

コンドロイチン硫酸の生合成と新たな機能—細胞分裂や骨疾患との関わり

北川 裕之(神戸薬科大学・生化学研究室)

コンドロイチン硫酸は、様々な細胞増殖因子や細胞外マトリックス成分と相互作用し、細胞接着、移動、増殖、分化、形態形成といった様々な細胞活動を制御している。これらコンドロイチン硫酸の機能発現は、生合成によって厳密に調節されていると考えられてきたが、コンドロイチン硫酸の生合成機構は長い間謎であった。しかしながら、最近になって我々を含む複数の研究グループによって、コンドロイチン硫酸の生合成に関与する糖転移酵素や硫酸基転移酵素遺伝子が殆ど同定され、その謎が解き明かされはじめた。さらに、コンドロイチン硫酸の生合成に関与する酵素遺伝子の変異が、様々な疾患を引き起こすことも見いだされてきた。本講演では、以下に記載した我々のコンドロイチン硫酸の生合成機構の解析と、コンドロイチン硫酸の合成異常により明らかとなった機能や疾患に関する研究成果をお話したい。

コンドロイチン硫酸の骨格構造の生合成機構

コンドロイチン硫酸は、コアタンパク質の特定のセリン残基に特徴的な四糖構造(GlcA 1-3Gal 1-3Gal 1-4Xyl 1-O-Ser)を介してプロテオグリカンとして合成される。コンドロイチン硫酸は、この四糖構造が生合成された後、非還元末端の GlcA 残基に、GalNAc 転移酵素(GalNAcT)-I の作用によって、GalNAc が 1-4 結合で転移されることにより始まる。そして、コンドロイチン硫酸に特徴的な二糖繰り返し単位である -3GalNAc 1-4GlcA 1- という構造が、コンドロイチン糖鎖伸長のためのグルクロン酸転移酵素(GlcAT)-II と GalNAcT-II の2種類の酵素活性によって繰り返し付加(重合)される。最近我々は、GalNAcT-I、-II および GlcAT-II 活性は、哺乳類においては6種類のコンドロイチン合成酵素ファミリー(コンドロイチン合成酵素(ChSy)-I、ChSy-II、コンドロイチン重合化因子(ChPF)、コンドロイチン GlcAT、コ

ンドロイチン GalNAcT-I、-II)によって担われており、これら 6 種の酵素が互いに協力し合いながら、コンドロイチン糖鎖の合成を行っていることを明らかにした。しかしながら、基質特異性の類似した複数の酵素が存在するため、これらの酵素遺伝子を用いた哺乳類におけるコンドロイチン糖鎖の機能解析は、容易ではないと思われた。そこで我々は、線虫にも硫酸化はされていないがコンドロイチンが存在するを見いだしていたので、コンドロイチン合成酵素ファミリーの線虫オーソログの検索を行ったところ、ChSy-I と ChPF のオーソログと考えられる cChSy と cChPF の 2 種しか存在しないことが判明した。

細胞分裂とコンドロイチン

線虫を用いたコンドロイチンの機能解析をおこなうために、九州大学の野村らとの共同研究により RNA interference 法を用いて cChSy や cChPF をノックダウンしたり、cChSy の変異体を作成した。その結果、cChSy や cChPF の発現が減少もしくは欠損した線虫は共に、コンドロイチンがほとんど合成されず、初期胚において細胞質分裂に異常をきたし、多核の胚ができて致死となることが明らかとなった(1, 2)。従って、生体内で cChSy と cChPF は共にコンドロイチンの生合成に必須であり、単独ではコンドロイチンの合成が出来ないこと、およびコンドロイチンが線虫の初期胚の細胞質分裂に必須であることが明らかとなった。

コンドロイチン硫酸の硫酸化異常による疾患

コンドロイチンの二糖繰り返し領域の重合反応が開始されると、すぐに硫酸化をはじめとする修飾反応も起こると考えられている。最近、Rajab らによって、重篤な進行性の脊柱後側弯症状や、脱臼を伴う重篤な関節炎を特徴とする常染色体劣性遺伝病として、spondyloepiphyseal dysplasia (SED) Omani type が報告された(3)。原因遺伝子は、連鎖解析により、コンドロイチン硫酸の GalNAc の 6 位の硫酸化修飾を担うコンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素-1 (C6ST-1)であることが示唆された。SED Omani type の患者では、

C6ST-1 の塩基配列の 911 番目の G が A に変異しており、その結果、アミノ酸配列の 304 番目のアルギニンがグルタミンに変化していた。そこで、患者の点変異体 C6ST-1 を構築し硫酸基転移酵素活性を測定した結果、硫酸基転移酵素活性は完全に消失していた。さらに、SED Omani type の患者から樹立した繊維芽細胞の合成するコンドロイチン硫酸鎖の構造や患者由来の尿中に存在するコンドロイチン硫酸鎖の構造を解析したところ、野生型と比べ、C6ST-1 の変異によりコンドロイチン硫酸の GalNAc の 6 位が硫酸化された構造が激減していた(4)。従って、SED Omani type の患者では、軟骨発生や骨分化において、コンドロイチン硫酸の GalNAc の 6 位が硫酸化された構造が激減することにより、低硫酸化あるいは硫酸化パターンが変化し、軟骨の細胞外マトリックスの主要構成成分であるコラーゲンなどと相互作用することが出来ないため、軟骨細胞の強度や弾性を維持できず、脊椎や椎間に異常をきたし、進行性の脊柱後側弯症状を引き起こしているのではないかと考えられる。

文献

- 1) Mizuguchi, S., Uyama, T., Kitagawa, H., Nomura, K. H., Dejima, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Sugahara, K., and Nomura, K. (2003) *Nature* **423**, 443-448
- 2) Izumikawa, T., Kitagawa, H., Mizuguchi, S., Nomura, K. H., Nomura, K., Tamura, J., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., and Sugahara, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, in press
- 3) Rajab, A., Kunze, J., and Mundlos, S. (2004) *Am. J. Med. Genet.* **126A**, 413-419
- 4) Thiele, H., Sakano, M., Kitagawa, H., Sugahara, K., Rajab, A., Höhne, W., Leschik, G., Nürnberg, P., and Mundlos, S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10155-10160