

シンデカン-2コアタンパク質の自己会合性について (続報)

石 塚 洋三千
高 田 美 紀
船 越 育 雄

要 約

細胞内のシグナル伝達経路を活性化する細胞表面の受容体は、一般に会合体を形成することが知られている。細胞膜に存在するシンデカン (シンデカン-1~4) はヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種であるが、細胞膜受容体の一つにも数えられている。シンデカンのすべてのメンバーのコアタンパク質はSDS-PAGEに於いて実際の分子量より2~4倍大きい分子として振舞うが、これはこのコアタンパク質がSDS溶液の中でさえも会合体をつくる能力をもつためとされている。我々はこれまで、大腸菌に発現させたマウスのシンデカン-2コアタンパク質を用いて、このタンパク質がSDS-PAGE上で異常な振舞いをする原因や会合体形成の機構について調べ、その結果の一部を昨年の本所報に報告した。しかしながら、会合体形成の有無に関しては間接的証明に止り、明確な証明を行うことができなかった。今回はいったん単量体にしてから再び会合体をつくらせる「再生」の手法を導入し、会合体形成の有無を明確にするとともに、これまで知られていなかった新たな知見を加えることができた。その概要は以下のとおりである。

大腸菌中に発現させたシンデカン-2またはここから細胞内領域を除いたものはSDS溶液 (SDS-PAGEの試料用緩衝液) 中では単量体と2量体の混合物として存在する。SDS-PAGEでは単量体は実際の分子量より約1.6倍、2量体は約3.1倍大きな分子として振舞う。

シンデカン-2の細胞外領域のみからなるコアタンパク質は単量体としてのみで存在し、SDS-PAGEでは実際の分子量より約1.8倍大きな分子として振舞う。

SDS-PAGEで単量体、2量体が実際の分子量より大きな分子として振舞う現象は、会合体形成とは関係なく、既に報告したように細胞外領域に酸性アミノ酸が多く、塩基性アミノ酸が少ないことに原因があるものと思われる。

シンデカン-2コアタンパク質のSDS-抵抗性の2量体形成には膜貫通領域のみが必要で、細胞外領域、細胞内領域は必要ではない。

グリコホリンAの場合、SDS抵抗性の2量体形成には膜貫通領域のGXXXGモチーフが重要とされている。シンデカン-2の膜貫通領域にも存在するこのモチーフのグリシンをアラニンに換えた3種類の変異体は、いずれもSDS-抵抗性の2量体が大きく減少するが、完全になくなることはない。

シンデカン-2のコアタンパク質はシンデカン-3、またはシンデカン-4のコアタンパク質とSDS溶液中でヘテロ2量体をつくる。

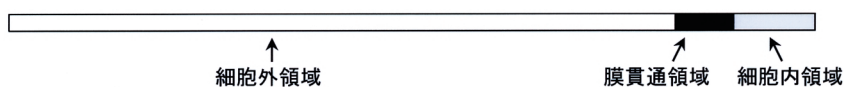
シンデカン-2はSDSを含まない溶液中でも2量体として存在する。

動物細胞由来のシンデカン-2をヘパリチナーゼとコンドロイチナーゼABCで処理して得たコアタンパク質をSDS-PAGE にかけて、主要バンドは大腸菌で発現させたコアタンパク質の単量体と2量体の中間に泳動した。これは単量体にグリコサミノグリカン鎖以外の糖鎖が結合したものとも考えられるが、2量体が一部切断をうけたものである可能性もあり、更に詳しい解析が必要である。

結 論

プロテオグリカンの1ファミリーであるシンデカンは、主要なグリコサミノグリカンとしてヘパラン硫酸をもつ。型膜タンパク質である。シンデカンファミリーは4種類のメンバー(シンデカン1~4)からなるが、これらは細胞-細胞間接着、ヘパラン硫酸結合性の増殖因子のシグナル伝達の制御、細胞-マトリックス接着とシグナル伝達の構築など多様な機能を担っている¹⁻⁴⁾。シンデカンのコアタンパク質はグリコサミノグリカンの結合する細胞外領域、単一の膜貫通領域、それに短いC末端の細胞内領域に分けることができる(図1A)。細胞外領域のアミノ酸配列は異なるシンデカンの間では相同性に乏しい。一方、膜貫通領域のアミノ酸配列は異なるシンデカンの間でも比較的良好に保存されているが、特定のシンデカンについて見ると、種間の配列の相同性は極めて高い。細胞内領域については、膜に隣接した領域(C1領域: 10アミノ酸)とC末端領域(C2領域: 4アミノ酸)にはシンデカンの種類、種の違いを問わずに

A. シンデカンの基本構造



B. シンデカンの膜貫通領域と細胞内領域のアミノ酸配列

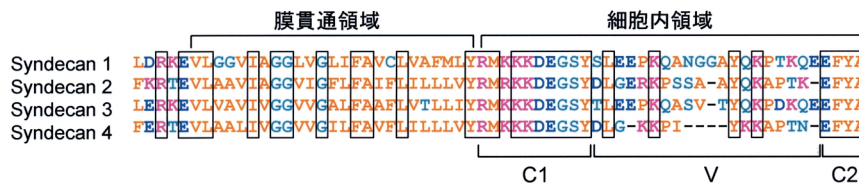


図1 シンデカンの分子構造

(A) シンデカンの基本構造。細胞外領域はシンデカンごとに特有な配列を持つが、膜貫通領域と細胞内領域のアミノ酸配列は相同性が高い。(B) マウスシンデカンの膜貫通領域と細胞内領域のアミノ酸配列。4種のシンデカンで共通のアミノ酸は4角で囲った。

同一の配列が存在するが、これに挟まれた領域（V領域）はシンデカンごとに特有な配列をしている（図1B）^{3,5)}。こうした配列上の特徴は各々のシンデカンのcDNAをクローニングすることにより明らかにされたものであるが、細胞内で実際に働いているシンデカンの機能構造を明らかにするには、タンパク質レベルの解析が欠かせない。例えば、機能を持つのは単量体なのか2量体なのか、それとも他の分子と複合体をつくって働くのか等々である。しかしながら、シンデカンタンパク質レベルで扱う場合、2つの大きな障害が存在する。第一は糖鎖の存在である。グリコサミノグリカン以外の糖鎖が共存している場合もあり、糖鎖を完全に除くのは難しい。第二はシンデカンのコアタンパク質をSDS-PAGE分析にかけたとき、糖が結合していない場合であっても実際の分子量より2~4倍大きな分子として検出されることである^{1,3)}。この理由として、シンデカンが会合体をつくっているからではないかと考えられてきたが、明確な証明がされているとはいえない。しかも、会合体形成では説明できない部分もあり、シンデカンタンパク質をSDS-PAGEで分析した結果の解釈には、しばしば不明瞭な点が残る場合があった。

会合体形成については、シンデカン-3のコアタンパク質を使って比較的詳しい研究がなされている^{2,5)}。このコアタンパク質の会合体形成には膜貫通領域とそれに隣接した細胞外の4アミノ酸配列が必須であるとされている。しかし、シンデカン-2と4ではこの4アミノ酸配列が他の配列に変わっているため、シンデカン-3の会合体形成についての考えをそのままシンデカン-2と4に適用することはできない。

一方、シンデカンの中でシンデカン-4は細胞内領域のみで会合体をつくることが明らかにされている^{6,8)}。この会合体形成はシンデカン-4の生物活性と密接に関わっており、会合体を形成した領域（細胞内領域の内、シンデカンに特有な領域）にプロテインキナーゼCが結合するとキナーゼ活性が高まるとされている^{9,13)}。また、ホスファチジルイノシトール4,5-2リン酸（PIP2）がシンデカン-4の細胞外領域の会合体の形成を促進し、PIP2の誘導により細胞内領域の全長からなるペプチドも会合体を形成しPKC活性を上昇させる¹²⁾。

我々はこれまで、シンデカンのSDS-PAGEでの異常泳動現象の原因、会合体形成の機構をより詳しく理解するため、まだこの方面の詳しい研究がなされていないシンデカン-2について、大腸菌に発現させたコアタンパク質を使って研究してきた。その結果、シンデカン-2コアタンパク質のSDS-PAGE上で異常泳動現象にはコアタンパク質がSDS抵抗性の2量体を形成することと、細胞外領域が極めて酸性であることによる泳動速度の低下が関与していることを明らかにした¹⁴⁾。しかしながら、会合体形成の有無の判断は間接的な証拠に基づいており、明確な証拠に基づいた判断であったとはいえない。そこで本研究では、新しい手法を導入して会合体形成の有無を明確に示すとともに、会合体形成の機構についても更に詳しい研究を行った。また、動物細胞に強制発現させたシンデカン-2からもコアタンパク質を調製し、大腸菌で発現させたコアタンパク質を用いて得られた知識を基に、予備的な構造解析を行った。

結 果

SDS抵抗性2量体形成への細胞外領域の関与

前回の実験で、シンデカンの細胞外領域のみからなる組換えコアタンパク質SD2E (図2参照) をSDS-PAGEにかけると、計算上の分子量より1.8倍大きな分子として泳動し、2量体であるかのように見えた。一方、これにGSTがついたもの (GST-SD2E) を泳動した場合には、この倍率は約1.4倍に低下したことから、実際にはSD2Eは単量体として存在し、異常に大きく振舞うのは他に原因があると考えた (図3)。しかしこのとき、SD2Eが単量体として存在することを明確に証明することができなかつたので、今回 図4に示した「再生実験」による証明を試みた。実験にはSD2EとSD2ED-1 (SD2EのC-末端より20アミノ酸を除いたもの) の混合物、SD2EとSD2M (細胞外および膜貫通領域からなるコアタンパク質) の混合物を用いた (図2参照)。まず、両試料を6M グアニジウム塩酸中で一夜処理して、一旦、コアタンパク質を完全に変性させたのち、リン酸緩衝液に対して透析することにより再生操作を行った。しかし、この処理をした試料であってもSDS-PAGEで観察されるバンドはこの処理をしていないものとまったく同じで、新しいバンドは検出されなかつた (図5)。SD2Eを直接SDS-PAGEにかけると計算上の分子量の約1.8倍大きな分子として検出される。これが2量体であるとすると、上記の変性、再生、SDS-PAGEの過程で単量体となってから変性前と全く同じ2量体が再生したことになる。しかしながら、異なる大きさSD2EとSD2ED-1との間またはSD2EとSD2Mとの間のヘテロ2量体と考えられるバンドは全く観察されなかつた。この結果はSDS-PAGEで見掛け上大きく振

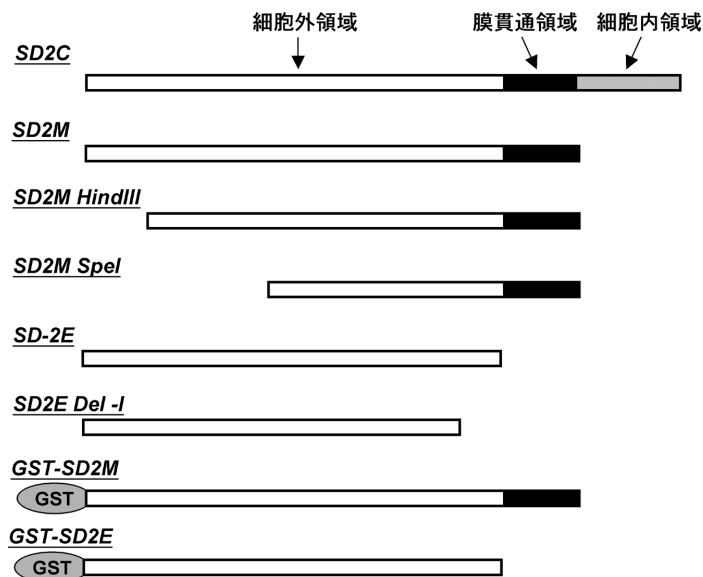


図2 本実験で使用した組換えシンデカン-2コアタンパク質の構造

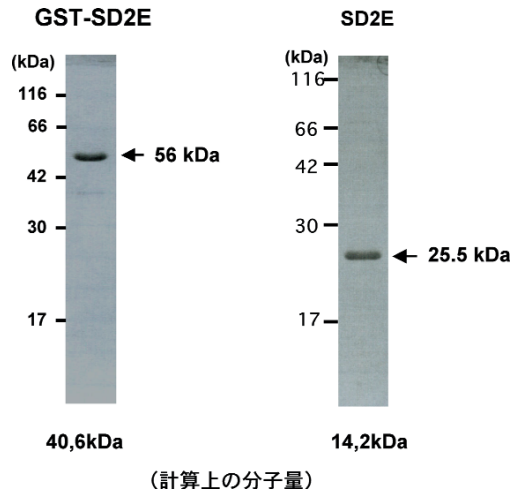


図3 シンデカン-2の細胞外領域のみを含む組換えコアタンパク質 (SD2E) のSDS-PAGE分析
GST融合体 (GST-SD2E) およびこれからGSTを除いたもの (SD2E) について分析した。
各レーンの下には実際の分子量を、バンドの横にはSDS-PAGEでの見掛けの分子量を示した。

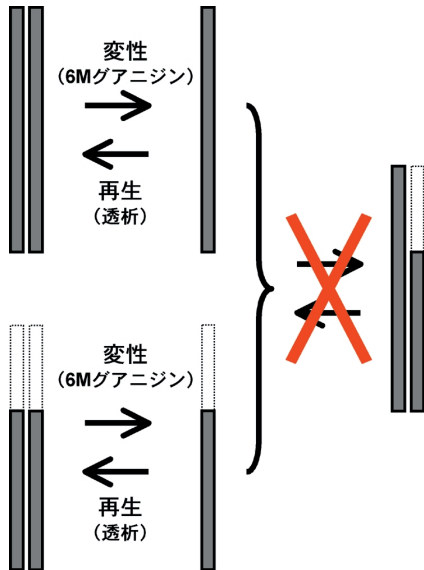


図4 シンデカン-2の細胞外領域が会合体をつくらないことを調べた実験
細胞外領域を共通に含む2種類の組換えコアタンパク質 (ただし一方は細胞外領域のみを含む) を混合し、6M グアニジン中で完全に变性させたのち、透析による再生操作を行った。得られた標品をSDS-PAGEにかけ元のバンド以外にヘテロ2量体に相当する位置にバンドが現れるか調べた。

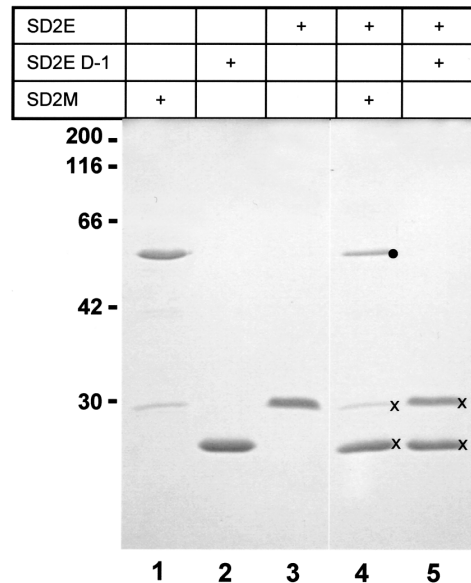


図5 シンデカン-2の細胞外領域が会合体をつくらないことを調べた実験
細胞外領域を共通に含む2種類の組換えコアタンパク質 (ただし一方は細胞外領域のみを含む) を混合し、6M グアニジン中で完全に变性させたのち、透析による再生操作を行った。得られた標品をSDS-PAGEにかけ元のバンド以外にヘテロ2量体に相当する位置にバンドが現れるか調べた。写真中に書き加えた印は混合前の試料中に含まれていた2量体を、x印は単量体を示す。

舞ったSD2Eが2量体ではなく、単量体であることを示している。

細胞外および膜貫通領域を含むコアタンパク質のSDS-抵抗性2量体形成

上述のようにシンデカン-2の細胞外領域（SD2E）はSDS-PAGEにおいて、計算上の分子量の約1.8倍大きな分子として振舞うが、これは2量体形成によるものではないことが判明した。これに対し、細胞外領域に加えて膜貫通領域を含む組換えタンパク質（SD2M）を合成しSDS-PAGE分析にかけると、計算上の単量体分子量の約1.6倍の大きさのバンドに加え、さらにその約2倍の大きさのバンドも出現した。この現象はGST融合タンパク質（GST-SD2M）の場合でも同じであり、膜貫通領域を含むコアタンパク質が単量体と2量体の混合物として存在していることを強く示唆している（図6）。それでは単量体と2量体の比はどの段階で決まるのかについて検討した。SDS-PAGEでSD2MまたはGST-SD2M由来のバンドは明確なバンドとなり、決してスメア状にはならない。従って、電気泳動中に単量体と2量体の比が変わるとは考えられない。そこで次に、両バンドの比がSDS-PAGE用試料溶液作成段階で決まる可能性を考え、試料溶液中のSD2Mの濃度を段階的に希釈した試料溶液を調製し、100℃、3分間加熱したのちSDS-PAGEで両バンドの比を調べた。試料調製段階で両バンドの比が決まるのなら、試料溶液中のSD2Mの濃度を低くすれば単量体のバンドの割合が大きくなることが予想される。図7の右側5レーンはCBB染色の結果であるが、SD2M濃度が低くなるにつれ単量体の割合が大きくなっていないばかりか、濃度が低くなるとほとんど検出できなくなっている。これはSD2M濃度が高くても単量体の割合はかなり低く、SD2Mの濃度を低くした場合はCBB染色の検出限

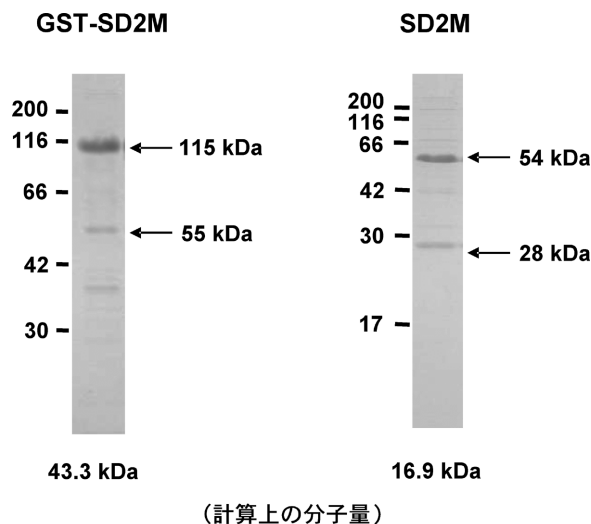


図6 シンデカン-2の細胞外領域と膜貫通領域を含む組換えコアタンパク質（SD2M）のSDS-PAGE分析 GST融合体（GST-SD2M）およびこれからGSTを除いたもの（SD2M）について分析した。各レーンの下には実際の分子量を、バンドの横にはSDS-PAGEでの見掛けの分子量を示した。

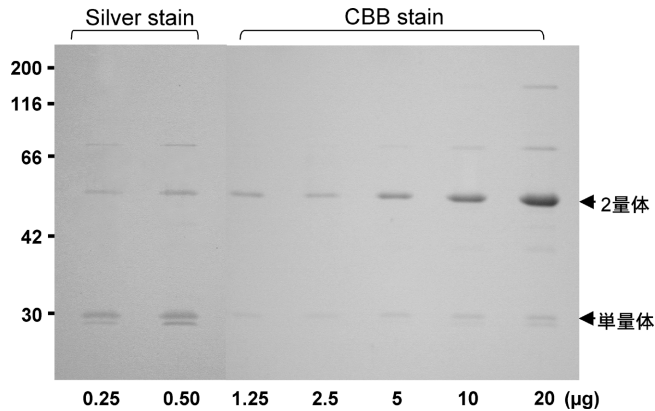


図7 SDS-PAGE用試料溶液中のSD2M濃度を変えた場合の単量体と2量体割合
SD2M濃度の異なるSDS-PAGE用試料溶液を調製し，SDS-PAGEにかけた．右4レーンはCBBにより，左2レーンは銀染色によりバンドを検出した．

界以下になったためにこのような結果になったものと考えられる．図7の左側2レーンはSD2M濃度をさらに低くした場合で，バンドは銀染色で検出した．SD2M濃度がここで用いたレベルまで低下すると単量体の割合は大きく上昇することがわかる．この結果は，SD2MがSDS-PAGEの試料溶液中では単量体と2量体の形で存在し，それは互いに換り得る状態にあることを示している．

SDS-抵抗性2量体形成への膜貫通領域の関与

すでに述べたように，シンデカン-2の細胞外領域のみでは2量体をつくらない．従って，

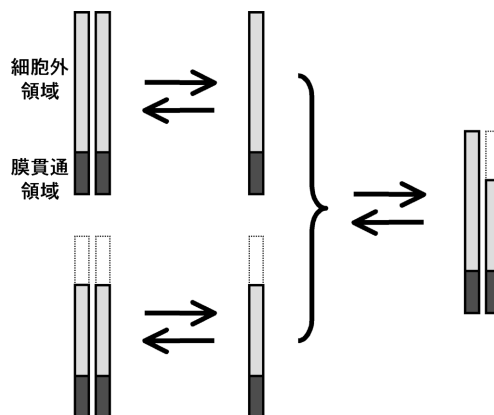


図8 シンデカン-2の膜貫通領域を含む組換えコアタンパク質を使った「再生」実験
シンデカン-2膜貫通全領域を共通に含むが，細胞外領域の長さは異なる2種類の組換えコアタンパク質を混合し，SDS-PAGE試料用緩衝液に溶かす．100℃，3分加熱したのちSDS-PAGE分析にかけ，ヘテロ2量体の有無を調べることで，混合前のシンデカン-2が2量体をつくっているかどうか判定する．

SD2Mが2量体を形成しているとするれば、膜貫通領域を介した結合であると考えられる。この考えを明確に証明するため、ここでも再生実験を行った。実験には膜貫通領域は共通に含むが、細胞外領域の長さは異なるいくつかの組換えタンパク質を作成し、それらを2種類ずつ組合せたものを試料として再生実験を行った(図8)。まず、細胞外領域の解析に利用したときと同じ方法を使い、グアニジン変性、再生操作後の試料をSDS-PAGEにより解析した。泳動像には試料中に含まれる2種類のタンパク質を個々にSDS-PAGEにかけたときに見られるバンドの他に、両タンパク質由来の2量体と考えられるバンドの間に新しいバンドが観察された(図は省略)。この泳動位置は2種類のタンパク質からなるヘテロ2量体の泳動位置に一致した。一方、図9は試料をグアニジン変性、再生操作を行わずにをSDS-試料用緩衝液に直接溶かし、100℃、3分加熱したのち、SDS-PAGEにかけた結果である。この場合でも、変性、再生操作を経た試料と同様、ヘテロ2量体と考えられる位置に新しいバンドが出現した。この結果は予想したとおり、(1)SD2MをSDS-PAGEにかけたときに見られる二本のバンドのうち、遅く泳動するバンドは2量体であり、速く泳動するバンドは単量体であること、(2)SDS-PAGE試料溶液中では単量体と2量体が存在し、それらは相互に換り得る状態にあることを示している。さらに、すでに示したように(図5)、SD2MがSD2Eと2量体をつくらないことと考え併せると、SD2Mの2量体形成には膜貫通領域が必須であるといえる。

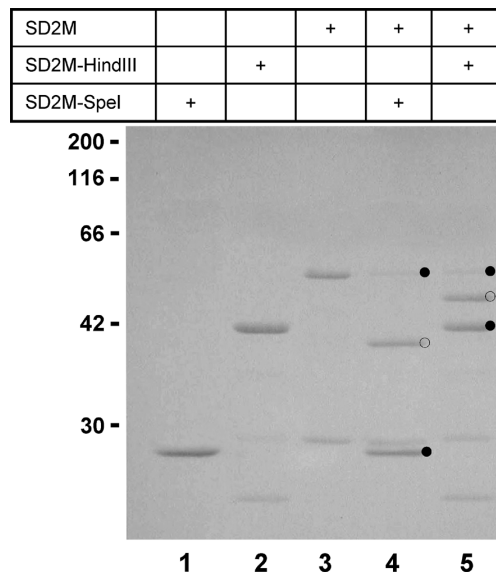


図9 シンデカン-2の膜貫通領域を含む組換えコアタンパク質を使った「再生」実験

シンデカン-2膜貫通全領域を共通に含むが、細胞外領域の長さは異なる2種類の組換えコアタンパク質を混合し、SDS-PAGE試料用緩衝液に溶かした。100℃、3分加熱したのち、SDS-PAGE分析にかけた。写真中に書き加えた印は混合前の試料中に含まれていた2量体を、印は混合後に生じたヘテロ2量体を示す。

SDS-抵抗性2量体形成への膜貫通領域の関与

これまで述べた実験からはSD2Mの2量体形成には膜貫通領域が必須であることは明らかであるが，細胞外領域が2量体形成に全く無関係であるかどうかは分からない．そこでこの点を

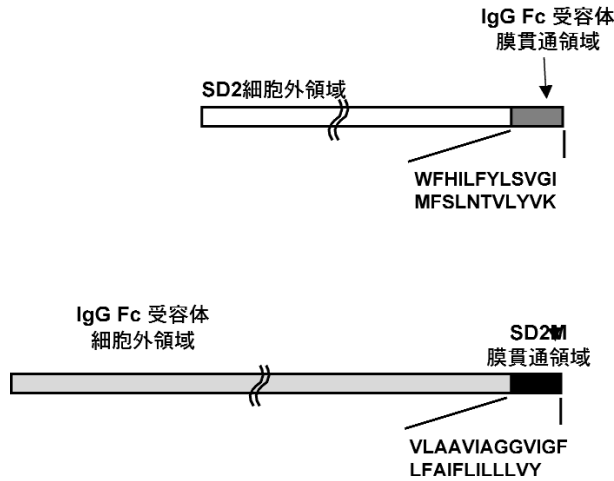


図10 SD2Mの細胞外領域または膜貫通領域をIgG Fc受容体の対応部分と交換した組換え体の作成
SD2Mの細胞外領域と膜貫通領域の2量体形成への関与を調べるため，SD2Mの細胞外領域または膜貫通領域を単量体膜タンパク質であるIgG Fc受容体の対応部分と組換えたタンパク質を作成した．

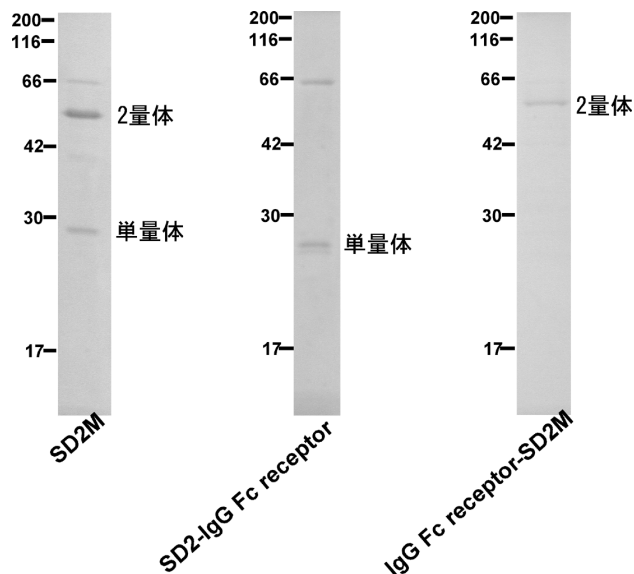


図11 SD2Mの細胞外領域または膜貫通領域をIgG Fc受容体の対応部分と交換した組換え体のSDS-PAGE分析

SD2Mの細胞外領域と膜貫通領域の2量体形成への関与を調べるため，SD2Mの細胞外領域または膜貫通領域を単量体膜タンパク質であるIgG Fc受容体の対応部分と組換えたタンパク質を作成し，SDS-PAGEにより分析した．

明確にするために、SD2Mの膜貫通領域をSDS溶液の中で単量体として存在していることが既に知られている膜タンパク質IgG Fc受容体 (IgG FcR) の該当部分と組換えタンパク質 (IgG FcRex-SD2Mm) を作成した (図10)⁵⁾。図11は得られた組換えタンパク質をSDS-PAGE分析にかけた結果である。IgG FcRex-SD2Mmの主要なバンドは計算上の分子量の約2倍の大きさに相当する位置に検出された。IgG FcRの細胞外領域 (IgG FcRex) はシンデカン-2の細胞外領域のようにSDS-PAGEで異常な振舞いを示さないで、このバンドは2量体に相当する。このようにSD2Eの細胞外領域をまったく無関係な膜タンパク質の細胞外領域に換えても、組換えタンパク質は2量体を形成した。従って、SD2Mの2量体形成にはもっぱら膜貫通領域のみが関与し、細胞外領域は必要としない。なお、図11にはSD2Mの膜貫通部分をIgG FcRの対応部分と交換した組換えタンパク質 (SD2Mex-IgG FcRm) の泳動結果も載せた。SD2M膜貫通領域をIgG FcRのものに換えると2量体を形成しなくなるのが分かる。

SD2Mの膜貫通領域への変異の導入とそれがSDS-抵抗性2量体形成に及ぼす影響

シンデカン-2の膜貫通領域を構成する24個のアミノ酸の中で、どのアミノ酸が2量体形成に大きな役割を演じているかを明らかにするため、SD2Mの膜貫通領域のいくつかのアミノ酸を変異させた組換えタンパク質を作成した (図12)。グリコホリンAの場合、SDS-抵抗性の2量体の形成には膜貫通領域中のGXXXGモチーフが重要とされている^{16・17)}。シンデカンファミリーのすべてのメンバーは膜貫通領域にGGXXG配列を含むので、変異はこのモチーフを変化させるように導入した。図13は得られた組換えタンパク質をSDS-PAGEで分析した結果である。

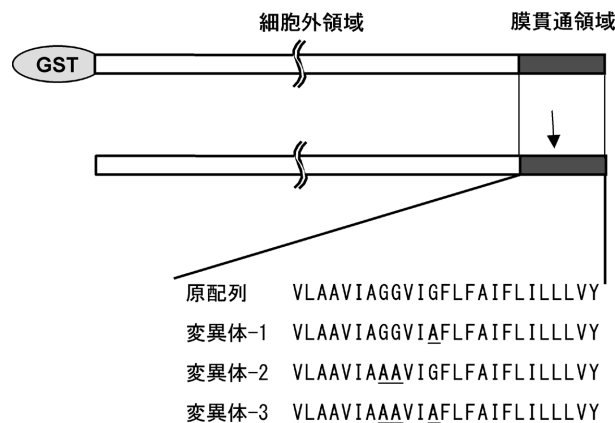


図12 SD2Mの膜貫通領域変異体の作成

膜貫通領域を介した2量体形成でのGXXXGモチーフの関与を調べるため、GGXXG配列中のグリシン (G) をアラニン (A) に変えたSD2Mの変異体を作成した。下線付きのAはGが置き換わったアラニンを示す。

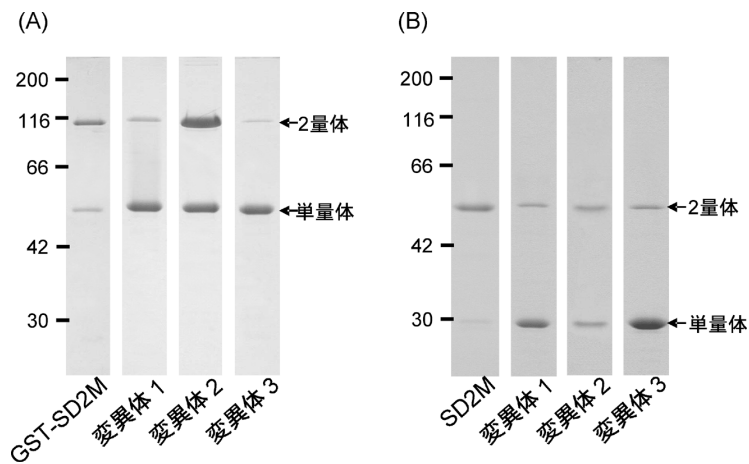


図13 SD2Mの膜貫通領域変異体のSDS-PAGE分析

膜貫通領域を介した2量体形成でのGXXXGモチーフの関与を調べるため、GGXXG配列中のグリシン(G)をアラニン(A)に変えたSD2Mの変異体を作成し、SDS-PAGE分析により単量体と2量体の存在比を調べた。(A)はGST融合タンパク質、(B)はGSTを除いてからの泳動像を示す。

いずれの変異体の場合も2量体の割合が減少し、単量体が増加した。特に変異-3では特に大きく変化した。しかし、いずれの変異体の場合も2量体がまったくなくなることはなく、弱いながらも2量体形成能は保持されていた。

シンデカンファミリー間でのヘテロ2量体の形成

シンデカン1~4の膜貫通領域はよく似たアミノ酸配列をもつ。このため、異なるシンデカンのコアタンパク質間でヘテロ2量体をつくる可能性が考えられる。これを確かめるため、シンデカン-3と4についても細胞外と膜貫通領域を含む組換えコアタンパク質(SD3M, SD4M)を作成し、SD2Mの最も外側の細胞外領域の一部を削って短くしたもの(SD2M Hind)と組合せて再生実験を行った。図14は再生後のSDS-PAGE分析の結果である。SD2MとSD3Mの組合せ、SD3MとSD2M Hindの組合せ、さらにSD4MとSD2M Hindの組み合わせのいずれの場合でも、ヘテロ2量体の分子量に相当する位置にバンドが現われ、シンデカン2と3間でも、またシンデカン2と4の間でもヘテロ2量体が形成されることが明らかとなった。

SD2Mの未変性条件下での存在状態

これまで述べた実験から、SD2MはSDS溶液中では2量体と単量体の混合物として存在することが明らかとなった。そこで次に、SDSを含まない溶液中に存在する未変性のSD2Mはどのような状態で存在するのかを探った。SD2Mは膜貫通領域を含むので、0.1% TritonX-100を含む溶液中での存在状態を調べた。図15は架橋剤であるジメチルスベリミデートによる処理を行う前後のSD2MのSDS-PAGE像である¹⁸⁾。架橋処理前の泳動像には2量体と単量体のバンドが

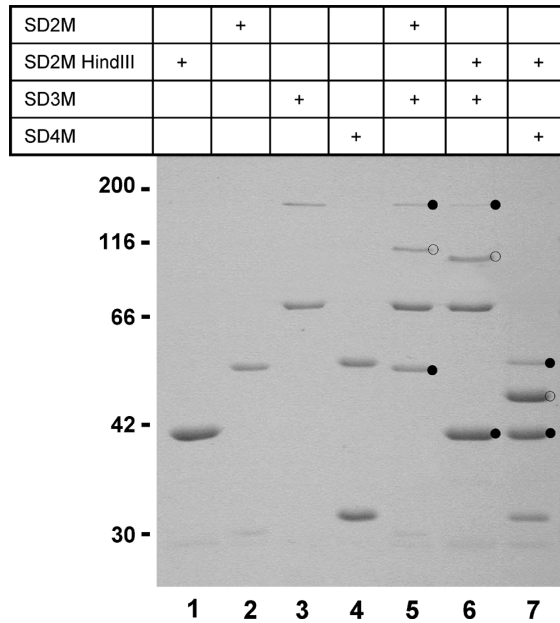


図14 シンデカン-2の膜貫通領域とシンデカン-3またはシンデカン-4の膜貫通領域とのSDS-抵抗性の2量体形成

膜貫通領域を含むシンデカン-2とシンデカン-3またはシンデカン-4を混合し、SDS-PAGE試料用緩衝液に溶かした。100℃, 3分加熱したのち、SDS-PAGE分析にかけた。写真中に書き加えた印は混合前の試料中に含まれていた2量体を、印は混合後に生じたヘテロ2量体を示す。

見られるが、架橋反応後は単量体のバンドは消え、2量体のバンドのみが検出された。2量体以上の多量体のバンドはほとんど検出することはできなかった。この結果は、SD2MはSDSを含まない溶液中であっても、SDS溶液中と同様、少なくともその一部は2量体として存在するが、2量体以上の会合体にはなっていないことを示している。

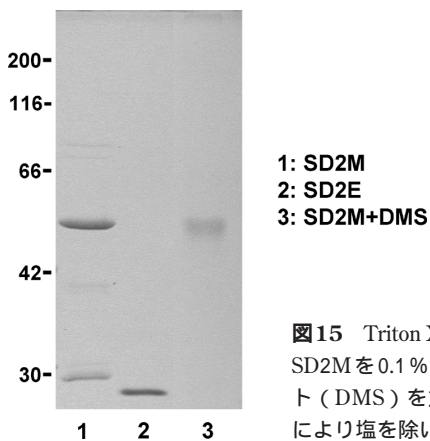


図15 Triton X-100溶液中でのSD2Mの架橋反応
SD2Mを0.1% Triton X-100を含む緩衝液に溶かし、ジメチルスペリミデート(DMS)を加えて架橋反応を行った。トリスを加えて反応をとめ、透析により塩を除いてからSDS-PAGEにかけた。

全長のシンデカン-2 コアタンパク質のSDS抵抗性2量体形成

これまでの実験では細胞外領域と膜貫通領域のみを含むシンデカン-2 コアタンパク質を用いて2量体形成について調べてきた．ここでは全長のシンデカン-2 コアタンパク質 (SD2C) を作成し，その2量体形成能について調べた (図16)．電気泳動像から明らかのように，SD2Cは細胞内領域を持たないSD2Mとよく似た2量体形成能を示した．このことはシンデカン-2の細胞内領域も細胞外領域と同様，2量体形成にはほとんど関わっていないことを示しているものと思われる．

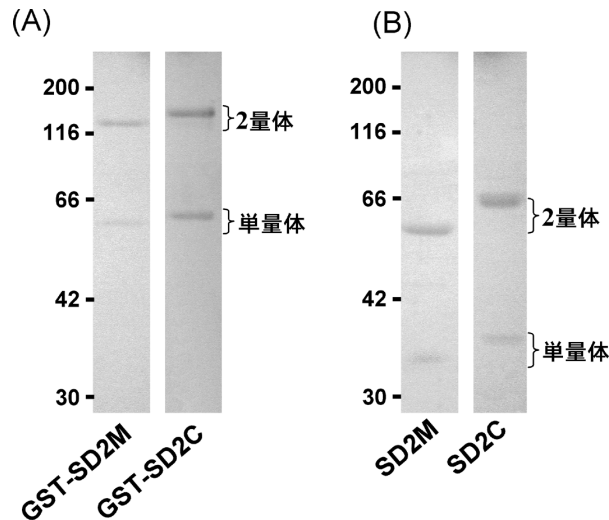


図16 全長のシンデカン-2組換えコアタンパク質 (SD2C) のSDS-PAGE分析
GST融合体 (GST-SD2EC) およびこれからGSTを除いたもの (SD2C) について分析した．GST-SD2E, SD2Mの泳動像も比較のため併記した．(A) GST融合体，(B) GSTを除いたもの．

動物細胞でのシンデカン-2の強制発現

これまでの研究では，大腸菌に発現させた組換えシンデカン-2 コアタンパク質を使ってこのコアタンパク質のもつ基本的性質を明らかにしてきた．しかし，本来，シンデカンは動物細胞でつくられているタンパク質であり，高度に糖鎖による修飾を受けている．従って動物細胞由来のシンデカンは大腸菌でつくられたものとは違った性質をもっている可能性もある．そこで以下の研究では動物細胞に大量に発現させたシンデカン-2を使って実験を行った．発現にはFlp-In発現システムを用いた．まず，全長のシンデカン-2のC末端にV5とHisタグのついたタンパク質をコードするDNAをFlp-In発現ベクターに挿入した．これをFlpリコンビナーゼ発現ベクターであるpOG44とともに，Flpリコンビナーゼ標的部位を予め組込んである293細胞 (ヒト胎児腎細胞) に導入し，ハイグロマイシン耐性クローンを選択した (図17)．得られたクローンはいずれもシンデカン-2のmRNAを強く発現していた．発現したシンデカン-2のコアタンパク質を調べるため1クローンを選び，1% Triton X-100を含む緩衝液でシンデカン-2を

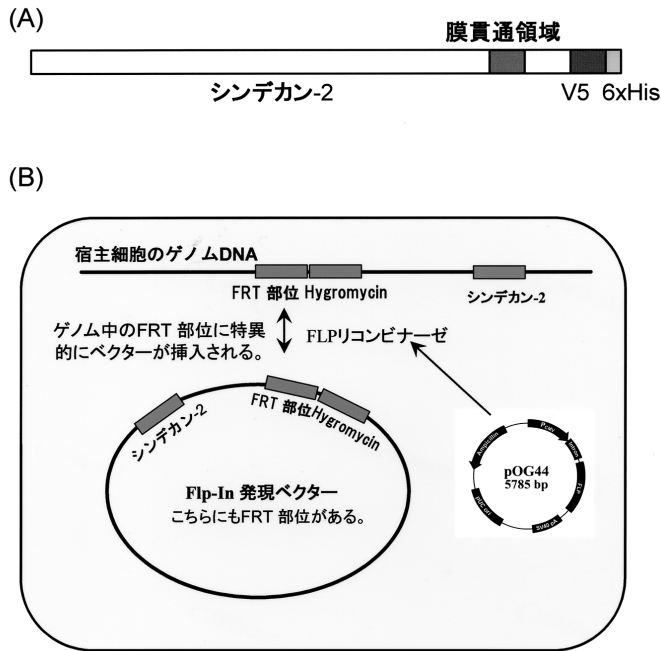


図 17 動物細胞でのシンデカン-2の強制発現

全長のシンデカン-2のC末端にV5と6xHisタグのついた組換えタンパク質をコードするDNAをFlp-In発現ベクターに組み込み、予めFRT部位を導入してある胎児腎細胞に導入し、hygromycin耐性クローンを取得した。

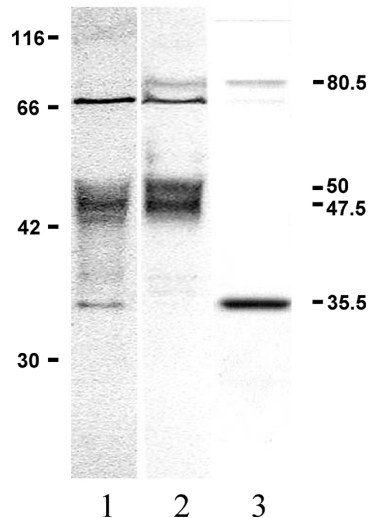


図 18 動物細胞 (293細胞) に発現した組換えシンデカン-2のSDS-PAGE

培養細胞から1% Triton X-100を含む緩衝液でシンデカン抽出し、Ni-NTAアガロース アフィニティークロマトグラフィーとDEAE-セルロースクロマトグラフィーにより精製した。得られた精製物をヘパリチナーゼとコンドロイチナーゼABCで消化したのち、SDS-PAGEかけ、ウエスタンブロットにより発現したシンデカン-2を抗V5抗体 (レーン1) と抗 α -ヘパラン硫酸抗体 (3G10, レーン2) により検出した。レーン3は大腸菌に発現させた同じタンパク質の泳動像 (CBB染色) を示す。

抽出し、金属キレートアフィニティーカラム (Ni-NTAカラム)、DEAE-セルロースカラムにより分離、精製した。得られたシンデカン-2はさらにヘパリチナーゼとコンドロイチナーゼABC処理によりグリコサミングリカン鎖を除いてから、SDS-PAGE、ウエスタンブロットによりコアタンパク質を解析した (図18)。レーン1は抗V5抗体、レーン2は抗ペパラン硫酸抗体 (3G10) による染色であるが、いずれの場合も主要バンドは47~50KDa付近に検出された。レーン3は大腸菌に発現させた同じコアタンパク質の泳動像であり、80.5KDaのバンドが2量体を35.5KDaのバンドが単量体である。両細胞由来のバンドの比較から明らかなように、293細胞に発現したシンデカン-2コアタンパク質の大きさは大腸菌でつくられる単量体と2量体の中間の大きさを示した。シンデカンにはグリコサミングリカン鎖以外の糖鎖が結合していることが知られているので、293細胞由来のコアタンパク質は単量体である可能性がある。一方、シンデカンは細胞から分離、精製する際に分解されやすいことが知られている。また、生理的に分解を受けることもある。従って293細胞由来の主要バンドは2量体が一部切断を受けたものである可能性もある。どちらが正しいか、この疑問に答えるための研究は現在進行中である。

考 察

本来、シンデカンはショウジョウバエ、ホヤ以上の高等動物の細胞表面に発現する膜型プロテオグリカンであり、微生物の中ではまったくつくられていない。シンデカンは常にヘパラン硫酸を含むが、コンドロイチン硫酸を持つものや、グリコサミングリカン鎖以外の糖鎖を含むものも知られている。このため、シンデカンのコアタンパク質の研究にはヘパリチナーゼやコンドロイチナーゼでグリコサミングリカン鎖を除いたものが使われるが、この処理ですべての糖鎖が除去されるわけではない^{19・20}。そこで我々は動物細胞に発現しているシンデカンコアタンパク質の構造解析に先立ち、大腸菌に発現させた糖鎖をまったく持たないシンデカン-2コアタンパク質をモデルタンパク質として使い、その性質を詳しく調べた。

前年度の報告ではシンデカン-2のコアタンパク質は細胞外領域と膜貫通領域だけ (SD2M) でSDS-抵抗性の2量体を形成するが、細胞外領域のみではSDS-抵抗性の2量体はつくらないと報告した¹⁴。細胞外領域のみからなるコアタンパク質 (SD2E) をSDS-PAGE分析にかけると、実際の分子量の約1.8倍の大きな分子として観察されるにもかかわらず、単量体と判断したのは、SD2EをGST融合タンパク質として発現させたとき単量体に近い泳動度を示すようになった。細胞外領域はマイナスの荷電密度が高く、これはSDS-PAGEで泳動速度を低下させる要因として働くことをあわせて考えた結果である。しかし、GST融合タンパク質として発現させたものが単量体に近い分子量となったのは、GSTが結合したため2量体であったSD2Eが単量体になったためであるとも考えられる。一方、細胞外領域と膜貫通領域からなるSD2Mの場合は、単独であっても、またGSTと結合した状態であっても、単量体と考えられるバンド

に加えそのさらに2倍大きな分子が観察されたことから、2量体としても存在しているものと考えた。しかし、上記の単量体か2量体かの判断は十分であったとはいえない。そこで今回は、新たに「再生」の手法を導入し、会合体形成の有無を調べた。シンデカン-2の細胞外領域を共通にもつ2つのタンパク質を混ぜ、変性再生操作をしたのち、SDS-PAGEにより分析した。観察バンドは変性操作前の2成分に由来するバンドのみで、新たなバンドの生成はまったく見られなかった。もし変性前のSD2Eが2量体なら、変性、再生操作後に同一バンドが観察されるので再生が起こっていることになる。しかし、混合した2成分からなる新たなバンド（ヘテロ2量体）はまったく検出できなかった。この事実はSD2Eが単量体であることを強く示している。これに対し、全膜貫通領域を含むコアタンパク質の場合は、変性、再生を行った場合はもちろん、この操作を行わずにSDS-PAGE用試料緩衝液中で混合するだけで、混合した2成分からなるヘテロ2量体の新たなバンドが生成した。この結果は、SD2Eの場合とは異なり膜貫通領域を含むコアタンパク質がSDS溶液中でも2量体を形成していることを明確に示している。このコアタンパク質はSDS溶液中では2量体に加え単量体としても存在しているので、上述のヘテロ2量体は混合した2成分由来の単量体同士が結合して形成されたものと考えられる。

シンデカンの膜貫通領域を介した2量体形成に関して注目されるのは、シンデカン-2の膜貫通領域がシンデカン-3または4の膜貫通領域ともSDS-PAGE用試料緩衝液中で混合することによって簡単に2量体を形成することである。シンデカンファミリーの各メンバーの膜貫通領域は相同性が高いため、異なったメンバー間でもヘテロ2量体が形成されたものと思われる。今回シンデカン-1についての実験データはないが、膜貫通領域の相同性の高さを考えると、これもシンデカン-2とヘテロ2量体をつくる可能性は十分にある。異なるシンデカン間でヘテロ2量体を形成することは、シンデカン-2をSDS-PAGEで分析する場合の新たな問題を提起する。一般に動物細胞には数種類のシンデカンを発現している。こうした複数のシンデカンを含む試料をSDS-PAGEにより分析する場合は、異なるシンデカンからなるヘテロ2量体のバンドが生成される可能性を念頭に置いた注意深い解析が必要となる。

シンデカン-2の2量体形成には細胞外領域と細胞内領域は必要ではない。シンデカン-3の2量体形成の場合、膜貫通領域に加えて膜に隣接する細胞外の4アミノ酸の配列が必須とされているが、SD2Mの細胞外領域をまったく異なるタンパク質であるIgG Fc受容体の細胞外領域と交換しても2量体を形成することから、シンデカン-2の2量体形成にはこの4アミノ酸の配列は必須ではない。このことは前回の報告でSD2M該当位置の4アミノ酸を変異させても2量体を形成した事実とも一致する。

シンデカンがSDS溶液中でも2量体を形成する結合様式についてはまだよく分かっていない。SDS抵抗性の2量体をつくるタンパク質としてグリコホリンAが知られている²¹⁾。この場合も、2量体形成には膜貫通領域のみが関与していることが明らかにされている。詳細な解析の結果、2量体形成に最も重要な役割を演じているのは膜貫通領域中に存在するGXXXG（Gは

グリシン, Xは任意のアミノ酸)モチーフであるとされている¹⁶⁾。膜貫通領域の α -ヘリックス構造中に存在するGXXXGあるいはこれに似たモチーフが他の膜タンパク質の膜貫通領域での会合に参与していることも報告されている¹⁷⁾。シンデカンでは, その種類, 生物種の違いを超えてGGXXG配列が保存されている。シンデカン-2での2量体形成におけるこの配列の重要性を調べるため, この配列中のGをAにかえた3種類の変異タンパク質(変異SD2M)をつくり, SDS抵抗性2量体形成能を調べた。変異の導入により, 2量体の形成は大きく減少したが単量体のみになることはなかった。従って, シンデカンのGXXXGは2量体形成に大きな影響力を持つ配列ではあるが, 必須な配列ではないことは明らかである。

これまでの研究では大腸菌に発現させたシンデカン-2の組換えコアタンパク質を使って実験を進めてきた。それはこのタンパク質が糖鎖をもたず, 解析が容易であるからである。しかし, 我々の本来の興味の対象は動物細胞に発現する糖鎖修飾を受けたシンデカンの構造とそれと密接に結びついた細胞機能である。大腸菌に発現させたシンデカン-2の組換えコアタンパク質を使って, コアタンパク質のもつ基本的な特徴のいくつかを知ることができたので, この知識を基に動物細胞に発現するシンデカン-2の構造についての研究を開始した。まず全長のシンデカンのC末端側にV5とHisタグのついたコアタンパク質を胎児由来の腎細胞に強制発現させた。発現した組換えシンデカン-2はヘパリチナーゼとコンドロイチナーゼによる消化後, SDS-PAGEにかけると主要バンドは47~50KDaの位置に泳動した。この見掛けの分子量は動物由来のシンデカンについて従来から報告されている値と一致する^{19)・20)}。しかしこの大きさは, 大腸菌で発現させた同じコアタンパク質の単量体と2量体の中間の値に相当する。動物細胞に発現したシンデカン-2のコアタンパク質がまったく切断を受けていないとすれば, SDS-PAGEで検出された主要バンドは単量体となる。大腸菌由来のシンデカン-2の単量体より大きい分子として泳動するのは, グリコサミノグリカン鎖以外の糖鎖がついていると考えれば説明がつく。一方, 動物由来のシンデカンは生理的に分解をうける場合や^{22)・23)}, 調製過程でプロテアーゼの作用を受けことも報告されている。従って, 動物細胞由来のシンデカンがSDS-PAGE上で主要バンドは2量体であり, 一部が切断を受け小さくなったものとも考えられる。シンデカン-4の細胞外部分をIgG Fc受容体で置換したものを強制発現させた場合, 大腸菌に発現させたものに近い単量体と2量体が発現している例も知られている²⁴⁾。

動物細胞に発現するシンデカン-2の構造や性質を理解するためには, 大腸菌由来のシンデカン-2の研究で得られた知識を背景としたさらに詳しい研究が必要である。

参 考 文 献

- 1) Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans, *Annu. Rev. Biochem.*, **68**: 729-777
- 2) Carey, D. J. (1997) Syndecan: multifunctional cell-surface co-receptors, *Biochem. J.*, **327**: 1-16
- 3) Zimmermann, P., David, G. (1999) The syndecans, tuners of transmembrane signaling, *FASEB J.*, **13**: S91-S100
- 4) Rapraeger, A. C. (2000) Syndecan-regulated receptor signaling, *J. Cell Biol.*, **149**: 995-997
- 5) Asundi, V. K., and Carey, D. J. (1995) Self-association of N-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region, *J. Biol. Chem.*, **270**: 26404-26410
- 6) Oh, E. -S., Woods, A., and Couchman, J. R. (1997) Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C, *J. Biol. Chem.*, **272**: 11805-11811
- 7) Lee, D., Oh, E. -S., Woods, A., Couchman, J. R., and Lee, W. (1998) Solution structure of a syndecan-4 cytoplasmic domain and its interaction with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *J. Biol. Chem.*, **273**: 13022-13029
- 8) Shin, J., Lee, W., Lee, D., Koo, B. K., Han, I., Lim, Y., Woods, A., Couchman J. R., and Oh, E. S. (2001) Solution structure of the dimeric cytoplasmic domain of Syndecan-4, *Biochemistry*, **40**: 8471-8478
- 9) Oh, E. -S., Woods, A., and Couchman, J. R. (1997) Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C, *J. Biol. Chem.*, **272**: 8133-8136
- 10) Oh, E. -S., Woods, A., Lim, S. T., Theibert, A. W., and Couchman, J. R. (1998) Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate coordinately regulate protein kinase C activity, *J. Biol. Chem.*, **273**: 10624-10629
- 11) Horowitz, A., and Simons, M. (1998) Regulation of syndecan-4 phosphorylation in vivo, *J. Biol. Chem.*, **273**: 10914-10918
- 12) Horowitz, A., and Simons, M. (1998) Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase C alpha, *J. Biol. Chem.*, **273**: 25548-25551
- 13) Murakami, M., Horowitz, A., Tang, S., Ware, J. A., and Simons, M. (2002) Protein kinase C (PKC) delta regulates PKCalpha activity in a Syndecan-4-dependent manner, *J. Biol. Chem.*, **277**: 20367-20371
- 14) 吉岡信吾, 高田美紀, 船越育雄 (2003) シンデカン-2 コアプロテインの自己会合性について, 京都産業大学先端科学技術研究所所報, 2: 141-161
- 15) Sears, D. W., Osman, N., Tate, B., McKenzie, I. F., and Hogarth, P. M. (1990) Molecular cloning and expression of the mouse high affinity Fc receptor for IgG, *J. Immunol.* **144**: 371-378
- 16) Russ, W. P., and Engelman, D. M. (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association, *J. Mol. Biol.*, **296**: 911-919
- 17) Kleiger, G., Grothe, R., Mallick, P., and Eisenberg, D. (2002) GXXXG and AXXXA: common alpha-helical interaction motifs in proteins, particularly in extremophiles, *Biochemistry*, **41**: 5990-5997
- 18) Mattson, G., Conklin, E., Desai, S., Nielander, G., Savage, D., and Morgensen, S. (1993) A practical approach to crosslinking, *Mol. Biol. Rep.*, **17**: 167-183.
- 19) Pierce, A., Lyon, M., Hampson, I. N., Cowling, G. J., and Gallagher, J. T. (1992) Molecular cloning of the major cell surface heparan sulfate proteoglycan from rat liver, *J. Biol. Chem.*, **267**: 3894-3900

- 20) Marynen, P., Zhang, J., Cassiman, J. J., Van den Berghe, and David, G. (1989) Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparin sulfate proteoglycans of lung fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **264**: 7017-7024
- 21) Lemmon, M. A., Flanagan, J. M., Hunt, J. F., Adair, B. D., Bormann, B. J., Dempsey, C. E., and Engelman, D. M. (1992) Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices, *J. Biol. Chem.*, **267**: 7683-7689
- 22) Carey, D. J., Conner, K., Asundi, V. K., O'Mahony, D. J., Stahl, R. C., Showalter, L., Cizmeci-Smith, G., Harman, J., and Rothblum, L. I. (1997) cDNA cloning, genomic organization, and in vitro expression of rat N-syndecan, *J. Biol. Chem.*, **272**: 2873-2879
- 23) Asundi, V.K., Erdman, R., Stahl, R.C., Carey, D.J. (2003) Matrix metallo- proteinase-dependent shedding of syndecan-3, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, in Schwann cells, *J. Neurosci. Res.*, **73**: 593-602
- 24) Tkachenko, E., Simon, M. (2002) Clustering induces redistribution of Syndecan-4 core protein into raft membrane domains, *J. Biol. Chem.*, **277**: 19946-19951