

ヘパラン硫酸-*O*-硫酸転移酵素HS2ST, HS6STとその機能

羽瀧弘子 (愛知医科大学分子医科学研究所)

ヘパラン硫酸 (HS)は細胞増殖因子、ECM 成分、プロテアーゼなど多様な生体分子と結合し、その活性を制御することによって、発生、分化、形態形成、生理的-病理的な現象に重要な役割を持つ。これら分子とHSの相互作用は様々な位置の硫酸化とウロン酸のエピメリゼーション、さらに脱 6-*O*-硫酸などの修飾を部分的にうけて合成される多様な構造に依存している。現在までにヘパラン硫酸合成酵素、修飾酵素の遺伝子はほぼすべてクローニングされて、これら遺伝子の変異体からHSの機能が解析されている。

私たちはFGF 2とHSの結合は2-*O*-硫酸残基に特異的であるという発見を基にして、HSの特異な*O*-硫酸化がどのような機能をもつか遺伝子工学的に明らかにすること、そしてより特異的なヘパリン結合性細胞増殖因子の活性制御オリゴ糖の開発を目指して研究を進めてきました。以下に私たちのこれまでの研究成果を概略します。

1 ヘパリン結合性細胞増殖因子(HBGF)はヘパラン硫酸の特異な構造と結合するらしい

特定のヘパラン硫酸が非常に低濃度で細胞増殖を阻害するという報告から、私たちは特異な構造を持つHSがHBGFの活性を制御するかもしれないと考えた。FGF 2に結合したHSは2-*O*-硫酸基に富み、最小構造は6-8糖であることを明らかにした。試験管内でFGF2結合性HSはプロテアーゼに抵抗性を示した。そこでこのようなHSの特異な*O*-硫酸化がどのような機能をもつかを遺伝子工学的に明らかにするため、これらを合成する硫酸転移酵素を精製し、クローニングをしました。

2 ヘパラン硫酸 6-*O*-硫酸転移酵素(HS6ST)と2-*O*-硫酸転移酵素(HS2ST)

培養細胞の無血清培養液からコンドロイチン 6-硫酸転移酵素が精製されたことを参考にして、強いHS-*O*-ST活性を示したCHO細胞を出発材料とした。意外なことにHS6ST活性の大部分は培地に分泌されたが、HS2STの95%以上が細胞層に存在した。HS6STは約13リットルの細胞培養液から、HS2STは 1×10^9 細胞から出発してほぼ単一タンパクまで精製し、それらのアミノ酸配列をもとにして、クローニングをした。それまでは単一タンパクがHS2STとHS6STの両活性をもつと考えられていたが、この2つの活性は異なった遺伝子産物であることを明らかにした。現在のところHS2STは1種類であるが、HS6STは3つのアイソフォーム(HS6ST-1, -2, と-3)と1つのスプライシング型(HS6ST-2S)が存在することを明らかにした。これら酵素の特異性と発現部位は特徴的

であり、実際にニワトリ胚肢芽におけるHS2ST, 6STsの発現パターンとHSの6-硫酸化構造はかなり良い相関性を示した。

3 ゼブラフィシの HS6ST

ゼブラフィシの神経板領域を決定する遺伝子の1つが HS6ST ホモログであることをオランダの Bink らが発見し、共同研究を行った。このリコンビナントタンパクは HS6ST 活性があり、基質特異性は HS6ST1 に極めて似ていることがわかった。この遺伝子をモルホリノで knock-down すると HS の 6-*O*-硫酸基は 20-40 % 減少し、眼、ヒレ、筋肉の形態形成に異常を示した。筋肉では Wnt のシグナリングの攪乱が推定された。

4 ショウジョウバエの HS2ST、HS6ST

ショウジョウバエの HS2ST 相同遺伝子として2つある。マウス HS2ST と 53%の相同性を示す Sd は HS2ST 活性を示し、基質特異性もよく似ていた。もう1つは背原軸の決定を決める因子の1つである pipe で、26%の相同性を示し HS2ST と推定されていた。しかし、調べた範囲内では HS を含めて、GAG に対する硫酸転移活性を示さなかった。

HS6ST の相同遺伝子は1つでその基質特異性は 6ST1 と 6ST2 の中間的な性質を示した。RNAi によるノックダウンでは気管支形成に欠損があり、FGF シグナリングの異常によることが示唆された (Kamimura, Nakato らとの共同研究)。

5 マウスの HS6ST-1, -2

HS6ST-1 ノックアウトマウス (6ST1-KO) は胎生 15.5 日から出産時までほとんど死亡し、野生型マウスより小さかった。胎盤の迷路層における微小血管の形成が異常であり、VEGF-A の mRNA とそのタンパクの減少によることが示唆された。一方、6ST2-KO は外見的には正常であり、成長して子供を産むことができる。6ST1-KO マウスの大部分の組織で HS の 6-*O*-硫酸化特にウロン酸-*N*-スルホグルコサミン 6 硫酸の構造が目立って減少していたがヘパリンの低 6-硫酸化は無かった。一方、6ST2-KO マウスでは HS の 6-*O*-硫酸化の減少はわずかであったが、ヘパリン中の 6-*O*-硫酸化が約 50%に減少した。これらからヘパリンのトリ硫酸化 2 糖ユニットの 6-*O*-硫酸化は HS6ST-2 が大きく寄与することが明らかになった。

6 リコンビナント HS2ST, 6ST による硫酸化オリゴ糖の合成と HB-GF 結合の特異性

リコンビナント HS6ST, HS2ST と CDSNS-ヘパリン(完全に脱硫酸後

再 *N*-硫酸化したヘパリン)由来のオリゴ糖を用いて異なる *O*-硫酸残基と硫酸化度をもつオリゴ糖群を作製し、HB-GF との親和性を系統的に解析した。その結果、重複はあるもののそれぞれ特異な親和性を示した。中でも FGF2 はやはり 2-*O*-硫酸に高い親和性を示し、一方 FGF10 は 6-*O*-硫酸により高い親和性を持つことが明らかになった。

これらの結果から HS-6-*O*-硫酸化は種々の HB-BF との相互作用を介して、発生、分化に重要な役割を果たすことが示された。しかし、その相互作用は当初予想した以上に複雑で発生時期、組織、動物種によって、正にも負にも制御される。恐らく、細胞増殖因子、そのレセプター、HS 3 者のバランスに少なくとも依存しているであろう。そして HB- GF と HS の *in vitro* における相互作用の特異性は、より特異的に GF 活性を制御できるオリゴ糖の開発につながることを期待させる。