

学 位 論 文 題 名

Chondroitin sulfate from porcine fetal membranes,
which exhibits neurite outgrowth promoting activity,
and novel chondroitin sulfotransferase activity of the
HNK-1 oligosaccharide-synthesizing sulfotransferase

(ブタ胎膜由来の神経突起伸長促進活性を有するコンドロイチン硫酸および
HNK-1オリゴ糖鎖合成酵素の新規コンドロイチン硫酸基転移酵素活性)

学位論文内容の要旨

プロテオグリカン (PG)は、コアタンパク質にグリコサミノグリカン (GAG)と呼ばれる直鎖状の多糖鎖が共有結合した生体高分子であり、細胞表面や細胞外マトリックス (ECM)に普遍的に存在している。GAG の一種であるコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸 (CS/DS)鎖は D-グルクロン酸 (GlcA)または L-イズロン酸 (IdoA)と N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc)の二糖単位の繰り返し構造から構成されている。CS/DS 鎖はコアタンパク質上の特定のセリン残基に、糖-タンパク質結合領域と呼ばれる四糖構造 GlcA-Gal-Gal-Xyl (Gal と Xyl はそれぞれガラクトースとキシロースを表す)に続いて合成される。CS/DS 鎖の二糖繰返し領域の糖鎖骨格は、結合領域の GlcA に GalNAc が転移され、その後一群の CS 合成酵素により GlcA および GalNAc が交互に転移、重合されることで形成される。そして、様々な硫酸基転移酵素や GlcA を IdoA に異性化するエピメラーゼにより修飾され、CS/DS は多様な構造をとる。硫酸基転移酵素は、3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS)を硫酸基供与体として、CS/DS 鎖のウロン酸の 2 位や GalNAc の 4 位または 6 位に硫酸基を転移する。硫酸化修飾は不均一に生じるため、CS/DS 鎖は多様な二糖単位を生成する。これらの二糖単位の組み合わせにより複雑な硫酸化配列パターンから成る機能ドメインが形成され、それらを介して CS/DS 鎖は様々なシグナル分子と相互作用し、対応する生理活性を発揮する。

組織再生は、分化能をもった細胞、その細胞の適切な足場となる ECM、および細胞増殖因子の三つの組み合わせにより可能になる。PG は ECM の構築に関与する分子であり、GAG は極めて多くの増殖因子と相互作用することが報告されている。このように PG は、組織再生の三要素のうちの二つと密接に関係しているため、PG の組織再生への応用が注目されている。組織再生における細胞の足場として現在用いられているものの 1 つとして、羊膜が挙げられる。羊膜は絨毛膜、脱落膜とともに胎膜を形成している膜であり、組織再生医療においては角膜、鼓膜、皮膚などの再生に応用されている。また、ヒト羊膜 ECM 成分がヒト胚性幹細胞を神経前駆細胞などに誘導する活性が証明されている。しかし、羊膜 ECM 中のどの成分がこの活性を発揮しているのかは未解明である。羊膜の ECM 成分の主要なものの 1 つとして PG があり、その CS/DS 側鎖が上述した角膜再生や神経前駆細胞の分化誘導活性に関与している可能性がある。そこで、羊膜を含むブタ胎膜の CS/DS 鎖の構造と各種増殖因子と

の相互作用を調べた。さらに、胎膜の CS/DS 鎖の神経突起伸長促進活性を測定した。

まず、ブタ胎膜から定法に従い CS/DS 鎖(FM-CS/DS)を抽出・精製し、二糖組成を分析した。FM-CS/DS は、GlcA-GalNAc、GlcA-GalNAc(4-*O*-sulfate)、GlcA-GalNAc(6-*O*-sulfate)の二糖単位を主成分としており、高硫酸化二糖単位も微量ではあるが含んでいた。また、イズロン酸を含む二糖単位である IdoA-GalNAc(4-*O*-sulfate)単位が連続した糖鎖配列が存在していることが明らかになった。FM-CS/DS 鎖を固定した基質上でマウス胎仔由来の海馬細胞を培養したところ、神経突起の伸長が促進され、FM-CS/DS 鎖が神経突起伸長促進活性を有することを初めて明らかにした。また、神経細胞の突起伸長を促進させる可能性のある複数の増殖因子に対する抗体を、神経細胞培養系に添加したところ、神経突起伸長促進活性は抗ミッドカイン抗体によって阻害された。さらに、分子間相互作用解析装置を用いて複数の増殖因子と FM-CS/DS 鎖との直接の相互作用を解析したところ、ミッドカインと高い親和性を示した。

この相互作用は、CS/DS 鎖中のイズロン酸部分のみを分解するコンドロイチナーゼ B による消化で消失し、結合にはイズロン酸を含む二糖単位の連続した糖鎖配列が必須であると予想された。今後、神経をはじめとする再生医療への FM-CS/DS 鎖の応用が期待される。

神経突起伸長促進活性は多硫酸化 CS にもみられ、その 1 つにカプトガニ軟骨由来の CS-K がある。CS-K は、GlcA(3-*O*-sulfate)-GalNAc(4-*O*-sulfate)二糖構造を豊富に含んでいるが、GlcA の 3 位に硫酸基を転移し、生物活性を賦与する酵素は未報告である。我々はその候補として、HNK-1 (human natural killer-1)糖鎖の形成に関わる硫酸基転移酵素、HNK-1ST を考えた。HNK-1 糖鎖は主に神経系で特徴的に発現する糖鎖である。糖タンパク質や糖脂質上の *N*-アセチルラクトサミン構造 (Gal-GlcNAc (*N*-アセチルグルコサミン))の非還元末端の Gal 残基に GlcA が転移された後、HNK-1ST によって GlcA の 3 位に硫酸基が転移され (GlcA(3-*O*-sulfate)-Gal-GlcNAc)、HNK-1 糖鎖が合成される。HNK-1 糖鎖の生合成に必須の GlcA 転移酵素はほぼ脳特異的に発現しており、HNK-1 糖鎖の発現とよく対応している。これに対して、HNK-1ST は HNK-1 糖鎖の分布と相関せず広汎に発現しており、脳以外の臓器での機能は明らかになっていない。前述したように CS も普遍的に存在する分子であり、HNK-1ST が CS の硫酸基転移酵素群と相同性を有していることを考え合わせると、HNK-1ST が CS にも硫酸基を転移する可能性がある。そこで、リコンビナントの HNK-1ST が CS に硫酸基を転移するかを検討した。 [³⁵S]PAPS を硫酸基供与体、硫酸化構造の異なる様々な CS バリエーションを硫酸基受容体として酵素反応を行ったところ、硫酸化されていない CS バリエーションであるコンドロイチンにのみ硫酸基を転移した。次に、コンドロイチンのどの部位に硫酸基を転移しているかを解明するために、酵素反応生成物の構造を陰イオン交換 HPLC と質量分析で解析した。その結果、非還元末端の GlcA の 3 位に硫酸基を転移することが明らかになった。CS の生合成酵素は基質の GlcA の 3 位が硫酸化されていると GalNAc 残基を転移できないことが証明されているので、HNK-1ST は、CS 鎖の伸長反応の停止のシグナルとなる 3-*O*-硫酸基を転移することによって、CS 鎖の長さを制御しているのかもしれない。

HNK-1ST 反応産物と類似した構造をもつ生体成分として、尿中に分泌されている α-トロンボモジュリン (α-TM)上のオリゴ糖鎖 (GlcA(3-*O*-sulfate)-Gal-Gal-Xly)が知られている。TM には、CS が共有結合している PG 型の β-TM と、CS を結合していない非 PG 型の α-TM の 2 種の分子型が存在し、パートタイム PG の 1 つである。しかし、α-TM のオリゴ糖側鎖の硫酸化を担う硫酸基転移酵素は同定されていない。そこで、CS/DS 鎖とコアタンパク質の結合領域の四糖(GlcA-Gal-Gal-Xyl)を硫酸基受容体として、HNK-1ST による酵素反応を行ったところ、硫酸の取り込みが見られた。したがって、α-TM の GlcA 残基の硫酸化は HNK-1ST によって触媒されていると考えられる。TM の CS 鎖の形成過程において、非還元末端に存在する GlcA の 3 位が硫酸化されると、GalNAc 転移酵素による CS 鎖の伸長反応が阻害され、CS 鎖

が付加していない非 PG 型の α -TM となると予想される。したがって、HNK-1ST による GlcA(3-*O*-sulfate)構造の形成が、TM を PG 型の β -TM にするか非 PG 型の α -TM にするかを仕分ける鍵になっているかもしれない。

これまでに、GlcA(3-*O*-sulfate)構造を含む CS は、脊椎動物において報告がない。通常 CS の二糖組成を分析する際には、CS 分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC を用いて多糖鎖を二糖単位にまで分解する。しかし、最近、コンドロイチナーゼ ABC での消化によって GlcA(3-*O*-sulfate)-GalNAc 二糖構造が GalNAc 単糖へと分解、変換されることが報告された。このため、これまでに脊椎動物において GlcA(3-*O*-sulfate)構造を含む CS の報告がなかったのは、コンドロイチナーゼ ABC での消化により GlcA(3-*O*-sulfate)構造が喪失されたためである可能性がある。今後、脊椎動物の生体内で、HNK-1ST が *in vivo* でも GlcA(3-*O*-sulfate)構造を含む CS を合成しうるのか、また実際に脊椎動物の組織において GlcA(3-*O*-sulfate)構造を含む CS が存在するのかを明らかにする必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	菅 原 一 幸
副 査	教 授	幸 田 敏 明
副 査	教 授	小布施 力 史
副 査	准教授	山 田 修 平

学 位 論 文 題 名

Chondroitin sulfate from porcine fetal membranes,
which exhibits neurite outgrowth promoting activity,
and novel chondroitin sulfotransferase activity of the
HNK-1 oligosaccharide-synthesizing sulfotransferase

(ブタ胎膜由来の神経突起伸長促進活性を有するコンドロイチン硫酸および
HNK-1オリゴ糖鎖合成酵素の新規コンドロイチン硫酸基転移酵素活性)

グリコサミノグリカン (GAG)は、芯タンパク質に結合したプロテオグリカンの形で動物細胞の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ために注目され、盛んに研究されている。本論文は、GAG鎖のうち、特にコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸(CS/DS)に着目し、その構造と機能の相関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、羊膜を含むブタ胎膜から CS/DS 鎖を抽出・精製し、その構造と機能の相関の研究結果を報告した。羊膜を含むブタ胎膜に存在する CS/DS 鎖が連続した IdoA-GalNAc(4-O-sulfate) (IdoA と GalNAc はそれぞれイズロン酸と *N*-アセチルガラクトサミンを表す)を含む糖鎖配列を介してミッドカインと相互作用し、海馬神経細胞の神経突起を伸長させることを明らかにした。審査員からの主要な質問として、これまでに報告されている他の臓器由来の CS/DS 鎖の構造と比べてブタ胎膜に存在する CS/DS 鎖の構造上の特徴を問うものがあつた。これに対し発表者は、他の臓器では CS 鎖および DS 鎖がそれぞれ単独の形で存在している場合が多いのに対して、ブタ胎膜では CS/DS 鎖のハイブリッド鎖の形で存在していること、さらにブタ胎膜の CS/DS 鎖中に IdoA を含む二糖構造が密集して存在していることを特徴として回答した。

本論文第三章では、HNK-1 硫酸基転移酵素が、コンドロイチンおよび GAG-芯タンパク質結合領域の四糖構造(グルクロン酸-ガラクトース-ガラクトース-キシロース)の、各グルクロン酸の 3 位に硫酸基を転移する酵素であることを明らかにしたという内容であつた。審査員からの主要な質問として、HNK-1 硫酸基転移酵素のコンドロイチンおよび GAG-芯タンパク質結合領域の四糖構造に対する活性と HNK-1 糖鎖前駆構造に対する活性との比較を問うものがあつた。これに対し発表者は、HNK-1 硫酸基転移酵素の活性は、従来考えられてきた基

質である HNK-1 糖鎖前駆体構造よりも GAG-芯タンパク質結合領域の四糖構造に対する方がより高いことを回答した。

この論文は、羊膜を含むブタ胎膜の CS/DS 鎖の構造と機能を明らかにし、HNK-1 硫酸基転移酵素がコンドロイチンと GAG-芯タンパク質結合領域の四糖にも作用することを新たに発見した。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。