A Natural Ligand for L-Selectin Is Heparan Sulfate with a Specific Structure

L-セレクトインの天然リガンドの一つは特異的構造をもったヘパラン硫酸である

Norgard-Sumnicht, K. and Varki, A. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 12012–12024

Key Words: *heparan sulfate, heparin, L-selectin, ligand*

The selectins (L-, P-, and E-selectin) are a family of calcium-dependent mammalian lectins that initiate interactions between blood cells and endothelial cells. P- and E-selectins are inducible receptors on endothelium that recognize certain sialylated, fucosylated ligands such as sialyl-Lewis^x (SLe^x) and sialyl-Lewis^a on leukocytes. They participate in the trafficking of these cells to areas of inflammation and injury. In contrast, L-selectin is expressed on leukocytes and recognizes specific carbohydrate ligands on endothelial cells. L-selectin mediates the “homing” of lymphocytes by binding to sialylated, sulfated oligosaccharides on the high endothelial venules (HEVs) of lymph nodes. It has been shown that oligosaccharides generate high affinity ligands for L-selectin by forming unique “clustered saccharide patches” on heavily glycosylated molecules such as mucins. L-selectin is also expressed on neutrophils and monocytes and participates in the emigration of these cells through the endothelium of nonlymphoid tissues. However, no corresponding ligand had been characterized in any endothelial cells from nonlymphoid tissues. The authors introduced here previously demonstrated that natural ligands for L-selectin on nonlymphoid endothelial cells are heparan sulfate proteoglycan (HS-PG) [Norgard-Sumnicht, K.E. *et al.* (1993) *Science*, **261**, 480–483]. In the paper introduced here, they reported that unusual structures present on HS chains, which have glucosamine residues with unsubstituted amino groups, might account for their specific affinity for L-selectin.

It is known that HS can contain many distinct types of highly sulfated domains, generated by different patterns of sulfation and epimerization, and interacts with numerous molecules, including selectins, growth factors, enzymes, and extracellular matrix proteins etc., through the highly sulfated domains. The pentasaccharide sequence responsible for the high affinity binding of heparin to antithrombin III is a specific sequence which includes a unique 3-*O*-sulfate group. HS which binds to bFGF contains repeating IdoA(2-*O*-S)-GlcNS disaccharide sequences with few 6-*O*-sulfate groups and it appears that both the 2-*O*- and *N*-sulfate groups are essential for the binding activity. In contrast, a high content of the 6-*O*-sulfate groups is required for its specific interaction with aFGF and FGF-4 [Ishihara, M. (1994) *Glycobiology*, **4**, 817–824].

Furthermore, the binding of HS to hepatocyte growth factor seems to involve unique domains with predominantly

セレクトイン(L-, P-, E-セレクトイン)はカルシウム依存性の動物レクチン群の仲間で、白血球細胞と内皮細胞の相互作用を引き起こす。P-とE-セレクトインは活性化した内皮細胞上に発現し、白血球上のシアリルルイス^x(SLe^x)やシアリルルイス^aのようなシアル酸やフコースを含んだ糖鎖をリガンドとして認識する。この相互作用は傷害を受けた炎症サイトへの白血球の誘導に関与している。これに対し、L-セレクトインは白血球上に発現し、内皮細胞の特異的糖鎖リガンドと相互作用をする。たとえば、L-セレクトインをもったリンパ球はリンパ節の高内皮細静脈(HEV)上のシアル酸や硫酸基を含んだオリゴ糖との結合により、リンパ節にホーミングする。L-セレクトインと高い親和性をもつリガンドはムチン様分子上にこれらのオリゴ糖鎖が多数結合して生じる糖鎖のクラスターパッチが形成されている必要がある。L-セレクトインは好中球や単球上にも発現されており、リンパ組織以外の血管内皮へのこれらの血球の誘導にも関与している。しかしながら、リンパ組織以外の内皮細胞からはL-セレクトインのリガンドは同定されていなかった。ここで紹介した著者たちは、以前リンパ組織以外の内皮細胞上のL-セレクトインのリガンドはヘパラン硫酸プロテオグリカン(HS-PG)であることを示した[Norgard-Sumnicht, K.E. *et al.* (1993) *Science*, **261**, 480–483]。ここで紹介する論文では、彼らはL-セレクトインとの結合性はHSの中の非置換アミノ基をもつグルコサミン残基を含んだ特異的な構造によると報告している。

HSは硫酸化やエピマー化度の異なる様々な高硫酸化ドメインを含んでいることが知られており、セレクトイン、増殖因子、酵素類、細胞外基質タンパク質など多くの分子がこの硫酸化ドメインを介して相互作用をしている。例えば、アンチトロニンIIIと強く結合する五糖鎖構造は3-*O*-硫酸基を含む特異的な糖鎖配列をもつ。bFGFと結合するHSは繰り返しのIdoA(2-*O*-S)-GlcNS配列を含んでいて、2-*O*-と*N*-硫酸基の両方が必須であり、6-*O*-硫酸基は少ない。これに対して、aFGFやFGF-4との特異的相互作用には6-*O*-硫酸基が必要である[Ishihara, M. (1994) *Glycobiology*, **4**, 817–824]。

さらに肝細胞増殖因子との結合には硫酸基をもたないイズ

non-sulfated iduronates, and the highest affinity seems to be most closely associated with 6-*O*-sulfate groups. Thus, the presence of various *O*-sulfate groups in addition to *N*-sulfate groups in the highly sulfated domains of HS can provide specific affinity to each protein.

Current understanding of the biosynthesis of heparin/HS indicates that all amino groups of glucosamine residues must be either *N*-sulfated or *N*-acetylated. However, the authors demonstrated the presence of some unsubstituted amino groups in HS from both bovine and human endothelial cells, but not from CHO cells by reactivities with nitrous acid and with sulfo-*N*-hydroxysuccinimide-biotin. The novel structures with unsubstituted amino groups were enriched in HS chains which bound to L-selectin in a calcium-dependent manner. It is very interesting that commercial heparin contains far fewer structures that can bind with high affinity to L-selectin than HS from endothelial cells. Heparin generally contains much higher sulfate groups and iduronate residues than HS, but few unsubstituted amino groups. It appears likely that endothelial HS carries specific sequences with unsubstituted amino group mediating L-selectin recognition that are not found in heparin. The authors did not show any carbohydrate sequences and domain structures including patterns of sulfation, and epimerization. However, the paper added an important aspect that unsubstituted amino groups may be more common than previously recognized and represent another way in which heparin/HS can mediate specific biological functions.

Fragments from commercial heparin as small as tetrasaccharides could block L- and P-selectin binding to SLe^x-bovin serum albumin, at concentrations far lower than those required for SLe^x itself [Nelson, R.M. *et al.* (1993) *Blood*, **82**, 3253–3258]. Thus, heparin/HS with the specific structure may be another type of high affinity natural ligand for the selectins. Future studies will, no doubt, focus on investigations of domain structure including the unsubstituted amino groups in heparin/HS involved in the binding of selectins and on regulations for formation of the unique domain structures of HS. From a pharmaceutical perspective, these heparin-like molecules might potentially be more useful than the sialylated, fucosylated polylactosamines with regard to use as therapeutic blockers for selectins.

Reported by Ishihara, M.

Seikagaku Corporation
Tokyo Research Institute
Higashiyamato-shi, Tokyo, 207
Japan

ロン酸を多く含むドメインが関与し、この結合性は6-*O*-硫酸基の含量と深く関連している。このように、HSの高硫酸化ドメインにおけるN-硫酸基と様々なO-硫酸基の存在がそれぞれのタンパク質との特異的結合性を与えている。

現在ヘパリン/HSの生合成の過程で、グルコサミン残基のすべてがN-硫酸化あるいはN-アセチル化されていると理解されている。しかし、この著者たちはウシやヒトの内皮細胞から調製したHSは非置換アミノ基が存在することを亜硝酸分解やソルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド-ビオチン法を用いて証明した。この非置換アミノ基はCHO細胞がつくるHSには見いだされなかった。そして、L-セレクトインとカルシウム依存的に結合するHS糖鎖の中にこの特異的構造が豊富に含まれていた。おもしろいことに、市販のヘパリンは内皮細胞からのHSに比べ、L-セレクトインと強く結合する糖鎖がはるかに少ない。ヘパリンは一般的にHSよりも硫酸化度やイズロン酸含量がはるかに高いが、非置換アミノ基はほとんど含んでいない。このように、内皮細胞由来HSはL-セレクトインと相互作用する非置換アミノ基を含んだ特異的糖鎖配列をもっている。この著者たちは、L-セレクトインとの相互作用に関する硫酸化やエピマー化を含んだ糖鎖配列やドメイン構造については何も示していない。しかしこの論文は、HSの非置換アミノ基の存在は今まで認識されていた以上に一般的現象で、特異的生物活性をもたらすのに必要な構造であるかもしれない、という大変重要な知見を加えた。

市販ヘパリンから調製された4糖鎖以上のオリゴ糖断片はSLe^x-ウシ血清アルブミンへのL-やP-セレクトインの結合をSLe^x自身よりもはるかに低い濃度で阻害する [Nelson, R.M. *et al.* (1993) *Blood*, **82**, 3253–3258]。このように、特異的構造をもったヘパリン/HSはセレクトインの天然高親和性リガンドの一つであるかも知れない。将来この分野の研究は、疑いなくセレクトインとの結合に関与するヘパリン/HSの非置換アミノ基を含んだドメイン構造そしてこのドメイン構造合成のための制御メカニズムの解明に向けられていくであろう。医薬品応用の観点から、ヘパリン様分子はセレクトインの阻害剤としてシアル酸やフコースを含むポリラクトサミンより、より有効な素材となるかもしれない。

生化学工業株式会社・東京研究所
石原 雅之