

審査の結果の要旨

氏名 村上 果林

本論文は1章からなり、結果はコクリンの調製、コクリンを用いた糖鎖リガンドの結合解析、高硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) の検出、コクリンを用いた免疫組織染色、高硫酸化GAG修飾を持つ分子の同定、コクリン変異体による糖鎖認識機構の解明の6つの節に分けて構成されている。グリコサミノグリカン(GAG)は、ウロン酸とアミノ糖の二糖単位の繰り返し構造を有する直鎖状の長鎖糖鎖の総称で、遊離またはコアタンパク質に付加したプロテオグリカンの形で細胞表面及び細胞外マトリックスに存在する。GAGは細胞増殖などに関与する様々なタンパク質と結合し、それらを密集させることにより膜貫通型受容体を近接させ多量体化を促進することでシグナル伝達を媒介すると考えられており、GAGの発現パターンの変化は細胞接着や増殖などに重要な影響を及ぼす。特にGAGの硫酸化のがん悪性化への関与が示唆されており、高硫酸化GAGの機能解明が待たれているため、本研究では高硫酸化GAG検出プローブの作製と、がん悪性化における高硫酸化GAGの機能解明を目的とした。

第1,2節では、Cochlin cDNAを含むプラスミドを作成し、N末端にシグナル配列とMycタグ、C末端にヒトIgG Fc領域を付加し、発現ベクターに組み込みCHO細胞で発現を行った。この細胞の培養上清からProtein A カラムにより組換え体タンパク質を精製し、糖鎖に対する結合を調べた。初めにエバネッセント波励起型蛍光検出法を用いて96種類の糖鎖ライブラリとの結合性を測定した結果、Cochlinはライブラリー中で唯一ヘパリンのみに特異的に結合し、他の主要な糖鎖には結合しなかった。次に、様々なGAGへのCochlinの結合性をELISAで調べた結果、Cochlinが高硫酸化ヘパリン及びコンドロイチン硫酸E (CSE)へ顕著に結合することを見出した。さらにGAGアレイを用いて48種類の化学合成GAG二糖単位に対する結合性を比較した結果、CochlinはGlcNS, IdoA, GlcU3Sを含む二糖への親和性が高いことを見出した。さらにSPRにてヘパリン、2-O-脱硫酸ヘパリン、CSD、CSEに対する解離定数を測定したところ、それぞれ約1.8, 44, 190, 14nMとなり、ヘパリンとCSEに対して抗体-抗原相互作用と同程度の強い結合能を持つことが示された。

第3節では、GAG合成酵素の変異細胞株に対するCochlinの結合をフローサイトメトリーにより解析したところ、GAG発現細胞と比較しGAG欠損細胞への結合が顕著に減少したことから、Cochlinが細胞表面の高硫酸化GAG発現の検出に利用できることを見出した。そこで複数の乳がん及び前立腺がん細胞株についてCochlinを用いた蛍光染色を行った結果、斑点状の染色像が得られ、細胞膜上の高硫酸化GAGを可視化できた。以上の結果から、Cochlinが高硫酸化GAG検出プローブとして利用可能であると示唆された。

第4,5節では去勢抵抗性前立腺がん細胞DU145について細胞表面に高硫酸化GAGを検出したが、この細胞をホルモンや増殖因子が除去された血清で培養すると結合が大きく増加した。この結果から、DU145においてホルモンや増殖因子の欠乏下で高硫酸化GAGが高発現することが示唆された。さらに、Cochlinを用いたヒト乳がん組織切片の染色により、がん細胞近傍に斑点状に局在する高硫酸化GAGが検出され、高硫酸化GAGは小葉がんの浸潤領域特異的に発現するという興味深い結果を得た。

Cochlinは、N末端からLCCL, vWFA1, vWFA2の3つのドメインで構成されるが、第6節ではCochlinの糖結合領域を探るため、各ドメインやドメイン欠損体を作製し、GAG結合能及び特異性を比較した。その結果まずvWFA1ドメインがGAGとの結合に必須であること、しかしvWFA2ドメインを欠損させると高硫酸化GAG以外のGAGへも結合することが分かり、高硫酸化GAG特異的な認識のために

はvWA1だけでなくvWA2との協調的な相互作用が必要であることが示唆された。一方LCCLドメインについては、N末端を129残基欠損させても全長と同様の結合能及び特異性を示したこと、またLCCLドメインのみを含む変異体はGAGへ結合しなかったことから、LCCLドメインはGAGとの相互作用に関与しないことが示唆された。LCCLドメインとvWA1ドメインの間のループ構造上の塩基性アミノ酸のアラニン置換体を作製したところ、ヘパリンへの結合親和性が減少することが分かった。しかしこのループ構造のみではGAGへ結合せず、153-158の塩基性アミノ酸リッチな領域はvWA1, 2によるGAGへの結合を補助する役割を担うと考えられた。さらに、LCCLドメイン直後のループ構造とvWA1, vWA2ドメインが協調的にGAGとの相互作用を制御するというGAG認識機構が推測された。

以上の結果は、Cochlinという分子を見出したことにより、従来困難だったGAGの機能解明に利用可能な新たな解析手法を構築しただけでなく、がんにおける高硫酸化GAGの治療標的としての可能性を示唆するものであり、糖鎖を標的とした新しい創薬への道を切り開いた。よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。