイン内の CUB2 ドメインを介して結合することで、CDCP1 のリン酸化 Y734 が不活性型の SFK の SH2 ドメインに結合することで SFK を活性化する。次に、③PKCδが結合している CDCP1 に、CUB2 ドメインを介して②で示した活性型 SFK が結合した CDCP1 が結合することにより PKCδがリン酸化され、SFK-CDCP1-PKCδ シグナルを増強する。

表 1 本研究で使用したプライマー

各 CDCP1 変異体発現プラスミドの構築で使用したプライマー		
1	CDCP1res-HA Fwd	5'-CGGAATTCATGGCCGGCCTGAACTGCGGG-3'
2	CDCP1res-HA Rev	5'-CGCTCGAGAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTATTCTGCT GGCTCCATGGG-3'
3	ΔECD-F Fwd	5'-CCAAGGACTGTGGACTTGAC-3'
4	ΔECD-F Rev	5'-AATCTCAAAAGCTTCTGCCC-3'
5	CUB123res-F Fwd	5'-ACCCCAAGGACTGTGGACTTGACTGTCATCCTCAT CG-3'
6	CUB123res-F Rev	5'-CAGACGTTTTATAGATGAGCGGTTTGCAATGCTGAAG-3'
7	ΔCUB123res-F Fwd	5'-ACCCCAAGGACTGTGGACTTGACTGTCATCCTCATCG-3'
8	ΔCUB123res-F Rev	5'-CAGACGTTTTATAGATGAGCGGTTTGCAATGCTGAAG-3'
MBP 融合 CUB ドメインの大腸菌発現プラスミドの構築で使用したプライマー		
9	rMBP-CUB2 Fwd	5'-CGCATATGTGCACAGACCACCGGTACTGC-3'
10	rMBP-CUB2 Rev	5'-GCGAATTCAACGCCTTCCTCTTTGAAATAAG-3'
11	rMBP-CUB3 Fwd	5'-GCCATATGGAGGAAGGCGTTTTACGGTGAC-3'
12	rMBP-CUB3 Rev	5'-CGGAATTCTGGGGTAAGTGTACCGAGAAGAG-3'
目的遺伝子解析で使用したプライマー		
13	CDCP1res-HA Fwd	5'-ATGGCCGGCCTGAACTGCGGG-3' (ΔCUB123res-F Fwd と兼用)
14	CDCP1res-HA Rev	5'-TTATTCTGCTGGCTCCATGGG-3' (各 CDCP1 変異体における Rev と兼用)
15	ΔECD-F Fwd	5'-CCAAGGACTGTGGACTTGACTG-3'
16	CUB123res-F Fwd	5'-TGCATCATCGAGTCTGTGTTTGAG-3'
17	rMBP-CUB2 Fwd	5'-TGCACAGACCACCGGTACTGC-3'
18	rMBP-CUB2 Rev	5'-AACGCCTTCCTCTTTGAAATAAG-3'
19	rMBP-CUB3 Fwd	5'-TGCACAGACCACCGGTACTGC-3'
20	rMBP-CUB3 Rev	5'-AACGCCTTCCTCTTTGAAATAAG-3'

本研究で使用したプライマーの塩基配列を示す。

Fwd: Forward、Rev: Reverse

表 2-1 試薬の組成

SDS-PAGE 電気泳動用試薬		
試薬	組成	終濃度
4× Lower Gel buffer	Tris	1.5 M
	SDS	0.4% (w/v)
4× Upper Gel buffer	Tris	0.5 M
	SDS	0.4% (w/v)
Laemmli buffer	Tris	25 mM
	Glycine	380 mM
	SDS	0.1% (w/v)
4× Sample buffer	Tris	0.4 M
	Glycerol	40% (v/v)
	BPB	4×10 ⁻² % (w/v)
	SDS	8% (w/v)
WB 用試薬		
Blotting buffer	Tris	25 mM
	Glycine	190 mM
	MeOH	5% (v/v)
大腸菌実験用試薬		
カラムバッファー	Tris	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
細胞実験用試薬		
細胞培養用培地 (10% FBS, P&S(+))	FBS	10% (w/v)
	P&S 溶液	1 % (w/v)
細胞培養用培地 (10% FBS, P&S(-))	FBS	10% (w/v)
トリプシン-EDTA 溶液	trypsin	0.2% (w/w)
	EDTA	0.1 mM

本研究で使用した各試薬における、組成とその終濃度を示す。

表 2-2 試薬の組成

SDS-PAGE 電気泳動用試薬		
試 薬	組 成	終濃度
細胞実験用試薬		
PLC Lysis buffer	Hepes	50 mM
	NaCl	150 mM
	Glycerol	10% (v/v)
	Triton X-100	1% (v/v)
	MgCl ₂	1.5 mM
	EGTA	1 mM
	NaF	100 mM

本研究で使用した各試薬における、組成とその終濃度を示す。

表 3-1 各 WB におけるバンドシグナル強度

図 9-1 における IP 後の各バンド強度の絶対値				
	CDCP1res-F + CDCP1rs-HA		ΔECD-F + CDCP1res-HA	
	CDCP1res-F	CDCP1rs-HA	ΔECD-F	CDCP1res-HA
1	21054.74	44926.43	6682.10	6881.62
2	10273.00	12175.34	57183.40	2812.47
3	7297.31	39449.33	20343.60	2279.45
Ave	12875.02	32183.70	28069.70	3991.18
SD	5910.14	14323.65	21328.62	2055.40

図 9-1 において取得した各 WB のバンドシグナル強度を、NHI ImageJ を用いて数値化したときの値を示す。得られた数値から、平均値(Ave)と標準偏差(SD)を算出した。

表 3-2 各 WB におけるバンドシグナル強度

図 13 における各 bait protein バンド強度の絶対値			
	rMBP	rMBP-CUB2	rMBP-CUB3
1	15357.66	26437.06	27893.48
2	20836.91	26371.52	25586.84
3	25428.37	27306.4	25816.37
Ave	20540.98	26704.99	26432.23
SD	4116.671	426.1002	1037.499
図 13 における各 prey protein との結合バンド強度の絶対値			
prey protein : CDCP1res-F			
	rMBP	rMBP-CUB2	rMBP-CUB3
1	1959.075	20969.74	6941.146
2	1549.095	31789.71	7607.187
3	10820.82	23375.2	5017.711
Ave	4776.328	25378.22	6522.015
SD	4277.373	4638.75	1097.907
prey protein : Δ ECD-F			
	rMBP	rMBP-CUB2	rMBP-CUB3
1	7411.196	7996.075	5613.38
2	3778.267	9798.652	2670.054
3	2714.317	14495.27	4673.731
Ave	4634.593	10763.33	4319.055
SD	2010.827	2739.566	1227.501

図 13 において取得した各 WB のバンドシグナル強度を、NHI ImageJ を用いて数値化したときの値を示す。得られた数値から、平均値(Ave)と標準偏差(SD)を算出した。

表 3-3 各 WB におけるバンドシグナル強度

図 16-1 における IP 後の各バンド強度の絶対値						
	CDCP1res-F + CDCP1rs-HA		Δ ECD-F + CDCP1res-HA		Δ CUB2res-F + CDCP1res-HA	
	CDCP1res-F	CDCP1rs-HA	Δ ECD-F	CDCP1res-HA	Δ CUB2res-F	CDCP1res-HA
1	26649.11	29049.54	51004.14	12909.74	13772.28	9552.167
2	18956.65	37170.47	61677.12	10307.14	27128.54	16916.11
3	2301.42	26445.02	44258.92	1592.21	9624.97	5237.54
Ave	15969.06	30888.34	24087.41	8269.70	16841.93	10568.60
SD	10161.91	4567.62	20211.09	4839.77	7468.19	4821.63

図 16-1 において取得した各 WB のバンドシグナル強度を、NHI ImageJ を用いて数値化したときの値を示す。得られた数値から、平均値(Ave)と標準偏差(SD)を算出した。

10. 実績

10-1. 論文実績

1 ○澤山 忠司、上北 尚正

The extracellular CUB domain of CDCP1 forms cell-cell contacts and regulates collective cell migration in BxPC3 cells

Memoirs of the National Defense Academy (2018, vol. 58, No. 1, 11-20)

2 ○上北 尚正、澤山 忠司

Dynamics of matrix metalloproteinase (MT1-MMP, MMP-2) mRNA expression during mid- and late-phase gestation in mice

Memoirs of the National Defense Academy (2018, vol. 58, No. 1, 1-10)

3 ○澤山 忠司、上北 尚正

Homophilic complex formation of CDCP1 via its extracellular CUB2 domain facilitates Src activation and promotes cancer cell migration. Oncology Reports, 印刷中

4 ○澤山 忠司、上北 尚正

膜型セリンプロテアーゼ MT-SP1 による CDCP1 切断を介したがん細胞の足場非依存性能制御の解析 防衛大学校理工学研究報告, 印刷中

10-2. 発表実績(国際学会)

1 ○澤山 忠司、上北 尚正

Homophilic complex formation of CDCP1 by CUB2 domain regulates lung cancer invasion.

2017 NCRI Conference (2017.11.7)

2 ○澤山 忠司、上北 尚正

The analysis of the extracellular domain of CDCP1 in lung cancer metastasis.

The 6th JCA-AACR special joint conference (2018.7.11)

10-3. 発表実績(国内学会)

1 ○澤山 忠司、上北 尚正

CDCP1 細胞外ドメインによる同種 2 量体形成は Src を活性化し癌の足場非依存性を制御する

第 25 回日本がん転移学会学術集会/総会 (2016.7.21)

2 ○澤山 忠司、上北 尚正

CDCP1 細胞外ドメインにおける同種多量体の形成は細胞内での Src シグナルを活性化し癌の足場非依存性を制御する

第 75 回日本がん学会学術総会 (2016.10.8)

3 ○澤山 忠司、上北 尚正

CDCP1 細胞外ドメインによる同種多量体形成は Src を活性化し肺がん転移を亢進する

第 39 回分子生物学会年会 (2016.12.2)

- 4 ○澤山 忠司、上北 尚正
CDCP1 細胞外ドメイン切断による同種複合体形成を介した足場非依存性シグナル制御機構の解明
第 26 回日本がん転移学会学術集会/総会 (2017.7.28)
- 5 上北 尚正、○澤山 忠司 小細胞肺癌における FAK を介した足場非依存性増殖の解析
第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会, (2017.7.28)
- 6 ○澤山 忠司、上北 尚正
CDCP1 細胞外ドメイン依存的な同種多量体形成を介した足場非依存性能の制御機構の解明
第 76 回日本がん学会学術総会 (2017.9.28)
- 7 ○澤山 忠司、上北 尚正
CDCP1 細胞外 CUB2 ドメインの癌転移に対する新規治療標的としての可能性
第 40 回分子生物学会年会 (2017.12.6)
- 8 ○澤山 忠司、上北 尚正
足場非依存性制御因子 CDCP1 の細胞外ドメインによる癌転移制御機構の解析
第 27 回日本がん転移学会学術集会/総会 (2018.7.19)
- 9 ○澤山 忠司、上北 尚正
膜型セリンプロテアーゼ MTSP1 による CDCP1 細胞外ドメイン切断を介した癌細胞運動能の調節
第 77 回日本がん学会学術総会 (2018.9.28)
- 10 ○澤山 忠司、上北 尚正
癌浸潤に関与する細胞運動能における CDCP1 細胞外 CUB2 ドメインの機能解析
第 41 回分子生物学会年会 (2018.11.30)