

コアフコース糖鎖と腫瘍マーカー

はじめに

糖鎖は、タンパク質の翻訳後修飾をなす重要な生体分子の一つで、発生・分化・増殖・がん化などに伴い糖鎖構造の変化することが古くから知られてきた。今日、臨床の場で用いられている腫瘍マーカーの多くが、がんに伴い出現する異常糖鎖を認識する抗体である。特定の糖鎖構造は、糖転移酵素だけの作用では決定されず、ドナー基質、ゴルジトランスポーター、アクセプターとなるタンパク質の構造など様々な因子によって制御を受ける。がん化に伴い見られる糖鎖構造の変化としては、分岐鎖構造の増加、シアル酸の変化、フコースの付加などが知られている。フコースによる糖タンパク質の糖鎖付加（フコシル化）には、非還元末端に付くもの（ルイス型、H型）と還元末端に付くもの（コアフコース）が存在する。中でもコアフコースは、肝がん特異的な腫瘍マーカーとして知られる AFP-L3 と深く関係し、近年 IgG の ADCC 活性（抗体依存性細胞障害活性）を調節する因子として、大変注目されている。本総説では、コアフコース糖鎖と腫瘍マーカーを中心に、概説したい。

1. AFP-L3 分画とその臨床的有用性

肝がんの腫瘍マーカーとして広く使われてきた AFP (α フェトプロテイン) は、慢性肝炎や肝硬変などの慢性肝疾患でも上昇することが問題である。これに対して、AFP-L3 とは AFP の 232 番目のアスパラギンに結合する 1 本の糖鎖にフコースが結合したもので、肝がん患者で特異的に検出される¹⁾。この糖鎖付加は、図 1 に示すように二本鎖の N 型糖鎖の還元末端（根元）に存在する N-アセチルグルコサミンに α 1-6 結合でフコースが付いたものでコアフコースと呼ばれる。コアフコースの合成においては、 α 1-6 フコース転移酵素（Fut8）が哺乳類では唯一関与する糖転移酵素で、1996 年我々のグループが世界に先駆けタンパク質精製、遺伝子クローニングに成功した^{2,3)}。AFP-L3 の検出は、コアフコースを認識するレクチン LCA (*Lens culinaris agglutinin*) を用いたレクチン親和性電気泳動によって行われる（図 2A）。この方法は、武田和久先生と Dr. Breborowicz によって開発されたものであるが、最近 WAKO 社では特殊な抗体を用いた免疫測定装置リバシス LBA-500 が開発され、AFP-L3 の自動測定が可能となった⁴⁾。AFP-L3 の臨床的有用性に関しては、新潟大学消化器内科学の青柳豊先生らによって大変精力的に研究がなされてきた。多数の論文があるが、文献 5 に長年のご研究の成果が総説としてまとめられているので、興味のある方は参考にしていただきたい。AFP-L3 が開発された当初、肝が

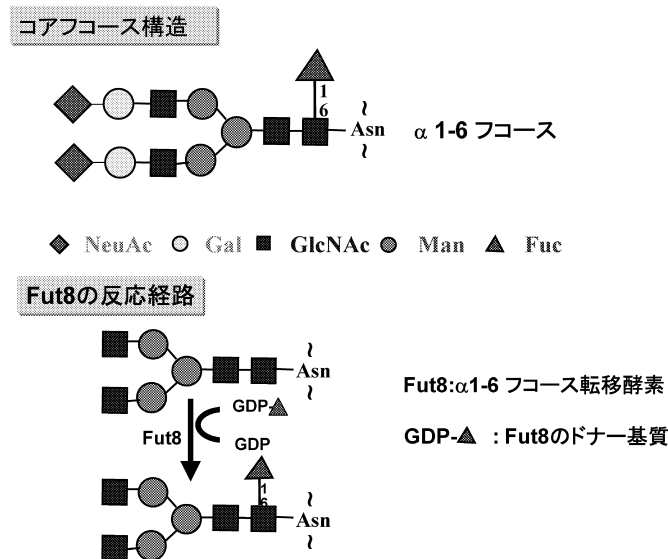


図 1 コアフコース構造と α 1-6 フコース転移酵素（Fut8）の反応経路

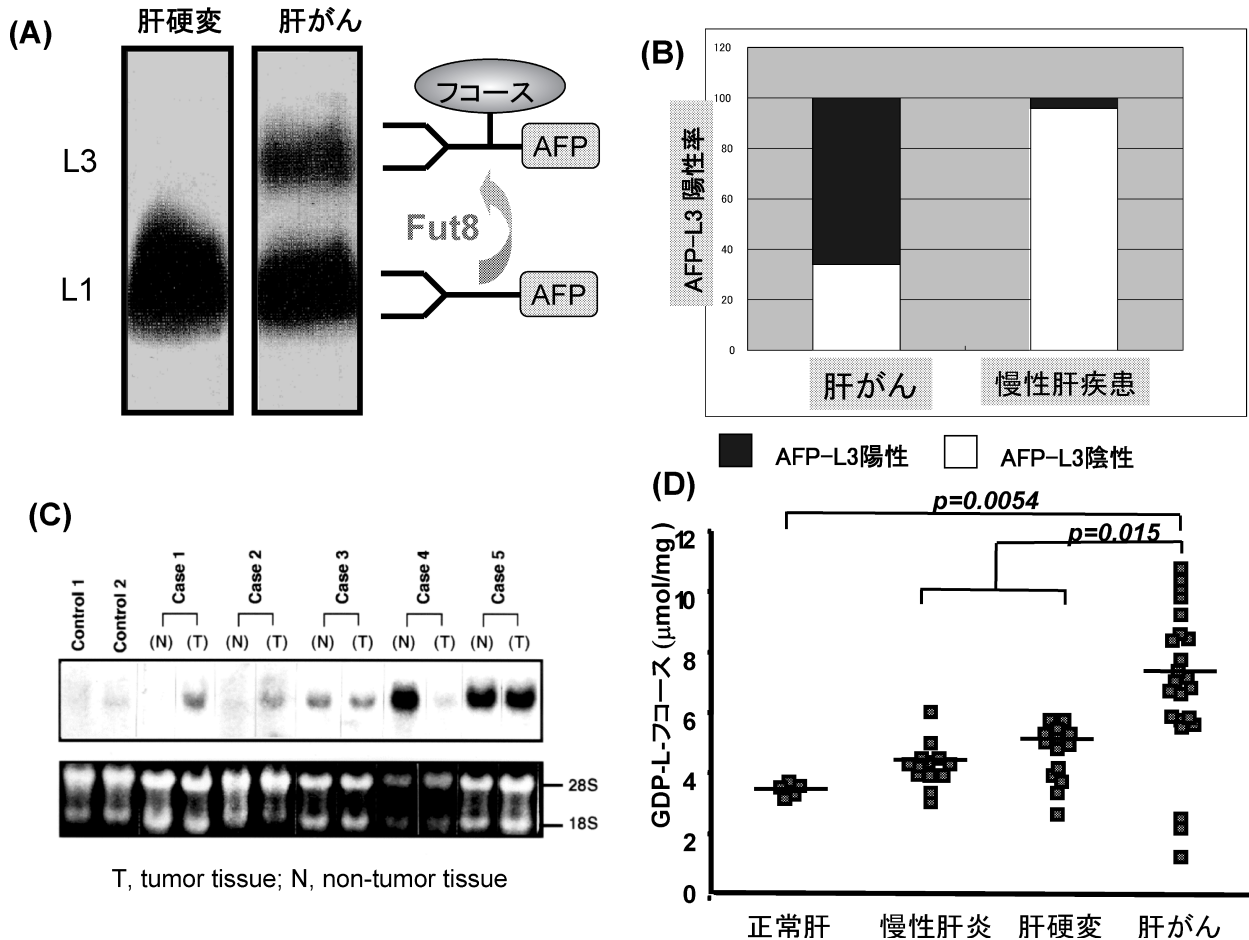


図2 Fut8 と AFP-L3 に関する研究結果

(A)LCA レクチン電気泳動による AFP-L3 (フコシル化 AFP) の検出。(B)肝がんおよび慢性肝疾患における AFP-L3 の陽性率。文献5より、引用。(C)Northern blot 法による、ヒト肝がんおよびその周囲組織における Fut8 mRNA 発現に関する検討。(D)肝がん、慢性肝疾患、正常肝組織における GDP-フコースの量。

んの早期診断や肝硬変から肝がん発症の予測診断に応用できるのではないかと、画期的な報告がなされた^{6,7)}。しかし、その後の多数例の検討から、早期肝がんでは AFP-L3 が検出される率は、それほど高くないというのが、現在の臨床医達の意見である。ただ、1996年に久留米大学から発表された、AFP-L3 陽性の肝がんは予後不良という論文⁸⁾に関しては、現在多くの臨床医が経験するところである。この理由に対する推察に関しては、本総説に後述する。AFP-L3 は、2005年アメリカの FDA (米国食品医薬品局) で、肝がんの腫瘍マーカーとして承認された。日本のように検診/画像診断システムが充実していないアメリカにとって、疑陽性の多い AFP よりも特異性が高い AFP-L3 が腫瘍マーカーとして好まれる理由がよくわかる。先日アメリカの腫瘍マーカーの学会で言われていたことだが、本

当に日本の肝臓内科医と肝疾患の診療システムは素晴らしいそうである。

2. AFP-L3 以外のコアフコース糖鎖を持つ腫瘍マーカー

肝細胞で産生される $\alpha 1$ -アンチトリプシンもまた、肝がん患者の血清中でコアフコース修飾されたものが増加することを、1997年に青柳先生らが発表している⁹⁾。同様の変化は、トランスフェリンにおいても見られるらしい。正常の肝臓では、極めて発現量が低い Fut8 によって糖鎖修飾を受けたタンパク質が、肝がん患者では微量に血中に存在するらしい。AFP-L3 との決定的な違いは、AFP は主に肝がん細胞、前がん細胞で産生されるものだが、 $\alpha 1$ -アンチトリプシンは殆どが正常の肝細胞で作られる。いずれにしても、コアフコースの結合したタンパク質は、肝細胞におい

て特別な意味を持つようだ(次項参照)。最近、プロテオミクスの技術の進歩により、コアフコースを持つ肝がんの腫瘍マーカーが、いくつか同定された^{10,11)}。中でも、GP73はB型肝炎の発がんモデルとして知られるウッドチャックで見つかったものだが、ヒトの肝がん症例でも検出され、新しい腫瘍マーカーとして有用視されそうである¹⁰⁾。さらに肝硬変の線維化状態とも関連性があるため、肝がんの予測マーカーとしても期待される。問題は、AFPや α 1-アンチトリプシンが分泌性タンパク質であるのに対して、GP73はゴルジタンパク質であることから、フコース修飾に関しては異なる制御を受ける可能性があることである。つまり、後述するフコースのcargo-receptorが肝細胞内に存在するとしたら、GP73はどこでトラップされるのだろうか? また近年私達は、グリコミクスの手法を用いた研究により、肝がんの新しい腫瘍マーカーとして、フコシル化ハプトグロビンを同定した¹²⁾。フコース付きのハプトグロビンが血液中に検出される率は、他のがん種に比べて肝がん種で圧倒的に多い。ただし本来、肝臓で産生されるハプトグロビンは、何故肝がん患者でフコシル化修飾を受けるのか、興味が持たれる。

3. AFP-L3が肝がん特異的に産生される機序

筆者が糖鎖研究に興味を持った最初の動機が、「何故、肝がん患者でAFP-L3分画が検出されるのか」ということである。最も単純に考えれば、正常の肝細胞に存在しないFut8ががん化によって発現上昇し、コアフコースを持つタンパク質が多く産生されるという筋書きである。ところが、Fut8の遺伝子クローニングに成功し²⁾、ヒトの肝がん組織でその遺伝子発現を検討したところ¹³⁾、がん部のみならず非がん部である肝硬変の組織でFut8の発現が上昇していた(図2C)。Fut8を肝がん細胞に過剰発現させるとAFP-L3の産生量は増加するので、Fut8は間違いなくAFP-L3の生合成には関与している¹³⁾。そこで図1のFut8の反応経路を見ていただきたい。GDP-フコースがFut8のドナー基質として存在しているのに気づく。実際に、シアル酸の生合成に関しても、糖転移酵素よりもドナー基質であるCMP-シアル酸の方が重要であるとの報告がある。そこで、私達は細胞内GDP-フコースを定量するアッセイ法を独自に開発しヒト肝がん組織で測定したところ¹⁴⁾、肝がんでは正常肝に比べてGDP-フコースが2倍程度上昇し、慢性肝炎、肝硬変組織に比べても有意に増加していた(図2D)。細胞内のGDP-フコース合成は複雑な経路をとるが、この中で律速酵素と呼べるFX(GDP-4-keto-6-deoxy-

mannose-3,5-epimerase-4-reductase, GDP-L-fucose synthase)の発現上昇が、肝がんのGDP-フコース増加に直結していることがわかった。しかし、わずか2倍弱のドナー基質の上昇により、図2Bに見られるような決定的な差が引き起こされるだろうか。そこでAFP-L3が肝がん特異的に産生される第3の機序として、フコシル化タンパク質胆汁排泄仮説を提唱したい。即ち、ごく僅かに存在するフコース転移酵素の働きによって肝細胞で産生されるタンパク質がフコシル化された時、それは胆汁中へ選択的に運ばれるというものである¹⁵⁾。胆汁中の糖鎖と血清の糖鎖を比較したとき、前者では圧倒的にフコースの含有率が高い。ハプトグロビン、 α 1酸性タンパク質、 α 1アンチトリプシンなど、個々のタンパク質においても同様の傾向が見られた。さらに、これらの糖鎖を二次元マップで詳細に解析すると、胆汁中で増加するフコシル化にはコアフコースのみならず、ルイス型のフコース(非還元末端)修飾も多く認められた。一般的に肝細胞において、このルイス型フコースの糖鎖修飾にはFut6が携わるが、マウスにおいてFut6は偽遺伝子になっている。従ってマウスの肝臓でのフコシル化はコアフコースが中心になる。そこでFut8ノックアウトマウスの胆汁を解析したところ、野生型マウスで見られた胆汁中への α 1酸性タンパク質や α 1アンチトリプシンの分泌が認められなかった。この事実は、肝臓におけるフコースによる糖タンパク質の糖鎖修飾が、胆管系への分泌のシグナルになっていることを示唆する。このように考えると、肝硬変患者で産生されたフコシル化AFPは血中に分泌されず、胆汁中へ分泌されているのではないかと想像できる(図3)。すなわち、肝細胞内に存在するレクチン様分子

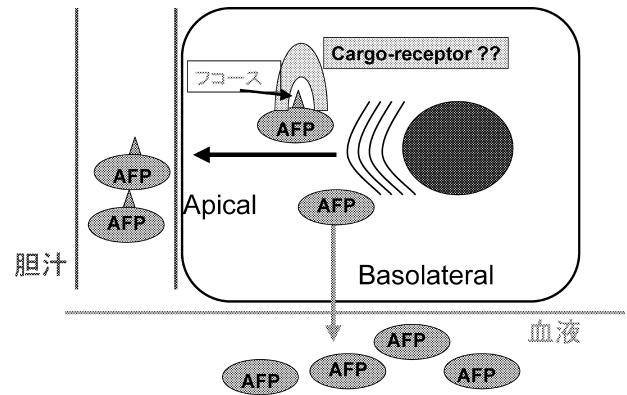


図3 肝硬変細胞において、AFP-L3(フコシル化AFP)が血液中で検出されないメカニズムに対する仮説
肝細胞に存在するフコースを認識するレクチン(cargo-receptor)があるのではないだろうか?

(cargo-receptor)の働きによって、フコシル化タンパク質は胆汁中に分泌されるという仮説が成り立つ。AFPを産生する肝硬変患者の胆汁を解析すれば実証できるが、それは種々の問題から容易でない。肝がんにおいては、細胞の極性の消失、微細胆管構造の変化、がん細胞の増殖/死滅などによって、図3のシステムに破綻をきたし、AFP-L3が血中に分泌されるのではないだろうか。もし、この仮説が正しいとすると、AFP-L3を産生する肝がんは予後不良⁸⁾という臨床のデータの裏付けとなる。いずれにしても、このcargo-receptorをどのように実証してゆくかが今後の課題である。

4. コアフコース研究のこれから

Fut8は、肝臓を除くほとんどの臓器で高発現している。従ってコアフコース構造は、かなり普遍的に存在する。糖鎖構造解析の教科書/論文を見ると、多くのN型糖鎖にコアフコースが+/-で書かれている。しかし血清タンパク質の大半を産生する肝臓においてFut8が低発現ゆえ、この糖鎖構造が肝がんの腫瘍マーカーとして脚光を浴びるのであろう。Fut8ノックアウトマウスは、著しい成長障害、生後3日以内の原因不明の死亡、肺気腫様の病理組織像、免疫系の異常、増殖因子のシグナル異常、インテグリンなどの接着分子の異常等、多くの表現型を示す¹⁰⁾。ここで糖鎖研究が難しいのは、何か特定のタンパク質のコアフコース欠損で生じた結果だけでなく、二次的な経路によって生じた遺伝子発現の異常まで考慮しなければならないことである。この点が、他分野の研究者が糖鎖研究に入り込みにくい所以かもしれない。しかし、それは糖鎖生物学の研究をしているものにとって、挑戦意欲を駆り立てる糖鎖研究の魅力とも言える。ただ、実際に細胞やタンパク質のフコシル化を制御するパラメーターとしては、糖転移酵素だけでなく、上述のドナー基質の合成経路、さらにゴルジへのドナー基質のトランスポーターが、より重要な位置を占めることがわかってきた。糖鎖生物学の研究は、さらに複雑になるかもしれない。

おわりに

最近、グラントの申請や報告書で、研究の出口を問われることが多い。コアフコースの研究は、AFP-L3などの臨床検査、ADCC活性などの抗体医薬に直結するため、非常に明確な目標がある。かつて脚光を浴びた腫瘍マーカーの研究が、近年の微量分析技術の進歩によって、リバイバルされている。ゲノミクスやプロテオミクスの研究によっ

て、新しい腫瘍マーカーが同定されるようになってきた。しかし本当の早期がんを診断するための戦略としては、量的な変化よりもむしろ質的な変化、つまり糖鎖修飾やプロテオリシスの方が重要かもしれないと思う。糖鎖の研究が、日常診療の場により多く取り上げられる日は、それほど遠くないのではと期待している。

最後に、本研究の遂行にあたり、大阪大学微生物病研究所教授の谷口直之先生、大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学教授の林 紀夫先生、大阪労災病院消化器内科副部長の野田勝久先生、松本病院外科部長の魚住尚史先生、NEDO 研究員の中川 勉博士、大阪大学 21 世紀 COE 研究員の中堅三弥子博士ほか、阪大医学部生化学教室の多くの方々に深謝します。

- 1) Taketa, K. (1990) *Hepatology*, **12**, 1420-1432.
- 2) Uozumi, N., Yanagidani, S., Miyoshi, E., Ihara, Y., Sakuma, T., Gao, C.X., Teshima, T., Fujii, S., Shiba, T., & Taniguchi, N. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 27810-27817.
- 3) Yanagidani, S., Uozumi, N., Ihara, Y., Miyoshi, E., Yamaguchi, N., & Taniguchi, N. (1997) *J. Biochem.*, **121**, 626-632.
- 4) <http://www.wako-chem.co.jp/rinyaku/products/lba/index.htm>
- 5) Aoyagi, Y. (1995) *Glycoconjugate journal*, **12**, 194-199.
- 6) Sato, Y., Nakata, K., Kato, Y., Shima, M., Ishii, N., Koji, T., Taketa, K., Endo, Y., Nagataki, S. (1993) *N. Engl. J. Med.*, **328**, 1802-1806.
- 7) Shiraki, K., Takase, K., Tameda, Y., Hamada, M., Kosaka, Y., Nakano, T. (1995) *Hepatology*, **22**, 802-807.
- 8) Yamashita, F., Tanaka, M., Satomura, S., Tanikawa, K. (1996) *Gastroenterology*, **111**, 996-1001.
- 9) Saitoh, A., Aoyagi, Y., Mori, S., Suda, T., Suzuki, Y., Sekine, C., & Asakura, H. (1997) *Acta Medica Biologica*, **45**, 11-14.
- 10) Block, T.M., Comunale, M.A., Lowman, M., Steel, L.F., Romano, P.R., Fimmel, C., Tennant, B.C., London, W.T., Evans, A.A., Blumberg, B.S., Dwek, R.A., Mattu, T.S., & Mehta, A.S. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 779-784.
- 11) Dai, Z., Liu, Y.K., Cui, J.F., Shen, H.L., Chen, J., Sun, R.X., Zhang, Y., Zhou, X.W., Yang, P.Y., & Tang, Z.Y. (2006) *Proteomics*, **6**, 5857-5867.
- 12) Noda, K., Miyoshi, E., Uozumi, N., Yanagidani, S., Ikeda, Y., Gao, C.X., Suzuki, K., Yoshihara, H., Yoshikawa, M., Kawano, K., Hayashi, N., Hori, M., & Taniguchi, N. (1998) *Hepatology*, **28**, 944-952.
- 13) Noda, K., Miyoshi, E., Gao, C.X., Nakahara, S., Kitada, T., Honke, K., Suzuki, K., Yoshihara, H., Yoshikawa, K., Kawano, K., Tonetti, M., Kasahara, A., Hori, M., Hayashi, N., & Taniguchi, N. (2003) *Cancer Res*, **63**, 6282-6289.
- 14) Okuyama, N., Ide, Y., Nakano, M., Nakagawa, T., Yamanaka, K., Moriwaki, K., Murata, K., Ohigashi, H., Yokoyama, S., Eguchi, H., Ishikawa, O., Ito, T., Kato, M., Kasahara, A., Kawano, S., Gu, J., Taniguchi, N., & Miyoshi, E. (2006) *Int. J. Cancer*, **118**, 2803-2808.

- 15) Nakagawa, T., Uozumi, N., Nakano, M., Mizuno-Horikawa, Y., Okuyama, N., Taguchi, T., Gu, J., Kondo, A., Taniguchi, N., & Miyoshi, E. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 29797-29806.
- 16) Taniguchi, N., Miyoshi, E., Gu, J., Honke, K., & Matsumoto, A. (2006) *Current Opinion in Structural Biology*, **16**, 561-566.

三善 英知

(大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学講座)

Core fucose and tumor marker

Eiji Miyoshi (Department of Molecular Biochemistry & Clinical Investigation, Osaka University Graduate School of Medicine, 1-7 Yamada-oka, Suita 565-0871, Japan)

細胞内輸送における Protrudin の役割

1. 膜リサイクリング制御タンパク質 Protrudin による神経突起形成機構

神経細胞は神経突起を出して神経回路を形成し、情報の入出力を行っている。これまで、神経突起形成のメカニズムについては、細胞骨格の再構築の制御という観点から多くの研究がなされてきた。その一方で、神経突起を形成するためには、細胞膜の構成成分が輸送供給されて突起における細胞膜表面積が増大する必要があるが、その機構についてはほとんど知られていなかった。今回筆者らは細胞内の膜リサイクル輸送システムが神経突起形成に重要であることを見出した。また、その制御の鍵となるタンパク質 Protrudin (プロトルーディン) を発見し、その詳細な作用機序を明らかにした¹⁾。

2. 膜のリサイクリングによる神経突起形成

細胞内にはさまざまな小胞輸送システムが存在しており、各種膜系の変形や移動などに関与している^{2,3)}。小胞輸送などの選択的な輸送システムはメンブレントラフィックと呼ばれており、Rabファミリーの低分子量Gタンパク質により厳密に制御されている⁴⁾。哺乳類には60種以上のRabが存在しているが、そのうちの一つのRab11はリサイクリングエンドソームに局在しており、膜のリサイクル輸送を制御している⁵⁾。

神経突起が形成されるためには、細胞内の膜成分が突起形成部位に限定して供給されなければならない。筆者らは、神経突起への膜の供給が、細胞膜のリサイクリングを

介してなされていることを提唱した。細胞膜のリサイクリングとは、細胞膜の一部が細胞内に取り込まれて(エンドサイトーシス)、リサイクリングエンドソームにいったん集められ、再び特異的な部位に向けて分泌される(エキソサイトーシス)システムである。筆者らの発見したProtrudinは、このリサイクリングシステムを制御することにより神経突起形成を誘導する新規のタンパク質であった。

3. 突起形成を誘導する Protrudin の発見

今回紹介する研究は偶然の発見から始まった。筆者らは以前に、膜シャペロンタンパク質のFKBP38が、結合分子の細胞内局在や機能を制御していることを明らかにした⁶⁾。FKBP38のノックアウトマウスを作製したところ、発生期の神経管閉鎖不全を呈するとともに異常な神経線維の走行が観察された。すなわち、FKBP38が神経の発生・分化に関係することが示唆された。そこでFKBP38の結合タンパク質を探索したところ、新規の膜タンパク質が同定された。

当初機能が不明であったその新規タンパク質をたまたま子宮頸がん由来のHeLa細胞株で過剰発現させたところ、神経突起を思わせるような突起が出現した。そこで「突起が伸びる」という意味の“protrude (プロトルード)”という英語にちなんで、このタンパク質を“Protrudin (プロトルーディン)”と命名した。

Protrudinは、Rab11結合ドメイン(RBD11)、膜貫通部位と予想される疎水性ドメイン(HP)、ERへの分布に関与するFFATモチーフ、タンパク質同士に結合に関与するcoiled-coilドメイン、脂質との結合に関与するFYVEドメインを有する膜タンパク質である(図1)。これらの構造的特徴から、Protrudinは細胞内の小胞輸送の制御に関与する可能性が考えられた。特に、ProtrudinはRab11結合ドメインを有することから、リサイクリングエンドソーム

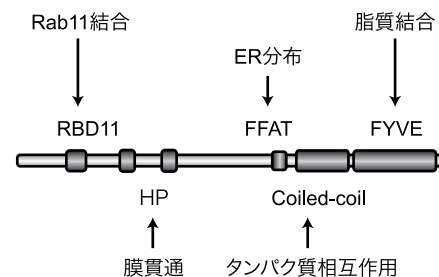


図1 Protrudinの構造

Protrudinは、Rab11結合ドメイン(RBD11)、疎水性ドメイン(HP)、ER分布に関与するFFATモチーフ、タンパク質相互作用に関与するcoiled-coilドメイン、脂質結合に関与するFYVEドメインを有する。