

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02447

研究課題名(和文)モルフォゲンの分布とシグナル範囲を規定するヘパラン硫酸クラスターの解析

研究課題名(英文) Analysis of heparan sulfate clusters defining morphogen distribution and signaling range

研究代表者

平良 眞規 (Taira, Masanori)

中央大学・理工学部・共同研究員

研究者番号：60150083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：胚発生の初期に高度硫酸化ヘパラン硫酸(HS)が存在するか否かを探るため、高度硫酸化HSに結合する単純ヘルペスウイルスのgDタンパク質に注目した。gDがHSへ結合するには3位のスルホン化が必要であり、それを触媒する酵素はHs3st3である。タグ付きgDをツメガエル胚に発現させ、細胞間隙へのgDの分布を免疫染色で検討した結果、原腸胚期では観察されず、hs3st3遺伝子が発現開始する神経胚期で検出された。原腸胚期で実際にgDが分泌されていることは、タグに対する抗体を発現させた細胞の周囲にはgDが結合したことから示された。従って、gDは高度硫酸化HSの検出プローブとして有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘパラン硫酸(HS)は良く研究されている糖鎖の一つでコアタンパク質に数本結合しHSプロテオグリカン(HSPG)を形成する。HSは二糖ユニットが数十から数百繰返し各ユニットに5箇所の修飾部位があり、その修飾の有無で細胞種特異的な修飾パターンをもつ。しかしこの多様性が各細胞においてどのように形づくられかは不明な点が多い。一般に1本のHS鎖に多様なユニットが含まれるとされているがその根拠は乏しく、むしろHSPG分子ごとには比較的均一なユニットのHS鎖が結合するという知見が我々により示された。本研究ではそれをさらに検証するためのツールを開発したことで学術的意義は大である。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether highly sulfated heparan sulfate (HS) is present in early embryogenesis, we focused on the herpes simplex virus gD protein that binds to highly sulfated HS. gD requires sulfonation at position 3 to bind to HS, and the enzyme that catalyzes this is Hs3st3. The distribution of tagged gD in the intercellular spaces around the expressing cells was examined by immunostaining, and the results showed that gD was not observed in the gastrula embryo, but was detected in the neurula embryo, when the hs3st3 gene starts to be expressed. The fact that gD is actually secreted during the gastrula embryo was indicated by the result that gD bound around cells expressing antibodies to the tag. These data suggest that gD is a useful detection probe for highly sulfated HS.

研究分野：分子発生学

キーワード：ヘパラン硫酸 ヘパラン硫酸クラスター ヘパラン硫酸修飾酵素 Hs3st3 N-acetylヘパラン硫酸 N-sulfoヘパラン硫酸 高度硫酸化ヘパラン硫酸 単純ヘルペスウイルスタンパク質gD

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Wnt や BMP、Nodal、FGF などのペプチド増殖因子はモルフォゲンとして胚発生における様々なパターン形成に関わる。これらのモルフォゲンの勾配形成とシグナル伝達に関与するとされるのがヘパラン硫酸 (HS) である。HS は古くより主として生化学的手法を用いて良く研究されてきた糖鎖で、glypican (Gpc1~Gpc6) や syndecan (Sdc1~Sdc4) などのコアタンパク質に数本結合して HS プロテオグリカン (HSPG) として細胞表層で機能する。HS 鎖は N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とグルクロン酸 (GlcA) の二糖ユニットが数十から数百個繰り返しており、1 つのユニットには 4 箇所のスルホン化と 1 箇所のエピメリ化を受ける 5 箇所の修飾部位をもち、各ユニットの各部位の修飾の有無で HS の修飾パターンが決まるため、細胞種ごとに大きな多様性をもつのが特徴である (Annavalet al., 2020)。HS には数百種以上のタンパク質リガンドが結合することが知られており、それらは HS 鎖のある特定の修飾パターンを認識して結合するため、各細胞がどのような修飾パターンの HSPG をもつかにより細胞表層とタンパク質リガンドとの間の多様で特異的な相互作用が生まれる (Vivès et al., 2014)。しかしこの HS の多様性が各細胞特異的にどのように形づくられか未だ不明な点が多く残されている。

HS の 5 つの部位の修飾酵素として Ndst、Glcce、Hs2st、Hs6st、Hs3st が存在し、脊椎動物ではそれぞれにパラログが Ndst には 4 つ、Glcce と Hs2st にはなくて、Hs6st には 3 つ、Hs3st には 7 つある。それらの中で Ndst が最初の修飾酵素で、GlcNAc を脱アセチル化してアミノ基にし (GlcN) そこをさらにスルホン化して N-スルホグルコサミン (GlcNS) になる。次に GlcNS を基質として Glcce によるエピメリ化で GlcA が IdoA になように、以降も大まかには前の修飾を基質として次の修飾が行われるので Hs2st、Hs6st、Hs3st の順に進行するされている。その中で HS の多様性は、各細胞種でどの修飾酵素のどのパラログをどの程度発現するかで決めていると漠然と考えられてきた。それは HS の修飾パターンの解析が、組織から抽出した HS 全体を二糖ユニットに分解してその修飾パターンを決めるという二糖分析のデータを元に HS 鎖の配列を予想したためである。その結果、1 本鎖の HS に修飾を受けない領域として NA ドメインを想定し、Ndst による修飾を受けかつ他の修飾も受け得る領域として NS ドメインを想定した。これが HS 鎖の NA・NS ドメイン・モデルである。そのような中、我々は GlcNAc 特異的抗体 NAH46 と GlcNS 特異的抗体 HepSS-1 を用いて、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis* 胚) を免疫染色し、共焦点顕微鏡観察による細胞生物学的解析を行ったところ、NAH46 のドット状シグナル (GlcNAc-rich HS クラスタ) と HepSS-1 のドット状シグナル (GlcNS-rich HS クラスタ) が重ならないことを見出した (Mii, Yamamoto et al., 2017)。つまり細胞表面には GlcNAc-rich HSPG の微小クラスタと GlcNS-rich HSPG の微小クラスタが独立に存在すること、つまり NA・NS ドメイン・モデルに合致しないこと、および 1 つの細胞がもつ HS の修飾パターンが不均一であることを示している。さらにそれぞれの微小クラスタを形成するコアタンパク質を同定したところ、GlcNAc-rich HSPG は Gpc4 であること、GlcNS-rich HSPG は Gpc4 あるいは Gpc5 であることを見出した。この結果は Gpc は脂質ラフトにクラスタを形成する知見と合致するものであり、また 1 つの細胞でも、各 Gpc をコアタンパク質とした HSPG クラスタがもつ HS 鎖は均一であり、NA ドメインのみをもつもの (NAH46 抗体陽性) と NA ドメインのみをもつもの (HepSS-1 抗体陽性) に分かれることを示している (Mii, Yamamoto et al., 2017)。

以上の結果を他のコアタンパク質にまで拡張して考えてみると、以下の作業仮設が成り立つ。すなわち、各細胞がどのような修飾パターンをもつ HS を形成し得るかを決めのは細胞種特異的な修飾酵素の遺伝子発現に基づくが、その可能性の中で実際にどの修飾パターンを形成するかはそれぞれのコアタンパク質の種類とアイソフォームに依存しており、その結果、個々の HSPG がどのリガンドと相互作用して機能するかが決まることになる。この作業仮設に基づく、これまであまり議論されてきていない、何故 Gpc の特定のパラログが Wnt canonical あるいは noncanonical シグナルに関わり、何故 Sdc の特定のパラログが FGF シグナルに関わるのかが容易に説明できることになる。

これまでの知見でもう一つ欠けていた重要な点は、HS の前駆体とされてきたヘパラン (Hn) 鎖がそれ自身で重要な生物学的機能をもっていたことである。先に述べてように、GlcNAc-rich HSPG は Ndst1 のノックダウン実験でも影響を受けなかったことから、実質 HnPG と考えられる。この HnPG クラスタには分泌性 Wnt 結合タンパク質の Frzb と Crescent が結合することを見出した (Mii, Yamamoto et al., 2017)。一方、Wnt8 は GlcNS-rich HSPG クラスタに結合して細胞内に取り込まれるのに対して、Wnt8-Frzb 複合体は HnPG に結合し細胞外にとどまること、その結果 Wnt8 の分布とシグナル範囲は分泌源の近傍に限られるのに対して Frzb が存在すると Wnt8 の分布とシグナル範囲が増大することが明らかとなった。このように HnPG はモルフォゲンである Wnt8 の作用を間接的に関わるという重要な生物学的役割を担っていることが明らかとなった (Mii, Yamamoto et al., 2017)。

これら我々の研究で明らかになった HS に関する最近の知見とそれに基づく作業仮設を実証するため、以下の研究計画を立てた。

2. 研究の目的

へパラン硫酸 (HS) は、コアタンパク質の特定の位置のセリン残基からの伸長反応によりまず HS 前駆体であるへパラン (Hn) が結合したプロテオグリカンが小胞体で作られ、ついでゴルジ体へ送られて、ゴルジ体の中で Ndst やその他の修飾酵素との複合体を形成し、特定の修飾反応が行われて、特徴的な修飾パターンを形成され、その後分泌小胞を形成を経て細胞表面に提示されると考えられている。ここで問題となるのは、ゴルジ体の中で Hn プロテオグリカンがどのように選択的に特定の修飾酵素との組合せで複合体を形成して修飾されるかである。最も極端な例としては、Gpc4 をコアタンパク質とする Hn プロテオグリカンの一部はゴルジ体で修飾酵素がほとんど作用しないか全く作用しない状態で分泌小胞に移動し細胞表面に提示されることで NAc-HS クラスター (あるいは Hn クラスター) が形成されると考えられる。一方、Gpc4 をコアタンパク質とする Hn プロテオグリカンの一部、あるいは Gpc5 をコアタンパク質とする Hn プロテオグリカンは、Ndst1 と一部の修飾酵素によりゴルジ体で修飾を受けて、NS-HS クラスターとして細胞表面に提示されると考えられる。どのようにゴルジ体で選別が行われるかは興味あるところではあるが、本研究ではその解析は保留して、最終的にどのような修飾パターンをもつ HS が、HA-HS (あるいは Hn) と NS-HS とは独立に細胞表面に存在するかを、新しいプローブを作成することで検出することを目的とする。これにより、一般に受け入れられている NA-NS ドメイン仮説に対する反証を提示することで、1つの細胞でもコアタンパク質依存的に一定の修飾パターンを持つ多様な HSPG を提示することが可能であること、それによりそれぞれと特異的にかつ独立に多様なタンパク質リガンドと相互作用することが可能になることを説明することを目指す。

3. 研究の方法

遺伝子のクローニングは cDNA を鋳型として PCR 法を用いて行うか、受託で DNA 化学合成を依頼した。得られた DNA 断片は発現ベクターの pCSf107mT あるいはその改変プラスミドに組み込み、それを鋳型として mRNA を *in vitro* 合成した。合成 mRNA は *Xenopus laevis* 胚の 4~8 細胞期の 1 割球の動物極領域に顕微注射し、原腸胚期あるいは神経胚期で固定した。発現したタンパク質の検出には、蛍光タンパク質との融合タンパク質の場合は直接に蛍光タンパク質の共焦点顕微鏡観察を行った。HA などのタグとの融合タンパク質の場合は、タグに対する免疫染色を行い、蛍光標識 (Fluoro488 あるいは Fluoro555) した IgG に対する 2 次抗体を用いて共焦点顕微鏡観察を行った。HS に対する特異抗体 NAH46 と HepSS-1 抗体を用いた免疫染色では蛍光標識 (Fluoro488 あるいは Fluoro555) の IgM に対する 2 次抗体を用いた。

4. 研究成果

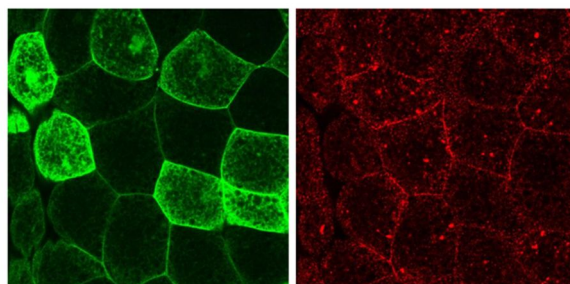
4-1) HepSS-1 の産生と保存

モノクローナル抗体の NAH46 と HepSS-1 は、NA-HA と NS-HS を同定するに必須の抗体であり、これまで生化学工業から市販されていたが、2015 年ごろに販売が中止となってしまった。そこで、ハイブリドーマ NAH46 の作成者である生化学工業と、HepSS-1 の作成者である義江修博士 (近畿大学) からハイブリドーマと使用許可を得て、松山誠博士 (重井医学研究所) の協力を得て、ハイブリドーマの培養液を調整し、*Xenopus* 胚の免疫染色に使えることを確認した。しかし HepSS-1 は、培養液の凍結誘拐により抗体が失活しやすく、また超低温層での長期保存の安定性に問題が感じられたことで、矢内原研究所への業務委託によりヌードマウスへのハイブリドーマ接種による腹水液を得た。*Xenopus* 胚を用いた免疫染色で検定したところ、反応性の高い HepSS-1 抗体液を得ることができた。そこで硫安沈殿と IgM のアフィニティカラム精製を試みたが、抗体の不安定性は改善されなかった。現時点では腹水を小分けして、凍結融解の回数を 2 回程度に抑えることで、比較的安定的に免疫染色の結果を得ることが可能となった。

4-2) HS 修飾酵素 Glce、Hs2st、Hs6st、Hs3st のクローニングと活性の検定

Ndst1 の遺伝子は既にクローニングしていたので、それ以外の 4 種の修飾酵素の遺伝子 glce、hs2st、hs6st、hs3st を *Xenopus laevis* の近交系の J 系統の胚の cDNA からクローニングした。パラログが存在する hs6st、hs3st については、公表されている *Xenopus laevis* 胚の RNA-seq 解析結果 (Session et al., 2016) を用いて、初期胚で高発現しているパラログを選別し、かつ *X. laevis* は異質四倍体であるためホメオログ L と S の中で高発現している方として、glce.L、hs2st1.S、hs6st1.L、hs3st3b1.S を選別し、PCR クローニングした。

Xenopus 胚の 4~8 細胞期の 1 割球の動物極領域にトレーサーの mVenus (緑色蛍光) mRNA と共に修飾酵素 mRNA を共注入し、原腸胚期で HepSS-1 抗体を用いた蛍光抗体免疫染色 (赤色蛍光) を行った。陽性コントロールとして ndst1 mRNA 単独の場合は、発現細胞 (緑色蛍光) で HepSS-1 のシグナル (赤色) が増大したが、ndst1+glce mRNA あるいは ndst1+hs2st mRNA では ndst1 mRNA 単独に比べて、発現細胞の HepSS-1 シグナルの強度に大きな違いが認められなかったが、ndst1+glce+hs2st mRNA では HepSS-1 シグナル強度は非注入細胞と同程度かさらに減

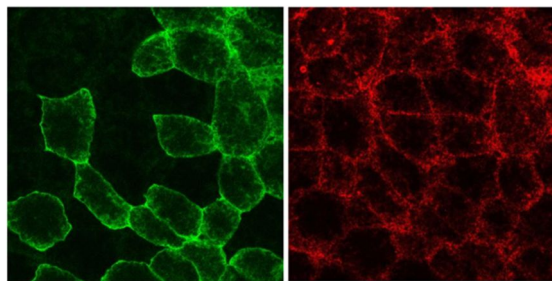


#4.7 63x-5 mVenus+Ndst1+Glce+2st1inj
HepSS1-Alexa555 Exc488 BP505-550 100% 860.jpg

#4.7 63x-5 mVenus+Ndst1+Glce+2st1inj
HepSS1-Alexa555 Exc543 BP560-615 100% 850.jpg

少しした(右図)。この結果は Ndst1 による NS-HS の増大 (HepSS-1 シグナルの増大) が、G1ce によるエピメリ化 (G1cA \leftrightarrow IdoA の可逆反応) では HepSS-1 による抗体反応は阻害しないが、G1ce による IdoA を基質として Hs2st が触媒して O2S (IdoA の 2 位の酸素のスルホン化) となることで G1ce の可逆反応が阻害され IdoA-2OS が蓄積することで HepSS-1 の反応が阻害されるという知見と合致するものであり、G1ce と Hs2st の活性を検出できたと考えられる。

上記実験の ndst1+hs2st mRNAs は ndst1 mRNA と HepSS-1 シグナル強度に違いは生じなかったが、ndst1+hs2st+hs6st mRNAs では HepSS-1 シグナルが減少し非注入細胞と同程度あるいは若干減少した(右図)。この結果は、Ndst1 による HepSS-1 のシグナル増大を Hs6ST が抑えたという点と、HepSS-1 は高硫酸化 HS に反応しないという知見と矛盾しない点から、Hs6st の活性を検出できたと考えられる。しかし非注入細胞のシグナル強度より何故わずかが減少しなかったかについては検討の余地が残された。



#4.1 63x6 mVenus+Ndst1+2st1+6st1
HepSS1-Alexa555 Exc488 100% 1110 BP505-550.jpg

#4.1 63x6 mVenus+Ndst1+2st1+6st1
HepSS1-Alexa555 Exc453 100% 900 BP560-615.jpg

4-3) FGF2 を用いた高硫酸化 HS の同定

FGF2 の HS への結合配列は G1cA-G1cNS-G1cA-G1cNS-IdoA2OS-G1cNS で、IdoA2OS が結合に必須と報告されているので (Ashikari-Hada et al., 2004) 高硫酸化 HS のプローブとして利用できる可能性がある。そこで mVenus-FGF2 (SP-mV-FGF2 コンストラクト) を mRNA 顕微注入で発現させ、原腸胚期で mVenus 蛍光観察を行った。その結果、細胞間隙に蛍光シグナルが検出されたが、FGF2 の過剰発現は中胚葉誘導活性など細胞分化に対して影響を与え、また高濃度の場合はアポトーシスを引き起こすため、高硫酸化 HS を検出するためのプローブとしては問題があった。そこで FGF2 の生物活性を軽減し HS 結合能のみをもたせることを考え、1 つは FGF レセプターへの結合に必須の 2 つアミノ酸をアラニンに変異させた mVenus-FGF2-2A コンストラクト、2 つ目は、報告されている HS 結合領域のみを用いた mVenus-FGF2-HSBS コンストラクトを作成した。mVenus-FGF2-2A は FGF2 と同様に細胞間隙にシグナルが検出されたがその強度は FGF2 に比べて非常に弱く、細胞核にもシグナルが検出されたため、細胞内への取り込みが促進されて核に蓄積した可能性が示されたため、細胞表面の高硫酸化 HS の検出には不向きであると考えられた。mVenus-FGF2-HSBS は予想に反して細胞間隙でのシグナルは検出されず、報告されていた HSBS は結合に必要な配列ではあったが、結合には十分ではなかったことが考えられた。FGF2 を高硫酸化 HS 検出のプローブとするには課題が多いことが予想されたため、一旦実験は中止とした。

4-4) HSV タンパク質 gD を用いた高硫酸化 HS の同定

高硫酸化 HS を検出するプローブの候補として、G1cA/IdoA2OX-G1cNS-IdoA2OS-G1cN6OS3OS-G1cA/IdoA2OX-G1cNS (X=H or S) に特異的に結合する単純ヘルペスウイルス (HSV) の糖タンパク質 gD (Esko & Sellick, 2002) を検討した。gD のコード領域 (CDS) は受託合成して HA タグ付き gD-HA コンストラクトを mRNA 顕微注入法で *Xenopus* 胚に発現させ、原腸胚期で固定して抗 HA 抗体で免疫染色したが、細胞間隙には検出されなかった。そこで分泌の有無を確認するため以下の方法をとった。まず 2 重タグの gD-mVenus-HA コンストラクトを作成し、それを細胞外で捕捉するものとして、mCherry のタグ付きの膜結合型単鎖 GFP 抗体 (morphotrap-mCherry) を入手した。そこで gD-mVenus-HA mRNA を動物極側の一割球に顕微注入し、離れた別割球に morphotrap-mCherry mRNA を注入した。原腸胚期で固定し、抗 HA 抗体で免疫染色した結果、mCherry の細胞膜のシグナルと重なって抗 HA 抗体のシグナルが強く検出された。このことは gD-mVenus-HA が分泌されて細胞間隙を移動して morphotrap-mCherry に捕捉されたことを示している。この結果と、gD-HA が細胞間隙に検出されないという以前の結果と合わせて考えると、原腸胚期の細胞表面には gD が結合できる修飾をもつ HS が存在しないことを示唆している。

gD が結合する HS には G1cNS と IdoA の 2 位と 6 位のスルホン酸修飾に加えて G1cN の 3 位のスルホン酸修飾 (O3S) が必須であることが報告されているので、その修飾酵素である Hs3st3b1 の発現パターンを RNA-seq データベースで調べたところ神経胚期で発現が増大していた。そこで gD-HA を発現させた胚を神経胚期で固定して免疫染色して細胞間隙を観察したところ、シグナルは弱いけどドット状の分布を示した。このドットが HS への結合によるものかを検討するため、HS 切断酵素の HepIII を発現させてそのドットが消失するかを検討した。*Pedobacter heparinum* の HepIII のプラスミド DNA (Hashimoto et al., 2014) は京都大学の橋本渉博士より入手した。HepIII をタグ付き発現ベクター pCsf107-mScarlet-OLLAS-GPI-T に組み込み、細胞膜上に GPI アンカーで結合させ、かつ可視化するために赤色蛍光タンパク質 mScarlet と OLLAS を繋げた HepIII コンストラクト (以下 HepIII-mScarlet と略記) を構築した。まず HepIII-mScarlet が期待通り細胞表面の HS を切断するか否かを検討するため、HepIII-mScarlet mRNA を *Xenopus* 初期胚の 1 割球に顕微注入し、原腸胚期で抗 N-acetyl HS 抗体で染色した結果、発現細胞で N-acetyl HS が強く減じることを確認した。そこで gD-HA と HepIII-mScarlet の mRNA を隣り合った割球に顕微注入し、gD-HA の細胞外分布を HepIII-mScarlet が減じさせるかを検討したが、効果は部分的であった。

培養細胞を用いた報告では、HSV1 の感染に抵抗性の細胞にヒト Hs3st3b を発現させると gD を

介する感染性が現れることが示されている(Shulka et al., 1999)。そこで *Xenopus* 胚に Hs3st3b1 単独あるいは Hs3st3b1 を含む 5 種の修飾酵素を共発現させて、原腸胚期および神経胚期で gD-HA の細胞外分布が増大するかを検討したが、顕著な効果は認められなかった。特定の HS の修飾パターンを得るには単なる共発現では難しいのか、あるいは特定の修飾酵素のパラログの組み合わせが必要なのかもしれない。

本研究で gD の細胞間隙での分布が認められたものの、その確認実験では期待通りの結果にならなかった。その要因として、(i) HepIII は高硫酸化 HS の切断活性が弱い、(ii) Hs3st3b1 は GlcNAc を基質とするため(Shukla et al., 1999)、GlcNAc の脱アセチル化を主として行う Ndst3 の発現が必要である可能性などが考えられた。(i) に関しては HepIII の代わりに、高度硫酸化 HS を切断する heparinase I (HepI) を用いることとし、市販酵素と同じ遺伝子である *Flavobacterium heparinum* (= *Pedobacter heparinus*) の Hep I の塩基配列を Genbank から入手し、それを *Xenopus* codon usage に変換したものを、Integrated DNA Technologies (IDT) 社に委託合成した。コンストラクトの作成は東京大学の池田貴史博士の協力を得てタグ付き発現ベクター-pCSf107-mScarlet-OLLAS-GPI-T(HepI-mScarlet)に組み込んだ。mRNA を合成し *Xenopus* 胚に顕微注射し mScarlet の蛍光を確認したところである。今後このコンストラクトを用いて、gD の細胞間隙への分布が HepI により消失するか否かを検討する予定である。

4-5) 結語

HS 鎖がもつ修飾パターンの多様性が、1 本の長い HS 鎖の中に種々の修飾パターンが含まれているために生じているのか、あるいは HSPG がもつ数本の HS 鎖は同じような修飾パターンをもっているが、HSPG ごとに、あるいはコアタンパク質の違いによって修飾パターンが異なるために、1 つの細胞がもつ HS 鎖に多様性が表れているのか、という HSPG の根本的な課題に本研究は取り組んだ。そのためにはこれまでの生化学的解析ではなくて、免疫染色を用いた細胞生物学的解析が必須であり、我々はモノクローナル抗体の NAH46 を HepSS-1 を用いて解析したことで、修飾パターンが大きく異なる NA-rich HS (あるいは Hn) クラスタと NS-rich HS クラスタを見出した。これらの抗体以外にも幾つもの抗体がある特定の修飾パターン特異的であることが論文で公表されているが、残念なことにそれらの多くは既に入手困難であったり、市販が取りやめになるなどしており、新たなツール開発が必要な状況となっていた。そこで注目したのがこれまで多数知られている HS 結合タンパク質を利用することである。本研究では、HS 結合タンパク質の中から、結合配列が明らかになっていた FGF2 と gD を用いた。今後はそれら以外にも範囲を広げることで HS の細胞生物学的解析に有用なタンパク質をさらに探す必要がある。HS への結合の特異性を確認するためのツールの 1 つとしては、硫酸化程度の低い HS を切断する HepIII と高硫酸化 HS を切断する HepI の遺伝子を発現させて作用させることが可能となった。さらに HS の修飾パターンを任意に変化させ得るものとして、5 種類の HS 修飾酵素遺伝子を発現させられようになった。今後は各修飾酵素のパラログ遺伝子も準備することで、特に 7 つのパラログを持つ Hs3st は生物活性を大きく変化させることが報告され出しており(Denys et al., 2019)、コアタンパク質と HS の修飾パターンとの関連性およびそれに結合するタンパク質リガンドとの関連も含めて総合的に解析して行く必要がある。

< 引用文献 >

- Annaval, T. et al. (2020). *Molecules* 25, 4215.
Ashikari-Hada, S. et al. (2004). *J. Biol. Chem.* 279, 12346-12354.
Denys, A. and Allain, F. (2019). *Oncol.* 9, 1-7.
Esko, J. D. and Selleck, S. B. (2002). *Annu. Rev. Biochem.* 71, 435-471.
Hashimoto, et al. (2014). *Biochemistry* 53, 777-786.
Mii, Y., et al. (2017). *Nat. Commun.* 8, 1973.
Sasisekharan, et al. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3660-3664.
Shukla, D., et al. (1999). *Cell* 99, 13-22.
Vivès, R. R., et al. (2014). *Front. Oncol.* 3, 1-11.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------