

総 説

軸索路形成におけるコンドロイチン硫酸の役割； コンドロイチン硫酸誘導体を用いたアプローチ

一條裕之

Chondroitin sulfate derivatives and their application for understanding axon guidance

Hiroyuki ICHIJO

Department of Anatomy, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama,

要 旨

発生期の神経系の軸索は経路に沿って配置されたガイダンス因子を順次に検知することで、軸索路を形成する。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの糖鎖、コンドロイチン硫酸 (CS) は細胞外で軸索伸長に多様な効果をおよぼすが、その構造多様性と機能の関係を検討することはこれまで困難であった。本稿では構造を改変したCS誘導体を用いて、軸索路形成に於けるCSの構造と機能の関係を明らかにする試みを紹介する。CSビオチン化誘導体を用いる実験では、軸索がCSを改変して自らの伸長に都合の良い微小環境を作ることが示唆された。CS脂質誘導体を吸着したビーズを用いる実験では、CSの構造の違いが成長円錐の行動に及ぼす効果を検討できるようになった。CSの構造と機能の関係を検討するために、誘導体を用いた培養実験は遺伝学的な方法の相補的なアプローチとして重要であろう。

Abstract

During development, neuronal growth cones and axons recognize sequentially molecular guidance cues along their paths and form precise axonal pathways. Carbohydrate chains of chondroitin sulfate proteoglycans (chondroitin sulfates, CSs) exert various effects on axonal elongation in extracellular environment of the nervous system; however, it has been difficult to examine relationship between CS structural diversity and its function. This review presents experimental approaches using CS derivatives in pathway formation. Biotinylated CS allowed us to reveal that growing axons are thought to improve microenvironment for their growth by modifying CS carbohydrate chains. Lipid-derivatized CS enabled us to investigate relationship between structural diversity of CS and its functional specificity on growth cones behaviors. In vitro experiments with using CS derivatives are important because of approaching directly to CS function.

Key words : proteoglycan, chondroitin sulfate, retina, axon, growth cone, circuit formation

■神経回路形成

神経系の発生過程において、神経細胞から伸長する軸索は正確な経路にそって進み、幾多の過程を経て標的となる神経細胞を探し出し、シナプスを形成する。神経細胞は神経回路形成を通じて、神経機能の構造的な基盤を作り上げる。神経回路形成は軸索が伸長経路を選択する「軸索路形成 (pathfinding)」と相手方の神経細胞集団や神経細胞を見つけ出してシナプスを作る「標識選択 (target recognition)」の過程に分けて考えると理解しやすい。軸索路形成は遺伝的に規定されている機構に大きく支配されている。軸索の先端にある成長円錐が周辺の細胞や細胞外基質がつくる小さな環境の違いを鋭敏に

感知し、伸長するべき道筋と避けるべき領域を識別する。環境の中にあつて、成長円錐の行動に影響を与えて軸索伸長に影響を及ぼす分子群を軸索ガイダンス因子 (axonal guidance cues) と呼び、それらは軸索を引き寄せるもの (attractive guidance cues) と遠ざけるもの (repulsive guidance cues) の異なった作用をもつ分子群であろうと古くから想定されてきた。過去20年ほどの間にそれらは次々と同定され、軸索路形成機構の理解が大きく進んだ。それらは考えられたとおり、軸索を誘引するものとして、または軸索を忌避させるものとして同定されたが、軸索側の受容体や細胞内情報伝達系の感受性の違いによって、誘引と忌避は相対的に切り換えら

れるもので、それらの組み合わせの違いによって、神経細胞の軸索路形成が調整されて、全体として整然とした軸索路が形成されることが明らかになった¹⁾。

■コンドロイチン硫酸プロテオグリカン

プロテオグリカン (proteoglycan) はコアタンパク質に長い直鎖状の糖鎖が共有結合したハイブリッド分子である²⁾。それらには糖鎖を構成する要素の違いによってヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan: HSPG) とコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (chondroitin sulfate proteoglycan: CSPG) などがある。いずれも神経系の発生に深く関わる分子で、HSPGはその糖鎖 (heparan sulfate, HS) を介して、さまざまな成長因子と相互作用して神経系の分化や回路形成に影響を与えられている。CSPGの糖鎖 (chondroitin sulfate, CS) は他の蛋白性因子と相互作用することに加えて、CSそのものの機能が注目されている。本稿では、CSの神経回路形成における機能を検討するための新しい方法とその応用を紹介する。

CSPGはコアタンパク質とコンドロイチン硫酸 (CS) という糖鎖から構成される。CSPGの機能はコアタンパクに由来するものと、CSに由来するものに分けて考える事ができる。コアタンパクはそれぞれのタンパク質構造に依存した分子間相互作用を介して細胞外マトリックスに参加する。CSはグルクロン酸 (GlcA) とNアセチルガラクトサミン (GalNAc) の二糖ユニットが20から200ほど繰り返す直鎖の高分子である。CSは細胞外質中で他の成長因子と相互作用し、その機能を調節すると考えられてきたが、それ自身が細胞に直接に認識されて guidance cueとしての効果を及ぼすことが示唆されている³⁾。

軸索伸長に及ぼすCSの効果は抑制性であることが様々な場面で観察されている^{4~15)}。さらにCSはグリア瘢痕に蓄積して、中枢神経系が損傷した時の軸索再伸長 (軸索路再生) を抑制することが知られており、CSを取り除くことによる治療効果が動物実験で証明され、応用が期待されている^{16~19)}。そのためCSは脊髄損傷などの医薬研究開発の一つの焦点となっている。しかしながら、他方、CSは異なった神経細胞に多様な効果を及ぼすことが報告されている。CSは培養海馬神経細胞の軸索伸長を促進し、網膜神経節細胞の栄養因子として機能するといわれている^{20~26)}。近年はマウスの一次視覚野に於ける神経回路の可塑性に及ぼすCSの効果が示された^{27~29)}。このような多様な効果はCSPGやCSの中には異なった機能特異性を有する多様な分子が含まれることを示唆している。軸索路形成を理解する上でもCSの多様な機能を可能にする機構を探究することは重要であろう。

CSの二糖ユニット (GlcA-GalNAc) のさまざまな位

置に硫酸基が付加される結果、異なった構造ユニットが形成されることが知られている²⁾。それらはアルファベットでO-, A-, B-, C-, D-, E-unitとよばれ、ユニットの組み合わせによってCS鎖の構造多様性が生み出される。CS鎖にはユニットの割合が異なるという組成の多様性や、CS鎖中のユニットの配列順序が異なるというユニット配列の多様性などの種々のレベルの多様性が存在すると考えられる。近年、細胞が特定のCS構造を識別しているという示唆があるが、その分子機構については不明の点が多く、興味深い^{22, 30~32)}。

■方法論的問題

しかしながら、これまで、CSの構造と機能の関係を探究することは容易ではなかった。CSは様々な段階を経て合成される。糖の合成、糖キャリアの発現とその調節、個々の糖鎖合成酵素の発現と活性調節、種々の糖鎖合成酵素の相互作用に依存したCS鎖の合成、CSユニットへの個々の硫酸基転移酵素の発現と活性調節、などが相互に関連して作働した結果としてCSの構造多様性が成り立つことを考えれば、CSのユニット組成や配列などの構造は遺伝的情報によって直接に規定されていないのは自明である³³⁾。現状では化学的に合成した標準的な構造のCS標品を用いることは困難であるので、生物学的なサンプルを利用した上で、生理学的なカタチで細胞に作用させて、その機能を探る必要が有る。

さらにCSの機能を探る場合には生体内においてはCSがコアタンパクと結合して機能する事を考慮しなければならず、CS鎖単独で細胞に与える効果は生理学的とはいえない。しかしながら、方法の困難さからこれまでに十分に配慮した研究が為されてきたとはいえない。生体サンプルから生成したCSPGにおいてCSの組成を明らかにして、同じコアタンパクに異なった種類のCSを有するCSPGのライブラリーカタログをつくって細胞や成長円錐に及ぼす効果を検討する事ができれば理想的であるが、十分に多量を生化学的に精製し、ライブラリー化するの著しく苦勞の多い作業である。CSPGがハイブリッド分子であり、CSの構造が遺伝情報に直接に記載されていないことから、遺伝子組換えタンパク質のように標準化した産物を試験管内で作るという野望は現段階では著しく困難であろう。これらの困難に加えて、CSとコアタンパクを分離して検討するためにはハイブリッド分子を組み立て、糖鎖とタンパクの組み合わせを自在に操る必要がある。

■ビオチン化コンドロイチン硫酸

軸索路形成におけるCSの機能を明らかにするために、私達はCSの二種類の誘導体を利用し、生体内のCSPGを模倣し、神経科学の実験に応用して成果を得ている。第一の誘導体はビオチン化CSである³⁴⁾。生物材

料から精製され販売されているCS標品の還元端にビオチンを化学的に結合させたもので、ビオチン化CSとストレプトアビジンを混和すると複合体が形成される³⁵⁾。インキュベートした溶液を非変性条件で電気泳動すると、ストレプトアビジンのシャープなバンドに変わって、高分子寄りに広く拡がって分布するスミア状のバンドが観察され、ビオチンとアビジンの高い親和性によってCS-biotin-streptavidin複合体が形成されたことを示す。streptavidinとbiotinは1対1で結合し、streptavidinは4量体を形成することが知られているので、CS-biotin 4分子とstreptavidin 4分子が結合し、全体として4本のCS鎖をもつ人工的なCSPGが作られたと考えられる。biotinとstreptavidinの結合は自然界において最も高親和性の結合の一つとして知られており、生理的な条件下で解離する可能性は著しく小さく、培養実験下でも安定した複合体を維持すると考えられ「人工的なCSPG」として、機能的な実験に活用する事ができる。コアタンパクに相当するstreptavidinは軸索伸長に影響を与えず、中立であることを予備実験で確認したので、CSの機能を独立して検討する事が期待される (Fig. 1)。

CSは軸索伸長について抑制性であるといわれることが多い。網膜神経節細胞の軸索はCSによって伸長が抑制されると考えられるが、生体内のCSの分布と軸索路の空間的配置を詳細に観察するとCSを豊富に含む領域に接して走行する網膜軸索があることが確認される³⁶⁾。さらに網膜神経節細胞の培養実験ではCSを含む培養基質の上では、少量の軸索伸長が観察されるので、網膜神経節細胞の中にはCSの軸索伸長抑制効果に対する感受性が異なるものが混在していると考えられる。さらに海馬などの異なった種類の神経細胞の実験では、CSによって軸索伸長が促進されると報告されている。これらのことは、CSが軸索伸長の及ぼす効果は細胞によって異なっており、これは神経細胞のCSに対する感受性が多様であることを示唆している。

網膜軸索とCSとの相互作用を検討するために、人工CSPG (CS-biotin-streptavidin) とラミニンを含む培養基質の上で網膜軸索を伸長させた。抗CS抗体と抗streptavidin抗体による免疫染色によって培養基質中の人工CSPGの密度を検討すると、軸索の伸長経路に一致して、抗CS抗体染色の減弱が観察された;抗streptavidin抗体染色は減弱していないことから、抗CS抗体染色密度の低下は、基質への抗体のアクセスが軸索によって機械的に妨げられているためではなく、基質中のCS染色だけが減少しているためと考えられ、網膜軸索によるCS鎖の切断やCS鎖の改変の可能性が考えられる。CS糖鎖部分の染色のみが減弱し、抗streptavidin抗体の染色が減弱しないことから、網膜軸索は基質に非特異的に影響を及ぼすのではなく、特異的に局所のCS糖鎖の密度を減少させていると考えられる³⁵⁾。軸索は伸長

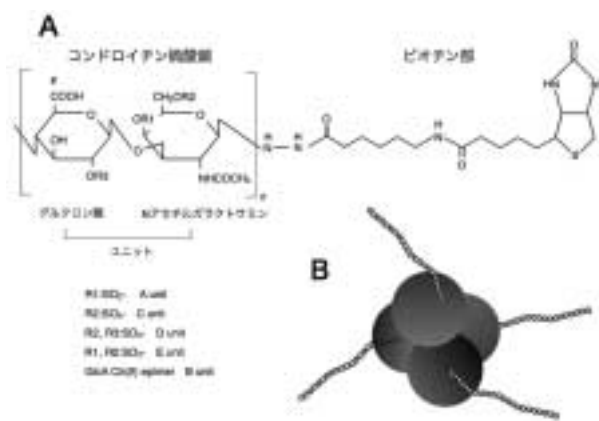


Figure 1

- (A) ビオチン化コンドロイチン硫酸。コンドロイチン硫酸の還元端にビオチンを結合させている。ユニットのR1位に硫酸基が付加されたものをAユニット、R2：Cユニット、R2とR3：Dユニット、R1とR2：Eユニットと呼ぶ。グルクロン酸のC5位(＃)のエピマーを有するユニットをBユニットと呼ぶ。これらのユニット構造の組み合わせによって構造多様性が生じる。
- (B) ストレプトアビジン-ビオチン化コンドロイチン硫酸-複合体の模式図。ストレプトアビジン (灰色の球状部) 1分子に対してビオチン化コンドロイチン硫酸 (鎖状) 1本が結合し、それらが4量体を作ると考えられる。

する微小環境に働きかけて、CS糖鎖を改変し、軸索伸長にふさわしいものにするという適応なのかもしれない。神経細胞がCS糖鎖構造を改変する機構はこれまで指摘されることは無く、研究されていなかった。脊髄損傷などの中枢神経系の軸索路再形成 (軸索路再生) におけるCSの重要性が指摘されている中、CSを改変する内在性の機構を示唆することは意義深く、CS-biotin誘導体を活用した研究例として重要である。

このようにCS-biotin誘導体は人工CSPGの作製に有用である。異なったユニット組成のCS標品を用いて、CS-biotinを合成し、CSの構造多様性を反映させた複合体を形成させることができよう。構造の異なるCS鎖の効果を同じコアタンパクに結合する生理的な条件下で比較し、構造多様性が機能特異性に及ぼす効果を検討する事が可能になる。軸索路形成だけでなく、他分野を含めた今後の応用のアイデアも期待される。

■コンドロイチン硫酸脂質誘導体

神経回路形成におけるCSの役割を理解するためにさまざまなアプローチがあるが、CSの効果を直接に検討する事ができる培養実験は重要である。従来から、培養皿の表面にCSを吸着させたスポットを作製し、スポットの内外の領域における軸索の振る舞いを比較する「スポットアッセイ」が用いられているが、この方法には問題が多い。安定したスポットを作るためには、最初にCSを培養表面に吸着させ、その後ラミニンなどの基礎的な基質をコートする必要があるが、先に吸着させたCS

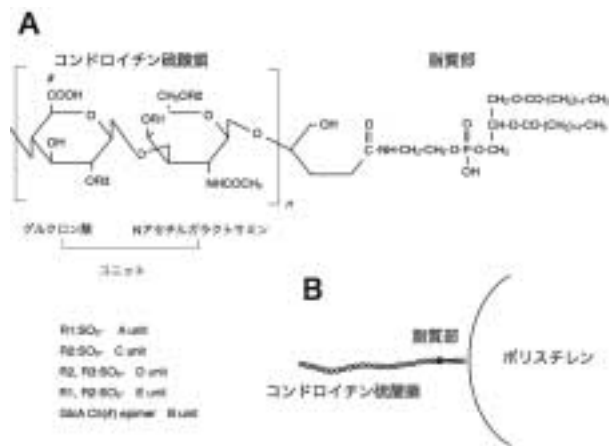


Figure 2

- (A) コンドロイチン硫酸脂質誘導体。コンドロイチン硫酸の還元端にフォスファチジルエタノールアミン（脂質部）を結合させている。
- (B) コンドロイチン硫酸ビーズの模式図。脂質部とポリスチレン表面が疎水性に結合し、コンドロイチン硫酸が表面に提示されたビーズが作られる。

がその後のラミニンのコーティングを妨げ、ラミニン密度がスポット内で少なくなってしまう。スポットの境界を明瞭にするためにはコーティングの順序を変えることはできず、軸索はラミニン密度の大きな環境を好むので、公平にCSの効果を検討するには不適当である。スポットアッセイの例の様に二次元的な培養基質上でCSの機能を調べることは容易ではない。Gilbertは二次元的培養基質には限界があることを指摘し、CSとagarを共有結合させた人工的な分子を作製し、CSを含む三元ゲルの中で細胞を培養することでCSの機能を検討し、成果を上げている³¹⁾。

私達は従来の方法における問題を解決して、CSの軸索伸長に及ぼす効果を直接に検討するために、CSの還元端にphosphatidylethanolamine (PE) のアミノ基を結合させたCS脂質誘導体を利用した³⁷⁾。CS脂質誘導体は親水性のCS鎖と疎水性のPE部分を有し、ポリスチレンビーズと共存させるとビーズの疎水性の表面にPE部分が吸着するので、CS鎖を外側に向けて配置するCS-PE beadsを作製することができる。培養基質の上にCS-PE beadsを散布しておく、軸索が伸長してビーズに接触する様子をタイムラプスムービーで観察することができる。この方法によって成長円錐が局所のCSに遭遇した後の行動の変化をとおして、成長円錐行動に及ぼすCSの効果を検討する事が可能になった。さらにユニット組成の異なる種々のCS標品の脂質誘導体を準備し、CSの構造多様性が成長円錐行動に及ぼす効果を検討することが可能になった。

近年、CSがマウスの視覚野に於ける可塑性に関わることが報告されている。CSはその鎖の中に含まれる組成や配列の違いなどの多様な情報を手がかりにして、軸

索や成長円錐の行動を細やかに調節に寄与すると考える事ができる。これまでに明らかにされてきたタンパク質性ガイダンス因子の示すスイッチのオンオフの様な明瞭な作用に加えて、CSの構造は穏和な作用や調節に適しているという仮説が考えられる。これらの組み合わせによって、神経回路の形成が絶妙に形成されるという仮説が新たに提案されるだろう。多様な構造を有するCS脂質誘導体を利用してCSの構造多様性と機能特異性を検討する実験はバイオニクス的である。軸索路形成ばかりでなく、他の現象や細胞に応じて、CS脂質誘導体をビーズ以外の基質と組み合わせることで、適切な実験系を考案することもできるだろう。このような試みはCSの構造多様性の効果を探る可能性が期待される。

■CS研究における今後の課題

本稿では二種類のCS誘導体、CS-biotin誘導体とCS脂質誘導体、を利用して、軸索路形成におけるCSの構造と機能を探る方法と応用を概説した。誘導体を利用した方法は新たな可能性を提示するが、CSの研究にはこの他に技術的な課題が残っている。現在、遺伝子工学に於ける遺伝子配列を決定する様な「CSユニットの配列を決定する」ための実用的な方法はなく、PCRの様に「特定のCS鎖の合成する」ための簡便な方法はない。CSを化学的に合成して標準的な構造を得ることは困難である。そのためCSの構造多様性を得るためには軟骨などから抽出した生物学的なサンプルの組成を化学的に分析し、ユニット組成の量によって分類して利用するしか方法はなく、構造が完全に定義されたCSとは言い難く、厳密な意味での構造機能連関を問うことはできていない。構造が確定したCS鎖のデオキシリボ糖や脂質誘導体を利用する事が可能になればさらに多くの構造機能連関に関する所見が得られると考えられる。

細胞外基質に含まれる因子と相互作用する受容体に関わる遺伝子改変動物を多種組み合わせ、CSの機能を明らかにする研究が近年行われ、遺伝学的なネットワークの解析を通じてCSの機能に迫る新しいアプローチとして成果を上げている³⁸⁻⁴⁰⁾。このアプローチによってCSの受容体同定の方法が提案された。これは遺伝学的に間接的にCSの機能の外堀を埋めていくものである。他方、今回私達の示したアプローチは、直接にCSに暴露された成長円錐の行動を観察しながら、構造多様性の機能を探るものなので、遺伝学的なアプローチとは相補的になる。CS誘導体を用いた培養実験において、遺伝学的に示された受容機構を巻き込みながら解析を進めることでさらなる進展が期待されるだろう。

新しいCS誘導体のアイデアは現象を理解する突破口になるだろう。今回紹介した誘導体以外にも有用なアイデアがあるだろう。例えば「蛍光色素を結合させたCS誘導体」を利用するアイデアは発展性が大きい⁴¹⁾。これ

らの新しいアイデアを従来からの遺伝学的方法に加えて取り入れることで、CSの構造機能連関に迫ることが期待される。

文 献

- 1) Kolodkin A. L., Tessier-Lavigne M.: Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**: a001727, 2011.
- 2) Maeda N., Ishii M., Nishimura K., Kamimura K.: Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochem. Res.* **36**: 1228-1240, 2011.
- 3) Kwok J. C., Warren P., Fawcett J. W.: Chondroitin sulfate: a key molecule in the brain matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**: 582-586, 2012.
- 4) Snow D. M., Lemmon V., Carrino D. A., Caplan A. L., Silver J.: Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* **109**:111-130, 1990.
- 5) Snow D. M., Watanabe M., Letourneau P. C., Silver J.: A chondroitin sulfate proteoglycan may influence the direction of retinal ganglion cell outgrowth. *Development* **113**: 1473-1485, 1991.
- 6) Brittis P. A., Canning D. R., Silver J.: Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science* **255**: 733-736, 1992.
- 7) Brittis P. A., Silver J.: Exogenous glycosaminoglycans induce complete inversion of retinal ganglion cell bodies and their axons within the retinal neuroepithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7539-7542, 1994.
- 8) Hoffman-Kim D., Lander A. D., Jhaveri S.: Patterns of chondroitin sulfate immunoreactivity in the developing tectum reflect regional differences in glycosaminoglycan biosynthesis. *J. Neurosci.* **18**: 5881-5890, 1998.
- 9) Chung K. Y., Taylor J. S., Shum D. K., Chan S. O.: Axon routing at the optic chiasm after enzymatic removal of chondroitin sulfate in mouse embryos. *Development* **127**: 2673-2683, 2000.
- 10) Yick L. W., Wu W., So K. F., Yip H. K., Shum D. K.: Chondroitinase ABC promotes axonal regeneration of Clarke's neurons after spinal cord injury. *Neuroreport* **11**: 1063-1067, 2000.
- 11) Ichijo H., Kawabata I.: Roles of the telencephalic cells and their chondroitin sulfate proteoglycans in delimiting an anterior border of the retinal pathway. *J. Neurosci.* **21**: 9304-9314, 2001.
- 12) Moon L. D., Asher R. A., Rhodes K. E., Fawcett J. W.: Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nature Neurosci.* **4**: 465-466, 2001.
- 13) Becker C. G., Becker T.: Repellent guidance of regenerating optic axons by chondroitin sulfate glycosaminoglycans in zebrafish. *J. Neurosci.* **22**: 842-853, 2002.
- 14) Walz A., Anderson R. B., Irie A., Chien C. B., Holt C. E.: Chondroitin sulfate disrupts axon pathfinding in the optic tract and alters growth cone dynamics. *J. Neurobiol.* **53**: 330-342, 2002.
- 15) Masuda T., Fukamauchi F., Takeda Y., Fujisawa H., Watanabe K., Okado N., Shiga T.: Developmental regulation of notochord-derived repulsion for dorsal root ganglion axons. *Mol. Cell. Neurosci.* **25**: 217-227, 2004.
- 16) Bradbury E. J., Moon L. D., Popat R. J., King V. R., Bennett G. S., Patel P. N., Fawcett J. W., McMahon S. B.: Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* **416**: 636-640, 2002.
- 17) Morgenstern D. A., Asher R. A., Fawcett J. W.: Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog. Brain Res.* **137**: 313-332, 2002.
- 18) Busch S. A., Silver J.: The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**: 120-127, 2007.
- 19) Cafferty W. B., Bradbury E. J., Lidieth M., Jones M., Duffy P. J., Pezet S., McMahon S. B.: Chondroitinase ABC-mediated plasticity of spinal sensory function. *J. Neurosci.* **28**: 11998-12009, 2008.
- 20) Huxlin K. R., Sefton A. J., Schulz M., Bennett M. R.: Effect of proteoglycan purified from rat superior colliculus on the survival of murine retinal ganglion cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **74**: 207-217, 1993.
- 21) Challacombe J. F., Elam J. S.: Chondroitin4-sulfate stimulates regeneration of goldfish retinal axons. *Exp. Neurol.* **143**: 10-17, 1997.
- 22) Clement A. M., Nadanaka S., Masayama K., Mandl C., Sugahara K., Faissner A.: The DSD-1carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **273**: 28444-28453, 1998.
- 23) Clement A. M., Sugahara K., Faissner A.: Chondroitin sulfate E promotes neurite outgrowth of rat embryonic day18hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **269**: 125-128, 1999.
- 24) Faissner A., Clement A., Lochter A., Streit A., Mandl C., Schachner M.: Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J. Cell Biol.* **126**: 783-799, 1994.
- 25) Feraud-Espinosa I., Nieto-Sampedro M., Bovolenta P.: Differential effects of glycosaminoglycans on neurite outgrowth from hippocampal and thalamic neurones. *J. Cell Sci.* **107**: 1437-1448, 1994.
- 26) Nadanaka S., Clement A., Masayama K., Faissner A., Sugahara K.: Characteristic hexasaccharide sequences in octasaccharides derived from shark cartilage chondroitin sulfate D with a neurite outgrowth

- promoting activity. *J. Biol. Chem.* **273**: 3296–3307, 1998.
- 27) Pizzorusso T., Medini P., Berardi N., Chierzi S., Fawcett J.W., Maffei L.: Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* **298**: 1248–1251, 2002.
- 28) Pizzorusso T., Medini P., Landi S., Baldini S., Berardi N., Maffei L.: Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 8517–8522, 2006.
- 29) Carulli D., Pizzorusso T., Kwok J. C., Putignano E., Poli A., Forostyak S., Andrews M. R., Deepa S. S., Glant T. T., Fawcett J. W.: Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* **133**: 2331–2347, 2010.
- 30) Ueoka C., Kaneda N., Okazaki I., Nadanaka S., Muramatsu T., Sugahara K.: Neuronal cell adhesion, mediated by the heparin-binding neuroregulatory factor midkine, is specifically inhibited by chondroitin sulfate E. *J. Biol. Chem.* **275**: 37407–37413, 2000.
- 31) Gilbert R. J., McKeon R. J., Darr A., Calabro A., Hascall V. C., Bellamkonda R. V.: CS-4.6 is differentially upregulated in glial scar and is a potent inhibitor of neurite extension. *Mol. Cell. Neurosci.* **29**: 545–58, 2005.
- 32) Properzi F., Carulli D., Asher R. A., Muir E., Camargo L. M., van Kuppevelt T. H., ten Dam G.B., Furukawa Y., Mikami T., Sugahara K., Toida T., Geller H. M., Fawcett J. W.: Chondroitin6-sulphate synthesis is up-regulated in injured CNS, induced by injury-related cytokines and enhanced in axon-growth inhibitory glia. *Eur. J. Neurosci.* **21**: 378–390, 2005.
- 33) Sugahara K., Mikami T., Uyama T., Mizuguchi S., Nomura K., Kitagawa H.: Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**: 612–620, 2003.
- 34) Shinohara Y., Sota H., Kim F., Shimizu M., Gotoh M., Tosu M., Hasegawa Y.: Use of a biosensor based on surface plasmon resonance and biotinyl glycans for analysis of sugar binding specificities of lectins. *J. Biochem.* **117**: 1076–1082, 1995.
- 35) Ando S., Sugiura N., Kimata K., Ichijo H.: Influences of retinal axons on the cultural substrate containing biotin-conjugated chondroitin sulfate in vitro. *Anat. Sci. Int.* **85**: 189–193, 2010.
- 36) Ichijo H.: Restricted distribution of D-unit-rich chondroitin sulfate carbohydrate chains in the neuropil encircling the optic tract and on a subset of retinal axons in chick embryos. *J. Comp. Neurol.* **495**: 470–479, 2006.
- 37) Sugiura N., Sakurai K., Hori Y., Karasawa K., Suzuki S., Kimata K.: Preparation of lipid-derivatized glycosaminoglycans to probe a regulatory function of the carbohydrate moieties of proteoglycans in cell-matrix interaction. *J. Biol. Chem.* **268**: 15779–15787, 1993.
- 38) Mikami T., Yasunaga D., Kitagawa H.: Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E. *J. Biol. Chem.* **284**: 4494–4499, 2009.
- 39) Shen Y., Tenney A. P., Busch S. A., Horn K. P., Cuascut F. X., Liu K., He Z., Silver J., Flanagan J. G.: PTPs is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science* **326**: 592–596, 2009.
- 40) Dickendesher T. L., Baldwin K. T., Mironova Y. A., Koriyama Y., Raiker S. J., Askew K. L., Wood A., Geoffroy C. G., Zheng B., Liepmann C. D., Katagiri Y., Benowitz L. I., Geller H. M., Giger R. J.: Ngr1 and Ngr3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nature Neurosci.* **15**: 703–712, 2012.
- 41) Arnosti C.: Fluorescent derivatization of polysaccharides and carbohydrate-containing biopolymers for measurement of enzyme activities in complex media. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **793**: 181–191, 2003.