

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659019

研究課題名（和文） ガン抑制遺伝子 EXTL2 によるプロテオグリカンの品質管理機構

研究課題名（英文） Proteoglycan quality control mechanisms by the tumor suppressor gene *EXTL2*

研究代表者

北川 裕之 (KITAGAWA HIROSHI)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40221915

研究成果の概要（和文）：ヘパラン硫酸は、遺伝性多発性外骨腫と呼ばれる常染色体性優性に遺伝する四肢長管骨の骨端に軟骨帽が多発する疾患の原因遺伝子がコードする糖転移酵素 *EXT1* と *EXT2* の複合体によって合成される。さらに哺乳類では、*EXT1* や *EXT2* に高い相同性をもつ *EXTL* family (*EXT-like gene family*) が3種類存在するが、その機能については不明な点が多い。本研究では、この3種類の *EXTL* family のうち *EXTL2* に焦点を絞り、*EXTL2* が *EXT1* 欠損時におけるヘパラン硫酸生合成に関与する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素であることとプロテオグリカンによる品質管理に関わる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Heparan sulfate (HS) is synthesized by HS co-polymerases encoded by the *EXT1* and *EXT2* genes, which are known as causative genes for hereditary multiple exostoses, a dominantly inherited genetic disorder characterized by multiple cartilaginous tumors. Three *EXT-like* (*EXTL*) genes that share significant sequence homologies with *EXT1* and *EXT2* have been identified in mammals. However, their roles in HS biosynthesis remain unclear. Here, we showed that the transfer of the first GlcNAc residue to the linkage region by *EXTL2* is critically required for the biosynthesis of HS in cells deficient in *EXT1* and is likely involved in the quality control mechanism of proteoglycans.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：生化学・分子生物学・糖鎖生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：プロテオグリカン・グリコサミノグリカン・糖転移酵素・ガン抑制遺伝子・コンドロイチン硫酸・ヘパラン硫酸・遺伝性多発性外骨腫・キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

プロテオグリカンはグリコサミノグリカン鎖によって修飾されるが、この糖鎖の合成異常は重篤な発症異常や遺伝性多発性外骨

腫などの病気の原因になる。我々は、糖鎖の合成異常を原因とする疾患の克服を目指して、一群のグリコサミノグリカン合成酵素のクローニングを行ってきた。グリコサ

ミノグリカンの合成は、キシロースの転移により開始し、結合領域と呼ばれる四糖構造(GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-O-Ser)が合成された後、最初のヘキシサミンが転移されて二糖繰り返し領域の合成が開始される。この結合領域のキシロースはリン酸化されると、結合領域を完成させるグルクロン酸転移酵素-1 によるグルクロン酸の転移が増強されることにより結合領域の完成が促進されるが、結合領域合成後に脱リン酸化されないと二糖繰り返し領域の合成は開始されないことが知られている。脱リン酸化が起らない場合、合成が停止した糖鎖をもつ異常プロテオグリカンが生じると考えられるが、どのようにしてその異常プロテオグリカンを処理しているのかは不明である。EXTL2 は我々がクローニングした機能未知の糖転移酵素であり、結合領域四糖に α 1-4 結合で *N*-アセチルヘキシサミンを転移する活性をもつ。

2. 研究の目的

プロテオグリカンはグリコサミノグリカン鎖によって修飾された糖タンパク質であり、その機能発現には糖鎖が重要である。プロテオグリカンの品質維持のためには糖鎖修飾を管理しなければならないが、その機構は明らかではない。我々の研究は、プロテオグリカンの品質を維持する品質管理機構の存在とその仕組み、また、システムの動作不良が細胞や個体にどのような影響を与えるかについて理解することを目的としている。

我々は、グリコサミノグリカンの合成に関連するが、機能の明らかでない2種の酵素、EXTL2とFamily with sequence similarity 20 member B (FAM20B)を独自にクローニングしており、これらの酵素がプロテオグリカンの品質管理に働く可能性を検討することで、プロテオグリカンの分泌や分解を司る新たな機構を発見できると考えている。

3. 研究の方法

(1) 四糖結合領域を模擬した様々な基質を用いて、FAM20B のリン酸基転移酵素活性を測定した。また、人の子宮頸癌由来細胞である HeLa 細胞において、*Fam20B* あるいは *EXTL2* を過剰発現あるいは発現を抑制し、それらの細胞より硫酸化グリコサミノグリカン鎖を抽出、精製し、ゲルろ過や HPLC 分析によりコンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸鎖の二糖組成および鎖長解析を行った。

(2) EXT1 欠損細胞である *gro2c* 細胞とそ

の親株である L 細胞を用いて EXT2、EXTL2、および EXTL3 遺伝子をノックダウンした安定細胞株をそれぞれ作製し、上記(1)と同様な方法でヘパラン硫酸鎖の二糖組成分析及び鎖長解析を行った。

(3) マウス EXTL2 (*mEXTL2*) cDNA を利用してマウス *EXTL2* 遺伝子を単離し、その制限酵素地図を作製した後、エキソン III にネオマイシン耐性遺伝子を挿入した遺伝子欠損マウス作製のターゲティングベクターを構築した。このベクターを ES 細胞にトランスフェクションし、PCR および Southern blot によるスクリーニングの結果、2クロンの相同組み換え体を得た。両クローンについて、キメラマウスを作製し、さらにヘテロマウスを得た後、C57BL/6 系統のマウスへの戻し交配を行った。その後、ヘテロマウス同士の交配により得たマウスの遺伝子型を判定した。

得られた EXTL2 のノックアウトマウスは見かけ上正常に発育した。そこで、EXTL2 のノックアウトマウス、ヘテロマウスおよび野生型マウスの肝臓より硫酸化グリコサミノグリカン鎖を抽出、精製し、ゲルろ過や HPLC 分析によりコンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸鎖の二糖組成および鎖長解析を行った。

4. 研究成果

(1) グリコサミノグリカン鎖は、結合領域と呼ばれる四糖構造(GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-O-Ser)を介してコアタンパク質に結合している。この四糖結合領域における Xyl 残基の2位は、一過的にリン酸化修飾を受けるが、Xyl 残基をリン酸化する酵素や Xyl 残基がリン酸化される生理的意義は不明であった。そこで、FAM20B の機能解析を行ったところ、FAM20B は四糖結合領域の Xyl 残基の2位をリン酸化する酵素であることが判明した。また、HeLa 細胞で FAM20B を過剰発現もしくはその発現を抑制すると、その発現量に応じてコンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸鎖の本数が制御され、グリコサミノグリカン鎖の量が調節されていることが明らかとなった。さらに、もう一つの酵素 EXTL2 を HeLa 細胞で過剰発現もしくはその発現を抑制すると、EXTL2 の発現量に応じてコンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸鎖の本数が抑制され、親株に比べて過剰発現株のグリコサミノグリカン鎖の量は減少しており、逆に EXTL2 の発現を抑制した細胞株ではより多くのグリコサミノグリカン鎖が細胞に蓄積することが判明した。

(2) ヘパラン硫酸は、ヒトから線虫までのほとんどすべての細胞表面や細胞外マトリックスに存在するグリコサミノグリカン鎖の一種である。その生合成は、遺伝性多発性外骨腫の原因遺伝子がコードする糖転移酵素 EXT1 と EXT2 の複合体によってコアタンパク質のセリン残基に結合する四糖結合領域に GlcNAc と GlcA の二糖が交互に繰り返り転移されることで行われる。さらに EXT1 や EXT2 に高い相同性をもつ EXTL family (EXT-like gene family) が存在し、*in vitro* においてヘパラン硫酸鎖の伸長開始に関与する GlcNAc を四糖結合領域に転移する活性は保持しているが、その機能については不明な点が多い。一方、モデル生物である線虫において、ヘパラン硫酸鎖生合成に EXT1 と EXTL3 のオーソログが必要不可欠であることが我々の研究により示されている。さらに、予備的な研究から、興味深いことにマウスの EXT1 欠損細胞 (gro2c 細胞) においても短いヘパラン硫酸鎖が合成されていることを我々は明らかにしていた。そこで、本研究では EXT1 欠損細胞におけるヘパラン硫酸鎖生合成に EXT2 と EXTL2 が関与しているのではないかと考え、さらに実験を行った。まず、EXT1 欠損細胞である gro2c 細胞を用いて EXT2、EXTL2、および EXTL3 遺伝子をノックダウンした安定細胞株を作製し、ヘパラン硫酸鎖の二糖組成分析及び鎖長解析を行いヘパラン硫酸鎖の重合化における EXTL2 の役割について調べた。その結果、EXT1 欠損細胞である gro2c 細胞で EXT2 や EXTL2 遺伝子をノックダウンさせるとヘパラン硫酸の二糖総量が減少したが、EXTL3 遺伝子をノックダウンしてもヘパラン硫酸の二糖総量には変化が見られなかった。このことから、EXT1 欠損細胞では、EXTL2 により四糖結合領域に GlcNAc が転移されることにより EXT2 のみでヘパラン硫酸鎖の重合化がおこることが明らかとなった。

(3) EXTL2 のノックアウトマウス、ヘテロマウスおよび野生型マウスの肝臓のグリコサミノグリカン鎖を解析し、EXTL2 がプロテオグリカンの品質管理に働く可能性を検討した。その結果、EXTL2 のノックアウトマウスは、ヘテロマウスや野生型マウスに比べコンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸鎖の量が共に増えており、EXTL2 が存在しないとより多くのグリコサミノグリカン鎖およびプロテオグリカンが細胞に蓄積していることが判明した。さらに、EXTL2 のノックアウトマウスのプロテオグリカン上に存在するグリコサミノグリカン鎖の構造を解析すると、ヘテロマウスや野生型マウスに比べリン酸化された短いグリコサミ

ノグリカン鎖が存在することが明らかとなった。

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1件)

(1) Okada M., Nadanaka S., Shoji N., Tamura J., and Kitagawa H.
Biosynthesis of heparan sulfate in *EXT1*-deficient cells.
Biochem. J., 査読有, 428(3), 2010, 463-471.

[学会発表] (計4件)

- ① 北川 裕之、コンドロイチン硫酸による骨格筋分化の制御、第84回日本生化学会大会 (2011.09.22 京都)
- ② 泉川 友美, 小池 敏靖, 北川 裕之、コンドロイチン N-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 によるコンドロイチン硫酸鎖の本数の制御機構、第84回日本生化学会大会 (2011.09.21~24 京都)
- ③ 小池 敏靖、泉川 友美、勝村 仁美、平塚 千紗、北川 裕之、キシロースリン酸化酵素である FAM20B によるグリコサミノグリカン生合成の制御、BMB2010 (2010.12.07-10、神戸)
- ④ 小池 敏靖、泉川 友美、北川 裕之、キシロースリン酸化酵素によるグリコサミノグリカン生合成の制御、第9回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム2010 (2010.10.02-03京都)

[図書] (計4件)

- ① 北川 裕之
生物薬科学実験講座 2011 (廣川書店) 4 巻-II, pp. 82-101 「¹H-NMR {(2)オリゴ糖}」
- ② Koike, T., Nadanaka, S., Kitagawa, H.
Enzyme assay of xylosyltransferase., GlycoPOD: GlycoScience Protocol Online Database
<http://jcgddb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeld=t84>
- ③ Nadanaka, S., Kitagawa, H.,
Enzyme assay of GAG glycosyltransferases for heparan sulfate., GlycoPOD: GlycoScience Protocol Online Database
<http://jcgddb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeld=t83>
- ④ Nadanaka, S., Kitagawa, H.,
Enzyme assay of GAG glycosyltransferases for chondroitin sulfate., GlycoPOD: GlycoScience Protocol Online Database
<http://jcgddb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeld=t82>

[産業財産権]

○出願状況（計1件）

名称：骨格筋再生促進剤
発明者：北川裕之、三上雅久
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2011-202470
出願年月日：23年9月16日
国内外の別：国内

取得状況（計1件）

名称：コンドロイチン重合化因子の同定と、
その利用
発明者：北川 裕之，菅原 一幸
権利者：同上
種類：特許
番号：特許 第 4514708 号
取得年月日：22年5月21日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~biochem/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 裕之 (KITAGAWA HIROSHI)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40221915

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

灘中 里美 (NADANAKA SATOMI)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60378578