

軟骨分化に関与するプロテオグリカンおよび  
関連タンパク質の構造と機能

氏田 稔

報告番号 甲第 3126 号

# 目 次

	頁
第1章 緒論	1
第2章 プロテオグリカン-M (PG-M) のカルボキシル末端領域に 存在するレクチン様ドメインの糖結合活性	
序論	10
実験材料および実験方法	12
結果	15
考察	25
要約	29
引用文献	30
第3章 PG-Mのレクチン様ドメインが示す糖結合特異性および そのリガンド	
序論	34
実験材料および実験方法	36
結果	40
考察	53
要約	56
引用文献	57
第4章 オステオグリシンのcDNAクローニングおよびその発現	
序論	60
実験材料および実験方法	61
結果	63
考察	69
要約	72
引用文献	73
第5章 総論	75
謝辞	
報文目録	
報文	
参考論文目録	
参考論文	

## 略 語

aa	: amino acid(s)
bp	: base pair(s)
BSA	: bovine serum albumin
CBB	: Coomassie Brilliant Blue
Con A	: concanavalin A
CRP	: complement regulatory protein
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	: epidermal growth factor
FCS	: fetal calf serum
Fuc	: fucose
Gal	: galactose
GlcNAc	: <i>N</i> -acetylglucosamine
GST	: glutathione <i>S</i> -transferase
kb	: kilobase pair(s) or kilobase(s)
kDa	: kilodalton
Man	: mannose
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: phosphate-buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PG	: proteoglycan
PHA	: phytohemagglutinin
PNA	: peanut agglutinin
RCA I	: <i>Ricinus communis</i> agglutinin I
SBA	: soybean agglutinin
SDS	: sodium dodecyl sulfate
Sia	: sialic acid
TBS	: Tris-buffered saline
TGF- $\beta$	: transforming growth factor- $\beta$
t-PA	: tissue-type plasminogen activator
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
WGA	: wheat germ agglutinin

# 第1章

## 緒論

すべての細胞は糖鎖を表面に持つ細胞膜に包まれており、多細胞動物ではほとんどの細胞が複合糖質を含む細胞間物質に囲まれて存在している。多細胞動物とは、このような糖鎖に囲まれた細胞が集まり、組織、器官、そして個体を作られることにより出来上がる生命体であり、その完全な理解のためには各組織を構成する細胞の集合や接着の機構を分子レベルで解明することが不可欠であろう。近年、細胞間認識や細胞の細胞外マトリックスへの接着に対して糖鎖が特に重要な働きをすることが明らかになってきており、その多様で複雑な構造と機能の関係が多く研究者により調べられている。細胞表面の複合糖質は、その糖鎖を細胞の外側に露出している。この表面糖鎖は、その細胞に特有な表面構造の形成や性質の獲得に寄与し、細胞間相互作用や細胞外情報認識に関与しているとされている。細胞の分化やがん化などに伴い、細胞表面糖鎖が質的、量的に変化し、また、特定の糖タンパク質が出現あるいは消失することはよく知られているが、これらの糖鎖変化の生物学的意義については不明な点が多い。この問題に対する解決法の1つとして、特定の糖鎖と結合する分子、すなわち糖鎖の受容体を研究することがあげられる。糖鎖受容体の1つに動物体内に存在するレクチン、すなわち動物レクチンが想定されている。レクチンは特定の糖鎖構造を認識して結合するタンパク質であり、最初に植物で発見されたが、その後、動物や微生物でも見いだされ、現在、「動植物あるいは細菌で見いだされる免疫学的産物にあらざる糖結合性タンパク質で、結合価が2価以上で、動植物細胞を凝集し、多糖類や複合糖質を沈降させ、その結合特異性は、単糖やオリゴ糖を用いた阻止実験で規定することができるものでなくてはならない」(1)と定義されている。動物レクチンは、糖鎖の受容体として細胞の接着や細胞間の情報伝達に関与し、発生や分化の過程で重要な役割を果たしていると考え

えられており、免疫系の細胞間接着分子であるセレクチンはその一例である。しかし、現在、様々な組織から次々と新しい動物レクチンが単離されてはいるが、それらの機能は、ほとんど不明であり、研究の進展が待たれるところである。また、cDNA解析の結果から推定されたタンパク質のアミノ酸配列より、これまでレクチンとしては研究されていなかった分子、例えば、ある種のプロテオグリカンのコアタンパク質に糖認識ドメインと思われるレクチン様ドメインの存在することが明らかとなっており、このような未知のレクチンの存在をも考えると糖識別による細胞認識は、これまでに分かっている例よりもはるかに多いことが予想されて興味深い。今後、発生や分化における糖鎖情報の意義を考える時、特定の糖鎖とその受容体の相互作用と役割の研究が並行して進められるべきであろう。

糖識別による機構を含め、細胞認識の点から多細胞動物における発生や分化を考える時、細胞表面の構造とともに、その周囲に存在する物質群、すなわち細胞外マトリックス成分が注目される。細胞外マトリックスは動物組織中の細胞の外側に存在する安定な生体構造物で、細胞が合成、分泌し、その周囲に蓄積した生体高分子の複雑な会合体である。細胞外マトリックスの構成成分は、コラーゲン、接着性糖タンパク質、そしてグリコサミノグリカンおよびプロテオグリカンの3つに大別される。一般に細胞外マトリックスは組織あるいは発生段階により構成成分の種類と存在比が異なっており、時間的、空間的に目的に合った、それぞれに特徴のある構造を作りだし、細胞分化や形態形成を制御していると考えられている。これらの成分は単に混在しているのではなく、それぞれの分子中に含まれている特定の機能ドメイン間の結合により有機的に形成された高次構造体として存在する。細胞外マトリックスは、従来、生理的に不活性な単なる組織の構造支持体としか考えられていなかったが、最近の数多くの研究により、細胞接着、細胞骨格の配向、細胞の形態、移動、増殖、分化、細胞内の代謝などと深く関わっていることが分かってきた。このように高度に組織化された細胞外マトリックス系は、神経系や免疫系などとともに高等多細胞

胞動物にしか存在しない機構であり、高等動物の生物学における重要な研究対象であると思われる。

細胞外マトリックスを構成する分子として古くから研究されてきた成分の1つにグリコサミノグリカンがある。この一群の硫酸化酸性多糖の特徴は、ヘキサミン(グルコサミンまたはガラクトサミン)とウロン酸(またはガラクトース)から成る二糖単位の繰り返し構造および硫酸基(ヒアルロン酸を除く)とカルボキシル基による多量の負電荷であり、これらは主に構成糖の種類によりヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸、ケラタン硫酸およびヘパラン硫酸/ヘパリンに分けられる(Fig. 1-1)。ヒアルロン酸を除き、グリコサミノグリカンは生体内では一般にタンパク質(コアタンパク質と呼ばれる)のセリン残基に共有結合したプロテオグリカンの形で存在する。コアタンパク質の種類や選択的スプライシング、および結合するグリコサミノグリカン鎖の種類、鎖長、結合位置、本数などにより様々な構造のプロテオグリカンが存在する。また、グリコサミノグリカン鎖部分では結合する硫酸基の位置や数、あるいはウロン酸の異性化などにより、さらに複雑な多様性が生じている。しかし、その不均一性は決して無秩序ではなく、細胞分化や発現部位などに対応している例も数多く知られている。プロテオグリカンのコアタンパク質とグリコサミノグリカン鎖は、それぞれ特定の細胞外マトリックス成分、細胞表面分子あるいは成長因子と結合する能力があり、プロテオグリカンの構造的な多様性と不均一性は、これらの結合活性を調節している可能性がある。この多様な構造を持ち、かつ多機能な分子であるプロテオグリカンの存在は、生命の多様性、特に発生、分化、個体差などを含めた多細胞動物の多様性を考える上でとても興味深い。

軟骨のプロテオグリカンであるアグリカンは現在、最も研究が進んでいるプロテオグリカンの1つであり、軟骨に特徴的に含まれ、その組織乾燥重量の約50%を占める。アグリカンに結合している多数のコンドロイチン硫酸鎖などが大量の水を吸収しゲルを形成する。これにより軟骨は圧縮に耐えるという特有

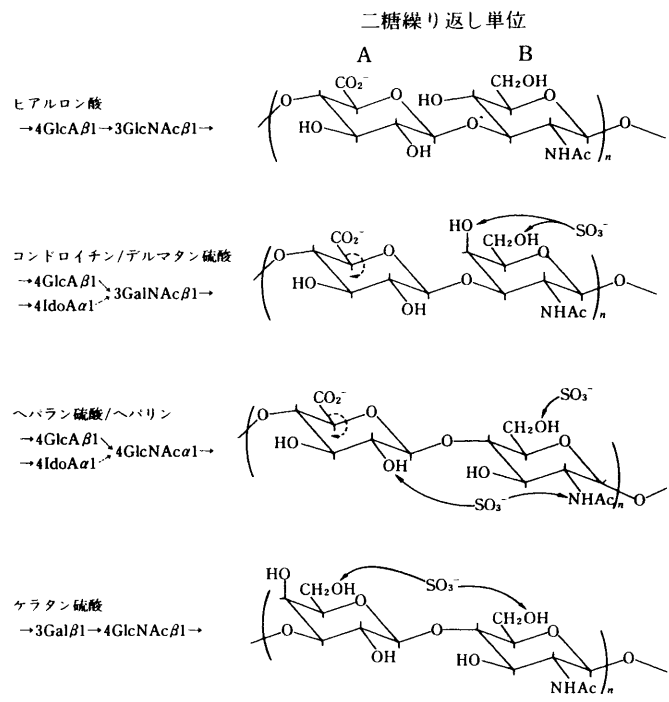


Fig. 1-1. Structures of glycosaminoglycans (2).



の性質を与えられる。アグリカンのコアタンパク質は、他の細胞外マトリックス分子と同様に周囲のマトリックス成分と結合する性質を持つ。すなわち、アミノ末端側の球状ドメインでリンクタンパク質とともにヒアルロン酸と結合することが示されており、また、カルボキシル末端側の球状ドメインは、コラーゲンの持つガラクトース残基など、様々な分子の糖残基と結合する可能性が示唆されている。このようにアグリカンは、そのコアタンパク質で他の周囲の分子と結合し、軟骨に特有な細胞外マトリックスを構成する。生体内にはコンドロイチン硫酸鎖を持つプロテオグリカンは他にもたくさん存在するが、コアタンパク質の結合活性が異なるため、アグリカンのように軟骨のプロテオグリカンとしては機能できないと思われる。各組織はそれぞれ異なる細胞外マトリックスを持っており、その構成分子と結合することのできるコアタンパク質を持つプロテオグリカンだけが特定の場所の細胞外マトリックス構成分子となれるのだろう。グリコサミノグリカン鎖の種類は同じでもコアタンパク質が異なる様々なプロテオグリカンが存在するのはこの理由によると考えられる。プロテオグリカンの機能をこのように考える時、グリコサミノグリカン鎖の活性と同時にコアタンパク質の性質にも注目する必要がある。近年、主にcDNAクローニングにより進められるコアタンパク質の解析の意義の1つはここにある。

一般に組織の細胞は、それぞれに特有の細胞外マトリックスに囲まれ、その機能を調節されているが、細胞外マトリックス分子の中にはその発現が場所的、時間的に制御されているものがある。それらは特に発生、分化において重要な働きをしていると考えられ、多くの研究者の注目の的になっている。そのような分子の例としてプロテオグリカン-M (PG-M) とプロテオグリカン-Lb (PG-Lb) があげられる。両分子の特異的な発現パターンから、これらの軟骨分化への関与が示唆されている。

四肢の発生系はパターン形成の機構を研究するのに最も適した実験系の1つである。四肢は枝芽とよばれる前後2対の間充織のふくらみから形成される。脊椎動物の四足類では四肢のパターン形成は基本的に同じであるが、実験が容易

に行えることからこの研究は主にニワトリ胚の肢の発生系で行われてきた。四肢のパターンは、最初に軟骨のパターンとして出現する。この軟骨が後に骨になることから、四肢のパターン形成の理解のためには、まず第一に軟骨分化の、特に分子レベルでの理解が必要であると考えられる。

肢芽は中胚葉の細胞から構成されており、ニワトリ肢芽は、翼では発生段階16、脚では発生段階17において出現する。その後、肢芽は伸長増大し、長さ  
と幅がほぼ同じになる発生段階23 (保温4日目) において肢芽間充織の中央部に細胞密度の高い領域が現れる (Fig. 1-2)。これが間充織凝集であり、この部位の細胞が後に軟骨へと分化することから、この細胞凝集は軟骨分化にとって非常に重要な現象であると考えられている。軟骨分化の過程で発現されるプロテオグリカン  
を調べたところ、軟骨が形成される前の肢芽では軟骨のプロテオグリカンであるアグリカンは明らかに異なるコアタンパク質を持つ大型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが存在することが明らかになった。これがPG-Mであり、フィブロネクチン、I型コラーゲン、ヒアルロン酸などとともに、この段階の肢芽間充織の主要な細胞外マトリックス成分である。抗PG-M抗体を用いた免疫組織学的研究から、PG-Mは肢芽の間充織凝集部位に特異的に発現し、軟骨の成熟とともに消失することが明らかとなった。このように凝集部位において一過性に発現する細胞外マトリックス分子は大変珍しく、間充織凝集および軟骨分化へのPG-Mの関与が示唆される (4)。また、実際に精製PG-Mは*in vitro*における肢芽間充織細胞の軟骨分化を促進する (5)。これにはPG-Mのコンドロイチン硫酸鎖の細胞接着阻害活性が関与していると考えられているが、同時にこの活性にはコアタンパク質の存在が不可欠であることも明らかになっている (6)。間充織細胞から分化した軟骨は、次いで四肢の基部-先端部方向に沿って全体が棒状形態をとり、形態的に異なる細胞から成る3種類の細胞層がその両端に現れる (Fig. 1-2)。先端に近い、丸く小さい細胞の層 (ゾーン1) では、細胞は活発に増殖し、軟骨は長軸方向に伸びていく。中心部の大きく肥大した細胞の層 (ゾーン3) では骨化が進み、やがて両端の軟骨を

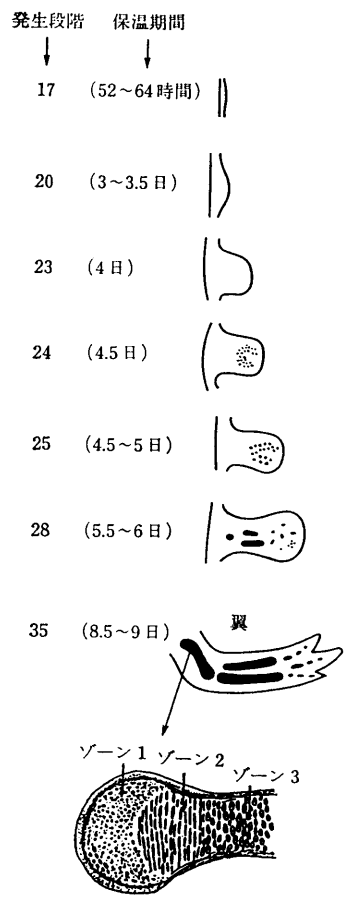


Fig. 1-2. Cartilage development in chick limb buds (3).

残して全体が骨へと置き換わる。これらの間の細胞層（ゾーン2）は扁平な細胞から成るが、この領域には小型デルマトン硫酸プロテオグリカンであるPG-Lbが特異的に発現しており、特に細胞形態および軟骨分化との関連が示唆されている(7)。PG-Lbのコアタンパク質はロイシンリッチプロテインファミリーに属し、特にその中でオステオグリシンと相同性が高い(8)。オステオグリシンは最初にウシの骨から単離された糖タンパク質であるが、ヒトとウシでcDNAクローニングが行われているだけであり、また、生物学的機能、生体内分布などについては全くわかっておらず、研究の進展が待たれるところである。TGF- $\beta$ は軟骨分化に関与しているとされ、また、TGF- $\beta$ ファミリーに属するアクチビンやbone morphogenetic protein (BMP) は軟骨分化において間充織細胞の凝集を促進することが知られている。このようにTGF- $\beta$ ファミリーの成長因子は間充織凝集と軟骨形成に必要な因子と考えられる(9)。TGF- $\beta$ はいくつかのプロテオグリカンのコアタンパク質に結合することが知られており、それらにはデコリン、バイグリカンおよびフィブロモジュリンのコアタンパク質が含まれる(10)。これらのコアタンパク質はオステオグリシンと同様にロイシンリッチプロテインであり、正確なTGF- $\beta$ 結合部位はまだ決定されていないが、TGF- $\beta$ がオステオグリシンと結合する可能性は充分にある。この結合がTGF- $\beta$ による軟骨分化の促進を制御していることも考えられ、また、PG-Lbとの分子構造の類似性からオステオグリシンが直接に軟骨分化に関与していることも予想される。

本研究では軟骨分化に関与すると考えられるPG-Mおよびオステオグリシンの構造と機能に関する研究を行った。肢芽のプロテオグリカンであるPG-Mのコアタンパク質の活性に注目し、そのカルボキシル末端領域に存在するレクチン様ドメインの糖結合活性を調べるとともに、この結合に対する肢芽内のリガンドの探索を行った。その上でPG-Mコアタンパク質の軟骨分化への関与、特にカルボキシル末端領域のレクチン活性の間充織凝集への寄与について考察した。オステオグリシンについては、今後の研究のための基礎データを蓄積する

目的でマウスのオステオグリシンのcDNAクローニングを行い、また、その組織分布について検討した。

## 引用文献

1. Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T., and Sharon, N. (1980) *Nature* 285, 66
2. 木全弘治, 羽渕脩躬, 羽渕弘子 (1993) 糖鎖の多様な世界 (木幡陽, 箱守仙一郎, 永井克孝編) pp. 105-180, 講談社
3. 木全弘治 (1992) 蛋白質 核酸 酵素 37, 1847-1857
4. Shinomura, T., Jensen, K. L., Yamagata, M., Kimata, K., and Solursh, M. (1990) *Anat. Embryol.* 181, 227-233
5. Shinomura, T., Nishida, Y., and Kimata, K. (1992) in *Articular Cartilage and Osteoarthritis* (Kuettner, K. E., Schleyerbach, R., Peyron, J. G., and Hascall, V. C., eds) pp. 35-44, Raven Press, New York
6. Yamagata, M., Suzuki, S., Akiyama, S. K., Yamada, K. M., and Kimata, K. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 8012-8018
7. Shinomura, T., Kimata, K., Oike, Y., Yano, S., and Suzuki, S. (1984) *Dev. Biol.* 103, 211-220
8. Shinomura, T., and Kimata, K. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 1265-1270
9. 濃野勉, 野地澄晴 (1993) 蛋白質 核酸 酵素 38, 2566-2581
10. Yamaguchi, Y. (1993) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 5, 428-437

## 第 2 章

### プロテオグリカン-M (PG-M) のカルボキシル末端領域に 存在するレクチン様ドメインの糖結合活性

#### 序 論

PG-Mは、ニワトリ肢芽の間充織凝集部位において特異的に発現し、軟骨の形成とともに減少することが示されている大型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである(1, 2, 3)。このような時間的、空間的に制御されたPG-Mの発現は、この分子が間充織凝集部位において一時的に形成される特殊な細胞外マトリックスの構築に関与し、軟骨分化において重要な役割を担っていることを示唆する。ニワトリPG-Mのコアタンパク質のcDNA解析の結果から推定されるアミノ酸配列より、そのアミノ末端領域にはヒアルロン酸結合領域、そしてカルボキシル末端領域には2つの上皮成長因子(EGF)様ドメイン、1つのC型レクチン様ドメインおよび1つの補体制御タンパク質(CRP)様ドメインの存在することが明らかとなった(4)。これらのドメインはヒト繊維芽細胞の大型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるバーシカンの対応するドメインにそれぞれ非常に高い相同性を示す(5)。PG-Mにはコンドロイチン硫酸付着領域における選択的スプライシングによりコアタンパク質の長さが異なるいくつかの分子型の存在することが知られており、バーシカンはその一例であると考えられる。つまり、ニワトリのPG-Mの両末端領域に存在する各ドメインのアミノ酸配列は、ヒトのバーシカンとの間でよく保存されているが、コンドロイチン硫酸付着部位の配列は相同性が低く、選択的スプライシングにより変化する。このように進化の過程でよく保存された領域は、PG-Mの持つ生物学的機能にとって非常に重要であると予想される。特にC型レクチン様ドメインとCRP様ドメインでは、ヒトとニワトリの間でアミノ酸配列の相同性がそれぞれ

96%および93%と極めて高く、注目に値する。これまでの研究により、ニワトリおよびヒトのPG-Mについてアミノ末端領域のヒアルロン酸結合能が確められている(2および6)。しかしながら、PG-Mのカルボキシル末端領域の機能は現在までのところ全くわかっていない。

軟骨の主要なプロテオグリカンであるアグリカンのカルボキシル末端領域にもEGF様ドメイン、C型レクチン様ドメインおよびCRP様ドメインのセットが見いだされる。そして、*in vitro*発現系により発現させたラットのアグリカンのカルボキシル末端領域は糖結合能を有することが認められた(7, 8)。また、糖認識によりリンパ球や白血球の細胞接着に関与する膜タンパク質であるセレクチン類(L-, P-およびE-セレクチン)もこれらのドメインのセットを有している。ただし、セレクチンではPG-Mやアグリカンと異なり、レクチン様ドメインはアミノ末端側に位置し、これにEGF様ドメインとCRP様ドメインが続く構造になっている(9-13)。これまでに各セレクチンに対する様々な糖鎖リガンドが同定されている。さらに、L-およびP-セレクチンはスルファチドに結合し(14, 15)、L-セレクチンはある種の硫酸化糖鎖リガンドを認識することが示されている(16-18)。これらの結果から、PG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域はレクチン活性を示し、硫酸基を持つ糖にも親和性を有することが予想された。最近の研究によりL-セレクチンがカルシウム依存的にヘパリンと結合することが見いだされた(19)。そこで今回、固相化された糖および硫酸化グリコサミノグリカンに対するPG-Mのカルボキシル末端領域の結合活性をグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質発現系を用いて調べてみた。

## 実験材料および実験方法

### 発現プラスミドの構築

PG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端側の307アミノ酸残基 (EGF-EGF-lectin-CRP) をコードする *Bam* HI-*Dra* I cDNA断片 (1.2 kb) (4) を末端を平滑末端としてGST融合タンパク質発現ベクターであるpGEX-3X (Pharmacia Biotech Inc.) の *Sma* I部位に挿入した。この組換えプラスミドを大腸菌 JM109株に導入することにより得られる形質転換細胞のうち、上記の1.2kbのcDNA断片をプローブとして用いるコロニーハイブリダイゼーションおよび発現される融合タンパク質の大きさを調べることにより目的のクローンを選択した (20)。上記と同様な方法で、*Bam* HI-*Hind* II cDNA断片 (207アミノ酸残基、EGF-EGF-lectin) あるいは *Hind* II-*Dra* I cDNA断片 (99アミノ酸残基、CRP) (4) をpGEX-3Xに組み込み、目的とする形質転換細胞を得た。また、PG-Mのレクチン様ドメインだけをコードするcDNA断片 (128アミノ酸残基、位置 3330-3457、lectin) (4) をPCRにより調製し、上記と同様に形質転換細胞を得た。cDNA断片が挿入されていないpGEX-3Xを持つ形質転換細胞も同時に得た。

### 融合タンパク質の調製

得られた形質転換細胞 (組換えpGEX-3Xプラスミドを持つ大腸菌 JM109株) を30 mlのLB/アンピシリン培地中で培養した (37 °C、12時間)。これを1リットルのLB/アンピシリン培地に加え、37 °Cで培養液の $A_{600}$ の値が0.6-0.7になるまで培養した。そして0.1 mMのイソプロピル-1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを添加して融合タンパク質の発現を誘導した。さらに37 °Cで4時間培養した後、遠心分離により菌体を回収した。この菌体を冷PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4)/1% (w/v) Triton X-100に懸濁して超音波処理を行った。これを遠心分離し (10,000 ×



g, 4 °C, 10分間)、上清からグルタチオン-セファロース 4Bカラムを用いて GST融合タンパク質あるいはGSTを精製した。溶出液を25 mM Tris-HCl, pH 7.5に対して透析した後、アフィニティークロマトグラフィーに使用した。

#### SDS-PAGEおよびイムノブロットイング

精製GST融合タンパク質およびGSTのSDS-PAGE後 (21)、CBB染色あるいはニトロセルロース膜へのブロットイングを行った (22)。ブロットイング後の膜をPG-Mレクチン様ドメインを認識するポリクローナル抗体である抗レクチン様ドメイン抗体で染色した (4)。

#### アフィニティークロマトグラフィー

糖-セファロース (マンノピオース-セファロース、ラクトース-セファロース、フコース-セファロースおよびキトオリゴ-セファロース (Honen Corp., Tokyo, Japan)、各1 ml) あるいはヘパリン-セファロース (Pharmacia Biotech Inc.) (1 ml) のカラムを使ってGST融合タンパク質およびGST (0.5 ml; 125 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5) のアフィニティークロマトグラフィーを行った。カラムは開始バッファー (125 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5) で平衡化し、また、阻害実験では単糖類あるいはグリコサミノグリカンを開始バッファーと試料に添加した。試料溶液をアプライした後、カラムを2.5 mlの開始バッファーで洗浄し、次いで溶出バッファー (125 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5) で溶出を行った。各画分 (0.5 ml) を回収し、それらの一部をSDS-PAGEと銀染色により分析した。VIDASビデオデンシトメーター (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使ってそれぞれのバンドを解析した。

グリコサミノグリカンが、その還元末端でゲルに結合しているグリコサミノグリカン-セファロース (23, 24) を用い、上記と同様の方法で融合タンパク質の結合活性を調べた。ただし、この場合のアフィニティークロマトグラフィー

は0.02% (w/v) Triton X-100存在下で行った。

## 結 果

### PG-Mのカルボキシル末端領域を含むGST融合タンパク質の調製

PG-Mのカルボキシル末端領域の異なるドメイン構造を含むGST-PG-M融合タンパク質を大腸菌内で発現させ、可溶性の融合タンパク質として精製した。その結果、GST-EELCおよびGST-EEL (Fig. 2-1参照) だけが可溶性タンパク質として回収された。これらのSDS-PAGEおよびイムノブロットイングの結果をFig. 2-2に示す。CBB染色により、これらの精製融合タンパク質が予想される大きさであることが示された (Fig. 2-2A)。また、抗レクチン様ドメイン抗体と反応することから、この2種の融合タンパク質がPG-Mのレクチン様ドメインを含んでいることが確認された (Fig. 2-2B)。CRP様ドメインだけ (GST-C)、あるいはレクチン様ドメインだけ (GST-L) を含む融合タンパク質はどちらも可溶性タンパク質として回収されなかった (結果は示していない)。

### PG-Mのカルボキシル末端領域の糖結合活性

精製GST-PG-M融合タンパク質 (GST-EELCおよびGST-EEL) の糖結合活性を糖-セファロース (マンノピオース-セファロース、ラクトース-セファロース、フコース-セファロースおよびキトオリゴ-セファロース) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより調べた。カルシウム存在下で糖-セファロースに結合したタンパク質をEDTAの添加により溶出した。非結合画分および結合画分のタンパク質をSDS-PAGEおよび銀染色により分析したところ、GST-EELCは各種糖-セファロースに対し、カルシウム依存的な結合を示すことが判明した (Fig. 2-3, A-D)。デンストメーターを用いて染色されたタンパク質バンドの量を測定した結果、GST-EELCはフコース-セファロースあるいはキトオリゴ-セファロースよりもマンノピオース-セファロースおよびラクトース-セファロースに対し、より高い親和性を示すことが明らかとなった (Table 2-1)。これは単糖類を用いた結合阻害実験によっても証明された。すなわち、

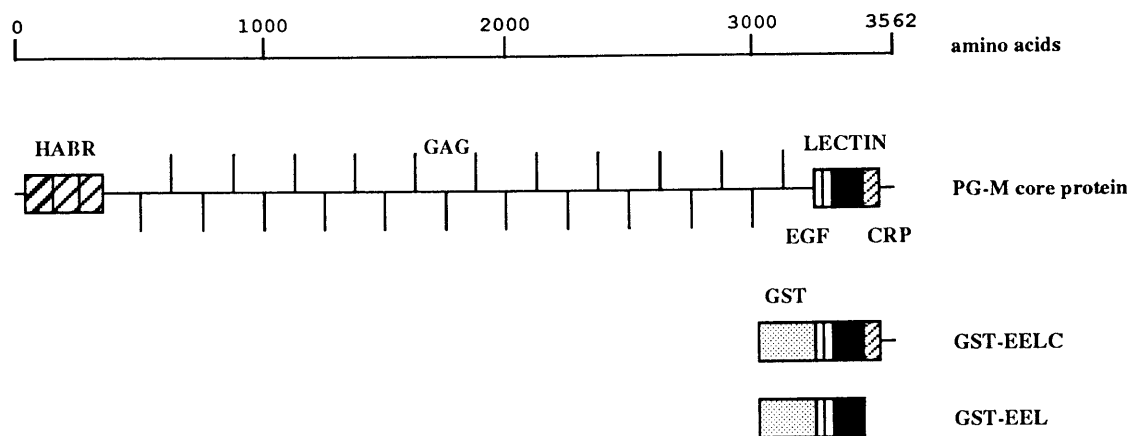


Fig. 2-1. Schematic structures of PG-M core protein (top) and expressed fragments (bottom). The domain organization of PG-M core protein is indicated by boxes as follows; hyaluronan-binding region (HABR), epidermal growth factor-like (EGF), lectin-like (LECTIN), and complement regulatory protein-like (CRP) domains. GAG and GST represent the glycosaminoglycan-attachment region and glutathione S-transferase, respectively. The number of amino acids is indicated at the top. The two GST fusion proteins, including duplicate EGF-like, lectin-like, and CRP-like domains (EELC) and duplicate EGF-like and lectin-like domains (EEL), are shown at the bottom.

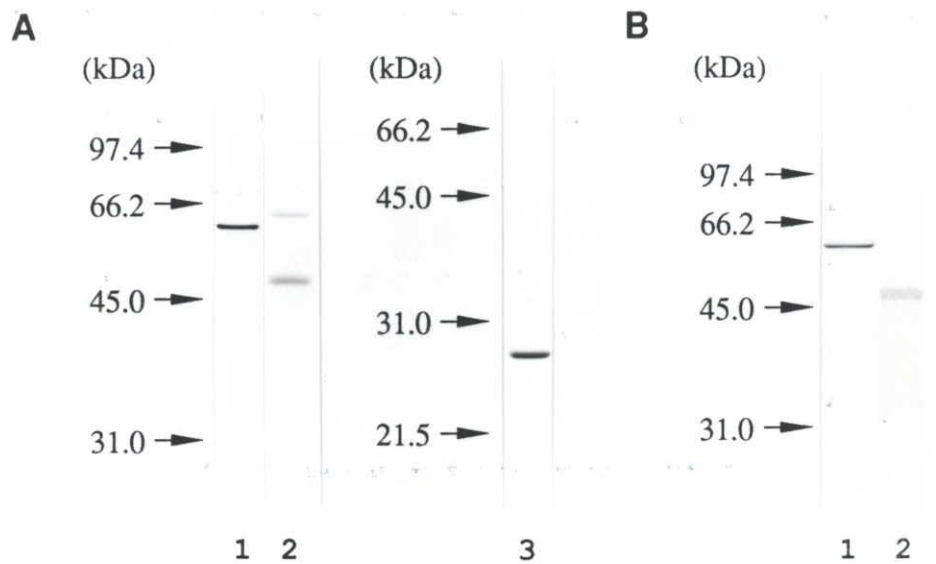


Fig. 2-2. Expression and purification of GST-PG-M fusion proteins. The two glutathione-Sepharose-purified GST-PG-M fusion proteins (GST-EELC and GST-EEL, see Fig. 2-1) and GST were electrophoresed on a 10% (lanes 1 and 2) or 12% (lane 3) SDS-polyacrylamide gel and then stained with CBB (A) or transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was stained with anti-lectin-like domain antibody, polyclonal antibodies to a peptide encoded in PG-M cDNA (amino acid residues 3395-3414) (4) (B). Lane 1, GST-EELC; lane 2, GST-EEL; lane 3, GST. The bands at 62 and 51 kDa correspond to GST-EELC and GST-EEL, respectively. The band at 27 kDa corresponds to GST. The other bands are from contaminants. Molecular mass markers are shown to the left of each arrow.

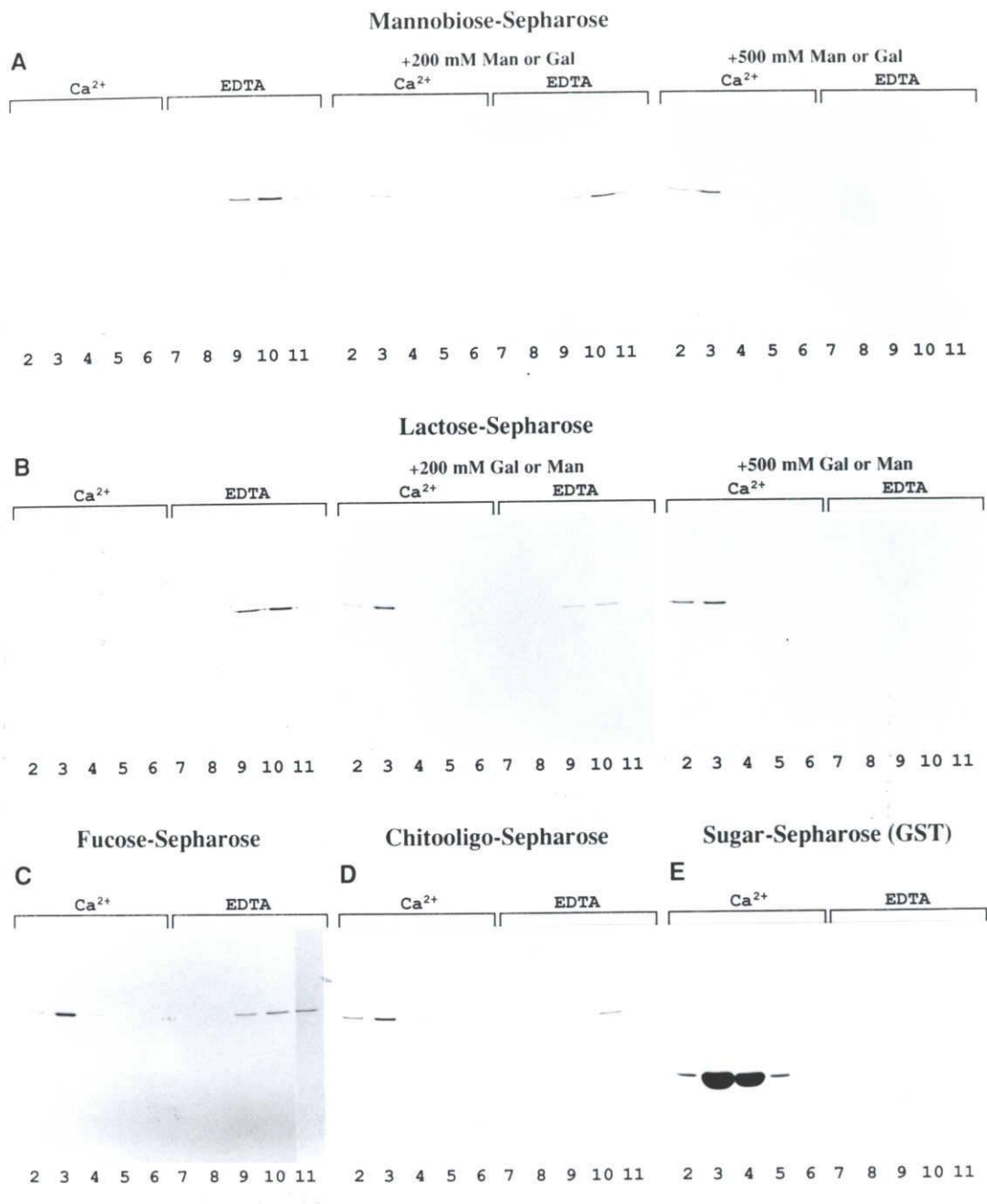


Fig. 2-3. Affinity chromatography of GST-PG-M fusion protein on immobilized carbohydrates. Purified GST-PG-M fusion protein (GST-EELC, see Fig. 2-1) was applied to the columns containing various carbohydrate-immobilized gels (A-D). After a wash with loading buffer (10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , fractions 2-6), the columns were eluted with elution buffer (2.5 mM EDTA, fractions 7-11). Fractions were analyzed by SDS-PAGE in 10% acrylamide. Proteins were detected by silver staining. Competing sugars were present at the indicated concentrations in the sample and loading buffer. Affinity chromatography of the glutathione-Sepharose-purified GST was performed as described above (E). Fractions were analyzed by SDS-PAGE in 12% acrylamide. Proteins were detected by CBB staining. The same results were obtained with four different carbohydrate-immobilized Sepharose gels tested.

Table 2-1

Binding of GST-PG-M fusion protein to immobilized carbohydrates

Binding of GST-EELC fusion protein (see Fig. 2-1) to various sugar-Sepharoses was determined as described under "Materials and Methods." Results shown represent the mean of duplicate determinations and are expressed as percentage of total recovered protein.

Carbohydrates	Amount of GST-EELC bound to immobilized carbohydrates
	( <i>%</i> )
Mannobiose	96
Lactose	88
L-Fucose	38
Chitoooligosaccharide	15

マンノピオース-セファロースあるいはラクトース-セファロースに対する GST-EELCの結合を完全に阻害するには500 mMのD-マンノースあるいはD-ガラクトースの添加が必要であったが (Fig. 2-3, AおよびB)、フコース-セファロースあるいはキトオリゴ-セファロースへの結合を阻害するには200 mMの単糖類の添加で充分であった (結果は示していない)。また、これらの阻害実験の結果はGST-EELCの糖-セファロースへの結合がセファロース部分ではなく糖部分に依存したものであるということを示している。

今回の結合実験に用いた融合タンパク質の中のPG-Mのカルボキシル末端領域以外の部分、すなわちGST部分の結合活性も同様のアフィニティークロマトグラフィーにより調べた。その結果、GSTは、これらの糖-セファロースには全く結合しないということが明らかとなり (Fig. 2-3E)、観察されたGST-EELCの糖結合活性はPG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域の部分によるものであることが判明した。

L-セレクチンのCRP様ドメインはレクチン活性に関与していることが見いだされているので (25)、PG-Mについてもカルボキシル末端領域の糖結合活性におけるCRP様ドメインの役割について調べた。このために、CRP様ドメインを欠く融合タンパク質であるGST-EELのアフィニティークロマトグラフィーをGST-EELCの場合と同様に行ったところ、GST-EELには糖結合能は全く認められなかった (Fig. 2-4)。よって、PG-MのCRP様ドメインはカルボキシル末端領域の糖結合活性に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、ラットのアグリカンではレクチン様ドメインだけでも弱いながらカルシウム依存性の糖結合活性を示すことが報告されている (8)。この違いが何に起因するのは現在までのところまだよくわかっていない。

#### PG-Mのカルボキシル末端領域のヘパリンおよびヘパラン硫酸結合能

PG-Mのカルボキシル末端領域のヘパリン結合能を、まず市販のヘパリン-セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーで調べた。GST-



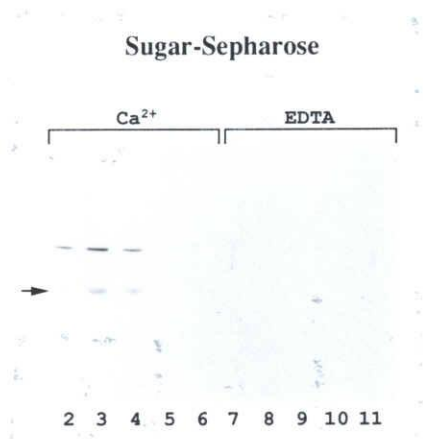


Fig. 2-4. Effect of CRP-like domain of PG-M on carbohydrate-binding activity. Affinity chromatography of purified GST-EEL fusion protein (see Fig. 2-1) was performed as described in Fig. 2-3. The arrow indicates the migration position of the GST-EEL fusion protein. The other bands are from contaminants. The same results were obtained with four different carbohydrate-immobilized Sepharose gels tested (mannobiose-Sepharose, lactose-Sepharose, fucose-Sepharose, and chitooligo-Sepharose).

EELCは糖-セファロースの場合と同じ条件でカルシウム依存的にヘパリン-セファロースに結合したが、GST-EELおよびGSTは結合しなかった (Fig. 2-5, A, D, およびE)。GST-EELCのヘパリン-セファロースへの結合は5 mg/mlのヘパリンの添加により阻害されたが (Fig. 2-5B)、500 mMの単糖類の添加 (Fig. 2-5C)あるいは5 mg/mlのコンドロイチン硫酸や5 mg/mlのデキストラン硫酸の添加 (結果は示していない) ではほとんど阻害されなかった。

ヘパリン、ヘパラン硫酸あるいはコンドロイチン硫酸が、その還元末端でセファロースビーズに結合している3種類のグリコサミノグリカン-セファロースを使ってアフィニティークロマトグラフィーを行い、GST-EELCのグリコサミノグリカンに対する親和性を調べた。GST-EELCはヘパリンおよびヘパラン硫酸に対し、ほぼ同じ親和性でカルシウム依存的な結合を示したが、コンドロイチン硫酸にはほとんど結合しなかった (Fig. 2-6)。GST-EELおよびGSTはこれらのグリコサミノグリカン-セファロースには結合しなかった (結果は示していない)。

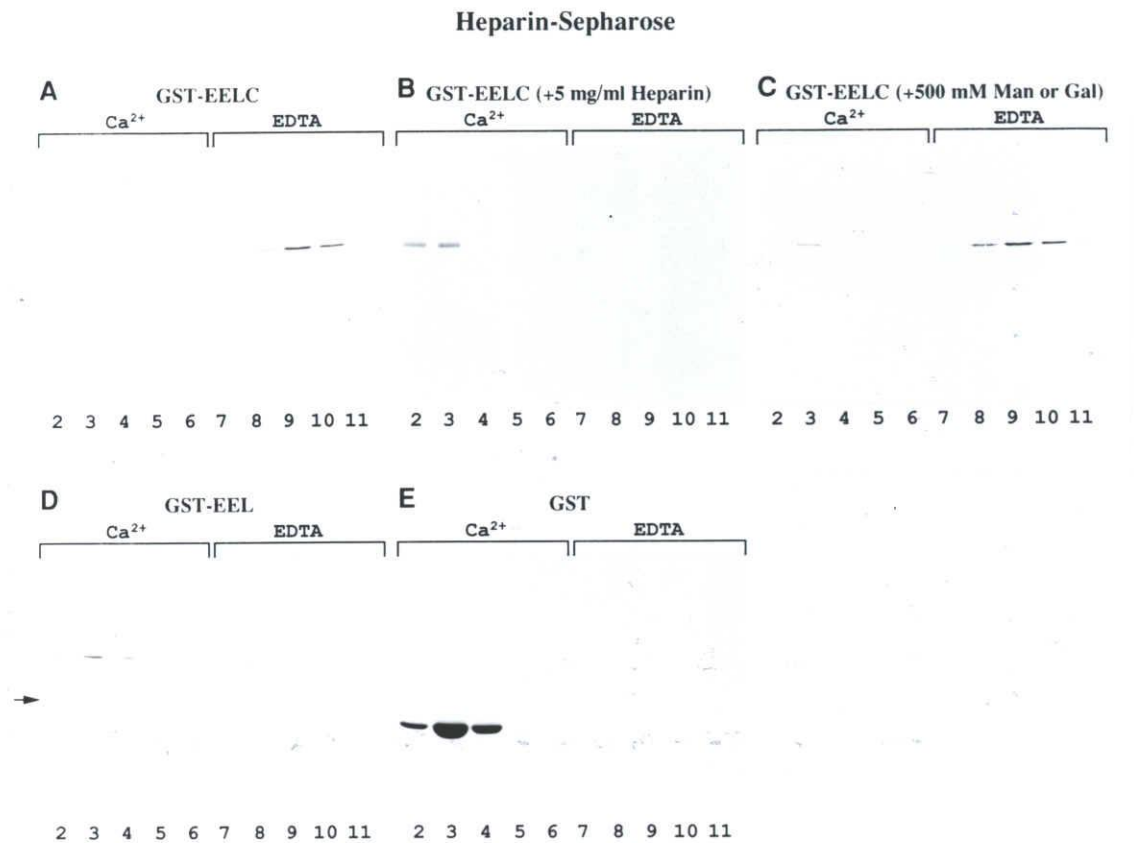


Fig. 2-5. Affinity chromatography of GST-PG-M fusion proteins on heparin-Sepharose. Purified GST-EELC fusion protein (see Fig. 2-1) was applied to heparin-Sepharose (A-C). After a wash with loading buffer (10 mM Ca<sup>2+</sup>, fractions 2-6), the columns were eluted with elution buffer (2.5 mM EDTA, fractions 7-11). Fractions were analyzed by SDS-PAGE in 10% acrylamide. Proteins were detected by silver staining. In B and C, 5 mg/ml heparin and 500 mM monosaccharides were present in the sample and loading buffer, respectively. Fractions in B were analyzed by SDS-PAGE after precipitation with trichloroacetic acid. Affinity chromatography of purified GST-EEL protein (see Fig. 2-1) and purified GST was performed as described above (D and E, respectively). Fractions were analyzed by SDS-PAGE in 10% (D) or 12% (E) acrylamide. Proteins were detected by silver staining (D) or CBB staining (E). The arrow indicates the migration position of the GST-EEL protein. The other bands are from contaminants.

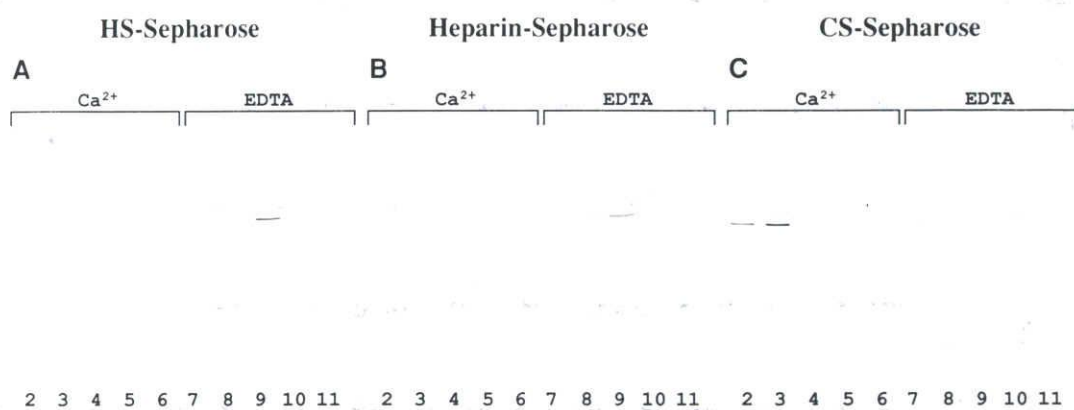


Fig. 2-6. Affinity chromatography of GST-PG-M fusion protein on glycosaminoglycan-conjugated Sepharose gels. Purified GST-EELC fusion protein (see Fig. 2-1) was applied to the columns (1 ml) of heparan sulfate (HS)-, heparin-, and chondroitin sulfate (CS)-conjugated Sepharose 6B gels which were prepared by the method described under "Materials and Methods." After a wash with loading buffer (10 mM Ca<sup>2+</sup>, fractions 2-6), the columns were eluted with elution buffer (2.5 mM EDTA, fractions 7-11). All the solutions included 0.02% (w/v) Triton X-100. Fractions were analyzed by SDS-PAGE in 10% acrylamide. Proteins were detected by silver staining.

## 考 察

PG-Mコアタンパク質のcDNA解析により、そのカルボキシル末端領域に2つのEGF様ドメイン、1つのC型レクチン様ドメイン、そして1つのCRP様ドメインの存在することが明らかにされている(4)。類似のドメイン構造を有するタンパク質は他にもいくつか見いだされており、例えばセレクチン類(9-13)、アグリカン(26, 27)、ニューロカン(28)などがあげられる(Fig. 2-7)。セレクチンとアグリカンについては、このドメイン構造がカルシウム依存的な糖結合能を有することが示されており(7, 8, 16, 17, 29, 30)、また、セレクチンの中にはスルファチドや硫酸化糖鎖のような硫酸基を持つ分子に親和性を有するものも知られている(14-19)。今回の研究によりPG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域がカルシウム依存的に数種の糖、ヘパリンおよびヘパラン硫酸に結合するということが初めて明らかにした。

PG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域を含むGST融合タンパク質(GST-EELC、Fig. 2-1参照)は、フコースやN-アセチルグルコサミンよりもマンノースおよびガラクトースに強く結合した(Fig. 2-3およびTable 2-1)。肺表面活性物質のタンパク質であるSP 28-36もC型レクチン様ドメインを有するタンパク質であり、同様に幅広い糖結合特異性を示す(31)。発現系、検定法およびドメイン構造が異なるが、ラットのアグリカンではカルボキシル末端領域はマンノースやN-アセチルグルコサミンよりもフコースやガラクトースに高い親和性を示した(7, 8)。Drickamer(32)が糖認識ドメインに見られる配列のうちで、糖結合特異性を支配するとして報告したアミノ酸残基についてはPG-Mとアグリカンでは同じであるが、両者の糖結合特異性はこのように同一ではなく、他にも重要なアミノ酸残基が存在することを示した。

PG-Mコアタンパク質がこの糖結合能により結合する胚芽内のリガンドは今のところ不明であるが、その実体の解明は大変興味のもたれるところである。フィブロネクチンやI型およびIII型コラーゲンも胚芽芽の間充織凝集部位の主

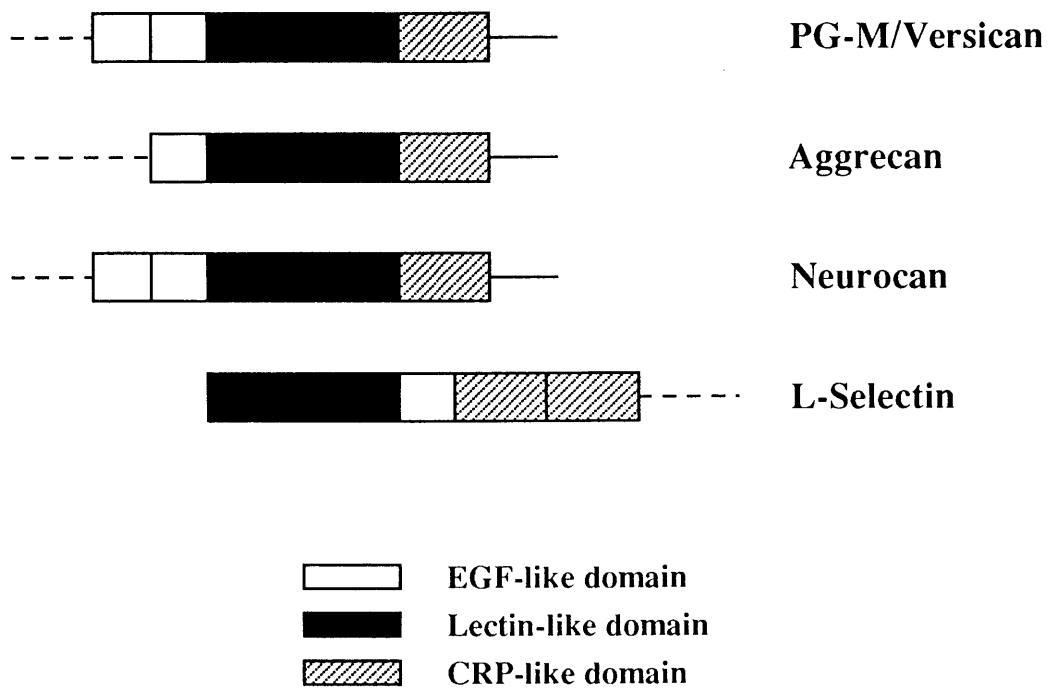


Fig. 2-7. Comparison of the COOH-terminal domains of PG-M with other related proteins. The organization of EGF-like, lectin-like, and CRP-like domains of related proteins sharing homologous domains with PG-M is shown schematically. Data for versican are from Ref. 5, for aggrecan from Refs. 26 and 27, for neurocan from Ref. 28, and for L-selectin from Refs. 11 and 12.

要な細胞外マトリックス成分であり (33)、これらは糖タンパク質であることが知られている。フィブロネクチンはアスパラギン結合型糖鎖を持っており (34-36)、コラーゲンもそのヒドロキシリシンに結合したガラクトース残基を持っている。これらの糖はPG-Mコアタンパク質のリガンドとして機能しているかもしれない。実際に、精製したPG-MはフィブロネクチンとI型コラーゲンに結合する (37)。ニワトリ胚芽の間充織凝集部位が特異的にピーナッツアグルチニン (PNA) により染色されることが報告されており (38)、PG-Mコアタンパク質がこのPNA結合性糖鎖とも相互作用しているかもしれない。さらに、ニワトリ胚から単離した $\beta$ -D-ガラクトシド結合性レクチンが*in vitro*において軟骨分化を促進するということが報告されており (39)、PG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域のレクチン活性が軟骨分化に関与している可能性が示唆される。

今回、PG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域がヘパリンおよびヘパラン硫酸にカルシウム依存的に結合することも見いだした。最近、L-セレクチンのヘパリンに対するカルシウム依存的な結合が報告された (19)。PG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域のヘパリンに対する結合はヘパリンの添加により阻害されるが (Fig. 2-5B)、コンドロイチン硫酸やデキストラン硫酸ではほとんど阻害されない。これらの結果は、この相互作用がヘパリンに特異的であり、単に陰イオンの影響によるものではないことを示す。また、この結合はマンノースやガラクトースなどの単糖類ではほとんど阻害されないことから (Fig. 2-5C)、PG-Mレクチン様ドメインのヘパリンに対する結合部位と単糖類に対する結合部位は同一ではないと考えられる。PG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域はヘパラン硫酸とも同様に結合するので (Fig. 2-6A)、PG-Mは胚芽内でヘパラン硫酸プロテオグリカンとも結合しているかもしれない。PG-Mがしばしば基底膜に存在することが見いだされているが (3, 40)、PG-Mは基底膜の主要成分であるIV型コラーゲンやラミニンには結合しないため (37)、ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンが基底膜内のPG-M

のリガンドとして機能していると考えられる。また、フィブロネクチンは2つのヘパリン結合ドメインを有しているので(41)、ヘパラン硫酸を介してPG-Mとフィブロネクチンが結合し、3者が複合体を形成している可能性も考えられる。

PG-Mでは、レクチン様ドメインと同様にCRP様ドメインもヒトとニワトリの間で非常に高いアミノ酸配列の相同性(93%)を示す(4, 5)。さらに、アグリカンのEGF様ドメインとCRP様ドメインは選択的スプライシングによる制御を受けることが報告されているが(26)、PG-Mではこのような制御は今のところ見いだされていない。以上のことから、PG-MのCRP様ドメインは重要な機能を有する欠くことのできないドメインであると予想される。実験の結果、CRP様ドメインを欠くGST-PG-M融合タンパク質(GST-EEL、Fig. 2-1参照)には糖、ヘパリンおよびヘパラン硫酸に対する結合活性はないことが明らかになった(Figs. 2-4および2-5D)。今回の結果と同様に、L-セレクチンでもCRP様ドメインの除去でレクチン活性が消失するということが報告されている(25)。

セレクチンではEGF様ドメインがリガンド認識や細胞接着に重要な役割をはたしていることが報告されており(42-45)、PG-MのEGF様ドメインもレクチン活性に関与しているかもしれない。

今回、PG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域に存在するC型レクチン様ドメインの糖結合能を証明し、また、ヘパリンおよびヘパラン硫酸への結合を見いだした。PG-Mは細胞接着阻害活性(46)や他の細胞外マトリックス分子に対する結合活性(2, 37)を示すことも報告されており、以上のような活性を通してPG-Mが枝芽の間充織凝集に寄与していると考えられる。



## 要 約

PG-Mはニワトリ胚芽の間充織凝集部位において一過性に発現する大型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであり、cDNA解析の結果から、そのコアタンパク質のカルボキシル末端領域にはEGF様、C型レクチン様およびCRP様ドメインの存在することが明らかとなっている。そのカルボキシル末端領域をGST融合タンパク質として大腸菌内で発現させて精製した。この精製融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィーを行い、糖結合活性を調べた結果、PG-Mのレクチン様ドメインはカルシウム依存的にD-マンノース、D-ガラクトース、L-フコースおよびN-アセチル-D-グルコサミンに結合することが示された。また、ヘパリンおよびヘパラン硫酸に対するカルシウム依存的な結合も見いだした。さらに、CRP様ドメインの除去によりレクチン活性が失われることから、このドメインもPG-Mのカルボキシル末端領域における糖認識構造の形成に寄与していると考えられた。

## 引用文献

1. Shinomura, T., Nishida, Y., and Kimata, K. (1992) in *Articular Cartilage and Osteoarthritis* (Kuettner, K. E., Schleyerbach, R., Peyron, J. G., and Hascall, V. C., eds) pp. 35-44, Raven Press, New York
2. Kimata, K., Oike, Y., Tani, K., Shinomura, T., Yamagata, M., Uritani, M., and Suzuki, S. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13517-13525
3. Shinomura, T., Jensen, K. L., Yamagata, M., Kimata, K., and Solursh, M. (1990) *Anat. Embryol.* **181**, 227-233
4. Shinomura, T., Nishida, Y., Ito, K., and Kimata, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14461-14469
5. Zimmermann, D. R., and Ruoslahti, E. (1989) *EMBO J.* **8**, 2975-2981
6. LeBaron, R. G., Zimmermann, D. R., and Ruoslahti, E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10003-10010
7. Halberg, D. F., Proulx, G., Doege, K., Yamada, Y., and Drickamer, K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9486-9490
8. Saleque, S., Ruiz, N., and Drickamer, K. (1993) *Glycobiology* **3**, 185-190
9. Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A., Jr., and Seed, B. (1989) *Science* **243**, 1160-1165
10. Johnson, G. I., Cook, R. G., and McEver, R. P. (1989) *Cell* **56**, 1033-1044
11. Lasky, L. A., Singer, M. S., Yodnock, T. A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, J., Nguyen, T., Stachel, S., and Rosen, S. D. (1989) *Cell* **56**, 1045-1055
12. Siegelman, M., Van de Rijn, M., and Weissman, I. (1989) *Science* **243**, 1165-1172
13. Stoolman, L. M. (1989) *Cell* **56**, 907-910

14. Suzuki, Y., Toda, Y., Tamatani, T., Watanabe, T., Suzuki, T., Nakao, T., Murase, K., Kiso, M., Hasegawa, A., Tadano-Aritomi, K., Ishizuka, I., and Miyasaka, M. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 426-434
15. Aruffo, A., Kolanus, W., Walz, G., Fredman, P., and Seed, B. (1991) *Cell* **67**, 35-44
16. Imai, Y., Singer, M. S., Fennie, C., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. (1991) *J. Cell Biol.* **113**, 1213-1221
17. True, D. D., Singer, M. S., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 2757-2764
18. Lasky, L. A., Singer, M., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W., Grimley, C., Fennie, C., Gillett, N., Watson, S., and Rosen, S. D. (1992) *Cell* **69**, 927-938
19. Norgard-Sumnicht, K. E., Varki, N. M., and Varki, A. (1993) *Science* **261**, 480-483
20. Shinomura, T., and Kimata, K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 1265-1270
21. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
22. Kijimoto-Ochiai, S., Katagiri, Y. U., and Ochiai, H. (1985) *Anal. Biochem.* **147**, 222-229
23. Funahashi, M., Matsumoto, I., and Seno, N. (1982) *Anal. Biochem.* **126**, 414-421
24. Habuchi, H., Suzuki, S., Saito, T., Tamura, T., Harada, T., Yoshida, K., and Kimata, K. (1992) *Biochem. J.* **285**, 805-813
25. Watson, S. R., Imai, Y., Fennie, C., Geoffrey, J., Singer, M., Rosen, S. D., and Lasky, L. A. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 235-243
26. Doege, K. J., Sasaki, M., Kimura, T., and Yamada, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 894-902
27. Chandrasekaran, L., and Tanzer, M. L. (1992) *Biochem. J.* **288**, 903-910

28. Rauch, U., Karthikeyan, L., Maurel, P., Margolis, R. U., and Margolis, R. K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19536–19547
29. Larsen, G. R., Sako, D., Ahern, T. J., Shaffer, M., Erban, J., Sajer, S. A., Gibson, R. M., Wagner, D. D., Furie, B. C., and Furie, B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11104–11110
30. Foxall, C., Watson, S., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., and Brandley, B. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 895–902
31. Haagsman, H. P., Hawgood, S., Sargeant, T., Buckley, D., White, R. T., Drickamer, K., and Benson, B. J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 13877–13880
32. Drickamer, K. (1992) *Nature* **360**, 183–186
33. Shinomura, T., and Kimata, K. (1990) *Develop. Growth Differ.* **32**, 243–248
34. Takasaki, S., Yamashita, K., Suzuki, K., and Kobata, A. (1980) *J. Biochem.* **88**, 1587–1594
35. Takamoto, M., Endo, T., Isemura, M., Kochibe, N., and Kobata, A. (1989) *J. Biochem.* **105**, 742–750
36. Takamoto, M., Endo, T., Isemura, M., Yamaguchi, Y., Okamura, K., Kochibe, N., and Kobata, A. (1989) *J. Biochem.* **106**, 228–235
37. Yamagata, M., Yamada, K. M., Yoneda, M., Suzuki, S., and Kimata, K. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13526–13535
38. Aulthouse, A.L., and Solursh, M. (1987) *Develop. Biol.* **120**, 377–384
39. Matsutani, E., and Yamagata, T. (1982) *Develop. Biol.* **92**, 544–548
40. Yamagata, M., Shinomura, T., and Kimata, K. (1993) *Anat. Embryol.* **187**, 433–444
41. Hayashi, M., and Yamada, K. M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 5263–5267

42. Pigott, R., Needham, L. A., Edwards, R. M., Walker, C., and Power, C. (1991) *J. Immunol.* 147, 130–135
43. Kansas, G. S., Saunders, K. B., Ley, K., Zakrzewicz, A., Gibson, R. M., Furie, B. C., Furie, B., and Tedder, T. F. (1994) *J. Cell Biol.* 124, 609–618
44. Kansas, G. S., Spertini, O., Stoolman, L. M., and Tedder, T. F. (1991) *J. Cell Biol.* 114, 351–358
45. Siegelman, M. H., Cheng, I. C., Weissman, I. L., and Wakeland, E. K. (1990) *Cell* 61, 611–622
46. Yamagata, M., Suzuki, S., Akiyama, S. K., Yamada, K. M., and Kimata, K. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 8012–8018

## 第 3 章

### PG-Mのレクチン様ドメインが示す糖結合特異性および そのリガンド

#### 序 論

ニワトリ肢芽における軟骨形成の特徴の1つは、発生段階23における間充織凝集がその始まりとなることである。この間充織凝集は、続いて起こる軟骨分化に不可欠であり、正確な骨格のパターン形成にとって重要な現象であると考えられている。よって、間充織凝集は高度に組織化された分子機構により時間的、空間的に制御されているはずである(1)。

PG-Mは、最初にニワトリ肢芽から単離され(2)、また、発生段階23における肢芽の間充織凝集部位の主要な細胞外マトリックス成分であることが示された(3)。PG-Mは軟骨の形成とともに減少し(3)、代わって軟骨に特徴的なプロテオグリカンであるアグリカンが急激に増加する(4)。このような時間的、空間的に制御された発現から、PG-Mは間充織凝集部位の特徴的な細胞外マトリックスの構築に関与していると考えられている。PG-Mは肢芽の細胞外マトリックス成分であるヒアルロン酸、フィブロネクチンおよびI型コラーゲンと結合することが示されている(5-7)。以上のことからPG-Mは他の細胞外マトリックス分子との相互作用を通して間充織凝集および軟骨分化の制御に関わっていると考えられる。

PG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域には進化の過程でよく保存されたEGF様、レクチン様、およびCRP様ドメインが存在する(8-10)。アミノ末端領域に存在するヒアルロン酸結合領域の活性はよく研究されており(2, 11)、また、第2章に述べられているようにレクチン様ドメインの糖結合活性

も明らかにされている(12)。しかし、このPG-Mのレクチン様ドメインが結合する枝芽内のリガンドについては研究されておらず、まったく不明である。

Aulthouseら(13)は、ニワトリ枝芽の間充織凝集部位に特異的にPNA結合性分子が出現することを報告している。さらにニワトリ胚の $\beta$ -D-ガラクトシド結合性レクチンが*in vitro*において軟骨分化を促進することが知られている(14)。これらのことからPG-Mのカルボキシル末端領域が示すレクチン活性の間充織凝集への関与が示唆される。

この章ではPG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域のオリゴ糖鎖に対する結合活性について述べる。大腸菌発現系および動物細胞発現系を用いて糖タンパク質糖鎖に対する結合特異性を調べ、さらに枝芽内でレクチン様ドメインが結合するリガンドを探索し、PG-Mのカルボキシル末端領域の間充織凝集における役割について議論する。

## 実験材料および実験方法

### 発現プラスミドの構築

ニワトリPG-Mのコアタンパク質のカルボキシル末端領域の307アミノ酸残基 (EGF-EGF-lectin-CRP) をコードする *Bam* HI-*Dra* I cDNA断片 (8) の末端を平滑末端とし、これをpGEX-3X (Pharmacia Biotech Inc.) の *Sma* I部位に組み込んだ (12)。得られた組換えpGEX-3XのGSTをコードする領域の5'末端を *Eco* NIにより切断し、末端を平滑末端とした。pMAMneo-Sプラスミド (Clontech, Palo Alto, CA) を *Sma* Iで消化した。消化断片を2% BIOGELアガロースゲル電気泳動 (BIO 101, La Jolla, CA) により分離し、組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) のシグナルペプチド (36アミノ酸残基) をコードする143 bpの断片をMERMAIDキット (BIO 101) を使って精製した。この143 bpのDNA断片を上記の *Eco* NIで切断し、末端を平滑末端とした組換えpGEX-3Xと連結した。これにより得られた組換えプラスミドを *Eco* RIと *Xho* Iで切断した後、t-PAシグナルペプチドとGST-PG-M融合タンパク質から成る分泌型キメラタンパク質 (Fig. 3-1参照) をコードする2.0 kbのDNA断片を精製し、その末端を平滑末端とした。この断片をSV40の複製起点を持つ動物細胞発現ベクターであるpcDNA1/NEO (Invitrogen, San Diego, CA) の *Eco* RV部位に組み込んだ。この組換えpcDNA1/NEOプラスミドをpSPGM-Cと名付けた。

### COS細胞における組換えPG-Mの一過性発現

COS-1細胞を100 units/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシンおよび10% FCSを含むDMEMで培養した (100 mm ディッシュ, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。60-70% コンフルエントのCOS-1細胞にpSPGM-CあるいはコントロールとしてpcDNA1/NEOをDEAE-デキストラン法により導入した (15)。



## 遺伝子導入されたCOS細胞によるPG-Mキメラタンパク質の分泌

遺伝子導入の後、COS-1細胞を37℃で60時間培養した。続いて細胞を200  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [ $^{35}\text{S}$ ]メチオニン (Tran $^{35}\text{S}$ -label, ICN Biomedicals, Inc.) で8時間標識し、培養液を回収した。遠心分離 (1,200 rpm, 5分間) により培養液から浮遊細胞を除き、上清に1% (w/v) Triton X-100を添加した。この溶液からグルタチオン-セファロース 4Bカラム (Pharmacia Biotech Inc.) を使って[ $^{35}\text{S}$ ]メチオニン標識されたGST-PG-Mキメラタンパク質を精製した。溶出には酸化型グルタチオンを用いた。溶出液を10% SDS-PAGE (16) およびフルオログラフィーにより分析し、また、アフィニティークロマトグラフィーあるいは固相結合実験に用いた。

## 大腸菌発現系によるPG-M融合タンパク質の調製

第2章で述べたように、ニワトリPG-Mのカルボキシル末端領域の307アミノ酸残基 (EGF-EGF-lectin-CRP) (8) を含むGST-EELC融合タンパク質あるいはGSTを大腸菌内で発現させて精製した (12)。溶出液を10 mM Tris-HCl, pH 7.5に対して透析し、アフィニティークロマトグラフィー、固相結合実験あるいはプロットアッセイに用いた。

## アフィニティークロマトグラフィー

COS細胞により分泌されたPG-Mキメラタンパク質を精製し、開始バッファー (150 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) で平衡化したラクトース-セファロースカラム (Honen Corp., Tokyo, Japan) にアプライした。開始バッファーで洗浄した後、開始バッファー中の $\text{CaCl}_2$ を2.5 mM EDTAに置き換えた溶出バッファーによりカラムに結合したタンパク質を溶出した。非結合画分および結合画分中のタンパク質をトリクロロ酢酸で沈殿させ、10% SDS-PAGEおよびフルオログラフィーにより分析した。

大腸菌に発現させたGST-EELC融合タンパク質を精製し、その溶液の0.5

mlを開始バッファー (150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% (w/v) Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) で平衡化した1 mlのフェチュイン-アガロースカラム (Sigma) にアプライした。5 mlの開始バッファーで洗浄した後、開始バッファー中のCaCl<sub>2</sub>を2.5 mM EDTAに置き換えた溶出バッファーによりカラムに結合したタンパク質を溶出した。各画分 (0.5 ml) を回収し、非結合画分および結合画分について10% SDS-PAGEおよび銀染色により分析した。

### 固相結合実験

オボアルブミン、トランスフェリン、フェチュインおよびアシアロフェチュインはSigma製のものを用いた。フィブロネクチンはウシ血漿からゼラチン-およびヘパリン-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した (17)。精製GSTを抗原としてマウス抗GST抗血清を作製した。様々な糖タンパク質で96穴マイクロタイタープレートのウェルを被覆し、BSAを用いてブロッキングした後、結合実験を以下のように行った。ウェルに<sup>35</sup>S]メチオニン標識されている精製GST-PG-Mキメラタンパク質の溶液 (0.05% (v/v) Tween 20, 1% BSAおよび5 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5)) を50 μl加え、2時間インキュベートした後、ウェルを0.05% (v/v) Tween 20および5 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBSで3回洗浄し、続いて結合したGST-PG-Mキメラタンパク質を遊離させるため、ウェルに50 μlの1% SDS溶液を加え、30分間インキュベートした。各ウェルの溶液の放射能を液体シンチレーションカウンターを使って測定した。阻害実験では100 mMの単糖類、そしてコントロール実験ではCaCl<sub>2</sub>の代わりに2.5 mM EDTAを上記の反応系に添加した。結合実験はすべて3回ずつ行った。大腸菌に発現させたGST-EELC融合タンパク質を用いた場合、ウェルに結合した融合タンパク質量をマウス抗GST抗血清およびパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体 (Cappel, Durham, NC) を使って測定した。

## レクチンブロット分析および枝芽の糖タンパク質のブロットアッセイ

ニワトリ枝芽に存在する糖タンパク質の様々なレクチンに対する反応性をレクチンブロット分析により調べた(18)。レクチンおよび抗レクチン抗血清はSigma製のものを用いた。ただし、抗RCA I抗血清はE-Y Laboratories, Inc. (San Mateo, CA)から購入した。発生段階23のニワトリ枝芽のSDS抽出物を10% SDS-PAGEで分離した。続いてCBB染色あるいはニトロセルロース膜へのブロッティングを行った(19)。末端シアル酸の除去はブロットされた膜の酸処理(25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 80 °C, 1時間)により行った(19)。エンド-β-グリコシダーゼ H (*Streptomyces griseus*由来; Seikagaku Corp., Tokyo, Japan) 処理は膜を50 mU/ml (50 mM クエン酸バッファー, pH 5.0)の酵素液に37 °Cで90分間浸すことにより行った(19)。その後、膜をいろいろなレクチンにより染色した。

PG-Mのカルボキシル末端領域のレクチン活性に対する枝芽内の糖タンパク質リガンドをブロットアッセイにより調べた。上記と同様に枝芽の抽出物に含まれるタンパク質を10% SDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース膜に転写した。3% BSAを用いてブロッキングした後、膜を0.05% (v/v) Tween 20, 1% BSAおよび5 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBS中で精製GST-EELC融合タンパク質、マウス抗GST抗血清およびパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体と順次反応させた。膜の洗浄は0.05% (v/v) Tween 20および5 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBSを用いて行った。コントロール実験ではGST-EELC融合タンパク質の代わりにGSTを用いた。検出はECL検出システム (Amersham, UK) により行った。

同様に、フィブロネクチンのレクチンブロット分析も行った。7% SDS-PAGEおよびブロッティング後、膜をレクチンで染色した。シアル酸の除去およびエンド-β-グリコシダーゼ H処理は上記と同様に行った。

## 結 果

### COS細胞におけるPG-Mキメラタンパク質の発現

今回、分泌型GST-PG-Mキメラタンパク質 (Fig. 3-1参照) をコードするcDNA断片を構築し、動物細胞発現ベクターであるpcDNA1/NEOに組み込んだ。この組換えプラスミド (pSPGM-C) を導入したCOS細胞を $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識した。分泌されたキメラタンパク質を培養上清から精製し、SDS-PAGEとフルオログラフィーにより分析した。pSPGM-Cを導入したCOS細胞ではキメラタンパク質の推定分子量と一致する64 kDaの大きさのバンドが認められたが (Fig. 3-2, レーン2)、コントロールの細胞ではそのようなバンドは見られなかった (レーン3)。このPG-Mキメラタンパク質にはN結合型糖鎖の結合が可能な部位が1箇所存在するが、SDS-PAGEでは糖鎖付加による移動度の上昇は認められなかった。よって、このキメラタンパク質には糖鎖は付加されていないと思われる。

### ラクトース-アフィニティークロマトグラフィー

COS細胞に発現させたPG-Mキメラタンパク質の糖結合活性を最初にラクトース-セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより調べた。PG-Mキメラタンパク質はカルシウム依存的にカラムに結合した (Fig. 3-3)。

### PG-Mキメラタンパク質の糖タンパク質糖鎖への結合

構造が知られているアスパラギン結合型糖鎖を有する4種の糖タンパク質 (オボアルブミン、トランスフェリン、フェチュインおよびアシアロフェチュイン) を用いた固相結合実験により、PG-Mのカルボキシル末端領域のオリゴ糖鎖に対する結合特異性を調べた。オボアルブミンは高マンノース型糖鎖とGP-II-B (20) およびGP-III-C (21) に見られるような混成型糖鎖を持っている。

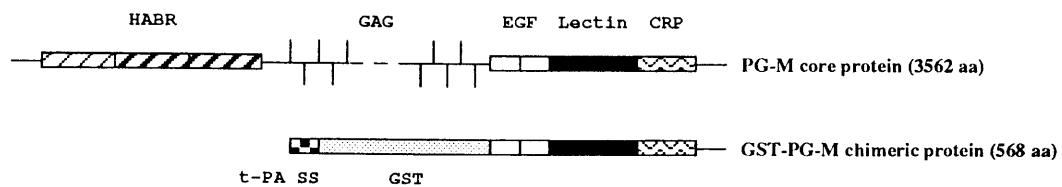


Fig. 3-1. Schematic representation of structural domains of the PG-M core protein (top) and a secretable GST-PG-M chimeric protein (bottom). The domain organization is indicated by boxes as follows; hyaluronan-binding region (HABR), epidermal growth factor-like (EGF), lectin-like (Lectin), and complement regulatory protein-like (CRP) domains. GAG, GST, and t-PA SS represent the glycosaminoglycan-attachment region, glutathione *S*-transferase, and tissue-type plasminogen activator signal sequence, respectively. The number of amino acids (aa) is indicated in the parentheses in the right.

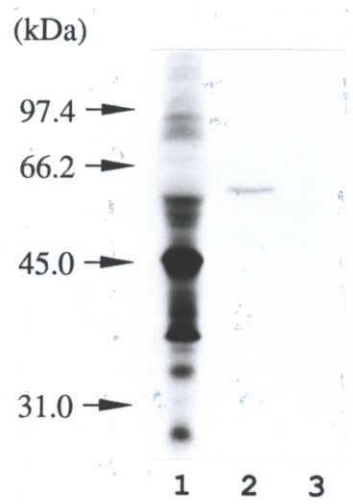
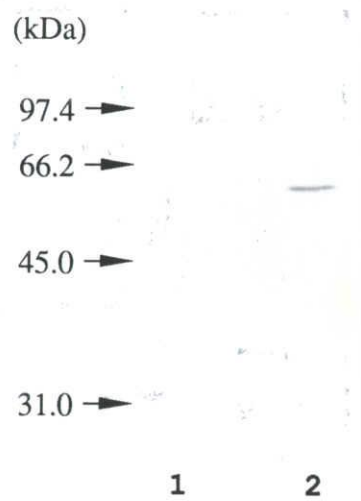


Fig. 3-2. Expression and purification of GST-PG-M chimeric protein. COS cells transfected with pSPGM-C and control COS cells (transfected with pcDNA1/NEO only) were labeled with [<sup>35</sup>S]methionine and the secreted GST-PG-M chimeric protein in the conditioned medium was purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose. The purified chimeric protein and total proteins in the conditioned medium were precipitated with trichloroacetic acid and visualized by fluorography following SDS-PAGE. Lane 1, total proteins in the conditioned medium from COS cells transfected with pSPGM-C; lane 2, the purified GST-PG-M chimeric protein secreted by COS cells transfected with pSPGM-C; lane 3, materials from control COS cells.



**Fig. 3-3.** Binding of PG-M chimeric protein to immobilized carbohydrate in affinity chromatography. The purified, [<sup>35</sup>S]methionine-labeled GST-PG-M chimeric protein was applied onto a lactose-Sepharose column in the presence of Ca<sup>2+</sup> and eluted with the elution buffer containing EDTA. The unbound and bound fractions were analyzed by SDS-PAGE followed by fluorography. Lane 1, unbound fraction; lane 2, bound fraction.

トランスフェリン (22) は 3 本の二本鎖複合型糖鎖と 1 本の三本鎖複合型糖鎖を持ち、フェチュイン (23) は 3 本の三本鎖複合型糖鎖と 3 本のムチン型糖鎖を持っている。アシアロフェチュインはフェチュインからシアル酸を除去したものである。これらの糖タンパク質で被覆したマイクロタイタープレートのウェルに<sup>[35S]</sup>メチオニン標識されているPG-Mキメラタンパク質を加え、Ca<sup>2+</sup>あるいはEDTA存在下で反応させた。洗浄後、ウェルに結合しているキメラタンパク質量を測定した。その結果、PG-Mキメラタンパク質はカルシウム依存的に糖タンパク質に結合し、高マンノース型糖鎖や混成型糖鎖よりも複合型糖鎖に特に高い親和性を示すことが明らかとなった (Fig. 3-4A)。また、フェチュインに対する親和性とアシアロフェチュインに対する親和性にはほとんど差がないことから、シアル酸はこの結合にあまり寄与していないと考えられた。このPG-Mキメラタンパク質の糖タンパク質への結合は濃度依存的であり、今回使用した糖タンパク質ではそれぞれ10 µg/mlの濃度において最大の結合が見られた (Fig. 3-4B)。よって、観察された各種の糖鎖に対する親和性の違いは、用いた糖タンパク質間の糖鎖含量の差によるものではないと思われた。いろいろな単糖類に対する親和性を調べるために、キメラタンパク質のフェチュインへの結合について阻害実験を行った (Fig. 3-4C)。その結果、このPG-Mキメラタンパク質はL-フコースやN-アセチル-D-グルコサミンよりもD-ガラクトースおよびD-マンノースに対して高い親和性を示すことがわかった。第2章では大腸菌に発現させたPG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域の各種の単糖類に対する親和性を固定化した糖に対する親和性と阻害実験により調べたが (12)、今回の結果は、その結果とほぼ同じであった。

#### PG-Mキメラタンパク質のフィブロネクチンへの結合

天然のリガンドを探索する実験の第一段階として、枝芽の細胞外マトリックスの主要な糖タンパク質であるフィブロネクチンの糖鎖とPG-Mのカルボキシル末端領域の間の相互作用を調べた。最初に、今回の実験に用いるフィブロネ



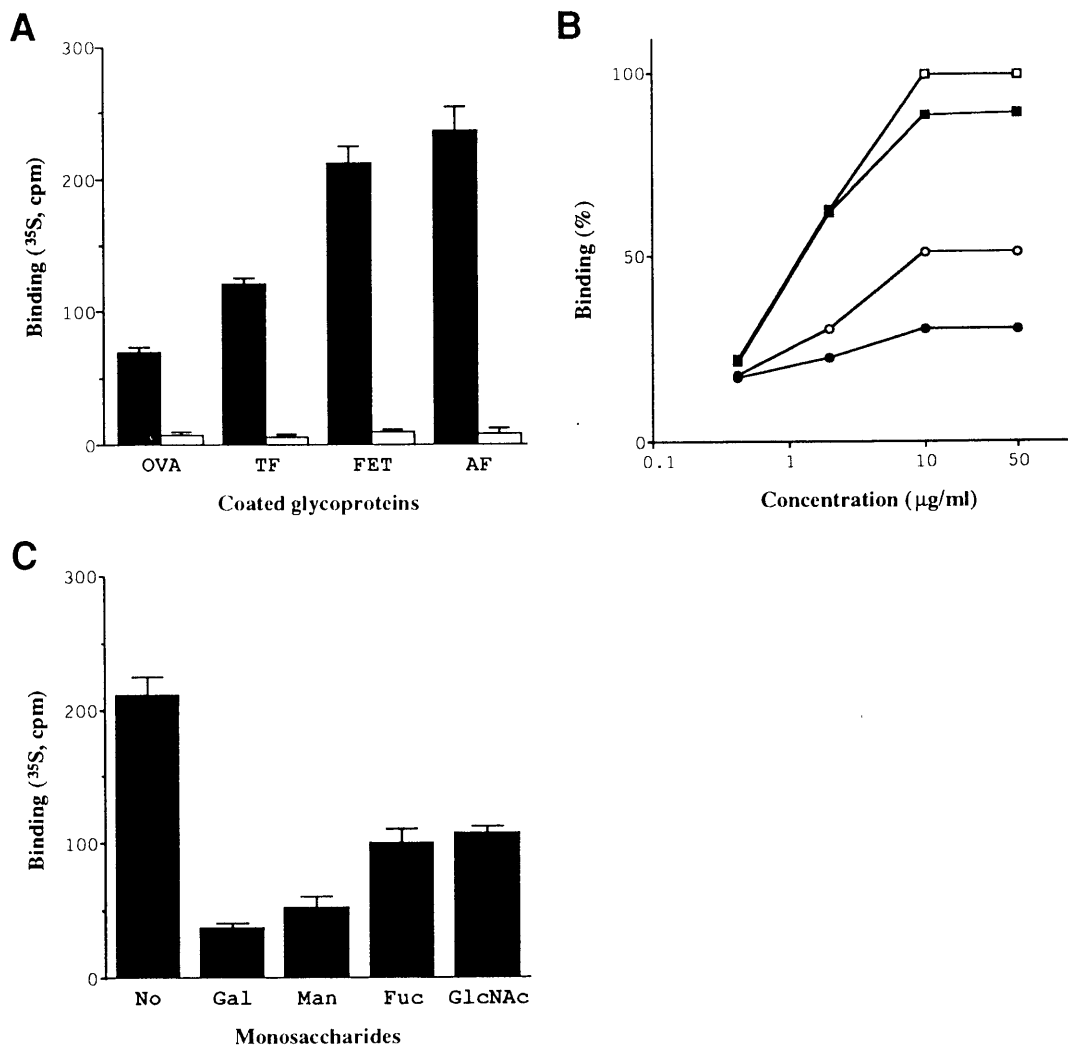


Fig. 3-4. Binding of PG-M chimeric protein to *N*-linked glycoproteins. *A*, microtiter wells were coated with various glycoproteins at a concentration of 50 μg/ml as indicated. The purified, [<sup>35</sup>S]methionine-labeled GST-PG-M chimeric protein was added to the wells, incubated, and then washed. The residual radioactivity was measured. The reaction was performed in the presence of Ca<sup>2+</sup> (closed bars) or EDTA (open bars). The values are the mean ± SD of three independent experiments. OVA, ovalbumin; TF, transferrin; FET, fetuin; AF, asialofetuin. *B*, concentration dependence of binding of PG-M chimeric protein to *N*-linked glycoproteins. The PG-M chimeric protein was incubated in the wells coated with increasing concentrations of *N*-linked glycoproteins. Binding assay was carried out in the presence of Ca<sup>2+</sup> as described in *A*. The values are the mean of three independent experiments. The data point that showed the highest binding was taken as 100%. ●, ovalbumin; ○, transferrin; ■, fetuin; □, asialofetuin. *C*, monosaccharide competition for binding of PG-M chimeric protein to fetuin. Binding assay was performed in the presence of Ca<sup>2+</sup> as described in *A*. Competing monosaccharides were present at a concentration of 100 mM in the reactions. The values are the mean ± SD of three independent experiments. No, no addition; Gal, D-galactose; Man, D-mannose; Fuc, L-fucose; GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine.

クチンの糖鎖を調べるためにレクチンブロット分析を行った (Fig. 3-5A)。フィブロネクチンは2本のポリペプチドから成る糖タンパク質であり、これらのサブユニットには選択的スプライシングにより長さの異なる多数の分子型の存在することが知られている。糖鎖のほとんどはアスパラギン結合型糖鎖であるが、一部、ムチン型糖鎖も存在する。これらの糖鎖の結合部位はウシ血漿フィブロネクチンにおいて詳しく調べられており、最も長いサブユニットではアミノ酸番号で399、497、511、846、976、1213および2168の位置にアスパラギン結合型糖鎖が存在する。また、2124および2125のどちらか、あるいは両方の位置にムチン型糖鎖が存在する。ウシ血漿フィブロネクチンは主に二本鎖複合型糖鎖を持っている (24)。Con Aは今回用いたフィブロネクチンと反応し、エンド-β-グリコシダーゼ H処理を行っても反応性は低下しなかった (Fig. 3-5A, レーン2および3)。RCA IIはこのフィブロネクチンと反応し、シアル酸の除去によりその反応性は高まった (レーン4および5)。PNAはこのフィブロネクチンとはほとんど反応しなかったが、シアル酸を除去した場合、長い方のサブユニットとは反応した (レーン6および7)。Con Aは主に高マンノース型および二本鎖複合型のアスパラギン結合型糖鎖に結合し (25)、エンド-β-グリコシダーゼ Hは高マンノース型および混成型糖鎖を切断する (26) ことが知られている。RCA IIはGalβ1-4GlcNAc-構造と結合し (27)、PNAはGalβ1-3GalNAc-構造と結合する (28)。レクチンブロット分析の結果と使用したレクチンの結合特異性から、今回用いたフィブロネクチンはこれまでに報告されているように二本鎖型を含む複合型糖鎖とムチン型糖鎖を持っていることが確認された。

フィブロネクチンで被覆したウェルへのPG-Mキメラタンパク質の結合を調べた結果、PG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域はカルシウム依存的にフィブロネクチンの糖鎖に結合するということが明らかとなった (Fig. 3-5B)。また、D-ガラクトースとD-マンノースは、ほぼ同じ程度にこの結合を阻害した。

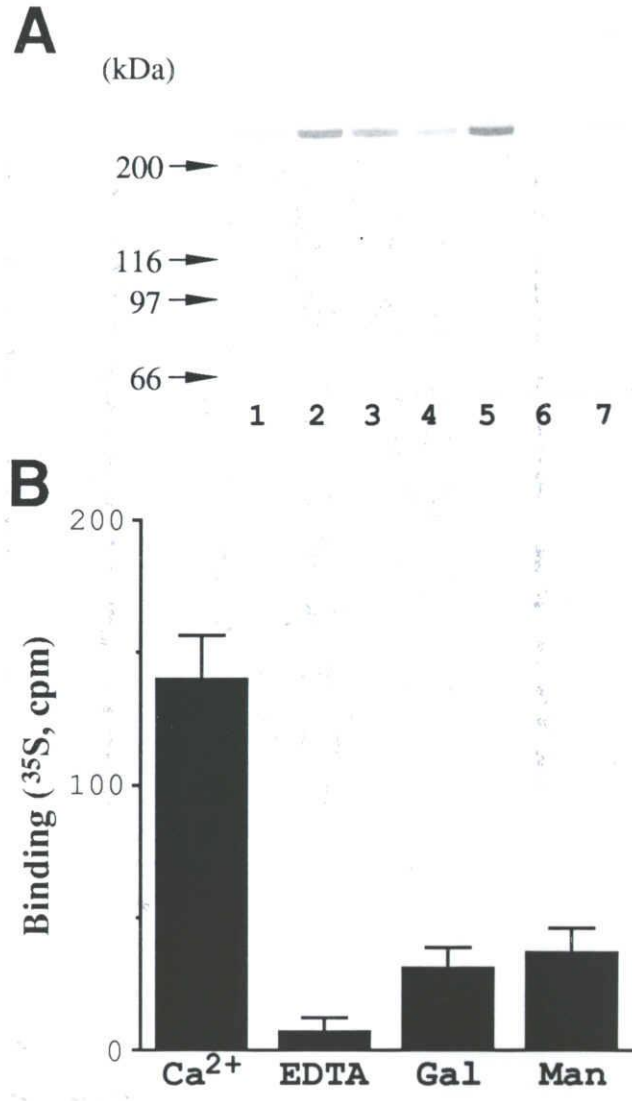


Fig. 3-5. Binding of PG-M chimeric protein to fibronectin. *A*, fibronectin was electrophoresed on 7% SDS-PAGE and its oligosaccharide chains were investigated by lectin blot analysis. Lane 1, CBB staining; lane 2, Con A; lane 3, Con A (after treatment with endo- $\beta$ -glycosidase H); lane 4, RCA I; lane 5, RCA I (after removal of sialic acids); lane 6, PNA; lane 7, PNA (after removal of sialic acids). *B*, wells of microplates were coated with fibronectin at a concentration of 50  $\mu$ g/ml. Binding assay was performed as described in Fig. 3-4. The reaction was carried out in the presence of Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup>), EDTA instead of Ca<sup>2+</sup> (EDTA), Ca<sup>2+</sup> plus 100 mM D-galactose (Gal), or Ca<sup>2+</sup> plus 100 mM D-mannose (Man).

## 大腸菌に発現させたGST-PG-M融合タンパク質の結合特異性

COS細胞から分泌されたPG-Mキメラタンパク質と大腸菌に発現させたGST-EELC融合タンパク質はどちらもカルシウム依存的にフェチインと結合した (Figs. 3-4および3-6)。また、固相結合実験により調べた結果、単糖類に対するそれらの親和性は互いに類似していた。GST-EELC融合タンパク質のオボアルブミンへの結合は非常に弱く、固相結合実験では測定することができなかった (結果は示していない)。これらのことから、PG-Mのカルボキシル末端領域については大腸菌あるいはCOS細胞のどちらで発現させてもそれらの結合特性は互いに類似していると考えられた。

## ニワトリ胚芽に存在するPG-Mの糖タンパク質リガンド

発生段階23のニワトリ胚芽に存在する糖タンパク質の糖鎖をいろいろなレクチンを使って調べ、さらにブロットアッセイによりGST-EELC融合タンパク質と結合する糖タンパク質リガンドを探索した。GST-EELC融合タンパク質はカルシウム存在下で胚芽内のいくつかの糖タンパク質と結合した (Fig. 3-7, レーン6)。40 kDaおよび33 kDaの2つの主要な糖タンパク質リガンド (GP-40およびGP-33) は、両方ともシアル酸の除去に関係なくPNAと反応し (レーン4および5)、GP-33はさらにCon A (レーン2) およびシアル酸除去後にRCA I (レーン3) とも反応した。また、エンド- $\beta$ -グリコシダーゼ H処理をしてもGP-33のCon Aとの反応性は変化しなかった (結果は示していない)。しかし、GP-40およびGP-33はどちらもWGA、SBAおよびE-PHAとは反応しなかった (結果は示していない)。Table 3-1にGP-40およびGP-33のレクチンとの反応性をまとめた。これらの結果から、GP-40およびGP-33はともに末端にシアル酸のないGal $\beta$ 1-3GalNAc-構造を有するムチン型糖鎖を持っており、GP-33はさらに末端にシアル酸のある二本鎖複合型のアスパラギン結合型糖鎖を有していると考えられる (19)。GST-EELC融合タンパク質の代わりにGSTを用いたコントロールのブロットアッセイではこれらのバンドは見られな

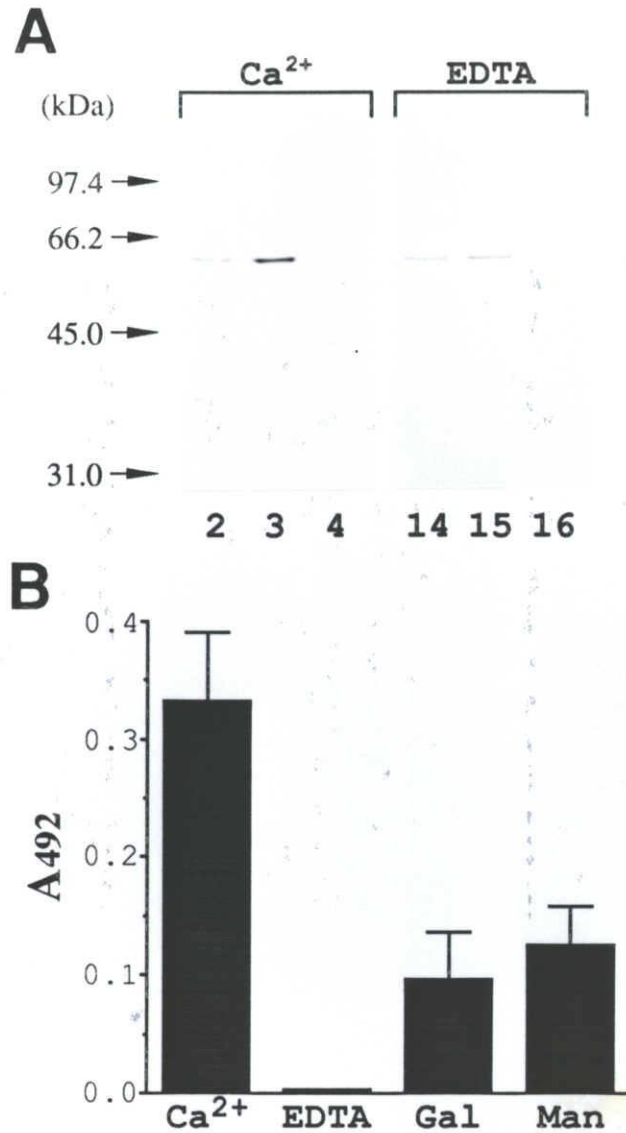


Fig. 3-6. Binding specificity of GST-PG-M fusion protein expressed in bacteria. *A*, the purified GST-EELC fusion protein was applied onto a fetuin-agarose column. After a wash with loading buffer (5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), the column was eluted with elution buffer (2.5 mM EDTA). Fractions were analyzed by SDS-PAGE in 10% acrylamide. Proteins were detected by silver staining. Fractions 2-4, fractions collected in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ ; fractions 14-16, fractions collected in the presence of EDTA. *B*, microtiter wells were coated with fetuin at a concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Binding assay was performed using the GST-EELC fusion protein as described under "Materials and Methods." The reaction between fetuin and the fusion protein was carried out in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ), EDTA instead of  $\text{Ca}^{2+}$  (EDTA),  $\text{Ca}^{2+}$  plus 100 mM D-galactose (Gal), or  $\text{Ca}^{2+}$  plus 100 mM D-mannose (Man). The values are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

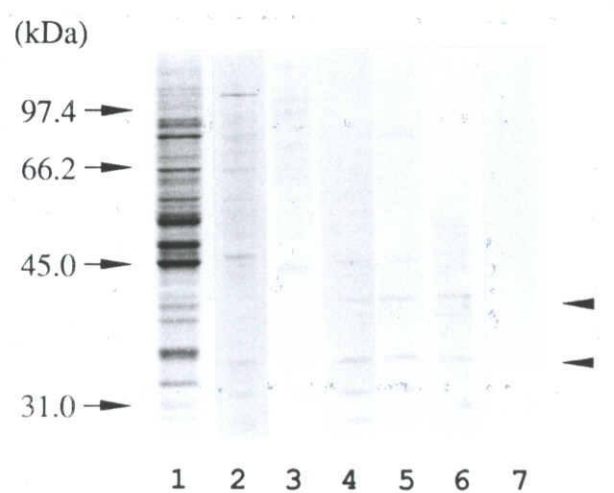


Fig. 3-7. Potential glycoprotein ligands in chick limb buds. Glycoprotein ligands for the carbohydrate-binding of PG-M in chick limb buds were investigated by lectin blot analysis and blot assay using the GST-EELC fusion protein as described under "Materials and Methods." The arrowheads at the right indicate the positions of two major potential glycoprotein ligands (40 and 33 kDa). Lane 1, CBB staining; lane 2, Con A; lane 3, RCA I (after removal of sialic acids); lane 4, PNA; lane 5, PNA (after removal of sialic acids); lane 6, GST-EELC fusion protein; lane 7, GST.

Table 3-1  
Summarized results of interactions of the 40-kDa and 33-kDa glycoprotein with lectins

	Lectins								
	Con A	Con A (Endo-H) <sup>b</sup>	RCA I	RCA I (-Sia) <sup>c</sup>	PNA	PNA (-Sia) <sup>c</sup>	WGA	SBA	E-PHA
GP-40 <sup>a</sup>	-	-	-	-	+	+	-	-	-
GP-33 <sup>a</sup>	+	+	-	+	+	+	-	-	-

+, Binding; -, no binding.

<sup>a</sup> GP-40 and GP-33 represent the 40-kDa and 33-kDa glycoprotein in chick limb buds that interact with the GST-EELC fusion protein, respectively.

<sup>b</sup> After treatment with endo- $\beta$ -glycosidase H.

<sup>c</sup> After removal of sialic acids.

かった(レーン7)。これらの結果より、ニワトリ胚芽に存在する特定の糖タンパク質がPG-Mのカルボキシル末端領域のリガンドであると考えられる。



## 考 察

第2章では、GST融合タンパク質として大腸菌に発現させたPG-Mコアタンパク質のカルボキシル末端領域 (GST-EELC) が固定化された糖に対してカルシウム依存的に結合することを述べた (12)。PG-Mのカルボキシル末端領域はD-マンノース、D-ガラクトース、L-フコースおよびN-アセチル-D-グルコサミンと結合した。しかし、この融合タンパク質が実際のPG-Mコアタンパク質の活性を保持しているかどうかは不明である。そこで今回、PG-Mのカルボキシル末端領域を分泌型GSTキメラタンパク質としてCOS細胞に発現させ、そのオリゴ糖鎖に対する結合特異性を調べた。

精製したPG-Mキメラタンパク質はカルシウム存在下で糖タンパク質糖鎖の中では複合型糖鎖に特に強く結合し、その結合はいろいろな単糖類により阻害された (Fig. 3-4)。結合のカルシウム依存性と単糖類による阻害は、この結合活性がPG-Mのカルボキシル末端領域に存在するC型レクチン様ドメインによるものであるということを示している。PG-Mのレクチン様ドメインは、同程度の親和性でガラクトースとマンノースに結合する。一般に動物レクチンはマンノース結合レクチンとガラクトース結合レクチンの2つに大別され、どちらの糖にも親和性を示すレクチンは比較的少ない。Drickamer (29) は、いろいろなC型レクチンのアミノ酸配列を比較することにより、糖認識ドメイン内の特定のアミノ酸がGlu-Pro-Asnである場合はマンノース結合性であり、Gln-Pro-Aspの場合はガラクトース結合性となることを見いだした。さらに、これらのアミノ酸のすぐそばに存在するTrp残基とグリシンリッチな配列がガラクトース結合における親和性と特異性に関与していることも明らかとなった (30)。PG-Mのレクチン様ドメインはガラクトース結合性の糖認識ドメインに特徴的なGln-Pro-Asp配列を持っているが、これに隣接するTrp残基とグリシンリッチな配列は存在しない。よって、PG-Mのレクチン様ドメインはガラクトースだけでなくマンノースにも親和性を有するのであろう。ところが、これ

らのアミノ酸配列に関してはPG-Mのレクチン様ドメインと同じ構造を持つアグリカンのレクチン様ドメインは、いろいろな種類の糖と結合できるという点では類似しているが、PG-Mのレクチン様ドメインと異なり、マンノースよりもやや強くガラクトースと結合すると報告されている (31, 32)。この差はPG-Mとアグリカンの間の他の構造の違いによると考えられる。

フィブロネクチンは枝芽の間充織凝集部位の主要な細胞外マトリックス成分であり (7)、また、精製したPG-Mはフィブロネクチンと結合する (5)。ニワトリ枝芽に存在するフィブロネクチンの糖鎖の構造はまだ分かっていないが、それらは、おそらく他の動物種あるいは組織のフィブロネクチンと同様に、主に複合型糖鎖であろう。これらのデータから予想されるように、PG-Mのカルボキシル末端領域はカルシウム依存的にフィブロネクチンの糖鎖と結合した (Fig. 3-5B)。今回の結合実験には糖鎖構造がよく研究されているウシ血漿フィブロネクチンを用いた。この結果から、第2章で述べたヘパラン硫酸プロテオグリカン (12) と同様にフィブロネクチンも枝芽におけるPG-Mのリガンドの1つであると考えられる。また、シンデカンファミリーのメンバーであるシンデカン 3がニワトリ枝芽の間充織凝集部位に発現することが報告されており (33)、このプロテオグリカンのヘパラン硫酸鎖および存在が推定されているムチン型糖鎖がPG-Mのレクチン様ドメインと相互作用していると予想される。

PNA結合性分子がニワトリ枝芽の間充織凝集部位に特異的に発現することが知られている (13)。今回、ブロットアッセイによりPG-Mのカルボキシル末端領域がニワトリ枝芽内の特定のPNA結合性分子と結合することが明らかとなった (Fig. 3-7)。この相互作用は枝芽の間充織凝集に関与しているかもしれない。実際にニワトリ胚の $\beta$ -D-ガラクトシド結合性レクチンが軟骨分化を促進することが報告されている (14)。これらの現象は細胞表面の糖鎖認識に基づいていると思われる。今回見いだされたPG-Mと結合するPNA結合性分子が細胞外マトリックスあるいは細胞表面の分子であるのかどうか、また、間充織凝集部位に特異的に発現するPNA結合性分子と同一であるのかどうかを決定

するには、cDNAクローニングを含むさらなる研究が必要であろう。

PG-Mはコンドロイチン硫酸鎖を持ち、さらにコアタンパク質にはヒアルロン酸結合領域、EGF様ドメイン、レクチン様ドメインおよびCRP様ドメインが存在する多機能な分子である(8)。PG-Mのコンドロイチン硫酸鎖は細胞接着阻害活性を持ち、これにより*in vitro*において軟骨分化を促進することが報告されている(1)。PG-Mはアミノ末端領域に存在するヒアルロン酸結合領域とカルボキシル末端領域のレクチン様ドメインにおける結合を介して細胞外マトリックスの網目構造に固定されることにより肢芽の間充織凝集部位に特有なマトリックスの構築に寄与し、また、このコンドロイチン硫酸鎖の活性を高めているのだろう。この場合、ヒアルロン酸、フィブロネクチンなどの糖タンパク質およびヘパラン硫酸プロテオグリカンなどがPG-Mの足場として機能していると思われる。以上のことから、細胞表面糖鎖との相互作用によるレクチン様ドメインの間充織凝集への寄与を含め、PG-Mの持ついろいろな活性が軟骨分化を制御していると考えられる。

## 要 約

PG-Mのカルボキシル末端領域にはEGF様ドメイン、C型レクチン様ドメインおよびCRP様ドメインが存在する。この領域はカルシウム依存的に糖と結合する。今回、PG-Mのカルボキシル末端領域のオリゴ糖鎖に対する結合特異性とニワトリ胚芽におけるリガンドを調べた。GSTとPG-Mのカルボキシル末端領域から成る分泌型キメラタンパク質をコードするcDNAを組み込んだpcDNA1/NEOをCOS細胞に導入し、その培養上清から分泌されたキメラタンパク質を精製した。様々な糖タンパク質に対する精製PG-Mキメラタンパク質の結合を固相結合実験により調べた結果、それはカルシウム依存的に複合型糖鎖に特に強く結合することが明らかとなった。さらにフィブロネクチンとの結合も見いだされた。また、このキメラタンパク質と大腸菌に発現させたGST-PG-M融合タンパク質を比較したところ、それらの結合特異性は互いに類似していた。そして、GST-PG-M融合タンパク質を使ったブロットアッセイにより、PG-Mのカルボキシル末端領域と結合するいくつかの糖タンパク質が発生段階23のニワトリ胚芽に見いだされた。

## 引用文献

1. Shinomura, T., Nishida, Y., and Kimata, K. (1992) in *Articular Cartilage and Osteoarthritis* (Kuettner, K. E., Schleyerbach, R., Peyron, J. G., and Hascall, V. C., eds) pp. 35-44, Raven Press, New York
2. Kimata, K., Oike, Y., Tani, K., Shinomura, T., Yamagata, M., Uritani, M., and Suzuki, S. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13517-13525
3. Shinomura, T., Jensen, K. L., Yamagata, M., Kimata, K., and Solursh, M. (1990) *Anat. Embryol.* **181**, 227-233
4. Chandrasekaran, L., and Tanzer, M. L. (1992) *Biochem. J.* **288**, 903-910
5. Yamagata, M., Yamada, K. M., Yoneda, M., Suzuki, S., and Kimata, K. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13526-13535
6. Toole, B., Banerjee, S., Turner, R., Munaim, S., and Knudson, C. (1991) in *Developmental Patterning of the Vertebrate Limb* (Hinchliffe, J. R., Hurle, J. M., and Summerbell, D., eds) pp. 215-223, Plenum Press, New York
7. Shinomura, T., and Kimata, K. (1990) *Dev. Growth & Differ.* **32**, 243-248
8. Shinomura, T., Nishida, Y., Ito, K., and Kimata, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14461-14469
9. Ito, K., Shinomura, T., Zako, M., Ujita, M., and Kimata, K. (1995) *J. Biol. Chem.* in press
10. Zimmermann, D. R., and Ruoslahti, E. (1989) *EMBO J.* **8**, 2975-2981
11. LeBaron, R. G., Zimmermann, D. R., and Ruoslahti, E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10003-10010
12. Ujita, M., Shinomura, T., Ito, K., Kitagawa, Y., and Kimata, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27603-27609

13. Aulthouse, A.L., and Solursh, M. (1987) *Dev. Biol.* **120**, 377-384
14. Matsutani, E., and Yamagata, T. (1982) *Dev. Biol.* **92**, 544-548
15. Seed, B., and Aruffo, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3365-3369
16. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
17. Hayashi, M., and Yamada, K. M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 5263-5267
18. Ujita, M., Furukawa, K., Aoki, N., Sato, T., Noda, A., Nakamura, R., Greenwalt, D. E., and Matsuda, T. (1993) *FEBS Lett.* **332**, 119-122
19. Kijimoto-Ochiai, S., Katagiri, Y. U., and Ochiai, H. (1985) *Anal. Biochem.* **147**, 222-229
20. Yamashita, K., Tachibana, Y., and Kobata, A. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 3862-3869
21. Tai, T., Yamashita, K., Ito, S., and Kobata, A. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 6687-6694
22. Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S., and Montreuil, J. (1975) *FEBS Lett.* **50**, 296-299
23. Nilsson, B., Norden, N. E., and Svensson, S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 4545-4553
24. Petersen, T. E., Skorstengaard, K., and Vibe-Pedersen, K. (1989) in *Fibronectin* (Mosher, D. F., ed) pp. 1-24, Academic Press, San Diego
25. Krusius, T., Finne, J., and Rauvala, H. (1976) *FEBS Lett.* **71**, 117-120
26. Arakawa, M., and Muramatsu, T. (1974) *J. Biochem. (Tokyo)* **76**, 307-317
27. Baenziger, J. U., and Fiete, D. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9795-9799
28. Kaifu, R., and Osawa, T. (1979) *Carbohydr. Res.* **69**, 79-88
29. Drickamer, K. (1992) *Nature* **360**, 183-186

30. Iobst, S. T., and Drickamer, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15512–15519
31. Halberg, D. F., Proulx, G., Doege, K., Yamada, Y., and Drickamer, K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9486–9490
32. Saleque, S., Ruiz, N., and Drickamer, K. (1993) *Glycobiology* **3**, 185–190
33. Gould, S. E., Upholt, W. B., and Kosher, R. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3271–3275

## 第4章

### オステオグリシンのcDNAクローニングおよびその発現

#### 序 論

オステオグリシンは、最初にウシの骨からosteoinductive factor (OIF) として単離された (1)。ウシの骨のオステオグリシンは22-28 kDaの糖タンパク質であり、糖鎖の除去により12 kDaの大きさになる。ヒトとウシのオステオグリシンのcDNA解析が行われており、この分子が特徴的な24残基のロイシンリッチリピートを持つタンパク質のファミリーであるロイシンリッチプロテインファミリーのメンバーであることが示されている (2, 3)。ヒトのオステオグリシン (298アミノ酸) とウシのオステオグリシン (299アミノ酸) の間のアミノ酸配列の相同性は92%である。しかし、その生物学的機能はまだわかっていない。また、オステオグリシンはPG-Lbに相同性を示すことがわかっている。

PG-Lbは43 kDaのコアタンパク質と52 kDaのコンドロイチン/デルマタン硫酸鎖から成る小型のプロテオグリカンであり (4)、発生過程のニワトリ四肢の骨端軟骨に存在する扁平な細胞から成る領域に特異的に発現している (5)。PG-Lbの生物学的機能は不明であるが、その独特な発現パターンから、この分子の軟骨形成への関与が示唆されている。これまでにPG-Lbのコアタンパク質をコードするcDNAクローンがニワトリ胚の骨端軟骨のcDNAライブラリーから単離されており (6)、解析の結果、PG-Lbもロイシンリッチプロテインであることが示された。

この章では、cDNA解析により推定したマウスのオステオグリシンのアミノ酸配列とノーザンブロット解析により明らかにした各種の組織におけるこの分子の発現について述べる。



## 実験材料および実験方法

### マウスゲノムライブラリーのスクリーニング

オステオグリシンをコードする遺伝子を単離するために $\lambda$ FixII 129SVマウスゲノムライブラリー (Stratagene, La Jolla, CA) をウシのオステオグリシンの合成cDNA断片 (ヌクレオチド番号 708-906) (2) をプローブとして用いたブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングした (6)。このcDNAプローブはPCRにより合成した (7)。陽性クローンはオートラジオグラフィにより検出した。

### DNA塩基配列決定

得られたクローンからマウスのオステオグリシンをコードするゲノムDNA断片を単離し、これをpGEM-3Zf(-)プラスミドベクター (Promega, Madison, WI) に組み込んだ。単離したゲノムDNA断片の塩基配列はジデオキシ法により決定した (8)。この塩基配列をDNASISコンピュータープログラム (Hitachi Software Engineering Co., Yokohama, Japan) を使って解析した。また、エクソン領域を決定するために、得られたゲノムDNAの塩基配列をウシのオステオグリシンのcDNA配列と比較した (2)。

### $\lambda$ gt11 cDNAライブラリーの作製とスクリーニング

グアニジンチオシアネート法 (9) とオリゴ(dT)-セルロース アフィニティークロマトグラフィ (10) により11-14日目のマウス胚芽からポリ(A)<sup>+</sup> RNAを単離した。この精製したポリ(A)<sup>+</sup> RNAからランダムプライマーを用いて $\lambda$ gt11 cDNAライブラリーを作製した。このcDNAライブラリーを上記のエクソン領域をコードする0.16 kbのPCR断片をプローブとして用いたブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。陽性クローンはオートラジオ

オグラフィーにより検出した。得られたクローンのDNAの*Eco* RI消化により挿入されているcDNA断片を切り出し、上記と同様の方法で塩基配列を決定した。その推定アミノ酸配列をNational Biomedical Research Foundationのデータベースを使って他のタンパク質のアミノ酸配列と比較した。

#### ノーザンブロット解析

マウスの各種組織のポリ(A)<sup>+</sup> RNA (Clontech, Palo Alto, CA) の各2.5 µgをホルムアルデヒド-0.8% アガロースゲルで電気泳動し、Hybond N<sup>+</sup>メンブラン (Amersham International, plc) に転写した。マウスのオステオグリシンをコードする1.3 kbのcDNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った (42 °C, 50% ホルムアミド, 24時間) (11)。続いてメンブランを洗浄し (15 mM NaCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1% SDS, 65 °C)、オートラジオグラフィーを行った。

#### サザンブロット解析

*Bgl* II, *Hind* III, *Kpn* I, *Pvu* II, *Sph* Iあるいは*Xba* Iで消化したマウスのゲノムDNA (Clontech) の各2 µgを0.7% アガロースゲルで電気泳動し、Hybond N<sup>+</sup>メンブランに転写した。上記の0.16 kbのPCR断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った (42 °C, 50% ホルムアミド, 24時間)。続いてメンブランを洗浄し (75 mM NaCl, 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.1% SDS, 60 °C)、オートラジオグラフィーを行った。

## 結 果

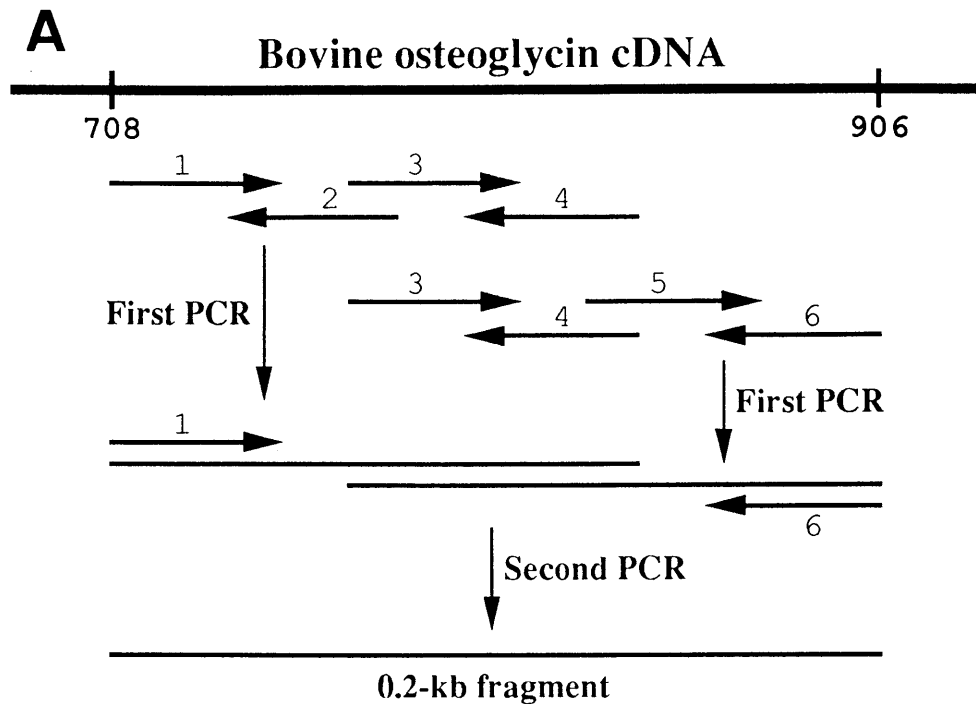
オステオグリシンをコードするマウスゲノムDNAクローンの単離と解析

ウシのオステオグリシンの一部をコードする0.2 kbの合成cDNA断片 (Fig. 4-1A参照) をプローブに用いてマウスゲノムライブラリーをスクリーニングした結果、13 kbのクローンが単離された。このクローンの塩基配列を決定し、ホモロジー解析を行ったところ、159ヌクレオチドから成るエクソンの存在が確認された (Fig. 4-1B)。

マウスのオステオグリシンをコードするcDNAクローンの単離と解析

マウスのオステオグリシン遺伝子のエクソンの1つに対応する0.16 kbのPCR断片をプローブに用いてマウス胚芽cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、5つのクローンが単離された ( $\lambda$ mOG1-5)。 $\lambda$ mOG3のインサートの大きさは1.3 kbであり、制限酵素地図を作製して調べた結果、これは他の4つのクローンのインサートDNAをすべて含んでいることがわかった。

$\lambda$ mOG3の塩基配列とその推定アミノ酸配列をFig. 4-2に示す。得られたcDNAの長さは1,268塩基であり、34,010の分子量を持つ298アミノ酸残基から成るタンパク質をコードする894ヌクレオチドの読み取り枠を1つ含む。開始コドンの上流の塩基配列とシグナルペプチダーゼの切断位置と考えられる部位の周囲のアミノ酸配列はそれぞれKozakのルール (12)とHeijneの(-3, -1)のルール (13)によく当てはまっている。シグナルペプチドは18アミノ酸残基から成ると考えられた。また、アスパラギン結合型糖鎖の結合が可能な部位が1箇所存在する (Asn<sup>258</sup>) (14)。さらにマウスのオステオグリシンにはグリコサミノグリカン鎖の結合が可能な<sup>101</sup>Ser-Gly-Ser<sup>103</sup>と<sup>295</sup>Gly-Ser<sup>296</sup>の配列が存在する (15-17)。しかし、それらはグリコサミノグリカン鎖の結合についてのコンセンサス配列であるSer-Gly-Xaa-Glyとは完全には一致していない (15)。マウスのオステオグリシンはヒトおよびウシのオステオグリシンに対してそれぞれ



**B** Mouse genomic sequence

```

ttttgtctcttaatttagAAATGCCCCAC-----GCAGACATCGgtaagttt
      :::::::::::      :::::::::::
      AAATGCCCCAC-----GCAGACATAC
      690                846
Sequence of bovine osteoglycin cDNA

```

Fig. 4-1. The strategy for PCR-based gene assembly (A) and an exon sequence of the gene for mouse osteoglycin (B). A, PCR-based gene assembly is depicted (7). The 0.2-kb bovine osteoglycin cDNA fragment (nucleotides 708-906) (2) was constructed from synthetic oligonucleotide primers by the two steps of PCR and used as a probe for the screening of a  $\lambda$ FixII 129SV mouse genomic library. The bold number indicates the nucleotide position of bovine osteoglycin cDNA (2). Horizontal arrows and bars represent synthetic oligonucleotides and PCR products, respectively. The nucleotide position of each primer is: 1, 708-753; 2, 739-783; 3, 769-814; 4, 800-845; 5, 831-876; 6, 861-906 (2). B, the sequences of an exon region of an isolated genomic clone for mouse osteoglycin and the corresponding region of bovine osteoglycin cDNA are shown. Identical nucleotides are marked by two dots (:). The number indicates the nucleotide position of bovine osteoglycin cDNA (2). The consensus splice sequences are indicated by bold letters, and the intron sequence is shown by small letters.

	TCA GTC ACT CCT AAC TTC AGT CAC CTT GTG TCT GCT GAA	39
ATG GAG ACT GTG CAC TCT ACA TTT CTC CTG CTA CTC TTC GTG CCT CTG ACA CAG CAA GCA	99	
Met <u>Glu Thr Val His Ser Thr Phe Leu Leu Leu Phe Val Pro Leu Thr Gln Gln Ala</u>	20	
CCA CAG TCG CAG CTG GAC TCA CAT GTT AAC TAT GAG TAT GCA ACA GGC AAT TCT GAA GAA	159	
Pro Gln Ser Gln Leu Asp Ser His Val Asn Tyr Glu Tyr Ala Thr Gly Asn Ser Glu Glu	40	
ACC AAA TTT AGC CAG GAT TAT GAA GAT AAA TAC CTG GAT GGG AAA AGT ATT AAG GAA AAA	219	
Thr Lys Phe Ser Gln Asp Tyr Glu Asp Lys Tyr Leu Asp Gly Lys Ser Ile Lys Glu Lys	60	
GAA ACT ATG ATA ATT CCT GAT GAG AAA AGT CTT CAG TTA CAA AAA GAT GAA GTT ATA CCA	279	
Glu Thr Met Ile Ile Pro Asp Glu Lys Ser Leu Gln Leu Gln Lys Asp Glu Val Ile Pro	80	
TCA TTA CCA ACC AAG AAA GAA AAT GAT GAA ATG CCC ACA TGC CTG TTG TGT GTC TGC TTA	339	
Ser Leu Pro Thr Lys Lys Glu Asn Asp Glu Met Pro Thr Cys Leu Leu Cys Val Cys Leu	100	
AGT GGC TCT GTC TAC TGT GAA GAA GTT GAC ATT GAT GCT GTA CCA CCA TTG CCA AAG GAA	399	
Ser Gly Ser Val Tyr Cys Glu Glu Val Asp Ile Asp Ala Val Pro Pro Leu Pro Lys Glu	120	
<u>Δ</u>		
TCA GCT TAT CTT TAT GCA CGA TTC AAC AAA ATT AAA AAG CTG ACT GCC AAG GAT TTT GCA	459	
Ser Ala Tyr Leu Tyr Ala Arg Phe <b>Asn Lys Ile Lys Lys Leu Thr Ala Lys Asp Phe Ala</b>	140	
GAC ATG CCA AAC CTA AGA AGA CTT GAT TTT ACG GGA AAT TTG ATA GAA GAC ATA GAA GAT	519	
Asp Met Pro Asn <b>Leu Arg Arg Leu Asp Phe Thr Gly Asn Leu Ile Glu Asp Ile Glu Asp</b>	160	
GGG ACT TTT TCA AAA CTT TCT CTG TTA GAA GAA CTT ACA CTT GCT GAA AAC CAA CTA CTA	579	
Gly Thr <b>Phe Ser Lys Leu Ser Leu Leu Glu Glu Leu Thr Leu Ala Glu Asn Gln Leu Leu</b>	180	
AGA CTT CCA GTT CTT CCT CCA AAG CTT ACT TTA CTT AAT GCC AAA CAC AAC AAA ATC AAG	639	
Arg <b>Leu</b> Pro Val Leu Pro Pro Lys Leu Thr Leu Leu Asn Ala Lys His Asn Lys <u>Ile Lys</u>	200	
AGT AAA GGA ATT AAA GCA AAC ACA TTC AAA AAA CTG AAT AAA CTC TCT TTT CTC TAT TTG	699	
Ser Lys Gly Ile Lys Ala Asn Thr <b>Phe Lys Lys Leu Asn Lys Leu Ser Phe Leu Tyr Leu</b>	220	
GAC CAT AAC GAC CTG GAA TCT GTG CCT CCT AAT TTA CCA GAA AGT CTA CGT GTA ATT CAC	759	
Asp His <b>Asn</b> Asp Leu Glu Ser Val Pro Pro Asn Leu Pro Glu Ser <b>Leu Arg Val Ile His</b>	240	
CTT CAG TTT AAC AGC ATA TCT TCA CTT ACA GAT GAT ACA TTC TGC AAG GCT AAT GAC ACT	819	
Leu Gln Phe <b>Asn Ser Ile Ser Ser Leu Thr Asp Asp Thr Phe</b> Cys Lys Ala Asn Asp Thr	260	
CGT TAC ATT CGG GAG CGA ATT GAA GAG ATT CGC CTG GAG GGC AAT CCA ATT GCT CTG GGA	879	
Arg Tyr Ile Arg Glu Arg Ile Glu Glu Ile Arg Leu Glu Gly Asn Pro Ile Ala Leu Gly	280	
AAG CAT CCA AAC AGT TTT ATC TGC TTA AAA AGA TTA CCC ATA GGG TCA TAC TTC TAA CCC	939	
Lys His Pro Asn Ser Phe Ile Cys Leu Lys Arg Leu Pro Ile Gly Ser Tyr Phe ***	298	
<u>Δ</u>		
CAT CAG TGC AGC TTA TAA CCT AAG GTA CAT GTG CCT AAT GTC TAA AGG AAC AGA AAC ATT	999	
AGT TTA ACA TTA CCG TTT TAT CTC ACT ATG ATG GAA GTT TAT GTT TAA ACA AAG TGT CCA	1059	
AAA TTG TTG TAT GTG ACT ACA AAA ATA ATC CAG CCT GAA TCT CTT AGT TCA AAA CAA AAT	1119	
ACT GTG AAA CTA AAC AGC ATT AAG GGT CTC CTT GTT GTT ATA CCA AAC CAC TAT CTA AAT	1179	
AGC ATG CTT TTA CAC AGA CAC TTG CTT GAG ATA CAC CAT TCC CAT GAC TAA TGA AGT AAG	1239	
AAA ATT CCA AGA AAC TTG CAA CTG TTT GT	1268	

Fig. 4-2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of mouse osteoglycin. Leucine-rich repeat motifs are underlined and the conserved amino acid residues in them are shown by bold letters. A putative signal peptide is marked with a broken underline. Possible *N*-glycosylation and glycosaminoglycan-attachment sites are indicated with ▲ and Δ, respectively. The nucleotide sequence data will appear in the DDBJ, EMBL and GenBank Nucleotide Sequence Databases with the accession number D31951.

れアミノ酸配列で85および86%の相同性を示す (2)。

#### ノーザンブロット解析

マウス胚芽のポリ(A)<sup>+</sup> RNAのノーザンブロット解析により、マウスのオステオグリシンは3.7 kbのmRNAによってコードされているということが示された (結果は示していない)。そして、この3.7 kbのmRNAの発現の程度は組織により異なっていることが明らかとなった (Fig. 4-3)。このmRNAは肺、骨格筋および睾丸において強く発現していた。また、腎臓においても発現は見られたが、脳では、その発現はわずかであった。マウスのオステオグリシンのmRNAは平滑筋、肝臓および膵臓では検出されなかった。

#### サザンブロット解析

マウスのゲノムDNAのサザンブロット解析により、マウスのオステオグリシンは単一の遺伝子によりコードされているということが示された (Fig. 4-4)。

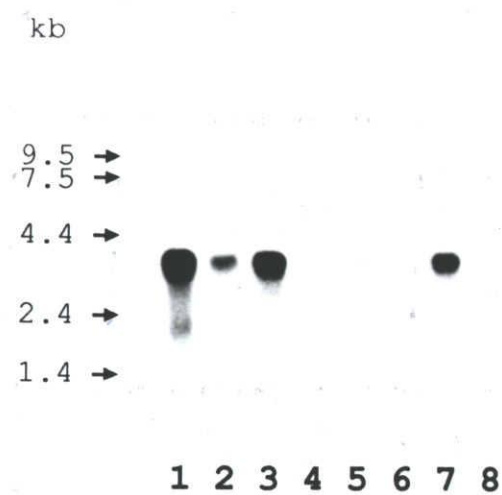


Fig. 4-3. Northern blot analysis of the mRNA encoding mouse osteoglycin. Poly (A)<sup>+</sup> RNAs from various mouse tissues were separated on a denaturing formaldehyde-agarose gel. After transferring to a Hybond N<sup>+</sup> membrane, the bound RNA was hybridized as described under "Materials and Methods." Sizes of the RNA species used for calibration are indicated in the left in kilobases (kb). Lanes: 1, lung; 2, kidney; 3, skeletal muscle; 4, smooth muscle; 5, brain; 6, liver; 7, testis; 8, pancreas.

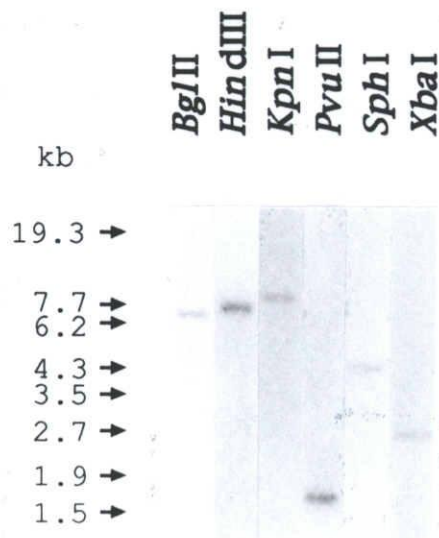


Fig. 4-4. Southern blot analysis of mouse genomic DNA encoding osteoglycin. 2  $\mu$ g portions of mouse genomic DNA were digested with six different restriction enzymes indicated at the top and then were separated on a 0.7% agarose gel. After transferring to a Hybond N<sup>+</sup> membrane, the bound DNA was hybridized as described under "Materials and Methods." Sizes of the DNA species used for calibration are indicated on the left in kilobase pairs (kb).



## 考 察

オステオグリシンはロイシンリッチプロテインファミリーのメンバーであり、その分子内に6つの特徴的な24残基から成るロイシンリッチリピートを持っている (Fig. 4-2)。このファミリーには他にPG-Lb (6)、デコリン (18)、バイグリカン (19)、フィブロモジュリン (20)、ルミカン (21)、toll (22)、chaptin (23) およびslit (24)などが含まれる (Fig. 4-5A)。ホモロジー解析の結果、オステオグリシンは、これらのメンバーの中で特にPG-Lbに高い相同性を示すことがわかった。マウスのオステオグリシンのカルボキシル末端側の3分の2の領域 (アミノ酸残基 86-296) はPG-Lbコアタンパク質のカルボキシル末端側の領域 (アミノ酸残基 104-314) に対して48%の相同性を示す (Fig. 4-5B)。さらに、これらの2つの分子のそれぞれに存在する6つのシステイン残基はすべて上記の相同性を示す領域に存在し、しかも、それらの残基の相対位置は両分子間で完全に一致していることも明らかとなった。システイン残基はジスルフィド結合の形成を通してタンパク質の高次構造の形成に寄与しており、オステオグリシンとPG-Lbの立体構造は互いに類似していると考えられる。このように進化の過程で保存された構造は、これらの分子の持つ生物学的機能と密接に関連していると考えられる。また、PG-Lbは骨端軟骨の扁平細胞層 (5) だけでなく、軟骨と骨化領域の境界部分にも発現される (6)。これらの結果から軟骨および骨の形成へのPG-Lbの関与が示唆され、オステオグリシンの機能を考える上で参考になると思われる。

TGF- $\beta$ はデコリン、バイグリカンおよびフィブロモジュリンのコアタンパク質と結合することが知られている (25)。さらにこの結合によりデコリンが細胞増殖を制御することも報告された (25)。ロイシンリッチリピートは様々なタンパク質間の結合に関与する結合ドメインを形成すると考えられており、同様にオステオグリシンもTGF- $\beta$ と結合するのかもしれない。この結合がTGF- $\beta$ による軟骨分化の制御に関与している可能性もある。また、ショウジョ

**A**

N - I - - - - - F - - L - - L - - L - L - -	mOG
N - I - - I - - - - F - - L - - L - - L - L - -	cPG-Lb
N K I S - V - - G - F - - L - - L - - L - L - -	hDecorin
N - I - - I - - - - - S - L - - L - - L - L - -	hBiglycan
N - I - - V P - - - - - L - - L - - L - L - H	bFM
N - I - - I - - - - - F - - - - - L - - L - L S H	bLumican
N - L - - L P - - - L F - - - - - L - - L - L - -	dToll
N - L - - I - - - - - F - - - - - L - - L D L S -	dChaoptin
N - I - - L - - - - - F - - L - - L - - L - L - -	dSlit

**B**

Lb	MKTFVNIFLGFFIFESVG	1-18
OG	METVHSTFL <sup>.</sup> LL <sup>.</sup> LL <sup>.</sup> FVPLTQQ <sup>.</sup> APQSQLDSHV <sup>.</sup> N <sup>.</sup> YEYATGNSE <sup>.</sup> E <sup>.</sup> TKFSQDYED <sup>.</sup> K <sup>.</sup> YLDGKSIKE <sup>.</sup> K	1-60
Lb	AVPITD <sup>.</sup> TVTYDSEFYD <sup>.</sup> VS <sup>.</sup> LGELPH <sup>.</sup> PFVSAENDQSDQVETEIGTAIP <sup>.</sup> SIIQESYSSAPL <sup>.</sup> TE	19-78
OG	ETMIIPDEK <sup>.</sup> SL <sup>.</sup> QL <sup>.</sup> LQKDEVIP <sup>.</sup> SLPTKKENDE <sup>.</sup> MPT <sup>.</sup> <b>CL</b> <sup>.</sup> LCV <sup>.</sup> CL <sup>.</sup> SG <sup>.</sup> SVY <sup>.</sup> C <sup>.</sup> EEVD <sup>.</sup> IDAVP <sup>.</sup> PL <sup>.</sup> PK <sup>.</sup> E	61-120
Lb	EPEEEASTPKLIDG <sup>.</sup> SSAQGS <sup>.</sup> GVLPQ <sup>.</sup> TQDGLPT <sup>.</sup> <b>CL</b> <sup>.</sup> CTCLGTTVY <sup>.</sup> CDDRELD <sup>.</sup> AVP <sup>.</sup> PL <sup>.</sup> PKN	79-138
OG	SAYLYARFN <sup>.</sup> KIK <sup>.</sup> KLTA <sup>.</sup> KDFAD <sup>.</sup> M <sup>.</sup> PNLRR <sup>.</sup> LDFTGN <sup>.</sup> LIED <sup>.</sup> IEDGTFSKLSL <sup>.</sup> LEEL <sup>.</sup> TLAENQL <sup>.</sup> L	121-180
Lb	TMYFY <sup>.</sup> SRYNRIRKINK <sup>.</sup> NDFANLNN <sup>.</sup> LKRIDL <sup>.</sup> TANLISEIHEDAFRR <sup>.</sup> L <sup>.</sup> QLLEL <sup>.</sup> VLRDNRIR	139-198
OG	RLPVL <sup>.</sup> PPK <sup>.</sup> L <sup>.</sup> LLNAKH <sup>.</sup> NKI <sup>.</sup> SKG <sup>.</sup> IKANT <sup>.</sup> F <sup>.</sup> KKL <sup>.</sup> NKLSFLY <sup>.</sup> LDHNDLESV <sup>.</sup> PNLPESL <sup>.</sup> RVI <sup>.</sup> H	181-240
Lb	QLPELPST <sup>.</sup> TLIDIS <sup>.</sup> NNRLGRK <sup>.</sup> GIRNEAFKDLHELQ <sup>.</sup> HLYITDNNLDH <sup>.</sup> VPLPLPESL <sup>.</sup> QALH	199-258
OG	LQFN <sup>.</sup> SIS <sup>.</sup> SLTDDTF <sup>.</sup> CKAND <sup>.</sup> TRYIRERIEE <sup>.</sup> IRLEGNP <sup>.</sup> IALGKHPNS <sup>.</sup> FIC <sup>.</sup> LKRLPI <sup>.</sup> GS <sup>.</sup> YF	241-298
Lb	LQNNNIQEMHEDTF <sup>.</sup> CKMRDFS <sup>.</sup> YVRRAL <sup>.</sup> EDIRLDGNP <sup>.</sup> INLSKTPYAYMCLPRL <sup>.</sup> PVGNLI	259-316

Fig. 4-5. Comparison of the amino acid sequences among members of the leucine-rich protein family and mouse osteoglycin. *A*, the consensus sequence of the leucine-rich repeats in mouse osteoglycin (mOG) (aa 153-176) is compared to the following consensus sequences: cPG-Lb, [chick PG-Lb (aa 171-194)] (6); hDecorin, [human decorin (aa 115-138)] (18); hBiglycan, [human biglycan (aa 263-286)] (19); bFM, [bovine fibromodulin (aa 185-208)] (20); bLumican, [bovine lumican (aa 219-242)] (21); dToll, [*Drosophila* toll (aa 376-399)] (22); dChaoptin, [*Drosophila* chaoptin (aa 888-911)] (23); dSlit, [*Drosophila* slit (aa 182-205 and 380-403)] (24). *B*, the amino acid sequence homology between mouse osteoglycin (OG) and chick PG-Lb (Lb). Identical amino acids are marked by two dots (:). Cysteine residues are indicated by bold letters. Potential *N*-glycosylation and glycosaminoglycan-attachment sites are marked with ● and ○, respectively. Dots (·) over top lines indicate every tenth amino acid.

ウバエのタンパク質であるtoll (22)、chaoptin (23) およびslit (24)はそれぞれ形態形成に関与していることが報告されており、オステオグリシンを含め、ロイシンリッチプロテインの生物学的機能を考える上でとても興味深い。

Madisenら (2) は、ウシ骨芽細胞ではオステオグリシンは主に1.9および2.4 kbのmRNAによりコードされ、ヒト骨肉腫の細胞株であるMG-63および781Tでは主に1.9および3.6 kbのmRNAによりコードされていると報告した。さらに彼らはノーザンブロット解析の結果から、ヒトのオステオグリシンの発現は骨系の細胞に限られているとし、この分子の骨形成における役割について考察した。しかし、今回行ったマウスのオステオグリシンmRNAのノーザンブロット解析ではいろいろな組織で3.7 kbのmRNAの発現が観察され、この分子の骨以外の組織における様々な機能も予想された。

生体内におけるオステオグリシンの機能に関する研究はあまり進んでいないが、他のロイシンリッチプロテインの機能や発現パターンから類推して、その機能は細胞分化や形態形成に関連したものであると考えられる。そしてそれはロイシンリッチリピートにより形成されるドメインのタンパク質との結合能に基づいていると思われる。

## 要 約

オステオグリシンは糖タンパク質であり、最初にウシの骨から単離された。そのcDNA解析から推定されたアミノ酸配列より、オステオグリシンはロイシンリッチリピートを持っていることが示された。今回、マウス胚芽のcDNAライブラリーから298アミノ酸から成るオステオグリシンをコードするcDNAクローンを単離し、その塩基配列を決定した。この分子は、ヒトおよびウシのオステオグリシンに対してそれぞれ85および86%の相同性を示す。さらに、マウスのオステオグリシンのカルボキシル末端側の3分の2の領域は、発生過程のニワトリ四肢の軟骨に存在する扁平な細胞から成る部分に特異的に発現するプロテオグリカンであるPG-Lbのカルボキシル末端側の領域に対して48%の相同性を示した。また、ノーザンブロット解析により、マウスのいくつかの組織において3.7 kbのオステオグリシンmRNAの発現が明らかとなった。

## 引用文献

1. Bentz, H., Nathan, R. M., Rosen, D. M., Armstrong, R. M., Thompson, A. Y., Segarini, P. R., Mathews, M. C., Dasch, J. R., Piez, K. A., and Seyedin, S. M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20805–20810
2. Madisen, L., Neubauer, R. M., Plowman, G., Rosen, D., Segarini, P., Dasch, J., Thompson, A., Ziman, J., Bentz, H., and Purchio, A. F. (1990) *DNA Cell Biol.* **9**, 303–309
3. Bentz, H., Thompson, A. Y., Armstrong, R., Chang, R., Piez, K. A., and Rosen, D. M. (1991) *Matrix* **11**, 269–275
4. Shinomura, T., Kimata, K., Oike, Y., Noro, A., Hirose, N., Tanabe, K., and Suzuki, S. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 9314–9322
5. Shinomura, T., Kimata, K., Oike, Y., Maeda, N., Yano, S., and Suzuki, S. (1984) *Dev. Biol.* **103**, 211–220
6. Shinomura, T., and Kimata, K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 1265–1270
7. Kriegler, M. (1990) in *Gene Transfer and Expression* pp. 165–172, W. H. Freeman and Company, New York
8. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467
9. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979) *Biochemistry* **18**, 5294–5299
10. Singer, R. H., and Penman, S. (1973) *J. Mol. Biol.* **78**, 321–334
11. Thomas, P. S. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 5201–5205
12. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 8125–8184
13. Von Heijne, G. (1984) *J. Mol. Biol.* **173**, 243–251
14. Bause, E. (1983) *Biochem. J.* **209**, 331–336
15. Bourdon, M. A., Krusius, T., Campbell, S., Schwartz, N. B., and Ruoslahti, E. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3194–3198

16. Huber, S., Winterhalter, K. H., and Vaughan, L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 752-756
17. Zimmermann, D. R., and Ruoslahti, E. (1989) *EMBO J.* **8**, 2975-2981
18. Patthy, L. (1987) *J. Mol. Biol.* **198**, 567-577
19. Fisher, L. W., Termine, J. D., and Young, M. F. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 4571-4576
20. Oldberg, Å., Antonsson, P., Lindblom, K., and Heinegård, D. (1989) *EMBO J.* **8**, 2601-2604
21. Funderburgh, J. L., Funderburgh, M. L., Brown, S. J., Vergnes, J.-P., Hassell, J. R., Mann, M. M., and Conrad, G. W. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 11874-11880
22. Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. (1988) *Cell* **52**, 269-279
23. Reinke, R., Krantz, D. E., Yen, D., and Zipursky, S. L. (1988) *Cell* **52**, 291-301
24. Rothberg, J. M., Jacobs, J. R., Goodman, C. S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990) *Genes & Dev.* **4**, 2169-2187
25. Yamaguchi, Y. (1993) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **5**, 428-437

## 第5章

### 総論

軟骨分化機構の解明は、四肢のパターン形成の理解のために必要であると考  
えられるが、他の細胞分化に比べ、研究が進んでいないのが現状である。四肢  
の軟骨分化の始まりは枝芽の間充織凝集であり、その凝集部位に特異的に発現  
している細胞外マトリックス分子がプロテオグリカン-M (PG-M) である。間  
充織細胞の軟骨細胞への分化については細胞の形態が特に重要であることが知  
られている。PG-Mのコンドロイチン硫酸鎖は細胞の形態や基質への接着性を  
変化させ、軟骨分化を促進することが報告されているが、コンドロイチン硫酸  
鎖に細胞を凝集させる活性があるとは考えにくく、間充織凝集には他の因子の  
関与が予想される。これについては以前からレクチンが凝集因子として想定さ  
れてきたが、今回研究対象としたPG-Mコアタンパク質のC型レクチン様ドメ  
インもその1つであると思われる。細胞外マトリックス成分あるいは細胞表面  
分子に対するこのレクチン様ドメインの結合を詳細に調べていくことは、間充  
織凝集およびそれに続く軟骨分化や四肢のパターン形成の分子レベルでの解明  
に役立つであろう。PG-Mのレクチン様ドメインの糖への結合はカルシウム依  
存的であり、また、他の動物レクチンに比べ、幅広い特異性を特徴とする。フィ  
ブロネクチンなど他の細胞外マトリックス分子においてもカルシウム依存的な  
結合が見いだされており、細胞外のカルシウム濃度の変動により細胞外マトリッ  
クスの三次元構造が変化する可能性もある。また、細胞分化の過程で細胞表面  
などの糖鎖の構造が変化することがよく知られている。比較的幅広い特異性を  
示すPG-Mのレクチン様ドメインの結合は、特異性の高いレクチンよりはこの  
ような糖鎖構造の変化による影響を受けにくいと思われ、他の動物レクチンに  
よる結合とはその生理学的な意義が基本的に異なっていると考えられる。

これまでの研究により非常に多くのロイシンリッチプロテインが見いだされ

ている。それらの機能は共通に存在するロイシンリッチリピートにより形成される結合ドメインの活性に基づいていると考えられるが、これらのタンパク質の示す生物学的機能や結合活性は実に様々である。これはロイシンリッチプロテインファミリーに属するタンパク質では、それぞれの分子がロイシンリッチリピートのコンセンサス配列に基づく共通の活性を持っているが、同時に個々のタンパク質に特徴的な他の構造の存在により、それぞれが多様な性質をさらに獲得していることによると思われる。

細胞外マトリックスの機能を解明するための手段の1つとして個々の構成分子の結合特性を分子レベルで調べていく方法があり、これまでに多くの知見が得られてきた。しかし一方で、非常に複雑な系である細胞外マトリックスの全容を明らかにするには、これらの蓄積されたデータをもとに生体内における個々の成分の機能を明確にするような研究手法が必要であることも指摘されている。近年、盛んに行われるようになったトランスジェニックマウスの作製やジーンターゲティングの手法は特定の分子の生体内における機能を解明するための直接的かつ決定的な方法であると考えられ、それらにより得られるデータは上記の指摘に対する答えの1つとなろう。PG-M遺伝子を導入したトランスジェニックマウスやジーンターゲティングにより作製した、PG-M遺伝子が欠損あるいは変化したマウスの性質を調べることにより、この分子の軟骨分化における役割がより明確に示されるものと思われる。そしてPG-Mを含め、軟骨分化に関与しているといわれている細胞外マトリックス分子の機能の完全なる解明は、軟骨形成を人工的に制御する方法の確立につながっていくと考えられる。



## 謝 辞

本研究を行うにあたり御指導くださいました北川泰雄教授に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、適切な御助言をくださいました三木清史博士に感謝致します。

本研究において実験・考察を行うにあたり御指導くださいました愛知医科大学・分子医科学研究所の木全弘治教授ならびに篠村多摩之博士に心より感謝し、御礼申しあげます。

実験を行うにあたりお世話になりました栄養制御研究室および愛知医科大学・分子医科学研究所の皆様へ感謝致します。

最後に大学院生活を送るにあたり苦勞をかけた両親に感謝致します。