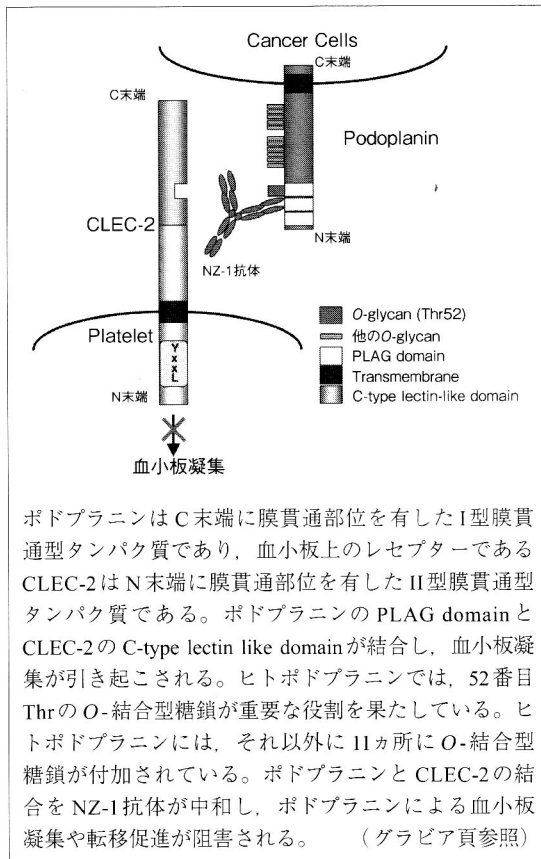


図2 NZ-1抗体によるポドプランिनとCLEC-2の結合阻害



Ⅲ. ポドプランिनの糖鎖構造解析

内在性の糖タンパク質を精製するには、感度・特異度の高い抗体が必須である。われわれはまずヒトポドプランिनに特異度の高いモノクローナル抗体 (NZ-1) を作製した⁶⁾。NZ-1抗体は、ウエスタンブロットやフローサイトメトリー、免疫組織染色に有用だけでなく、免疫沈降にも感度・特異度ともに高いことがわかった。さらに、質量分析計 (MS) を使った詳細な糖鎖構造解析 (特にO-結合型糖鎖) には、数十 μ gの精製タンパクが必要となる。よって、ヒトポドプランिनを高発現している癌細胞株のスクリーニングも同時に行った。その結果、NZ-1抗体を用いて、ヒトポドプランिनを高発現しているヒト膠芽腫細胞LN319からヒトポドプランिनを大量に精製した⁷⁾。

MSを用いて、ポドプランिनの糖鎖構造を解析した結果、ポドプランिनは m/z 1257の糖鎖をもつことがわかった (図4A)⁷⁾。さらに、 m/z 1257のMS/MS解析により、ポドプランिनは disialyl-core1構造をもつことがわかった (図4B)。また、ポドプランिन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、この部位には disialyl-core1構造が1カ所のみ付加されていることがわかった。

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⁷⁾。すなわち、ポドプランिनは sialo-mucin bindersであるMAHやWGAに反応したが、core1 binderであるPNAやBPLには反応しなかった。また、ポドプランिनをシアリダーゼ処理することにより、core1 binderのシグナルがみられ、sialo-mucin bindersのシグナルが消失した。core1 ± sialic acid bindersのABA, ACA, MPA, Jaccalinには、ポドプランिनのシアリダーゼ処理の有無にかかわらず反応した。

ヒトポドプランिनのPLAG domainには、O-結合型糖鎖付加予想部位が4カ所ある。そこで、Edman分解法によりペプチドシークエンスを行った結果、Thr52のみに糖鎖が付加されていることが示唆された (図4C)。さらに、他のヒトポドプランिनの糖鎖付加部位もすべて同様の方法で決定した (図2)。以上の詳細な解析により、ヒトポドプランिन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。

Ⅳ. ポドプランिनの血小板上レセプターの同定

最近われわれは、井上らとともに、ポドプランिनの血小板上受容体として、C型レクチン様受容体のCLEC-2 (C-type lectin-like receptor-2) を同定した⁸⁾。レセプター発見のきっかけとなったのは、刺激からのラグタイムが長いという特徴的なポドプランिन誘導性の血小板凝集パターンである (図3A, B)。この凝集パターンを示す血小板上のレセプターとして、コラーゲンレセプターであるGPVIや、蛇毒ロドサイチンのレセプターとして発見さ