

“ヒアルロン酸の生合成及び代謝の意義”

ヒアルロン酸合成の脂質依存性に関する生化学的検討

板野 直樹 (信州大学大学院医学研究科分子腫瘍学分野)

ヒアルロン酸は、我々の身体を構成する主要な細胞外マトリックス成分として、細胞の基本的な働きである増殖や移動などを調節している。ヒアルロン酸は図 1 に示す様に N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸が結合した 2 糖繰り返し多糖であり、その構造から水を保持することで細胞間の潤滑や緩衝に機能しているといわれている。そうしたヒアルロン酸を合成する酵素が Hyaluronan Synthase (HAS) である。HAS は原核生物から真核生物まで幅広く存在しており、哺乳動物の HAS には 3 種のアイソフォーム (HAS1, HAS2, HAS3) が存在する。HAS はその一次構造の解析から、7 回膜貫通膜蛋白質と考えられ、細胞膜中に存在してヒアルロン酸の合成と分泌に関与しているとされる (図 2)。

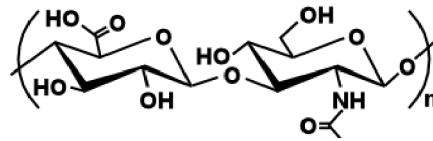


図 1. ヒアルロン酸の構造

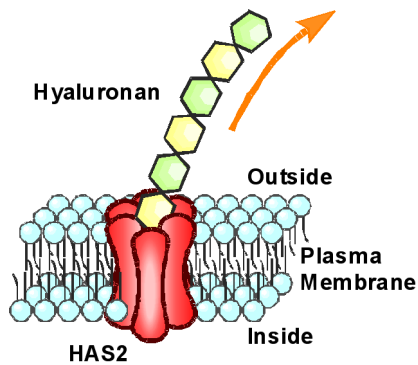


図 2. ヒアルロン酸合成の模式図

連鎖球菌由来の HAS の解析から、酵素活性の維持に脂質成分が重要であるとの知見が得られている (1)。しかしながら、動物細胞由来の HAS については、その脂質要求性に関する実験は今日まで行われていない。本発表では、無細胞ヒアルロン酸合成系を用いて解析した HAS 活性の脂質要求性について最近の知見を報告する。一方で、細胞の癌化が引き金となりヒアルロン酸の合成が過剰になることが報告されている。近年の遺伝子工学的な解析から、この様なヒ

アルロン酸合成の異常が、がんの悪性化と密接に関連していることが明らかとなっている。従って、異常なヒアルロン酸合成を正常化することで、癌の進展を阻止することが可能と考えられるため、ヒアルロン酸糖鎖合成を作用点とした抗浸潤・転移剤の開発が重要となる。4-メチルウンベリフェロン (MU) は、以前にヒト皮膚線維芽細胞や C 型連鎖球菌のヒアルロン酸合成を阻害することが見出され (2)、更に、担癌マウスを用いた解析から抗転移作用も認められている (3)。MU を基礎とした新規ヒアルロン酸合成阻害剤の開発には、その作用機序を明らかにする必要がある。本発表の後半では、MU によるヒアルロン酸合成阻害の機序に関して新たな知見を報告する。

HAS 活性の脂質要求性を検討するために、無細胞ヒアルロン酸合成系の確立を試みた。まず、ヒト HAS2 をバキュロウイルス-昆虫細胞系においてヒスチジンタグとの融合蛋白質として発現した。発現細胞の細胞膜画分より HAS2 蛋白質を界面活性剤によって可溶化し、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーにより部分精製した。可溶化 HAS2 と種々のリン脂質からなるリポソームを混合して膜の再構成を行い、それらが酵素の安定性と活性維持にどのような効果をもたらしているのか検討した。その結果から HAS-脂質複合体の中にある HAS は脂質等により堅固に保持されて安定性が維持されることがわかった。この無細胞ヒアルロン酸合成系を用いることで、脂質複合体中での HAS の機能を理解することが可能になり、ヒアルロン酸合成機構の解明が更に進むことが期待される。

HAS 遺伝子導入細胞を用いた解析から、以前の報告でヒト皮膚線維芽細胞において示されたのと同様に、MU がヒアルロン酸合成とマトリックス形成を濃度依存的に阻害することがわかった (4)。そして、この阻害効果に対応して、細胞内在性の UDP-グルクロン酸糖転移酵素 (UGT) の働きにより MU 糖誘導体 (MU-グルクロン酸) が産生することを明らかにした。一方、MU-グルクロン酸は直接ヒアルロン酸合成を阻害しないことから、UGT による MU-グルクロン酸の生成反応が阻害に重要と考えられた。そこで、無細胞ヒアルロン酸合成系に組換え UGT 蛋白質を添加し、MU-グルクロン酸の産生を促進したときのヒアルロン酸合成抑制について検討した。その結果、MU-グルクロン酸の産生増加に伴って、MU によるヒアルロン酸合成の阻害効果が増強することを見出した。同様に、細胞においてヒト UGT を過剰発現すると、MU によるヒアルロン酸合成の阻害が増強した。以上の結果から、細胞内在性 UGT の糖転移反応により細胞内 UDP-グルクロン酸が消費されて、UDP-グルクロン酸を合成基質とするヒアルロン酸の合成が競合的に阻害された可能性が考えられた。以上の結果は、UGT の基質が潜在的なヒアルロン酸合成阻害剤として作用する可能性を示唆しており、新規ヒアルロン酸合成阻害剤の開発に本情報は有用と考えられる。

最後になりますが、MUの作用機序に関する研究は、弘前大学医学部医学科生化学第一講座との共同研究であり、故高垣啓一先生には本研究の全般にわたり多大なるご尽力、そしてご指導を頂きました。ここに高垣先生のご逝去を悼み、心よりご冥福をお祈り申し上げます。

(1) Weigel, P.H., Kyossev, Z., Torres, L.C. Phospholipid dependence and liposome reconstitution of purified hyaluronan synthase. (2006) *J Biol Chem.* 281:36542-36551

(2) Nakamura, T., Takagaki, K., Shibata, S., Tanaka, K., Higuchi, T., and Endo, M. Hyaluronic-acid-deficient extracellular matrix induced by addition of 4-methylumbelliferone to the medium of cultured human skin fibroblasts. (1995) *Biochem Biophys Res Commun.* 208: 470-475.

(3) Yoshihara, S., Kon, A., Kudo, D., Nakazawa, H., Kakizaki, I., Sasaki, M., Endo, M., and Takagaki, K. A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. (2005) *FEBS Lett.* 579: 2722-2726.

(4) Kakizaki, I., Kojima, K., Takagaki, K., Endo, M., Kannagi, R., Ito, M., Maruo, Y., Sato, H., Yasuda, T., Mita, S., Kimata, K., and Itano, N. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. (2004) *J Biol Chem.* 279: 33281-33289