

博士論文

Cochlin と GAG 鎖の相互作用とその生物学的意義

平成 28 年 3 月博士（生命科学）申請

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

本田智子

目次

<b>1. 略語表</b> .....	5
<b>2. 序論</b>	
1. レクチン .....	7
2. 難聴 .....	10
3. プロテオグリカン .....	15
<b>3. 本論</b>	
1. 序 .....	23
2. 材料と方法	
2-1 調製した試薬等 .....	28
2-2 抗体 .....	29
2-3 細胞培養 .....	30
2-4. GAG .....	30
2-5 GAG-BSA conjugate の作製 .....	31
2-5-1 SDS-PAGE	
・ゲルの作製 .....	31
・泳動および CBB 染色 .....	32
2-5-2 BCA assay .....	32
2-6 レポーター細胞の作製	
・ウイルス感染 .....	33
・FACS .....	33
・レポーターアッセイ .....	34
2-7 Cochlin Fc 融合タンパク質作製	
2-7-1 ヒト Cochlin Fc 融合タンパク質発現ベクター作製 .....	35
・アガロースゲル電気泳動による DNA の精製 .....	35
・DNA ライゲーションおよび大腸菌への形質転換 .....	36
・プラスミド抽出 .....	36
・DNA シークエンス解析 .....	36
・Lipofection .....	36
2-7-2 ヒト Cochlin 変異体 Fc 融合タンパク質発現ベクター作製 .....	37
2-7-3 FLAG タグ付加ヒト Cochlin 変異体タンパク質発現ベクター作製 .....	37
2-7-4 マウス Cochlin Fc 融合タンパク質発現ベクター作製	

・マウス Cochlin 発現ベクター作製 .....	37
・マウス Cochlin LCCL ドメイン発現ベクター作製 .....	38
2-7-5 Western blotting .....	38
2-7-6 ELISA .....	39
2-8 マウス内耳の免疫染色	
・動物 .....	40
・マウス内耳の採取 .....	40
・パラフィン包埋 .....	40
・切片作製 .....	41
・脱パラフィン .....	41
・HE 染色 .....	41
・mCochlin Fc 融合タンパク質および抗体による染色 .....	41
2-9 マウス内耳 GAG の二糖組成解析	
・マウス内耳の GAG 抽出 .....	42
・heparinase 消化 .....	42
・chondroitinase 消化 .....	42
・消化産物の蛍光標識 .....	43
・ゲルろ過 HPLC .....	43
・イオン交換 HPLC .....	43
3. 結果	
3-1 CS-E-BSA conjugate の作製 .....	44
3-2 ヒト Cochlin と GAG との結合性解析 .....	46
3-2-1 ヒト Cochlin レポーター細胞と GAG との結合性解析	
・ヒト Cochlin レポーター細胞作製 .....	46
・ヒト Cochlin レポーター細胞を用いたレポーターアッセイ .....	47
・ヒト Cochlin 変異体レポーター細胞を用いたレポーターアッセイ .....	50
3-2-2 ヒト Cochlin 変異体 Fc 融合タンパク質と GAG との結合性解析	
・Western blotting .....	53
・ELISA によるヒト Cochlin Fc 融合タンパク質と GAG との結合解析 .....	55
3-3 マウス Cochlin と GAG との結合性解析	
3-3-1 マウス Cochlin レポーター細胞と GAG とのレポーターアッセイ .....	58
3-3-2 マウス Cochlin Fc 融合タンパク質と GAG との結合性解析	
・Western blotting .....	60

• ELISA .....	62
3-3-3 マウス Cochlin LCCL ドメイン Fc 融合タンパク質と GAG との結合性解析	
• Western blotting .....	63
• ELISA .....	64
3-4 免疫染色	
3-4-1 HE 染色 .....	65
3-4-2 Cochlin Fc 融合タンパク質、抗 Cochlin 抗体を用いたマウス内耳の 免疫染色 .....	67
3-5. マウス内耳 GAG の二糖組成解析 .....	70
3-6. C542F 変異体について .....	71
4. 考察	
4-1 ヒト Cochlin と GAG とのレポーターアッセイ .....	73
4-2 ヒト Cochlin 変異体と GAG との結合アッセイ .....	74
4-3 マウス Cochlin と GAG との結合アッセイ .....	77
4-4 内耳の免疫染色 .....	80
4-5 マウス内耳 GAG の二糖組成解析 .....	81
5. 総括 .....	82
6. 謝辞 .....	84
7. 参考文献 .....	85

## 1. 略語表

2-AB	: 2-aminobenzamide
2-ME	: 2-mercaptoethanol
Amp	: ampicillin
AP	: alkaline phosphatase
BSA	: bovine serum albumin
CBB	: Coomassie brilliant blue
cDNA	: complementary DNA
Chn	: chondroitin
COCH	: coagulation factor C homology
CPRG	: chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside
CS	: chondroitin sulfate
Da	: dalton
D-MEM	: Dulbecco's modified essential medium
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNA	: deoxyribonucleic acid
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	: fluorescence-activated cell sorter
FBS	: fetal bovine serum
FCS	: fetal calf serum
Fw	: forward
GalNAc	: <i>N</i> -acetylgalactosamine
GSG	: glycosaminoglycan
GAM	: goat anti-mouse IgG
GlcA	: D-glucuronic acid
GlcNAc	: <i>N</i> -acetylglucosamine

HA : hyaluronic acid

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPLC : high performance liquid chromatography

HS : heparan sulfate

NFAT : nuclear factor of activated T cells

PAA : polyacrylamide

PAGE : poly-acrylamide gel electrophoresis

PBS : phosphate buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PE : phycoerythrin

PI : propidium iodide

PVDF : polyvinylidene difluoride

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

Rv : reverse

SDS : sodium dodecyl sulfate

SS : signal sequence

TBS : Tris buffered saline

TEMED : tetramethylethylenediamine

Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

## 1. 序論

### 1. レクチン

#### 1-1. レクチン

レクチンとは、1888年 Hermann Stillmark によりトウゴマの抽出物から最初に報告された (1)、抗体と酵素を除く糖鎖を特異的に認識し結合するタンパク質の総称である (2)。その後、植物から抽出したレクチンが ABO 式血液型特異的に凝集することが報告された (3)。現在ではレクチンは植物だけでなく菌類から動物まで幅広い生物種に存在していることが知られている。

レクチンは糖鎖認識領域 (Carbohydrate-recognition domain; CRD) と呼ばれる糖鎖認識に関与する保存されたアミノ酸配列を有しており、高度に保存されている。この CRD の構造をもとにレクチンはいくつかのファミリーに分類されている。ファミリーには、最大のファミリーであるマメ科レクチン、マメ科レクチンと類似性をもつ L タイプレクチン、カルシウム依存性の C タイプレクチン、 $\beta$ ガラクトースを認識するガレクチンなどが知られている。さらに、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンやグラム陰性菌の毒素などもレクチンである (4)。

また、レクチンは古くから様々なツールとして利用されており、例えばレクチンを固相化したカラムは糖タンパク質の精製・分離に用いられている。近年では iPS/ES 細胞を目的の細胞に分化させた際に生じる未分化な iPS/ES 細胞 (患者に移植すると腫瘍化する可能性がある) の除去に薬剤融合型のレクチンを用いる方法が開発されている (5)。

以下に代表的なレクチンファミリーについて詳細を記す。

#### 1-2. マメ科レクチン

マメ科レクチンはマメ科植物の主に種子に存在するレクチンであり (6, 7)、ファミリー間で類似した一次構造を有しており、糖との結合には金属イオンが必要である。真菌や昆虫、動物に対して毒性をもつレクチンが報告されていることから植物において生体防御の機能を発揮していると考えられている (8)。

マメ科レクチンのうち最初に構造が報告されたのは Concanavalin A (Con A)であり、これはタチナタマメに存在する分子量 26 kDa のレクチンである。二量体や四量体を形成し、糖鎖非還元末端の  $\alpha$ -Glc/Man と結合することが知られている。

### 1-3. C タイプレクチン

結合にカルシウムイオンを必要とする動物レクチンである。C タイプレクチンの代表的なものとしてセレクチンがあげられる。セレクチンは L-セレクチン、E-セレクチン、P-セレクチンの 3 種類が知られている。L-セレクチンはリンパ球に発現しており、血管内皮細胞上に存在するリガンドと相互作用することによりリンパ球のホーミングに関与している (9)。リンパ節内でリンパ球が通り抜ける細血管である高内皮細静脈には、6-sulfo sialyl Lewis X と呼ばれる硫酸化糖鎖が存在しており、これが L-セレクチンの主要なリガンドとなっている (10, 11)。また、マクロファージや樹状細胞上にも C タイプレクチンが発現しており、自己・非自己の糖鎖を認識、結合することで多様な免疫応答の誘導に関与していると考えられている (12)。

### 1-4. ガレクチン

カルシウム非依存的に $\beta$ ガラクトシドに結合するレクチンであり、一次配列上に保存された糖認識領域を持つ。分子様式によりプロトタイプ (1つの糖鎖結合ドメインからなる)、タンデムリピートタイプ (1つの糖鎖結合ドメインと糖鎖とは結合しないドメインからなる)、キメラタイプ (2つの糖鎖結合ドメインからなる)に大別される (13)。脊椎動物から無脊椎動物まで幅広く存在しており、哺乳類では 10 種類以上が報告されている (14)。

哺乳類で最初に発見されたガレクチン 1 はプロトタイプであり (15)、分子量約 14 kDa のタンパク質である。生体内に普遍的に発現しており、神経幹細胞の増殖や (16)、活性化 T 細胞のアポトーシスに関与しているといわれている (17)。



### 1-5. シグレック

免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、シアル酸に結合するレクチンである。N末端側から V-セット免疫グロブリン様ドメイン、1 から 16 個の C2-セット免疫グロブリン様ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質内ドメインを有している (18)。主に免疫系の細胞に発現しており、細胞質内に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) とよばれる抑制性のモチーフをもつことから、シグナル伝達を負に制御すると考えられている。V-セット免疫グロブリン様ドメインが糖結合に重要であることが報告され (19, 20, 21)、さらに 3'-シアリルラクトースとの共結晶を用いた X 線結晶構造解析によりシアル酸との結合に必要なアミノ酸残基も同定されている (22)。

### 1-6. 他のレクチンファミリー

他のレクチンファミリーとしては、マメ科レクチンと類似の構造をもつ L 型レクチン、シアル酸に特異性を示す I 型レクチン、微生物に広く存在する R 型レクチン、マンノース 6 リン酸に結合する P 型レクチン、酸性糖鎖に結合するアネキシンなどが知られている (23)。

## 2. 難聴

### 2-1. 聴覚の仕組み

耳介で集められた音は外耳道を通り鼓膜に送られる。音の大小や高低は鼓膜の振動に変換される。音が大きいと振動も大きくなり、音が小さいと振動も小さい。鼓膜の振動は中耳の耳小骨に伝達される。耳小骨はツチ骨、キヌタ骨、アブミ骨からなり、それぞれの骨は靭帯によって繋がっている。この靭帯の働きにより振動の調節を行う（大きい振動は小さく、小さい振動は大きくし、適切な大きさの振動が伝わる）。この振動が内耳中の蝸牛に伝わる。蝸牛内はリンパ液で満たされており、このリンパ液中を振動が伝わりコルチ器に存在する有毛細胞が振動することで電気信号に変換され、蝸牛神経を介して大脳に信号が伝達される。一つの有毛細胞はある特定の音にしか反応せず、また反応する音の高低によって存在する位置が異なっている。つまり蝸牛の入り口側には高い音に、奥側には低い音に反応する有毛細胞が存在している。最終的に大脳皮質の聴覚野で音として認識される (24)。

### 2-2. 難聴

難聴は大きく分けて感音性難聴と伝音性難聴に分類される。検査はオーディオメーターを用いて気導と骨導両方の閾値を調べることによって行う。気導と骨導に差がないものを感音性難聴、気導と骨導に差があり骨導では閾値が正常範囲を示すものを伝音性難聴と判断する (25)。感音性難聴は内耳に障害がおこることによって生じる難聴であり、音が聞こえにくくなる、言葉が不明瞭といった症状が生じるといわれている。先天的なものと後天的なものがあり、先天的な原因としては遺伝、発達異常などがあげられる。一方後天的な原因としては外傷や加齢などがある (26)。原因が不明で治療法が確立されていないものが多く、補聴器を用いても聴力を補うのが難しい場合もある。加齢性難聴も感音性難聴の一種であり、これは患者数が最も多いといわれている。治療法が確立されていないため補聴器を用いることが多いが、個人差が大きく補聴器を用いても聴力が回復しない場合もある。一方、伝音性難聴は外耳や中耳に障害が起こることによっておこる難聴であり、音が聞こえにくくなるといわれている。伝音性難聴には治療法が確

立されているものが多く、ほとんどの患者で聴力が回復する傾向にある。難聴はその残存聴力により軽度難聴から重度難聴まで4段階に分類されている (Table 1)(27)。

**Table 1. 難聴の程度**

	聴力レベル	症状
軽度難聴	25-39 dB	騒がしい環境での会話が困難
中程度難聴	40-69 dB	補聴器なしでの会話が困難
高度難聴	70-89 dB	高出力補聴器が必要
重度難聴	90 dB 以上	手話などによる会話が必要

### **2-3. 遺伝性難聴障害**

遺伝性難聴障害は症候群性難聴と非症候群性難聴に大別されており、約 70%の遺伝性難聴は非症候群性である。非症候群性遺伝性難聴は、遺伝形式により常染色体優性遺伝 (non-syndromic autosomal dominant deafness; DFNA)、常染色体劣性遺伝 (DFNB)、X連鎖性遺伝 (DFNX)に分類されており、原因遺伝子座の報告順に1から番号がつけられている (28)。

DFNA は、非症候群性難聴の約 30%を占めていると推定されており、国内における患者は約 1 万人と予想されている (29)。DFNA に関しては 40 種類以上の原因遺伝子が同定されており、原因遺伝子として有毛細胞に関する遺伝子 (*KCNQ4*; K<sup>+</sup> channel subunit, DFNA2)、非感覚細胞に関する遺伝子 (*COCH*; extracellular matrix component, DFNA9)、蓋膜に関する遺伝子 (*TECTA*; extracellular matrix component, DFNA8, 12)などが報告されている (28)。症状は原因遺伝子および患者により様々である。例えば *TECTA* 遺伝子の変異による難聴では軽度から中程度の難聴を呈することが多いとされている (30)。

#### **2-4. DFNA9**

1991年に Khetrapal により病理所見が報告された後、1998年 Robertson らによって報告された内耳に豊富に存在するタンパク質である Cochlin をコードする *COCH* を原因遺伝子とする常染色体優性遺伝性難聴障害である (31)。症状はメニエール病と類似しており、めまいや耳鳴りを伴う進行性の高音障害型感音性難聴を示すことが知られているが (32)、めまいの頻度は患者によりばらつきが大きい。DFNA9 患者はベルギー、オランダ、アメリカ、日本、オーストラリアで報告されている (33)。Cochlin は N 末端側から LCCL ドメイン、vWA1 ドメイン、vWA2 ドメインからなる分泌型のタンパク質である。DFNA9 患者では *COCH* 遺伝子上に約 20 カ所の突然変異箇所が知られているがそのほとんどが LCCL ドメイン内である。しかし Cochlin の機能は未だに不明であり、DFNA9 発症メカニズムも判明していない。

#### **2-5. LCCL ドメイン**

LCCL ドメインは C 末端に高度に保存されたアミノ酸配列をもち、2000年に Trexler らにより命名されたドメインである。Limulus factor C、Cochlin、Lgl1 の 3 つに共通していたことから LCCL ドメインと名付けられた (34)。Limulus factor C はカブトガニの体液に存在するセリンプロテアーゼであり、リポ多糖 C (lipopolysaccharide; LPS) に結合し、体液凝固カスケードを引き起こすことでグラム陰性菌からの感染防御を担っているという報告がある (35, 36)。現在ヒトでは LCCL ファミリーとして計 6 つの遺伝子 (*COCH*; Gene ID: 1690、*VIT*; Gene ID: 5212、*CRISPLD1*; Gene ID: 83690、*CRISPLD2*; Gene ID: 83716、*DCBLD1*; Gene ID: 285761、*DCBLD2*; Gene ID: 131566) が同定されている。

#### **2-6. Cochlin**

Cochlin は DFNA9 の原因遺伝子として同定された *COCH* の遺伝子産物である。内耳の蝸牛や三半規管 (Fig. 1) に高発現していることが知られており、特に蝸牛ではコラーゲンを除いた全蝸牛タンパク質の約 70% を占めているという報告もある (37)。

Cochlin は LCCL ドメインと 2 つの vWA (von Willebrand factor domain A) ドメイ

ンからなる分泌型タンパク質である。

このうち LCCL ドメインの機能は明らかになっていないが、vWA ドメインはコラーゲンとの結合に関与しており、蝸牛の構造を支える役割を担っていると考えられている。

Cochlin にはアイソフォームが 4 種類存在しており、p63 (全長)、p44 ( $\Delta$ LCCL)、p40 ( $\Delta$ LCCL, *ivd1*) および p16 (LCCL) がある (38)。Cochlin のアイソフォームの一つ、p16 は Cochlin-tomoprotein (CTP) とも呼ばれており、内耳の外リンパに特異的に含まれている。また、他の内耳に存在する体液である髄液や血液、中耳洗浄液には存在していないことが報告されている (39)。そのため、この性質を活かして CTP は外リンパ瘻の診断マーカーとして利用されている。外リンパ瘻とは内耳リンパ腔と周囲臓器のあいだに瘻孔が生じる病気であり、難聴や耳鳴り、めまい、平衡感覚障害などの症状を呈する。瘻孔は蝸牛窓や前庭窓 (Fig. 2)、骨迷路 (Fig. 1) 破壊部などに生じる。原因としては外因性 (ダイビングなど) や内因性 (くしゃみなど) の圧外傷などが知られているが、原因がわからないこともある (40)。

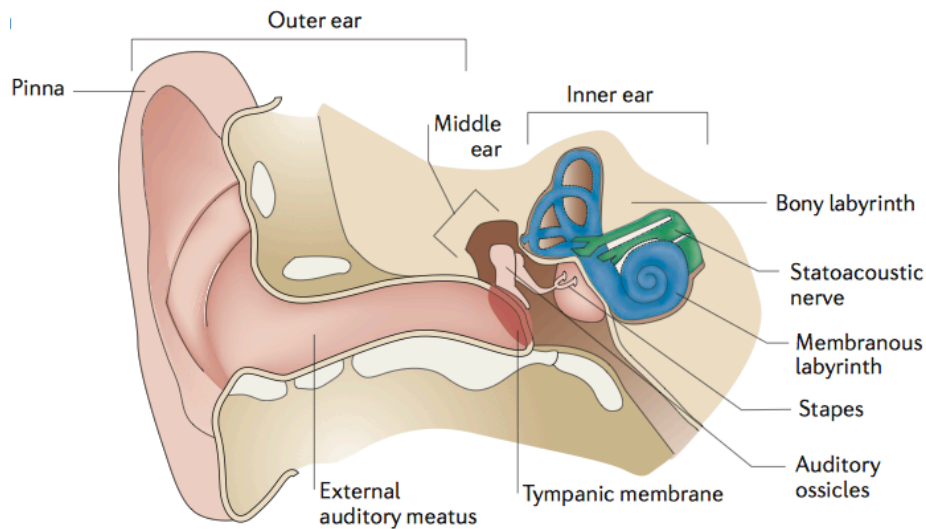


Fig. 1 耳の構造

Mattherw W. Kelley. Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. (2006) *Nature reviews Neuroscience*. 7, 837-849

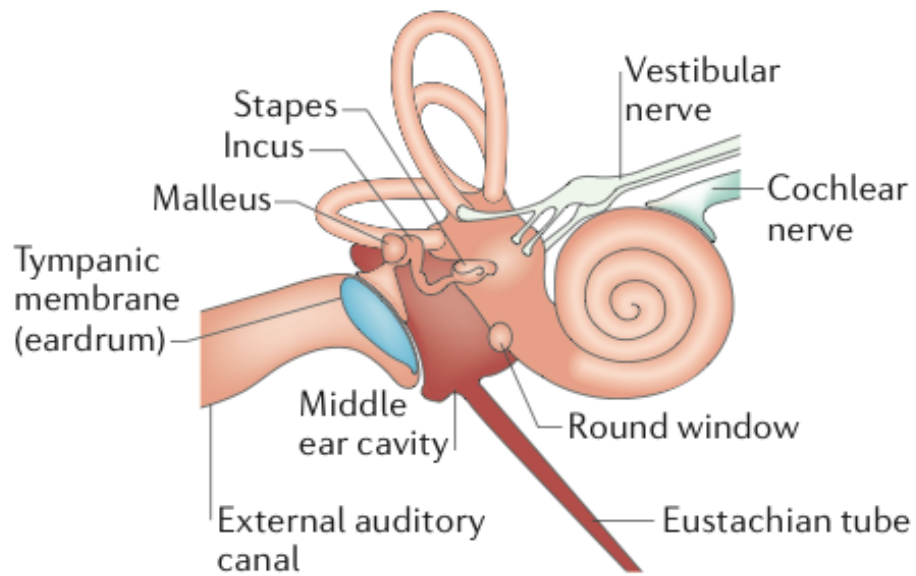


Fig. 2 中耳、内耳の構造

Hudspeth AJ. Integrating the active process of hair cells with cochlear function. (2014) *Nature reviews neuroscience*. 15, 600-614

### 3. プロテオグリカン

#### 3-1. プロテオグリカン

コアとなるタンパク質の特定のセリン残基に側鎖としてグリコサミノグリカン (GAG)が共有結合した分子の総称であり (41)、細胞外マトリックスや細胞表面に普遍的に存在している。現在までに約 20 種類のコアタンパク質が見出されている (Table 2) (42, 43, 44, 45)。

Table 2. 代表的なプロテオグリカン

プロテオグリカン	側鎖のGAG (数)	分布
アグリカン	CS, KS(多数)	軟骨
シンデカン	HS, CS (3-8)	結合組織
デコリン	CS/DS (1)	細胞表面
バーシカン	CS	繊維芽細胞
パールカン	HS (1-3)	基底膜

**CS: chondroitin sulfate, KS: keratin sulfate, HS: heparan sulfate, DS: dermatan sulfate**

体内のプロテオグリカンのうち最も豊富に存在しているものはアグリカンである。アグリカンはコンドロイチン硫酸 (CS)とケラタン硫酸 (KS)を側鎖にもつ分子量約 2,500 kDa の大型のプロテオグリカンである。アグリカンは N 末端の G1 ドメインを介してヒアルロン酸 (HA)と結合し (46)、巨大複合体を形成する。特に軟骨ではアグリカンとヒアルロン酸からなる巨大分子がその大部分を占めており、その保水作用により軟骨に弾力をあたえていることが知られている (47)。

また内耳にはミメカンが存在するという報告がある (48)。ミメカンはスモールロイ

シンリッチリピートプロテオグリカンファミリーのメンバーであり、側鎖にケラタン硫酸鎖をもつ (49)。また、コアタンパク質は同定されていないが、内耳の内リンパ液にもプロテオグリカンが存在し、内リンパ液中のタンパク質の約 3%を占めているという報告がある (50)。

プロテオグリカンの生合成は、コアタンパク質部分が翻訳された後、ゴルジ体で糖鎖修飾を受けることによっておこる。

### **3-2. GAG**

プロテオグリカンの糖鎖部分に相当し、細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する枝分かれのない直鎖状の酸性多糖である。現在まで植物には見出されておらず、GAG は動物細胞に特異的な構造であると考えられている (51)。GAG は、様々な増殖因子やサイトカインとの相互作用を介して種々の生物学的機能、例えば細胞増殖や分化などの制御に関与している (52, 53)。また、ウイルスや細菌が感染する際の足場にもなっている (54, 55)。GAG とタンパク質との相互作用は静電的な相互作用と古くは考えられていたが、近年ではほとんどの場合は GAG 中の特定の糖鎖配列を介した特異的な分子認識であると考えられている (51)。

#### **GAG の構造**

GAG はウロン酸 (glucuronic acid (GlcA)、iduronic acid (IdoA))とアミノ糖 (*N*-acetyl galactosamine (GalNAc)、*N*-acetylglucosamine (GlcNAc))の二糖繰り返し構造を基本骨格にもち (56, 57)、その構成二糖に基づいてコンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate; CS)/デルマタン硫酸 (dermatan sulfate; DS)、ヘパラン硫酸 (heparan sulfate; HS)/ヘパリン (heparin; Hep)、ヒアルロン酸 (hyaluronic acid; HA)に分類される (Fig. 3)。HA を除く GAG は、水酸基やアミノ基の一部に硫酸化修飾や水酸基のエピマー化を受けることによって多様な構造を形成する。



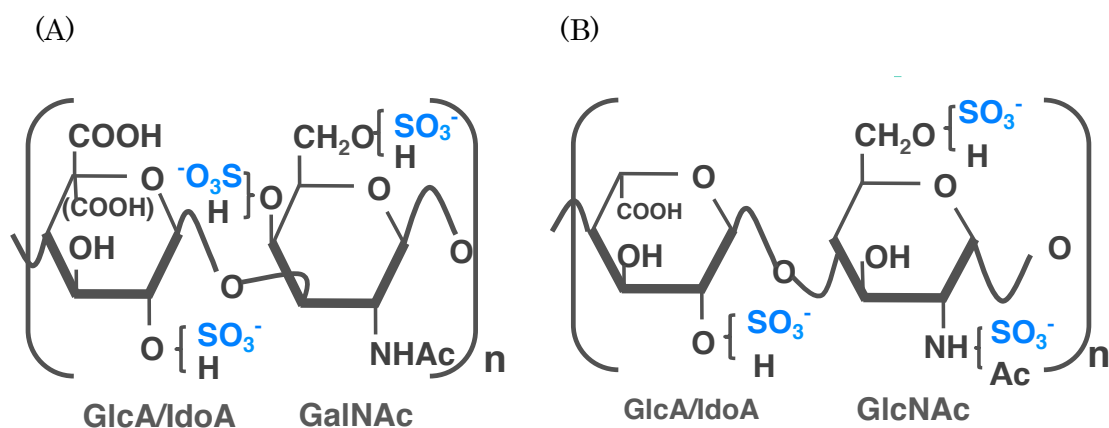


Fig. 3 GAG の二糖構造

CS/DS (A)と HS/Hep (B)鎖の二糖単位の構造。CS/DS は GlcA/IdoA  $\beta$  1-3GalNAc、HS/Hep は GlcA/IdoA  $\alpha$  1-4GlcNAc という形で二糖が重合している。

### 3-3. CS/DS

CS/DS は hexosaminic acid (HexA)と GalNAc の二糖が繰り返し重合した分子量  $10^4$  から  $10^5$  の多糖であり、軟骨や角膜、血管、皮膚など多くの組織に存在している (58)。CS/DS は、構成二糖内に含まれる硫酸化修飾の位置や数、エピマー化などが異なる異性体が存在し、O、A、B、C、D、E に大別されている (Table 3)。また、二糖組成中の A unit の割合が高いものを CS-A、D unit の割合が高いものを CS-D などと呼んでおり、IdoA を含むものを DS と呼ぶ。

CS は、1952 年に医薬品としての認可を受けており (59)、関節痛や腰痛などに効果があるとされている。近年、CS/DS の神経細胞への作用が注目されており、ブタ胎膜から抽出された CS/DS 混成鎖が、増殖因子の一つであるミッドカインと特異的に相互作用することにより神経突起伸張促進活性をもつことが報告された (60)。

**Table 3. CS の硫酸化二糖構造**

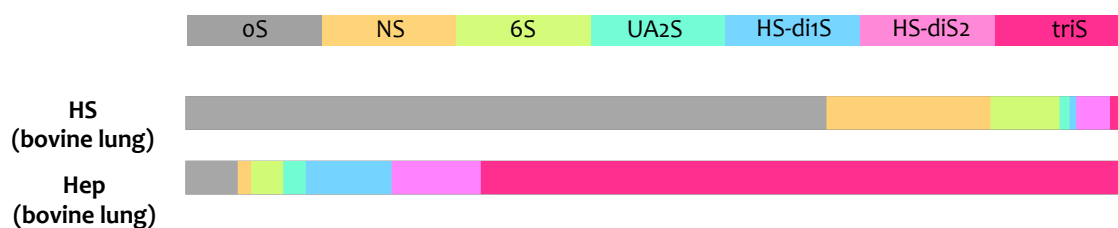
略語	二糖単位
O-unit	GlcA-GalNAc
A-unit	GlcA-GalNAc (4S)
B-unit	IdoA (2S)-GalNAc (4S)
C-unit	GlcA-GalNAc (6S)
D-unit	GlcA (2S)-GalNAc (6S)
E-unit	GlcA-GalNAc (4S, 6S)

2S: C2 水酸基が硫酸化されていることを示す。4S, 6S も同様に C4、C6 水酸基が硫酸化されていることを示す。

### 3-4. HS/Hep

HS/Hep は HexA と GlcNAc の二糖が繰り返し重合した分子量  $10^4$  から  $2 \times 10^5$  の多糖である。HS と Hep の明確な区別は難しいが、glucosamine (GlcN) が Nアセチル化されており、かつ HexA が GlcA の割合が高いものを HS、GlcN が N硫酸化されており、HexA が IdoA の割合が高いものを Hep と定義している。HS/Hep は構成二糖内にランダムな硫酸化修飾を受けることにより多様な構造を形成するが、総じて HS では硫酸化の程度は低く、Hep では高い (Table 4) (61)。

**Table 4. HS/Hep 二糖構造の構成比**



Hep には抗血液凝固作用があることがよく知られており、手術時や血栓防止剤として利用されている。抗血液凝固作用は、血液凝固阻害因子であるアンチトロンビン III と Hep が相互作用することによって発揮され、その相互作用には Hep 内に存在する特定の五糖構造が必須である (62)。

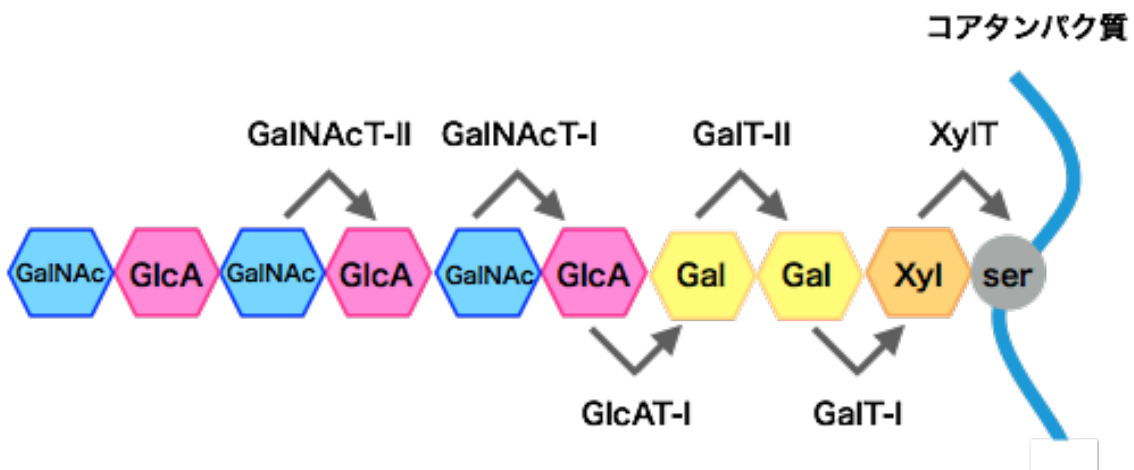
### 3-5. GAG の生合成

CS/DS、HS/Hep の生合成は、コアタンパク質の特定のセリン残基にキシロース転移酵素 (XylT)、ガラクトース転移酵素-I (GalT-I)、ガラクトース転移酵素-II (GalT-II)、グルクロン酸転移酵素-I (GlcAT-I)により GlcA-Gal-Gal-Xyl- (Ser)からなるタンパク質結合領域四糖が合成されることにより開始される。

#### 3-5-1. CS/DS の生合成

CS/DS は、タンパク質結合領域四糖の末端 GlcA に *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素-I (GalNAcT-I)により GalNAc が転移された後、コンドロイチン硫酸グルクロン酸転移酵素-II (CS-GlcAT-II)とコンドロイチン硫酸 *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GalNAcT-II)によって UDP-GlcA と UDP-GalNAc から GlcA と GalNAc が交互に転移され、GlcA-GalNAc の二糖繰り返し構造が合成される (Fig. 4) (63)。

DS に特徴的な IdoA-GalNAc の二糖構造は、GlcA-GalNAc の二糖繰り返し構造が合成された後に、デルマトン硫酸エピメラーゼ (dermatan sulphate epimerase; DSE)により GlcA 残基の C5 位のカルボキシ基が異性化されることによってつくられる。



#### Fig. 4 CS/DS の生合成

コアタンパク質の特定のセリン残基に GAG-タンパク質結合領域四糖が合成された後、GalNAcT-I により GalNAc が転移されることで CS/DS の合成が開始される。その後、CS-GlcAT-II、GalNAcT-II により GAG 二糖繰り返し領域が合成される。

**Hacker U. et. al. Heparan sulfate proteoglycans: the sweet side of development (2005) *Nature reviews*.**

CS/DS は、その二糖繰り返し構造が合成された後、種々の硫酸基転移酵素の働きにより鎖内に不均一な硫酸化修飾が起こる。エピメラーゼや硫酸基転移酵素の詳細な研究から、次のような順で硫酸化修飾が起こると考えられている。まず、(1) GalNAc の 4 位の硫酸基または 6 位の硫酸基がコンドロイチン硫酸 4-*O*-硫酸基転移酵素/デルマタン硫酸 4-*O*-硫酸基転移酵素 (C4ST/D4ST) またはコンドロイチン硫酸 6-*O*-硫酸基転移酵素 (C6ST) により硫酸化修飾を受ける。(2) GalNAc の 4 位の硫酸基が修飾された CS/DS は *N*-アセチルガラクトサミン 4-硫酸 6-*O*-硫酸基転移酵素 (GalNAc4S-6ST) によりさらに 6 位に硫酸化修飾が起こることがある。また、(2') GalNAc の 6 位に硫酸化修飾された CS/DS は、ウロノシル 2-*O*-硫酸基転移酵素 (UST) により GlcA または IdoA の 2 位の硫酸化修飾が起こる。さらに、DSE は CS から DS だけではなく DS から CS への逆反応も触媒するが、それは GalNAc の 4 位の硫酸化によって阻害されることが知られている (64)。

#### 3-5-2. HS/Hep の生合成

HS/Hep は、タンパク質結合領域四糖の末端 GlcA に *N*-アセチルグルコサミン転移酵素-I (GlcNAcT-I) により GlcNAc が転移された後、ヘパラン硫酸グルクロン酸転移酵素 (HS-GlcAT-II) と *N*-アセチルグルコサミン転移酵素-II (GlcNAcT-II) によって UDP-GlcA と UDP-GlcNAc から GlcA と GlcNAc が交互に転移され、GlcA-GlcNAc の二糖繰り返し構造を合成する (Fig. 5) (63)。

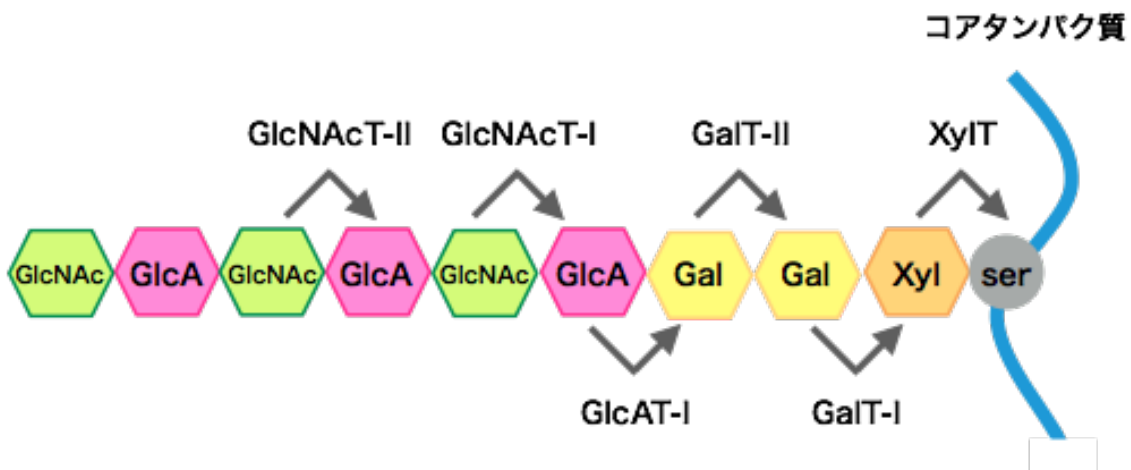


Fig. 5 HS/Hep の生合成

コアタンパク質の特定のセリン残基に GAG-タンパク質結合領域四糖が合成された後、GlcNAcT-I により GlcNAc が転移されることで HS/Hep の合成が開始される。その後、HS-GlcAT-II、GlcNAcT-II により GAG 二糖繰り返し領域が合成される。

Hacker U. *et. al.* Heparan sulfate proteoglycans: the sweet side of development (2005) *Nature reviews*.

HS/Hep も CS/DS と同様に種々の硫酸基転移酵素の働きにより次のような順で鎖内に不均一な硫酸化修飾が起こる。まず *N*-デアセチラーゼ/*N*-硫酸基転移酵素 (*N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase; NDST)により GlcNAc の脱アセチル化およびアミノ基の *N* 硫酸化が起こる (65, 66, 67, 68)。次いで、グルクロン酸 C5 エピメラーゼ (glucronic acid C5 epimerase; GLCE)により GlcA 残基の C5 位のカルボキシ基が異性化される (69)。さらに、へパラン硫酸 2-*O*-硫酸基転移酵素 (HS2ST)、へパラン硫酸 6-*O*-硫酸基転移酵素 (HS6ST)、へパラン硫酸 3-*O*-硫酸基転移酵素 (HS3ST)の働きにより IdoA の 2 位、GlcN の 6 位、GlcN の 3 位が硫酸化修飾される。HS/Hep が合成された後、細胞表面やゴルジ体内腔に存在する HS6-*O* エンドスルファターゼ (SULF)により GlcN の 6 位が脱硫酸化されることで HS/Hep とタンパク質との相互作用を調節している。

### **3-6. GAG の代謝分解**

GAG の代謝分解は主にリソソームで行われる。多糖の GAG はまずエンド型の加水分解酵素によりオリゴ糖へと低分子化される。次にスルファターゼにより脱硫酸化された後 (70, 71)、エキソ型のグリコシダーゼである *N*-アセチルヘキソサミニダーゼやグルクロニダーゼ、イズロニダーゼなどにより非還元末端側から順次加水分解される。

エンド型の分解酵素に関しては、エンド- $\beta$ -グルクロニダーゼであるヘパラナーゼとエンド- $\beta$ -アセチルヘキソサミニダーゼであるヒアルロニダーゼ (HYAL) がそれぞれ HS/Hep と CS/DS、HA の代謝分解に関与していることが知られている。HYAL には 6 つのファミリー分子が存在しているが、そのうちのひとつである HYAL1 が欠損すると GAG が代謝されずに細胞内に蓄積し、知能障害、運動能力・聴力の喪失、呼吸困難などを伴う代謝異常症であるムコ多糖症の IX 型を発症することが知られている (72, 73)。また、エキソ型の分解酵素を欠損した場合には VII 型のムコ多糖症を発症する (74)。

## 2. 本論

### 1. 序

第一の生命鎖としての核酸鎖、第二の生命鎖であるタンパク質鎖に次いで第三の生命鎖とよばれる糖鎖は、様々な分子と相互作用することによって発生・分化、免疫など様々な生命現象において重要な役割を果たしている。糖鎖は構成する糖の種類やその結合様式の違い、分岐の有無や長さなどにより膨大なバリエーションがあり、タンパク質や核酸に比べて構造が多様かつ複雑であることから、生命活動において多くの情報を担っているといわれている。糖鎖は、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンなどの複合糖質の形で細胞表面や細胞外マトリックス中に存在している。糖鎖構造は細胞の分化や癌化に伴い変化することが知られており、癌細胞に特異的にみられる糖鎖構造は腫瘍マーカーとしても用いられている。このような変化は糖転移酵素の発現量の変化によるものであり、癌化した細胞において発現が上昇する糖転移酵素の存在も明らかになっている (75, 76)。しかし、複雑な生命活動においては糖鎖単体が機能しているわけではなく、糖鎖を特異的に認識するタンパク質であるレクチンとの相互作用によってその機能を発揮している。例えば、糖鎖は増殖因子やサイトカインなどと相互作用することにより細胞増殖や分化などの制御に関与している (77)。また、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) が受容体と結合し、シグナルを伝達するためには細胞表面の HS が必要である。HS は FGF と受容体の両者と相互作用し、FGF の安定化や二量体の形成を補助し (FGF の活性化には二量体を形成する必要がある)、また受容体よりも圧倒的に多く存在することによって FGF と受容体との会合をサポートする (78)。レクチンとしては、マメ科レクチンが有名であるが、植物だけでなく動物や細菌においても幅広い種に存在している。

当研究室と独立行政法人産業技術総合研究所糖鎖遺伝子機能解析チームとの共同研究により、バイオインフォマティクスを用いて既知のレクチン分子との相同性を指標に新規レクチン候補遺伝子の探索を行った。これにより 100 以上の新規レクチン候補遺伝子があげられた。そのうちの一つに LCCL ドメインを有する LCCL ファミリーがある。LCCL ドメインは、カブトガニ (*Limulus polyphemus*) の体液凝固因子 *Limulus*

factor C、ヒトの蝸牛に存在するタンパク質 Coch-5b2、ラットの妊娠後期の胎児の肺に発現しているタンパク質 late gestation lung protein (Lgl 1)でみられることから、それぞれの頭文字をとり、LCCL ドメインと名付けられた (34)。このうち *Limulus factor C* は、グラム陰性菌の LPS に結合し、体液凝固カスケードを引き起こすことで生体防御を担っていることが知られている (35, 36)。しかし、Cochlin (旧名 Coch\_5b2)や Rat Lgl1 に関しては糖に結合するという報告はない。LCCL ドメインは約 100 アミノ酸からなり、C 末端に YXXSXXCXAAVHXXGVI という高度に保存された配列をもつ。ヒトでは LCCL ファミリーとして計 6 つの遺伝子 (*COCH*; Gene ID: 1690、*VIT*; Gene ID: 5212、*CRISPLD1*; Gene ID: 83690、*CRISPLD2*; Gene ID: 83716、*DCBLD1*; Gene ID: 285761、*DCBLD2*; Gene ID: 131566)が同定されている。

今回着目した Cochlin をコードする遺伝子 *COCH* (coagulation factor C homology) は、常染色体優性遺伝性難聴障害 DFNA9 (Late-onset non-syndromic autosomal-dominant hearing loss 9)の原因遺伝子として同定された (79)。*COCH* の遺伝子産物である Cochlin は、内耳の蝸牛に最も豊富に存在するタンパク質であり (37)、三半規管にも高発現していることが知られている (80)。*COCH* 遺伝子上に変異が入ると、20 から 40 代にかけて進行性の聴覚障害と平衡感覚障害を呈する DFNA9 を発症することが報告されている (81)。

ヒト Cochlin は、N 末端から LCCL ドメイン、創傷部位への血小板の接着を引き起こすタンパク質 von Willebrand factor と相同性のある 2 つの type A ドメイン (vWA) からなる、分子量約 63 kDa の分泌型タンパク質である (Fig. 6)。DFNA9 患者では *COCH* 遺伝子上に変異が入っているが、現在までに 51 番目のプロリンがセリンに置換された P51S (82, 83)、以下同様の表記法で V66G (84)、G87W (85)、G88E (84)、V104 del (104 番目のバリンの欠損) (86)、I109N (87)、W117R (84)、A119T (88)、C542F (89) など約 20 種類の変異や欠失が報告されており、その大部分が LCCL ドメイン内に生じた変異であった (Fig. 6)。



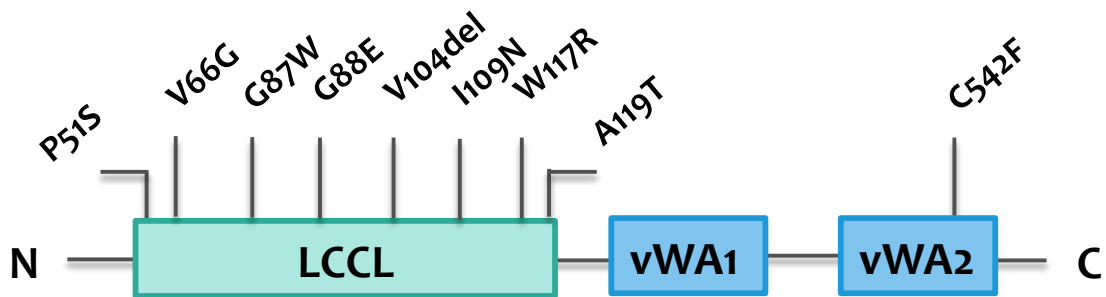


Fig. 6 Cochlin のドメイン構造と DFNA9 患者にみられる変異

Cochlin は N 末端からシグナル配列、LCCL ドメイン、vWA1 ドメイン、vWA2 ドメインからなる 550 アミノ酸のタンパク質である。図中に DFNA9 患者にみられるミスセンス変異の箇所を示す。

しかし、健常人と DFNA9 患者では Cochlin の分布や存在量に差は見られず、DFNA9 発症のメカニズムは明らかになっていない (37)。従来の DFNA9 研究では、Cochlin 分子の性質や発現量に着目して研究がなされており、現在までに次のような知見が得られている。①DFNA9 患者でみられる変異を導入した Cochlin 変異体を培養細胞に強制発現させると、変異体によって分泌されるものと分泌されず細胞内でオリゴマーを形成するものがある (90)。②変異体 Cochlin と wild type (WT) Cochlin を共発現させると、オリゴマーを形成し細胞障害性を示す (91)。③Cochin ノックアウトマウスが難聴を発症する (92)。Cochlin の凝集や細胞毒性に着目している論文が多いが、論文により結果が異なっており、どの結果が実際の生体内の挙動を反映しているのかは不明である。また、これら Cochlin 自体が細胞障害性を呈するという考え方では Cochlin ノックアウトマウスが難聴を発症することを説明することはできない。つまり Cochlin 分子に着目した研究だけでは DFNA9 の発症機序を解明することはできないといえる。

Cochlin の機能は未だ不明なままであるが、当研究室卒業生古澤、柳原の研究から Cochlin wild type (WT) が細胞外マトリックスの構成成分であるグリコサミノグリカンの一つであるヘパリンと強く結合することが明らかになった (Fig. 7)。

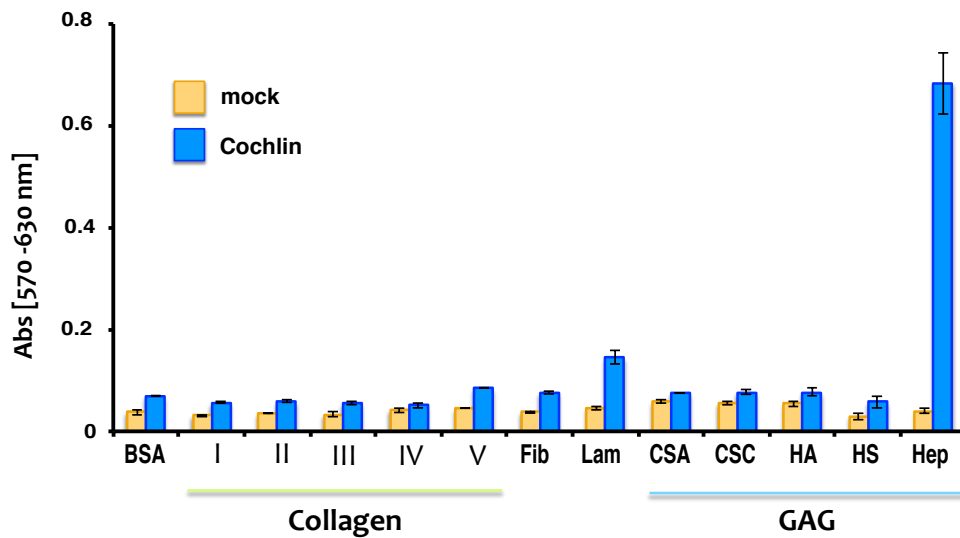


Fig. 7 ヒト Cochlin レポーター細胞の細胞外マトリックス成分に対するレポーターアッセイ（当研究室卒業生古澤修士論文より）

ウシアブミン (BSA)はカップリングしていない BSA 単体、I は I 型コラーゲン、II は II 型コラーゲン、III は III 型コラーゲン、IV は IV 型コラーゲン、V は V 型コラーゲン、Fib はフィブロネクチン、Lam はラミニン、CS-A (コンドロイチン硫酸 A) は CS-A-BSA、CS-C (コンドロイチン硫酸 C)は CS-C-BSA、HA は HA-BSA、HS は HS-BSA、Hep は Hep-BSA を固相化したものを示す。結果はそれぞれ 3 重測定した値の平均値と標準偏差を示す。同じ実験を 3 回以上行い、いずれにおいても同様の結果を得た。

Cochlin がヘパリンと結合したことから、Cochlin の LCCL ドメインは糖結合活性をもつのではないかと考えた。

そこで本研究では、Cochlin と GAG との結合が DFNA9 に関係している可能性を検討した。今までの研究では Cochlin 分子にのみ着目し、その凝集や細胞毒性が議論されてきたが DFNA9 メカニズムの解明には至っていない。DFNA9 の患者では次のことが報告されている。① 高音障害型の両側進行性難聴と前庭機能障害を呈する。② 高音が障害された後、徐々に中、低音域にも感音性難聴を呈する。③ 蝸牛、前庭の広範囲に

ムコ多糖 (GAG)タンパク質の沈着が見られる。特にラセン靭帯、ラセン板縁、基底版に顕著である。④ 有毛細胞が部分的に消失している。⑤前庭の有毛細胞がほぼ完全に消失している (33)。これらのことから、DFNA9 患者の内耳では GAG の沈着および有毛細胞の消失が見られているといえる。つまり GAG は DFNA9 発症と深い関連があることが推測される。

今まで Cochlin と GAG との関係性は報告されていなかったが、今回新たに Cochlin のリガンドとして GAG を見出した。そこで、本研究では Cochlin と GAG との結合に着目し、健常人と患者における GAG 結合性の変化、また生体内における GAG の構造を調べることで今まで Cochlin のみの研究からでは明らかにすることができなかった DFNA9 発症メカニズムの解明に迫ることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2-1 調製した試薬等

- PBS (-)

137 mM NaCl、2.68 mM KCl を含むリン酸緩衝液 (pH 7.4)

- EDTA/PBS

0.5 mM EDTA を含む PBS (pH 8.0)

- TBS

150 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.5)

- TBS-T

TBS に Tween 20 を 0.1%含む溶液

- FACS buffer

NaHCO<sub>3</sub> (0.35 g/L)、0.1% (w/v)NaN<sub>3</sub>、0.1% (w/v)BSA を含む Hanks' balanced salt solution (Gibco BRL)

- LB 培地

液体培地は Bacto Trypton (Becton Dickinson)10 g、Bacto Yeast Extract (Becton Dickinson)5 g、NaCl 5 g を MilliQ で 1 L とし、高圧蒸気滅菌した培地。

寒天培地は、液体培地の組成に Bacto Agar (Becton Dickinson)15 g を加えた組成で作製した。その後、ampicillin sodium salt (Sigma-Aldrich)を 100 µg/mL となるように溶かし、シャーレにまいて固めた。

- running gel buffer (pH 8.8)

Tris (Wako) 90.85 g (final 1.8 M)、SDS (Wako) 4.0 g、MilliQ up to 500 mL

- stacking gel buffer (pH 6.8)

Tris 60.6 g (final 0.8 M)、SDS 2.0 g、MilliQ up to 500 mL

- 10 x Running buffer

Tris 90.9 g、glycine (Wako) 432.0 g、SDS 30.0 g、MilliQ up to 3 L

- 6 x non reducing (reducing) SDS sample buffer

BPB (Wako) 1.2 mg、SDS 1 g、upper gel buffer 7 mL、glycerol 3 mL [5% (v/v)]

2-mercaptoethanol (2-ME; Sigma-Aldrich)]

- Transfer buffer

25 mM Tris, 192 mM glycine を MilliQ で 1 L とする

- CPRG (chlorophenolered  $\beta$ -D-galactopyranoside) reaction Buffer

100 mM 2-ME、9 mM MgCl<sub>2</sub> (Wako)、0.125% (v/v)NP-40 (Wako)を含む PBS (-)

- CPRG reaction buffer

100 mM 2-ME、9 mM MgCl<sub>2</sub>、0.125% NP-40 を含む PBS (-)

- Alkaline phosphatase buffer

100 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 100 mM Tris-HCl 溶液 (pH 9.5)

## 2-2 抗体

抗 myc 抗体 (9E10)は、ハイブリドーマ (CRL-1729)を ATCC より購入し、当研究室卒業生胡博士が培養上清からプロテイン A カラムで精製したものを使用した。PE 標識抗マウス IgG 抗体は、goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG (H+L) human ads-phycoerythrin (PE)標識抗体を Southern Biotech より購入した (catalog number: 1032-09 以後 GAM-PE と表記)。horseradish peroxidase (HRP)標識抗マウス IgG 抗体は、peroxidase-conjugated affiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) を Jacson ImmunoResearch より購入した(catalog number: 115-035-166、以後 GAM-HRP と表記)。alkaline phosphatase (AP)標識抗ヒト IgG Fc 抗体は、anti-human IgG (Fc specific) AP conjugate を Sigma-Aldrich より購入した (catalog number: A9544、以後 Fc-AP と表記)。AP 標識抗マウス IgG 抗体は、blotting grade affinity purified goat anti-mouse IgG (H+L) alkaline phosphatase conjugate を BIO-RAD より購入した (catalog number: 170-6520、以後 GAM-AP と表記)。抗マウス Cochlin 抗体は、rabbit polyclonal (IgG) anti cochlin 抗体を LS Bio より購入した (catalog number LS-C334796-50、以後抗 mCochlin 抗体と表記)。抗ヒト Cochlin 抗体は、当研究室卒業生古澤が作製し、培養上製からプロテイン A カラムで精製したものを使用した (以後抗 hCochlin 抗体と表記)。AP 標識抗ラビット IgG 抗体は、AP-conjugate AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L)を Jackson ImmunoResearch より購入した (catalog

number: 111-055-003、以後 GAR-AP と表記)。

### **2-3 細胞培養**

細胞培養は全て 37°C、5% CO<sub>2</sub> を供給するインキュベーターで行った。特に記述のない限り、細胞培養には Tissue culture 100 mm dish (MIDSCI) を使用した。細胞培養に使用した培地は以下に示す。

D10 培地： 10%非働化 FCS (Sigma-Aldrich)、25 mM HEPES-NaOH、100 U/mL penicillin G (Sigma-Aldrich)、100 µg/mL streptomycin (Wako)、2 mM L-glutamine (Wako)、50 µM 2-ME を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich)

R10 培地： 10%非働化 FCS、100 U/mL penicillin G、100 µg/mL streptomycin、2 mM L-glutamine、50 µM 2-ME を含む RPMI 1640 medium (Invitrogen)。

HEK293 および HEK293T 細胞は D10 培地で培養した。

レトロウイルスパッケージング細胞である Platium-E (以後、Plat-E と表記)細胞は東京大学医科学研究所の北村俊雄博士から供与して頂いた (93)。Plat-E 細胞は D10 培地に 10 µg/mL blasticidin S-HCl (Invitrogen)、1 µg/mL puromycin (Sigma-Aldrich) を加えて培養した。

BWZ.36 細胞は California 大学の N. Shastri 博士から供与して頂いた (94)。BWZ.36 細胞は R10 培地で培養した。

### **2-4 GAG**

chondroitin (Chn)、chondroitin sulfate A (CS-A)、chondroitin sulfate B (CS-B)、chondroitin sulfate C (CS-C)、hyaluronic acid (HA)、heparan sulfate (HS) はいずれも生化学工業より購入した。Heparin (Hep) は CALBIOCHEM より購入した。chondroitin sulfate D (CS-D) は PG リサーチより購入した。Chondroitin sulfate E (CS-E) は Wako より購入した。2 位脱硫酸化 heparin (2-*O*-desulfated Hep)、6 位脱硫酸化 heparin (6-*O*-desulfated Hep)、*N* 位脱硫酸化再アセチル化 heparin (*N*-desulfated re*N*-acetylated heparin; *N*-desulfated Hep) はいずれもフナコシより購入した。

## **2-5 GAG-BSA conjugate の作製**

Chn-BSA、CS-A-BSA、CS-B-BSA、CS-C-BSA、CS-D-BSA、HA-BSA、HS-BSA、Hep-BSA、2-*O*-desulfated Hep-BSA、6-*O*-desulfated Hep-BSA、*N*-desulfated Hep-BSA は当研究室卒業生古澤、柳原が作製したものを使用した（古澤修士論文、柳原修士論文）。

CS-E 1 mg を MilliQ 80  $\mu$ L に溶解し、5 mg/mL *N*-ethoxycarbonyl-2-ethoxy- 1, 2-dihydroquinoline (EEDQ; wako) エタノール溶液を 100  $\mu$ L 添加した後、室温で 1 時間静置した。反応液を 4°C に冷却した後、MilliQ 100  $\mu$ L に溶解した BSA 2 mg を添加し、4°C で 24 時間静置した。反応液に TBS (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl) を加えて活性化されたカルボキシ基を不活化し、CS-E-BSA 溶液を得た。

CS-E-BSA 溶液の濃度は、BSA を標準としてとして BCA protein assay kit (Thermo) を用いて算出した。作製した CS-E-BSA は SDS-PAGE に供し、カップリングが行われていることを確認した。

### **2-5-1 SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)**

#### **■ゲルの作製**

電気泳動は Laemmli の方法に従って行った (95)。ゲルは下層に running gel、上層に stacking gel となるように作製した。10% (7.5%) running gel 溶液 [30% (w/v) アクリルアミド溶液 (Wako) 6.0 (4.5) mL、running gel buffer 4.5 mL、MilliQ 水 7.5 (9.0) mL] に 4 mg の過硫酸アンモニウム (APS; Wako)、7.5  $\mu$ L の tetraethylethylenediamine (TEMED; Wako) を加え、適量をゲル板に流し込み、2-propanol (Wako) を重層させて空気を遮断し重合させた。Running gel の重合が完了したのを確認した後、2-propanol を除去した。Stacking gel 溶液 [30% (w/v) アクリルアミド溶液 7.5 mL、stacking gel buffer 4.5 mL、MilliQ 水 6 mL] に 2 mg の過硫酸アンモニウム、7.5  $\mu$ L の TEMED を加え、running gel に重層させ、コームを挿入して重合させた。

## ■泳動および CBB 染色

サンプルに適量の 6 x non reducing SDS sample buffer または 6 x reducing SDS sample buffer を加え懸濁した後、95°C で 5 分間熱処理を行ったものを SDS-PAGE に供した。泳動には Mini protein III system (Bio-Rad) を用い、1 x running buffer (10 x running buffer を MilliQ 水で 10 倍希釈したもの) 中で 200V 定電圧下、60 分間行った。CBB 染色によってタンパク質の検出を行う場合には、CBB 染色液 [methanol (Wako) : 酢酸 : MilliQ 水 = 5 : 1 : 5、Coomassie brilliant blue R-250 (ICN) 0.5 g/100 mL] に浸し、振とうさせながら 30 分程度染色した後、脱染色 I 液 [methanol : 酢酸 : MilliQ 水 = 5 : 1 : 4] 及び脱染色 II 液 [methanol : 酢酸 : MilliQ = 5 : 10 : 85] を用いて脱染色を行った。

### 2-5-2 BCA assay

BCA standard [25 µg/mL、125 µg/mL、250 µg/mL、500 µg/mL、750 µg/mL、1,000 µg/mL、1,500 µg/mL、2,000 µg/mL] およびサンプルの希釈液 (2 倍希釈、4 倍希釈) を作製し、96-well ELISA plate (High protein binding; Greiner) に 50 µL アプライした。それぞれのサンプルに BCA assay reagent A、B (Thermo) を 50 : 1 で混合した溶液 200 µL を添加した後 37°C で 15 分間静置した。液が紫色に変わったことを確認後、吸光度計 (波長: 570 nm) で測定した。

### 2-6 レポーター細胞の作製

Cochlin の糖結合活性を検証するため、当研究室卒業生古澤、柳原が作成したヒト、マウス Cochlin (ヒト : *COCH*、マウス : *Coch*) をマウス CD3ζ鎖との融合タンパク質として細胞表面に発現するレトロウイルスベクターを使用した (古澤修士論文、柳原修士論文)。このベクターは N 末端から myc タグ、*COCH* の終止コドンを除いたコーディング領域の全長 (aa 2~550)、NK 細胞受容体の一つで I 型膜タンパク質であるマウス NKp46 (Genbank : NM\_010746) の stalk 領域 (aa 212~254 残基の領域)、I 型膜貫通タンパク質であるマウス CD8α (Genbank : BC030679) の膜貫通領域 (CD8α の aa 143~181 残基の領域)、IL-2 シグナルを伝達するマウス CD3ζ (Genbank : BC052824) 鎖



細胞内領域 (CD3 $\zeta$ 鎖の aa 52~164 残基の領域)を発現するようにレトロウイルスベクター-pMXs-IRES-GFP に組み込んだものである。なお、遺伝子組み換え実験は、「遺伝子組み換え生物等の使用実施規則」に基づき新領域創成科学研究科バイオサイエンス委員の承認を受けて実施した。

## ■ ウイルス感染

作製したそれぞれのレトロウイルスベクターを用い、Cochlin レポーター細胞を作製した。レトロウイルスパッケージング細胞株 Plat-E に pMXs/myc-m*Coch*-NKp46-CD8 $\alpha$ -CD3 $\zeta$ または pMXs/h*COCH*-NKp46-CD8 $\alpha$ -CD3 $\zeta$ をトランスフェクトしてレトロウイルスを以下の方法に従って作成し、そのウイルスを BWZ.36 細胞に感染させることを行った。

Plat-E 細胞を 6-well 培養プレート (Falcon)に  $1 \times 10^5$  cells/well になるようにまき、24 時間培養した後 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen)を用い、4  $\mu$ g の pMXs/myc-m*Coch*-NKp46-CD8 $\alpha$ -CD3 $\zeta$ または pMXs/h*COCH*-NKp46-CD8 $\alpha$ -CD3 $\zeta$ を Plat-E 細胞にトランスフェクトし、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下のインキュベーター内で培養した。2 日後に培養上清を回収し、3,500 rpm、4°C、10 分間遠心し、得られた上清をレトロウイルス液とした。前日に 6-well 培養プレートに  $1 \times 10^5$  cells/well でまき培養していた BWZ.36 細胞にレトロウイルス液および polybren (Wako)を終濃度 8  $\mu$ g/mL となるように添加し 37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下のインキュベーター内で培養した。2 日間培養した BWZ.36 細胞を Cochlin レポーター細胞とした。

## ■ FACS

作製した Cochlin レポーター細胞の細胞表面にレポーター分子が発現しているかを、抗 myc 抗体または抗 hCochlin 抗体を用いた FACS 解析により調べた。

各レポーター細胞をセルカウントし、 $1 \times 10^5$  cells/well で 96-well U 底プレート (Falcon)に細胞を添加した。1,800 rpm、4°C で 3 分間遠心し上清を捨て、200  $\mu$ L の FACS buffer で 1 回洗浄した後 FACS buffer で 5  $\mu$ g/mL に希釈した抗 myc 抗体または抗 hCochlin 抗体を 30  $\mu$ L/well で加え、氷上で 30 分間反応させた。200  $\mu$ L/well の FACS

buffer で 2 回洗浄した後、FACS buffer で 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した GAM-PE を 30  $\mu\text{L}/\text{well}$  で加え、遮光下、氷上で 30 分間反応させた。200  $\mu\text{L}$  の FACS buffer で 2 回洗浄した後、細胞を 200  $\mu\text{L}$  の FACS buffer で懸濁して 1.2 mL クラスタチューブ (CLP) に細胞懸濁液を移した。測定前に 3 mg/mL PI を 30  $\mu\text{L}/\text{well}$  で加え、FACS Calibur で測定し、CELL Quest (Becton Dickinson)、Flowjo (Tree Star Inc.) でデータ解析を行った。

### ■ レポーターアッセイ

レポーター細胞表面上のレポーター分子と GAG との結合をレポーターアッセイにより解析した。また、当研究室卒業生古澤が作製した DFNA9 患者にみられる変異を導入した Cochlin 変異体レポーター細胞を用いたレポーターアッセイも行った (古澤修士論文)。

96-well ELISA プレートに、PBS (-) で 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した抗 myc 抗体または 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した GAG-BSA (Chn-BSA、CS-A-BSA、CS-B-BSA、CS-C-BSA、CS-D-BSA、CS-E-BSA、HA-BSA、HS-BSA、Hep-BSA、6-*O*-desulfated Hep-BSA、2-*O*-desulfated Hep-BSA、*N*-desulfated Hep-BSA) を 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  加え 4°C で一晩静置し、抗体、GAG-BSA の固相化を行った。200  $\mu\text{L}/\text{well}$  の PBS (-) で 3 回洗浄し、R10 培地で希釈した各レポーター細胞を 200  $\mu\text{L}/\text{well}$  ( $1 \times 10^5$  cells) で加え、37°C、5%  $\text{CO}_2$  条件下のインキュベーター内で 16 時間培養した。1,800 rpm、4°C で 3 分間遠心し、上清を除き、150  $\mu\text{L}/\text{well}$  の PBS (-) で洗浄した。上清を除き、ボルテックスで細胞塊を崩し、CPRG reaction buffer に溶解した 0.15 mM chlorophenolred  $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG; Wako) を 150  $\mu\text{L}/\text{well}$  加え、37°C で 1 時間静置した。溶液の色が黄色から紫色に変わったことを確認後、吸光光度計 (Labsystems, Multiskan JX; 波長 : 570 nm, 630 nm) で測定した。

## 2-7 Cochlin Fc 融合タンパク質作製

### 2-7-1 ヒト Cochlin Fc 融合タンパク質発現ベクター作製

ヒト Cochlin の糖結合活性を検証するため、ヒト Cochlin とヒト IgG Fc 領域を融合したキメラタンパク質を作製した。N 末端から CD8 $\alpha$  のシグナル配列、myc タグ、*COCH* のシグナル配列および終止コドンを除いた全長 (aa 27~550)、hIgG Fc 領域を発現するように pCAGGS-puro (pCAGGs ベクターにピューロマイシン耐性遺伝子が組み込まれており、薬剤セレクションが可能) に組み込んだ。ヒト Cochlin (Genbank: NM\_004086.1) cDNA 断片は、当研究室卒業生古澤が作製した pBlueScript II SK(+) ベクターに導入されたプラスミドを鋳型とし (古澤修士論文)、プライマー hCOCH full-ss Fw/MunI、hCOCH full-end Rv/XhoI および KOD-plus DNA polymerase (Toyobo) を用い、総計 50  $\mu$ L の反応容量で [pre-denature: 94°C 2 min, denature: 94°C 30 sec, annealing: 55°C 45 sec, elongation: 68°C 2 min] x 30 サイクルで PCR を行うことにより増幅した。その後 PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、DNA を精製した。精製後の DNA 断片を制限酵素 EcoRI および XhoI で切り出し、同様に制限酵素処理したベクター pCAGGS puro に挿入した。用いたプライマーの配列を以下に示す。

hCOCH full-ss Fw/MunI : 5'-ccgcaattggccgctcccattgct-3'

hCOCH full-end Rv/XhoI : 5'-ccgctcgagttgctgggattct-3'

#### ■アガロースゲル電気泳動による DNA の精製

PCR で増幅した DNA 断片および制限酵素処理により得た DNA 断片は、1%アガロースゲルを用いて 1 x TAE 中、100 V で泳動し目的の DNA バンドを切り出した。精製には QIAquick gel extraction kit (Qiagen) を用いた。アガロースゲルは、1% (w/v) のアガロース (SeaKem ME agarose; CAMBREX) を泳動用バッファー (1 x TAE) に溶解させ、etydium bromide (Sigma) を終濃度 0.1 mg/mL になるように添加した後、ゲル化させて作製した。

#### ■DNA ライゲーションおよび大腸菌への形質転換

ライゲーションは、Ligation Mix (Takara)を用いて行った。プラスミドベクターとインサート DNA 断片のモル比が 1 : 10 となるよう調製した DNA 溶液 5  $\mu$ L に、等量の Ligation Mix を添加し、16°C で 1 時間反応させた。このライゲーション反応液 5  $\mu$ L を、50  $\mu$ L の DH5 $\alpha$ 株コンピテントセルに加え、ヒートショック法 (42°C 30 秒)によってトランスフォーメーションを行った。その後、100  $\mu$ g/mL の ampicillin を選択薬剤として含む LB プレート (LB/Amp プレート)にまいて 37°C で 16 時間培養した。

#### ■プラスミド抽出

100  $\mu$ g/mL ampicillin を含む LB 培地を用いて LB/Amp プレート上に形成されたシングルコロニーを 37°C で 16 時間振とう培養した後、FastGene plasmid mini kit (日本ジェネティクス)を用い、大腸菌からのプラスミド抽出を行った。

#### ■DNA シークエンス解析

作製したプラスミドのシークエンス解析は DNA sequencing kit (ABI PRISM)を用いた dye terminator 法によって確認した。解析には ABI 3500 Genetic analyzer (Applied Biosystems)を用いた。

#### ■Lipofection

作製した発現ベクターを用い、hCochlin-Fc 融合タンパク質を作製した。HEK293 細胞を 6-well 培養プレートに  $1 \times 10^5$  cells/well になるようにまき、24 時間培養した後 Lipofectamine 2000 reagent を用い、4  $\mu$ g の pCAGGS-puro/ myc-hCOCH-hIgG Fc をトランスフェクトし、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下のインキュベーター内で培養した。2 日後に培養上清を回収し、3,500 rpm、4°C、10 分間遠心し、得られた上清を Western blotting に供し、hCochlin Fc 融合タンパク質の発現を確認した。また Fc 融合タンパク質の発現が確認できた細胞は、6 cm dish に拡大培養し、2  $\mu$ g/mL puromycin を培養上清に加え 1 から 2 週間培養することにより薬剤セレクションを行った。薬剤セレクション後の細胞を安定発現細胞とした。

### 2-7-2 ヒト Cochlin 変異体 Fc 融合タンパク質発現ベクター作製

DFNA9 患者でみられる変異を *COCH* 遺伝子に挿入することで、GAG との結合が wild-type と比較して変化するかを調べるために、DFNA9 患者でみられる変異を導入した Cochlin 変異体の Fc 融合タンパク質を作製した。Cochlin 変異体 DNA 断片は、当研究室卒業生古澤が作製した pCDNA3.1 発現ベクターに導入されたプラスミドを鋳型とし（古澤修士論文）、以下のプライマーを用いて 7-1 と同様の方法でベクターを作製した。用いたプライマーの配列を以下に示す。

hCOCH full-ss Fw/MunI: 5'-ccgcaattggccgctcccattgct-3'

hCOCH full-end Rv/XhoI: 5'-ccgctcgagttgctgggattct-3'

### 2-7-3 FLAG タグ付加ヒト Cochlin 変異体タンパク質発現ベクター作製

DFNA9 患者でみられる変異を *COCH* 遺伝子に挿入した Cochlin 変異体の構造が変化しているか、また 542 番目のシステイン残基がジスルフィド結合に関与しているかを調べるために、DFNA9 患者でみられる変異を導入した Cochlin 変異体に FLAG タグを付加したリコンビナントタンパク質を作製した。Cochlin 変異体 DNA 断片は、当研究室卒業生古澤が作製した pCDNA3.1 発現ベクターに導入されたプラスミドを鋳型とし（古澤修士論文）、以下のプライマーを用いて 7-1 と同様の方法でベクターを作製した。用いたプライマーの配列を以下に示す。

hCOCH full ss Fw/XhoI: 5'-ccgctcgagtgctccgcagcctggatcccggc-3'

hCOCH full FLAG Rv/EcoRV:

5'-ccggatatcttacttgctgctcatgctctttgtagtccatttgetgggattetaag -3'

### 2-7-4 マウス Cochlin Fc 融合タンパク質発現ベクター作製

#### ■ マウス Cochlin 発現ベクター作製

マウス Cochlin の糖結合活性を検証するとともに、マウス内耳の免疫染色に用いるため、マウス Cochlin とヒト IgG Fc 領域を融合したキメラタンパク質を作製した。当研究室卒業生柳原が作製した（柳原修士論文）pMXs/myc-mCoch-NKp46-CD8 $\alpha$ -CD3 $\zeta$ 発現ベクターから、マウス Cochlin のシグナル配列および終止コドンを除いた全長（aa27

～552 残基)を制限酵素 EcoRI と XhoI を用いて切り出し、同様に制限酵素消化した pCAGGS-puro/myc-hIgG Fc (pCAGGS-puro ベクターに、myc タグおよびヒト IgG Fc 領域を組み込んでいる)ベクターに組み込んだ。7-1 と同様の方法で lipofection を行った。

#### ■マウス Cochlin LCCL ドメイン発現ベクター作製

Cochlin の LCCL ドメインと GAG との結合性を調べるために、マウス Cochlin の LCCL ドメインとヒト IgG Fc 領域を融合したキメラタンパク質を作製した。当研究室卒業生柳原が作製した pBlueScript II SK (+)ベクターに導入されたマウス Cochlin を鋳型とし (柳原修士論文)、マウス Cochlin の LCCL ドメイン (aa 32～114 残基)を制限酵素 EcoRI および XhoI を付加したプライマー mCOCH LCCL Fw/EcoRI、mCOCH LCCL Rv/XhoI を用いて増幅した。その後 PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、DNA を精製した。精製後の DNA 断片を制限酵素 EcoRI および XhoI で切り出し、同様に制限酵素処理したベクター pCAGGS-puro /myc-hIgG Fc に組み込んだ。7-1 と同様の方法で Lipofection を行った。用いたプライマーの配列を以下に示す。

mCOCH LCCL Fw/EcoRI : 5'-caagaattcgttccattctctgt-3'

mCOCH LCCL Rv/XhoI : 5'-ttgctcgaggaaggacgc-3'

#### **2-7-5 Western blotting**

Fc 融合タンパク質の発現を Western blotting により確認した。マウス Cochlin LCCL ドメイン Fc 融合タンパク質は発現量が少なかったため、protein A Sepharose (GenScript)を用いて培養上清のアフィニティー精製・濃縮を行った。1.5 mL tube (Watson)に protein A Sepharose 30  $\mu$ L、培養上清 600  $\mu$ L を入れ、4°C で 1 時間ローテーションした。PBS (-)で 2 回洗浄した後、40  $\mu$ L の glycine HCl pH 2.7 で Fc 融合タンパク質を Sepharose から溶出させた後、Tris-HCl pH 9.0 を用いて溶出液を直ちに中和した。

培養上清または protein A で精製した培養上製を SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE の終了したゲルから PVDF 膜 Immobilon-P (Millipore)に semi-dry 法でタンパク質を

転写した。転写には trans blot SD drmi-dry transfer cell (Bio-Rad)を用い、Transfer buffer 中で 15V 定電圧下 90 分間転写した。転写後の PVDF 膜を 3% Difco skim milk (Becton Dicknson)を含む TBS-T 中、1 時間室温でブロッキングを行った後、3% Difco skim milk を含む TBS-T で 5,000 倍希釈した抗 myc 抗体または抗 Fc-AP 抗体 4 mL をハイブリバッグ (コスモ・バイオ)に添加し 1 時間室温で振とうさせた。PVDF 膜を TBS-T で 5 回洗浄した後、3% Difco skim milk を含む TBS-T で 10,000 倍希釈した GAM-HRP 4 mL をハイブリバッグに添加し 1 時間室温で振とうさせた。PVDF 膜を TBS-T で 5 回洗浄した後、HRP の場合は Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore)を反応させ、Image Quast LAS4000 (GE ヘルスケア)で検出した。AP の場合は 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP; 東京化成)、nitro blue tetrazolium (NBT; Wako)を含む AP buffer 中で反応を行った。

#### **2-7-6 ELISA**

ヒトおよびマウス Cochlin と GAG との結合性を評価するために、ELISA 法による結合解析を行った。96-well ELISA プレートに 5 µg/mL の抗 myc 抗体または 15 µg/mL の GAG-BSA (Chn-BSA、CS-A-BSA、CS-B-BSA、CS-C-BSA、CS-D-BSA、CS-E-BSA、HS-BSA、Hep-BSA、2-*O*-desulfated Hep-BSA、6-*O*-desulfated Hep-BSA、*N*-desulfated Hep-BSA、HA-BSA)を 50 µL/well で添加し、4°C 一晩静置することで固相化を行った。各 well に添加した溶液を除去し、TBS-T 200µL で 2 回洗浄を行った。3% skim milk を 200 µL/well で添加し、1 時間室温で静置しブロッキングを行った。TBS-T 200 µL で 2 回洗浄を行った後、各 Fc 融合タンパク質 (培養上清)40 µL を各 well に添加し、1 時間室温で静置した。TBS-T 200 µL で 2 回洗浄を行った後、TBS-T で 10,000 倍希釈した Fc-AP 抗体を 50 µL/well で加え室温で 1 時間静置した。TBS-T 200 µL で 5 回洗浄した後、20 mL の MilliQ 水で溶解した Sigmafast *p*-nitrophenyl phosphate tablet (SIGMA)を 100 µL/well で添加し、37°C で 10 分から 30 分間反応させた。溶液の色が黄色に変わりつつあることを確認後、吸光度計 ((Labsystems, Multiskan JX; 波長: 405 nm)で測定を行った。

## 2-8 マウス内耳の免疫染色

### ■動物

日本エスエルシー株式会社より近交系 C57BL/6J マウス (♀)を購入し、研究室の SPF (specific pathogen-free)飼育室で飼育した。実験には 8 から 13 週齢のマウスを用いた。動物実験は、「東京大学動物実験実施規則」に基づき新領域創成科学研究科バイオサイエンス委員の承認を受けて実施した。

### ■マウス内耳の採取

マウスを台に固定し、ジエチルエーテルによる麻酔を行った後、PBS (-)による灌流、4%パラホルムアルデヒド (Wako)による固定を行った。マウスの首の後ろから鼻先までの皮膚を切り、切った皮膚を左右に剥がした。頭骨の中心の窪みに沿って首の後ろから鋏で切り込みを入れ、ピンセットを用いて頭骨を左右に剥がした後、スパーテルで脳を取り出した。口を開いてその両側を耳の穴に向かって切り下あごを切り離れた後、耳の穴と繋がった頭骨の内側に存在する三角形の骨で包まれた内耳を採取した。このとき、周りに付着している肉片は可能な限り鋏とピンセットで取り除いた。

### ■パラフィン包埋

採取した内耳を 4%パラホルムアルデヒド/PBS (-)に浸し 4°C で一晩静置した。内耳の周囲を覆っている頭蓋骨は固く切片を切ることができないため、脱灰し頭蓋骨を柔らかくした。脱灰は内耳を 120 mM EDTA に浸し、1 週間室温で静置することで行った。その間 2 日ごとに EDTA 液を交換した。内耳を取り出し、エタノールを用いて段階的 (70%、80%、99.5%)に脱水を行った。最終的にモレキュラーシーブ 4A 1/16 (nacalaitesque)を加え完全に水を除去した 100%エタノールに浸すことで脱水を完了させた。脱水した内耳をキシレンに浸し、65°C の乾燥機内でキシレン、パラフィン (paraplast; Sigma-Aldrich)を 1 : 1 で混ぜた混合液に浸しパラフィンに馴染ませた後、パラフィンで包埋を行った。



#### ■切片作製

包埋した内耳を熱したカッターナイフで切り出し、トリミングをしながらパラフィンブロック大 (As One)に固定した。マイクロトーム (RV-240; 大和光機工業)に Microtome Holder (Feather)および刃 (Feather)をセットし、13  $\mu\text{m}$  の切片を切り micro slide glass (Matsunami, S9444)に付着させた。

#### ■脱パラフィン

切片の染色を行うために脱パラフィンを行った。切片が付着したスライドグラスをキシレンに浸しパラフィンを溶かした後、100%エタノールに浸した。エタノールの濃度を段階的 (99.5%、80%、70%)に下げながら水に馴染ませ、最終的に MilliQ 水に置換した。

#### ■HE 染色

内耳組織の全体像を把握するため、脱パラフィンを行った切片を Hematoxylin & Eosin (HE)染色した。切片が付着したスライドグラスにヘマトキシリン (Mayer's Hematoxylin Solution; Wako)をのせ、5 分間室温で反応させた。流水で洗浄した後、スライドグラスに MilliQ 水をのせ、45°C で 15 分間静置することで発色を行った。MilliQ 水を除去した後 200  $\mu\text{L}$ のエオシン (0.5% Eosin Y ethanol solution; Wako)をのせ、10 分間室温で反応させた。その後 99.5%エタノールで洗浄し、エタノールの濃度を段階的に増加させることで脱水を行った後キシレンに浸し、最終的に Eukitt (O. Kindler)中に封入した。封入したサンプルを顕微鏡で観察した。

#### ■mCochlin Fc タンパク質および抗体による染色

切片の抗原性を高めるために、脱パラフィン後の切片を用いて抗原の賦活化を行った。賦活化は切片に 200  $\mu\text{L}$  の L.A.B. Solution (Liberate antibody binding solution; Polysciences)をのせ室温で 10 分間静置することで行い、その後 PBS (-)で 3 回洗浄を行った。スライドグラスに 200  $\mu\text{L}$  の mCochlin Fc 融合タンパク質が含まれている培養上清、mock Fc 融合タンパク質 (myc タグおよびヒト IgG Fc 領域により構成)が含まれ

ている培養上清、または PBS (-) で 400 倍希釈した抗 mCochlin 抗体をのせ、1 時間室温で反応させた。反応は、スライドガラスが乾かないように、湿らせたキムワイプを入れたタッパ中で行った。TBS-T で 3 回洗浄した後、TBS-T で 2,000 倍希釈した抗 Fe-AP 抗体または抗 GAR-AP 抗体をのせ、1 時間室温で反応させた。TBS-T で 3 回洗浄した後、200  $\mu$ L の AP 基質 (16.5 mg/mL BCIP/dimethylformamide (DMF) を AP buffer で 100 倍希釈) をのせ、37°C で 20 分間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄した後、Eukitt 中に封入し、顕微鏡で観察した。

## **2-9 マウス内耳 GAG の二糖組成解析**

### **■ マウス内耳の GAG 抽出**

マウス (C57BL/6J、♀、8-12 週齢) を灌流固定し内耳を摘出した (詳細はマウス内耳の採取参照)。内耳を鋏で細かく切った後、polytron homogenizer PT 3100 (セントラル科学貿易) を用いて内耳をホモジェナイズした。アセトンによる脱脂を行い、4°C デシケーター中で乾燥させることで内耳のアセトンパウダーを得た。アセトンパウダーを 0.5 M  $\text{CaCl}_2$  を含む 0.5 M ホウ酸バッファー pH 8.0 中でアクチナーゼ E (科研製薬) 消化し、アセトンパウダーに含まれるタンパク質を分解した後、trichloroacetic acid (TCA; Wako) 沈殿によりタンパク質を除去した。次にエタノール沈殿 (80%) により高分子 (GAG) を沈殿させて回収し、PD-10 (GE healthcare) を用いた脱塩を行うことで GAG 画分を得た。

### **■ heparinase 消化**

内耳に存在する HS/Hep 二糖組成を決定するために、内耳から抽出した GAG を加水分解した。25 mM  $\text{CaCl}_2$  (Wako) を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 7.0)、37°C 中で heparinase I, II, III (Sigma-Aldrich) を一晩反応させた。

### **■ chondroitinase 消化**

内耳に存在する CS/DS 二糖組成を決定するために、内耳から抽出した GAG を加水分解した。60 mM sodium acetate、0.02% BSA を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、37°C

中で chondroitinase ABC (Sigma-Aldrich)を一晩反応させた。

#### ■消化産物の蛍光標識

GAG を heparinase I, II, III あるいは chondroitinase ABC で加水分解した反応液を乾燥させた後、蛍光試薬を含む溶液 (0.35 M 2-アミノベンズアミド (2-AB; nacalaitesque)と 1.0 M シアノ水素化ホウ素ナトリウム (関東化学)を含むジメチルスルホキシド (Wako) : 酢酸 = 7 : 3 (v/v)混合液)を 20  $\mu$ L ずつ加え、65°C で 2 時間反応させ、糖鎖の還元末端を蛍光標識した (96)。反応後、未反応の 2-AB 試薬をクロロホルム (Wako)抽出により除去した (97)。

#### ■ゲルろ過 HPLC

2-AB 標識した GAG を Superdex peptide (GE Healthcare)を用いてゲルろ過 high performance liquid chromatography (HPLC)による解析を行った。流速 0.4 mL/min、0.2 M 重炭酸アンモニウム (Wako)で溶出し、励起波長 330 nm、検出波長 420 nm の蛍光をモニターした。標品の溶出位置と比較することにより、二糖画分を分取した。

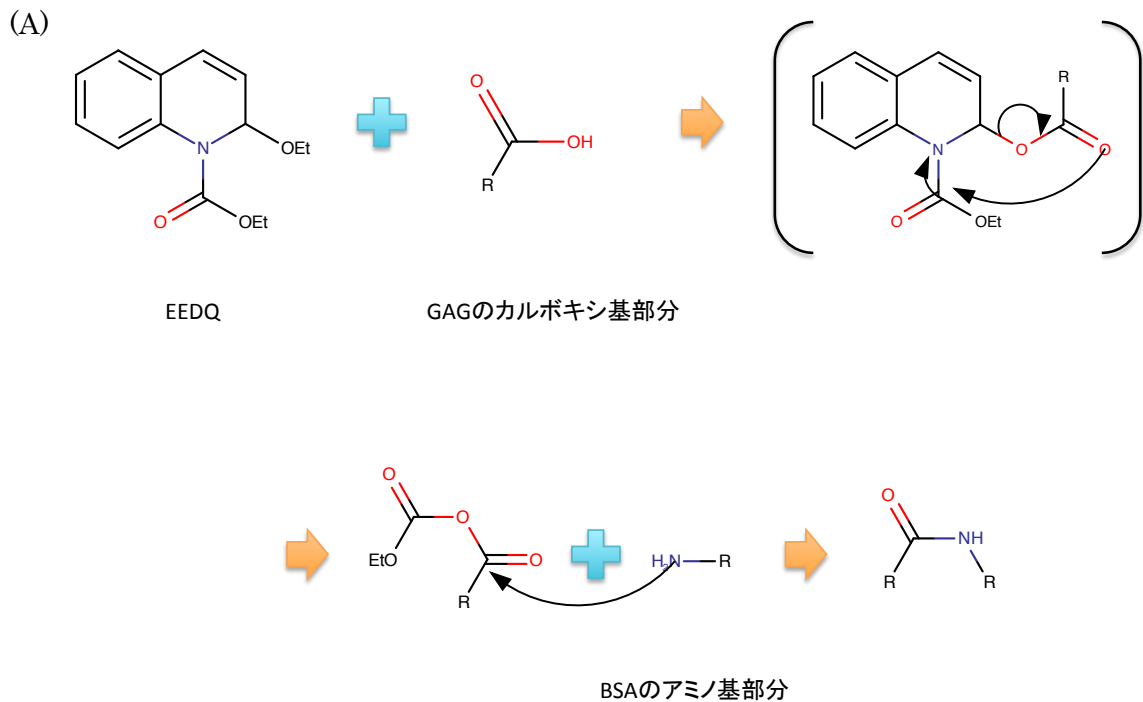
#### ■イオン交換 HPLC

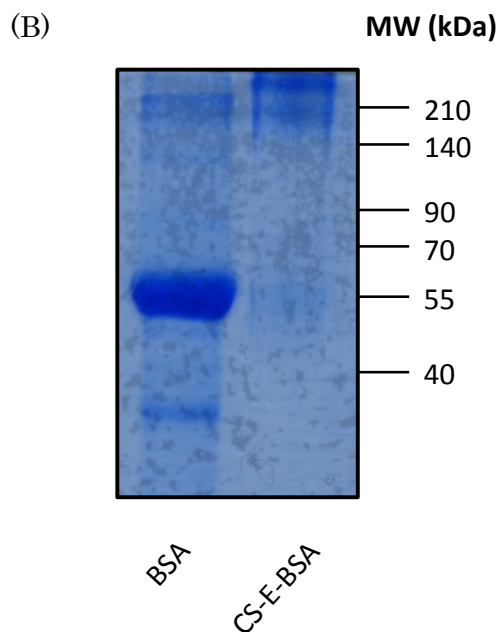
ゲルろ過 HPLC で回収した二糖画分を Hi Trap DEAE FF (0.7 x 2.5 cm、volume: 1 mL、GE Healthcare) を用いてイオン交換 HPLC 解析を行った。流速 0.4 mL/min、Tris-HCl 溶液 pH 7.2 中で NaCl の濃度を直線勾配で上昇[0-5 分: 0 M、5-10 分: 0-200 mM、10-60 分: 200~1000 mM]させて溶出し、励起波長 330 nm、検出波長 420 nm の蛍光をモニターした。HS/Hep または CS/DS 由来の標準二糖の 2-AB 誘導体の溶出位置と比較することにより、各ピークの構造を同定した。

### 3. 結果

#### 3-1 CS-E-BSA conjugate の作成

細胞外マトリックスの主成分である CS や HS などの GAG は親水性であるため、疎水性の ELISA プレートに固相化することができない。そこでカップリング試薬の EEDQ を用いることで GAG と BSA とをカップリングし、ELISA プレートに固相化できるようにした。カップリング反応は、GAG のウロン酸（グルクロン酸とイズロン酸）に存在するカルボキシル基をカップリング試薬 EEDQ で活性化し、BSA のアミノ基との間に共有結合を形成させるというものである (Fig. 8A)。カップリング反応後、CS-E-BSA を SDS-PAGE に供し、カップリング反応が行われたことを確認した (Fig 8B)。SDS-PAGE の結果、CS-E-BSA のバンドは BSA の分子量 (69 kDa) よりも高分子側にシフトしていた (210 kDa 以上)。さらに、BSA の分子量の位置 (69 kDa) にバンドが見られないことから、反応に供した BSA は完全にカップリングされていると考えられる。また、CS-E-BSA の濃度を BSA の濃度として BCA assay により定量した。その結果、CS-E-BSA の濃度は、4.25 mg/mL であった。また、他の GAG-BSA conjugate も同様の方法で作製した。





**Fig. 8 CS-E-BSA conjugate 作製**

(A) EEDQ によるカップリング反応機構。構造式中の矢印は電子の移動を示す。カップリング試薬 EEDQ により GAG 中のカルボキシル基を活性化し、BSA のアミノ基と共有結合を形成させる。(B) CSE-BSA の SDE-PAGE 泳動図。ポリアクリルアミドゲルは 7.5% のものを用い、SDS-PAGE 後 CBB 染色を行った。BSA はカップリング反応に供していない BSA を、CSE-BSA は CS-E を BSA とカップリングしたものを示す。

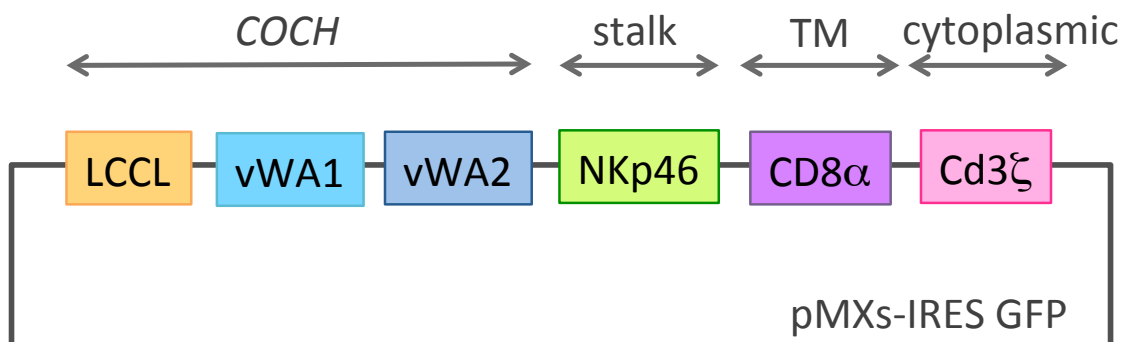
### 3-2 ヒト Cochlin と GAG との結合性解析

#### 3-2-1 ヒト Cochlin レポーター細胞と GAG との結合性解析

##### ■ ヒト Cochlin レポーター細胞作製

ヒト Cochlin の糖結合性を評価するために、レポーター細胞を作製した。レポーター細胞には T リンパ腫 BW5147 細胞に IL-2 プロモーターの制御下でβガラクトシダーゼ遺伝子を発現するレポーター遺伝子を導入した細胞株 BWZ.36 を用いている。この細胞に N 末端から myc タグ、シグナル配列および終止コドンを除いた *COCH* 全長、NKp46 の stalk、I 型膜タンパク質である CD8αの膜貫通ドメイン (transmembrane domain; TM)、IL-2 シグナルを伝達するマウス CD3ζ鎖細胞内領域を付加した組み換え体タンパク質を発現させたヒト Cochlin レポーター細胞を作製した。作製したヒト Cochlin レポーター細胞を抗 hCochlin 抗体を用いたフローサイトメトリーに供することで、細胞表面における組み換え体タンパク質の発現を確認した (Fig. 9)。抗 hCochlin 抗体を用いたフローサイトメトリー解析の結果、ヒト Cochlin レポーター細胞のヒストグラムは、mock レポーター細胞 (myc タグ、NKp46 stalk、CD8α TM、CD3ζ 細胞内領域を発現している) と比較して大きく右側にシフトした。このことから細胞表面におけるヒト Cochlin レポーター分子の発現を確認することができた。

(A)



(B)

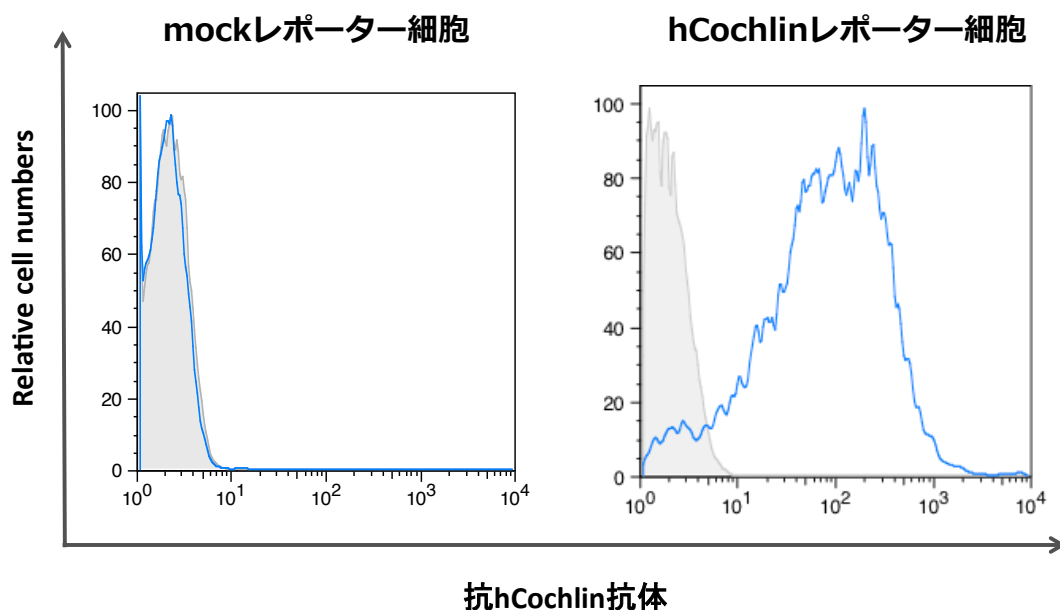


Fig. 9 ヒト Cochlin レポーター細胞の発現確認。

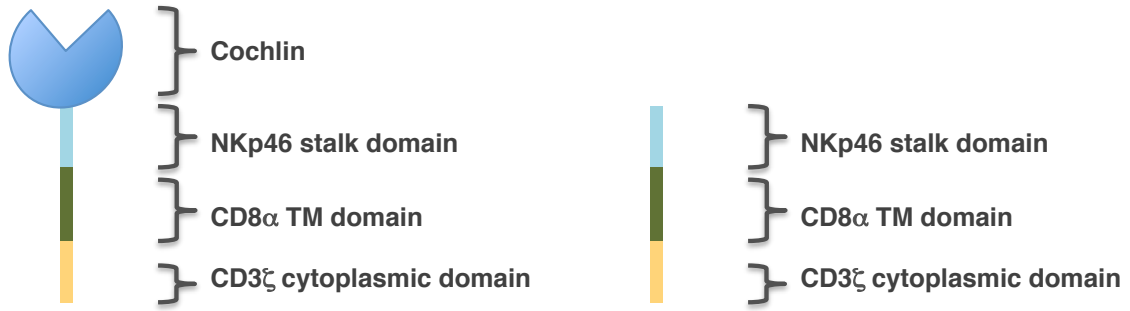
(A)ヒト Cochlin 発現ベクターのコンストラクト。N 末端側から、ヒト Cochlin タンパク質、NKp46 の stalk 領域、CD8 $\alpha$ の膜貫通領域、CD3 $\zeta$ の細胞内領域を発現するように作製した。(B)ヒト Cochlin レポーター細胞のフローサイトメトリ解析。左図は mock レポーター細胞、右図はヒト Cochlin レポーター細胞を示している。灰色部分は一次抗体なしのネガティブコントロール、青線は抗 hCochlin 抗体を添加した際の蛍光強度のヒストグラムを示す。

#### ■ヒト Cochlin レポーター細胞を用いた reporter assay

ヒト Cochlin が認識する糖鎖構造を同定するため、当研究室卒業生古澤、柳原が作製した GAG-BSA、および今回新たに作成した CS-E-BSA を ELISA プレートに固相化し、レポーターアッセイを行った。レポーターアッセイの原理を簡単に記す。細胞表面に発現させた Cochlin キメラタンパク質 (Fig. 10A)が糖に結合し架橋されることで細胞質側に付加したマウス CD3 $\zeta$ 鎖が IL-2 シグナルを伝達し、最終的に $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現するため、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定することで糖への結合の有無や強弱を評価することができる (Fig. 10B)。レポーターアッセイを行った結果、ヒト Cochlin

は CS-E、Hep、2-O-desulfated Hep、6-O-desulfated Hep と、またわずかに CS-B と結合することが判明した。

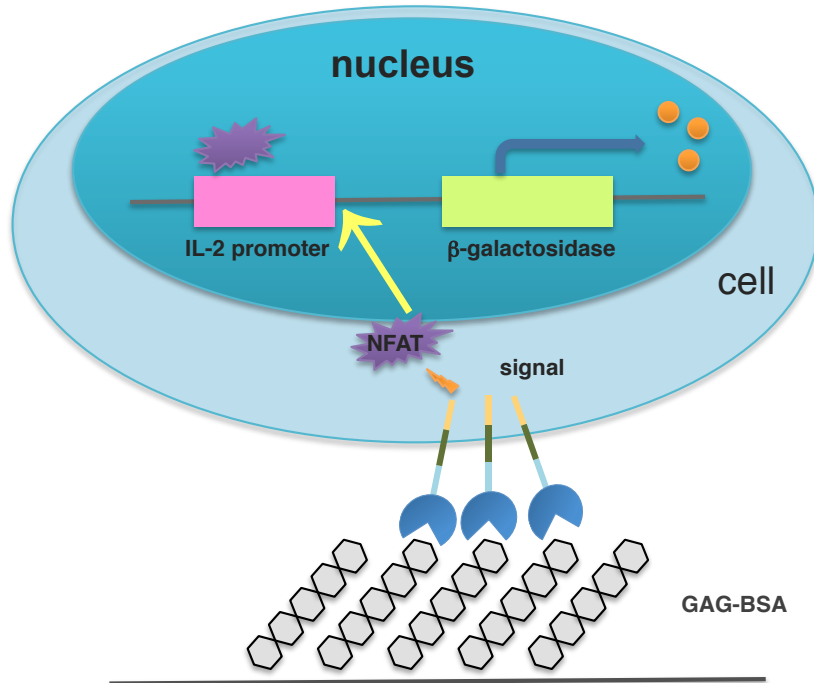
(A)



Cochlinレポーター分子

mockレポーター分子

(B)





(C)

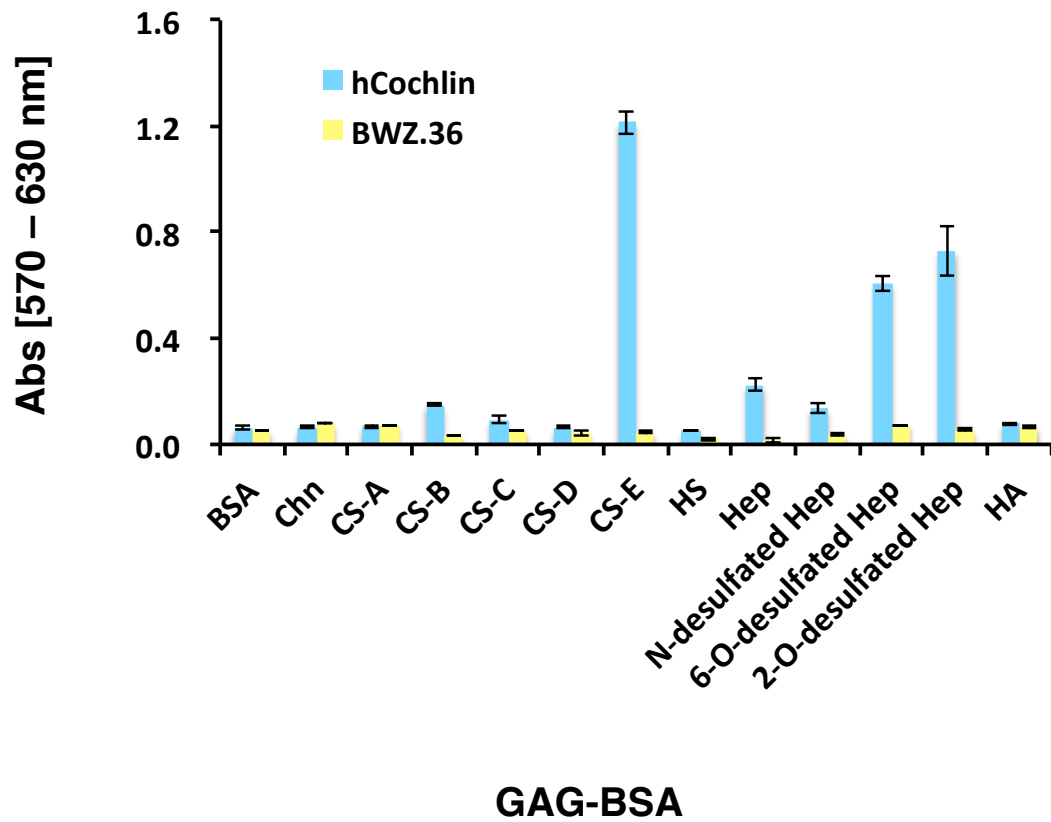


Fig. 10 レポーターアッセイ

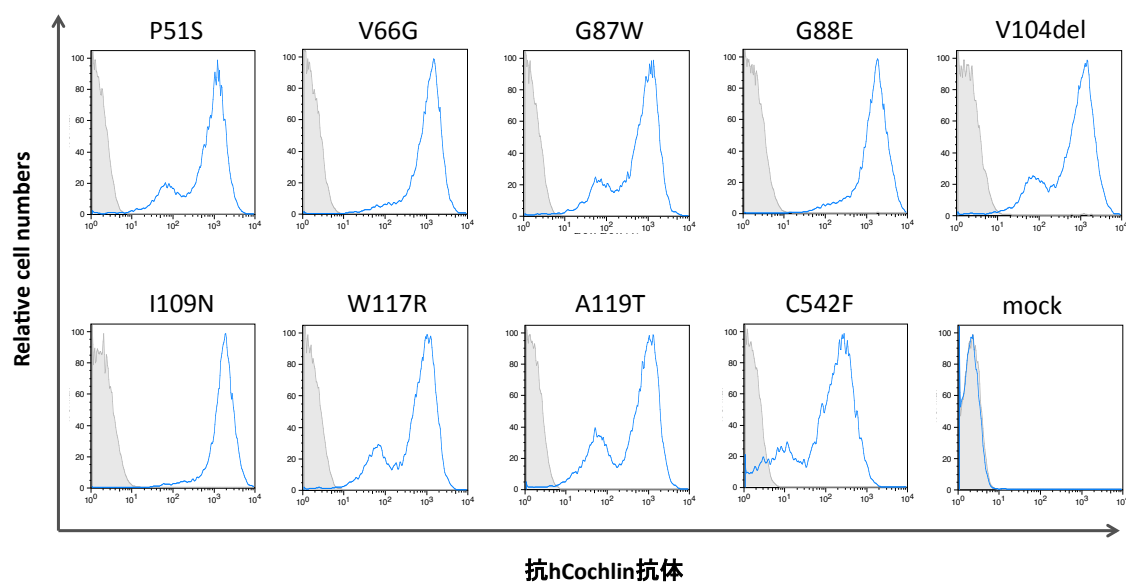
(A) Cochlin および mock レポーター分子の模式図。Cochlin レポーター分子はヒト Cochlin タンパク質、NKp46 の stalk 領域、CD8 $\beta$ の膜貫通領域、CD3 $\zeta$ の細胞内領域を組み合わせた分子である。一方 Mock レポーター分子は NKp46 の stalk 領域、CD8 $\beta$ の膜貫通領域、CD3 $\zeta$ の細胞内領域を組み合わせた分子である。(B)レポーターアッセイ原理。細胞表面に発現させた Cochlin キメラタンパク質がリガンドとなる糖鎖と結合し架橋刺激が入ると、CD3 $\zeta$ から細胞内でシグナル伝達を開始され、転写因子である nuclear factor of activated T-cell (NFAT)の脱リン酸化が起こり、IL-2 プロモーターを活性化することで $\beta$ -ガラクトシダーの発現が誘導される。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性を検出することで Cochlin の糖鎖への結合の有無や強弱を測定することができる。(C)ヒト Cochlin レポーター細胞と GAG とのレポーターアッセイ。BSA はカップリン

グしていない BSA 単独を固相化したもの、Chn は Chn-BSA、CS-A は CS-A-BSA、CS-B は CS-B-BSA、CS-C は CS-C-BSA、CS-D は CS-D-BSA、CS-E は CS-E-BSA、HA は HA-BSA、HS は HS-BSA、Hep は Hep-BSA、6-*O*-desulfated Hep は 6-*O*-desulfated Hep-BSA、2-*O*-desulfated Hep は 2-*O*-desulfated Hep-BSA、*N*-desulfated Hep は *N*-desulfated Hep-BSA を固相化したものをそれぞれ示す。結果はそれぞれ平均値と標準偏差を示す (n=3)。同様の実験を 2 回以上行い、いずれにおいても同様の結果を得た。

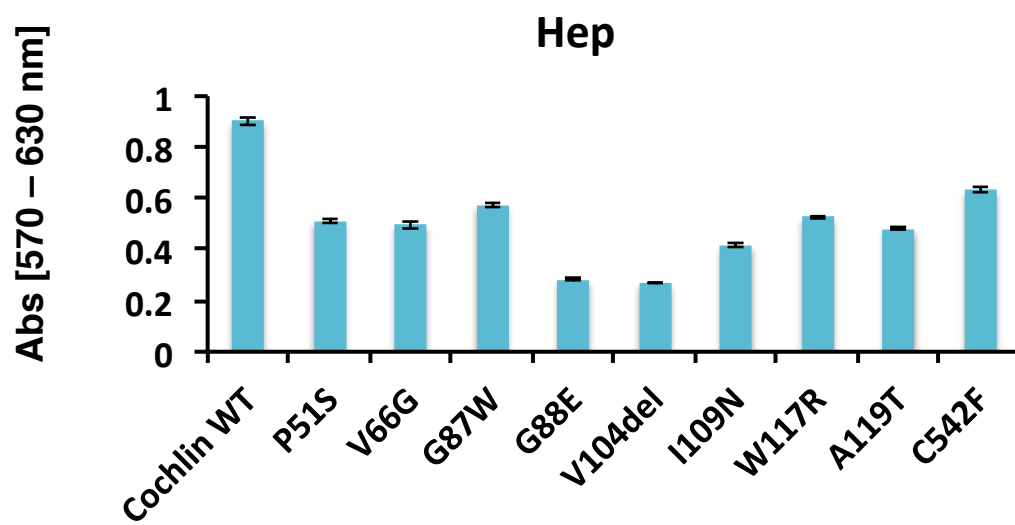
#### ■ ヒト Cochlin 変異体レポーター細胞を用いたレポーターアッセイ

DFNA9 患者では *COCH* 遺伝子上に様々な変異が入っていることが報告されている。変異が入ることによって Cochlin と GAG との結合性が変化するかを調べるために、DFNA9 患者由来の変異を導入したヒト Cochlin 変異体を細胞表面に発現させたヒト Cochlin 変異体レポーター細胞を作成した。作製したヒト Cochlin 変異体レポーター細胞を抗 hCochlin 抗体を用いたフローサイトメトリーに供することで、細胞表面における組み換え体タンパク質の発現を確認した (Fig. 11A)。抗 hCochlin 抗体を用いたフローサイトメトリー解析の結果、ヒト Cochlin 変異体レポーター細胞のヒストグラムは、mock レポーター細胞 (myc タグ、NKp46 stalk、CD8 $\alpha$  TM、CD3 $\zeta$  細胞内領域を発現している) と比較して右側にシフトした。このことから全ての Cochlin 変異体レポーター細胞表面におけるヒト Cochlin 変異体レポーター分子の発現を確認することができた。しかし、変異体によりヒト Cochlin リコンビナントタンパク質の発現量は異なっていた。次にこれらヒト Cochlin 変異体レポーター細胞を用いて Hep との結合性を評価した。各ヒト Cochlin 変異体レポーター細胞のリコンビナントタンパク質の発現量が揃っていなかったため、Hep に対する結合性を抗 hCochlin 抗体に対する結合性を 1 としたときの相対値で示した (Fig. 11B, C)。その結果、WT と比較して全てのヒト Cochlin 変異体において Hep や *N*-desulfated Hep との結合性が減少する傾向にあった。

(A)



(B)



(C)

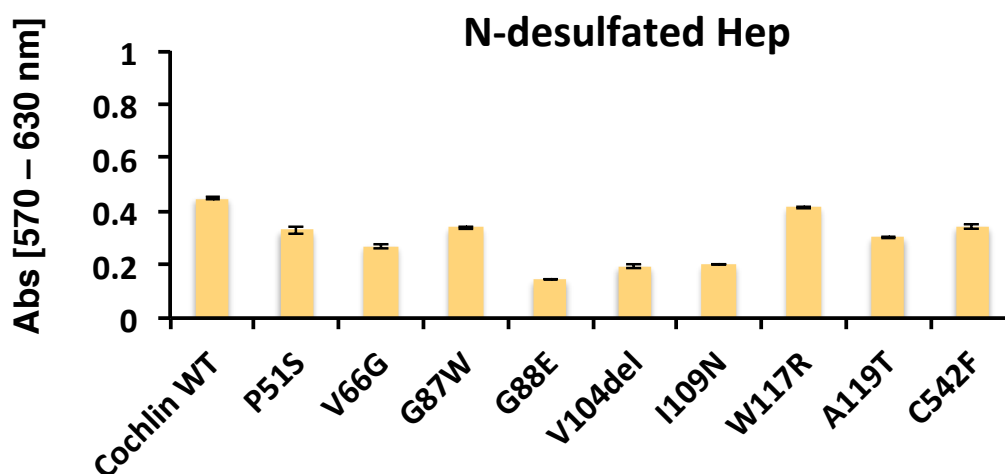


Fig. 11 ヒト Cochlin 変異体レポーター細胞と Hep、N-desulfated Hep とのレポーターアッセイ。

(A) ヒト Cochlin 変異体レポーター細胞のフローサイトメトリー解析。灰色部分は一次抗体なしのネガティブコントロール、青線は抗 hCochlin 抗体を添加した際の蛍光強度のヒストグラムを示す。P51S は 51 番目のプロリンがセリンに置換された変異体、以下同様の表記法で V66G、G87W、G88E、V104del (104 番目のバリンの欠損)、I109N、W117R、A119T、C542F の 9 種類の変異を導入したヒト Cochlin 変異体レポーター細胞を mock は mock レポーター細胞を用いたことをそれぞれ示す。Cochlin 変異体と Hep (B)、N-desulfated Hep (C) との結合性をレポーターアッセイにより解析した。Cochlin WT はヒト野生型 Cochlin、P51S は 51 番目のプロリンがセリンに置換された変異体、以下同様の表記法で V66G、G87W、G88E、V104del (104 番目のバリンの欠損)、I109N、W117R、A119T、C542F の 9 種類の変異を導入したヒト Cochlin 変異体を用いたことをそれぞれ示す。それぞれのレポーター細胞における Cochlin 変異体レポーター分子の発現率の差を、抗 hCochlin 抗体への結合を基準に標準化した。具体的には、抗 hCochlin 抗体を固相化したときの 570 nm の吸光度を 1 としたときの GAG-BSA を固相化した時の 570 nm の吸光度、つまり (GAG-BSA)

/(抗 hCochlin 抗体)の値を縦軸にとった。結果はそれぞれ平均値と標準偏差を示す (n=3)。同様の実験を 2 回以上行い、いずれにおいても同様の結果を得た。

### 3-2-2 ヒト Cochlin 変異体 Fc 融合タンパク質と GAG との結合性解析

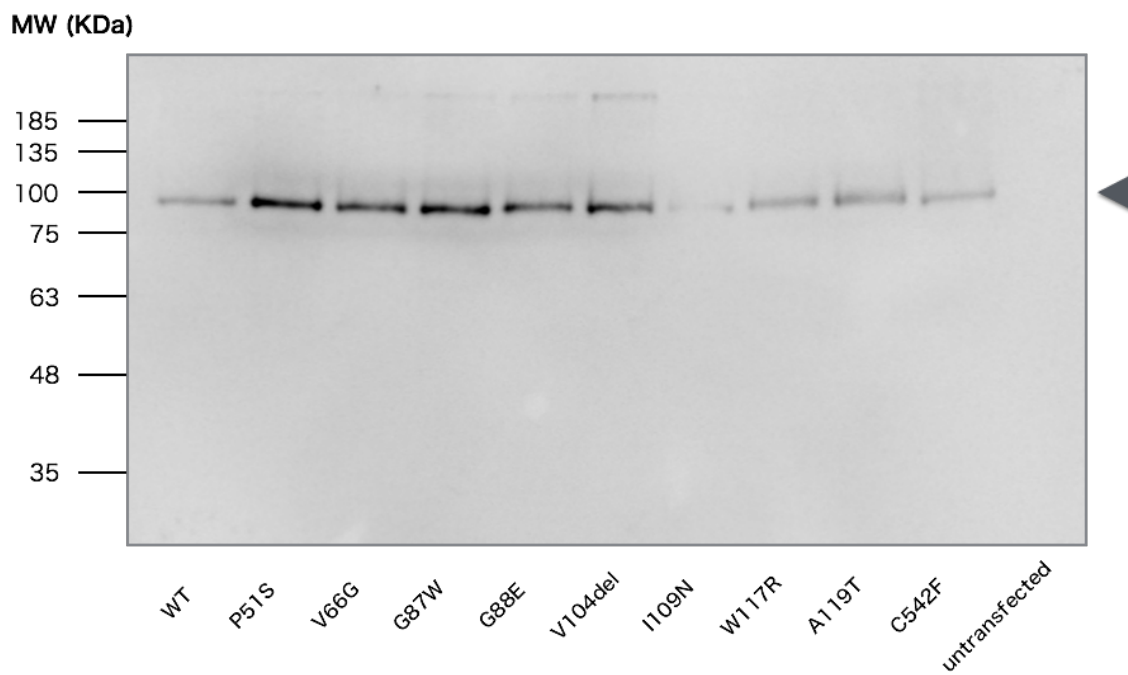
DFNA9 患者でみられる変異を導入したヒト Cochlin 変異体レポーター細胞を作成し、Hep との結合性を評価した。しかし、複数種類のレポーター細胞を作成したところレポーター分子の発現にばらつきが生じてしまい、発現量をコントロールし揃えることが困難であった。そこで、ヒト Cochlin 変異体 Fc 融合タンパク質を作成し、ELISA の系によって糖鎖との結合性を評価することにした。分泌タンパク質としてそれぞれの Cochlin 変異体を作成することによって濃度を揃えたアッセイが容易になると考えた。

#### ■ Western blotting

作製した各ヒト Cochlin 変異体発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクトし、N 末端から myc タグ、シグナル配列および終止コドンを除いた *COCH* 全長、ヒト IgG Fc 領域を付加した組み替えタンパク質を培養上清中に分泌させた (Fig. 12A)。培養上清を回収して抗 myc 抗体を用いた Western blotting に供し、Fc 融合タンパク質の発現を確認した (Fig. 12B)。ヒト Cochlin Fc 融合タンパク質の分子量 87 kDa の位置にバンドが検出されたことから (▶の位置)、ヒト Cochlin Fc 融合タンパク質の発現が確認された。また、185 kDa 以上の高分子の位置にもバンドが検出された。これは変異体によって濃さが異なっていることからタンパク質が熱処理によりアグリゲートしたものである可能性がある。



(B)



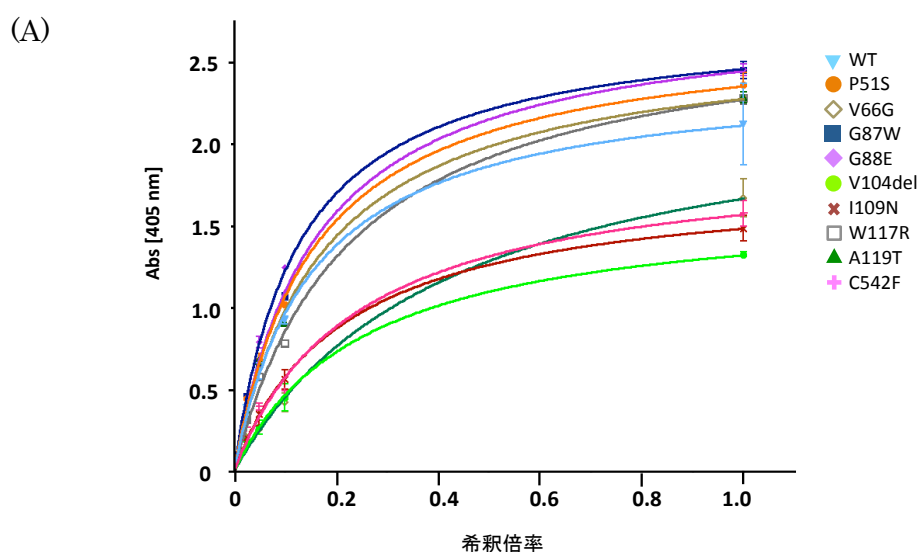
**Fig. 12 cochlin Fc 融合タンパク質の Western blotting**

(A) Cochlin Fc 融合タンパク質の模式図。Cochlin Fc 融合タンパク質は N 末端から myc タグ、シグナル配列および終止コドンを除いた *COCH* 全長、ヒト IgG Fc 領域を発現するように作製した。(B) ヒト Cochlin Fc 融合タンパク質の Western blotting。HEK293 細胞の培養上清を回収し、抗 myc 抗体を用い

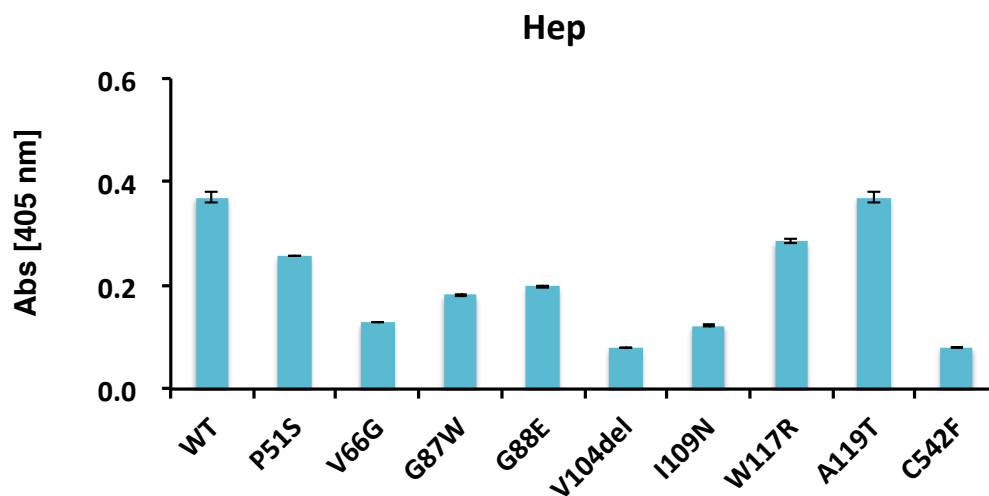
た western blotting に供した。ポリアクリルアミドゲルは 10% のものを用いた。Cochlin WT は野生型の Cochlin Fc 融合タンパク質、P51S は 51 番目のプロリンがセリンに置換された変異体、以下同様の表記法で V66G、G87W、G88E、V104del (104 番目のバリンの欠損)、I109N、W117R、A119T、C542F の 9 種類の変異を導入したヒト Cochlin 変異体 Fc 融合タンパク質をそれぞれ示す。untransfected はリポフェクションを行っていない HEK293 の培養上清を示す。黒矢印 (▶) は、Cochlin Fc 融合タンパク質のバンドの位置 (87 kDa) を示す。

#### ■ ELISA によるヒト Cochlin Fc 融合タンパク質と GAG との結合解析

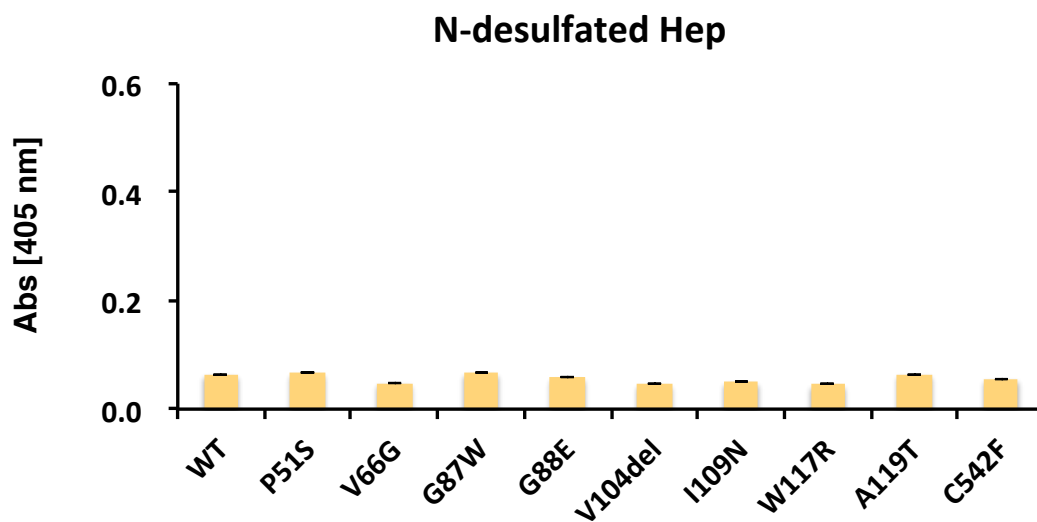
培養上清に含まれている各ヒト Cochlin 変異体 Fc 融合タンパク質の濃度を揃えるために、抗 myc 抗体を固相化した ELISA プレート上に濃度を振った培養上清 (原液、10 倍希釈、20 倍希釈、40 倍希釈) をのせ、抗 Fc AP 抗体で検出を行った。縦軸に 405 nm の吸光度、横軸に希釈倍率をプロットしたグラフを作成し (Fig. 13A)、発色から 10 分後の吸光度が 0.8 になる希釈倍率を決定した。この希釈倍率を用いて Hep、N-desulfated Hep、CS-E に対する結合性を ELSIA の系で評価した。その結果、ヒト Cochlin WT と比較してヒト Cochlin 変異体では Hep や CS-E との結合性が低下していた (Fig. 13B, C, D)。特に V66G や V104del、I109N、C542F では Hep との結合性が、G87W、C542F では CS-E との結合性が半分以下にまで低下していた。また、ヒト Cochlin WT と同様に N-desulfated Hep との結合性はみられなかった。



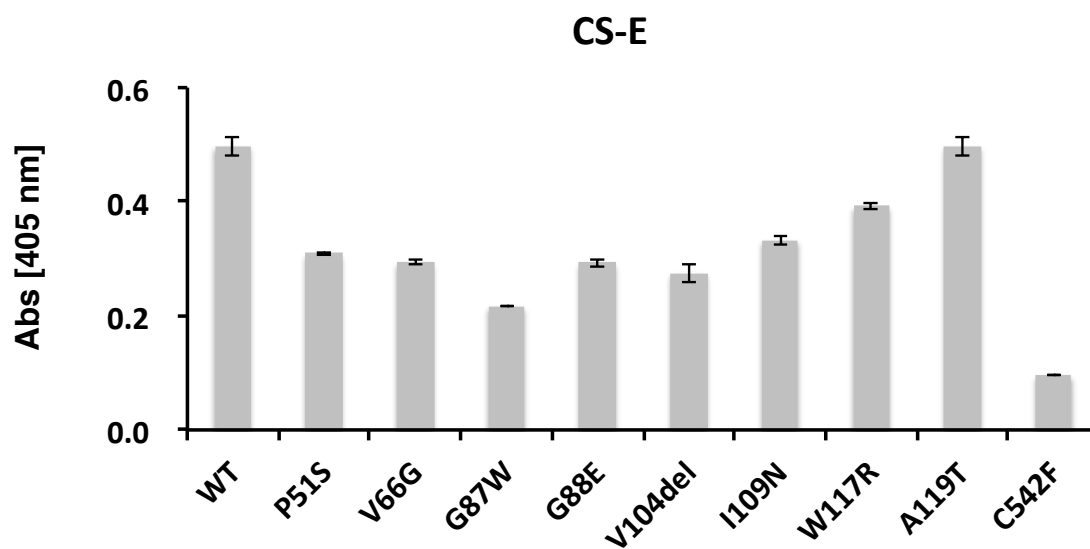
(B)



(C)



(D)





(E)

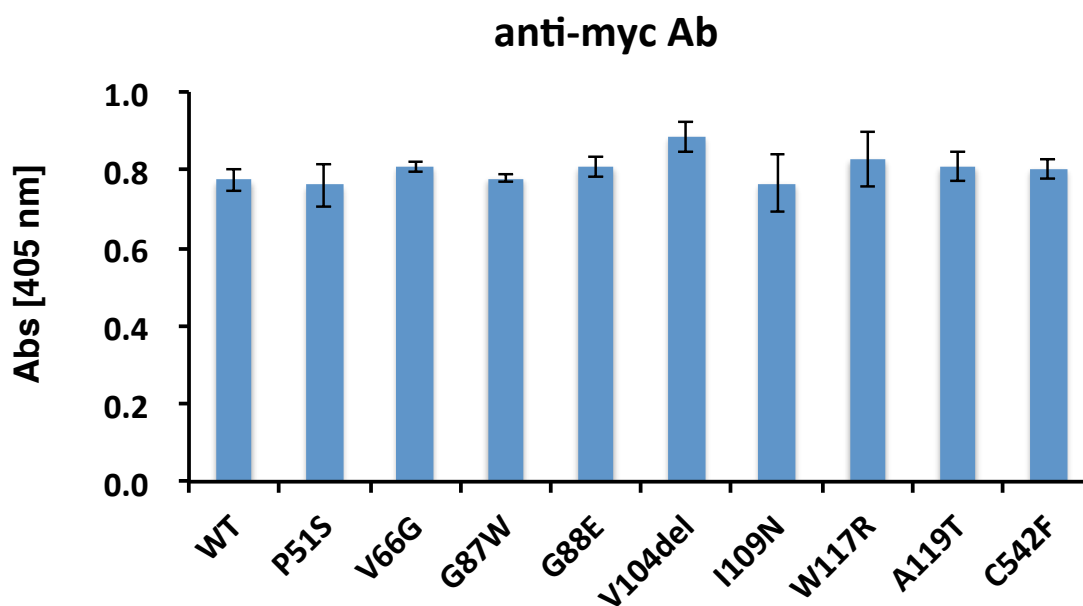


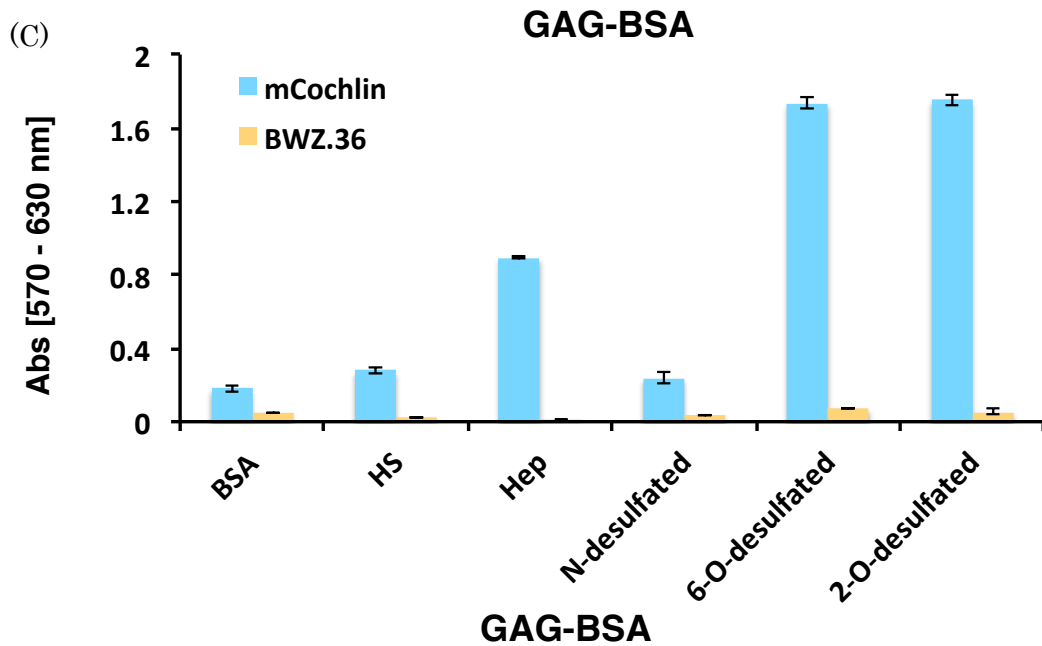
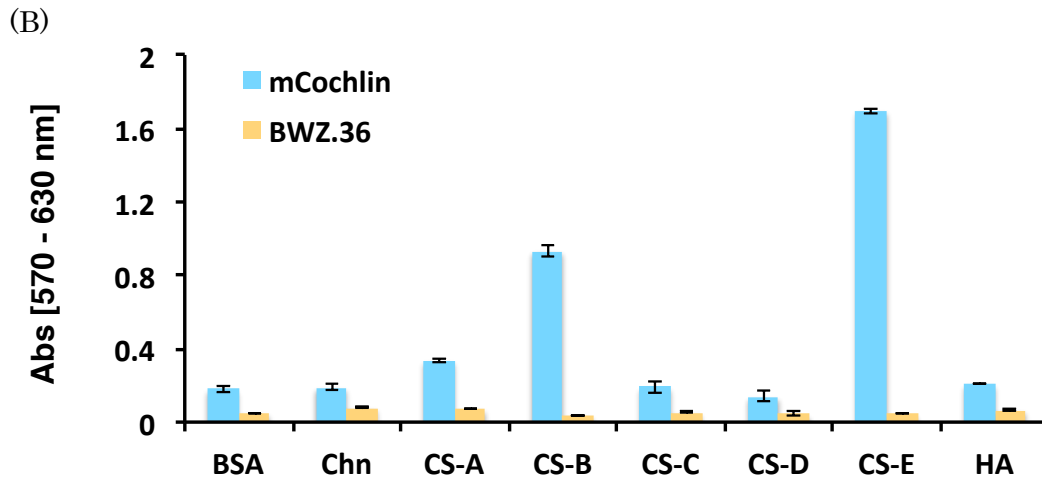
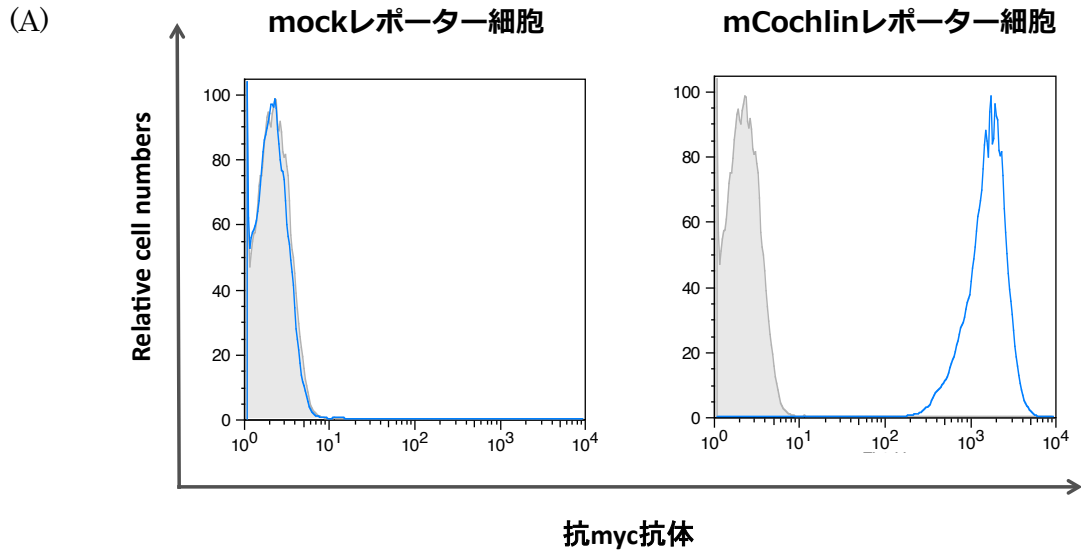
Fig. 13 ELISA によるヒト Cochlin 変異体 Fc 融合タンパクと GAG との結合性解析

(A)抗 myc 抗体を用いた ELISA による相対濃度の測定。抗 myc 抗体を固相化した際の各ヒト Cochlin 変異体の吸光度を測定し、縦軸に 405 nm の吸光度、横軸に希釈倍率をプロットした。ELISA によるヒト Cochlin 変異体と Hep (B)、*N*-desulfated Hep (C)、CS-E (D)、抗 myc 抗体 (E)との結合性解析。WT は野生型のヒト Cochlin Fc 融合タンパク質、P51S は 51 番目のプロリンがセリンに置換された変異体、以下同様の表記法で V66G、G87W、G88E、V104del (104 番目のバリンの欠損)、I109N、W117R、A119T、C542F の 9 種類の変異を導入したヒト Cochlin 変異体 Fc 融合タンパク質をそれぞれ示す。それぞれの Fc 融合タンパク質発現の僅差を、抗 myc 抗体への結合を基準に標準化した。具体的には、抗 myc 抗体を固相化したときの 405 nm の吸光度を 1 としたときの各 GAG における 405 nm の吸光度、つまり (GAG-BSA)/(抗 myc 抗体)の値を縦軸にとった。結果はそれぞれ平均値と標準偏差を示す (n=3)。同様の実験を 2 回以上行い、いずれにおいても同様の結果を得た。

### 3-3 マウス Cochlin と GAG との結合性解析

#### 3-3-1 マウス Cochlin レポーター細胞と GAG とのレポーターアッセイ

実際にヒト内耳に Cochlin が結合する構造の GAG が存在するのか、また Cochlin が内耳のどの部分に発現しているのかを調べたいと考えているがヒトの組織を入手するのは困難である。そこで、ヒトとマウスの Cochlin の GAG に対する結合性を比較し、同様の傾向を示すのであればマウスの内耳を実験に用いることとした。BWZ.36 細胞に、N 末端から myc タグ、シグナル配列および終始コドンを除いた マウス *Coch* 全長、NKp46 stalk、I 型膜タンパク質である CD8 $\alpha$  の膜貫通領域、IL-2 シグナルを伝達するマウス CD3 $\zeta$  鎖細胞内領域を付加した組み換え体タンパク質を発現させたマウス Cochlin レポーター細胞を作製した。抗 myc 抗体を用いてフローサイトメトリーを行い、マウス Cochlin が細胞表面に発現していることを確認した (Fig. 14A) 後、ヒト Cochlin と同様の方法でレポーターアッセイを行った。その結果、マウス Cochlin は CS-B、CS-E、Hep、6-*O*-desulfated Hep、2-*O*-desulfated Hep と結合していた (Fig. 14B, C)。ヒト Cochlin レポーター細胞は CS-E、Hep、6-*O*-desulfated Hep、2-*O*-desulfated Hep と結合していた (Fig. 10C) ことから、マウスとヒト Cochlin では GAG の結合性が類似していることが判明した。しかし、ヒトではわずかな結合しかみられなかった CS-B に対してマウス Cochlin では Hep と同程度の強い結合性を示しており、CS-B に対する結合性はマウスとヒトで異なっていた。マウスとヒト Cochlin が類似した糖結合性を示していたことから、以後の実験はマウスを用いて行うこととした。



**Fig. 14** マウス Cochlin レポーター細胞と GAG とのレポーターアッセイ。

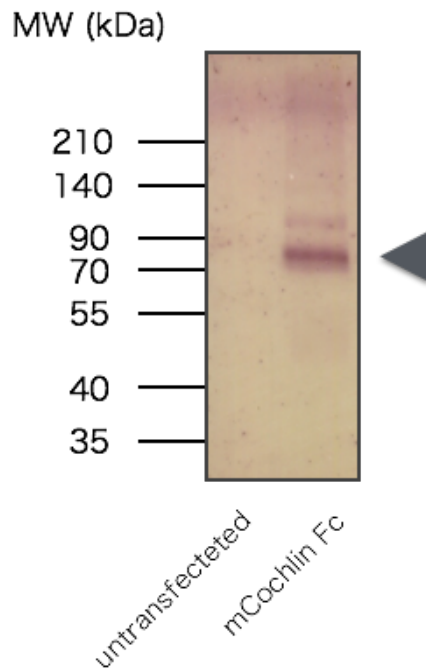
(A)マウス Cochlin レポーター細胞のフローサイトメトリー解析。左図は mock レポーター細胞 (N 末端から myc タグ、NKp46 の stalk、CD8 $\beta$  の TM、CD3 $\zeta$  の細胞内領域を発現する)右図はマウス Cochlin レポーター細胞を示している。灰色部分は一次抗体なしのネガティブコントロール、青線は抗 myc 抗体を添加した際の蛍光強度のヒストグラムを示す。マウス Cochlin レポーター細胞と CS/DS (B)、HS/Hep (C)とのレポーターアッセイ。BSA はカップリングしていない BSA 単独を固相化したもの、Chn は Chn-BSA、CS-A は CS-A-BSA、CS-B は CS-B-BSA、CS-C は CS-C-BSA、CS-D は CS-D-BSA、CS-E は CS-E-BSA、HA は HA-BSA、HS は HS-BSA、Hep は Hep-BSA、6-O-desulfated Hep は 6-O-desulfated Hep-BSA、2-O-desulfated Hep は 2-O-desulfated Hep-BSA、N-desulfated Hep は N-desulfated Hep-BSA を固相化したものをそれぞれ示す。結果はそれぞれ平均値と標準偏差を示す (n=3)。同様の実験を 2 回以上行い、いずれにおいても同様の結果を得た。

### **3-3-2 マウス Cochlin Fc 融合タンパク質と GAG との結合性解析**

内耳に Cochlin が結合する構造が存在するかを調べるために、ヒト IgG Fc 領域を付加したマウス Cochlin Fc 融合タンパク質を作成した。

#### **■Western blotting**

発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクトし、N 末端から myc タグ、シグナル配列および終止コドンを除いたマウス Cochlin 全長、ヒト IgG Fc 領域を付加した組み替えタンパク質を培養上清中に分泌させた。培養上清を回収し、プロテイン A で精製・濃縮を行った後 Western blotting に供し、抗 Fc AP 抗体を用いて Fc 融合タンパク質の発現を確認した。その結果、コントロールと比較してマウス Cochlin Fc 融合タンパク質では、予想される分子量 87 kDa 付近にバンドが検出された (Fig. 15)。また、Cochlin は、2ヶ所の N型糖鎖修飾部位をもつことが知られている。そのため、90 kDa よりもやや上に見られるバンドは、糖鎖修飾を受けた Cochlin であると考えられる。



**Fig. 15** マウス cochlin Fc 融合タンパク質の Western blotting

HEK293 細胞の培養上清を回収し、プロテイン A を用いて Fc 融合タンパク質を精製・濃縮した後、Western blotting に供した。ポリアクリルアミドゲルは 10% のものを用いた。mCochlin Fc はマウス Cochlin Fc 融合タンパク質、untransfected はリポフェクションを行っていない HEK293 細胞の培養上清をそれぞれ示す。黒矢印 (▶) は mCochlin Fc 融合タンパク質のバンドの位置 (87 kDa) を示す。

## ■ ELISA

マウス Cochlin Fc 融合タンパク質の GAG 結合性がマウスレポーター細胞を用いた GAG 結合性試験の結果と同様であるかを調べるために、ELISA の系でマウス Cochlin Fc 融合タンパク質と GAG との結合性を評価した。その結果、マウス Cochlin Fc 融合タンパク質は、CS-B、CS-D、CS-E、Hep に結合していた (Fig. 16)。マウス Cochlin レポーター細胞は、CS-B、CS-E、Hep と結合していた (Fig. 14B, C)ことから、マウス Cochlin Fc 融合タンパク質の GAG 結合性はマウス Cochlin レポーター細胞と類似していた。しかし、マウス Cochlin Fc タンパク質ではマウス Cochlin レポーター細胞では結合性がみられなかった CS-D との結合もみられた。

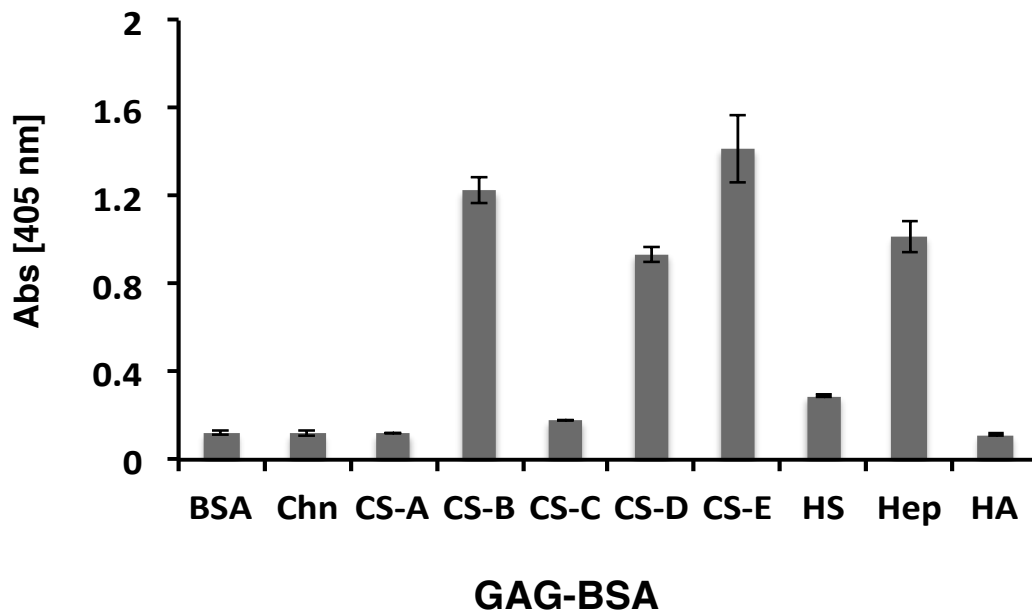


Fig. 16 マウス Cochlin Fc 融合タンパク質と GAG との結合解析。

BSA は GAG とカップリングしていない BSA 単独を固相化したもの、Chn は Chn-BSA、CS-A は CS-A-BSA、CS-B は CS-B-BSA、CS-C は CS-C-BSA、CS-D は CS-D-BSA、CS-E は CS-E-BSA、HA は HA-BSA、HS は HS-BSA、Hep は Hep-BSA を固相化したものをそれぞれ示す。結果はそれぞれ平均値と標準偏差を示す (n=3)。同様の実験を 2 回以上行い、いずれにおいても同様の結果を得た。

### 3-3-3 マウス Cochlin LCCL ドメイン Fc 融合タンパク質と GAG との結合性解析

#### ■Western blotting

発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクトし、N 末端から myc タグ、マウス Cochlin LCCL ドメイン、ヒト IgG Fc 領域を付加した組み換え体タンパク質を培養上清中に分泌させた。培養上清を回収し、プロテイン A で精製・濃縮を行った後 Western blotting に供し、抗 Fc-AP 抗体を用いて Fc 融合タンパク質の発現を確認した。その結果、コントロールと比較してマウス Cochlin LCCL Fc 融合タンパク質は予想される分子量 41 kDa (Cochlin LCCL: kDa、hIgG Fc: 23 kDa)付近にバンドが検出された (Fig .17)。

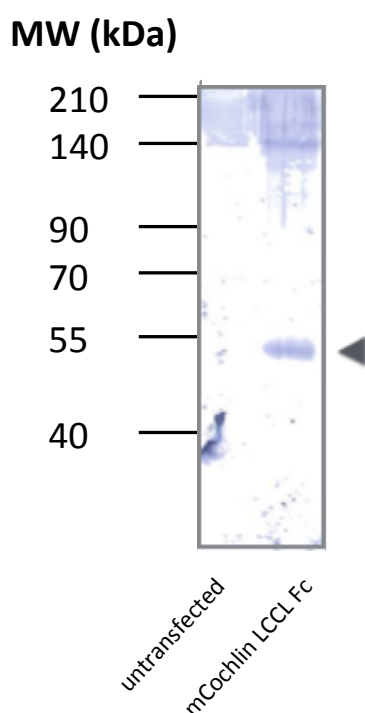


Fig. 17 マウス cochlin Fc 融合タンパク質の Western blotting

HEK293 細胞の培養上清を回収し、プロテイン A を用いて Fc 融合タンパク質を精製・濃縮した後、Western blotting に供した。ポリアクリルアミドゲルは 10%のものを用いた。mCochlin LCCL Fc はマウス Cochlin LCCL Fc 融合タ

ンパク質、untransfected はリポフェクションを行っていない HEK293 の培養上清をそれぞれ示す。黒矢印 (▶) はマウス Cochlin LCCL ドメイン Fc 融合タンパク質のバンドの位置 (41 kDa) を示す。

#### ■ ELISA

マウス Cochlin LCCL ドメイン Fc 融合タンパク質と HS/Hep との結合性を ELISA の系で評価した。その結果、マウス Cochlin LCCL ドメイン Fc 融合タンパク質は Hep や 6-*O*-desulfated Hep、2-*O*-desulfated Hep とは結合したが HS や *N*-desulfated Hep とは結合しなかった (Fig. 18)。この結果はマウス Cochlin レポーター細胞を用いた結合アッセイの結果 (Fig. 14C) と一致している

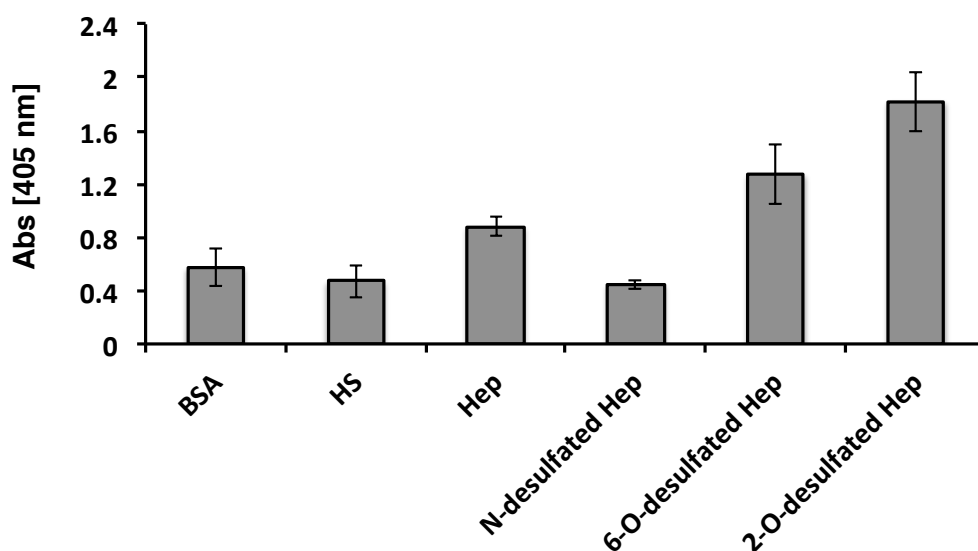


Fig. 18 マウス Cochlin LCCL ドメイン Fc 融合タンパク質と HS/Hep との結合解析。

BSA は GAG とカップリングしていない BSA 単独を固相化したもの、HS は HS-BSA、Hep は Hep-BSA、*N*-desulfated Hep は *N*-desulfated Hep-BSA、6-*O*-desulfated Hep は 6-*O*-desulfated Hep-BSA、2-*O*-desulfated Hep は 2-*O*-desulfated Hep-BSA を固相化したものをそれぞれ示す。結果はそれぞれ平均値と標準偏差を示す (n=3)。同様の実験を 2 回以上行い、いずれにおいても同様の結果を得た。



### 3-4 免疫染色

#### 3-4-1 HE 染色

作成した内耳蝸牛の切片の全体像 (Fig. 19)を把握するために、まず HE による染色を行った。その結果、蝸牛の鼓室階、前庭階、中央階およびコルチ器などを観察することができた (Fig. 20)。

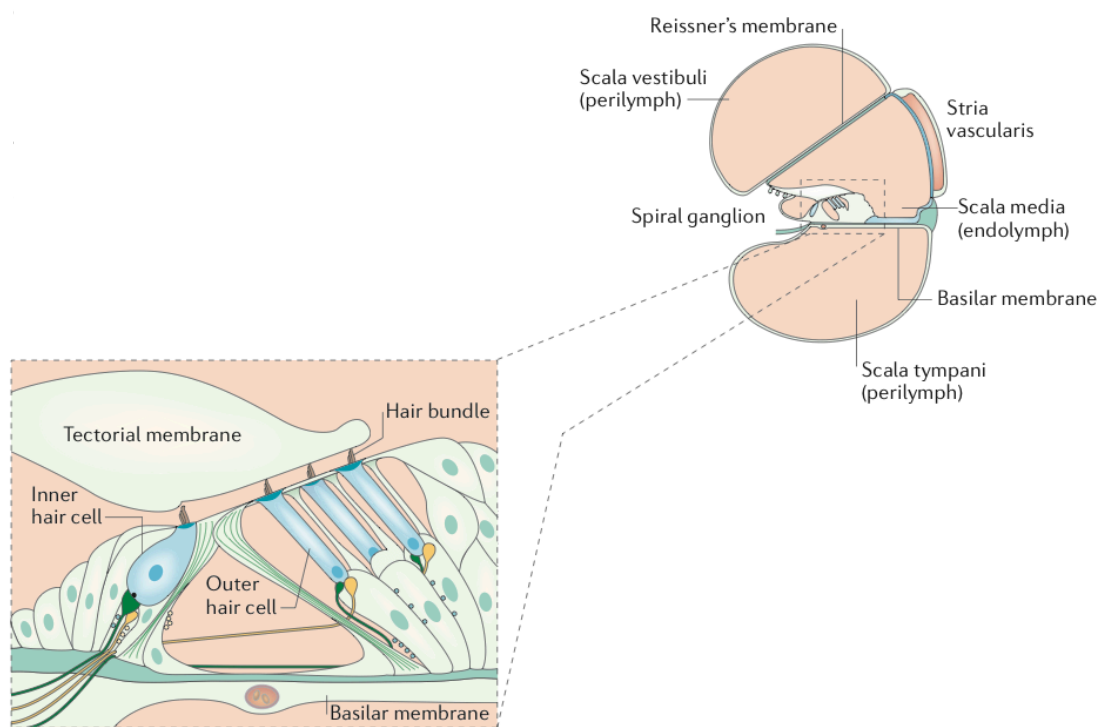


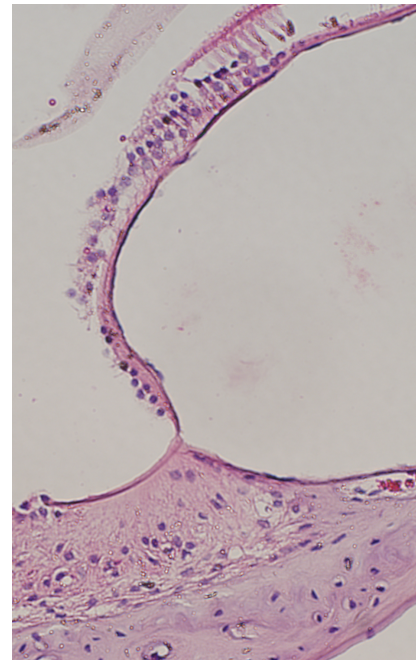
Fig. 19 蝸牛の構造

Hudspeth AJ. Integrating the active process of hair cells with cochlear function. (2014) *Nature reviews neuroscience*. 15, 600-614

(A)



(B)



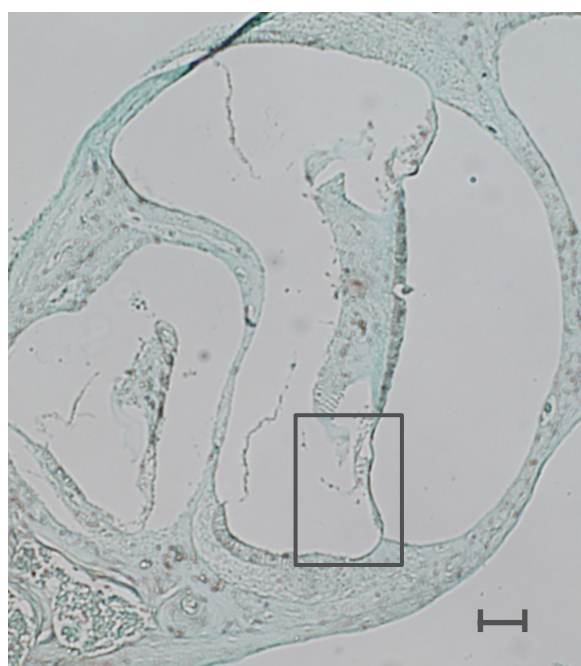
**Fig. 20** マウス内耳 HE 染色

マウス (8-13 週齢、♀、C57BL/6J)内耳の 13  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製し、HE 染色を行った。蝸牛 (A)および(A)中の四角で囲った部分を拡大した(B)染色図を示す。図中のスケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。図中の略語はそれぞれ OC, organ of Corti; RM, Reissner's membrane; SM, scala media; ST, scala tympani, SV, scala vestibule; TM, tectorial membrane (97)を示す。

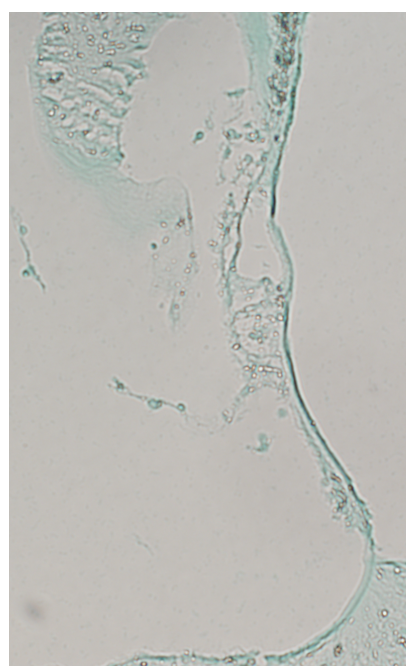
### 3-4-2 Cochlin Fc 融合タンパク質、抗 Cochlin 抗体を用いたマウス内耳の免疫染色

パラフィン切片の作製が上手くいっていることが確認できたので、次に Cochlin が結合する構造および Cochlin の局在を調べるために、マウス Cochlin Fc 融合タンパク質及び抗 mCochlin 抗体を用いてマウス内耳の免疫染色を行った (Fig. 21)。その結果、マウス Cochlin Fc 融合タンパク質を用いて Cochlin のリガンドを染色した場合にはマウス内耳が全体的に染まっていた (Fig. 21A, B)。特に鼓室階や前庭階の縁、基底板に強い染色がみられた。このことからマウス Cochlin Fc 融合タンパク質が結合する構造は内耳に広く分布しているが、特に鼓室階や前庭階の縁、基底板に多く存在していると考えられる。一方、抗 Cochlin 抗体を用いて同じ内耳の切片を染色すると鼓室階や前庭階の縁に沿って染色像が見られた。また、ラセン靭帯は染色されたが、血管条は染色がみられなかった (Fig. 21E, F)。さらに、基底板においても特異的な染色が見られた。このことから Cochlin は蝸牛の鼓室階や前庭階の縁やラセン靭帯、基底板に存在していると考えられる。

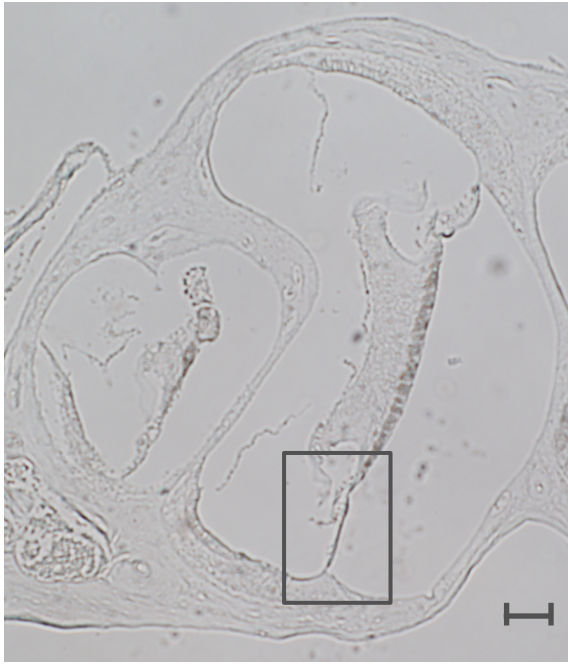
(A) mCochlin Fc 融合タンパク質



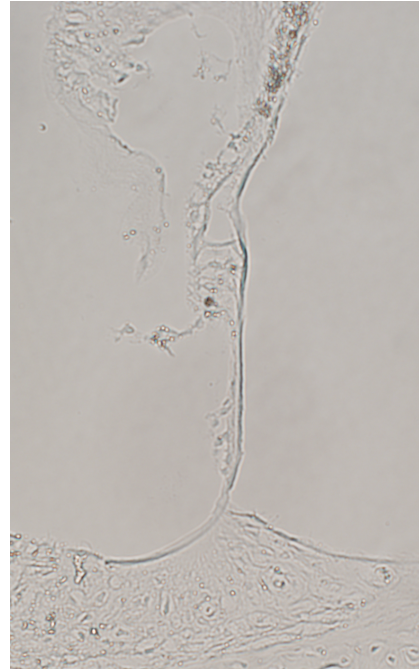
(B)



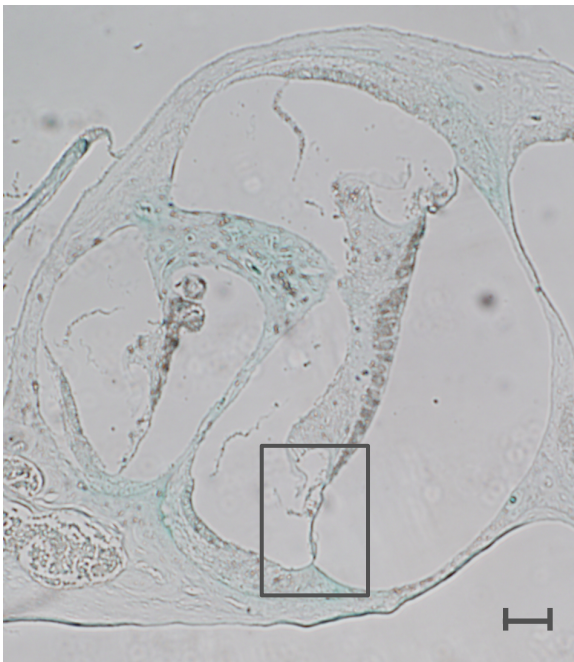
(C) mock Fc 融合タンパク質



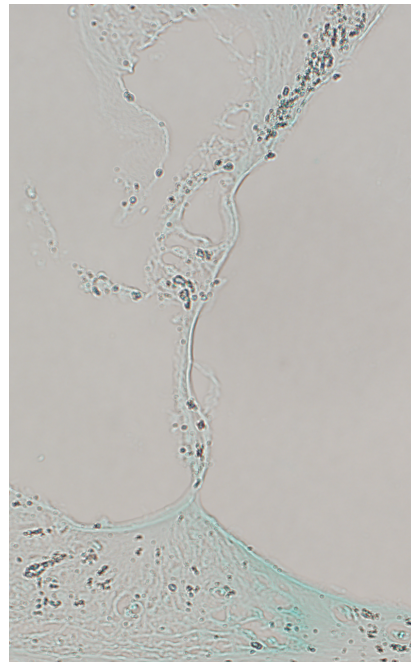
(D)



(E) 抗 mCochlin 抗体

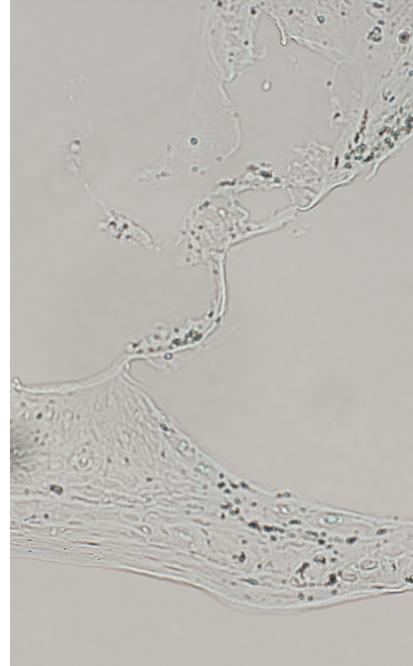
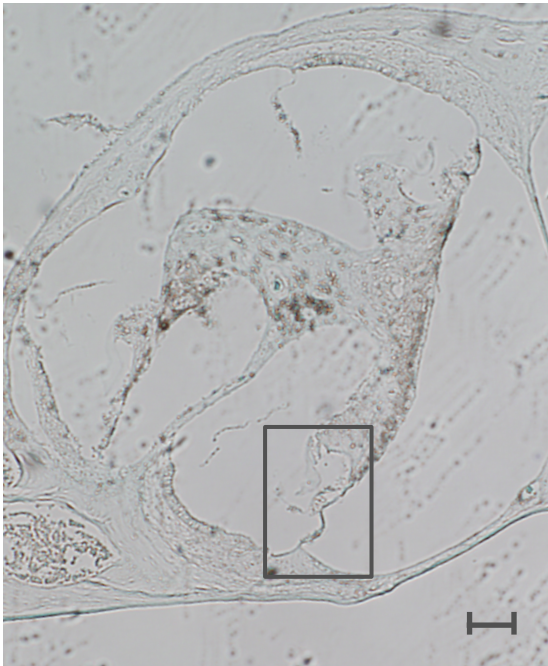


(F)



(G) 二次抗体 (GAR AP)のみ

(H)



**Fig. 21** マウス内耳の免疫染色

マウス内耳の 13  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製し、mCochlin Fc 融合タンパク質または抗 mCochlin 抗体を用いた染色を行った。mCochlin Fc 融合タンパク質 (A, B)、mock Fc 融合タンパク質 (C, D)、抗 mCochlin 抗体 (E, F)、二次抗体 (GAR AP)のみ (G, H)の染色図を示す。また、(A, C, E, G)は蝸牛、(B, D, F, H)は A、C、E、G 中の四角で囲った部分を拡大した図を示す。図中のスケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

### 3-5. マウス内耳 GAG の二糖組成解析

マウス内耳に存在する GAG にどのようなものが存在するのかを明らかにするために内耳から GAG 画分を調製し、heparinase I、II、III 消化することにより HS/Hep、chondroitinase ABC 消化することにより CS/DS の二糖組成を、ゲルろ過およびイオン交換 HPLC を用いて解析した。その結果 HA を除くとマウス内耳の GAG は約 72% が HS/Hep、28% が CS/DS であることが判明した。また、HS/Hep 組成は nonsulfated の構造が 5.8%、monosulfated が 62.5%、2-O 及び 2 位の N または 6-O、及び 2 位の N の 2 カ所が同時に硫酸化された二糖二ユニットが 31.7% であり、trisulfated の構造は検出されなかった (Table 5)。一方、CS/DS 組成は、GalNAc の 4 位に硫酸基をもつ A unit が 64.3%、GalNAc の 6 位に硫酸基をもつ C unit が 23.1%、disulfated が 12.6% であり、nonsulfated や trisulfated の構造は検出されなかった (Table 6)。

**Table 5. マウス内耳の GAG (HS/Hep)画分の二糖組成**

disaccharide units	nonsulfated	monosulfated		disulfated		trisulfated
				2-O, N-di / 6-O, N-di	2-O, 6-O-di	
relative content (%)	5.8	62.5	31.7	ND	ND	

ND: not detected

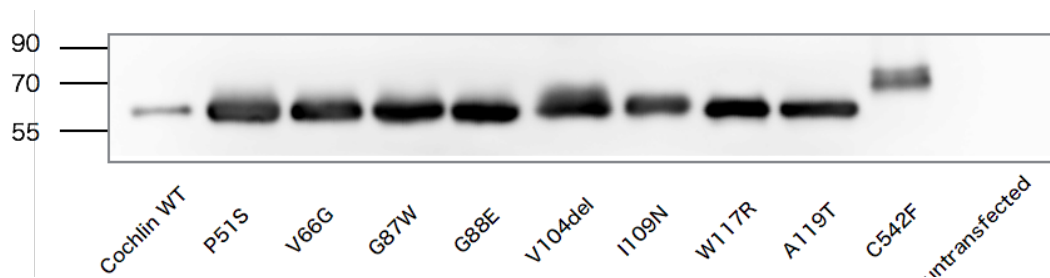
**Table 6. マウス内耳の GAG (CS/DS)画分の二糖組成**

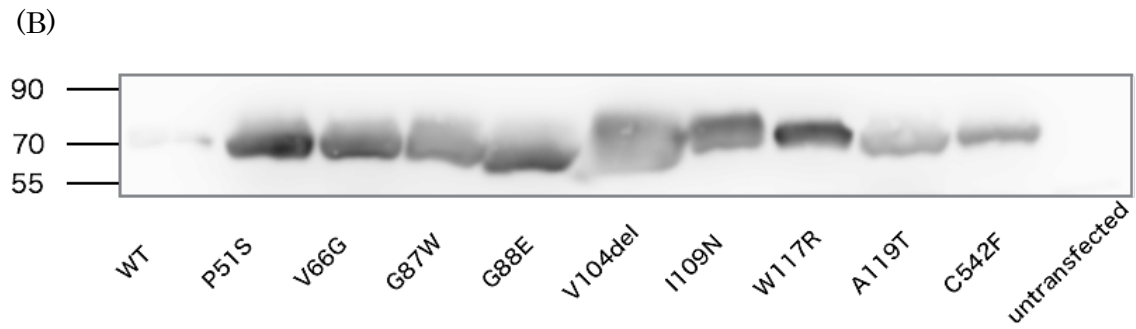
disaccharide units	nonsulfated	monosulfated		disulfated		trisulfated
		4-O-sulfated	6-O-sulfated	2-O,4-O-di/2-O, 6-O-di/4-O, 6-O-di		
relative content (%)	ND	64.3	23.1	12.6	ND	

### 3-6. C542F 変異体について

DFNA9 患者でみられる COCH 遺伝子上の変異は LCCL ドメインに集中していた。しかし、DFNA9 患者では vWA ドメインへの変異も報告されている。本実験ではそのうちのひとつ C542F 変異体を用いた糖結合アッセイを行い、WT と比較して Hep に対する結合性が大きく減少していることを見出した。この結合性が減少した要因としてジスルフィド結合の形成不全を考えた。C542F 変異体はシステイン残基に変異が入っているため、この 542 番目のシステイン残基がジスルフィド結合に関与していた場合、本来形成するはずであったジスルフィド結合が形成されず、Cochlin 分子が正常な構造をとれなくなっているのではないかと推測した。Street らは 362 番目と 542 番目のシステイン残基でジスルフィド結合を形成していると報告している (89)。そこでこの推測を確かめるために、ヒト Cochlin の終止コドンを除いた全長に FLAG タグを付加させた Cochlin WT または各 Cochlin 変異体リコンビナントタンパク質を作成し、Western blotting に共することで構造を比較した。その結果、非還元状態では Cochlin WT、LCCL ドメインに変異を導入した変異体 Cochlin (P51S、V66G、G87W、G88E、V104del、I109N、W117R、A119T) と比較して Cochlin C542F 変異体では高分子の位置にバンドがみられた (Fig. 22A)。一方、還元状態にすると Cochlin WT および LCCL ドメインに変異を導入した変異体と Cochlin C542F 変異体のバンドの位置が揃い (Fig. 22B)、その分子量は非還元状態で Cochlin C542F 変異体のバンドがみられた位置であった。また、Cochlin の分子量は 63 kDa であることから、このバンドは Cochlin のものであると考えられる。

(A)





**Fig. 22 Cochlin WT および C542F 変異体の Western blotting**

ヒト Cochlin WT および C542F 変異体を非還元 (A)または還元 (B)状態の Western blotting。HEK293 細胞の培養上性を回収し、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting に供した。ポリアクリルアミドゲルは 10%のものを用いた。Cochlin WT は野生型の Cochlin タンパク質、P51S は 51 番目のプロリンがセリンに置換された変異体、以下同様の表記法で V66G、G87W、G88E、V104del (104 番目のバリンの欠損)、I109N、W117R、A119T、C542F の 9 種類の変異を導入したヒト Cochlin 変異体をそれぞれ示す。Untransfected はリポフェクションを行っていない HEK293 の培養上清を示す。Cochlin の分子量は 63 kDa である。

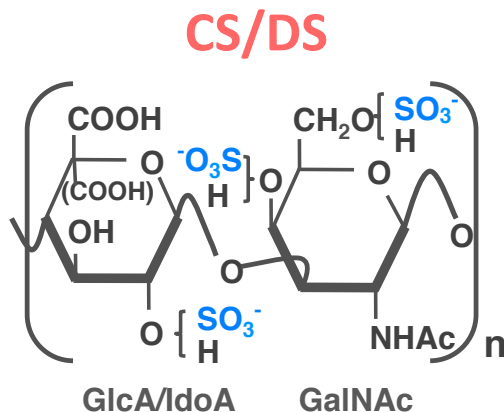


## 4. 考察

### 4-1. ヒト Cochlin と GAG とのレポーターアッセイ

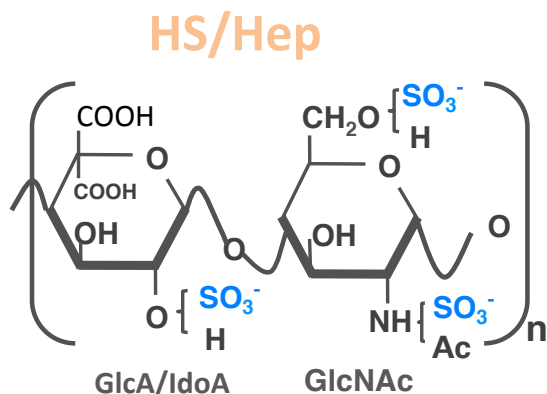
当研究室卒業生古澤は、ヒト Cochlin がヘパリンと結合することを以前に明らかにしたが（古澤修士論文）、GAG は二糖ユニット内に硫酸化されうる部位を複数箇所もち、ランダムに硫酸化修飾を受けることで多様な構造を形成している（Fig. 23）。そこで、Cochlin が GAG のどの硫酸化構造を認識しているのかを調べるために、より詳細な糖結合性解析を行った。GAG は大きく CS/DS と HS/Hep とに分けられるため（Fig. 23）、それぞれに対して Cochlin との結合性をレポーターアッセイにより評価した。その結果、ヒト Cochlin は CS/DS の CS-E と結合することがわかった（Fig. 10）。CS-E は二糖ユニット内に硫酸基を 2 つもつ構造が多く含まれているため、ヒト Cochlin は高硫酸化構造と結合することが示唆された。しかし、同様に 2 カ所硫酸化された二糖ユニットを多く含む CS-D とは結合性が見られなかったことから、単に電荷で結合しているわけではなく、構造特異的に結合していると考えられた。一方、HS/Hep に関しては Hep や脱 6-O-硫酸化 Hep、脱 2-O-硫酸化 Hep と結合することがわかった（Fig. 10）。これらに共通した構造も二糖ユニット内に 3 カ所または 2 カ所硫酸化修飾を受けている構造を多く含むことから、やはりヒト Cochlin は高硫酸化構造と結合すると考えられる。しかし、同様に 2 カ所硫酸化修飾を受けている 2 位の N 硫酸基を脱硫酸化した Hep に関しては Hep と比較して有為に結合性が低下していたことから、ヒト Cochlin は特定の硫酸化構造を認識しており、特に HS/Hep との結合には 2 位の N-硫酸基が重要であることが示唆された。

(A)



略語	二糖単位
O-unit	GlcA-GalNAc
A-unit	GlcA-GalNAc (4S)
B-unit	IdoA (2S)-GalNAc (4S)
C-unit	GlcA-GalNAc (6S)
D-unit	GlcA (2S)-GalNAc (6S)
E-unit	GlcA-GalNAc (4S, 6S)

(B)



略語	二糖単位
OS	HexA-GlcNAc
UA2S	HexA (2S)-GlcNAc
6S	HexA -GlcNAc (6S)
NS	HexA-GlcN (NS)
diS1	HexA -GlcN (NS,6S)
diS2	HexA (2S)-GlcNAc (6S)
diS3	HexA (2S)-GlcNAc (NS)
triS	HexA (2S)-GlcN (NS, 6S)

Fig. 23 GAG 構造の模式図

CS/DS (A)HS/Hep (B)の二糖ユニットの構造を示す。CS/DS は GlcA または IdoA と GalNAc、一方、HS/Hep は GlcA または IdoA と GlcNAc の二糖繰り返し構造からなる。また、二糖ユニットに含まれる硫酸基の位置や数によりそれぞれユニット名が定義されている。

#### 4-2 ヒト Cochlin 変異体と GAG との結合アッセイ

DNFA9 患者では *COCH* 遺伝子上に変異が入っており、その変異は主に LCCL ドメインに存在していた (Fig. 24)。 *COCH* 遺伝子上に変異が入ることで GAG との結合性が変化するかを調べるために、DNFA9 患者でみられる変異を導入したヒト Cochlin 変異体を作製し、GAG との結合性を評価した。レポーターアッセイ及び ELISA による両方の系において、ヒト Cochlin WT と比較して全てのヒト Cochlin 変異体で Hep との結合性が減少する傾向にあった (Fig. 11A, 13B)。レポーターアッセイに関してはヒト Cochlin 変異体レポーター細胞間でレポーター分子の発現量を揃えることが困難であったため、Hep との結合性を抗 Cochlin 抗体への結合性を基準に相対値で示した。しかし、抗体への結合性が変異体間で均一であるという実験的な証拠がなく、また抗 Cochlin 抗体を用いたフローサイトメトリーにより Cochlin レポーター細胞の発現を確

認した際に Cochlin C542F 変異体レポーター細胞では他の変異体と比較してシフトが弱かった (Fig. 11A)。これは発現量が弱いまたは変異を導入したことにより抗体の結合性が低下している可能性が考えられる。そのため、myc タグを付加したヒト Cochlin Fc 融合タンパク質を用いた ELISA の系の方がより定量的であるといえる。DFNA9 患者における Cochlin のアミノ酸変異の位置と難聴の発症時期をみると、30 代までの比較的早期に発症するものは V66G、I109N、C542F、40 代で発症するものは G87W、V104del、A119T、40 代以降と比較的後齢に発症するものは P51S、G88E、W117R と報告されている (Table 7) (86, 90, 98)。これらの発症時期と CS-E あるいは Hep との結合性との相関について考えてみた。まず、CS-E と Cochlin 変異体の結合が WT と比較して 40%以下になっているものは C542F、60%以下になっているものは G87W、I109N、70%以上のものは P51S、V66G、G88E、I109N、W117R、A119T であった (Fig. 13D、Table 8)。両者を比較すると、早期に発症した 3 つの変異のうち 1 つ (C542F) の変異では Hep との結合が WT の 40%以下になっていた。しかし、早期に発症した残り 2 つの変異体 (V66G、I109N) では WT の 70%以上の Hep 結合性を保持していた。つまり Cochlin 変異体と CS-E との結合性と発症時期の間に相関関係はみられなかった。一方、Hep との結合が WT と比較して 40%以下になっているものは V66G、V104 del、I109N、C542F、60%以下になっているものは G87W、G88E、70%以上のものは P51S、W117R、A119T であった (Fig. 13B、Table 9)。両者を比較すると、早期に発症した 3 つ (V66G、I109N、C542F) の変異では Hep との結合が WT の 40%以下になっていた。また、後期に発症した 3 つのうち 2 つ (P51S、W117R) では Hep との結合性を 70%以上保持していた。これらのことから、Cochlin と Hep との結合性の強弱と発症時期の間に概ね相関性がみられることが明らかとなった。今まで Cochlin 分子の性質から相関を見出そうといくつかの研究グループから報告が成されているが、いずれもきれいな相関が見出された報告は皆無である。

また、今回 ELISA の系により Hep との結合性を調べた結果、A119T は Hep との結合性が WT と同程度であった。Hep との結合性の低下が見られなかった A119T が難聴を発症することについては、現時点では明確な答えを提示することはできない。しかし、今回のアッセイでは C 末端側に hIgG Fc 領域を融合したリコンビナントタンパク質を

用いたため、Cochlin の構造とは無関係に hIgG Fc 領域により二量体を形成した状態で GAG との結合性を評価した。そのため生体内では A119T 変異により Cochlin 構造が変化し二量体を形成できないなどの変化があり、GAG との結合性に影響を与えている可能性は否定できない。

また、Cochlin の LCCL ドメインに変異を導入したことにより Hep や CS-E との結合性が WT と比較して低下していたことから、Cochlin と GAG との結合が LCCL ドメインを介していることが示唆された (Fig. 13B, C, D)。さらに、マウス Cochlin LCCL ドメイン Fc 融合タンパク質がマウス Cochlin Fc 融合タンパク質と同様の HS/Hep 結合性を示したことから (Fig. 14C, Fig. 18)、LCCL ドメインが GAG との結合性に関与していると考えられる。

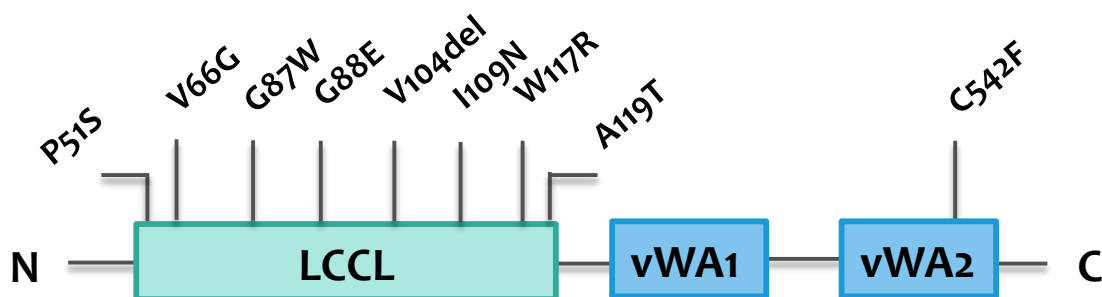


Fig 24. Cochlin のドメイン構造と患者にみられる変異。

DFNA9 患者でみられる COCH 遺伝子上の変異を示す。

Table7. DFNA9 患者における Cochlin の変異箇所と難聴の発症時期

発症時期	早期 (10-30代)	中期 (40代)	後期 (40-60代)
Cochlin 変異箇所	V66G I109N C542F	G87W V104del A119T	P51S G88E W117R

Table 8. Cochlin 変異体と Hep との結合性

CS-Eとの 結合性	低 (40%以下)	中 (60%以下)	高 (70%以上)
Cochlinの 変異箇所	C542F	G87W V104del	P51S V66G G88E I109N W117R A119T

Table 9. Cochlin 変異体と Hep との結合性

Hepとの 結合性	低 (40%以下)	中 (60%以下)	高 (70%以上)
Cochlinの 変異箇所	V66G V104del I109N C542F	G87W G88E	P51S W117R A119T

#### 4-3. マウス Cochlin と GAG との結合アッセイ

マウス Cochlin レポーター細胞は、CS-B、CS-E、Hep、de-6-O-desulfated Hep、de-2-O-desulfated Hep と結合した (Fig. 14B, C)。この結果はヒト Cochlin と類似していた (Fig. 10)。マウスとヒトの Cochlin はアミノ酸レベルで約 95%の相同性をもち、LCCL ドメインでは 94%の相同性を有している (Fig. 25)。また DFNA9 患者で変異が見られるアミノ酸に関しては100%保存されていることが知られている。このことから、Cochlin はヒトとマウスで同様の機能を発揮しており、DFNA9 患者で変異が見られたアミノ酸はその活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方で、CS/DS に関してはヒトとマウスの結合性が若干異なっており、マウス Cochlin では CS-B と結合したがヒト Cochlin ではほとんど結合性が見られなかった。ヒトとマウスの LCCL

ドメインの配列を比較すると、アミノ酸の性質が大きく変わっているのは、ヒトではアラニンであった 31 番目のアミノ酸がマウスではプロリンに (A31P)、以下同様の表記法で P51S、Y62F、S84G、T122A の 5 つのアミノ酸であった (Fig. 25)。この変異をヒト Cochlin に導入した Cochlin キメラ Fc 融合タンパク質を作製し、これらのアミノ酸が CS-B との結合に関与しているかを検討することは興味深い。なぜならこのように少数のアミノ酸残基が糖結合特異性を定義しているのであれば、それらの変化により糖結合部位の構造がどのように変化するかを追跡することでアミノ酸の三次元構造から糖との結合性を予測することが可能になるかもしれない。

	31	41	51	61	71
human	PIA	ITCFTRGLDIRKEKADVLCPGGC	PLEEFSV	YGNIVYASVSSICGAA	
mouse	PIP	VTCFTRGLDIRKEKADVLCPGGCS	LEEFSV	FGNIVYASVSSICGAA	
	81	91	101	111	121
human	VHRGVISNSGGPVRVYSLPGRENYSSVDANGIQSQMLSRWSASFT				
mouse	VHRGVIGTSGGPVRVYSLPGRENYSSVDANGIQSQMLSRWSASFA				

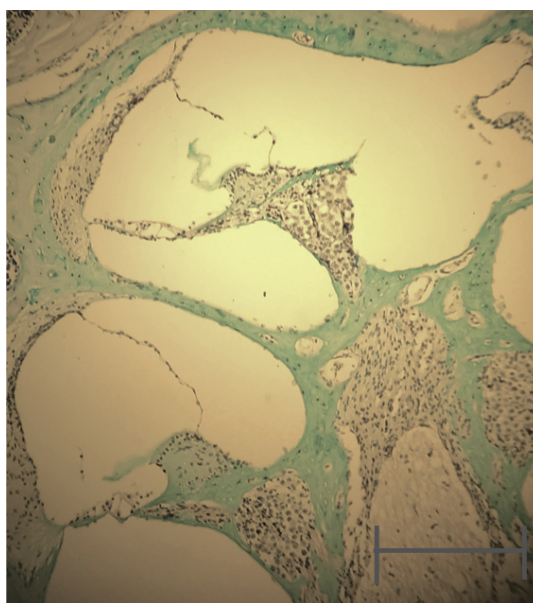
Fig. 25 ヒトとマウス Cochlin LCCL ドメインのアミノ酸配列比較

ヒトとマウス Cochlin LCCL ドメインのアミノ酸配列を比較した。完全に一致しているアミノ酸は青、性質が一致しているアミノ酸を赤、不一致のアミノ酸を黒で示した。数字はアミノ酸残基の番号を示している。

#### 4-4. 内耳の免疫染色

マウス内耳を mCochlin Fc 融合タンパク質で染色したところ、蝸牛が一様に染色され、特に鼓室階や前庭階の縁に沿って強い染色が観察された (Fig. 21A, B)。このことから Cochlin のリガンドとなる構造 (GAG)は、蝸牛に一様に分布していることが示唆された。しかし、アルシアンブルーを用いてムコ多糖 (GAG)を染色したところ、Cochlin Fc 融合タンパク質を用いた染色で見られた染色部位よりもより限局された部位 (蝸牛の鼓室階や前庭階の縁)のみが染色された (Fig. 25)。今回 Cochlin Fc 融合タンパク質に

よる染色にはマウス **Cochlin full length** を用いたため **vWA** ドメインの寄与が含まれてしまったのではないかと考えられる。**vWA** ドメインは内耳のコラーゲンなどに結合することが報告されているため（、内耳に豊富に存在するコラーゲンと **GAG** の両者が染色されたことによりアルシアンブルーを用いて **GAG** を染色したときよりも広範囲にわたる染色がみられたと推測される。先行研究におけるレポーター細胞を用いたアッセイではコラーゲンとの結合性は検出されなかったが、レポーター細胞は **C** 末端側を細胞に繫留しているため、**N** 末端側の寄与が大きいアッセイであるといえる。そのため、**vWA** ドメインによる結合が反映されていなかった可能性が考えられる。マウス **Cochlin LCCL** ドメイン **Fc** 融合タンパク質を用いた染色を行うことにより、**LCCL** ドメインにフォーカスしたリガンドの染色を行うことができると考えられる。一方、抗 **Cochlin** 抗体を用いた染色では基底版および蝸牛の縁に沿った染色像が得られたため (**Fig. 21E, F**)、**Cochlin** 蝸牛の縁や基底版に発現し分布していることがわかった。これらの結果から、**Cochlin** と **Cochlin** のリガンド分子は蝸牛の縁で共局在し、そこで結合していると考えられる。また、過去の研究により **Cochlin** は蝸牛のラセン靭帯やラセン版、基底版に存在しているという報告がある (99)。今回の染色ではラセン靭帯や基底版における染色が観察されたがラセン板縁の染色はみられなかったことから、一部過去の報告と同様の結果が得られたといえる。この原因については、抗体の感度が低かったために、発現量の少ない部位が染色されなかったのではないかと考えている。



**Fig. 25** マウス内耳切片のアルシアンブルー染色。

マウス内耳の 13  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製し、アルシアンブルー染色を行った。パラフィン切片を作成した後脱パラフィンし、酢酸で前処理した。その後アルシアンブルー染色液に浸し室温で 30 分静置することで染色を行った。その後、酢酸で洗浄・脱水処理をし、Eukitt 中に封入した。図中のスケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

**4-5. マウス内耳 GAG の二糖組成解析**

マウス内耳の二糖組成を調べたところ HS/Hep では monosulfated がメジャーな構造であり、次に多いのが 6-*O*、*N* または 2-*O*、*N* の disulfated 構造であった (Table 5)。Cochlin と HS/Hep との結合性解析の結果から、Cochlin は、HS/Hep の Hep、de 6-*O*-desulfated Hep、de 2-*O*-desulfated Hep と結合することが判明している (Fig. 14C)。このことから、マウス内耳には Cochlin が結合し得る構造である 6-*O*、*N* または 2-*O*、*N* の disulfated 構造が HS/Hep 全体の 3 割程度存在しており、免疫染色の際に mCochlin Fc 融合タンパク質を用いた組織染色で得られた染色像はこの disulfated 二糖構造との結合を反映していると考えられる。また、CS/DS に関しては GalNAc の 4 位に硫酸基がついた A unit が主要な構造であったが、disulfated な構造も 13%程度存在していた (Table 6)。mCochlin と CS/DS との結合アッセイの結果から mCochlin は disulfated CS/DS の CS-B や CS-E とは結合するが CS-D とは結合しないことが判明している (Fig. 14B)。それゆえ、今回検出された二硫酸化二糖構造を主要な成分とする CS/DS が CS-B や CS-E であれば mCochlin が結合する構造であるといえる。

また、内耳に存在する HS/Hep が 72%であったのに対して CS/DS が 28%であったこと、またマウスでは CS/DS 中に CS-B、CS-E 構造が数%しか含まれていないことが知られているため、生体内における Cochlin のメジャーなリガンドは desulfated Hep であると考えられる。



#### 4-6. C542F 変異体について

DFNA9 患者でみられる COCH 遺伝子上の変異は LCCL ドメインに集中していた。また、マウス Cochlin LCCL ドメインが Hep に対する結合性を有していたことからこの LCCL ドメインが糖結合ドメインであることが示唆される。しかしまれではあるが DFNA9 患者で LCCL ドメインに変異はなく、vWA ドメインに変異をもつ報告がある。その vWA ドメインにみられる変異のうち C542F に関して糖結合アッセイを行ったところ、他の変異体と同様に Hep に対する結合性が減少していた。この C542F の変異がシステイン残基にみられる変異であったことから、ジスルフィド結合の形成不全が原因ではないかという推測をたて還元・非還元条件下で SDS-PAGE を行ってみた (Fig. Fig. 22)。その結果、WT 及び C542F 以外の変異体 Cochlin では還元・非還元状態でバンドの位置が変化しており還元状態では非還元状態と比較して高分子側にバンドがみられた。このことから、Cochlin は分子内ジスルフィド結合を形成していると考えられる。一方、Cochlin C542F 変異体では還元・非還元状態でバンドの位置が変化しておらず、その位置は Cochlin WT の還元状態のバンドの位置と一致していた。このことから、Cochlin C542F 変異体では Cochlin WT で形成されている分子内ジスルフィド結合が形成されていないことが示唆される。つまり、542 番目のシステイン残基は分子内ジスルフィド結合に関与しており、C542F の変異がみられる患者では分子内ジスルフィド結合が形成できなくなることで正常な Cochlin 分子の構造 (立体構造及び二量体化) が形成されなくなることで GAG との結合性が減少し、DFNA9 を発症するのではないかと考えられる。

## 5. 総括

### 1. 難聴の発症時期と Hep-binding との相関

本研究により、hCochlinがGAGのHepや6-*O*-desulfated Hep、2-*O*-desulfated Hep、CS-Eと結合することが判明した。また、DFNA9患者に見られる*COCH*遺伝子上の変異を導入した変異体Cochlinでは、HepやCS-Eに対する結合性が低下していた。さらに文献により早期に難聴を発症するといわれているCochlin変異体(V66G、V104del、C542F)では特にHepとの結合性が低く、WTの22~33%にまで低下していた。一方、後期に難聴を発症するといわれているCochlin変異体(P51S、W117R)ではHepとの結合性がWTの70~77%であり、難聴の発症時期とGAGとの結合性には相関が見られた。この*COCH*遺伝子上の変異はLCCLドメインに集中しており、またLCCLドメインのFc融合タンパク質を用いたGAGとの結合性解析において全長のCochlinと同様の結合性を示したことから、CochlinのLCCLドメインがこのGAGとの結合に関与しているといえる。従来の研究ではCochlinの性状(分泌、凝集など)に着目して発症時期との相関が議論されてきたが、今回、Cochlinに結合するGAG鎖という新たなパートナー分子を見出したことにより、GAG鎖の加齢による変化という新たな視点から説明が可能になったことは大きなインパクトがある。また同時に、健常人における加齢性難聴も同じ理解で説明可能であり、これら難聴への治療あるいは予防への切り口になる可能性を秘めている。

### 2. DFNA9が遅発性であることについて

現在までに、DFNA9患者では内耳の蝸牛、前庭の広い範囲にGAGが蓄積していること(100)、患者により程度の差があるが有毛細胞が部分的に消失していること(101)が報告されている。これを受け他の研究ではCochlin分子にのみ着目し、変異体Cochlinが凝集したり細胞外に分泌されなかったりすることで有毛細胞に障害が起こると考えているものが多数を占めている。しかし、近年Cochlinノックアウトマウスも加齢に伴い難聴を発症することが報告され(92)、変異体Cochlin自身が有毛細胞を障害するという考えは否定された。一方、GAGは加齢に伴い発現量が減少し、硫酸化程度も低下

することが知られている。また本研究により、Cochlin と Hep が LCCL ドメインを介して結合していること、変異体 Cochlin では Hep との結合性が低下することが判明した。これらのことから、Cochlin 変異体では GAG との結合性が低いため、健常人よりも早い時期に Cochlin と GAG との結合が閾値以下になる、あるいは Cochlin と結合できない GAG が蝸牛や前庭に蓄積することで有毛細胞を障害することにより遅発性の進行性難聴を発症するのではないかと考えられる。

### 3. DFNA9 が優性遺伝形式をとることについて

DFNA9 が優性遺伝形式であることについては、ホモ接合体のほうがヘテロ接合体よりも早期に難聴を発症すること (81、82)、変異体 Cochlin は WT や変異体 Cochlin 同士で安定的なダイマーを形成すること (91)、さらに *Coch* 遺伝子をノックアウトしたマウス (*Coch*<sup>+/0</sup>) のヘテロ接合体では難聴を発症しないこと (92) が報告されている。また DFNA9 患者で知られた変異 (G88E) をノックインしたマウスのヘテロ接合体 *Coch*<sup>+/G88E</sup> では難聴を発症するが、*Coch*<sup>+/+</sup> では発症しないということから、Cochlin 変異体が Cochlin WT の働きを阻害していることが考えられる。これとは別に、レクチンにおいてダイマー形成はその糖との結合性を飛躍的に上昇されることが古くからよく知られている (102)。このことから、Cochlin WT もダイマーを形成し、糖との結合性を増加させている可能性がある。しかし Cochlin 変異体が存在すると、正常な Cochlin ともダイマーを形成するが、Cochlin 変異体と GAG との結合性が低いことからこのダイマーでは GAG との結合性をあげることができず正常 Cochlin の働きを阻害してしまう可能性が高い。そのため、片方の遺伝子に変異が入っただけでも難聴を発症するのではないかと考えている。

## 6. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究において終始御懇篤なるご指導、御鞭撻をいただきました本学新領域創成科学研究科医薬デザイン工学研究室の山本一夫教授に深く感謝の意を表します。

本研究に対し、幾多の貴重な御意見と御協力を賜りました本学新領域創成科学研究科医薬デザイン工学研究室の松本直樹准教授に心から感謝致します。

本研究を行うにあたり、貴重なご意見を賜りました本学新領域創成科学研究科医薬デザイン工学研究室の小波悠紀子博士に深く感謝致します。

## 7. 参考文献

1. Stillmark, H. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus comm.* L. und einigen anderen Euphorbiceen. (1888) Inaug.Diss.Dorpat.
2. Goldstein IJ, Hayes CE. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. (1978) *Adv. Carb. Chem. Biochem.* 35, 127-340.
3. Sumner JB, Howell SF. Identification of hemagglutinin of Jack bean with Concanavalin A. (1936) *J Bacteriol.* 32(2) 227-237.
4. Weis WI, Drickamer K. Structural basis of lectin- Carbohydrate Recognition. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* 65, 441-473.
5. Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-Specific Probe rBC2LC. (2013) *Stem Cells Transl. Med.* 2, 265-273.
6. Sharon, N., and Lis, H. Legume lectins-a large family of homologous proteins. (1990) *FASEB J.* 4, 3198-3208.
7. Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., and Wyns, L. Legume lectin structure. (1998) *Biochem. Biophys. Acta* 1383, 9-36.
8. De Hoff, P.L. *et al.* Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. (2009) *Mol Genet Genomics.* 282(1), 1-15.
9. Arbones ML, Ord DC, Ley K, Ratech H, Maynard-Curry C, Otten G, Capon DJ, Tedder TF. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin deficient mice. (1994) *Immunity.* 1, 247-260.
10. Kawashima H, Petryniak B, Hiraoka N, Mitoma J, Huckaby V, Nakayama J,

- Uchimura K, Kadomatsu K, Muramatsu T, Lowe JB, Fukuda M. N-Acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases 1 and 2 cooperatively control lymphocyte homing through L-selectin ligand biosynthesis in high endothelial venules. (2005) *Nat. Immunol.* 6, 1096-1104.
11. Uchimura K, Gauguet JM, Singer MS, Tsay D, Kannagi R, Muramatsu T, von Andrian UH, Rosen SD. A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deficient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules. (2005) *Nat. Immunol.* 6, 1105-1113.
12. 日野 真吾、【解説】C型レクチン受容体ファミリーを介した非自己糖鎖の免疫修飾作用 (2010) 化学と生物 Vol. 48、No. 8
13. Kasai K, Hirabayashi J. Galectins. A family of animal lectins that decipher glycocodes. (1996) *J. Biolchem.* 119, 1-8.
14. Gray CA, Adelson DL, Bazer FW, Burghardt RC, Meeusen EN, Spencer TE. Discovery and characterization of an epithelial-specific galectin in the endometrium that forms crystals in the trophoblast. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(21) 7982-7.
15. Hirabayashi J, Ayaki H, Soma G, Kasai K. Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human 14 kDa beta-galactoside-binding lectin. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* 1008(1) 85-91.
16. Sakaguchi M, Shingo T, Shimazaki T, Okano HJ, Shiwa M, Ishibashi S, Oguro H, Ninomiya M, Kadoya T, Horie H, Shibuya A, Mizusawa H, Poirier F, Nakauchi H, Sawamoto K, Okano H. A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(18) 7112-7117.
- 17 Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. (1997) *J. Exp. Med.* 185(10). 1851-1858.
18. Angata T. Specificity of Glycan Recognition by Siglecs (2006) Trends in

Glycoscience and Glycotechnology. 18, 197-208.

19. Engel P, Wagner N, Miller AS, Tedder TF. Identification of the Ligand-binding Domains of CD22, a Member of the Immunoglobulin Superfamily that Uniquely Binds a Sialic Acid-dependent Ligand. (1995) *J. Exp. Med.* 181, 1581-1586.
20. Nath D, Van der Merwe PA, Kelm S, Bradfield P, Crocker PR. The Amino-terminal Immunoglobulin-like Domain of Sialoadhesin Contains the Sialic Acid Binding Site. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 26184-26191.
21. Law CL, Aruffo A., Chandran KA, Doty RT, Clark EA. Ig domains 1 and 2 of murine CD22 constitute the ligand-binding domain and bind multiple sialylated ligands expressed on B and T cells. (1995) *J. Immunol.* 155, 3368-3376.
22. May AP, Robinson RC, Vinson M, Crocker PR, Jones EY. Crystal Structure of the N-Terminal Domain of Sialoadhesin in Complex with 3' Sialyllactose at 1.85Å Resolution. (1998) *Mol. Cell* 1, 719-728.
23. 株式会社 医学生物学研究所 HP レクチンとは  
[http://www.mbl.co.jp/r\\_and\\_d/lectin2.html](http://www.mbl.co.jp/r_and_d/lectin2.html)
24. 監修：梶原 哲郎 「美しい人体図鑑」 笠倉出版社 pp74-75
25. 中度難聴（感音性難聴）web site 【静の森】  
<http://home.att.ne.jp/grape/take3/nanchou/002.html>
26. 株式会社 日本コクレア HP 感音性難聴  
<http://www.cochlear.com/wps/wcm/connect/jp/home/understand/hearing-and-hl/what-is-hearing-loss/types-of-hl/sensorineural-hearing-loss>
27. 株式会社 日本コクレア HP 難聴の程度  
<http://www.cochlear.com/wps/wcm/connect/jp/home/understand/hearing-and-hl/what-is-hearing-loss/degrees-of-hl>
28. Petit C. From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint. (2006) *Trends Mol. Medi.* 12, 57-64.
29. 喜多村 健 遺伝性難聴の概要 (2002) *Audiology Japan.* 45, 283-288.

30. Iwasaki S, Harada D, Usami S, Nagura M, Takeshita T, Hoshino T. Association of clinical features with mutation of TECTA in a family with autosomal dominant hearing loss. (2002) *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 128, 913-917.
31. Robertson NG, Lu L, Heller S, Merchant S, Eavey R, McKenna M, Nadol Jr J, Miyamoto R, Linthicum Jr F, Neto J, Hudspeth AJ, Seidman C, Morton C, Seidman J. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9 a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. (1998) *Nat. Genet.* 20, 299-303.
32. Fransen E, Verstreken M, Verhangen WI, Wuyts FL, Huygen O, D'Haese P, Rovrtson N, Morton C, McGuirt WT, Smith R, Declau F, Heyning P, Camp GV. High prevalence of symptoms of meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. (1999) *Hum. Mol. Genet.* 8, 1425-1429.
33. 池園 哲郎、シリーズ教育講座「末梢前庭器から前庭神経核へ—最近の知見」  
1.COCH 遺伝子とめまい (2005) *Equilibrium Res Vol.* 64, 1-11
34. Trexler M, Banyai L, Patthy L. The LCCL module (2000) *Eur. J. Biochem.* 267, 5751-5757.
35. Nakamura S, Yanagi S, Yamamura H. Purification and characterization of cytosolic protein-tyrosine kinase from bovine platelets. (1988) *Eur. J. Biochem.* 174, 471-477.
36. Nakamura T, Tokunaga F, Morita T, Iwanaga S, Kusumoto S, Shiba T, Kobayashi T, Inoue K. Intracellular serine-protease zymogen, factor C, from horseshoe crab hemocytes Its activation by synthetic lipid A analogues and acidic phospholipids. (1988) *Eur. J. Biochem.* 176, 89-94.
37. Ikezono T, Omori A, Ichinose S, Pawankar R, Watanabe A, Yagi T. Identification of the protein product of the Coch gene (hereditary deafness gene) as the major component of bovine inner ear protein. (2001) *Biochim. Biophys.*



- Acta*. 1535, 258-265.
38. Ikezono T, Shindo S, Li L, et al. Identification of a novel Cochlin isoform in the perilymph: insights to Cochlin function and the pathogenesis of DFNA9. (2004) *Biochem Biophys Res Commun*. 314, 440-446.
39. Ikezono T, Shindo S, Sekine K, Shiba K, Matsuda H, Kusama K, Koizumi Y, Sugizaki K, Sekiguchi S, Kataoka R, Pawankar R, Baba S, Yagi T, Okubo K. Cochlin-tomoprotein (CTP) detection test identifies traumatic perilymphatic fistula due to penetrating middle ear injury. (2011) *Acta Oto-Laryngologica*. 131, 937-944.
40. 厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班および新規診断マーカーCTPを用いた難治性内耳疾患の多施設検討に関する研究班、 2012年
41. Lindahl U, Roden L. (1972) In *Glycoproteins*. Elsevier, New, York pp.491-517.
42. Doege K, Sasaki M, Horigan E, Hassell JR, Yamada Y. Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones. (1987) *J. Biol. Chem*. 262, 17757-17767.
- 43 Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. BIOLOGY OF THE SYNDECANS: A Family of Transmembrane Heparan Sulfate Proteoglycans. (1992) *Annu. Rev. Cell Biol*. 8, 365-393.
- 44 Iozzo, R. The biology of the small leucine-rich proteoglycans: functional network of interactive proteins. (1999) *J. Biol. Chem*. 274, 18843-18846.
45. Renato VI, Alan DM. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. (1996) *FASEB*. 10, 598-614.
46. Matsumoto K. The Role of Hyaluronan in Catilage. (2010) *Trend. Glycosci. Glycotech*. 22 (124) 57-67.

47. Roughley. P.J.. and Lee. E. R. (1994) Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Micro. Res. Techniq.* 28,385-397.
48. Luijendijk MWJ, Pol TJR, Duijnhoven G, Hollander AI, Caat J, Limpt V, Brunner HG, Kremer H, Cremers FPM. Cloning, characterization, and mRNA expression analysis of novel human fetal cochlear cDNAs. (2003) *Genomics* 82, 480-490.
49. Ma QY, Xuo CL, Ma JH, Zhang XN, Ru Y, Li P, Pan CM, Liu Z, Gao HM, Chen MD, Song HD. Glucocorticoid up-regulates mimecan expression in corticotroph cells. (2010) *Mol. Cell. Endocrinol.* 321, 239-244.
50. Borelli G, Mayer GN, Pontual H, Boeuf G, Payan P. Biochemical relationships between endolymph and otolith matrix in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). (2001) *Calcif. Tissue. Int.* 69 (6) 356-364.
51. 山田修平 グリコサミノグリカンの構造多様性と機能 (2004)糖質科学におけるポストゲノム研究 Vol. 78、No. 9、851-855.
52. 谷口直之ら(2003)糖鎖機能第三の生命鎖 タンパク質核酸酵素 48、pp.901-909 共立出版
53. Sasisekharan R, Raman R, Prabhakar V. Glycomics Approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. (2006) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8, 181-231.
54. Sugahara K, Mikami T. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. (2007) *Opin. Struct. Biol.* 17, 536-545.
55. Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of Cell Surface Heparin Sulphate Proteoglycans. (1999) *Annu. Rev. Biochem.* 68, 729-777.

56. Meyer K. Chemical structure of hyaluronic acid (1958) *Fed. Proc.* 17, 1075-1077.
57. Hoffman P. et al. (1958) *Fed. Proc.* 17, 1078-86
58. Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions (1991) *Annu. Rev. Biochem.* 60, 443-475.
59. 野村 義宏 特集 広がりつつあるサプリメントを理解する—腎不全患者に活用するために 20 コンドロイチン硫酸 (2008) 臨床透析 Vol.24 No.13 日本メディカルセンター
60. Hashiguchi T, Mizumoto S, Yamada S, Sugahara K. Analysis of the structure and neuritogenic activity of chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from porcine fetal membranes. (2010) *Glycoconj. J.* 27, 49-60.
61. 糖鎖研究試薬 生化学工業株式会社
62. Willie FV, Alexander S, Barbara J, Klaus J. The Structure of the Capsular Polysaccharide (K5 Antigen) of Urinary-Tract-Infective *Escherichia coli* 010:K5:H4. (1981) *Eur. J. Biochem.* 116, 359-364.
63. Mizumoto S, Sugahara K. グリコサミノグリカンの生合成機構 JCGGDB リポート
64. Malmstrom A. Biosynthesis of dermatan sulfate. II. Substrate specificity of the C-5 uronosyl epimerase. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 161-165.
65. hashimoto Y, Orellana A, Gil G, Hirschberg CB. Molecular cloning and expression of rat liver N-heparan sulfate. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 15744-15750.
66. Eriksson I, Sandback D, Ek B, Lindahl U, Kjellen L. cDNA cloning and sequencing of mouse mastocytoma glucosaminyl

- N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase, an enzyme involved in the biosynthesis of heparin. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 10438-10443.
67. Aikawa J, Esko JD. Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase family. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2690-2695.
68. Aikawa J, Grobe K, Tsujimoto M, Esko JD. Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin glnac *N*-deacetylase/GlcN *N*-sulfotransferase: Structure and activity of the fourth member, NDST4. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 5876-5882.
69. Li JP, Gong F, Darwish KE, Jalkanen M, Lindahl U. Characterization of the D-glucuronyl C5-epimerase involved in the biosynthesis of heparin and heparan sulfate. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 20069-20077.
70. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. (2007) *Nature* 446, 1030-1037.
71. Häcker U, Nybakken K, Perrimon N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 530-541.
72. Natowics MR, Short MP, Wang Y, Dickersin GR, Gebhardt MC, Rosenthal DI, Sims KB, Rosenberg AE. Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. (1996) *N. Engl. J. Med.* 335, 1029-1033.
73. Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow BA, Natowics MR. Mutations in *HYAL1*, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6296-6300.
74. Bame KJ. Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. (2001) *Glycobiology.* 11 (6), 91R-98R.

75. kudo T, Ikehara Y, Togayachi A, Morozumi K, Watanabe M, nakamura M, Nishihara S, Narimatsu H. Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. (1998) *Lab. Invest.* 78 (7), 797-811.
76. Taniguchi N, Miyoshi E, Ko JH, Ikeda Y, Ihara Y. Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanisms. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* 1455, 287-300.
77. Sugahara K, Mikami T. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 536-545.
78. Asada M, Yoneda A, Imamura T. Engineering of a Heparin-Binding growth factor with Heparan Sulfate sugar chains. (2001) *Trends Glycosci. Glycotech.* 13 (72), 385-394
79. Robertson NG, Skvorak AB, Yin Y, Weremoxicz S, Johnson KR, Kovatch K A, Battey JF, Bieber FR, Morton CC. Mapping and Characterization of a Novel Cochlear Gene in Human and in Mouse: A Positional Candidate Gene for a Deafness Disorder, DFNA9. (1997) *Genomics* 46: 345-54.
80. Robertson NG, Rsendes BL, Lin JS, Lee C, Aster JC, Adams JC, Morton CC. Inner ear localization of mRNA and protein products of *COCH*, mutated in the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10, 2493-2500.
81. Verstreken M, Declau F, Wuyts FL, D'Haese P, Van Camp G, Franssen E, Van den Hauwe L, Buyle S, Smets RE, Feenstra L, Van der Stappen A, Van de Heyning PH. Hereditary Otovestibular Dysfunction and Meniere's Disease in a Large Belgian Family Is Caused by a Missense Mutation in the *COCH* gene. (2001) *Otol. Neurotol.* 22, 874-881.
82. de Kok YJ, Bom SJ, Brunt TM, Kemperman MH, van Beusekom E, van der Velde-Visser SD, Robertson NG, Morton CC, Huygen PL, Verhagen WI, Brunner HG, Cremers CW, Cremers FP. A Pro51Ser mutation in the *COCH* gene is associated with late onset autosomal dominant progressive

- sensorineural hearing loss with vestibular defects. (1999) *Hum. Mol. Genet.* 8, 361-366.
83. Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI, Wuyts FL, Huygen PL, D'Haese P, Robertson NG, Morton CC, McGuirt WT, Smith RJ, Declau F, Van de Heyning PH, Van Camp G. High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the *COCH* gene. (1999) *Hum. Mol. Genet.* 8, 1425-1429.
84. Robertson NG, Lu L, Heller S, Merchant SN, Eavey RD, McKenna M, Nadol JB, Miyamoto RT, Linthicum FH, Lubianca Neto JF, Hudspeth AJ, Seidman CE, Morton CC, Seidman JG. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. (1998) *Nat. Genet.* 20, 299-303.
85. Collin RW, Pauw RJ, Schoots J, Huygen PL, Hoefsloot LH, Cremers CW, Kremer H. Identification of a Novel *COCH* Mutation, G87W, Causing Autosomal Dominant Hearing Impairment (DFNA9). (2006) *Am. J. Genet.* 170, 1791-1794.
86. Negy I, Horvath M, Trexler M, Repassy G, Patten L. A novel *COCH* mutation, V104del, impairs folding of the LCCL domain of cochlin and causes progressive hearing loss. (2004) *J. Med. Genet.* 41, e9.
87. Kamarinos M, McGill J, Lynch M, Dahl H. Identification of a Novel *COCH* Mutation, I109N, highlights the Similar Clinical Features Observed in DFNA9 Families. (2001) *Hum. Mutat.* 18 (6), 547-548.
88. Usami S, Takahashi K, Yuge I, Ohtsuka A, Namba A, Abe S, Fransen E, Patten L, Otting G, Van Camp G. Mutations in the *COCH* gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochlea-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. (2003) *Eur. J. Hum. Genet.* 11, 744-748.
89. Street VA, Kallman JC, Robertson NG, Kuo SF, Morton CC, Phillips JO. A Novel DFNA9 Mutation in the vWFA2 Domain of *COCH* Alters a Conserved

- Cysteine Residue and Intrachain Disulfide Bond Formation Resulting in Progressive Hearing Loss and Site-Specific Vestibular and Central Oculomotor Dysfunction. (2005) *Am. J. Med. Genet. A* 139, 86-95.
90. Bae SH, Robertson NG, Cho HJ, Morton CC, Jung DJ, Baek JI, Choi SY, Lee J, Lee KY, Kim UK. Identification of Pathogenic Mechanisms of COCH Mutations, Abolished Cochlin Secretion, and Intracellular Aggregate Formation: Genotype-Phenotype Correlations in DFNA9 Deafness and Vestibular Disorder. (2014) *Hum. Mutat.* 35 (12) 1506-1513.
91. Yao J, Py BF, Zhu H, Bao J, Yuan J. Role of protein misfolding in DFNA9 hearing loss. (2010) *J. Biol. Chem.* 285 (20) 14909-14919.
92. Jones SM, Robertson NG, Fiven S, Giersch ABS, Liberman MC, Morton CC. Hearing and vestibular deficits in the Coch<sup>-/-</sup> null mouse model: Comparison to the Coch<sup>G88E/G88E</sup> mouse and to DFNA9 hearing and balance disorder. (2010) *Hear. Res.* 272, 42-48.
93. Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. (2008) *Gene Therapy.* 7, 1063-6.
94. Sanderson S, Shastri N. LacZ inducible, antigen/NHC-specific T cell hybrids. (1994) *Int. Immunol.* 6 (3) 369-376.
95. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature.* 227, 680-685
96. Kinoshita A, Sugahara K. 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. (1999) *Anal. Biochem.* 269, 367-378.
97. Kawashima H, Atarashi K, Hirose M, Hirose J, Yamada S, Sugahara K,

- Miyasaka M. Oversulfated Chondroitin/Dermatan Sulfate Containing GlcA  $\beta$  1/IdoA  $\alpha$  1-3GalNAc (4, 6-*O*-disulfate) Interact with L- and P-selectin and chemokines. (2002) *J. Biol. Chem.* 277 (15) 12921-12930.
98. Masuda M, Mutai H, Arimoto Y, Nakano A, Matsunaga T. A novel frameshift variant of COCH supports the hypothesis that haploinsufficiency is not a cause of autosomal dominant nonsyndromic deafness 9. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 469 (2). 1-5.
99. Yao J, Benedicte FP, Zhu H, Bao J, Yuan J. Role of protein misfolding in DFNA9 hearing loss (2010) *J. Biol. Chem.* 285 (20), 14909-14919.
100. Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Lishu Li, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe A, Saito A, Yagi T. Expression of Cochlin in the Vestibular Organ of Rats. (2005) *ORL J Otorhinolaryngol Ralat Soec.* 67 (5), 252-258.
101. Merchant SN, Linthicum FH, Nadol JB Jr. Histopathology of the inner ear in DFNA9. (2000) *Adv. Otorhinolaryngol.* 56, 212-217.
102. 監修：小林 一清、正田 晋一郎 「糖鎖科学の基礎と実用化」 シーエム  
シー出版 pp182-183