

## 細胞外領域シェディングの特異性は「不利な要素」によって規定される

白壁 恭子

## 1. はじめに

細胞外領域シェディング（以下シェディングと呼ぶ）は、細胞表面の膜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り、主にADAM（a disintegrin and metalloprotease）ファミリーに属する膜型のメタロプロテアーゼによって担われる（図1）<sup>1,2)</sup>。シェディングが及ぼす影響は切断される膜タンパク質の機能によって異なり、膜タンパク質の細胞外領域として生合成される増殖因子やサイトカインのシェディングはそれらが作用する領域を広げるし、受容体のシェディングはそれを発現する細胞のリガンド反応性を弱める。また接着分子のシェディングは接着構造の破壊や可溶性細胞外領域による競合阻害を通じて、細胞の接着能を低下させると考えられる。つまりシェディングは切断される膜タンパク質だけではなく、それを発現する細胞の機能をも制御する影響力の大きな翻訳後修飾機構なのである。

シェディングは細胞の応答機構の一つであり、細菌成分を感知したマクロファージが炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ （tumor necrosis factor- $\alpha$ ）を盛んにシェディングして放出するように、適切な膜タンパク質が特異的にシェディングされなければならない<sup>3)</sup>。しかしながら、シェディングを受ける膜タンパク質の切断部位にアミノ酸配列上の特徴がないこと<sup>4)</sup>や、ADAMファミリー組換えタンパク質を用いた*in vitro*の実験ではどのADAMファミリーもきわめてゆるい基質特異性しか示さないこと<sup>5,6)</sup>から、シェディングの特異性を決める分子機構には不明な点が多い。実際に主要なシェディング酵素であるADAM10とADAM17について報告されている基質を比較すると共通するものも多いが、それぞれのノックアウトマウスの表現型には明確な

違いがあることから生体内では基質特異性が保たれていると考えられる（表1）。我々は、酵素も基質も膜貫通型タンパク質という特徴的な酵素反応であるシェディングの特異性は、細胞膜の上でのみ維持されるのではないかと考え、特定の条件下にある細胞でシェディングされる膜タンパク質をプロテオミクススクリーニングした上で、同定された膜タンパク質を比較解析すれば、シェディングの特異性を決める分子機構に迫れるのではないかと考えた。

## 2. シェディングのプロテオミクススクリーニング

シェディングの特異性を解析するためには、できるだけ生理的な条件で起こるシェディングをスクリーニングの材料にするべきであると考え、グラム陰性菌の細胞壁成分であるLPS（lipopolysaccharide）で刺激したマクロファージ培養細胞Raw 264.7という、TNF- $\alpha$ のシェディングが活性化することが知られている炎症反応を模倣した系を用いることにした<sup>7,8)</sup>。安定同位体標識したアミノ酸を用いたプロテオミクス技術を用い、LPS刺激したRaw 264.7細胞の培養上清と、メタロプロテアーゼ阻害剤存在下でLPS刺激したRaw 264.7細胞の培養上清を比較することで、複数の膜タンパク質をシェディングターゲットとして同定した<sup>9)</sup>。そして、同定された膜タンパク質のうち、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する二つの接着分子、CADM1 [cell adhesion molecule 1, 別名SynCAM (synaptic cell adhesion molecule 1)] とALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule, 別名CD166) の解析から、シェディ

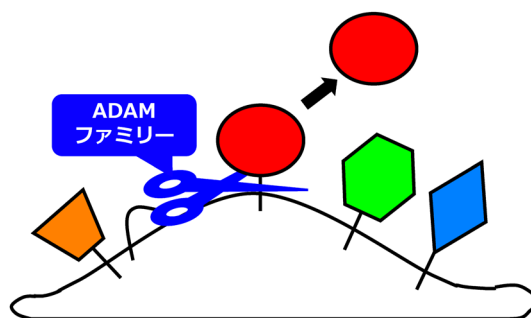


図1 細胞外領域シェディングの模式図

赤で示した膜タンパク質が選択的にシェディングを受けるが、シェディングの特異性を決める分子機構はほとんど明らかにされていない。

立命館大学生命科学部生命医科学科（〒525-8577 滋賀県草津市野路東1-1-1）

Specificity of ectodomain shedding is defined by the absence of unfavorable factors

Kyoko Shirakabe (Department of Biomedical Sciences, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, 1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930749

© 2021 公益社団法人日本生化学会

表1 主要なシェディング酵素であるADAM10とADAM17の主な基質とノックアウトマウスの表現型の比較（文献2より改変）

シェディング酵素	基 質	基質の機能	ノックアウトマウスの表現型
ADAM10	Notch-1	細胞の運命決定	胎生致死. 心臓・中枢神経系・血管・体節の発達障害. Notch シグナルを欠損したマウスと類似した表現型.
	APP	アミロイド $\beta$ 前駆体	
	Ephrin A2	軸索ガイダンス	
	E-cadherin	接着分子	
	EGF	EGF ファミリー増殖因子	
	L1	接着分子	
	IL-6 receptor	炎症性サイトカイン受容体	
ADAM17	TNF- $\alpha$	炎症性サイトカイン	周産期致死. 上皮・心臓・肺の発達障害. EGF 受容体シグナルを欠損したマウスと類似した表現型.
	TNF receptor I and II	炎症性サイトカイン受容体	
	TGF- $\alpha$	EGF ファミリー増殖因子	
	HB-EGF	EGF ファミリー増殖因子	
	L1	接着分子	
	IL-6 receptor	炎症性サイトカイン受容体	
	Notch-1	細胞の運命決定	
	APP	アミロイド $\beta$ 前駆体	

ングの特異性を決める分子機構について有意義な情報を得ることができた<sup>9,10)</sup>.

### 3. CADM1のシェディング感受性のO型糖鎖による制御

CADM1はさまざまな上皮細胞由来のがんで発現が低下するがん抑制遺伝子として同定された, 細胞外に免疫グロブリン様領域を三つ持つ接着分子である<sup>11,12)</sup>. CADM1には, 最も細胞膜寄りの免疫グロブリン様領域と膜貫通領域との間という, まさにシェディングで切断される部分をコードする選択的エクソンがあり, その有無により複数のスプライシングバリエントが存在する (図2A上). そこでこれらのCADM1スプライシングバリエントの細胞外領域にタグを付加した発現ベクターを構築し, 細胞外領域がシェディングされ培養上清に放出されるか検討したところ, 全長の3%にも満たない33塩基対の選択的エクソン「エクソン9」を含むスプライシングバリエント (v9とv8/9) だけがシェディングされるという意外な結果を得た (図2A下). この結果は, エクソン9がコードするたった11個のアミノ酸配列にシェディングの特異性を決める重要な要素が含まれていることを示唆していた.

そこで, まずエクソン9を含むシェディング感受性CADM1バリエントのシェディング切断部位を調べた. シェディングによって生じる切り株タンパク質を精製し, N末端配列を決定することでシェディング切断部位を特定したところ, エクソン9がコードするアミノ酸配列内ではなく直後で切断されることがわかり, エクソン9がシェディング切断配列そのものを挿入することでシェディング

感受性を付与しているのではないことがわかった. ここで我々は, エクソン9の直前のエクソン8がO型糖鎖修飾を受けるトレオニン残基を多数コードしていることに注目した. エクソン9がないと切断部位とO型糖鎖が接近し, シェディングが阻害されるのではないかと考えたのである. そこでエクソン8を含むがエクソン9を含まないシェディング耐性のCADM1バリエントについて, エクソン8がコードするトレオニン残基をアラニン残基に置換し, 切断部位の前にO型糖鎖修飾を受けないアミノ酸配列が六つ並ぶようにしたところ, シェディング感受性に転換されることがわかった. 一方で, シェディング感受性を付与するエクソン9がコードする11アミノ酸配列はDTTATTE-PAVHであり, 前半にトレオニン残基が多く切断部位寄りの後半にはO型糖鎖修飾を受けないアミノ酸が五つ存在する. そこでこの5アミノ酸を欠失させ, 切断部位とトレオニン残基を近づけたところ, シェディング耐性になることがわかった. この5アミノ酸をアラニン残基に置換してもシェディング感受性は維持されたが, トレオニン残基に置換するとシェディング耐性になることもわかった. これらの結果は, エクソン9がシェディング切断部位の前に糖鎖修飾を受けないアミノ酸を五つ挿入し切断酵素が入り込む隙間を作ること, CADM1にシェディング感受性を付与していることを示唆していた (図3A)<sup>9)</sup>.

### 4. ALCAMのシェディング感受性の酸性アミノ酸による制御

ALCAMは間葉系幹細胞のマーカーとしても知られる,

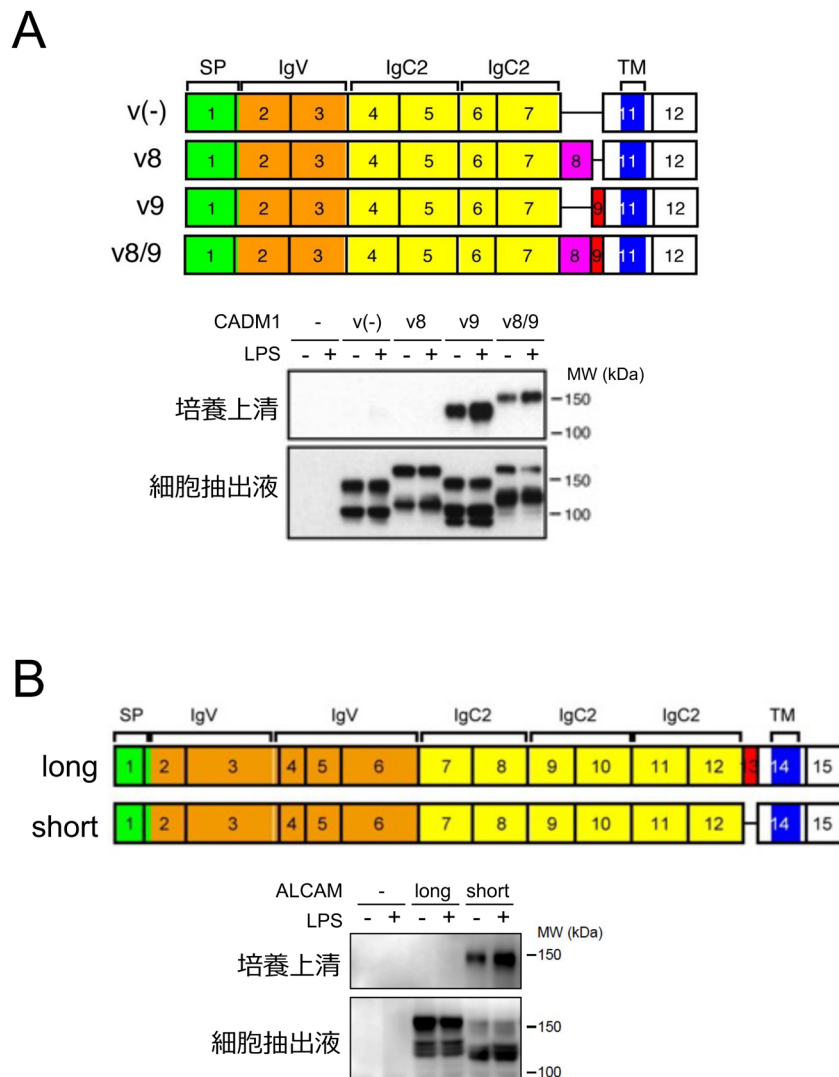


図2 CADM1とALCAMのスプライシングバリエントとシェディング感受性

(A) CADM1 スプライシングバリエントのエクソン構造とシェディング感受性. マウス *Cadm1* 遺伝子には細胞膜寄りの免疫グロブリン様定常領域 (IgC2) と膜貫通領域 (TM) の間をコードするエクソン8とエクソン9という二つの選択的エクソンが存在し, エクソン9を含むスプライシングバリエント (v9とv8/9) だけがシェディング感受性である. (B) ALCAM スプライシングバリエントのエクソン構造とシェディング感受性. マウス *Alcam* 遺伝子にも細胞膜寄りの免疫グロブリン様領域と膜貫通領域の間をコードする選択的エクソン, エクソン13, が存在し, エクソン13を含まないスプライシングバリエント (short) はシェディング感受性, 含むスプライシングバリエント (long) はシェディング耐性である. SP: シグナル配列, IgV: 免疫グロブリン様可変領域. 写真は文献9, 10より引用.

細胞外に免疫グロブリン様領域を五つ持つ接着分子である<sup>13)</sup>. ALCAMにも, CADM1と同様に, 最も細胞膜寄りの免疫グロブリン様領域と膜貫通領域との間に, 全長の3%にも満たない選択的エクソン「エクソン13」があり二つのスプライシングバリエントが存在する (図2B上)<sup>14)</sup>. そこでこれらALCAMバリエントの発現ベクターを構築しシェディングされるか検討したところ, CADM1のエクソン9とは対照的に, ALCAMのエクソン13を含むスプライシングバリエントはシェディング耐性, 含まないスプライシングバリエントはエクソン感受性であった (図2B下).

この結果は, ALCAMのエクソン13は「シェディング耐性付与エクソン」であることを示唆しており, エクソン13の挿入によって生じる14アミノ酸配列にもシェディングの特異性を決める重要な要素が含まれていると考えられた.

エクソン13を含まないシェディング感受性のALCAMバリエントのシェディング切断部位を決定したところ, 細胞膜から数えて16番目のアスパラギン残基と15番目のバリン残基の間で切断されることがわかった. エクソン13は細胞膜から数えて25番目から12番目までのアミノ酸をコードすることから, エクソン13がなければ切断される



部分に何らかの阻害要素を含む14アミノ酸配列を挿入することでシェディングを阻害している可能性が示唆された。阻害要素としてCADM1と同様のO型糖鎖修飾が考えられたので、エキソン13がコードする二つのセリン残基をアラニン残基に置換したところシェディング耐性に変化はみられず、O型糖鎖修飾以外の阻害要素が存在することが示唆された。ここで我々は、エキソン13が負電荷を持つ「酸性アミノ酸」であるグルタミン酸残基とアスパラギン酸残基を六つもコードしていることに注目した。そしてこれらの酸性アミノ酸をすべて中性アミノ酸であるグルタミン残基もしくはアスパラギン残基に置換したところ、シェディング感受性に転換されることがわかった。六つの酸性アミノ酸のどれがシェディングの阻害に必要なのか明らかにするために、N末端側とC末端側からそれぞれ一つずつ中性アミノ酸への置換を増やした変異体を作製したが、どちらから始めても四つ以上置換しないとシェディング感受性にならないことがわかり、酸性アミノ酸の場所ではなく数がシェディング耐性の付与に重要であることが示唆された。また、エキソン13を含まないシェディング感受性のALCAMバリエントのシェディング切断部位を挟む二つのアミノ酸を酸性アミノ酸に置換したところ、シェディング耐性になることもわかった。これらの結果は、エキソン13がシェディング切断部位近傍に酸性アミノ酸を多数挿入することで、ALCAMをシェディング耐性に行っていることを示唆していた(図3B)<sup>10)</sup>。

## 5. 「不利な要素」によるシェディングの特異性決定

これらのCADM1とALCAMのスプライシングバリエントを用いた解析を通じ、シェディングの特異性を決める分子機構について新たな知見がもたらされた。まず留意しておくべき点として、シェディング感受性のCADM1とALCAMバリエントの切断部位のアミノ酸配列はやはり相同性が低い。切断部位前後の10アミノ酸はCADM1がPACHD/SRAGE、ALCAMがVNSLN/VSANEであり、切断部位の後ろ3番目がアラニン残基、5番目がグルタミン酸残基である点は共通しているがその他のアミノ酸には類似性がない。一方でこれらの切断部位の膜からの距離は、CADM1が細胞膜から数えて15番目と14番目の間、ALCAMが16番目と15番目の間と比較的類似している。エキソン13がコードする六つの酸性アミノ酸を置換したシェディング感受性ALCAM変異体の切断部位も、細胞膜から数えて15番目と14番目の間であった。ノックアウト細胞やsiRNAを用いた解析から、CADM1とALCAMのシェディングを担う酵素がADAM17であることが示唆されており、これらの結果を総合すると、膜貫通型のプロテアーゼであるADAM17にはアミノ酸配列に強い好み

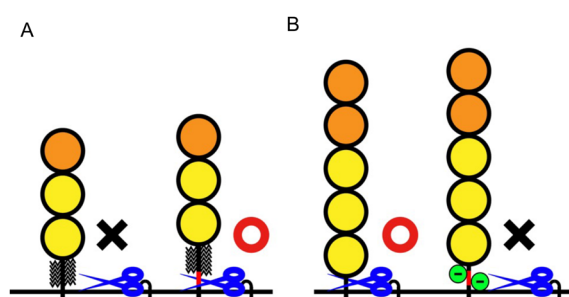


図3 CADM1とALCAMのシェディング感受性は不利な要素によって規定される

(A)シェディング耐性CADM1バリエント(左)のシェディングはO型糖鎖修飾(波線)によって、(B)シェディング耐性ALCAMバリエント(右)のシェディングは酸性アミノ酸(緑丸)によって、それぞれ阻害されるが、選択的エキソンの有無によりADAM17(青ハサミ)が入り込む隙間が生まれるとシェディング感受性になる(A右、B左)。

ない一方で「膜からの距離」には好みがあることがうかがえる。そしてO型糖鎖や酸性アミノ酸といった「不利な要素」がシェディング感受性を決めているという我々の解析結果とあわせて考えると、ADAMファミリーが好む場所に「不利な要素のない」膜タンパク質がシェディング感受性になるという、シェディングの特異性を決める法則の存在が示唆される(図3)。シェディングのコンセンサス配列やADAMファミリーの基質特異性といった「シェディングに有利な要素」に注目した解析では、シェディングの特異性決定機構を理解することができなかったことも、この法則の妥当性を裏づけるものと考えている。

## 6. おわりに

以上、シェディングのプロテオミクススクリーニングを端緒とした一連の研究を通じて我々は、シェディングの特異性は「不利な要素」によって決まっていると考えている。現時点で我々が見つけた不利な要素は「O型糖鎖」と「酸性アミノ酸」であるが、ノイラミダーゼを用いた実験からシェディングを抑えるO型糖鎖にはシアル酸が含まれることが示されているため<sup>9)</sup>、これら二つの要素には「負の電荷を持つ」という共通点がある。負の電荷を持つ細胞外マトリクス構成成分なども「不利な要素」になる可能性があるだろう<sup>15)</sup>。多くの膜タンパク質が不利な要素でシェディングから守られる中、ADAMファミリーが入り込む隙間を持つものだけがシェディングを受けるという特異性決定機構は、影響力の大きなシェディングを制御する上で理にかなっているのかもしれない。今後は、選択的スプライシングにより分子構造はほぼ同一だがシェディング感受性が異なるCADM1やALCAMバリエントを作り出す生物学的な意義についても明らかにしていきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Seals, D.F. & Courtneidge, S.A. (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.*, **17**, 7–30.
- 2) Reiss, K. & Saftig, P. (2009) The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **20**, 126–137.
- 3) Huovila, A.P., Turner, A.J., Peltö-Huikko, M., Karkkainen, I., & Ortiz, R.M. (2005) Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 413–422.
- 4) Blobel, C.P. (2005) ADAMs: key components in EGFR signaling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 32–43.
- 5) Caescu, C.I., Jeschke, G.R., & Turk, B.E. (2009) Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem. J.*, **424**, 79–88.
- 6) Tucher, J., Linke, D., Koudelka, T., Cassidy, L., Tredup, C., Wichert, R., Pietrzik, C., Becker-Pauly, C., & Tholey, A. (2014) LC-MS based cleavage site profiling of the proteases ADAM10 and ADAM17 using proteome-derived peptide libraries. *J. Proteome Res.*, **13**, 2205–2214.
- 7) Shirakabe, K., Hattori, S., Seiki, M., Koyasu, S., & Okada, Y. (2011) VIP36 protein is a target of ectodomain shedding and regulates phagocytosis in macrophage Raw 264.7 cells. *J. Biol. Chem.*, **286**, 43154–43163.
- 8) Shirakabe, K., Shibagaki, Y., Yoshimura, A., Koyasu, S., & Hattori, S. (2014) A proteomic approach for the elucidation of the specificity of ectodomain shedding. *J. Proteomics*, **98**, 233–243.
- 9) Shirakabe, K., Omura, T., Shibagaki, Y., Mihara, E., Homma, K., Kato, Y., Yoshimura, A., Murakami, Y., Takagi, J., Hattori, S., et al. (2017) Mechanistic insights into ectodomain shedding: susceptibility of CADM1 adhesion molecule is determined by alternative splicing and O-glycosylation. *Sci. Rep.*, **7**, 46174.
- 10) Iwagishi, R., Tanaka, R., Seto, M., Takagi, T., Norioka, N., Ueyama, T., Kawamura, T., Takagi, J., Ogawa, Y., & Shirakabe, K. (2020) Negatively charged amino acids in the stalk region of membrane proteins reduce ectodomain shedding. *J. Biol. Chem.*, **295**, 12343–12352.
- 11) Murakami, Y. (2005) Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci.*, **96**, 543–552.
- 12) Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., & Ogita, H. (2008) Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 603–615.
- 13) Swart, G.W. (2002) Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur. J. Cell Biol.*, **81**, 313–321.
- 14) Hebron, K.E., Li, E.Y., Arnold Egloff, S.A., von Lersner, A.K., Taylor, C., Houkes, J., Flaherty, D.K., Eskaros, A., Stricker, T.P., & Zijlstra, A. (2018) Alternative splicing of ALCAM enables tunable regulation of cell-cell adhesion through differential proteolysis. *Sci. Rep.*, **8**, 3208.
- 15) Karamanos, N.K., Theocharis, A.D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S.S., Vynios, D.H., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C.E.H., et al. (2021) A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J.*, febs.15776.

## 著者寸描

## ●白壁 恭子 (しらかべ きょうこ)



立命館大学生命科学部生命医科学科教授。博士（理学）。

■略歴 1992年東京大学理学部卒業，97年京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了。日本学術振興会特別研究員（RPD），さがけ専任研究員，慶應義塾大学医学部テニユアトラックプログラム講師，東京医科歯科大学ジョイントリサーチ講座准教授などを経て2018年より

現職。

■研究テーマと抱負 シェディングを介した細胞間コミュニケーションの解析。細胞外領域を放出するだけでなく，細胞表面のタンパク質組成を書き換えることもできるシェディングの真の実力を明らかにしたいと考えて研究しています。

■ウェブサイト <http://www.ritsumeai.ac.jp/~kshira/index.html>

■趣味 パレーボール。