Glycobiology 研究の現状

東京都老人総合研究所 木幡 陽

For the purpose of elucidating the biological information included in the sugar chains of glycoconjugates, and of using them for the understanding of biology, glycobiology has launched. In contrast to nucleic acids and proteins, sugar chains of many different structures can be formed by using a small number of monosaccharide units. Finding of a series of structural rules in the sugar chains enabled us to consider the functions of sugar chains on their structural basis. Recent finding of a novel group of sugar chains in dystroglycan further expanded this novel scientific field of molecular biology.

glycoprotein / N-linked sugar chain / O-linked sugar chain / immunoglobulin G / dystroglycan / complex type sugar chain.

1. はじめに

細胞生物学領域の研究の進展により、複合糖質の糖鎖が、多細胞生物で営まれているさまざまな識別現象のシグナルの役割を果たしていることを示す事実が報告されている。加えて、近年発展しつつある遺伝子工学の技術を利用して作りだされたタンパク質が、予期した生物活性を発現しない例が相次いで見いだされるにおよび、あらためてタンパク質に結合した糖鎖の機能的な役割が注目され、Glycobiology (糖鎖生物学) という新しい研究領域が生まれてきた。

糖鎖は核酸やタンパク質と同様にユニットのつながった鎖でできている。しかし基本的に一本の鎖からなる核酸やタンパク質と異なり、糖鎖には少数のユニットで極めて多様な構造を作りうるという特性がある。ここで鎖の一番小さな二つのユニットでできているA-Bを考えてみよう。タンパク質では、例えばAをアラニン、Bをバリンと決めるとその構造は一つしかない。核酸のDNAで考えると、Aをデオキシアデニル酸、Bをデオキシグアニル酸と決めるとやはりその構造は一つしかないのである。これに対して糖鎖の場合はかなり状況が異なっている。いまAをマンノース、Bをガラクトースと決めてみよう。図1に示したように、マンノース残基はガラクトースのC-2、C-3、C-4、C-6の四個所に結合しうるので四種類の異性体が存在しうる。マンノースがガラクトースに結合する際には α と β の二つの

図1 二糖の構築。A=マンノース、B=ガラクトース。マンノースの実線のアノマー構造は α を、点線は β を示す。斜体の数字は炭素の番号を示す。

アノマー構造が可能なので、これを計算に入れると異性体の数は $2 \times 4 = 8$ となる。さらにマンノース残基は図1に示したピラノース構造以外にフラノース構造をもとりうるので、この可能性を加えるとマンノース-ガラクトース (Man-Gal) という二糖は十六種類の異性体構造を有することになる。鎖を構成するユニットの数がさらに三つに増えた場合、タンパク質や核酸の場合は直鎖なので相変わらず一種類の構造しか作りえないが、糖鎖の場合は枝分かれが可能となるので、可能な異性体の数は数百種類となる。このように糖鎖には少数のユニットによって多様な構造が作り出されるという、核酸やタンパク質には見られない特徴が具わっているのである。

さて動植物が作りだすタンパク質には図2に示すようなAsnに結合したN-結合型と呼ばれるものとセリンやトレオニンに結合したO-結合型と総称されるも

The present situation of glycobiology research

Akira KOBATA

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

の二種類の糖鎖が見いだされている。すでに述べたように、糖鎖の異性体の数は二糖で十六種類、三糖で数百種類というふうに、構成するユニットの数の増加にしたがって幾何級数的に増えていくので、図2のN-結合型糖鎖のように十四個のユニットからなる糖鎖の作りうる異性体の数は天文学的な値となり、当初、個々の生物現象とその背景にある糖鎖の構造を結びつけることは、実験室の枠を越えるのではないかと危惧された。幸いなことに糖鎖構造の研究が進むにしたがって、糖タンパク質の糖鎖にひそむ構造の法則性が次々と明らかになり、その構造の多様性は極めて限られた部分に認められることが判明した¹⁾。

2. 糖タンパク質糖鎖に見られる構造の法則性

まず例をN-結合型糖鎖にとってその法則性を説明してみよう。N-結合型糖鎖にはマンノース三個とN-アセチルグルコサミン二個からなる枝分れ五糖が共通の母核として含まれており、この母核の上に構築される

図2 糖タンパク質に見出される主要な二糖の糖鎖。Neu5Ac, N-アセチルノイラミン酸；Gal, ガラクトース；GlcNAc, N-アセチルグルコサミン；Man, マンノース；GalNAc, N-アセチルガラクトサミン。

図3 N-結合型糖鎖に見出された三つのサブグループ。1, 複合型；2, 高マンノース型；3, 混成型。実線で囲んだ部分は共通母核の五糖構造を示す。Fuc, フコース。他の単糖の略号は図2に同じ。

図4 複合型糖鎖の枝分かれ構造 (A) と多様な側鎖の構造 (B) を示す。Sia, シアル酸。他の単糖の略号は図3に同じ。

構造の特徴によって、図3に示すような三つのサブグループに分けられている。複合型 (1) の糖鎖の特徴は母核の二つの α -マンノシル残基にN-アセチルグルコサミン残基で始まる側鎖が最高五本まで結合していることである。高マンノース型 (2) の糖鎖は母核の二つの α -マンノシル残基に α -マンノシル残基ばかりが最高六個まで結合したものである。なおこのグループの糖鎖には、図3に点線で囲んだマンノース五個N-アセチルグルコサミン二個からなる、二つの枝分かれ構造を持った七糖が共通母核として含まれている。混成型 (3) の糖鎖は母核のMan α 1-6腕には高マンノース型のように α -マンノース残基が、またMan α 1-3腕には複合型に見られるような側鎖が結合している。こうした法則性に加えて、複合型と混成型の糖鎖にはさらに根本のN-アセチルグルコサミン残基のC-6位に α -フコース残基が付いたり付かなかったり、また母核の β -マンノース残基のC-4位に β -N-アセチルグルコサミン残基 (このN-アセチルグルコサミン残基は母核糖鎖の立体構造に大きな影響を与えることから、特別にbisecting GlcNAcの名で呼ばれている) が付いたり付かなかったりして糖鎖の多様性の形成に寄与している。

図3の三種のサブグループのうちで、複合型糖鎖が特に多様な構造を持っており、生体内のさまざまな認識のシグナルの役割をはたしている。この構造的多様性は二つのファクターによって作り出されていることが判明している。その一つは母核についた側鎖の数の違いで、図4のAに示すように一本側鎖から五本側鎖までのものが知られている。なお図4Aに示すように、三本側鎖の複合型糖鎖には2, 4枝分かれ構造を持ったものと2, 6枝分かれ構造を持ったものの二種類の異性

図5 O-結合型糖鎖の母核構造。単糖の略号は図2に同じ。

体が知られている。複合型糖鎖の多様性を作りだすもう一つのファクターは側鎖の構造の違いで、図4のBに示すようにN-アセチルグルコサミン残基にはじまる実に多様な側鎖の存在が知られている。なお図4Bに示した側鎖の構造は現在までに知られているもののほんの一部であり、しかも毎年新しい側鎖構造が発見されつつある。すなわち、複合型糖鎖の多様性は、Aの枝分かれとBのさまざまな側鎖の組み合わせによって作り出されているのである。

N-結合糖鎖に較べて、O-結合糖鎖の構造の法則性は少ない。現在までのところ、その母核部分の構造の違いによって図5に示すような4種類のグループの存在が主要なものとして知られている。

3. 糖タンパク質糖鎖の機能

以上に述べたような糖鎖の構造上の法則性の発見により、糖タンパク質糖鎖の機能的役割が次々と明らかになり始めた。その主なものにきざってここで紹介することは紙数の関係で不可能であるので、我々が中心となって進めてきた免疫グロブリンG(IgG)の糖鎖を話題にその一端を紹介することにしよう。

IgGはH鎖とL鎖と呼ばれる大小二つのポリペプチド各二本ずつがS-S結合で繋がったヘテロテトラマーで、H鎖の297番目に位置するアスパラギン残基に一本ずつのN-結合型糖鎖を持っている。この糖鎖の構造は図6に示すように単純な二本側鎖複合型でありながら、血清糖タンパク質の中では他に類を見ないような高いミクロ不均一性を持っている。このミクロ不均一性はシアル酸の有無に加えて主に図6の構造のなかで下線を付した四種の単糖の有無によって生み出されている。したがって、IgGの糖鎖はシアル酸を除去しても少なくとも十六種類 (24) の異なった構造のものからなっている。さらに興味深いことに数多くの健康人の血清から精製したIgGについて調べると、この多様な糖鎖の相対比率が極めて一定していることが判明した。注目すべき点は、単クローンIgGの糖鎖を調べるとこのような十六種類の糖鎖の比率に一定性が見られないことである。すなわち、ヒトのIgGを作りだしているB細胞には異なるセットの糖転移酵素群を持ったものが存在し、健康人ではその比率がほぼ一定していると

図6 ヒトIgGの一番大きな糖鎖の構造。単糖の略号は図2に同じ。

見られるわけである²⁾。

ヒト血清IgGの糖鎖には非還元末端（糖鎖の一番外側）にβ-ガラクトース残基を持つものが多く含まれているにもかかわらず、このIgGを広く糖鎖の構造研究に使われているナタ豆や肺炎双球菌のβ-ガラクトシダーゼで消化してもガラクトースが遊離してこない。我々はさまざまなβ-ガラクトシダーゼのIgGに対する作用を調べて、*Streptococcus* 6646Kのβ-ガラクトシダーゼがIgGのガラクトース残基をほぼ完全に除去することができることを見つけた³⁾。そこで、これを利用して同酵素消化前後のヒトIgGの機能を比較研究してみた⁴⁾。その結果、ガラクトースが除去されると、補体結合反応やFc-レセプターとの結合性といったIgGのFc領域の機能が低下することが判明した。IgGのガラクトースはβ-ガラクトース残基と結合することで知られるヒマレクチン(RCA)と結合しないことも知られており、恐らくこのガラクトース残基はFc領域のポリペプチドに埋め込まれてこの領域の立体構造の構築に関わっているものと思われる。

このように糖タンパク質のN-結合型糖鎖が免疫や細胞の分化、悪性化、等の広範な局面で重要な働きをしていることが明らかになりつつある。

一方、O-結合型糖鎖はムチンと呼ばれる粘性糖タンパク質の主要な糖鎖であることもあって、長い間その機能はタンパク質への物性賦与であると考えられてきた。しかし、白血球の毛細血管透過現象の分子の基礎をなしているセレクトリン群のリガンドがO-結合型糖鎖であることが判明するにおよび、にわかにこの糖鎖の識別のシグナルとしての役割が注目を集めつつある⁵⁾。たとえば、白血球の表面の主要な糖タンパク質であるロイコシアリンの糖鎖は、B細胞によってT細胞が認識される際になんらかの役割を果たしていると考えられている⁶⁾。またヒトやネズミのT細胞をマイトジェンで活性化すると、活性前には1型母核を基本とするNeu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAcという4糖であったロイコシアリンの糖鎖が、2型母核からなるNeu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAcという6糖に変化することが判明している⁷⁾。この分枝した6糖の出現は、免疫不全症であるAIDSやWiscott-Aldrich症候群でも起こることが知られており^{8)・9)}、未分化T細胞の表現形質の一つとして注目されている。さらにこの4糖から6糖への変換は絨毛癌の産生するヒト絨毛性腺刺激ホルモンに含まれる4本のO-結合型糖鎖でも顕著に起こることから、癌性分化抗原の一つとも考えられている¹⁰⁾。

4. 糖鎖生物学の新しい世界への展開

一方、東京都老人総合研究所糖鎖生物学部門の遠藤と千葉が、帝京大学医学部神経内科の松村教授のグループと共同で進めた末梢神経細胞のα-ジストログリカンの糖鎖生物学的研究によって、従来の法則から外れた構造の糖鎖がこの糖タンパク質の機能発現に重要な役割を演じていることが判明した^{11)・12)}。細胞の形質膜に局在し、細胞外マトリックスと細胞内骨格を結びつけている分子の役割が、近年注目を集めている。ジストログリカン複合体はインテグリンと並んでこのような役割を演じている形質膜分子として見いだされたものである。この複合体はα-ジストログリカンとβ-ジストログリカンの二つの糖タンパク質からなるヘテロダイマーで、図7に示すように、糖鎖を大量に含むα-ジストログリカンが細胞外マトリックスのラミニンと結合し、β-ジストログリカンが細胞内骨格と結合している¹⁴⁾。

遠藤らはウシ末梢神経細胞のα-ジストログリカンとラミニンの結合機構を調べて、セリンやトレオニンにO-結合したシアル酸を含む糖鎖が、ラミニンとの特異的な結合に必須であることを見いだした。そこでこのO-結合糖鎖の構造を調べたところ、Neu5Ac(NeuGc)α2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manという四糖がα-ジストログリカンの317番目から488番目のアミノ酸の間にクラスターをつくって存在するセリンやトレオニンに結合していることが判明した。この四糖クラスターが細胞外マトリックス中のラミニンと結合することが、末梢神経のミエリン形成の上で必須な役割を演じているわけである。

図7 ジストログリカン複合体の構造。形質膜を貫通するβ-ジストログリカンに結合したα-ジストログリカンが、O-結合糖鎖（黒丸）を介してラミニンと結合している様を示す。β-ジストログリカンは細胞質側でウトロフィリンやDp116等の細胞骨格タンパク質と結びついている。論文5)より改変。

Man-SerやMan-Thr結合でタンパク質に結びついた糖鎖は酵母や植物の糖タンパク質に広く見出されているが、動物界ではきわめて希である。これまでのところKrusiusら¹⁵⁾がラットの脳のプロテオグリカンにこのような結合で結びついた糖鎖が存在していることを報告しているのみであった。我々のジストログリカンの報告¹²⁾に続いて、Yuenら¹⁶⁾がラットの脳の糖タンパク質に結合しているHNKのエピトープであるSO₄-3GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAc残基が、還元末端にマンノース残基を持ったO-結合型の糖鎖に含まれていることを報告している。このように稀な糖鎖がα-ジストログリカンの重要な機能を担っているという発見は、今後動物界に組織限定的に見出されるさまざまな新しい型の糖鎖が、特定の組織で異なった機能を演じていることを示す糸口となるかも知れない。

文 献

- 1) Kobata, A. (1996) *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine* (Meyers, R. A., ed.) 2, 446-457, VHC Publishers Inc., N.Y.
- 2) Kobata, A. (1990) *Glycobiology* 1, 5-8.
- 3) Furukawa, K., Matsuta, K., Takeuchi, F., Kosuge, E., Miyamoto, T. and Kobata, A. (1990) *International Immunology* 2, 105-112.
- 4) Tsuchiya, N., Endo, T., Matsuta, K., Yoshinoya, S., Aikawa, T., Kosuge, E., Takeuchi, F., Miyamoto, T. and Kobata, A. (1989) *J. Rheumatol.* 16, 258-290.
- 5) Lasky, L.A., Singer, M., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W., Grimley, C., Fennie, C., Gillet, N., Watson, S. and Rosen, S.P. (1992) *Cell* 69, 927-938.
- 6) Ardman, B., Sikorski, M.A. and Staunton, D.E. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5001-5005.
- 7) Piller, F., Piller, F., Fox, R.I. and Fukuda, M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15146-15150.
- 8) Piller, F., Le Deist, F., Weinberg, K.I., Parkman, R. and Fukuda, M. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 1501-1510.
- 9) Saitoh, O., Piller, F., Fox, R.I. and Fukuda, M. (1991) *Blood* 77, 1491-1499.
- 10) Amano, J., Nishimura, R., Mochizuki, M. and Kobata, A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 1157-1165.
- 11) Yamada, H., Chiba, A., Endo, T., Kobata, A., Anderson, L.V.B., Hori, H., Fukuta-Ohi, H., Kanazawa, I., Campbell, K.P., Shimizu, T. and Matsumura, K. (1996) *J. Neurochem.* 66, 1518-1524.
- 12) Chiba, A., Matsumura, K., Yamada, H., Inazu, T., Shimizu, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Kobata, A. and Endo, T. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 2156-2162.
- 13) Matsumura, K., Chiba, A., Yamada, H., Fukuta-Ohi, H., Fujita, S., Endo, T., Kobata, A., Anderson, L.V.B., Kanazawa, I., Campbell, K.P. and Shimizu, T. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 13904-13910.
- 14) Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leuville, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S. W. and Campbell, K. P. (1992) *Nature* 355, 696-702.
- 15) Krusius, T., Finne, J., Margolis, R. K. and Margolis, R. U. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 8237-8242.
- 16) Yuen, C.-T., Chai, W., Loveless, W., Lawson, A.M., Margolis, R.U. and Feizi, T. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 8924-8931.