

ヘパラ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 淵 弘 子 木 全 弘 治

ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)は、タンパク芯に硫酸化グリコサミノグリカンの一種であるヘパラン硫酸(HS)を付加した負電荷に富んだ高分子である。これら HSPG は細胞表面と細胞外マトリックス・基底膜の普遍的な構成分子である。その HS 鎖部分はヘパリン結合性細胞増殖因子、形態形成因子、細胞外マトリックス・基底膜成分、プロテアーゼインヒビター、プロテアーゼ、リパーゼなど非常に広範なタンパク質と結合し、その活性を制御する¹⁻⁴⁾。これらリガンドと HS の結合は生化学的研究や X-線結晶解析による研究から、HS の特異な構造、特に硫酸基のパターンによるものや HS 鎖の負電荷に依存するものがあることがこれまでに明らかにされている^{5,6)}。

この 10 年あまり、HS 合成に関連する遺伝子群のクローニングに続き変異体動物が作製され、解析の結果、HS 鎖は種々の細胞増殖因子のシグナル伝達を制御して胚発生、器官形成に必須の分子であること、さらに炎症、免疫応答や脂質代謝のような生理的現象、感染症などの疾患にも深く関わっていることが明らかにされた⁷⁻¹⁰⁾。本稿ではこのような HS 鎖の多様な機能について筆者らの成果も含めて最近の知見を紹介する。

1 ヘパラン硫酸鎖の構造と生合成経路

HSPG はそのタンパク芯の構造によって分類さ

れる。代表的な細胞膜型 HSPG には、タンパク芯が膜貫通型領域を持つシンデカンと GPI アンカーで膜へ挿入するグリピカンがある。シンデカンファミリーは 4 種類からなり、細胞内にある C 末端ドメインは 4 種類の分子で高い相同性を持つが細胞外ドメインの相同性は低い。細胞外ドメインには共通して数本の HS 鎖が結合している。グリピカンファミリーは 6 種類存在し、細胞外ドメインによく保存された 14 個のシステインを持つためコンパクトなタンパク芯に 2-3 本の HS 鎖が結合している。これらの HSPG は細胞外ドメインの膜貫通領域付近で分解を受け、膜から遊離することがある。細胞外マトリックス・基底膜型 HSPG としてパルカンやアグリンがある。これら以外にベーターグリカン、CD44、NG2、コラーゲン XVIII などが知られている。

HSPG の HS 鎖の合成は、タンパク芯の特異なセリン残基へ 4 糖からなる橋渡し構造が付加することから始まり、EXT-1、-2 などの HS ポリメラーゼによるグルクロン酸と *N*-アセチルグルコサミンからなる 2 糖繰り返し骨格構造の伸長、種々の硫酸転移酵素による特異的な位置の硫酸化(*N*-, 2-*O*-, 6-*O*-, 3-*O*-)、C-5 エピメラーゼによるエピ化(グルクロン酸残基からイズロン酸残基への変換)などの修飾反応をうけて進行する(図 1)。さらにこれら HS は、細胞表面において特異的スルファターゼにより脱 6-硫酸化修飾を受け。このように、HS は多段階の修飾反応を受け

The function of heparan sulfate proteoglycans in morphogenesis and physio-pathology

Hiroko Habuchi: 愛知医科大学 分子医科学研究所

Kouji Kimata: 同大 先端医学・医療研究拠点

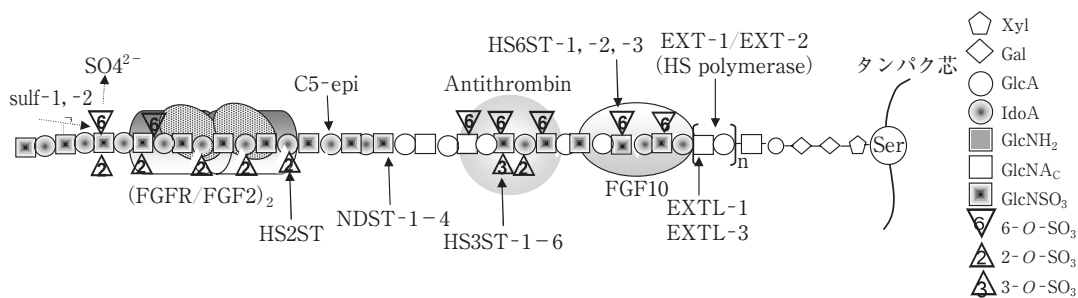


図 1 ヘパラン硫酸の構造と合成酵素

タンパク芯の特定のセリン残基へキシロース (Xyl), ガラクトース (Gal), グルクロン酸 (GlcA) の順に各糖転移酵素によって橋渡し構造が合成される。ついで最初の *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に続いて EXT-1/EXT-2 HS ポリメラーゼによって 2 糖繰り返し構造が伸長する。この骨格構造がさらに NDST-1-4 によって GlcNAc 残基を脱アセチル-*N*-硫酸化して GlcNS へ、C-5 エピメラーゼによって GlcA がイズロン酸 (IdoA) へ、HS2ST によって IdoA/GlcA の 2 位の硫酸化、HS6ST-1-3 によって glcNAc/GlcNS の 6 位の硫酸化、HS3ST-1-6 によって GlcNS/GlcNc/GlcN の 3 位の硫酸化とゴルジ体で修飾される。さらに細胞表面でエンドスルファターゼ (Sulf-1, -2) によって特異な GlcNS の 6 位の硫酸基が分解される。

表 1 ヘパラン硫酸の合成・修飾酵素遺伝子の変異体

酵素	遺伝子	表現型/ヒトの疾患	文献
HS ポリメラーゼ	<i>Ext1</i>	原腸形成欠損になり 8.5 日胚で致死	11
		脳特異的な遺伝子破壊は軸索誘導の欠陥 (Mm)	12
		常染色体優性遺伝性多発外骨腫 (Hs)	13
	<i>Ext2</i>	原腸形成欠損になり胎生致死, ヘテロ体は異所性骨成長と軟骨分化の異常 (Mm)	14
		常染色体優性遺伝性多発外骨腫 (Hs)	15
<i>N</i> -脱アセチラーゼ/ <i>N</i> -硫酸転移酵素	<i>Ndst1</i>	呼吸不全による出生時の致死	16
		大脳形成不全と頭蓋顔面の欠陥 (Mm)	17
		炎症部位への白血球血管外遊走を阻害 (Mm)	18
		リポプロテインの肝細胞への取り込み阻害 (Mm)	19
	<i>Ndst2</i>	結合識型肥満細胞内顆粒中の特異なプロテアーゼとヒスタミン含量が減少 (Mm)	20, 21
HS グルクロニル C5- エピメラーゼ	<i>Hsepi</i>	出生時の致死, 両腎臓の欠損, 肺の形成不全 (Mm)	22
		特異的な軸索誘導と移動の欠陥 (Ce)	23
HS2- <i>O</i> -硫酸転移酵素	<i>Hs2st</i>	出生 24 時間以内に致死, 両腎臓の欠損, 眼, 骨格異常 (Mm), 網膜神経節細胞の軸索誘導の欠陥 (Mm)	24
		特異的な軸索誘導と移動の欠陥 (Ce)	25
			23
HS6- <i>O</i> -硫酸転移酵素	<i>Hs6st1</i>	大部分は出生前に致死, 胎盤迷路層の血管形成不良, 肺形成の異常 (Mm)	26
		網膜神経節細胞軸索の投射異常 (Mm)	25
	<i>hs6st</i>	FGFR シグナル阻害による気管形成の異常 (Dm)	27
	<i>hst-6</i>	特異的な軸索誘導と移動の欠陥 (Ce)	23
HS3- <i>O</i> -硫酸転移酵素	<i>Hs3st1</i>	止血は正常 (抗凝血活性を持つアンチスロンビン III と特異的に結合する HS 構造を合成する), 遺伝的背景特異的な致死 (Mm)	28

Mm; マウス, Hs; ヒト, Dm; ショウジョウバエ, Ce; 線虫

て極めて多様な構造を持ち、種々のリガンドと結合する (図 1)。たとえば図 1 に示したように、FGF-2 は HS2-硫酸転移酵素 (HS2ST) によって合成される イズロン酸の 2 位に硫酸基 [IdoA

(2SO₄)] を持つ HS に強く結合する。また、FGF-10 の結合には HS6-硫酸転移酵素 (HS6STs) によって合成される *N*-スルホグルコサミンの 6 位の硫酸基 [GlcNS(6SO₄)] が必要である。アンチト

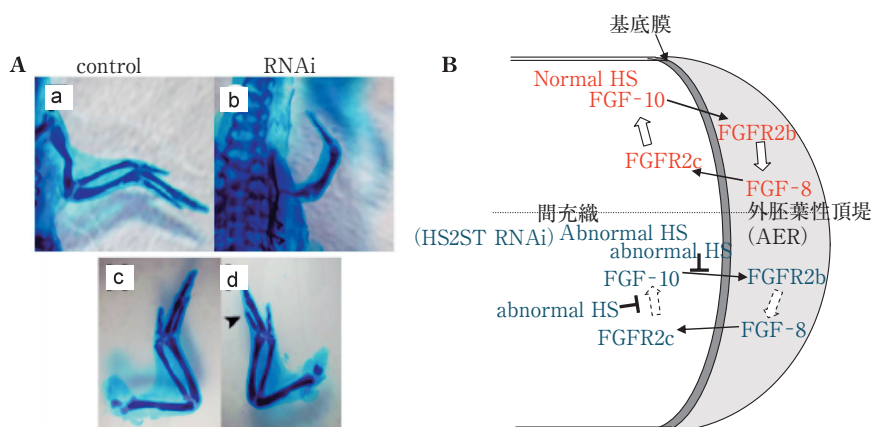


図 2 HS2ST siRNA によるニワトリ胚肢芽の形成異常

A) ニワトリ胚のステージ 13-14 の右側の予定肢芽領域に HS2ST RNAi を注入後、9 日目で骨格をアルシアンブルー染色した。コントロールの左側肢芽 (a, c) に比べて HS2ST RNAi 中にした右側肢芽 (b, d) はほとんど成長しないか指が短くなった。B) HS による肢芽形成制御機序のモデル：上半分が肢芽形成における正常な HS 構造による FGF-8-FGF-10 シグナルループの制御、下半は HS2ST RNAi による HS 構造改変による FGF-8-FGF-10 シグナル攪乱。(文献 29 より改変引用)

ロンビンの HS 結合構造は *N*-スルホグルコサミンの 3 位の硫酸基が必須であり、HS3-硫酸転移酵素 (HS3ST-1, -5) によって合成される。

HS 鎖の一種と考えてよいヘパリンは主として結合織型肥満細胞内顆粒に存在し、特に高頻度の硫酸化を受けている。

2 HS 合成遺伝子変異体の器官形成異常

HS の生合成酵素の変異体が種々の動物で作製されており、その解析結果を表 1 にまとめた¹¹⁻²⁸⁾。

HS を完全に合成できない EXT-1 や EXT-2 遺伝子破壊マウスは 6.5 日胚で特徴的な胚外構造を欠損し、原腸形成ができないで初期胚で致死になる^{11,14)}。その原因として発生過程の重要な制御因子の一つである *Ihh* (HS 結合性) が正常に局在できないことによるらしい。このことから HS が発生初期から極めて重要な機能を持つことは明らかである。HS 鎖中の特異な構造を持つ機能が種々の HS 修飾酵素の遺伝子をノックアウトやノックダウンした変異体を用いて解析された。今回、主として HS2ST と HS6ST 変異体について紹介する。

1. マウスの腎臓形成と HS2ST²⁴⁾

ジーントラップ法で HS2ST 遺伝子を破壊した

マウスは両側の腎臓を完全に欠損し、盲管となった尿管のみが形成される。しかし、副腎、膀胱、卵巣などの泌尿生殖器官は正常に形成された。この異常が起こる機序は明らかでないが、後腎発生に関与する *Wnt11* と *Gdnf* (グリア細胞由来神経栄養因子) の発現と局在が攪乱されていた。おそらく HS の IdoA (2SO₄) 残基との相互作用が異常になったことによると推定される。ホモ体ではこれ以外に骨の石灰化の増加、胸骨の融合、虹彩欠損を持つ眼の形成異常、口蓋裂、多指症が観られる。さらに最近の研究では、視交叉部で網膜神経節細胞 (RGC) の軸索誘導に異常があることが報告された²⁵⁾。線虫においても HS2ST を欠損させると軸索誘導の異常があり²³⁾、HS2ST による軸索誘導の制御は種を超えて似た機構があると思われる。

2. ニワトリ胚の肢芽形成と HS2ST²⁹⁾

ニワトリ胚の肢芽の形成には種々の FGF とそのレセプター (FGFR) が基底膜をはさんで発現し、シグナル間の相互作用によって肢芽形成が進行する。FGFs, FGFRs は HS・ヘパリンへ結合するので、HS の微細構造によって肢芽形成が制御されていることが期待される。ニワトリ胚肢芽における HS-O-硫酸転移酵素のうち HS2ST は肢芽全体に、HS6ST-1 は主として肢芽の前方に、

HS6ST-2 は後方に発現し、HS6STs の高発現部位の HS は 6-硫酸化が有意に高い。HS2ST に特異的な siRNA を、ステージ 13-14 のニワトリ胚の予定肢芽領域に注入してヘパリン硫酸の 2-硫酸化を阻害すると肢芽の伸長が阻害され、注入後 9 日では肢芽がほとんど成長しないか指が短くなった(図 2A)。

肢芽形成における FGFs 間のシグナル伝達は以下のように報告されている。まず、肢芽形成の予定領域の中胚葉に FGF-10 が発現し、そのレセプターである FGFR-2b が発現している外胚葉性頂堤(AER)に作用する。ついでそのシグナル伝達によって FGF-8 が AER に誘導される。FGF-8 は AER を超えてその直下の間充細胞にある FGFR-2c を介したシグナル伝達によって、間充細胞を増殖させて肢芽を先端部方向へ成長させるとともに FGF-10 のさらなる発現を誘導する。siRNA で間充細胞の HS2ST の発現を阻害すると間充細胞に発現する FGF-10 遺伝子の発現は RNAi 発現部位で有意に減少し、上皮である AER での FGF-8 遺伝子の発現は明らかに減少した。このとき HS-FGFs-FGFRs の三者間の複合体形成から siRNA による HS の変化をみると、FGF-8/FGFR-2c との複合体形成は RNAi を発現している肢芽部分で減少傾向を示した。一方、FGF-10/FGFR-2b との複合体形成は RNAi を発現している肢芽間充細胞部分で逆に増加した。FGF-10 の HS への結合は 6-硫酸基があれば十分であり⁵⁾、HS の 2-硫酸化を阻害すると代償的に 6-硫酸化が増加するので²⁷⁾、発現した FGF-10 はこのように改変された HS 構造(多分 6-硫酸化の増加)によって間充細胞にトラップされて、そのレセプターである FGFR-2b を発現している AER への拡散が少なくなりシグナルが低下し、その結果 FGF-8 の発現が低下する。さらに HS2ST RNAi 処理で改変された HS は FGFR-2c を介した FGF-8 シグナルを低下させ、間充細胞の FGF-10 の発現を低下させたと考えられる。このように HS の O-硫酸化の変化によって FGF-8 と FGF-10 のシグナルのループが阻害されていると推察される(図 2B)。

最近、HS の N-硫酸化が部分的に阻害された

NDST-1 ノックアウトマウスは涙腺の枝分かれ構造を欠損することが報告され³⁰⁾、HS の N-硫酸化が FGF10-FGFR-2b シグナル伝達に重要な機能を持つことを示した。このとき NDST-1 の発現は間充細胞と異なって上皮細胞で必須と思われるので、上皮細胞の合成する HS、つまり FGF-10 を受け取る側の細胞の HS の構造が重要であることを示した。

3. HS6ST と血管新生および視神経誘導^{26,25)}

マウスの HS6ST は三つのアイソフォームが存在し、その基質特異性と発現部位はオーバーラップはあるが異なる³¹⁾。HS6ST-1 を欠損するマウスのほとんどは 15.5 日胚から出生までに死亡し、出生した個体は体が小さい。ホモ体では大部分の組織において HS の 6-硫酸化が激減する²⁶⁾。母親の血液から栄養補給とガス交換をする胎盤迷路層の血管形成が半減しており(図 3A, B)、強い血管形成因子である VEGF-A の遺伝子発現、タンパクともに減少した。ホモ体の胎盤の VEGF-A mRNA の低下は、この発現を誘導する因子の活性が HS の変化によって攪乱された結果と考えられる。さらに VEGF-A のヘパリン結合型は 6-硫酸化 HS によって活性が促進されるので³²⁾、6-硫酸化の阻害は VEGF 活性そのものを低下させたと推定される。VEGF-A の発現を誘導する因子はまだ明らかでないが、変異体が類似の表現型を示す Wnt2 が第一の候補として考えられる。Wnt2 と HS の結合は HS6ST-1^{+/+}からの HS に比べて HS6ST-1^{-/-}からの HS へ弱いこともその可能性を支持する(図 3C)。ゼブラフィッシュの HS6ST-2^{-/-}は尾部静脈由来の微小血管形成異常が観られ、VEGF-A が関わっていることが報告されている³³⁾。

HS6ST1 のノックアウトマウスでは肺胞の形成異常と思われる肺胞の肥大が観察された。肺胞形成に重要な因子である FGF10 は前述したようにグルコサミンの 6 位の硫酸基を持つ構造に高い結合性を示すこと⁵⁾、FGF10 の高い発現部位である肺胞の枝分かれ構造の先端には Hs6st-1 が発現していること³⁴⁾、などを考え合わせると HS 構造異常が FGF-10 のシグナルを攪乱した結果と推定され、興味深い。

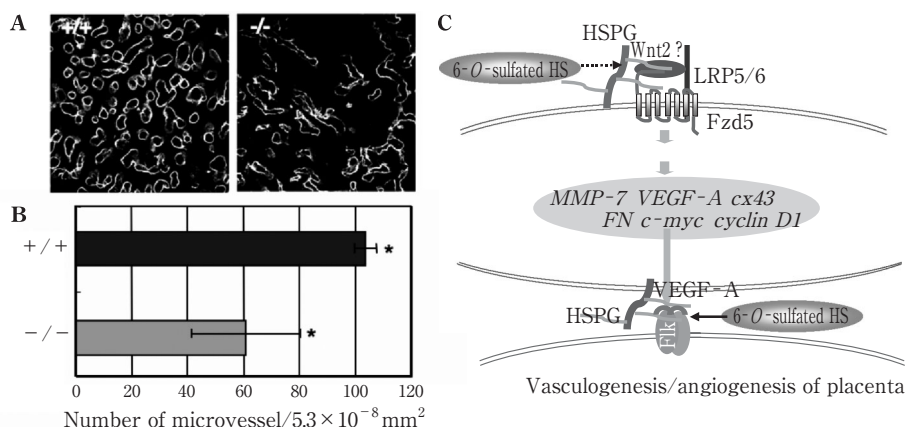


図 3 HS6ST-1 ノックアウトマウスの胎盤迷路層の血管形成欠損

A) 15.5 日胚胎盤を血管内皮細胞に特異的な CD31 抗体で染色した共焦顕微鏡写真。左が HS6ST-1^{+/+}、右が HS6ST-1^{-/-}。B) 一定面積当たりのホモ体の血管数は 60% 以下に減少した (*p<0.03)。C) 迷路層の血管形成における 6-硫酸化ヘパラン硫酸による VEGF-A の発現、活性制御機序のモデル。(文献 26 より改変引用)

Pratt らによってジーントラップ法で作製された HS6ST-1^{-/-}マウスは、網膜神経節細胞からの軸索が異常に反対側の眼へ投射された²⁵⁾。このような変異は Slit1^{-/-}と Slit2^{-/-}のマウスの表現型と類似している。また、HS6ST-1^{-/-}マウスの網膜神経節細胞の Slit2 に対する神経突起の反応性 (Slit2 タンパクに対する反撥性) は、HS6ST-1^{+/+}の網膜神経節細胞に比べて低下していた。このような神経の軸索誘導の異常は線虫の Hs6st 変異体でも報告されている²³⁾。HS6ST が神経回路網の形成に重要な役割を持つとの結果に関連して、ヒトの遺伝的疾患であるカルマン症候群に関して以下のような興味ある報告がある^{35,36)}。カルマン症候群は嗅球から視床下部への神経の伸長が阻害されて、中枢性の性腺機能低下、嗅覚障害を示す。この疾患の原因遺伝子の一つである *KAL-1* は神経細胞接着分子と似たタンパク質であるアノスミン-1 をコードしている。アノスミン-1 は HS 結合性でヒト胎児の嗅覚神経の軸索の標的部分に発現し、*in vitro* では小脳由来の培養神経細胞の神経突起の伸展を誘導する。線虫の Kal-1 の機能を修飾する遺伝子の一つとして *Hs6st(hst-6)* が同定された。*Hs6sts* 遺伝子とカルマン症候群とが本当に関連があるかどうか今後の解析が待たれる。

3 ヘパラン硫酸の生理的病理的機能

1. HS 修飾遺伝子 NDST-1 とアレルギー¹⁸⁾

HS は炎症部位への白血球の接着 (ローリング) に関わる P-セクチン、L-セクチンや炎症性サイトカインと結合する。内皮細胞の HSPG と結合したサイトカインは白血球表面にあるそれらのレセプターに結合し、その結果白血球表面のインテグリンが活性型になり、白血球と内皮細胞の接着が強くなって白血球が血管外に遊走すると考えられている。従って、HS 構造の異常は血管内皮細胞から白血球の浸潤を攪乱することが予想されるが、*in vivo* の炎症に HS が実際に関わるかどうかを明らかにするため、NDST-1 遺伝子を白血球と内皮細胞特異的に破壊したマウスを用いて調べた。この変異内皮細胞の HS の N-スルホグルコサミンの含量は 3 分の 1 に減少した。変異マウスは正常に発生するが、種々の炎症モデルで好中球の浸潤は半減した。好中球の浸潤に影響するのは白血球の HS か内皮細胞の HS かあるいは両方の変異かを明らかにするため、X-線照射後の骨髓移植実験が行われた。その結果、好中球の浸潤の阻害は変異マウスに正常マウスの骨髓を移植した時に観察されたが、正常マウスに変異マウスの骨髓を移植した時には観察されなかった。従って、好中球の浸潤阻害は白血球の HS ではなく内

皮細胞の HS を変異させたときに起きると結論された。その障害機序は 1) 白血球表面の L-セレクチンと内皮細胞の HS との結合が弱くなりローリング速度が速くなること, 2) ケモカインの内皮細胞の HS を介して内腔側へ輸送が障害されること, 3) 白血球へのケモカインの提示が減少すること, その結果として好中球の内皮細胞への接着性と移動が減少して, 血管外への遊走が減少することが示された。

2. HS 修飾遺伝子 NDST-2 と肥満細胞の顆粒形成^{20, 21)}

結合織型肥満細胞の顆粒に含まれるヘパリンは, 肥満細胞の顆粒形成と免疫機能を支えていると考えられている。肥満細胞を欠損するマウスは自己抗体, 補体成分, Fc 受容体の投与によって発症する関節炎にかかりにくい。この作用は肥満細胞の顆粒内に貯蔵されている TNF- α , IL-1 の放出, 顆粒内ヒスタミンなどの様々な炎症分子や血管形成因子の放出による。これら分子はヘパリン結合性である。事実, ヘパリン合成に必須の酵素である NDST-2 欠損マウスは結合織型肥満細胞の顆粒形成が異常になり, ヒスタミンの量が減少し, ある種のプロテアーゼの顆粒への貯蔵が障害される。しかし, NDST-2 欠損マウスがアレルギーなどに抵抗性を示すかどうかについては今のところ報告がない。

3. 肝細胞の HS と高脂血症¹⁹⁾

HSPG は血管内皮細胞にリパーゼを結合させるレセプターとして働き, 肝臓ではリポプロテインのクリアランスレセプターとしてリポプロテインの代謝を制御する。トリグリセライド(中性脂肪)は食事から摂取するか, 肝臓で合成されてそれぞれキロミクロンあるいは超低密度リポプロテイン(VLDL)粒子として血中に入る。キロミクロンと VLDL は血中を循環するにつれて, リポプロテインリパーゼによって脂肪酸に分解されてエネルギー源として利用されたり, 脂肪組織に蓄えられる。これらの残存粒子はさらに肝臓の類洞で肝リパーゼによって分解され, 続いて肝臓にあるレセプター(LDL レセプター, LDL レセプター関連タンパク質など)を介して細胞内に取り込まれて代謝される。これらのレセプターは残存粒子表面に

あるアポ B タンパク質やアポ E タンパク質, 粒子表面に会合しているリパーゼを認識する。これらリポプロテインの代謝に重要な分子はいずれも HS 結合性を示す。細胞レベルの研究から HS がアポ B, アポ E タンパク質, リポプロテインリパーゼ, 肝リパーゼなどと結合して, リポプロテインを細胞内に取り込むことが明らかにされている。

このような HS による脂質の代謝制御が *in vivo* において果たして機能しているどうかについて, 肝細胞の NDST-1 の発現を特異的に障害したマウスを用いて調べられた。この変異マウスの肝細胞の HS の N-硫酸化は 50%に減少した。この変異マウスの血漿はトリグリセライドを多く含むリポプロテインを蓄積するが, コレステロール濃度は影響されなかった。この点で LDLR 欠損マウスと異なっている。LDLR 欠損マウスは血漿中のトリグリセライドとコレステロール濃度はともに高い。LDLR と NDST-1 の両方を欠損するダブルノックアウトマウスの血漿中のトリグリセライドとコレステロール濃度はどちらか一つだけのノックアウトマウスと比べて明らかに高い。NDST-1 変異マウスではトリグリセライドを多く含む VLDL の血漿中のクリアランスが減少していた。実際, 肝臓への VLDL の取り込みは減少した。さらに単離した肝細胞でも VLDL の取り込みが減少すること, アポ E タンパク質と変異マウスの肝細胞由来の HS の結合は劇的に減少した。食事から摂取したトリグリセライドの血漿からのクリアランスも同様に変異マウスでは減少した。NDST-1 の発現を血管内皮細胞で特異的に障害しても血漿中のトリグリセライドやコレステロールは変化しないことから, 肝細胞の HS のみがクリアランスに関わると結論された。

クリアランスの機序はまだ明らかにされていないが, 細胞膜型 HSPG はクラスターを形成して恒常的にエンドサイトーシスされることが知られているので³⁷⁾, キロミクロンや VLDL などのリポプロテイン粒子と直接結合して, 一緒にエンドサイトーシスされてクリアランスされるのかもしれない。肝細胞は種々の HSPG を発現している。どのような HSPG が, そしてどのような HS 構造が

この細胞内取り込みに関わるのかは今後明らかにされるであろう。

興味あることに、糖尿病では高脂血症との合併症がみられる。インスリン欠損ラットの肝臓の HS は低硫酸化で、NDST-1 の発現が減少していることが知られている。インスリン欠損による糖尿病と高脂血症の接点は HS の構造変化かもしれない。

4. HS とアミロイドプラーク形成³⁸⁾

アルツハイマー症(AD)の発病初期に見られる老人斑は、 β -アミロイドペプチドを核として種々の分子が会合して形成される。HS はこれら分子との相互作用によってアミロイド形成に重要な役割を果たす。さらにアミロイド前駆体タンパク質(APP)から β -アミロイドへ切断するプロテアーゼ活性の制御にも関与する。 β -アミロイドペプチドは APP から β -セクレターゼ、 γ -セクレターゼの 2 段階の分解によって生じる。HS・ヘパリンは β -セクレターゼと直接に相互作用して APP の分解を阻害するので、HS は APP プロセシングの新しい制御機構に関わる天然の制御分子かもしれない。AD の治療の要となる β -セクレターゼを阻害する HS/ヘパリン構造は 10 糖以上で 24 糖まではサイズに依存して阻害活性が増大し、阻害には 6-硫酸基が重要である。化学的に過硫酸化したヘパリンの阻害活性は逆に減少することから、阻害活性が単に硫酸化度で決まるわけではない。また、グルコサミン残基の *N*-硫酸基を *N*-アセチル基に置換すると阻害活性は増大する³⁸⁾。これらの結果から、 β -セクレターゼを阻害する HS の構造は $[\text{IdoA}/\text{GlcA}-\text{GlcNS}(6\text{SO}_4)]_5$ と推定された。

一方でアミロイドプラークは HSPG を含み、プラークにあるタンパクは HS 結合性である。実際に、ヘパラナーゼ(イブロン酸 2-硫酸残基が還元側にあるグルクロン酸残基部分で分解)を過剰発現したマウスの肝臓や腎臓では、炎症に付随したアミロイドーシスでアミロイドの沈着が妨げられる³⁹⁾。このこともアミロイドプラークの形成には HS が強く関わっていることを示す。このように、HS はアミロイドプラークの形成制御において二面性を持つ。ヘパラナーゼによって生じるオ

リゴ糖(平均サイズは 16 糖くらい)はアミロイドプラークのタンパクを沈着させる活性(多量体化)を持たないが、 β -セクレターゼ活性を阻害する能力は保持するのかもしれない。この二つの条件を満たすようなオリゴ糖の探索は AD の新しい治療薬の開発の基礎になるかもしれない。

5. HS と感染症⁴⁰⁻⁴²⁾

多くのウイルス、寄生物は標的細胞に感染するのに細胞表面にある HS を利用する。I 型単純ヘルペスウイルスは細胞表面の HS へウイルスの gB と gC を介して結合し、続いてウイルスの gD 部分が HS のグルコサミンの 3 位に硫酸基を転移する HS3ST のうちの HS3ST-3 と-5 によって合成される特異な構造を持つ HS へ結合して宿主細胞に侵入する⁴⁰⁾。クラミジアトラコマチスによるクラミジア感染症も標的細胞の HS の *N*-スルホグルコサミン 6-硫酸基を利用して侵入する⁴¹⁾。緑膿菌は肺への感染に HSPG を利用するが、この細菌自体はヘパラン硫酸へ結合しない⁴²⁾。マウスに緑膿菌を接種すると野生型マウスでは 37% が感染で死亡するが、HSPG の一つであるシンデカン-1 を欠損するマウスは死亡しない。シンデカン-1 やヘパリンと一緒に緑膿菌を接種すると 60% ものマウスが死亡する。種々の実験結果から、その機序として緑膿菌の毒性因子 LasA がシンデカン-1 の細胞表面からの遊離(シェディング)を促進し、その HS 鎖によって LasA の毒性が増強され、結果的にホストの防御機構を妨げるのでであろうと推察されている。

おわりに

ヘパラン硫酸は膨大なタンパク質と結合する。その結合特異性も硫酸化のパターン、負電荷度に依存するものなど様々である。タンパク分子の活性を負に正に制御するなど様々である。現在までに HS 合成酵素遺伝子を改変した動物体が作製され、かなりの遺伝子破壊マウスは胎生致死あるいは生誕直後に死ぬ。そのためにそれ以後の各遺伝子の機能はまだ十分に解析されていない。NDST-1 のみ一部の組織特異的な遺伝子破壊の影響が解析されているが、今後ほかの遺伝子に関しても組織特異的に遺伝子破壊したマウスを利用し

て、HS 構造と疾患との関連が明らかにされるであろう。そして、このような解析からヘパリン結合分子の機能を制御するヘパラン硫酸オリゴ糖構造のヒントが生まれることを期待したい。

●文 献

- 1) Bernfield M, Gotte M, Park PW et al : *Annu Rev Biochem* **68** : 729-777, 1999
- 2) Esko JD, Selleck SB : *Annu Rev Biochem* **71** : 435-471, 2002
- 3) Habuchi H, Habuchi O, Kimata K : *Glycoconj J* **21** : 47-52, 2004
- 4) Nakato H, Kimata K : *Biochim Biophys Acta* **1573** : 312-318, 2002
- 5) Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y et al : *J Biol Chem* **279** : 12346-12354, 2004
- 6) Kreuger J, Spillmann D, Li JP, Lindahl U : *J Cell Biol* **174** : 323-327, 2006
- 7) Habuchi O : *Biochim Biophys Acta* **1474** : 115-127, 2000
- 8) Bishop JR, Schuksz M, Esko JD : *Nature* **446** : 1030-1037, 2007
- 9) Bulow HE, Hobert O : *Annu Rev Cell Dev Biol* **22** : 375-407, 2006
- 10) Kimata K, Habuchi O, Habuchi H, Watanabe H : Knockout mice and Proteoglycans, Kamerling JP. COMPREHENSIVE GLYCOSCIENCE, Vol. 3, pp159-191, Elsevier, Netherlands, 2007
- 11) Lin X, Wei G, Shi Z et al : *Dev Biol* **224** : 299-311, 2000
- 12) Inatani M, Irie F, Plump AS et al : *Science* **302** : 1044-1046, 2003
- 13) Ahn J, Ludecke HJ, Lindow S et al : *Nat Genet* **11** : 137-143, 1995
- 14) Stickens D, Zak BM, Rougier N et al : *Development* **132** : 5055-5068, 2005
- 15) Stickens D, Clines G, Burbee D et al : *Nat Genet* **14** : 25-32, 1996
- 16) Ringvall M, Ledin J, Holmborn K et al : *J Biol Chem* **275** : 25926-25930, 2000
- 17) Grobe K, Inatani M, Pallerla SR et al : *Development* **132** : 3777-3786, 2005
- 18) Wang L, Fuster M, Sriramarao P et al : *Nature Immunol* **6** : 902-910, 2005
- 19) MacArthur JM, Bishop JR, Stanford KI et al : *J Clin Invest* **117** : 153-164, 2007
- 20) Humphries DE, Wong GW, Friend DS et al : *Nature* **400** : 769-772, 1999
- 21) Forsberg E, Pejler G, Ringvall M et al : *Nature* **400** : 773-776, 1999
- 22) Li JP, Gong F, Hagner-McWhirter A et al : *J Biol Chem* **278** : 28363-28366, 2003
- 23) Bulow HE, Hobert O : *Neuron* **41** : 723-736, 2004
- 24) Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS et al : *Genes Dev* **12** : 1894-1906, 1998
- 25) Pratt T, Conway CD, Tian NM et al : *J Neurosci* **26** : 6911-6923, 2006
- 26) Habuchi H, Nagai N, Sugaya N et al : *J Biol Chem* **282** : 15578-15588, 2007
- 27) Kamimura K, Koyama T, Habuchi H et al : *J Cell Biol* **174** : 773-778, 2006
- 28) HajMohammadi S, Enjyoji K, Princivalle M et al : *J Clin Invest* **11** : 989-999, 2003
- 29) Kobayashi T, Habuchi H, Tamura K et al : *J Biol Chem* **282** : 19589-19597, 2007
- 30) Pan Y, Carbe C, Powers A et al : *Development* **135** : 301-310, 2008
- 31) Habuchi H, Tanaka M, Habuchi O et al : *J Biol Chem* **275** : 2859-2868, 2000
- 32) Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Kimata K : *J Biol Chem* **280** : 31508-31515, 2005
- 33) Chen E, Stringer SE, Rusch MA et al : *Dev Biol* **284** : 364-376, 2005
- 34) Izvolsky KI, Shoykhet D, Yang Y et al : *Dev Biol* **258** : 185-200, 2003
- 35) Bulow HE, Berry KL, Topper LH et al : *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 6346-6351, 2002
- 36) Hudson ML, Kinnunen T, Cinar HN, Chisholm AD : *Dev Biol* **294** : 352-365, 2006
- 37) Yanagishi M : *J Biol Chem* **267** : 9505-9511, 1992
- 38) Scholefield Z, Yates EA, Wayne G et al : *J Cell Biol* **163** : 97-107, 2003
- 39) Li JP, Galvis MLE, Gong F et al : *Proc Natl Acad Sci USA* **102** : 6473-6477, 2005
- 40) Shukla D, Spear PG : *J Clin Invest* **108** : 503-510, 2001
- 41) Yabushita H, Noguchi Y et al : *Glycobiology* **12** : 345-351, 2002
- 42) Park PW, Pier GB et al : *Nature* **411** : 98-102, 2001