

ヘパラン硫酸プロテオグリカン - 細胞と組織のオーガナイザー

Heparan sulfate proteoglycans potential cell and tissue organizers

松岡 耕二¹⁾・佐々木 啓子¹⁾

Koozi MATUOKA and Keiko SASAKI

ヘパラン硫酸は動物組織に普遍的に分布する直鎖状の糖鎖、グリコサミノグリカン（酸性ムコ多糖）の一種である。生体内では、糖鎖がコアタンパク質に結合したブラシ形状のプロテオグリカンとして存在しており、その存在場所、様式にはコアタンパク質の性質によって、細胞膜を貫通している型、細胞膜にグリコシルホスファチジルイノシトールアンカーで結合している型、細胞外マトリックスとして基底膜に組み込まれている型などがある。ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合/相互作用をする分子種は、主にコアタンパク質に結合している糖鎖の構造によって決まるが、ヘパラン硫酸には糖鎖配列が極めて多様であるという特徴がある。すなわち、D-グルコサミンと「D-グルクロン酸またはL-イズロン酸」の繰り返しを基本構造としながらも、D-グルコサミンはN-アセチル化またはN-硫酸化され、さらに3位、6位にもO-硫酸基、ウロン酸部分は2位にO-硫酸基を持つことがあるので、組み合わせ的に膨大な可能性を持つ。糖鎖全体としてみると、硫酸化の程度（酸性度でもある）の高い高硫酸化クラスターが点在していることになり、それらは概して生理活性の高い領域であるが、それ以外の個々の糖鎖配列が特異的な機能を担っている場合も多々見られる。そのようなプロテオグリカンや糖鎖の構造を決定付けるのはそれを合成/代謝する酵素類なので、それらの発現・活性によってヘパラン硫酸プロテオグリカンの種類と構造、したがってその機能が制御されている。がん細胞での変化、疾病に伴う変動も種々知られている。数多くの塩基性部分を持つ分子がヘパラン硫酸に親和性を示すこともあって、ヘパラン硫酸結合分子は極めて多岐に渡っているが、主要なグループには増殖因子、サイトカインの一群、細胞外マトリックス成分や接着分子の一群があって、発生時、器官形成における必要性・重要性を示している。

1. はじめに

生物の体は細胞を生命の基本単位として構成されている。ヒトなど多細胞動物の場合で見れば、約50～60kgの成体は60%近くを占める水分を吸い込んだゼリーのような固形分から成り、そこに約60兆個の細胞がちりばめられている（香川 & 野澤, 1987）。細胞どうしは密着していることもばらばらに離れていることもあるが、それらの間には必ず何らかの化学物質が存在している。そして、それらの物質は単に詰め物として空間を埋めている訳でなく、ほとんどの場合、細胞に何らかの情報を伝えるものとして働いており、細胞はそれに基づいて移動したり、運

動したり、増殖したり、何かを合成、分泌したりして、さらに他の細胞へと情報を送り出している。そのようなネットワークによって作られた細胞社会に依拠して、多細胞生物はまとまった個体として機能・生存することが可能となっている。

細胞の表面にはタンパク質、脂質などの多様な分子が分布していて、他の分子と結合・接着しているが、その際に重要な働きをしているのが糖鎖である。また、細胞間を埋める構造物もタンパク質、脂質などからなっているが、ここでも重要なのが糖鎖を含む分子である。糖鎖は長さとしては実に多様で、構成する単糖が数個の場合もあれば、1万個を超すものまである。本稿で扱うのは、アミノ糖と酸性糖（ウロン酸）によって構成されるグリコサミノグリカン（GAG, glycosaminoglycan; 別名 酸性ムコ多糖）の一種であるヘパラン硫酸（HS, heparan sulfate; 古くは、ヘパリチン硫酸）である（香川 & 野澤, 1987; Lindahl, 2007）。ほとんどの場合、生体内

連絡先: 松岡耕二 kmatuoka@cis.ac.jp

1) 千葉科学大学・薬学部・分子細胞生物学研究室
Laboratory for Molecular/cellular Biology, Faculty
of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2011年10月11日受付、2011年12月21日受理)

のGAGはコアタンパク質に結合したブラシ状の高分子、プロテオグリカン (PG; proteoglycan) として存在している (香川 & 野澤, 1987; Zhang, 2010)。HSもヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の構造を採っているため、以下にはHS、HSPGを合わせて記述する。

2. GAGとPGの種類と構造

GAGは、基本的にはアミノ糖と酸性糖 (ウロン酸) が交互に結合した多糖鎖であり、主なものには表1、図1のような種類がある (例外として、ケラタン硫酸KSIはウロン酸を含まない)。この他にもたとえば、コンドロイチン硫酸 (CS) には、硫酸化される位置や数、硫酸化の程度の違いによる種々の変種がある。後述するようにHSも構成する糖の配列はCSよりはるかに変化に富んでいて、機能の違いをもたらしていると考えられている。

HSとCSはすべての細胞で豊富に作られる分子種であり、細胞表面に数十万コピー、ECMにmg/mLのオーダーで存在すると言われるように、細胞機能の調節に重要な働きをしていると考えられている (Lander & Selleck, 2000)。ヘパリン (HP) は、構成糖の種類がHSに類似していることからHSの一種とも考えられるが、専ら肥満細胞で合成されること、まずPGとして合成されながらもコアタンパク質から外れた遊離の糖鎖となっていること、硫酸化の程度が非常に高いことなど、特異な分子種である (Ishihara & Ono, 1998)。アンチトロンピン III に結合して抗凝血作用を高めることはよく知られている (Lindahl, 2007; 岸本 et al., 2008)。KSIは角膜、軟骨などに、またヒアルロン酸 (HA、別名ヒアルロン酸) は皮膚、関節液などに結合組織成分として存在している (香川 & 野澤, 1987) が、これらも単なる「詰め物」に留まらず、細胞の機能に影響を与えている。

HAだけはコアタンパク質を持たない直鎖状の糖鎖として合成されるが、他のGAGはまずコアタンパク質が作られ、その特定のセリン残基にOグリコシド結合のリンケージ配列が形成されてそれぞれの糖鎖が伸長する、というステップを踏んで主にゴルジ体において合成される (Zhang, 2010)。HSとCSの場合は「グルクロン酸 (GlcA) ガラクトース (Gal) ガラクトース (Gal) キシロース (Xyl) セリン」が共通のリンケージである (例外的にKSの一部はNグリコシド結合でコアタンパク質上に合成される)。完成したPGの性質 (大きさ、形状、局在、機能) は糖鎖部分によることは当然であるが、コアタンパク質によって規定される場所も大きいので、コアタンパク質の数に応じてPGの種類が存在することになる。

3. HSPGの種類

HSPGを見ると、主なものだけでも表2のようなものがある (石原 & 栗田, 1997; 岸本 et al., 2008) さらに、たとえば表ではベータグリカン細胞膜貫通型としているが、代謝によって分泌型となっているものもあって、一層多様である (Andres et al., 1989)。細胞表面に見られる主な構造物は、細胞どうしを結合するもの、細胞と細胞外の構造物 (細胞外マトリックス、extracellular matrix ECM) を結合するものがあるが、HSPGの分子種はその構造によって、細胞のそれらの機能に働いている。

細胞膜貫通型HSPGの代表的なものはシンデカンのファミリーである。細胞外部分には数本のHS糖鎖が付いており (CS糖鎖を含むこともある) その作用によってECM成分であるフィブロネクチン、コラーゲン、ラミニンなどに結合することによって細胞を組織中に支持している。また、後述する多様な分子を親和力により保持して細胞表面の受容体に供与する作用もある (岸本 et al., 2008)。たとえば、フィブロネクチン、コラーゲンはHSの働きによって細胞膜上のインテグリンへの結合が促進される。そのような外部分子との接触は信号として、コアタンパク質の細胞内部分を介して細胞骨格系に伝えられるので、細胞の内外の情報伝達を担っていることになる。グリピカンのファミリーは全体が細胞外に出ており、2~3本のHS鎖が付いたコアタンパク質がグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーにより細胞膜に結合するという構造をもっている。これも細胞外分子との相互作用に働いていると考えられる。これらの細胞表面HSは、細胞の社会的行動を制御するシグナルを作り出しているとも推定される (Matuoka et al., 1987)。一方で、パールカンを代表とする基底膜結合型のHSPGが種々存在する。HSPGは基底膜の構成成分として不可欠な分子である (石原 & 栗田, 1997)。細胞は細胞表面の分子を介して基底膜のHSPGに結合して、組織に接着しているのだろう。

4. HSPGに結合する分子

細胞間、細胞近傍など細胞を取り巻く環境には上述したように多様なHSPGが存在している。その上、HSPGといってもCS糖鎖を含むハイブリッドPGもあり (Zhang, 2010) それらがどの分子と相互作用をしているかを確定するのは困難であるが、おおまかな様子は掴んでおきたい。まず、種々の分子に結合するのは主にHSPG中のHS糖鎖部分である。これは、表1のように、Dグルコサミンと「Dグルクロン酸またはLイズロン酸」の繰り返し構造から成る高分子の糖鎖であるが、DグルコサミンはN-アセチル化またはN硫酸化されていて、さらに3位、6位にO硫酸化されていることがあり、ウロン酸部分は2位に

○硫酸化を受けることがある (Lindahl, 2007; 羽瀨 & 木全, 2008)。全体として硫酸化の程度は、N硫酸基、○硫酸基合わせて二糖単位あたり1個内外である (岸本 et al., 2008)。HPはこれが3個近くもあり、GAGの中で最も高い。硫酸基は生理的条件下では酸性なので、硫酸含有GAG、特にHPは強い酸性を示す。したがって、これらHS、HPの糖鎖およびPGは塩基性物質に親和性を持つ。タンパク質など生体内分子は部分的に見れば塩基性を示すというケースは多々あるので、HS/HPは多様な物質に結合できると考えられる。実際、表3に例示しているように、成長因子、サイトカイン、ECM成分からエネルギー代謝関連分子、血液凝固系、さらにウイルス表面コート分子に及んでいる (Zhang, 2010; 岸本 et al., 2008)。その他にも抗菌ペプチド、形態形成因子類、組織代謝酵素、各種の分解酵素など、種々の分子との親和力が示唆されており、また、HPは血漿タンパク質の23%のものと相互作用するという報告があるぐらいである (Saito & Munakata, 2007)。

このように見ると、HS/HPはその陰電荷に基づいて塩基性物質に網羅的に結合しているように思われるかもしれないが、構成糖の規則的な繰り返し構造を持つことの多いGAGの中ではHS/HPの配列は変化に富んでいるという特徴がある (羽瀨 & 木全, 2008; 岸本 et al., 2008)。すなわち、構成する糖が様々な部位に様々な頻度で硫酸化されているために、HS/HP糖鎖の個々の領域は個性的な配列をなしている、したがって結合する対象は限定されていることが分かってきた。もちろん、硫酸基に富んだ「高硫酸化クラスター」が高い反応性を示すことはよく見られているが、単に酸性度、陰電荷が大きければいいという訳ではない。例を挙げると、特異的な結合配列として初めて見出されたのはHP中の5糖構造 (ペンタサッカライド) である (Lindahl, 2007)。これはアンチトロンピンに結合するものだが、3個のグルコサミンのうち2個はN硫酸化されていること、2個のウロン酸部分は1個はグルクロン酸、1個はイズロン酸であること、6-O硫酸基と3-O硫酸基を持つことが必要であること、が明らかにされた。また、単純ヘルペスウイルスHSVgDタンパク質との結合には、HS/HPにおいては通常Nアセチル化またはN硫酸化されているD-グルコサミンはアミノ基が修飾されていない上に3-O硫酸基を有することが必要だとされている (Shukla & Spear, 2001)。アミロイドペプチド生成に関わるセクレターゼに対しては [ウロン酸 6-O-スルホ-N-スルホグルコサミン] の6回繰り返し、という配列が阻害活性を示す (Scholefield et al., 2003)。さらに、FGF-1、FGF-2、FGF-7、HGFなど一群の成長因子がHS/HPに結合する部位の糖鎖配列は微妙に異なっていること

が見られている (岸本 et al., 2008)。このような配列特異性をもって、HSPGは生体内において適材適所の相互作用を担っているものと考えられる。

5. HS/HP糖鎖の代謝酵素

糖鎖に上記のような配列特異性をもたらすものは、それを合成/分解する酵素である。HS糖鎖の合成に関わるものとして、数々の酵素が見出されてきた (表4) (Zhang, 2010; 羽瀨 & 木全, 2008)。変異体の研究から分かって来たそれらの生体内での働きは、まずは器官形成であろう。欠損すると致死となる場合の多いことから、正常なHSの存在が不可欠であることが改めて確認される。その他、ムコ多糖代謝異常症として知られるリソソーム病があり、酵素の先天的な欠損によりリソソームでの分解が不全なため、細胞内、体内にGAGが蓄積することによって引き起こされるものであるが、 α -L-イズロニダーゼ、イズロン酸-2-スルファターゼ、ヘパラン硫酸 N-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼなどの機能不全によりHSなどの蓄積が起こるので、これらも生体には欠かせない酵素ということになる (Beck, 2007)。

2-OST (2-O硫酸転移酵素) 破壊による腎形成欠損には軸索誘導の異常が、2-OST、6-OST (6-O硫酸転移酵素) 破壊による肢芽形成欠如、血管形成異常にはHSが結合する成長因子群の内、FGF系、VEGF系の発現、活性化の阻害が関わっていると考えられる (Pratt et al., 2006; Kobayashi et al., 2007; Ashikali-Hada et al., 2005)。単純ヘルペスウイルス、クラミジア・トラコマチスなどの病原性微生物も、細胞表面HSのグルコサミンの3-O硫酸化、6-O-硫酸化を利用して感染する (Shukla & Spear, 2001; Yabushita et al., 2002)。NDST (N脱アセチラーゼ/N硫酸転移酵素) を破壊すると、内皮細胞のHSの硫酸化が低下して白血球の浸潤、遊走が阻害される (Wang et al., 2005)。また、脂質代謝に関わるLDL受容体、アポBタンパク質、アポEタンパク質、リパーゼなどはHSに結合するとされており、NDSTの破壊により中性脂肪を多く含むリポタンパク質が蓄積する (MacArthur et al., 2007)。インスリン欠損ラットではNDST活性が低下しており、糖尿病に伴う高脂血症との関連が疑われる。

その他に重要な酵素として、エンド グルコシダーゼのヘパラーゼがある (Nakajima et al., 1988)。これは組織全般に分布して組織・細胞におけるHSの代謝回転に関わっているもので、古くから知られているバクテリア由来のHS分解酵素ヘパリチナーゼ (Hovingh & Linker, 1970) とは全く別種である。血小板における活性が高いことから (Hullett et al., 1999)、血管内皮細胞表面のHSは血小板の付着を妨

げるので、止血時には血小板がヘパラーゼを放出してHSを分解して結合するという働きが考えられる。また、転移能の高いがん細胞はヘパラーゼ活性が高いという現象が知られている (Nakajima et al., 1988)。基底膜の構成成分HSは物質透過の制御、増殖因子の貯蔵庫として働いているので、がん細胞にとっては浸潤するため、また、血管新生因子を遊離させるためにヘパラーゼが有利に働くものと見られる。

6. おわりに

以上、不十分ながらHS/HPとそのPGが生体・細胞においていかに重要な機能を担っているかを紹介した。細胞の社会行動における役割について触れられなかったので、機会を改め、図も入れて見やすく整理したいと思っている。最後に2007~2008年に米国で起ったヘパリン不純物による医療上の有害事象について触れたい。これは米国企業のヘパリン製剤を投与された患者785人以上にアレルギー症状に似た副作用が現れ、少なくとも149人の死者が出たもので、中国内の工場で生産された原料を分析したところ、化学的に修飾されたGAG(たとえば、二糖単位あたり4個の0硫酸基をもつ過硫酸化コンドロイチン硫酸)が混合されていた (Warkentin & Greinacher, 2009)。内因性(接触)凝固系を介したトロンピン産生による免疫システムの亢進によると見られるが、高度硫酸化多糖が免疫系活性化を引き起こすというのは新たな認識であり、HS/HPのもつ機能にはさらに広がりがあることを考えさせる出来事であった。

参考文献

- Andres JL et al. (1989) *JCell Biol* 109:3137-3145
 Ashikali-Hada S et al. (2005) *JBiolChem* 280:31508-31515
 Beck M (2007) In: Dahl S et al. eds, *Genetic metabolic disorders*, pp13-18
 Hovingh P, Linker A (1970) *JBiolChem* 245:6170-6175
 Hultt MD et al. (1999) *NatMed* 5:803-809
 Ishihara M, Ono K (1998) *Trend Glycosci Glycotech* 10:223-233
 Kobayashi T et al. (2007) *JBiolChem* 282:19589-19597
 Lander AD, Selleck SB (2000) *JCell Biol* 148:227-232
 Lindahl U (2007) *Thromb Haemost* 98:109-115
 Matuoka K et al. (1987) *JCell Biol* 104:1105-1115
 MacArthur JM et al. (2007) *JClin Invest* 117:153-164
 Nakajima M et al. (1988) *JCell Biochem* 36:157-167
 Pratt T et al. (2006) *JNeurosci* 26:6911-6923
 Saito A, Munakata H (2007) *Biochim Biophys Acta* 1770:241-246
 Schofield Z et al. (2003) *JCell Biol* 163:97-107
 Shukla D, Spear PG (2001) *JClin Invest* 108:503-510
 Wang L et al. (2005) *Nat Immunol* 6:902-910
 Warkentin TE, Greinacher A (2009) *Expert Opin Drug Saf* 8:129-144
 Yabushita H et al. (2002) *Glycobiol* 12:345-351
 Zhang L (2010) *Prog Mol Biol Translat Sci* 93:1-17
 石原雅之, 栗田明 (1997) *防衛医大誌* 22: 143-156
 香川靖雄, 野澤義則 (1987) *図説医化学* 第3版 p8, p31, p90
 岸本聡子 et al. (2008) *生体の科学* 59:92-100
 羽淵弘子, 木全弘治 (2008) *生体の科学* 59:84-91

表1 主なグリコサミノグリカン(別名: 酸性ノ多糖)の種類

名称	略名	構造	分子量の例(重合度)	主な存在部位(機能)
コンドロイチン	CH	N-アセチル-D-ガラクトサミンとD-グルクロン酸から成る二糖の繰返し。O-グリコシドでコアタンパク質に結合してプロテオグリカン(PG)として存在。	25,000~ 30,000	角膜(構造形成)
コンドロイチン-4硫酸 (コンドロイチン硫酸A)	C4S	N-アセチル-D-ガラクトサミン4硫酸とD-グルクロン酸。二糖あたり1個の硫酸基を持つ。O-グリコシドでコアタンパク質に結合してPGとして存在。コンドロイチン硫酸類にはヘパラン硫酸、ケラタン硫酸とのハイブリッドPGも見られる。	30,000~ 50,000 (80~ 130)	骨、象牙質 (石灰化)
コンドロイチン-6硫酸 (コンドロイチン硫酸C)	C6S	N-アセチル-D-ガラクトサミン6硫酸とD-グルクロン酸。O-グリコシドでコアタンパク質に結合してPGとして存在。	30,000~ 50,000	軟骨(緩衝能)
デルマトン硫酸 (コンドロイチン硫酸B)	DS	N-アセチル-D-ガラクトサミン4硫酸とL-イズロン酸から成る二糖の繰返し。O-グリコシドでコアタンパク質に結合してPGとして存在。	20,000~ 40,000 (40~ 50)	皮膚、結合組織 (保水、弾力)
ヒアルロナン (ヒアルロン酸)	HA	D-N-アセチルグルコサミンとD-グルクロン酸から成る二糖の繰返し。直鎖状の多糖。	100,000~ 10,000,000 (150~ 60,000)	皮膚、関節液、 硝子体 (保水、弾力、潤滑)
ヘパラン硫酸	HS	D-グルコサミン、D-グルクロン酸、L-イズロン酸を構成糖とする多糖のN-アセチル、N硫酸、O硫酸置換体。硫酸化の程度はまちまち。O-グリコシドでコアタンパク質に結合してPGとして存在。コンドロイチン硫酸類とのハイブリッドPGも見られる。	15,000	細胞表面、基底膜 増殖因子結合、接着)
ヘパリン	HP	D-グルコサミン、D-グルクロン酸、L-イズロン酸から成る多糖のN硫酸、N-アセチル、O硫酸置換体。ムコ多糖のうちでは最も硫酸化が高く、二糖あたり約3個の硫酸基を持つ。PGとして合成されるが、コアタンパク質が外れて糖鎖だけになって存在。	7,000~ 20,000	肥満細胞 (血液凝固抑制)
ケラタン硫酸	KS	N-アセチルグルコサミン6硫酸とガラクトース。ウロン酸を含まない。PGとして存在するが、コアタンパク質との結合は例外的に一部N-グリコシド。コンドロイチン硫酸類とのハイブリッドPGも見られる。	4,000~ 20,000	角膜、軟骨 (構造形成)

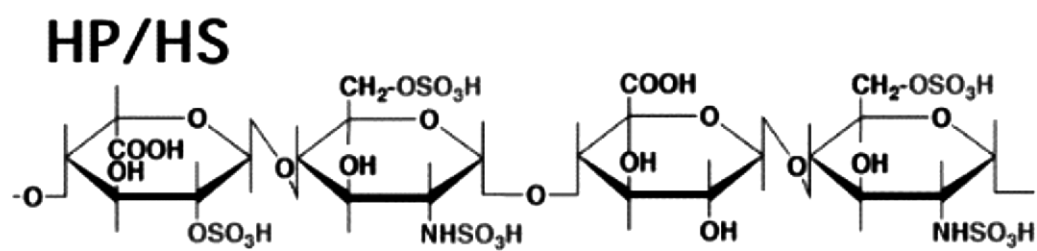
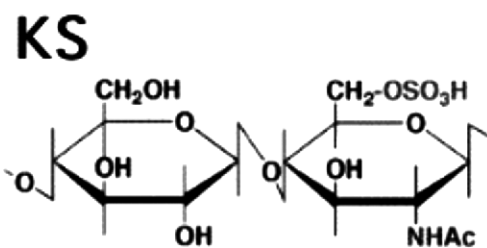
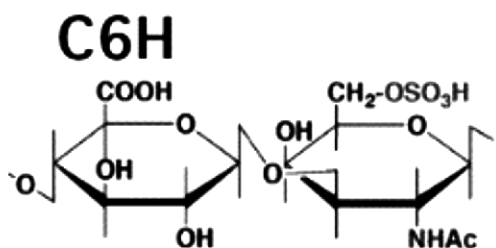
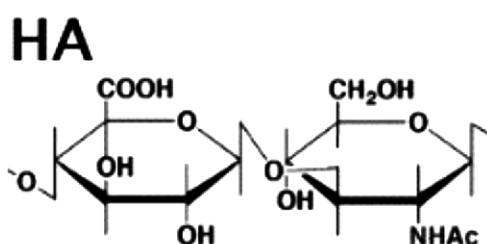
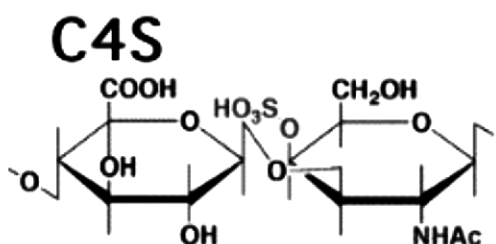
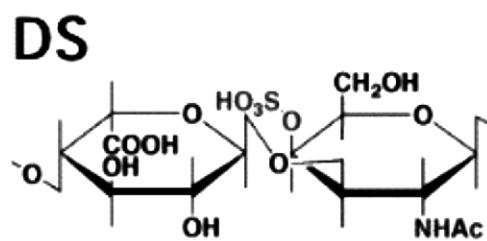
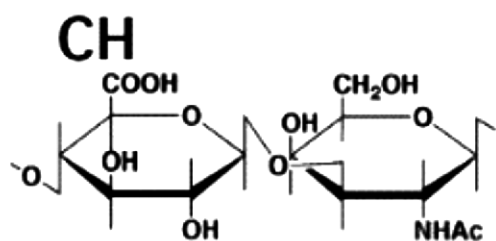


表2 主なヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)

分子名	知られているサブタイプ	コアタンパク質の分子量(例)
細胞膜貫通型 シンデカン syndecan ベータグリカン beta glycan(TGFBR3) フィブログリカン fibroglycan CD44	4種	33kDa 250-350kDa 23kDa 51kDa
細胞表面結合型 グリピカン glypican	6種	62kDa
基底膜結合型 パールカン perlecan(低密度型) ?(高密度型) テストカン testican アグリン agrin コラーゲン XVIII collagen XVIII	4種~コンドロイチン硫酸鎖が多い 3種	400-500kDa 20-40kDa 65kDa 250kDa 187kDa

表3 ヘパラン硫酸プロテオグリカン・ヘパリンに結合する主な分子

分類	分子名
成長因子	FGF-1~7, EGF, VEGF
サイトカイン	IL-2, 3, 4, 8, GM-CSF, TNF-
マトリックス成分	フィブロネクチン、ピトロネクチン、ヘパリン、コラーゲン、トロンボスポンジン、チロシン
ウイルスコートタンパク質	HM-1, gp120, HSV gC, HSV gD, HHV-8 gK8.1A
エネルギー代謝関連分子	リポタンパク質リパーゼ、アポリポタンパク質B, スーパーオキシドディスムターゼ
血液凝固システム	アンチトロンピンIII、ヘパリン補因子II

表4 主なヘパラン硫酸代謝酵素

酵素名	機能	変異の影響例
EXTL1, EXTL2, EXTL3	糖鎖合成開始、糖鎖の伸長	多発性外骨腫は起らない？
EXT1, EXT2	ポリメラーゼ。糖鎖の伸長	胎性致死、原腸形成欠損、多発性外骨腫
NDST-1, NDST-2, NDST-3, NDST-4	N 脱アセチラーゼ / N 硫酸転移酵素。脱アセチル化、N 硫酸化	致死、呼吸不全、大脳形成不全
C5-epimerase	C5-エピメラーゼ。グルクロン酸をイズロン酸に転換する	致死、腎臓欠損、大脳形成不全、軸索誘導・移動の欠陥
2-OST	2-O 硫酸転移酵素。グルクロン酸、イズロン酸の2位の硫酸化	致死、腎臓欠損、大脳形成不全、軸索誘導・移動の欠陥
6-OST-1, 6-OST-2, 6-OST-3	6-O 硫酸転移酵素。N アセチルグルコサミン、N-スルホグルコサミンの6位の硫酸化	ほとんど致死、肺気管形成以上、軸索誘導・移動の欠陥
3-OST-1, 3-OST-2, 3-OST-3A, 3-OST-3B, 3-OST-4, 3-OST-5, 3-OST-6	3-O 硫酸転移酵素。N アセチルグルコサミン、N-スルホグルコサミン、グルコサミンの3位の硫酸化	特異的な致死、止血機能は正常
SULF1, SULF2	6-O-スルファターゼ。6-O-スルホ-N-スルホグルコサミンの6位の脱硫酸化	胎性致死、軸索伸長不全
heparanase	エンド グルコシダーゼ。HSの分解、除去。細胞組織全般、血小板活性が見られる(バクテリア由来のヘパリチナーゼは全く別の酵素)	がん細胞で活性亢進