

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

細胞を血行性脳実質内動員する機序の解析および
そのアルツハイマー病治療への応用に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 内村 健治

平成21(2009)年 3月

目 次

I.	総括研究報告	
	細胞を血行性脳実質内動員する機序の解析および そのアルツハイマー病治療への応用に関する研究	----- 1
	内村 健治	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	----- 7
III.	研究成果の刊行物・別刷	----- 8

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
総括研究報告書

細胞を血行性脳実質内動員する機序の解析および
そのアルツハイマー病治療への応用に関する研究

主任研究者 内村 健治 国立長寿医療センター 研究所 室長

研究要旨: アルツハイマー病の病態下では骨髄単球由来ミクログリア細胞が中枢神経系に特異的な血液脳関門を通過し血行性に脳内に浸潤することが報告されている。本研究はこの脳内浸潤分子メカニズムを明らかにし、脳移行性細胞を遺伝子搬送体として利用する細胞医薬によりアルツハイマー病新規治療法の開発を目指す。本主任研究者は現在までに末梢組織への血行性細胞遊走に関わる分子機序を解明している(Uchimura et al, *Nature Immunol* 2005; Veerman et al, *Nature Immunol* 2007 など)。本年度はこれらの研究成果を進展させ、脳血管内での末梢投与ミクログリア細胞の動態を生体内ビデオ蛍光顕微鏡によりライブイメージング解析した。その結果、脳内移入ミクログリア細胞がセレクトインリガンド糖鎖を発現している事を発見し、セレクトイン-糖鎖の分子メカニズムの脳内浸潤における重要性を明らかにした。一方、本主任研究者はヘパラン硫酸多硫酸化ドメインがアルツハイマー病モデルマウス脳内重合アミロイドβタンパク(Aβ)沈着部位に特異的に発現することを発見し、さらにこの特殊なドメインがAβ重合に関わっている可能性をチオフラビンTアッセイにより検討した。その結果、当該多硫酸化ドメインがin vitroでAβ重合を促進する作用を有する事を明らかにした。さらに興味深い事に、当該ドメインを分解する細胞外スルファターゼ(本主任研究者が2002年に発見)がAβ沈着部位発現多硫酸化ドメインをex vivoで分解する知見を得る事に成功した。細胞外スルファターゼが神経毒性の原因と予想される重合Aβの形成を減弱/阻止する可能性が強く示唆された。アルツハイマー病態において、脳移行性細胞に脳内搬送および脳内発現させる候補遺伝子として細胞外スルファターゼ遺伝子が選定された。アルツハイマー病モデルマウスと細胞イメージング解析法の使用により脳内Aβ沈着を減少させる技術の開発基盤の確立につながる成果が得られた。

A. 研究目的

アルツハイマー病の病態下では中枢神経系に特異的な血液脳関門を通過し骨髄単球由来ミクログリアが脳内に浸潤

することが報告されている (Simard et al., *Neuron*, 2006)。脳内へ移行した細胞はアミロイド沈着体を食食能などにより積極的に除去する働きを示すものと考えられ

ている。これらの細胞は、動脈投与または静脈投与により血行性に脳内へ浸潤・生着する。現在、この詳細な分子メカニズムは不明である。本研究は単球由来マイクログリア、アルツハイマー病モデルマウスおよびマウス生体内ビデオ蛍光顕微鏡法を用いて当該細胞の脳血管外遊走と脳内への移入機構を明らかにすることを目的とする。さらに、これら脳移行性細胞を多く送り込むことにより脳内神経毒性アミロイド斑を効率的に除去する治療法や、アミロイド斑分解除去遺伝子の脳内搬送体としてこれら細胞を利用する細胞医薬をもとにしたアルツハイマー病新規治療法開発における技術基盤の提供も目指す。

B. 研究方法

本研究者は以前、白血球の血管から標的末梢組織内へ血管外遊走する際のセレクトインとそのリガンド糖鎖の分子相互作用の重要性を免疫学的立場から明らかにした (Uchimura et al., *Nature immunol* 2005)。本研究ではこの末梢組織細胞浸潤解析において確立した生体内ビデオ蛍光顕微鏡法を脳内細胞浸潤解析に応用する。本研究一年目である昨年度に本研究者は新規血管外遊走の分子機序を発見することに成功した (Veerman et al, *Nature Immunol*, 2007)。この際に用いたトランスウェルアッセイを発展させ脳移行性マイクログリアと血管内皮細胞との相互作用を *in vitro* で確認した。また、本研究室に設置した生体内ビデオ蛍光顕微鏡により末梢投与マイクログリア細胞 (MG5) のマウス脳内に

おけるライブイメージングを行った。MG5 で得られた知見が他のマイクログリア細胞でも観察可能かどうかを確認するため、マウスマイクログリア細胞 (BV2) を入手し、その培養維持を行った。フローサイトメトリーにより血管外遊走時に働くと予想される細胞表面分子 (セレクトイン、セレクトインリガンド糖鎖、インテグリンなど) の発現を解析した。また、それぞれの接着分子のカウンターパート分子が加齢アルツハイマー病モデルマウス脳内血管で発現しているかどうかを組織化学染色法で解析した。代謝ラベル法により当該細胞を CFSE 蛍光色素標識し、マウス脳内における標識細胞の動態を生体内ビデオ蛍光顕微鏡を用いて解析した。加齢アルツハイマー病モデルマウス Tg2576 の脳内における標識細胞動態解析にも着手した。

一方、本研究者はヘパラン硫酸多硫酸化ドメインがアルツハイマー病モデルマウス脳内重合 A β 沈着部位に選択的に強く発現することを昨年度発見している。ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの A β 重合への役割および当該ドメインを分解する細胞外スルファターゼの解析をヘパリン (多硫酸化ドメインを多く持つヘパラン硫酸誘導体) と化学修飾ヘパリン (多硫酸化ドメイン含有が非常に少ない誘導体) を用いた *in vitro* A β 重合 Thio-T アッセイにより比較検討した。

(倫理面への配慮)

研究の実施に先立ち、本研究課題は本センター設置の遺伝子組換え生物実験安全委員会の審査を受け承認を得た。

また、本センター設置の実験動物委員会および動物実験倫理委員会の審査を受け承認を得た。本研究課題に参画する者は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」、「動物の愛護及び管理に関する法律」および「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」の更なる理解を確認し遵守した。厚生労働省研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針を遵守し一層の徹底を図った。

C. 研究結果

脳移行時に働くと予想される分子(P, E-セレクトインリガンド、インテグリン)のフローサイトメトリーによる解析結果から、BV2マイクログリア細胞がP-, E-セレクトインリガンド糖鎖、CD44および α Mインテグリンを発現している事が明らかとなった。加齢アルツハイマー病モデルマウス脳内血管における接着分子の発現を組織化学染色法で解析した結果、野生型では観られないP-, E-セレクトインが発現する結果が得られた。末梢静脈投与したBV2マイクログリア細胞のマウス脳内での動態を生体内ビデオ蛍光顕微鏡法で観察・解析した結果、他の末梢組織内でみられるローリングや接着の機構が観察された。興味深い事に、加齢アルツハイマー病モデルマウスTg2576の脳内ではローリングや接着の機構が増強されている知見が得られた。現在この解析結果に関して他のアルツハイマー病モデルマウスでも同様に観察されるかどうかを検討している。

一方、ヘパリン硫酸多硫酸化ドメイン

のA β 重合への役割をヘパリンと化学修飾ヘパリンを用いたin vitro A β 重合Thio-Tアッセイにより比較検討した結果、多硫酸化ドメインがA β 重合を促進する事が明らかとなった。さらに、当該ドメインを分解する細胞外スルファターゼの解析を行った。大変興味深い事にアルツハイマー病モデルマウス脳内多硫酸化ドメインが細胞外スルファターゼによりex vivoで完全に分解される事を発見した。

D. 考察

マウスマイクログリア細胞がP-, E-セレクトインリガンドをその細胞表面に発現すること、アルツハイマー病モデルマウス脳内血管に野生型では観られないP-, E-セレクトインが発現する知見は今までに報告がなく新しい知見である。昨年度に得た、MG5細胞のローリングに働く分子がL-セレクトインではなく、P-, E-セレクトインリガンドである可能性とよく合致した結果であった。これら分子が脳内浸潤において重要な役割を担っている事が強く示唆された。一方でP-, E-セレクトイン中和抗体等を用いて発現している当該分子がモデルマウス脳内において実際に機能していることの確証を得る必要がある。また、Tg2576とは別のアルツハイマー病モデルマウスであるJ20マウスの加齢育成が間もなく完了するので、このモデルマウスに関してローリング及び接着の増強という同様な結果が観察されるかどうかをさらに検討する必要がある。一方、神経毒性重合A β の除去を亢進させることが強く期待さ

れる細胞外スルファターゼ遺伝子を脳移行性細胞にウィルスベクターを用いて発現させ、血行性にアルツハイマー病モデルマウス脳内へ送り込むことも検証しなければいけない。細胞外スルファターゼ遺伝子の脳内搬送体として脳移行ミクログリア細胞を使用する可能性を検討するため、当該細胞における外来遺伝子発現用ベクターの検討を行った。ポリオーマウィルスベクターを用いると脳移行ミクログリア細胞において高い確率(>95%)で外来遺伝子を発現させる事ができる知見を現在得ており、研究継続している。今後、遺伝子投与後経時的に脳内における重合A β の沈着を観察しアルツハイマー病の病因の一つとして考えられる神経毒性重合A β の沈着を阻止または除去することがこの方法により可能であるかどうかをモデルマウスを用いて検討する必要がある。

E. 結論

セレクチンという特定の接着分子の相互作用がアルツハイマー病の病態発症に関わっている可能性が示された事は本研究の大きな進展である。当該セレクチン分子のモデルマウスにおける発現はアルツハイマー病患者脳内においても同様に観察されるかどうかを検討するテーマへ発展させなければならない。また、細胞外スルファターゼ遺伝子を脳内A β 沈着 阻止/減少を誘導する脳内搬送遺伝子の候補として解析を継続する。当初の研究計画は滞り無く実施された。

F.健康危険情報
該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Muramatsu, T. and Uchimura, K. Sulfotransferases. In Experimental Glycoscience. (N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki and S. Hase, editors). Springer, Tokyo. 386-388. (2008)

Uchimura, K. and Muramatsu, T. N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases. In Experimental Glycoscience. (N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki and S. Hase, editors). Springer, Tokyo. 83-86. (2008)

内村健治

セレクチンと糖鎖

臨床検査 52:465-471, (2008)

2. 学会発表

細野友美, Britschgi, M., Jenniskens, G.J., ホサインモトラブ 道川 誠
Wyss-Coray, T., 内村健治
アルツハイマー病モデルマウスの脳におけるヘパラン硫酸糖鎖の発現解析
第28回日本糖質学会年会, つくば, 平成20年8月19日

ホサインモトラブ Tsay, D. Jenniskens, G.J. Rosen, S.D. 内村健治
細胞外スルファターゼにより発現調節さ

れる細胞表面抗ヘパラン硫酸抗体エピソード

第28回日本糖質学会年会, つくば, 平成20年8月20日

内村健治

アルツハイマー病と糖鎖生物学:モデル動物を用いた解析

第2回GFRG研究会, 東京, 平成20年9月18日

内村健治

セレクチンリガンド糖鎖の硫酸化とリンパ球血管外遊走メカニズム

第19回プロテオグリカン特別講演会、札幌, 2008年10月28日、

Tomomi Hosono, Motarab Hossain, Markus Britschgi, Makoto Michikawa, Guido J. Jenniskens, Tony Wyss-Coray and Kenji Uchimura

Cerebral Accumulation of Highly Sulfated Domains of Heparan Sulfate in Mouse Models of Alzheimer's Disease, Annual meeting of Glycobiology 2008, Fort Worth, USA, Nov 13, (2008)

内村健治

リンパ球血管外遊走におけるセレクチンリガンド糖鎖の硫酸化

第6回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、品川, 2008年12月4日

Tomomi Hosono, Motarab Hossain, Markus Britschgi, Makoto Michikawa, Guido J. Jenniskens, Tony Wyss-Coray

and Kenji Uchimura

Cerebral accumulation of highly sulfated domains of heparan sulfates in mouse models of Alzheimer's disease
BMB2008, 神戸, 2008年12月9日

Md. Motarab Hossain, Tomomi Hosono, Renhong Tang, Toin van Kuppevelt, Guido Jenniskens, Steven Rosen and Kenji Uchimura

Extracellular Remodeling of Heparin/Heparan Sulfate Proteoglycans by Sulfs, Glucosamine 6-endosulfatases
BMB2008, 神戸, 2008年12月9日

Tomomi Hosono, Steven Rosen, Linda Noble, Kenji Uchimura

Gene-expression patterns of proteoglycans and sulfotransferases in the mouse spinal cord temporally regulated after contusion injury
BMB2008, 神戸, 2008年12月9日

内村健治

「白血球血管外遊走におけるセレクチン硫酸化糖鎖の分子相互作用」

愛知医科大学 分子医科学研究所セミナー講演, 愛知, 2009年2月4日

Kenji Uchimura

“Study of lymphocyte homing to lymph nodes and its application for an analysis of brain homing in an Alzheimer's mouse model”

1st NAGOYA Global Retreat, 大府, 2009年2月21日

Md. Motarab Hossain, Tomomi Hosono,
Renhong Tang, Toin H. van Kuppevelt,
Guido J. Jenniskens, Steven D. Rosen
and Kenji Uchimura

Extracellular degradation of the
RB4CD12 anti-heparan sulfate epitope
by HSulf-1 and HSulf-2 67th Harden
Conference, Cambridge UK, Mar 29,
(2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定
を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Uchimura, K and Muramatsu, T	N-aetylglucosamine-6-0-sulfo transferases	Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H., Kawasaki, T., and Hase, S.	Experimental Glycoscience Glycobiology	Springer	Japan	2008	83-86
Muramatsu, T and Uchimura, K	Sulfotransferases	Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H., Kawasaki, T., and Hase, S.	Experimental Glycoscience Glycobiology	Springer	Japan	2008	386-388

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
内村健治	セレクチンと糖鎖	臨床検査	第52巻	465-471	2008

研究成果の刊行物・別刷

Reprint from

Naoyuki Taniguchi, Akemi Suzuki, Yukishige Ito, Hisashi Narimatsu,

Toshisuke Kawasaki, Sumihiro Hase (Eds.)

Experimental Glycoscience

Glycobiology

© Springer 2008

Printed in Japan. Not for Sale.

 Springer

N-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferases

Kenji Uchimura,¹ Takashi Muramatsu²

Introduction

N-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase (GlcNAc6ST) transfers a sulfate group from PAPS to an *N*-acetylglucosamine residue, which is usually located at the non-reducing end of glycoconjugates. It is important to note that sulfation proceeds the elongation of the glycan chain. This enzyme is involved in the synthesis of keratan sulfate and sialyl 6-sulfo Lewis X, which is present on the luminal surface of the high endothelial venule (HEV) of lymph nodes. So far, five isozymes of GlcNAc6ST have been identified in humans (Table 1). They share about 30% sequence identity, and have the configuration of type II transmembrane proteins, a feature typical of Golgi-located enzymes.

The sulfate group is transferred only to C-6 of *N*-acetylglucosamine by GlcNAc6ST-1, the first cloned enzyme, which was shown by a biochemical analysis of the product (Uchimura et al. 1998). Convenient substrates to assay GlcNAc6STs are oligosaccharides with an *N*-acetylglucosamine terminus, and radioactively labeled PAPS as the sulfate donor. Usually, the product of the enzymatic reaction is separated from PAPS by high-performance liquid chromatography or thin-layer chromatography. The latter procedure is useful for assaying a large number of samples (Uchimura et al. 2002). Substrate specificities of GlcNAc6STs assayed *in vitro* are not dramatically different from each other. However, among GlcNAc6ST-1, -2, and -3, only GlcNAc6ST-2 can act on core 3 structure (Gal β 1-3GalNAc) (Uchimura et al. 2002). As reported by de Graffenried and Bertozzi, Golgi localization of GlcNAc6STs is different: GlcNAc6ST-1 is confined to the trans-Golgi network, GlcNAc6ST-3 is confined to the early secretory pathway, and GlcNAc6ST-2 is distributed throughout the Golgi. This difference in localization influences enzymatic activities observed in intact cells.

Comments

Important roles played by GlcNAc6STs have been revealed especially by employing genetical approaches. Sialyl 6-sulfo Lewis X is a ligand structure of L-selectin, which

¹Section of Pathophysiology and Neurobiology, Department of Alzheimer's Disease Research, National Institute for Longevity Sciences (NILS), 36-3 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8522, Japan
Phone: +81-562-46-2311, Fax: +81-562-46-3157
E-mail: arumihcu@nils.go.jp

²Department of Health Science, Faculty of Psychological and Physical Science, Aichi Gakuin University, 12 Araiike, Iwasaki-cho, Nishin, Aichi 470-0195, Japan
Phone: +81-561-73-1111, Fax: +81-561-73-1142
E-mail: tmurama@dpc.aichi-gakuin.ac.jp

Table 1 *N*-acetylglucosamine-6-sulfotransferases

Name	Other abbreviated names	Gene name	Map	Accession No.	Major sites of expression	PubMed ID No. for key references
GlcNAc6ST-1		<i>CHST2</i>	3q24	NM-004267	Multiple tissues	9712885, 10200296, 11726653, 12855678, 15175329, 15220337, 15728736, 1622785, 16227986, 16624895, 16772045
GlcNAc6ST-2	LSST HEC-GLCNAcST	<i>CHST4</i>	16q22.3	NM-005769	HEV	10330415, 10435581, 11520459, 11726653, 12107080, 12855678, 14597732, 16227985, 16227986, 16772045, 16897186
GlcNAc6ST-3	I-GlcNAcST	<i>CHST5</i>	16q22	NM-024533	Intestine, cornea	10491328, 11278593, 11726653, 12855678, 16938851
GlcNAc6ST-4	C6ST-2	<i>CHST7</i>	Xp11.3	NM-019886	Multiple tissues	10781596, 10913333, 10956661
GlcNAc6ST-5	C-GlcNAcST	<i>CHST6</i>	16q22	NM-021615	Cornea	11017086, 11278593, 15013869

Gene name, chromosomal location, and accession No. are those of human enzymes

regulates the initial step of lymphocyte homing to lymph nodes by inducing the rolling of lymphocytes on the luminal surface of HEV. GlcNAc6ST-2 is preferentially expressed in HEV, and GlcNAc6ST-1 is expressed in many tissues including HEV. In GlcNAc6ST-2-deficient mice, lymphocyte homing to peripheral lymph nodes is reduced to 50–60% of that observed in wild-type mice. However, in double knockout (DKO) mice, deficient in both GlcNAc6ST-1 and -2, the value is reduced to 25%, indicating that both enzymes are involved in the synthesis of *t*-selectin ligand (Kawashima et al. 2005; Uchimura et al. 2005). The complete loss of sialyl 6-sulfo Lewis X structure from HEV of DKO mice is indicated by biochemical and immunohistochemical analyses. In HEV of DKO mice, the rolling of lymphocytes is still observed, but the rolling velocity is greatly increased. Thus, sialyl Lewis X structure without GlcNAc6-sulfation is sufficient to induce a minimum level of rolling, and its GlcNAc6-sulfation normalizes rolling by decreasing the rolling velocity.

GlcNAc6ST-5 is expressed in the cornea and is involved in the synthesis of keratan sulfate. Null mutation of GlcNAc6ST-5 in human leads to macular corneal dystrophy type I and II (Akama et al. 2000). GlcNAc6ST-3 is closely related to GlcNAc6ST-5. Hayashida et al. have revealed that knockout mice deficient in GlcNAc6ST-3 lack highly sulfated keratan sulfate in the cornea and have thinner corneas compared to wild-type mice. The collagen fibrillar architecture is markedly altered in the cornea of the mutant mice. Zhang et al. have shown that GlcNAc6ST-1 is involved in the synthesis of highly sulfated keratan sulfate in the brain. Synthesis of highly sulfated keratan sulfate is

induced upon brain injury. In GlcNAc6ST-1 knockout mice, this induction is impaired, and glial scar formation, which inhibits repair of the brain, is suppressed.

Upregulation of GlcNAc6STs under pathological conditions is a subject of significant interest. The GlcNAc6ST-2 level is increased in mucinous adenocarcinoma of the colon, and in chemotherapy-resistant ovarian adenocarcinoma. Expression of GlcNAc6ST-1 and -2 is increased in the synovium of mice upon collagen-induced arthritis, a model of rheumatoid arthritis.

Protocol: GlcNAc-6-O-sulfotransferase Assay

Microsomal fractions in mammalian cell lines that are transfected with expression plasmids encoding GlcNAc-6-O-sulfotransferases are used as enzymes. Various oligosaccharides derived from N-linked or O-linked glycans and keratan sulfate are applicable to the assay described here. Oligosaccharide substrates tested are GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc, GlcNAc β 1-6Man-O-methyl, GlcNAc β 1-2Man, GlcNAc β -6[Gal β 1-3]GalNAc-*p*-nitrophenyl and GlcNAc β 1-3GalNAc-*p*-nitrophenyl. Thin-layer chromatography (TLC) is employed to handle a large number of samples.

1. The standard reaction mixture in a 1.5 mL tube contains 1 μ mol Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 μ mol $MuCl_2$, 0.04 μ mol adenosine 5'-monophosphate, 2 μ mol sodium fluoride, 20 μ mol oligosaccharides, 150 pmol [^{35}S]-3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) (1.5×10^6 cpm), 0.05% of Triton-X and 5 μ L of enzymes in a final volume of 20 μ L.

2. Incubate the tube containing the reaction mixture at 30°C for 1 h.

3. Aliquots of 2 μ L of the reaction mixture are applied to TLC plates. The plates are precoated with 0.1-mm thick cellulose.

4. Develop the plates with a developing solvent, ethanol/pyridine/*n*-butyl alcohol/water/acetic acid (100:10:10:30:3, by volume).

5. End the development when the solvent front reaches to the top of the plates. The ^{35}S -labeled oligosaccharides migrate faster than [^{35}S]-PAPS.

The radioactivity of the ^{35}S -labeled oligosaccharides is visualized and measured using a BAS2000 bioimaging analyzer.

References

- Akama TO, Nishida K, Nakayama J, Watanabe H, Ozaki K, Nakamura T, Dota A, Kawasaki S, Inoue Y, Maeda N, Yamamoto S, Fujiwara T, Thonar EJ, Shimomura Y, Kinoshita S, Tanigami A, Fukuda MN (2000) Macular corneal dystrophy type I and type II are caused by distinct mutations in a new sulphotransferase gene. *Nat Genet* 26:237-241
- Kawashima H, Petryniak B, Hiraoka N, Mitoma J, Huckaby V, Nakayama J, Uchimura K, Kadomatsu K, Muramatsu T, Lowe JB, Fukuda M (2005) N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases 1 and 2 cooperatively control lymphocyte homing through I-selectin ligand biosynthesis in high endothelial venules. *Nat Immunol* 6:1096-1104
- Uchimura K, Muramatsu H, Kadomatsu K, Fan QW, Kurosawa N, Mitsuoka C, Kannagi R, Habuchi O, Muramatsu T (1998) Molecular cloning and characterization of an N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase. *J Biol Chem* 273:22577-22583

- Uchimura K, El-Fasakhany FM, Hori M, Hemmerich S, Blink SE, Kansas GS, Kanamori A, Kumamoto K, Kannagi R, Muramatsu T (2002) Specificities of *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferases in relation to L-selectin ligand synthesis and tumor-associated enzyme expression. *J Biol Chem* 277:3979-3984
- Uchimura K, Gauguet JM, Singer MS, Tsay D, Kannagi R, Muramatsu T, von Andrian UH, Rosen SD (2005) A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deficient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules. *Nat Immunol* 11:1105-1113

Reprint from

Naoyuki Taniguchi, Akemi Suzuki, Yukishige Ito, Hisashi Narimatsu,

Toshisuke Kawasaki, Sumihiro Hase (Eds.)

Experimental Glycoscience

Glycobiology

© Springer 2008

Printed in Japan. Not for Sale.

 Springer

Sulfotransferases

Takashi Muramatsu¹, Kenji Uchimura²

Introduction

Molecular cloning has been accomplished for a large number of carbohydrate sulfotransferases. The majority of them are involved in the synthesis of glycosaminoglycans such as heparan sulfate, chondroitin sulfate, and keratan sulfate (Habuchi et al. 2006), whereas some of them play roles in formation of glycans in glycoproteins or glycolipids. Increasing numbers of carbohydrate sulfotransferases have been knocked out in mice to understand the role of sulfate groups more precisely (Table 1). Interestingly, all knockout mice exhibit phenotypes, underlining the physiological importance of carbohydrate sulfation.

Comments

The first carbohydrate sulfotransferase knocked out was heparan sulfate 2-O-sulfotransferase. Inactivation of the gene by Gene trap leads to neonatal death in mice due to failure of kidney formation (Bullock et al. 1998). The striking phenotype gave convincing evidence that heparan sulfate plays important roles in mammalian development.

Heparan sulfate/heparin *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase (NDST) catalyzes both the deacetylation and sulfation of an amino group in *N*-acetylglucosamine. NDST1 is involved in the synthesis of heparan sulfate, and NDST-2 in the synthesis of heparin. The action of NDST usually precedes the action of other sulfotransferases. However, in embryonic stem cells derived from NDST1 and NDST2 double knockout mice, which lack *N*-sulfated glucosamine, heparan sulfate with 6-sulfated *N*-acetylglucosamine was detected, indicating that the 6-sulfation step, which does not require *N*-sulfation, is present (Holmborn et al. 2004). Reflecting the physiological importance of heparan sulfate, NDST1 knockout mice die at the neonatal stage (Ringvall et al. 2000). Conditional knockout at a restricted tissue is required to understand the precise role of heparan sulfate chain in a physiological process (Wang et al. 2005).

N-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferases (GlcNAc6STs) are involved in the synthesis of both *t*-selectin ligands and keratan sulfate. Decreased lymphocyte homing in GlcNAc6ST deficient mice is due to the impaired synthesis of *t*-selectin ligand and other phenotypes are due to failure in the synthesis of highly-sulfated keratan sulfate. *In vivo* lymphocyte homing assay is shown as a protocol. Further information concerning the

¹Department of Health Science, Faculty of Psychological and Physical Science, Aichi Gakuin University, 12 Arai-ke, Iwasaki-cho, Nishin, Aichi 470-0195, Japan
Phone: +81-561-73-1111, Fax: +81-561-73-1142
E-mail: tmurama@dpc.aichi-gakuin.ac.jp

²Section of Pathophysiology and Neurobiology, Department of Alzheimer's Disease Research, National Institute for Longevity Sciences (NILS), 36-3 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8522, Japan
Phone: +81-562-46-2311, Fax: +81-562-46-3157
E-mail: arumihcu@nils.go.jp

Table 1 List of knockout of carbohydrate sulfotransferases

Name of enzymes	Methods	Phenotypes	PubMed ID No. of key references
Heparan sulfate/ heparin <i>N</i> -deacetylase/ <i>N</i> -sulfotransferase-1	KO, conditional KO	Neonatal death; disturbed Calcium ion kinetics in myotube; cerebral hypoplasia and craniofacial defects; impaired neutrophil infiltration	10852901, 12692154, 15292174, 15319440, 16020517, 16056228
Heparan sulfate/ heparin <i>N</i> -deacetylase/ <i>N</i> -sulfotransferase-2	KO	Abnormal mast cells	10466726, 10466727
Heparan sulfate 2- <i>O</i> -sulfotransferase	Gene trap	Neonatal death due to renal agenesis; impaired retinal axon guidance	9637690, 16807321
Heparan sulfate 3- <i>O</i> -sulfotransferase-1	KO	Normal hemostasis; genetic background-specific lethality and intrauterine growth retardation	12671048
Heparan sulfate 6- <i>O</i> -sulfotransferase-1	Gene trap, KO	Impaired retinal axon guidance; Abnormalities in fetal microvessels	16807321, 17405882
Chondroitin 4-sulfotransferase	Gene trap	Severe chondrodysplasia	16079159
Chondroitin 6-sulfotransferase	KO	Decreased naïve T lymphocytes in the spleen of young mice	11696535
<i>N</i> -Acetylglucosamine- 6- <i>O</i> -sulfotransferase-1	KO	Decreased lymphocyte homing; suppression of glial scar formation in the injured brain	15175329, 16227985, 16227986, 16624895
<i>N</i> -Acetylglucosamine- 6- <i>O</i> -sulfotransferase-2	KO	Decreased lymphocyte homing	11520459, 14597732, 16227985, 16227986
<i>N</i> -Acetylglucosamine- 6- <i>O</i> -sulfotransferase-3	KO	Thin cornea	16938851
HNK-1 sulfotransferase	KO	Alterations in synaptic efficacy, spatial learning and memory; reduced extracellular space in the brain	12213450, 12358771, 16262627
Cerebroside sulfotransferase	KO	Abnormalities in paranodal junctions; male sterility; impaired neutrophil infiltration	11917099, 12151530, 14583626, 15659616

phenotype of GlcNAc6ST knockout mice is provided in the section on GlcNAc6STs. Among five isozymes of GlcNAc6STs, three enzymes have been knocked out. Among isozymes of heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferases, so far, knockout of only one enzyme has been published. This is also true for heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferases.

Cerebroside sulfotransferase is involved in the formation of both sulfatide (HSO3-3-galactosyl ceramide) and seminolipid (HSO3-3-monogalactosylglycerol). The neurological phenotype observed in cerebroside sulfotransferase knockout mice is ascribed to the lack of sulfatide, and male sterility in these mice is due to the impaired synthesis of seminolipid.

Protocol: In Vivo Lymphocyte Homing Assay

Lymphocytes circulate between the blood and the lymphoid organs. Lymphocyte homing to lymph nodes is initiated by the binding of L-selectin to its ligands. A major class of L-selectin ligands in lymphocyte homing is sialyl 6-sulfo Lewis X. GlcNAc-6-O-sulfation is essential for the ligand activity. To assess the activity of homing ligand, an in vivo assay of lymphocyte homing is utilized. Lymphocyte donors and recipients in the assay described here are adult mice. Flow cytometry is used to quantify homing of lymphocytes to lymph nodes.

1. Dissect out mesenteric lymph nodes of 5- to 10-week-old CD-1 mice and place them in phosphate buffered saline (PBS).
2. Mash the nodes with two slide glasses to have single-cell suspensions in PBS.
3. Filter suspensions through a nylon cell strainer (40 μ m pore size).
4. Metabolically label filtered cells with 5 μ M 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) at 37°C for 30 min.
5. Inject the cells (1.7×10^7 in 100 μ l PBS/mouse) into tail veins of 8- to 10-week-old mice.
6. One hour after injection, kill the mice and dissect out peripheral lymph nodes, mesenteric lymph nodes, Peyer's patches, and spleen.
7. Create single-cell suspensions of these organs in PBS by teasing with 23-gauge needles.
8. Determine the fraction of CMFDA-labeled cells in suspensions by flow cytometry (5×10^5 cells per organ).
9. Acquire and analyze data with CellQuest software.

References

- Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS, Wilson VA (1998) Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev* 12:1894-1906
- Habuchi H, Habuchi O, Uchimura K, Kimata K, Muramatsu T (2006) Determination of substrate specificity of sulfotransferases and glycosyltransferases (proteoglycans). *Methods Enzymol* 416: 225-243
- Holmborn K, Ledin J, Smeds E, Eriksson I, Kusche-Gullberg M, Kjellen L (2004) Heparan sulfate synthesized by mouse embryonic stem cells deficient in NDST1 and NDST2 is 6-O-sulfated but contains no N-sulfate groups. *J Biol Chem* 279:42355-42358
- Ringvall M, Ledin J, Holmborn K, van Kuppevelt T, Ellin F, Eriksson I, Olofsson AM, Kjellen L, Forsberg E (2000) Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1. *J Biol Chem* 275:25926-25930
- Wang L, Fuster M, Sriramamo P, Esko JD (2005) Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol* 6:902-910

シリーズ最新医学講座・I 糖鎖と臨床検査・4

セレクチンと糖鎖

内村 健治

臨 床 検 査

第52巻 第4号 別刷

2008年4月15日 発行

医学書院