

研究題目：抗体 R-10G を用いるヒト iPS 細胞由来ケラタン硫酸の研究

豊田 英尚 (立命館大学薬学部、教授)

ES 細胞や iPS 細胞は再生医療・新薬開発に大きく寄与するものと期待されている。ヒト iPS/ES 細胞の研究に汎用されている SSEA-3、SSEA-4、TRA (tumor rejection antigen)-1-60、TRA-1-81 抗体のエピトープはいずれも糖鎖であることから、iPS/ES 細胞における糖鎖研究の重要性は明らかである。最近報告者らは、ヒト iPS/ES 細胞に特異的な単クローン抗体 R-10G の作製に成功し、そのエピトープは、ケラタン硫酸であることを明らかにしている(1)。ケラタン硫酸 (keratan sulfate, KS) は、 $-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}(6\text{S})\beta 1$ -の硫酸化二糖の繰り返し構造を持つ糖鎖である。硫酸基が Gal の 6 位炭素に結合する場合もあり、シアル酸やフコースが結合する場合もある。TRA-1-60 もまた ケラタン硫酸を認識する抗体として報告されている。しかしながら著者らは、R-10G と TRA-1-60 はヒト iPS 細胞の同一コロニー内の異なる細胞集団と結合することを明らかにしており(1)、R-10G エピトープと TRA-1-60 エピトープの糖鎖構造の解明が急がれている。そこで、本研究では 7 種類のビオチン化ケラタン硫酸類縁オリゴ糖 (*N*-アセチルラクトサミンの 2 量体) を化学合成し、これらをプローブとして用いる ELISA 法により R-10G および TRA-1-60 の結合特異性を詳細に解析した。

<方法>表 1 に示すように、硫酸化の程度 (0S、2S、4S) および繰り返し 2 糖単位の configuration (type 1; $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$, type 2; $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$) の異なる 7 種類のオリゴ糖鎖のビオチン化誘導体を作成し (東京化成工業の協力による)、これらをアビジンプレートに固定したのち、R-10G、TRA-1-60、および従来ケラタン硫酸認識抗体として市販されている 5-D-4 抗体を加えて反応させ、プレートに結合した抗体量を HRP-標識抗マウス Ig ユサギ抗体で可視化して測定した。

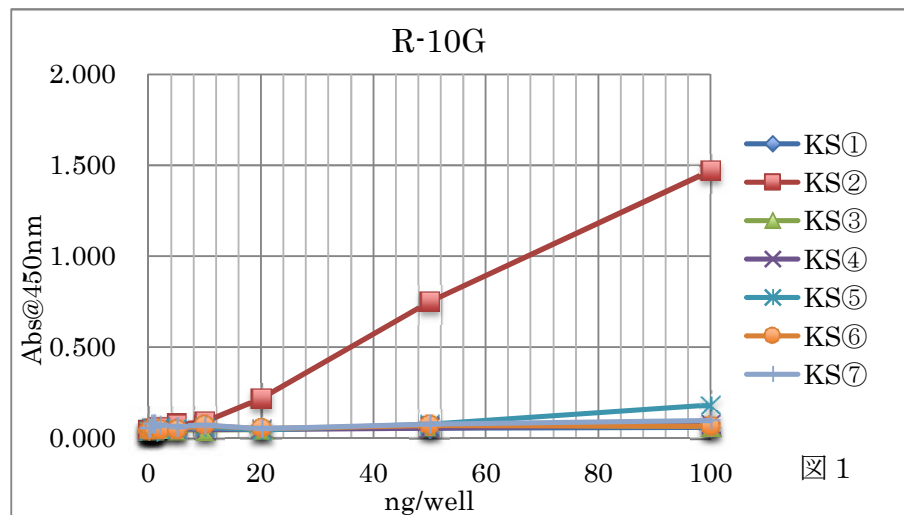
表1 ビオチン化ケラタン硫酸類縁オリゴ糖鎖

KS1 : $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1$ (type 2-type 2 (0S));
KS2 : $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}(6\text{S})\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}(6\text{S})\beta 1$ (type 2-type 2 (2S));
KS3 : $\text{Gal}\beta(6\text{S})1-4\text{GlcNAc}(6\text{S})\beta 1-3\text{Gal}(6\text{S})\beta 1-4\text{GlcNAc}(6\text{S})\beta 1$ (type 2-type 2 (4S));
KS4 : $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1$ (type 1-type 2 (0S));
KS5 : $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}(6\text{S})\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}(6\text{S})\beta 1$ (type 1-type 2 (2S));
KS6 : $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1$ (type 1-type 1 (0S));
KS7 : $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}(6\text{S})\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}(6\text{S})\beta 1$ (type 1-type 1 (2S)).

<結果>上記 7 種類のビオチン化した合成糖鎖を結合させたプレートに、0-100 ng/well の R-10G 抗体を添加したのち、結合した抗体量を測定したところ、図 1 に示すように、R-10G は KS2 に対して、加えた抗体量依存的に強い結合活性を示した。R-10G は一方、KS2 と同じ type 2-type 2 の基本骨格を持つが硫酸基修飾を含まない KS1 (ポリラクトサミン)、KS2 の Gal 残基が硫酸基修飾された高硫酸化ケラタン硫酸である KS3、KS2 と異なり type 1-type 2 の基本骨格を持つ KS4 および KS5、さらに、type 1-type 1 の基本骨格を持つ KS6 および KS7 に

対しては、ほとんど結合活性を示さなかった。以上の結果から、KS2の最小エピトープは、ケラタン硫酸の基本的な繰り返し単位を構成している、GlcNAcの6位が硫酸基修飾を受けた (type 2-type 2)の4糖構造であることが明らかとなった。ところで、この糖鎖構造は生体に含まれるほとんどすべてのケラタン硫酸に共通の基本繰り返し構造である。にもかかわらず、本抗体は、ヒト iPS/ES 細胞、脳など極めて限られた組織、細胞にしか結合しない。その理由は、他の組織、たとえば、軟骨や角膜のケラタン硫酸は、この基本構造がさらに硫酸化された高硫酸化ケラタン硫酸構造を含むからであると考えられる。

TRA-1-60 について同様の ELISA を行ったところ、KS4 に対して最も強い結合性を示し、次いで KS5 にその数分の1程度の結合性を示した。一方、R-10G のエピトープ糖鎖である KS2 に対しては全く結合しなかった。KS4 および KS5 は type 1-type 2 の混合型基本骨格を持つ共通点を有す



ることから、本構造が TRA-1-60 による認識の主要因となっていると考えられる。なお、TRA-1-60 の結合性は GlcNAc の 6 位に硫酸基を持たない糖鎖 (KS4) で強く、硫酸基修飾を受けると (KS5) 結合性は減弱した。これらの結果は、TRA-1-60 の最小エピトープは KS4 (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1) という特殊なポリ-N-アセチルラクトサミン型糖鎖であることを示している。

5-D-4 は調べた 7 種の合成オリゴ糖鎖のうち KS3 とのみ結合した。従って 5-D-4 の最小エピトープは、高硫酸化ケラタン硫酸の基本骨格 KS3 (Gal (6S) β 1-4GlcNAc (6S) β 1-3Gal (6S) β 1-4GlcNAc (6S) β 1) であることが示された (2)。

以上の研究成果は、ヒト iPS/ES 細胞表面マーカー抗体の研究として、また、成体におけるケラタン硫酸プロテオグリカンの研究として多方面より高く評価されている。

- (1) Kawabe, K., et al., A novel antibody for human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells recognizes a type of keratan sulfate lacking oversulfated structures. *Glycobiology*, **23**, 322-336 (2013).
- (2) Nakao H, Nagai Y, Kojima A, Toyoda H, Kawasaki N, Kawasaki T. Binding specificity of R-10G and TRA-1-60/81, and substrate specificity of keratanase II studied with chemically synthesized oligosaccharides. *Glycoconj. J.*, **34**, 789-795 (2017).