



Aggrus の糖鎖修飾と血小板凝集活性

はじめに

第3の生命鎖と言われる糖鎖は、発生、分化、がん、炎症などの様々な生命現象において重要な役割を果たしていることがわかってきた。我々は、がん細胞表面に発現している分子 Aggrus (アグラス) が血小板凝集を誘導し、その活性には Aggrus の特定部位に付加された糖鎖構造が必要なことを見いだした。この結果は、タンパク質翻訳後修飾の大きな分野を占める糖鎖修飾が、タンパク質の機能に直接的に関与していることを示す新たな例である。さらに、糖鎖構造の制御による活性制御の可能性もあり、詳細な糖鎖構造の解析や、その相手分子となる受容体の検索が望まれている。また、血小板生化学の視点からも、Aggrus を起点とした新しい情報伝達経路が開拓される可能性がある。Aggrus は近年リンパ管マーカーとして脚光を浴びている podoplanin と同じ分子であることが明らかとなった。このことは、Aggrus がリンパ管において、その発生・分化に関与していることを示唆している。発生・分化における Aggrus の機能や血小板凝集活性の場合と同様な糖鎖による機能制御の有無は、興味深い問題である。本稿では、まず Aggrus の歴史や関連の研究を紹介し、次に我々の研究成果を、現在進行中の研究内容を交えて紹介したい。

1. Aggrus の歴史

がんが血管に侵入して血行性の転移をとる場合、血管内皮細胞表面に接着し、血管外へ浸潤する。この血管内皮への接着の際に、多くの場合、血小板凝集が認められることが知られている。鶴尾らは、マウス結腸がん細胞株 colon adenocarcinoma 26 を繰り返し実験的に肺転移させることで、高転移性株 NL-17 細胞と低転移性株 NL-14 細胞を

取得した¹⁾。さらに NL-17 細胞に高反応性を示し、NL-14 細胞には低反応性を示すモノクローナル抗体 8F11 抗体を作成した²⁾。in vitro の実験で、NL-17 細胞はマウスの血小板凝集を引き起こすが、8F11 抗体によりその活性は阻害された。また、in vivo の実験で、NL-17 細胞の実験的肺転移が 8F11 抗体の投与によって阻害された³⁾。これらのことから、NL-17 細胞は 8F11 抗体に認識される血小板凝集因子 gp44 (後に Aggrus と命名) によりマウス血小板を凝集し、その結果、肺転移を起こすことが示唆された。その後、豊島らは 8F11 抗体カラムと WGA カラムを使って NL-17 細胞から Aggrus タンパク質を精製した⁴⁾。精製 Aggrus は血漿成分非存在下で濃度依存的にマウスの血小板凝集を引き起こし、さらにこの凝集反応は 8F11 抗体によって完全に阻害された。これら一連の研究の後、Aggrus 遺伝子の探索が続けられたが、タンパク質を精製してアミノ酸配列を決め、遺伝子を取得する正攻法では結果が得られなかった。

一方、次項で述べるように、ゲノムプロジェクトによる豊富な遺伝子情報をもとに、他の幾つかのグループが同じ分子に異なる名前をつけて独立に研究を行っていた。それらの分子と Aggrus の多くの共通点に気づいた我々は、その遺伝子を発現させ、8F11 抗体が認識している 44 kDa の糖タンパク質 Aggrus の遺伝子本体を同定した⁵⁾。Aggrus 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、ヒトでは 162 アミノ酸、マウスでは 172 アミノ酸からなる糖タンパク質である。O-結合型糖鎖付加部位となりうる Ser/Thr が、ヒトで 38 カ所、マウスで 34 カ所存在する。また、マウスでは N-結合型糖鎖付加部位 (Asp-X-Ser/Thr コンセンサス配列、X は Pro 以外) が 1 カ所あり、実際に N-結合型糖鎖が付加されていることが確認されている。さらに PKA や PKC によるリン酸化部位を C 末端に有しているが、実際にリン酸化を受けるという情報は無い。

2. 多くの別名がある Aggrus

他のグループにより、Aggrus と分子量、組織分布、糖鎖の付加様式の類似した分子として、T1 α 、podoplanin などの名称で、マウス、ラット、ヒト、イヌなどから遺伝子が取得された。マウスから遺伝子が単離された OTS-8/gp38/E11 antigen/RANDAM-2、ラットから単離された T1 α /podoplanin/RTI40/PA2.26、イヌから単離された gp40、ヒトから単離された gp36 などである。さらに我々はハムスター、ウシからも遺伝子を単離した。

特に T1 α と podoplanin と名付けられた分子に関する研究がさかに行われている。Williams らは T1 α という名称を用い、この分子が肺の I 型肺胞上皮細胞上に発現しており、II 型の肺胞上皮細胞には発現していないことを示した⁶⁾。また、T1 α は肺胞上皮幹細胞から I 型肺胞上皮細胞への分化とともに発現されてくることも示された。さらに Breiteneder らは podoplanin という名称で、43 kDa の糖タンパク質が腎の糸球体上皮細胞 (podocyte) に発現しており、腎の微小変化群のラットモデルで発現が低下することを報告した⁷⁾。Ramirez らにより T1 α のノックアウト (KO) マウスが作製されたが、このマウスは呼吸不全により生後すぐに死亡した⁸⁾。さらに、Schacht らは、T1 α の KO マウスではリンパ管の形成不全や先天的なリンパ水腫が見られることを報告した⁹⁾。

T1 α は I 型肺胞上皮細胞に選択的に発現していることから、II 型肺胞上皮細胞と区別することができる選択的マーカーとして、多くの研究グループに利用されている。一方、podoplanin はリンパ管内皮細胞に発現し、血管内皮細胞に発現していないことから、リンパ管を血管と区別する特異的マーカーとして繁用され始めている。様々な臓器のがん、炎症性疾患、糸球体腎炎、移植腎においてリンパ管の増生が報告されており、podoplanin をリンパ管マーカーとして用いることで詳細な研究が可能となった。

一方、我々は肺がん、精巣腫瘍などの一部のがんで Aggrus の遺伝子発現が上昇していることを報告した^{5,10,11)}。Aggrus がそれぞれのがんにおいてどのような機能を担っているのか、実際に転移能などに寄与しているのか、大変興味深い。

3. Aggrus の血小板凝集活性中心の解析

我々は、T1 α /podoplanin が Aggrus と同一の分子であることを証明し、さらに、Aggrus の血小板凝集活性の活性中心の探索を行った⁵⁾。幸いなことに、この分子の生理活性の一つである「血小板凝集活性」は「測定できる」生理活性として実験系が確立していた。我々は、8F11 抗体が Aggrus の活性を阻害することから、8F11 抗体の抗原認識部位が活性中心もしくはその近傍を認識していると予測した。そして、マウス Aggrus の 39-44 番目のアミノ酸配列 (39-DGMVPP-44) を 8F11 抗体による認識部位と特定した (図 1 A)。このエピトープに変異を入れると血小板凝集活性が阻害されることを予測したが、41 番目のメチオニンをアラニンに変換した M41A によってマウスの血小板凝集が引き起こされるという、予想と反する結果が得られ

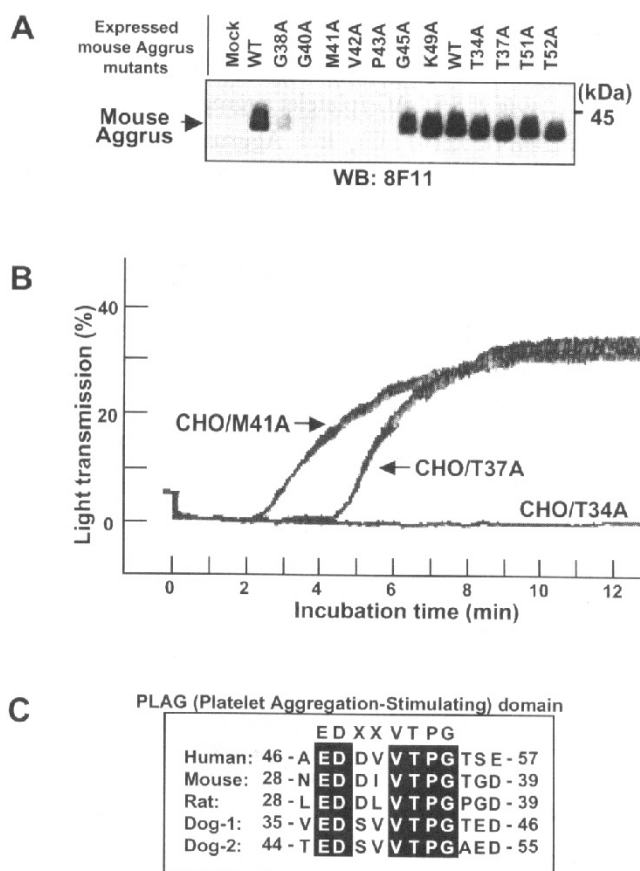


図 1 Aggrus の血小板凝集活性部位の同定

A. 点突然変異遺伝子を用いて、8F11 抗体の抗原認識部位の特定を行った。B. 8F11 抗体認識部位に点変異を入れた M41A 株でも血小板凝集活性が認められたが、近傍のスレオニンに変異を入れた T34A では血小板凝集活性が失活した。C. 抗体認識部位近辺に動物種を越えて、アミノ酸配列がよく保存された領域 PLAG domain を見いだした。

た (図 1 B)。また、8F11 抗体によって認識される領域を含む合成ペプチド 39-DGMVPPGIE-47 では血小板凝集は引き起こされなかった。従って、8F11 抗体によって認識されるペプチド配列には、血小板に直接結合する部位が含まれていないことがわかった。我々は、抗体認識部位近傍の糖鎖が活性中心であり、8F11 抗体が Aggrus に結合することによって糖鎖の受容体との相互作用が阻害され、血小板凝集能が中和されるのではないかと仮定した。そこで 8F11 抗体認識部位の近傍、34, 37 番目のスレオニンをアラニンに変換し、それぞれ CHO 細胞に発現させ、マウス血小板に対する反応性を調べた。その結果、34 番目のスレオニンをアラニンに変換した株 T34A のみが血小板凝集を引き起こさないことがわかった (図 1 B)。マウス Aggrus

の34番目のスレオニン近傍のEDXXVTPGという配列が他の動物種のAggrusにおいてもよく保存されていることから、この配列をPLAG (platelet aggregation stimulating) domainと名付けた(図1C)。ヒトAggrusのPLAG domainに位置する52番目のスレオニンをアラニンに変換した株T52Aも同様に、血小板凝集を起こさなかった。

4. Aggrusの糖鎖と血小板凝集活性

糖鎖の血小板凝集活性への関与を証明するため、CHO細胞の糖鎖不全変異株、Lec細胞株シリーズを利用した¹⁰⁾。Lec1細胞はN-結合型糖鎖合成の初期段階に関与するGnT-Iが失活しているため、N-結合型糖鎖は不完全な形でしか合成されない。Lec2細胞はシアル酸の供与体であるCMP-Siaをゴルジ体に取り込むCMP-Sia transporterが失活しており、結果としてシアル酸の付加されない糖鎖構造を持つ。また、Lec8細胞は、ガラクトース供与

体UDP-Galを取り込むUDP-Gal transporterが失活しており、ガラクトースが付加される位置で生合成がストップして、不完全な糖鎖構造となる。これらのLec細胞株に、ヒトおよびマウスAggrusを強制発現させ、血小板凝集活性を確認したところ、Lec1細胞に発現させたAggrusでは、親株のCHO細胞に発現させた場合と同様に血小板凝集活性を有した。一方、Lec2, Lec8細胞に発現させた場合、いずれも血小板凝集活性を失っていた(図2A)。この結果から、活性に関与しているのはO-結合型糖鎖で、シアル酸が欠けただけでも失活してしまうことがわかった。また、CHO, Lec1, Lec2, Lec8に発現させたAggrusに対するレクチンプロット法により、Aggrus本体に付加された糖鎖構造の情報を得た(図2B)。その結果、シアル酸の付加されたCore1構造(Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr)の存在が示唆された¹⁰⁾。

我々のこれまでの研究では、①活性に関与する糖鎖付加

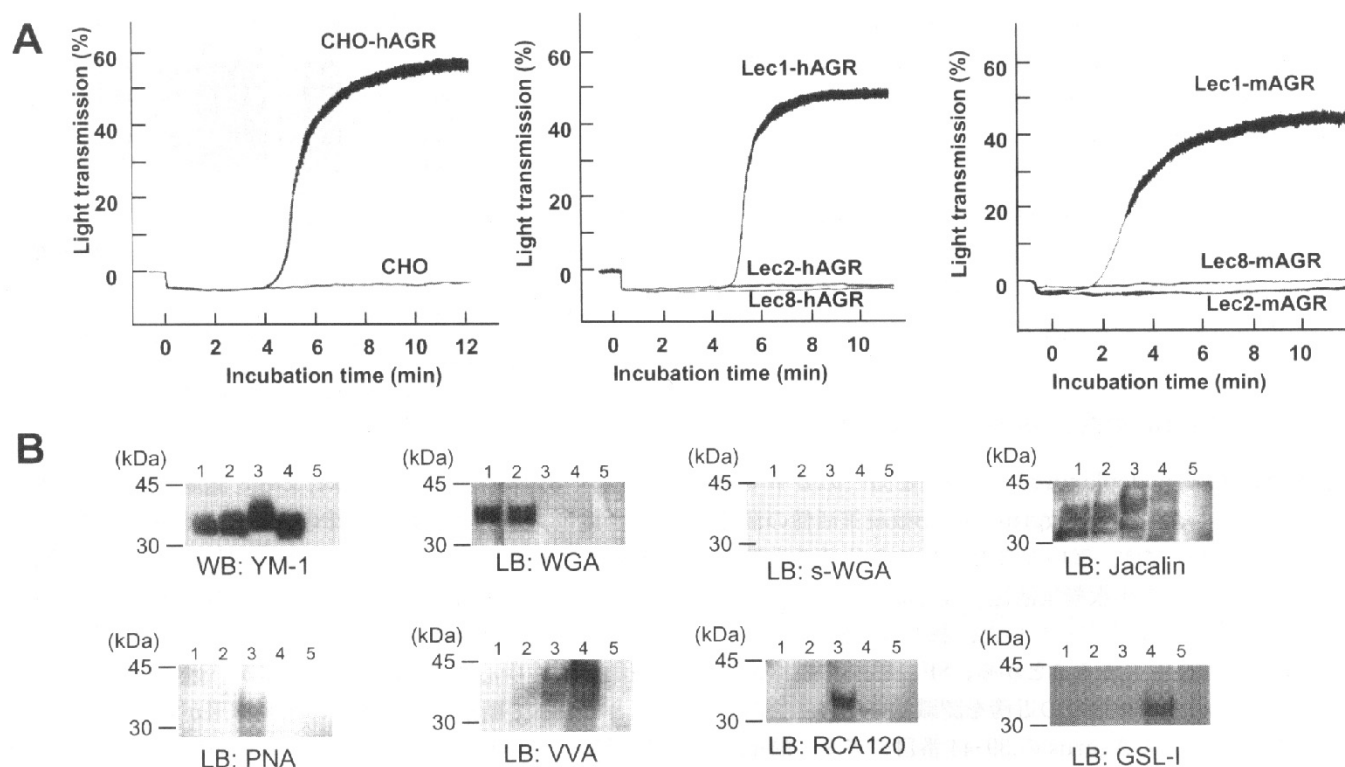


図2 Aggrusの血小板凝集活性に関与している糖鎖構造解析

A. ヒトおよびマウスAggrusを発現させた各細胞株の血小板凝集活性。Lec1にAggrusを発現させた場合、CHO発現株と同様に活性を示したが、Lec2, Lec8発現株は活性を示さなかった。B. 各細胞株発現Aggrusのレクチンプロット解析の結果 (lane 1: CHO-hAGR, lane 2: Lec1-hAGR, lane 3: Lec2-hAGR, lane 4: Lec8-hAGR, lane 5: CHO-mock, WB: Western blot, LB: Lectin blot, YM-1は本研究において作製した抗ヒトAggrus抗体)。これらの結果により、Aggrusはシアル酸を持ったCore1構造を保持していることが示唆された。

部位 (マウス T34, ヒト T52) を同定した, ②シアル酸のついた O-結合型糖鎖が活性に関与していることを証明した, という独立した結果を得た。しかし, 活性部位に本当にシアリル T 構造が付いているかどうか, 直接証明はしていない。例えば, 他の大多数の糖鎖付加部位はシアリル T 構造だが, 活性に関与している部位にはシアル酸とガラクトースの付いた, 別の糖鎖構造である可能性も否定された訳ではない。活性部位に実際どういった糖鎖構造が付加されているか, 大変興味深い。

お わ り に

Aggrus 本体の研究とは別に, Aggrus の相手分子が何か, という問いがある。これまでの我々の解析では, Aggrus は各種セレクトインやシグレックには結合しなかった。また, フィブロネクチン, ラミニン, ビトロネクチン, コラーゲン I, IV などの細胞外マトリックスに結合しないことが示唆されている¹²⁾。一方, 膜表面にあっては ERM complex と共に存在することが示されている¹³⁾。Aggrus が血小板凝集活性の際に, またリンパ管などの分化・発生の過程で, さらにがん細胞において, どのような相手分子と, どのように相互作用し, どういった機能を担っているのか, についてさらなる研究が望まれる。

本研究の機会を与えて下さった山形大学・環境病態統御学講座・法医病態診断学分野の大澤資樹教授に感謝いたします。また, 本研究は東京大学・鶴尾 隆教授, 藤田直也助教授, 加藤幸成博士, 国田朱子さんとの共同研究として遂行されました。

- 1) Tsuruo, T., Yamori, T., Naganuma, K., Tsukagoshi, S., & Sakurai, Y. (1983) *Cancer Res.* **43**, 5437-5442
- 2) Watanabe, M., Okochi, E., Sugimoto, Y., & Tsuruo, T. (1988) *Cancer Res.* **48**, 6411-6416
- 3) Sugimoto, Y., Watanabe, M., Oh-hara, T., Sato, S., Isoe, T., & Tsuruo, T. (1991) *Cancer Res.* **51**, 921-925
- 4) Toyoshima, M., Nakajima, M., Yamori, T., & Tsuruo, T. (1995) *Cancer Res.* **55**, 767-773
- 5) Kato, Y., Fujita, N., Kunita, A., Sato, S., Kaneko, M., Osawa, M., & Tsuruo, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 51599-51605
- 6) Williams, M.C., Cao, Y., Hinds, A., Rishi, A.K., & Wetterwald, A. (1996) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **14**, 577-585
- 7) Breiteneder-Geleff, S., Matsui, K., Soleiman, A., Meraner, P., Poczewski, H., Kalt, R., Schaffner, G., & Kerjaschki, D. (1997) *Am. J. Pathol.* **151**, 1141-1152
- 8) Ramirez, M.I., Millien, G., Hinds, A., Cao, Y., Seldin, D.

C., & Williams, M.C. (2003) *Dev. Biol.* **256**, 61-72

- 9) Schacht, V., Ramirez, M.I., Hong, Y.K., Hirakawa, S., Feng, D., Harvey, N., Williams, M., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F., Oliver, G., & Detmar, M. (2003) *EMBO J.* **22**, 3546-3556
- 10) Kaneko, M., Kato, Y., Kunita, A., Fujita, N., Tsuruo, T., & Osawa, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 38838-38843
- 11) Kato, Y., Sasagawa, I., Kaneko, M., Osawa, M., Fujita, N., & Tsuruo, T. (2004) *Oncogene* **23**, 8552-8556
- 12) Kotani, M., Tajima, Y., Osanai, T., Irie, A., Iwatsuki, K., Kanai-Azuma, M., Imada, M., Kato, H., Shitara, H., Kubo, H., & Sakuraba, H. (2003) *J. Neurosci. Res.* **73**, 603-613
- 13) Scholl, F.G., Gamallo, C., Vilaro, S., & Quintanilla, M. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 4601-4613

金子 美華

(東京都神経科学総合研究所分子発生生物学研究部門)

Functional glycosylation and platelet-aggregation stimulating activity of Aggrus

Mika Kaneko (Department of Developmental Neuroscience, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, 2-6 Musashidai, Fuchu, Tokyo 183-8526, Japan)

葉緑体の膜プロテアーゼによるタンパク質の品質管理

1. は じ め に

葉緑体は, 植物が光化学エネルギー反応と炭酸同化により自立栄養生長するために必須の細胞内小器官 (オルガネラ) で, 光合成細菌の細胞内共生に由来する。葉緑体は光による影響を強く受けるので, 植物が様々な光環境下で生育するために独自の適応機構を発揮する。

葉緑体機能に関する研究は大きく分けて二つの流れを考えることができる。一つは光合成反応を担う物質の物理化学・生物化学的解析すなわち光合成の直接的な研究, そしてもう一つは葉緑体分化に関わる分子遺伝学と細胞生物学的研究の流れである。これら両方向の研究から, 光合成機能と葉緑体分化のメカニズムは密接に関係しており, 両者に共通する過程として膜プロテアーゼによるタンパク質品質管理 (クオリティコントロール, QC) が葉緑体のキープロセスであることが最近明らかになってきた。本稿では, 我々が解析を進める葉緑体型 ATP 依存性メタロプロテアーゼ FtsH を中心とした, 葉緑体における膜タンパク質