

## 軟骨におけるコンドロイチン硫酸合成酵素の機能

佐藤 隆

産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター・糖鎖遺伝子機能解析チーム

コンドロイチン硫酸(CS)は軟骨などの細胞外マトリックス成分に多く含まれるグリコサミノグリカン糖鎖の一種で、高度に硫酸化された長鎖状の構造である。軟骨における主たるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンはアグリカンであり、大量の CS が結合したアグリカン分子は、ヒアルロン酸やコラーゲンと共に、軟骨マトリックス特有の弾力性と保水作用を生み出している。また、軟骨以外でも CS は細胞膜表面のレセプター分子に結合して様々なサイトカインのコレセプターとして機能することが報告され、発生、分化、がん化、細胞浸潤など多岐にわたるサイトカインを介したシグナル伝達に CS が寄与する可能性が示唆されている。

CS の糖鎖構造はプロテオグリカンコアタンパク質の特定のセリン残基に非還元末端からグルクロン酸(GlcUA)  $\beta$  1,3ガラクトース  $\beta$  1,4ガラクトース  $\beta$  1,3キシロースからなる四糖のリンケージ領域が結合し、そこに *N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)と GlcUA の二糖繰り返し糖鎖が伸長する。この4糖のリンケージ領域はヘパラン硫酸あるいはヘパリンの糖鎖構造と共通であり、非還元末端の GlcUA に GalNAc が転移されると GalNAc と GlcUA の2糖繰り返しの CS 合成が始まり、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が転移されると GlcNAc と GlcUA の2糖繰り返しのヘパラン硫酸/ヘパリン合成が開始されると考えられている。

ほ乳動物の CS 合成に関しては、現在までに合計6種類の糖転移酵素遺伝子が報告されている。ヒトの CS 合成酵素はそのアミノ酸配列の相同性から3つのペアに分類できる。ChSy/CSS1 と CSS3 はそれぞれ2つの糖転移酵素ドメインを持った酵素で GalNAc 転移酵素活性と GlcUA 転移酵素活性の両方を持っている。CSGlcUA-T と ChPF/CSS2 のペアは1つの糖転移酵素ドメインだけを持っており、前者は GlcUA 転移酵素活性を、後者は CS 鎖の伸長反応に関与している。3つ目の CSGalNAcT-1 と CSGalNAcT-2 のペアは GalNAc 転移酵素ドメインのみを持ち、リンケージ領域の4糖に CS 生合成開始の最初の GalNAc を転移する活性を有している。これら6種類の酵素の *in vitro* での基質特異性や組織における遺伝子発現分布はこれまでに報告されているが、それぞれ

の酵素の *in vivo* での基質特異性、コアとなるプロテオグリカンの種類、コンドロイチン硫酸合成における役割分担は未だ未解明のままである。我々は *in vivo* での CS の機能や、関節疾患との関連を明らかにするため、CS 生合成の開始反応を担う酵素の一つであり、軟骨組織の CS 合成において重要な役割を担っている酵素である CSGalNAcT-1 のノックアウト (KO) マウスを作製し、軟骨における表現型の解析を行った。

*Csgalnact1* KO マウスは正常に誕生し、雌雄ともに正常な生殖能を有していたが、全長・体重ともに野生型マウスに比べておよそ 1 割小さかった。2 週齢の KO マウスでは、上腕骨、頸骨などの長骨の長さが短く、成長板の増殖軟骨細胞の細胞外マトリックスの減少とカラム構造に異常が見られた。軟骨 CS の生化学的分析の結果、KO マウスは CS 含量が野生型のおよそ半分に減少していたが、CS 鎖の長さや硫酸化度には大きな変化がなかった。免疫組織染色により、KO マウス軟骨ではアグリカンやリンクプロテインの減少が観察され、ウエスタンブロットの結果、アグリカン分子の分解が亢進していた。以上の結果、*Csgalnact1* KO マウスでは、CS の減少により細胞外マトリックス成分中のアグリカンのプロテアーゼへの感受性が増してアグリカン分子の分解が亢進して、成長板の構造に異常を生じることから正常な軟骨内骨化が妨げられた可能性が考えられた。本研究は、NEDO「糖鎖機能活用技術開発」プロジェクトの一環として実施したものである。