

高硫酸化コンドロイチン硫酸鎖による神経突起形成機構の解析

2018

生化学

志田 美春







## 略語表

## 略語表

本文において以下の略号を用いた。

2-AB : 2-aminobenzamide  
BDNF : brain-derived neurotrophic factor  
BSA : bovine serum albumin  
C4ST : chondroitin 4-*O*-sulfotransferase  
C6ST : chondroitin 6-*O*-sulfotransferase  
cDNA: complementary DNA  
CNS : central nervous system  
CNTN-1 : contactin-1  
CS : chondroitin sulfate  
CSST : CS sulfotransferase  
ChABC : chondroitinase ABC  
DMSO : dimethyl sulfoxide  
FAK : focal adhesion kinase  
FBS : fetal bovine serum  
FCS : fucosylated CS  
Fuc : L-fucose  
GAG : glycosaminoglycan  
GalNAc : *N*-acetyl-D-galactosamine  
GalNAc4S-6ST : GalNAc 4-sulfate 6-*O*-sulfotransferase  
Gapdh : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
GlcA : D-glucuronic acid  
HBSS : Hanks' balanced salt solution  
HEPES : 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonic acid  
HPLC : high performance liquid chromatography  
HS : heparan sulfate  
IgG : immunoglobulin G  
ITG : integrin  
IU : international unit (s)  
KD : dissociation constant  
KO : knockout  
mRNA : messenger RNA  
PBS : phosphate-buffered saline  
PCR : polymerase chain reaction

## 略語表

PFA : paraformaldehyde

PG : proteoglycan

PLO : poly-L-ornithine

rpm : round per minute (s)

RU : resonance unit (s)

Tris : 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1, 3-diol

UST : uronyl 2-O-sulfotransferase

<核酸>

A : adenine

C : cytosine

G : guanine

T : thymine

## 序論

生命活動の最小単位である細胞の表面や周囲には、多種多様な構造をもつ糖鎖が無数に存在する。これらの糖鎖は、エネルギー代謝に関わるグリコーゲンなどと異なり、脂質やタンパク質と共に、糖脂質、糖タンパク質あるいはプロテオグリカン (PG) のような複合糖質を構成している。複合糖質は、様々な生体分子との相互作用を介して、細胞間コミュニケーションを始めとする生命機能の中核をつかさどる(1)。それゆえ糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖と呼ばれる。

ポストゲノム研究の飛躍的な進展に伴い、糖鎖関連遺伝子は 100 を優に超える疾患とすでに紐づけられている(2)。代表的な糖鎖関連の先天性疾患群として、精神運動発達遅滞を呈する先天性 N-結合型糖鎖合成異常症や、骨関節病変を始めとする全身性の多様な臨床所見を呈するライソゾーム病が認知されるようになった(3,4)。加えて近年、糖鎖の後天性機能破綻が、認知症やがんを始めとする種々の疾患にも深く関与することが報告されている(5,6)。したがって、糖鎖関連の疾患領域は多岐に渡りかつ横断的である様相を呈している。

糖鎖関連疾患はなぜこれほどまでに広範囲の領域に及ぶのか。その理由として糖鎖の構造多様性が挙げられる(7)。複合糖質を構成する糖鎖は、グルコースやマンノースなどの主に約 10 種類の単糖から構成される。さらに、糖鎖の構造多様性は、構成単糖の種類だけでなく、結合様式や修飾によっても創出される。複合糖質の構成糖鎖の中でも PG を構成する糖鎖は、アミノ糖を構成糖に有することからグリコサミノグリカン (GAG) 鎖と呼ばれており、構造多様性に富む糖鎖の代表として知られている。

GAG 鎖はウロン酸およびアミノ糖を構成糖とする二糖単位が直鎖状に数十回ほど重合した構造を基本骨格に有し、二糖単位の構成糖に基づいてヘパラン硫酸 (HS) 鎖およびコンドロイチン硫酸 (CS) 鎖の二群に大別される(8,9)。HS 鎖と比較して CS 鎖は、組織の構造支持などの静的機能が通説であったため、歴史的にその重要性が蔑ろにされてきた。しかし近年 CS 鎖は特有の構造多様性を存分に発揮することにより、細胞増殖や形態形成、神経可塑性などの様々な生命現象を制御することが矢継ぎ早に報告されており、脚光を浴びている(10-23)。ゆえに、我々に身近な生命現象を理解する上でも、CS 鎖の構造と生理活性との関連の解明は意義深い(24)。

CS鎖に特有の多様な構造は、二糖単位の構成糖であるグルクロン酸 (GlcA) または *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基における硫酸基の数に基づき、モノ硫酸化二糖単位およびジ硫酸化二糖単位の 2 種類に大別される。さらに、各々硫酸基の位置に基づき、前者は A unit [GlcA-GalNAc (4-O-sulfate)] および C unit [GlcA-GalNAc (6-O-sulfate)]、後者は D unit [GlcA (2-O-sulfate) -GalNAc (6-O-sulfate)] および E unit [GlcA-GalNAc (4,6-O-disulfate)] に小別される(23,25) (Fig. 1)。また生体内におけるこれら 4 種類の硫酸化パターンは、基質特異性の異なる多彩な硫酸基転移酵素 (CSST) により、モノ硫酸化二糖単位である A unit および C unit が非硫酸化二糖単位である O unit (GlcA-GalNAc) を基質として生合成された後、モノ硫酸化二糖単位のそれぞれを基質としてジ硫酸化二糖単位である E unit および D unit が生合成されることにより創出される(8,23,26,27)。

所属研究室では、CSST を始めとする多彩な生合成酵素が CS 鎖の硫酸化パターンおよび発現量を時間・空間的に厳密に制御していることを解明してきた(23,28-39)。さらに近年、CS 鎖の硫酸化パターンの時間・空間的変化が発達期の脳の成熟を担うことも報告した(16)。よって、CS 鎖の硫酸化パターンの時間・空間的変化が、CS 鎖による生理機能発現の根幹を担うと示唆される。それゆえ、先天的あるいは後天的要因による時間・空間的な CS 鎖の硫酸化パターンの発現異常は種々の疾患の根源となりうる。

特筆すべきことに、哺乳動物の組織中の CS 鎖に含まれる二糖単位は、大半がモノ硫酸化二糖単位である A unit および C unit であるため、ジ硫酸化二糖単位である D unit および E unit は僅かしか存在しない。一方で最近、ジ硫酸化二糖単位を多量に含有する高硫酸化 CS が細胞分化(14,40,41)を始め、がんの転移(42)や組織の線維化(43,44)などの制御にも関与することが解明されつつある。よって、CS 鎖の機能発現における高硫酸化 CS は度外視できない。

実際、所属研究室を中心とした研究により、ジ硫酸化二糖単位を多量に含有するイカやサメ由来の高硫酸化 CS は海馬神経細胞に対して顕著な神経突起伸長促進作用を示すことが見出されている(45-47)。対照的に、モノ硫酸化二糖単位を多量に含有する哺乳類由来の低硫酸化 CS は成体期における中枢神経系 (CNS) 再生の主要阻害分子として振る舞う(48,49)。つまり、CNS において高硫酸化 CS の生理活性は、低硫酸化 CS の生理活性とは一線を画することから、CNS 疾患領域において、高硫酸化 CS の医療応用に多大なる期待が寄せられている。

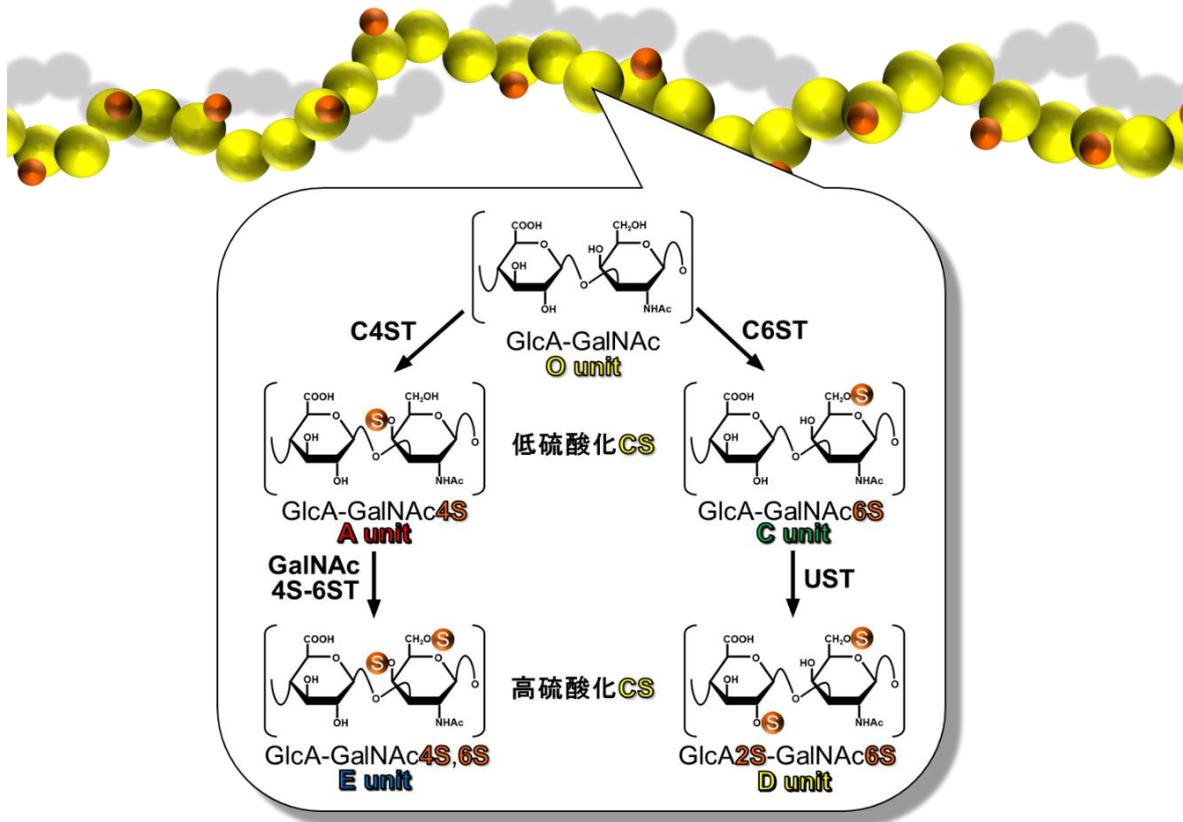


Fig. 1 基質特異性の異なる CSST により創出される CS 鎖の主要な二糖単位

CS 鎖は GlcA および GalNAc を構成糖とする二糖単位が直鎖状に数十ほど重合した構造を基本骨格に有する。CS 鎖の非硫酸化二糖単位である O unit の大半は、C4ST または C6ST によりモノ硫酸化二糖単位である A または C unit に変換され、これらを多量に含有する CS 鎖は低硫酸化 CS と呼ばれる。モノ硫酸化二糖単位の一部は、その後さらに GalNAc4S-6ST または UST によりジ硫酸化二糖単位である E または D unit に変換され、これらを多量に含有する CS 鎖は高硫酸化 CS と呼ばれる。構造中の “S” は硫酸基を示し、2S、4S、6S は、それぞれ 2 位、4 位、6 位のヒドロキシ基が硫酸基に置換された構造を示す。GlcA、グルクロン酸；GalNAc、*N*-アセチルガラクトサミン；C4ST、コンドロイチン 4-*O*-硫酸基転移酵素；C6ST、コンドロイチン 6-*O*-硫酸基転移酵素；GalNAc4S-6ST、*N*-アセチルガラクトサミン 4-硫酸 6-*O*-硫酸基転移酵素；UST、ウロノシル 2-*O*-硫酸基転移酵素。

この医療応用の実現のためには、高硫酸化 CS の神経突起伸長促進活性における分子機構の解明が喫緊の課題である。現在、この分子機構モデルとして、「サイトカインのリザーバー」および「CS 受容体のリガンド」の 2 つが提唱されている(23,50) (Fig. 2)。これらの分子機構モデルは、高硫酸化 CS の神経突起伸長促進活性のみならず、CS 鎖の多彩な機能を包括的に理解するための分子基盤を探る有効な手がかりとして重要視されている。そこでこれら 2 つの分子機構モデルに着目し、CNS における高硫酸化 CS の神経突起伸長促進活性の分子機構を追究した。

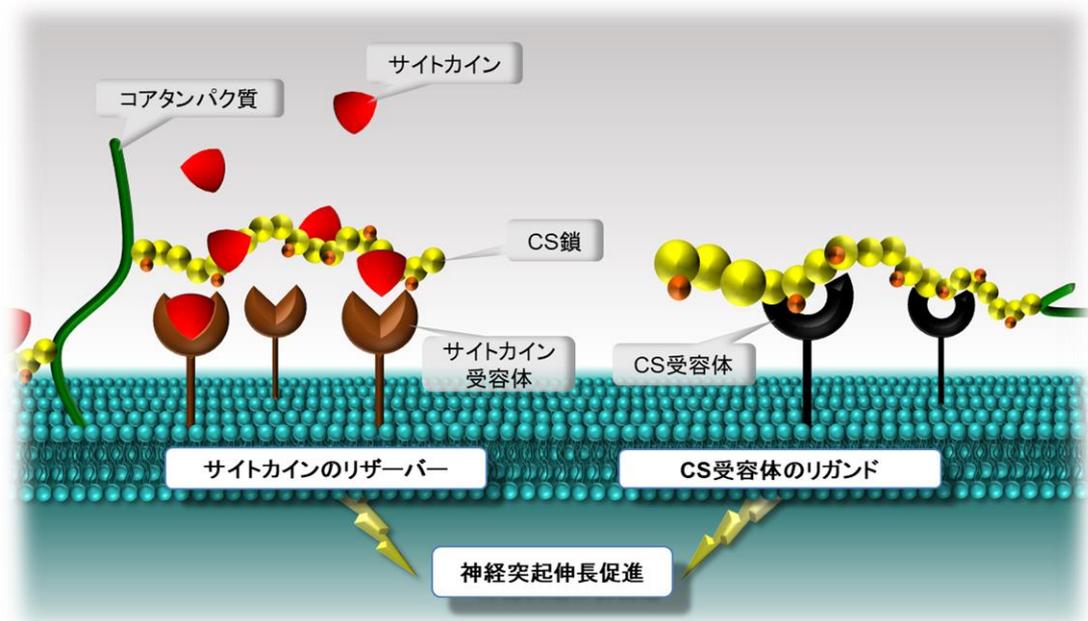


Fig. 2 高硫酸化 CS の神経突起伸長促進活性における 2 種類の分子機構モデル

CS 鎖 (黄) はコアタンパク質 (緑) に共有結合した PG として、細胞膜 (青緑) の表面や細胞外マトリックスに存在する。「サイトカインのリザーバー」モデル (左) では、高硫酸化 CS は、分泌された微量のサイトカイン (赤) を捕獲し、サイトカイン受容体 (茶) に効果的に提示する。その結果、サイトカインにより制御される生理機能を制御する。一方で、「CS 受容体のリガンド」モデル (右) では、高硫酸化 CS は、細胞膜表面に存在する CS 受容体 (黒、特定の細胞接着分子など) に結合し、細胞内シグナル伝達経路を活性化する。よって、CS 受容体の種類や構成により、神経突起の伸長に対してポジティブあるいはネガティブな応答性を示す。

第1章では「サイトカインのリザーバー」モデルに焦点を当てた。このモデルは長年の通説であり、高硫酸化 CS が様々なサイトカインと高い結合親和性を有することに端を発している(9,24,25,51,52)。細胞表面や細胞外マトリックスに存在する高硫酸化 CS は、分泌された微量のサイトカインを捕獲し、分泌細胞の細胞表面やその周囲に濃縮させる。その結果、サイトカインが標的細胞の細胞表面に存在するサイトカイン受容体に効果的に提示される。つまり、高硫酸化 CS はサイトカインの拡散を制御することにより、サイトカインにより制御される生理機能を制御すると考えられている。

実際、CNS において高硫酸化 CS の一つである E unit を多量に含有するイカ由来の CS 鎖 (CS-E) は、「サイトカインのリザーバー」として機能することにより、強力な神経突起伸長促進活性を示すことが解明されている(20,23,25,53)。また合成オリゴ糖を用いた研究から、CS-E の神経突起伸長促進活性の発現において、2つの E unit がタンデムに結合した CS-E 四糖が最小機能単位であることが示されている(54)。よって、CS-E は神経細胞分化・機能制御因子として、種々の CNS 疾患に対する治療薬のシード化合物として有用であると考えられている(50)。

一方で、棘皮動物に由来する特徴的なフコース分枝を有する CS 鎖 (FCS) は、CS-E と同様の CS 鎖骨格を有し、様々な生理活性を示すことが報告されている(55-59) (Fig. 3)。しかし FCS の活性として、CS-E に特有の神経突起伸長促進活性は見出されていなかった。さらに興味深いことに FCS は、CS 鎖骨格にフコース分枝を有するため、CS 分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC (ChABC) による酵素消化に対して難消化性を示す(60,61)。よって、FCS の新規活性の発現における分子機構の解明により、CS-E を代替する比較的長半減期のシード分子として、FCS の新たな有用性が見出せると期待された。そこで FCS の新規活性として神経突起伸長促進活性に着目し、FCS が CS-E に代替するシード分子になりうるか、その可能性を検証した(62)。

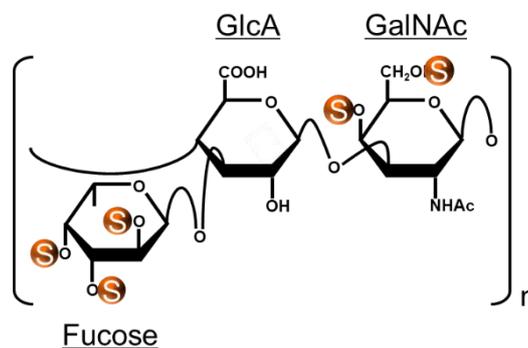


Fig. 3 棘皮動物に特有のフコース分枝を有する CS 鎖 (FCS) の構造

FCS の CS 鎖骨格は GalNAc の 4 位と 6 位が硫酸化修飾を受けた E unit を多量に含有する。また CS 鎖骨格中の GlcA 残基の 3 位にフコース分枝を有する。さらにフコース残基も硫酸化修飾による構造多様性を示す。構造中の“S”は硫酸基を示し、その位置は置換されるヒドロキシ基の“H”を示す。

第2章では、「CS受容体のリガンド」モデルに焦点を当てた。このモデルは、近年浸透しつつある概念であり、2009年に所属研究室の安永らが、高硫酸化CSの受容体を世界で先駆けて同定したことに端を発している(11)。世界初のCS受容体として同定されたcontactin-1 (CNTN-1)は、CS-Eの受容体として機能し、非受容体型チロシンキナーゼであるFynの活性化を介して、軸索様の神経突起伸長を促進する(11)。またこの知見は、CS鎖の機能発現における新規概念として「CS受容体のリガンド」モデルを提唱したのみならず、タンパク質ではなく糖鎖自身が細胞膜受容体のリガンドとして機能することを示した最初の報告となった。

興味深いことに、促進性のCS受容体としてCNTN-1が同定されて以降、活発な研究により、損傷した軸索表面に発現する複数の細胞接着分子が阻害性のCS受容体として機能し、軸索再生を阻害するシグナル経路を活性化することが相次いで解明された(63-65) (Fig. 4)。これらの報告は「CS受容体のリガンド」モデルの妥当性を裏付けるだけでなく、CS鎖が軸索再生阻害における単なる物理的障壁であるという通説を覆した。現在、CNS損傷の治療薬として、阻害性CS受容体を標的とした低分子化合物や中和ペプチドの開発が試みられている(66-69)。

阻害性CS受容体と同様に促進性CS受容体もCNS損傷の創薬の標的となりうる。しかし、促進性CS受容体はCNTN-1が同定されているにすぎず、阻害性CS受容体と比較して、未解明の部分が多く残されている。したがって、促進性CS受容体を標的とした創薬の実現のためには、促進性CS受容体を介した神経突起伸長促進機構の解明が急がれる。

所属研究室ではこれまでに、CS-Eとは異なる硫酸化パターンを有するCS-Dが、CS-Eと同様に神経突起伸長促進作用を有することを報告している(45,46)。しかしながら興味深いことに、CS-D基質上で海馬神経細胞を培養すると、比較的短い樹状突起様の神経突起が複数本観察され、CS-E基質上における軸索様の長い神経突起とは顕著に異なることが見出されている(47)。つまり、海馬神経細胞の形態が足場基質となる高硫酸化CSの硫酸化パターンに依存することから、CS-Dによる神経突起伸長の促進は、CS-Eの受容体であるCNTN-1とは異なる新規の促進性CS受容体を介すると推察された。そこで、CS-Dによる樹状突起様の神経突起形成に関与する新規の促進性CS受容体の同定を試みた。

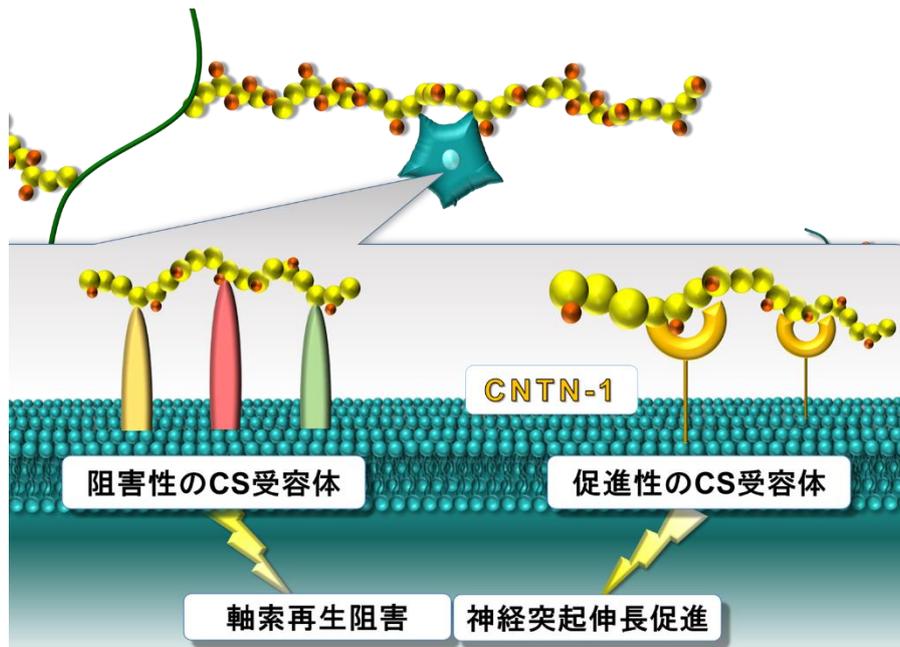


Fig. 4 CNS における阻害性または促進性 CS 受容体を介した CS 鎖の機能発現

CNS 損傷において、損傷した軸索表面に発現する複数の膜貫通型細胞接着分子が軸索再生を阻害するシグナル経路を活性化し、軸索再生を阻害する（阻害性の CS 受容体）。一方で、海馬神経細胞の表面に発現する GPI アンカー型細胞接着分子である CNTN-1 は、唯一同定されている促進性 CS 受容体であり、高硫酸化 CS の一つである CS-E の受容体として機能し、軸索様の神経突起伸長を促進するシグナル経路を活性化する（促進性 CS 受容体）。



## 本論

### 第1章 硫酸化フコース分枝を有する CS 三糖の神経突起伸長促進活性の解析

#### 第1節 緒言

成体期において、CS 鎖は中枢神経の損傷部位で劇的に増加し、損傷後の軸索再生を阻害する。これは CS 鎖が軸索伸長を阻害する物理的な障壁であるためと考えられてきた(48,49)。一方、発生期の CNS において CS 鎖は、細胞外マトリックスに豊富に存在しており、脳の発達に伴って、その硫酸化パターンが劇的に変化する。硫酸化パターンの異なる CS 鎖は、それぞれ異なる機能を発揮することにより、神経回路網の形成や神経可塑性の発現・維持に重要な役割を果たしていることが解明されつつある(16,49)。よって、CNS において CS 鎖の硫酸化パターンは、その機能発現と密接な関係があると考えられている。

これまでに、高硫酸化 CS の一つである E unit を多量に含有するイカ由来の CS 鎖 (CS-E) は、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) を始めとする神経栄養因子のリザーバーとして機能することにより、海馬神経細胞に対して強力な神経突起伸長促進活性を示すことが報告されている(20,23,25,53)。さらに合成オリゴ糖を用いた研究から、この活性発現においては、E unit 単独の CS-E 二糖では不十分で、2つの E unit がタンデムに結合した CS-E 四糖が最小機能単位であることも示されている(54)。よって、CS-E 四糖は CNS 損傷を始めとする種々の CNS 疾患に対する治療薬のリード化合物として注目されている。

一方で、CS-E と同様の CS 鎖骨格を有する“CS-E アナログ”が、数種のナマコの体壁から単離精製されている。これらの多糖は、CS 鎖骨格に共有結合した硫酸化  $\alpha$ -フコース分枝を特徴とし、FCS (フコース分枝を有する CS 鎖) と総称されている(70-75)。FCS はこれまでに、抗凝固活性(55,56)を始め、抗血栓活性(56,58)、抗ウイルス活性(57)や抗がん活性(59)などの多岐にわたる生理活性を持ち合わせることが報告されている。しかし、CS-E 特有の神経突起伸長促進活性については未報告である。

これは、これまで FCS の生理活性において、CS 鎖骨格ではなくフコース分枝の構造多様性が注目されてきたからである。驚くべきことに、FCS の抗凝固活性および抗血栓活性は、温和条件下における FCS の酸加水分解による硫酸化フコース分枝の除去により消失する(55,56)。ゆえに、これらの活性の発現は、フコース分枝の構造多様性、あるいは CS 鎖骨格に結合したフコース分枝の存在に依存すると考えられている(60,61,70)。しかし、FCS の活性発現の全てがフコース分枝のみに依存し、CS 鎖骨格には全く依存しないと結論付けるのは早計である。

さらに興味深いことに、FCS は、フコース分枝の存在により、CS 鎖骨格を有するにもかかわらず、CS 鎖分解酵素である ChABC による酵素消化に対する難消化性を示すことも知られている (6,12-14)。したがって、FCS に神経突起伸長促進作用を見出すことができれば、CS-E に代替する比較的長半減期のシード分子となると期待された。

本章において著者は、代表的なナマコであり、CS 鎖骨格に E unit を比較的多量に含有するマナマコ *Apostichopus japonicus* 由来の FCS に着目し、本 FCS が CS-E と同様に神経突起伸長促進活性を有することを見出した。さらに、糖鎖の合成オリゴ糖を用いて、CS-E 介在性の神経突起伸長促進活性におけるフコース分枝構造との相関解析、および FCS の神経突起伸長促進活性における最小機能単位の同定を試みた。

## 第 2 節 実験材料および方法

### 2-1. 実験材料

Fluoroshield™ は ImmunoBioScience 社 (アメリカ、ワシントン) より、DNase I は Roche Custom Biotech 社 (アメリカ、インディアナ) より、抗 BDNF 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社 (アメリカ、テキサス) より、Cy3 標識抗  $\beta$  チューブリン抗体、ovalbumin、poly-L-ornithine (PLO)、rabbit IgG isotype control (isotype ctrl) はシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社 (東京) より、8 well プラスチックチャンバースライド、B27 supplement、GlutaMAX™ I、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)、Hoechst 33342、Neurobasal™ medium、Trypsin はサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社 (横浜) より、*Proteus vulgaris* 由来コンドロイチナーゼ ABC (ChABC) (EC 4.2.2.4)、不飽和 CS 二糖標品、サメ軟骨由来 CS-C、イカ軟骨由来 CS-E は生化学工業株式会社 (東京) より、Fetal Bovine Serum (FBS) は BioWest 社 (フランス、メヌ=エ=ロワール) より、2-アミノベンズアミド (2-AB)、トリトン X-100、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液はナカライテスク株式会社 (京都) より、妊娠 16 日目 C57BL/6 系クリーンマウスは日本 SLC 株式会社 (静岡) より、カバーガラスは松浪硝子工業株式会社 (大阪) より、ウシ血清アルブミン (BSA)、パラホルムアルデヒド (PFA) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。*A. japonicus* 由来 FCS および、化学合成した CS オリゴ糖(76,77) (Table 1-1 参照) は、鳥取大学の田村純一博士より恵与された。

### 2-2. *A. japonicus* からの FCS の抽出と精製

20.56 g の凍結乾燥した *A. japonicus* 体壁の懸濁液を 160 mL の沸騰水中で 10 分間処理した後、200 mL の 0.5 M ホウ酸塩緩衝液 (pH 7.0) を添加した。次いで、懸濁液を 55°C でタンパク質分解酵素である N Amano G を 3 日毎に 1.46 g 添加しながら、合計 9 日間酵素消化した。酵素消化した懸濁液を 15 分間沸騰させ、セライトで濾過した。濾液を Pellicon Biomax PXB008A50 (Merck Millipore、ドイツ、Darmstadt) を用いて限外濾過し、次いで 1.25 % NaOAc を含有する 80 %エタノールで沈殿させ、0°C で遠心分離した。得られた粗多糖画分の一部 (3.02 g) を少量の 0.15 M LiCl / 0.05 M 酢酸 (pH 4.0) で希釈し、DEAE-セルロースカラム ( $\phi$ 4.4~35 cm) に通した後、カラムを 0.15、0.5、1.0 および 2.0 M の LiCl を含む緩衝液を 750 mL ずつ用いて段階的に洗浄した。これらのうち、FCS を最も多く含む 2.0 M LiCl 画分を上記の限外濾過にかけた後、ゲル浸透カラムクロマトグラフィー (LH-20、H<sub>2</sub>O、 $\phi$ 4.6~34 cm) および、限外濾過により脱塩・濃縮した。得られた溶液を凍結乾燥することにより、1.18 g の *A. japonicus* 由来 FCS を得た。

Table 1-1 合成CSオリゴ糖の構造

名称	略称	構造式	文献
CS-C二糖	CS-C-di		(77)
CS-E二糖	CS-E-di		(77)
CS-E四糖	CS-E-tetra		(77)
FCS三糖	FCS-tri		(76)

### 2-3. *A. japonicus* 由来 FCS の温和条件下における酸加水分解

本節 2-2 で得た 23.2 mg の *A. japonicus* 由来 FCS を、1 M ギ酸中、80°C で 15 時間処理した。次いで、ギ酸を減圧下で除去した後、残渣をゲル浸透カラムクロマトグラフィー (LH-20、1% AcOH、φ1.3~86 cm) で精製することにより、4.4 mg の脱フコシル化多糖 (CS 多糖画分) を得た。

### 2-4. *A. japonicus* 由来 FCS の二糖組成

#### 2-4-1. ChABC による酵素消化

本節 2-3 で得た CS 多糖画分を、不飽和 CS 二糖単位に消化するために、ChABC 10 mIU 相当量を用い、最終濃度 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) および 60 mM NaOAc を含む全量 20 μL の水溶液中で 37 °C、2 時間酵素消化した(78,79)。

#### 2-4-2. 2-アミノベンズアミド (2-AB) 蛍光標識および HPLC 分析

本節 2-4-1 で得た消化物を乾固させた後、最終濃度 350 mM 2-AB と 1.0 M NaCNBH<sub>4</sub> を含む全量 5 μL の DMSO:氷酢酸 (7:3) 混合溶液中で、65 °C で 2 時間反応させ、不飽和 CS 二糖単位を 2-AB で蛍光標識した(80)。反応溶液を 500 μL の蒸留水に溶解し、等量のクロロホルムと混和後、2,000 rpm で 5 秒間遠心し、未反応の 2-AB をクロロホルム溶媒に抽出した(81)。この操作を 10 回繰り返した後、各試料を乾固した。蛍光標識された各試料を 400 μL の蒸留水に溶かし、フィルター付きマイクロチューブでろ過後、ポリアミン結合シリカカラム YMC-Pack PA-03 (YMC、京都) を用いた陰イオン交換 HPLC で不飽和 CS 二糖単位の組成比を分析した。HPLC は、室温下、流速 1.0 mL/min、60 分間、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 濃度 16 mM から 530 mM までの直線勾配条件で分析した。検出は蛍光試薬である 2-AB 由来の蛍光を指標に、励起波長 320 nm/蛍光波長 420 nm で行なった(82)。2-AB 蛍光標識された CS 二糖標品の溶出時間を指標に、検出されたピークを同定および定量した。

### 2-5. *In vitro* における CS 依存的な神経突起伸長促進活性の解析

#### 2-5-1. CS コート

8 well チャンバースライドの各 well に 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.4) で最終濃度 1.5 μg/mL に調製した PLO 溶液を 400 μL 添加し、室温で 2 時間以上静置した。各 well をリン酸緩衝液 (PBS、pH 7.4) で 3 回洗浄した後、PBS で任意の濃度に調製した CS 溶液を 400 μL 添加し、4°C で一晩静置した。細胞播種の直前に、各 well を PBS で 3 回洗浄し、300 μL の培養用培地 [B27 supplement (1×)、5 mM GlutaMAX™I、0.1% ovalbumin、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (1×) を含む Neurobasal™ medium] を添加した。

### 2-5-2. 海馬神経細胞の培養

本実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」および「実験動物の飼育及び保管等に関する法律」、「動物の愛護及び管理に関する条例」等に基づき、神戸薬科大学の動物実験委員会の承認を受けており、「神戸薬科大学動物実験指針」を順守して実施した。動物愛護と動物福祉の観点から動物実験の使用は、目的に合致した最小限にとどめた。

妊娠 16 日齢 C57BL/6 系クリーンマウスより摘出した胎仔を氷冷 PBS に浸した後、胎仔より全脳を摘出し、氷冷 HBSS に浸した。実体顕微鏡下、先鋭ピンセットで全脳表層の脳膜を剥離すると共に大脳半球を展開した後、大脳皮質の後端の内側への折返し縁に存在する海馬を採取し、氷冷 HBSS 中に回収した。回収した海馬片を氷冷 HBSS で 3 回洗浄した後、100  $\mu$ L の 0.25 % Trypsin および 0.05 % DNase I を混合した HBSS 溶液で 37°C、10 分間処理した。続いて 5 分間氷冷した後、1,500 rpm で 1 分間遠心し、上清を除いた後、細胞塊を氷冷した 200  $\mu$ L の Neurobasal medium で洗浄した。1,500 rpm で 2 分間遠心し、上清を除いた後、適量の培養用培地を添加し、ピペッティングにより単一細胞に分散させた。生細胞数をトリパンブルー色素排除法で計測し、本節 2-5-1 で CS コートしたチャンバースライドに 10,000-12,000 cells/cm<sup>2</sup> となるように 100  $\mu$ L/well で播種し、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養した。

### 2-5-3. 海馬神経細胞の免疫蛍光染色

本節 2-5-2 で 24 時間培養した海馬神経細胞を、200  $\mu$ L/well の 4% (w/v) PFA/PBS により、室温で 30 分間、細胞固定した後、各 well を PBS で 3 回洗浄した。次いで、200  $\mu$ L/well の 0.2% トリトン X-100 を含む 3% BSA/PBS 溶液により、室温で 30 分間、ブロッキングおよび透過処理した。その後、100  $\mu$ L/well の Cy3 標識抗  $\beta$  チューブリン抗体 (1 : 2,000) を含む 3% BSA/PBS 溶液により、室温で 2 時間、免疫染色した後、各 well を PBS で 3 回洗浄した。そして 200  $\mu$ L/well の最終濃度 2.0  $\mu$ g/mL の Hoechst 33342/PBS を入れて室温で 10 分間、核染色した。PBS で 1 回洗浄後、封入剤 Fluoroshield™ を用いてカバーガラスをスライド上に貼り付けた。なお、本解析の染色像は Neuron-specific beta-III Tubulin Antibody (Tuj1) を用いた場合と同様であった (データ不掲載)。

### 2-5-4. 海馬神経細胞の神経突起長の計測

本節 2-5-3 で作製したプレパラートの検鏡画像をオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-8000、株式会社キーエンス、大阪) により撮影した後、画像解析ソフトウェア (FLVFS-LS、株式会社フローベル、東京) を用いて、無作為抽出した 50 個以上の各細胞において最長かつ細胞体直径より長い神経突起の長さを計測した。

#### 2-5-5. BDNF 阻害による CS-E 基質上での海馬神経細胞の神経突起伸長

本節 2-5-2 に記載した方法に従い、海馬神経細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 2 時間培養した後、内在性 BDNF の機能阻害のため、100 μL/well の最終濃度として 1.0 μg/mL の抗 BDNF 抗体(54)または isotype control (ctrl) を含む培養用培地溶液を添加した。同様の条件下で 22 時間培養した後、免疫蛍光染色および神経突起長計測を本節 2-5-3 および 2-5-4 の方法に従って行った。

#### 2-6. 統計解析

統計解析ソフトとして SPSS (日本アイ・ビー・エム株式会社、東京) を用い、統計的有意差の基準として  $p < 0.05$  を採用した。また統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) の後、Tukey-Kramer 法により行った。なお、全ての値は平均±標準誤差 (S.E.M.) で示した。

第3節 結果

3-1. *A. japonicus* 由来 FCS は硫酸化フコース分枝を有する CS-E アナログである

ナマコ由来 FCS の有する硫酸化フコース分枝の構造は、様々な生理活性との構造活性相関が解析されてきた過程で、その細部に至るまで緻密に分析されてきた。対照的に、FCS の CS 鎖骨格は、生理活性との相関がないものとして、その構造特性の分析が蔑ろにされてきた。そのため、代表的なナマコである *A. japonicus* 由来の FCS についても、CS 鎖骨格の構造特性が十分に解析されているとは言えない。そこでこの構造特性の一つである硫酸化パターンを解析するために、まず CS 分解酵素である ChABC を利用し、*A. japonicus* の体壁から単離精製した FCS 標品を不飽和 CS 二糖単位にまで酵素消化した。その結果、先行研究(60,61)と一致して、インタクトな FCS は CS 骨格を有するにもかかわらず、ChABC 処理に対して難消化性を示した。この難消化性は主に GlcA 残基の 3-O 位に結合したフコース分枝の存在に起因すると報告されている(60,61)。そこで FCS からフコース分枝を除去するために、温和条件下で酸加水分解処理をしたところ、ChABC 処理に対して易消化性を示した。以上のことから、今回単離精製した *A. japonicus* 由来 FCS は先行研究(70,83)と同様に、GlcA 残基の 3-O 位に結合したフコース分枝を有すると考えられた。

次に、*A. japonicus* 由来 FCS の CS 鎖骨格の硫酸化パターンを市販の CS 鎖標品である CS-C および CS-E と比較分析するために、各々の ChABC 消化により得られた不飽和 CS 二糖単位を 2-AB で蛍光標識し、HPLC で分析した (Table 1-2)。その結果、注目すべきことに、FCS の CS 鎖骨格に含まれる主要な硫酸化パターンは、ジ硫酸化二糖単位の一つである E unit (48%) であり、次いでモノ硫酸化二糖単位である C unit (28%) が多かった。また、FCS の CS 鎖骨格に含まれる E unit の割合は、E unit を多量に含有するイカ軟骨由来 CS-E (Table 1-2) と比較すると約 20 ポイント少なかったが、典型的な低硫酸化 CS であるサメ軟骨由来 CS-C (0.5%) に比べ明らかに多いことから、神経突起伸長促進活性の発現には十分であると考えられた。以上のことから、*A. japonicus* 由来 FCS は硫酸化フコース分枝を有する CS-E アナログであり、CS-E と同様に神経突起伸長促進活性を有する可能性が高いと推察された。

Table 1-2. *A. japonicus* 由来 FCS 標品における各二糖単位の物質百分率 (mol%)

Composition	<i>A. japonicus</i> 由来 FCS	サメ軟骨由来 CS-C	イカ軟骨由来 CS-E
O unit	12	0.8	6.2
A unit	12	13	17
C unit	28	78	8.2
D unit	not detected	8.0	not detected
E unit	48	0.5	68

3-2. *A. japonicus* 由来 FCS はイカ由来 CS-E と同等の神経突起伸長促進活性を有する

前述の通り、イカ軟骨由来 CS-E は海馬神経細胞に対して強力な神経突起伸長促進活性を示すことが明らかとなっている(11,23,25,46,47)。また前項の解析から、*A. japonicus* 由来 FCS は硫酸化フコース分枝を有する CS-E アナログであることが明らかとなった。よって、FCS も CS-E と同様に強力な神経突起伸長促進活性を有すると期待された。そこで、FCS の神経突起伸長促進活性を評価するため先行研究(11, 46,47, 84,85)の解析方法と同様に、FCS、および市販の CS 鎖標品である CS-C および CS-E を、PLO コートしたチャンバースライドにコートし、それらの基質上で海馬神経細胞を 24 時間培養したのち、各神経細胞の最長神経突起長を計測した。

その結果、先行研究(11,23,25,46,47)の結果と一致して、PLO 単独と比較して CS-C 基質上において、神経突起の形態に顕著な変化は認められなかった。対照的に、CS-E または *A. japonicus* 由来 FCS 基質上においては、いずれにおいても一本の顕著に長い神経突起を有する神経細胞が多数観察された (Fig. 1-1 A)。

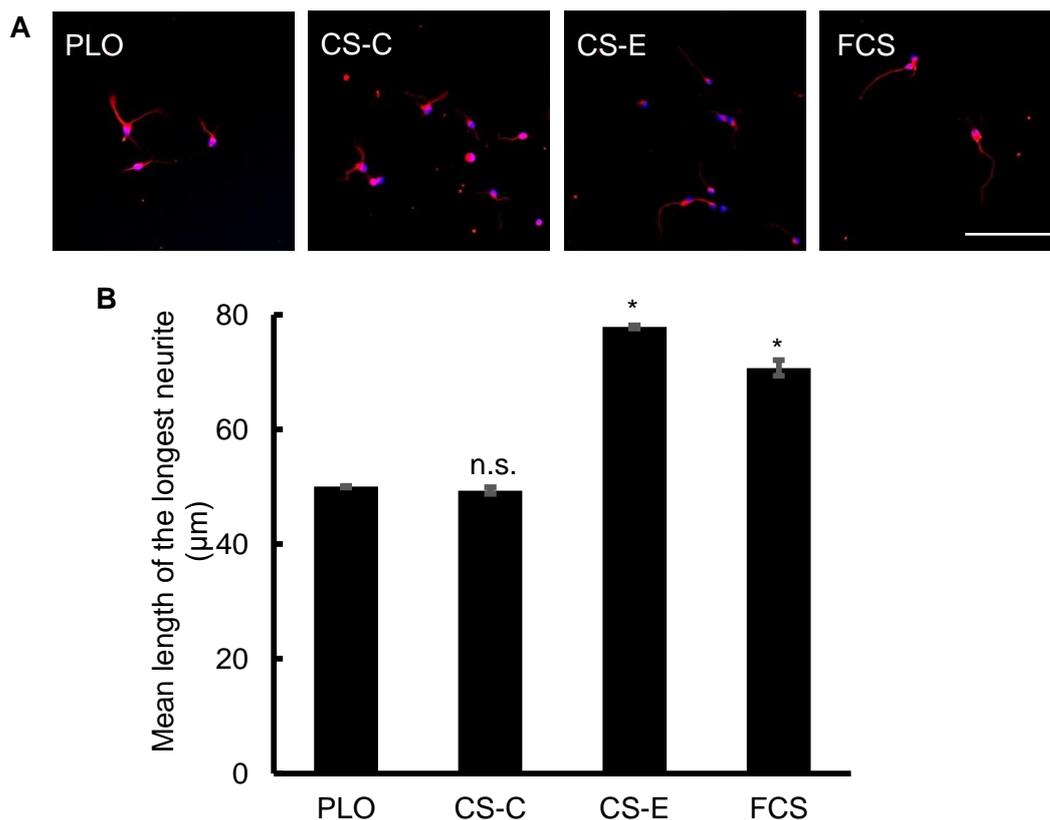


Fig. 1-1 *A. japonicus* 由来 FCS の *in vitro* における神経突起伸長促進活性

**A.** PLO コート上に各 CS 鎖標品 (サメ軟骨由来 CS-C またはイカ軟骨由来 CS-E、*A. japonicus* 由来 FCS) (5 μg/mL) をコートした基質上で、胎生 16 日齢マウス由来海馬神経細胞 (10,000 cells/cm<sup>2</sup>) を 24 時間培養した。細胞を固定後、Cy3 標識抗 β チューブリン抗体 (赤色) および Hoechst 33342 (青色) により海馬神経細胞を染色した。スケールバーは 100 μm を示す。

**B.** 条件ごとに無作為抽出した 50 個以上の神経細胞について最長神経突起長を計測し、その平均値を算出した。(n=3; \*, p<0.01; n.s. not significant, 対 PLO)

そこで、各々の条件において最長神経突起長を指標に神経突起伸長活性を定量したところ、*A. japonicus* 由来 FCS 介在性の神経突起伸長促進活性は、イカ軟骨由来 CS-E に匹敵した (Fig. 1-1 B)。前項の解析結果より、FCS は E unit の割合が CS-E より 20 ポイント低い一方で、特有の硫酸化フコース分枝を有する。これらのことから、*A. japonicus* 由来 FCS は神経突起伸長活性を有する CS-E アナログとして振る舞うだけでなく、その活性の発現において、フコース分枝が E unit の代償的機能を担うと示唆された。

### 3-3. *A. japonicus* 由来 FCS の神経突起伸長促進活性の最小機能単位は FCS 三糖である

合成オリゴ糖を利用した解析から、2 つの E unit がタンデムに結合した CS-E 四糖が、CS-E の神経突起伸長促進活性の発現における最小機能単位であることが示されている (54)。したがって、FCS 介在性の神経突起伸長促進活性において、フコース分枝が E unit の代償的機能を担うと仮定すると、フコース分枝を有する E unit である FCS 三糖が CS-E 四糖と同様に神経突起伸長促進活性を有する最小機能単位であると推定された。*A. japonicus* 由来 FCS に含まれるフコース分枝の多くは 2,4-O-ジ硫酸化されていることが報告されている (73)。よって、仮説の検証のための FCS 三糖として、化学合成した 2,4-O-ジ硫酸化体のフコース分枝を有する E unit (FCS-tri) (76) を用い、まず神経突起伸長促進活性の濃度依存性を解析した。

興味深いことに、FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性は FCS-tri のコート濃度依存的に増強され、15 µg/mL において最大活性を示した (Fig. 1-2 A)。一方で 15 µg/mL より高濃度領域 (20 µg/mL 以上) では、神経突起伸長促進活性の低下が観察された。これは FCS-tri 中の多量の硫酸基が有するマイナス電荷に起因する反接着効果であると考えられた。

次に、FCS-tri 介在性の神経突起伸長活性における構造的な重要性を評価するために、FCS-tri と、化学合成した 3 種類の CS オリゴ糖 (CS-C-di、CS-E-di および CS-E-tetra) の神経突起伸長促進活性を比較検討した (Fig. 1-2 B, C)。先行研究の結果 (54) と一致して、神経突起伸長促進活性は、PLO と比較して CS-E-di では認められなかった一方で、PLO および CS-E-di と比較して CS-E-tetra では有意に認められた。このことから、CS-E 四糖が CS-E 介在性の神経突起伸長促進活性の最小機能単位であることが確認できた。また、FCS-tri は、PLO、および *A. japonicus* 由来 FCS の主要構成 CS 二糖単位に相当する CS-C-di および CS-E-di と比較して、有意な神経突起伸長促進活性が認められた。このことから 2,4-O-ジ硫酸化フコース分枝が *A. japonicus* 由来 FCS 介在性の神経突起伸長促進活性における重要構造であり、FCS-tri が FCS の神経突起伸長促進活性の最小機能単位であると示唆された。さらに、FCS-tri の神経突起伸長促進活性は CS-E-tetra と同等であった。これらの知見から、FCS-tri 中の 2,4-O-ジ硫酸化フコース分枝は E unit の機能を模擬していることが明らかとなった。

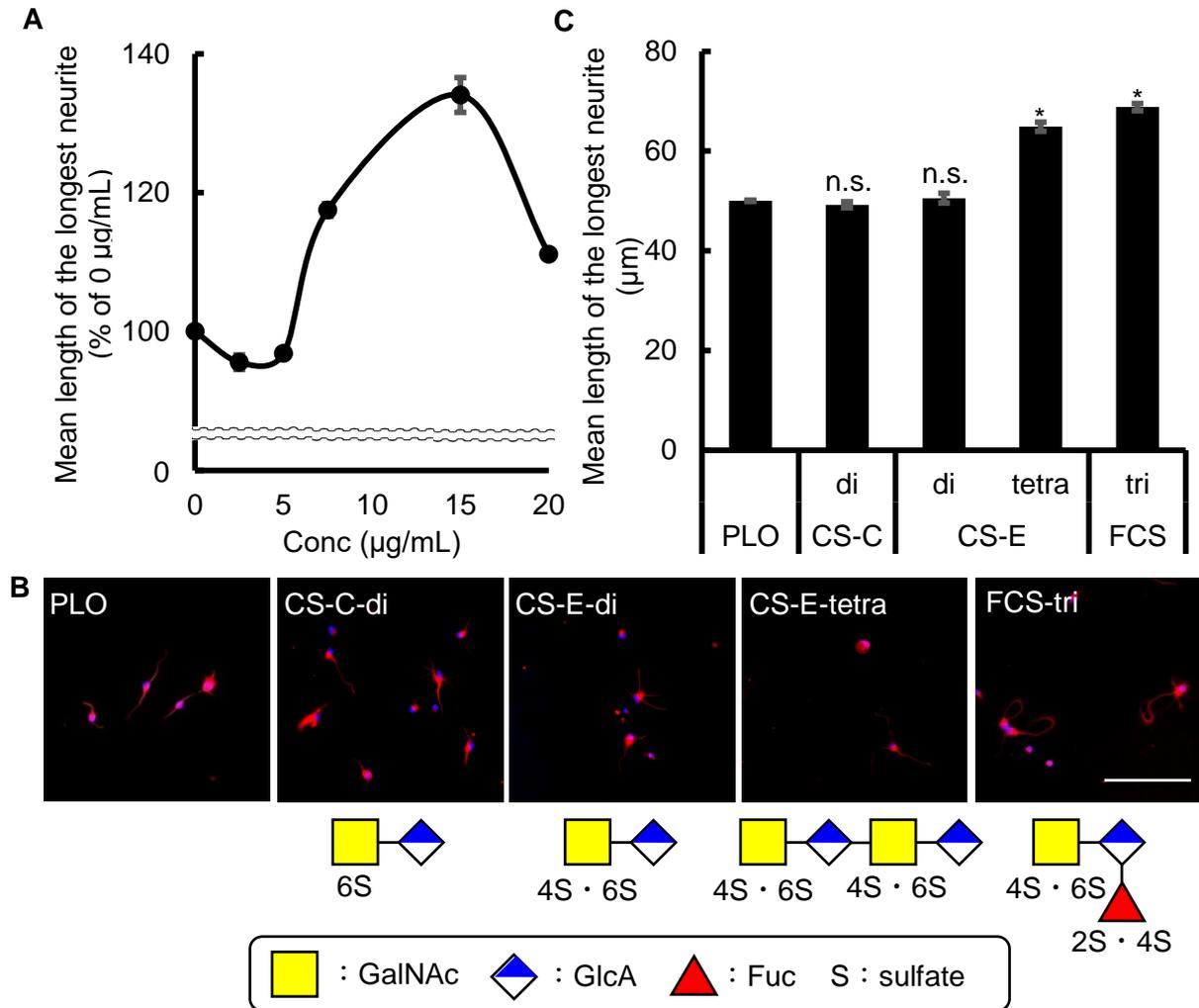


Fig. 1-2 FCS-tri などの合成 CS オリゴ糖の神経突起伸長促進活性

**A.** PLO コート上に FCS-tri (2.5 または 5.0、7.5、15、20  $\mu\text{g/mL}$ ) をコートした基質上で、胎生 16 日齢マウス由来海馬神経細胞 (10,000 cells/ $\text{cm}^2$ ) を 24 時間培養した。  
**B, C.** PLO コート上に各合成 CS オリゴ糖 (CS-C-di または CS-E-di、CS-E-tetra、FCS-tri) (15  $\mu\text{g/mL}$ ) をコートした基質上で、胎生 16 日齢マウス由来海馬神経細胞 (10,000 cells/ $\text{cm}^2$ ) を 24 時間培養した。**B.** スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。**C.** 条件ごとに無作為抽出した 50 個以上の神経細胞について最長神経突起長を計測し、その平均値を算出した。(n=3 ; \*, p<0.01 ; n.s. not significant, 対 PLO)

3-4. FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性は BDNF シグナル伝達経路を介する

CS-E は BDNF を始めとする神経栄養因子と高親和性を示し、神経栄養因子のリザーバーあるいは共受容体として機能する(20,23)。また、海馬神経細胞における CS-E 介在性の神経突起伸長促進活性は BDNF シグナル伝達経路を活性化することに起因することが報告されている(53,54)。よって、*A. japonicus* 由来 FCS および FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性も BDNF シグナル伝達経路の活性化に起因すると期待された。そこで、BDNF に対する中和抗体を用い、イカ軟骨由来 CS-E および *A. japonicus* 由来 FCS、および各々に対応する合成オリゴ糖である CS-E-tetra および FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性に及ぼす影響を検討した。

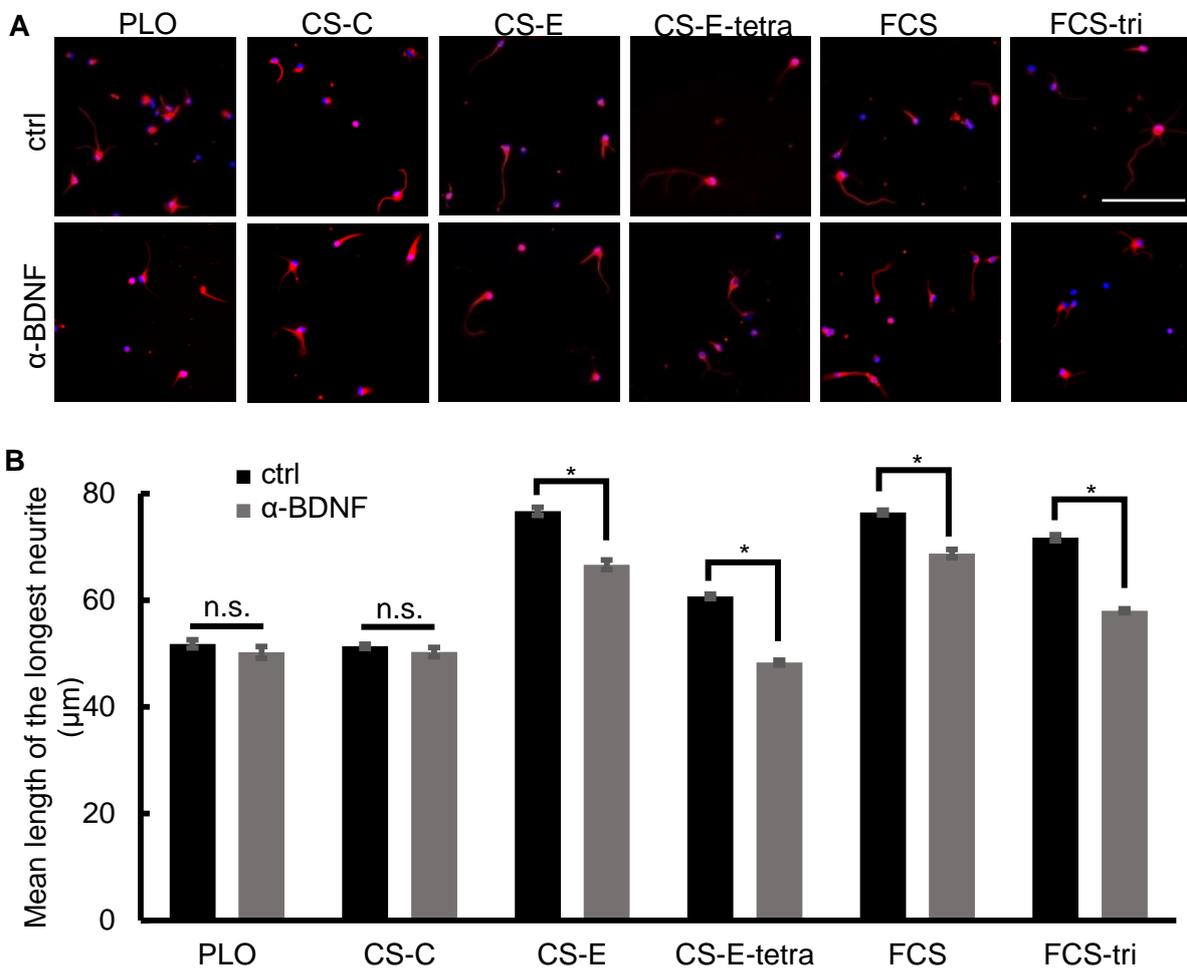


Fig. 1-3 CS-E および FCS 依存性神経突起伸長に対する抗 BDNF 抗体の効果

**A, B.** PLO コート上に各合成 CS オリゴ糖 (CS-E-tetra または FCS-tri) (15 μg/mL) または各 CS 鎖標品 (サメ軟骨由来 CS-C またはイカ軟骨由来 CS-E、*A. japonicus* 由来 FCS) (5 μg/mL) をコートした基質上で、胎生 16 日齢マウス由来海馬神経細胞 (12,000 cells/cm<sup>2</sup>) を播種した。その 2 時間後、抗 BDNF 抗体 (1 μg/mL) または isotype ctrl を添加した。その後は Fig. 1-1 の解析と同様に行った。(n=3) **A.** スケールバーは 100 μm を示す。 **B.** 条件ごとに無作為抽出した 50 個以上の神経細胞について最長神経突起長を計測し、その平均値を算出した。(n=5 ; \*, p<0.01 ; n.s, not significant, 対 ctrl)

イカ軟骨由来 CS-E および *A. japonicus* 由来 FCS、CS-E-tetra、FCS-tri のいずれにおいても、isotype control (ctrl) と比較して抗 BDNF 抗体の添加では、神経突起伸長促進活性が有意に低下した (Fig. 1-3)。このことから、FCS および FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性は BDNF シグナル伝達経路の活性化を必要とすることが明らかとなった。

## 第4節 考察

ジ硫酸化 CS 二糖単位である E unit を多量に含有する CS 鎖であるイカ由来 CS-E は、強力な神経突起伸長促進活性を有する(20,23,25,53)。よって著者は、特徴的なフコース分枝を有しかつ CS 鎖骨格中に E unit を多量に含有する *A. japonicus* 由来の FCS(70,83)が、CS-E と同様の活性を有すると期待し、フコース分枝構造と CS-E 介在性の神経突起伸長促進活性との相関を解析した。その結果、今回新たに単離精製した *A. japonicus* 由来 FCS は、CS-E と同等の神経突起伸長活性を有することが明らかとなった。また合成オリゴ糖を用いた解析から、*A. japonicus* 由来 FCS 介在性の神経突起伸長活性の発現における最小機能単位は FCS-tri (2,4-O-ジ硫酸化フコース分枝を有する E unit) であることが明らかとなった。さらにこれらの分子機構として、FCS および FCS-tri が CS-E および CS-E 四糖と同様に BDNF のリザーバーとして機能する可能性を見出した。よって、これらの知見は、FCS 介在性の神経突起伸長促進活性は E unit を多く含有する CS 鎖骨格に依存的であると示唆するのみならず、FCS におけるフコース分枝が E unit の代償的機能を担うという仮説の裏付けとなった。

BDNF の中和抗体により合成オリゴ糖である FCS-tri 介在性の神経突起伸長は ctrl と同程度に抑制される一方で、多糖鎖である FCS 介在性の神経突起伸長は ctrl と同程度までには抑制されなかった。よって、FCS 介在性の神経突起伸長活性の発現においてサイトカインのリザーバー以外の分子機構の存在が示唆される。実際、オリゴ糖である CS-E 四糖はサイトカインのリザーバーとしてのみ機能する一方で、多糖鎖である CS-E はサイトカインのリザーバーだけでなく第2章で詳述する CS 受容体のリガンドとしての機能も併せ持つと考えられている(23)。したがって、FCS 介在性の神経突起伸長活性の発現においても CS-E と同様、あるいは新規の CS 受容体を介する可能性が示唆された。

以上の知見から、FCS-tri の構造と生理活性との相関は CS 鎖の多彩な機能の発現機構を包括的に理解する一助となりうる。したがって、化学合成された CS 鎖または FCS を用いた CS 鎖の構造活性相関解析の今後の進展により、CS 鎖の神経突起伸長促進活性のみならず、CS 鎖の多彩な機能を包括的に理解するための分子基盤が構築できる可能性がある。

興味深いことに、本解析において FCS-tri は E unit を 1 つしか有しないにも関わらず、E unit を 2 つ有する CS-E-tetra と同様の活性を示したことから、FCS-tri の 2,4-O-ジ硫酸化フコース分枝は E unit の機能を模擬することも明らかとなった (Fig. 1-4)。また所属研究室における予備的解析により、FCS-tri は FCS の有する抗凝固活性(55,56)および抗血栓活性(56,58)を有さない可能性が見出されている (未発表データ)。さらに FCS-tri は、CS-E 四糖と比較し化学合成が簡便である。また、CS-E 四糖は成体期における CNS 損傷治療薬のリード化合物となりうるかと期待されている。

これらのことから FCS-tri は、CS-E の最小機能単位である CS-E 四糖を代替する、成体期における CNS 損傷治療のゴールドスタンダードとなりうる治療薬のリード化合物としての可能性を秘めていると考えられた。

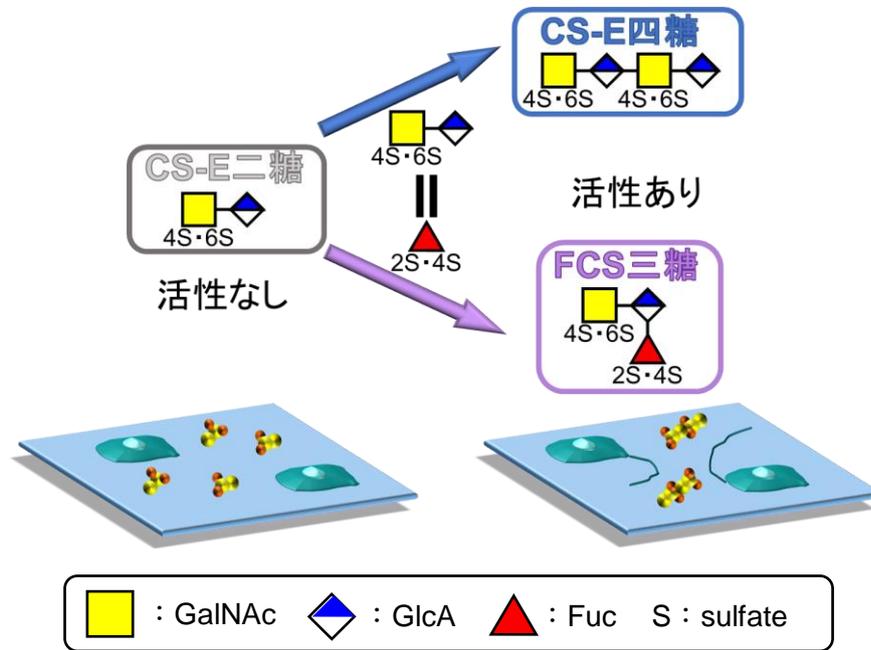


Fig. 1-4 FCS-tri などの合成 CS オリゴ糖の構造と神経突起伸長促進活性の相関関係  
 活性のない CS-E 二糖に、CS-E 二糖が結合した CS-E 四糖、および 2,4-O-ジ硫酸化フコース  
 が結合した FCS 三糖は同等の活性を示す。よって、CS-E 二糖と 2,4-O-ジ硫酸化フコースは  
 生物学的に等価である、すなわち、FCS 三糖の 2,4-O-ジ硫酸化フコース分枝は E unit を模擬  
 していると考えられた。

第5節 小括

- ・ *A. japonicus* 由来 FCS の CS 鎖骨格において、含有量が最多である二糖単位は E unit であった。
- ・ *A. japonicus* 由来 FCS はイカ軟骨由来 CS-E と同等の神経突起伸長促進活性を有することがわかった。
- ・ *A. japonicus* 由来 FCS 介在性の神経突起伸長促進活性における最小機能単位は、FCS-tri (2,4-O-ジ硫酸化フコース分枝を有する E unit) であった。
- ・ FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性において、2,4-O-ジ硫酸化フコース分枝は E unit の機能を模擬すると考えられた。
- ・ *A. japonicus* 由来 FCS および FCS-tri 介在性の神経突起伸長促進活性の発現は、イカ軟骨由来 CS-E および CS-E-tetra と同様に BDNF シグナル伝達経路の活性化を必要とすることがわかった。

第2章 CS-Dによる神経突起伸長の促進機構の解析

第1節 緒言

CS鎖の生理機能発現における分子モデルとして、第1章で述べた「サイトカインのリザーバー」モデルに加えて、所属研究室では「CS受容体のリガンド」モデルを新たに提唱している。実際、2009年に、CNSにおける促進性のCS受容体としてCNTN-1を世界に先駆けて同定している(11)。この報告以降、活発な研究により、脊髄損傷において阻害性のCS受容体が相次いで同定され(63-65)、創薬の標的として注目を集めている。よって、促進性CS受容体についても創薬の標的となりうると期待される。しかし、促進性CS受容体を介した神経突起伸長促進機構は未解明の部分が多く残されており、この解明が喫緊の課題である。

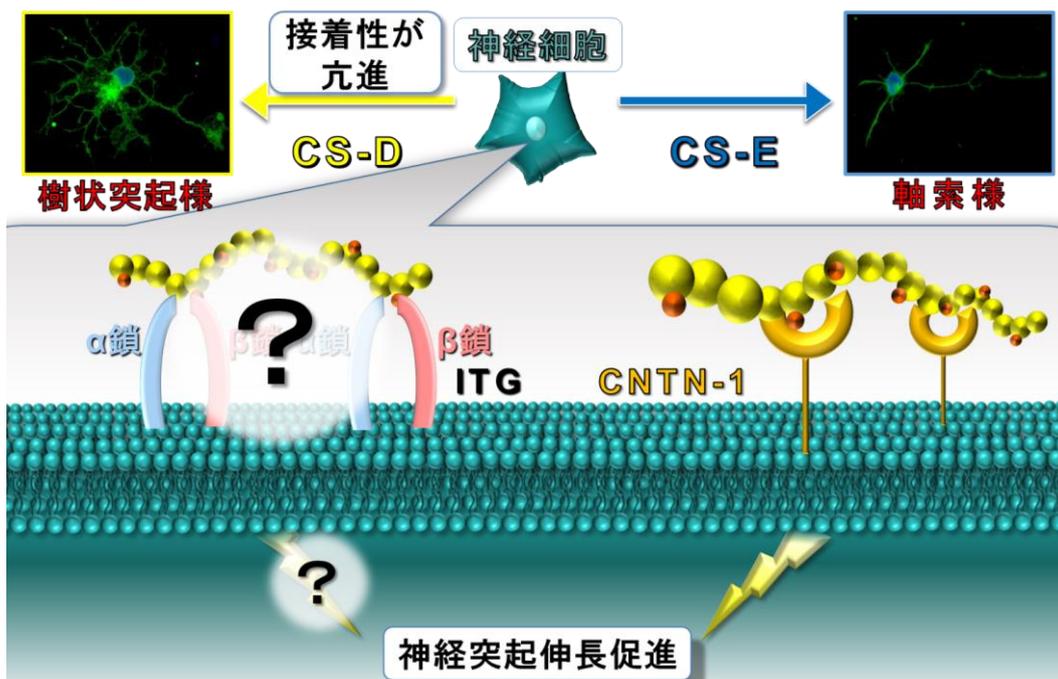


Fig. 2-1 高硫酸化CSによる促進性CS受容体を介した神経突起伸長促進機構モデル

CS-EはCNTN-1のリガンドとして機能し、軸索様の神経突起伸長を促進する(右)。一方で、CS-Eとは異なる硫酸化パターンをもつCS-D基質上では、神経突起の形態がCS-E基質上とは明らかに異なり、樹状突起様の神経突起および接着性の亢進が観察される。これらのことから、CS-Dによる神経突起伸長の促進において、細胞外マトリックス成分と強い接着性をもつITGがCS受容体として機能する可能性が考えられた(左)。

面白いことに、海馬神経細胞の形態は足場基質となる高硫酸化 CS の硫酸化パターンに依存する(45-47)。E unit [GlcA-GalNAc (4,6-O-disulfate)] とは硫酸化パターンの異なる D unit [GlcA (2-O-sulfate) -GalNAc (6-O-sulfate)] を多量に含有する高硫酸化 CS である CS-D は、CS-E とは異なり、比較的短い樹状突起様の神経突起の形成を促進する。さらに CS-D 基質上では、CS-E 基質上と比較して海馬神経細胞の接着性が亢進する様子が観察される(47)。これらのことから、CS-E の受容体である CNTN-1 とは異なり、なおかつ細胞外マトリックス成分と強い接着性をもつ分子が、CS-D の硫酸化パターンを認識し、樹状突起様の神経突起形成を促進する CS 受容体として機能すると推察された(Fig. 2-1)。

そこで CS-D に対する新規 CS 受容体の候補分子として、細胞外マトリックス中のタンパク質成分と細胞との接着を担う主要な細胞接着分子であるインテグリン (ITG) ファミリーに着目した。ITG ファミリーは、あらゆる細胞の細胞膜において  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の 2 つのサブユニットから構成されるヘテロ二量体を形成し、細胞内外の架け橋として、細胞外マトリックスに埋め込まれた情報を読み取り、細胞内へ伝達する(86,87)。また認識可能な細胞外マトリックスの種類は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の組み合わせに依存し、ITG ファミリーのサブユニットの組み合わせは 24 種類が報告されている(88)。

ITG ファミリーは、細胞接着分子として同定された 1980 年代以降の活発な研究により、単に細胞外マトリックスと細胞との接着を担うだけではなく、種々のシグナル伝達経路を介して、細胞分化や細胞死を制御することが解明されてきた(89)。近年においても、その勢いは衰えることなく、創薬の観点から解明が急がれるがんの転移(90)や組織の線維化(91)などの生命現象に、特定のサブユニットから構成される ITG が深く関与することが報告されている。よって、特定のサブユニットから構成される ITG の機能の理解を深めることは、我々の身近な生命現象を理解する上でも意義深い。

これまでに CNS において ITG ファミリーは、*in vivo* および *in vitro* において重要な役割を担うことが示されてきた(92-94)。例えば、フィブロネクチン受容体である ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 や ITG $\alpha$ 5 $\beta$ 1 はいずれも大脳皮質の層形成を制御することが報告されている(95-97)。興味深いことに、ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 は海馬神経細胞の樹状突起スパインの機能維持にも関与することが報告された(98,99)。対照的に、ITG $\alpha$ 5 $\beta$ 1 は、ごく最近、ドパミン作動性神経細胞の神経突起伸長を制御すること(100,101) が報告され、パーキンソン病に対する細胞移植療法の問題解決の糸口となると期待されている。このように、同種リガンドに対する ITG の間でも分子種により異なる機能を発現するため、ITG の分子種の同定は極めて重要である。

これまでに特定の ITG とメラノーマ細胞に由来する CS 鎖が結合することが報告されている(102,103)。また近年、CNS において興味深いことに、低硫酸化 CS による軸索再生の障害が低硫酸化 CS による ITG シグナルの不活性化に起因すると示唆された(104)。

対照的に、神経細胞表面に発現する高硫酸化 CS が ITG シグナルを活性化することも報告されている(105)。さらに、所属研究室ではこれまでに、高硫酸化 CS 基質上において海馬神経細胞の神経突起伸長が顕著に促進されることも報告している(45-47)。これらのことから、高硫酸化 CS による神経突起伸長において、神経細胞表面に発現する特定の ITG が、高硫酸化 CS の受容体として機能し、神経突起伸長の促進に寄与する可能性が示唆される。しかし、これまでに CNS において ITG が CS 受容体として機能するという事実を直接的に明らかにした報告は存在しない。そこで著者は ITG ファミリーに着目し、CS-D による神経突起伸長の促進に関与する CS 受容体としての妥当性の検証および責任分子種の同定を試みた。

## 第2節 実験材料および方法

### 2-1. 実験材料

Anti-Integrin beta 1 抗体 [BV7] ( $\alpha$ -ITG $\beta$ 1)、PP2 (CAS#172889-27-9)、PP3 (CAS#5334-30-5) は Abcam 社 (アメリカ、マサチューセッツ) より、TRI REAGENT<sup>®</sup>は Molecular Research Center 社 (アメリカ、オハイオ) より、Amine Coupling Kit、Acetate、HBS-P、Sensor Chip CM5 は GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 (東京) より、Neuron-specific beta-III Tubulin Antibody (Tuj1)、Recombinant Human Integrin alpha V beta 3 Protein (組換え ITG $\alpha$ V $\beta$ 3) は R&D Systems 社 (アメリカ、ミネソタ) より、Light Cycler Capillaries、Light Cycler Fast Start DNA Master PLUS SYBR<sup>®</sup> Green I は Roche Molecular Diagnostics 社 (アメリカ、カリフォルニア) より、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody (Alexa Fluor 488 抗ウサギ IgG 抗体)、Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody (Alexa Fluor 594 抗マウス IgG 抗体)、Phospho-FAK (Tyr397) Polyclonal Antibody (抗 pFAK 抗体) はサーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社 (横浜) より、クジラ軟骨由来 CS-A、サメ軟骨由来 CS-D は生化学工業株式会社 (東京) より、dNTP Mixture (各 2.5 mM)、Random Primer (nonadeoxyribonucleotide mixture ; pd (N)<sup>9</sup>) はタカラバイオ株式会社 (草津) より、M-MLV reverse transcriptase、RNasin<sup>®</sup> Plus ribonuclease inhibitor、RQ1 RNase-free DNase はプロメガ株式会社 (東京) より、cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (CAS#137813-35-5) は株式会社ペプチド研究所 (大阪) より、Millicell<sup>®</sup> EZ slides 8-well glass slide はメルク株式会社 (東京) より、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、Genistein (CAS#446-72-0) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。

### 2-2. リン酸化 FAK (focal adhesion kinase) の免疫染色および観察

第1章、第2節の2-5-1および2-5-2の方法に従って、Millicell<sup>®</sup> EZ slides 8-well glass slide の各 well を 5  $\mu$ g/mL または 15  $\mu$ g/mL の CS-C または CS-D 溶液でコートし、その基質上で胎生 16 日齢マウス胎仔由来の海馬神経細胞を 24 時間培養した。そして、第1章、第2節の2-5-3の方法に従って、固定、ブロッキングおよび透過処理まで行った後、100  $\mu$ L/well の Tuj1 (1 : 2,000) および抗 pFAK 抗体 (1 : 250) を含む 3% BSA/PBS 溶液により、4°C で 12 時間、抗体反応させた後、各 well を PBS で 3 回洗浄した。続いて、100  $\mu$ L/well の Alexa Fluor 488 抗ウサギ IgG 抗体 (1 : 2,000) および Alexa Fluor 594 抗マウス IgG 抗体 (1 : 2,000) を含む 1% BSA/PBS により、室温で 2 時間、抗体反応させた後、各 well を PBS で 3 回洗浄した。最後に、第1章、第2節の2-5-3の方法に従って、核染色および封入を行った。完成したプレパラートの観察は共焦点顕微鏡 LSM700 (カールツァイス、東京) を用い、63 倍油浸レンズで行った。

### 2-3. *In vitro*におけるCS鎖依存的な神経突起伸長促進活性の解析

#### 2-3-1. 海馬神経細胞のITGシグナル阻害によるCS鎖の神経突起伸長促進作用への影響

第1章、第2節の2-5-1に従い、細胞播種の直前に、各wellをPBSで3回洗浄した。その後、培養用培地に、細胞播種後の最終濃度が任意の濃度となるように各阻害剤（Genistein または PP2、PP3）を添加した。そして第1章、第2節の2-5-2 から 2-5-4 の方法に従い、各条件における神経突起伸長促進活性を評価した。

#### 2-3-2. 海馬神経細胞のITGの機能阻害によるCS鎖の神経突起伸長促進作用への影響

第1章、第2節の2-5-5の方法に準じ、 $\alpha$ -ITG $\beta$ 1 または isotype ctrl（最終濃度 0.5、1.0  $\mu$ g/mL）、または cyclo（最終濃度 10、30  $\mu$ M）を含む培養用培地溶液を添加した。

### 2-4. Real-time RT-PCR法による胎生16日齢マウスの海馬における遺伝子の発現解析

#### 2-4-1. Complementary DNAの合成

第1章、第2節の2-5-2の方法に従って、摘出した胎生16日齢マウス胎仔の海馬片から、TRI REAGENT<sup>®</sup>の標準プロトコールに準じて total RNA を抽出した。次に、total RNA の濃度および純度を NanoDrop（サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社、横浜）で測定し、RQ1 RNase-free DNase の標準プロトコールに従って total RNA に含まれる微量のゲノム DNA を分解した。その後、一定量の total RNA を鋳型として、M-MLV reverse transcriptase の標準プロトコールに従い、Random Primer および dNTP Mixture を用いて、RNasin<sup>®</sup> Plus ribonuclease inhibitor 存在下で逆転写反応を行った。

#### 2-4-2. Real-time PCR

検量線作成用の鋳型は、外部標準としてハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*Gapdh*) を採用し、この cDNA 断片を組み込んだベクターを  $10^6$  molecules/ $\mu$ L から  $10^3$  molecules/ $\mu$ L にまで段階希釈したものを用いた。また本節 2-4-1 で合成した cDNA は、Nuclease Free Water で 5 倍希釈して用いた。これら各 2.5  $\mu$ L を鋳型とし、Light Cycler Fast Start DNA Master PLUS SYBR<sup>®</sup> Green I キットの標準プロトコールに従って全体積 10  $\mu$ L となるように試料を調製し、ライトサイクラーシステム ST300（Roche Diagnostics 社）で 95 °C 5 sec 間、60 °C 5 sec 間、72 °C 10 sec 間を 40 cycle の条件下で、PCR 法により各遺伝子の増幅を行った。なお、各遺伝子に対するプライマーは Table 2-1 に示した。定量は PCR 増幅産物が任意の量に達したサイクル数（Threshold cycle、Ct 値）を利用して作成した検量線に基づいて行った。また、目的遺伝子の発現量は、各試料の *Gapdh* の発現量に対する相対値として算出した。

Table 2-1 Real-time PCR の primer 一覧

Gene name	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
<i>Itga1</i>	CCTTCCCTCGGATGTGAGTCA	AAGTTCTCCCCGTATGGTAAGA
<i>Itga3</i>	CCTCTTCGGCTACTCGGTC	CCGGTTGGTATAGTCATCACCC
<i>Itga4</i>	GATGCTGTTGTTGTACTIONTCGGG	ACCACTGAGGCATTAGAGAGC
<i>Itga5</i>	CTTCTCCGTGGAGTTTTACCG	GCTGTCAAATTGAATGGTGGTG
<i>Itga6</i>	TGCAGAGGGCGAACAGAAC	GCACACGTCACCACTTTGC
<i>Itga8</i>	TGGCTGGGATTCCAAGAGGA	GTGCCCCGACCAATATGTCA
<i>Itgav</i>	CCGTGGACTTCTTCGAGCC	CTGTTGAATCAAACCTCAATGGGC
<i>Itgb1</i>	ATGCCAAATCTTGCGGAGAAT	TTTGCTGCGATTGGTGACATT
<i>Itgb3</i>	GAGCCCATTTTCTTCTCCCG	GCAACACCATGAATCCATCCC
<i>Gapdh</i>	CATCTGAGGGCCCACTG	GAGGCCATGTAGGCCATGA

## 2-5. BIAcore X100 による CS 鎖と ITGaVβ3 の相互作用解析

### 2-5-1. センサーチップへの組換え ITGaVβ3 の固定

ランニング緩衝液として HBS-P (0.01 M HEPES (pH 7.4)、0.15 M NaCl、0.005% Surfactant P20) を用い、25 °C の条件下で、BIAcoreX100 (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) にセンサーチップ CM5 を挿入した。リガンド固定の標準プロトコールに従い、まずリガンドである組換え ITGaVβ3 を固定するための最適 pH をプレコンセントレーション効果の解析により判定し、pH 4.0 と定めた。次に、組換え ITGaVβ3 を Acetate (pH 4.0) で最終濃度 20 μg/mL となるように希釈し、Amine Coupling Kit を用いて、センサーチップ CM5 のリガンド固定化セル側の表面に固定した。

### 2-5-2. CS 鎖と ITGaVβ3 との相互作用解析

ランニング緩衝液として 2 mM CaCl<sub>2</sub> および 1 mM MgCl<sub>2</sub> を含む HBS-P を用い、25 °C の条件下で、BIAcore X100 に本節 2-5-1 で ITGaVβ3 を固定したセンサーチップ CM5 を挿入した。10 mg/mL の CS-C および CS-D を含む HBS-P 溶液を、ランニング緩衝液で各 CS 鎖の見かけの平均分子量に基づいて 5~50 μM の範囲で希釈し、これらの溶液をリガンド固定化セルおよびリファレンスセルに、流速 15 μL/min で、各 5 分間 (結合期 2 分、解離期 3 分) 添加した。得られたセンサグラムを Biacore X100 Evaluation Software により、1:1 (Langmuir) binding モデルに適合させ、Kinetics 解析を行い、解離定数 (KD) を得た。

#### 2-6. 統計解析

統計解析ソフトとして **SPSS**（日本アイ・ビー・エム株式会社、東京）を用い、統計的有意差の基準として  $p < 0.05$  を採用した。また統計解析は、一元配置分散分析（ANOVA）の後、**Tukey-Kramer** 法により行った。なお、全ての値は平均±標準誤差（**S.E.M.**）で示した。また、神経突起伸長に関するいずれの実験においても、阻害剤非添加もしくは中和抗体に対するコントロール抗体を添加した際には、**CS-D** もしくは **CS-E** により、**PLO** もしくは **CS-C**、**CS-A** に比較して有意な神経突起伸長促進作用が認められた。

### 第3節 結果

#### 3-1. CS-D による神経突起伸長の促進は ITG シグナルの活性化に起因する

ITG に細胞外マトリックスのタンパク質成分が結合すると、 $\beta$  鎖の細胞内領域に結合した細胞骨格タンパク質に、細胞内シグナル伝達分子である FAK が結合する。結合した FAK が自己リン酸化により活性化されると、ITG のクラスターリングが促進され、細胞外マトリックスと細胞間の接着性が亢進する(89)。前述のように、海馬神経細胞の接着性は CS-D 基質上で顕著に亢進することが見出されている(47)。よって、CS-D により FAK の活性化が促進されると推察された。そこで、各 CS 鎖基質上で培養した海馬神経細胞において、各 CS 鎖基質への接着性および、FAK の活性化体であるリン酸化 FAK (pFAK) の発現動態を免疫染色法により解析した。

先行研究の結果(47)と一致して、細胞骨格タンパク質である tubulin の染色により、コントロールである PLO および CS-C 基質上と比較して CS-D 基質上では、海馬神経細胞の細胞体の接着面積が明らかに増大しており、複数本の神経突起伸長が促進されている様子が観察された (Fig. 2-2-1)。このことから、CS-D 基質上では少なくとも海馬神経細胞の接着性が亢進していると推察された。また pFAK の染色性はいずれの基質上においても海馬神経細胞の細胞体において観察されたが、CS-D 基質上においては CS-D のコート濃度依存的に pFAK の染色強度が増強した (Fig. 2-2-1)。これらのことから、CS-D 基質上における海馬神経細胞の接着性の亢進は CS-D により ITG のシグナル伝達分子である FAK の活性化が促進された結果である可能性が示唆された。

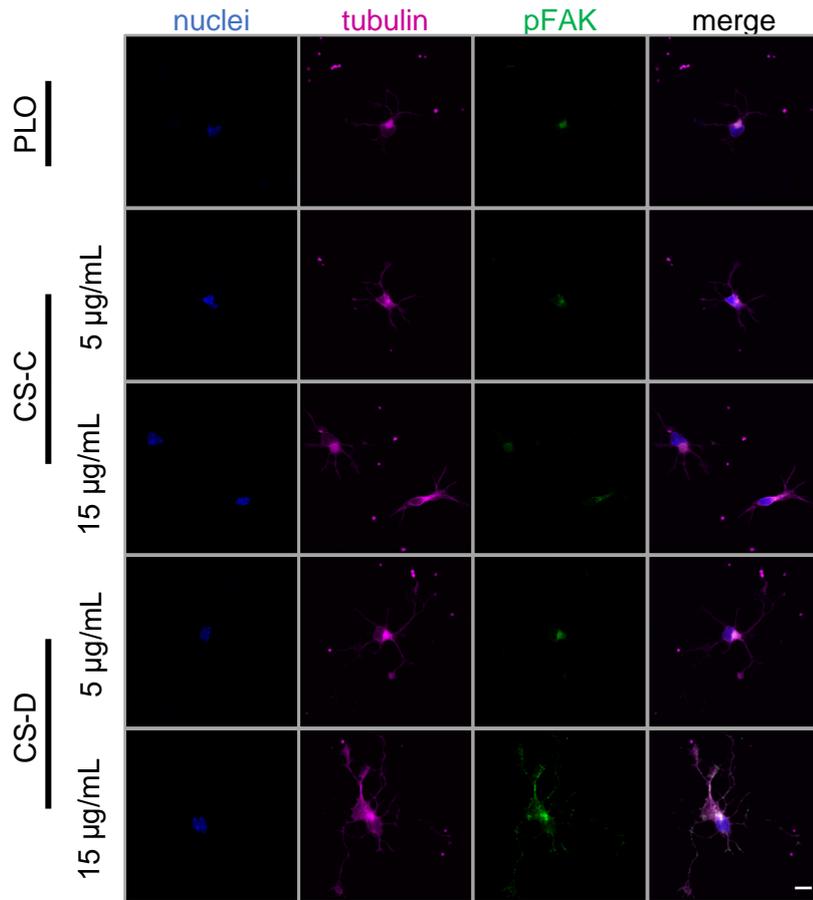


Fig. 2-2-1 各 CS 基質上における海馬神経細胞の細胞形態および pFAK の発現動態

PLO コート上に CS-C または CS-D (5 µg/mL または 15 µg/mL) をコートした基質上で、胎生 16 日齢マウス由来海馬神経細胞 (10,000 cells/cm<sup>2</sup>) を 24 時間培養した。細胞を固定後、海馬神経細胞の tubulin を Tuj1 (マゼンタ)、pFAK を抗 pFAK 抗体 (緑)、核を Hoechst 33342 (青色) で染色した。スケールバーは 10 µm を示す。

興味深いことに、ITG を介した FAK シグナル伝達経路の活性化により、神経突起の伸長を含む神経細胞分化が制御されることが報告されている(106,107)。よって、CS-D 基質上における神経突起伸長の促進についても FAK シグナル伝達経路の活性化に起因すると考えられた。そこでこの検証のために、FAK を阻害する Genistein を用いて、CS-D による神経突起伸長に及ぼす影響を検討した。

その結果、コントロールである PLO および CS-C 基質上における神経突起伸長は Genistein の添加による影響が認められなかった一方で、CS-D による神経突起伸長の促進は Genistein の濃度依存的に有意に抑制された (Fig. 2-2-2 A, B)。よって、CS-D による神経突起伸長の促進は FAK の活性化に起因することが明らかとなった。したがって、CS-D 基質上における神経突起伸長の促進についても ITG を介することが示唆された。

一般に ITG と ITG のリガンドとの結合により活性化された FAK は、その下流のシグナル分子で、非受容体型チロシンキナーゼである Src/Fyn と結合し、それらの下流のシグナル経路を活性化する(89)。CNS において、Src は Fyn が代償的に機能するため遺伝子欠損 (KO) による異常を示さないが、Fyn KO は海馬の形成異常が認められる(108)。さらに、Src/Fyn のダブル KO は、大脳の層形成異常を示すなど、神経突起の伸長制御を含む脳の形態形成の破たんを来す(109)。よって、CS-D に特徴的な複数本の神経突起伸長の促進において、Src/Fyn が関与する可能性が想定された。そこで次に、この検証のため、Src/Fyn を含むチロシンキナーゼの阻害剤である PP2 を用いて、CS-D による神経突起伸長に及ぼす影響を検討した。

その結果、PP2 のネガティブコントロールである PP3 と比較して、コントロールである PLO および CS-C 基質上における神経突起伸長は PP2 の添加による影響が認められなかった。一方で、CS-D による神経突起伸長の促進は PP2 の添加により有意に抑制された (Fig. 2-2-2 C, D)。よって、CS-D による神経突起伸長の促進は Src/Fyn の活性化を介することが明らかとなった。

以上のことから、海馬神経細胞は細胞表面の ITG を介して CS-D 基質との接着性を亢進させ、主要な ITG のシグナル経路である FAK-Src/Fyn の活性化を誘導することにより、自らの神経突起を伸長させていると考えられた。よって、FAK-Src/Fyn の活性化を介して神経突起伸長を促進する ITG 分子種が CS-D の受容体として機能しうると示唆された。

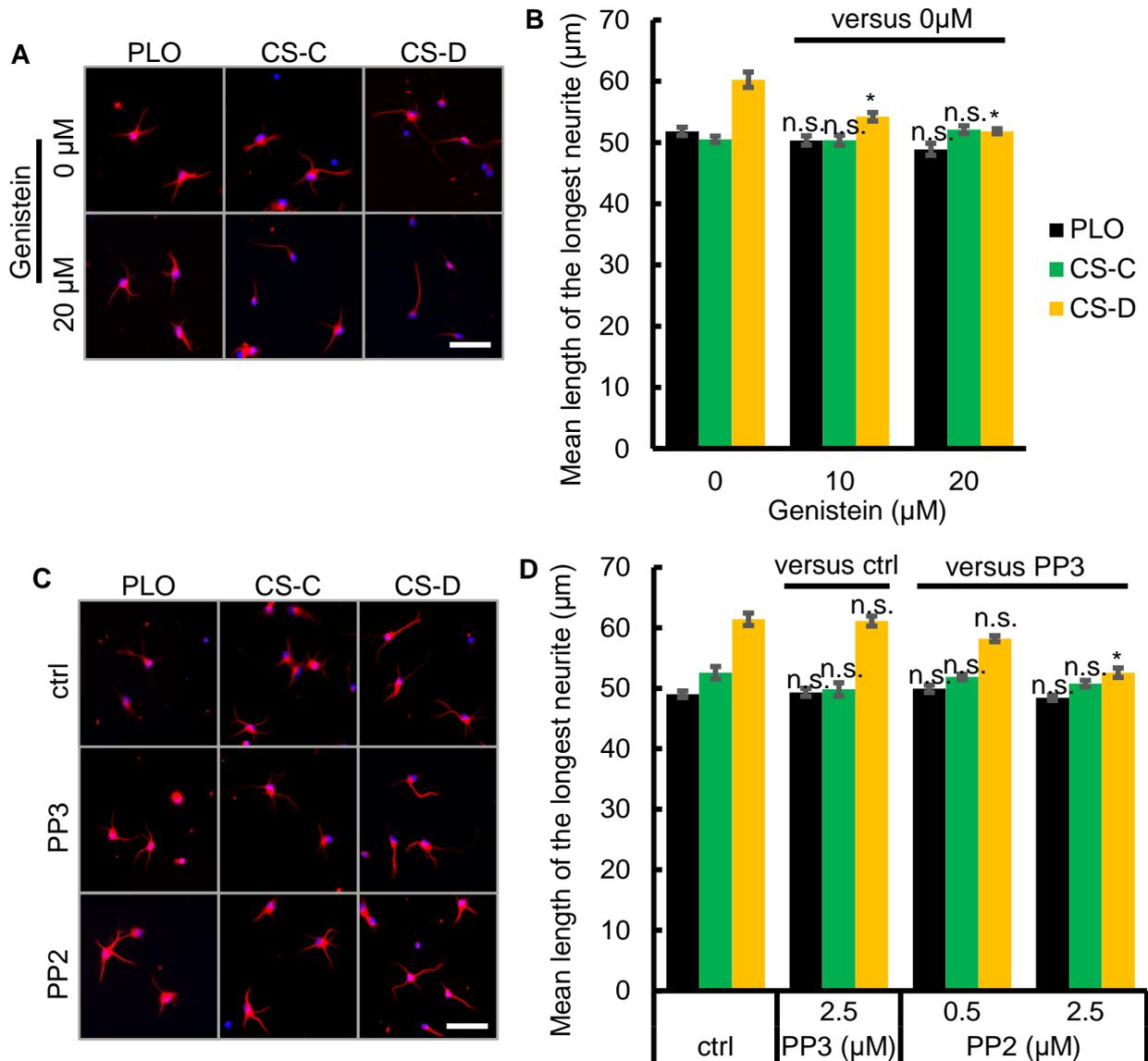


Fig. 2-2-2 ITG シグナル阻害による CS-D の神経突起伸長促進作用への影響

**A, C.** 培養用培地に FAK を阻害する Genistein (20 μM) (**A**)、Src/Fyn を含むチロシンキナーゼを阻害する PP2 または PP2 のネガティブコントロールである PP3 (2.5 μM) (**C**) を添加し、CS-C または CS-D (5 μg/mL) をコートした基質上で、海馬神経細胞を Fig. 2-2-1 の解析と同様に培養した。細胞を固定後、Cy3 標識抗 β チューブリン抗体 (赤色) および Hoechst 33342 (青色) により海馬神経細胞を染色した。スケールバーは 100 μm を示す。**B, D.** 条件ごとに無作為抽出した 50 個以上の神経細胞について最長神経突起長を計測し、その平均値を算出した。(n=5 ; \*, p<0.01 ; n.s. not significant) **B.** 対 0 μM。 **D.** PP3 は対 ctrl、PP2 は対 PP3。

### 3-2. CS-D による神経突起伸長の促進は ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 を介する

細胞外マトリックスの受容体としてあらゆる細胞に発現している ITG は、構成サブユニットにより、その機能だけでなく、対応するリガンドの種類や発現プロファイルも異なる(110)。そこで、CS-D による神経突起伸長の促進において、CS-D の受容体として機能する ITG の構成サブユニットを同定する目的で、これまでに神経細胞分化に関与することが報告(111)されている主要な ITG の構成サブユニット (ITG $\alpha$ 1、 $\alpha$ 3、 $\alpha$ 4、 $\alpha$ 5、 $\alpha$ 6、 $\alpha$ 8、 $\alpha$ v、ITG $\beta$ 1、 $\beta$ 3) に着目し、胎生 16 日齢のマウス胎仔由来海馬片における各サブユニットの mRNA 発現量を Real-time PCR 法により定量した。

その結果、 $\alpha$  鎖については *Itga1* および *Itga3*、*Itga4*、*Itga5*、*Itga6*、*Itga8*、*Itgav* のいずれも発現していることが確認できた (Fig.3-2 A)。また、 $\beta$  鎖についても、*Itgb1* および *Itgb3* のいずれも発現していることが確認できた (Fig.3-2 B)。これらの結果から、胎生 16 日齢のマウス胎仔由来海馬においては、少なくとも神経細胞分化に関与する主要な ITG の構成サブユニットの全てが発現していることが判明した。

ここで  $\alpha$  鎖と比べて分子種の少ない  $\beta$  鎖に着目すると、神経系において、ITG $\beta$ 1 は今回の解析で発現量を確認した全ての  $\alpha$  鎖とヘテロダイマーを形成する一方で、ITG $\beta$ 3 は ITG $\alpha$ V とのみヘテロダイマーを形成することが知られている(88)。そこで、CS-D 受容体の構成分子として、神経突起伸長を促進する ITG の  $\beta$  鎖を同定するために、各  $\beta$  鎖に対する機能阻害を試みた。ITG $\beta$ 1 に対してはその中和抗体である  $\alpha$ -ITG $\beta$ 1 を、ITG $\beta$ 3 に対しては ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 に特異的な阻害ペプチドである *cyclo* (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) を用いた。

まず ITG $\beta$ 1 については、コントロールである PLO および CS-C 基質上だけでなく、CS-D 基質上の神経突起伸長も、*isotype ctrl* と比較して  $\alpha$ -ITG $\beta$ 1 の添加による影響が認められなかった (Fig. 2-3 C, D)。対照的に ITG $\beta$ 3 については、PLO および CS-C 基質上における神経突起伸長は *cyclo* の添加による影響が認められなかったが、CS-D による神経突起伸長の促進は *cyclo* の濃度依存的に有意に抑制された (Fig. 2-3 E, F)。これらのことから、CS-D による神経突起伸長の促進は主に ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 を介すると考えられ、ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 が神経突起伸長を促進する CS-D 受容体として機能する ITG である可能性が強く示唆された。

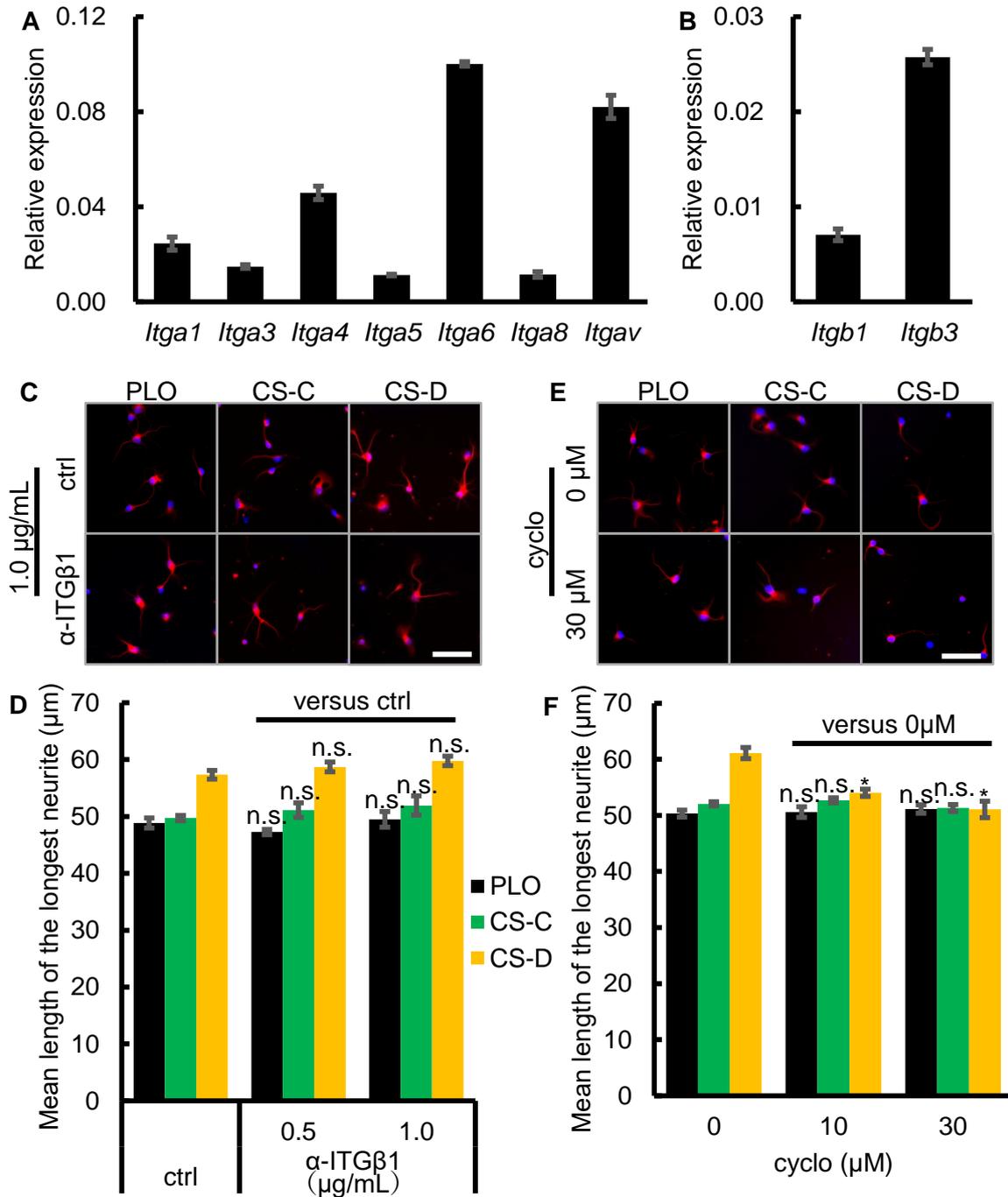


Fig. 2-3 ITG の機能阻害による CS-D の神経突起伸長促進作用への影響

**A, B.** 胎生 16 日齢マウスの海馬片における神経細胞分化に関与する主要な ITG を構成する  $\alpha$  鎖 (A) または  $\beta$  鎖 (B) の mRNA 発現量。海馬片から total RNA を抽出し、DNase 処理したものを鋳型として cDNA を合成し、この cDNA を鋳型として Real-time PCR 法により定量した。(n=3)

**C-F.** ITG の機能阻害を用いた CS-D における神経突起伸長促進作用の解析。CS-C または CS-D をコートした基質上に海馬神経細胞を播種し、その 2 時間後に  $\alpha$ -ITG $\beta$ 1 (C, D) または cyclo (E, F) を添加し、合計で 24 時間となるように培養した。その後は Fig. 2-2-2 の解析と同様に行った。C, E. スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。D, F. n=5 ; \*, p < 0.01 ; n.s. not significant。D. 対 ctrl。F. 対 0  $\mu$ M。

### 3-3. CS-D は ITGαVβ3 と親和性を示す

前項の結果を受けて、ITGαVβ3 の CS-D 受容体としての妥当性を検証するために、ITGαVβ3 と CS-D との親和性を、表面プラズモン共鳴法を利用した分子間相互作用解析装置である BIAcore を用いて解析した。リガンドである組換え ITGαVβ3 にアナライトである CS-C または CS-D を相互作用させた結果、コントロールである CS-C と比べて CS-D においては、ITGαVβ3 との相互作用により結合親和性を示すセンサグラムが得られた。また、得られたセンサグラムから算出した CS-D と ITGαVβ3 との結合に対する解離定数 KD は 1.103 μM であった (Fig. 2-4)。この解離定数 KD が糖鎖と結合性を有するタンパク質であるレクチンと同程度であること(112,113)から、CS-D は ITGαVβ3 と親和性を示す、すなわち CS-D が ITGαVβ3 のリガンドとして振る舞うことが明らかとなった。

以上のことから、CS-D による神経突起伸長の促進は、神経細胞表面に発現する ITGαVβ3 が CS-D の受容体として機能し、FAK-Src/Fyn 経路の活性化を介して発現すると考えられた。

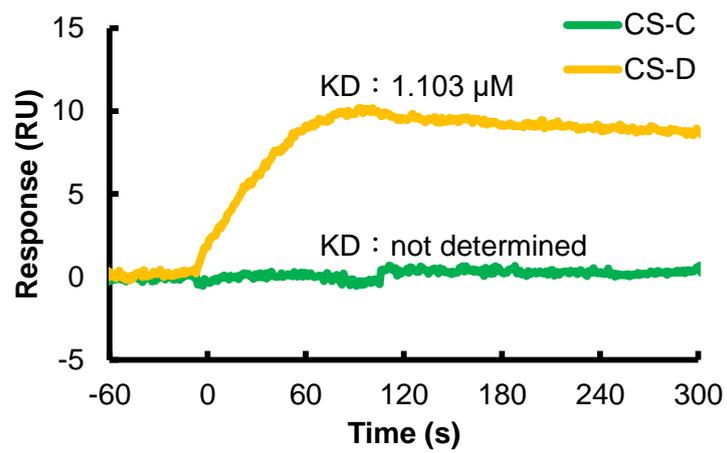


Fig. 2-4 BIAcore X100 による CS 鎖と ITGαVβ3 の相互作用解析  
リガンドである組換え ITGαVβ3 にアナライトである CS-C または CS-D を相互作用させ、ITGαVβ3 と CS-D との親和性を解析した。RU : Resonance Unit, KD : 解離定数。

### 3-4. 神経細胞の表面に発現する ITGαVβ3 は CS-E の受容体としても機能する

興味深いことに、CS-D とは異なる硫酸化パターンを有する高硫酸化 CS である CS-E は、今回の解析から CS-D 受容体として見出した ITGαVβ3 と結合することにより、破骨細胞分化を抑制することが報告されている(41)。このことから、破骨細胞の表面に発現する ITGαVβ3 は CS-E 受容体として機能する可能性が示唆される。したがって、神経細胞の表面に発現する ITGαVβ3 は、CS-D のみならず、CS-E の受容体としても機能しうると考えられた。

そこで、海馬神経細胞において ITGαVβ3 の CS-E 受容体としての妥当性を検証するために、前述の方法と同様に、まず ITG のシグナルである FAK-Src/Fyn を阻害することにより、CS-E による神経突起伸長への FAK-Src/Fyn の関与を検証した。その結果、コントロールである PLO および CS-A 基質上における神経突起伸長は、FAK を阻害する Genistein の添加による影響が認められなかった一方で、CS-E による神経突起伸長の促進は有意に抑制された (Fig. 2-5 A)。また、ネガティブコントロールである PP3 と比較して、PLO および CS-A 基質上における神経突起伸長は Src/Fyn を含むチロシンキナーゼ阻害剤である PP2 の添加によって変化が認められなかったが、CS-E による神経突起伸長の促進は有意に抑制された (Fig. 2-5 B)。これらの結果から、CS-E による神経突起伸長の促進は、CS-D と同様に ITG シグナルである FAK-Src/Fyn の活性化を介することが明らかとなった。

次に、ITGαVβ3 の CS-E による神経突起伸長への関与を検証するために、ITGαVβ3 に特異的な阻害ペプチドである cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) を用いて、ITGαVβ3 の機能阻害を試みた。その結果、PLO および CS-A 基質上における神経突起伸長は cyclo の添加による影響が認められなかったが、CS-E による神経突起伸長の促進は有意に抑制された (Fig. 2-5 C)。よって、CS-E による神経突起伸長に ITGαVβ3 が関与することが明らかとなった。また前述したように、CS-E は *in vitro* において ITGαVβ3 と結合することが報告されている(41)。以上のことから、ITGαVβ3 は神経突起伸長を促進する CS-D 受容体としてのみならず、CS-E 受容体としても機能する可能性が強く示唆された。

ITG シグナルである FAK-Src/Fyn は ITGαVβ3 以外の ITG によっても活性化されるため、CS-E による神経突起伸長の促進に ITGαVβ3 以外の ITG が関与する可能性も考えられた。そこで、ITGαVβ3 以外の主要な ITG の構成サブユニットである ITGβ1 に着目し、その中和抗体である α-ITGβ1 により ITGβ1 の機能を阻害し、CS-E の ITGαVβ3 に対する特異性を検討した。

その結果、PLO および CS-A 基質上における神経突起伸長は isotype ctrl と比較して  $\alpha$ -ITG $\beta$ 1 の添加による影響が認められなかったが、CS-E による神経突起伸長の促進は有意に抑制された (Fig. 2-5 D)。以上のことから、CS-E は ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 のみならず、ITG $\beta$ 1 を含む特定の ITG 分子種のリガンドとしても機能すると考えられた。

これまでの結果をまとめると、高硫酸化 CS である CS-D および CS-E 基質上で誘導促進される固有の神経突起の伸長は、それぞれ異なる ITG 分子種が固有の CS 受容体として機能することに起因する可能性が示唆された。

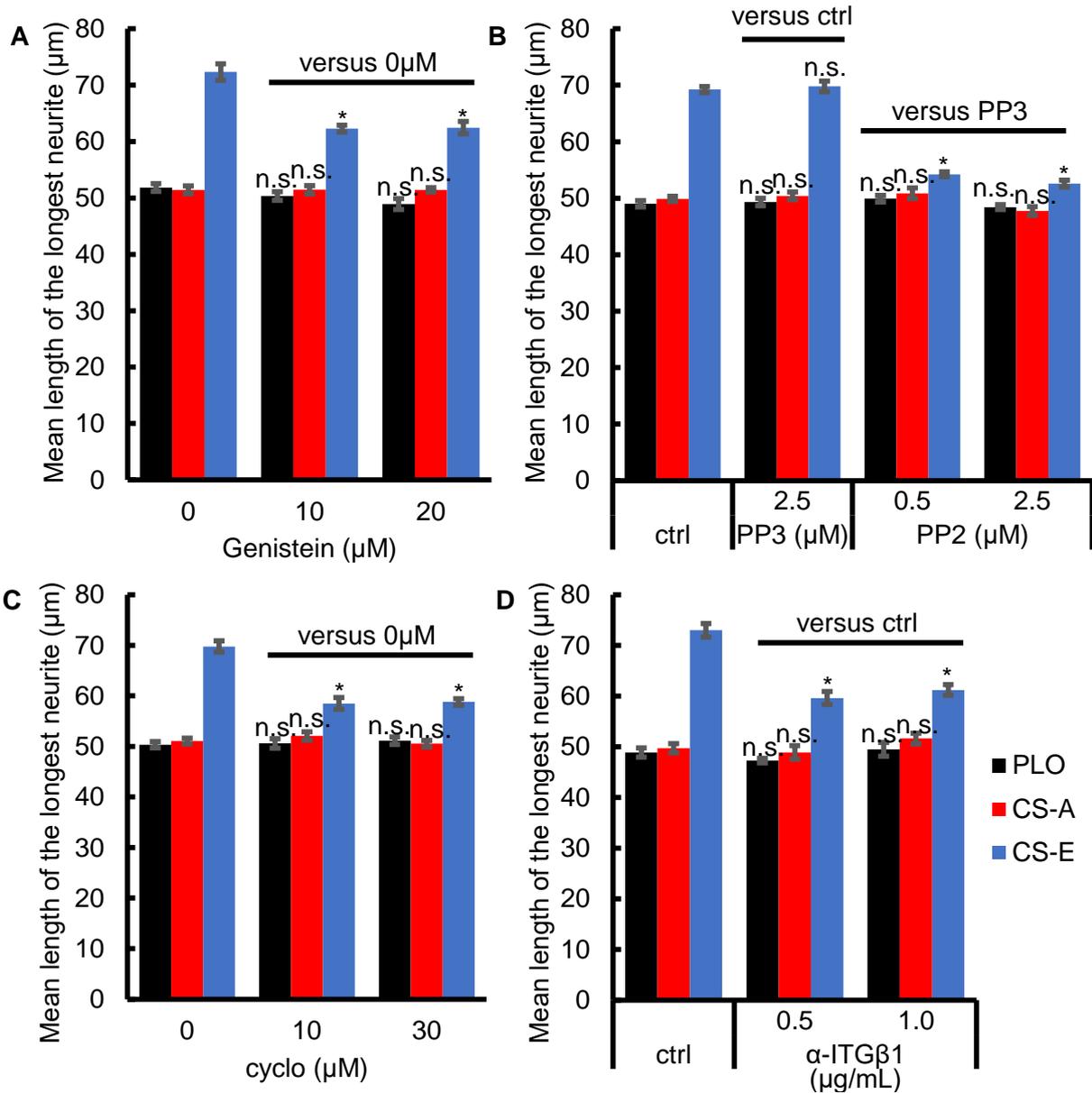


Fig. 2-5 ITG のシグナルまたは機能の阻害による CS-E の神経突起伸長促進作用への影響 PLO コート上に CS-A または CS-E (5  $\mu$ g/ml) をコートした基質上に、海馬神経細胞を播種した。ITG のシグナル阻害 (A, B) は Fig. 2-2-2、ITG の機能阻害 (C, D) は Fig. 2-3 と同様に解析した。n=5 ; \*, p<0.01 ; n.s. not significant。 A, C. 対 0  $\mu$ M。 B. PP3 は対 ctrl、PP2 は対 PP3。 D. 対 ctrl。

## 第4節 考察

D unit を多量に含有する高硫酸化 CS である CS-D は、海馬神経細胞において樹状突起様の神経突起の形成を促進する。さらに CS-D 基質上では海馬神経細胞の接着性が亢進する様子が観察される(47)。また、神経細胞の細胞膜表面に発現し、細胞外マトリックス成分と強い接着性をもつ分子である ITG が、CS 受容体として機能する可能性も示唆されていた(104,105)。これらのことから著者は、特定の ITG が CS-D の受容体として機能することにより樹状突起様の神経突起形成を促進すると期待し、この検証を行った。その結果、CS-D による神経突起形成の促進は、神経細胞表面に発現する ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 が CS-D に対する促進性 CS 受容体として機能し、FAK-Src/Fyn 経路の活性化を介して発現されると考えられた。よって、これらの知見は ITG が神経細胞に発現する CS 受容体として機能することを直接的に示した最初の例である。

では実際に *in vivo* においても、神経細胞表面に発現する ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 が CS-D に対する促進性 CS 受容体として機能しうるのだろうか。CNS 領域の中で解析が比較的進んでいる大脳皮質に焦点を当てると、ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 が層形成に必要な不可欠であることが報告されている(97)。また所属研究室では、生後発達期の大脳皮質において D unit が CS 鎖全体のおおむね 2%存在することを明らかにしている(16)。ここで D unit [GlcA (2-O-sulfate) -GalNAc (6-O-sulfate)] の生合成は、C unit [GlcA-GalNAc (6-O-sulfate)] を基質として、GlcA 残基の 2 位に硫酸基を転移する CSST である UST が担う。興味深いことに、大脳皮質の神経細胞において UST のノックダウンにより D unit の発現量を低下させると、層形成に必要な不可欠な神経細胞の移動が抑制されることが報告されている(114)。これらのことから、神経細胞表面に発現する ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 が CS-D に対する促進性 CS 受容体として機能し、大脳皮質の層形成を制御する可能性がある。

今回の解析で用いた海馬においては、緒言でも述べたように、ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 が海馬神経細胞の樹状突起スパインの機能維持に関与することが報告されている(98,99)。さらに、CSPG が樹状突起スパインやシナプスの安定化に寄与することが報告されている(115)。また所属研究室ではこれまでに、UST の発現が、成体期において神経細胞が新生および再生しうる領域である海馬・嗅球などに限局していることも報告している(116)。よって、海馬においては脳の他の領域に比べ CS-D が相対的に多く存在すると考えられ、CS-D が ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 を介して樹状突起スパインやシナプスの安定化に寄与する可能性がある。海馬神経細胞の樹状突起スパインの機能維持は、海馬の高次機能である認知や記憶の機能維持に寄与する(117,118)ことから、*in vivo* において海馬に分布する CS-D が認知や記憶の機能維持に積極的に寄与するかもしれない。

しかし、D unit を含む機能的な CS 鎖においては、脳の領域別発現プロファイルの全体像が濃霧に包まれている。この最大の原因は、存在量の少ない CS-D の検出が比較的困難であるためである。したがって、マイクロダイセクションなどを駆使することで、脳の領域ごとに CS-D の発現量を比較し、CS-D の主要な存在領域を同定することが重要である。一方で、CS-D を認識しうる抗 CS 抗体として、CS56 抗体や MO-225(119,120)が報告されているが、いずれも D unit のみを特異的に認識する抗体とは言い難い。したがって、現状を打開するために、選択性や感度がより高い抗 CS-D 抗体の作出が急がれる。あるいは、UST や、D unit の前駆体である C unit を生合成する CSST である C6ST-1 のトランスジェニックマウスなど、D unit の割合が相対的に増加したマウスの脳を解析することで、*in vivo* における CS-D の機能に迫れるかもしれない。

今回の解析から著者は、ITGαVβ3-FAK-Src/Fyn 経路の活性化を介した神経突起伸長の促進において、CS-D のみならず CS-E も ITGαVβ3 に対するリガンドとして機能することを見出した。これまでに ITGαVβ3 に対するリガンドは、CS-D および CS-E 以外にも、細胞周囲でビトロネクチンを始めとする CS 鎖と共存するタンパク質分子が複数報告されている(121)。しかし興味深いことに神経細胞は他の細胞と比べて、周囲の微小環境に CSPG が多く含まれているため(50)、神経細胞においては CS 鎖である CS-D や CS-E が ITGαVβ3 に対するリガンドとして機能する可能性を考えた。したがって、細胞周囲の微小環境を構成する D unit や E unit を含む機能的 CS 鎖の発現分布が、神経細胞上の ITGαVβ3 を介した神経突起伸長の制御を担っているのかもしれない。

これまでに破骨細胞においては、リガンドであるビトロネクチンなどが ITGαVβ3 と結合し、神経細胞と同様の FAK-Src/Fyn 経路を活性化することにより分化を促進することが報告されている(122)。一方で近年、細胞周囲に過剰に存在する CS-E が、細胞周囲で共存するビトロネクチンなどと、ITGαVβ3 との結合を競合的に阻害することにより、破骨細胞分化を抑制すると報告された(41)。したがって、神経細胞以外の細胞における ITGαVβ3 の機能発現は、細胞周囲の微小環境を構成するビトロネクチンなどの発現分布のみならず、E unit を含む機能的 CS 鎖の発現分布にも依存するように思われる。

ITG シグナルが活性化されると、成長円錐におけるアクチンの脆弱性が誘発されることにより、神経突起伸長が促進される。一方で、CS-E は、第1章で詳述したように、CS 受容体のリガンドとしてだけでなく、BDNF を始めとするサイトカインのリザーバーとしても機能する。したがって、CS-E は、BDNF のリザーバーとして BDNF の神経突起伸長活性を増強するのみならず、自らが ITG のリガンドとして神経細胞の有する神経突起伸長ポテンシャルを上昇させることにより、相乗的に BDNF の神経突起伸長活性を増強する可能性が示唆された。

また、本章において著者は ITG $\alpha$ V $\beta$ 3 のみならず、ITG $\beta$ 1 を含む特定の ITG 分子種が CS-E の促進性 CS 受容体として機能する可能性も見出した。以上のことから、高硫酸化 CS である CS-D および CS-E 基質上で誘導促進される固有の神経突起の伸長は、それぞれ異なる ITG 分子種が固有の CS 受容体として機能することに起因する可能性が示唆された。また、これまでに、所属研究室では CS-E の受容体として CNTN-1 を同定している (11)。よって、CS 鎖に依存的な生命現象が生じる微小環境は、時空間的に CS 鎖の構造多様性および CS 受容体の多彩な組み合わせが絶妙に調和されることにより、織り成されると考えられた。

第5節 小括

・海馬神経細胞において **CS-D** および **CS-E** による神経突起伸長の促進はいずれも **ITG** シグナルである **FAK- Src/Fyn** の活性化に起因した。

・海馬神経細胞において **CS-D** および **CS-E** による神経突起伸長の促進はいずれも **ITGαVβ3** を介した。

・ **ITGαVβ3** は **CS-D** と結合親和性を示した。

・海馬神経細胞において **CS-D** による神経突起伸長の促進は **ITGβ1** を介さなかった。

・海馬神経細胞において **CS-E** による神経突起伸長の促進は **ITGβ1** を介した。



## 総括

高硫酸化 **CS** は海馬神経細胞に対して顕著な神経突起伸長促進作用を示すことが見出されているため、**CNS** 疾患領域において、高硫酸化 **CS** の医療応用に多大なる期待が寄せられている。そこで著者は、**CS** 鎖の生理機能発現における分子機構モデルとして提唱されている「サイトカインのリザーバー」および「**CS** 受容体のリガンド」の2つに着目し、**CNS** における高硫酸化 **CS** の神経突起伸長促進活性の分子機構を追究した。

前者においては、合成オリゴ糖である **FCS-tri** を利用した解析から、神経突起伸長活性を有する **CS-E** 四糖のアナログとして **FCS-tri** の有用性を見出した。よって、**FCS-tri** の構造と生理活性との相関は **CS** 鎖の多彩な機能の発現機構を包括的に理解する一助となる。

後者においては、神経系における **CS-D** および **CS-E** に対する新規の促進性 **CS** 受容体として **ITG $\alpha$ V $\beta$ 3** を同定したのみならず、**ITG $\beta$ 1** を含む特定の **ITG** 分子種が **CS-E** に対する促進性 **CS** 受容体として機能する可能性も見出した。よって、**CS** 鎖に依存的な生命現象が生じる微小環境は、時空間的に **CS** 鎖の構造多様性および **CS** 受容体の多彩な組み合わせが絶妙に調和されることにより、織り成されると考えられた。

これらの知見により、**CNS** における高硫酸化 **CS** の医療応用の実現に向けて、一歩前進した。また、本研究は高硫酸化 **CS** の神経突起伸長促進活性のみならず、**CS** 鎖の多彩な機能を包括的に理解するための分子基盤を探る一助となった。

## 謝辞

## 謝辞

本論文は、著者が神戸薬科大学大学院薬学研究科の博士課程在籍中に得た研究成果を博士論文としてまとめたものです。

本研究の遂行に際しまして、恩師、北川 裕之教授には実施の機会およびご指導、ご鞭撻を賜りました。また、三上 雅久講師には直接ご懇篤なるご指導を賜りました。よって、ここに衷心より深謝の意を表します。

第 1 章の研究に際しまして、*A. japonicus* 由来 FCS および化学合成した CS オリゴ糖をご恵与頂きました鳥取大学の田村 純一教授に厚く感謝いたします。

本論文の審査に際しまして、種々の有益なご助言、ご指導を賜りました主査の微生物化学講座 小西 守周教授、副査の医療薬学講座 力武 良行教授、衛生化学講座 長谷川 潤教授に深く感謝いたします。

最後に、平成 28 年度からの 2 年間にわたり公益社団法人 日本薬学会長井記念薬学研究奨励金のご援助を賜りましたので、ここに深謝の意を表します。

## 参考文献

1. Varki, A. (2017) Biological roles of glycans. *Glycobiology* **27**, 3-49
2. Freeze, H. H., Chong, J. X., Bamshad, M. J., and Ng, B. G. (2014) Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. *The American Journal of Human Genetics* **94**, 161-175
3. Freeze, H. H. (2013) Understanding human glycosylation disorders: biochemistry leads the charge. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 6936-6945
4. Sasarman, F., Maftai, C., Campeau, P. M., Brunel-Guitton, C., Mitchell, G. A., and Allard, P. (2016) Biosynthesis of glycosaminoglycans: associated disorders and biochemical tests. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **39**, 173-188
5. Pinho, S. S., and Reis, C. A. (2015) Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer* **15**, 540
6. Freeze, H. H., Eklund, E. A., Ng, B. G., and Patterson, M. C. (2015) Neurological aspects of human glycosylation disorders. *Annual Review of Neuroscience* **38**, 105-125
7. Moremen, K. W., Tiemeyer, M., and Nairn, A. V. (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 448
8. Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2000) Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 518-527
9. Uyama, T., Kitagawa, H., and Sugahara, K. (2007) Biosynthesis of glycosaminoglycans and proteoglycans. in *Comprehensive Glycoscience* (Kamerling, J. P. ed.), Elsevier, Amsterdam. pp 79-104
10. Mizuguchi, S., Uyama, T., Kitagawa, H., Nomura, K. H., Dejima, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Sugahara, K., and Nomura, K. (2003) Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **423**, 443
11. Mikami, T., Yasunaga, D., and Kitagawa, H. (2009) Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 4494-4499
12. Izumikawa, T., Kanagawa, N., Watamoto, Y., Okada, M., Saeki, M., Sakano, M., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M., and Kitagawa, H. (2010) Impairment of embryonic cell division and glycosaminoglycan biosynthesis in glucuronyltransferase-I-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 12190-12196
13. Nadanaka, S., Kinouchi, H., Taniguchi-Morita, K., Tamura, J., and Kitagawa, H. (2011) Down-regulation of chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 by Wnt signaling triggers diffusion of Wnt-3a. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 4199-4208
14. Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J., and Kitagawa, H. (2012) Chondroitin sulfate-E fine-tunes osteoblast differentiation via ERK1/2, Smad3 and Smad1/5/8 signaling by binding to N-cadherin and cadherin-11. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **420**, 523-529
15. Mikami, T., Koyama, S., Yabuta, Y., and Kitagawa, H. (2012) Chondroitin sulfate is a crucial

- determinant for skeletal muscle development/regeneration and improvement of muscular dystrophies. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 38531-38542
16. Miyata, S., Komatsu, Y., Yoshimura, Y., Taya, C., and Kitagawa, H. (2012) Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nature Neuroscience* **15**, 414-422
  17. Mizumoto, S., Ikegawa, S., and Sugahara, K. (2013) Human genetic disorders caused by mutations in genes encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 10953-10961
  18. Takeuchi, K., Yoshioka, N., Onaga, S. H., Watanabe, Y., Miyata, S., Wada, Y., Kudo, C., Okada, M., Ohko, K., Oda, K., Sato, T., Yokoyama, M., Matsushita, N., Nakamura, M., Okano, H., Sakimura, K., Kawano, H., Kitagawa, H., and Igarashi, M. (2013) Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nature Communications* **4**, 2740
  19. Izumikawa, T., Sato, B., and Kitagawa, H. (2014) Chondroitin sulfate is indispensable for pluripotency and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Scientific Reports* **4**, 3701
  20. Kitagawa, H. (2014) Using sugar remodeling to study chondroitin sulfate function. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **37**, 1705-1712
  21. Koike, T., Mikami, T., Shida, M., Habuchi, O., and Kitagawa, H. (2015) Chondroitin sulfate-E mediates estrogen-induced osteoanabolism. *Scientific Reports* **5**, 8994
  22. Miyata, S., and Kitagawa, H. (2016) Chondroitin sulfate and neuronal disorders. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)* **21**, 1330-1340
  23. Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013) Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1830**, 4719-4733
  24. Raman, R., Raguram, S., Venkataraman, G., Paulson, J. C., and Sasisekharan, R. (2005) Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nature Methods* **2**, 817-824
  25. Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., and Kitagawa, H. (2003) Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 612-620
  26. Silbert, J. E., and Sugumaran, G. (2002) Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB Life* **54**, 177-186
  27. Kusche-Gullberg, M., and Kjellén, L. (2003) Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 605-611
  28. Kitagawa, H., Kano, Y., Shimakawa, H., Goto, F., Ogawa, T., Okabe, H., and Sugahara, K. (1999) Identification and characterization of a novel UDP-GalNAc: GlcA $\beta$ -R  $\alpha$ 1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase from a human sarcoma cell line. *Glycobiology* **9**, 697-703
  29. Uyama, T., Ishida, M., Izumikawa, T., Trybala, E., Tufaro, F., Bergström, T., Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2006) Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates E disaccharide expression of chondroitin sulfate required for herpes simplex virus infectivity. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 38668-38674

30. Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ikegami-Kuzuhara, A., Nadanaka, S., Goto, F., Ogawa, T., and Sugahara, K. (2008) Sulfation of the galactose residues in the glycosaminoglycan-protein linkage region by recombinant human chondroitin 6-O-sulfotransferase-1. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 27438-27443
31. Tone, Y., Pedersen, L. C., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara, J., Tamura, J., Negishi, M., and Sugahara, K. (2008) 2-o-phosphorylation of xylose and 6-o-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 16801-16807
32. Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J., and Kitagawa, H. (2009) FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region. *Biochemical Journal* **421**, 157-162
33. Anggraeni, V. Y., Emoto, N., Yagi, K., Mayasari, D. S., Nakayama, K., Izumikawa, T., Kitagawa, H., and Hirata, K.-i. (2011) Correlation of C4ST-1 and ChGn-2 expression with chondroitin sulfate chain elongation in atherosclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **406**, 36-41
34. Izumikawa, T., Okuura, Y., Koike, T., Sakoda, N., and Kitagawa, H. (2011) Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates the chain length of chondroitin sulfate in co-operation with chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-2. *Biochemical Journal* **434**, 321-331
35. Nakagawa, N., Izumikawa, T., Kitagawa, H., and Oka, S. (2011) Sulfation of glucuronic acid in the linkage tetrasaccharide by HNK-1 sulfotransferase is an inhibitory signal for the expression of a chondroitin sulfate chain on thrombomodulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **415**, 109-113
36. Izumikawa, T., Koike, T., and Kitagawa, H. (2012) Chondroitin 4-O-sulfotransferase-2 regulates the number of chondroitin sulfate chains initiated by chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1. *Biochemical Journal* **441**, 697-705
37. Nadanaka, S., Kagiya, S., and Kitagawa, H. (2013) Roles of EXTL2, a member of the EXT family of tumour suppressors, in liver injury and regeneration processes. *Biochemical Journal* **454**, 133-145
38. Izumikawa, T., Sato, B., Mikami, T., Tamura, J., Igarashi, M., and Kitagawa, H. (2015) GlcUA $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl (2-O-phosphate) is the preferred substrate for chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 5438-5448
39. Izumikawa, T., Dejima, K., Watamoto, Y., Nomura, K. H., Kanaki, N., Rikitake, M., Tou, M., Murata, D., Yanagita, E., Kano, A., Mitani, S., Nomura, K., and Kitagawa, H. (2016) Chondroitin 4-O-sulfotransferase is indispensable for sulfation of chondroitin and plays an important role in maintaining normal life span and oxidative stress responses in nematodes. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 23294-23304
40. Kawamura, D., Funakoshi, T., Mizumoto, S., Sugahara, K., and Iwasaki, N. (2014) Sulfation patterns of exogenous chondroitin sulfate affect chondrogenic differentiation of ATDC5 cells.

- Journal of Orthopaedic Science* **19**, 1028-1035
41. Miyazaki, T., Miyauchi, S., Anada, T., Tawada, A., and Suzuki, O. (2015) Chondroitin Sulfate - E Binds to Both Osteoactivin and Integrin  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  and Inhibits Osteoclast Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* **116**, 2247-2257
  42. Willis, C. M., and Klüppel, M. (2014) Chondroitin sulfate-E is a negative regulator of a pro-tumorigenic Wnt/beta-catenin-Collagen 1 axis in breast cancer cells. *PLOS ONE* **9**, e103966
  43. Suzuki, K., Arumugam, S., Yokoyama, J., Kawauchi, Y., Honda, Y., Sato, H., Aoyagi, Y., Terai, S., Okazaki, K., and Suzuki, Y. (2016) Pivotal role of carbohydrate sulfotransferase 15 in fibrosis and mucosal healing in mouse colitis. *PLOS ONE* **11**, e0158967
  44. Habuchi, H., Ushida, T., and Habuchi, O. (2016) Mice deficient in N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase exhibit enhanced liver fibrosis and delayed recovery from fibrosis in carbon tetrachloride-treated mice. *Heliyon* **2**, e00138
  45. Nadanaka, S., Clement, A., Masayama, K., Faissner, A., and Sugahara, K. (1998) Characteristic hexasaccharide sequences in octasaccharides derived from shark cartilage chondroitin sulfate D with a neurite outgrowth promoting activity. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 3296-3307
  46. Clement, A. M., Sugahara, K., and Faissner, A. (1999) Chondroitin sulfate E promotes neurite outgrowth of rat embryonic day 18 hippocampal neurons. *Neuroscience Letters* **269**, 125-128
  47. Hikino, M., Mikami, T., Faissner, A., Vilela-Silva, A.-C. E. S., Pavão, M. S. G., and Sugahara, K. (2003) Oversulfated Dermatan Sulfate Exhibits Neurite Outgrowth-promoting Activity toward Embryonic Mouse Hippocampal Neurons IMPLICATIONS OF DERMATAN SULFATE IN NEURITOGENESIS IN THE BRAIN. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 43744-43754
  48. Silver, J., and Miller, J. H. (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience* **5**, 146-156
  49. Fawcett, J. W. (2015) The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease. *Progress in Brain Research* **218**, 213-226
  50. Miller, G. M., and Hsieh-Wilson, L. C. (2015) Sugar-dependent modulation of neuronal development, regeneration, and plasticity by chondroitin sulfate proteoglycans. *Experimental Neurology* **274**, 115-125
  51. Purushothaman, A., Sugahara, K., and Faissner, A. (2012) Chondroitin sulfate “wobble motifs” modulate maintenance and differentiation of neural stem cells and their progeny. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 2935-2942
  52. Sugahara, K., and Mikami, T. (2007) Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 536-545
  53. Nandini, C. D., Mikami, T., Ohta, M., Itoh, N., Akiyama-Nambu, F., and Sugahara, K. (2004) Structural and functional characterization of oversulfated chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from the notochord of hagfish neuritogenic and binding activities for growth factors and neurotrophic factors. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 50799-50809
  54. Gama, C. I., Tully, S. E., Sotogaku, N., Clark, P. M., Rawat, M., Vaidehi, N., Goddard Iii, W. A.,

- Nishi, A., and Hsieh-Wilson, L. C. (2006) Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity. *Nature Chemical Biology* **2**, 467-473
55. Mourão, P. A. S., Pereira, M. S., Pavão, M. S. G., Mulloy, B., Tollefsen, D. M., Mowinckel, M.-C., and Abildgaard, U. (1996) Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 23973-23984
56. Mourão, P. A. S., Guimarães, M. A. M., Mulloy, B., Thomas, S., and Gray, E. (1998) Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. *British Journal of Haematology* **101**, 647-652
57. Lian, W., Wu, M., Huang, N., Gao, N., Xiao, C., Li, Z., Zhang, Z., Zheng, Y., Peng, W., and Zhao, J. (2013) Anti-HIV-1 activity and structure–activity-relationship study of a fucosylated glycosaminoglycan from an echinoderm by targeting the conserved CD4 induced epitope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1830**, 4681-4691
58. Wu, M., Wen, D., Gao, N., Xiao, C., Yang, L., Xu, L., Lian, W., Peng, W., Jiang, J., and Zhao, J. (2015) Anticoagulant and antithrombotic evaluation of native fucosylated chondroitin sulfates and their derivatives as selective inhibitors of intrinsic factor Xase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **92**, 257-269
59. Liu, X., Liu, Y., Hao, J., Zhao, X., Lang, Y., Fan, F., Cai, C., Li, G., Zhang, L., and Yu, G. (2016) In vivo anti-cancer mechanism of low-molecular-weight fucosylated chondroitin sulfate (LFCS) from sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *Molecules* **21**, 625
60. Vieira, R. P., and Mourão, P. A. S. (1988) Occurrence of a unique fucose-branched chondroitin sulfate in the body wall of a sea cucumber. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 18176-18183
61. Vieira, R. P., Mulloy, B., and Mourão, P. A. S. (1991) Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-beta-D-glucuronosyl residues. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 13530-13536
62. Shida, M., Mikami, T., Tamura, J., and Kitagawa, H. (2017) A characteristic chondroitin sulfate trisaccharide unit with a sulfated fucose branch exhibits neurite outgrowth-promoting activity: Novel biological roles of fucosylated chondroitin sulfates isolated from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **487**, 678-683
63. Shen, Y., Tenney, A. P., Busch, S. A., Horn, K. P., Cuascut, F. X., Liu, K., He, Z., Silver, J., and Flanagan, J. G. (2009) PTP $\sigma$  is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science* **326**, 592-596
64. Fisher, D., Xing, B., Dill, J., Li, H., Hoang, H. H., Zhao, Z., Yang, X.-L., Bachoo, R., Cannon, S., and Longo, F. M. (2011) Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors. *Journal of Neuroscience* **31**, 14051-14066
65. Dickendesh, T. L., Baldwin, K. T., Mironova, Y. A., Koriyama, Y., Raiker, S. J., Askew, K. L.,

- Wood, A., Geoffroy, C. G., Zheng, B., and Liepmann, C. D. (2012) NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nature Neuroscience* **15**, 703-712
66. Lang, B. T., Cregg, J. M., DePaul, M. A., Tran, A. P., Xu, K., Dyck, S. M., Madalena, K. M., Brown, B. P., Weng, Y.-L., and Li, S. (2015) Modulation of the proteoglycan receptor PTP [sgr] promotes recovery after spinal cord injury. *Nature* **518**, 404-408
67. Xu, B., Park, D., Ohtake, Y., Li, H., Hayat, U., Liu, J., Selzer, M. E., Longo, F. M., and Li, S. (2015) Role of CSPG receptor LAR phosphatase in restricting axon regeneration after CNS injury. *Neurobiology of Disease* **73**, 36-48
68. Lee, H. S., Ku, B., Park, T. H., Park, H., Choi, J.-K., Chang, K.-T., Kim, C.-H., Ryu, S. E., and Kim, S. J. (2016) Identification of novel protein tyrosine phosphatase sigma inhibitors promoting neurite extension. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **26**, 87-93
69. Hirokawa, T., Zou, Y., Kurihara, Y., Jiang, Z., Sakakibara, Y., Ito, H., Funakoshi, K., Kawahara, N., Goshima, Y., and Strittmatter, S. M. (2017) Regulation of axonal regeneration by the level of function of the endogenous Nogo receptor antagonist LOTUS. *Scientific Reports* **7**, 12119
70. Kariya, Y., Watabe, S., Hashimoto, K., and Yoshida, K. (1990) Occurrence of chondroitin sulfate E in glycosaminoglycan isolated from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 5081-5085
71. Fonseca, R. J. C., Santos, G. R. C., and Mourão, P. A. S. (2009) Effects of polysaccharides enriched in 2, 4-disulfated fucose units on coagulation, thrombosis and bleeding. *Thrombosis and Haemostasis* **102**, 829-836
72. Ustyuzhanina, N. E., Bilan, M. I., Dmitrenok, A. S., Shashkov, A. S., Kusaykin, M. I., Stonik, V. A., Nifantiev, N. E., and Usov, A. I. (2015) Structure and biological activity of a fucosylated chondroitin sulfate from the sea cucumber *Cucumaria japonica*. *Glycobiology* **26**, 449-459
73. Ustyuzhanina, N. E., Bilan, M. I., Dmitrenok, A. S., Tsvetkova, E. A., Shashkov, A. S., Stonik, V. A., Nifantiev, N. E., and Usov, A. I. (2016) Structural characterization of fucosylated chondroitin sulfates from sea cucumbers *Apostichopus japonicus* and *Actinopyga mauritiana*. *Carbohydrate Polymers* **153**, 399-405
74. Mourão, P. A. S., Vieira, R. P., and Kariya, Y. (1995) Sulfated polysaccharides from echinoderms reveal unique structures and new potential as bioactive polymers. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **7**, 235-246
75. Pavão, M. S. G. (2014) Glycosaminoglycans analogs from marine invertebrates: structure, biological effects, and potential as new therapeutics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**, 123
76. Tamura, J., Tanaka, H., Nakamura, A., and Takeda, N. (2013) Synthesis of  $\beta$ -D-GalNAc (4, 6-diS)(1-4)[ $\alpha$ -L-Fuc (2, 4-diS)(1-3)]- $\beta$ -D-GlcA, a novel trisaccharide unit of chondroitin sulfate with a fucose branch. *Tetrahedron Letters* **54**, 3940-3943
77. Tamura, J., Neumann, K. W., Kurono, S., and Ogawa, T. (1997) Synthetic approach towards sulfated chondroitin di-, tri- and tetrasaccharides corresponding to the repeating unit. *Carbohydrate Research* **305**, 43-63

78. Izumikawa, T., Koike, T., Shiozawa, S., Sugahara, K., Tamura, J., and Kitagawa, H. (2008) Identification of Chondroitin Sulfate Glucuronyltransferase as Chondroitin Synthase-3 Involved in Chondroitin Polymerization CHONDROITIN POLYMERIZATION IS ACHIEVED BY MULTIPLE ENZYME COMPLEXES CONSISTING OF CHONDROITIN SYNTHASE FAMILY MEMBERS. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 11396-11406
79. Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O., and Suzuki, S. (1968) Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *Journal of Biological Chemistry* **243**, 1523-1535
80. Yamada, S., and Sugahara, K. (2003) Preparation of oligosaccharides from sulfated glycosaminoglycans using bacterial enzymes. in *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates. Methods in Molecular Biology™* (Thibault, P., and Honda, S. eds.), Humana Press. pp 71-78
81. Kawashima, H., Atarashi, K., Hirose, M., Hirose, J., Yamada, S., Sugahara, K., and Miyasaka, M. (2002) Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcA $\beta$ 1/IdoA $\alpha$ 1-3GalNAc (4, 6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 12921-12930
82. Kinoshita, A., and Sugahara, K. (1999) Microanalysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide by high-performance liquid chromatography: application to disaccharide composition analysis and exosequencing of oligosaccharides. *Analytical Biochemistry* **269**, 367-378
83. Kariya, Y., Watabe, S., Kyogashima, M., Ishihara, M., and Ishii, T. (1997) Structure of fucose branches in the glycosaminoglycan from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Carbohydrate Research* **297**, 273-279
84. Higashi, K., Takeuchi, Y., Mukuno, A., Tomitori, H., Miya, M., Linhardt, R. J., and Toida, T. (2015) Composition of glycosaminoglycans in elasmobranchs including several deep-sea sharks: identification of chondroitin/dermatan sulfate from the dried fins of *Isurus oxyrinchus* and *Prionace glauca*. *PLoS One* **10**, e0120860
85. Rigato, F., Garwood, J., Calco, V., Heck, N., Faivre-Sarrailh, C., and Faissner, A. (2002) Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced fibronectin type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/contactin. *Journal of Neuroscience* **22**, 6596-6609
86. Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M. D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**, 491-498
87. Hynes, R. O. (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549-554
88. Anderson, L. R., Owens, T. W., and Naylor, M. J. (2014) Structural and mechanical functions of integrins. *Biophysical Reviews* **6**, 203-213
89. Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-1033
90. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Mark, M. T., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., and Ceder, S. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329-335

91. Conroy, K. P., Kitto, L. J., and Henderson, N. C. (2016)  $\alpha$ v integrins: key regulators of tissue fibrosis. *Cell and Tissue Research* **365**, 511-519
92. Clegg, D. O., Wingerd, K. L., Hikita, S. T., and Tolhurst, E. C. (2003) Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Frontiers in Bioscience* **8**, d723-750
93. Denda, S., and Reichardt, L. F. (2007) Studies on integrins in the nervous system. *Methods in Enzymology* **426**, 203-221
94. Wu, X., and Reddy, D. S. (2012) Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacology & Therapeutics* **134**, 68-81
95. Marchetti, G., Escuin, S., Van Der Flier, A., De Arcangelis, A., Hynes, R. O., and Georges - Labouesse, E. (2010) Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 is necessary for regulation of radial migration of cortical neurons during mouse brain development. *European Journal of Neuroscience* **31**, 399-409
96. Sekine, K., Kawauchi, T., Kubo, K.-i., Honda, T., Herz, J., Hattori, M., Kinashi, T., and Nakajima, K. (2012) Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. *Neuron* **76**, 353-369
97. Anton, E. S., Kreidberg, J. A., and Rakic, P. (1999) Distinct functions of  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ v integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* **22**, 277-289
98. Cingolani, L. A., Thalhammer, A., Lily, M. Y., Catalano, M., Ramos, T., Colicos, M. A., and Goda, Y. (2008) Activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor composition and abundance by  $\beta$ 3 integrins. *Neuron* **58**, 749-762
99. Pozo, K., Cingolani, L. A., Bassani, S., Laurent, F., Passafaro, M., and Goda, Y. (2012)  $\beta$ 3 integrin interacts directly with GluA2 AMPA receptor subunit and regulates AMPA receptor expression in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 1323-1328
100. Nishimura, K., Doi, D., Samata, B., Murayama, S., Tahara, T., Onoe, H., and Takahashi, J. (2016) Estradiol facilitates functional integration of iPSC-derived dopaminergic neurons into striatal neuronal circuits via activation of integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. *Stem Cell Reports* **6**, 511-524
101. Izumi, Y., Wakita, S., Kanbara, C., Nakai, T., Akaike, A., and Kume, T. (2017) Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 expression on dopaminergic neurons is involved in dopaminergic neurite outgrowth on striatal neurons. *Scientific Reports* **7**, 42111
102. Iida, J., Meijne, A. M. L., Oegema, T. R., Yednock, T. A., Kovach, N. L., Furcht, L. T., and McCarthy, J. B. (1998) A role of chondroitin sulfate glycosaminoglycan binding site in  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin-mediated melanoma cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 5955-5962
103. Yang, J., Price, M. A., Neudauer, C. L., Wilson, C., Ferrone, S., Xia, H., Iida, J., Simpson, M. A., and McCarthy, J. B. (2004) Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *The Journal of Cell Biology* **165**, 881-891
104. Tan, C. L., Kwok, J. C. F., Patani, R., Chandran, S., and Fawcett, J. W. (2011) Integrin activation promotes axon growth on inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans by enhancing integrin

- signaling. *Journal of Neuroscience* **31**, 6289-6295
105. Nishimura, K., Ishii, M., Kuraoka, M., Kamimura, K., and Maeda, N. (2010) Opposing functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate during early neuronal polarization. *Neuroscience* **169**, 1535-1547
  106. Beggs, H. E., Schahin-Reed, D., Zang, K., Goebbels, S., Nave, K.-A., Gorski, J., Jones, K. R., Sretavan, D., and Reichardt, L. F. (2003) FAK deficiency in cells contributing to the basal lamina results in cortical abnormalities resembling congenital muscular dystrophies. *Neuron* **40**, 501-514
  107. Robles, E., and Gomez, T. M. (2006) Focal adhesion kinase signaling at sites of integrin-mediated adhesion controls axon pathfinding. *Nature Neuroscience* **9**, 1274-1283
  108. Lowell, C. A., and Soriano, P. (1996) Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes & Development* **10**, 1845-1857
  109. Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O'Brien, P., and Cooper, J. A. (2005) Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. *Journal of Neuroscience* **25**, 8578-8586
  110. De Arcangelis, A., and Georges-Labouesse, E. (2000) Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends in Genetics* **16**, 389-395
  111. Schmid, R. S., and Anton, E. S. (2003) Role of integrins in the development of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex* **13**, 219-224
  112. Nicholson, M. W., Barclay, A. N., Singer, M. S., Rosen, S. D., and van der Merwe, P. A. (1998) Affinity and kinetic analysis of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent cell-adhesion molecule-1. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 763-770
  113. Rabinovich, G. A., Toscano, M. A., Jackson, S. S., and Vasta, G. R. (2007) Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 513-520
  114. Ishii, M., and Maeda, N. (2008) Oversulfated chondroitin sulfate plays critical roles in the neuronal migration in the cerebral cortex. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 32610-32620
  115. Dityatev, A., and Schachner, M. (2003) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 456-468
  116. Mitsunaga, C., Mikami, T., Mizumoto, S., Fukuda, J., and Sugahara, K. (2006) Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate Hybrid Chains in the Development of Cerebellum SPATIOTEMPORAL REGULATION OF THE EXPRESSION OF CRITICAL DISULFATED DISACCHARIDES BY SPECIFIC SULFOTRANSFERASES. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 18942-18952
  117. Koleske, A. J. (2013) Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nature Reviews Neuroscience* **14**, 536-550
  118. Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., and Nakahara, H. (2003) Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences* **26**, 360-368
  119. Yamagata, M., Kimata, K., Oike, Y., Tani, K., Maeda, N., Yoshida, K., Shimomura, Y., Yoneda, M., and Suzuki, S. (1987) A monoclonal antibody that specifically recognizes a glucuronic acid 2-sulfate-containing determinant in intact chondroitin sulfate chain. *Journal of Biological*

## 参考文献

- Chemistry* **262**, 4146-4152
120. Deepa, S. S., Kalayanamitra, K., Ito, Y., Kongtawelert, P., Fukui, S., Yamada, S., Mikami, T., and Sugahara, K. (2007) Novel sulfated octa-and decasaccharides from squid cartilage chondroitin sulfate E: sequencing and application for determination of the epitope structure of the monoclonal antibody MO-225. *Biochemistry* **46**, 2453-2465
121. Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007) The integrins. *Genome Biology* **8**, 215
122. Duong, L. T., Lakkakorpi, P., Nakamura, I., and Rodan, G. A. (2000) Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biology* **19**, 97-105