総 説

糖脂質 GM3 の機能解明に向けて
— 生合成阻害剤の活用 —

臼 杵 靖 剛

生化学工業(株)東京研究所 (〒207 東京都東大和市立野 3-1253)

Toward the Understanding of Glycolipid GM3 Functions
— Application of Metabolic Inhibitors —

Seigou USUKI

Tokyo Research Institute, Seikagaku Corporation

(1253, Tateno 3-chome, Higashiyamato-shi, Tokyo, 〒207)

Abstract : Glycolipid GM3 increases with cell density of cell growth. GM3 of the plasma membrane is an important modulator of cellular functions of growth. Partial turnover of GM3 is regulated by the presence of the terminal sialic acid moiety. The activities of GM3-metabolizing enzymes *i.e.* sialidase or sialyltransferase change in the dividing cells. Both enzymes function in the growth control of cells with GM3-mediated inhibition of epidermal growth factor receptor phosphorylation. 2-Deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid (NeuAc2en) is a potent GM3 sialidase inhibitor, which resultantly shows the cell-growth inhibitory effect. Rational, computer-assisted drug design of NeuAc2en derivatives (strong inhibitors) was applied in the development of a new therapeutic treatment for influenza virus infection. CMP-NeuAc is known to produce NeuAc2en spontaneously in the physiological condition. Resultant NeuAc2en might regulate cellular sialidase activity. To further clarify cellular functions of GM3 sialidase or sialyltransferase, it is necessary to design new type of NeuAc2en or CMP-NeuAc derivatives, targeted on the subcellular site of the enzymes.

Key words : GM3, NeuAc2en, sialidase, sialyltransferase, inhibitor

1 はじめに

スフィンゴ糖脂質 (以下糖脂質と略す) は、長鎖塩基スフィンゴシンに脂肪酸が酸アミド結合した疎水性のセラミド構造と親水性の糖鎖構造とから構成される両親媒性の複合糖質である。細胞膜を構成する脂質成分のなかで糖脂質の占める割合は必ずしも高いとはいえずリン脂質やコレステロールの 1/50~1/100 にすぎないが、種特異抗原、癌抗原としての細胞マーカー分子として、あるいは活性因子レセプター機能制御において重要な機能を担っている。構成糖としてシアル酸を含有する糖脂質をとくにガングリオシドと総称する。ガングリオシドは古くより脊椎動物の脳神経系に存在していることが知られていたが、糖脂質研究の碩学山川民夫博士により赤血球膜より GM3 ガングリオシド (Fig. 1) が単離精製されたことを契機に動物細胞に普遍的に存在することが明ら

かとなってきた。

GM3 は細胞増殖・分化機能をもつことが発見されて以来、機能性糖脂質分子として非常に注目を集め精力的に研究が進められてきた。今日、ガングリオシドは神経系以外の組織にも分布していることが知られており、その組織細胞膜において細胞間認識のマーカー分子として、またホルモンや成長因子などの多種多様な endogenous な分子のアンテナ役として、あるいはウイルス・細菌などの外来分子に対する細胞側の結合分子としての機能が研究されている。

一方、糖脂質は、小胞体で合成されたセラミドが細胞内輸送によってゴルジ体に運ばれ、ゴルジ体に規則的に配置された糖転移酵素により段階的な糖付加反応を受けることにより合成される¹⁾。その後、細胞膜に輸送され、動物細胞の細胞膜微量構成成分としてセラミドを脂質二重層の外側分子層に挿入し、糖鎖部分を細胞外側に

突き出した完全非対称的配向で存在する。

糖脂質の糖鎖構造はその機能発現に極めて重要であり細胞の発生・分化や癌化の過程で変化する。合成酵素のシアル酸転移酵素および分解酵素のシアリダーゼとによ

Fig. 1 Structures of GM3 and Its Derivatives.
1 : GM3, 2 : De-*N*-acetyl GM3, 3 : Lyso GM3, 4 : Lactosylceramide (LacCer), 5 : Ceramide, 6 : *N,N*-Dimethylsphingosine, 7 : Sphingosine.

る糖脂質の生合成は細胞周期や細胞密度（増殖の接触阻害）に依存して変化する。このようにして上記過程での情報伝達分子として特定の糖脂質の生合成が制御されている。機能性情報分子として GM3 は細胞膜上で部分的に代謝回転していることからもたらされる。この過程には末端のシアル酸残基が関与している。最近、セラミドを介した情報伝達系が注目されているが、本論文ではセラミドとその類縁体については触れないので他の総説を参照していただきたい。本稿では筆者は GM3 に焦点をあわせ、その生合成と代謝にかかわるシアリダーゼとシアル酸転移酵素による細胞増殖制御についてまず概説したい。さらに、両酵素に深くかかわる細胞内環境について概観した後、それらの生合成阻害剤を活用した GM3 の機能解明の現状を紹介したい。

2 GM3 と細胞増殖制御

ガングリオシドは上皮成長因子 (EGF) レセプター、血小板由来増殖因子 (PDGF) レセプター、インスリンレセプター、等のレセプターにおけるチロシンキナーゼ活性を阻害することにより細胞増殖を抑制することが示されている。EGF レセプターに限定すると例えば、卵巣上皮癌由来の細胞株 A-431 は EGF 刺激によりレセプターの自己リン酸化として Src 相同ドメイン (SH2) に伝えられ GAP, P85/P13K, PLC- γ といった G タンパク系やリン脂質合成系に情報伝達される。この細胞系に *in vitro* で GM3 を添加すると 0.35 mM の濃度でそのレセプターリン酸化を 64% 阻害し、増殖を抑制する²⁾。GM1 にも弱いながらリン酸化阻害 (26%) がみられる。さらに興味あることに、箱守と花井によれば、

Fig. 2 A Working Model for the Regulation of Growth Control of Cells Based on GM3, Its Derivatives, and Metabolism.

EGFR : epidermal growth factor, PKC : protein kinase C, (+) : enhancement of system, (-) : inhibition of system.

See the structures of GM3 and its derivatives in Fig. 1.

GM3 代謝化合物の de-*N*-acetylGM3 は EGF 依存性の EGF レセプターのリン酸化を促進し、リゾ GM3 は阻害するという³⁾。EGF レセプターのリン酸化は GM3 関連化合物のスフィンゴシン⁴⁾、*N,N*-ジメチルスフィンゴシン⁵⁾、セラミド⁶⁾、によっても促進される (Fig. 2)。

ところで、de-*N*-acetylGM3 によるリン酸化促進には非イオン界面活性剤 (TritonX-100) が必要である。スフィンゴシンの効果はレセプターの二量体化がなくてもチロシinkinase の活性化が起こる。GM3 による阻害は TritonX-100 は必要でなく、EGF のレセプターへの結合の阻害はない。TritonX-100 は、³²P 標識した ATP が EGF レセプターのキナーゼ活性部位に接近しやすくしているが、同時にミセル形成や EGF レセプター以外の膜成分との非生理的相互作用の可能性も出てくるので注意を要する。上記のスフィンゴ脂質が果たして生理的条件下で EGF レセプターに作用しているのかという問題が指摘されている。内因性糖脂質の機能を探る手段として糖脂質、セラミド類縁体生合成阻害剤を用いる方法が極めて有用であることが示され、注目されている^{7)~9)}。一方、*in situ* の手段としてはヒト野性型 EGF レセプターをトランスフェクトした CHO 細胞の突然変異株がある。この細胞は培養条件を変えると GM3 を発現しなくなりレセプター活性の回復がみられた¹⁰⁾。しかしながら、市川、平林らは GM3 のみならずすべての糖脂質が欠損したメラノーマ細胞が増殖できることを報告している¹¹⁾。短絡的には GM3 は細胞増殖に関与しないと考えられるが、ノックアウトマウス、ミュータントでよくみられる代替分子による可塑性という議論もあり問題は解決されない。Fig. 2 には筆者らのシアリダーゼによる制御等を加えた GM3 とその代謝産物による細胞増殖制御の情報伝達モデルを示した。次に、シアリダーゼについて述べる。

2.1 GM3 シアリダーゼと細胞増殖

細胞分裂中の KB, 3T3, NIL-8 線維芽細胞で細胞表面の GM3 量が急激に変化することが調べられている^{12), 13)}。GM3 を合成するシアル酸転移酵素活性が細胞周期の G1/G0 期で最大になるという報告がある¹⁴⁾。一方、細胞膜性シアリダーゼ活性が、細胞増殖過程において接触阻止細胞密度になると、減少するという報告もある^{15), 16)}。筆者らはヒト線維芽細胞の培養上清にシアリダーゼが遊離してくるのを見いだした¹⁷⁾。基質特異性と至適 pH の検討からそのようなシアリダーゼには pH 6.5 で GM3 のみを基質とする酵素と pH 4.5 でシアリルラクトース (NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc) を基質とする (GM3 にも弱いながら反応する) 酵素の 2 種類が存在することが認められた。2 つのシアリダーゼは TritonCF-54 による活性化においても相違を示す。前者の

シアリダーゼは細胞増殖の初期に高活性になり接触阻止細胞密度で活性が減少することから細胞表面の GM3 による細胞増殖に関与すると考えられる。

2-Deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid (NeuAc2en)

実際、細胞表面で作用するシアリダーゼ阻害剤 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid (NeuAc2en) は培養液中の中性 GM3 シアリダーゼ活性を阻害し、細胞周期の G1 期を遅延させた¹⁸⁾。さらにヒト正常線維芽細胞を *C. perfringens* 由来のシアリダーゼで処理することで GM3 の減少とラクトシルセラミド (LacCer) の増加が認められ、細胞増殖も促進した (Fig. 3, 4)。

小倉と Sweeley ら¹⁹⁾は 100 μ M の LacCer の添加によって細胞増殖の促進を認めている。Chatterjee ら²⁰⁾はウシ大動脈平滑筋細胞で LacCer による細胞増殖効果を報告しているが、低密度リボタンパク質 (LDL) による LacCer 合成のガラクトース転移酵素の活性化を考えているようである。ところで、メタボリックラベリング実験からも細胞増殖過程での細胞表面の GM3 の減少が観察されている (Table 1)。

ヒト線維芽細胞の 2 つの細胞株 FS-4, MSU-2 では培養 48 h 後には細胞の GM3 のメタボリックラベリング量が約 60% 消失した¹⁸⁾。一方、GM3 抗体 (M 2590) による免疫染色によって G1 期のヒト線維芽細胞はすべての細胞が GM3 を強く発現するようになること²¹⁾、あるいは上述した GM3 合成のシアル酸転移酵素活性が G1 期に増大することから代謝バランスとしては GM3 含量はむしろ増大していることになる。筆者らは細胞増殖過程における GM3 の代謝回転速度を決定する要因として GM3 シアリダーゼに着目して研究をすすめた。実際に、Table 1 に示したように細胞増殖と平行に起こる GM3 の減少は NeuAc2en の存在下で阻害され、細胞増殖の阻害効果も認められたことから細胞表面でのシアリダーゼの関与が間接的に証明された。最近、Cantz ら²²⁾によって GM3 の同様な脱シアリル化プロセスがヒト神経芽種の Sk-N-MC で認められた (Table 1)。同時に、250 μ M の NeuAc2en により細胞増殖も阻害されたことからヒト線維芽細胞以外でもシアリダーゼによる細胞増殖制御メカニズムが働いている可能性を強く示唆する。しかし Sk-N-MC 細胞に NeuAc2en を作用させた時の GM3 の脱シアリル化に対する阻害効果は 48 h のインキュベーションでは弱く、96 h 後に無

Fig. 3 Effect of Sialidase and Lactosylceramide on DNA Synthesis of Human Fibroblasts. Preconfluent fibroblasts (1×10^4 cells/cm²) were cultured in ASF301 medium in the presence or absence of *C. perfringens* sialidase (a) or lactosylceramide (b) for 48 h with assays of DNA synthesis. Data are mean $\pm$ SD (bars) values of three experiments.

処置の細胞と GM3 の脱シアリル化の程度を比較した結果では約 1/2 にまで阻害した。このことから細胞の種類によっても NeuAc2en 感受性に相違があるようである。

2.2 GM3 シアリダーゼの起源

ところで培養液中に放出されるシアリダーゼの細胞内起源はどうか。動物起源のシアリダーゼはリソ

Fig. 4 Effect of Bacterial Sialidase on Distribution of Labeled Lipids from Fibroblasts. Human fibroblasts were cultured in a chemically defined medium (ASF301) with (¹⁴C) serine for 2 days followed by treatment with the presence (+) or absence (-) of *C. perfringens* sialidase for 1 day. The labeled lipids in the harvested cells were extracted with chloroform : methanol (2 : 1), and examined by autoradiography of HPTLC (chloroform : methanol : 0.4% CaCl₂ : 30% NH₃ 3/60 : 35 : 4 : 3). PE : phosphatidylethanolamine, LacCer : lactosylceramide, PC : phosphatidylcholine, SM : sphingomyelin, PS : phosphatidylserine.

Table 1 Desialylation of Cellular GM3 in the Presence or Absence of NeuAc2en.

Cell	Reduced GM3 % with NeuAc2en at :	
	0 μM	80 or 250 μM
Human fibroblast		
FS-4	62.3%	19.5% (80 μM)
MSU-2	64.9%	28.1% (80 μM)
Human neuroblastoma		
SK-N-MC	49.5%	44.9% (250 μM)

Chase of metabolically labeled GM3 of cells was compared between 0 h and 48 h of cell culture.

ソーム内腔²³⁾, リソソーム膜²⁴⁾, 細胞膜²⁵⁾, 細胞質²⁶⁾に局在し, 基質特異性 (ガングリオシド, 糖タンパク質, オリゴ糖に対する反応性) や免疫学的にも互いに区別されるといわれている。ヒト線維芽細胞では先天性代謝異常症の skin biopsy により早くからシアリダーゼ活性が研究されていた。Table 2 に示したように細胞膜に GM3 に作用するシアリダーゼがあり, リソソームにはシアリルラクトースや糖タンパク質に反応性の高いシ

Table 2 Human Fibroblast Sialidases Discriminated by Cellular Localization, and Substrate, Optimal pH, Detergent.

Cellular localization	Substrate	Optimal pH	Detergent	Reference ^a
Lysosome	Sialyllactose	4.0	no use	(27)
	GM3	4.3	Cholate	(28)
	GM3, 4-MU-NeuAc ^a , Sialyllactose	4.5	Glycodeoxycholate	(29)
	4-MU-NeuAc>>GD1a	4.0	Triton X-100	(30)
Plasma membrane	GM3	4.5	Trion X-100	(31)
	GM3	4.0~4.5	Triton X-100	(27)
	GD1a>>4-MU-NeuAc	4.0	Triton X-100	(30)

a : 4-MU-NeuAc=4-Methylumbelliferyl-*N*-acetylneuraminic acid

b : See the number of references section.

アリダーゼが存在することが細胞内分画で調べられた^{27)~31)}。

しかし、「デングラ」の愛称で親しまれてきた細胞内分画のための密度勾配超遠心分離法はマーカー酵素とともに細胞内小器官（オルガネラ）の分離を可能にしたとはいえリソソームのような低比重オルガネラを細胞膜と完全に密度分離するにはしばしば困難がともなうものである。培養液中のシアリダーゼの起源を明らかにするにはリソソームと細胞膜を完全に分離しうる高分子ポリマー新素材による細胞内分画技術の躍進に期待したい。ここではシアリダーゼの起源の可能性だけに止めたい。培養液に酵素が放出される現象はリソソーム酵素のマンノース-6-リン酸を介したプロセスで分泌されていることが知られている^{32)~34)}。CHO 細胞でも NeuAc2en で阻害されるシアリダーゼが培養上清に出てくるが、同時に分泌されてくる糖タンパク糖鎖に作用しているようである³⁵⁾。筆者らがヒト線維芽細胞でみたシアリルラクトースに特異性のある酸性シアリダーゼもリソソーム由来の可能性がある。一方、ブタ脳の細胞膜シアリダーゼがグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーで細胞膜に結合していて特異的ホスホリパーゼ C で膜から遊離するという報告もあり³⁶⁾、培養上清のシアリダーゼの起源になっている可能性がある。

3 シアリダーゼと NeuAc2en 類縁体

NeuAc2en は動物、細菌、ウイルス由来のシアリダーゼのすぐれた阻害剤として汎用されてきた (Fig. 5)。

Table 3 に動物由来のシアリダーゼに対して報告された典型的な NeuAc2en 類縁体 (Fig. 5, 化合物構造 1~4) の阻害定数 (K_i) についてまとめた。すべてが精製シアリダーゼを用いているわけではないのできょう雑物質の影響も当然考えられるが、その K_i は 10^{-4} ~ 10^{-6} M であった^{26), 37), 38)}。また、NeuAc2en はリソソームまたは細胞膜シアリダーゼより細胞質シアリダーゼに対し

Fig. 5 Structures of NeuAc2en and Its Derivatives.

The compound numbers refer to those in Table 2 and 3.

て 8~14 倍の高い阻害特異性を示した。NeuAc2en の生理活性としては細胞増殖阻害効果以外に SK-N-MC 細胞でアセチルコリンエステラーゼ活性の増大を阻害することが報告されている³⁹⁾。

動物細胞由来のシアリダーゼは不安定であるため精製も困難であり、cDNA クローニングも遅れている。一方、細菌、ウイルスのシアリダーゼの精製は比較的容易

Table 3 Inhibition Constants of NeuAc2en Derivatives for Mammalian Sialidase .

Sialidase source	Cellular localization	Substrate	K_i (M)			
			1 ^a	2	3	4
Rat liver	Intralysosome	4-MU-NeuAc ^b	3.0×10^{-5}	ND	ND ^d	ND
		GM3	NI ^c	ND	ND	ND
	Cytosol	4-MU-NueAc	1.2×10^{-6}	ND	ND	ND
		GM3	3.3×10^{-5}	ND	ND	ND
	Plasma membrane	4-MU-NeuAc	NI	ND	ND	ND
		GM3	2.8×10^{-4}	ND	ND	ND
	Lysosomal membrane	4-MU-NeuAc	ND	ND	ND	ND
		GM3	2.3×10^{-4}	ND	ND	ND
Rat muscle	Cytosol	4-MU-NeuAc	1.0×10^{-5}	ND	NI	5×10^{-5}
Chinese hamster ovary cells	Cytosol?	4-MU-NeuAc	1.0×10^{-5}	ND	3.0×10^{-4}	4.5×10^{-5}
Human fibroblast	Lysosome	4-MU-NeuAc	1.0×10^{-5}	ND	1.0×10^{-5}	1.0×10^{-5}
Adenovirus transformed kidney cells	Plasma membrane	4-MU-NeuAc	1.0×10^{-5}	ND	1.0×10^{-5}	1.0×10^{-5}
Bovine testis	Lysosome	4-MU-NeuAc	1.6×10^{-5}	2.1×10^{-5}	ND	ND

a : Compound numbers as set out in Fig. 5

b : 4-MU-NeuAc=4-Methylumbelliferyl-*N*-acetylneuraminic acid

c : NI=not inhibited.

d : ND=not determined.

Table 4 Inhibition of Sialidases from Various Sources by Analogues of NeuAc2en modified at the C-4 Position.

Compound ^a	Sialidase- K_i (M)						
	<i>Flu A</i>	<i>Flu B</i>	<i>Paraflu</i>	<i>C. perf.</i>	<i>V. chol.</i>	<i>A. urea.</i>	Sheep
1 ^a	4×10^{-6}	2×10^{-5}	1×10^{-5}	8×10^{-6}	3×10^{-6}	1×10^{-6}	8×10^{-6}
5	1×10^{-9}	1×10^{-8}	8×10^{-4}	$>10^{-4b}$	6×10^{-5}	$>10^{-2c}$	3×10^{-4}
6	4×10^{-8}	1×10^{-6}	3×10^{-4}	7×10^{-4}	3×10^{-4}	3×10^{-4}	1×10^{-4}
7	3×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-4}	3×10^{-4}	$>5 \times 10^{-4b}$	$>5 \times 10^{-4b}$	ND ^d
8	2×10^{-6}	1×10^{-6}	5×10^{-5}	3×10^{-3}	6×10^{-3}	3×10^{-3}	$>10^{-3c}$
9	2×10^{-4}	8×10^{-4}	4×10^{-5}	$>10^{-3b}$	$>5 \times 10^{-4b}$	$>10^{-3b}$	$>10^{-3c}$
10	6×10^{-6}	1×10^{-5}	2×10^{-5}	$>10^{-3b}$	3×10^{-3}	4×10^{-3}	$>10^{-3b}$
11	8×10^{-6}	9×10^{-5}	3×10^{-5}	5×10^{-5}	$>5 \times 10^{-5b}$	$>10^{-4b}$	$>10^{-3c}$
12	4×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-4}	7×10^{-3}	3×10^{-3}	$>5 \times 10^{-3b}$	$>10^{-3c}$

Flu A : influenza virus A, *Flu B* : influenza virus B, *Paraflu* : parainfluenza 2 virus, *C. perf.* : *Clostridium perfringens*, *V. chol.* : *Vibrio cholerae*, *A. urea.* : *Arthrobacter ureafaciens*, Sheep : sheep liver.

a : Compound numbers as set out in Fig. 5.

b : Derived from a preliminary estimate of the order of inhibition only. K_i estimates were not performed due to insufficient availability of compound.

c : No significant inhibition observed at a concentration of 1 mM compound.

d : ND=not determined.

である。現在までのところインフルエンザの有効なワクチンや抗ウイルス剤は開発されていないが、シアリダーゼ阻害剤がインフルエンザウイルスのヘマグルチニンの受容体結合阻害剤⁽⁴⁰⁾等とともに研究されてきた。そのようなシアリダーゼ阻害剤のトピックとしては、インフルエンザウイルス A/Tokyo/3/67 のようにシアリダーゼタンパクの結晶化に成功したものから得られたX線回折結果から阻害剤をデザインすることが可能になったことである。そのX線結晶解析をもとに活性部位の三次元構造とシアル酸のコンフォメーション解析の結果より NeuAc2en のコンフォメーションがもっともその活性部位にフィットすることが明らかになった⁽⁴¹⁾。既に NeuAc2en はインフルエンザの動物感染モデルでは効果がないということがわかっていたので⁽⁴²⁾、いかにすれば、阻害活性を示す NeuAc2en 類縁体が得られるかを、相互作用の立体構造的情報に基づき各種の NeuAc2en の類縁体を分子設計しその阻害能が調べられた。その設計思想は、活性部位に存在するアミノ酸残基 Glu 119 のカルボキシル基に接しうる NeuAc2en の C-4 のヒドロキシル基を塩基で置換すればイオンの結合（塩形成）により、相互の親和性が飛躍的に増大し、阻害剤となりうるということが予想された。Table 4 に実際に合成された C-4 ヒドロキシル基の塩基置換体で調べられたシアリダーゼに対する K_i の一覧を挙げた⁽⁴³⁾。

驚くべきことに、化合物 5 と 6 (C-4-グアニジドと C-4-アミノ置換体) は予想通りとはいえないインフルエンザ A シアリダーゼに対して K_i が $10^{-8} \sim 10^{-9}$ M という非常に強力な阻害能を示した (Table 4)。同じ Table 4 のヒツジ肝臓のシアリダーゼに対する K_i と比較しても少なくとも 1000 倍以上の親和性があるので、ウイルスシアリダーゼに極めて高い選択性の阻害剤であるといえる。C-4-グアニジド置換体の化合物 5 は *in vivo* の動物モデルでも抗ウイルス効果がみられた。しかし、継代中にシアリダーゼの Glu 119 が Gly あるいは Ala に変異したインフルエンザが出現して親和性が 1/10 に低下して抗ウイルス作用も低下してしまったという報告がされている^{(44),(45)}。上述のように、阻害剤の分子設計という手法は新規阻害剤の創製には非常に有用である。しかし、実用化という点では相手側の変異（ここではウイルス変異）も考慮する必要がある、実際の医薬品として市場に提供できるまでに至るには、まだまだ越えねばならないハードルはいくつもある。どのインフルエンザウイルスにも有効で、インフルエンザウイルスの変異を克服した次世代の抗インフルエンザ薬の開発が切に希望される。

4 CMP-シアル酸の細胞内での役割

CMP-シアル酸の細胞内での役割を考慮するに先立

Fig. 6 Proposed Cleavage Mechanisms of CMP-NeuAc at pH > 7.

Fig. 7 Effect of pH on the Decomposition of CMP-NeuAc in 0.1 M Tris/HCl or Sodium Phosphate Buffers, 24 h, 37°C. (□) NeuAc2en, (●) CMP-NeuAc, (○) NeuAc, (△) CMP.

ち、その合成と分解について概観してみる。CMP-シアル酸は細胞核で合成され、細胞質に分布する。細胞膜の内側の膜に結合性の Cytidine 5'-monophosphate (CMP) acid hydrolase (注: Cytidine monophospho-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase は別の酵素) という酵素により CMP とシアル酸に分解することにより CMP-シアル酸の細胞外への漏出を防いでいる⁴⁶⁾。CMP-シアル酸はゴルジ体内腔のシアル酸転移酵素の糖供与体基質となるが、ゴルジ体膜の CMP-シアル酸トランスポータにより輸送がコントロールされている。トランスポータの機能はゴルジ体内腔の CMP-シアル酸濃度を細胞質の 30~50 倍程度まで上げることである⁴⁷⁾。界面活性剤で可溶化すると低い活性しか示さない糖転移酵素が巨大な複合糖鎖を次々に合成できる理由のひとつにトランスポータの関与が推察される。細胞質で生成したシアル酸を取り除く機構としてはリソソーム膜のシアル酸トランスポータが指摘できる⁴⁸⁾。シアル酸転移酵素はゴルジ体以外に血清に存在する可溶性酵素やラットひ臓リンパ球細胞で報告されているようなエクソ型酵素も知られている⁴⁹⁾。以前にCMP-シアル酸が細胞に取り込まれるかどうかという議論があっ

Fig. 8 A Model for CMP-NeuAc Metabolism Inside or Outside of Golgi Apparatus. (-): inhibition.

た。Hirschberg らは CMP-シアル酸の培養液中での安定性にも配慮して厳密な実験により取り込まれないことを証明した⁵⁰⁾。しかし、培養液中の CMP-シアル酸の分解で生成したシアル酸が取り込まれて再利用されただけでは説明のつかないシアリル化が細胞膜にみられた。こうしてエクト型シアル酸転移酵素の存在が指摘された。最近、B リンパ球特異的接着分子でシアル酸特異的レクチン活性を有する CD 22 がエクト型シアル酸転移酵素と相互作用すると示唆されたがこのことは後に否定されている⁵¹⁾。

4.1 CMP-シアル酸と NeuAc2en

NeuAc2en は、尿、唾液、血液中に微量に存在しているが、CMP-シアル酸より非酵素的に生成すると考えられている⁵²⁾。この反応は pH 7.2 もしくはそれよりも高い pH 条件で進行する。Fig. 6 に示したように自己分解反応は主に 2 つの反応で起こる。100 μ mol の CMP-NeuAc は pH 7.5 の 0.1 MTris-塩酸緩衝液中で 37°C, 24 h 処理すると、残留 CMP-NeuAc (50 μ mol), CMP (49 μ mol), NeuAc (40 μ mol), NeuAc2en (7 μ mol) を生成する (Fig. 7)。高温 (例えば、52°C) にするとその他に NeuAc 2 リン酸と Cytidine も生成するが、この条件下では検出限界以下であった。

ここで CMP-シアル酸の細胞内での役割について筆者の仮説を述べておきたい。前述のように CMP-シアル酸は細胞質に存在しているので細胞質内で NeuAc2en は容易に生成していると考えられる。血液、尿中の NeuAc2en も細胞質で生成した NeuAc2en が放出した結果と考えられる。細胞質で生成した NeuAc2en は細胞質性シアリダーゼを阻害して細胞質内のシアリル化複合糖質の分解を制御するのではないかと考えられる。Fig. 8 にそのモデルを示した。

4.2 シアル酸転移酵素と CMP-シアル酸類縁体

最近、シアル酸転移酵素が次々に cDNA クローニングされ 13 種類が明らかになっている⁵³⁾。ところで、シアル酸転移酵素は受容体基質および供与体基質と相互作用する部位を内包している。実際に、後者についてはそのアミノ酸一次配列に他の糖転移酵素には存在しない特有のシアリルモチーフという高度に保存された領域が 2 つあり、そのうちの一つであるシアリルモチーフ I は CMP-シアル酸との結合に関与することが示された⁵⁴⁾。将来、シアル酸転移酵素の X 線解析が可能になればシアリダーゼ阻害剤のように特異性の高い受容体および供与体基質型阻害剤を分子設計することも可能になるだろう。

CMP-シアル酸はそれ自体非常に特徴的な構造を有しており、実用的な合成法がついに最近になって報告されたほど合成化学的には困難であった⁵⁵⁾。従ってその類縁体も酵素合成によって合成されたものが多い (Fig.

9)。それらのシアル酸転移酵素に対する効果が調べられた結果、阻害剤ではなく受容体基質として転移能が観察されている。例えば、NeuAc の C-4 ヒドロキシル基をデオキシ化⁵⁶⁾、メチル化⁵⁷⁾、C-9 ヒドロキシル基をアミノ化、アセタミド化、アジド化、ヘキサノイルアミド化、ベンズアミド化^{58), 59)}、フルオレセニル化⁶⁰⁾、フルオロ化⁶¹⁾した類縁体、C-5 の *N*-アセチル基をホルミル基、トリフルオロアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、アミノアセチル基⁶²⁾で置換した類縁体はシアル酸転移酵素によって転移されることが報告されている。KI-8110 は細胞膜シアル酸含量を減少させることで癌転移抑制効果があることが報告されているが⁶³⁾、後にこの効果はシアル酸転移酵素ではなくゴルジ体の CMP-シアル酸トランスポータの阻害であることが明らかになった⁶⁴⁾。

ところで、CMP 自体にもシアル酸転移酵素阻害活性があることがよく知られている⁶⁵⁾。Schauer らは一連の CMP 類縁体と CMP-シアル酸類縁体で α 2,3-および α 2,6-シアル酸転移酵素の阻害活性を調べている⁶⁶⁾。 α 2,6-シアル酸転移酵素ではリン酸基数の増加に伴い Cytidine < CMP < CDP < CTP の順に阻害活性が強まった。CMP 類縁体型阻害剤として CMP-dialdehyde (Fig. 9) が GM 3 合成のシアル酸転移酵素活性を阻害し、Cytidine 5'-fluoro phosphate (Fig. 9) が 1.25 mM でヒト血清中のシアル酸転移酵素を 98% 阻害したことを示す報告もある^{67), 68)}。一方、GMP-シアル酸類縁体 (例えば、過ヨウ素酸化 CMP-シアル酸) では Fig. 9 に示した CMP-dialdehyde と比較してこの酵素に対する阻害活性の増大はみられなかった⁶⁶⁾。このことはシアル酸転移酵素の糖供与体基質型阻害剤にシアル酸残基は必要ないようにも考えられるが、GM3 合成酵素は UDP によっても CMP と同程度の阻害を受けるという報告もあり⁶⁵⁾、単に CMP をミミックしただけの構造では阻害剤としての特異性が落ちるようである。

ところで、シアル酸転移酵素は受容体基質の多様性に応じてかなりの数が存在すると考えられているが、受容体基質認識部位の構造も異なっているであろう。ゆえに、このようなシアル酸転移酵素に対して特異的な受容体基質型阻害剤の分子設計をすることは容易なことではないことは想像できる。よく用いられる方法としては受容体基質認識部位を構成するアミノ酸の残基のうち鍵となる極性基と相互作用する糖鎖のヒドロキシル基を H (デオキシ類似体)、OCH₃、NH₂ などの置換基で変換することである。しかし、このような仕方では得られた糖鎖をミミックした受容体基質型類縁体は他の糖転移酵素の類縁体基質になってしまい阻害剤としての特異性が下がるという欠点がある。さらに阻害剤としてそのような化合物を培養細胞に作用させても分子が大きいために代謝

Fig. 9 CMP-NeuAc and Its Derivatives.

を受けやすく、ゴルジ体の酵素の極部位にターゲッティングされる確率は低いと考えられる。有効な受容体基質型阻害剤を得るためには受容体基質認識部位に特異的な最小の糖鎖単位にまで絞られた構造を持ち、且つチオグリコシド結合のようなグリコシダーゼに対する保護がされたオリゴ糖がよいのではないかと筆者は考える。

5 おわりに

GM3 の細胞増殖における意義を明らかにしようとする研究が始まって以来、多くの研究者が様々な角度からこの課題に取り組んできた。本論文では GM3 の機能を代謝の面から解明するためには生合成酵素の研究が必須であることと、それらの酵素阻害剤が有用であることを強調した。重要なポイントは酵素阻害剤を用いる方法は培養細胞に適してはいるが、阻害剤の阻害特異性および細胞内分布の情報がなければ判断を誤るので注意を要することを指摘しておきたい。しかし、特異性の高い新規阻害剤の分子設計は、これら生合成酵素の研究には極めて有効な手段である。分子設計にあたっては物理化学者あるいは有機合成化学者をも巻き込んだ広い領域からの展開が必要である。例えば、関連生合成酵素の X 線

結晶構造解析などを利用した Rational Drug Design によりリードとなる候補阻害剤をデザインし、最近、話題となっているコンビナトリアルケミストリー（系統的ランダム固相合成法）等と組み合わせることにより効率的な有用新規阻害剤の探索研究の推進が可能となろう。近い将来、これら新規阻害剤の中から、糖脂質の生体内機能を自由にコントロールできるような医薬品開発のシードが生まれることを期待したい。

最後に、本論文をまとめるにあたり、いろいろと御指導、御助言下さいました小倉 潔博士〔(財)臨床医学総合研究所〕、斎藤恵実教授（静岡県立大、薬学部）、橋本弘信教授（東京工大、生命理工学部）、宮武正教授（昭和薬科大・薬物治療学）、脇道典博士〔(株)生化学工業・東京研究所〕にこの場を借りまして感謝申し上げます。

（受付：1997 年 6 月 3 日，受理：1997 年 6 月 10 日）

文 献

- 1) G. van Echten, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.*, 268, 5341 (1993).
- 2) E.G. Bremer, J. Schlessinger, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.*, 261, 2434 (1986).

- 3) N. Hanai, T. Dohi, G.A. Nores, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.*, **263**, 6296 (1988).
- 4) R.J. Davis, N. Girones, M. Faucher, *J. Biol. Chem.*, **263**, 5373 (1988).
- 5) Y. Igarashi, K. Kitamura, Q.H. Zhov, S. Hakomori, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 77 (1990).
- 6) S. Mathias, K.A. Dressler, M. Faucher, *J. Biol. Chem.*, **88**, 10009 (1991).
- 7) E. Wang, W.P. Norred, C.W. Bacon, R.T. Riley, A.H. Merrill, *J. Biol. Chem.*, **266**, 14486 (1991).
- 8) B. Felding-Habermann, Y. Igarashi, B.A. Fenderson, L.S. Park, N.S. Radin, J. Inokuchi, G. Stras-smann, K. Handa, S. Hakomori, *Biochemistry*, **29**, 6314 (1990).
- 9) Y. Okada, N.S. Radin, S. Hakomori, *FEBS Lett.*, **235**, 25 (1988).
- 10) F.M.B. Weis, R.J. Davis, *J. Biol. Chem.*, **265**, 12059 (1990).
- 11) S. Ichikawa, N. Nakajo, H. Sakiyama, Y. Hirabayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2703 (1994).
- 12) S. Chatterjee, C.C. Sweeley, L.F. Velicer, *J. Biol. Chem.*, **250**, 61 (1975).
- 13) C.A. Lingwood, S. Hakomori, *Exp. Cell Res.*, **108**, 385 (1975).
- 14) J.D. Burczak, J.L. Fairley, C.C. Sweeley, *Biochim. Biophys. Acta.*, **804**, 442 (1984).
- 15) C.L. Schengrund, M.A. Repman, *J. Neurochem.*, **39**, 940 (1982).
- 16) G. Yogeewaran, S. Hakomori, *Biochemistry*, **14**, 2151 (1975).
- 17) S. Usuki, S.C. Lyu, C.C. Sweeley, *J. Biol. Chem.*, **263**, 6847 (1988).
- 18) S. Usuki, P. Hoops, C.C. Sweeley, *J. Biol. Chem.*, **263**, 10595 (1988).
- 19) K. Ogura, C.C. Sweeley, *Exp. Cell Res.*, **199**, 169 (1992).
- 20) S. Chatterjee, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 554 (1991).
- 21) H. Rösner, Ch. Gries, H.P. Rodemann, *Exp. Cell Res.*, **190**, 161 (1990).
- 22) J. Kopitz, C. von Reitzenstein, K. Sinz, M. Cantz, *Glycobiology*, **6**, 367 (1996).
- 23) T. Miyagi, S. Tsuiki, *Eur. J. Biochem.*, **141**, 75 (1984).
- 24) T. Miyagi, J. Sagawa, K. Konno, S. Handa, S. Tuiki, *J. Biochem.*, **107**, 787 (1990).
- 25) T. Miyagi, S. Tsuiki, *J. Biol. Chem.*, **260**, 6710 (1985).
- 26) T. Miyagi, K. Hata, Y.A. Hasegawa, T. Aoyagi, *Glycoconjugate J.*, **10**, 45 (1993).
- 27) M. Zeigler, G. Bach, *Biochemical J.*, **198**, 505 (1981).
- 28) M. Zeigler, V. Sury, G. Bach, *Eur. J. Biochem.*, **183**, 455 (1989).
- 29) H.R. Schneider-Jakob, M. Cantz, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **372**, 443 (1991).
- 30) V. Chigorno, G. Cardace, M. Pitto, S. Sonnino, R. Ghidoni, G. Tettamanti, *Anal. Biochem.*, **153**, 283 (1986).
- 31) M. Lieser, E. Harms, H. Kern, G. Bach, M. Cantz, *Biochem. J.*, **260**, 69 (1989).
- 32) S. Kornfeld, *FASEB J.*, **1**, 462 (1987).
- 33) A. Gonzales, J.H. Grubb, W.S. Sly, *J. Cell Biol.*, **85**, 839 (1980).
- 34) S. Gottschalk, A. Waheed, K. von Figura, *Biochem. Chem. Hoppe-Seyler*, **370**, 75 (1989).
- 35) M.J. Gramer, C.F. Goochee, *Biotechnol. Prog.*, **9**, 366 (1993).
- 36) A. Chiarini, A. Fiorilli, C. Siniscalco, G. Tettamanti, B. Venerando, *J. Neurochem.*, **55**, 1576 (1990).
- 37) T.G. Warner, J. Chang, J. Ferrari, R. Harris, T. McNerney, G. Bennet, J. Burnier, M.B. Sliwowski, *Glycobiology*, **3**, 455 (1993).
- 38) G.T.J. van der Horst, U. Rose, R. Brossmer, F.W. Verheijen, *FEBS Lett.*, **277**, 42 (1990).
- 39) J. Kopitz, C. von Reitzenstein, C. Mühl, M. Cantz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 1188 (1994).
- 40) S.-K. Choi, M. Mammen, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 4103 (1997).
- 41) M. von Itzstein, W.-Y. Wu, G.B. Kok, M.S. Pegg, J.C. Dyason, B. Jin, T.V. Phan, M.L. Smythe, H.F. White, S.W. Oliver, P.M. Colman, J. N. Varghese, D.M. Ryan, J.M. Woods, R.C. Bethell, V.J. Hotham, J.M. Cameron, C.R. Penn, *Nature*, **363**, 418 (1993).
- 42) P. Palese, J. L. Schulman, "Chemoprophylaxis and Virus Infections of the Upper Respiratory Tract", Vol. I, J.S. Oxford. (1977) p. 189.
- 43) C.T. Holzer, M. von Itzstein, B. Jin, M.S. Pegg, W.P. Stewart, W.-Y. Wu, *Glycoconjugate J.*, **10**, 40 (1993).
- 44) T.J. Blick, T. Tiong, A. Sahasrabudhe, J.N. Varghese, P.M. Colman, G.J. Hart, R.C. Bethell, J.L. McKimm-Breschkin, *Virology*, **214**, 475 (1995).
- 45) L.V. Gubareva, R. Bethell, G.J. Hart, K.G. Murti, C.R. Penn, R.G. Webster, *J. Virol.*, **70**, 1818 (1996).
- 46) E.L. Kean, K.J. Bighouse, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7813 (1974).
- 47) C.B. Hirschberg, M.D. Snider, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 63 (1987).
- 48) G.M.S. Mancini, H.R. de Jonge, H. Galjaard, F.W. Verheijen, *J. Biol. Chem.*, **264**, 15247 (1989).
- 49) B. Hoflack, R. Cacan, J. Montreuil, A. Verbert, *Biochim. Biophys. Acta*, **568**, 348 (1979).
- 50) C.B. Hirschberg, S.R. Goodman, C. Green, *Biochemistry*, **15**, 3591 (1976).
- 51) J. Weinstein, E. de Souza, U. Silva, J.C. Paulson, *J. Biol. Chem.*, **257**, 13845 (1982).
- 52) J.-M. Beau, R. Schauer, J. Haverkamp, J.P. Kamerling, L. Dorland, J.F.G. Vliegthart, *Eur. J. Biochem.*, **140**, 203 (1984).
- 53) S. Tuji, A.K. Datta, J.C. Paulson, *Glycobiology*, **6**, v-vii (1996).
- 54) A.K. Datta, J.C. Paulson, *J. Biol. Chem.*, **270**, 1497 (1995).
- 55) Y. Kajihara, T. Ebata, K. Koseki, H. Kodama, H. Matsushita, H. Hashimoto, *J. Org. Chem.*, **60**,

- 5732 (1995).
- 56) H.J. Gross, R. Brossmer, *Glycoconjugate J.*, **4**, 145 (1987).
- 57) J.M. Beau, R. Schauer, *Eur. J. Biochem.*, **106**, 531 (1980).
- 58) H.J. Gross, A. Bünsch, J.C. Paulson, R. Brossmer, *Eur. J. Biochem.*, **168**, 595 (1987).
- 59) G. Herrler, H.J. Gross, A. Imhof, R. Brossmer, G. Milks, J.C. Paulson, *J. Biol. Chem.*, **267**, 12501 (1992).
- 60) H.J. Gross, R. Brossmer, *Eur. J. Biochem.*, **177**, 583 (1988).
- 61) H.S. Conradt, A. Bünsch, R. Brossmer, *FEBS Lett.*, **170**, 295 (1984).
- 62) H.J. Gross, R. Brossmer, *Glycoconjugate J.*, **12**, 739 (1995).
- 63) I. Kijima-Suda, Y. Miyamoto, S. Toyoshima, M. Ito, T. Osawa, *Cancer Res.*, **46**, 858 (1986).
- 64) B.E. Harvey, P. Thomas, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 571 (1993).
- 65) L.D. Cambron, K.C. Leskawa, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 585 (1993).
- 66) R.G. Kleineidam, T. Schmelter, R.T. Schwarz, R. Schauer, *Glycoconjugate J.*, **14**, 57 (1997).
- 67) R.J. Bernacki, W. Kortnyk, "Development of membrane sugar and nucleotide sugar analogs as potential inhibitors or modifiers of cellular glycoconjugates", *The Glycoconjugates*, Vol. IV, Academic Press, (1982), p. 245.
- 68) W. Korytnyk, N. Angelino, W. Klohs, R.J. Bernacki, *Eur. J. Med. Chem.*, **15**, 77 (1980).
-

日本油化学会誌本号掲載 論文要旨

〔総説〕 魚介類の脂質区に出現する有毒成分の性状と起源

安 元 健

東北大学農学部 (〒981 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町1-1)

魚介類の脂質区に出現する有毒成分は関与する中毒のタイプによって、下痢性貝毒、神経性貝毒、シガテラ魚類中毒に3分される。下痢性貝毒の主要成分のオカダ酸とその類縁体は渦鞭毛藻の *Dinophysis fortii* によって生産され、タンパク脱リン酸酵素 2A 型を阻害し、強力な発がん促進物質である。神経性貝毒は渦鞭毛藻 *Gymnodinium breve* を起源とし、エーテル環がはしご状に連結した骨格を特徴とする。シガテラ原因毒のシガトキシン類は渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* を起源とし、同じくはしご状のエーテル環骨格を有する。神経性貝毒とシガテラ毒は電位依存性のナトリウムチャンネルを活性化する。いずれの毒も高度に酸化され、強力な毒性を有し、分子量が大きい。これらの毒の化学的あるいは生化学的定量法を紹介する。

(連絡者：安元 健) Vol. 46, No. 10, 1065 (1997)

〔総説〕 糖脂質 GM3 の機能解明に向けて

— 生合成阻害剤の活用 —

臼 杵 靖 剛

生化学工業(株)東京研究所 (〒207 東京都東大和市立野3-1253)

糖脂質 GM3 は細胞増殖の密度に応じて増加する。細胞膜の GM3 は細胞増殖機能の重要なモジュレーターである。一部分の GM3 の代謝回転は末端に存在するシアル酸残基によって調節されている。GM3 代謝酵素すなわちシアリダーゼとシアル酸転移酵素の活性は細胞分裂している細胞において変化する。両酵素は、上皮成長因子受容体のリン酸化の GM3 が介在する阻害反応とともに、細胞増殖制御において機能している。2-デオキシ-2,3-デヒドロ-N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc2en) は GM3 シアリダーゼの有効な阻害剤であり、細胞増殖阻害効果を示す。新しいインフルエンザウイルス感染の治療法の開発に NeuAc2en よりコンピューターを利用して分子設計された類縁体 (強力な阻害剤) が用いられた。CMP-シアル酸は生理的条件下で NeuAc2en を非酵素的に生成する。生成した NeuAc2en は細胞のシアリダーゼ活性を調節している可能性が指摘できる。GM3 シアリダーゼとシアル酸転移酵素の細胞内での機能を明らかにするためには、細胞内の酵素存在部位にターゲティングされる NeuAc2en および CMP-シアル酸の新タイプの類縁体が分子設計される必要がある。

(連絡者：臼杵 靖剛) Vol. 46, No. 10, 1075 (1997)