

研究課題別評価書

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_d (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_d 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_d の生合成に参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ことで、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。

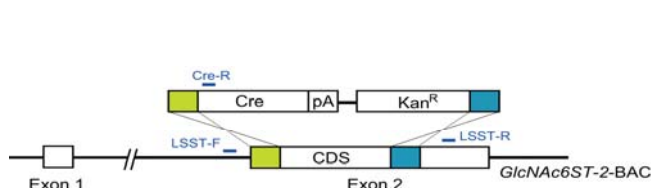


図 1 組換え型 BAC クローン

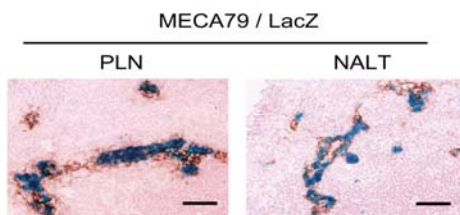


図 2 PLN および NALT の MECA79 抗原陽性 HEV (茶色)における LacZ (青色)の発現

(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_d 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_d 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_d 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_d 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_d 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が有意に低下した。以上の結果より、PNA_d 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_d 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_d 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れ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。

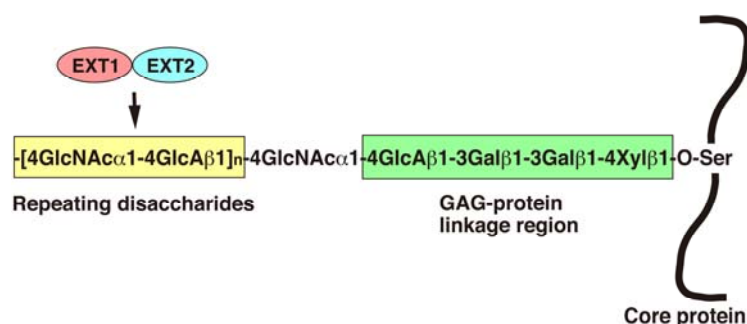


図 3 ヘパラン硫酸鎖の伸長
GlcNAc と GlcA の繰り返し構造は
EXT1/EXT2 ヘテロダイマーにより
生合成される。EXT1 を欠損すると
ヘパラン硫酸鎖は伸長しない。

5. 自己評価

本さきがけ研究で私は、硫酸基転移酵素 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)の樹立に成功し、詳細な組織学的検討の結果、GlcNAc6ST-2 が末梢リンパ節 HEV だけでなく鼻咽頭関連リンパ組織 NALT の HEV および大腸上皮細胞にも強く発現することを見いだした。そこでさらに硫酸基転移酵素遺伝子欠損マウスを用いた解析を進め、硫酸化糖鎖 PNA_d が末梢リンパ節のみではなく、NALT へのリンパ球ホーミングおよび経鼻的に体内に侵入する抗原に対するアレルギー応答にも必須の役割を果たすことを明らかにした。また、大腸上皮細胞においては

GlcNAc6ST-2 が大腸ムチンの GlcNAc の 6 位の硫酸化を担うこと、さらには炎症モデルを用いた解析から、大腸ムチンの粘膜バリアとしての働きに GlcNAc6ST-2 によって生合成される硫酸化糖鎖が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらには、大腸における GlcNAc6ST-2 遺伝子の発現制御機構に関して、腸内細菌およびその代謝産物である酪酸がその発現制御に関与する事を明らかにした。これらの硫酸化糖鎖の機能解析と平行して、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に成功し、ヘパラン硫酸が胎児血管の形成および HEV におけるケモカインの提示に関与することを見いだした。研究開始当初は、硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 は末梢リンパ節 HEV に特異的に発現すると考えられてきたが、本研究で初めてその他の組織におけるこの硫酸基転移酵素の組織分布の詳細を明らかにするとともにそれぞれの組織における組織特異的機能を明らかにすることができた。また、硫酸化糖鎖の発現を規定する硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 の発現制御機構の一端を明らかにすることもできた。以上のことから、本研究課題「硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明」は、糖鎖生物学と免疫学の接点で重要な成果をあげることができたと自己評価している。

6. 研究総括の見解

種々の遺伝子改変マウスの作成により、硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 が末梢リンパ節 HEV だけでなく NALT の HEV や大腸上皮細胞にも強く発現すること、硫酸化糖鎖 PNA^d が末梢リンパ節のみではなく、NALT へのリンパ球ホーミングおよび経鼻性抗原に対するアレルギー応答にも必須の役割を果たすことを明らかにした。これらの結果から、PNA^d の機能阻害による免疫応答制御の可能性が示唆された。また、大腸ムチンの GlcNAc 6位の硫酸化は GlcNAc6ST-2 により行われ、これは粘膜バリア機能に必須であること、GlcNAc6ST-2 の発現調節に腸内細菌およびその代謝産物である酪酸が関与することなどを明らかにした。このように、研究は極めて順調に行われた。免疫疾患治療への応用の道も見える。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文 *corresponding author

1. Hirose M, Murai T, and Kawashima H*. Elevation of rat plasma P-selectin in acute lung injury. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.*, 1772:382-389, 2007.
2. Kawashima H*, Hirakawa J, Tobisawa Y, Fukuda M, and Saga Y. Conditional gene targeting in mouse high endothelial venules. *J. Immunol.*, 182:5461-5468, 2009.
3. Tobisawa Y, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H*. Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice. *J. Biol. Chem., in press*

②著書

1. Kawashima H. Determination of chemokine-glycosaminoglycan interaction specificity. *Methods in Enzymology* 416:254-263, 2006.
2. Kawashima H. Functions of glycans revealed by gene inactivation of L-selectin ligand sulfotransferases in mice. *Methods in Enzymology* 416:279-290, 2006.

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Mitoma J, Bao X, Petryanik B, Schaerli P, Gauguet JM, Yu SY, Kawashima H, Saito H, Ohtsubo K, Marth JD, Khoo KH, von Andrian UH, Lowe JB, and Fukuda M. Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nature Immunology*, 8:409-418, 2007.
2. Hatakeyama S, Sugihara K, Nakayama J, Akama TO, Wong SM, Kawashima H, Zhang J, Smith DF, Ohyama C, Fukuda M, and Fukuda MN. Identification of mRNA splicing factors as the endothelial receptor for carbohydrate-dependent lung colonization of cancer cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106:3095–3100, 2009.

②総説

1. Kawashima H. Roles of sulfated glycans in lymphocyte homing. *Biol. Pharm. Bull.* 29:2343–2349, 2006.