

学 位 論 文 題 名

Identification and characterization of novel chondroitin sulfate-specific hydrolases

(新規コンドロイチン硫酸特異的加水分解酵素の同定および性質の解明)

学位論文内容の要旨

【研究背景】

コンドロイチン硫酸 (CS) はコアタンパク質と共有結合したプロテオグリカンとして、細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する。CS は、*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) とグルクロン酸 (GlcA) の二糖が交互に繰り返し重合した直鎖状の多糖鎖であり、CS 鎖に多様な硫酸化修飾が起ることによって、構造多様性を獲得する。CS 鎖上に形成された特定の配列と様々な生理活性タンパク質が結合することで、CS 鎖は多様な活性を発揮する。例えば、Wnt、骨形成タンパク質、繊維芽細胞増殖因子、プレイオトロフィンなどの細胞増殖・分化因子と結合することで、細胞の増殖や分化、神経突起の伸長など、生体内で様々な機能に関与している。近年、CS の生合成に関する研究は盛んに行なわれるようになり、CS 生合成酵素遺伝子の殆どがクローニングされてきた。しかし、CS の代謝分解に関する研究は十分には進んでいない。CS の代謝分解は、初めにエンド型の糖加水分解酵素により多糖鎖をオリゴ糖にまで加水分解した後に、リソソームにおいてエキソ型の糖加水分解酵素および硫酸基加水分解酵素が非還元末端より順々に作用すると考えられている。後半のエキソ型の酵素群については比較的研究が進んでいるが、分解の初期段階を担うエンド型の酵素については解析が不十分である。

【研究目的】

CS の代謝分解における初期段階は、本来ヒアルロン酸 (HA) を分解するヒアルロニダーゼ (HYAL) が副次的にその役割も担っていると考えられている。しかし、HYAL の CS に対する作用は限定的である。すなわち、HYAL は CS よりも HA に対する分解作用が高く、また、ウロン酸の 2 位が硫酸化された CS 構造には全く作用しない。このため、既知の HYAL の作用だけでは CS の代謝分解を説明することは不十分である。そこで、CS 特異的なエンド型分解酵素の存在を予想し、その同定および役割の解明を目指し研究を行った。

【研究内容】

(I) 線虫を用いた解析 HYAL は弱いながらも CS に作用するため、未知の CS 分解酵素は HYAL と相同性のあるタンパク質であると考えられた。以前の研究より、線虫には硫酸化修飾を受けていない CS であるコンドロイチン (Chn) は存在するが HA は存在しないことが明らかになっていた。しかし、線虫のゲノムをデータベースで調べたところ、ヒトの HYAL と相同性のある遺伝子が存在することが判明した。そこで、モデル生物である線虫に着目して、CS 特異的な分解酵素の同定を目指し、この HYAL 様遺伝子の解析を行なった。HYAL 様遺伝子がコードするタンパク質に Flag タグを付け、融合タンパク質として一過性に発現させた。精製した酵素を酵素源として Chn に対する活性を解析した。

(II) ヒトの HYAL を用いた解析 ヒトには HYAL 及びその関連遺伝子として、HYAL1、HYAL2、HYAL3、HYAL4、PH-20 の 5 種が報告されている。このうち、HYAL1、HYAL2、PH-20 の糖加水分解活性は確認されており、それぞれ HYAL と報告されている。しかしながら、HYAL3 と HYAL4 に関しては酵素活性の報告はなされていなかった。そこで、これらのクローニングを行い、Flag タグを付けた融合タンパク質として一過性に発現させ、精製タンパク質を用いて様々な CS 異性体に対する分解活性を調べた。

(III) HYAL4 の基質認識に関わるアミノ酸の同定 上記の(II)の研究結果より、申請者は、

HYAL4 が CS 特異的な加水分解酵素であり、CS 鎖中の比較的珍しい糖鎖配列を選択的に認識して切断することを明らかにした。さらに、マウス Hyal4 (mHyal4) とヒト HYAL4 (hHYAL4) では、CS に対する基質特異性が異なることも明らかにした。そこで、これらの基質認識の違いを産み出すアミノ酸配列の同定を目指し、変異を導入した HYAL4 やキメラ酵素を作製し、それらの性質の解析を行った。

(VI) 生体内での HYAL4 の機能解析 (II) の解析より hHYAL4 が局所的にしか発現していないことが判明した。これは、生体内に CS が普遍的に存在することとは一致しておらず、HYAL4 がリソソームにおいて一般的な CS の代謝分解を担う酵素であるという予想に反していた。そこで、HYAL4 の生体内での機能の解明を目指し、HYAL4 の組織での発現部位や、細胞での局在を解析した。また、HYAL4 を高発現させた細胞株における CS への影響を調べた。

【研究結果】

(I) 線虫を用いた解析 HYAL 様遺伝子がコードしているタンパク質を用いて Chn に対する活性を解析した結果、Chn に対して分解活性を持つことを明らかにした。本酵素は Chn に対して最もよく作用し、CS への作用は弱く、HA には殆ど作用しないことが判明した。本酵素の基質特異性は既知の HYAL とは明らかに異なっており、新規の Chn 分解酵素であることを明らかにした。主要な分解物のサイズは四糖、六糖、八糖であった。さらに、得られた四糖を質量分析および陰イオン交換 HPLC で解析した結果、GlcA β 1-3GalNAc β 1-4 GlcA β 1-3GalNAc という構造であった。これらのことから、この分解酵素は Chn/CS 特異的な加水分解酵素であり、エンド- β -N-アセチルガラクトサミニダーゼであることを証明した。以上の結果より、本酵素をコンドロイチン加水分解酵素 (Chnase) と名づけた。

(II) ヒトの HYAL を用いた解析 HYAL4 の様々な CS 異性体に対する活性を解析した結果、GlcA(2S) β 1-3GalNAc(6S) (2S: 2-O-sulfate, 6S: 6-O-sulfate) という二糖単位を多く含む CS-D に対して強い分解活性を示し、HA には作用しなかった。この二糖単位を含む CS 鎖はヒトの生体内ではあまり存在せず、HYAL4 は特殊な CS 構造を認識して切断していると予想された。HYAL4 による CS-D の主要な分解産物のサイズは四糖、六糖、八糖であった。また、殆ど全ての分解産物の還元末端部分は GlcA(2S) β 1-3GalNAc(6S) 構造であり、HYAL4 は GlcA(2S) β 1-3GalNAc(6S) β 1-4GlcA(2S) β 1-3GalNAc(4S or 6S) という糖鎖配列中のガラクトサミニド結合を主として切断することを明らかにした。以上より、HYAL4 は特定の CS 配列を分解する、特異的なエンド- β -N-アセチルガラクトサミニダーゼであることを証明した。

(III) HYAL4 の基質認識に関わるアミノ酸の同定 mHyal4 は hHYAL4 と同様に CS 特異的な加水分解酵素であった。しかし、分解産物の詳細な解析の結果、hHYAL4 と mHyal4 では認識する CS 中の糖鎖配列に違いがあることを明らかにした。hHYAL4 は CS-D に対して最も強い分解活性を示したが、mHyal4 は他の CS バリエーションである CS-A、CS-C も、CS-D と同程度の分解活性を示した。hHYAL4 と mHyal4 のアミノ酸配列は 80% 以上同一であるため、わずかなアミノ酸の違いが両者の基質認識の違いに関わっていると考えた。そこで、hHYAL4 と mHyal4 のキメラタンパク質やアミノ酸に変異を導入した HYAL4 変異体を作製し、それぞれについて基質特異性を解析し、GlcA β 1-3GalNAc(4S) 構造の認識に最も重要であるアミノ酸残基を決定した。さらに、特定のアミノ酸を変化させることによって、ヒトとマウスの HYAL4 の基質特異性を変化させることにも成功した。

(VI) 生体内での HYAL4 の機能解析 mHyal4 の発現も限局的であり、精巣と 17 日齢胎児のみであった。また、細胞での局在を解析した結果、mHyal4 はリソソームには発現しておらず、細胞表面で GPI アンカー型タンパク質として発現していた。mHyal4 を安定的に高発現させた細胞株では、CS の鎖長がコントロールと比較して有意に短くなっていた。これらのことから、HYAL4 はリソソームで CS の代謝分解に関わる酵素であると予想していたが、むしろ細胞表面で CS 鎖を分解し、それによって CS の働きを調節している酵素である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	山田修平
副査	教授	菅原一幸
副査	教授	綾部時芳
副査	教授	小布施力史

学位論文題名

Identification and characterization of novel chondroitin sulfate-specific hydrolases

(新規コンドロイチン硫酸特異的加水分解酵素の同定および性質の解明)

コンドロイチン硫酸は細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する分子であり、様々な生理活性タンパク質と相互作用してその機能を調節することにより、細胞の増殖や分化、神経突起の伸長など、生体内で多岐に渡る生命現象に関与しており、近年非常に注目されている生体成分である。著者は、世界で初めてエンド型コンドロイチン硫酸加水分解酵素の同定を行った。

まず、モデル生物である線虫のゲノムにヒアルロン酸分解酵素であるヒアルロニダーゼと相同性のある遺伝子が存在するにも関わらず、線虫はヒアルロン酸を合成せずコンドロイチンのみを合成することに注目し、この遺伝子産物がヒアルロニダーゼではなくコンドロイチン加水分解酵素であることを想定した。分子生物学的手法を利用して組換え体酵素を調製し、その活性を調べ、コンドロイチン加水分解酵素であることを確認した。

次に、ヒトヒアルロニダーゼ遺伝子ファミリーの中でこれまで酵素活性の報告のなかったヒアルロニダーゼ-4が、実はヒアルロン酸にはまったく作用しないコンドロイチン硫酸特異的加水分解酵素であることを証明した。さらに、本酵素の様々なコンドロイチン硫酸異性体に対する分解活性を定量的に調べ、また分解産物のオリゴ糖の構造解析を精密に行うことにより、この酵素の認識する糖鎖配列を決定した。

さらに著者は、この酵素の高い基質特異性を規定するアミノ酸配列の解明も行った。マウスのヒアルロニダーゼ-4が、ヒトの酵素同様、コンドロイチン硫酸に特異的なエンド型の加水分解酵素であり、両者はアミノ酸配列に高い同一性があるにも関わらず、それぞれの認識する硫酸化構造に違いがあることを見出した。そこで、著者は多数のキメラ型酵素や、点突然変異を導入した組換え体酵素を調製し、基質特異性を詳細に調べ、両酵素の基質認識の違いに関わる複数のアミノ酸残基の同定に成功した。

これを要するに、著者は、コンドロイチン硫酸の分解に関して新知見を得たものであり、コンドロイチン硫酸の機能解析、応用に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。