

## 論文の内容の要旨

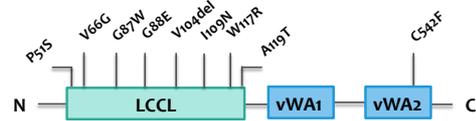
論文題目 CochlinとGAG鎖の相互作用とその生物学的意義

氏名 本田 智子

## 【序論】

細胞表面には、数多くの糖鎖が存在している。糖鎖は体内の水分保持に加え、より高度な生命現象である受精や胚発生、免疫応答など生体内で多岐にわたる役割を担っている。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。

今回着目したレクチン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* の原因遺伝子として同定された。*COCH* 遺伝子上に変異が入ると、20 から 40 代で進行性の難聴障害と平衡感覚障害を呈する。*COCH* の遺伝子産物である Cochlin は蝸牛に最も豊富に存在し、三半規管にも高発現している。Cochlin は N 末端から LCCL、vWA1、vWA2 の 3 つのドメイン構造からなる分子量 63 kDa の分泌タンパク質である (Fig. 1)。



**Fig. 1 Cochlin のドメイン構造と *DFNA9* 患者でみられるミスセンス変異。** 患者で報告されている *COCH* 遺伝子の変異。

現在までに *DFNA9* 患者では *COCH* 遺伝子上に約 20 種類ミスセンス変異が報告されており、その変異は LCCL ドメインに集中している。しかし、健常人と *DFNA9* 患者では Cochlin の分布や発現量に差は見られず、*DFNA9* 発症メカニズム、更には優性遺伝形式をとることや遅発性である理由は不明である。

Cochlin が何らかの細胞外マトリクス成分と相互作用するという前提でリガンドの探索をしたところ、グリコサミノグリカン (GAG) の一つであるヘパリン (Hep) と結合することが明らかになった。そこで、マウス内耳の GAG 組成や局在、年齢による GAG の変化に着目し、Cochlin と GAG との結合を詳細に調べることにより、*DFNA9* 発症メカニズムを解明することを本研究の目的とした。

## 【結果と考察】

### 1. ヒト Cochlin 糖結合性解析

#### 1-1. レポーターアッセイ

ヒト Cochlin の糖結合性をレポーターアッセイにより調べた。レポーターアッセイの原理を記す。細胞表面に発現させたレポーター分子がリガンドと結合し架橋刺激が入ると、CD3 $\zeta$ から細胞内にシグナル伝達が起こる。最終的に IL-2 プロモーターを活性化し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現が誘導される。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を検出することでレポーター分子の結合の有無や強弱を測定する。Reporter assay の結果、ヒト Cochlin は CS-B、CS-E、6-*O*-de sulfated Hep、2-*O*-de sulfated Hep と強く結合した。また、Hep とも結合性を示した。

#### 1-2. 患者由来 Cochlin 変異体の糖結合性解析

DFNA9 患者にみられる変異を導入した 8 種類のコチリン変異体レポーター細胞を作成し、レポーターアッセイにより糖結合性を調べた。その結果 Cochlin 変異体では、程度に差があるものの Cochlin wild-type (WT) と比較して GAG に対する結合性が減少する傾向にあった

(Fig. 2)。この結果から、DFNA9 患者では Cochlin の LCCL ドメインに変異が生じることによって GAG に対する結合性が低下していることが示唆された。

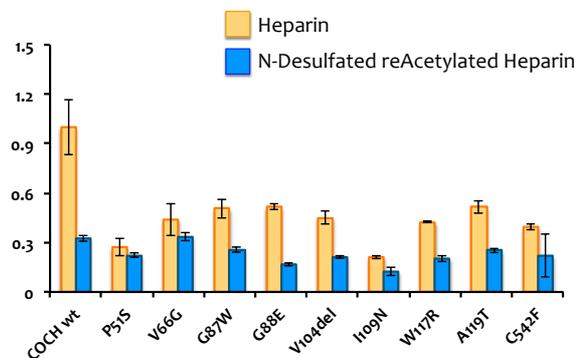


Fig. 2 変異体 Cochlin の Hep、N-desulfated Hep に対する結合性。

Reporter assay による変異体 Cochlin と Hep、N-desulfated Hep の結合性解析。縦軸は吸光度、横軸は Cochlin に変異を入れた箇所を示す。

### 2. マウス Cochlin 糖結合性解析

マウス Cochlin の糖結合性を調べるために、ヒト Cochlin と同様にマウス Cochlin レポーター細胞を作成し、Reporter assay により GAG との結合性を調べた。その結果、マウス Cochlin は CS-E、Hep、2-*O*-desulfated Hep、6-*O*-desulfated Hep と結合しており、これはヒト Cochlin の結果と類似の傾向を示した。ヒト組織の入手は困難であるため、次にマウスの組織を用いてより詳細な解析を行った。

### 3. マウス内耳の GAG 組成

マウス内耳に Cochlin が結合可能な GAG が存在するかを調べるために、GAG 画分を調製し、その二糖ユニットの解析を行った。内耳から GAG を抽出した後 heparinase I, II, III により二糖に消化し、ゲルろ過およびイオン交換 HPLC を組み合わせた解析を行うことにより内耳由来ヘパラン硫酸 (HS)/Hep の二糖組成を決定した。その結果、内耳の HS/Hep は Hep に見られる三硫酸化構造はほとんど存在しなかったが、二硫酸化構造 (6-*O*-desulfated or 2-*O*-desulfated) および一硫酸化構造が含まれていた (Table 1)。

Table 1 マウス内耳 HS/Hep 二糖組成

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

ELISA およびレポーターアッセイの結果から、Cochlin は Hep、6-*O*-desulfated Hep、2-*O*-desulfated Hep と結合することが明らかになっている。そのため、マウス内耳には Cochlin と結合可能な GAG の二糖ユニットが存在していることが判明した。また、内耳 CS の二糖組成は Chondroitinase ABC を用いて消化した後 HS/Hep と同様の手法により解析した。

### 4. マウス内耳の免疫染色

マウス内耳において Cochlin が結合する GAG 鎖の局在を調べるために、マウス Cochlin-Fc 融合タンパク質を作成した。作成したマウス Cochlin-Fc 融合タンパク質の GAG 鎖との結合性を評価するために、ELISA の系でアッセイを行った。その結果、マウス Cochlin は CS-B、CS-D、CS-E、Hep と結合し、Reporter assay と同様の結果が得られたため、この Fc 融合タンパク質を用いてマウス内耳組織の免疫染色を行った。

#### 4-1 マウス内耳免疫染色

マウス内耳における Cochlin および Cochlin が結合する GAG の局在を明らかにするため、マウス内耳のパラフィン切片を作製し免疫染色を行った。マウスから内耳を採取し、4% PFA で固定した後 120 mM EDTA 溶液中で脱灰を行った。その後、内耳をパラフィンで包埋しミクロトームを用いて 15  $\mu$ m の連続切片を作成した。まず内耳組織の全体像を把握するために HE 染色を行ったところ蝸牛等の構造を観察することができた。次に抗 Cochlin 抗体およびマウス Cochlin Fc 融合タンパク質を用いて内耳の染色を行ったところ、両者とも特異的な染色像が得られた。また、抗 Cochlin 抗体とマウス Cochlin Fc 融合タンパク質による染色部位が重なっており、Cochlin とそのリガンドが共局在していることが示唆された。

## 【結論】

今回の実験によりヒト Cochlin は、GAG の 6-O-desulfated Hep や 2-O-desulfated Hep、CS-E、CS-B と強く結合していることが明らかになった。また、内耳 GAG の HS/Hep 組成を調べたところ、内耳には二硫酸化 HS/Hep (6-O, 2-O or N-desulfated Hep)、一硫酸化 HS/Hep が存在していることが判明した。このことから、内耳には Cochlin のリガンドとなりうる GAG が存在しているといえる。さらに、内耳の免疫染色を行った結果、内耳において Cochlin と Cochlin のリガンドが共局在していた。Cochlin と細胞外マトリックスに存在する分子との結合性を Reporter assay により調べたところ、GAG のみと強く結合していたことから、Cochlin は内耳において GAG と結合していることが強く示唆された。

従来の研究では Cochlin 分子の性質や発現量にのみ着目して DFNA9 発症メカニズムを解明しようとしていたが、今回の研究においては、Cochlin のリガンドとして GAG という分子を見出し、両者の相互作用という観点から DFNA9 の症状を理解できるようになった点で新しい視点を開いたといえる。

DFNA9 患者由来の変異を導入した Cochlin レポーター細胞では GAG に対する結合性が減少しており、特に CSE に対する結合性はほぼ消失していた。このことから、DFNA9 患者では Cochlin 遺伝子上に変異が入ることにより GAG との結合性が低下することで病気を発症する可能性が示唆された。また、過去の研究から GAG は年齢とともにその硫酸化が低下し、さらに発現量が減少することが知られている。この知見から、年齢とともに内耳中の GAG 量が減少することにより、元々 GAG に対する結合性が低かった患者 Cochlin の GAG との結合によるシグナルが閾値以下になることで健常人よりも早期に難聴等を発症するのではないかと考えられる。さらに、Cochlin のようなレクチンと糖との相互作用はタンパク質同士の相互作用よりも弱いことが知られており、レクチンは一般に二量体や多量体を形成することで結合性を高めている。Cochlin も二量体を形成することが知られているが、DFNA9 患者では正常な Cochlin と変異体 Cochlin が同時に合成され、ヘテロダイマーを多く形成する。このヘテロダイマーは親和性を上昇させることができないことから、DFNA9 は優性遺伝の形式をとると考えられた。