

提出日：平成 28 年 5 月 1 日

平成 27 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

## (2) 研究成果の概要

課題名	血小板凝集因子ポドプラニンの立体構造解析		
研究代表者	氏名	加藤幸成	
	所属機関名・部局名	東北大学大学院・医学系研究科	
	職名	教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	国際共同研究課題	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	高木淳一		
<p>我々はこれまで、血小板凝集因子ポドプラニンの遺伝子クローニングに成功し、その分子生物学的解析を行ってきた。ポドプラニンはC末端に膜貫通部位を有したI型膜貫通型タンパク質であり、N末端に血小板凝集の活性中心であるEDxxVTPGという配列(PLAG配列)を持つ。さらに、ヒトポドプラニンに特異度の高いモノクローナル抗体(NZ-1)を作製した。NZ-1により免沈したポドプラニンの糖鎖構造を解析した結果、ポドプラニンの血小板凝集に必須であるdisialyl-core1という糖鎖構造を持つことが明らかとなった。一方、ポドプラニンの血小板上受容体として、C型レクチン様受容体のCLEC2を同定した。NZ-1抗体は、ポドプラニンとCLEC2との結合を阻害し、ポドプラニンによる血小板凝集も完全に阻害した。また、NZ-1抗体をポドプラニン発現細胞と共にマウスに尾静注すると、肺転移も有意に抑制した。</p> <p>抗ポドプラニン抗体NZ-1(rat IgG2a, lambda)は、PLAG配列を含む14アミノ酸のペプチド(PAペプチド)を免疫して作製した抗体である。これまで、受入担当研究室の協力を得て、NZ-1抗体とPAペプチドとの複合体の立体構造を決定し、NZ-1抗体に結合した状態のPAペプチドが非常にユニークな立体構造を取っていることが明らかとなり、PAタグシステムとして確立した。平成27年度は、PAタグシステムの効率化について検討した。</p> <p>NZ-1抗体をPAタグ抗体として使用する際には、通常の抗ポドプラニン抗体として使用する場合と比較し使用量が膨大である。平成27年度は、高密度培養のシステムを導入し、1g/L以上の収量を得ることが可能となった。また、既存のタグシステムでは困難な点を、PAタグシステムで解決できるかどうかを検討した。種々の膜タンパク質のN末にPAタグを付加し分泌型タンパク質として発現させ、培養上清からの精製を実施したところ、すべてのタンパク質について効率良く精製タンパク質を取得できた。さらに、HEK-293Tのヒトポドプラニンノックアウト細胞(HEK-293T/PDPN-KO)の樹立に成功した。HEK-293T/PDPN-KOに膜タンパク質を発現させたところ、発現株としての有用性および増殖能も維持されていることがわかった。今後、さらにPAタグシステムの有用性を上げるための研究を継続する。</p>			