◆トピックス◆

Gas6 とそのレセプター

大橋 一正*, 水野 健作*

Gas6 and its Receptors

Kazumasa OHASHI*, Kensaku MIZUNO*

Key words: Gas6, protein S, receptor tyrosine kinase, Axl, Sky, ligand, vascular smooth muscle cells

はじめに

Gas 6 (growth-arrest specific gene 6 の略) 遺伝子は, NIH 3 T 3 細胞の血清飢餓時に発現が誘導されてくる遺伝子の一つとして単離された¹⁾. その構造は, 抗血液凝固因子として知られる protein S と非常に類似した構造を持っていたが, その生理機能は不明であった. 一方, 新規な受容体型チロシンキナーゼのリガンドの探索の過程で, Gas 6 が 3 種の受容体型チロシンキナーゼ Axl, Sky, Mer の共通のリガンドとして機能していることが最近明らかとされた. また, Gas 6 は, 血管平滑筋細胞に対して細胞増殖補助因子や走化性因子として機能するほか, 線維芽細胞, シュワン細胞, 破骨細胞など多くの細胞に対しても多様な生物活性を示すことが明らかにされてきた. 本稿では, Gas 6 とそのレセプターの構造, ならびに生物活性について, 現在までに得られている知見を紹介する.

Gas6 の構造と受容体の同定

Gas 6 は protein S と 44% の高い相同性を持ち, protein S と同様のドメイン構成を持つ (図

1). すなわち, N 末端部に, ビタミン K 依存的に γ -カルボキシル化されるグルタミン酸がクラスターを形成している Gla ドメインが存在し, それに続き EGF 様ドメインが 4 個並び, C 末端部に性ホルモン結合性グロブリン (SHBG) 様ドメインが存在する¹⁾.

Gas 6 の受容体として, Axl, Sky, Mer の 3 種の受容体型チロシンキナーゼが同定されている²⁾. Axl は, 癌遺伝子の研究から, 慢性骨髄性白血病患者の遺伝子ライブラリーより, NIH 3 T 3 細胞の形質転換能を指標に単離された³⁾. この遺伝子は同時期に複数の研究室より単離されており, Ufo, Ark とも呼ばれている. また, 私たちは, これと類似した構造を持つ受容体型チロシンキナーゼ Sky を c-sea プロトオンコジーンのカナーゼドメインをプローブとしたスクリーニングによって単離した⁴⁾. Sky は Tyro 3, Rse, Brt とも呼ばれている⁵⁾. さらに, Axl/Sky と類似した受容体型チロシンキナーゼとして, Mer が単離された⁶⁾. これらの受容体は, 細胞外ドメインに 2 個のイムノグロブリン様ドメインと 2 個のフィブロネクチンタイプ III ドメインを, 細胞内ドメインにチロシンキナーゼドメインを持ち, 受容体型チロシンキナーゼの中で

* 九州大学理学部生物学科 [〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1]

Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, (6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.)

図 1 protein S ファミリーと Axl/Sky ファミリーの相関図

Gla: γ -カルボキシグルタミン酸
 SHBG: 性ホルモン結合性グロブリン
 Ig: イムノグロブリン
 FN III: ファイブロネクチンタイプ III
 TM: 膜貫通領域
 TK: チロシンキナーゼ

一つのサブファミリーを形成している (図 1)。以後, Axl/Sky ファミリーと称する。

1995 年, Varnum らは, Wi 38 細胞の培養上清中より Axl の細胞外ドメインを用いて Axl のリガンドを精製し, 部分アミノ酸配列の決定から, それが Gas 6 であることを明らかにした⁷⁾。それに続き, Stitt らは, protein S が Sky のリガンドであると報告したが⁸⁾, 私たちとジェネンティックのグループは, protein S は Sky のリガンドではなく, Gas 6 が Axl, Sky の共通のリガンドであることを明らかにした⁹⁾¹⁰⁾。Stitt らの結果は, 異種由来のリガンドと受容体 (ヒト protein S とマウス Sky) が偶然にも弱い結合を示したために起きたことで, 同種間での結合は認められず, protein S は Sky の生理的なリガンドとしては作用しないと考えられる。

私たちは, Gas 6 と Axl/Sky ファミリーとの

関係についてさらに解析を進め, Gas 6 は Axl, Sky, Mer 全てに結合し, その親和性は, Axl > Sky > Mer の順で, Kd 値はおおの 0.4 nM, 2.7 nM, 29 nM であることを明らかにした (図 1)¹¹⁾。protein S はいずれの受容体にも結合しなかった¹¹⁾。Gas 6 の Mer に対する親和性はあまり高いことから, 生理的な未知のリガンドが他に存在する可能性が残されている。また, protein S に対しても, Axl/Sky ファミリーの新たなメンバーがレセプターとして存在する可能性が残されている。

Gas6 の機能ドメイン

Gas 6 は, 受容体型チロシンキナーゼのリガンドとしてはこれまでにない新しい構造を持つものであるため, 分子内のどのドメインが受容体との結合, 活性化に必要であるのかを検討し

表 1 Gas 6 の生物活性

標的細胞	生物活性
NIH3T3 細胞	生存維持 増殖促進
血管平滑筋細胞	生存維持 トロンビンによる増殖の強化 走化性
シュワン細胞	生存維持 増殖促進
破骨細胞	骨吸収促進
多形核白血球	血管内皮細胞への接着阻害
その他	細胞接着 (Gla ドメインを介したホスファチジルセリンへの結合)

た。Gas 6 の各ドメインの欠失変異体を作製し、その結合活性、受容体の自己リン酸化誘導活性、NIH 3 T 3 細胞の増殖促進活性を検討した。その結果、Gas 6 の C 末端部にある SHBG 様ドメインのみで必要かつ十分な活性を持つことが明らかとなった¹²⁾¹³⁾。一方、N 末端部の Gla ドメインが Gla 化されていない Gas 6 は活性が著しく低下していることも明らかとなり¹²⁾¹⁴⁾、Gas 6 の Gla ドメインは、Gas 6 の活性発現に必要な調節ドメインとして機能していると考えられる¹²⁾。また、Gas 6 にはスプライシングの違いにより、EGF 様ドメインと SHBG 様ドメインの間に 43 アミノ酸が挿入されたアイソフォームが存在する。挿入部分はプロテアーゼによる切断を受けやすく、活性ドメインである SHBG 様ドメインを N 末端部より切り離すような制御機構が推定されている¹⁵⁾。

Gas6 の生物活性

Gas 6 の生物活性を表 1 にまとめた。中野らは、血管平滑筋細胞より分泌され、血管平滑筋細胞のトロンビンやリゾホスファチジル酸による増殖を強化する因子として growth potentiating factor (GPF) を単離し、これが Gas 6 と同一の分子であることを報告した¹⁶⁾。Gas 6 は、それ自身では血管平滑筋細胞の増殖を促進しないが、G タンパク質共役型受容体を活性化するトロンビンなどの刺激による増殖を

強化する活性を持つ¹⁶⁾。また、Gas 6 は血管平滑筋細胞に対して、アポトーシスを抑制し、生存維持活性を示す¹⁷⁾。さらに、最近、Gas 6 は血管平滑筋細胞の走化性因子として、細胞の移動を誘引する活性を持つことが報告され¹⁸⁾、血管の修復、維持、あるいは動脈硬化の誘因因子として多様な役割を担っていることが推定される¹⁷⁾¹⁸⁾。また、NIH 3 T 3 細胞に対する増殖促進活性、生存維持活性や、初代培養のシュワン細胞に対する増殖促進活性、生存維持活性が報告されている¹⁹⁾²⁰⁾。また、破骨細胞には Sky が発現しており、分化した破骨細胞では Gas 6 依存的に骨吸収活性が上昇することが報告されている²¹⁾。

さらに、注目すべき新たな生物活性として、Gas 6 は Gla ドメインを介してホスファチジルセリンに特異的に結合することが最近見出された²²⁾。Axl を発現している U 937 単球芽細胞は Gas 6 依存的にホスファチジルセリンに結合することから、Gas 6 は、Gla ドメインを介してホスファチジルセリンを認識し、SHBG 様ドメインを介して Axl に結合する 2 価性細胞間接着分子として機能すると考えられる²²⁾。また、Axl を強制発現させた細胞が Gas 6 依存的に凝集を引き起こすことがほかのグループからも報告されている²³⁾。ホスファチジルセリンは、老化細胞やアポトーシスを引き起こす細胞の表面に配向することが知られており、Axl または Sky を発現したマクロファージなどが、Gas 6 を介して

これらの細胞を認識し, 食食を促進する可能性が示唆される。また, 血管内皮細胞に Gas 6 が発現し, ホルボールエステル (PMA) や血小板活性化因子 (PAF) などの刺激による多形核白血球の血管内皮細胞への結合を Gas 6 が阻害するとの報告があり, Gas 6 が血管内における過剰な炎症反応を抑制する因子として機能している可能性が示唆されている²⁴⁾。

おわりに

Gas 6 は, 当初, 増殖休止期に発現誘導される遺伝子として単離されたが, その後, 受容体が同定され, さらに細胞増殖の促進, 走化性, 細胞接着因子としての活性など多様な生物活性が明らかにされつつある。特に, Gla ドメインと SHBG 様ドメインを用いた 2 価性の細胞接着因子として機能する点は, 他の増殖因子には見られない特徴であり, 今後の研究の進展が期待される。

文 献

- 1) Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C: The protein encoded by a growth arrest-specific gene (*gas6*) is a new member of vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* **13**: 4976-4985, 1993.
- 2) 水野健作, 大橋一正: 受容体型チロシキナーゼ Sky/Tyro3 のリガンドはプロテイン S か? *細胞工学* **15**: 222-228, 1996.
- 3) O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa III R, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET: *axl*, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **11**: 5016-5031, 1991.
- 4) Ohashi K, Mizuno K, Kuma K, Miyata T, Nakamura T: Cloning of the cDNA for a novel receptor tyrosine kinase, *sky*, predominantly express in brain. *Oncogene* **9**: 699-705, 1994.
- 5) Mark MR, Scadden DT, Wang, Z, Gu Q, Goddard A, Godowski PJ: *rse*, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain. *J Biol Chem* **269**: 10720-10728, 1994.
- 6) Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS: Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, *c-mer*. *Cell Growth Differ* **5**: 647-657, 1994.
- 7) Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ, Yanagihara D, Bennett L, Sylber M, Merewether LA, Tseng A, Escobar E, Liu ET, Yamane HK: Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth arrest-specific gene 6. *Nature* **373**: 623-626, 1995.
- 8) Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, Masiakowski P, Ryan TE, Tobkes NJ, Chen DH, DiStefano PS, Long GL, Basilico C, Goldfarb MP, Lemke G, Glass DJ, Yancopoulos GD: The anticoagulation factor Protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* **80**: 661-670, 1995.
- 9) Ohashi K, Nagata K, Tushima J, Nakano T, Arita H, Tsuda H, Suzuki K, Mizuno K: Stimulation of Sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* **270**: 22681-22684, 1995.
- 10) Godowski JP, Mark RM, Chen J, Sadick DM, Raab H, Hammonds GR: Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as a ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro3. *Cell* **82**: 355-358, 1995.
- 11) Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, Mizuno K: Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **271**: 30022-30027, 1996.
- 12) Tanabe K, Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Mizuno K: Roles of γ -carboxylation

- and a sex hormone-binding globulin-like domain in receptor-binding and in biological activities of Gas6. *FEBS Lett* **408** : 306-310, 1997.
- 13) Mark MR, Chen J, Hammonds RG, Sadick M, Godowsk PJ : Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem* **271** : 9785-9789, 1996.
- 14) Nakano T, Kawamoto K, Kishino J, Nomura K, Higashino K, Arita H : Requirement of gamma-carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6 : contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem J* **323** : 387-392, 1997.
- 15) Goruppi S, Yamane H, Marcandalli P, Garcia A, Clogston C, Gostissa M, Varnum B, Schneider C : The product of a *gas6* splice variant allows the release of the domain responsible for Axl tyrosine kinase receptor activation. *FEBS Lett* **415** : 59-63, 1997.
- 16) Nakano T, Hogashino K, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita, H, Ohara O, Arita H : Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca^{2+} -mobilizing growth factors. *J Biol Chem* **270** : 5702-5705, 1995.
- 17) Nakano T, Kawamoto K, Higashino K, Arita H : Prevention of growth arrest-induced cell death of vascular smooth muscle cells by a product of growth arrest-specific gene, *gas6*. *FEBS Lett* **387** : 78-80, 1996.
- 18) Fridell CY, Villa J, Attar CE, Liu TE : Gas6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **273** : 7123-7126, 1998.
- 19) Goruppi S, Ruaro E, Schneider C : Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* **12** : 471-480, 1996.
- 20) Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, Bunge R, Godowski JP, Sliwkowski XM, Mather PJ : Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci* **16** : 2012-2019, 1996.
- 21) Nakamura SY, Hakeda Y, Takakura N, Kameda T, Hamaguchi I, Miyamoto T, Kakudo S, Nakano T, Kumegawa M, Suda T : Tyro3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem Cell* **16** : 229-238, 1998.
- 22) Nakano T, Ishimoto Y, Kishino J, Umeda M, Inoue K, Nagata K, Ohashi K, Mizuno K, Arita H : Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* **272** : 29411-29414, 1997.
- 23) McCloskey P, Fridell Y, Attar E, Villa J, Jin Y, Varnum B, Liu TE : Gas6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl. *J Biol Chem* **272** : 23285-23291, 1997.
- 24) Avanzi CG, Gallicchio M, Bottarel F, Gammaitoni L, Cavalloni G, Buonfiglio D, Bragardo M, Bellomo G, Albano E, Fantozzi R, Garbarino G, Varnum B, Aglietta M, Saglio G, Dianzani U, Dianzani C : Gas6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells. *Blood* **91** : 2334-2340, 1998.