

血小板凝集因子 Podoplaninの分子生物学的解析

Molecular analysis of podoplanin, a platelet aggregation-inducing factor

(独) 産業技術総合研究所・糖鎖医学研究センター
NEDO

加藤 幸成 Yukinari Kato

研究背景

癌細胞の血行性転移において、癌細胞による血小板凝集が認められることが報告されている。癌細胞による血小板凝集は、癌細胞の血管内皮細胞への接着や局所的な増殖を引き起こす。さらに、癌細胞と血小板の凝集塊が、毛細血管に詰まることも血行性転移の促進に寄与している。近年我々は、癌細胞上の血小板凝集因子/転移促進因子であるPodoplaninの遺伝子クローニングに成功した¹⁾。ヒトPodoplaninは、脳腫瘍、種々の扁平上皮癌、精巣腫瘍、悪性中皮腫などに高発現している。また、Podoplaninは特異的なリンパ管マーカーとしても知られている。

PodoplaninはC末端に膜貫通部位を有したI型

膜貫通型タンパク質である(図1)。ヒトPodoplaninはマウスPodoplaninとホモロジーが低いにも関わらず、マウスの血小板凝集を引き起こす¹⁾。マウスPodoplaninの中和抗体(8F11)のエピトープ解析、および詳細な変異実験により、EDxxVTPGという配列の3回繰り返し(PLAG domain)のスレオニン(Thr)がPodoplaninによる血小板凝集の活性中心であり、種を超えて保存されていることが明らかとなった。さらに、糖鎖合成不全の変異CHO細胞株(Lec1, Lec2, Lec8)を用いることにより、PLAG domainのThrに付加されているO-結合型糖鎖のシアル酸が血小板凝集の活性中心であることがわかった²⁾。また最近我々は、Podoplaninの血小板上受容体として、C型レクチン様受容体のCLEC-2

を同定した³⁾。ヒトPodoplaninのPLAG domainに高い反応性を示すモノクローナル抗体(NZ-1)を樹立したところ、NZ-1抗体は、PodoplaninとCLEC-2の結合を阻害し、さらにPodoplaninによる血小板凝集や転移を阻害した。

本研究では、このPLAG domainに付加し、血小板凝集活性に重要な役割を果たす糖鎖構造の解析を目的とした⁴⁾。

研究概要

NZ-1抗体を用いて、ヒトPodoplaninを高発現しているヒト膠芽腫細胞LN319からヒトPodoplaninを精製した。質量分析計を用いて、Podoplaninの糖鎖構造を解析した結果、Podoplaninはm/z 1257の糖鎖を持つことがわかった。さらに、m/z 1257のMS/MS解

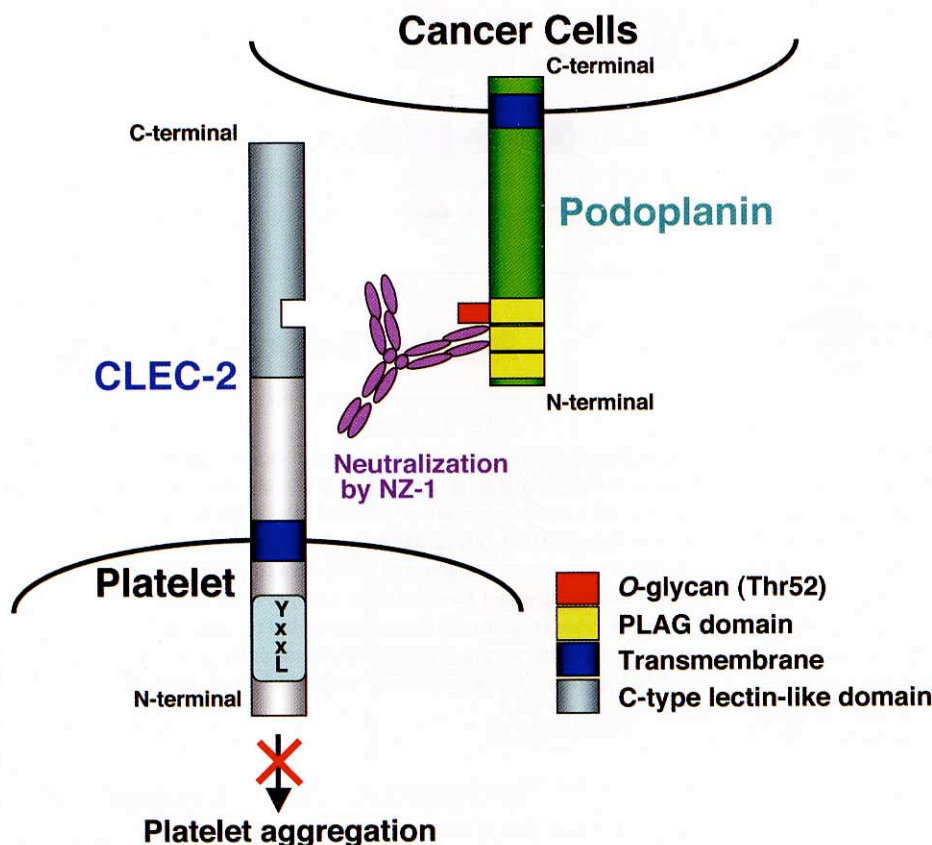


図1 PodoplaninとCLEC-2の結合をNZ-1抗体が阻害する

析により、Podoplaninは disialyl-core1 構造を持つことがわかった(図2)。レクチンアレイを用いた解析によっても、同様の結果が示唆された。また、ヒトPodoplaninを Asp-N で処理し、PLAG domainを含む糖ペプチド(Ala23-Glu57)を分離したところ、disialyl-core1 構造が一カ所のみ付加されていることがわかった。ヒトPodoplaninのPLAG domainには、O-結合型糖鎖付加部位が4カ所ある。そこで、Edman分解法によりペプチドシーケンスを行った結果、Thr52のみに糖鎖が付加されていることが示唆された。さらに、PLAG domainのThr52のみにO-結合型糖鎖を付加した様々な糖ペプチドを *in vitro*

で合成し、レセプターであるCLEC-2との反応性を調べたところ、disialyl-core1 構造を付加した糖ペプチドのみがCLEC-2と高い反応性を示した。以上の詳細な解析により、ヒトPodoplaninによる血小板凝集の活性中心は、PLAG domainのThr52に付加されたdisialyl-core1 構造であることが明らかとなった。Podoplaninは腫瘍マーカー、リンパ管マーカーとして有用なだけでなく、癌治療のターゲットとしても期待される。

なお、本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)からの委託を受けて実施したものである。

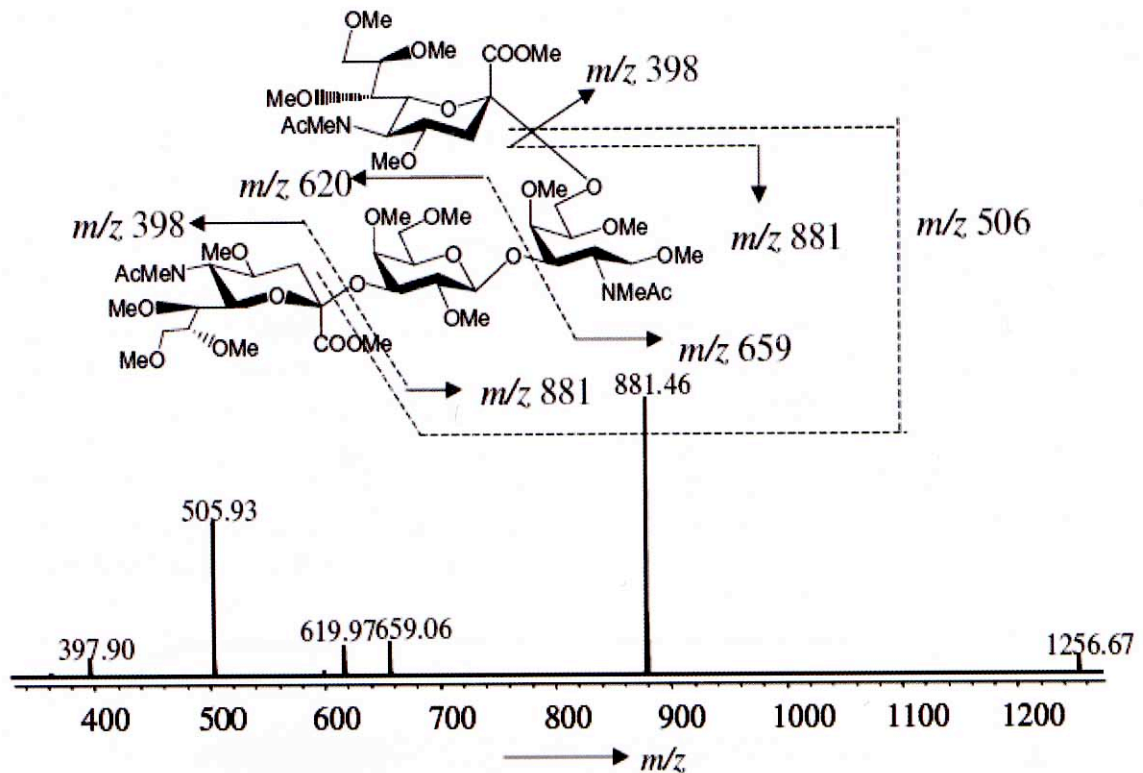


図2 PodoplaninのThr52にはdisialyl-core1の糖鎖が付加されている

Podoplanin (Aggrus) is a mucin-type sialoglycoprotein that plays a key role in tumor cell-induced platelet aggregation and metastasis. Podoplanin possesses a platelet aggregation-stimulating (PLAG) domain, and Thr52 in the PLAG domain of human podoplanin is important for its activity. We recently identified C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) as an endogenous receptor of podoplanin on platelets. In this study, endogenous or recombinant human podoplanin were purified using a novel anti-podoplanin antibody (NZ-1), and total glycosylation profiles were surveyed by lectin microarray. Analyses of glycopeptides produced by Edman deg-

radation and mass spectrometry revealed that the disialyl-core1 (NeuAca2-3Galβ1-3(NeuAca2-6)GalNAca1-(O-Thr)) structure was primarily attached to a glycosylation site at residue Thr52. We next synthesized various glycopeptides of podoplanin that includes both PLAG domain and O-glycan on Thr52. Interestingly, a disialyl-core1-attached glycopeptide was specifically recognized by CLEC-2. These results indicated that the disialyl-core1 at Thr52 is critical for podoplanin-induced platelet aggregation. Podoplanin and CLEC-2 might represent a promising therapeutic target in cancer metastasis.

1) Kato Y., Fujita N. et al., J. Biol. Chem. 278, 51599-51605, 2003.
2) Kaneko M., Kato Y. et al., J. Biol. Chem. 279, 38838-38843, 2004.

3) Suzuki-Inoue K., Kato Y. et al., J. Biol. Chem. 282, 25993-26001, 2007.
4) Kaneko MK., Kato Y. et al., FEBS Lett. 581, 331-336, 2007.