

## 学位請求論文の内容の要旨

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| 論文提出者氏名  | 附属高度先進医学研究センター 糖鎖工学講座<br>氏名 須藤晋一郎 |
| (論文題目)<br><b>Essential hyaluronan structure for binding with hyaluronan-binding protein (HABP) determined by glycotechnological approach</b><br>(糖鎖工学的アプローチにより決定したヒアルロン酸結合タンパク質 (HABP) と結合するヒアルロン酸の必須構造)   |                                   |
| (内容の要旨)<br><br><b>【背景・目的】</b><br>細胞外マトリックスの主要な成分であるヒアルロン酸 (HA) は、グルクロン酸 (GlcA) と <i>N</i> -アセチルグルコサミン (GlcNAc) の繰り返し二糖単位が直鎖状に連なった高分子の非硫酸化多糖である。HA は他の分子と相互作用することにより細胞形態の維持や、細胞の分裂、移動、接着、シグナル伝達などに関与している。軟骨においては、アグリカンとよばれるプロテオグリカン (PG) と凝集体を形成することによりクッション性を発揮し、脳においては、アグリカンの他、ニューロカンのような神経組織に特異的な PG とペリニューロナルネットとよばれる細胞外マトリックスを形成し、シナプスの安定化に寄与している。HA はアグリカンの球状ドメイン 1 (G1 ドメイン) とリンクプロテインと複合体を形成して、HA-アグリカン凝集体をさらに安定化している。G1 ドメインは GlcA と <i>N</i> -アセチルガラクトサミン (GalNAc) の繰り返し二糖単位が直鎖状に連なったコンドロイチン硫酸 (ChS) などの他のグリコサミノグリカン (GAG) とは結合せず、HA とのみ結合することが知られているが、結合に必要な糖鎖長以外に HA の糖鎖構造に関する情報は無い。<br>当研究室ではウシ精巢性ヒアルロニダーゼ (BTH) の加水分解反応と、その逆反応である糖転移反応を利用して、HA と ChS の二糖単位が様々に配置したハイブリッド型オリゴ糖の作製に成功している。これまでにハイブリッド型オリゴ糖を用いて GAG の構造と機能との関係を明らかにしてきた。<br>本研究では、G1 ドメインと結合する HA の構造に関する情報を得るために、HA と非硫酸化 ChS であるコンドロイチン (Ch) の構造をデザイン通りに配置した HA-Ch-ハイブリッド型オリゴ糖のシリーズを調製し、それらを用いて、G1 ドメインと結合する HA の必須構造を調べた。<br><br><b>【方法】</b><br>構造が知られた HA-Ch-ハイブリッド型オリゴ糖は、2-アミノピリジン (PA) で還元末端を蛍光標識した HA 及び Ch オリゴ糖 (六糖、八糖または十糖) をアクセプターに、長鎖の HA または Ch をドナーに用い、1~3 段階の BTH の糖転移反応 (NaCl 非存在下、pH7.0、37℃、24h) により調製した。精製は TSK-gel Amido-80 カラム (φ 4.6×250 mm) を用いた順相 HPLC で行った。また非還元末端の GlcA を欠損させたオリゴ糖を調製するために、 $\beta$ -グルクロニダーゼで消化した。非還元末端に不飽和結合をもつオリゴ糖は、コンドロイチン ABC リアーゼで消化することにより調製した。これらのオリゴ糖はゲルろ過クロマトグラフィーで精製し、HPLC 及び質量分析計を用いて純度検定を行った。各種オリゴ糖と G1 ドメインとの結合活性は、リンクプロテインを含む G1 ドメイン |                                   |

(HABP) を基質に用いた競合 ELISA 様の方法により測定した。その結果より G1 ドメインと結合する HA の必須構造を推定した。

#### 【結果】

HABP との結合に必須の HA の構造は以下のように推定された。

- 1) 天然型の HA の最小糖鎖長は十糖であり、糖鎖長依存的に結合活性が増加した。
- 2) 還元末端側を蛍光標識したオリゴ糖では糖鎖長にもよるが、標識していない場合より結合活性はおおよそ 25% の低下にとどまった。
- 3) 非還元末端を Ch 二糖単位で置き換えたオリゴ糖では結合活性が完全に失われたことから、非還元末端の HA 二糖単位が結合に重要であることが示された。
- 4) 非還元末端の GlcA がひとつ欠損した奇数オリゴ糖の場合、非還元末端の GlcNAc が結合に不可欠であった。
- 5) 非還元末端以外の HA 二糖単位を、Ch 二糖単位に置き換えても結合活性は完全には失われず、最大でも 84% の低下であった。

#### 【考察】

HA の非還元末端から GlcA を欠損させても HABP と結合するが、非還元末端を Ch 二糖に置き換えると結合しなくなることから、結合には非還元末端の GlcNAc の構造が必要であることが示唆された。非還元末端ではない糖鎖内部の HA 二糖単位を Ch 二糖単位に置き換えても結合活性は失われないことから、HABP は GlcA の数を認識し、糖鎖内部の GlcNAc は GalNAc でもよいことが示唆された。従って、HABP は GAG の糖鎖長と非還元末端の構造を厳密に認識することにより、他の GAG とは結合せずに HA とのみ結合することが示唆された。

本研究では、糖鎖工学的なアプローチにより HA の HABP への結合に必須の構造を明らかにした。HA は相互作用するタンパク質により様々な機能を発揮し、炎症の抑制や神経の可塑性、癌細胞の浸潤、転移の亢進などに関与する。ハイブリッド型オリゴ糖の合成と糖鎖の末端構造の改変を組み合わせた糖質工学的アプローチは、HA と ChS の構造と機能との関係を明らかにする研究に有用と考えられる。