


論文内容要旨 (和文)

氏名 羽田 智子 

論文題目 ヘパリン/ヘパラン硫酸のヘパリン結合性増殖因子との結合構造および
活性制御に関する研究

ヘパラン硫酸(HS)はヘキサロン酸(グルクロン酸またはイズロン酸)とN-アセチル化したグルコサミンの2糖の繰り返し構造を骨格とするグリコサミノグリカンの一種である。この繰り返し2糖は生合成の過程で、脱N-アセチル化/N-硫酸転位酵素(NDST)によるN-アセチル基のN-硫酸基への置換、C5 エピメラーゼ(Epi)によるグルクロン酸のイズロン酸への変換、HS2-O-硫酸転位酵素(HS2ST)によるヘキサロン酸の2位の硫酸化、さらにHS6-O-硫酸転位酵素(HS6ST)によるグルコサミンの6位の硫酸化、HS3-O-硫酸転位酵素によるグルコサミンの3位の硫酸化を生じる。このようにHSはさまざまな修飾酵素の作用を受け、硫酸化パターンの違いを含む多様な微細構造をもつ。HS鎖の特異的な硫酸基や硫酸化パターンが正常な発生やヘパリン結合性増殖因子の局在などに重要であることが、HS2STのノックアウトマウスが両側の腎臓が完全欠失し、出生前後に死亡することや、NDST-1やEpi遺伝子ノックアウトマウスも出生後に死亡するなど、マウスだけでなくショウジョウバエ、線虫を含む遺伝子改変生物の解析から示されている。ヘパリン結合性増殖因子はHS鎖中の特異的な微細構造を認識して結合し、その活性を制御していると考えられている。事実、HS修飾酵素遺伝子改変ショウジョウバエにより、*Fgf*や*Wingless*(*Wnt* ホモログ)や*Notch*がHSにより制御されていることが示されている。しかし、これら因子の活性制御に関わるHS糖鎖構造は依然として不明な点が多い。様々なヘパリン結合性増殖因子との結合構造を系統的に解析することは、HS鎖の多様性や糖鎖によるヘパリン結合性増殖因子の制御を理解する上で重要である。従来の結合構造解析はアフィニティーカラム分画物の構造の比較により求められることが多く、研究者間で異なった組織由来のHS鎖由来オリゴ糖が出発物質として用いられたために、しばしば異なる結果を示した。そこで本論文では、構造明らかなオリゴ糖ライブラリーを用いることにより、結合に必要な糖鎖長および硫酸基の種類と数を系統的に解析した。まず、結合に必要な糖鎖長を解析するために、イズロン酸2硫酸-Nスルホグルコサミン6硫酸構造を多く含むヘパリンを酵素により断片化し糖鎖長で分画したオリゴ糖ライブラリーを作製した。9種のヘパリン結合性増殖因子をそれぞれ固相化したアフィニティーカラムを用いて結合に必要な糖鎖長を解析し、6種のヘパリン結合性増殖因子は8糖程度のオリゴ糖と結合できたが、3種はより長い糖鎖長が結合に必要なことを明らかにした。次に、結合に必要な硫酸基の種類と数を明らかにするために、完全に脱硫酸化しN-硫酸化したヘパリンからヘキサロン酸-Nスルホグルコサミン構造のみで構成される8糖を調製し、リコンビナントHS2STおよびHS6STを用いて位置特異的に硫酸化した8糖ライブラリーを作製した。8糖と結合した6種のヘパリン結合性増殖因子を8糖ライブラリーを用いて解析し、結合には(1)2-O-硫酸基のみが必要、(2)6-O-硫酸基のみが必要、(3)2-O-硫酸基も6-O-硫酸基もともに必要、(4)2-O-硫酸基か6-O-硫酸基のどちらかが必要、の4タイプに分類できること、および結合に必要な硫酸基数を明らかにした。さらにヘパリン/HSとの結合に長鎖が必要であることが示されたヘパリン結合性増殖因子との結合に必要なO-硫酸基は、選択的に脱O-硫酸化したヘパリンと表面プラスモン共鳴を用いて解析した。以上の方法により、9種のヘパリン結合性増殖因子との結合構造を明らかにし、加えて様々なヘパリン結合性増殖因子が、それぞれ異なったヘパリン/HSの糖鎖長や硫酸基の種類および数を認識することが明らかになった。この手段は他のヘパリン結合性因子の結合構造を解析する上で、有用であると考えられた。

次に、ヘパリン/HSによるヘパリン結合性増殖因子活性制御の機構を明らかにするため、強力な血管新生因子で、ヘパリン結合性増殖因子の1つであるVEGF₁₆₅を例にとり解析した。ヘパリンがVEGF₁₆₅依存性増殖と管腔形成を促進することを示した。さらにヘパリンがVEGF₁₆₅依存性VEGFレセプターのリン酸化を増加することや、細胞表面のHS鎖を酵素によって除くとVEGFレセプターやシグナル分子のリン酸化が低下することを示した。このようなヘパリンの促進効果は、ヘパリン非結合性のスプライシングフォームであるVEGF₁₂₁ではみられなかった。以上の結果は、ヘパリンやHS鎖がVEGF₁₆₅やレセプターと複合体を形成することによって、レセプターやシグナル分子の活性化を制御することを示唆した。さらにヘパリンはVEGF₁₆₅の安定性にも寄与することを明らかにした。今後はオリゴ糖によるヘパリン結合性増殖因子の活性制御について解析していきたい。

論文内容要旨 (英文)

氏名 羽田 智子



論文題目 Studies on binding structures and regulation mechanism involved in the interaction of heparin/heparan sulfate with heparin-binding growth factors

Heparan sulfate (HS) exists ubiquitously on cell surfaces and in extracellular matrix. HS chains are known to interact with a variety of proteins such as heparin-binding growth factors (HBGFs). It has been shown that the binding of certain HBGF requires HS regions with specific monosaccharide sequence and sulfation patterns. In order to clarify the specific binding structures for various HBGFs, we have investigated systematically. We generated a library containing various sizes of heparin oligosaccharides, and examined the required chain length for HBGF binding. The result showed that HBGFs could be classified into two groups, the octasaccharide-binding group (Group A) and non-binding group (Group B). Next, we generated a library of sulfated octasaccharides using recombinant HS 2-*O*-sulfotransferase and HS 6-*O*-sulfotransferase, having well defined structure. The structural requirement, *i.e.* the position and the number of sulfate groups, for binding of Group A HBGFs were examined using an octasaccharide library. This result showed that the members of Group A HBGFs were classified by different requirement of sulfation position as follows: (1) 2-*O*-sulfate groups, (2) 6-*O*-sulfate groups, (3) both 2-*O*- and 6-*O*-sulfate groups, and (4) either 2-*O*- or 6-*O*-sulfate groups. These results demonstrated that these libraries are convenient tools for analysis of the binding structures of heparin/HS for HBGFs. On the other hand, the important *O*-sulfate groups for binding of Group B HBGFs were examined using specific *O*-desulfated heparins and surface plasmon resonance technique. These results indicate that the structural domain in heparin/HS exhibiting affinity to each HBGF could be differentiated in terms of chain size, sulfation position, and the number of sulfate groups.

The role of heparin/HS in regulation of HBGF activities was exemplified by the effect on VEGF activities. VEGF-dependent mitogenic activity and tube formation were promoted by added heparin. Further, heparin enhanced VEGF-induced phosphorylation of VEGF receptor. Depletion of the cell surface HS resulted in the reduction of phosphorylation of VEGF receptor and its downstream molecule. It is likely therefore that heparin forms a ternary complex with VEGF and VEGF receptors, thereby enhancing VEGF-dependent signaling. In addition, we also examined stabilization of VEGF was increased by heparin.

学位論文の審査及び学力確認の結果の要旨

平成 17年2月18日

理工学研究科長 殿

論文博士論文審査委員会

主査 長谷川 典巳

副査 原 慶明

副査 鬼武 一夫

副査 佐々 武史

副査



学位論文審査及び学力確認の結果を下記のとおり報告します。

記

1. 論文申請者

氏 名 羽田 智子

2. 論文題目 (英文の場合は, その和訳を併記すること。)

ヘパリン/ヘパラン硫酸のヘパリン結合性増殖因子との結合構造および活性制御に関する研究

3. 学位論文公聴会

開催日 平成17年 2月10日

場 所 理学部先端科学実験棟S401 (大講義室)

4. 審査年月日

論文審査 平成17年1月26日 ~ 平成17年2月10日

学力確認 平成17年2月9日 ~ 平成17年2月10日

5. 学位論文の審査及び学力確認の結果 (「合格」・「不合格」で記入すること。)

(1) 学位論文審査 合格

(2) 学 力 確 認 合格

6. 学位論文の審査結果の要旨 (1, 200字程度)

別紙のとおり

7. 学力確認の結果の要旨

別紙のとおり

氏名	羽田 智子
学位論文の審査結果の要旨	
<p>序論では、研究の背景と研究の内容についてまとめた。ヘパラン硫酸(HS)はその糖鎖内に存在する多様な硫酸化パターンでヘパリン結合性増殖因子(HBGF)と結合し、その活性を制御することが、HS 修飾酵素遺伝子改変生物の解析等から示唆されている。しかし HS の結合構造が解明されている HBGF は僅かである。そこで、特定の HBGF は HS の特異なパターン構造で結合し、その活性が制御されていると仮説をたて、様々な HBGF の HS 結合構造解析および制御機構の解析を行った。</p> <p>第1章は、天然ヘパラン硫酸を用いた肝細胞増殖因子結合構造の解析についてまとめた。天然 HS オリゴ糖を肝細胞増殖因子(HGF)アフィニティーカラムで分画でき、HGF 結合構造を示した。また、HGF は FGF-2 と異なった構造を認識することを解明した。</p> <p>第2章は、オリゴ糖ライブラリーを用いたヘパリン結合性因子との結合構造の解析についてまとめた。結合に必要な硫酸部位や硫酸基数を系統的に簡便に解析するため、構造が明らかで特徴的な構造の以下に示す8種の8糖からなるライブラリーを作製した。</p> <p>(1)HexA-GlcNS₄構造の8糖(Octa-I)、(2)リコンビナント HS 2-O-硫酸転位酵素により1,2,3個の2-O-硫酸基をそれぞれ持つ Octa-I の3種、(3)リコンビナント HS 6-O-硫酸転位酵素により1,2,3個の6-O-硫酸基をそれぞれ持つ Octa-I の3種、(4)HexA(±2S)-GlcNS(±6S)-[HexA(2S)-GlcNS(6S)]₂構造の8糖である。これらの8糖ライブラリーを用いて、9種の HBGF (FGF-2, FGF-4, FGF-7, FGF-8, FGF-10, FGF-18, HGF, 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)₁₆₅, 骨形成タンパク(BMP)-6) との結合構造を解析して、各 HBGF との結合に必要な糖鎖長、硫酸化部位、硫酸基数を明らかにし、HBGF はそれぞれ異なった HS 構造を認識することを明らかにした。本方法による系統的な解析は、天然 HS を用いた解析では困難だった HBGF 結合最小構造の明示を可能にした。</p> <p>第3章は修飾ヘパリンを用いたヘパリン結合性因子との結合構造解析についてまとめた。HS 長鎖とのみ結合する HBGF は、特異的に2-O-硫酸基または6-O-硫酸基を脱硫酸化したヘパリンとの親和性を、表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサーにより解離定数として求めることで、結合に必要な O-硫酸基と結合への寄与の大きさを数値化することができた。</p> <p>第4章は、血管内皮細胞増殖因子を活性化するヘパリンの作用機序の解析についてまとめた。ヘパリンが VEGF₁₆₅ の生理活性(細胞増殖や管腔形成)を促進することを示し、その活性制御には2-O-硫酸基と6-O-硫酸基が共に必要であることを解明した。このヘパリンによる促進効果は VEGF レセプターのチロシンリン酸化促進と VEGF₁₆₅ の安定化によるものであり、さらに細胞表面の HS が、VEGF レセプターやシグナル伝達物質のリン酸化を制御していることも明らかにした。</p> <p>以上のように、オリゴ糖ライブラリーと脱硫酸化ヘパリンによる解析から、様々な HBGF の結合する HS 構造を解明することができ、今後、オリゴ糖ライブラリーをさらに充実させることにより、HBGF だけでなく、レセプター結合構造や HBGF-レセプター複合体形成に必要な構造など、HBGF の活性制御に必要な構造を明らかにできるものと考えられる。これらの研究成果は国際的生化学の論文誌に2報に掲載され、本研究の後半部分は投稿中である。</p> <p>本研究成果は学術的に大きな価値があり、本論文を博士(理学)論文として合格と判定する。</p>	
学力確認の結果の要旨	
<p>学力の確認は公聴会の席で、研究成果の発表の後に質疑応答の形式で行われた。研究の背景、基礎知識、専門知識についての質問に対して明確な説明、応答があり、羽田智子氏は研究背景の基礎知識を含め、専門領域についても深い知識を有しており、公聴会後の審査委員会で、審査委員全員一致で羽田智子氏に博士(理学)の学位を授与することは妥当であると結論し、合格と判定した。</p>	