糖鎖の構造と機能

梶本哲也 昭和大学薬学部 Tetsuya KAJIMOTO || 伊田喜光 昭和大学薬学部 Yoshiteru IDA

細胞表層に存在する複合糖鎖の生物学的機能は高次構造を有する糖鎖に抗体、酵素、レクチンなどの糖認識タンパクが結合することによって発現する。E-セレクトインのリガンドとなるシアロリス X を中心に、エネルギー的に安定な構造と生理活性を発現する構造の違いならびに糖鎖類似体の設計について概説する。

1. はじめに

複合糖質として細胞表層に発現している「糖鎖」は、遺伝子の支配を受けながらも、生命の普遍性よりはむしろ生命の多様性を顕示する役割を演じていると考えられる。A 型抗原を赤血球膜上に発現している父母からは決して B 型の子供は誕生せず（遺伝子支配）、B 型の人には A 型の人が持たない糖鎖（B 型抗原）を発現（多様性顕示）する。この事実はその典型的な例と言えよう。

今日までに複合糖鎖として生体試料から精製された糖鎖は、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、グルコサミン、ガラクトサミン、シアル酸など、比較的限られた種類の単糖から構築されている。また、糖鎖が結合している相手によって、糖脂質、糖タンパク、グリコサミノグリカンの 3 つのグループに大別されている。個々の糖鎖はそれぞれのグループに特徴的な糖シークエンス（一次構造）と機能を有している。これら糖鎖の生物学的機能は糖鎖の一次構造に基づく高次（立体）構造によって発現しているはずである。最近の機器分析の進歩はめざましく、最新の技術を駆使してシアロオリゴ糖鎖（シアル酸を含有するオリゴ糖鎖）の立体構造の解析が盛んに行われている。

そこで本稿では、核磁気共鳴 (NMR) スペクトルや X 線結晶解析等により立体構造が明確になった生理活性シ

アロオリゴ糖鎖の構造と機能の関係について最近の話題を中心に話を進める。また、プロテオグリカンの一つであるヘパリン/ヘパラン硫酸を例に今後に残された課題についても触れる。

2. 糖鎖の立体構造の表現方法とエキソアノメリック効果について

糖鎖の二次構造はタンパクやペプチドの場合と同様に、各ユニット（単糖）間のエーテル結合（グリコシル結合）に関わる 2 つの 2 面角で表現される。すなわち、エーテル酸素を介して結合する非還元末端側の 1 位の炭素と還元末端側の X 位の炭素との間の 2 つの結合の回転に関して、 $H_1-C_1-O-C_X$ および $H_X-C_X-O-C_1$ をそれぞれ ϕ と ψ で表わす。これらはモデルの上では自由回転が可能であるが、実際にはエキソアノメリック効果や構成単糖どうしの相互作用（立体障害や水素結合）によって回転可能な範囲が制限されている。

Lemieux らは、グリコシド結合 (OR) は C_1-C_2 結合とアンチペリプラナー（同一平面上逆平行）となる配座が最安定であることを見出し、これをエキソアノメリック効果と命名した。また最近、岸らは C-グリコシドも O-グリコシドと類似のコンフォメーションをとることを発見し、本効果が立体障害に起因するとしている¹⁾。α-グリコシドも β-グリコシドも、エキソアノメリック効果を受けて $R-X-C_1-C_2$ がなす角度がほぼ 180° となるために、β-D-グリコシド結合では $(\phi, \psi) = (-60^\circ, 0)$ 、

Structure and Bioactivity of Oligosaccharides

梶本哲也 昭和大学薬学部 (142 東京都品川区旗の台 1-5-8) 助教授、薬博 1982 年徳島大薬学部卒、1984 年京大大学院薬学研究科修士課程修了。1986 年熊本大教務員、1987 年助手、1990 年スクリッパ医学研究所博士研究員、1991 年理研国際フロンティアシステム研究員、1992 年副チームリーダー、現在は研究推進委員、1996 年より昭和大薬学部助教授。

〈趣味〉バトミントン

伊田喜光 同上・教授、薬博 (写真右)

1964 年九大医学部薬学科卒、1996 年大学院薬学研究科修士課程修了。1966 年九大薬学部助手、1979 年昭和大助教授、1995 年教授。

図1 エキソアノメリック効果に支配されたグリコシド結合の安定立体配座

図2 GD_{1a} 糖鎖の安定配座とシアル酸結合のアンチペリプラナー型およびシンクリナル型配座 (括弧内の値は HSEA により計算された距離)

α -D-グリコシド結合は(ϕ, ψ)=(-60°, 0)となる(図1)。

3. ガングリオシド糖鎖の安定な立体構造と生理活性発現の構造

では、グリコシド結合の立体配座の安定化に寄与するエキソアノメリック効果はそのまま糖鎖全体の立体配座の安定化に寄与するのであろうか。

1991 年 Sabesan らは 600 MHz NMR を用いてガングリオシド GD_{1a} の立体配座解析を行った²⁾。彼らは、水に対する溶解度が低い糖脂質の濃度を高めるために GD_{1a} からオゾン分解とそれに続くアルカリ処理により糖鎖部分を切り出し、その ¹H-NMR と ¹³C-NMR シグナルを詳細に帰属し、さらに NOESY を測定して立体的に近接する H-H 間の距離を算出した(図2)。一方で彼らは、GD_{1a} 糖鎖について HSEA (hard sphere exo-anomeric) 法を用いて非結合原子間相互作用とエキソアノメリック効果を考慮した分子力場計算を行い、その最安定配座が末端シアル酸部分を除いて NOESY の結果と良く一致することを確認した²⁾。HSEA 計算によると、安定立体配座であるアンチペリプラナー型配座の場合には H-3(d)/H-3ax(e), H-3(d)/H-8(e), H-8(e)/H-4(d) 間の水素原子間距離はそれぞれ 2.11 Å, 4.37 Å, 2.58 Å, シンクリナル配座ではそれぞれ 4.15 Å, 2.80 Å, 4.64 Å になる。一方、NOESY 実測によると H-3(d) は H-3ax(e) との距離は 2.71 Å と計算されると同時に H-1(c) と H-3eq(f) との間に弱い NOE が観察された。このことは末端のシアル酸がアンチペリプラナー型だけでなく、一部シンクリナル型も混在している可能性を示唆する。いずれにしても、GD_{1a} 糖鎖の中性糖部分の立体構造はもっぱらエキソアノメリック効果によって制御されている。これに対して、シアル酸部分は多少の自由度を持ちながらも、1 位カルボキシル基の立体障害のために、大方はアンチペリプラナー構造を取るものと考えられる。

4. シアロルイス X の安定構造と活性発現の構造

次に、糖脂質と糖タンパク双方に存在が確認されているシアロルイス X を例に考察してみよう。シアロルイス X は N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコース、シアル酸から構成される四糖であり(図3)、白血球や癌細胞の表層に存在し、血管内皮細胞上に発現される E-セレクトインのリガンドとして働くことが知られている³⁾。最近、この E-セレクトインとシアロルイス X との相互作用が炎症部位への白血球の遊走の引き金となっていることが認められた。このことはシアロルイス X が E-セレクトインと白血球との相互作用を阻害できることを示唆し、シアロルイス X は新規な抗炎症剤として期待されている。

Wong らは糖転移酵素のドナー基質である糖ヌクレ

図3 シアロルイス X のアンチペリプラナー型配座(上)とシンクリナル型配座(下)

オチドを再生するシステムを作り上げ、シアロルイス X の大量合成を可能にした。また、彼らは ^{13}C -ラベルしたシアロルイス X を調製し、カップリング定数 ($J_{\text{C-H}}$ 値) を測定するとともに ROESY などの NMR スペクトルを詳細に解析した (図 3 上図)⁴⁾。その結果、この場合も GD_{1a} 同様、シアル酸結合はアンチペリプラナー型配座であり、中性糖のグリコシド結合はエキソアノメリック効果に支配されていることを裏付けている。

一方、シアロルイス X-グルコシルセラミドの全合成に成功した長谷川、木曾らは、フコース、ガラクトースの水酸基を水素に置換した数種のシアロルイス X 類似体を合成し、E-セレクトインに対する結合能力を詳細に検討した。その結果、フコースの 3 個の水酸基、ガラクトースの 4,6-位の 2 個の水酸基、シアル酸のカルボキシル基が E-セレクトインとの結合に必須であると結論した⁵⁾。

上記の背景を基に、著者らはシアロルイス X 類似体としてペプチドを含むテトラマー (1) と二糖体 (2) を合成した (図 4)。これらはいずれも E-セレクトインとの結合に必須とされる 5 つの水酸基と 1 つのカルボキシル基を備えており、活性を検討したところ、実際にシアロルイス X と同等またはそれ以上の E-セレクトイン結合活性を示した⁶⁾。

ところが最近、ガラクトースの 4,6-位水酸基の必要性に疑問を投げかけるデータが 2 つのグループから報告された。一つは漢方薬甘草の成分であるグリチルリチンのアグリコンをテンプレートとした C-フコース誘導体 (3) であり⁷⁾、もう一つは L-フコースと同じ立体配置の 2 級水酸基をもつ D-マンノースとピフェニル酢酸との複合体 (4) である⁸⁾。いずれの分子もガラクトースの 4,6-位水酸基に相当する水酸基を持っていないにもかかわらず、シアロルイス X より E-セレクトインに強く結合する。著者らも甘味料として汎用されているステビオシドをテ

ンプレートとして類似体 (5) を合成した⁹⁾。

ところで、シアロルイス X はそれ自身の最安定配座を堅持したまま E-セレクトインと結合するのであろうか。Cooke ら (1994 年) は、距離情報は ROESY よりトランスファー NOE からの方が得やすいことを利用して、リガンドとタンパクの親和性が μM から mM レベルであるシアロルイス X の立体配座解析を行い、E-セレクトインと結合するときのシアロルイス X はそれ自身の最安定立体配座とは異なる配座を取ると予想した¹⁰⁾。Scheffler ら (1995 年) は E-セレクトインと結合しているシアロルイス X の構造を NOE スペクトルの解析によって詳細に検討し、NOE 値 (%) から糖残基間の距離を算出した (表 1)。さらに、モンテカルロ法 (Metropolis Monte Carlo: MMC) によって得られた 457,309 個の立体配座の中から上述の NOE の結果を満足する 29 個の構造を抽出し、その平均的立体構造を求め、E-セレクトインと結合しているシアロルイス X の構造がシンクリナル型配座に近似していると推定した (図 3 下図)¹¹⁾。

また最近、スイスのグループは、シアロルイス X の構造中のルイス X 部分は比較的固く、シアル酸部分のみが高い自由度を持っていることに注目し、カルボキシル基を安定配座の配向と一致・固定させたシアロルイス X 類似体 (図 4-6) を合成し、これが E-セレクトインと結合しないことを確認した¹²⁾。

一方、E-セレクトインの X 線結晶解析の結果¹³⁾を基に考察すると、シアル酸のカルボキシル基は安定配座では Lys111 や Lys113 と水素結合し、シンクリナル配座では Arg97 と結合すると予想される。また、Lys113 をグルタミン酸に点変異させた E-セレクトインもシアロルイス X のリセプターになり得る。以上のことは、シアロルイス X の安定立体構造が単独の場合と E-セレクトインと結合した場合との間で大きく異なることを示唆する¹⁴⁾。

図 4 シアロルイス X とシアロルイス X 類似体の構造

表1 NOEより算出されたシアロロイス X
残査上のプロトン間距離

	NOE (%) complex (free)	Lower limit <i>r</i> (Å)	Upper limit <i>r</i> (Å)
H1(Fuc) - H3(GlcNAc)	- 37 (- 8)	2.3	2.6
H1(Fuc) - NAc(GlcNAc)	- 9 (- 1)	2.8	3.3
H5(Fuc) - H2(Gal)	- 8 (- 15)	2.9	3.4
H5(Fuc) - H6(Gal)	- 12 (- 1)	2.7	3.1
Me(Fuc) - H2(Gal)	- 20 (- 4)	2.5	2.9
H1(Gal) - H4(GlcNAc)	- 45 (- 20)	2.2	2.5
H3(Gal) - H8(Sia)	- 37 (0)	2.3	2.6
H3 _{ax} (Sia) - H3(Gal)	0 (- 4)	4.0	
H3 _{eq} (Sia) - H3(Gal)	0 (0)	4.0	

5. インフルエンザウイルスはシアロオリゴ糖鎖の 安定構造を認識するか？

ところで、動物細胞表層のシアロオリゴ糖は細菌やウイルスのリガンドとして働くこともあり、その結合はこれら外敵の侵入の第一段階となる。特にインフルエンザウイルスの外殻タンパクであるヘマグルチニンおよびシアリダーゼとシアロオリゴ糖鎖との結合は詳細に研究されている。鈴木らの研究によると、近年流行しているインフルエンザウイルスのヘマグルチニンは2,3-シアロ結合よりもむしろ2,6-シアロ結合を認識する傾向がある。すなわち α -D-NeuAc(2-6)- β -D-GalOR 構造はインフルエンザウイルスが宿主細胞の表層を認識する足場としてマークされ¹⁵⁾、インフルエンザウイルスの増殖はその後のシアロ酸の酵素的加水分解により開始される。

還元末端側の糖の6位に糖が結合している場合の高度構造の検討には、前述の ϕ と ψ に加えて還元末端側の糖の C₅-O₆ の回転をも考慮する必要がある、その2面角を ω で表わすことが提唱されているが、一般には C₅-O₆ の2面角をゴーシュ (g), トランス (t) の組み合わせで表現する方法が使われている (図5)。Sabesan, Bock らによると、水溶液中の α -D-NeuAc(2-6)- β -D-Gal-OR の C₅-O₆ 結合は主としてゴーシュ・トランス (gt) 型であり、tg や gg 型はマイナーである。一方、Lemieux ら (1980 年) は、グルコースやガラクトースの6位メチレンプロトンの一方をメチル基に置換して C₅-O₆ 結合を tg/gt 型に固定する方法を開発した。Sabesan と Bock ら (1994 年) は本法を用いて α -D-NeuAc(2-6)- β -D-Gal-OR に本法を適用し、ガラクトース6位の *pro-R* および *pro-S* の水素をメチル基に置換し、その C₅-O₆ 結合をそれぞれ tg および gt 型に固定することに成功した¹⁶⁾。また、彼らは前者が後者より速くシアリダーゼによる解裂を受けることを明らかにした。さらにガラクトース6位の酸素原子を硫黄に置換したチオシアロシ

図5 シアロ糖鎖の tg 配座と gt 配座

ドを合成し、tg-チオシアロシドが gt-チオシアロシドより強いシアリダーゼ阻害剤になることを明らかにした。

以上のことはシアリダーゼが水溶液中ではマイナーである tg 型を認識していることを示しており、シアロロイス X の場合と同様、糖鎖認識タンパクが非最安定構造を認識する例である。

6. ヘパリンの構造と繊維芽細胞成長因子

最後に、医療用医薬品 (抗血液凝固剤) としても利用されてきた糖鎖、ヘパリン/ヘパラン硫酸について議論したい。近年、ヘパリン/ヘパラン硫酸が塩基性繊維芽細胞成長因子 (b-FGF) と結合し、細胞の増殖に関与していることが明らかとなってきている。ヘパリンに限らず、グリコサミノグリカンと呼ばれる一群の糖鎖は基本的にアミノ糖と酸性糖が交互に結合した繰り返しの構造をしており、ヘパリンの b-FGF-結合領域 (ドメイン) は2,6-硫酸化イブロン酸と N-硫酸グルコサミンが β 1-4 結合で繰り返した六糖を構成単位とすると推定されている (図6)。

Linhardt, Rees ら (1996 年) は、この六糖と b-FGF との複合体の結晶について X 線解析を行った。その結果、Idu-3 は ¹C₄ 配座、Idu-5 は ²S₀ 型のスクューボート配座であることを明らかにした。このことは、ここでのヘパリン/ヘパラン硫酸が b-FGF の立体構造に影響していないことを意味している¹⁷⁾。

その一方で、Ornitz, Waksman ら (1995 年) は、硫酸基を持たない三糖である α -L-IdoA (1-4)- α -D-GlcNAc(1-4)- β -D-GlcA-1-OMe も b-FGF と結合し、強い細胞増殖活性 (マイトジェニック効果) を発現すると報告している¹⁸⁾。彼らは、この三糖と b-FGF との複

図6 ヘパリン／ヘパラン硫酸中の b-FGF 結合領域の構造とその類似体の合成計画

合体の X 線結晶解析を行い、Linhardt, Rees らが提唱した糖鎖認識部位と異なる部位でマイトジェニック効果が発現すると予測し、この部位は水素結合の数から、b-FGF の二量化を惹起すると予想した。彼らはさらに、N-アセチル基の代わりに N-硫酸基を有する α -L-IdoA (1-4)- α -D-GlcNSO₃-(1-4)- β -D-GlcA-1-OMe がマイトジェニック効果を全く示さないことから、N-硫酸基は活性発現に関係なく、酸性糖の O-硫酸基が重要であることを指摘している。

以上の知見を基に、著者らも L-スレオニンアルドラーゼを用いた反応を利用してヘパリンの構成酸性糖であるイズロン酸の類似体 (4-アザイズロン酸) の調製ならびにこれを用いた人工 b-FGF 結合ドメインの合成を行っている (図6)¹⁹⁾。

7. おわりに

糖鎖は抗体、酵素、レクチン等の糖鎖認識タンパクによって認識されて生理活性を発現する。本稿では立体的に安定な構造と生理活性を発現する構造とが異なる糖鎖を中心に述べてきた。現実には、上述のような明確な構造-活性相関が得られた例は稀である。糖鎖の構造と機能の相関が次々と解明され、糖鎖医薬品あるいは糖鎖モデル医薬品の開発が近いことを願っている。

終わりに臨み、共同研究者である Chi-Huey Wong 教授 (スクリッパ医学研究所, 理研・国際フロンティア) ならびにシアロルイス X 類縁体の合成研究にご協力いただいた諸氏に感謝いたします。また、朝倉哲郎教授 (東京農工大学工学部) にはペプチド様シアロルイス X 類縁体の立体構造解析を行っていただき、お礼を申し上げます。

文 献

- 1) S. A. Babirad, Y. Wang, P. G. Goekjian, Y. Kishi: *J. Org. Chem.*, **52**, 4819 (1987)
- 2) S. Sabesan, J. O. Duus, T. Fukunaga, K. Bock, S. Ludvigsen: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3236 (1991)
- 3) M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. Hakomori, J. Paulsen: *Science*, **250**, 1132 (1990). J. B. Lowe, L. M. Stoolman, R. P. Nair, R. D. Larsen, T. L. Berhend, R. M. Marks: *Cell*, **63**, 475 (1990)
- 4) Y. Ichikawa, Y.-C. Lin, D. P. Dumas, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9283 (1992)
- 5) A. Hasegawa, T. Ando, M. Kato, H. Ishida, M. Kiso: *Carbohydr. Res.*, **257**, 67 (1994)
- 6) T. Uchiyama, V. P. Vassilev, T. Kajimoto, W. Wong, H. Huang, C.-C. Lin, C.-H. Wong: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5395 (1995); K. Hiruma, T. Kajimoto, G. Weitz-Schmidt, I. Ollmann, C.-H. Wong: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, in press (1996)
- 7) B. N. N. Rao, M. B. Anderson, J. H. Musser, J. H. Gilbert, M. E. Shaefer, C. Foxall, B. K. Brandley: *J. Biol. Chem.*, **269**, 19663 (1994)
- 8) T. P. Kogan, B. Dupre, K. M. Keller, I. L. Scott, H. Bui, R. V. Market, P. J. Beck, J. A. Voytus, B. M. Revelle, D. Scott: *J. Med. Chem.*, **38**, 4976 (1995)
- 9) T. Ikeda, T. Nohara, T. Kajimoto, C.-H. Wong: *unpublished*.
- 10) R. M. Cooke, R. S. Hale, S. G. Lister, G. Shah, M. P. Weir: *Biochemistry*, **33**, 10591 (1994)
- 11) K. Scheffler, B. Ernst, A. Katopodis, J. L. Magnani, W. T. Wang, R. Weismann, T. Peters: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 1841 (1995)
- 12) G. Thoma, F. Schwarzenbach, R. O. Duthaler: *J. Org. Chem.*, **61**, 514 (1996)
- 13) B. J. Graves, D. K. Burns: *Nature*, **367**, 532 (1994)
- 14) C. R. Bertozzi: *Chemistry and Biology*, **2**, 703 (1995)
- 15) Y. Suzuki: *Yakugaku Zasshi*, **113**, 556 (1993)
- 16) S. Sabesan, S. Neira, F. Davidson, J. O. Duus, K. Bock: *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1616 (1994)
- 17) S. Faham, R. E. Hileman, J. R. Fromm, R. J. Linhardt, D. C. Rees: *Science*, **271**, 1116 (1996)
- 18) D. M. Ornitz, A. B. Herr, M. Nilson, J. Westman, C.-M. Svahn, G. Waksman: *Science*, **268**, 432 (1995)
- 19) M. Kaneko, T. Kajimoto, Y. Ida, C.-H. Wong: *unpublished*.