

# 研究報告書

研究課題名：  
硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明

(研究領域:「代謝と機能制御」)

研究者氏名: 川島 博人

(研究期間: 2006年10月1日～2010年3月31日)

## 研究報告書

### 1. 研究課題名

硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明

### 2. 氏名

川島 博人

### 3. 研究のねらい

糖転移酵素や硫酸基転移酵素などの糖鎖関連遺伝子産物を介して産生される代謝産物である糖鎖は、細胞接着、免疫、がん転移、ウイルス感染、タンパク質品質管理などにおいて重要な役割を果たしている。糖鎖構造は非常に多様性に富む一方で、しばしば組織特異的に特定の機能を発揮する。しかしこれまでに、糖鎖の組織特異的な機能を *in vivo* で解析する研究手法は十分に確立されていない。また、糖転移酵素などの糖鎖関連遺伝子の組織または細胞特異的な発現制御機構に関しては、数例に関して解明が進んでいるものの、いまだに不明な点が数多く残されている。本研究では、これまで我々が特に着目して研究を行ってきた硫酸化糖鎖の *in vivo* における組織特異的な機能解析およびその発現を制御する硫酸基転移酵素の発現制御機構の解明を通じて、代謝産物である糖鎖の機能および発現制御機構を組織特異的に解析するための基盤技術の整備を指向した研究を進める。

我々はこれまでに、硫酸基転移酵素遺伝子欠損マウスを用いて、高内皮細静脈(HEV, high endothelial venule)に特異的に発現するユニークな構造を持つ硫酸化糖鎖 PNA<sub>d</sub> (peripheral lymph node addressin)が、末梢リンパ節へのリンパ球ホーミングに必須の役割を果たすことを示してきた(Kawashima *et al.*, *Nature Immunology*, 6:1096-1104, 2005)。PNA<sub>d</sub> はリンパ球ホーミングレセプター・L-セレクチンの特異的なリガンドとして機能し、リンパ球の HEV 表面上におけるローリングを媒介する。本研究の具体的な研究の進め方は、以下の通りである。すなわち、はじめに PNA<sub>d</sub> の生合成に関与する硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 (*N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase-2)が HEV 特異的に発現することに着目し、そのプロモーター/エンハンサーの支配下に Cre リコンビナーゼを発現する新規トランスジェニックマウスを樹立し、組織特異的な糖鎖機能の解明のためのツールを樹立する。このマウスを用いることにより、これまで末梢リンパ節 HEV 特異的に発現すると考えられてきた GlcNAc6ST-2 の詳細な組織分布を解明する。この過程で硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 がこれまでに知られていない組織でも発現することが確認された場合には、すでに樹立している GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウスを用いてそれらの組織特異的な硫酸化糖鎖の機能を詳細に解析する。さらに、本研究で樹立する Cre トランスジェニックマウスをヘパラン硫酸伸長酵素 EXT1 の flox マウスと掛け合わせ、組織特異的なヘパラン硫酸欠損マウスを作製し、機能解析を進める。リンパ球の浸潤過程においては、ローリングに引き続き、HEV に発現する硫酸化糖鎖の一種であるヘパラン硫酸に提示されたケモカインによるリンパ球上の接着分子インテグリンの活性化が起こると考えられているが、EXT1 の全身性ノックアウトマウスは胎生致死であるため、*in vivo* における証明はなされていない。本研究では、上記の様に独自に樹立する Cre トランスジェニックマウスを用いて HEV 特異的なヘパラン硫酸欠損マウスを作製し、*in vivo* においてヘパラン硫酸がケモカインの提示分子として機能するか否かを解明する。

### 4. 研究成果

#### (1) GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウスの樹立

はじめに、HEV 特異的な硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 の遺伝子発現調節領域を含む BAC (bacterial artificial chromosome) に Cre リコンビナーゼ遺伝子を挿入した組換え型 BAC を作製した(図 1 参照)。次に、この組換え型 BAC をマウス受精卵にマイクロインジェクションし、GlcNAc6ST-2 遺伝子のプロモーター/エンハンサーの支配下に Cre リコンビナーゼを発現する新規トランスジェニックマウス(GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウス)の樹立を行った。この

GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウスは外見・行動・受精ともに正常であり、リンパ球ホーミングアッセイによる検討を行ったところ、リンパ球の体内動態も正常であった。

次に、Cre リコンビナーゼを発現する組織で特異的に LacZ を発現する ROSA26 レポーターマウスと GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウスを掛け合わせるにより、GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウスにおける Cre リコンビナーゼの組織分布を X-Gal と反応させることで詳細に解析した。その結果、末梢リンパ節(PLN)のみではなく、鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)の HEV(図2 参照)および大腸上皮細胞においても Cre リコンビナーゼが強く発現することを見いだした。この結果は、NALT の HEV および大腸上皮細胞には GlcNAc6ST-2 が発現することを示している。そこで、GlcNAc6ST-2 の遺伝子座に EGFP 遺伝子を挿入したノックインマウスを用いて検討を行ったところ、確かに NALT の HEV および大腸上皮細胞のいずれにおいても GlcNAc6ST-2 遺伝子の発現に由来する EGFP の緑色蛍光が観察された。

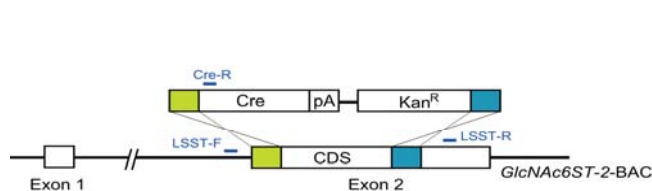


図1 組換え型 BAC クローン

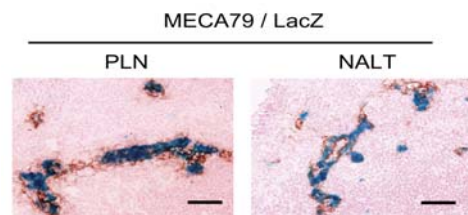


図2 PLN および NALT の MECA79 抗原陽性 HEV (茶色)における LacZ (青色)の発現

## (2) NALT の HEV における硫酸化糖鎖の機能解析

上記の解析により、NALT の HEV には硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 が発現することが分かった。そこで次に、その機能解析を試みた。はじめに、GlcNAc6ST-2 および HEV を含む広汎な組織に発現する硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-1 の両者を欠損するダブルノックアウトマウス(DKO マウス)と野生型マウスの NALT の凍結切片を作製し、PNA<sub>d</sub> を認識する MECA-79 抗体および L-セレクチン-IgM キメラ分子を用いて DKO マウスの NALT HEV における PNA<sub>d</sub> の発現を解析したところ、DKO マウスにおいては L-セレクチンのリガンドとして働く PNA<sub>d</sub> の発現が完全に消失することが確認された。GlcNAc6ST-2 単独欠損マウスでは PNA<sub>d</sub> の発現は低下するものの完全には欠失しなかったことから、GlcNAc6ST-1 と GlcNAc6ST-2 の両者が NALT の HEV における PNA<sub>d</sub> の生合成に関与すると考えられた。次に、リンパ球ホーミングアッセイにより、NALT へのリンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の役割を検討した。その結果、DKO マウスにおいては、約 80% NALT へのホーミングが抑制されることを見いだした。次に、卵白アルブミン(OVA)をアジュバントとともに経鼻的にマウスに投与し、アレルギー反応を惹起した。その結果、DKO マウスにおいては、OVA 特異的 IgE 抗体産生および経鼻的に OVA を投与した直後に誘導されるくしゃみの回数有意に低下した。以上の結果より、PNA<sub>d</sub> はこれまでに知られていた末梢リンパ節 PLN へのホーミングのみでなく、粘膜系のリンパ組織の一種である NALT へのホーミングにも関与すること、また経鼻的に侵入する抗原に対するアレルギー反応に関与することが明らかになった。これらの知見は、PNA<sub>d</sub> をターゲットとした新しい抗アレルギー薬の開発が可能であることを示唆するものであり、医学・薬学的見地から興味深い。

## (3) 大腸上皮細胞における硫酸化糖鎖の機能解析

上記(1)の解析により大腸上皮細胞においても GlcNAc6ST-2 が発現することを見いだした。そこで次に、その発現調節機構の解析および機能解析を試みた。はじめに、抗生物質のアモキシシリンを飲水中に加えて腸内細菌を除去したところ、大腸における GlcNAc6ST-2 の発現が低下することを見いだした。腸内細菌の嫌気発酵産物である単鎖脂肪酸 (SCFA) は、大腸内においていくつかの遺伝子の発現を制御することが知られている。そこで次に、SCFA を用いて大腸上皮由来培養細胞株における GlcNAc6ST-2 の発現誘導を検討した。その結果、上皮細胞成長因子 (EGF) 存在下で、SCFA の一つである酪酸により GlcNAc6ST-2

mRNA が誘導されることを見いだした。大腸の粘膜表面はムチン層により保護されており、分泌型ムチンである Muc2 が主要な成分である。そこで、マウス大腸の凍結切片を用いて、抗 Muc2 抗体染色および硫酸化糖鎖を選択的に染色する pH1.0 の条件下におけるアルシアンブルー染色を行ったところ、GlcNAc6ST-2 欠損マウスでは、Muc2 の発現は変化しないが糖鎖の硫酸化が著しく減少することが明らかになった。さらに Muc2 を野生型マウスおよび GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウス(KO マウス)の大腸より調製し、LC-ESI-MS/MS を用いてその O-型糖鎖の詳細な構造解析を行ったところ、KO マウスにおいては Muc2 上の GlcNAc-6 硫酸構造が完全に消失することが明らかになった。また、デキストラン硫酸誘発性大腸炎モデルにおいて、KO マウスで野生型マウスに比べて大腸炎の増悪化が認められた。以上の結果より、GlcNAc6ST-2 は大腸内において腸内細菌の嫌気発酵産物である酪酸によりその発現が制御され、Muc2 の O-結合型糖鎖を硫酸化することで上皮細胞の保護や恒常性の維持および大腸炎に対する防御機能を果たすことが示唆された。

#### (4) ヘパラン硫酸コンディショナルノックアウトマウスの作製とその解析

ヘパラン硫酸伸長酵素 EXT1 (図 3 参照)をコードする遺伝子のエキソン 1 の両端が loxP サイトで挟まれた EXT1-flox マウスを Tie2-Cre マウスと掛け合わせて血管内皮細胞全般においてヘパラン硫酸を欠損させたところ、血管密度の低下を伴ってマウスは胎生致死に陥るを見いだした。胎生致死となる理由は現在までのところ明らかではないが、ヘパラン硫酸が胎児血管に対する増殖因子の提示に関与し、その傷害により胎生致死となった可能性を今後検討する予定である。

研究のねらいの項で述べたように、リンパ球の浸潤過程においては、上述の L-セレクチンと PNA の相互作用によるローリングに引き続き、HEV に発現する硫酸化糖鎖の一種であるヘパラン硫酸に提示されたケモカインによるリンパ球上の接着分子インテグリンの活性化が起こると考えられているが、*in vivo* における証明はない。そこで次に、上記の GlcNAc6ST-2-Cre Tg と EXT1-flox マウスとの掛け合わせを行い、末梢リンパ節 HEV および大腸上皮細胞特異的ヘパラン硫酸欠損マウスの作製を行った。得られたコンディショナルノックアウトマウスにおいては、抗ヘパラン硫酸鎖抗体により確かに末梢リンパ節 HEV および大腸上皮細胞におけるヘパラン硫酸の発現がほぼ欠損することが示された。また、末梢リンパ節 HEV に局在するケモカイン CXCL12 の量が大きく低下し、ヘパラン硫酸が HEV 上におけるケモカインの提示に関与することが明らかになった。

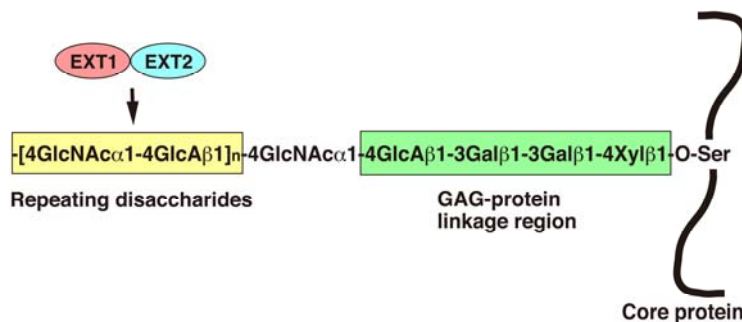


図 3 ヘパラン硫酸鎖の伸長  
GlcNAc と GlcA の繰り返し構造は EXT1/EXT2 ヘテロダイマーにより生合成される。EXT1 を欠損するとヘパラン硫酸鎖は伸長しない。

#### 5. 今後の展開

今後は、Tie2-Cre Tg マウスと EXT1-flox マウスの掛け合わせにより得た血管全般でヘパラン硫酸を欠損するマウスを用いて、胎児血管の形成過程におけるヘパラン硫酸の機能を、特に増殖因子の捕捉およびシグナルを伝達する特異的レセプターへの提示における機能に着目して進めるとともに、GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウスと EXT1-flox マウスの掛け合わせにより得たヘパラン硫酸コンディショナルノックアウトマウスを用いて、リンパ節へのリンパ球ホーミングおよび大腸炎に伴う白血球浸潤におけるヘパラン硫酸の役割を特にケモカインの提示との関連に着目しながら解析していきたい。

## 6. 研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hiraoka N, Petryniak B, Kawashima H, Mitoma J, Akama TO, Fukuda MN, Lowe JB, Fukuda M, Significant decrease of  $\alpha$ 1,3-linked fucose is associated with increase in 6-sulfated N-acetylglucosamine in peripheral node addressin of FucT-VII deficient mice exhibiting diminished lymphocyte homing, *Glycobiology*, vol. 17, 277-293 (2007)
2. Hirose M, Murai T, Kawashima H, Elevation of rat plasma P-selectin in acute lung injury, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1772, 382-389 (2007)
3. Mitoma J, Bao X, Petryniak B, Schaerli P, Gauguet JM, Yu SY, Kawashima H, Saito H, Ohtsubo K, Marth JD, Khoo KH, von Andrian UH, Lowe JB, Fukuda M, Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment, *Nature Immunology*, vol. 8, 409-418 (2007)
4. Toshiyuki Murai, Hiroto Kawashima, A simple assay for hyaluronidase activity using fluorescence polarization, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 376, 620-624 (2008)
5. Shingo Hatakeyama, Kazuhiro Sugihara, Jun Nakayama, Tomoya O. Akama, Shuk-Man Annie Wong, Hiroto Kawashima, Jianing Zhang, David F. Smith, Chikara Ohyama, Minoru Fukuda, Michiko N. Fukuda, Identification of mRNA splicing factors as the endothelial receptor for carbohydrate-dependent lung colonization of cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 106, 3095-3100 (2009)
6. Hiroto Kawashima, Jotaro Hirakawa, Yuki Tobisawa, Minoru Fukuda, Yumiko Saga, Conditional gene targeting in mouse high endothelial venules, *J. Immunol.*, vol. 182, 5461-5468 (2009)
7. Yuki Tobisawa, Yasuyuki Imai, Minoru Fukuda, Hiroto Kawashima, Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice, *J. Biol. Chem.*, published online: December 16, 2009, doi:10.1074/jbc.M109.067082

### (2) 特許出願

なし

### (3) その他の成果

#### (A) 学会発表

1. 高橋理孝、川島博人、マウス高内皮細静脈特異的な硫酸基転移酵素の転写開始点の決定、日本薬学会東海支部例会(名古屋)(2006年12月2日)
2. 平川城太郎、大道由香梨、今井康之、福田穰、川島博人、粘膜リンパ組織高内皮細静脈における硫酸化糖鎖の役割、第71回日本生化学会中部支部例会(名古屋)(2007年5月19日)
3. Jotaro Hirakawa, Yukari Ohmichi, Yasuyuki Imai, Minoru Fukuda, Hiroto Kawashima, Essential Role of Sulfated Glycans in Lymphocyte Recruitment to Nasal-associated Lymphoid Tissues and Immune Responses against Inhaled Allergens, XIX International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, Australia (2007/7/16)
4. 平川城太郎、大道由香梨、今井康之、福田穰、川島博人、硫酸基転移酵素欠損マウスにおける鼻粘膜免疫応答の低下、第27回日本糖質学会年会(博多)(2007年8月3日)
5. 小野田貢、川島博人、スギ花粉抗原 Cry j 1 のフコース含有糖鎖による抗原性の修飾、平成19年度日本薬学会東海支部例会(岐阜)(2007年12月8日)
6. 木村文穂、野上弘美、今井康之、川島博人、簡便な O-結合型糖鎖分析法の確立とその応用、平成19年度日本薬学会東海支部例会(岐阜)(2007年12月8日)
7. Jotaro Hirakawa, Yukari Ohmichi, Yasuyuki Imai, Minoru Fukuda, Hiroto Kawashima,

Lymphocyte recruitment to nasal-associated lymphoid tissues is regulated by two sulfotransferases, 2009 International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, Kanazawa, Japan (2009/6/3)

8. 高倉惇、坪井康一郎、今井康之、小松雅明、川島博人、大腸特異的 Atg7 欠損マウスにおけるデキストラン硫酸誘発性大腸炎の解析、第 82 回日本生化学会大会(神戸)(2009 年 10 月 23 日)
9. 飛澤悠葵、今井康之、福田穰、川島博人、硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 によるマウス大腸ムチンの硫酸化とその大腸炎防御機能、第 82 回日本生化学会大会(神戸)(2009 年 10 月 24 日)
10. 飛澤悠葵、今井康之、福田穰、川島博人、マウス GlcNAc6ST-2 による Muc2 ムチンの硫酸化とその大腸炎に対する防御機能の解析、第 29 回日本糖質学会年会(高山)(2009 年 11 月 9 日)
11. Yuki Tobisawa, Yasuyuki Imai, Minoru Fukuda, and Hiroto Kawashima, Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-2 and its protective function against colitis in mice, *Glycobiology* 2009, San Diego, CA, USA (2009/11/13)
12. Jotaro Hirakawa, Yukari Ohimichi, Yasuyuki Imai, Minoru Fukuda, and Hiroto Kawashima, Essential role of sulfated-glycans in lymphocyte recruitment to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses, *Glycobiology* 2009, San Diego, CA, USA (2009/11/13)
13. 大槻卓也、吉岡純一、小野田貢、今井康之、川島博人、スギ花粉アレルギー Cry j 1 の N-結合型糖鎖による抗原性の修飾、平成 21 年度日本薬学会東海支部例会(岐阜)(2009 年 11 月 23 日)
14. 渡部草太、平川城太郎、加賀正基、今井康之、川島博人、リンパ節高内皮細静脈におけるケモカイン CXCL10 の発現とその役割、平成 21 年度日本薬学会東海支部例会(岐阜)(2009 年 11 月 23 日)

(B)受賞

なし

(C)著作物

1. Kawashima H, Determination of chemokine-glycosaminoglycan interaction specificity, *Methods in Enzymology*, vol. 416, 254-263 (2006)
2. Kawashima H, Functions of glycans revealed by gene inactivation of L-selectin ligand sulfotransferases in mice, *Methods in Enzymology*, vol. 416, 279-290 (2006)
3. Kawashima H, Roles of sulfated glycans in lymphocyte homing, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, 2343-2349 (2006)