

コンドロイチン硫酸由来のオリゴ糖ネオグライコリピドを用いての サイトカイン，ケモカイン，HGF，FGF-7の結合解析

玉 置 広 寿
福 井 成 行

はじめに

プロテオグリカン (PG) はコアタンパク質に1本あるいは数本のグリコサミノグリカン鎖 (glycosaminoglycan, GAG) が共有結合したもので，細胞膜の普遍的な構成成分であるとともに細胞外基質の重要な構成成分ともなっている．PGに認められる通常のGAGには，コンドロイチン硫酸AおよびC (chondroitin sulfate A and C, CSA and CSC)，コンドロイチン硫酸B (CSB) ととも呼ばれるデルマトン硫酸 (dermatan sulfate, DS)，ヘパラン硫酸 (heparan sulfate, HS)，ケラト硫酸 (keratan sulfate, KS) が知られている．

GAGの示す高い硫酸基とカルボキシル基含量のために，PGは生体構成成分の中で最も負に荷電した成分の一つであり，この性質から正に荷電したアミノ酸のクラスターを持ちヘパリン結合性を有する繊維芽細胞増殖因子 (FGF) や肝細胞増殖/分散因子 (HGF/SF) などに代表される様々な増殖因子，免疫応答の発現や調節など細胞間相互作用に関与する生物活性因子であるサイトカインや特定の白血球に対しその濃度勾配の方向に遊走させる因子であるケモカインなどと相互作用することが古くから知られていた．また，血液凝固因子の生理活性阻害物質の一つでヘパリンコファクターとも呼ばれるアンチトロンピンはヘパリンとの結合によって活性化されることは良く知られた事実である^{1,2,3)}．最近，ウロン酸と4位あるいは6位の炭素が硫酸化されたN-アセチルガラクトサミンからなる二糖の繰り返し構造をもつコンドロイチン硫酸やデルマトン硫酸がケモカインのRANTES (Regulation upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted) やPF-4 (platelet factor-4)，サイトカインのインターフェロン- γ (IFN- γ) に結合することが相次いで報告された^{4,5)}．また，ヘパリン結合性の細胞増殖因子である肝細胞増殖/分散因子のHGF/SFや創傷治癒に関わる角質細胞増殖因子のKGF (別名FGF-7) がコンドロイチン硫酸やデルマトン硫酸とも結合して生理活性を示すことも示された^{6,7,8)}．GAGの担う生物学的な役割に興味注がれ，最近の研究では細胞増殖因子，サイトカイン，ケモカイン分子上に認められる塩基性のアミノ酸からなるドメインと結合するGAGの構造上の特徴や生物学的な活性とGAG結合との因果関係を明らかにするためのいくつかの試

みがなされ、ヘパリンやHSについては糖鎖の構造と活性との相関が明らかにされつつある。しかしながら、コンドロイチン硫酸やデルマタン硫酸との相互作用に関しては糖鎖構造との相関には不明な点が多い。また、コンドロイチン硫酸とデルマタン硫酸との間での相対的な結合強度の違いや、コンドロイチン硫酸やデルマタン硫酸がいかにしてリガンドと受容体との結合を制御して生物学的な活性を担うのかについては今後の問題とされている。

生物学的な機能を発揮する糖鎖の大きさは単糖が1～10個程度結合したオリゴ糖の単位と考えられ、オリゴ糖鎖のもつ生物学的な機能をタンパク質との相互作用の面から追求する基本的な方法として糖鎖マイクロアレイを開発した^{9,10)}。糖鎖マイクロアレイは糖タンパク質や糖脂質から酵素や化学的な処理で遊離させた糖鎖、グリコサミノグリカンを部分的に切断した糖鎖の還元末端にSchiff塩基を介して合成ホスファチジルエタノールアミンと結合させるneoglycolipid (NGL) 化技術¹¹⁾を応用したものである。糖鎖のNGL化は反応効率の良さとHPTLCでの高分離能に加えて、NGL化糖鎖はHPTLC後にバンドからの直接の質量分析で糖鎖構造の推定が可能となる利点がある。そこで、疎水性残基の導入によって糖鎖の固相化が可能となると考え支持体やspotの方法などを工夫したものである。考案した糖鎖マイクロアレイは、最近開発され広く用いられているプラズモン共鳴法 (SPR) と比較すると結合様式の解析の面では劣るが、ほとんど全ての種類の糖鎖に応用できることと、糖鎖マイクロアレイ作成に用いられる糖鎖量はごく少量のピコモル単位で糖鎖-タンパク質の相互作用シグナルを検出できること、しかも多種類の糖鎖を同一条件下で比較できるために結合に関わる糖鎖構造の特異性を知ることのできる利点がある。

これまでの糖鎖マイクロアレイの開発に向けての研究から、その過程でコンドロイチン硫酸を認識する抗体 (CS-56と Δ -CS) の抗原決定基糖鎖の構造特異性を明らかにし、ウサギ中枢神経系におけるSSEA-1抗原糖鎖を有する μ チン型糖鎖の発見、細胞接着分子のE-およびL-セレクチンの結合する糖鎖についてはこれまでに報告された糖鎖の相互作用の特異性と相対的な結合強度の違いを再確認することができた¹²⁾。そこで、GAGの中でもヘパラン硫酸に比較すると構造の多様性が比較的少ないデルマタン硫酸 (DS) に焦点を絞り、DSオリゴ糖を網羅した糖鎖マイクロアレイの作成を試みた。そして、DSと相互作用するがコンドロイチン硫酸との比較に関して議論の余地が残されているIFN- γ とRANTESについてGAG間における結合強度の比較とそれらが認識する固有の糖鎖構造の有無 (特異性) を調べた。また、ヘパリンに比較すると弱いがコンドロイチン硫酸に比較してDSに選択的に結合すると報告されているHGF/SF、創傷治癒過程でDSと結合してその働きを促進させるとの報告がなされているKGF (別名FGF-7) についてもDS鎖上に結合する固有の糖鎖構造が存在するかどうかを明らかにしようと試みた。

結 果

1. コンドロイチン硫酸AおよびC, デルマトン硫酸 (DS) をコンドロイチナーゼABCで部分消化して得た糖鎖で作成した糖鎖マイクロアレイによるIFN- とRANTESの結合する糖鎖の検索

ウシ気管由来のコンドロイチン硫酸A (CSA) およびサメ軟骨由来のコンドロイチン硫酸C (CSC), ブタ小腸粘膜由来のデルマトン硫酸 (DS) を材料として2merから20merのオリゴ糖鎖を得るために, コンドロイチナーゼABCリアーゼによる部分消化を行った. リアーゼによる脱離反応によって糖鎖非還元末端に生じる不飽和グルクロン酸の示す232nmの吸光度の測定から約40%の消化を確認し, 消化物は10%エタノールを含む1M NaClで平衡化したBiogel P-10によるゲルろ過で分画した. 2merから20merのオリゴ糖鎖 (50nmol) はSephadex G-10によるゲルろ過で脱塩した. 用いたGAGの二糖組成分析から, GalNAc4Sを主成分とするCSAにあっても約40%の6-硫酸と5%のGalNAcを, GalNAc 6Sを主成分とするCSCであっても15%のGalNAc4SとGalNAc2S,6Sを含み, GalNAc4Sを主成分とするDSであっても約10%がGalNAc 6SとGalNAc4S,6Sが占め, GalNAc 6SとGalNAc4S,6S含量に匹敵する割合のGlcAを含むものであった. したがって, コンドロイチナーゼABCリアーゼによる糖鎖断片をゲルろ過で分離した画分には構成する単糖とウロン酸の数は同じであっても様々に修飾を受けた糖鎖が混在する.

2merから20merに分画された糖鎖の還元末端のアルデヒド基を1,2-dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DHPE)のアミノ基と水素化ホウ素ナトリウム共存下で還元アミノ化し

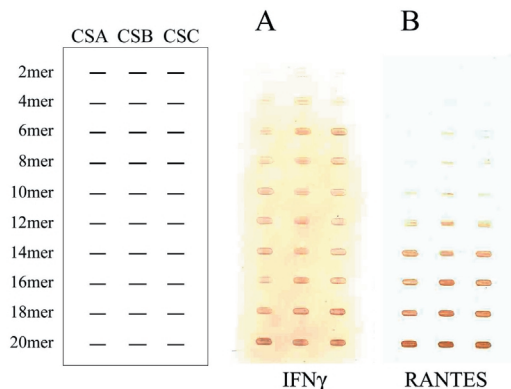


図1. コンドロイチナーゼABCリアーゼによりCSA, DS, CSCから調製した糖鎖断片を用いた糖鎖マイクロアレイによるIFN-γ (A)とRANTES(B)の結合.

DHPE化NGL 1pmolをスポットしたニトロセルロース (NC) 膜に3% BSAを含むTNMに希釈した1 μg/mlのIFN-γあるいは1 μg/mlのRANTESをoverlayし, その後anti-IFN-γとanti-RANTESを二次抗体とし, ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体を用いてIFN-γとRANTESの糖鎖への結合をDABの呈色として調べた.

て共有結合させてネオグライオリピド (NGL) を得た。NGLはシリカカラムを用いて精製し、合成量は $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 60:35:8(\text{v/v})$ などを展開溶媒としてシリカゲルプレート上で展開した時の新たなNGLによるスポットを365nmのUVで励起したときのPrimulin染色の蛍光強度から算出した。糖鎖マイクロアレイの作成についてのNGLのニトロセルロース膜へのスポットと糖鎖への抗体の結合シグナルの検出についてはこれまでに報告した方法⁹⁾に従った。

CSA, DS, CSC由来の糖鎖を用いて調製した2merから20mer糖鎖をDHPE化したNGLの1 pmolをスポットしたニトロセルロース (NC) 膜にIFN- γ とRANTESをoverlayして、それぞれanti-IFN- γ とanti-RANTESを二次抗体として糖鎖へのIFN- γ とRANTESの結合を調べた。図1に示されるように、IFN- γ は4mer以上の糖鎖に結合し、RANTESは10mer以上の糖鎖に結合することが認められ、特にIFN- γ では鎖長が伸びるにつれて結合シグナルが増強していた。しかしながら、CSA, DS, CSC間でのシグナル強度の比較から、IFN- γ とRANTES共にCSA, DS, CSC間で差を認めることがなく、硫酸基の位置やイズロン酸の有無によって作られる固有な糖鎖構造がそれらの結合に必要とは考えられない。従って、結合シグナルの強弱は糖鎖に含まれる硫酸基の数に依存した静電的な結合と考えられる。

2. コンドロイチナーゼAC で完全消化して得たDS由来、および部分消化して得たのCSAとCSC由来の糖鎖断片を用いてのADHP化NGLの調製

先の実験ではコンドロイチン硫酸の部分消化にコンドロイチナーゼABCリアーゼを用いた。コンドロイチナーゼABCリアーゼはグルクロン酸残基のみならずイズロン酸残基の非還元末端をも切断するので、DSの場合では得られる糖鎖はグルクロン酸とイズロン酸の混在した糖鎖である。そこで、DSへの特異的な結合の有無を調べるために、コンドロイチナーゼAC による完全消化を行い、生理活性を持つとされる10糖程度以下の大きさの糖鎖を効率よく得るためにBiogel P-6によるゲルろ過を行った。不飽和ウロン酸による232nmの吸収を指標として不飽和グルクロン酸と主に硫酸化GalNAcからなる2merと非還元末端の不飽和グルクロン酸を除きイズロン酸のみを含む糖鎖断片 (4merから12mer画分) を分離した。また、以前の実験からDHPE化NGLは定量が困難であることに加え糖鎖マイクロアレイ化の過程で固相化されているかどうかの確認が困難であった。そこでDHPEの代わりにDHPEのアミノ基にアントラセンを導入し新たにアミノ基を導入して蛍光をもたせた誘導体のADHP (*N*-aminoacetyl-*N*-(9-anthracenylmethyl)-DHPE) を合成して糖鎖をADHP化した。ADHP化NGLは245nmの励起によって390-410nmの蛍光を発し定量が容易であるのみならず、NC膜上にスポットされた1 pmolのADHP化NGLであっても紫外線の照射によって容易に検出できる利点がある。

図2に、CSA, DS, CSC由来の糖鎖を用いてADHP化NGLを調製したときのHPTLCにおける展開パターンの一例を示した。ADHP化には糖鎖50nmolに対してADHP 100nmolを用いて反応させたので、先端部に展開される遊離のADHPと遅れて展開されるADHP化NGLの蛍光強

Separation of ADHP-neoglycolipids of oligosaccharides
derived from chondroitin sulfates A and B

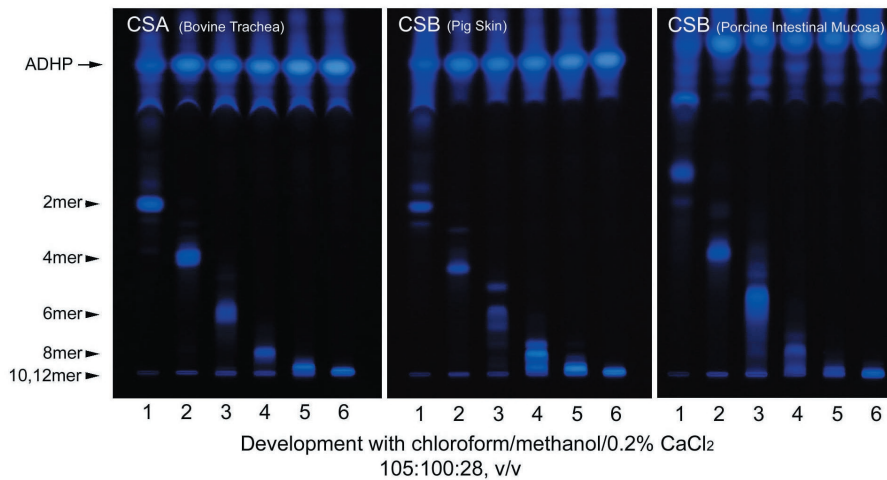


図2．コンドロイチナーゼAC。リアーゼを用いたCSA，DS，CSC由来の糖鎖断片を用いてADHP化NGLを調製したときのHPTLCにおける展開パターンの一例．

糖鎖断片50nmolにADHP 100nmolを用いて還元アミノ化反応によってNGLを合成し、クロロホルム/メタノール/水=105:100:28(v/v)の溶媒で展開させた。先端部に展開される遊離のADHPとADHP化NGLの蛍光強度の比較から、2merではほぼ100%がADHP化され、鎖長が長くなるに従ってADHP化の効率が徐々に減少することが分かる．

度の比較から結合の効率が分かる．事実，2merではほとんど100%の糖鎖がADHP化されるが，鎖長が長くなるに従ってADHP化の効率が徐々に減少して，12mer画分では約20%程度にまで減少していた．ADHP化糖鎖（ADHP-NGL）はHPTLCにて先端部に展開される遊離のADHPと原点付近に留まっている未反応の糖鎖から抽出分離し，ADHPのもつ蛍光強度を指標として精製ADHP-NGLの量を求めた．

3. コンドロイチナーゼAC 消化によるCSA，CSC，DS由来の糖鎖を固相化した糖鎖マイクロアレイを用いてのHGF/SFとFGF-7の結合する糖鎖の検索

4種類のGAG（CSA，DS（ブタ皮膚およびブタ小腸粘膜），CSC）を材料として，それら由来の糖鎖から調製した2merから12mer糖鎖のADHP化NGL 1pmolをNC膜にスポットした糖鎖マイクロアレイを作成した．そして，GAG 糖鎖の中にHGF/SFとFGF-7が特異的に結合する糖鎖が含まれているかどうかを調べた．実験条件として最初に，糖鎖とリガンドを結合させる反応条件として生理的な状態を反映させる目的で，0.15M NaCl, 2 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgCl_2 を含む10mM Tris-HCl緩衝液，pH7.4（TNCMと略す）を用いて，生理的な濃度とされる20 ng/mlのHGF/SFあるいは30ng/mlのFGF-7をoverlayして4でovernightさせた．そして，両者の結合を維持（安定化）させるために以後の洗浄と二次抗体との反応には，10mM

Tris-HCl緩衝液、pH7.4にNaCl濃度を20mM、Ca⁺⁺とMg⁺⁺濃度をそれぞれ5 mM, 2 mMとした条件（TNCM-Lと略す）を用いた。

図3に示されるように、DS由来の糖鎖にはCSAやCSCに比べてやや強い結合シグナルを与えているようにも見受けられるが、HGF/SF、FGF-7ともに2merから12merの全ての糖鎖に、しかも4種類のGAGにほぼ等しい結合シグナルを与えた。しかも、IFN- γ やRANTESの場合と異なって、CSAでは鎖長が長くなっても結合シグナルの強度が変わらず、8mer以上では逆に弱くなる傾向もみられた。この原因として、静電的な結合のみならず脂質部分に対する疎水結合を含む非特異的な吸着が含まれている可能性ある。そこで、静電的な結合を排除する目的でTNCM中のNaCl濃度を0.05M間隔で段階的に上昇させイオン強度を高めた条件下で結合を比較した。結果は示さないが、0.20M NaClでは図3と同様な結合シグナルを与えたが、0.25M NaCl以上では結合シグナルが全く検出されず、全てのGAG糖鎖に対して結合性を失うものであった。この結果は、図3で示される結合シグナルは静電的な結合をみていた可能性が高く、今回実験材料として用いたGAG、特に2種のDSにはHGF/SFあるいはFGF-7が認識して結合する固有の糖鎖構造が含まれていなかったと考えられる。しかしながら、CSAに認められた鎖長に依存しない結合シグナルの原因については不明で、可能性の一つとしてADHP化の効率が、鎖長のみならず硫酸基を多く持つ糖鎖ほど悪いこととHPTLCによる分離能（展開距離）の低さなどに起因する無視できない反応副産物の混入が考えられる。今後、DSに対して特異的に結合する糖鎖の検索に関して、コンドロイチナーゼACを用いることの是非とADHP化NGLの精製の方法をも含めて再検討する必要がある。

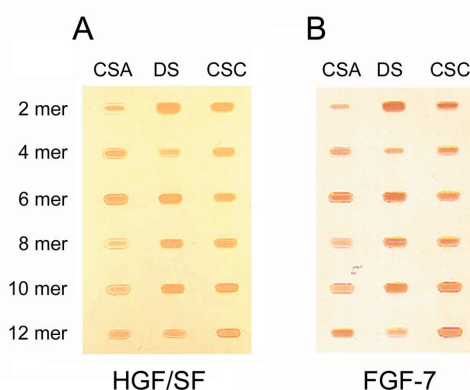


図3. コンドロイチナーゼAC消化によりCSA、DS（ブタ皮膚）、CSCから調製した糖鎖断片を用いた糖鎖マイクロアレイによるHGF/SF(A)とFGF-7(B)の結合する糖鎖の検索。

ADHP化NGL 1pmolをスポットしたニトロセルロース（NC）膜に3% BSAを含むTNCMに生理的濃度とされる20ng/mlのHGF/SFあるいは30ng/mlのFGF-7をoverlayし、その後anti-HGF/SFとanti-FGF-7を二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体を用いてHGF/SFとFGF-7の糖鎖への結合をDABの呈色として調べた。

考 察

これまでの多くの研究から、グリコサミノグリカン (Glycosaminoglycan, GAG) やプロテオグリカン (proteoglycan, PG) は細胞の増殖, 分化, 創傷治癒などの広範な生物学的な役割に深く関わっていることが明らかとされている。特に, ヘパリン (heparin), ヘパラン硫酸 (heparan sulfate, HS), デルマタン硫酸 (dermatan sulfate, DS) に代表される GAG は, (1) 成長因子, サイトカイン, ケモカインなどを安定化させたり, cofactor あるいは coreceptor として作用すること。(2) 酵素の活性を調節する因子として働くこと。(3) 創傷, 感染, 癌化による細胞損傷に応答するシグナル分子となっていること。(4) 病原微生物やウイルスの接着や組織への浸潤, および寄生虫による毒性因子などの標的分子となることや, それらが免疫系から免れることに関わることなどが明らかとされている。特に, 細胞外マトリックス上でのサイトカインやケモカインと GAG との相互作用により生じるリガンドの局所への蓄積やリガンドの濃度勾配はリンパ系細胞の集積や受容体へのリガンドの受け渡しに補助的に関わるとされ, サイトカインやケモカインが結合する GAG の特異性を明らかにすることは重要な課題の一つとなっている。

免疫細胞の集積 (recruitment) や免疫応答の調節に関わるサイトカインやケモカインには約 50 種類が存在することが知られている。その中で, IL-8, macrophage inflammatory peptides (MIP-1a, -1b), regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interferon gamma (IFN- γ) などは GAG と結合することが示され, GAG との結合を調べたものでは, RANTES は heparin との相互作用が最も強いが DS は HS や CSA より強く結合するとした報告や, DS の結合は HS や CSC よりも弱いとする報告があり, RANTES の活性化に及ぼす DS の影響や DS との直接的な結合の有無については明確な結果が示されていない。IFN- γ についても CSA との結合は古くから知られていたが, マスト細胞の IFN- γ 結合要素 (IFN- γ binding element) として同定されたものは DS であった。細胞外マトリックス上でのサイトカインやケモカインと GAG との相互作用により生じるリガンドの局所への蓄積やリガンドの濃度勾配はリンパ系細胞の集積や受容体へのリガンドの受け渡しに補助的に関わるとされ, サイトカインやケモカインが結合する GAG の特異性を明らかにすることは重要な課題となっている¹²⁾。

CSA, DS, CSC をコンドロイチナーゼ ABC リアーゼで部分消化して得た糖鎖断片を固相化した糖鎖マイクロアレイ実験から, IFN- γ は 4mer 以上の糖鎖に結合し, RANTES は 10mer 以上の糖鎖に結合することが認められた。そして, いずれもが CSA, DS, CSC に共通して結合するので CSA, DS, CSC の間での差異を認めなかった。これまでに報告されている研究では実験条件の違いによると思われるが相反する結果も示され, RANTES は heparin との相互作用が最も強いが DS は HS や CSA より強く結合するものや, DS の結合は HS や CSC よりも弱いとする

ものがあり、RANTESの活性化に及ぼすDSの影響やDSとの直接的な結合の有無については明確な結果が示されない状態であった。今回の同一条件下で比較できる糖鎖マイクロアレイの結果から、おそらくRANTESと糖鎖との結合はRANTES分子の結晶構造から示される塩基性アミノ酸ドメインの大きさに依存した静電的な結合であろうと考えられた。また、IFN- γ についてもCSAとの結合は古くから知られていたが、マスト細胞のIFN-g結合要素（IFN- γ binding element）として同定されたものはDSであり、その特異性については様々な報告がなされていた。今回の結果から、IFN- γ との結合強度は用いたCSA、DS、CSC由来の糖鎖で同程度であり、特にDSに親和性が高いとする結果は得られなく、RANTESの場合とは異なり4 mer以上の糖鎖に結合するもので鎖長に依存した結合強度を示すものであった。IFN- γ 分子の結晶構造から示される塩基性アミノ酸ドメインの大きさはRANTESに比較して狭い領域であることから、IFN-gの場合もRANTESと同様に立体構造上の塩基性アミノ酸からなるドメインに、そのドメインの大きさに依存した硫酸化糖鎖が結合する静電的な相互作用によるものと考えられた。したがって、IFN- γ とRANTESが認識する固有の糖鎖構造は今回用いた糖鎖に限って言えば存在しないものと推察される。

最近、DSの担う役割についての数多くの報告が相次いでなされている。コンドロイチン硫酸B（chondroitin sulfate B, CSB）とも呼ばれるDSの構造は、 β 1-4結合したN-アセチルガラクトサミン（N-acetylgalactosamine, GalNAc）と β 1-3結合したグルクロン酸（glucuronic acid, GlcA）の二糖単位が直鎖状に配列したものである。DSはGalNAcの存在からコンドロイチン硫酸の一つとして定義されるが、イズロン酸（iduronic acid, IdoA）をもつことからコンドロイチン硫酸A（chondroitin sulfate A, CSA）やコンドロイチン硫酸C（chondroitin sulfate C, CSC）とは性状を異にし、IdoA残基をもつGAGであるヘパリンやHSの仲間としても見なされている。IdoAは多くのGAG結合タンパク質が結合する領域の構造特異性を決めている糖とされ、事実、IdoA含量の高いGAGはGlcA含量が高いGAGに比べて高い繊維芽細胞の増殖阻害作用を有することが報告されている。また、HSの示す生物学的な役割をDSは活性が弱いながらも有するとはいくつかの例が明らかとされている。DSは、CSAやCSBに類似してGalNAc残基の4位と6位の炭素が硫酸基によって修飾されるが、また、ヘパリンやHSに類似してIdoAの2位の炭素が硫酸化されうる。特に、ヘパリン、HS、DSの生合成過程におけるGlcAからIdoAへの変換に関わるエピメリ化とIdoA残基の2位炭素の硫酸化による修飾はランダムな反応によって行われるのではなく、調節された遺伝子の発現により生じた酵素系を反映して特有の構造が作られると考えられている¹³⁾。特に、DSにおける構造の多様性は、ウロン酸の部分がGlcAのまま存在するもの、エピメリ化されIdoAになったもの、さらにIdoAの2位が硫酸化を受けた2-O-sulfated IdoAの三種類が存在する。またGalNAcの部分では硫酸基の結合しないGalNAcか4位が硫酸化された4-O-sulfated GalNAc、6位が硫酸化された6-O-sulfated GalNAc、4位と6位がともに硫酸化された4-O-and 6-O-disulfated GalNAcの4種類があり、これらの組み合わ

せによって生物学的な機能をもった様々の糖鎖構造が作られる。

DS鎖を有するプロテオグリカンが結合する分子として、細胞外マトリックス分子のcollagenやfibronectinなど、増殖因子の繊維芽細胞増殖因子-1 (FGF-1), FGF-2, 肝細胞増殖/分散因子 (HGF/SF), 角質細胞増殖因子 (KGF, 別名FGF-7) など、プロテアーゼ阻害物質のheparin cofactor II, 血液凝固に関わるthrombinなど、サイトカインのインターフェロン γ (IFN- γ), ケモカインのRANTESや血小板因子のPF-4および病原性毒素の α -defensin, などが明らかとされ、その幾つかでは結合することによって生じる酵素活性の阻害、タンパク質の安定化、細胞増殖の調節機能など様々な生物学的な影響が指摘されている。しかしながら、多くの場合において、それらが結合するDS鎖分子上の特異的な糖鎖構造については不明とされている。

最近、DSのもつ機能的な役割が明らかにされると期待されているものに、HGF/SFがある。HGF/SFは再生肝細胞のもつ増殖因子あるいは細胞遊走因子として分離されたものであるが、heparinやHSと比べるとその程度は弱い。DSはHGF/SFと結合して、細胞膜型のチロシンキナーゼ受容体 (c-met) を活性化することが報告されている^{14,15,16)}。そして、HGF/SFあるいはc-metの逸脱した発現が細胞の癌化や癌細胞の転移に関わることが指摘され¹⁷⁾、HGF/SFによるc-met活性化に及ぼすheparinやHSのみならずDSとの相互作用に興味を持たれている。HGF/SFと結合するDS鎖の構造についてはFS8胎児皮膚繊維芽細胞の産生するGAGの検索から、硫酸化を受けていないIdoA残基を含みGlcAを含まない糖鎖で4位が硫酸化されたGalNAc (GalNAc4S) からなる8糖が最小単位であろうと報告されているが、固有の糖鎖構造については不明である¹⁶⁾。そこで、コンドロイチナーゼAC リアーゼ消化するとDSからIdoA残基のみを含む糖鎖を得ることが可能である。そこで、市販の二種類のDS (ブタ皮膚由来のDSとブタ腸粘膜由来のDS) を用いて酵素による徹底消化を行って糖鎖の非還元末端のDGA以外はIdoA残基からなる糖鎖を得ることができれば、その中にHGF/SFの結合する糖鎖を見出せると考えた。2merから12merの鎖長の異なるNGL化して糖鎖を固相化した糖鎖マイクロアレイを用いれば、HGF/SFの結合する糖鎖を同定できるのみならず、IFN- γ とRANTESの場合のようにHGF/SFの結合する最小単位の糖鎖の大きさをも決定できると考えた。ブタ皮膚由来のDSとブタ腸粘膜由来のDSに含まれる全ウロン酸当たりのGlcA残基の割合については、前者では、15 ~ 19%, 後者で1% ~ 0.5%と報告されているが、コンドロイチナーゼAC リアーゼによる徹底消化後の232nmの吸光度からブタ皮膚由来のDSは約20%, ブタ腸粘膜由来のDSでは約3%の値が得られた。ブタ腸粘膜での結果から用いた酵素標品にはコンドロイチナーゼBリアーゼの若干の混入があることを否定できないが、今回の実験ではGalNAc-GlcA結合を選択的に切断していたことを示すもので、得られた糖鎖断片は非還元末端糖鎖以外がIdoA残基からなるものであったと推定される。HGF/SFとFGF-7の結合実験にはDHPEにアントラセンを導入したADHP化NGLを用いた。それは、NC膜にスポットしたADHP化NGLは紫外線を用いて確

認できると同時に、HPTLCで展開したスポットは直接に質量分析できる利点を考慮したからである。DHPEにアントラセンを導入することによりDHPEに比較して疎水性が増しHPTLCでの展開度が増し分離能が上昇するが、逆に多くの硫酸基を含む高い親水性を持つ糖鎖のNGL化は困難となることから、ADHP化NGLでは2merから12merを用いた。今回の実験から、ADHPであっても相対的に短い2merから8merの糖鎖であれば効率よくNGL化されるが、10mer、12merでは効率が下がっていた。このようにして得たADHP化NGLをNC膜に固相化した糖鎖マイクロアレイを用いてHGF/SFの結合糖鎖の検索を行ったが、結果に示したようにDS鎖の2merから12merすべてに結合が見られ、しかもCSA、CSC由来の糖鎖にも同程度に結合する結果がえられた。また、この結合はイオン強度を上昇させた実験から分かるように静電的な結合であって、得られた結合シグナルは固有の糖鎖に特異的に結合しているものではないことが分かった。この結果は、市販のブタ皮膚由来のDSとブタ腸粘膜由来のDSにはHGF/SFの結合する固有の糖鎖が含まれていない可能性も考えられる。しかしながら、静電的な結合であればIFN- γ とRANTESの場合で見られた様に糖鎖の長さに依存して結合シグナルが強くなるはずである。ところが、この結果はCSAの場合に顕著に見られるように糖鎖が長くなるにつれ結合シグナルが弱くなっていた。また、 Δ GAと直鎖になったGalNAcからなる非天然物の2mer-ADHPにも結合した。この原因として考えられることは、アントラセンを導入したADHPを用いたことによる非特異的な結合が生じたことと、ADHP化の効率が悪い場合（特に10mer、12merなどの様に鎖長が長いとき）の反応液からADHP化NGLを分離精製するときの無視できない量の未反応の糖鎖や蛍光を有する反応副産物の混入である。従って今後の問題として、非特異的な結合についてはpositive controlとなるヘパリン糖鎖を調製して結合シグナルの検出条件を検討することが必要であり、ADHP化効率の向上化あるいは精製度の向上化を試みることも重要となる。

DSを主要構成要素とする組織は皮膚であり乾燥重量の0.3%を占める。皮膚は外界との接点としてのbarrier機能を持っていることに基づいていると思われるが、創傷治癒とDSとの関わりについての研究は興味を持たれる一つの分野となっている。創傷により生じる浸出液中にはsyndecan-1や-4、decorinが含まれるが、主要なGAGはDSであり、その濃度は8-23mg/mlにもなることが知られている。最近、創傷治癒に細胞増殖因子としてkeratinocyte growth factor (KGF, 別名FGF-7)の関与が明らかとされた^{8,18)}。FGF-7はFGF受容体のsplice variantの一つであるFGFR2 bにのみ結合して上皮細胞である角質細胞をparacrine的に刺激する因子である。創傷によってFGF-7とFGFR2 bの発現が誘導され、受容体FGFR2 bを介しての細胞増殖のシグナルが出されるが、その際に創傷浸出液に高濃度に含まれるDSがcofactorとして働くことが明らかとされた。また、FGF-7に依存した細胞増殖に及ぼすGAGの影響を調べたときに低濃度ではヘパリンが高い増殖能を与えるが、創傷浸出液に含まれるDSと同程度の高濃度ではDSはヘパリンよりも細胞増殖能を示すことが報告されている。また、CSAやCSCでは

いずれの濃度であってもDSの示す効果を及ぼさないことも明らかとされた¹⁹⁾。高濃度であってもヘパリンは阻害的に働くことがないにもかかわらず、ヘパリンよりもFGF-7に対しての親和性が低いDSが高濃度でヘパリンよりも強い細胞増殖を促進することの理由は不明とされているが、FGF-7とDSがどのように相互作用しているのか興味が持たれていた。そこで、前述したように分析条件に関していくつかの問題点が考えられたが、FGF-7を糖鎖マイクロアレイ上にoverlayしてDS由来の糖鎖に特異的に結合するかどうかを調べてみた。しかしながら、FGF-7の場合であってもHGF/SFの場合と同様に、若干DS鎖に強い結合シグナルを与えているように見えるが、すべての糖鎖に広く結合シグナルを与えるものであった。したがって、今回の実験ではFGF-7の相互作用するDS鎖を特定することができなかった。いずれにしろ、目的とする結果を得るためには、糖鎖断片を得るためのコンドロイチナーゼAC リアーゼに含まれるB活性の考慮を含めて、ADHP化の効率を高めてADHP化NGLの精製純度を高めること、および結合シグナルの非特異的結合を排除できる方法を再検討することが必要である。

引用文献

- 1) Esko, J.D. and Lindahl, U. (2001); Molecular diversity of heparan sulfate. *J. Clin. Invest.*, **108**, 169-173
- 2) Rostand, K.S. and Esko, J.D. (1997); Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect. Immun.*, **65**, 1-8
- 3) Schmidchen, A., Frick, I. and Brorck, L. (2001); Dermatan sulfate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. *Mol. Microbiol.*, **39**, 708-713
- 4) Kuschert, G.S., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., and Wells, T.N. (1999) Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry*, **38**, 12959-12968
- 5) Brooks, B., Briggs, D.M., Eastmond, N.C., Fernig, D.G., and Coleman, J.W. (2000); Presentation of IFN-gamma to nitric oxide-producing cells: a novel function for mast cells. *J. Immunol.*, **164**, 573-579
- 6) Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Ron, D., Finch, P. W., Florio, C., and Aaronson, S. A. (1990); Characterization of the receptor for keratinocyte growth factor. Evidence for multiple fibroblast growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* **265**, 12767-12770
- 7) LaRochelle, W. J., Sakaguchi, K., Atabay, N., Cheon, H. G., Takagi, Y., Kinaia, T., Day, R. M., Miki, T., Burgess, W. H., and Bottaro, D. P. (1999); *Biochemistry* **38**, 1765-1771
- 8) Trowbridge, J.M., Rudistill, J.A., Ron, D. and Gallo, R.L. (2002); Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratiocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.*, **277**, 42815-42820
- 9) Fukui, S., Feizi, T., Galustian, C., Lawson, A.M. and Chai, W (2002); Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions. *Nature Biotechnology*, **20**, 1011-1017
- 10) 福井成行 (2003): 糖鎖マイクロアレイ; 糖鎖情報解読へのSweet Spot. *生化学*, **75**巻, 1545-1550
- 11) Feizi, T., Stoll, M.S., Yuen, C. -T., Chai, W., & Lawson, A.M. (1994); Neoglycolipids: Probes of oligosaccharide structure, antigenicity and function. *Methods Enzymol.* **230**, 484-519

- 12) Trowbridge, J.M. and Gallo, R.L. (2002); Dermatan sulfate: new function from an old Glycosaminoglycan. *Glycobiology*, **12**, 117R-125R
- 13) Litwack, E., Ivins, J., Kumbasar, A., Paine-Saunders, S., Stipp, C., and Lander, A. (1998); Expression of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in the developing rodent. *Dev. Dyn.*, **211**, 72-87
- 14) Lyon, M., Deakin, J.A., Mizuno, K., Nakamura, T., and Gallagher, J.T. (1994); Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants. *J. Biol. Chem.*, **269**, 11216-11223
- 15) Ashikari, S., Habuchi, H., and Kimata, K. (1995); Characterization of heparan sulfate oligosaccharides that bind to hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29586-29593
- 16) Lyon, M., Deakin, J.A., Rahmoune, H., Fernig, D.G., Nakamura, T., and Gallagher, J.T. (1998); Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.*, **273**, 271-278
- 17) Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1996); Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J. Biochem. (Tokyo)*, **119**, 591-600
- 18) Igarashi, M., Finch, P.W., and Aarosen (1998); Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.*, **273**, 13230-13235
- 19) Sher, I., Weizman, A., Lubinsky-Mink, S., Lang, T., Adir, N., Schomburg, D., and Ron, D. (1999); *J. Biol. Chem.*, **274**, 35016-35022