Function of Heparan Sulfate in Pluripotent Stem Cells

多能性幹細胞におけるヘパラン硫酸の機能

Hirano, Kazumi; and Nishihara, Shoko

Department of Bioinformatics, Faculty of Engineering, Soka University, 1-236 Tangi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

FAX: +82-426-91-2495, E-mail: shoko@soka.ac.jp

(Received on May 2, 2014, accepted on May 27, 2014)

Key Words: heparan sulfate, sulfation, embryonic stem cell, self-renewal, differentiation

Abstract

Heparan sulfate (HS) is one of glycosaminoglycan (GAG) and is composed of GlcA–GlcNAc repeating disaccharide units, which are sulfated by several sulfotransferases. Sulfation structure of HS results in various patterns and can facilitate binding to each morphogen and growth factor, such as BMPs, Wnts, FGFs, and EGFs, and regulate the associated signaling pathways. It was previously revealed that HS and its sulfation are required for maintenance and differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells through FGF4, BMP4, and Wnt signaling. However, most of the functions of HS sulfation patterns are still unknown. In this mini-review, we describe and discuss the functions of HS, including its sulfation pattern in pluripotent stem cells.

要 約

ヘパラン硫酸はグリコサミノグライカンの一つであり、GlcA–GlcNAcの二糖繰り返しユニットから構成され、複数の硫酸転移酵素により硫酸化される。ヘパラン硫酸の硫酸化構造にはさまざまなパターンがあり、骨形成タンパク質 (BMP)、Wnt、線維芽細胞成長因子 (FGF)、上皮成長因子 (EGF) などのモルフォゲンや成長因子と結合してシグナル経路を調節している。以前、われわれや他の研究グループは、ヘパラン硫酸とその硫酸化がFGF4、BMP4、Wntシグナルを介してマウス胚性幹細胞 (ES細胞) の維持と分化を制御していることを明らかにした。しかし、ヘパラン硫酸の硫酸化パターンが持つ機能の多くはいまだに不明である。本稿では、多能性幹細胞におけるヘパラン硫酸とその硫酸化パターンの機能を紹介する。

A. Synthesis of Heparan Sulfate

Heparan sulfate (HS) is one of glycosaminoglycan (GAG) that ubiquitously exists in the extracellular matrix and on the cell surface. Many molecules that are important for development, including fibroblast growth factors (FGFs), Wnts, and bone morphogenic proteins (BMPs), can bind to specific sulfated regions of HS chains and regulate signaling by binding HS and signal-associated molecules (Fig. 1) (1).

In proteoglycans that comprise GAGs and core proteins, the HS chains are covalently attached to Ser residues in the core proteins through the linkage region GlcA β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4Xyl β 1-*O*-Ser (Fig. 2) (2). Recently, it has been reported that synthesis of the linkage region is enhanced by FAM20B, which is a kinase that phosphorylates the Xyl residue in the linkage region (3). Additionally, HS and chondroitin sulfate (CS) synthesis is acquired for dephosphorylation of the Xyl residue in the linkage region by 2-phosphoxylose phosphatase (XYLP). HS chains are synthesized in the Golgi apparatus by several enzymes, including members of the hereditary multiple exostoses (EXT) protein family, which elongate the HS chain by adding repeating disaccharide units of D-glucuronic acid-*N*-acetyl-D-glucosamine (-4GlcA β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc α 1-)_n.

These repeating units are then differentially modified by

A. ヘパラン硫酸の生合成

ヘパラン硫酸は、グリコサミノグライカン (GAG) の一つであり、細胞外マトリクスや細胞表面の広範囲に発現している。線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor: FGF)、Wnt、骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein: BMP) などの発生において重要な分子は、ヘパラン硫酸の特異的な硫酸化領域に結合する。ヘパラン硫酸は、その結合を調節することによりシグナル伝達を制御している (図1) (1)。

グリコサミノグライカンとコアタンパク質から構成されるプロテオグライカンにおいて、ヘパラン硫酸はリンケージ領域 (GlcA β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4Xyl β 1-*O*-Ser) を介して、コアタンパク質のセリン残基に共有結合する (図2) (2)。最近、リンケージ領域中のキシロース (Xyl) 残基のリン酸化酵素であるFAM20Bにより、リンケージ領域の合成が増強されることが報告された(3)。さらに、ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸の合成には、2-リン酸化キシロース脱リン酸化酵素 (XYLP) による、リンケージ領域のXylの脱リン酸化が必要であることも合わせて報告された。ヘパラン硫酸は、ゴルジ体において遺伝性多発性外骨腫の原因遺伝子であるEXTタンパク質ファミリーなどにより合成される (図3)。EXTは、繰り返し二糖ユニットであるグルクロン酸-*N*-アセチルグルコサミン (-4GlcA β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc α 1-)_nを転移してヘパラン硫酸を伸長させる。

種々の構造的・機能的に多様な合成物を生み出すため

Fig. 1. Scheme of sulfate modification and signal regulation by sulfated glycosaminoglycan. A sulfate ion is transported into the cytosol by the sulfate transporter. The transported sulfate ion is converted into 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) by PAPS synthase. PAPS is transported into the Golgi apparatus through PAPS transporters (PAPSTs). Numerous sulfotransferases transfer sulfate from PAPS to the appropriate positions in glycans, such as glycosaminoglycans (GAGs). Sulfate-modified GAGs bind to various growth factors and support signal transduction.

epimerization and sulfation to produce a wide range of structurally and functionally diverse compounds (Fig. 3) (2). *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase (NDST), which transfers sulfate to the *N*-position of GlcNAc and initiates whole sulfation of HS, is a key enzyme for initiating the sulfation because subsequent *O*-sulfations at various positions occur near *N*-sulfation (4). After *N*-sulfation, glucuronyl C5-epimerase changes GlcA into iduronic acid (IdoA) by epimerization of COOH at position 5 of GlcA. HS 2-*O*-sulfotransferase (HS2ST) transfers sulfate to position 2 of GlcA/IdoA, and HS 6-*O*-sulfotransferase (HS6ST) transfers sulfate to position 6 of GlcNAc/GlcNS. Finally, HS 3-*O*-sulfotransferase (HS3ST) transfers sulfate to position 3 of GlcNS (5). Although this 3-*O*-sulfation is a relatively rare modification in HS sulfation, certain specific signal ligands and receptors bind to this sulfated structure and regulate the associated signaling pathways (6–8).

B. Embryonic Stem Cells and Signaling to Maintain Pluripotency

Embryonic stem (ES) cells are derived from the inner cell mass (ICM) of pre-implantation blastocysts (9, 10), have the characteristic features of self-renewal and pluripotency, and are able to differentiate into all cell types derived from different germ layers (11–13). Engraftment of functional somatic cells induced from ES cells is a promising approach in regenerative medicine for functional recovery after injury. However, this topic is not easily studied because of ethical problems associated with using human embryos to establish human ES cells and the potential issue of im-

に、これらヘパラン硫酸の繰り返しユニットは、エピマー化や硫酸化といった修飾を差次的に受ける (図3) (2)。脱*N*-アセチル/*N*-硫酸転移酵素 (NDST) は、GlcNAcの*N*位を硫酸化し、ヘパラン硫酸の全体の硫酸化を惹起する。さまざまな位置の*O*位の硫酸化は*N*位の硫酸化の近傍で起こるために、NDSTはヘパラン硫酸の硫酸化修飾の開始を担う重要な酵素であると言える (4)。*N*位の硫酸化の後、グルクロニル C5-エピメラーゼは、GlcAの5位のCOOHをエピマー化させることでイズロン酸 (IdoA) へと変換する。ヘパラン硫酸2-*O*-硫酸転移酵素 (HS2ST) は、GlcA/IdoAの2位に、ヘパラン硫酸6-*O*-硫酸転移酵素 (HS6ST) はGlcNAc/GlcNSの6位に硫酸基を転移する。さらに、ヘパラン硫酸3-*O*-硫酸転移酵素 (HS3ST) が、GlcNSの3位に硫酸基を転移する (5)。この3位の硫酸化はヘパラン硫酸の硫酸化修飾において相対的に稀な修飾であるが、特異的なシグナルリガンドや受容体と結合し、関連するシグナル経路を制御していることが報告されている (6–8)。

B. ES細胞の維持と分化に働くシグナル

胚性幹 (ES) 細胞は、着床前胚盤胞の内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) から樹立され (9, 10)、自己複製能と多分化能を維持している。さらにES細胞は、異なる胚葉由来するすべての細胞に分化することが可能な幹細胞である (11–13)。ES細胞から適切に分化誘導された体細胞の移植は、傷害や疾患などにより正常な働きを失った組織・臓器の機能回復を目指す再生医療への有望なアプローチである。しかしながら、ヒトES細胞を樹立するためにヒト胚を使用するという倫理的な問題、さらに移植に伴う免疫拒絶の問題があるため、再生医療への応用は容易ではなかった。人工多能性

Fig. 2. Scheme of synthesis of heparan sulfate. In proteoglycans composing GAGs and core proteins, the heparan sulfate (HS) chains are covalently attached to Ser residues in the core proteins through the linkage region GlcA β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4Xyl β 1-*O*-Ser. Synthesis of the linkage region is enhanced by FAM20B, which is a kinase that phosphorylates the Xyl residue in the linkage region. Effective synthesis of HS is acquired for the dephosphorylation of Xyl residue in the linkage region by 2-phosphoxylose phosphatase (XYLP). The EXT1/EXT2 complex generates disaccharide repeats of HS.

Fig. 3. Scheme of sulfate modification of heparan sulfate. The heparan sulfate (HS) chain is received sulfate modification by sulfotransferases. *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase (NDST), which transfers sulfate to the *N*-position of GlcNAc and initiates whole sulfation of HS; subsequently, *O*-sulfations at various positions occur near *N*-sulfation. After *N*-sulfation, glucuronyl C5-epimerase changes GlcA into iduronic acid (IdoA) by epimerization of COOH at position 5 of GlcA. HS 2-*O*-sulfotransferase (HS2ST) transfers sulfate to the 2 position of GlcA/IdoA, and 6-*O*-Sulfotransferase (HS6ST) also transfers sulfate to the 6 position of GlcNAc/GlcNS. Finally, 3-*O*-sulfotransferase (HS3ST) transfers sulfate to the 3 position of GlcNS.

immune rejection. Induced pluripotent stem (iPS) cells are ES-like pluripotent stem cells induced from somatic cells that solved problems associated with using human embryos (14, 15). Clarifying the mechanisms of ES cell differentiation can accelerate clinical application of ES and iPS cells as well as provides basic knowledge regarding the early developmental process.

Leukemia inhibitory factor (LIF) (16, 17), a known extrinsic factor, plays an important role in maintaining self-renewal of

幹 (iPS) 細胞は、体細胞から誘導された、ES細胞に類似した多能性幹細胞で、この細胞の発見により、これらの問題の一部を解決した(14, 15)。ES細胞の分化機構を明らかにすることは、初期発生に関する基礎知識を提供するだけでなく、ES細胞とiPS細胞を用いた臨床応用の早期実現につながる。

外因性因子として知られる白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor: LIF) (16, 17) は、signal transduction and activation of transcription 3 (STAT3) の活性化を介してマウスES細胞

mouse ES cells *via* signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3) activation (18). Another extrinsic factor, BMP4, acts in synergy with LIF to maintain self-renewal by modulating the Smad-mediated induction of the *inhibitor of differentiation (Id)* gene (19). Canonical Wnt signaling *via* β -catenin also plays a role in the regulation of self-renewal through Nanog expression, which is a key transcription factor involving the pluripotent core circuit (20–22). On the other hand, Lyashenko *et al.* reported that self-renewal of β -catenin-deficient mouse ES cells is maintained, indicating that β -catenin is not required for self-renewal (23). Ying *et al.* demonstrated that maintenance of the ground state of mouse ES cells requires inhibition of GSK3 β , which is a downstream factor of Wnt signaling that degrades β -catenin and down-regulates Wnt signaling (24). In other words, this report suggested that the promotion of Wnt signaling is fundamental to sustain pluripotency of mouse ES cells. However, there is room for debate regarding the function of Wnt signaling in mouse ES cells.

In the differentiation of mouse ES cells, both BMP and Wnt signaling have important functions (25). BMP/Smad signaling is essential for determining if cells will be ectodermal or mesodermal (25, 26). When BMP/Smad signaling is activated in mouse ES cells, ectodermal differentiation is inhibited and mesodermal differentiation is accelerated. Wnt/ β -catenin signaling promotes mesodermal differentiation in mouse ES cells (27, 28). FGF4 is produced in an autocrine fashion in mouse ES cells, and FGF4/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling contributes to the differentiation of mouse ES cells into neural and mesodermal lineages (29). Moreover, ERK activation is inhibited by BMP signaling *via* dual specificity phosphatase-9 (DUSP9), which dephosphorylates ERK (30).

C. The Carbohydrate Chain on the ES Cell Surface

ES cells express various carbohydrate antigens as undifferentiated markers on the cell surface and include antigens such as stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1), SSEA-3, SSEA-4, SSEA-5, GloboH, TRA-1-60 antigen, and TRA-1-81 antigen (31–35). Previous data suggest that the HS sulfation pattern changes during differentiation of mouse ES cells (7, 36), which suggests that the expression of GAG, including its sulfation pattern, can be a marker reflecting the state of pluripotent stem cells. However, most functions of these carbohydrate structures have not been clarified yet.

D. The Function of the HS Chain in Mouse ES Cells

The control of sulfated HS structures is considered essential for spatiotemporal regulation of cellular differentiation and growth throughout development. Indeed, in *EXT1* or *EXT2*-deficient mice,

胞の自己複製能の維持に重要な役割を果たす(18)。他の外因性因子として知られる骨形成タンパク質-4 (BMP4) は、LIFと協調的に働き、Smadを介した *inhibitor of differentiation (Id)* 遺伝子の発現の誘導を調整することで、マウスES細胞の自己複製能を維持している(19)。

β -cateninを介する古典的なWntシグナルは、多能性を制御する転写因子群（コアサーキット）の主要な転写因子であるNanogの発現を通じてマウスES細胞の自己複製能の制御を果たしている(20–22)。一方、Lyashenkoらは、 β -cateninを欠損させたマウスES細胞の自己複製能が維持されていることを報告した。これは、 β -cateninが自己複製能の維持に必須でないことを示していた(23)。また、Yingらは、マウスES細胞の基底状態の維持に、Wntシグナルの下流の因子であるGSK3 β (GSK3 β は、 β -cateninを分解してWntシグナルを抑制する)の阻害が必要であることを報告した(24)。つまり、Wntシグナルの促進が、マウスES細胞の多能性の維持に必要であることを示した。このように、WntシグナルのマウスES細胞の自己複製能への関与はいまだ議論の余地があり、統一的な見解が得られていないのが現状である。

さらに、BMPとWntシグナルはマウスES細胞の分化においても重要な役割を担っている(25)。BMP/Smadシグナルは、中胚葉または外胚葉への細胞運命決定に必須である(25, 26)。BMP/Smadシグナルが活性化しているとき、外胚葉分化は抑制され、中胚葉分化は促進される。Wnt/ β -cateninシグナルは、マウスES細胞の中胚葉分化を促進する(27, 28)。マウスES細胞においてFGF4は自己分泌され、FGF4/extracellular signal-regulated kinase (ERK) シグナルは、神経、中胚葉系列への分化を促進する(29)。ERKの活性化（リン酸化）は、ERKの脱リン酸化酵素であるdual specificity phosphatase-9 (DUSP9)を介したBMP/Smad/DUSP9シグナルにより阻害される(30)。

C. ES細胞表面の糖鎖

ES細胞は、ステージ特異的胚抗原-1 (stage-specific embryonic antigen-1: SSEA-1)、SSEA-3、SSEA-4、SSEA-5、GloboH、TRA-1-60抗原、TRA-1-81抗原など、未分化状態で特徴的なさまざまな細胞表面糖鎖抗原を発現している(31–35)。以前、われわれと他のグループは、マウスES細胞の分化に伴い、ヘパラン硫酸の硫酸化パターンが変化することを示した(7, 36)。これは、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸などのグリコサミノグリカンの発現、およびそれらの硫酸化パターンが多能性幹細胞の状態を反映するマーカーとなりうることを意味している。しかし、これら糖鎖構造のマウスES細胞、さらにヒト多能性幹細胞であるヒトES/iPS細胞における機能はほとんど明らかになっていない。

D. マウスES細胞におけるヘパラン硫酸鎖の機能

ヘパラン硫酸の硫酸化構造のコントロールは、発生過程における細胞の分化と増殖の時空間的な制御に必要不可欠であると考えられている。実際、*EXT1*、*EXT2*欠損マウス、つ

namely mice lacking HS chains, the embryo fails to reach gastrulation and dies (37). Thus, from the loss of function study, it was revealed that HS is essential for early development. For addressing HS function in early development, studies used and analyzed genetically modified mouse ES cells. HS and its related genes are expressed in undifferentiated mouse ES cells and change during differentiation into extraendoderm and three germ layers, including Sox1-positive ectoderm and Flk-positive mesoderm (36, 38, 39).

For function analysis of HS, we performed *EXT1* transient knockdown in mouse ES cells. *EXT1*-knockdown ES cells have short HS chains and reduce Wnt signaling and undifferentiation. We also found that HS, but not CS, is required for self-renewal of mouse ES cells through Wnt signaling (22). FGF4 and BMP4 signaling did not change in this study. Moreover, HS degradation by heparitinase caused reduction of FGF, BMP4, and Wnt signaling in mouse ES cells. These results indicate that HS chains help facilitate signal transduction as a co-receptor and maintain self-renewal. On the other hand, other groups reported that *EXT1*-deficient ES cells, which have no HS chains, could not differentiate (36, 40–42). In the *EXT1*-deficient ES cells, inhibition of *Nanog* expression via FGF4 signaling was eliminated because FGF4 signaling, the differentiation trigger, could not work with deficient HS chains. These results indicate that HS chains are also necessary for the initiation of differentiation, and these reports suggest that HS has pleiotropic functions depending on the length of the chain.

E. The Function of Sulfation of HS in Mouse ES Cells

The nucleotide sulfate, namely 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), is a substrate for the sulfation of glycans or proteins and is synthesized in the cytoplasm by PAPS synthase (Fig. 1). PAPS transporter (PAPST), localized in the Golgi membrane, transports PAPS into the Golgi apparatus. Numerous sulfotransferases transfer sulfate from transported PAPS to the appropriate positions on proteins or glycans, such as GAG. To analyze the function of sulfation, we performed *PAPST1,2*-knockdown in mouse ES cells (43). *PAPST1,2*-knockdown, which reduces the level of sulfation of all sulfated lipids, proteins, and glycans, including HS, causes the inhibition of FGF2, FGF4, BMP4, and Wnt signaling, and promotes neural differentiation. Chemical inhibition of sulfation by chlorate treatment accelerates neural differentiation of mouse ES cells (44). Furthermore, *NDST1,2*-knockdown, which only reduces the sulfation of HS, also causes suppression of FGF2, FGF4, BMP4, and Wnt signaling and decreased self-renewal. These data indicate that the sulfation of proteins or glycans, especially HS, is essential to regulate signaling and maintain self-renewal of mouse ES cells.

Previous studies used *NDST1,2*-knockout ES cells to eluci-

よりヘパラン硫酸が合成されないマウスは、原腸陥入不全を起こし、胎生致死の表現型を示す(37)。この機能欠損の研究から、ヘパラン硫酸は初期発生に重要な役割を担っていることが明らかになった。初期発生におけるヘパラン硫酸の働きを知るために、われわれや他のグループは、遺伝子改変マウスES細胞を使用し解析した。ヘパラン硫酸やヘパラン硫酸関連遺伝子は未分化性を維持したマウスES細胞で発現しており、それらの発現は、胚体外内胚葉や、Sox1陽性外胚葉、Flk陽性中胚葉を含む三胚葉への分化に伴い変化する(36, 38, 39)。

ヘパラン硫酸の機能解析のために、われわれは、マウスES細胞の*EXT1*を一過的にノックダウンした。*EXT1*ノックダウンES細胞では、ヘパラン硫酸鎖が短くなり、Wntシグナルおよび未分化性が低下していたことから、ヘパラン硫酸(コンドロイチン硫酸ではなく)がWntシグナルを介してマウスES細胞の自己複製能の維持に必要であることが明らかになった(22)。このノックダウン細胞において、FGF4、BMP4シグナルは変化していなかった。さらに、ヘパリンナーゼによりマウスES細胞表面上のヘパラン硫酸を分解すると、Wntシグナルだけでなく、FGF、BMPシグナルの低下を引き起こした。この知見は、ヘパラン硫酸が共受容体としてシグナル伝達を補佐し、マウスES細胞の自己複製能を維持していることを示している。一方、他の研究グループは、*EXT1*欠損ES細胞、つまりヘパラン硫酸が全く発現していないES細胞は分化することができないことを報告した(36, 40–42)。*EXT1*欠損ES細胞において、分化の引き金であるFGF4シグナルがヘパラン硫酸の欠損により機能せず、FGF4シグナルを介した*Nanog*の発現抑制が解除されていたことから、ヘパラン硫酸は分化の開始に必要なことが分かった。これらの報告は、ヘパラン硫酸が鎖長に依存した多面的な機能を有していることを示唆している。

E. マウスES細胞におけるヘパラン硫酸の硫酸化修飾の機能

3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸(PAPS)は、糖鎖やタンパク質の硫酸化修飾の基質であり、PAPS合成酵素により細胞質で合成される(図1)。ゴルジ体の膜に存在するPAPS輸送体(PAPST)は、PAPSをゴルジ体内腔へと輸送する。さまざまな硫酸転移酵素は、ゴルジ体内腔へと運ばれたPAPSから硫酸基をタンパク質やグリコサミノグリカンなどの糖鎖の適切な位置へと転移する。われわれは、硫酸化の機能を解析するために、*PAPST1,2*のノックダウンを行った(43)。*PAPST1,2*のノックダウンは、硫酸化脂質、硫酸化タンパク質、硫酸化糖鎖など、ヘパラン硫酸を含むすべての硫酸化のレベルを低下させ、それに伴いFGF2,4、BMP4、Wntシグナルが低下し、神経分化を促進させた。塩素酸塩を用いた硫酸化の化学的抑制もまた、マウスES細胞の神経系への分化を促進した(44)。さらに、*NDST1,2*のノックダウンは、ヘパラン硫酸の硫酸化のみを低下させ、FGF2,4、BMP4、Wntシグナルを*PAPST1,2*のノックダウンと同様に抑制し、自己複製能を低下させた。これらの知見は、タンパク質や糖鎖の硫酸化、特にヘパラン硫酸の硫酸化がシグナルの制御とマウスES細胞の自己複製の維持に必須であることを示している。

他のグループは、ヘパラン硫酸の硫酸化の機能の探索の

date the function of HS sulfation (45, 46). *NDST1,2*-null mouse ES cells have HS with almost no sulfation, but possess HS that has a small amount of 6-*O*-sulfation (47). Depletion of *NDST1,2* prohibited differentiation, including neural lineage differentiation, in mouse ES cells by inhibition of FGF4 signaling. These studies demonstrate that sulfation of HS regulates self-renewal and differentiation of mouse ES cells.

F. The Function of Sulfation Pattern of HS in Mouse ES Cells

Sulfation pattern in HS is formed by several sulfotransferases and changes during differentiation of mouse ES cells (36). This finding was achieved by phage display antibodies that recognize specific sulfation structures of HS (36, 48). However, the function of sulfation pattern of HS during differentiation of mouse ES cells is still unclear. We assume that the alterations of sulfation pattern of HS may regulate several signaling pathways and differentiation.

To identify the sulfation pattern of HS involved in the differentiation of mouse ES cells, we screened sulfotransferases by their overexpression and found that overexpression of *HS3ST*, an enzyme facilitating 3-*O*-sulfation in HS, reduced self-renewal and promoted differentiation of mouse ES cells (7). The function of 3-*O*-sulfation of HS is largely unknown because large quantities of HS are required for structural analyses, and technology to quantitate 3-*O*-sulfation have not yet been developed. We used the HS4C3 antibody, a phage display antibody recognizing 3-*O*-sulfation of HS, for analysis, and revealed that 3-*O*-sulfation is required for differentiation into primitive endoderm, primitive ectoderm including epiblast stem cells, and subsequently the three germ layers (7, 8). Furthermore, 3-*O*-sulfation of HS associates with Fas, which is a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor family, and translocates intracellular Fas into lipid rafts on the mouse ES cell surface. Then, Fas/caspase-8/caspase-3 signaling is activated by the accumulation of Fas in rafts and subsequently induces the degradation of the Nanog protein, which is a key transcription factor for maintaining self-renewal and pluripotency of ES cells by activated caspase-3 (7, 49). Thus, we showed that 3-*O*-sulfation of HS is a novel regulator of mouse ES cell differentiation.

G. Prospective

To date, many studies have demonstrated that HS and its sulfation pattern regulate several signaling pathways to maintain self-renewal and pluripotency of mouse ES cells (Fig. 4). One of the remaining important issues is understanding the role of HS in human pluripotent stem cells, such as human ES and iPS cells. Mouse ES cells are defined as “naïve” pluripotent stem cells because of

ために *NDST1,2* ノックアウト ES 細胞を用いて研究を行った (45, 46). *NDST1,2* 欠損 ES 細胞では、硫酸化修飾を受けていないヘパラン硫酸がほとんどであるが、低い割合で GlcNAc の 6 位の硫酸化が起きている (47)。マウス ES 細胞における *NDST1,2* の欠損は、FGF4 シグナルの抑制を介して神経系への分化を阻害した (45, 46)。これらの報告は、ヘパラン硫酸の硫酸化はマウス ES 細胞の自己複製と分化の両者を制御していることを示している。

F. マウス ES 細胞におけるヘパラン硫酸の硫酸化パターンの機能

ヘパラン硫酸の硫酸化はいくつもの硫酸転移酵素によってなされ、その硫酸化パターンはマウス ES 細胞の分化過程において変化する (36)。ヘパラン硫酸の硫酸化パターンの解析は、ヘパラン硫酸の特異的な硫酸化構造を認識するファージディスプレイ抗体を用いて行われた (36, 48)。しかし、マウス ES 細胞の分化時における、それぞれのヘパラン硫酸の硫酸化パターンの機能と意義はいまだに明らかになっていない。そこで、われわれは、ヘパラン硫酸の硫酸化パターンの変化は、シグナルや分化を制御しているという想定をした。マウス ES 細胞の分化に関与する硫酸化パターンを特定するため、各硫酸転移酵素を過剰発現しスクリーニングを行った。その結果、ヘパラン硫酸の 3 位に硫酸基を転移する *HS3ST* を過剰発現させると、マウス ES 細胞の自己複製が抑制され、分化が促進することを見いだした (7)。ヘパラン硫酸の 3 位の硫酸化 (3-*O* 硫酸化構造) の定量には、大量のヘパラン硫酸が必要であり、その定量法はまだ確立・発展していないため、3-*O* 硫酸化構造の機能はほとんど知られていない。われわれは、*HS4C3* 抗体 (3-*O* 硫酸化構造を特異的に認識するファージディスプレイ抗体) を用いて 3-*O* 硫酸化構造の機能解析を行い、3-*O* 硫酸化構造が原始内胚葉、原始外胚葉 (エピ幹細胞の状態を含む) とそれに引き続く内・中・外胚葉への分化に必要であることを明らかにした (7, 8)。さらに、3-*O* 硫酸化構造が Fas (腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) 受容体ファミリーの一つ) と結合し、細胞内部の Fas を脂質ラフトへと移動させることを見いだした。Fas が脂質ラフトへ蓄積することで、Fas/caspase-8/caspase-3 シグナルが活性化し、それに引き続き、活性型 caspase-3 による Nanog タンパク質の分解が誘導される (7, 49)。このようにわれわれは、3-*O* 硫酸化構造が、マウス ES 細胞の分化を制御する新たな因子であることを示した。

G. 展望

これまでに、ヘパラン硫酸がマウス ES 細胞の多能性と自己複製能の維持に働くシグナルを制御していることを、多くの研究が証明をしている (図 4)。しかし、いまだ残っている重要な課題の一つに、ヒト ES 細胞や iPS 細胞などのヒト多能性幹細胞におけるヘパラン硫酸の機構の理解がある。マウス ES 細胞は、着床前エピブラストと機能的に類似して

Fig. 4. The function of heparan sulfate in mouse embryonic stem cells. For maintenance of self-renewal in mouse ES cells, heparan sulfate (HS) with a long sulfated chain helps transduction of Wnt and BMP signaling as a co-receptor. LIF signaling independently works on HS. When mouse embryonic stem (ES) cells differentiate, *N*-sulfation of HS is required for FGF4 signal transduction. Fas signaling facilitates rapid differentiation by degradation of the Nanog protein after FGF4 signaling.

their functional similarity to pre-implantation epiblasts (50). On the other hand, mouse epiblast stem cells are distinguished from mouse ES cells by differences in the developmental stage; namely, that they are derived from post-implantation blastocysts. The pluripotent state of epiblast stem cells has been described as “primed” based on their post-implantation epiblast-like transcriptional and epigenetic properties (50–52). Human pluripotent stem cells, ES cells, and iPS cells share defining features with mouse epiblast stem cells in the primed state rather than mouse ES cells in the naïve state. Therefore, human ES/iPS cells are believed to be primed pluripotent stem cells (50–52).

Recently, we reported that Fas signaling *via* 3-*O*-sulfation of HS is also required for the transition from naïve to primed state (8). Furthermore, we demonstrated that chemical inhibition of sulfation by chlorate accelerates neural differentiation of human iPS cells (44). These findings indicate the possibility that sulfation of GAGs, including HS, regulates self-renewal and pluripotency in humans through several signaling pathways. Other important factors of GAGs are core proteins, such as syndecans, glypicans, and agrin. Annalisa *et al.* reported that glypican-4, an HS proteoglycan, regulates Wnt signaling and pluripotency in mouse ES cells (53). We expect that the physiological roles of HS in pluripotent stem cells will be further elucidated in future studies.

いることから“ナイーブ”状態の多能性幹細胞と定義される(50)。一方、着床後のエピブラストから樹立されたマウスエピ幹細胞は、マウスES細胞とは異なる発生ステージの多能性幹細胞であり、着床後エピブラストと類似した遺伝子発現やエピジェネティクスのパターンを持つことから“プライム”状態の多能性幹細胞と定義されている(50–52)。ヒトES/iPS細胞は、ナイーブ状態のマウスES細胞ではなく、プライム状態のエピ幹細胞の特徴を共有する。したがって、ヒトES/iPS細胞はプライム状態の多能性幹細胞であると考えられている(50–52)。

2013年にわれわれは、ヘパラン硫酸の3-*O*硫酸化構造を介したFasシグナルがナイーブ状態からプライム状態への移行に必要であることを報告した(8)。さらに、過塩素酸による硫酸化の化学的抑制が、ヒトiPS細胞の神経分化を促進することも証明した(44)。これらの知見は、ヘパラン硫酸などのGAGの硫酸化が、さまざまなシグナルを通してヒト多能性幹細胞の自己複製・多能性を制御している可能性を示している。硫酸化以外のGAGの重要な因子に、コアタンパク質(syndecan, glypican, agrinなど)がある。Annalisaらは、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一つであるglypican-4がマウスES細胞においてWntシグナルと多能性を制御しているという知見を報告した(53)。今後、さらに多能性幹細胞におけるヘパラン硫酸の生理的意義の解明が進むことが期待される。

References

1. Lin, X. (2004) *Development* **131**, 6009–6021.
2. Esko, J. D., and Selleck, S. B. (2002) *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 435–471.
3. Koike, T., Izumikawa, T., Sato, B., and Kitagawa, H. (2014) *J. Biol. Chem.*, in press.
4. Esko, J. D., and Lindahl, U. (2001) *J. Clin. Invest.* **108**, 169–173.
5. Mochizuki, H., Yoshida, K., Shibata, Y., and Kimata, K. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 31237–31245.

6. Thacker, B. E., Xu, D., Lawrence, R., and Esko, J. D. (2013) *Matrix Biol.*, in press.
7. Hirano, K., Sasaki, N., Ichimiya, T., Miura, T., Van Kuppevelt, T. H., and Nishihara, S. (2012) *PLoS ONE* **7**, e43440.
8. Hirano, K., Van Kuppevelt, T. H., and Nishihara, S. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 1175–1181.
9. Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) *Nature* **292**, 154–156.
10. Martin, G. R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 7634–7638.
11. Suda, Y., Suzuki, M., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1987) *J. Cell. Physiol.* **133**, 197–201.
12. Beddington, R. S., and Robertson, E. J. (1989) *Development* **105**, 733–737.
13. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., and Robertson, E. (1984) *Nature* **309**, 255–256.
14. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) *Cell* **126**, 663–676.
15. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) *Cell* **131**, 861–872.
16. Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988) *Nature* **336**, 688–690.
17. Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. (1988) *Nature* **336**, 684–687.
18. Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2048–2060.
19. Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003) *Cell* **115**, 281–292.
20. Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A. H. (2004) *Nat. Med.* **10**, 55–63.
21. Miyabayashi, T., Teo, J. L., Yamamoto, M., McMillan, M., Nguyen, C., and Kahn, M. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 5668–5673.
22. Sasaki, N., Okishio, K., Ui-Tei, K., Saigo, K., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Nishimura, T., Suda, Y., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Hitoshi, S., Ikenaka, K., and Nishihara, S. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 3594–3606.
23. Lyashenko, N., Winter, M., Migliorini, D., Biechele, T., Moon, R. T., and Hartmann, C. (2011) *Nat. Cell Biol.* **13**, 753–761.
24. Ying, Q. L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008) *Nature* **453**, 519–523.
25. Loebel, D. A., Watson, C. M., De Young, R. A., and Tam, P. P. (2003) *Dev. Biol.* **264**, 1–14.
26. Finley, M. F., Devata, S., and Huettner, J. E. (1999) *J. Neurobiol.* **40**, 271–287.
27. Bakre, M. M., Hoi, A., Mong, J. C., Koh, Y. Y., Wong, K. Y., and Stanton, L. W. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 31703–31712.
28. Lindsley, R. C., Gill, J. G., Kyba, M., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (2006) *Development* **133**, 3787–3796.
29. Kunath, T., Saba-El-Leil, M. K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007) *Development* **134**, 2895–2902.
30. Li, Z., Fei, T., Zhang, J., Zhu, G., Wang, L., Lu, D., Chi, X., Teng, Y., Hou, N., Yang, X., Zhang, H., Han, J. D., and Chen, Y. G. (2012) *Cell Stem Cell* **10**, 171–182.
31. Tang, C., Lee, A. S., Volkmer, J. P., Sahoo, D., Nag, D., Mosley, A. R., Inlay, M. A., Ardehali, R., Chavez, S. L., Pera, R. R., Behr, B., Wu, J. C., Weissman, I. L., and Drukker, M. (2011) *Nat. Biotechnol.* **29**, 829–834.
32. Liang, Y. J., Kuo, H. H., Lin, C. H., Chen, Y. Y., Yang, B. C., Cheng, Y. Y., Yu, A. L., Khoo, K. H., and Yu, J. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 22564–22569.
33. Atwood, J. A. 3rd, Cheng, L., Alvarez-Manilla, G., Warren, N. L., York, W. S., and Orlando, R. (2008) *J. Proteome Res.* **7**, 367–374.
34. Muramatsu, T., and Muramatsu, H. (2004) *Glycoconj. J.* **21**, 41–45.
35. International Stem Cell Initiative, Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P. A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K. G., Choo, A. B., Churchill, G. A., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J. S., Dvorak, P., Emanuelsson, K., Fleck, R. A., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, P. J., Hamilton, R. S., Hampl, A., Healy, L. E., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, M. P., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, J. L., Jones, M., Kee, K., King, B. L., Knowles, B. B., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, B. S., Manning, D., Mayshar, Y., McKay, R. D., Michalska, A. E., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, S. L., Moore, H. D., Mummery, C. L., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, C. M., Oh, S. K., Olsson, C., Otonkoski, T., Park, K. Y., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, M. F., Piekarczyk, M. S., Pera, R. A., Reubinoff, B. E., Robins, A. J., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, T. C., Semb, H., Sherrer, E. S., Siemen, H., Stacey, G. N., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, T., Tuuri, T., van den Brink, S., Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, T. A., Young, L. A., and Zhang, W. (2007) *Nat. Biotechnol.* **25**, 803–816.
36. Johnson, C. E., Crawford, B. E., Stavridis, M., Ten Dam, G., Wat, A. L., Rushton, G., Ward, C. M., Wilson, V., van Kuppevelt, T. H., Esko, J. D., Smith, A., Gallagher, J. T., and Merry, C. L. (2007) *Stem Cells* **25**, 1913–1923.
37. Lin, X., Wei, G., Shi, Z., Dryer, L., Esko, J. D., Wells, D. E., and Matzuk, M. M. (2000) *Dev. Biol.* **224**, 299–311.
38. Baldwin, R. J., ten Dam, G. B., van Kuppevelt, T. H., Lacaud, G., Gallagher, J. T., Kouskoff, V., and Merry, C. L. (2008) *Stem Cells* **26**, 3108–3118.
39. Nairn, A. V., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Xie, J., Harris, K., Dalton, S., Kulik, M., Pierce, J. M., Toida, T., Moremen, K. W., and Linhardt, R. J. (2007) *J. Proteome Res.* **6**, 4374–4387.
40. Holley, R. J., Pickford, C. E., Rushton, G., Lacaud, G., Gallagher, J. T., Kouskoff, V., and Merry, C. L. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 6241–6252.
41. Kraushaar, D. C., Yamaguchi, Y., and Wang, L. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 5907–5916.
42. Kraushaar, D. C., Rai, S., Condac, E., Nairn, A., Zhang, S., Yamaguchi, Y., Moremen, K., Dalton, S., and Wang, L. (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 22691–22700.
43. Sasaki, N., Hirano, T., Ichimiya, T., Wakao, M., Hirano, K., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Suda, Y., and Nishihara, S. (2009) *PLoS ONE* **4**, e8262.
44. Sasaki, N., Hirano, T., Kobayashi, K., Toyoda, M., Miyakawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Akutsu, H., Umezawa, A., and Nishihara, S. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **401**, 480–486.
45. Lanner, F., Lee, K. L., Sohl, M., Holmborn, K., Yang, H., Wilbertz, J., Poellinger, L., Rossant, J., and Farnebo, F. (2010) *Stem Cells* **28**, 191–200.
46. Forsberg, M., Holmborn, K., Kundu, S., Dagälv, A., Kjellén, L., and Forsberg-Nilsson, K. (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 10853–10862.
47. Holmborn, K., Ledin, J., Smeds, E., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., and Kjellén, L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 42355–42358.
48. Lensen, J. F., Rops, A. L., Wijnhoven, T. J., Hafmans, T., Feitz, W. F., Oosterwijk, E., Banas, B., Bindels, R. J., van den Heuvel, L. P., van der Vlag, J., Berden, J. H., and van Kuppevelt, T. H. (2005) *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1279–1288.

49. Fujita, J., Crane, A. M., Souza, M. K., Dejosez, M., Kyba, M., Flavell, R. A., Thomson, J. A., and Zwaka, T. P. (2008) *Cell Stem Cell* **2**, 595–601.
50. Nichols, J., and Smith, A. (2009) *Cell Stem Cell* **4**, 487–492.
51. Brons, I. G., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A., and Vallier, L. (2007) *Nature* **448**, 191–195.
52. Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., Gardner, R. L., and McKay, R. D. (2007) *Nature* **448**, 196–199.
53. Fico, A., De Chevigny, A., Egea, J., Bösl, M. R., Cremer, H., Maina, F., and Dono, R. (2012) *Stem Cells* **30**, 1863–1874.

Profile of the Authors

Kazumi Hirano received his Ph.D. in 2013 at the Department of Bioinformatics, Faculty of Engineering, University of Soka (adviser: Prof. Shoko Nishihara). He is currently an assistant professor at the Department of Bioinformatics, Faculty of Engineering, University of Soka (2013–). His research interests are in functions of glycans in pluripotent stem cells.

Shoko Nishihara received her Ph.D. in 1982 from Dept. of Chemistry, School of Science, the University of Tokyo (Prof. Yoji Arata). She continued her research as a research associate at Dept. of Microbiology, the Jikei University School of Medicine. Then she worked on *Drosophila* oocyte maturation as a postdoctoral fellow at Dept. of Biochemistry, University of North Carolina (Prof. Laura Kalfayan) and continued her *Drosophila* work as a postdoctoral fellow at Dept. of Molecular Biology, Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences. In 1991 she moved as an assistant professor to Institute of Life Science, Soka University (Prof. Hisashi Narimatsu) and was introduced to the field of glycobiology. In this period she contributed to the molecular cloning and characterization of the fucosyltransferase gene family. In 2001 she moved to her current position, Professor, at Dept. of Bioinformatics, Soka University. Research projects within her group are focused on (1) analysis of glycan functions in ES/iPS cells (2), analysis of conserved glycan functions using *Drosophila*, and (3) functional analysis of sugar-nucleotide transporter families including PAPS transporters.