

生理活性糖鎖・硫酸化グリコサミノグリカンの生合成機構の解析

北川 裕之

Biosynthetic Mechanism of the Bioactive Sulfated Glycosaminoglycans

Hiroschi KITAGAWA

Department of Biochemistry, Kobe Pharmaceutical University, 4-19-1 Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan

(Received April 1, 2002)

Sulfated glycosaminoglycans including heparin/heparan sulfate and chondroitin/dermatan sulfate have been implicated in numerous pathophysiological phenomena in vertebrates and invertebrates. The critical roles of glycosaminoglycans, especially heparan sulfate, in developmental processes involving the signaling of morphogens such as Wingless and Hedgehog proteins, as well as of fibroblast growth factor, in *Drosophila* have recently become evident. In biosynthesis, the tetrasaccharide sequence (GlcA-Gal-Gal-Xyl-), designated the protein linkage region, is first built on a specific Ser residue at the glycosaminoglycan attachment site of a core protein. A heparin/heparan sulfate chain is then polymerized on this fragment by alternate additions of *N*-acetylglucosamine and glucuronic acid (GlcA) through the actions of glycosyltransferases with overlapping specificity encoded by the tumor suppressor *EXT* family genes. In contrast, a chondroitin/dermatan sulfate chain is synthesized on the linkage region by alternate additions of *N*-acetylgalactosamine and GlcA through the actions of glycosyltransferases, designated chondroitin synthases. Recent studies have achieved purification of a few and molecular cloning of all of the glycosyltransferases responsible for these reactions and have revealed the bifunctional nature of a few of these enzymes. The availability of the cDNA probes has provided several important clues to help solve the molecular mechanisms of the biosynthetic sorting of heparin/heparan sulfate and chondroitin/dermatan sulfate chains, as well as of the chain elongation and polymerization of these glycosaminoglycans.

Key words—glycosaminoglycan; glycosyltransferase; proteoglycan; tumor suppressor gene; sulfotransferase

1. はじめに

細胞が合成する糖鎖の1種である硫酸化グリコサミノグリカンは、タンパク質と結合しプロテオグリカンと呼ばれ、ほとんどすべての細胞の表面や細胞外マトリックスに存在する。硫酸化グリコサミノグリカンは直鎖状の糖鎖で、主要な部分はアミノ糖とウロン酸からなる二糖が数十回繰り返される二糖繰り返し領域から構成される。硫酸化グリコサミノグリカンは、構成される二糖繰り返し領域の構造から大きく分けてコンドロイチン硫酸とデルマトン硫酸からなる一群とヘパリンとヘパラン硫酸で構成される一群に分類される。前者は構成二糖単位 (GlcA-GalNAc と IdoA-GalNAc) の中にアミノ糖としてガラクトサミンを含むのでガラクトサミノグリカン

であり、後者は構成二糖単位 (GlcA-GlcNAc と IdoA-GlcNAc) にグルコサミンを含むのでグルコサミノグリカンといえる (Fig. 1) (GlcA はグルクロン酸, IdoA はイズロン酸, GalNAc は *N*-アセチルガラクトサミン, GlcNAc は *N*-アセチルグルコサミン)。

硫酸化グリコサミノグリカンは様々な細胞増殖因子や細胞外マトリックス成分と相互作用し、細胞接着、移動、増殖、分化、形態形成といった細胞活動を制御したり、炎症や癌細胞の転移などの病的な現象にも関わっている。特に近年、ショウジョウバエの変異体を用いた研究からも硫酸化グリコサミノグリカンの重要性が明らかになってきた。例えば、ショウジョウバエのヘパラン硫酸合成酵素遺伝子である *tout-velu* (*ttv*) 変異体,¹⁾ UDP-グルコース (Glc) から UDP-グルクロン酸 (GlcA) を合成する UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子 *sugarless* 変異体,²⁾ ヘパラン硫酸 *N*-脱アセチル化/*N*-硫酸基

神戸薬科大学 (〒658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1)

*本総説は、平成13年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

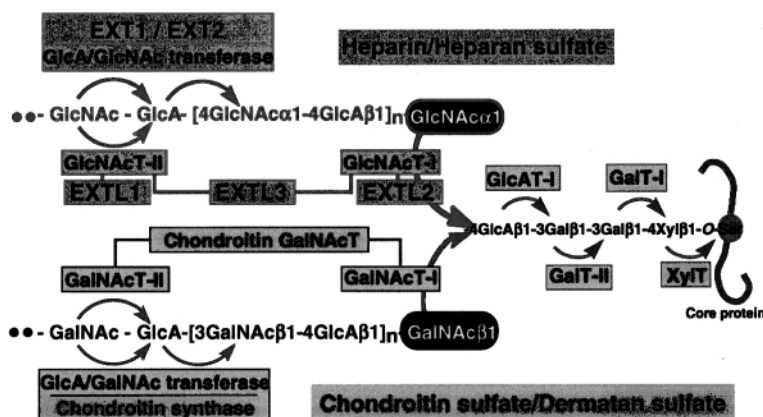


Fig. 1. Biosynthesis of Sulfated Glycosaminoglycans Backbone

Sulfated glycosaminoglycans are synthesized as proteoglycans, on specific Ser residues in the so-called glycosaminoglycan-protein linkage region, $\text{GlcA}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Xyl}\beta 1\text{-O-Ser}$, which is common to heparin/heparan sulfate and chondroitin sulfate/dermatan sulfate chains. The linkage region synthesis is initiated by the addition of Xyl to Ser followed by the addition of two Gal residues, and is completed by the addition of GlcA, each reaction being catalyzed by a specific glycosyltransferase, i.e. xylosyltransferase (XylT), galactosyltransferase-I (GalT-I), galactosyltransferase-II (GalT-II) or glucuronyltransferase-I (GlcAT-I), respectively. The glycosaminoglycans are built up on this linkage region by the alternating addition of *N*-acetylhexosamine and GlcA residues. Heparin/heparan sulfate is synthesized once GlcNAc is transferred to the common linkage region by *N*-acetylglucosaminyltransferase-I (GlcNAcT-I), whereas chondroitin sulfate/dermatan sulfate is formed if GalNAc is first added by *N*-acetylgalactosaminyltransferase-I (GalNAcT-I).

転移酵素遺伝子 *sulfateless* 変異体³⁾等の解析から硫酸化グリコサミノグリカン鎖が *Wingless*, *Decapentaplegic*, *Hedgehog* のシグナル伝達に關与する分子としてショウジョウバエの発生, 分化などに深く関わっていることが証明された。⁴⁾ また, マウスにおいてもヘパラン硫酸の糖鎖骨格の合成酵素の遺伝子 *EXT1* (後述) のノックアウトマウスでは胎性致死であり,⁵⁾ ヘパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素遺伝子の変異体は, 腎臓の形態形成異常や骨格の欠陥がみられ出生直後に致死になることが報告され,⁶⁾ 硫酸化グリコサミノグリカン鎖が多くの生命現象に欠くことのできないものであることが明らかになってきた。このような硫酸化グリコサミノグリカン鎖の重要な機能の発現と調節を考えるには, 生合成メカニズムの解明が不可欠である。しかしながら, 著者がこの分野の研究に着手した当時, 硫酸化グリコサミノグリカンの生合成に關与する酵素の遺伝子は全くクローニングされておらず, 生合成メカニズムには多くの不明な点が残されていた。ここでは, 著者が行ってきた硫酸化グリコサミノグリカンの生合成に關わる糖転移酵素や硫酸基転移酵素の cDNA クローニング⁷⁾や機能解析により明らかとなった硫酸化グリコサミノグリカンの生合成機構を概説する。

2. グルクロン酸転移酵素 -I (GlcAT-I) による結合領域の生合成

ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸などの硫酸化

グリコサミノグリカン鎖は, コアタンパク質の特定のセリン残基に共通の四糖構造 ($\text{GlcA}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Xyl}\beta 1\text{-O-Ser}$) を介してプロテオグリカンとして合成される (Fig. 1)。この四糖構造の合成はキシロース (Xyl) 転移酵素により, 糖供与体として UDP-Xyl を用いてコアタンパク質上のセリン残基がキシロシル化され開始される。その後, 同様に順次ガラクトース (Gal), Gal, GlcA がそれぞれの転移酵素により単糖単位で転移し, 結合領域と呼ばれる四糖構造 (GlcA-Gal-Gal-Xyl) が合成される。結合領域の生合成に關わる 4 つの糖転移酵素のうちで, 著者らは結合領域を完成させる GlcAT-I に着目した。なぜなら, GlcAT-I は細胞内での比活性が最も低いことが報告され, GlcAT-I の発現が硫酸化グリコサミノグリカン鎖の発現量を制御している可能性が考えられたからである。後述するように, グルクロン酸転移酵素 -I (GlcAT-I) はヘパラン硫酸系やコンドロイチン硫酸系多糖鎖の二糖繰返し領域を合成するグルクロン酸転移酵素 (Fig. 1) とは別の酵素分子である。

2-1. GlcAT-I の cDNA クローニング GlcAT-I 活性は 1969 年にニワトリ胎仔の軟骨で初めて検出され,⁸⁾ その後, ニワトリの脳やマウスの肥満細胞を酵素源として精製が試みられたが, GlcAT-I が生体内に微量しか存在しないこと, また, 膜結合型の酵素であるためその可溶化が困難であることなどの

理由から均一にまでは精製されていなかった。そこで我々は、酵素を精製するという手法ではなく、他のグルクロン酸転移酵素との相同性によるクローニングを試みた。GlcAT-Iはコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸、ヘパリン/ヘパラン硫酸に共通のグリコサミノグリカン-タンパク質結合領域 Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl 残基に、UDP-GlcA を糖供与体として β 1-3 結合で GlcA を転移させる酵素である。これに対し、当時既にクローニングされていた HNK (human natural killer)-1 糖鎖抗原 (GlcA (3-O-sulfate) β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-O-R, R は N-結合型糖鎖) の生合成に関与するグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) は、末端に Gal β 1-4 GlcNAc という構造を持つ糖タンパク質をアクセプターとし、UDP-GlcA を糖供与体として β 1-3 結合で GlcA を転移させる酵素である。⁹⁾ 我々は、GlcAT-I と GlcAT-P の酵素反応類似性から、両酵素の触媒部位の一次構造は類似していると考え、GlcAT-P の塩基配列をもとに GlcAT-I cDNA のクローニングを以下のように行った。ラット GlcAT-P と相同性を示すタンパク質が *C. elegans*, *S. mansoni* に存在し、そのアミノ酸配列を比較することにより保存された4つのドメインが見出されていた (Fig. 2)。⁹⁾ その中で最もよく保存された部分のアミノ酸配列を利用して縮重プライマーを合成し、硫酸化グリコサミノグリカンが豊富に存在し、しかも GlcAT-P が発現していないヒト胎盤由来 cDNA を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により *GlcAT-I* の検索を行った (Fig. 2)。その結果、335 アミノ酸からなる II 型膜貫通タンパク質をコードする1種の新規グルクロン酸転移酵素候補遺伝子が得られた (Fig. 2) ので、組換え型として発現させ GlcAT-I 活性を持つかどうかを調べた。その際、発現に用いる細胞自身が合成する内在性の GlcAT-I の混入を避けるために、筆者が他の転移酵素の発現に用いていた可溶型として発現させる系を使用した。¹⁰⁾ 可溶性のタンパク質として発現させるためにインシュリンのシグナルシークエンスと、発現したタンパク質を IgG-Sepharose を用いて精製可能にするため proteinA の IgG-結合ドメインとが、新規グルクロン酸転移酵素候補遺伝子のコードするタンパク質の膜貫通ドメインを含む N-末端側から43個のアミノ酸と入れ換わるような発現ベクターを構築し、これを

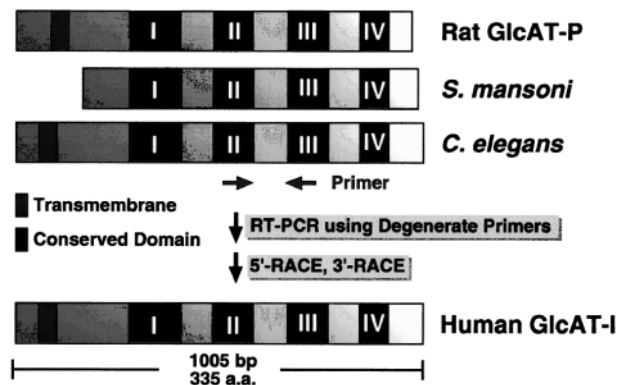


Fig. 2. Polymerase Chain Reaction (PCR) Cloning of Human GlcAT-I cDNA

The alignment of the amino acid sequence of rat GlcAT-P with those of the corresponding putative proteins in *Caenorhabditis elegans* and *Schistosoma mansoni* revealed the presence of four highly conserved motifs (I-IV) in the large catalytic region. Accordingly, we first designed degenerate oligonucleotide primers to the conserved regions found in the motifs II and III for a PCR-based approach to clone new members of this gene family. With human placenta cDNA as the template, the PCR using degenerate primers resulted in the amplification of a novel cDNA. To clone the complete coding sequence of the novel cDNA, the cloning strategy of rapid amplification of cDNA ends (RACE) was employed. The revealed sequence of the overlapping cDNA fragments indicated a single open reading frame of 1005-bp coding for a protein of 335 amino acids.

COS細胞に導入して可溶性の融合タンパク質を得た。発現された組換え型タンパク質を IgG-Sepharose を用いて精製し、内在性の GlcAT-I を除去後、グリコサミノグリカン-タンパク質結合領域の Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-O-Ser と UDP-GlcA を用いて活性を調べた結果、得られた新規グルクロン酸転移酵素候補遺伝子は GlcAT-I をコードすることが明らかになった。¹¹⁾ GlcAT-I は GlcAT-P とアミノ酸レベルで43%の相同性があり、さらに各ドメイン中には非常によく保存された部位が見られた (Fig. 2)。¹¹⁾ GlcAT-I は、硫酸化グリコサミノグリカン生合成に関与する糖転移酵素の中で最初に cDNA クローニングされたものとなった。

2-2. GlcAT-I の組織発現 RT (Reverse Transcription)-PCR 法によりヒト GlcAT-I mRNA の発現部位、発現量を調べた結果、前立腺、膵臓、脳 (胎児) などにおいて強い発現が見られた。また、組織により発現量は異なっていたが胎児を含め調べたすべての組織に発現が認められた (Fig. 3)。¹²⁾ これは、硫酸化グリコサミノグリカンがすべての組織で発現しているという知見に一致しており、今回クローニングした GlcAT-I が硫酸化グリコサミノグリカン鎖生合成に関与していることを示唆している

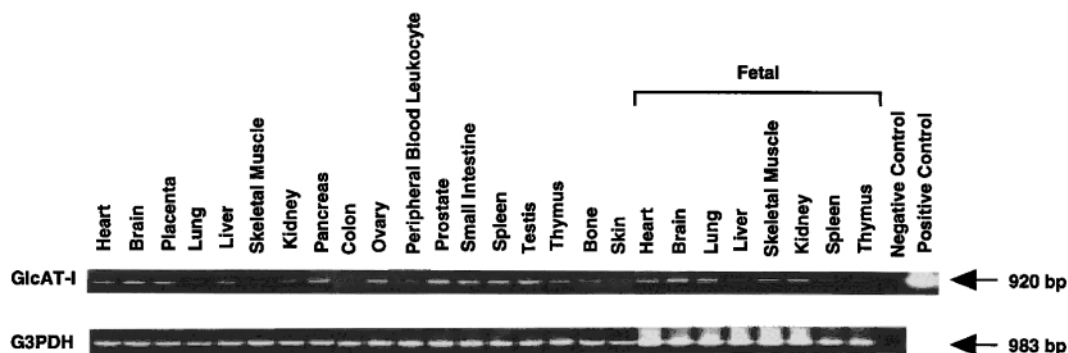


Fig. 3. Differential Expression of the GlcAT-I Gene in Various Human Tissues
The arrow indicates the expected position for a PCR product.

と考えられる。GlcAT-I 欠損 CHO 細胞株（ヘパラン硫酸もコンドロイチン硫酸も合成できない）における硫酸化グリコサミノグリカン合成が GlcAT-I cDNA の導入によって回復できることから、¹³⁾ GlcAT-I がコンドロイチン硫酸系多糖鎖とヘパラン硫酸系多糖鎖の両方の結合領域を合成する唯一のグルクロン酸転移酵素であると考えられる。

2-3. GlcAT-I 高発現細胞における糖鎖発現

GlcAT-I によって硫酸化グリコサミノグリカン鎖合成量の制御が行われているかどうか調べるために、GlcAT-I cDNA を COS-1 細胞に強制発現させた結果、コンドロイチン硫酸及びヘパラン硫酸発現量が増大した。¹⁴⁾ また、GlcAT-P cDNA を COS-1 細胞に導入すると HNK-1 糖鎖抗原が発現することが知られているが、⁹⁾ 前述のように GlcAT-I は GlcAT-P とアミノ酸レベルで 43% という高い相同性を示したことから GlcAT-I による HNK-1 糖鎖抗原合成活性についても調べた。その結果、GlcAT-P cDNA を導入したときに比べると弱いものの GlcAT-I によっても HNK-1 糖鎖抗原が発現することを見出した。¹⁴⁾ Esko らのグループが最近発現クローニング法を用いてハムスター GlcAT-I をクローニングし、ヒト GlcAT-I とアミノ酸レベルで 95% の相同性を示すことを報告したが、¹⁵⁾ 彼らもハムスター GlcAT-I cDNA を COS-7 細胞に導入すると HNK-1 糖鎖抗原が発現することを見出している。¹⁵⁾ したがって、GlcAT-I と GlcAT-P の基質特異性が一部オーバーラップしている可能性が予想されたので、我々は両酵素の基質特異性を詳しく調べた。

2-4. 組換え型 GlcAT-I と GlcAT-P の基質特異性の比較¹⁴⁾ 非還元末端に Gal 残基を持つ Table

Table 1. Comparison of the Acceptor Specificity of GlcAT-I and GlcAT-P Secreted into the Culture Medium by Transfected COS-1 Cells

Acceptor	Enzyme activity ^{b)}	
	GlcAT-I pmol/ml medium/h	GlcAT-P pmol/ml medium/h
Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl	14.2	0.5
Chondroitin (GalNAc β 1-4GlcA) _n	ND ^{c)}	1.2
Lactose (Gal β 1-4Glc)	ND	ND
N-Acetylactosamine (Gal β 1-4GlcNAc)	ND	14.9
Asialoorosomucoid (Gal β 1-4GlcNAc-R) ^{a)}	ND	71.6
Gal β 1-4GlcNAc β 1-O- naphthalenemethanol	ND	83.3
Gal β 1-3GlcNAc	ND	ND
Gal β 1-3GalNAc	0.2	ND

a) R represents the remainder of the N-linked oligosaccharide chain.

b) The values represent the averages of two independent experiments.

c) ND, not detected (<0.1 pmol/ml medium/h).

1 に示した 8 種の基質を用いて GlcA 転移量を測定した結果、組換え型ヒト GlcAT-I は結合領域三糖 (Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl) にのみ GlcA 転移活性を示したことから、少なくとも GlcAT-I は結合領域三糖の非還元末端から 2 番目の Gal までを認識していると考えられた。このことは、最近の GlcAT-I の X 線結晶構造解析結果によっても支持されている (後述)。また、以前から示唆されていたように GlcAT-I はグリコサミノグリカン-タンパク質結合領域には GlcA を転移するが、コンドロイチンの二糖繰り返し領域には GlcA を転移しなかったことから、コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の伸長に関与するグルクロン酸転移酵素-II (GlcAT-II) と

は明らかに性質の異なる酵素であることも証明された。一方、組換え型ラット GlcAT-P は Gal β 1-4GlcNAc β 1-*O*-naphthalenemethanol とアシアロオロソムコイドを基質としたときに高い GlcA 転移活性を示したことから、GlcAT-P は主に *N*-アセチルラクトサミン構造を認識していると考えられた。これらの結果から、GlcAT-I と GlcAT-P の *in vitro* での基質特異性は全くオーバーラップしていないと考えられたが、前項で述べた GlcAT-I による HNK-1 糖鎖抗原合成活性はどのように説明できるのでしょうか？ HNK-1 糖鎖抗原生成に関与する未知の基質が存在するのでしょうか？ GlcAT-I がすべての組織で発現しているにも関わらず、生体内での HNK-1 糖鎖抗原の発現が脳、神経系に限られていることや、遺伝子導入していない COS-1 細胞では内在性の GlcAT-I が発現しているにも関わらず HNK-1 糖鎖抗原が発現していないことなどを考えれば、通常の生体内においては、GlcAT-I が HNK-1 糖鎖抗原の合成に関わっている可能性は低いと考えられる。しかし、癌細胞などで GlcAT-I が高発現された状態が存在すれば、その際には HNK-1 糖鎖抗原の合成に関わっているのかもしれない。実際、数種の癌細胞株において GlcAT-I が高発現し、HNK-1 糖鎖抗原も陽性を示す細胞を見出している（未発表）。

2-5. GlcAT-I の遺伝子構造と発現制御機構

したがって、GlcAT-I の発現が硫酸化グリコサミノグリカン鎖の合成量ばかりでなく、癌細胞における HNK-1 糖鎖抗原の発現をも制御している可能性が考えられたので、GlcAT-I の遺伝子構造と発現制御機構を調べた。その結果、ヒト GlcAT-I は 11 番染色体の長腕 12.2 に位置し、全長約 7 kb で 5 つのエキソンから構成されていることが判明した。¹²⁾ また、1 種の偽遺伝子が 3 番染色体に存在することも明らかとなった。¹²⁾ さらに、本遺伝子の 5' 上流領域の構造並びに転写開始部位の決定を行い、数種の癌細胞株を用いて GlcAT-I プロモーター活性を調べた。いずれの癌細胞においても、GlcAT-I プロモーターは SV40 のプロモーターと同程度、若しくはそれ以上の強い転写活性を示した。¹²⁾ また、GlcAT-I のプロモーター領域を様々な長さに欠失させることにより、-303 から -153 bp の間に強いエンハンサーエレメントが存在することを明らかにした。¹²⁾ 現在、

その転写因子を同定し、詳しい解析を行っている。

2-6. GlcAT-I の結晶構造解析 最近、NIH の M. Negishi らのグループによってヒト GlcAT-I が結晶化されたが、これはグリコサミノグリカン合成に関わる糖転移酵素の最初の結晶化の例となるとともに、著者らとの共同研究によって、ドナー基質 UDP-GlcA の反応生成物 UDP 及びアクセプター基質 Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl との三者複合体が X 線結晶構造解析された糖転移酵素の最初の例にもなった。¹⁶⁾ この研究の結果、酵素分子は二量体を形成しているらしいこと、糖転移酵素に共通の DXD モチーフは UDP-GlcA の UDP 部分のリボース、酵素の触媒作用に不可欠のマンガンイオン、及び水分子と相互作用していることが示され、2 つの Gal 残基を認識する複数のアミノ酸残基、GlcA を受け取る Gal 残基の 3 位の水酸基を認識し、触媒塩基として機能するグルタミン酸残基などが原子レベルで同定され、詳細な酵素反応機構も明らかになった。さらに重要な点は、これらの cofactors（ドナーとアクセプター）と相互作用し、触媒作用に関わっていると推定されるアミノ酸残基が色々な他の糖転移酵素でもよく保存されている点である。それらの酵素には、後述するヘパラン硫酸ポリメラーゼや GlcNAcT-I（いずれも癌抑制遺伝子 *EXT* ファミリーメンバーによってコードされている）も含まれ、これらの糖転移酵素の触媒部位がよく似た三次元構造を有していると考えられる。今後、X 線結晶構造解析による構造生物学的アプローチによっても、グリコサミノグリカン鎖の生合成メカニズムの解明に深いメスが入ることが期待される。

3. コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸とヘパリン/ヘパラン硫酸の仕分け合成機構

GlcAT-I により結合領域四糖が完成した後、この四糖構造に GalNAc と GlcA が交互に転移されるとコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸が、GlcNAc と GlcA が交互に転移されるとヘパリン/ヘパラン硫酸が合成される (Fig. 1)。その後はこれら二糖繰り返し領域が様々な硫酸化され、生物活性を持ったドメイン構造が形成される。したがって、結合領域四糖にコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸が付加されるか、ヘパリン/ヘパラン硫酸が付加されるのかは、プロテオグリカン分子の機能を大きく変えることになるため、この付加機構は厳密に制御され

ていると考えられる。しかしながら、コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸とヘパリン/ヘパラン硫酸の仕分け合成の鍵となる最初の GalNAc 又は GlcNAc をそれぞれ β 位, α 位で転移する酵素と、繰り返し領域の GalNAc 又は GlcNAc をそれぞれ β 位, α 位で転移する酵素は別のものであると考えられていたが,^{17,18)} これらの最初のアミノ糖の転移酵素はクローニングされておらず、活性発現の調節メカニズムは不明であった。

3-1. α -GalNAc 転移酵素の発見 そこで著者らは、様々な糖転移酵素が分泌されていることが知られるウシ胎仔血清と、ヘパリンとコンドロイチン硫酸合成能を持つマウス肥満細胞腫ミクロソーム画分を酵素源として用い、化学合成された結合領域四糖セリン (GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser) を基質として、コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸とヘパリン/ヘパラン硫酸の仕分け合成の鍵となる結合領域へ最初の GalNAc 又は GlcNAc をそれぞれ β 位, α 位で転移する酵素活性を調べたが、両酵素活性とも検出されなかった。しかしながら意外にも、GalNAc を α 位で転移する新規の酵素 (α -GalNAc 転移酵素) 活性を検出することができた。^{19,20)} さらに、この反応生成物の構造は、¹H-NMR 解析により GalNAc が α 1-4 結合で GlcA に結合した GalNAc α 1-4GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-O-Ser であることを明らかにした。²¹⁾ 興味深いことに、Fig. 4 に示すように α -GalNAc 転移酵素の反応生成物は、ちょうどヘパリン/ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の生合成において最初のヘキサミンが転移された構造 (GlcNAc α 1-4GlcA-Gal-Gal-Xyl) と

(GalNAc β 1-4GlcA-Gal-Gal-Xyl) の中間的構造をしている。しかしながら、この反応生成物が天然のグリコサミノグリカン中に見出されていないことから、 α -GalNAc 転移酵素がグリコサミノグリカンの生合成においてどのような役割を担うのかについては不明であった。

3-2. α -GalNAc 転移酵素の精製とその遺伝子の同定 そこで著者らは、 α -GalNAc 転移酵素を精製し、さらに詳しくこの酵素の性質について調べてみることにした。本酵素がウシ胎仔血清中に見出されたことから,¹⁹⁾ 生体内である細胞が α -GalNAc 転移酵素を活発に分泌しているのではないかと考え、様々な癌細胞の培養上清中に含まれる α -GalNAc 転移酵素活性を測定したところ、ヒトの繊維性組織球腫細胞株 (MFH-7) の無血清培養培地中に活発に分泌されることを見出した。²¹⁾ この培地中に分泌される α -GalNAc 転移酵素の比活性は、ウシ胎仔血清中のその比活性に比べ約 100 倍程度高かったので、この無血清培養培地を酵素源として phenyl-Sepharose, ヘパリン-Sepharose, UDP-hexanola-mine-agarose を用い、 α -GalNAc 転移酵素をほぼ均一にまで精製した。特に、最後の UDP-hexanola-mine-agarose に α -GalNAc 転移酵素がマンガンイオン依存的に結合することを見出したことにより、精製倍率を飛躍的に上昇させることができた。この精製酵素は SDS-PAGE 上で分子量約 38-kDa の大きさを示し、N-末端から 30 残基のアミノ酸配列を調べると、癌抑制遺伝子の 1 つとして知られる遺伝性多発性外骨腫 (hereditary multiple exostoses) の原因遺伝子 *EXT* と高い相同性を示す遺伝子として単

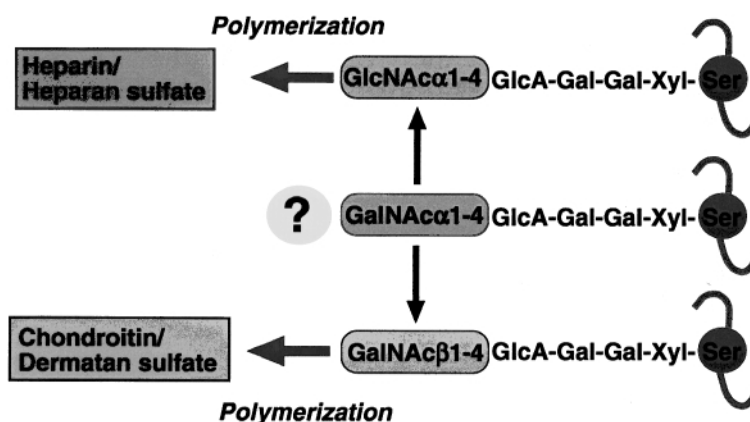


Fig. 4. Is α -GalNAc Transferase Involved in the Glycosaminoglycan Biosynthesis?

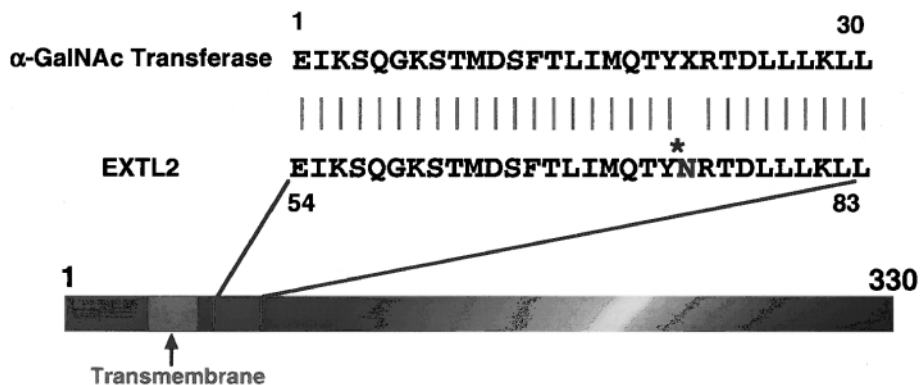


Fig. 5. Comparison of the Amino Terminal Amino Acid Sequence of the Purified α -GalNAc Transferase with the Corresponding *EXTL2* Sequence

X represents an unidentified amino acid residue which is most likely glycosylated and one potential *N*-glycosylation site is marked by an asterisk.

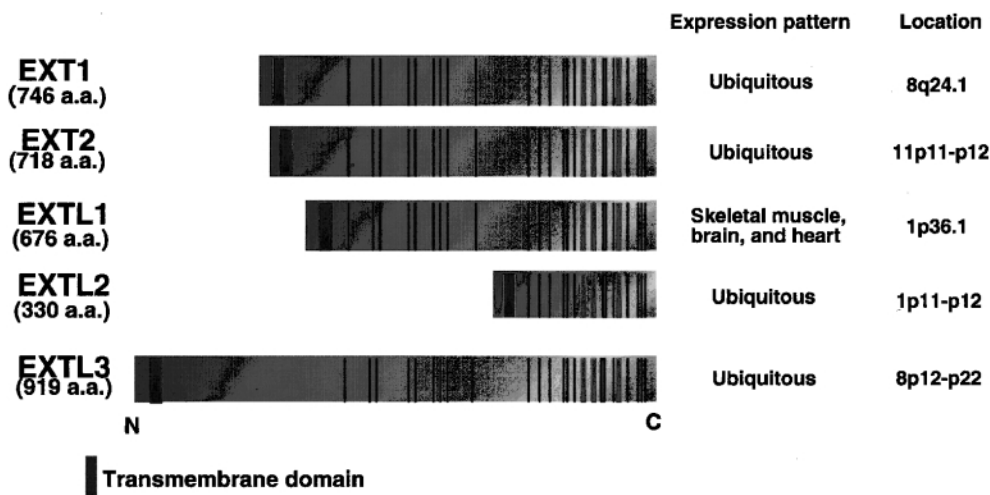


Fig. 6. Comparison of the Five Cloned Members of the *EXT* Gene Family

Highly conserved regions are indicated by bars. The *EXTL2* composed of 330 amino acids is approximately half the size of the other *EXT* family members that have 676–919 amino acids. The variation in size is due to differences in the length of the amino terminal side of the protein. The protein shows significant homology with the carboxy termini of the other members of the family.

離された *EXTL2* (*EXT*-like gene 2) のコードするタンパク質の 54–83 番目のアミノ酸配列と完全に一致した (Fig. 5).²²⁾ *EXTL2* のコードするタンパク質は 330 アミノ酸からなり、他の多くの糖転移酵素に特徴的な type II トポロジーを形成する膜貫通タンパク質である (Fig. 6). したがって、精製した α -GalNAc 転移酵素は、*EXTL2* のコードするタンパク質の膜貫通ドメインを含む N-末端側から 53 個のアミノ酸を欠くことにより、細胞外へ分泌されたものであると考えられた。

3-3. 組換え型 α -GalNAc 転移酵素の発現と基質特異性 次に、*EXTL2* のコードするタンパク質が実際に α -GalNAc 転移酵素であるということと、

本酵素の基質特異性を調べるために、*EXTL2* タンパク質を前述の GlcAT-I と同様に可溶型として細胞で発現させた。発現された組換え型タンパク質を IgG-Sepharose を用いて精製し、内在性の α -GalNAc 転移酵素を除去後、結合領域四糖セリン (GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser)、その類似体である *N*-アセチルコンドロシン (GlcA-GalNAc) や化学合成された結合領域末端二糖 GlcA β 1-3Gal β -O-naphthalenemethanol を基質に用いて α -GalNAc 転移酵素活性を測定したところ、すべて α -GalNAc 転移酵素の基質となった (Table 2).²²⁾ さらに、反応生成物を同定することにより、*EXTL2* のコードするタンパク質は確かに α 1-4GalNAc 転移酵素をコードす

Table 2. Acceptor Specificity of the α 1,4-*N*-Acetylhexosaminyltransferase Secreted into the Culture Medium by Transfected COS-1 Cells

Acceptor	α -GalNAcT activity ^{a)}	GlcNAcT-I activity ^{a)}
	pmol/ml medium/h	pmol/ml medium/h
GlcA β 1-3Gal β 1- <i>O</i> -naphthalenemethanol	109	31
GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1- <i>O</i> -Ser	50	ND ^{b)}
GlcA β 1-3GalNAc	117	— ^{c)}

a) The values represent the averages of two independent experiments. b) ND, not detected (<0.1 pmol/ml medium/h). c) —, not determined.

ることが明らかとなった。また、この結果より α -GalNAc 転移酵素は結合領域末端の二糖 (GlcA β 1-3Gal) を強く認識することが判明した。

4. EXT ファミリーメンバーとヘパラン硫酸の生合成

4-1. 遺伝性多発性外骨腫とヘパラン硫酸生合成
 前述のように *EXTL2* は、遺伝性多発性外骨腫の原因遺伝子 *EXT* ファミリーメンバーの1つである。遺伝性多発性外骨腫は常染色体優性に遺伝し、ヒトの四肢長管骨の骨端に軟骨帽を持つ良性の骨腫瘍が多発する疾患である。²³⁾ 発症頻度は約5万人に1人で骨格の変形や低身長を伴い、約2%の患者の腫瘍は悪性転化する。^{23,24)} 連鎖解析により多発性外骨腫の原因遺伝子は、ヒトの染色体上に *EXT1* (ヒト染色体 8q24.1), *EXT2* (同 11p11-13), *EXT3* (同 19p) の3種存在することが報告され、そのうち *EXT1* と *EXT2* はクローニングされている。²⁵⁻²⁷⁾ その後、この *EXT* 遺伝子ファミリーは、*EXT1* と *EXT2* との配列の相同性により、さらに3種 *EXTL1* (*EXT*-like gene 1), *EXTL2*, *EXTL3* が同定されクローニングされているが、これら3種の遺伝子の多発性外骨腫発症との連鎖は報告されていない。²⁸⁻³¹⁾ クローニングされている5種の *EXT* ファミリーメンバーはすべて type II トポロジーを形成する膜貫通タンパク質であり、そのうち *EXTL2* のコードするタンパク質は330アミノ酸と、他のメンバーがコードするタンパク質 (676—919アミノ酸) の約半分の大きさである。これらの大きさの違いは主に *N*-末端側の違いによるものであり、*C*-末端側の相同性はかなり高い (Fig. 6)。悪性軟骨肉腫の *EXT1* や *EXT2* 遺伝子のヘテロ接合性の喪失が検出

されているので、これらは癌抑制遺伝子と考えられたが、その機能は遺伝子の同定後3年程不明であった。1998年、カナダの Tufaro らは1型単純ヘルペスウイルスが細胞に感染する際に細胞表面のヘパラン硫酸に結合することを利用した発現クローニング法により、*EXT1* が細胞表面のヘパラン硫酸合成に関与する遺伝子であること、³²⁾ また、スウェーデンの Lindahl らはヘパラン硫酸の糖鎖伸長に関与する糖転移酵素を精製することにより、*EXT1* と *EXT2* はヘパラン硫酸の二糖繰り返し領域の生合成に関与するヘパラン硫酸ポリマーゼ (GlcA/GlcNAc 転移酵素: Fig. 1 参照) をコードしていることをそれぞれ見出した。³³⁾ さらに、Lindahl らは著者らとの共同研究により、*EXT1* と *EXT2* は細胞内でヘテロ複合体を形成してゴルジ体に存在し、複合体を形成しない場合と比較して、著しく糖転移活性が上昇することを報告した。³⁴⁾ 以上の結果から、他の *EXT* ファミリーメンバーもヘパラン硫酸の生合成に関与している可能性が示唆されていた。

4-2. *EXTL2* はヘパラン硫酸生合成の開始を司る GlcNAc 転移酵素 -I もコードする
 そこで、著者らは α -GalNAc 転移酵素の反応生成物が天然のグリコサミノグリカン中に見出されていないことと、*EXTL2* が *EXT1* や *EXT2* と構造上相同性を有することから、 α -GalNAc 転移酵素として同定した *EXTL2* がヘパラン硫酸の生合成に関与する可能性を検討した。 α -GalNAc 転移酵素は上記のようにグリコサミノグリカン-タンパク質結合領域の末端二糖 (GlcA β 1-3Gal) に高い親和性を示すことから、¹⁹⁻²¹⁾ *EXTL2* がヘパラン硫酸合成への鍵を握る結合領域に α 1-4 結合で GlcNAc を転移する GlcNAc 転移酵素 -I (GlcNAcT-I) (Fig. 1) である可能性を検討した。GlcNAcT-I の基質として知られる化学合成された GlcA β 1-3Gal β -*O*-naphthalenemethanol と、前述のように GlcNAcT-I の基質とならないと報告されている結合領域四糖セリン (GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser)²⁰⁾ をそれぞれ基質として用いると、組換え型 *EXTL2* タンパク質は GlcA β 1-3Gal β -*O*-naphthalenemethanol を用いた時のみ GlcNAc 転移酵素活性を示した (Table 2)。²³⁾ さらに、この反応生成物を同定することにより、著者らが見出した新規 α -GalNAc 転移酵素は、ヘパラン硫酸合成への鍵を握る結合領域に α 1-4 結合で

GlcNAc を転移する GlcNAcT-I¹⁷⁾ 活性をも示すことが判明し, *EXTL2* は α 1-4-*N*-アセチルヘキサミン転移酵素をコードすることが明らかとなった.²³⁾ GlcNAcT-I が結合領域四糖セリンに GlcNAc を転移することができない原因は, すでに指摘されていたように, GlcNAcT-I がコアタンパク質のヘパラン硫酸付加部位周辺のアミノ酸配列を認識するためと考えられる.¹⁷⁾ また, GlcA β 1-3Gal β -*O*-naphthalenemethanol のような人工合成基質のアグリコン部分は, そのようなアミノ酸配列の疎水的な性質を模倣しているため, GlcNAcT-I の基質となったものと考えられる.

4-3. *EXT* ファミリーメンバーの組織での発現

ヘパラン硫酸はほとんどすべての細胞の表面や細胞外マトリックスに存在する. そこで, *EXTL2* 遺伝子 (α 1-4-*N*-アセチルヘキサミン転移酵素遺伝子) がどのような組織で発現しているのかを RT-PCR 法を用いて調べたところ, その発現量には差が見られるが調べた限りすべてのヒトの組織 (成人組織 18 種, 胎児組織 8 種) で *EXTL2* 遺伝子の発現が見られた (Fig. 7).²³⁾ また, 比較のために, 現在までにクローニングされているヒトの 5 種の *EXT* 遺伝子ファミリーメンバーの発現パターンを Fig. 6 にまとめた. このように, *EXTL1* 遺伝子を除く他の *EXT* ファミリーの遺伝子は, *EXTL2* 遺伝子同様その発現量には差が見られるが, ヒトやマウスの組織において ubiquitous に発現していることが報告されている.

4-4. *EXTL1* と *EXTL3* のヘパラン硫酸生合成への関与 最近著者らは, ヒト *EXTL1* と *EXTL3* もヘパラン硫酸の生合成に関与する GlcNAc 転移酵

素をコードすることを明らかにした (Fig. 1).³⁵⁾ 発現させた組換え体 *EXTL1* は GlcA β 1-(4GlcNAc α 1-4GlcA β 1)*n* に GlcNAc を α 1-4 結合で転移し, ヘパラン硫酸の糖鎖伸長に関与する可能性が示唆された. 一方, *EXTL3* は, 同じ活性の他に, さらに *EXTL2* と同様, グリコサミノグリカン-タンパク質結合領域四糖に相当する人工疑似基質 GlcA β 1-3Gal β -*O*-naphthalenemethanol にも α 1-4GlcNAc 残基を転移する GlcNAcT-I 活性をも有し, ヘパラン硫酸の糖鎖骨格の開始と伸長に関わる可能性が示された. このように, 3 種の *EXTLs* はすべて GlcNAc 転移酵素活性を有するが, それらの基質特異性はすべて異なり, *EXT1* や *EXT2* とも異なる (Table 3). 特に *EXTL1* は, 他の *EXT* ファミリーがすべての組織に発現しているのと対照的に骨格筋や脳などの組織に特異的に発現している上に (Fig. 6), *EXTL1* は GlcNAcT-II 活性しか示さない. したがって, *EXTL1* が生体内でどのようにヘパラン硫酸の生合成に関わっているのかは今のところ不明である. それに対し *EXTL3* は, 他の *EXT* ファミリー同様すべての組織に発現し, *EXTL2* と同様にヘパラン硫酸の仕分け合成に関わる酵素として機能

Table 3. Summary of Glycosyltransferase Activities Detected in *EXT* Family Member

	<i>EXT1</i>	<i>EXT2</i>	<i>EXTL1</i>	<i>EXTL2</i>	<i>EXTL3</i>
GlcNAcT-I	-	-	-	+	+
GlcNAcT-II	+	+	+	-	+
HS-GlcAT-II ^{a)}	+	+	-	-	-
α -GalNAcT	-	-	-	+	-

a) Heparan sulfate GlcAT-II.

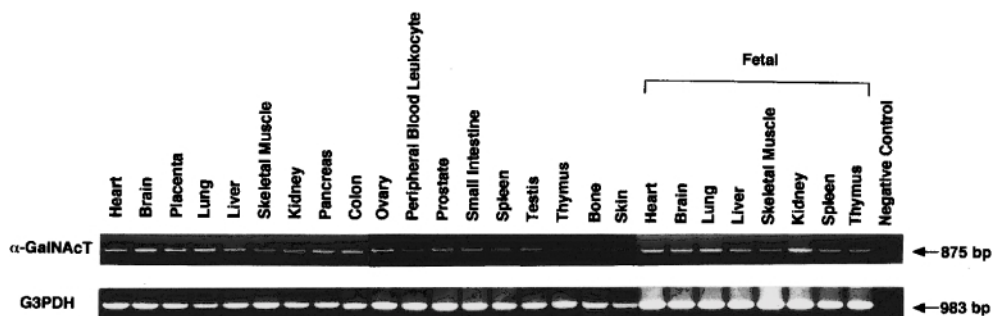


Fig. 7. Differential Expression of the α 1,4-*N*-Acetylhexosaminyltransferase Gene in Various Human Tissues. The arrow indicates the expected position for a PCR product.

しているものと推定される (Fig. 1). 最近著者らは、線虫にコンドロイチンやヘパラン硫酸が存在し、³⁶⁾ *EXTL3* のオーソログが線虫やショウジョウバエにも存在することを見出した。さらに、*EXTL3* のオーソログである *rib-2* (線虫) と *DEXT3* (ショウジョウバエ) がそれぞれ、ヒトの *EXTL3* 同様共にヘパラン硫酸の糖鎖骨格の開始と伸長に関わる GlcNAc 転移酵素をコードすることを明らかにした。^{37,38)} 興味深いことに、線虫やショウジョウバエの *EXT* ファミリーは、*EXTL2* のオーソログが存在しないため、*rib-2* と *DEXT3* がそれぞれヘパラン硫酸の開始を担う唯一の遺伝子と考えられる。実際、*DEXT3* の変異体は、ヘパラン硫酸が必須である Hedgehog 及び Wingless のシグナル伝達が働かず、致死になることが報告されている。

5. α -GalNAc 転移酵素の機能

前述のように、我々の発見した α -GalNAc 転移酵素は *EXTL2* によりコードされ、ヘパラン硫酸の糖鎖骨格の開始に関与する GlcNAcT-I 活性をも保持していることが明らかになった。しかし、 α -GalNAc 転移酵素活性は GlcNAcT-I 活性よりも強かったので (Table 2),²²⁾ α -GalNAc 転移活性も何か生体内で機能している可能性が考えられる。

5-1. パートタイムプロテオグリカンの生合成

筆者らは、この α 1-4GalNAc 転移反応の生成物 (GalNAc α 1-4GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-O-Ser) が、コンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸の重合に関与するグルクロン酸転移酵素の基質にならないこと³⁹⁾から、 α -GalNAc の転移はグリコサミノグリカン鎖合成の停止シグナルとなる仮説をたて、グリコサミノグリカン鎖の合成が停止している例として

パートタイムプロテオグリカン考えた。パートタイムプロテオグリカンとは、グリコサミノグリカン鎖による修飾を受けプロテオグリカンの形態を持つ分子と、修飾を受けずコアタンパク質のみで存在する分子の2種の分子型が存在するタンパク質に対する総称である。筆者らは、パートタイムプロテオグリカンとして知られるトロンボモジュリンを例にとって上記の仮説の検討を行った。トロンボモジュリンは抗血液凝固活性を持ったコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであり、コンドロイチン硫酸による修飾を受けた活性の強い β -トロンボモジュリンと修飾を受けていない活性の弱い α -トロンボモジュリンの2種の分子型が存在する。 α -トロンボモジュリン上に存在する O-結合型糖鎖の構造解析を行ったところ、残念ながら α -GalNAc を非還元末端に持った結合領域五糖は存在しなかったが、糖鎖の伸長が途中で停止したグリコサミノグリカンタンパク質結合領域四糖構造である GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl が見つかった (Fig. 8).⁴⁰⁾ したがって、 α -GalNAc 構造はパートタイムプロテオグリカンの生合成に関与している可能性は低いと考えられた。これまでは、タンパク質がグリコサミノグリカン鎖による修飾を受けるかどうかを決定するのは最初の糖転移反応に関わるキシロース転移酵素であると考えられていた。しかし、著者らの結果はこの通説と異なり、結合領域四糖への N-アセチルヘキソサミンの転移は仕分け合成の鍵となるばかりでなく、グリコサミノグリカン鎖が伸長するかどうかを決定する重要な制御ステップでもあることを示している。

5-2. HNK-1 糖鎖抗原の発現制御 現在のところ、天然のグリコサミノグリカン鎖中には α -

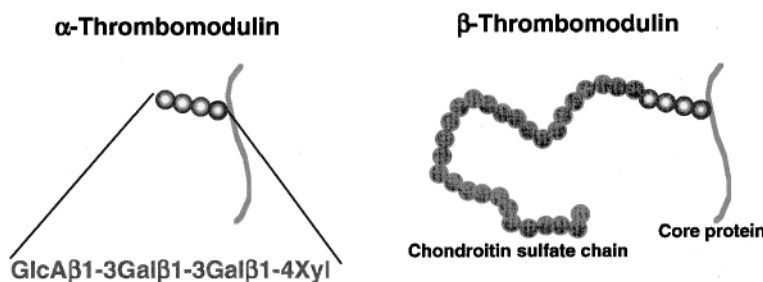


Fig. 8. Two Glycoforms of Thrombomodulin

Thrombomodulin, a cell surface glycoprotein, is a critical mediator of endothelial anticoagulant defenses occurring both as a chondroitin sulfate proteoglycan (β -thrombomodulin) and a protein (α -thrombomodulin) unsubstituted by chondroitin sulfate chain, hence its description as a "part-time" proteoglycan. We demonstrated that α -thrombomodulin bore the truncated linkage tetrasaccharide, GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl, and we suggested that the critical determining step for the proteoglycan biosynthesis may be the transfer of the fifth sugar residue, the first GalNAc.

GalNAc 転移酵素の反応生成物が見出されていない。そこで次に著者らは、 α -GalNAc 転移酵素がグリコサミノグリカン鎖以外の糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の生合成に関与している可能性を考えた。 α -GalNAc 転移酵素は上記のように GlcA β 1-3Gal という二糖に高い親和性を示すことから、¹⁹⁻²²⁾ 天然に存在するこの二糖を末端に持つ糖鎖を検索した。すると、GlcAT-I の項で前述した、ヒト・ナチュラルキラー細胞を含む一部のリンパ球や神経系の細胞表面に特異的に発現され、細胞接着や神経突起伸展に関与することが知られる HNK-1 糖鎖抗原 [GlcA (3-O-sulfate) β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-] の前駆体 (GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-) がこの二糖を末端に持っていた。そこで著者らは、HNK-1 糖鎖抗原の前駆体に α -GalNAc 転移酵素が作用すれば、 α -GalNAc 転移酵素と 3-O-硫酸基転移酵素がこの前駆体を奪い合うことになり、 α -GalNAc 転移酵素が HNK-1 糖鎖抗原の発現を制御する可能性を考えた (Fig. 9)。そこで、HNK-1 糖鎖抗原の前駆体である glucuronylneolactotetraosylceramide (GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) と HNK-1 糖鎖抗原である sulfoglucuronylneolactotetraosylceramide [GlcA (3-O-sulfate) β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer] が α -GalNAc 転移酵素の基質になるかどうか調べたところ、HNK-1 糖鎖抗原前駆体のみ基質となった。²¹⁾ この結果は、 α -GalNAc 転移酵素の発現が HNK-1 糖鎖抗原の発現を制御しうることを示唆したが、実際に生体内で起こっていることを証明するには、天然からこの反応生成物である GalNAc α 1-4GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer を単離しなくてはならない。現在、著

者らは α -GalNAc 転移酵素を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成したので、このマウスを解析することにより α -GalNAc 転移酵素の機能が明らかになるものと期待している。

6. コンドロイチン硫酸の生合成

6-1. コンドロイチン硫酸生合成の開始を司る GalNAc 転移酵素-I

一方、コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の生合成は、前述のようにグリコサミノグリカン-タンパク質結合領域の四糖構造の非還元末端の GlcA 残基に、GalNAc 転移酵素-I (GalNAcT-I) の作用によって、まず GalNAc が β 1-4 結合で転移され始まる。しかしながら最近まで、コンドロイチン硫酸の開始と仕分けに関わる GalNAcT-I に関しては、ほとんど情報がなかった。K. Rohmann らは先駆的な研究によって、¹⁸⁾ 熱安定性の異なる 2 種類の β GalNAc 転移酵素が存在することを報告した。それ以来、コンドロイチンの二糖繰り返し領域の合成に関わる GalNAc 転移酵素-II (GalNAcT-II) 以外に、GalNAcT-I が存在すると信じられてきた。しかし、熱に安定とされてきた GalNAcT-I が、実は上記の α -GalNAc 転移酵素と同一であるらしいことが著者らの研究により判明した。¹⁹⁾ その後、著者らは、前述のパートタイムプロテオグリカンの一種である α -トロンボモジュリン (Fig. 8) をアクセプター基質として、 β GalNAc 残基を α -トロンボモジュリン上の結合領域四糖に転移する真の GalNAcT-I 活性を、ヒトメラノーマ細胞の培養上清中に初めて確認した。⁴¹⁾ メラノーマ細胞の酵素は、 α -トロンボモジュリンの四糖の非還元末端の GlcA 残基に、 β 1-4GalNAc 残基を転移することができた。⁴¹⁾ このことは、GalNAcT-I がコアタンパク質のアミノ酸配列を認識していることを強く示唆しており、ヘパラン硫酸系多糖鎖の付加決定の場合同様、コンドロイチン硫酸系多糖鎖の付加決定のメカニズムにも、コアタンパク質上のアミノ酸配列情報が重要な役割を果たしていると思われる。

6-2. コンドロイチン硫酸の二糖繰り返し領域の生合成

一旦、結合領域四糖に β 1-4GalNAc 残基が転移されると、コンドロイチン硫酸あるいはデルマタン硫酸の二糖繰り返し単位である -3GalNAc β 1-4GlcA β 1- という構造が、コンドロイチン糖鎖伸長のための GlcAT-II と GalNAcT-II の 2 種類の酵素の協調作用によって繰り返し付加されるも

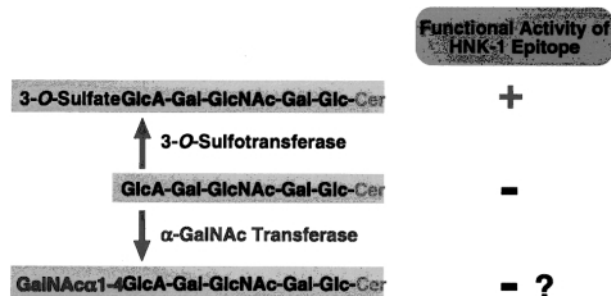


Fig. 9. Possible Function of α -GalNAc Transferase
 α -GalNAc transferase may play an important role in the regulation of the expression of the HNK-1 carbohydrate epitope.

のと考えられてきた。1997年、G. Sugumaranらは、ニワトリの複数の組織から80-kDaのGlcAT-IIを部分精製した。⁴²⁾ 著者らは、ウシ血清中にGlcAT-II活性とGalNAcT-II活性を同定し、⁴³⁾ 両酵素活性がマウスやニワトリの発生過程で劇的に変動すること⁴⁴⁾やアクセプターの硫酸化のパターンの違いにより制御されること^{39,45)}を見出した。さらに、著者らは、GlcAT-II活性とGalNAcT-II活性がゲルろ過クロマトグラフィーにおいて160-kDaの位置に共に溶出され、両活性は様々なクロマトグラフィーでも相互分離できないことを報告した。⁴⁶⁾ すなわち、両活性は単一のタンパク質上に存在するか、あるいは両酵素が複合体を形成している可能性が考えられた。しかし、両活性を数万倍にまで精製したが、均一な酵素を得るまでには至らなかった。

6-3. コンドロイチン合成酵素 (ChSy) の cDNA クローニング そこで、著者らはGlcAT-II活性とGalNAcT-II活性を合わせ持つコンドロイチン合成酵素 (GlcA/GalNAc 転移酵素: Fig. 1 参照) が存在すると予想し、我々が精製を行って得た様々な情報を基に、現在飛躍的に充実してきたデータベースからそのcDNAをクローニングすることにした。上記の結果から、コンドロイチン合成酵素は少なくとも80-kDa以上の大きさと考えられたので、ヒトの50-kDa以上のタンパク質をコードする遺伝子のcDNAが登録されているHuman Unidentified Gene-Encoded Large Protein (HUGE) データベースを検索した。その際、以下の2つの情報を用いた。1) コンドロイチン合成酵素は、ゴルジに局在する他の糖転移酵素に一般的に見られるtype II トポロジーを持つ膜貫通タンパク質と考えられた。2) GalNAcT-IIは β 1-4でGalNAcを転移させる酵素であるが、pfamに登録されている β 1-4Gal転移酵素ファミリーは β 1-4でGalを転移させる酵素で

あるので、この反応類似性よりGalNAcT-IIも β 1-4Gal転移酵素ファミリーに属する可能性が考えられた。そこで、“1つの膜貫通ドメイン”と“ β 1-4Gal転移酵素”をキーワードに用いて、HUGEデータベースを検索したところ、1つの候補遺伝子を見つけた。候補遺伝子タンパク質は802個のアミノ酸から構成され、N末端側から膜貫通ドメイン、 β 1-3Gal転移酵素ファミリー及び β 1-4Gal転移酵素ファミリーに特徴的なドメインを持っていた (Fig. 10)。⁴⁷⁾ そこで、候補遺伝子タンパク質を前述と同様に可溶型として細胞で発現させた。発現した組換え型タンパク質をIgG-Sepharoseを用いて精製し、内在性のコンドロイチン合成酵素を除去後、コンドロイチンを用いてGalNAcT-II活性やGlcAT-II活性を測定したところ、両活性とも検出することができ、候補遺伝子はコンドロイチン合成酵素 (ChSy) をコードすることが明らかとなった (Fig. 1)。⁴⁷⁾ しかしながら、結合領域四糖構造を持つ α -トロンボモジュリン (Fig. 8) はChSyの基質にはならなかったことから、クローニングしたChSyはGalNAcT-I活性を持っていないことが明らかとなった。

6-4. コンドロイチン GalNAc 転移酵素 (ChGn) の cDNA クローニング したがって、ChSy以外にGalNAcT-Iをコードしている遺伝子が存在すると思われる。著者らは、GalNAcT-IはChSy同様GalNAc転移酵素活性を持ち、転移される糖の結合様式 (β 1-4) と用いる糖供与体 (UDP-GalNAc) が同じであるので、相同性があると考えた。そこで、ChSyのアミノ酸配列を用いてBLASTサーチを行った結果、ChSyに27%の相同性を持つ候補遺伝子を見つけた。候補遺伝子産物は532個のアミノ酸から構成され、N末端側から膜貫通ドメイン、ChSyに相同性を示すドメイン (β 1-4Gal転移酵素ファミリードメイン) を持っていた (Fig.

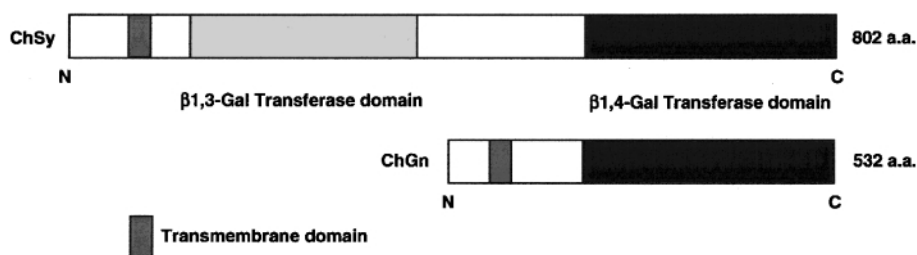


Fig. 10. Comparison of the Two Cloned Members of Chondroitin Synthase Gene Family

10).⁴⁸⁾ そこで、候補遺伝子産物の膜貫通ドメイン以降の配列を前述の分泌型発現ベクターに組み込み、可溶性タンパクとして COS 細胞で発現させた。発現した組換え型タンパク質を IgG-Sepharose を用いて精製し、内在性の糖転移酵素を除去後、 α -トロンボモジュリン (Fig. 8) 及びコンドロイチンを糖転移活性測定用受容体として用いた時、いずれも GalNAc 転移活性が検出された。⁴⁸⁾ したがって、候補遺伝子産物は GalNAcT-I 及び GalNAcT-II 活性を合わせ持つ事が明らかになったので、候補遺伝子産物をコンドロイチン GalNAc 転移酵素 (*ChGn*) と名付けた (Fig. 1).⁴⁸⁾

6-5. *ChSy* と *ChGn* の組織での発現 コンドロイチン硫酸は、ヘパラン硫酸同様ほとんどすべての細胞の表面や細胞外マトリックスに存在する。そこで、*ChSy* 遺伝子や *ChGn* 遺伝子がどのような組織で発現しているのかを Northern blotting 等を用いて調べたところ、両遺伝子ともその発現量には差が見られるが調べた限りすべてのヒトの組織で *ChSy* 遺伝子及び *ChGn* 遺伝子の発現が見られた (Fig. 11).⁴⁸⁾ 興味深いことに、*ChSy* 及び *ChGn* が非常によく似た発現パターンを示す事がわかった。この事から *ChSy* 及び *ChGn* が共同でコンドロイチン硫酸の生合成に関与している可能性が示唆され

た。現在、この両遺伝子の発現制御機構を解析している。

6-6. コンドロイチン硫酸の硫酸化の制御機構 コンドロイチンの二糖繰り返し領域の伸長反応が開始されるとすぐに硫酸化をはじめとする修飾反応も起こると考えられている。コンドロイチン硫酸もヘパラン硫酸同様、硫酸基の結合位置とその組み合わせにより多様構造を形成し、特定の多様構造が生物学的機能の発現に重要であると考えられている。著者らは、コンドロイチン硫酸の GalNAc 残基の 4 位と 6 位の硫酸化の割合が、ニワトリの脳の発生において劇的に変化し、この変化は GalNAc 残基の 4 位や 6 位の硫酸化を担うコンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素とコンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素の活性変動と相関することを証明した。⁴⁹⁾ この結果は、特定の硫酸基転移酵素の発現様式を人為的に変化させることによりコンドロイチン硫酸の硫酸化構造を変化させ、機能改変をすることが可能であることを強く示唆した。そこで著者らは、コンドロイチン硫酸の機能を探る目的で、GalNAc 残基の 6 位の硫酸化を担う 3 種のコンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素の cDNA を、他の 6-O-硫酸基転移酵素との相同性を利用して EST (expressed sequence tags) データベースよりクローニングした。^{50,51)} この 3 種の遺伝子がコードするタンパク質は、すべて type II トポロジーを示す膜貫通タンパク質であったので、前述と同様に可溶型として COS 細胞で発現させた。発現した組換え型タンパク質をそれぞれ IgG-Sepharose を用いて精製し、内在性の硫酸基転移酵素を除去後、コンドロイチンを用いて硫酸基転移酵素活性を測定したところ、3 種とも 6-O-硫酸基転移酵素活性を検出した。現在、このうち 1 種の硫酸基転移酵素 (コンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素-I) を高発現させることにより硫酸化構造を変化させたトランスジェニックマウスを作製し、コンドロイチン硫酸の特定の硫酸化構造の生物学的意義の解明を試みている。

7. おわりに

以上著者らは、硫酸化グリコサミノグリカン鎖の生合成に関与する 10 種類以上の糖転移酵素や硫酸基転移酵素の同定や cDNA クローニングを行い、その性質を調べることにより、硫酸化グリコサミノグリカン鎖の生合成機構を解明してきた。他の研究

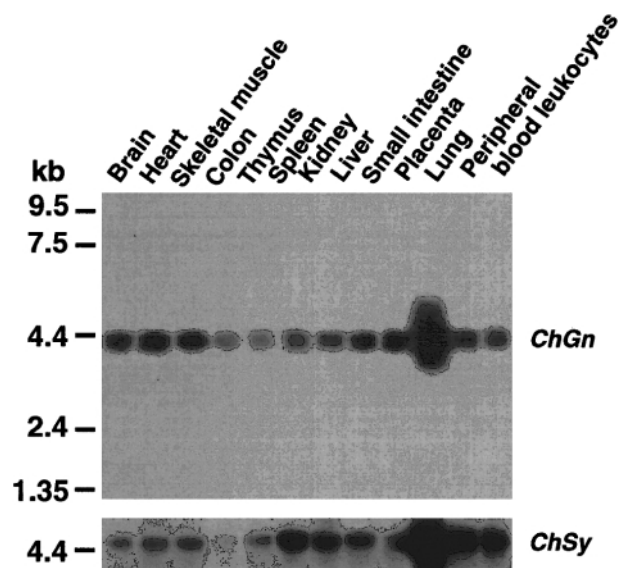


Fig. 11. Northern Blot Analysis of Chondroitin GalNAcT (*ChGn*) and Chondroitin Synthase (*ChSy*) in Human Tissues

Northern blots with RNA from various human tissues were hybridized with a probe for *ChGn* (upper panel) or for *ChSy* (lower panel).

者による成果を合わせると、グリコサミノグリカン鎖の生合成に關与するほぼすべての糖転移酵素や硫酸基転移酵素の cDNA クローニングが終了した。現在は、クローニングされた酵素の X 線結晶構造解析、発現制御機構解析、相互作用解析、そしてこれら酵素遺伝子を過剰発現させたり欠損させた動物を用いた機能解析が進んでいる。また、我々は癌抑制遺伝子 *EXT* ファミリーメンバーのすべてがヘパラン硫酸の生合成に關与する糖転移酵素をコードすることを明らかにした。本文中でも述べたが、*EXT* ファミリーメンバーは線虫やショウジョウバエにも存在し、ショウジョウバエの *EXT1* 遺伝子の相同遺伝子 *tout-velu* (*ttv*) の変異体を調べることにより、ヘパラン硫酸は Hedgehog を長距離拡散させ、組織のパターン形成を制御していることが判明している。¹⁾興味深いことに、この *ttv* の変異体では同様にヘパラン硫酸を必要とする FGF や Wingless のシグナル伝達には全く影響がないことが報告されている。²⁾ それに対し、同じショウジョウバエの *EXTL3* 遺伝子の相同遺伝子 *DEXT3* (brother of *ttv*; *botv*) の変異体は、Hedgehog ばかりでなく FGF や Wingless のシグナル伝達にも異常が生じることが最近報告された。このことは同じヘパラン硫酸でもその量や質(硫酸化のパターンなど)の違いによって、シグナル伝達における役割が制御されていることを示唆するものである。また、ヒトの *EXT1* や *EXT2* の欠損によるヘパラン硫酸の合成異常を伴う発癌メカニズムについては不明であるが、*ttv* の変異体の結果とインディアン Hedgehog の骨形成における役割を考えると、*EXT* ファミリーメンバーは細胞表面のヘパラン硫酸の量や質を変化させることにより、Hedgehog の拡散を制御して正常な骨形成を維持しているのかもしれない。今後、それぞれの *EXT* ファミリーメンバーのヘパラン硫酸鎖生合成における役割や発現制御機構がさらに解明され、糖転移酵素の機能不全による多発性外骨腫発症のメカニズムの解明が進むものと思われる。

謝辞 本研究は、神戸薬科大学生化学研究室において行われたものであり、御指導いただきました菅原一幸教授に心より感謝申し上げます。また、本研究の推進に多大なご協力を賜った、土田和徳博士、灘中里美博士、Kim Byung-Taek 博士、田中友

香子修士、氏川郁穂修士、加納優子修士、堤佳重修士、刀禰裕子修士、島川大見修士、田岡将輝修士、宇山徹修士、江草徳幸修士をはじめとする学生諸氏や共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。なお、本研究は、文部科学省、かなえ医薬振興財団、薬学研究奨励財団、上原記念生命科学財団、ひょうご科学技術協会のご援助により行われたものであり、ここにお礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Bellaiche Y., The I., Perrimon N., *Nature*, **394**, 85-88 (1998).
- 2) Binari R. C., Staveley B. E., Johnson W. A., Godavarti R., Sasisekharan R., Manoukian A. S., *Development*, **124**, 2623-2632 (1997).
- 3) Lin X., Perrimon N., *Nature*, **400**, 281-284 (1999).
- 4) Perrimon N., Bernfield M., *Nature*, **404**, 725-728 (2000).
- 5) Lin X., Wei G., Shi Z., Dryer L., Esko J. D., Wells D. E., Matzuk M. M., *Dev. Biol.*, **224**, 299-311 (2000).
- 6) Bullock S. L., Fletcher J. M., Beddington R. S., Wilson V. A., *Genes Dev.*, **12**, 1894-1906 (1998).
- 7) Sugahara K., Kitagawa H., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 518-527 (2000).
- 8) Helting T., Rodén L., *J. Biol. Chem.*, **244**, 2799-2805 (1969).
- 9) Terayama K., Oka S., Seiki T., Miki Y., Nakamura A., Kozutsumi Y., Takio K., Kawasaki T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 6093-6098 (1997).
- 10) Kitagawa H., Paulson J. C., *J. Biol. Chem.*, **269**, 1394-1401 (1994).
- 11) Kitagawa H., Tone Y., Tamura J., Neumann K. W., Ogawa T., Oka S., Kawasaki T., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 6615-6618 (1998).
- 12) Kitagawa H., Taoka M., Tone Y., Sugahara K., *Biochem. J.*, **358**, 539-546 (2001).
- 13) Bai X., Wei G., Sinha A., Esko J. D., *J. Biol. Chem.*, **274**, 13017-13024 (1999).
- 14) Tone Y., Kitagawa H., Imiya K., Oka S., Kawasaki T., Sugahara K., *FEBS Lett.*, **459**, 415-420 (1999).
- 15) Wei G., Bai X., Sarkar K., Esko J. D., *J. Biol.*

- Chem.*, **274**, 7857–7864 (1999).
- 16) Pedersen L. C., Tsuchida K., Kitagawa H., Sugahara K., Darden T. A., Negishi M., *J. Biol. Chem.*, **275**, 34580–34585 (2000).
 - 17) Fritz T. A., Gabb M. M., Wei G., Esko J. D., *J. Biol. Chem.*, **269**, 28809–28814 (1994).
 - 18) Rohrmann K., Niemann R., Buddecke E., *Eur. J. Biochem.*, **148**, 463–469 (1985).
 - 19) Kitagawa H., Tanaka Y., Tsuchida K., Goto F., Ogawa T., Lidholt K., Lindahl U., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **270**, 22190–22195 (1995).
 - 20) Lidholt K., Fjelstad M., Lindahl U., Goto F., Ogawa T., Kitagawa H., Sugahara K., *Glycoconjugate J.*, **14**, 737–742 (1997).
 - 21) Kitagawa H., Kano Y., Shimakawa H., Goto F., Ogawa T., Okabe H., Sugahara K., *Glycobiology*, **9**, 697–703 (1999).
 - 22) Kitagawa H., Shimakawa H., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **274**, 13933–13937 (1999).
 - 23) Solomon L., *Am. J. Hum. Genet.*, **16**, 351–363 (1964).
 - 24) Schmale G. A., Conrad E. U., Raskind W. H., *J. Bone Jt. Surg.*, **76**, 986–992 (1994).
 - 25) Cook A., Raskind W., Blanton S. H., Pauli R. M., Gregg R. G., Francomano C. A., Puffenberger E., Conrad E. U., Schmale G., Schellenberg G., Wijsman E., Hecht J. T., Wells D., Wagner M. J., *Am. J. Hum. Genet.*, **53**, 71–79 (1993).
 - 26) Wu Y., Heutink P., de Vries B., Sandkuijl L. A., van den Ouweland A. M. W., Niermeijer M. F., Galjaard H., Reyniers E., Willems P. J., Halley D. J. J., *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 167–171 (1994).
 - 27) Le Merrer M., Legeai-Mallet L., Jeannin P. M., Horsthemke B., Schinzel A., Plachu H., Toutain A., Achard F., Munnuch A., Maroteaux P., *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 717–722 (1994).
 - 28) Wuyts W., Van Hul W., Hendrickx J., Speleman F., Wauters J., De Boulle K., Van Roy N., Van Agtmael T., Bossuyt P., Willems P. J., *Eur. J. Hum. Genet.*, **5**, 382–389 (1997).
 - 29) Saito T., Seki N., Yamauchi M., Tsuji S., Hayashi A., Kozuma S., Hori T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**, 61–66 (1998).
 - 30) Wise C. A., Clines G. A., Massa H., Trask B. J., Lovett M., *Genome Res.*, **7**, 10–16 (1997).
 - 31) Van Hul W., Wuyts W., Hendrickx J., Speleman F., Wauters J., De Boulle K., Van Roy N., Bossuyt P., Willems P. J., *Genomics*, **47**, 230–237 (1998).
 - 32) McCormick C., Leduc Y., Martindale D., Mattison K., Esford L. E., Dyer A. P. Tufaro F., *Nat. Genet.*, **19**, 158–161 (1998).
 - 33) Lind T., Tufaro F., McCormick C., Lindahl U., Lidholt K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 26265–26268 (1998).
 - 34) Senay C., Lind T., Muguruma K., Tone Y., Kitagawa H., Sugahara K., Lidholt K., Lindahl U., Kusche-Gullberg M., *EMBO Reports*, **1**, 282–286 (2000).
 - 35) Kim B.-T., Kitagawa H., Tamura J., Saito T., Kusche-Gullberg M., Lindahl U., Sugahara K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 7176–7181 (2001).
 - 36) Yamada S., Die I. V., Van den Eijnden D. H., Yokota A., Kitagawa H., Sugahara K., *FEBS Lett.*, **459**, 327–331 (1999).
 - 37) Kitagawa H., Egusa N., Tamura J., Kusche-Gullberg M., Lindahl U., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **276**, 4834–4838 (2001).
 - 38) Kim B.-T., Kitagawa H., Tamura J., Kusche-Gullberg M., Lindahl U., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 13659–13665 (2002).
 - 39) Kitagawa H., Ujikawa M., Tsutsumi K., Goto F., Tamura J., Neumann K. W., Ogawa T., Sugahara K., *Glycobiology*, **7**, 905–911 (1997).
 - 40) Nadanaka S., Kitagawa H., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 33728–33734 (1998).
 - 41) Nadanaka S., Kitagawa H., Goto F., Tamura J., Neumann K.W., Ogawa T., Sugahara K., *Biochem. J.*, **340**, 353–357 (1999).
 - 42) Sugumaran G., Katsman M., Sunthakar P., Drake R.R., *J. Biol. Chem.*, **272**, 14399–14403 (1997).
 - 43) Kitagawa H., Tsuchida K., Ujikawa M., Sugahara K., *J. Biochem.*, **117**, 1083–1087 (1995).
 - 44) Kitagawa H., Ujikawa M., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **271**, 6583–6585 (1996).
 - 45) Kitagawa H., Tsutsumi K., Ujikawa M., Goto F., Tamura J., Neumann K.W., Ogawa T., Sugahara K., *Glycobiology*, **7**, 531–537 (1997).
 - 46) Tsuchida K., Lind T., Kitagawa H., Lindahl U., Sugahara K., Lidholt K., *Eur. J.*

- Biochem.*, **264**, 461–467 (1999).
- 47) Kitagawa H., Uyama T., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **276**, 38721–38726 (2001).
- 48) Uyama T., Kitagawa H., Tamura J., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 8841–8846 (2002).
- 49) Kitagawa H., Tsutsumi K., Tone Y., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **272**, 31377–31381 (1997).
- 50) Tsutsumi K., Shimakawa H., Kitagawa H., Sugahara K., *FEBS Lett.*, **441**, 235–241 (1998).
- 51) Kitagawa H., Fujita M., Ito N., Sugahara K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 21075–21080 (2000).
- 52) The I., Bellaiche Y., Perrimon N., *Mol. Cell*, **4**, 633–639 (1999).