

接着分子 ALCAM のシェディングによる発ガン制御

立命館大学生命科学部生命医科学科タンパク質修飾生物学研究室

白壁 恭子

〈これまでの研究と研究計画〉

膜タンパク質シェディング（以下シェディング）とは、細胞表面の膜に埋め込まれたタンパク質を膜近傍で切断し、細胞外領域ほぼ全体を可溶化するプロセッシング機構である（図1）。細胞外領域が可溶性タンパク質として機能する増殖因子や炎症性サイトカインなどのシグナル分子の場合、シェディングを受けることでより広い領域で機能できるようになることは理解しやすいが、膜タンパク質として機能する必要があるシグナル分子の受容体や接着分子の場合、そのシェディングがどのような役割を果たしているのかは不明な点が多い。我々は生体内でシェディングが果たしている役割を総合的に明らかにすることを目的として、培養上清に放出されるタンパク質からシェディングされて放出された膜タンパク質をプロテオミクススクリーニングする系を独自に構築し研究を進めている（Shirakabe et al., *J. Biol. Chem.* 286, 43154-43163 (2011)）。そして膜タンパク質として生合成される炎症性サイトカイン TNF α を盛んに放出する「炎症反応時のマクロファージ」では、TNF α 以外の膜タンパク質のシェディングも亢進しているのではないかと考え、LPS (lipopolysaccharide) で活性化したマクロファージ培養細胞を材料に用いてスクリーニングを行った結果、様々な機能を持つ膜タンパク質が炎症反応時にシェディングされることを明らかにしている（Shirakabe et al., *J. Proteomics.* 98, 233-243 (2014)）。さらに同定された接着分子の一つである CADM1 (cell adhesion molecule 1) の解析から意外な事実を明らかにした。CADM1 にはシェディングで切断される膜近傍の部分に選択的スプライシングが挿入されたスプライシングバリエントが存在するが、特に全長の3%にも満たない第9エクソンが挿入されたバリエントはシェディング感受性、挿入されないバリエントはシェディング耐性なのである（図2、Shirakabe et al., *Sci. Rep.* 7, 46174 (2017)）。この選択的スプライシングによって接着分子のシェディング感受性を制御する仕組みは、分子構造はほとんど同じだがシェディング感受性だけが異なる接着分子を一つの遺伝子から作り出すことを可能にするだけでなく、シェディング感受性とシェディング耐性の接着分子を細胞ごとに任意の割合で同時に作り出し膜に埋め込むことを可能にする。この結果は我々に、シェディング感受性を持つことで接着分子に接着以外の機能が付け足される可能性を想起させるものであった。

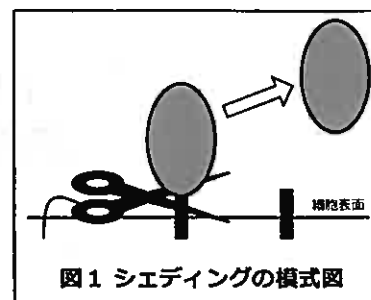


図1 シェディングの模式図

スクリーニングによって CADM1 と同時に同定された ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) にもまた膜近傍に選択的エクソンが挿入されたスプライシングバリエントが存在する。そこでこれらのスプライシングバリエントのシェディング感受性を検討したところ、選択的エクソンが挿入されたバリエントはシェディング耐性、挿入されないバリエントはシェディング感受性と、CADM1 の第9エクソンとは反対の機構でシェディング感受性が規定されることがわかった（図3、未発表データ）。ALCAM は様々な臓器のガンで高発現し発ガンに寄与すると考えられているが、その発現量と予後との相関が臓器によってまちまちであり、ガンの悪性度に対して相反する活性を持ちうる可能性が示唆されている。そこで我々は、臓器によって優位に発現している ALCAM のスプライシングバリエントが異なり、シェディング感受性が異なることによって、ガンの悪性度

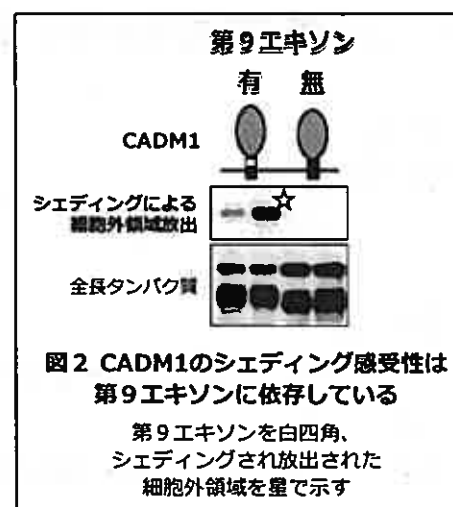


図2 CADM1のシェディング感受性は第9エクソンに依存している

第9エクソンを白四角、シェディングされ放出された細胞外領域を星で示す

への影響が一致しないのではないかと考えた。そして、シェディング感受性の ALCAM には、単なる接着分子としての役割だけでなく、細胞間接着や基質の硬さなどの機械的シグナルを伝える Hippo-YAP/TAZ 経路を活性化するという機能が付加されるのではないかと考え、その可能性を検証するために本研究計画を立案した。

＜研究結果＞

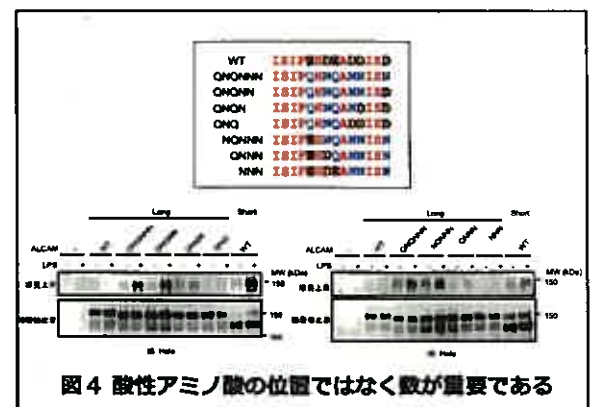
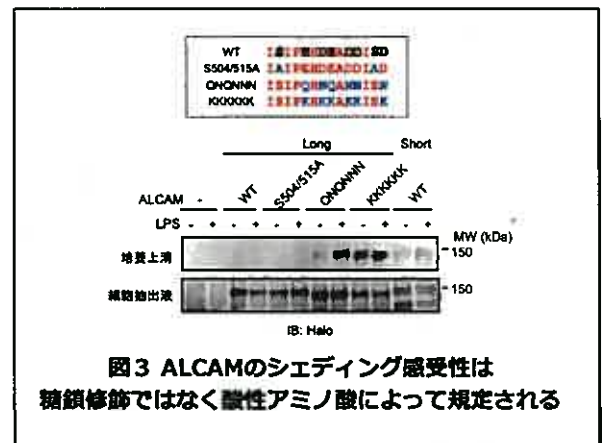
まずシェディング感受性とシェディング耐性の ALCAM スプライシングバリエントを YAP/TAZ の転写活性を測定するレポータープラスミドと同時に発現し、その影響を検討したところ、いずれのバリエントも転写活性をやや促進し、双方に大きな違いは見られなかった。同時に YAP/TAZ の発現量もウエスタンブロッティングで比較検討したが、両方のバリエントで同様に若干発現量が増加するという結果を得たため、ALCAM のシェディング感受性の違いにより Hippo-YAP/TAZ 経路の活性化には違いがないと結論づけた。残念ながら本研究計画通りの研究の遂行は困難になった。

そこで ALCAM スプライシングバリエントのシェディング感受性の違いがどのように生まれるのかその分子機構を明らかにする研究へとシフトした。前述の CADM1 ではシェディング切断部位近傍の O 型糖鎖修飾がシェディングを阻害することを明らかにしているため、ALCAM のシェディングを阻害する選択的エクソンである第 1 3 エクソンが O 型糖鎖修飾を受けうるセリン残基 (S) を 2 つコードすることに注目した。しかしこれらのセリン残基を糖鎖修飾を受けないアラニン残基 (A) に置換しても、シェディング感受性に変化はなく (図 3、S504/515A)、ALCAM の第 1 3 エクソンによるシェディング感受性制御には O 型糖鎖修飾は寄与しないことを示唆していた。

そこで第 1 3 エクソンがアスパラギン酸残基 (D) とグルタミン酸残基 (E) という負電荷を持つ酸性アミノ酸を 14 個中 6 つと高頻度にコードしていることに注目した (図 3、上)。これらの酸性アミノ酸を全て、電荷を持たない極性アミノ酸であるアスパラギン残基 (N) やグルタミン残基 (Q) に置換したところ、シェディング感受性になることがわかった (図 3、QNQNNN)。さらに 6 つの酸性アミノ酸を正電荷を持つ塩基性アミノ酸であるリジン残基 (K) に置換したところ、わずかにシェディング感受性が亢進する傾向が見られた (図 3、KKKKKK)。これらの結果は、負電荷を持つ酸性アミノ酸残基がシェディング切断部位付近に存在することでシェディングが阻害されることを示唆していた。

次にこの 6 つの酸性アミノ酸残基のうちどの残基がシェディングの阻害に必要であるか検討した。6 つの酸性アミノ酸を全て電荷を持たない極性アミノ酸に置換した変異体 (QNQNNN) について、N 末端側と C 末端側から順に酸性アミノ酸に戻っていったところ、N 末端側でも C 末端側でも 2 つの酸性アミノ酸に戻すことでシェディング感受性がほとんど無くなることがわかった。この結果は酸性アミノ酸の位置ではなく数がシェディング感受性を規定していることを示唆していた。

さらに 6 つの酸性アミノ酸を塩基性アミノ酸に置換した最もシェディング感受性の強い変異体について、その切断配列を同定したところ、推定膜貫通領域から 14 番目と 15 番目のアミノ酸の間で切断されることがわかった。第 1 3 エクソンが存在しないシェディング感受性の ALCAM スプライシングバリエントは推定膜



貫通領域から 15 番目と 16 番目のアミノ酸の間で切断されることから、ALCAM をシェディングする酵素は膜からの距離に比較的厳格であり、その近傍に酸性アミノ酸が存在すると切断できなくなることが示唆された（以上いずれも未発表データ）。

<考察と今後の展望>

ここまで述べてきたように、本研究では残念ながらシェディング感受性の接着分子 ALCAM が接着以外に持つ機能を明らかにすることはできなかった。現在 CADM1 にシェディング感受性を付与する第 9 エキソンを欠失したマウスを作成中であり、その解析からシェディング感受性と耐性の接着分子を作り分ける生理的な意義を明らかにできるのではないかと期待している。ALCAM にシェディング耐性を付与する第 13 エキソンを欠失したマウスの作成も今後検討していきたい。

今回の研究から、ALCAM のシェディング感受性が切断部位近傍に存在する酸性アミノ酸によって阻害されることが明らかとなった。CADM1 のシェディングが切断部位近傍の O 型糖鎖修飾によって阻害されるといふ結果と合わせて考えると、シェディング感受性を決める分子機構について新しい考え方が生まれるように思う。これまで漠然と考えられてきたようにシェディングされやすいアミノ酸配列を持つものが積極的にシェディング感受性になるのではなく、ほとんどの膜タンパク質が糖鎖修飾や酸性アミノ酸によって保護されシェディング耐性である中で、かろうじて切断酵素が入り込める隙間のある膜タンパク質がシェディングされているのではないだろうか。多くの膜タンパク質が糖鎖修飾を受けることを考え合わせると、影響力の強いシェディングからほとんどの膜タンパク質が保護されているとするこの考えは妥当なのではないかと考えている。

我々は CADM1 の切断酵素は TNF α のシェディングを担う TACE (TNF α converting enzyme) であること、シェディング切断部位は推定膜貫通領域から 14 番目と 15 番目のアミノ酸の間であることを明らかにしている。すでに ALCAM の切断酵素も TACE であるという予備的な結果を得ているので、TACE のシェディングは必ず膜から 14~15 番目のアミノ酸で起こり、その付近に糖鎖や酸性アミノ酸が存在するとシェディングできなくなるというシェディングの特異性を決める一般則が見えてきている。ガンの発症に関わる増殖因子、生活習慣病を含む慢性炎症を基盤とする様々な疾患の原因となる炎症性サイトカイン、神経変性疾患に関わるアミロイド前駆体タンパク質など、実に様々な疾患に関わる膜タンパク質がシェディングを受ける。今後もシェディングの制御機構を明らかにする基礎的な研究を続けることで、シェディングに関わる疾患の新しい治療方法の構築に貢献したいと考えている。