

とにより, Sulf-1 は細胞内への増殖シグナルの減少を誘導している可能性が示唆された。グルコサミンの6位硫酸化は FGF-2-HS 糖鎖ではなく FGFR1-HS 糖鎖の結合に必要であるため, Sulf は後者の分子間相互作用を調節する可能性がある。Sulf-1 が HS 糖鎖リモデリングにより受容体自身による阻害を促進する可能性も検討しなければいけない<sup>48)</sup>。MSulf-1, MSulf-2 遺伝子欠損マウスより調製した胚線維芽細胞において FGF-2 によるシグナル伝達と細胞分裂が野生型に比べて増加する結果は, 上記仮説をよく支持した<sup>49, 50)</sup>。

### 3-4. Sulf の生体内における役割: Sulf ノックアウトマウスの表現型

既に述べたように, Sulf-1 は Wnt 依存的な筋組織の発生に関わる<sup>15)</sup>。しかしながら, 両 Sulf-1, Sulf-2 は胚発生時の Wnt シグナルに必須とはいえない。このことはマウスにおいて明らかである。Wnt リガンド分子の遺伝子欠損では胎生致死または出生直後の死亡が観察される (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>)。しかし, Sulf-1 または Sulf-2 単独の遺伝子ノックアウトでは, ほとんどの場合わずかな異常が発生時に観察されるのみである<sup>37, 49-51)</sup>。ジーントラップ法による Sulf-2 遺伝子ノックアウトでは, 胎仔マウスの生育が遅れ, 出生後の体重の減少と肺の異常が一部のマウスで観察される<sup>51)</sup>。胎生致死に至った Sulf-2 遺伝子ノックアウトマウスは脳機能不全と関連する<sup>52)</sup>。Sulf-1 および Sulf-2 の両遺伝子欠損では, 約 50% の出生直後の死亡が観察されるが残りのマウスは成体まで成長する<sup>37, 49, 50)</sup>。胎生致死でない Sulf-1, Sulf-2 両遺伝子欠損マウスは野生型に比べて体格が小さいが, いずれの臓器も組織レベルでの異常はみられない<sup>50)</sup>。一方, Sulf 両遺伝子欠損マウスのわずかな骨格形成異常が報告された<sup>53, 54)</sup>。Sulf-1, Sulf-2 両遺伝子欠損マウスの表現型で最も詳しく解析されているのが摂食障害である<sup>37)</sup>。Ai らは Sulf 両遺伝子欠損マウスの食道における平滑筋への神経分布の異常を観察し, そのことが筋収縮能の障害を引き起こしていると結論づけた。すなわち, 両 Sulf が筋組織への神経分布における GDNF を介したシグナル伝達を増加させていることを明らかにした<sup>37)</sup>。さらに Ai らは, 精巣セルトリ細胞が発現する Sulf-1 および Sulf-2 が, GDNF シグナル伝達で制御される精子形成幹細胞自己複製を量的に規定していることを明らかにした<sup>40)</sup> (図 5)。また, Sulf-1 および Sulf-2 が筋サテライト細胞の FGF-2 依存性増殖を抑え, 筋細胞への分化を誘導し筋再生を促していることが, Sulf 両遺伝子欠損マウスより明らかとなった<sup>55)</sup>。いずれの場合も Sulf-1 または Sulf-2 単独の遺伝子ノックアウトでは異常がみられない。どちらか一方の Sulf が, HS 糖鎖スルファターゼ酵素活性レベルで補償作用を示すのか, または機能的な補償作用を示すのか明らかにする必要がある。

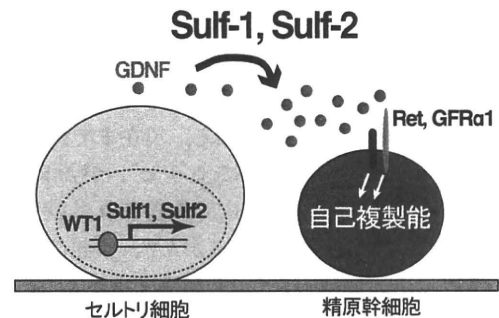


図 5 Sulf による GDNF シグナルの制御モデル

精巣セルトリ細胞 (Sertoli cell) より発現される Sulf-1, Sulf-2 が HS 鎖 S-ドメインを介し細胞表面や細胞外マトリックスに貯留, 隔離 (sequestration) されている GDNF を HS 鎖 S-ドメイン分解によりリリースさせる。結果的に精子形成幹細胞 (spermatogonial stem cell) への GDNF 生物学的利用率 (bioavailability) を増大させる。精子形成幹細胞が発現する Ret および GFR $\alpha$ 1 を介したシグナル伝達が正に制御される。精巣セルトリ細胞における Sulf-1, Sulf-2 の遺伝子発現は WT1 転写因子により調節される<sup>40, 66)</sup>。本文参照。文献 40) より改変。

さらに, ヘパラン硫酸 6-硫酸転移酵素<sup>10)</sup>のグルコサミン 6 位の硫酸化亢進による代償作用の有無も検討しなければならない。また, もう一つの解釈として, Sulf は *in vitro* では多くのシグナル伝達系を制御する潜在的な作用を示すが, 正常な個体発生においては Sulf の作用は根本的に不可欠なものではなく, シグナル伝達の強度を微調整するファインチューナーの役割を担っているのかもしれない。さらに詳しい解析が必要である。

### 4. 新規細胞外スルファターゼ Sulf の病態への関与: Sulf のがんにおける発現調節不全

HSulf-1, HSulf-2 のクローニング後, 我々はがんにおける Sulf の関与を明らかにするため SAGE (serial analysis of gene expression, 連続的遺伝子発現解析) 法を行った。SAGE 法とは, それぞれの mRNA から 10-11bp の遺伝子配列 (タグ) を抽出し作成したライブラリーをもとに, 組織における mRNA 発現量を定量する方法である。ライブラリーにおける特定遺伝子に対応するタグの出現数は, 組織でのその遺伝子の発現量を表している。ライブラリーのタグの総数に対する出現した特定遺伝子タグ数の割合を計算することによって, 発現頻度を求めることができる。HSulf-2 遺伝子 (SULF2) に関して, タグの発現頻度は 3 種のがん, すなわち乳がん, 中枢神経系がん, 大腸がんにおいてその正常組織と比較した場合著しく高かった。そのタグの発現頻度は腫瘍組織において 6-8 倍増加している。HSulf-1 遺伝子 (SULF1) に関しては, より少ないタグ数ではあったが乳がんと中枢神経系がんにおいてその発現頻度は高くなっていった<sup>23)</sup>。これらの結果は Sulf のがんへの関与の最初のヒントとなった。その後, ヒト乳がんにおける SULF1, SULF2 の発現上昇が確認された<sup>38)</sup>。引き続きマ

ウスの乳がんモデルである MMTV-Neu マウスおよび MMTV-Wnt1 マウスを解析した結果, Sulf-2 は正常乳腺組織では検出されないが, 過形成乳腺および乳腺腫瘍ではその発現が観察された<sup>38)</sup>. 上記に加え, 現在までに定量 PCR またはマイクロアレイ解析によりヒトがんにおける *SULF1*, *SULF2* の発現上昇が広く報告されている. 例えば, *SULF1* は肝細胞がん<sup>43)</sup>, 膵臓がん<sup>45)</sup>, 頭頸部扁平上皮がん<sup>56)</sup>, 胃がん<sup>57)</sup>, 肺腺がん<sup>58)</sup>, 肺扁平上皮がん<sup>58)</sup> で発現が増加している. *SULF2* は, 肝細胞がん<sup>59)</sup>, 肺腺がん<sup>58)</sup>, 肺扁平上皮がん<sup>58)</sup> で発現が増加している. 公開されているマイクロアレイ解析データベース Oncomine (www.oncomine.com) を用いて, 正常組織と腫瘍組織における発現レベルを解析すると, 有為差 ( $p < 0.0001$ ) を伴う変動のうち, *SULF1* は 30 の比較例で 3–60 倍の発現増加が確認される. 2 例の比較においてのみ発現減少がみられる. *SULF2* は有為差 ( $p < 0.0001$ ) を伴う変動 9 例全てにおいて 2–8 倍の発現増加が確認された. 比較例の詳細は文献 60) に記載されている. また, レトロウイルスを用いたマウス挿入変異誘発システムの解析から, *Sulf-2* が神経膠腫において発がん性遺伝子の一つであることが明らかにされた<sup>61)</sup>. 大変興味深いことに, 上述の Oncomine の *SULF2* 解析結果 9 例のうち 5 例はヒト神経膠腫である<sup>60)</sup>.

## 5. おわりに

Wnt, BMP, GDNF, FGF などのシグナル伝達が中心となる疾患において, Sulf-1 と Sulf-2 の疾患の発症や進行への関与が明らかになってきている. Otsuki らは, ヒト変形性骨関節炎における関節軟骨で Sulf-1, Sulf-2 の mRNA 及びタンパク質が正常軟骨に比べて発現増加することを示した. その後, ヒト軟骨細胞および *Sulf-1* または *Sulf-2* 遺伝子欠損マウスを用いて, 変形性骨関節症における Sulf の役割を明確に示した. すなわち, Sulf-1, Sulf-2 は BMP7 シグナルを増強させ, FGF2 シグナルを減弱させることにより, 関節軟骨における恒常性維持を担っている<sup>54)</sup>. このバランスが破綻すると軟骨の変性が誘発されると示唆された. さらに, 加齢に伴って関節軟骨における Sulf-1, Sulf-2 の発現が増加することを示した<sup>62)</sup>. 加齢は多くのヒト疾患においてリスクファクターとなっており, Sulf の加齢に伴い発症する他の疾患 (例えばアルツハイマー型認知症) への関与があるかもしれない. 我々はある種の神経変性疾患における Sulf-2 と HS 糖鎖 S-ドメインの発現調節不全を見出し, 今後この分野における HS 糖鎖と Sulf の機能解明に貢献できればと願っている.

## 謝辞

本稿で取り上げた筆者らの研究報告はカリフォルニア大学サンフランシスコ校 Steven Rosen 教授との共同研究に

よるものであり, この場を借りてお礼申し上げます.

## 文 献

- Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., & Kjellen, L. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 24979–24982.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., & Zako, M. (1999) *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 729–777.
- Bishop, J.R., Schuksz, M., & Esko, J.D. (2007) *Nature*, **446**, 1030–1037.
- Esko, J.D. & Selleck, S.B. (2002) *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 435–471.
- Gallagher, J.T. (2001) *J. Clin. Invest.*, **108**, 357–361.
- Iozzo, R.V. (2001) *J. Clin. Invest.*, **108**, 165–167.
- Sugahara, K. & Kitagawa, H. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 518–527.
- Yan, D. & Lin, X. (2009) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a002493.
- Habuchi, H., Habuchi, O., & Kimata, K. (2004) *Glycoconj. J.*, **21**, 47–52.
- Habuchi, O. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1474**, 115–127.
- Esko, J.D. & Lindahl, U. (2001) *J. Clin. Invest.*, **108**, 169–173.
- Nakato, H. & Kimata, K. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1573**, 312–318.
- Lamanna, W.C., Kalus, I., Padva, M., Baldwin, R.J., Merry, C. L., & Dierks, T. (2007) *J. Biotechnol.*, **129**, 290–307.
- Lee, J.S. & Chien, C.B. (2004) *Nat. Rev. Genet.*, **5**, 923–935.
- Dhoot, G.K., Gustafsson, M.K., Ai, X., Sun, W., Standiford, D. M., & Emerson, C.P., Jr. (2001) *Science*, **293**, 1663–1666.
- Ohto, T., Uchida, H., Yamazaki, H., Keino-Masu, K., Matsui, A., & Masu, M. (2002) *Genes Cells*, **7**, 173–185.
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S., & Rosen, S.D. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 49175–49185.
- Diez-Roux, G. & Ballabio, A. (2005) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **6**, 355–379.
- Rosen, S.D. (2004) *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 129–156.
- Uchimura, K., Gauguet, J.M., Singer, M.S., Tsay, D., Kannagi, R., Muramatsu, T., von Andrian, U.H., & Rosen, S.D. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 1105–1113.
- Uchimura, K. & Rosen, S.D. (2006) *Trends Immunol.*, **27**, 559–565.
- Kawashima, H., Petryniak, B., Hiraoka, N., Mitoma, J., Huckaby, V., Nakayama, J., Uchimura, K., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Lowe, J.B., & Fukuda, M. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 1096–1104.
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., & Rosen, S.D. (2003) *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **15**, 159–164.
- Saad, O.M., Ebel, H., Uchimura, K., Rosen, S.D., Bertozzi, C. R., & Leary, J.A. (2005) *Glycobiology*, **15**, 818–826.
- Ai, X., Do, A.T., Lozynska, O., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., & Emerson, C.P., Jr. (2003) *J. Cell. Biol.*, **162**, 341–351.
- Viviano, B.L., Paine-Saunders, S., Gasunas, N., Gallagher, J., & Saunders, S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 5604–5611.
- Cosma, M.P., Pepe, S., Annunziata, I., Newbold, R.F., Grompe, M., Parenti, G., & Ballabio, A. (2003) *Cell*, **113**, 445–456.
- Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L.V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M., & von Figura, K. (2003) *Cell*, **113**, 435–444.
- Nakayama, K. (1997) *Biochem. J.*, **327**, 625–635.

- 30) Tang, R. & Rosen, S.D. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 21505-21514.
- 31) Nagamine, S., Keino-Masu, K., Shiomi, K., & Masu, M. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391, 107-112.
- 32) Hossain, M.M., Hosono-Fukao, T., Tang, R., Sugaya, N., van Kuppevelt, T.H., Jenniskens, G.J., Kimata, K., Rosen, S.D., & Uchimura, K. (2010) *Glycobiology*, 20, 175-186.
- 33) Ai, X., Do, A.T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., Lu, K., & Emerson, C.P., Jr. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 4969-4976.
- 34) Frese, M.A., Milz, F., Dick, M., Lamanna, W.C., & Dierks, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 28033-28044.
- 35) Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., Bistrup, A., Li, J., Lyon, M., Gallagher, J., Werb, Z., & Rosen, S.D. (2006) *BMC Biochem.*, 7, 2.
- 36) Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., & Rosen, S.D. (2006) *Methods Enzymol.*, 416, 243-253.
- 37) Ai, X., Kitazawa, T., Do, A.T., Kusche-Gullberg, M., Labosky, P.A., & Emerson, C.P., Jr. (2007) *Development*, 134, 3327-3338.
- 38) Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Bistrup, A., Lum, D.H., Egeblad, M., Boudreau, N., Werb, Z., & Rosen, S.D. (2005) *Neoplasia*, 7, 1001-1010.
- 39) Nawroth, R., van Zante, A., Cervantes, S., McManus, M., Hebrok, M., & Rosen, S.D. (2007) *PLoS ONE*, 2, e392.
- 40) Langsdorf, A., Schumacher, V., Shi, X., Tran, T., Zaia, J., Jain, S., Taglienti, M., Kreidberg, J.A., Fine, A., & Ai, X. (2010) *Glycobiology*, 21, 152-161.
- 41) Lai, J., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Greene, E.L., Matthews, T.A., Smith, D. I., Kaufmann, S.H., Roberts, L.R., & Shridhar, V. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 23107-23117.
- 42) Lai, J.P., Chien, J., Strome, S.E., Staub, J., Montoya, D.P., Greene, E.L., Smith, D.I., Roberts, L.R., & Shridhar, V. (2004) *Oncogene*, 23, 1439-1447.
- 43) Lai, J.P., Chien, J.R., Moser, D.R., Staub, J.K., Aderca, I., Montoya, D.P., Matthews, T.A., Nagorney, D.M., Cunningham, J.M., Smith, D.I., Greene, E.L., Shridhar, V., & Roberts, L.R. (2004) *Gastroenterology*, 126, 231-248.
- 44) Dai, Y., Yang, Y., MacLeod, V., Yue, X., Rapraeger, A.C., Shriver, Z., Venkataraman, G., Sasisekharan, R., & Sanderson, R.D. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 40066-40073.
- 45) Li, J., Kleeff, J., Abiatari, I., Kayed, H., Giese, N.A., Felix, K., Giese, T., Buchler, M.W., & Friess, H. (2005) *Mol. Cancer*, 4, 14.
- 46) Wang, S., Ai, X., Freeman, S.D., Pownall, M.E., Lu, Q., Kessler, D.S., & Emerson, C.P., Jr. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 4833-4838.
- 47) Narita, K., Staub, J., Chien, J., Meyer, K., Bauer, M., Friedl, A., Ramakrishnan, S., & Shridhar, V. (2006) *Cancer Res.*, 66, 6025-6032.
- 48) Schlessinger, J. (2003) *Science*, 300, 750-752.
- 49) Lamanna, W.C., Baldwin, R.J., Padva, M., Kalus, I., Ten Dam, G., van Kuppevelt, T.H., Gallagher, J.T., von Figura, K., Dierks, T., & Merry, C.L. (2006) *Biochem. J.*, 400, 63-73.
- 50) Holst, C.R., Bou-Reslan, H., Gore, B.B., Wong, K., Grant, D., Chalasani, S., Carano, R.A., Frantz, G.D., Tessier-Lavigne, M., Bolon, B., French, D.M., & Ashkenazi, A. (2007) *PLoS ONE*, 2, e575.
- 51) Lum, D.H., Tan, J., Rosen, S.D., & Werb, Z. (2007) *Mol. Cell Biol.*, 27, 678-688.
- 52) Kalus, I., Salmen, B., Viebahn, C., von Figura, K., Schmitz, D., D'Hooge, R., & Dierks, T. (2008) *J. Cell. Mol. Med.*, 13, 4505-4521.
- 53) Ratzka, A., Kalus, I., Moser, M., Dierks, T., Mundlos, S., & Vortkamp, A. (2008) *Dev. Dyn.*, 237, 339-353.
- 54) Otsuki, S., Hanson, S.R., Miyaki, S., Grogan, S.P., Kinoshita, M., Asahara, H., Wong, C.H., & Lotz, M.K. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 10202-10207.
- 55) Langsdorf, A., Do, A.T., Kusche-Gullberg, M., Emerson, C.P., Jr., & Ai, X. (2007) *Dev. Biol.*, 311, 464-477.
- 56) Kudo, Y., Ogawa, I., Kitajima, S., Kitagawa, M., Kawai, H., Gaffney, P.M., Miyauchi, M., & Takata, T. (2006) *Cancer Res.*, 66, 6928-6935.
- 57) Junnila, S., Kokkola, A., Mizuguchi, T., Hirata, K., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Puolakkainen, P., & Monni, O. (2010) *Genes Chromosomes Cancer*, 49, 28-39.
- 58) Lemjabbar-Alaoui, H., van Zante, A., Singer, M.S., Xue, Q., Wang, Y.Q., Tsay, D., He, B., Jablons, D.M., & Rosen, S.D. (2010) *Oncogene*, 29, 635-646.
- 59) Lai, J.P., Sandhu, D.S., Yu, C., Han, T., Moser, C.D., Jackson, K.K., Guerrero, R.B., Aderca, I., Isomoto, H., Garrity-Park, M. M., Zou, H., Shire, A.M., Nagorney, D.M., Sanderson, S.O., Adjei, A.A., Lee, J.S., Thorgeirsson, S.S., & Roberts, L.R. (2008) *Hepatology*, 47, 1211-1222.
- 60) Rosen, S.D. & Lemjabbar-Alaoui, H. (2010) *Expert Opin. Ther. Targets*, 14, 935-949.
- 61) Johansson, F.K., Brodd, J., Eklof, C., Ferletta, M., Hesselager, G., Tiger, C.F., Uhrbom, L., & Westermark, B. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 11334-11337.
- 62) Otsuki, S., Taniguchi, N., Grogan, S.P., D' Lima, D., Kinoshita, M., & Lotz, M. (2008) *Arthritis Res. Ther.*, 10, R61.
- 63) Uchimura, K., Lemjabbar-Alaoui, H., van Kuppevelt, T.H., & Rosen, S.D. (2010) *Methods Enzymol.*, 480, 51-64.
- 64) Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V., Siegfried, E., Stam, L., & Selleck, S.B. (1999) *Nature*, 400, 276-280.
- 65) Lin, X. & Perrimon, N. (1999) *Nature*, 400, 281-284.
- 66) Ratelade, J., Arrondel, C., Hamard, G., Garbay, S., Harvey, S., Biebuyck, N., Schulz, H., Hastie, N., Pontoglio, M., Gubler, M. C., Antignac, C., & Heidet, L. (2010) *Hum. Mol. Genet.*, 19, 1-15.

