

2003年12月22日
独立行政法人 理化学研究所

ADAM プロテアーゼの糖鎖修飾が器官形成に必須の役割を果たすことを証明

- ADAM プロテアーゼが関与する疾患のメカニズム解明に手がかり -

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、線虫を用いて、ADAM プロテアーゼ^{*1}の一種である MIG-17 が、新規タンパク質 MIG-23 により糖鎖修飾を受けること、さらにこの糖鎖修飾が MIG-17 による器官形成過程の細胞移動の調節に必須であることを明らかにしました。発生・再生科学総合研究センター（竹市雅俊センター長）細胞移動研究チームの西脇清二チームリーダーらによる研究成果です。この研究は独立行政法人科学技術振興機構・名古屋大学の松本邦弘教授、独立行政法人産業技術総合研究所の地神善文博士の研究グループとの共同研究で進められました。

ADAM プロテアーゼはコラーゲンやプロテオグリカン（皮膚や軟骨組織などの主成分）などの細胞外基質^{*2}の分解活性があり、その発生・分化における機能が注目されています。また、関節リウマチなどの自己免疫疾患や血液凝固に関係する遺伝性疾患への関与が明らかにされており、がん細胞の浸潤・転移への関与も示唆されています。ADAM プロテアーゼは糖鎖修飾されたタンパク質ですが、これまで、その糖鎖修飾の機構と役割は不明でした。本研究では線虫の分泌型 ADAM プロテアーゼである MIG-17 を研究対象として、遺伝学、細胞生物学、分子生物学、生化学など多角的な手法を用いて、糖鎖修飾が生体内での ADAM プロテアーゼの機能に必要な不可欠な役割を果たしていることを明らかにしました。

これらの成果は種々の疾患や病態における ADAM プロテアーゼの働きを明らかにする重要な手がかりになると同時に、タンパク質の糖鎖修飾とその機能的重要性に関する理解を大きく前進させるものです。この成果は英国の科学雑誌『Nature Cell Biology』のウェブサイト上のアドバンス・オンライン・パブリケーション（AOP・12月22日付、日本時間12月22日）に発表されるとともに、2004年1月号に掲載されます。

1. 背景

動物の器官形成には細胞同士の情報交換、接着や移動などが適切に行われる必要があります。このため細胞は様々なタンパク質を細胞外に分泌します。この中には細胞外基質の成分であるコラーゲンやプロテオグリカンのようなタンパク質、およびそれを分解するタンパク質分解酵素などがあります。これらのタンパク質はほとんどが表面に糖鎖を持つ糖タンパク質です。これまでも糖鎖修飾の機能的重要性は指摘されてきましたが、技術的な難しさもあり、生体内での糖鎖の機能はまだよく分かっていませんでした。西脇チームリーダーらは線虫（*C. elegans*）（写真1）を使って、分泌型の ADAM プロテアーゼである MIG-17 が生殖巣（哺乳類の卵巣や精巣に相当）の形態形成に必須の役割を果たすことを既に明らかにしていました。今回の研究では、生殖巣形成過程で MIG-17 と共同してはたらく新規タンパク質 MIG-23 を発見しました。また MIG-23 が細胞内のゴルジ体^{*3}で機能するヌクレオ

シド2リン酸分解酵素^{*4} (NDPアーゼ) であり、MIG-17が細胞から分泌される過程で糖鎖を付加する働きがあることを突き止めました。さらに、このMIG-23によるMIG-17の糖鎖修飾が、MIG-17の機能に必須であることを明らかにしました。

2. 研究手法と成果

線虫の生殖巣はU字型の形態をしています。これは生殖巣原基の先端細胞が幼虫期にU字型の移動を行うことにより形成されます(写真2)。この細胞の移動にはADAMプロテアーゼであるMIG-17の働きが必要です。MIG-17は筋肉細胞で作られて、体腔中に分泌された後、生殖巣に付着して働き、先端細胞が移動することが分かっています。突然変異によって線虫のMIG-17の機能が失われると、生殖巣を形作る先端細胞が正常な道筋を通らなくなり、生殖巣の形態が異常となります(写真2)。MIG-17突然変異体と同じように先端細胞の移動経路が異常となる変異体を多数分離しました。このうちのひとつMIG-23突然変異体を調べたところ、これはゴルジ体内でタンパク質の糖鎖修飾を行うNDPアーゼに似たタンパク質が変異を起こしていることが分かりました。

MIG-23突然変異体においてNDPアーゼの活性を測定したところ、活性が低下していました。また、酵母菌のNDPアーゼの突然変異体にMIG-23を入れてやるとNDPアーゼの活性が回復することも突き止めました。これらの結果からMIG-23は予想どおりNDPアーゼであることが分かりました。

MIG-23変異体がMIG-17変異体と同じ生殖巣の形態異常を示すことから、MIG-23変異体においてMIG-17タンパク質の糖鎖修飾が異常となっている可能性があります。そこで電気泳動法^{*5}などを用いてMIG-17の糖鎖修飾を調べたところ、正常な分子に比べて結合している糖鎖の量が少ないことが分かりました。このことからMIG-23変異体ではMIG-17の糖鎖修飾が不十分であるためにMIG-17が正常に働かないことが考えられます。蛍光抗体法^{*6}を用いてMIG-17が生殖巣に付着するかどうかを調べたところ、MIG-23変異体ではほとんど付着しないことがわかりました(写真3)。

糖鎖修飾を持たないMIG-17タンパク質を人工的に作成し、MIG-17突然変異体に入れたところ、生殖巣には付着せず、細胞移動を調節する機能もないことが分かりました。最後に、遺伝学的手法を用いてMIG-23が働いている細胞を調べたところ筋肉細胞であることも分かりました。これはMIG-17が筋肉細胞で作られることと一致しています。

以上の結果からMIG-17は筋肉細胞で作られ、MIG-23によって糖鎖修飾された後、細胞外に分泌され、生殖巣に付着して働くことが明らかになりました(図4)。

3. 今後の展望

MIG-23のようなNDPアーゼはゴルジ体内で様々な分泌タンパク質の糖鎖の修飾を行っていると考えられます。本研究から明らかになったことはNDPアーゼの異常が意外にもADAMプロテアーゼという限られたタンパク質の糖鎖修飾と機能に顕著な影響を及ぼすことです。これは他の分泌タンパク質に比べてADAMプロテアーゼは糖鎖による修飾が特に重要であることを示唆しています。先に述べたようにADAMプロテアーゼの種々の疾患への関与が分かってきており、このような

疾患の原因として ADAM プロテアーゼの糖鎖修飾の異常も考えられます。また逆に ADAM プロテアーゼの糖鎖を何らかの方法で改変することにより、ADAM プロテアーゼの機能を調節し、疾患の治療へつなげる可能性も期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

神戸研究所 発生・再生科学総合研究センター

細胞移動研究チーム チームリーダー 西脇 清二

Tel : 078-306-3262 / Fax : 078-306-3261

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 ADAM プロテアーゼ

ADAM プロテアーゼは、メタロプロテアーゼ・ディスインテグリン (A Disintegrin And Metalloprotease) ファミリーというグループに属するタンパク質分解酵素。メタロプロテアーゼとディスインテグリンは共にヘビ毒から発見された成分で、出血作用や血液凝固阻害作用がある。この2つの分子が結合した形態 (メタロプロテアーゼ・ディスインテグリン) を持つ様々なタンパク質や酵素が種々の動物の組織中に存在し、各種の細胞間相互作用に関わっていることが近年明らかになってきている。

※2 細胞外基質

細胞から分泌されるコラーゲンやプロテオグリカンなどを含む多種類のタンパク質が作る複合体で、組織や器官の隙間に存在する。動物の発生や病態において重要な役割を果たしている。

※3 ゴルジ体

細胞内の小器官で分泌タンパク質の通り道。タンパク質はゴルジ体の中で糖鎖を付加される。

※4 ヌクレオシド 2 リン酸分解酵素 (NDP アーゼ)

ヌクレオシド 2 リン酸をヌクレオシド 1 リン酸とリン酸に分解する酵素。ゴルジ体の中でタンパク質の糖鎖修飾を行う。

※5 電気泳動法

アクリルアミドゲル中に置いたタンパク質に電場をかけると、タンパク質がその大きさ（分子量）に応じた速度でゲル中を移動するので、この方法によりタンパク質の分子量を測定できる。

※6 蛍光抗体法

目的とするタンパク質に対する抗体に蛍光色素を付加しておき、組織標本に結合させることにより、組織標本中のタンパク質の分布を調べる方法。



写真1 線虫 (*C. elegans*)

C. elegans (正式には *Caenorhabditis elegans*) は、土壤中に生息する体長約 1mm の自活性の線虫で、現在、世界的に最も注目を集めているモデル実験動物である。2002年のノーベル医学生理学賞が、英、米の線虫研究のパイオニア 3 人に授与された。

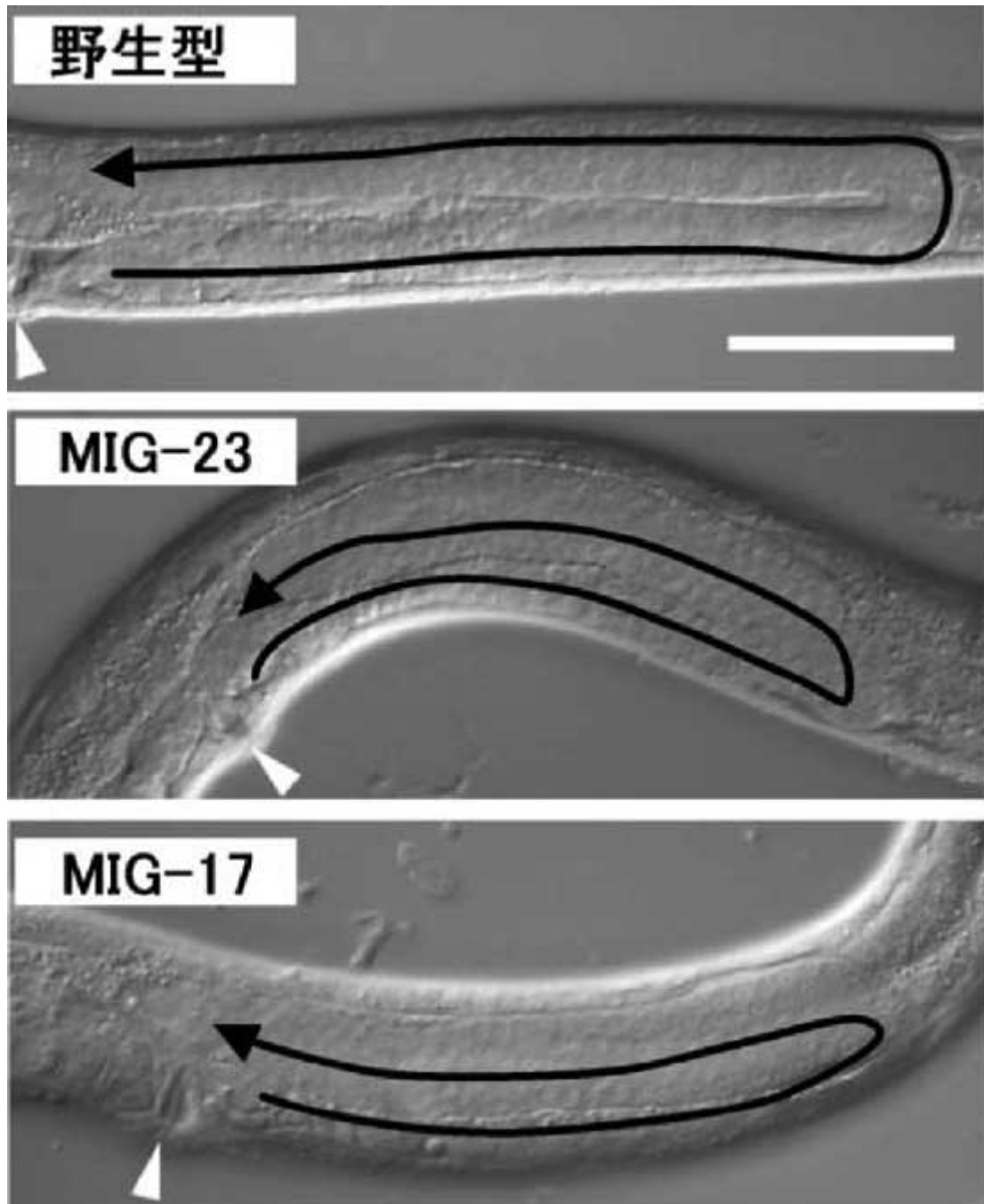


写真2 変異体に見られる生殖巣の形態異常

生殖巣の形態（先端細胞の移動）を線と矢印で示した。写真の上側が背側、下側が腹側。矢尻は産卵口。野生型では生殖巣はU字型をしているが、MIG-23とMIG-17変異体では先端細胞の移動異常により、生殖巣が背側までとどかずU字を押しつぶしたような形になっている。

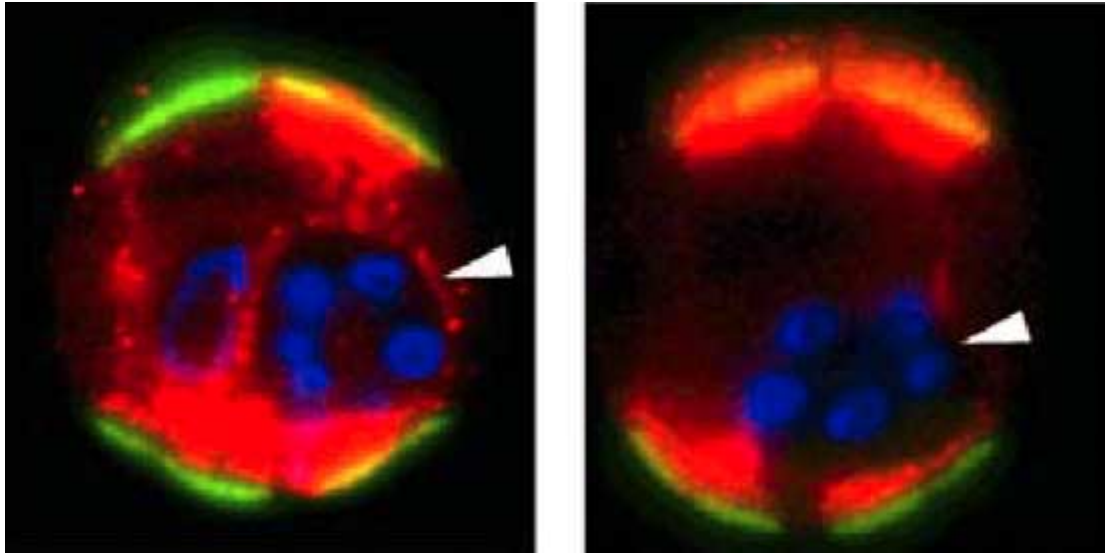


写真3 MIG-17 タンパク質の生殖巣上への付着

線虫の横断面の標本。(左) 野生型。MIG-17 タンパク質 (赤) は背側と腹側の筋肉 (緑) から分泌されて生殖巣管の上に付着する (矢尻)。環状に配置された青色の丸は生殖巣内の生殖細胞の核である。(右) MIG-23 変異体。MIG-17 タンパク質 (赤) はほとんど生殖巣管に付着しない (矢尻)。

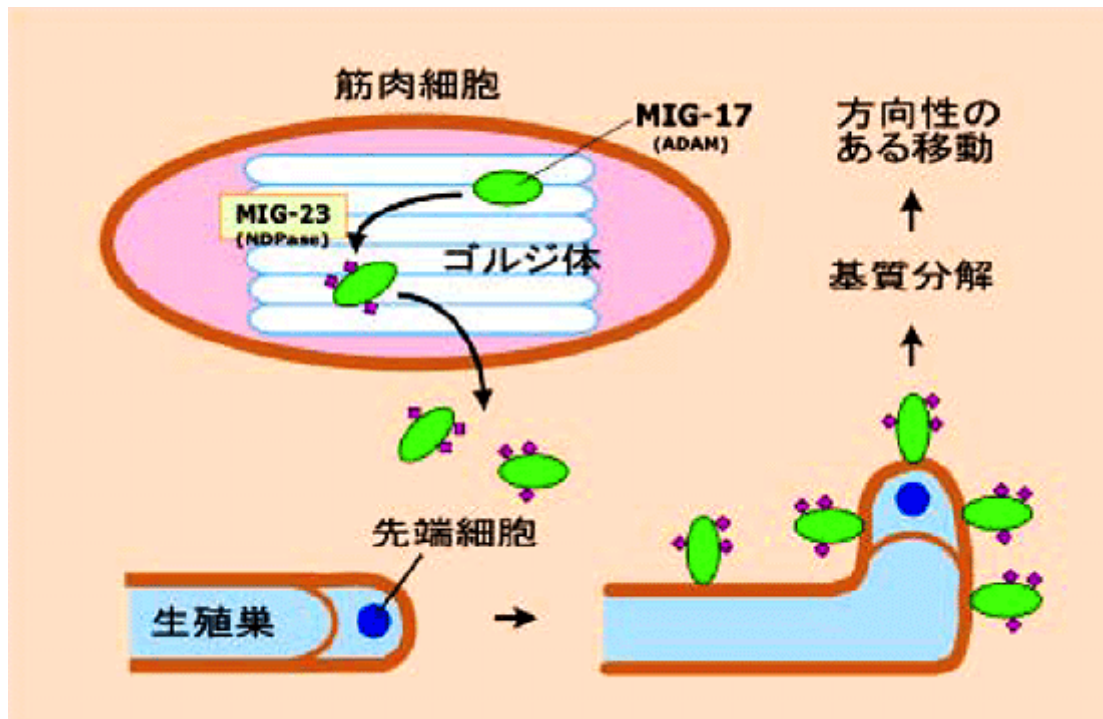


図4 MIG-17 は筋肉細胞のゴルジ体の中で MIG-23 の働きにより糖鎖修飾(ピンク)を受ける。その後体腔に分泌されて生殖巣に付着すると何らかの基質(未解明)を分解し、先端細胞は方向性のある移動ができるようになる。