

## ◆トピックス◆

## へパラン硫酸スルホトランスフェラーゼ欠損マウス

羽 室 強\*

Heparan Sulfate Sulfotransferase Deficient Mice

Tsutomu HAMURO\*

Key words : heparan sulfate, heparin, sulfotransferase

## はじめに

へパラン硫酸 (HS) は硫酸化されたグリコサミノグリカン (GAG) の一つであり、ウロン酸とグルコサミンの繰り返し二糖骨格に硫酸基が付加された構造をもつ。コンドロイチン硫酸やデルマトン硫酸も硫酸化 GAG に属するが、それらはアミノ糖としてガラクトサミンを含む点で HS とは異なる。なお、肥満細胞内に局在するヘパリンは HS と同族である。HS はコアタンパク質と共有結合したへパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) として細胞表面上や基底膜に存在し、さまざまな物質と相互作用をしつつ、生理的に重要な役割を担っている<sup>1)</sup>。HSPG には、基底膜型と細胞膜結合型が存在し、前者にはパルカンおよびアグリンが知られている。後者には膜貫通領域をもつシンデカン (syndecan-1~4)、およびグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) を介して細胞膜に結合しているグリピカン (glypican-1~6) の 2 つの主要なファミリーがある。

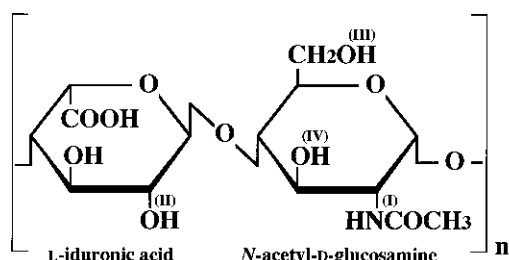
近年、こうした硫酸化多糖の生合成に関与する分子のノックアウトマウスが作出され、

HSPG についても、その生理的意義が明らかになりつつある<sup>2)~17)</sup>。これらは、表 1 に示すように、個々のコアタンパク質や糖鎖合成酵素、あるいはスルホトランスフェラーゼを標的としたものなどさまざまであるが、本稿ではスルホトランスフェラーゼを欠損させたマウスに焦点を絞って紹介したい。なお、HSPG 欠損マウス全般に関する進展については、Forsberg らの総説を参照されたい<sup>18)</sup>。

## へパラン硫酸 (HS) の生合成

HS は次の 3 つの段階を経て生合成される。すなわち、① そのコアタンパク質のセリン残基への、キシロース (Xyl)、ガラクトース (Gal)、およびグルクロン酸 (GlcA) からなる四糖鎖 (GlcA-Gal-Gal-Xyl-O-Ser) の段階的な付加、② *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) および GlcA の二糖繰り返し構造 (GlcA-GlcNAc) の伸張、③ GlcNAc の脱アセチル化と *N*-硫酸化、および④ GlcA の異性化と水酸基の硫酸化である<sup>19)</sup>。③のステップでは、まず GlcNAc の *N*-アセチル基が除かれた後、アミノ基へ硫酸基が転

\* (財) 化学及血清療法研究所血液製剤研究部 [〒 869-1298 熊本県菊池郡旭志村川辺] Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, KAKETSUKEN [Kawabe, Kyokushi, Kikuchi, Kumamoto 869-1298, Japan.]  
Tel: 0968-37-4052 Fax: 0968-37-3616 e-mail: hamuro@kaketsuken.or.jp



- (I) : glucosaminyl *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase (NDST)  
 (II) : heparan sulfate 2-*O*-sulfotransferase (2-OST)  
 (III) : heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferase (6-OST)  
 (IV) : heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase (3-OST)

図 1 ヘパラン硫酸 (HS) 硫酸基修飾に関与する主要な酵素群

ヘパラン硫酸の基本骨格となる繰り返し二糖単位の構造, 硫酸転移部位 (I~IV), およびそれらの硫酸転移を触媒する主要な酵素群を示した. スルホトランスフェラーゼの基質特異性により, 硫酸転移反応は I, II, III, IV の順で進むと考えられる. 左側のウロン酸はイズロン酸であるが, グルクロン酸から成る二糖単位も存在する.

移され, 硫酸化グルコサミン (GlcNSO<sub>3</sub>) が形成される. この2つの反応は Glucosaminyl *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase (NDST) と呼ばれる一つの酵素によって触媒される. 一方, ④のステップでは, エピメラーゼにより一部の GlcA がイズロン酸 (IdoA) に異性化され, その後, HS 2-*O*-sulfotransferase (2-OST) による IdoA/GlcA の2位水酸基への硫酸基付加, HS 6-*O*-sulfotransferase (6-OST) による GlcNSO<sub>3</sub> の6位水酸基への硫酸基付加, および HS 3-*O*-sulfotransferase (3-OST) による GlcNSO<sub>3</sub> の3位水酸基への硫酸基付加の順で硫酸化が進む (図 1). この硫酸転移反応の流れは, スルホトランスフェラーゼの基質特異性によって決められている<sup>1)</sup>.

### Glucosaminyl *N*-deacetylase/ *N*-sulfotransferase (NDST) 欠損マウスからの情報

NDST は NDST-1~4 までのアイソフォー

ムが同定されており<sup>20)</sup>, そのうち NDST-1 遺伝子のノックアウトマウスについては Ringvall ら<sup>11)</sup>, および Fan ら<sup>12)</sup> が, NDST-2 遺伝子のノックアウトマウスは Humphries ら<sup>13)</sup>, および Forsberg ら<sup>14)</sup> が報告している. Ringvall ら<sup>11)</sup> によると, NDST-1 遺伝子ノックアウトマウス (NDST-1<sup>-/-</sup>) では, 一部の胎仔が胎齢 14.5 日~18.5 日の間で死亡するものの, 大部分は出生直後に死亡するという (表 1). 胎生期死亡の個体では, 頭蓋および眼の形成不全が見られたが, 新生児致死の個体は呼吸不全を起こしており, 組織学的観察で肺の拡張不全が確認された. 肺機能不全による致死は, Fan らの報告<sup>12)</sup> とも一致する. Ringvall らは, さらに胎齢 18.5 日の NDST-1<sup>-/-</sup> 胎仔の肺, 肝, および腎の免疫組織染色を行い, GlcNSO<sub>3</sub> を含む HS の発現が著しく減少していること, および, 肺でのサーファクタント A および B の分泌が減少していることを確認した. また, 胎齢 14.5 日の胎仔由来線維芽細胞を用いてグルコサミンの *N*-硫酸化の程度を測定したところ, 野生型では 40%以上が硫酸化されているのに対し, NDST-1<sup>-/-</sup> では 15%以下まで減少していた. 以上の結果より, NDST-1 は肺の機能形成に非常に重要であるとともに, 肝および腎での HS の *N*-硫酸化に関しても主要な役割を担っていることが示唆された.

一方, NDST-2 遺伝子のノックアウトマウス (NDST-2<sup>-/-</sup>) は正常に出生し, 雌雄ともに繁殖能を保持し, 20 カ月の飼育でも肺, 肝, 腎, 精巣, 心, 脾, および骨格筋に異常を認めなかった. 肝での HS の *N*-硫酸化の程度も, 野生型と NDST-2<sup>-/-</sup> で差が無く, NDST-2 は HS の生合成にはあまり重要でないことが判明した. 一方, 腹腔洗浄液よりマクロファージ, リンパ球, および肥満細胞の混合細胞を調製し, <sup>35</sup>S-sulfate 存在下で培養することによって硫酸基の標識を行い, 細胞 100 万個当たりの HS (あるいはヘパリン) の硫酸化量を測定した結果, NDST-2<sup>-/-</sup> では野生型の 12%まで減少していることが判

表1 ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) 関連ノックアウトマウス

標的因子 (別名)	発現部位	欠損マウスの表現型	文献
コアタンパク質合成 perlecan	広範囲	40%が胎盤 10.5 日で死亡 (頭部形成不全) 60%が出生直後に死亡 (呼吸不全, 骨格形成不全)	2)
syndecan-1 (syndecan)	上皮細胞に高発現	正常に出生, Wnt-1 誘導乳ガン形成が 70% 抑制	3)
syndecan-3 ( <i>N</i> -syndecan)	神経細胞に高発現	正常に出生, 絶食後の食欲低下, 学習・記憶能力低下	4)
syndecan-4 (ryudocan/ amphiglycan)	広範囲	正常に出生, 接着斑形成不全, 閉塞性腎症の増悪, 皮膚の創傷治癒の遅延	5), 6), 7)
glypican-2 (cerebroglycan)	胎仔の神経系に発現	正常に出生, 詳細は未報告	8)
glypican-3 (OCI-5)	胎仔の肺, 肝, 腎	出生後数日で死亡, 腎形成異常, 肺感染症, 過成長	9)
[GlcA-GlcNAc] 二糖単位の伸張 EXT-1	広範囲	胎齢 8.5 日までに全て死亡, 囊胚形成不全, ヘパラン硫酸合成能消失	10)
硫酸基修飾 NDST-1	広範囲	一部が胎齢 14.5 日~18.5 日で死亡 (頭蓋および眼の形成不全) 大部分が出生直後に死亡 (呼吸不全, 肺拡張不全)	11), 12)
NDST-2	広範囲	正常に出生, 肥満細胞内のプロテアーゼおよびヒスタミン量低下	13), 14)
HS2-OST	胎仔で広範囲	死産, あるいは出生 24 時間以内に死亡, 腎形成不全, 骨格形成不全 HS の 2-O-硫酸化の消失, FGF との親和性低下	15), 16)
HS3-OST-1	広範囲	正常に出生, 血液凝固も正常	17)

GlcA; glucuronic acid, GlcNAc; *N*-acetylglucosamine, EXT; hereditary multiple exostoses, NDST; glucosaminyl *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase, HS; heparan sulfate, OST; *O*-sulfotransferase, FGF; fibroblast growth factor

明した。肝臓の HS の硫酸化には変化がないことから、腹腔由来混合細胞の硫酸化の減少は、主にヘパリンの硫酸化の程度に起因することが推測された。そこで、ヘパリンの産生細胞である肥満細胞について解析を行ったところ、腹腔肥満細胞の細胞数の減少、肥満細胞特異的なプロテアーゼであるキマーゼおよびトリプターゼの活性低下、およびヒスタミン含量の減少が確認された。また、電子顕微鏡を用いた観察より、腹腔肥満細胞および皮膚由来の肥満細胞で細胞内顆粒数の減少が認められた。

以上の結果より、NDST-2<sup>-/-</sup>ではヘパリンの硫酸化不全が生じ、肥満細胞分泌顆粒内のプロテアーゼやヒスタミンの貯留能力が低下したと考えられ、NDST-2は主に肥満細胞におけるヘパリンの硫酸化を担っていることが判明した。しかし、NDST-1とNDST-2遺伝子のダブル

ノックアウトマウスは、NDST-1単独欠損マウスに比べてより早期に死亡するようであり<sup>11)</sup>、NDST-2も部分的にHSの生合成に関与している可能性はあろう。

### HS2-O-sulfotransferase (2-OST) 欠損マウスからの情報

2-OSTは、1997年、Kobayashiらによって Chinese hamster ovary 細胞よりクローニングされた<sup>21)</sup>。翌年、Bullockらはジーントラップ法によって腎形成不全マウスを作出し、その破壊された遺伝子を解析した結果、マウス 2-OST 遺伝子に相当することが判明した<sup>15)</sup>。この 2-OST 遺伝子欠損マウス (2-OST<sup>-/-</sup>) は死産か、出生後 24 時間以内に全て死亡した。新生児致死の個体では、腎がまったく形成されていなかったが、

その他の泌尿生殖器(副腎,膀胱,卵巣)は正常に形成されていた。また,2-OST<sup>-/-</sup>では骨石灰化の亢進,胸骨の異所性骨化,および頸部脊椎骨の融合などの骨格異常が観察され,口蓋裂や多指症(特に右前肢部)も高頻度に出現した。眼では色素網膜上皮細胞の分化不全による虹彩欠損がみられた。

以上の結果より,HSのIdoA/GlcAの2位硫酸基硫酸化は腎や骨格形成に非常に重要であることが明らかとなった(図1参照)。Ringvallらは,NDST-1<sup>-/-</sup>の腎におけるHSの2位硫酸化の量を測定していないが,2-OSTはNDSTの後に働くため,NDST-1<sup>-/-</sup>の腎でも,二次的にHS2位硫酸基修飾の程度が減少している可能性が考えられる。しかし,NDST-1<sup>-/-</sup>の腎が正常に形成されることは非常に興味深い。マウス腎では,NDST-1のほかにもNDST-2およびNDST-3のmRNAが検出されており<sup>20)</sup>,また,NDST-1<sup>-/-</sup>では完全にはN-硫酸化が消失していないことから<sup>11)</sup>,NDST-2やNDST-3が代償的に機能するとともに,わずかなHSの2位硫酸基修飾でも腎の形成には十分であるのかもしれない。

### HS3-O-sulfotransferase (3-OST) 欠損マウスからの情報

GlcNSO<sub>3</sub>の3位へ硫酸基を転移する酵素の3-OSTは,Shworakらによって1997年にクローニングされ<sup>22)</sup>,現在少なくとも4つのアイソフォームが同定されている<sup>23)</sup>。アンチトロンピンは,HSあるいはヘパリンと結合することによってプロテアーゼ阻害活性を著しく上昇するが,これにはHS/ヘパリンの3位硫酸基修飾が必須である<sup>24)</sup>。Shworakらは,血栓傾向の表現型を予想して,3-OST-1遺伝子欠損マウス(3-OST-1<sup>-/-</sup>)を作出し,その解析結果をGlycobiology学会(2000年)で報告した<sup>17)</sup>。それによると,3-OST-1<sup>-/-</sup>の組織では,アンチトロンピン阻害活性促進能をもつHS(HS<sup>act</sup>)の

量が,野生型に比べ2~25%まで低下しているにもかかわらず,組織フィブリン沈着の程度は,3-OST-1<sup>-/-</sup>と野生型との間でまったく差がなかった。さらに,塩化鉄を用いた血管壁傷害実験でも,3-OST-1<sup>-/-</sup>は野生型と同様の閉塞速度を示したことから,3-OST-1<sup>-/-</sup>は血栓傾向を発症しないことが判明した。Shworakらは,こうした予想に反する結果に対し,今回の血栓評価系が不適切であった可能性,あるいは残存するHS<sup>act</sup>の関与などを考察しているが,今後のより詳細な研究によって,アンチトロンピンとHSの凝固系制御における真の役割が明らかになるものと考えられる。

### おわりに

HSPGは,スルホトランスフェラーゼの種類および発現部位,あるいは発現時期の違いによって,多様な硫酸基修飾のパターンを示す。そして,この多様性を利用して,成長因子や細胞外基質などと選択的に結合し,それらの機能を調節している<sup>25)</sup>。NDST-1<sup>-/-</sup>や2-OST<sup>-/-</sup>にみられる肺や腎などの形成不全は,硫酸化の低下したHSPGに成長因子などが結合できず,機能を発揮できなかったことに起因しているのかもしれない。また,HSPGそのものの生理的役割についてもまだまだ不明な点が多い。今後,ノックアウトマウスの新たな作出,およびこれらを掛け合わせた複合欠損マウスなどの研究を通じて,HSPGの生理的意義が一層明らかになるものと期待される。

謝辞:御校閲を戴きました小嶋哲人先生(名古屋大学医学部教授),岩永貞昭先生,および亀井慎太郎博士((財)化学及血清療法研究所)に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 羽瀨弘子,木全弘治:ヘパラン硫酸の硫酸化と増殖因子シグナリングの制御.細胞工学 18:325-332,1999.

- 2) Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Has-sell JR, Yamada Y: Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* **23**: 354-358, 1999.
- 3) Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberledge S, Bernfield M: Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet* **25**: 329-332, 2000.
- 4) Reizes O, Lincecum J, Wang Z, Goldberger O, Huang L, Kaksonen M, Ahima R, Hinkes MT, Barsh GS, Rauvala H, Bernfield M: Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3. *Cell* **106**: 105~116, 2001.
- 5) Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Tsuzuki S, Nakamura E, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T: Syndecan-4 deficiency impairs focal adhesion formation only under restricted conditions. *J Biol Chem* **275**: 5249-5252, 2000.
- 6) Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Matsuo S, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T: Syndecan-4 deficiency increases susceptibility to kappa-carrageenan-induced renal damage. *Lab Invest* **81**: 509-516, 2001.
- 7) Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncel-la S, Denhez F, Detmar M, Goetinck P: Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest* **107**: R9-R14, 2001.
- 8) Lander AD, Selleck SB: The elusive functions of proteoglycans: *in vivo* veritas. *J Cell Biol* **148**: 227-232, 2000.
- 9) Cano-Gauci DF, Song HH, Yang H, McKerlie C, Choo B, Shi W, Pullano R, Piscione TD, Grisaru S, Soon S, Sedlackova L, Tanswell AK, Mak TW, Yeger H, Lockwood GA, Rosenblum ND, Filmus J: Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol* **146**: 255~264, 1999.
- 10) Lin X, Wei G, Shi Z, Dryer L, Esko JD, Wells DE, Matzuk MM: Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol* **224**: 299-311, 2000.
- 11) Ringvall M, Ledin J, Holmborn K, van Kuppevelt T, Ellin F, Eriksson I, Olofsson AM, Kjellen L, Forsberg E: Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase-1. *J Biol Chem* **275**: 25926-25930, 2000.
- 12) Fan G, Xiao L, Cheng L, Wang X, Sun B, Hu G: Targeted disruption of NDST-1 gene leads to pulmonary hypoplasia and neonatal respiratory distress in mice. *FEBS Lett* **467**: 7-11, 2000.
- 13) Humphries DE, Wong GW, Friend DS, Gurish MF, Qiu WT, Huang C, Sharpe AH, Stevens RL: Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* **400**: 769-772, 1999.
- 14) Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M, Eriksson I, Ledin J, Hellman L, Kjellen L: Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* **400**: 773-776, 1999.
- 15) Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS, Wilson VA: Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev* **12**: 1894-1906, 1998.
- 16) Merry CL, Bullock SL, Swan DC, Backen AC, Lyon M, Beddington RS, Wilson VA, Gallagher JT: The molecular phenotype of heparan sulfate in the *hs2st*<sup>-/-</sup> mutant mouse. *J Biol Chem* **276**: 35429-35434, 2001.
- 17) Shworak NW, Post M, Enjoi K, Christi P, Lech M, Beeler D, Rayburn H, Rosenberg RD: 3-OST-1 deficient mice lack an obvious procoagulant phenotype. *Glycobiology* **10**(suppl): 1082-1083, 2000.
- 18) Forsberg E, Kjellen L: Heparan sulfate; lessons from knockout mice. *J Clin Invest* **108**: 175-180, 2001.
- 19) Esko JD, Lindahl U: Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* **108**: 169-173, 2001.
- 20) Aikawa J, Grobe K, Tsujimoto M, Esko JD: Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc *N*-deacetylase/GlcN *N*-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4. *J Biol Chem* **276**: 5876-5882, 2001.
- 21) Kobayashi M, Habuchi H, Yoneda M, Habuchi O, Kimata K: Molecular cloning and expression of Chinese hamster ovary cell heparan-sulfate 2-sulfotransferase. *J Biol Chem* **272**: 13980-13985, 1997.
- 22) Shworak NW, Liu J, Fritze LM, Schwartz JJ, Zhang L, Logeart D, Rosenberg RD: Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase. *J Biol Chem* **272**: 28008-28019, 1997.
- 23) Shworak NW, Liu J, Petros LM, Zhang L, Kobayashi M, Copeland NG, Jenkins NA, Rosenberg RD: Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cDNAs and identification of distinct genomic loci. *J Biol Chem* **274**: 5170-5184, 1999.
- 24) Lindahl U, Backstrom G, Thunberg L, Leder IG: Evidence for a 3-*O*-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 6551-6555, 1980.
- 25) 羽瀨弘子, 木全弘治: 上皮と間充織のはざまにあるヘパラン硫酸プロテオグリカン. *生化学* **73**: 1246-1256, 2001.