博　士（生命科学）　赤　津　ちづる

学位論文題名

Development and characterization of a monoclonal antibody, a useful tool for the biosynthetic analysis of chondroitin sulfate/ dermatan sulfate found in the central nervous system

（脳神経系に存在するコンドロイチン硫酸/ デルマタン硫酸の生合成機構の研究に有用な単クローン抗体の開発）

学位論文内容の要旨

グリコサミノグリカン（GAG）は、動物細胞の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する直鎖状の多糖鎖で、芯タンパク質と呼ばれる多種類のタンパク質に共有結合したプロテオグリカン（PG）の形で存在し、様々な生理機能の発現に関与している。GAG は、ウロン酸（グルクロン酸（GlcA）またはイズロン酸（IdoA））とアミノ糖からなる二糖が長く連なった基本骨格を有し、アミノ糖の種類により、コンドロイチン硫酸（CS）とヘパラン硫酸（HS）に大別される。CS は、GlcA と *N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）の二糖単位からなり、HS は GlcA とグルコサミン（GlcN）からなる。両糖鎖は、GlcA の IdoA への異性化や硫酸基の付加といった修飾を不均一に受けるため、複雑な構造多様性を有する。GAG は、成長因子や神経栄養因子などのタンパク質と結合して、その機能を調節することにより生理作用を発揮すると考えられているが、その際、タンパク質は GAG 鎖上の特定のオリゴ糖配列を認識して結合する場合がある。したがって、GAG 鎖の生合成は厳密に調節されていると考えられ、生合成機構の解明は GAG の機能を知る上で重要である。本研究では、特に CS に着目し、まず、脳における CS の解析を行った。脳では、成人でも、海馬などで毎日 5,000~10,000 個の新しい神経細胞が生まれているが、その分子メカニズムの構造的基盤は不明である。マウスの海馬細胞の *in vitro* の培養系を用いたこれまでの研究から、CS が神経再生の一端を担う分子としてその役割が注目されている。

脳において CS は、CS とデルマタン硫酸（DS）とのハイブリッド型糖鎖を形成して存在する。DS は GlcA が IdoA に異性化した CS の構造異性体である。これまでに、脳が著しく発達する胎生期のブタの脳の CS/DS 鎖は、成獣の脳に比べて DS 含量が高く、神経突起の伸長促進活性や様々な増殖因子との結合能が有意に高いことが報告されている。さらに、生後の発達期のマウス脳では、小脳における DS の含量が高くなっており、DS ドメインの生合成を担う酵素群の発現も小脳に特異的であった。これらの知見から、CS/DS 鎖中の DS ドメインの脳の発達における重要な役割が示唆された。そこで、DS の時間的空間的な発現に関するより詳細な知見を得るため、DS 生合成で GlcA の IdoA への異性化を司る DS-エピメラーゼ（DS-epi）について、発現時期や発現領域を解析した。まず、DS-epi の 2 種類のアイソザイム、*DS-epi1* と *DS-epi2* の mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法および定量 PCR

法により調べた。マウス UniGene データベース検索により得られたマウス *DS-epi1* および *DS-epi2* の塩基配列を基に、両遺伝子の cDNA をクローニングし、それを鋳型に ^{35}S で標識されたそれぞれの遺伝子に対する cRNA プローブを合成し、生後発達段階のマウス脳の凍結切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、*DS-epi1* の発現はほとんど見られず、一方、*DS-epi2* は脳の広範囲に発現が確認された。次に、各発達段階のマウス脳を嗅球、大脳/中脳、小脳、橋/延髄に分け、各部位から抽出した総 RNA を用いて cDNA を合成し、それを鋳型に定量 PCR 法を用いて *DS-epi1* および *DS-epi2* 遺伝子の発現量を定量した。調べた全ての部位および発達段階において、*DS-epi2* の発現が *DS-epi1* より常に高く、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果と一致していた。さらに、実際の脳組織中の CS/DS 鎖の二糖組成を解析するため、マウス脳の各部位から CS/DS 鎖を抽出し、基質特異性の異なるコンドロイチナーゼで消化して産生した二糖を蛍光標識し、陰イオン交換 HPLC による分析を行い、CS/DS 二糖の量を算出した。DS 構造は調べた全ての部位に存在していたが、特に小脳においてその割合が高かった。*DS-epi2* の発現は脳の広範囲に渡っており、部位ごとの発現量の差は見出されなかった。したがって脳における DS 構造の生合成では、異性化に続いておこる硫酸化が律速であることが示唆され、脳における CS/DS の生合成機構の一端を明らかにすることができた。

脳においては、CS だけでなく HS もその発達に関与している。HS の合成に関与する酵素である EXT1 を、脳で特異的に欠損させたマウスは脳の著しい奇形が認められ、HS の脳の発達における重要性が明らかにされている。したがって、両者の発現部位や時期の特異性を調べることは、脳の発達におけるそれぞれの機能を解明する上でも重要である。CS と HS は、その構造の大部分を占める二糖繰り返し領域の構造が大きく異なるにもかかわらず、両者に共通の結合領域と呼ばれる四糖構造 GlcA-Gal-Gal-Xyl (Gal, ガラクトース; Xyl, キシロース) を介して、芯タンパク質のセリン残基に結合している。生合成の過程において、両 GAG 鎖は、最初に合成された結合領域上に CS または HS 多糖鎖が生合成されるという過程を経るが、共通の構造上に異なる GAG 鎖が生合成される仕分けのメカニズムは解明されていない。このことを明らかにするには、結合領域の詳細な解析が重要であり、これまでに、CS と HS の結合領域では微細修飾構造が異なることが報告されている。Xyl のリン酸化は CS と HS の両者に見られ、Gal の 4 位または 6 位の硫酸化は CS の結合領域にのみ見出されている。この修飾構造の違いが CS と HS の仕分け合成のシグナルになっている可能性があり、結合領域の微細修飾構造の違いを識別する特異抗体が開発されれば、両 GAG 鎖の仕分け合成機構を解析する上で有用なツールとなり得る。本研究では、CS の結合領域に対する単クローン抗体を作製し、その反応性を解析した。

サメ軟骨由来の CS-PG をプロテアーゼで消化して調製した CS-ペプチドをコンドロイチナーゼ ABC で徹底消化し、二糖繰り返し領域を分解、除去して結合領域を含む六糖-ペプチド画分を調製した。さらに、酢酸水銀での処理により、六糖-ペプチド画分の非還元末端の不飽和ウロン酸を除去し、五糖-ペプチド画分を得た。これをキャリアタンパク質にペプチド部分を介して結合させたものを抗原として、マウスを免疫した。血中の抗体価が十分に高値を示した時点で、マウスから脾臓を摘出し、常法に従ってハイブリドーマを作製し、単クローン抗体を得た。結合領域の六糖-ペプチド画分に対する反応性を基にスクリーニングし、高い反応性を示したクローン 4E1/D6 について、詳細にエピトープ構造を探索した。修飾構造や長さの異なる結合領域オリゴ糖-ペプチドとの反応性、脱硫酸化酵素や脱リン酸化酵素で処理した結合領域オリゴ糖-ペプチドへの反応性の変化などを ELISA 法により解析した結果、4E1/D6 は GalNAc(±6-*O*-sulfate)-GlcA-Gal-Gal-Xyl という糖鎖構造を認識していると示唆された。一方、結合領域オリゴ糖-ペプチドをアルカリで処理してペプチド部分を除去すると、

4E1/D6 との反応性が低下したことから、4E1/D6 はペプチド部分も認識していることが判明した。抗原として用いた結合領域オリゴ糖-ペプチドの質量分析とアミノ酸組成分析の結果から、4E1/D6 は Ser、Pro、Gly、Glu の四アミノ酸残基をエピトープ構造に含むことが示唆された。4E1/D6 は、フローサイトメトリーで解析した結果、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞には反応性を示したが、GAG 鎖を合成できない変異株に対する反応性は著しく低下した。このように、申請者は CS 由来の結合領域に特異的に反応する抗体 4E1/D6 を初めて開発した。この抗体は今後、結合領域の解析に非常に有用なツールとしての利用が期待される。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　菅　原　一　幸
副　査　教　授　綾　部　時　芳
副　査　教　授　西　村　紳一郎
副　査　教　授　幸　田　敏　明
副　査　教　授　小布施　力　史
副　査　教　授　門　出　健　次
副　査　准教授　山　田　修　平

学位論文題名

Development and characterization of a monoclonal antibody, a useful tool for the biosynthetic analysis of chondroitin sulfate/ dermatan sulfate found in the central nervous system

（脳神経系に存在するコンドロイチン硫酸/ デルマタン硫酸の生合成機構の研究に有用な単クローン抗体の開発）

グリコサミノグリカン（GAG）は芯タンパク質に結合したかたちで動物細胞の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する直鎖状の多糖鎖である。近年、GAG 鎖が様々な生理機能の発現に関与するので注目され、盛んに研究されているが、その生合成機構には不明な点が多い。本論文は、このような状況にある GAG 鎖のうち、特にコンドロイチン硫酸（CS）に着目し、その生合成機構の一端を明らかにすることを目的として行われたものである。

本論文第二章では、生後発達期のマウス脳を用いて、CS 鎖の生合成過程において、その構造異性体であるデルマタン硫酸（DS）へ異性化される過程を触媒する DS-エピメラーゼ（DS-epi）の発現の調査結果が報告された。DS-epi の二種類のアイソザイムのうち、生後発達期の脳では *DS-epi1* に比べ *DS-epi2* の発現が常に高く、脳における DS 構造の異性化は DS-epi1 ではなく DS-epi2 によって担われていることが示唆された。第三章では、CS 鎖が、もう 1 種類の主要な GAG 鎖であるヘパラン硫酸（HS）鎖とどのように区別して生合成されるかを調べるために、CS 鎖の生合成過程において最初に生合成され、HS 鎖と共通の糖鎖骨格を有するが異なる微細修飾構造を有する CS 鎖の、芯タンパク質への結合領域に対する単クローン抗体を開発し、そのエピトープ構造を決定したという内容であった。

審査員からは、開発された抗体は HS の結合領域には反応しないのかという質問があった。この質問に対し、発表者からは、実際に HS の結合領域に対する反応性は確認できていないが、推定したエピトープ構造として CS 鎖のみが有する *N*-アセチルガラクトサミン残基を含

んでいること、またペプチド構造として CS 鎖の付加部位付近に見られるコンセンサス配列を含んでいることから、CS のみに反応する可能性が高いという回答があった。さらに、この抗体は CS 鎖の芯タンパク質への結合領域の糖鎖部分とペプチド部分両者を認識しているため、芯タンパク質の CS 多糖鎖付加部位の検出にも有用であるとも回答した。

この論文は、CS 鎖の生合成メカニズムを明らかにするための重要な手がかりを提起した点で高く評価され、今後、CS 鎖の生理機能を解明し、さらに創薬の標的分子などとしての応用につながることが期待される。よって審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（生命科学）の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。