

TMEM2による個体レベルでのヒアルロン酸分解機構

飛澤 悠葵

1. はじめに

グリコサミノグリカンファミリーの一つであるヒアルロン酸 (HA) はグルクロン酸と *N*-アセチルグルコサミンの2糖が繰り返し連なる構造をとる巨大な直鎖状の多糖類であり、細胞外マトリックス (ECM) の主成分であるとともに血液やリンパ液などの体液中にも豊富に存在する (図1A)。HAは合成酵素 hyaluronic acid synthase (HAS) 1, HAS2, HAS3, および分解酵素 hyaluronidase (HYAL) 1, HYAL2などにより、生体内で合成・分解される。体重70kgの成人における総HA重量は約15gであり、代謝回転は速くその3分の1が1日で置き換わる¹⁾。これは、組織内の他のECM分子の半減期が数か月から数年であることとは対照的であり、細胞がHA分解のために非常に活発かつ緻密な代謝機構を有することを示唆している²⁾。HAは代謝回転が非常に速いことが報告されてきたが、細胞膜で合成され細胞外に放出された“nascent”なHAの分子量は200万を超えるため、HAの代謝は多段階のプロセスを経ると考えられている。従来受け入れられてきたHAの分解モデルは、細胞外空間のHAが最初に細胞外または細胞表面のヒアルロニダーゼによって中間サイズのHAフラグメントに部分的に分解され、その後これらの中間サイズのHAは細胞に取り込まれ、エンドソームおよびリソソーム内のヒアルロニダーゼによってさらに分解される、というものである³⁾。これらの小さなHAフラグメントは、最終的にリソソームエキソグリコシダーゼによって単糖類に分解され、それらの単糖類は新しいグリカンの生成または解糖のためにリサイクルされると考えられる (図1B)⁴⁾。しかし、一般的に中心的なHA分解酵素と考えられているHYALファミリーの分子 (HYAL1, HYAL2, SPAM1/

PH20) は、酸性pH領域に最適pHを持つため主にリソソームで働くと考えられており、これらの点から細胞外におけるHA分解酵素の存在が推測され探索されてきた。たとえば、Yoshidaらにより新規のタンパク質であるCEMIP/HYBID (KIAA1199としても知られる) がHA分解に関与していることが報告され、関節リウマチ、変形性関節症などにおける関与が報告された⁵⁾。(ただし、CEMIP/HYBIDのHA分解には細胞内機構の関与を必要とするとされており、CEMIP/HYBID自体がHA分解酵素活性を持つかどうかは明らかでない。)我々は、一連の研究によりCEMIP/HYBIDと部分的相同性を持つ膜貫通型タンパク質であるtransmembrane protein-2 (TMEM2) が、*in vivo*における生理的なヒアルロニダーゼであることを示したので、以下この点について紹介する。

2. TMEM2は新規なHA分解酵素である

TMEM2は、少なくとも一つの推定膜貫通ドメインの存在だけに基づきグループ化された300以上の異なるヒトオープンリーディングフレームの一つとして同定された分子である⁶⁾。TMEM2はCEMIP/HYBIDと配列が似ていること、そしてゼブラフィッシュのtmem2変異体が発達中の心臓に過剰なHA蓄積を示すという観察から⁷⁾、未同定の細胞表面ヒアルロニダーゼであることが推測された。我々は2017年にこの2型膜貫通型タンパク質TMEM2が細胞膜表面で働くHA分解酵素であることを報告した⁸⁾。TMEM2はアミノ末端を細胞質内に、カルボキシ末端側を細胞表面に持つ2型膜貫通型タンパク質である。その構造は細胞内領域、膜貫通領域、G8ドメイン、二つのGGドメインに挟まれた複数のPbH1ドメインからなる (図2A)。2014年に報告された分泌型HA分解酵素CEMIPタンパク質の酵素活性部位を有すると考えられる細胞外ドメインと48%のアミノ酸相同性を有するが、他のHA分解酵素との相同性はみられない。TMEM2発現遺伝子を導入したHEK293T細胞を用いたアッセイと分解されたHA産物のゲルろ過分析では、TMEM2は高分子量HA (平均1500kDa; ~7500単糖) を~5kDa (~25単糖) の断片に分解する (図2B)⁸⁾。TMEM2の発現レベルを上げると、基質としてより小さなHAを使うことも、~5kDaより小さなHA断片の生成にはつながらなかった (図2B)⁸⁾。それに比べて、HYAL2

岐阜大学医学部附属病院・泌尿器科 (〒501-1194 岐阜県岐阜市柳戸1-1)

TMEM2 is important for systemic hyaluronan metabolism at the individual level

Yuki Tobisawa (Department of Urology, Gifu University Hospital, Yanagido 1-1, Gifu, Gifu 501-1194, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950531

© 2023 公益社団法人日本生化学会

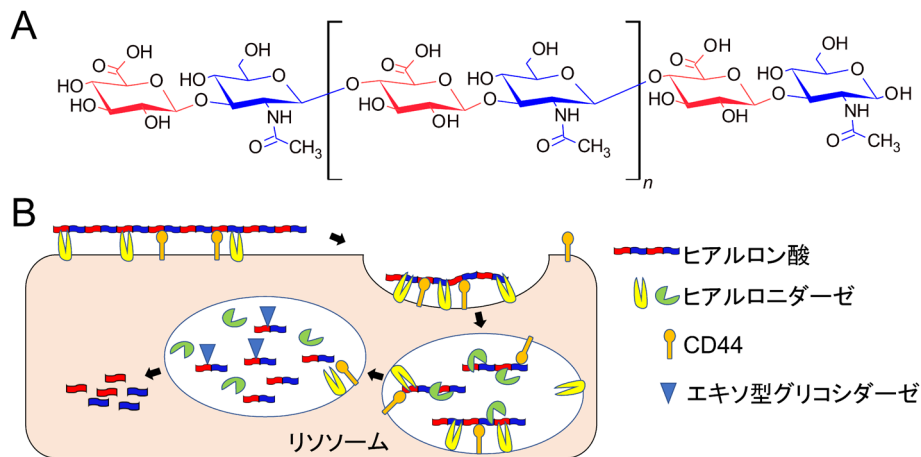


図1 HAの構造と分解機構
(A) HAの構造. (B) HAの分解機構.

はHAを~20kDaの断片に切断し、一方PH-20/SPAM1はさらに小さな断片に分解することが報告されている⁹⁾。それに加え、HYALファミリータンパク質はHAだけでなく、HAと同じグリコサミノグリカン (GAG) に類するコンドロイチン硫酸 (CS) とデルマトン硫酸 (DS) も分解する³⁾。一方、TMEM2のGAG分解活性はHAに特異的であり、TMEM2はCS-A, CS-C, CS-D, DSを分解しない⁸⁾。一般に平行な β ヘリックスフォールドを持つ細菌の多糖類リアーゼは、補酵素として2価の陽イオンを利用するが、TMEM2も同様にカルシウムもしくはマグネシウムなどの2価金属イオン要求性である。細胞外ドメインのみを含む組換え可溶性TMEM2は、pH 5~8の範囲で最適pHを示し、pH 6で最大の活性を示す⁸⁾。TMEM2はpH 5以下では活性を失い、pH 4ではまったく不活性である。このような最適pHは、TMEM2が細胞外環境では酵素的に活性であるが、リソソームでは活性ではない可能性と一致している。上記のTMEM2の最適pHを決定した実験は、可溶性TMEM2が無細胞アッセイ系でHAを分解できるため、TMEM2は細胞内作用経路の関与なしにそれ自体でヒアルロニダーゼ活性を発揮できることを意味している⁸⁾。さらに、遺伝子組換えにより膜貫通領域と細胞内領域を欠損させカルボキシ末端にHis tagをつけて、HEK293F細胞の大量発現系で分泌タンパク質として大量発現させ、培養上清をコバルトのカラムで単離精製した分泌型のTMEM2も試験管内においてHA分解活性を示す (投稿準備中)。これは、ヒアルロニダーゼ活性のために細胞内機構の関与を必要とするCEMPとは対照的である⁵⁾。最近の我々の研究では、内因性TMEM2が基質に固定化したHAを接触依存的に分解することを示し、このことは細胞表面ヒアルロニダーゼとして作用するという考えをさらに支持している (図2C)¹⁰⁾。本酵素の活性が生体内においてどのように機能するかについては後述する。

3. TMEM2はマウス個体のHA分解機構の中心的役割を担う

特定のヒアルロニダーゼ分子が同定される以前は、HAの全身代謝回転は1980年代から1990年代にかけて、主にUppsala大学のLaurent博士のグループによって非常に広範囲に研究されていた^{1, 11-14)}。これらの研究によると、(i) HAは局所的に異化されるか、リンパによってリンパ節や一般循環に運ばれる¹⁾、(ii) 局所組織から放出されたHAのほとんどは、循環に達することなくリンパ節で分解される¹¹⁾、(iii) 一般循環に達したHAは、主に肝臓で取り込まれ異化されるが、ごく一部は腎臓と脾臓で取り込まれる¹²⁾、(iv) 肝臓では、類同上皮細胞が主にHAの取り込みと分解に関与する¹³⁾。リンパ節におけるHAの取り込みと分解を担う細胞タイプは決定されなかったが、リンパ管内上皮細胞が責任集団であることが示唆された¹⁴⁾。そして(v) 細胞レベルでは、内在化したHAはリソソームに運ばれ、リソソームヒアルロニダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -N-アセチルグルコサミニターゼの働きにより単糖類に分解される⁴⁾。これらの先駆的な研究の後、複数の“ヒアルロニダーゼ”分子の候補が同定され、これらの分子を欠損した変異マウスが作製された。しかしながら、全身的なHA異化の特定の段階におけるこれらのヒアルロニダーゼ分子のそれぞれの役割は、実はまだよくわかっていない。これは少なくとも部分的には、マウスの血管とリンパ管が非常に小さく扱いづらいため、全身的なHA代謝研究には適していないためである。上にあげたような代謝研究は、一般にラットやヒツジのような大きな動物、あるいはヒトの血液とリンパ液の標本を用いて行われてきた。その結果、ヒアルロニダーゼノックアウトマウスの研究は、欠損した特定のヒアルロニダーゼ分子の機能的意義を推論するために、主に血液と組織におけるHA蓄積量に頼ってきた。しかし

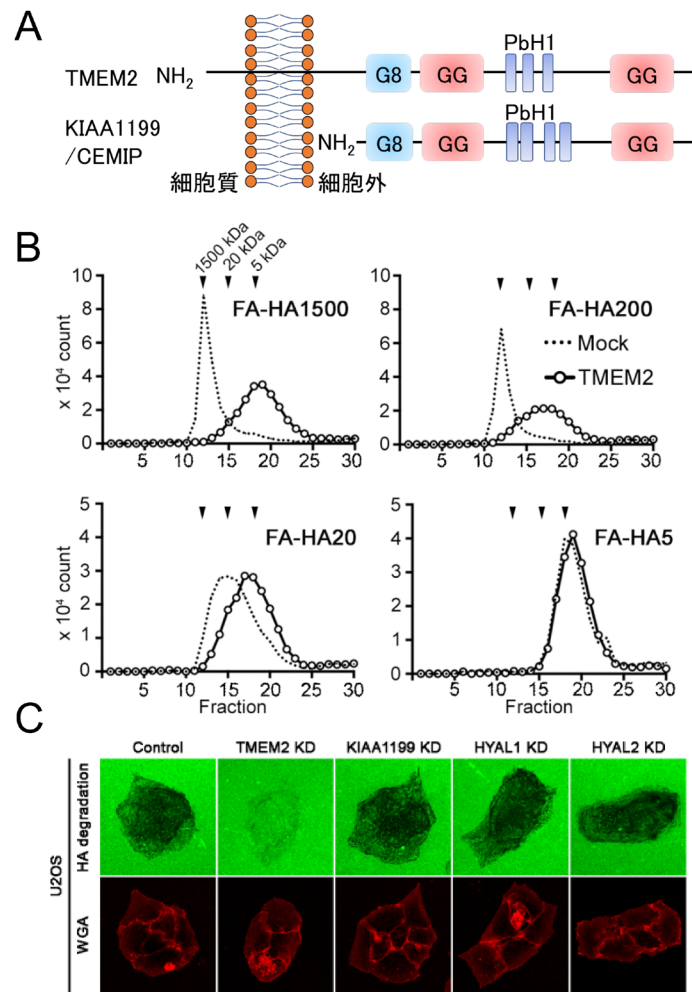


図2 TMEM2の特徴 (文献8および10より一部引用)

(A) TMEM2とCEMIPの細胞外構造は類似のドメイン構造を有しており、アミノ酸配列は48%の相同性を示している。G8およびGGドメインは八つもしくは二つのよく保存されたグリシンを有する構造で、非炎症性難聴関連タンパク質であるCEMIP, TMEM2をはじめとした疾患関連タンパク質に存在する。PbH1ドメインは多糖類を基質とする酵素群によく見られる大きならせん状に巻かれた平行な β ストランドの積み重ね構造。(B) HEK293Tに一過性発現させたTMEM2はヒアルロン酸(HA)を5kDaまで分解した。FA-HA1500, FA-HA200, FA-HA20, FA-HA5は蛍光標識された平均分子量1500K, 200K, 20K, および5KのHA。(C) 基質に固定化したHAはsiRNAによるHA分解酵素のノックダウン実験の結果、U2OS細胞が発現するTMEM2により接触依存的に分解されていた。HA degradation: 蛍光標識HAが分解された部分は蛍光物質が剥がれ落ち黒く見える。WGA: 細胞表面の糖タンパク質に結合するレクチンで細胞の輪郭を示している。

ながら、血中および組織中のHA蓄積(特にノックアウト後の長い期間の後にみられる蓄積)はヒアルロニダーゼ活性の喪失の直接的な特性ではないため、*in vivo*でのHA分解活性を評価するための代用パラメータとしてHA蓄積を用いることには限界がある。この問題は、コンベンショナルノックアウトマウスを解析に用いた場合、発生および成長の過程で欠損したヒアルロニダーゼの長期的な喪失を補う適応反応が起きうるため、データの解釈とその生理的機能の解明を複雑にする可能性がある。これらの問題を最小限に抑え、TMEM2の代謝的役割をより直接的かつ選択的に決定するために、我々はCAGプロモーター支配下でタ

モキシフェン誘導性のCreERT2を発現するシステム(CAG-CreERT2)を利用し、生後の任意の時期で後発的にTMEM2を欠損するマウス(Tmem2-iKO)を用い、Tmem2の不活性化後直ちにマウス生体に生じるHA代謝への影響を検討した¹⁵⁾。

Tmem2-iKOはTMEM2ノックアウトの誘導後、野生型マウスと比較して血漿HA濃度が12日目には約4倍、19日目には約40倍に上昇することが明らかとなった(図3A)。アガロースゲル電気泳動を使用し、血液中のHAの性質をさらに解析すると、約1000kDaの高分子量(HMW)HA(図3B, 矢印)がTmem2-iKOに存在することが明らかに

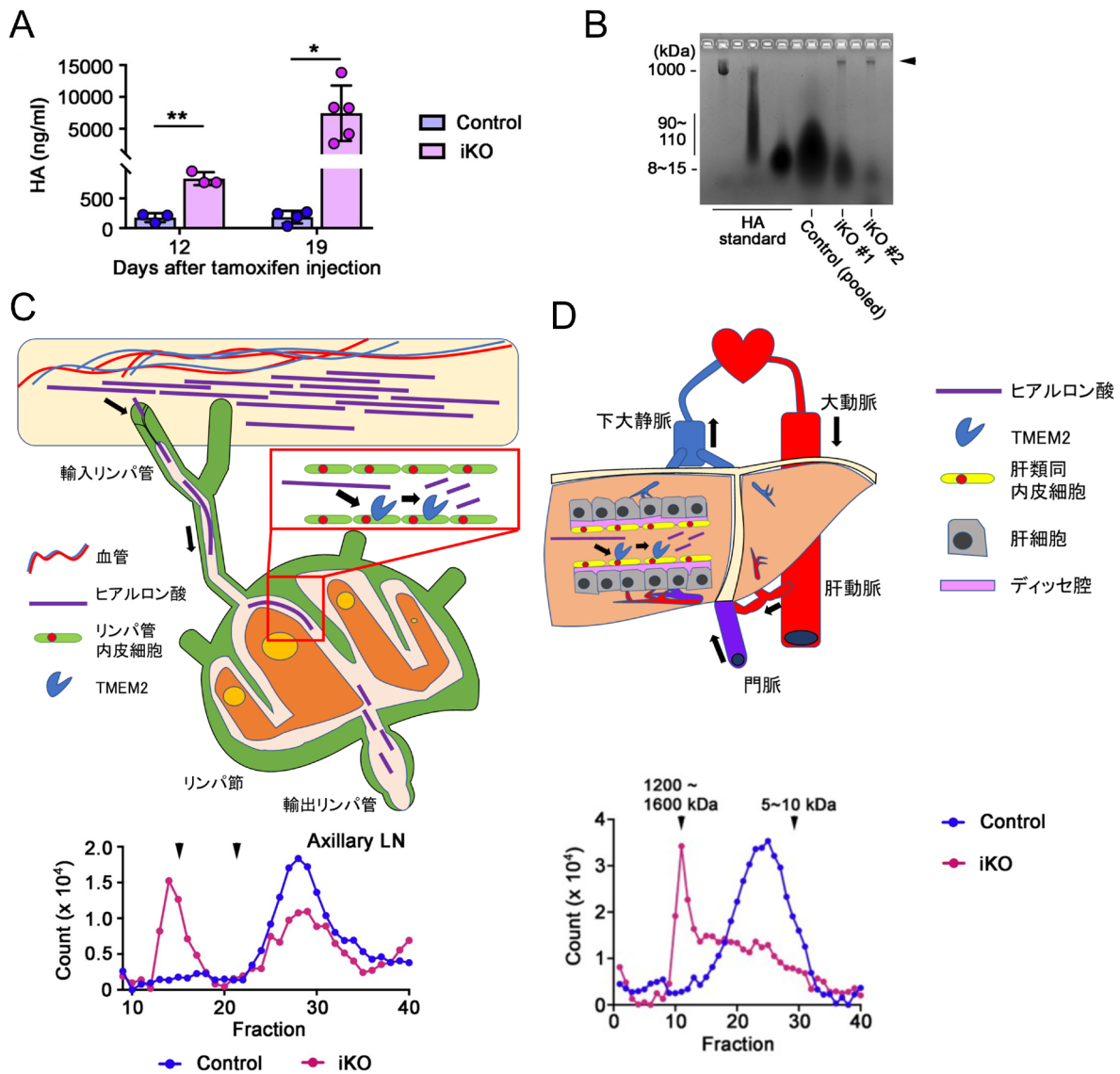


図3 TMEM2の生体内HA代謝への影響（文献15より一部引用）

(A) *Tmem2*^{flox/flox}/*CAG-CreERT2* (iKO) マウスはタモキシフェン誘導後12日, 19日後に血漿中HA濃度が有意に上昇した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (student's *t*-test). (B) iKOマウス血漿中のHAは未分解の高分子量HAが存在した (矢印). (C) 末梢組織に存在するTMEM2によるHA代謝の模式図. 末梢組織のHAは輸入リンパ管を通して所属リンパ節に流れ込み, リンパ管内皮細胞上のTMEM2により切断される. (D) 体循環でのTMEM2によるHA代謝の模式図. 体循環に注ぎ込まれたHAは肝動脈もしくは門脈を介して肝臓に流れ込み肝類同内皮細胞上のTMEM2により切断される. (C, D) iKOマウスではリンパ組織内および血液循環内に注入したHAの代謝が著しく阻害されていた.

なった. したがって, *Tmem2*-iKOでは, 循環血液のHA含量が著しく増加するだけでなく, かなりの量の未消化なHMW HAが循環血液中に含まれることが明らかとなった. また*Tmem2*-iKOマウスでは腎臓, 肝臓, リンパ節, 肺, 骨髄など各組織においてもHAの沈着がみられ, HA分解に異常が生じていると考えられた¹⁵⁾. 末梢組織に生じるHAは細静脈に回収しきれなかった代謝産物とともに末梢組織内に開口末端を持つリンパ管から取り込まれ, リンパ節へと運ばれた後, 胸管を通して静脈に流れ込むと考えられる. また一方で血中に流れ込んだHAは90%以上

が肝臓で処理されている. これらのHA分解に重要な臓器においてTMEM2はCD31陽性の内皮細胞で高発現していた¹⁵⁾. これらのステップに対するTMEM2の影響を検討するため, 蛍光標識したHAを前者ではフットパッド内に注入し所属リンパ節に流れ込んだHAのサイズを測定したところ, *Tmem2*-iKOは野生型マウスに比較し投与6時間後のHA分解産物が著しく少なく, HA分解活性が阻害されていることが明らかとなった (図3C). また後者では下大静脈にHAを注入し10分後心採血により回収した血漿HAのサイズを測定すると, こちらも*Tmem2*-iKOでHA分解が

著しく阻害されていることが明らかとなり、TMEM2は生体における生理的HA分解において中心的な役割を担うことが明らかとなった(図3D)。

4. おわりに

本稿では生体内のHA代謝について、膜貫通型HA分解酵素であるTMEM2を中心に概説した。これまでにHA分解酵素として報告されている酵素のうち細胞表面で機能する可能性があるといわれてきた分子としては、HYAL2およびCEMIP/HYBIDがあるが、これらが実際に細胞表面において機能し生体のHA代謝に関与しているかについての直接的な証拠は得られていない。(Tmem2-iKOにみられたようなノックアウト誘導後の急速なHAの高度な蓄積および*in vivo*のリンパ系での分解能低下といった直接的なデータは、どちらのノックアウトマウスモデルに関しても示されていない。)本稿で提示した*in vivo*データは、全身性HA代謝に不可欠な役割を果たすヒアルロニダーゼとしてのTMEM2の重要性を明確に示している。また、本稿で示した誘導可能なグローバルノックアウトシステムと短期間の*in vivo*でのHA分解解析の組み合わせは、Cre/loxPシステムを使用可能なloxP配列挿入済みのマウスがすでに作製されているHYAL2やCEMIPなど他のヒアルロニダーゼ分子の研究に容易に適用できる。これらのさまざまなヒアルロニダーゼノックアウトモデル間の代謝表現型の比較により、生体内での多様なヒアルロニダーゼ分子の相対的な重要性と作用機序に関する理解が進むことが期待できるとともに、HA代謝が影響を及ぼす疾患のメカニズムの解明につながることを期待できる。

謝辞

本稿で紹介したTMEM2の機能解析は、大阪大学・犬伏俊博先生、弘前大学・山本勇人先生、藤田尚紀先生、大山力教授、Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute・山口祐教授、入江史敏先生との共同研究の成果です。この場を借りて深く感謝いたします。また、実験をサポートしていただいた弘前大学およびSanford Burnham Prebys Medical Discovery Instituteのスタッフの皆様にも感謝申し上げます。

文 献

- Fraser, J.R. & Laurent, T.C. (1989) Turnover and metabolism of hyaluronan. *Ciba Found. Symp.*, **143**, 41–53, discussion, 53–59., 281–285.
- Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S.R., Bank, R.A., Shaw, J.N., Lyons, T.J., Bijlsma, J.W., Lefeber, F.P., Baynes, J.W., & TeKoppele, J.M. (2000) Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.*, **275**, 39027–39031.
- Stern, R. & Jedrzejas, M.J. (2006) Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem. Rev.*, **106**, 818–839.
- Laurent, T.C. & Fraser, J.R. (1992) Hyaluronan. *FASEB J.*, **6**, 2397–2404.
- Yoshida, H., Nagaoka, A., Kusaka-Kikushima, A., Tobiishi, M., Kawabata, K., Sayo, T., Sakai, S., Sugiyama, Y., Enomoto, H., Okada, Y., et al. (2013) KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5612–5617.
- Wrzesinski, T., Szelag, M., Cieslikowski, W.A., Ida, A., Giles, R., Zodro, E., Szumska, J., Pozniak, J., Kwias, Z., Bluyssen, H.A., et al. (2015) Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors. *BMC Cancer*, **15**, 518.
- Smith, K.A., Lagendijk, A.K., Courtney, A.D., Chen, H., Paterson, S., Hogan, B.M., Wicking, C., & Bakkers, J. (2011) Transmembrane protein 2 (Tmem2) is required to regionally restrict atrioventricular canal boundary and endocardial cushion development. *Development*, **138**, 4193–4198.
- Yamamoto, H., Tobisawa, Y., Inubushi, T., Irie, F., Ohyama, C., & Yamaguchi, Y. (2017) A mammalian homolog of the zebrafish Transmembrane Protein 2 (TMEM2) is the long-sought-after cell surface hyaluronidase. *J. Biol. Chem.*, **292**, 7304–7313.
- Lepperdinger, G., Strobl, B., & Kreil, G. (1998) HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22466–22470.
- Irie, F., Tobisawa, Y., Murao, A., Yamamoto, H., Ohyama, C., & Yamaguchi, Y. (2021) The cell surface hyaluronidase TMEM2 regulates cell adhesion and migration via degradation of hyaluronan at focal adhesion sites. *J. Biol. Chem.*, **296**, 100481.
- Laurent, U.B., Dahl, L.B., & Reed, R.K. (1991) Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver. *Exp. Physiol.*, **76**, 695–703.
- Fraser, J.R., Laurent, T.C., Pertoft, H., & Baxter, E. (1981) Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem. J.*, **200**, 415–424.
- Smedsrod, B., Pertoft, H., Eriksson, S., Fraser, J.R., & Laurent, T.C. (1984) Studies in vitro on the uptake and degradation of sodium hyaluronate in rat liver endothelial cells. *Biochem. J.*, **223**, 617–626.
- Fraser, J.R., Kimpton, W.G., Laurent, T.C., Cahill, R.N., & Vakakis, N. (1988) Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue. *Biochem. J.*, **256**, 153–158.
- Tobisawa, Y., Fujita, N., Yamamoto, H., Ohyama, C., Irie, F., & Yamaguchi, Y. (2021) The cell surface hyaluronidase TMEM2 is essential for systemic hyaluronan catabolism and turnover. *J. Biol. Chem.*, **297**, 101281.

著者寸描

●飛澤 悠葵 (とびさわ ゆうき)



岐阜大学医学部附属病院泌尿器科講師。
博士 (薬学)。

■略歴 1981年秋田県に生る。2005年
静岡県立大学薬学部卒業。10年同大学院
薬学研究科博士後期課程修了。米国での
ポスドク経験。弘前大学大学院医学研究
科助教。Sanford Burnham Prebys Medical
Discovery Instituteへの研究留学を経て、
23年より現職。

■研究テーマと抱負 癌細胞における糖鎖性バイオマーカーの
探索と腫瘍免疫におけるグリコサミノグリカンの機能について
基礎研究を行っている。新薬開発につながるもしくは臨床の疑
問に答えられるような研究を展開したい。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/ytobisawa>

■趣味 ゲーム、漫画、動画視聴。