

学 位 論 文 題 名

Biochemical Study on gp64, a Putative Cell-Cell
Adhesion Protein of the Cellular Slime Mold,
Polysphondylium pallidum

(細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* の
細胞接着タンパク質 gp64の生化学的研究)

学位論文内容の要旨

近縁の *Dictyostelium discoideum*と同様、細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum*の細胞集合は、中心細胞から放出される走化性物質とそれを受容する周辺細胞のシグナルリレー系、細胞間接着タンパク質に支配され、最終的に数万の細胞からなる集合体が形成される。細胞性粘菌の細胞接着の分子的仕組みの解析は、粘菌の細胞集合のみならず発生機構の分子的基礎をなすと考えられる。

*P. pallidum*ではEDTA耐性の2種の細胞間接着成分が存在している。一つは、マイナーな成分で集合前期に発現し始め、もう一つは主要な成分で増殖期から発生後期にかけて存在するものである。この主要な成分は、一価抗体による接着阻害実験から分子量 64 kDaの糖タンパク質(gp64)であることが明らかにされた。精製gp64に対して作製した単クローン性抗体は *P. pallidum*の細胞接着を阻害し、この阻害能はL-フコースにより中和された。この結果は、gp64の糖鎖が細胞接着に関与することを示唆している。

これまで、細胞性粘菌の細胞間接着タンパク質の構造に関する研究はほとんどなされていない。*P. pallidum*のgp64は *D. discoideum*の細胞接着タンパク contact sites A (cs A)よりも量的に多いことから構造解析に適したタンパク質である。そこで、タンパク質の構造解析をする前提としてgp64の大量精製のシステムを確立した。本精製法は、界面活性剤による可溶化、超遠心による可溶化成分の分離、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAEセルロース・クロマトグラフィーの4つのステップか

らなる。特に有効なステップは硫酸アンモニウムによる塩析の過程で、2.5 M~3.0 Mの硫酸で現れる不溶性の浮上画分を回収することにある。本方法により 3×10^{10} の集合期の細胞から 6.4 mg の gp64 を短時日で精製する事ができる。

先に決定されていた gp64 の cDNA 配列から、gp64 のアミノ酸配列には次の3つの構造上の特徴が見られた。1) 全体で10箇所のアスパラギン結合糖鎖の付加可能な部位が存在すること。2) N末端とC末端の両側に疎水性アミノ酸の配列が存在し糖脂質アンカーによる修飾が予想されること。3) cDNA 配列から予想されるアミノ酸320残基中システインが36残基存在すること。

そこで、これらの特徴に基づき gp64 がどのように細胞接着に関わるのか、その分子の機構を明らかにする目的で gp64 の構造解析を行った。

まず、糖鎖の種類を調べるために、精製 gp64 のヘキサミン分析を行ったところ、gp64 1分子あたり9.9分子のグルコサミンを検出したが、ガラクトサミンは検出されなかった。このことから、gp64 に存在する糖鎖はセリン・スレオニン結合型糖鎖ではなく、アスパラギン結合型であると判断した。糖鎖付加可能な配列を持つ10箇の小さなペプチドを精製し、各ペプチドについてアミノ酸組成分析とアミノ酸配列分析により糖鎖の有無を調べた。その結果、NX T/S の配列を持つ6箇所は全て糖鎖が付加しているが、NX C の4箇所については付加が認められなかった。

次に、N末端とC末端のプロセッシングと糖脂質アンカーによる修飾についての解析を行った。ピリジリエチル化 gp64 を直接エドマン分解に供することにより、N末端19残基からなるシグナル・ペプチドのプロセッシング（除去）があることを明らかにした。次に真のC末端を決定するため、ピリジリエチル化 gp64 をリシルエンドペプチダーゼで消化し逆相 HPLC で精製後、全てのペプチドの帰属を決定したが、C末端を含むと考えられるペプチドのみは回収できなかった。そこで、C末端にリジンを持つペプチド（リジンペプチド）を特異的に回収するアンヒドロトリプシン親和性カラムによりリジンペプチドとC末端ペプチドの分離を行い真のC末端を決定した。その結果真のC末端は予想より22残基N末端側の Ser 279 であることが明らかとなった。これらの特徴から gp64 は糖脂質アンカー型タンパク質と想定し、アンカーの構造解析を進めた。gp64 の糖脂質アンカーは Thy-1 antigen, variant surface glycoprotein (VSG) のようなフォスファチジルイノシトール特異的フォスホオリパーゼ C (PI-PLC) で切断される典型的なものとは異なり PI-PLC には非感受

性で、亜硝酸による脱アミノ反応により切断を受ける。しかも、脱アミノ反応によって生じる物質がフォスファチジルイノシトール (PI) とは異なった。アンカーに含まれる脂肪酸はエステル結合を切断する弱アルカリ処理では切断されず、アミド結合を切る強酸処理で切断されるものであった。主な脂肪酸は C22 : 0 でヒドロキシ脂肪酸は含まれていなかった。このことは、gp64の糖脂質アンカーが酵母などの下等真核生物に見られるセラミドを含むものであることを示唆するものである。そこで、脂肪酸抽出後のサンプルに長鎖塩基の有無を分析し、C18 ファイトスフィンゴシンを持つことを明らかにした。つまり、gp64の糖脂質アンカーは一般の PIを含むアンカーではなくフォスフォセラミドを含むものであることが明らかになった。細胞接着タンパク質には糖脂質アンカーを持つものが若干報告されているが、細胞性粘菌においては解析された接着タンパク質の全てが糖脂質アンカーを持つことが示されている。また、セラミドを持つ糖脂質アンカーは下等真核生物に限られており、細胞性粘菌の進化的立場を考える上でも興味深い点である。

最後にgp64 1分子あたり36残基存在するシステインの存在様式について調べた。まず SH基検出試薬 DACM による反応を行ない、36残基全てがS-S架橋を形成しているものと推定された。そこで、そのS-S架橋の位置を決定することにより他の接着タンパク質との topological な相同性を調べた。精製gp64を各種のタンパク質分解酵素により分解し、得られた全てのペプチドを逆相HPLCで2回精製後、アミノ酸組成分析とアミノ酸配列分析によりS-S架橋の位置を決定した。最終的に1分子あたり18箇所存在するS-S架橋のうち15箇所を決定した。その結果、フィブロネクチンや補体系のタンパク質に特徴的に見られるSushi domainを少なくとも5つ持つことが明らかとなった。Sushi domainの存在をS-S架橋構造を含めて明らかにしたのは無脊椎生物については本研究が初めてである。このドメインの機能についてはまだはっきりしていないが、タンパク質-タンパク質の相互作用に関与することが示唆されており、細胞接着にこのドメインがどのように関わるのか大変興味のある今後の課題である。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	落 合	廣
副 査	教 授	吉 川	正 明
副 査	教 授	高 橋	孝 行
副 査	助教授	奥 山	英登志

学 位 論 文 題 名

Biochemical Study on gp64, a Putative Cell-Cell Adhesion Protein of the Cellular Slime Mold, *Polysphondylium pallidum*

(細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* の
細胞接着タンパク質 gp64の生化学的研究)

細胞性粘菌の細胞接着の分子的仕組みの解析は、粘菌の細胞集合のみならず発生機構の分子
的基礎をなす研究と考えられる。 *Polysphondylium pallidum*ではEDTA 耐性の2種の細胞
間接着成分が存在している。一つは、マイナーな成分で集合前期に発現し始め、もう一つは主
要な成分で増殖期から発生後期にかけて存在するもので分子量 64 kDa の糖タンパク質 (gp64)
である。

これまで、細胞性粘菌の細胞間接着タンパク質の構造に関する研究はほとんどなされていな
い。 *P. pallidum* の gp64 は *D. discoideum* の細胞接着タンパク質 contact sites A (cs A) より
も量的に多いことから構造解析に適したタンパク質である。そこで、申請者はタンパク質の
構造解析をする前提としてまずgp64 の大量精製のシステムを検討し、 3×10^{10} の集合期の細
胞から 6.4 mg の gp64 を短時間で精製するシステムを確立した。

先に決定されていた gp64 の cDNA 配列から、申請者はgp64 のアミノ酸配列に次の3つの
構造上の特徴を認めた。1) 全体で 10 箇所のアスパラギン結合糖鎖の付加可能な部位が存在す
ること。2) N末端とC末端の両側に疎水性アミノ酸の配列が存在し糖脂質アンカーによる修飾

が予想されること。3) cDNA 配列から予想されるアミノ酸 320 残基中システインが36 残基存在すること。

まず、糖鎖の結合部位を明らかにするために、糖鎖付加可能な配列を持つ 10 箇の小さなペプチドを精製し、各ペプチドについてアミノ酸組成分析とアミノ酸配列分析により糖鎖の有無を調べた。その結果、NXT/S の配列を持つ6箇所には全て糖鎖が付加しているが、NXC の4 箇所には付加を認めなかった。

次に、N末端とC末端のプロセッシングと糖脂質アンカーによる修飾についての解析を行った。ピリジリエチル化 gp64 を直接エドマン分解し、N末端 19 残基からなるシグナル・ペプチドのプロセッシング（除去）があることを明らかにした。次に真のC末端を決定するため、C末端にリジンを持つペプチド（リジンペプチド）を特異的に回収するアンヒドロトリブシン親和性カラムによりリジンペプチドとC末端ペプチドの分離を行い真のC末端を決定した。その結果真のC末端は予想より22 残基 N末端側の Ser 279 であることを明らかにした。これらの特徴から gp64 は糖脂質アンカー型タンパク質と想定し、アンカーの構造解析を進めた。gp64 の糖脂質アンカーはフォスファチジル・イノシトール特異的フォスホリパーゼ C (PI-PLC) に非感受性で、亜硝酸による脱アミノ反応により切断を受けた。また、脱アミノ反応によって生じた物質はフォスファチジルイノシトール (PI) ではなかった。主な脂肪酸は C22:0 でこれらの脂肪酸はアミド結合型のものであった。このことは、gp64 の糖脂質アンカーがセラミドを含むものであることを示唆するものである。そこで、脂肪酸抽出後のサンプルを長鎖塩基の有無について分析し、C18 ファイトスフィンゴシンを持つことを明らかにした。つまり、gp64 の糖脂質アンカーは一般の PI を含むアンカーではなくフォスフォセラミドを含むものであることを明らかにした。

最後に gp64 1 分子あたり 36 残基存在するシステインの存在様式について調べた。精製 gp64 を各種のタンパク質分解酵素により分解して得られた全てのペプチドをアミノ酸組成分析とアミノ酸配列分析により S-S 架橋の位置を決定した。最終的に 1 分子あたり18 箇所存在する S-S 架橋のうち 15 箇所を決定した。その結果、gp64 がフィブロネクチンや補体系のタンパク質に特徴的に見られる Sushi domain を少なくとも 5 つ持つことを明らかにした。Sushi

domain の存在をS-S 架橋構造を決定して明らかにしたのは無脊椎生物については本研究が初めてである。このドメインの機能についてはまだはっきりしていないが、タンパク質-タンパク質の相互作用に関与することが示唆されており、細胞接着にこのドメインがどのように関わるのか新たな展望を開いたものといえる。 7編の参考論文のうち6編は英文で、米国生化学会誌 (J. Biol. Chem. 誌) の2編を含め権威有る国際誌に投稿されており、最終試験の結果も満足するものであった。 審査員一同は申請者が博士 (理学) の学位を受ける十分な資格を有すると認めた。