

機関番号：33920

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570113

研究課題名(和文) ヘパラン硫酸プロテオグリカンの硫酸化パターンによる多様なリガンド活性の調節機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms for the activity of heparin-binding ligands through heparan sulfate proteoglycan with the specific sulfation patterns

研究代表者

羽瀨 弘子 (HABUCHI HIROKO)

愛知医科大学・客員研究員

研究者番号：90329821

研究成果の概要(和文)：

ヘパラン硫酸 6-O-硫酸転移酵素(HS6ST)と HS2ST リコンビナント酵素から硫酸化パターンの異なるヘパラン硫酸 8 糖を作製し、FGF-2 と FGF-4 活性は異なった硫酸化パターンの 8 糖で阻害されることを明らかにした。HS2ST ノックアウトマウス、HS6ST-1、-2 ダブルノックアウトマウスからのマスト細胞はそれぞれヘパリンの 2 硫酸化、6-O-硫酸化を欠損し、マスト細胞特異的な 3 種類のプロテアーゼの沈着阻害も各マスト細胞で異なっていた。HS6ST1 が IHH の原因遺伝子の 1 つであることを Bulow らとの協同研究で明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

HS octasaccharide library was produced by recombinant HS6ST and HS2ST. FGF-2-dependent signaling was inhibited by 2-O-sulfated HS octasaccharide, whereas the inhibition of FGF-4-dependent signaling required 2-O- and 6-O-sulfated HS octasaccharide. Mast cells derived from HS2ST and HS6ST-1 -2 double knockout mice fetal skin produced 2-O-sulfate- and 6-O-sulfate-deficient heparin, respectively. The deposit of three mast cell-specific proteases were distinctly inhibited in the each mutated mast cells. the collaborated studies with Bulow elucidated that the mutated *HS6ST1* gene was involved in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH).

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：糖鎖生物、ヘパラン硫酸、硫酸転移酵素、細胞増殖因子、遺伝子改変マウス、プロテオグリカン、マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)ヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖部分であるヘパラン硫酸鎖は様々位置に硫酸基をもつ多様な構造をもつ多糖である。糖鎖部分は細胞増殖因子、細胞外マトリックス成分、リポプロテインリパーゼ、プロテアー

ゼなど非常に広範な分子の活性を制御して、発生、生理的、病理学的に重要な機能をもつ。
(2)私たちはヘパラン硫酸鎖の硫酸化酵素群を単離、クローニングしその性質を明らかにした。それらのリコンビナント酵素を用いて均一な構造のヘパラン硫酸オリゴ糖を合

成し、様々な細胞増殖因子との結合特異性を明らかにした。さらにこれら酵素を欠損したマウスを作製し、その機能の解析に取り組んだ。ヘパラン硫酸 6-硫酸転移酵素-1 (HS6ST-1) 欠損マウスは後期胚で致死になり、胎盤迷路層の血管形成不良と肺胞形成異常を示した。

2. 研究の目的

(1) ヘパラン硫酸の硫酸化パターンによる種々のヘパリン/ヘパラン硫酸結合性細胞増殖因子のシグナル制御を解析する。

(2) 皮膚創傷治癒の過程に関わるヘパリン/ヘパラン硫酸結合性分子の硫酸化パターンによる活性制御機構-創傷治癒の初期反応に関わるマスト細胞内のヘパリン結合分子と硫酸化パターンとの相互作用を含めて解析する。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞の増殖を阻害するヘパラン硫酸オリゴ糖をリコンビナント HS 硫酸転移酵素を用いて作製し、FGF 依存性のシグナル阻害で調べる。また HS6ST-1, -2 に特異的な siRNA を用いて、組織形成へのこれら遺伝子の役割を調べる。

(2) 皮膚創傷治癒の初期過程にかかわる結合識型マスト細胞を野生型マウス (WT) と HS6ST-1, HS6ST-2, HS2ST ノックアウトマウス (KO) から培養し、マスト細胞特異的プロテアーゼに対する影響を調べる。

4. 研究成果

(1) ヘパラン硫酸 6-硫酸転移酵素 (HS6ST)-1, -2 のダブルノックアウトマウス胚由来の線維芽細胞 (dKO-MEF) を用いて、3種類の FGF (-1, -2, -4) 活性に及ぼすヘパラン硫酸の硫酸化パターンの影響を調べた。FGF-1, -4 は 6-硫酸基の影響を強く受け、dKO-MEF ではシグナル伝達及び細胞増殖が強く阻害された。その阻害機序は FGF-1, -4 は 6-硫酸基を欠損する HS との結合性が目立って減少すること、シグナル伝達複合体である FGF レセプター/FGF/HS の形成も著しく減少することに明らかにした (J. Biol. Chem. (2008) 283, 10366-10376)。

(2) 線維芽細胞の増殖因子であり、血管形成も促進する線維芽細胞増殖因子 (FGF)-2 はヘパラン硫酸 (HS) の 2-O-硫酸基に強い結合性を示すことが私たちを含めてこれまでの研究から明らかにされた。異なる硫酸化パターンを持つ HS 8 糖が FGF 活性に対する影響を明らかにした。FGF-2 依存的なシグナル伝達は 2-O-硫酸基を持つが 6-O-硫酸基を欠損するような HS-8 糖によって強く阻害されるが、FGF-4 依存的なシグナル伝達は阻害され

なかった。FGF-4 活性の阻害には 2-O-と 6-O-硫酸基の両方をもつ HS-8 糖が必要であった。これらの結果は異なる硫酸化パターンをもつ HS-8 糖が特定の FGF 活性を制御できる可能性を示唆した (Glycobiology (2009) 19, 644-654)。

(3) 肢芽形成には FGF-8, -10 をはじめ多くのヘパリン結合性細胞増殖因子、形態形成因子が作用する。ニワトリ胚肢芽領域に HS6-O-硫酸転移酵素 (HS6ST) -1, -2 に特異的な RNAi を接種すると遺伝子発現が抑えられ酵素の基質特異性を反映した HS の 6-O-硫酸基の減少を引き起こした。HS6ST-2 RNAi 処理は HS6ST-1 RNAi 処理より高頻度で肢芽の成長を阻害した。これら結果は HS の 6-O-硫酸化レベルと正確な O-硫酸化パターンがニワトリ肢芽の形成に重要な役割を持つことを支持する (Dev. Growth Differ. (2010) 52, 146-156)。

(4) Esko 博士ら (U. S. A.) との協同研究から以下のことが明らかになった。ヘパラン硫酸 2-O-硫酸転移酵素 (HS2ST) ノックアウトマウスはトリグリセライドが血漿に蓄積し、キロミクロンや投与した VLDL の排除が遅れた。培養肝細胞への VLDL の取り込みは N-硫酸基や 2-O-硫酸基を欠損するヘパリンによって阻害されないが 6-O-硫酸基を欠くヘパリンによってヘパリンと同程度に阻害された。これらの結果はヘパラン硫酸の 2-O-硫酸基がこれら分子の肝細胞への取り込みに必要であることを示した (J. Biol. Chem. (2010) 285, 286-294)。

(5) 創傷治癒の初期反応にはマスト細胞が関与することが知られている。肺胞の形成には様々なプロテアーゼが関与していることが知られている。肺のマスト細胞は高濃度のプロテアーゼ (MCPs) やコラゲナーゼなどを合成し、それらのいくつかはヘパリンと結合して顆粒内に保持され、外部からの刺激に応じて遊離される。そこでマスト細胞のプロテアーゼ群と特異的なヘパリン構造との相互作用を調べた。異なった特異性を持つヘパラン硫酸硫酸転移酵素 (HSST) を欠損した HS6ST1-KO, HS6ST2-KO, HS2ST-KO マウスと HS6ST-1, -2 ダブルノックアウトマウス胎仔皮膚からマスト細胞を培養し、結合識型マスト細胞 (CTMC) を得た。HS2ST-KO からの CTMC は完全に 2-硫酸化を欠損したヘパリンを合成した。マスト細胞特異的な 3 種類のプロテアーゼ (トリプターゼ、カイマーゼ、カルボキシペプチダーゼ A) 活性は野生型 (WT) マウスの CTMC に比較していずれも減少した。特にトリプターゼは 1/20 以下へ激減しトリプターゼタンパク量も激減していたが、その

mRNA の発現レベルはほとんど変わらなかった。カイマーゼも同様な傾向を示した。これらの結果はヘパリンの2-硫酸化も HS2ST1 によって合成されること、これらマスト細胞プロテアーゼの顆粒内保持には要求程度には違いがあるがヘパリンの2-硫酸残基が関わった(第82回日本生化学会大会(2009))。HS6ST1-KO, HS6ST2-KO, HS6ST-1, -2 ダブルノックアウトからの CTMC について同様に解析した。その結果、ヘパリンの6-硫酸化は HS6ST-1 と HS6ST-2 によって合成されることが明らかになった。HS6ST-1, -2 ダブルノックアウトからの CTMC のトリプターゼ、カルボキシペプチダーゼ A は激減し、カイマーゼは半減したが、それぞれの mRNA の発現は WT マウスと比較してほとんど変化しなかった。従って、トリプターゼ、カルボキシペプチダーゼ A の顆粒内保持にはヘパリンの6-硫酸化が要求される。これら4種類のノックアウトマウス由来の CTMC の結果をまとめるとマスト細胞特異的なプロテアーゼ群とヘパリンとの相互作用はそれぞれ異なることを示唆し、トリプターゼの保持にはヘパリンの2硫酸残基と6-硫酸残基の両方が必要であることを示した。

(6) Bulow 博士(U. S. A.)らとの協同研究から突発性ゴナドトロピン欠乏性機能低下症(IHH)の家族が HS6ST1 遺伝子に変異を持つことが明らかになった。IHH 患者は家族によって異なった5カ所のアミノ酸の変異をもつ。これら HS6ST1 遺伝子の変異は in vitro, in vivo ともに活性低下になった。即ち、リコンビナント変異酵素は野生型の36~76%の活性を示した。さらに Hs6st 変異にもつ線虫を用いた in vivo の実験で、kal-1 依存的な軸索分枝は HS6ST-1 遺伝子導入で観察されたが HS6ST1 変異遺伝子導入では分枝は減少した。これらから HS6ST1 は IHH の原因遺伝子の1つであることが示された(Proc. Natl. Acad. Sci. (2011) accepted)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Heparan Sulfate 6-O-sulfotransferase 1 (*HS6ST1*), a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism Tornberg J, Sykietis G.P. Habuchi H, Pitteloud N, and Bulow H.E. *et al* (16名中の13番目) *Proc. Natl. Acad. Sci* (2011) accepted 査読有
- ② Preparation of chondroitin sulfate libraries containing disulfated

disaccharide units and inhibition of thrombin by these chondroitin sulfates. Numakura M, Kusakabe N, Ishige K, Ohtake-Niimi S, Habuchi H, Habuchi O. *Glycoconj J.* (2010) **27**, 479-489 査読有

③ Mice deficient in N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase are unable to synthesize chondroitin/dermatan sulfate containing N-acetylgalactosamine 4,6-bissulfate residues and exhibit decreased protease activity in bone marrow-derived mast cells Ohtake-Niimi S, Kondo S, Ito T, Kakehi S, Ohta T, Habuchi H, Kimata K, Habuchi O. *J Biol Chem* (2010) **285**, 20793-20805. 査読有

④ Functional analysis of chick heparan sulfate 6-O-sulfotransferases in limb bud development. Kobayashi T, Habuchi H, Nogami K, Ashikari-Hada S, Tamura K, Ide H, Kimata K. *Dev Growth Differ.* (2010) **52**, 146-156. 査読有

⑤ Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase is required for triglyceride-rich lipoprotein clearance. Stanford KI, Wang L, Castagnola J, Habuchi H, Esko JD et al (13名中9番目) *J Biol Chem.* (2010) **285**, 286-294. 査読有

⑥ Specific inhibition of FGF-2 signaling with 2-O-sulfated octasaccharides of heparan sulfate Ashikari-Hada S, Habuchi H, Sugaya N, Kobayashi T, Kimata K. *Glycobiology* (2009) **19**, 644-654. 査読有

⑦ 6-O-sulfation of heparan sulfate differentially regulates various fibroblast growth factor-dependent signalings in culture. Sugaya N, Habuchi H, Nagai N, Ashikari-Hada S, Kimata K. *J Biol Chem.* (2008) **283**, 10366-10376 査読有

⑧ ヘパリン硫酸プロテオグリカンの器官形成と疾患における役割 羽瀧弘子、木全弘治 *生体の科学* (2008) **59**, 83-91 査読無

[学会発表] (計2件)

① 二糖二硫酸単位を含むコンドロイチン硫酸ライブラリーの調製とこれらのコンドロイチン硫酸によるトロンビン活性の阻害 沼倉真理緒、日下部教子、石毛和也、大竹新美しおり、羽瀧弘子、羽瀧脩躬 BMB2010 (第83回日本生化学会大会)神戸ポートアイランド 2010年12月8日

② 培養マスト細胞におけるヘパリンの2-硫酸化と2-硫酸化ヘパリンの機能 羽瀧弘子、羽瀧脩躬、木全弘治 第82回日本生化学会大会 神戸ポートアイランド

2009年10月24日

〔図書〕(計1件)

Mice deficient in heparan sulfate
6-O-sulfotransferase-1. Habuchi H, Kimata
K. *Prog Mol Biol Transl Sci.* (2010) **93**,
79-111. Elsevier Inc.

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: ノックアウト動物
発明者: 木全弘治、羽瀨弘子、佐藤尚子
権利者: 生化学工業株式会社
種類: 特許
番号: 特願 **2009-193909**
出願年月日: 2009年8月25日
国内外の別: 国内

○取得状況(計2件)

名称: クラミジア感染症処置剤
発明者: 藪下廣光、羽瀨弘子、木全弘治
権利者: 生化学工業株式会社
種類: 特許
番号: 特許第 **4633233**
取得年月日: 2010年11月26日
国内外の別: 国内

名称: 硫酸基転移酵素及びそれをコードする
DNA
発明者: 羽瀨弘子、田中雅之、木全弘治
権利者: 生化学工業株式会社
種類: 特許
番号: 特許第 **4226693**
取得年月日: 2008年12月5日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.aichi-med-u.ac.jp/institute/
outline/sentanigaku.html](http://www.aichi-med-u.ac.jp/institute/outline/sentanigaku.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽瀨 弘子 (HABUCHI HIROKO)
愛知医科大学・客員研究員
研究者番号: 90329821

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: