

特集：糖鎖機能の多層性と神経 sugar code

細胞外スルファターゼ Sulf によるヘパラン硫酸糖鎖機能の調節

内村 健治

糖鎖は基本骨格が合成されコアタンパク質に付加された後にも酵素的修飾をうける。その修飾には、硫酸化、エピマー化、脱アセチル化、グリコリル化、脱水環状化、リン酸化等が含まれる。糖鎖の硫酸化はスルフォトランスフェラーゼというゴルジ体局在酵素により担われ、ヘパリン/ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸といったプロテオグリカンの糖側鎖に多くみられる。硫酸化糖鎖は細胞表面および細胞外マトリックスにおいて発現し機能する。硫酸化糖鎖は細胞内に取り込まれた後、リソソームに運搬されスルファターゼと呼ばれる酵素により代謝分解される。近年、リソソーム局在スルファターゼとは異なる細胞外スルファターゼ Sulf-1 および Sulf-2 の存在が報告された。Sulf-1 および Sulf-2 はヘパリン/ヘパラン硫酸の6位硫酸化を細胞外で脱硫酸化するスルファターゼであることが明らかとなった。Sulf-1 および Sulf-2 は Wnt, BMP, GDNF, FGF といったヘパリン結合性因子のヘパラン硫酸糖鎖への結合を細胞外で調節し、それら因子のシグナル伝達を巧妙に制御していることが明らかになってきた。細胞外で硫酸基を遊離するという新規分解メカニズムの発見とヘパリン/ヘパラン硫酸糖鎖の細胞外における機能制御という全く新しい分野が登場した。本総説では細胞外スルファターゼ Sulf についてその分子特性、生理機能および病態病理への関与について述べる。

1. ヘパラン硫酸プロテオグリカン

ヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan: HSPG) は、ほとんどの多細胞生物において細胞表面に存在し、また細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の主成分でもある¹⁻³⁾。HSPG は多種多様な生理活性タンパク質を結合することにより多くの生物機能をもつ。これらタンパク質リガンドは成長因子、モルフォゲン、サイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼ、マトリックス分子、接着分子、アポリポタンパク質などである (表1)^{2,4)}。HSPG はコアタンパク質に1本または数本のヘパラン硫酸 (HS) と呼ばれるグリコサミノグリカン (GAG) 糖

鎖が共有結合した構造をとる (図1)⁵⁾。HSPG の名前はコアタンパク質の種類により命名され、代表的な細胞表面 HSPG としてシンデカン (Syndecan 1-4) とグリピカン (Glypican 1-6) ファミリーが存在する。パルカン、アグリン、コラーゲン X VIII は ECM HSPG である^{2,6)}。

HS 糖鎖はその合成開始が厳密に制御され⁷⁾、HSPG が持つ生物機能の本質を担う分子である。一つの例として、HS 糖鎖合成欠損によるマウス原腸胚形成異常があげられる⁸⁾。HS 糖鎖は、ウロン酸とグルコサミンの二糖が繰返し連なった、枝分かれのない直鎖状ポリマーである。二糖繰返し単位は最大で100単位になることもある。ウロン酸残基はグルクロン酸 (glucuronic acid: GlcA) またはその酵素的エピマー化により生じるイズロン酸 (iduronic acid: IdoA) で、それぞれ2位が硫酸化され得る。グルコサミン残基は6位、3位が硫酸化され、さらに、N位はアセチル化または硫酸化される⁹⁾。これらウロン酸およびグルコサミン残基の硫酸化はゴルジ体局在のスルフォトランスフェラーゼ群により担われる¹⁰⁾。HS 糖鎖は硫酸化の程度

(独)国立長寿医療研究センター (〒474-8511 愛知県大府市森岡町源吾 35 番地)

Sulfs: extracellular endosulfatases that regulate physiological functions of heparan sulfate

Kenji Uchimura (National Center for Geriatrics and Gerontology, 35 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8511, Japan)

表1 ヘパリン/ヘパラン硫酸糖鎖と相互作用するタンパク質

文献 2, 4, 60) 参照.

| General class | Examples |
|-------------------------|--|
| Adhesion molecules | L-selectin, Mac-1, NCAM, PECAM-1 |
| Chemokines | IL-8, CXCL12, CCL21, CXCL10, CCL2 |
| Cytokines | IL-7, IFN- γ , IL-3, TNF- α , GM-CSF |
| Growth factors | HB-EGF, VEGF, PDGF, FGF-1, FGF-2, FGF-8, HGF, amphiregulin, midkine, pleiotrophin |
| Morphogens | Wnts, Shh, BMPs, TGF- β |
| Axon guidance molecules | Netrin-1, slit, semaphorin-5A, ephrin-A3 |
| ECM molecules | Laminin, fibronectin, thrombospondin, fibrin, collagens, tenascin, vitronectin |
| Enzymes | Lipoprotein lipase, urokinase, elastase, hyaluronidase, superoxide dismutase, thrombin |

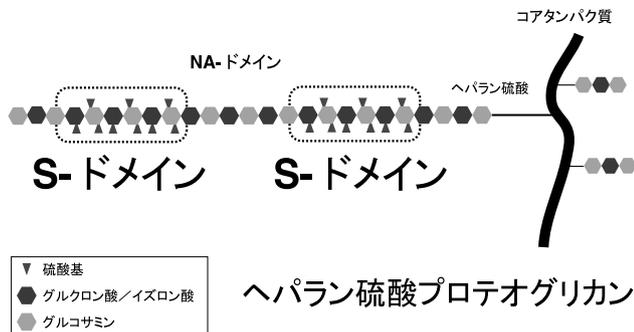


図1 ヘパラン硫酸プロテオグリカンの模式図

ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) はコアタンパク質に直鎖状のヘパラン硫酸 (HS) 糖鎖が1本-数本共有結合した分子である。HS糖鎖は「S-ドメイン」と呼ばれる多硫酸化された二糖単位が2-8単位連なったドメインを含む。「S-ドメイン」は硫酸化されていないドメイン「NA-ドメイン」により分離された形をとる。ここには示さないが、S-ドメインに隣接するドメインは「transitionドメイン」と呼ばれ比較的硫酸基修飾が少ない二糖単位より成る。Sulf-1, Sulf-2はHS糖鎖内部S-ドメインの主要な構成単位である IdoA2S-GlcNS6S 二糖の6位の硫酸基を遊離するスルファターゼである。本文参照。文献5)より改変。

によりいくつかのドメインが内部で形成される。多硫酸化されたドメインは「S-ドメイン」と呼ばれ、2, 6, N位が硫酸化された IdoA2S-GlcNS の二糖単位を主な構成単位とする。S-ドメインに隣接するドメインは「transitionドメイン」と呼ばれ比較的硫酸化の程度が低い。これらのドメインは硫酸化がみられないN-アセチルグルコサミンを含む二糖単位が主体となる「NA-ドメイン」と呼ばれる領域により分離されている^{5,11)}。ヘパリンはその二糖単位の約80%が IdoA2S-GlcNS6S であり、HS糖鎖「S-ドメイン」のケミカルアナログとして見なすことができる。

HS糖鎖は個体発生や組織構築に伴いその二糖単位組成、直鎖の長さおよび硫酸化のパターンに多様性をもつ^{4,12,13)}。すなわち、HS糖鎖の硫酸化の位置および程度によりそのタンパク質リガンドとの結合が制御されていると考えられる。さらにいえば、硫酸化のパターンによりHS糖鎖の生物機能が規定されている^{3,9,14)}。特に、HS糖鎖のグルコサミン残基6位の硫酸化は多くのリガンドタンパク質のHS糖鎖結合に必須であることが報告されている。

6位の硫酸化はスルフトランスフェラーゼ (HS6ST-1, HS6ST-2, HS6ST-3) によりゴルジ体で合成される⁹⁾。この6位の硫酸化を特異的に分解する酵素、細胞外スルファターゼ Sulf-1, Sulf-2 が2001年から2002年にかけて報告された¹⁵⁻¹⁷⁾。硫酸化された後に細胞外でその硫酸基を遊離するという、新規酵素的分解メカニズムの発見とHS糖鎖の細胞外における機能制御という全く新しい分野が登場した。以下、これら Sulf-1, Sulf-2 のクローニングおよび生物機能に関して現在までに明らかになっている事項を総説としてまとめる。

2. 新規細胞外スルファターゼ Sulf の発見

2-1. スルファターゼファミリー

スルファターゼは様々な分子の硫酸エステル結合を加水分解する酵素である。現在までにヒトでは17種のスルファターゼ遺伝子が確認されており、多くはリソソームに局在する¹⁸⁾。リソソーム局在スルファターゼ群は、酸性条件下においてヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸およびケラタン硫酸といったGAGや硫酸化糖脂質などを連続的に代謝分解する。また、ヒドロキシステロール硫酸を加水分解するステロールスルファターゼは、ミクロソームに局在する膜結合型のタンパク質である。小胞体やゴルジ体に局在するスルファターゼも存在する¹⁸⁾。

2-2. QSulf-1 の発見

Dhootらはウズラ胚の体節よりソニックヘッジホッグ (Shh) 応答遺伝子として QSulf-1 遺伝子をクローニングした¹⁵⁾。QSulf-1 mRNAは、ウズラ胚発生期の体節、神経基板、神経管腹側部、脊索において高レベルで検出される。アンチセンスを用いた Shh 遺伝子発現阻害により QSulf-1 の筋分化時期の体節および神経管における発現がブロックされた。QSulf-1 が体節および神経管における Shh 応答遺伝子であることが明らかにされた。また、QSulf-1 遺伝子の発現阻害により筋分化調節因子 MyoD の発現が選択的に阻害された。MyoD 遺伝子発現が Wnt シグナル依存性であることから、QSulf-1 は Wnt シグナルを正に制御する因子であると予想された。Dhootらは C2C12 筋芽細胞株

および TCF (T cell factor) 転写因子応答ルシフェラーゼアッセイを用いて, QSulf-1 が Wnt シグナル制御因子であることを確認した¹⁵⁾. Sulf-1 タンパク質は, HS, ヘパリン, ケラタン硫酸糖鎖の非還元末端グルコサミンの 6 位の硫酸基に作用する酵素であるリソソーム局在型スルファターゼ (G6S) と高い相同性を有する領域をもっていた. また一連のリソソーム局在型スルファターゼとは異なり, QSulf-1 はその発現細胞の細胞表面に局在した. QSulf-1 が細胞表面 HSPG に結合する Wnt を脱硫酸化により遊離させ, Wnt シグナルを正に制御することが示唆された. 現在においてこの生理機能は細胞外スルファターゼ Sulf の最も良く検証された機能の一つであり, 後に述べる病態研究においても重要となる. Dhoot らに続いて, ラットの QSulf-1 相同遺伝子 *RSulfFP1* が報告された¹⁶⁾. しかしながら, QSulf-1, *RSulfFP1* いずれにおいてもスルファターゼ活性を有することは示されなかった.

2-3. HSulf-1, HSulf-2 の発見と細胞外スルファターゼ活性

筆者が在籍していたカリフォルニア大学サンフランシスコ校 Steven Rosen 研究室では上記と全く異なるアプローチにより Sulf 遺伝子の発見とクローニングを行った¹⁷⁾. L-セレクチンと呼ばれる細胞表面分子は, レクチンの一種で糖鎖を認識する¹⁹⁾. この認識糖鎖構造は, 6 位が硫酸化されたグルコサミンを含むシアリル 6-スルフォリス X 構造である. この硫酸化を担うスルフトランスフェラーゼ

は GlcNAc6ST-1, GlcNAc6ST-2 である²⁰⁻²²⁾. Rosen 研究室ではこのシアリル 6-スルフォリス X の 6 位の硫酸基を細胞外で分解し L-セレクチンの認識を制御する機構があるのではないかという仮説を立て, その細胞外分解酵素を探索していた. その過程で従来のリソソーム局在型スルファターゼとは異なるタンパク質をコードする遺伝子を 2 種, ヒトとマウスにおいて同定した¹⁷⁾. それぞれ, ヒトおよびマウスの脳, 心臓, 肺, 子宮, 精巣など各種臓器において mRNA レベルで発現が確認された^{17,23)}. 我々は 2 種の遺伝子にコードされるタンパク質が強制発現 CHO 細胞の培養上清に分泌されることを明らかにした. 分泌されたタンパク質はともに 4-メチルウンベリフェリル硫酸 (4-MUS, 細胞内局在スルファターゼの活性測定に広く用いられる基質) に対してアリルスルファターゼ活性を示した. 他のほとんどのスルファターゼと異なり, 酵素活性に対する至適 pH が中性であることはこの酵素が細胞外で働くことを強く支持した¹⁷⁾. 予想とは異なり L-セレクチン認識糖鎖はこれらの酵素により分解されなかったが, 陰イオン交換カラム高速液体クロマトグラフィーおよび各種 GAG 糖鎖を用いたアッセイ法から, これら 2 種のタンパク質が細胞外に分泌されるヘパリン/HS 糖鎖を基質とするエンド型 (糖鎖内部の硫酸基に働く) スルファターゼであることを突き止めた. さらに詳しく解析した結果, HS 糖鎖「S-ドメイン」の IdoA2S-GlcNS6S 単位の 6 位硫酸基を遊離する活性をもつことを明らかにした (図 2). 我々及び他の

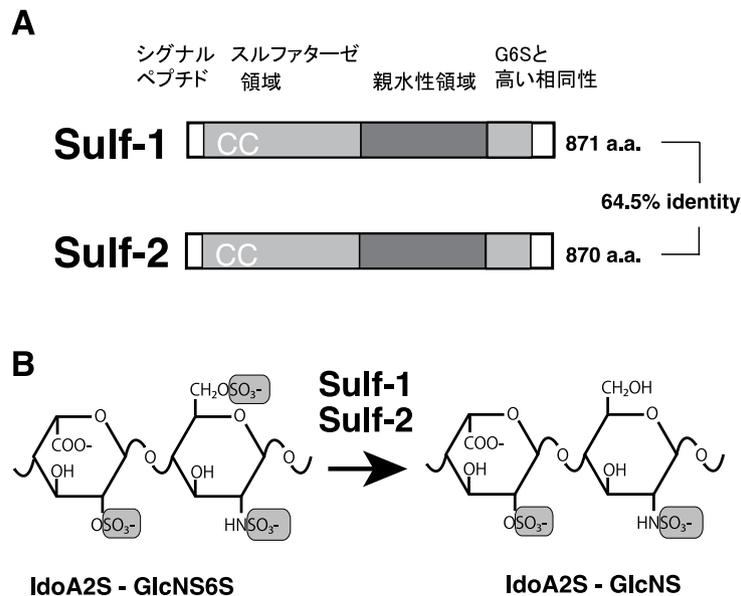


図 2 細胞外スルファターゼ Sulf の構造と酵素反応様式

A. ヒト Sulf-1, Sulf-2 を示す. スルファターゼ活性に必須であるシステイン残基 (CC) は Sulf-1 および Sulf-2 で保存されている. G6S: リソソーム局在型グルコサミン 6 スルファターゼ. B. Sulf-1, Sulf-2 は HS 糖鎖内部「S-ドメイン」の IdoA2S-GlcNS6S 二糖の 6 位硫酸基を遊離する^{17,36,63)}.

グループのその後の解析から、GlcA/IdoA-GlcNS6S 単位の6位硫酸基を遊離する活性も保持することが明らかにされた²⁴⁻²⁶⁾。2種のうち一つは *QSulf-1* の相同遺伝子としてヒト遺伝子を *HSulf-1*、マウス遺伝子を *MSulf-1*、と名付けた。また、もう一つは全く新しいファミリー遺伝子としてそれぞれ *HSulf-2*、*MSulf-2* と命名した¹⁷⁾。

2-4. Sulf の構造とプロセシング：pre-pro-protein

QSulf-1 や RSulfFP1 の構造と同様に、予想されたヒトおよびマウスの Sulf-1, Sulf-2 は 870-875 アミノ酸 (a.a.) であった (図2)。両 Sulf は N 末端に 22-27 a.a. のシグナルペプチド、リソソーム局在スルファターゼ群と相同性をもつ約 370 aa のスルファターゼ領域、約 320 aa の親水性領域 (以下、HD 領域) およびヒト G6S と高い相同性をもつ約 100 aa の C 末端領域を有していた (図2)。Sulf-1, Sulf-2 のアミノ酸配列はそれぞれ、ヒト及びマウス種間で非常に高い相同性があった (93-94%)。Sulf-1 および Sulf-2 の間では 63-65% のアミノ酸配列が一致している。両 Sulf のスルファターゼ領域には真核生物の全スルファターゼに共通するシステイン残基が含まれていた^{15,17)}。このシステイン残基は sulfatase modifying factor 1 により α -ホルミルグリシンに変換されスルファターゼ活性に必須である^{27,28)}。Sulf-1 および Sulf-2 は「pre-pro-protein」として生合成され

た後、シグナルペプチドが切断されて、約 125 kDa の「pro-protein」となる (図3)。その後、furin プロテアーゼ²⁹⁾ により HD 領域内でプロセシングされ 75 kDa と 50 kDa のフラグメントとなる^{17,30,31)}。さらに、これらのフラグメントはジスルフィド結合により結合する。ヒトおよびマウス両 Sulf はこれらプロセシングを受け、細胞表面または細胞外に分泌される^{17,30,32)}。一方、ウズラの Sulf は細胞表面に局在し、細胞外に分泌されない^{15,33)}。この種間の違いがなぜ起きるのかは明らかになっていない。

Sulf の HD 領域は Sulf タンパク質の細胞表面局在においても重要な働きをする^{30,33,34)}。この細胞表面相互作用は塩濃度により可逆的である^{17,30)}。ヒト Sulf-1, Sulf-2 は脂質ラフトに濃縮されており³⁰⁾、細胞外に分泌された活性型 Sulf は超高速遠心によりベレットとして回収できることが明らかにされた³²⁾。大変興味深いことに、furin によるプロセシングは Sulf の 4-MUS を基質とするアシルスルファターゼ活性、ヘパリン/HS 糖鎖を基質とするエンドスルファターゼ活性のいずれにも必須ではないが脂質ラフトへの局在には必要である³⁰⁾。脂質ラフトにおける各種タンパク質の会合が、多くのシグナル伝達において重要なことから、Sulf プロセシングがヘパリン結合性因子シグナル調節機能に深く関わることを示された。

3. 新規細胞外スルファターゼ Sulf の生物機能

3-1. Sulf によるリガンドタンパク質-HS 分子間相互作用の調節：bioavailability の制御

現在までに、Sulf が多くのタンパク質リガンドのヘパリンまたは HS 糖鎖への結合を調節していることが明らかにされている^{25,26,35-37)}。中でも Sulf-2 に関して詳しく調べられている^{35,36)}。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 165, 線維芽細胞増殖因子 (FGF)-1, SDF-1/CXCL12, SLC/CCL21 の固層化ヘパリンへの結合が、リコンビナントまたはネイティブの HSulf-2 前処理により、消失または減少する³⁵⁾。VEGF165, FGF-1 に対する作用はグルコサミン 6 位の硫酸基がそれら因子の結合に重要であるという以前の報告によく合致した。他のリガンド分子に関しては、6 位硫酸基の重要性が新たな知見となった。さらに、HSulf-2 が固層化ヘパリンに結合したこれらリガンド分子を結合複合体より遊離する作用をもつことが示された³⁵⁾。すなわち、細胞表面や細胞外マトリックスの HSPG に隔離又は貯留 (sequestration) されているリガンド分子を Sulf が遊離させ、その受容体を発現する細胞への作用を促進するメカニズムの存在が示唆された。実際、HSulf-2 は *in vivo* で血管新生を促す³⁸⁾。HSPG に貯留された血管新生因子 (例えば VEGF165) を遊離させ、その生物学的利用率 (bioavailability) を増加させた結果であることが予想された。

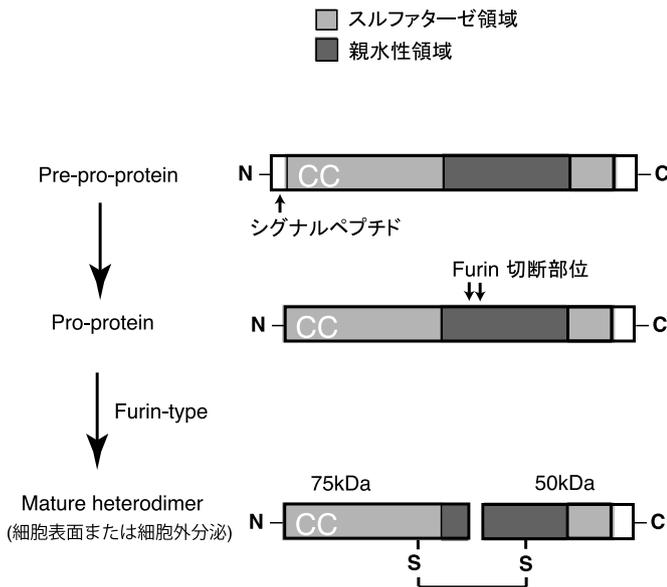


図3 細胞外スルファターゼ Sulf のプロセシング

ヒト Sulf-1, Sulf-2 (HSulf-1, HSulf-2) はシグナルペプチドをもつ「pre-pro-protein」として生合成される。小胞体においてシグナルペプチドが切断され「pro-protein」となる。親水性 (HD) 領域内に存在する furin プロテアーゼ部位においてプロテアーゼ切断を受け、75 kDa, 50 kDa のフラグメントが生成される。これらはジスルフィド結合によりヘテロ二量体となり細胞外へ分泌されるか細胞表面に局在する。プロテアーゼ切断は Sulf のスルファターゼ活性に影響を与えないが、Sulf の脂質ラフトへの局在および Wnt シグナル伝達促進作用には必須である³⁰⁾。本文参照。文献 60) より改変。

3-2. Sulfによる細胞レベルでのHS結合性因子シグナルの正の制御：Wnt, BMP, GDNF

QSulf-1 遺伝子発見の項で述べたように、Wnt 応答性細胞に QSulf-1 を発現させると、Wnt1 リガンドによるシグナル伝達が当該細胞で増強される¹⁵⁾。また、QSulf-1 は Wnt8 の HSPG への結合を調節する²⁵⁾。QSulf-1 で観察された結果は HSulf-1, HSulf-2 の Wnt リガンド (Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt4) に対する作用においても確認された^{30, 39)}。Ai らは図 4 に示すモデルを提唱している。Sulf-1 を発現していない細胞では、Wnt リガンドは細胞表面 HSPG 上の HS 鎖と強固に結合し捕捉されているため、その Frizzled 受容体との機能的な相互作用が困難である。そのため Wnt シグナル伝達が抑えられていると考えられる。一方、Sulf-1 を発現する細胞では Sulf-1 により HS 鎖の 6-硫酸が分解され、HS 鎖に結合している Wnt と HS 鎖との親和性が低下する。その結果、Wnt の Frizzled への結合が促され、Wnt-HS-Frizzled の三量体が構成されると考えられる。最終的に Wnt 下流のシグナルが活性化され、Wnt 標的遺伝子の転写が誘導される (図 4)。同じようなアプローチにより、Sulf の骨形成因子 (BMP)-4²⁰⁾ およびグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) のシグナル伝達促進作用が明らかとなった^{37, 40)}。BMP の機能を阻害するアンタゴニストである Noggin は BMP と結合し、BMP とその受容体との相互作用を阻害する。また、Noggin の細胞表面からの放出および拡散は、HS 鎖により調節されており、Noggin は HS 糖鎖 S-ドメインの硫酸基を介して HS 鎖に結合する²⁶⁾。Sulf は HS 糖鎖 S-ドメインの IdoA2S-GlcNS6S 単位の 6 位硫酸基を分解することから、Sulf により Noggin が HS 鎖から遊離される可能性について培養細胞を用いて詳細に検討された。QSulf-1 の過剰発現により細胞表面に結合している

Noggin 量が減少し、BMP シグナルの下流に存在する SMAD のリン酸化が促進されることが明らかとなった²⁶⁾。すなわち、HS 糖鎖との結合により Noggin が細胞表面に限局されている場合は、BMP は細胞表面の Noggin に強固に捕捉され、その受容体との相互作用が阻害されると示唆された。一方、Sulf により Noggin の細胞表面での限局が崩れると、BMP のその受容体への到達 (accessibility) が容易となり、BMP シグナルの活性化が起こると考えられた。Sulf-1 が Noggin の放出および拡散をコントロールすることにより、BMP シグナルの受容を細胞レベルで選択している可能性が強く示唆された。

3-3. Sulfによる細胞レベルでのHS結合性因子シグナルの負の制御：HB-EGF, FGF-2, HGF

Sulf により正に制御される上記リガンド分子とは対照的に、ヘパリン結合性上皮成長因子様増殖因子 (HB-EGF)、FGF-2、肝細胞増殖因子 (HGF) のシグナル伝達は Sulf 発現細胞で負に制御される^{41~47)}。Sulf-1 強制発現細胞をヘパリン結合性増殖因子である HB-EGF で処理すると、HB-EGF 受容体のリン酸化およびそのシグナルカスケードの下流に存在する MAPK/ERK (mitogen activated protein kinase/extracellular signaling regulated protein kinase) のリン酸化レベルが、対照細胞に比べて減少する⁴¹⁾。同じくヘパリン結合性増殖因子である FGF-2 や HGF で処理した場合も、HB-EGF で処理した場合と同様にそのシグナル伝達の下流に存在する MAPK/ERK のリン酸化レベルは減少する^{43, 45, 46)}。これに対し、ヘパリンと結合しない上皮成長因子 (EGF) で細胞を処理しても EGF 受容体のリン酸化や MAPK/ERK のリン酸化レベルは、Sulf-1 強制発現細胞と対照細胞で同じである⁴¹⁾。細胞表面におけるリガンド-HS-受容体の三量体形成 (FGF2-HS-FGFR1) を困難にするこ

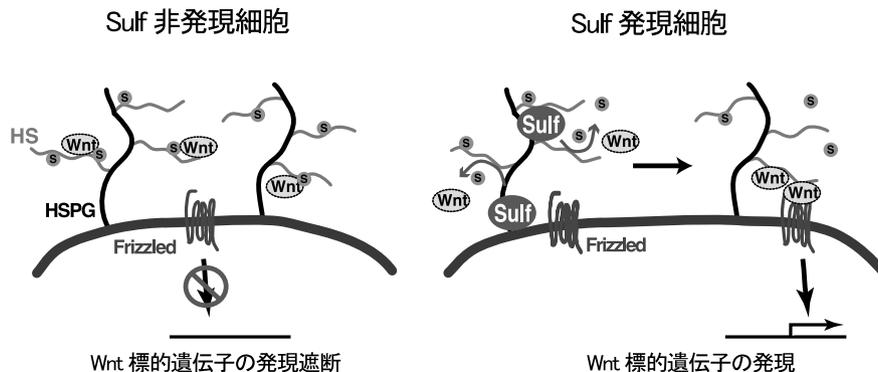


図 4 SulfによるWntシグナルの制御モデル

Sulf 発現細胞では、Sulf が HS 鎖 S-ドメインの 6 位硫酸基を遊離し、HS 鎖 S-ドメインを介して結合している Wnt の HS 鎖への親和性を低下させる。Wnt の Frizzled への結合が促され、Wnt-HS-Frizzled の三量体が構成されると推測される。Wnt 下流のシグナルが活性化され、Wnt 標的遺伝子の転写が誘導される。HSPG (グリピカン) とその硫酸化が Wnt のシグナル伝達に関わるという以前の報告はこのモデルを支持する^{64, 65)}。本文参照。文献 25) より改変。

とにより, Sulf-1 は細胞内への増殖シグナルの減少を誘導している可能性が示唆された. グルコサミンの6位硫酸化は FGF-2-HS 糖鎖ではなく FGFR1-HS 糖鎖の結合に必要であるため, Sulf は後者の分子間相互作用を調節する可能性がある. Sulf-1 が HS 糖鎖リモデリングにより受容体自身による阻害を促進する可能性も検討しなければいけない⁴⁸⁾. *MSulf-1*, *MSulf-2* 遺伝子欠損マウスより調製した胚線維芽細胞において FGF-2 によるシグナル伝達と細胞分裂が野生型に比べて増加する結果は, 上記仮説をよく支持した^{49,50)}.

3-4. Sulf の生体内における役割: Sulf ノックアウトマウスの表現型

既に述べたように, Sulf-1 は Wnt 依存的な筋組織の発生に関わる¹⁵⁾. しかしながら, 両 Sulf-1, Sulf-2 は胚発生時の Wnt シグナルに必須とはいえない. このことはマウスにおいて明らかである. Wnt リガンド分子の遺伝子欠損では胎生致死または出生直後の死亡が観察される (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>). しかし, *Sulf-1* または *Sulf-2* 単独の遺伝子ノックアウトでは, ほとんどの場合わずかな異常が発生時に観察されるのみである^{37,49-51)}. ジーントラップ法による *Sulf-2* 遺伝子ノックアウトでは, 胎仔マウスの生育が遅れ, 出生後の体重の減少と肺の異常が一部のマウスで観察される⁵¹⁾. 胎生致死に至った *Sulf-2* 遺伝子ノックアウトマウスは脳機能不全と関連する⁵²⁾. *Sulf-1* および *Sulf-2* の両遺伝子欠損では, 約 50% の出生直後の死亡が観察されるが残りのマウスは成体まで成長する^{37,49,50)}. 胎生致死でない *Sulf-1*, *Sulf-2* 両遺伝子欠損マウスは野生型に比べて体格が小さいが, いずれの臓器も組織レベルでの異常はみられない⁵⁰⁾. 一方, *Sulf* 両遺伝子欠損マウスのわずかな骨格形成異常が報告された^{53,54)}. *Sulf-1*, *Sulf-2* 両遺伝子欠損マウスの表現型で最も詳しく解析されているのが摂食障害である³⁷⁾. Ai らは *Sulf* 両遺伝子欠損マウスの食道における平滑筋への神経分布の異常を観察し, そのことが筋収縮能の障害を引き起こしていると結論づけた. すなわち, 両 Sulf が筋組織への神経分布における GDNF を介したシグナル伝達を増加させていることを明らかにした³⁷⁾. さらに Ai らは, 精巣セルトリ細胞が発現する Sulf-1 および Sulf-2 が, GDNF シグナル伝達で制御される精子形成幹細胞自己複製を量的に規定していることを明らかにした⁴⁰⁾ (図 5). また, Sulf-1 および Sulf-2 が筋サテライト細胞の FGF-2 依存性増殖を抑え, 筋細胞への分化を誘導し筋再生を促していることが, *Sulf* 両遺伝子欠損マウスより明らかとなった⁵⁵⁾. いずれの場合も *Sulf-1* または *Sulf-2* 単独の遺伝子ノックアウトでは異常がみられない. どちらか一方の Sulf が, HS 糖鎖スルファターゼ酵素活性レベルで補償作用を示すのか, または機能的な補償作用を示すのか明らかにする必要がある.

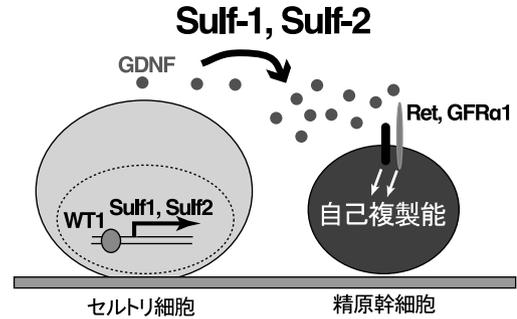


図 5 Sulf による GDNF シグナルの制御モデル

精巣セルトリ細胞 (Sertoli cell) より発現される Sulf-1, Sulf-2 が HS 鎖 S-ドメインを介し細胞表面や細胞外マトリックスに貯留, 隔離 (sequestration) されている GDNF を HS 鎖 S-ドメイン分解によりリリースさせる. 結果的に精子形成幹細胞 (spermatogonial stem cell) への GDNF 生物学的利用率 (bioavailability) を増大させる. 精子形成幹細胞が発現する Ret および GFR α 1 を介したシグナル伝達が正に制御される. 精巣セルトリ細胞における Sulf-1, Sulf-2 の遺伝子発現は WT1 転写因子により調節される^{40,66)}. 本文参照. 文献 40) より改変.

さらに, ヘパラン硫酸 6-硫酸転移酵素¹⁰⁾のグルコサミン 6 位の硫酸化亢進による代償作用の有無も検討しなければならない. また, もう一つの解釈として, Sulf は *in vitro* では多くのシグナル伝達系を制御する潜在的な作用を示すが, 正常な個体発生においては Sulf の作用は根本的に不可欠なものではなく, シグナル伝達の強度を微調整するファインチューナーの役割を担っているのかもしれない. さらに詳しい解析が必要である.

4. 新規細胞外スルファターゼ Sulf の病態への関与: Sulf のがんにおける発現調節不全

HSulf-1, *HSulf-2* のクローニング後, 我々はがんにおける Sulf の関与を明らかにするため SAGE (serial analysis of gene expression, 連続的遺伝子発現解析) 法を行った. SAGE 法とは, それぞれの mRNA から 10-11bp の遺伝子配列 (タグ) を抽出し作成したライブラリーをもとに, 組織における mRNA 発現量を定量する方法である. ライブラリーにおける特定遺伝子に対応するタグの出現数は, 組織でのその遺伝子の発現量を表している. ライブラリーのタグの総数に対する出現した特定遺伝子タグ数の割合を計算することによって, 発現頻度を求めることができる. *HSulf-2* 遺伝子 (*SULF2*) に関して, タグの発現頻度は 3 種のがん, すなわち乳がん, 中枢神経系がん, 大腸がんにおいてその正常組織と比較した場合著しく高かった. そのタグの発現頻度は腫瘍組織において 6-8 倍増加している. *HSulf-1* 遺伝子 (*SULF1*) に関しては, より少ないタグ数ではあったが乳がんと中枢神経系がんにおいてその発現頻度は高くなっていった²³⁾. これらの結果は Sulf のがんへの関与の最初のヒントとなった. その後, ヒト乳がんにおける *SULF1*, *SULF2* の発現上昇が確認された³⁸⁾. 引き続きマ

ウスの乳がんモデルである MMTV-Neu マウスおよび MMTV-Wnt1 マウスを解析した結果, Sulf-2 は正常乳腺組織では検出されないが, 過形成乳腺および乳腺腫瘍ではその発現が観察された³⁸⁾. 上記に加え, 現在までに定量 PCR またはマイクロアレイ解析によりヒトがんにおける *SULF1*, *SULF2* の発現上昇が広く報告されている. 例えば, *SULF1* は肝細胞がん⁴³⁾, 膵臓がん⁴⁵⁾, 頭頸部扁平上皮がん⁵⁶⁾, 胃がん⁵⁷⁾, 肺腺がん⁵⁸⁾, 肺扁平上皮がん⁵⁸⁾ で発現が増加している. *SULF2* は, 肝細胞がん⁵⁹⁾, 肺腺がん⁵⁸⁾, 肺扁平上皮がん⁵⁸⁾ で発現が増加している. 公開されているマイクロアレイ解析データベース Oncomine (www.oncomine.com) を用いて, 正常組織と腫瘍組織における発現レベルを解析すると, 有為差 ($p < 0.0001$) を伴う変動のうち, *SULF1* は 30 の比較例で 3–60 倍の発現増加が確認される. 2 例の比較においてのみ発現減少がみられる. *SULF2* は有為差 ($p < 0.0001$) を伴う変動 9 例全てにおいて 2–8 倍の発現増加が確認された. 比較例の詳細は文献 60) に記載されている. また, レトロウイルスを用いたマウス挿入変異誘発システムの解析から, *Sulf-2* が神経膠腫において発がん性遺伝子の一つであることが明らかにされた⁶¹⁾. 大変興味深いことに, 上述の Oncomine の *SULF2* 解析結果 9 例のうち 5 例はヒト神経膠腫である⁶⁰⁾.

5. おわりに

Wnt, BMP, GDNF, FGF などのシグナル伝達が中心となる疾患において, Sulf-1 と Sulf-2 の疾患の発症や進行への関与が明らかになってきている. Otsuki らは, ヒト変形性骨関節炎における関節軟骨で Sulf-1, Sulf-2 の mRNA 及びタンパク質が正常軟骨に比べて発現増加することを示した. その後, ヒト軟骨細胞および *Sulf-1* または *Sulf-2* 遺伝子欠損マウスを用いて, 変形性骨関節症における Sulf の役割を明確に示した. すなわち, Sulf-1, Sulf-2 は BMP7 シグナルを増強させ, FGF2 シグナルを減弱させることにより, 関節軟骨における恒常性維持を担っている⁵⁴⁾. このバランスが破綻すると軟骨の変性が誘発されると示唆された. さらに, 加齢に伴って関節軟骨における Sulf-1, Sulf-2 の発現が増加することを示した⁶²⁾. 加齢は多くのヒト疾患においてリスクファクターとなっており, Sulf の加齢に伴い発症する他の疾患 (例えばアルツハイマー型認知症) への関与があるかもしれない. 我々はある種の神経変性疾患における Sulf-2 と HS 糖鎖 S-ドメインの発現調節不全を見出し, 今後この分野における HS 糖鎖と Sulf の機能解明に貢献できればと願っている.

謝辞

本稿で取り上げた筆者らの研究報告はカリフォルニア大学サンフランシスコ校 Steven Rosen 教授との共同研究に

よるものであり, この場を借りてお礼申し上げます.

文 献

- 1) Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., & Kjellen, L. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 24979–24982.
- 2) Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., & Zako, M. (1999) *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 729–777.
- 3) Bishop, J.R., Schuksz, M., & Esko, J.D. (2007) *Nature*, **446**, 1030–1037.
- 4) Esko, J.D. & Selleck, S.B. (2002) *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 435–471.
- 5) Gallagher, J.T. (2001) *J. Clin. Invest.*, **108**, 357–361.
- 6) Iozzo, R.V. (2001) *J. Clin. Invest.*, **108**, 165–167.
- 7) Sugahara, K. & Kitagawa, H. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 518–527.
- 8) Yan, D. & Lin, X. (2009) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a002493.
- 9) Habuchi, H., Habuchi, O., & Kimata, K. (2004) *Glycoconj. J.*, **21**, 47–52.
- 10) Habuchi, O. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1474**, 115–127.
- 11) Esko, J.D. & Lindahl, U. (2001) *J. Clin. Invest.*, **108**, 169–173.
- 12) Nakato, H. & Kimata, K. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1573**, 312–318.
- 13) Lamanna, W.C., Kalus, I., Padva, M., Baldwin, R.J., Merry, C. L., & Dierks, T. (2007) *J. Biotechnol.*, **129**, 290–307.
- 14) Lee, J.S. & Chien, C.B. (2004) *Nat. Rev. Genet.*, **5**, 923–935.
- 15) Dhoot, G.K., Gustafsson, M.K., Ai, X., Sun, W., Standiford, D. M., & Emerson, C.P., Jr. (2001) *Science*, **293**, 1663–1666.
- 16) Ohto, T., Uchida, H., Yamazaki, H., Keino-Masu, K., Matsui, A., & Masu, M. (2002) *Genes Cells*, **7**, 173–185.
- 17) Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S., & Rosen, S.D. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 49175–49185.
- 18) Diez-Roux, G. & Ballabio, A. (2005) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **6**, 355–379.
- 19) Rosen, S.D. (2004) *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 129–156.
- 20) Uchimura, K., Gauguet, J.M., Singer, M.S., Tsay, D., Kannagi, R., Muramatsu, T., von Andrian, U.H., & Rosen, S.D. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 1105–1113.
- 21) Uchimura, K. & Rosen, S.D. (2006) *Trends Immunol.*, **27**, 559–565.
- 22) Kawashima, H., Petryniak, B., Hiraoka, N., Mitoma, J., Huckaby, V., Nakayama, J., Uchimura, K., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Lowe, J.B., & Fukuda, M. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 1096–1104.
- 23) Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., & Rosen, S.D. (2003) *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **15**, 159–164.
- 24) Saad, O.M., Ebel, H., Uchimura, K., Rosen, S.D., Bertozzi, C. R., & Leary, J.A. (2005) *Glycobiology*, **15**, 818–826.
- 25) Ai, X., Do, A.T., Lozynska, O., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., & Emerson, C.P., Jr. (2003) *J. Cell. Biol.*, **162**, 341–351.
- 26) Viviano, B.L., Paine-Saunders, S., Gasiunas, N., Gallagher, J., & Saunders, S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 5604–5611.
- 27) Cosma, M.P., Pepe, S., Annunziata, I., Newbold, R.F., Grompe, M., Parenti, G., & Ballabio, A. (2003) *Cell*, **113**, 445–456.
- 28) Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L.V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M., & von Figura, K. (2003) *Cell*, **113**, 435–444.
- 29) Nakayama, K. (1997) *Biochem. J.*, **327**, 625–635.

- 30) Tang, R. & Rosen, S.D. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 21505–21514.
- 31) Nagamine, S., Keino-Masu, K., Shiomi, K., & Masu, M. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**, 107–112.
- 32) Hossain, M.M., Hosono-Fukao, T., Tang, R., Sugaya, N., van Kuppevelt, T.H., Jenniskens, G.J., Kimata, K., Rosen, S.D., & Uchimura, K. (2010) *Glycobiology*, **20**, 175–186.
- 33) Ai, X., Do, A.T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., Lu, K., & Emerson, C.P., Jr. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 4969–4976.
- 34) Frese, M.A., Milz, F., Dick, M., Lamanna, W.C., & Dierks, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 28033–28044.
- 35) Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., Bistrup, A., Li, J., Lyon, M., Gallagher, J., Werb, Z., & Rosen, S.D. (2006) *BMC Biochem.*, **7**, 2.
- 36) Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., & Rosen, S.D. (2006) *Methods Enzymol.*, **416**, 243–253.
- 37) Ai, X., Kitazawa, T., Do, A.T., Kusche-Gullberg, M., Labosky, P.A., & Emerson, C.P., Jr. (2007) *Development*, **134**, 3327–3338.
- 38) Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Bistrup, A., Lum, D.H., Egeblad, M., Boudreau, N., Werb, Z., & Rosen, S.D. (2005) *Neoplasia*, **7**, 1001–1010.
- 39) Nawroth, R., van Zante, A., Cervantes, S., McManus, M., Hebrok, M., & Rosen, S.D. (2007) *PLoS ONE*, **2**, e392.
- 40) Langsdorf, A., Schumacher, V., Shi, X., Tran, T., Zaia, J., Jain, S., Taglienti, M., Kreidberg, J.A., Fine, A., & Ai, X. (2010) *Glycobiology*, **21**, 152–161.
- 41) Lai, J., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Greene, E.L., Matthews, T.A., Smith, D. I., Kaufmann, S.H., Roberts, L.R., & Shridhar, V. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 23107–23117.
- 42) Lai, J.P., Chien, J., Strome, S.E., Staub, J., Montoya, D.P., Greene, E.L., Smith, D.I., Roberts, L.R., & Shridhar, V. (2004) *Oncogene*, **23**, 1439–1447.
- 43) Lai, J.P., Chien, J.R., Moser, D.R., Staub, J.K., Aderca, I., Montoya, D.P., Matthews, T.A., Nagorney, D.M., Cunningham, J.M., Smith, D.I., Greene, E.L., Shridhar, V., & Roberts, L.R. (2004) *Gastroenterology*, **126**, 231–248.
- 44) Dai, Y., Yang, Y., MacLeod, V., Yue, X., Rapraeger, A.C., Shriver, Z., Venkataraman, G., Sasisekharan, R., & Sanderson, R.D. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 40066–40073.
- 45) Li, J., Kleeff, J., Abiatari, I., Kayed, H., Giese, N.A., Felix, K., Giese, T., Buchler, M.W., & Friess, H. (2005) *Mol. Cancer*, **4**, 14.
- 46) Wang, S., Ai, X., Freeman, S.D., Pownall, M.E., Lu, Q., Kessler, D.S., & Emerson, C.P., Jr. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4833–4838.
- 47) Narita, K., Staub, J., Chien, J., Meyer, K., Bauer, M., Friedl, A., Ramakrishnan, S., & Shridhar, V. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 6025–6032.
- 48) Schlessinger, J. (2003) *Science*, **300**, 750–752.
- 49) Lamanna, W.C., Baldwin, R.J., Padva, M., Kalus, I., Ten Dam, G., van Kuppevelt, T.H., Gallagher, J.T., von Figura, K., Dierks, T., & Merry, C.L. (2006) *Biochem. J.*, **400**, 63–73.
- 50) Holst, C.R., Bou-Reslan, H., Gore, B.B., Wong, K., Grant, D., Chalasani, S., Carano, R.A., Frantz, G.D., Tessier-Lavigne, M., Bolon, B., French, D.M., & Ashkenazi, A. (2007) *PLoS ONE*, **2**, e575.
- 51) Lum, D.H., Tan, J., Rosen, S.D., & Werb, Z. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 678–688.
- 52) Kalus, I., Salmen, B., Viebahn, C., von Figura, K., Schmitz, D., D'Hooge, R., & Dierks, T. (2008) *J. Cell. Mol. Med.*, **13**, 4505–4521.
- 53) Ratzka, A., Kalus, I., Moser, M., Dierks, T., Mundlos, S., & Vortkamp, A. (2008) *Dev. Dyn.*, **237**, 339–353.
- 54) Otsuki, S., Hanson, S.R., Miyaki, S., Grogan, S.P., Kinoshita, M., Asahara, H., Wong, C.H., & Lotz, M.K. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10202–10207.
- 55) Langsdorf, A., Do, A.T., Kusche-Gullberg, M., Emerson, C.P., Jr., & Ai, X. (2007) *Dev. Biol.*, **311**, 464–477.
- 56) Kudo, Y., Ogawa, I., Kitajima, S., Kitagawa, M., Kawai, H., Gaffney, P.M., Miyauchi, M., & Takata, T. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 6928–6935.
- 57) Junnila, S., Kokkola, A., Mizuguchi, T., Hirata, K., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Puolakkainen, P., & Monni, O. (2010) *Genes Chromosomes Cancer*, **49**, 28–39.
- 58) Lemjabbar-Alaoui, H., van Zante, A., Singer, M.S., Xue, Q., Wang, Y.Q., Tsay, D., He, B., Jablons, D.M., & Rosen, S.D. (2010) *Oncogene*, **29**, 635–646.
- 59) Lai, J.P., Sandhu, D.S., Yu, C., Han, T., Moser, C.D., Jackson, K.K., Guerrero, R.B., Aderca, I., Isomoto, H., Garrity-Park, M. M., Zou, H., Shire, A.M., Nagorney, D.M., Sanderson, S.O., Adjei, A.A., Lee, J.S., Thorgeirsson, S.S., & Roberts, L.R. (2008) *Hepatology*, **47**, 1211–1222.
- 60) Rosen, S.D. & Lemjabbar-Alaoui, H. (2010) *Expert Opin. Ther. Targets*, **14**, 935–949.
- 61) Johansson, F.K., Brodd, J., Eklof, C., Ferletta, M., Hesselager, G., Tiger, C.F., Uhrbom, L., & Westermark, B. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11334–11337.
- 62) Otsuki, S., Taniguchi, N., Grogan, S.P., D' Lima, D., Kinoshita, M., & Lotz, M. (2008) *Arthritis Res. Ther.*, **10**, R61.
- 63) Uchimura, K., Lemjabbar-Alaoui, H., van Kuppevelt, T.H., & Rosen, S.D. (2010) *Methods Enzymol.*, **480**, 51–64.
- 64) Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V., Siegfried, E., Stam, L., & Selleck, S.B. (1999) *Nature*, **400**, 276–280.
- 65) Lin, X. & Perrimon, N. (1999) *Nature*, **400**, 281–284.
- 66) Ratelade, J., Arrondel, C., Hamard, G., Garbay, S., Harvey, S., Biebuyck, N., Schulz, H., Hastie, N., Pontoglio, M., Gubler, M. C., Antignac, C., & Heidet, L. (2010) *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 1–15.