

主論文の要旨

**Dermatan sulphate is an activating ligand of
anaplastic lymphoma kinase**

〔デルマトン硫酸は未分化リンパ腫キナーゼの活性化リガンドである〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

町野 正明

【緒言】

未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)は、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)ファミリーに属するI型膜貫通型タンパク質であり、その細胞内チロシンキナーゼ活性は、特定のリガンドによる受容体クラスターリングによって増強される。ALKの強力な生物活性は、未分化大細胞リンパ腫(ALCL)におけるt(2; 5)(p23; q35)染色体転座によってヌクレオフォスミン(NPM-ALK)に融合したALKが産生されたときに最初に発見された。

2015年にMurrayらは、ヘパラン硫酸(HS)とその過硫酸化部分ヘパリン(HP)は、ALKの新規活性化リガンドであると報告した。HSはコンドロイチン硫酸(CS)、デルマトン硫酸(DS、CS-Bとしても知られている)、およびケラタン硫酸(KS)とともに、グリコサミノグリカン(GAG)として分類される分岐を欠く線状糖鎖である。GAGは、RTKのような受容体のクラスターリング制御において重要であり、不均一な硫酸化を伴う反復二糖ユニットで構成されている。更にMurrayらは、鎖長の短いHPはALKを活性化しなかったが、より長いヘパリン鎖はALKの二量体形成と活性化を誘導したと報告した。またHSフォームとして、ALKのN末端領域(NTR)との相互作用に十分なHSは八糖型であることを示した。

本研究は、HSと同じようにCSまたはDSなど他のGAGもALKのリガンドであるかどうかを検証することを目的とした。

【方法】

表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance, SPR)

BIACORE X-100(GE Healthcare)を使用して実施した。SPR分析は、表面への分子の吸脱着挙動を金属表面近傍の屈折率変化として非標識かつリアルタイムで追跡できる方法である。ALKのNTR(Proteintech)は、CM5センサーチップに固定化され、ALKのNTRとCS、DSとの相互作用を検証した。異なる硫酸化パターンのCSおよびDSの溶液(20 μ g/mL)を分析対象物として注入した。速度論的解析では、分析対象物の段階希釈(0、1.6、8、40、200、および1000 nM)を30 μ l/分で再生せずに連続的に注入した。結合パラメーターは、1:1結合フィッティングモデルで計算され、すべてのGAGの分子量は10,000と推定された。

Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

神経芽細胞腫細胞株NB-1を18時間血清飢餓状態にして、DSにて15分間刺激した。NB-1に異なる濃度のDSを投与し、ALKとリン酸化ALKの発現をWestern blotting法にて確認した。デンストメトリー分析は、ImageJソフトウェアを使用して220 kDaの分子量(p220-ALK)のバンドの定量化を行った。

免疫細胞化学的分析(Immunocytochemistry, ICC)

NB-1細胞を18時間血清飢餓状態にした後、2.5 μ MのDSで15分間刺激した。NB-1にDS十六糖(dp16)を投与し、リン酸化ALKの発現を免疫染色にて観察した。画像は

BZ-9000 顕微鏡 (KEYENCE) で撮影した。

Pull-down assay

全長 ALK および NTR を欠く短縮型 ALK (ALK Δ NTR) を HEK293T 細胞に 2 日間過剰発現させ、免疫沈降法にてタンパク質間の相互作用を検証した。全長 ALK はビオチン結合化 DS によって正常にプルダウンされるか、DS が ALK の特異的リガンドであるかを確認した。

【結果と考察】

ALK の NTR 上の塩基性アミノ酸クラスターは、イオン結合を介して HS と相互作用することが報告されている (図 1A)。SPR 分析にて、DS は ALK の NTR との有意な相互作用を示したが、他の硫酸化パターンを含む CS フォームは ALK に結合しなかった (図 1B)。ALK の NTR と CS または DS の間の相互作用の速度論的解析では、センサーグラムのカーブから DS と ALK の間のみ有意な相互作用を示した。DS と ALK の親和性の指標となる解離定数 (K_D) は、 2.922×10^{-8} M であった。他の硫酸化パターンを含む CS フォームは ALK と一定の親和性を示さなかった (図 1C および 1D)。

内在性に ALK の発現を認める NB-1 細胞において、DS が ALK を活性化するかどうか検証した。Western blotting 法にて DS 二糖 (dp2) を除いて、DS 四糖 (dp4) より長い DS は、ALK の自己リン酸化を用量依存的に誘導し、ALK の活性化を促した (図 2A-D)。5 μ M では ALK を活性化しなかったが、天然 DS を使用しても同様の結果が得られた (図 2E)。デンシトメトリー分析にて図 2A から E の定量化を行い、ALK に対するリン酸化 ALK の比率をプロットした。dp4 より長い DS は ALK の自己リン酸化を濃度依存的に誘導し ALK を活性化した (図 2F)。NB-1 細胞を 2.5 μ M の DS で刺激し、鎖長が長いほど ALK の活性化が強くなった (図 2G)。ヘパリンの場合と同様に、より長い糖鎖は ALK のより強い自己リン酸化を誘導し、より長い DS が ALK のクラスターリングを促進する傾向があることを示した (図 2H)。注目すべきことに、同じ濃度の DS 十六糖 (dp16) と HP 二十糖 (dp20) は、同様のレベルで ALK の活性化を誘導した (図 2I)。

140 kDa の ALK (p140-ALK) は、選択的転写開始、細胞外切断、または選択的スプライシングの結果によって生成される短縮型 ALK であり、これらのアイソフォームのいくつかは NTR を欠いていると報告されているため、まだ特徴付けられていない。本実験では、特に高濃度の DS によって、ALK がリン酸化されていた。更なる研究が必要であるが、NTR は DS の主な特異的結合部位であることが示された。

免疫細胞化学的分析にて、NB-1 細胞に DS dp16 投与することでリン酸化 ALK のシグナルが亢進し、DS が ALK のリガンドであることを確認した (図 3)。

ALK の NTR の重要性にさらに取り組むために、全長 ALK と NTR を欠く短縮型 ALK (ALK Δ NTR) を HEK293T 細胞に過剰発現させた。その後、細胞溶解物をビオチン結合 DS と混合し、ストレプトアビジンでプルダウンした。ALK Δ NTR は DS によってプルダウンされず、全長 ALK は DS によって正常にプルダウンされた。これにより DS

が ALK の NTR の特異的リガンドであることを確認した(図 4A)。2.5 μM の DS dp16 および天然 DS は、全長の ALK を活性化したが、一貫して ALK Δ NTR の活性化を誘導できなかった(図 4B および 4C)。これにより ALK 上の NTR が DS の強い結合部位であることを結論付けた。

本研究によって、DS が ALK の特異的リガンドであることを示された。ALK は、細胞内領域にチロシンキナーゼドメインを含み、中枢神経系と末梢神経系の両方で発現する RTK である。また DS はデコリンやバイグリカンなどのコアタンパク質に結合しプロテオグリカンとして複合体を形成しており、それらは皮膚、血管、骨、神経系に多く存在している。DS は HS と ALK 結合部位を共有しており、糖鎖が長いほど HS よりも高い活性を示した。HS 八糖は ALK 活性化に十分であったが、DS 四糖も ALK 活性化に十分であった(図 4D)。興味深いことに、CS は ALK に対して親和性を示さなかった。DS と CS の違いは、存在するウロン酸(UA)の形態であり、DS にはイズロン酸(IdoA)が含まれ、CS にはグルクロン酸(GlcA)が含まれる。注目すべきことに、HS の一部には UA コンポーネントとして IdoA が含まれている。このことから、本研究結果は、IdoA が ALK による認識の重要な要素である可能性があることを示唆している。

【結論】

DS が ALK の新しいリガンドであることが証明された。DS は ALK の NTR と直接相互作用し、DS 四糖は ALK の活性化に十分な誘導能を示した。