

- 14) Geisbrecht, E.R. & Montell, D.J. (2004) *Cell*, 118, 111–125.  
 15) Kanuka, H., Kuranaga, E., Takemoto, K., Hiratou, T., Okano, H., & Miura, M. (2005) *EMBO J.*, 24, 3796–3806.

倉永 英里奈, 三浦 正幸  
 (東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室)

#### Non-classical caspase functions

Erina Kuranaga and Masayuki Miura (Department of Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

### 軟骨アグリカンとコンドロイチン硫酸合成機構

#### 1. はじめに

軟骨は、成人・成獣においては関節、鼻部、耳介等に局在し主として個体の運動機能を助ける一方、胎生期においては殆どの骨の原基として機能し骨格形成に重要な役割を果たしている。軟骨組織には血管と神経支配がなく、細胞成分としては軟骨細胞のみであり、その細胞外マトリックスは軟骨特有の分子群によって構成されている。軟骨の物理的特性はその特殊なマトリックスにあり、強力な保水作用と弾力性は特にヒアルロン酸とアグリカンによるものといえる。アグリカンの最大の特徴は大量のコンドロイチン硫酸 (CS) を含有する点であり、アグリカン以外の分子は、この特徴を持たない。軟骨組織の同定に CS の存在を示すアルシアンブルー等の染色法が用いられ、軟骨細胞の決定的指標としてアグリカンの発現が採用されているのはこのためである。変形性関節症等の軟骨破壊性疾患においてはアグリカンの分解が決定的過程と考えられ、アグリカナゼの生体内機能に関する研究が行われている。また、軟骨組織再生・組織工学分野ではアグリカンやヒアルロン酸と類似の物理的特性を持つ素材の開発やアグリカンを発現する軟骨細胞への分化機構の解明に向けた研究が行われている。アグリカンの分解機構、軟骨の再生医療・組織工学に関しては他稿に譲ることとし、本稿ではアグリカンに焦点を絞り、アグリカンの機能本体である CS の合成機構に関して最近我々が得た研究成果を含めて解説する。

#### 2. プロテオグリカン会合体<sup>1)</sup>

硝子軟骨の組成は水分が約 80%、コラーゲンが 12%、プロテオグリカンとヒアルロン酸が 2%、その他が約 6% である。乾燥重量で比較した総タンパク質における割合は II 型コラーゲンが約 60%、アグリカンが約 35% とされている。

軟骨マトリックスは II, IX, XI 型等軟骨特有のコラーゲンから成る線維成分とその間隙を埋めるヒアルロン酸、アグリカン等のプロテオグリカン群およびその他の糖タンパク質から構成されている。前者の線維成分が組織の基本骨格を構築して剛性を担う一方、後者は線維間に沈着して軟骨に独特の硝子様形態と弾力性を与えている。後者の主成分はアグリカンとヒアルロン酸で、これらの分子はリンクタンパク質 (link protein, LP) とともにプロテオグリカン会合体という一定の構造を形成して組織に沈着している。ヒアルロン酸 1 分子当たり 100 以上のアグリカンと LP が特異的に結合しており、会合体は  $10^8$ – $10^9$ Da に及ぶ (図 1 A)。

#### 3. アグリカンの球状ドメイン<sup>2)</sup>

アグリカンのコアタンパク質は G1, G2, G3 と呼ばれる三つの球状ドメインと二つのグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAG) 結合ドメインからなる。N 末端側の G1 と C 末端側の G3 ドメインが各々、他のマトリックス分子と特異的に結合することによってアグリカンは組織に安定に沈着し、中央のドメインに共有結合した GAG 鎖が局所で機能を発揮すると考えてよい。

N 末端側の G1 ドメインはヒアルロン酸および LP と特異的に結合する。これら 3 分子の特異的結合がアグリカン会合体の安定な沈着に必須である。LP は G1 ドメインと相同な分子で、LP と G1 ドメインは各々 A, B, B' の三つのサブドメインより成る (図 1B)。A サブドメインは Ig-フォールドの構造を取り、B および B' サブドメインは各々リンクモジュールという構造を取っている<sup>3)</sup>。リンクモジュールはヒアルロン酸と特異的に結合するモジュールとして知られ TSG6 や CD44 にも存在するが、LP と G1 ドメインにおいてはリンクモジュールが二つ隣り合わせに並ぶ点が特徴である。LP とアグリカン G1 においてはヒアルロン酸との結合の最小単位は B-B' であり、B あるいは B' 単独のリンクモジュールには結合能がない<sup>4)</sup>。A サブドメインは B-B' とヒアルロン酸との結合を補強する。アグリカンの G1 と LP とは A サブドメイン同士で結合する。

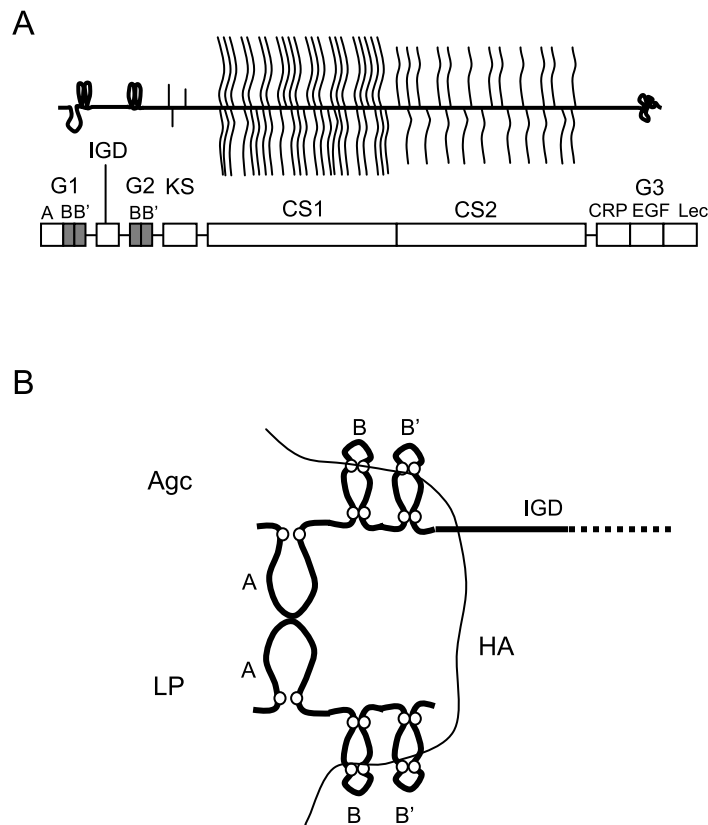


図1 A) アグリカン分子の模式図とコアタンパク質のドメイン. アグリカンコアタンパク質はG1, G2, G3の三つの球状ドメイン, interglobular domain (IGD), ケラタン硫酸ドメイン (KS), コンドロイチン硫酸 (CS) ドメインを持つ. CS ドメインはさらに CS1, CS2 に分けられる. B) アグリカン (Agc) のG1ドメイン, LP, ヒアルロン酸 (HA) の三者の結合.

この3者の特異的な結合はプロテオグリカン会合体のマトリックスへの安定な沈着に必須である<sup>5)</sup>.

G2ドメインはB, B'の二つのサブドメインよりなる. アミノ酸配列の90%以上がG1のB-B'部分と一致するにもかかわらずG2ドメインはヒアルロン酸との結合能を持たない. G2ドメインはアグリカンに特異的で, アグリカンファミリーに属する他のプロテオグリカンには存在しない. G2ドメインにはアグリカンのコアタンパク質をゴルジ装置内に留める作用が報告されており, G2は十分なCS鎖付加に役立っているのかもしれない<sup>6)</sup>.

C末端側に存在するG3ドメインはCRP, EGFリピート, レクチンドメインから成る. G3ドメインはフィブリリン (fibrillin), フィビュリン (fibulin), フィブロネクチン等のマトリックス分子と結合する<sup>1)</sup>. これらマトリックス分子はおそらくG3を中心に複合体を形成すると推測されている. 加齢に従ってG3ドメインが切離されて欠失したアグリカンが増加することがわかっている<sup>6,7)</sup>. G3ドメ

インはアグリカンの安定な沈着に必要というよりむしろ他分子がマトリックスに沈着するための足場を提供していると推測される.

#### 4. グリコサミノグリカン付加ドメイン

アグリカンは100本以上のCS鎖をコアタンパク質に共有結合しており, アグリカン機能の本体はCS鎖にあるといつてよい. アグリカンコアタンパク質のG2とG3の間にケラタン硫酸 (KS) ドメインとCSドメインが存在するが, さらにCSドメインはCS1, CS2の二つのサブドメインに分けられる. ヒトのCS1には19アミノ酸残基より成る多様な繰り返し配列 (variable number of tandem repeat, VNTR) が存在し, リピート数は13から33まで報告されている<sup>8)</sup>. 一般にCS鎖結合配列とされているSer-Gly-X-Glyあるいは(Asp/Glu)-X-Ser-Gly配列が一つのリピート配列内に二箇所存在するため, このVNTRによって40本までのCS鎖付加の個人差が生じる可能性がある. VNTR

が軟骨の脆弱性と関与すると推測されていたが、これまでに有意な相関が見られたのは手の関節炎のみで、しかも相関したのはリピート数 27 のアリルだった<sup>9)</sup>。いまだリピート数と CS 鎖の本数との相関は確認されておらず、リピート数の少ない個体の疾患との関与も明らかではない。

## 5. 軟骨におけるコンドロイチン硫酸合成機構

プロテオグリカンのコアタンパク質への CS 鎖の付加は幾つかの行程を経て行われる (図 2)。まずコアタンパク

質内の CS 結合配列内の Ser 残基にキシロース (Xyl), 二つのガラクトース (Gal), グルクロン酸 (GlcUA) が順次転移することにより橋渡し領域が合成される。非還元末端 (伸長していく側) の GlcUA に GalNAc が転移する。この反応を開始 (initiation) と呼び、この GalNAc 転移活性を GalNAcT-I 活性と呼ぶ。その後、GlcUA, GalNAc が順次交互に転移していく。糖鎖伸長 (elongation) 過程において GalNAc を転移する活性は GalNAcT-II 活性と呼ばれる。

近年, GAG 鎖合成に関与する酵素遺伝子が次々に同定

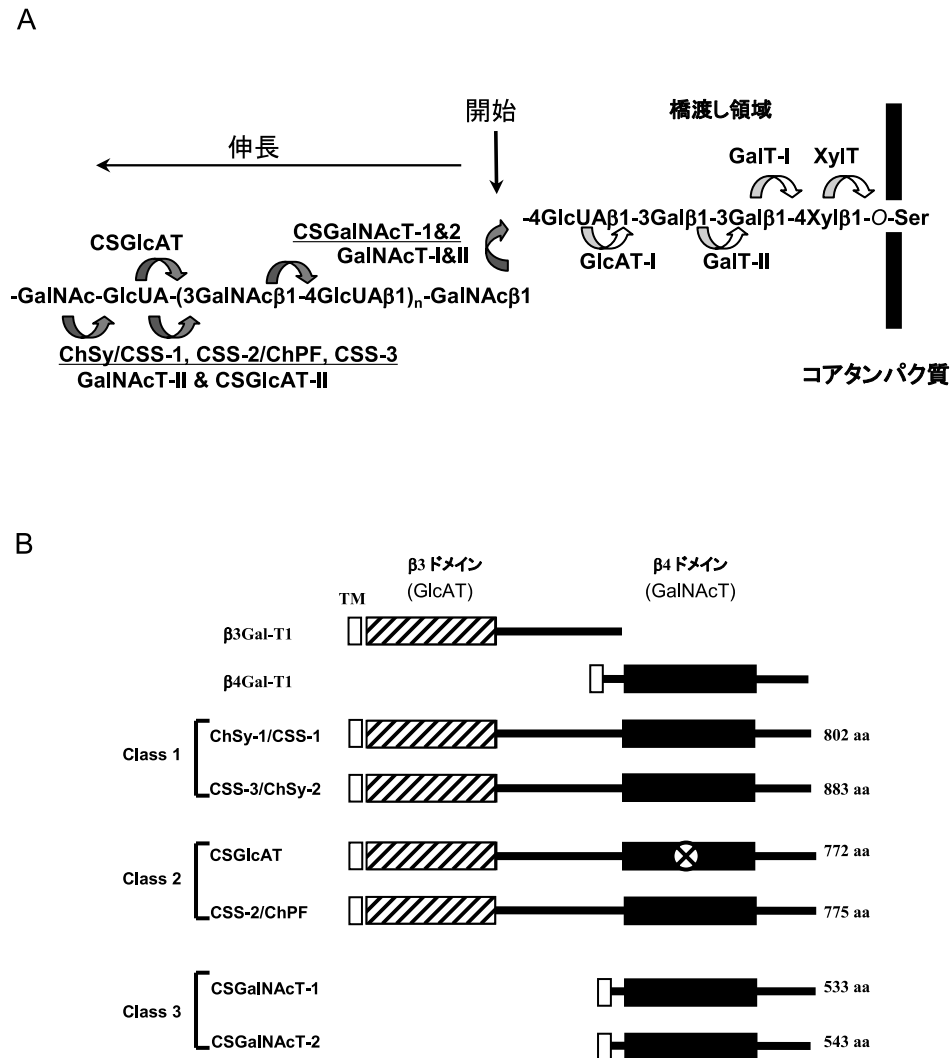


図 2 CS 鎖とその合成機構

A) CS 鎖の付加様式と関与する糖転移酵素。B) CS 糖鎖骨格合成に関与する糖転移酵素遺伝子群。TM (膜貫通ドメイン), ChSy (chondroitin synthase), CSS (chondroitin sulfate synthase), CSGlcAT (chondroitin sulfate glucuronyltransferase), ChPF (chondroitin polymerizing factor), CSGalNAcT (chondroitin sulfate *N*-acetylgalactosaminyltransferase)。併記されているのは二箇所の研究グループがそれぞれ異なった名前で報告しているため。

され、CS 鎖骨格の合成には六つの糖転移酵素が関与することが明らかとなった<sup>10,11)</sup>。これらの酵素はゲノム構造やアミノ酸配列の相同性から三つのサブクラスに分けられ、いずれも N 末端側に膜貫通ドメインを持つ。四つの酵素は  $\beta 3$  (GlcAT) ドメインと  $\beta 4$  (GalNAcT) ドメインの両方を持ち、他の二つは  $\beta 4$  (GalNAcT) ドメインのみを持つ (図 2B)。1 分子内に二つの活性ドメインを有する酵素を可溶性タンパク質として強制発現すると、酵素は GlcA あるいは GalNAc をアクセプター基質に転移するが単独では CS 鎖伸長 (polymerization) 活性は見られない。独立に発現させた 2 種類の酵素を反応液に加えても糖鎖伸長が見られないが、2 種類の酵素遺伝子を細胞に共発現させて得た酵素サンプルは CS 鎖伸長活性を示す<sup>12)</sup>。おそらく polymerization には 2 種類の酵素がヘテロダイマーを形成することが必要なのだろう。発現パターンに一定の特徴があるとはいえ、これらの酵素群は生体内において比較的広汎に発現し、生化学的解析からも恐らく相補的機能を持つと推測される。

CS 鎖合成における硫酸修飾と糖鎖伸長との関係は長年に渡って議論されてきたが、2 種類の糖転移酵素の共発現によって硫酸化されていないコンドロイチンの糖鎖伸長が起こるという事実は、糖鎖伸長に硫酸修飾が必須ではないことを示している。しかし一方で、コンドロイチン 4 硫酸転移酵素-1 (chondroitin 4 sulfotransferase-1, C4ST-1) の欠損マウス<sup>13)</sup>や同酵素発現欠失変異株<sup>14)</sup>において CS の糖鎖骨格が減少していることから、おそらく同酵素は糖転移酵素複合体の安定化に寄与しているものと推測される。

我々は、生体内で CS を最も多く含む軟骨において CS 合成に主たる役割を果たす糖転移酵素の同定を行い、当該酵素が CSGalNAcT-1 であることを明らかにした<sup>15)</sup>。まず *in situ* ハイブリッド形成法によりマウス軟骨における発現を検討したところ、CSGalNAcT-1 を含む 4 種類の酵素遺伝子発現がアグリカンコアタンパク質の発現と共局在していることを確認した。次に ATDC5 および N1511 細胞の軟骨細胞分化過程において CSGalNAcT-1 と CSGlcAT がアグリカンコアタンパク質の発現と同期して増加することを明らかにした。さらにラット軟骨系 LTC 細胞株に CSGalNAcT-1 を強制発現させると CS 合成量が約 2.2 倍に増加すること、マウス椎間板内に同酵素を強制発現させると椎間板における CS 量が増加することを見いだした。CSGalNAcT-1 強制発現株とコントロール LTC 細胞株とでアグリカンの分子構造に関して比較検討したところ、1 分子のアグリカンに付加する CS 量が同酵素強制発現株にお

いて増えていることがわかった。CS 鎖長は両者の細胞株で有意差がないため、CS 鎖の付加していない部分に新たに CS 鎖が付加したものと推測された。また、一定の CS 糖鎖長あたりの硫酸修飾の程度はコントロール群と同等であった。これらの結果は、軟骨の CS 合成能が飽和に達しているわけではなく CSGalNAcT-1 の過剰発現によって組織内の CS 沈着量を増加させることができること、CS 合成量が増加したとき CS 鎖が伸長するのではなく CS 鎖の本数が増えること、増加した CS 鎖にも同様の硫酸修飾が行われることを示している。1 分子当たり 2.2 倍の CS を持つアグリカンは恐らくマトリックス局所において強力な保水作用を発揮し、従って軟骨機能を増強すると推測される。我々はこのアグリカン分子を「スーパーアグリカン」と呼び、当該分子の軟骨機能と代謝への影響を検討している。

## 6. お わ り に

軟骨は修復がきわめて難しい組織であり、高齢化社会に伴う軟骨破壊性疾患の増加の面でも軟骨修復・再生技術の開発が期待されている。アグリカンの研究には長い歴史があり、各ドメインの多彩な機能が報告されているが、同分子の決定的な機能は G1 ドメインが持つヒアルロン酸結合能と大量の CS 鎖にあると筆者は考えている。我々は今回、軟骨において CS 合成の鍵を握る糖転移酵素を同定したが、CS 合成機構の詳細が解明されたわけではない。アグリカン会合体とコラーゲン線維との相互作用および CS 鎖による生理活性分子の貯留と活性制御の解析は、軟骨マトリックスの機能の解明に繋がる大きな研究課題である。

- 1) Dudhia, J. (2005) *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 2241–2256.
- 2) Watanabe, H., Yamada, Y., & Kimata, K. (1998) *J. Biochem.*, **124**, 687–693.
- 3) Blundell, C.D., Almond, A., Mahoney, D.J., DeAngelis, P.L., Campbell, I.D., & Day, A.J. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 18189–18201.
- 4) Watanabe, H., Cheung, S.C., Itano, N., Kimata, K., & Yamada, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 28057–28065.
- 5) Watanabe, H. & Yamada, Y. (1999) *Nat. Genet.*, **21**, 225–229.
- 6) Luo, W., Guo, C., Zheng, J., Chen, T.L., Wang, P.Y., Vertel, B.M., & Tanzer M.L. (2000) *J. Bone Miner. Metab.*, **18**, 51–56.
- 7) Plaas, A.H., Wong-Palms, S., Roughley, P.J., Midura, R.J., & Hascall, V.C. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 20603–20610.
- 8) Doege, K.J., Coulter, S.N., Meek, L.M., Maslen, K., & Wood, J.G. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 13974–13979.
- 9) Horton, W.E. Jr., Lethbridge-Cejku, M., Hochberg, M.C., Balakir, R., Precht, P., Plato, C.C., Tobin, J.D., Meek, L., &

- Doege, K. (1998) *Osteoarthritis Cartilage*, 6, 245-251.
- 10) Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., & Kitagawa, H. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13, 612-620.
- 11) 渡辺秀人, 木全弘治 (2005) 未来を拓く糖鎖科学 (永井克孝監修, 川崎敏祐編), 金芳堂, 京都.
- 12) Izumikawa, T., Uyama, T., Okuura, Y., Sugahara, K., & Kitagawa, H. (2006) *Biochem. J.*, 403, 545-552.
- 13) Kluppel, M., Wight, T.N., Chan, C., Hinek, A., & Wrana, J.L., (2005) *Development*, 132, 3989-4003.
- 14) Uyama, T., Ishida, M., Izumikawa, T., Trybala, E., Tufaro, F., Bergstrom, T., Sugahara, K., & Kitagawa, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 38668-38674.
- 15) Sakai, K., Kimata, K., Sato, T., Gotoh, M., Narimatsu, H., Shinomiya, K., & Watanabe, H. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 4152-4161.

渡辺 秀人

(愛知医科大学分子医科学研究所)

Aggrecan and its chondroitin sulfate in cartilage  
Hideto Watanabe (Institute for Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University, Karimata 21, Yazako Nakakute, Aichi, 480-1195, Japan)

## ほ乳類精子形成幹細胞研究の展開と展望

### 1. はじめに

ほ乳類の精子形成幹細胞研究は近年注目を浴びている。本稿では、組織形態学・精子形成幹細胞の移植・*in vitro*での幹細胞培養・*in vivo*での幹細胞の運命追跡・*in vivo*でのイメージングと、主に実験・観察技術の観点からこの分野の研究を概観する。原則としてマウスを用いた研究を紹介する。

### 2. 精巣の形態学的観察と幹細胞システムのモデル

ほ乳類の精子形成は、精巣のなかで複雑に折れ曲がる直径約 200 $\mu$ m の精細管の中で進行する。精細管の基本構造は、基底膜とその内側を覆うセルトリ細胞および外側の筋様細胞（ともに体細胞）であり、生殖細胞はセルトリ細胞の間に埋まっている。幹細胞を含む精原細胞（体細胞分裂の段階）は基底膜上に位置し、精母細胞（減数分裂期）、精子細胞（半数体）の順に内腔側に向かって配列する（図 1）。成熟精子は精細管内腔に放出され、精巣網、精巣上

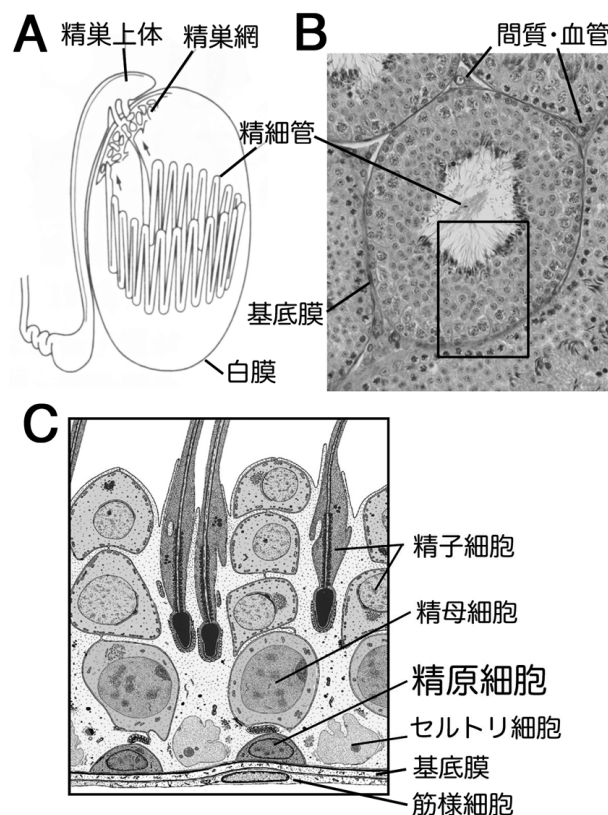


図1 マウス精巣の構造と精子形成

(A) 精巣の全体像。文献 18 より改変。(B) 切片のヘマトキシリン-エオジン染色像。(C) 精細管上皮の模式図。B の四角部分に対応する。文献 1 より改変。精細管の中で基底膜に接して存在する精原細胞の一部が未分化型精原細胞であり、その更に一部が幹細胞である。

体、輸精管を経て体外へ射出される。精子形成幹細胞は、基底膜を埋め尽くしている精原細胞の中のごく少数を占めるに過ぎない。精細管の外側は血管とライディッヒ細胞（男性ホルモン産生細胞）をはじめとする間質が埋めている<sup>1)</sup>。

1950 から 70 年代にかけて、切片やホルマウント精細管標本の形態（主に染色した核形態）の詳細な観察から精子形成の大筋が明らかにされ<sup>1)</sup>、精細管上皮の周期性が記載された<sup>2)</sup>。このころ、どの細胞が幹細胞で、どのように機能するのかについていくつかの説が提出された。現在、「未分化型精原細胞」と総称される少数の（精巣全体の 1% 以下）未熟な核形態を示す細胞の中に幹細胞が含まれることが分かっている。未分化型精原細胞は、単独で存在する細胞  $A_{single}$  ( $A_s$ )、二つの娘細胞が不完全細胞質分裂により連結した  $A_{paired}$  ( $A_{pr}$ ) および 4, 8 あるいは 16 の細胞が連結