総 説

血液細胞分化・増殖と糖脂質

中 村 充

自治医科大学・血液研究所・造血発生

(〒329-04栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1)

Glycosphingolipids in Hematopoietic Cells during Cell Growth and Differentiation

Mitsuru NAKAMURA

Division of Hemopoiesis, Jichi Medical School

(3311-1 Yakushiji, Minamikawachi, Tochigi-ken, 〒329-04)

Abstract : The functional studies of glycosphingolipids in hematology and immunology fields have been discussed in this review. First, (1) Glycolipid antigens known as cell surface differentiation antigens of human leukocytes, (2) glycosphingolipids that determine the differentiation direction of human myelogenous leukemia cell line HL-60 cells, (3) their expression control mechanism, and (4) the control mechanism of cell differentiation by the glycolipids are summarized. Subsequently, (5) sugar chain expression control mechanism of selectin ligands in human B lymphoid cell lines, (6) cytokine (IL-3)-associated and autonomous growth-associated ganglioside GD1a in mouse myelogenous leukemia cell line NFS60 cells, (7) its expression mechanism, and (8) its transcription and cell growth control mechanism through STAT5 are described.

Key words : glycosphingolipids, leukemia cells, cell growth and differentiation, glycosyltransferases, transcriptional control.

1 はじめに

脂質の中でも、糖脂質はその糖鎖の複雑さのゆえに、機能研究の面で随分遅れをとっていた。しかし、近年状況が一変し、細胞分化や発生、細胞接着、細胞及び分子認識、細胞増殖の制御、情報伝達機構などの点で、その生物学的役割が次々と明らかにされはじめた。特に糖転移酵素遺伝子のクローニングの仕事がここ数年次々と発表され、今後は他の分野と同様に遺伝子操作によって知見を積み重ねて行く方向へと急速に展開していきそうな様子である。また、同じくここ数年のセラミドを中心とした研究の急速な進展に伴って、同じスフィンゴシン塩基を持つ脂質部分も、糖鎖を細胞外へプレゼンテーションするための単なる細胞膜へのアンカーというよりも、むしろ情報伝達に直接かかわる分子として機能している可能性を模索する動きも活発になってきた。

これらの方向性は、血液学・免疫学の分野における糖脂質研究でも同様にうかがうことができる。本稿では、血液学・免疫学両分野での糖脂質の機能研究につき、

我々の研究成果にも触れながら解説を試みたい。前半では血液細胞の分化、後半ではその増殖・免疫機能を中心に、糖脂質の機能・糖脂質自体の発現制御機構・ならびに糖脂質の機能の発現メカニズムにつき順次述べることにする。

2 血液細胞分化と糖脂質

2・1 ヒト白血球分化抗原としての糖脂質

糖脂質は以前より、細胞分化・がん(癌)化の問題を中心に、細胞を特徴付けるマーカーとしての解析がなされてきた。ヒトの血液細胞においても、各分化ステージの細胞並びに終末分化細胞は、分化マーカーとして各種糖鎖抗原を発現している。おおまかに言って、リンパ系細胞ではガングリオ系の GM3 とグロボ系の中性糖脂質、骨髄球系細胞ではガングリオ系の GM3 とネオラクト系の中性・酸性糖脂質が主成分となっている (Table 1)。すなわちヒト血球系細胞では、ガングリオ系、ネオラクト系、グロボ系の 3 系列の糖脂質からなっていること、そして特にガングリオ系では最も基本的な GM3 が中心

Table 1 Backbone Structures of Main Glycosphingolipids.

Names	Backbone structures	Abbreviations	Examples
Ganglio series	Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$	Gg	GM3, GD3, GM2, GM1a, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b
Asialo series (α -series)	Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$	Gg	GA2, GA1, GM1b, GD1 α
Globo series	GalNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal α 1 $\rightarrow$ 4Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$	Gb	Gb3, Gb4, Gb5 (Forssman Ag)
Neolacto series	Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$	nLc	nLc4, NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3nLc4, NeuAc α 2 $\rightarrow$ 6nLc4
Lacto series	Gal β 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$	Lc	Lc3, Lc4,

Table 2 Antigenic Sugar Chains Known as Human Leukocyte Differentiation Antigens and Their Related Antigens, Selectins and Sialoadhesins.

CD#	Nomenclatures	Sugar chain structures	Expressing cells
CD17	LacCer	Gal β 1 $\rightarrow$ 4 Glc β 1 $\rightarrow$ Cer	granulocytes, platelets
CD77	Gb3Cer(Gb3)	Gal α 1 $\rightarrow$ 4 Gal β 1 $\rightarrow$ 4 Glc β 1 $\rightarrow$ Cer	B cells
CD60	9-O-Ac-GD3	II ³ (Neu5,9Ac ₂ -Neu5Ac)-LacCer	T cells
CD15	Le ^x	Gal β 1 $\rightarrow$ 4(Fuc α 1 $\rightarrow$ 3) GlcNAc β 1 $\rightarrow$	granulocytes, monocytes
CD15s	sialyl-Le ^x	NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3 Gal β 1 $\rightarrow$ 4(Fuc α 1 $\rightarrow$ 3) GlcNAc β 1 $\rightarrow$	granulocytes, monocytes, lymphocyte subsets
CD65	VIM-2	NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4(Fuc α 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$	myeloid cells
CD57	HNK-1	SO ₄ $\rightarrow$ GlcUA β 1 $\rightarrow$ (Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$) _n 3 Gal β 1 $\rightarrow$	NK cells
n.a.	Le ^y	Fuc α 1 $\rightarrow$ 2Gal β 1 $\rightarrow$ 4(Fuc α 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc β 1 $\rightarrow$	granulocytes
CD#	Nomenclatures	Expressing Cells	Sugar chain ligands
CD62P	P-selectin	activated platelets, activated endothelial cells	sialyl-Le ^x , sialyl-Le ^a , Le ^x , sulfatides
CD62E	E-selectin	activated endothelial cells	sialyl-Le ^x , sialyl-Le ^a , sulfatides
CD62L	L-selectin	leukocytes	sialyl-Le ^x , sialyl-Le ^a
CD22	gp135 antigen	mature B cells	NeuAc α 2 $\rightarrow$ 6Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc
n.a.	sialoadhesin	macrophages	NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3(4)GlcNAc NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3(4)GlcNAc NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc

Le=Lewis type blood group antigens, GlcUA=glucuronic acid, $n=1$ or 2 , n.a.=not assigned.

であることが、全体としての特徴である。この他、酸性糖脂質に分類されるシアリル Le^x も顆粒球、単球、そして一部のリンパ球に発現している。

これらの研究とは独立して、免疫学・血液学の分野では、白血球を認識する抗原を系統的に分類・研究するための仮説的概念 (CD 分類 = clusters of differentiation) が提唱されてきた。その CD 分類の中に糖鎖抗原が数多く入っている。CD 分類は 1982 年以来、数年に

一度の割合で開かれるヒト白血球分化抗原に関する国際カンファランスで、CD 番号が次々と付けられてきた。1993 年 11 月の第 5 回、1996 年 11 月の第 6 回カンファランスを経て、その数 166 にものぼる認識抗原が分類されることになった¹⁾。糖脂質・糖鎖に関係するヒト白血球分化抗原を Table 2 にまとめておいた。まず CD17 は LacCer と同定されていて、主に多形核白血球や血小板において強く発現し、特に多形核白血球の活性化にとも

ない速やかに消失することが知られている²⁾。筆者らも CD17 強陽性の骨髓球系幹細胞の HL-60 が、単球系・顆粒球系を問わず細胞分化に伴って速やかに CD17 陰性になることを、化学的にも免疫学的にも確認している³⁾。次いで CD77 は Gb3 と同定され、特にリンパ節胚中心の B 細胞に強く発現している⁴⁾。また昨今世を騒がせている、病原性大腸菌 O157 の出すヴェロトキシンのレセプターとしても知られている。CD60 は、9-*O*-Ac-GD3 などの非還元末端糖鎖構造である 9-*O*-Ac-NeuAc α 2 $\rightarrow$ 8NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal と同定されて、T リンパ球に強く発現している⁵⁾。CD15 は Le^x で、SSEA-1 抗原とも呼ばれる。この抗原の発現については沢山の研究がなされているが、特に血小板表面の P-セレクトンのリガンドとして細胞接着に関与していることが報告されている⁶⁾。Sialyl-Le^x は第 5 回のカンファランスで CD15 に sialic acid の意味で添字を付けて CD15s と呼ぶことが提唱された。顆粒球、単球、そして一部のリンパ球上に発現していて P-セレクトンや活性化血管内皮細胞表面の E-セレクトンのリガンドとして細胞接着に作用している^{7)~9)}。また、白血球上の L-セレクトンのリガンドとしても細胞接着に関与していると報告されている¹⁰⁾。骨髓球系細胞の他、リンパ球系細胞では NK 細胞、ALL に発現しているものの CLL や悪性リンパ腫には発現しないことが報告されている¹¹⁾。CD65 はシアル酸とフコースを含む 7 糖構造 (NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4(Fuc α 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$) と同定されている¹²⁾。この抗原は好中球をはじめ、急性及び慢性骨髓球系白血病細胞に特に強く発現している。CD75 は α 2 $\rightarrow$ 6 シアル酸転移酵素依存性の糖鎖抗原であることが推定されている¹³⁾。成熟 B 細胞、T 細胞に発現するが、未熟なプレ B 細胞やミエロマ細胞には発現しない。しかも、骨髓球系細胞には発現しないとされているが、最近我々は骨髓球系細胞の単球系分化で抗 CD75 抗体反応性の糖タンパク質が発現することを見いだしている¹⁴⁾。これに関連して、シアル酸を末端に持つ糖鎖 (NeuAc α 2 $\rightarrow$ 6Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc, NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3(4)GlcNAc, NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc) をリガンドとする新しい細胞接着分子としてシアロアドヘシン・ファミリー分子が報告されている。そのうち

CD22, シアロアドヘシン, CD33 はそれぞれ細胞、マクロファージ、骨髓系細胞・単球に発現している。シアリル Le^x またはシアリル Le^a 糖鎖をリガンドとする有名な細胞接着因子セレクトンは、P-セレクトンが CD62P, E-セレクトンが CD62E, L-セレクトンが CD62L と大文字の添字をつけて表現することになっている。これら以外にも、CD ナンバーが振られていないいくつかの糖鎖抗原が、ヒト白血球表面膜上に発現する。Le^x にさらにフコースのついた Le^y やポリラクトサミンの側鎖構造を持つ I 活性糖鎖などである。これらは血液細胞の分化ステージならびに活性化状態に応じた発現をし、特に後者はすべての成熟 B 細胞株に強く、多くの T 細胞株でわずかに発現し、そして NK 細胞株では全く発現しないことが報告されている¹⁵⁾。さらに、硫酸基をもつ硫酸糖脂質も注目を集め、セレクトンのリガンドなどとして次々と報告されている^{16), 17)}。

2.2 血液細胞分化を方向付ける糖脂質

血液細胞は、骨髓中の totipotent な血液幹細胞が pluripotent $\rightarrow$ oligopotent $\rightarrow$ unipotent $\rightarrow$ 終末分化細胞へと分化して造られる。それぞれの分化ステージや終末分化細胞のみならず、分化過程そのものにおける糖脂質の役割も解析されてきた。骨髓性白血病細胞株 HL-60 を単球系に分化させると、ネオラクト系ガングリオシドが減少して GM3 が著明に増加し、顆粒球系に分化させたときは、ネオラクト系ガングリオシドが増加し GM3 が減少した¹⁸⁾ (Table 3)。多能性幹細胞由来と考えられる K562 を用いた解析から、GM3 が赤血球系分化では減少し、巨核球系分化とともに GM3 が増加した¹⁹⁾。このように、白血病細胞の分化に伴って糖脂質の合成系列の選別が起こり、糖脂質組成が特徴的に変化する。つまり、顆粒球系分化ではポリラクトサミン直鎖構造をもつネオラクト系ガングリオシドが主要な構成成分となり、単球・マクロファージ系分化および巨核球系分化ではガングリオ系の GM3 が主成分となるのである。

このような糖脂質の特徴的発現は、次のような実験事実から、白血病細胞表面上のフェノタイプを単に定めているだけでなく、細胞分化方向を決定している因子の一つである可能性が判明した (Table 3)。まず、無血清培地中で生育中のヒト骨髓性白血病細胞株 HL-60 に、高

Table 3 Gangliosides and Cell Differentiation of Human Myelogenous Leukemia HL-60 Cells.

Inducers	Differentiation lineages	Ganglioside patterns
TPA	monocytoid	GM3 $\uparrow$, neolacto-series gangliosides $\downarrow$
RA, DMSO	granulocytoid	GM3 $\downarrow$, neolacto-series gangliosides $\uparrow$
GM3	monocytoid	
neolacto-series gangliosides	granulocytoid	

TPA=tetradecanoylphorbol-13-*O*-acetate, RA=all-*trans* retinoic acid, DMSO=dimethyl sulfoxide.

度に精製した GM3 を添加すると、顕著な増殖抑制が観察され、単球・マクロファージ系細胞に変化していた²⁰⁾。HL-60 のみならず、ヒト単球性白血病細胞株 U937 も単球系成熟細胞へ分化誘導する活性を示した²¹⁾。また、完全化学合成した GM3 にも、このような分化誘導活性を認めたことから、精製過程で除去できなかった夾雑物による現象ではないことが示された²²⁾。さらに、GM3 は K562 細胞を巨核球系に分化させ、その分化誘導活性は細胞の種類と分化ステージにより、その分化方向が影響を受けることが判明した¹⁵⁾。一方、顆粒球系分化現象で増加するネオラクト系ガングリオシドを用いると、HL-60 細胞は顕著な増殖抑制を示し、明瞭な顆粒球系成熟細胞へ分化した²³⁾。また、レチノイン酸耐性の HL-60 細胞亜株も、ネオラクト系ガングリオシドの外來性添加により、成熟顆粒球へと分化させることができた²⁴⁾。

2・3 血液細胞分化能を有する糖脂質の発現制御

血液細胞分化の方向性の決定に特定の糖脂質が関与しているとする、その糖脂質の生合成のコントロールそのものが分化の方向性の決定に重要であることが推察できる。では、どのように機能性糖脂質の生合成がコントロールされているのであろうか？ HL-60 細胞の単球・マクロファージ系及び顆粒球系の 2 方向性分化を例にとって、糖転移酵素活性の変動の全体像を解析した結果、次のことが判明した²⁵⁾。a) ネオラクト系ガングリオシド生合成の下流域にある酵素群が、どちらの分化方向でもほぼ常にアップレギュレートされているか活性レベルが維持されている。b) 単球系分化では、GM3 合成酵素がアップレギュレートされる一方、ネオラクト系ガングリオシド生合成の最上流域にある Lc3Cer 合成酵素 (*N*-アセチルグルコサミン転移酵素) がダウンレギュレートされる。そのため、下流域の酵素群の活性化にもかかわらず結果としてネオラクト系糖脂質の合成が抑えられる。c) 顆粒球系分化では、GM3 合成酵素が不変なのに対し、ネオラクト系ガングリオシド生合成の最上流域にある Lc3Cer 合成酵素がアップレギュレートされているため、下流域の酵素群の活性化とあいまってネオラクト系糖脂質の合成が上昇する。

このことは、糖脂質生合成経路最上流の 2 つのキーエンザイムである GM3 合成酵素と Lc3Cer 合成酵素の活性化が他の下流域の糖転移酵素群よりも相対的に重要で、いわば律速段階にあたるものと考えられる。この 2 つの律速酵素のスイッチ ON-OFF のメカニズムが、糖脂質生合成経路の選別ならびに細胞分化の方向性の決定に重要な働きを担っていることを示唆しているものと考えられた。

他のグループも同様のデータを出していて、ヒトの白血病細胞株のうち骨髓系細胞株のみがネオラクト系の糖

脂質を発現し、リンパ系細胞株で発現しない理由として、合成経路最上流の Lc3Cer 合成酵素の活性が鍵を握っているとしている²⁶⁾。つまり、合成経路下流域のラクトサミンユニット伸長酵素は骨髓球系細胞のみならずリンパ系細胞株でも高活性だが、最上流の Lc3Cer 合成酵素はリンパ球系細胞株には発現せず、骨髓球系細胞株においてのみ発現している。そのため、リンパ球系細胞株ではネオラクト系のほうには代謝の流れが行かず、ネオラクト系の糖脂質が発現しないのである。

2・4 糖脂質による分化制御メカニズム

ガングリオシドがどのように白血病細胞の分化を誘導するのかについては、まだ充分には解明されていない。しかし、現在までのところ次のような実験事実が判明している。すなわち、(1) GM3 によりプロテインキナーゼ C の活性化がおこるが、GM3 による HL-60 の単球系分化は、プロテインキナーゼ C 抑制剤であるスフィンガンニン (長鎖塩基) によってブロックされない²⁷⁾。このことは、GM3 による HL-60 の単球・マクロファージ系分化では、プロテインキナーゼ C が活性化されるがそれは重要な役割を担っていないことを示唆している。(2) HL-60 の場合、分化誘導能を持たない GM1 に比べて、分化を誘導できる GM3 は 2~4 倍ほど速く取り込まれ、GM3 の取り込み曲線は高親和性と低親和性の 2 相性のパターンを示し、細胞側に特定の糖脂質の認識機構が存在している可能性が示唆された²⁸⁾。(3) 分化を誘導できる濃度の GM3 は、GM1 に比べ、細胞内にインターナライズされやすく、緩やかにしか代謝されない GM1 に対し、分化能を有する GM3 は速やかに変化を受けていた²⁹⁾。(4) 外來性 GM3 により、HL-60 細胞内での糖脂質生合成が亢進し、特に酸性糖脂質では GM3 の生合成が高まっていた³⁰⁾。それはタンパク合成の結果としてのものであること、殊に GM3 合成酵素活性の亢進によることが示唆された。もちろん、こうした GM3 量の増大は、細胞分化が観察されるかなり前に起こっており、細胞分化に重要な一過程を担っているものと推定された。

特に (2)~(4) は、GM3 による HL-60 の単球・マクロファージ系分化において、GM3 の代謝回転が亢進していることを示唆している。外來性の GM3 が細胞に組み込まれると、それ自身は速やかな代謝を受けるが、外來性 GM3 のインターナライズが引き金となって、単球系分化のキーエンザイムである GM3 合成酵素の活性化のスイッチが入るのであろう。これが他の代謝変化と相まって、細胞分化のプログラムのスイッチを ON にしていると同時に、分化方向の決定に重要な役割を演じているものと示唆された。

細胞分化プログラムのスイッチを ON にするものとして最近特に注目されているのが、セラミドである。ス

フィンゴシンとともにセカンドメッセンジャーとして、細胞表面から細胞内へのシグナル伝達に関与しているとされている³¹⁾。特に Okazaki 及び Hannun らは、セラミドにより HL-60 細胞が単球系に分化誘導されることを発表した³²⁾。さらに Kolesnick らは糖脂質の生合成をブロックしてやると、単球系分化時に HL-60 細胞が接着性を失うという報告をしている³³⁾。我々の実験でも、コントロールの GM1 に比べて外来性の GM3 がセラミドにまで速やかに分解され、長期間細胞内で高レベルで維持されることが判明した²⁹⁾。スフィンゴシン、セラミドを研究しているグループは、GM3 などの糖脂質に由来するセラミドは細胞分化に無関係であると主張しているが、今後、糖脂質代謝・スフィンゴミエリン代謝全体を見すえたトータルな研究・解析が特に望まれる。

ここで扱っている白血病細胞の分化誘導現象は、分化させることにより造腫瘍性を低下させたり完全に喪失させたりするので、制癌という観点から大変注目を集めている。特に、オールトランスのレチノイン酸 (ATRA) が急性前骨髄性白血病の臨床例に著効を示すことから、この領域の重要性がうかがえる³⁴⁾。この報告が出る前から、我々も急性骨髄性白血病患者の末梢血を組織培養し、その培養液中に GM3 を添加して単球系細胞へ分化させ、顕著な増殖抑制を示した。このことは、ガングリオシドによる分化誘導現象を白血病治療に応用できる可能性を強く示唆している。さらに、天然には存在しない、人工シアロ糖化合物である α -シアロコレステロールや α -シアロジグリセリドが HL-60 細胞を顆粒球系に分化させる活性を有していることもわかり³⁵⁾、大量に調製、あるいは有機化学合成が難しい GM3 にかわって、*in vivo* の実験あるいは臨床への応用に大きな展望が開けてくるものと思われる。特に、レチノイン酸抵抗性の臨床例に、ネオラクト系ガングリオシドを組み合わせることで、治療が可能となるかも知れない。

3 血液細胞増殖・免疫機構と糖脂質

3・1 血液細胞増殖・免疫機構に関与する糖脂質

血液細胞の分化マーカーとしての糖脂質研究は、主にヒトにおいて特になされてきたが、マウスでも研究が進みつつある。有賀らはマウスの骨髄球性およびリンパ球性白血病細胞株の糖脂質の解析から、中性糖脂質では GalCer, LacCer が単球性ないし骨髄単球性白血病細胞に特徴的であり、アシアロ系 (ガングリオ系) の GA1 が骨髄芽球性ないし顆粒球性、T 細胞リンパ性白血病細胞にそれぞれ特徴的であると報告した³⁶⁾ (Table 1)。さらに、酸性糖脂質では GM1a, GM1b, GalNAc-GM1b などが骨髄球性白血病細胞に特徴的であった。特に興味深いのがマウスヘルパー T 細胞のサブセットを特

徴付けるマーカーとしてガングリオシドを挙げた Mührladt らの報告である³⁷⁾。彼らによると、GD1a によって特徴付けられるのが T_{H1} で、GD1a によって識別されるのが T_{H2} であるという。T_{H1} に特徴的な GD1a は T_{H2} にもわずかに存在するが、GD1a の方は T_{H2} だけに発現し T_{H1} には認められないという (GD1a, GD1a の構造については Fig. 1 の説明文参照)。ヘルパー T 細胞のサブセットのマーカーとして大変有効なものと考えられる。

我々もマウス血液細胞における GD1a の特徴的発現を、全く別のアプローチで解析している。つまり、サイトカイン依存性という性質を持ったマウスの骨髄性白血病細胞株、特にインターロイキン-3 (IL-3) 依存性株に IL-3 遺伝子を導入して、IL-3 非依存性の自律性増殖株を樹立した。そのガングリオシド組成を解析したところ、GM1b 及び GD1a が親株にも導入株にも等しく認められたのに対し、GD1a が導入株だけに特徴的に発現していたのである (Fig. 1)。GD1a 発現は、親株の IL-3 依存性株を大量の IL-3 で増殖刺激したときにも認められたことから、IL-3 による細胞増殖に密接に関連する糖脂質と考えられた³⁸⁾。また、自律性増殖能を獲得した IL-3 導入株は抗 IL-3 抗体存在下で増殖抑制がかからず、抗 IL-3 抗体は GD1a 発現を抑制しなかった。このことから、正常な IL-3 レセプターの働きを介さず、細胞内自己分泌機構 (intracellular autocrine mechanism) により自律性増殖が可能になっていること、並びに GD1a の発現自体も自律性増殖そのものに関係したものであることが推定された³⁹⁾。また、増殖因子依存性を有する状態から、非依存性の自律性増殖能を獲得する段階、すなわち癌化のステージが一段階進展するときに出現することから、GD1a は一つの癌関連糖脂質と呼ぶことができるものと考えられた。

3・2 細胞増殖・免疫に関連した糖鎖の発現制御

糖鎖の生合成全体の動きが、合成経路最上流のほぼ一つの糖転移酵素の活性の変動によってコントロールされていることを、前述の 2・3 項で記した。このことを示す実験事実は他にも例がある。我々のマウスのサイトカイン (IL-3) 関連ガングリオシド GD1a の発現のコントロールに関しても、その構造 (NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4(NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3)Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$ Cer) を鑑みて、末端の方からシアル酸転移酵素 (GD1a 合成酵素)、ガラクトース転移酵素、N-アセチルガラクトサミン転移酵素、シアル酸転移酵素 (GM3 合成酵素) について、親株と導入株とで順次酵素活性を測定していった。すると、合成経路下流域の転移酵素群は有意な差がなくいずれも十分な酵素活性を有していたのに対し、合成経路最上流の GM3 合成酵素のみが IL-3 導入株でアップレギュレートされていた³⁸⁾ (Fig. 1)。これも糖

Fig. 1 Switching "ON" of GM3 Synthase Activities and IL-3-associated Ganglioside GD1a Biosynthesis after IL-3 Gene Transfection and Acquiring Autonomous Growth Capability in Murine Myelogenous Leukemia NFS60 Cells.

Before acquiring autonomous cell growth, NFS60 cells exhibited low activities of GM3 synthase as shown in the upper part $\times$ and expressed only GM1b and GD1 α with very little amount of GD1a. After IL-3 gene introduction in the cells, however, GM3 synthase activities were up-regulated resulting IL-3-associated ganglioside GD1a expression as shown in the middle part in addition to GM1b and GD1 α .

GD1a :

GD1 α :

脂質生合成全体の流れが下流域の合成酵素群ではなく、合成経路最上流のただ一つの律速酵素によってコントロールされていることを物語っている。

もう一つの例は、ヒト B リンパ球系細胞におけるセレクトリンリガンド、sialyl-Le^x の発現がコア 2 N-アセチルグルコサミン転移酵素のみによってコントロールされているという実験結果である。これは糖脂質ではなく、糖鎖の生合成が複雑きわまりないコントロールではなく、比較的シンプルな制御を受けてすることを示す例としてここに挙げてみたい。未熟な分化段階の B 細胞性白血病細胞株にのみ KM93 単クローン抗体に反応する sialyl-Le^x が発現していて、成熟細胞株には発現しない。フコース転移酵素もシアル酸転移酵素も、ガラクトース転移酵素も、sialyl-Le^x 発現には関係なかったが、唯一コア 2 N-アセチルグルコサミン転移酵素のみ sialyl-Le^x 発現にパラレルだった^{(40),(41)}。また、ホルボールエステルによってプレ B 細胞をより成熟な表面マーカーを持つ細胞へと分化させたとき、フコース転移酵素もシアル酸転移酵素も、ガラクトース転移酵素も、その発現がほとんど変動しなかったのに対し、唯一コア 2 N-アセチルグルコサミン転移酵素のみ sialyl-Le^x 発現にパラレルにダウンレギュレートされていた。コア 2 N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を強制発現させると、ホルボールエステルによる sialyl-Le^x 発現のダウンレギュレーションがブロックできたことから、コア 2 N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子の発現が sialyl-Le^x を介した細胞接着現象をコントロールしているものと考えられた⁽⁴²⁾。さらに、コア 2 N-アセチルグルコサミン転移酵素発現の動きは、臨床サンプルでも活性化 B 細胞でも観察された⁽⁴³⁾。このシステムは非常にシンプルかつユニークなもので、B 細胞には sialyl-Le^a は存在せず、sialyl-Le^x のみ発現している。また、E-セレクトリンのみに依存する細胞接着を示し、P-セレクトリンは無関係である。さらに、糖脂質性の sialyl-Le^x も、N-型結合の糖タンパク質性 sialyl-Le^x も発現せず、O-型結合の糖タンパク質性 sialyl-Le^x のみ発現している。この単純なシステムは、糖鎖の生合成のコントロールを研究するのに非常に便利で、コア 2 N-アセチルグルコサミン転移酵素の転写制御の研究に用いている⁽⁴⁴⁾。他にリンパ球の活性化に重要な役割を果たしていると考えられる leukosialin (CD43) のムチン型糖鎖も、コア-2 骨格構造上に発現される。ただ一つこの酵素活性のレギュレーションが CD43 のムチン型糖鎖構造全体を決めている⁽⁴⁵⁾。このことから、さらにその糖鎖上にセレクトリンリガンドが発現する⁽⁴⁶⁾ことから、そして 2・3 項で述べた Lc3Cer 合成酵素の働きからも、糖鎖における N-アセチルグルコサミン転移酵素の解析は重要であると考えられる。

以上のことを考えあわせると、糖脂質・糖タンパク質を問わず糖鎖の生合成全体の動きが、ありとあらゆる糖転移酵素一つ一つが複雑に支配されていてコントロールされるというよりも、むしろキーとなる一つ二つの糖転移酵素を媒介にして全体が制御されるという、非常にシンプルなメカニズムになっている可能性が高いものと思われる。 $\beta 1 \rightarrow 4$ ガラクトース転移酵素遺伝子の 5'-上流に SP-2 サイトが⁽⁴⁷⁾、また $\alpha 2 \rightarrow 6$ シアル酸転移酵素遺伝子の 5'-上流に AP-1 サイトがある⁽⁴⁸⁾ことが知られているように、上述のキーエンザイム、GM3 合成酵素と Lc3Cer 合成酵素などの遺伝子上流にも何らかの転写調節因子が関与するサイトの存在が予想される。事実、コア-2 N-アセチルグルコサミン転移酵素において、我々はある転写調節因子による遺伝子発現・活性発現・

Fig. 2 Involvement of IL-3-Associated Ganglioside GD1a in IL-3 Signal Transduction in Murine Myelogenous Leukemia NFS60 Cells.

In the IL-3-transfected NFS60 cells, IL-3 molecules may act intracellularly on the signal transduction pathways both on cell growth and, probably, on GM3 synthase activation. Activated GM3 synthase results in the biosynthesis IL-3-associated ganglioside GD1a. GD1a enhances STAT5 tyrosine phosphorylation and phosphorylated STAT5 may act as transcriptional activator on cell growth.

シアリル Le^x 発現のコントロールにつき解析し、データを得はじめている⁴⁹⁾。また最近われわれは、律速段階をつかさどる酵素の一つである GM3 合成酵素遺伝子のキャンディデートをクローニングすることができた。以降の解析により、ガングリオ系ガングリオシドの生合成のコントロールについての知見も蓄積して行くことが予想される。

3.3 糖脂質による増殖制御メカニズム

セレクトリンリガンドについては、その機能はかなりはっきりしているが、3.1 項で述べたマウス骨髓球系白血球細胞における IL-3 関連ガングリオシド GD1a の機能については、当初細胞増殖に関係することが示唆されるだけで、充分解明されてはいなかった。そこで我々は、最近急速に進展した細胞内増殖シグナル伝達機構の解析結果を参考にして、次のようなことを明らかにした。すなわち、この IL-3 関連ガングリオシド GD1a は自律性増殖能を獲得した細胞表面のフェノタイプを単に特徴付けているのではなく、IL-3 によるタンパクのチロシンリン酸化を促進的に調節していた^{50), 51)}。チロシンリン酸化が亢進したターゲット分子は、免疫沈降および免疫プロット法により、STAT5 と同定された。GD1a は IL-3 レセプターの下流で転写調節因子 STAT5 のチロシン残基のリン酸化を促進し、STAT5 の核内への速やかに移行を促して、細胞増殖関連遺伝子の転写をスタートさせるものと考えられる (Fig. 2)。Müldradt らのマウスヘルパー T 細胞のサブセットのマー

カーとしての報告³⁷⁾を合わせて考えると、これまで余り注目されてこなかった GD1a というガングリオシドが、免疫や細胞増殖シグナル伝達などに深く関与していることを示唆していて興味深い。

4 結 語

本稿では、我々が携わってきた糖脂質 (糖鎖) の、血液細胞分化・増殖・免疫機構における発現とその発現制御メカニズム、およびシグナル伝達を中心にした糖脂質の作用メカニズムについて解説を試みた。まだまだ不十分な解明しかなされておらず、いまだに広大な未開拓領域が存在している。しかし、急速な勢いで進展する情報伝達などの分野における知見とあいまって、糖脂質を生合成する酵素の遺伝子操作による細胞生物学的な機能解析が、今まさに始まっているというのが現状である。

謝 辞

最後に、本稿の執筆機会を与えてくださいました、近畿大学理工学部の宮澤三雄先生、並びに生化学工業東京研究所の臼杵靖剛博士に、そして共同研究者の自治医大・造血発生の角田敦子博士、同血液科の桐戸敬太博士、同造血発生の古川雄祐博士、同造血発生の福田有紀子技官、北大医学部癌研生化学の斎藤政樹教授をはじめとする多くの方々に深謝いたします。

(受付: 1997 年 6 月 12 日, 受理: 1997 年 6 月 19 日)

文 献

- 1) S.F. Schlossman, L. Boumsell, W. Gilks, J.M. Harlan, T. Kishimoto, C. Morimoto, J. Ritz, S. Shaw, R. Silverstein, T. Springer, T.F. Tedder, R. F. Todd, "Leukocyte Typing V", Oxford Univ. Press, Oxford, England, (1995).
- 2) F.W. Symington, *J. Immunol.*, **142**, 2784 (1989).
- 3) 中村 充, 角田敦子, 福田浩子, 照井康仁, 迫江公巳, 斎藤政樹, 生化学, **64**, 670, (1992).
- 4) B. Dorken, A. Moller, A. Pezzutto, R. Schwartz-Albiez, G. Moldenhauer, "Leukocyte Typing. IV" Oxford Univ. Press, Oxford, England (1989), p. 118
- 5) B. Knip, W.A. Flegel, H. Northoff, E.P. Rieber, *Blood*, **82**, 1776 (1993).
- 6) E. Larsen, T. Palabrica, S. Sajer, G.E. Gilbert, D.D. Wagner, B.C. Furie, B. Furie, *Cell*, **63**, 467 (1990).
- 7) M.J. Polley, M.L. Phillips, E. Wayner, E. Nudelman, A.K. Singhai, S. Hakomori, J.C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6224 (1991).
- 8) M.L. Phillips, E. Nudelman, F.C.A. Gaeta, M. Perez, A.K. Singhai, S. Hakomori, J.C. Paulson, *Science*, **250**, 1130 (1990).
- 9) G. Walz, A. Aruffo, W.E. Kolanus, M. Bevilacqua, B. Seed, *Science*, **250**, 1132 (1990).
- 10) E.L. Berg, J. Magnani, R.A. Warnock, M.K. Robinson, E.C. Butcher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1048 (1992).
- 11) K. Ohmori, T. Yoneda, G. Ishihara, K. Shigeta, K. Hirashima, M. Kanai, S. Itai, T. Sasaoki, S. Arii, H. Arita, R. Kannagi, *Blood*, **74**, 255, (1989).
- 12) B.A. Macher, J. Buehler, P. Scudder, W. Knapp, T. Faizi, *J. Biol. Chem.*, **263**, 10186 (1988).
- 13) S. Munro, B.J.E.G. Bast, K.J. Colley, T.F. Tedder, *Cell*, **68**, 1003 (1992).
- 14) 中村 充, 角田敦子, 迫江公巳, 山野井仁子, 成松久, 斎藤政樹, 生化学, **63**, 788 (1991).
- 15) K. Ohmori, A. Takada, T. Yoneda, Y. Buma, K. Hirashima, K. Tsuyuoka, A. Hasegawa, R. Kannagi, *Blood*, **81**, 101 (1993).
- 16) A. Aruffo, W. Kolanus, G. Walz, P. Fredman, B. Seed, *Cell*, **67**, 35 (1991).
- 17) Y. Imai, D.D. Tue, M. S. Singer, S.D. Rosen, *J. Cell Biol.*, **111**, 1225 (1990).
- 18) H. Nojiri, F. Takaku, T. Tetsuka, K. Motoyoshi, Y. Miura, M. Saito, *Blood*, **64**, 534 (1984).
- 19) M. Nakamura, K. Kirito, J. Yamanoi, T. Wainai, H. Nojiri, M. Saito, *Cancer Res.*, **51**, 1940 (1991).
- 20) M. Saito, H. Terui, H. Nojiri, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 223 (1985).
- 21) H. Nojiri, F. Takaku, Y. Terui, Y. Miura, M. Saito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 782 (1986).
- 22) 明石真言, 野尻久雄, 小川智也, 永井克孝, 斎藤政樹, 脂質生化学研究, **28**, 177 (1986).
- 23) H. Nojiri, S. Kitagawa, M. Nakamura, K. Kirito, Y. Enomoto, M. Saito, *J. Biol. Chem.*, **263**, 7443 (1988).
- 24) S. Kitagawa, H. Nojiri, M. Nakamura, R.E. Gallagher, M. Saito, *J. Biol. Chem.*, **264**, 16149 (1989).
- 25) M. Nakamura, A. Tsunoda, K. Sakoe, J.-G. Gu, A. Nishikawa, N. Taniguchi, M. Saito, *J. Biol. Chem.*, **267**, 23507 (1992).
- 26) C.L. Stults, B.A. Macher, *Arch. Biochem. Biophys.*, **303**, 125 (1993).
- 27) V.L., Stevens, E.F. Winton, E.E. Smith, N.E. Owens, J. M. Kinkade Jr., A.H. Merrill Jr., *Cancer Res.*, **49**, 3229 (1989).
- 28) M. Nakamura, H. Ogino, H. Nojiri, S. Kitagawa, M. Saito, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 782 (1989).
- 29) M. Nakamura, A. Tsunoda, Y. Furukawa, T. Sakai, M. Saito, *FEBS Lett.*, **400**, 350 (1997).
- 30) M. Nakamura, A. Tsunoda, Y. Furukawa, T. Sakai, M. Saito, (in preparation) (1997).
- 31) R. Kolesnick, *Prog. Lipid Res.*, **30**, 1 (1991).
- 32) T. Okazaki, A. Bielawska, R.M. Bell, Y.A. Hannun, *J. Biol. Chem.*, **265**, 15823 (1990).
- 33) C.C. Kan, R.N. Kolesnick, *J. Biol. Chem.*, **267**, 9663 (1992).
- 34) M.E. Huang, Y.C. Ye, S.R. Chen, J.R. Chai, J. X. Lu, L. Zhao, L.J. Gu, Z. V. Wang, *Blood*, **72**, 567 (1988).
- 35) M. Saito, H. Nojiri, H. Ogino, A. Yuo, H. Ogura, M. Itoh, K. Tomita, T. Ogawa, Y. Nagai, S. Kitagawa, *FEBS Lett.*, **271**, 85 (1990).
- 36) T. Ariga, K. Yoshida, K. Nemoto, M. Seki, N. Miyatani, R.K. Yu, *Biochemistry*, **30**, 7953 (1991).
- 37) F. Ebel, E. Shmitt, J. Peter Katalinic, B. Knip, P. F. Mühlradt, *Biochemistry*, **31**, 12190 (1992).
- 38) A. Tsunoda, M. Nakamura, K. Kirito, K. Hara, M. Saito, *Biochemistry*, **34**, 9356 (1995).
- 39) M. Nakamura, K. Kirito, A. Tsunoda, K. Hara, Y. Furukawa, M. Saito, *Glycoconj. J.*, **13**, 255 (1996).
- 40) 中村 充, 角田敦子, 古川雄祐, 北川誠一, 酒井尚雄, 石田 孝, 白枡靖剛, 井ノ口仁一, 生化学, **68**, 731 (1996).
- 41) M. Nakamura *et al.*, (submitted) (1997).
- 42) M. Nakamura *et al.*, (submitted) (1997).
- 43) M. Nakamura *et al.*, (in preparation) (1997).
- 44) M. Nakamura *et al.*, (in preparation) (1997).
- 45) M.F.A. Bierhuizen, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.*, **269**, 4473 (1994).
- 46) K. Maemura, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.*, **267**, 24379 (1992).
- 47) G.F. Hollis, J.G. Douglas, N.L. Shaper, J.H. Shaper, J.M. Stafford-Hollis, R.J. Evans, I. R. Kirsch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 1069 (1989).
- 48) E.C. Svensson, B. Soreghan, J.C. Paulson, *J. Biol. Chem.*, **265**, 20863 (1990).
- 49) M. Nakamura *et al.*, (in preparation) (1997).
- 50) 角田敦子, 中村 充, 原 健二, 古川雄祐, 大田雅嗣, 斎藤政樹, 生化学, **65**, 697 (1993).
- 51) M. Nakamura *et al.*, (in preparation) (1997).

[総説]

血液細胞分化・増殖と糖脂質

中 村 充

自治医科大学・血液研究所・造血発生 (〒329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1)

本稿では、血液学・免疫学両分野での糖脂質の機能研究につき、我々の研究成果に触れながら解説を試みたい。まず、ヒト白血球分化抗原としての糖脂質糖鎖についてまとめたあと、ヒト骨髓性白血病細胞株 HL-60 の2方向性分化の分化方向を決定付ける糖脂質とその発現制御メカニズム、そしてその糖脂質による細胞分化制御メカニズムにつき述べる。次いで、ヒト B リンパ球細胞株の接着に関与する糖鎖の発現制御機構、及びマウス骨髓性白血病細胞株 NFS60 の自律性増殖にともなったサイトカイン (IL-3) 関連ガングリオシド GD1a の発現調節機構、その GD1a による STAT 5 を介した転写調節・細胞増殖促進メカニズムにつき詳述する。

(連絡者: 中村 充) Vol. 46, No. 10, 1109 (1997)

[総説]

トリアシルグリセリン組成の分析法

鎌 田 恒 夫

十文字女子大学社会情報学部社会情報 (〒352 埼玉県新座市菅沢 2-1-28)

トリアシルグリセリン (TG) 組成分析法について概説し、酸化法により安価な TLC-FID 装置を用いて油脂の TG 組成が高感度で分析できることを例に挙げて示した。本法では無数に存在する TG 分子種を S_3 , S_2U , SU_2 , U_3 の4つの TG 組成に単純化するので、そのデータ解析は非常に簡単である。したがって、TG 組成に基づいて要求される物性の食用油脂を自由に調製することによって高分解能 HPLC や GLC と同様の TG 分子種分析が可能である。

(連絡者: 鎌田 恒夫) Vol. 46, No. 10, 1117 (1997)

[総説]

生体調節機能を持つ脂質成分

日比野 英 彦

日本油脂株式会社王子工場食品研究所 (〒114 東京都北区豊島 4-18-11)

植物ステロール (シトステロール), γ -オリザノール (β -シトステロールフェルラ酸エステル), シトスタノール脂肪酸エステル, ホスファチジルコリン, *sn*-1-オレオイル-*sn*-2-ドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンおよび脂肪酸第一級アミドのような脂質化合物に関する生体の調節機能をレビューした。

植物ステロール, γ -オリザノール, シトスタノール脂肪酸エステルは血清脂質の代謝を改善した。

特に, γ -オリザノールは中枢神経系に良い効果を与える。

脂質化合物群, ホスファチジルコリン, *sn*-1-オレオイル-*sn*-2-ドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンおよび脂肪酸第一級アミドは自然なレム睡眠を誘導した。

(連絡者: 日比野英彦) Vol. 46, No. 10, 1127 (1997)