

氏 名 濱 中 裕 喜

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第236号

学位授与の日付 平成8年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Carbohydrate Modification of 6B4 Proteoglycan,
and Its Splicing Variant, Receptor-like Protein
Tyrosine Phosphatase ζ in the developing chick
brain

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 長濱 嘉孝
教 授 野田 昌晴
教 授 堀内 嵩
教 授 山森 哲雄

論文内容の要旨

The brain contains a diverse set of proteoglycans as the major component of the cell-surface glycoconjugates and of the extracellular matrix (ECM). 6B4 proteoglycan (6B4PG) is one of the major soluble chondroitin sulfate proteoglycans in the brain, and has a structure corresponding to the extracellular domain of a proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase, PTP ζ (RPTP β). In this study, he first identified chick 6B4 PG by purifying it from embryonic chick brain and determining the N-terminal amino acid sequence. The obtained sequence corresponded well to that of rat 6B4 PG. From the biochemical properties of the purified protein and its immunoreactivity with MAb 6B4, he concluded that MAb 6B4 (originally raised against rat 6B4 PG)-reactive proteoglycan in chick tissue is chick 6B4 PG.

Next, he prepared polyclonal antibodies which specifically recognize chick 6B4 PG and PTP ζ , and analyzed the carbohydrate structures on the two molecules in the developing chick brain. Immunoprecipitation experiments using these antibodies revealed that almost all of the keratan sulfate and protein-bound Le^x carbohydrate structure were exclusively bound to 6B4 PG and PTP ζ . The modifications with keratan sulfate and Le^x carbohydrate were occurred on both of 6B4 PG and PTP ζ . Furthermore he found that the modifications of 6B4 PG and PTP ζ with those carbohydrates are spatiotemporally regulated during development.

Addition of keratan sulfate to these proteoglycans markedly increased from embryonic day 11 (E11), in contrast to that of Le^x and HNK-1 carbohydrates which increased gradually during development in accordance with expression of the core proteins. This suggests that keratan sulfate plays some specific roles in development. In the developing tectum, in contrast to the uniform distribution of the core proteins during development, keratan sulfate was expressed only in the lateral region of the tectum at E10, and the expression was extended toward the dorsal area until E13. Moreover, keratan sulfate modification occurs in several restricted regions of the early embryonic chick brain, especially at morphogenetic boundary regions such as the roof plate of the tectum, the zona limitans intrathalamica in the diencephalon, and the mes-metencephalic boundary.

At the mes-metencephalic boundary, keratan sulfate modification of these proteoglycans was specifically observed from E3 to E6 on a ring of cells encircling the neural tube. In this region, keratan sulfate staining was observed on the cell bodies and the radially oriented processes. These processes were likely to be stained with anti-vimentin antibody but not with anti-neurofilament antibody. Thus, he tentatively defined these processes as

radial glial fibers that are considered to be the scaffold for migrating neurons. He also found that the neurofilament- and Ng-CAM-positive growing axons passed through the keratan sulfate-rich mes-metencephalic region. The expression pattern of keratan sulfate in this region spatiotemporally corresponded well to the *Wnt-1* and *Fgf-8* expression and to the fovea isthmi formation, a groove separating the mes-metencephalon along the neural tube. He confirmed that these locally expressed keratan sulfate is bound to 6B4 PG and PTP ζ . These results suggest that keratan sulfate on 6B4 PG and PTP ζ play important roles in brain morphogenesis by modulating the cell-cell and/or cell-substratum interactions mediated by these molecules.

審査結果の要旨

本論文の内容は脳の主要な可溶性コンドロイチン硫酸(CS)プロテオグリカン(PG)である6B4PG(phosphacan)とそのRNA splicing variant である蛋白チロシンフォスファターゼ ζ (PTP ζ)の脳発生における糖鎖修飾の様式とその意義を明らかにすることを目的とする研究である。

申請者は生化学的解析において材料採集の容易なニワトリ胚より6B4PGを精製・同定し、これに対するポリクローナル抗体を作製した。またPTP ζ を特異的に認識する抗ペプチド抗体 α PZ-1を作製し、6B4PGとPTP ζ を分別することによって以下のことを明らかにした。

- ①PTP- ζ は6B4PGと同様にコンドロイチン硫酸PGである。
- ②脳内のケラタン硫酸(KS)はほとんど6B4PGとPTP ζ に結合している。
- ③6B4PGとPTP ζ は脳においてLe^x糖鎖が結合しているほとんど唯一の蛋白質である。
- ④6B4PGとPTP ζ のKSによる修飾は、他の糖鎖(CS、HNK-1糖鎖、Le^x糖鎖)による修飾が蛋白の発現量と相関するのに対し、特に顕著に調節されている。
 - (a) 発生初期においてKSによる両蛋白の修飾は脳胞の境界部のごく限られた領域(終脳の腹側、間脳の zona limitans、中脳の背板、中脳と後脳の境界部)においてのみ見られる。
 - (b) 発生初期の中脳と後脳の境界部の修飾は一過性におこり、放射状グリアにおいて見られる。
 - (c) 発生中期においても中脳の腹側から背側にかけて順次修飾が起こるといふ調節が見られる。

6B4PGすなわちPTP ζ の細胞外領域にはN-CAM、Ng-CAM、contactin といった細胞接着分子、細胞外マトリックス分子である tanascin が結合することが報告されている。また最近、申請者の所属する研究グループにおいて、ヘパリン結合性神経突起伸展因子(HB-GAM/pleiotrophin)が6B4PGに結合すること、また本因子の作用が抗6B4PG抗体によって抑制できることが見いだされた。このように6B4PG、PTP ζ の両分子は細胞外において多くの分子と相互作用することが知られているが、その結合がPTP ζ のPTPase活性を制御しているかについては不明である。また、PTPaseの細胞内基質蛋白分子も同定されていない。しかしながら、両分子の発現部位や時期から、細胞移動や神経回路形成に重要な機能を果たしていることが推定されている。本研究によって明らかにされた脳胞形成時の境界部に限定されたKSによる両分子の修飾は、Wnt-1やFgf-8の発現部位と一致しており、これらの分子と6B4PG、PTP ζ との相互作用の調節の可能性を示唆している。また従来KSは *in vitro* において神経突起の伸展に阻害的作用を示すと言われてきた。申請者は実際の脳発生におけるKS発現領域を精査した結果、そのような現象は見られないことを明らかにしている。以上のように本論文はPTP ζ の糖鎖修飾に対して初めて検討を加えたものであり、数々の重要な新知見を得ている。これらの研究結果は6B4PGとPTP ζ 両分子の脳形成における役割について非常に有用な知見を与えたものとしてその学術的意義は大きく、理学博士の学位を取得するに足りるものである。

また、学位論文として提出された研究結果について口頭発表させた後、審査委員が論文内容について諮問した。さらに、申請者の関連研究分野の一般知識及びその背景となる基

礎知識についても口頭諮問により審査した。これらの諮問に対する申請者の応答はいずれも適切であった。また、提出された学位論文は英文で書かれており、英語の能力についても適正であると考えられた。これらの結果をもとに、審査委員会は申請者の持つ研究能力及び学力は学位取得に値するものと判断した。