細胞膜表面糖鎖による細胞間コミュニケーション

橋本康弘・中村京子・東 秀好・鈴木明身

理研フロンティア・生体超分子研究グループ ☎351-0198 和光市広沢2-1

1. はじめに

人間は60兆個もの細胞によって構成されている。それぞれの細胞は異なった形と機能を持っており全体として調和のとれた細胞社会を作って個体を形成している。これらの細胞は“糖衣”と称される糖鎖によっておおわれている。糖鎖の構造は細胞種に特異的であり、細胞の活性化や分化の過程で劇的に変化する。したがってこれらの糖鎖は、細胞社会においてどんな細胞種が存在し、どのような分化段階にあるかを示す情報分子であろうと推測されている。またこの糖鎖情報を受容し、細胞間相互作用を仲介する分子が存在すると予想されている。しかし、この仮説がどこまで普遍化できるのかは現時点では必ずしも明確でない。本

総説では以下に述べる解析の進捗状況が異なる3つの糖鎖受容体研究の例をあげ、この仮説の将来について若干の考察を加えてみたい。

2. 糖鎖受容体の存在とその生理的意義が明確にされているもの

具体例はセレクトリン・ファミリー (E-, P-, およびL-セレクトリン) に属する分子群である。例えば、E-およびP-セレクトリンは血管内皮上に存在し、白血球上のリガンド糖鎖を認識して、炎症時の白血球の血管外への遊走を仲介することが知られている¹⁾。すなわち、炎症巣で生じたサイトカインの作用により局所の血管内皮上にE-およびP-セレクトリンが発現される。これらのセレクトリンは白血球上のリガンド糖鎖と相互作用することにより白血球のローリングを引き起こす。リガンド糖鎖とセレクトリンの相互作用はアフィニティーは低い、結合速度が速いため、血管内のような流れのある環境でも作用しうると考えられている。このローリングの過程の後に、白血球の血管内皮への強い接着が生じる。これは炎症巣や血管内皮から供給される走化性因子のシグナルを受けて細胞接着因子であるインテグリンの活性化が起こり、血管内皮上のインテグリン・リガンド (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) との相互作用が生じるためである。この接着は細胞の変形を伴うような強い接着である。この過程に引き続いて、白血球が血管内皮間をすり抜けて血管外へ出てゆく遊走の過程が観察される。インテグリン依存性の接着は強固なものであるが、血流の場で直接白血球を捕捉することはできない。インテグリン依

Cellular Communications Mediated by Cell Surface Glyco-chains and Their Glyco-receptors

Yasuhiro Hashimoto, Kyoko Nakamura, Hideyoshi Higashi, and Akemi Suzuki

Supra-Biomolecular Research Group, RIKEN Frontier Research System, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

All mammalian cells have "glycocalix" on their surface, which comprises glycolipids, glycoproteins, and proteoglycans. Structures of carbohydrate chains in the glycocalix are cell type specific, and are known to change dramatically during the process of cellular activation or differentiation. Thus, these carbohydrates have been regarded to be potential signaling molecules to show what kind of cells are present in the cellular society and which differentiation stages they are. In this context, it has been hypothesized that there must be "glyco-receptors", which receive the signals and mediate cellular communications. Only a few cases, however, have been identified so far, and a little is known about how they mediate cellular communications. In the present review, we would like to summarize the results of these "glyco-receptor" researches and discuss the future of this research field.

Key words : selectins / Siglecs / glyco-chains / glyco-receptors

Table 1 Siglec family proteins

Common name		Ligand	Distribution	Target
Siglec-1	Sialoadhesin	Sia α 2,3Gal	macrophage	lymphocyte
Siglec-2	CD22	Sia α 2,6Gal	B cell	T cell
Siglec-3	CD33	Sia α 2,3Gal	myeloid precursor cell	stroma cell
Siglec-4a	Myelin associated glycoprotein (MAG)	Sia α 2,3Gal	myelin	axon
Siglec-4b	Schwann cell myelin protein (SMP)	Sia α 2,3Gal	avian myelin	axon
Siglec-5	OB-BP2 (leptin-binding protein-2)	Sia α 2,3/6Gal	neutrophil monocyte	unknown
Siglec-6	OB-BP1 (leptin-binding protein-1)	Sia α 2,6GalNAc	B cells placenta	unknown
Siglec-7		Sia α 2,3/(6)Gal	NK cell monocyte	unknown
Siglec-8		Sia α 2,3/6Gal	eosinophil	unknown
Siglec-9		Sia α 2,3/6Gal	monocyte neutrophil	unknown

存性の接着に先んじてセレクトイン依存性の相互作用が必須である。事実、セレクトインのノックアウト（特にP-およびE-セレクトインのダブルノックアウト）マウスではインテグリン系は正常であるにもかかわらず、白血球の遊走が著しく低下している²⁾。以上のことから糖鎖と糖鎖受容体の相互作用はインテグリン依存性の蛋白質間相互作用と質的に異なる細胞間相互作用を仲介していることが理解される。

以上述べたようにセレクトイン依存性の細胞間相互作用は *in vitro* のみならず *in vivo* での生理的意義も確立されている。しかし、他の糖鎖受容体でセレクトインと同様に“認知”されたものはいまだ無いと言って良い。裏返せば糖鎖依存性の細胞間相互作用が普遍性を持つためには、他の事例が数多く実証されなければならない。以下に第2のセレクトインとなるべき一群の分子群について述べる。

3. 糖鎖受容体の存在が実証されているがその生理的意義が必ずしも明確でないもの

具体例はシグレック・ファミリーに属する分子群である。シグレック (Siglec) という名称は Sialic acid-binding Ig super family lectins に由来している³⁾。ファミリー蛋白質はcDNAクローニングによりその一次構造が明らかにされ、イムノグロブリン・スーパーファミリー (Ig super family) に属することが示されている。またすべ

てのシグレックはシアル酸 (sialic acid) を末端に持つオリゴ糖鎖をリガンドとする。神経系に存在する Siglec-4 以外は主に血球系細胞に細胞種特異的に発現されている (Table 1)。また、多くのシグレックは ITIM (immune receptor tyrosine-based inhibitory motif) と称される抑制性のシグナル伝達に関わる細胞内ドメインを持っている。事実、Siglec-3 や Siglec-7 の ITIM には細胞の活性化を抑制するフォスファターゼ (SHP-1 や SHP-2) が結合する。すなわち ITIM は細胞の過剰な増殖反応を抑える作用を持つと想定される。例えば Siglec-7 を発現している NK 細胞は、免疫学的なプライミングを受けずに癌細胞やウイルス感染細胞を殺傷する能力を持っているが、この殺傷能力は正常細胞に対して発揮されてはならない。このため NK 細胞は抑制性のレセプターを持つと考えられている。ごく最近、Siglec-7 が NK 細胞の抑制性シグナルの一部を担っていることが示された⁴⁾。すなわち、抗体によって Siglec-7 を架橋すると Siglec-7 の ITIM がリン酸化され、ここに SHP-1 が結合して NK 細胞の細胞障害活性が抑制されるのである。B 細胞に発現されている Siglec-2 (CD22) が過剰な抗体産生を抑制することも示されている。事実 Siglec-2 のノックアウトマウスは過剰な抗体産生による自己免疫反応を示している^{5,6)}。

このようにシグレックの一次構造、糖鎖結合特性、発現パターン、さらには機能の一部が解明されているにもかかわらず、重要な点が未解決なままである。それは、シグレックの持つ糖鎖結合

活性がシグレックの機能に必須であるか否かが検証されていないのである。上記のNK細胞やB細胞での抑制性のシグナル伝達に関しても、シグレックに対する抗体を加えることによって活性化をミミックしているだけである。糖鎖リガンドの結合が抗体と同様の反応を誘導するかどうかは全く検証されていない。より事態を複雑にしているのは、多くのシグレックがリガンドとして認識する Sialyl alpha2,3 or 6 Gal 構造が生体中にごくありふれたものであり、血清中においては糖蛋白質糖鎖という形でミリモル・オーダーの高濃度で存在していることである。また、多くのシグレックは発現細胞自身が持つ糖鎖によって（すなわち細胞膜上のシスの相互作用によって）糖結合サイトがふさがれている。すなわちシグレック周囲の環境には生理的な状況においてリガンド糖鎖が大量に存在し、常に糖鎖を結合した状態にあるように見える。ただし、これはシグレックときわめて弱い相互作用をしている糖鎖が存在するというだけかもしれない。すなわちシグレックには高親和性を示す真の内因性リガンドというべき分子が存在する可能性が考えられる。高親和性を示す真のリガンド分子にとっては、低親和性の血清糖蛋白質や cis に存在する膜糖蛋白質などは何の阻害効率も持たないかもしれない。そして、真のリガンドが提示されたときのみ、Siglec の生理的活性化が起こるのかもしれない。いずれの Siglec においても真の内因性リガンドとみなしうる分子が同定されていない。この分子を同定することがシグレックの生体内における意義を理解するキーポイントとなるのではないかと考えている。

4. 糖鎖受容体の存在が示唆されているがその本体が実証されるにいたっていないもの

糖鎖受容体の存在が示唆されているものの多くはその本体が実証されるにいたっていない。そのような1例として我々の研究グループの東による研究を紹介したい。

我々は糖脂質を研究対象としているが、糖脂質

は（特に酸性糖脂質であるガングリオシドは）脳神経系組織の重要な構成要素である。事実、糖脂質は脳において他の臓器と比べて100倍以上の高濃度で含まれており、神経機能との関連が想定されている。特に、神経芽細胞腫に糖脂質を加えると神経突起を誘導する現象が注目を集めている。しかし、これらの糖脂質がどのようなメカニズムで作用しているかはほとんど解明されていない。糖脂質によって誘導されるシグナル系を解析する一環として細胞内キナーゼに注目した。対象としたキナーゼは、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II) およびサイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) の2種である。これらのキナーゼは、記憶の細胞レベルでのモデルと考えられている長期増強の成立に必須である。東らはそれぞれのキナーゼに特異的なペプチド基質に蛍光色素を結合した。この蛍光基質は細胞膜を透過するので、細胞外液に加えることによって細胞質内にロードできる。細胞内キナーゼが活性化されると基質ペプチドはリン酸化され蛍光シグナルを与えるのでキナーゼの活性化の程度や細胞質内の分布を調べられる^{7,8)}。そこでこの方法を海馬由来の初代培養神経細胞に応用した。興味深いことに GT1b や GM2 ガングリオシドを細胞培養液へ添加するとそれぞれ細胞内 CaMK II や PKA を活性化することが示された。PKA の活性化は GM2 以外にも、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を末端に含む糖脂質や糖鎖によって引き起こされた。またこの活性化は培養神経芽細胞腫 (NG108-15 細胞) でも観察された。使用した糖鎖リガンド、特にオリゴ糖鎖は細胞膜を透過しないと考えられるので、神経細胞の細胞表面上には糖鎖受容体が存在し、この活性化によって細胞内キナーゼの活性化が引き起こされる可能性が考えられた。そこで GT1b 糖鎖や GalNAc 糖鎖を持った人工糖鎖プローブを作製しこれを使って、糖鎖受容体活性の検出を試みた。これらの糖鎖プローブは NG108-15 細胞に高親和性に特異的結合を示した。さらにこれらの糖鎖プローブを細胞培養外液に加えることによって、それぞれ細胞内 CaMK II および PKA の活性化が誘

導された。以上の結果は、NG108-15細胞上に高親和性の糖鎖受容体が存在することを示している。今後この糖鎖受容体のcDNAクローニング、受容体の神経系における分布、およびその作用機序を解明したいと考えている。

5. おわりに

紙面の都合で、述べなかったが、シグレックに対する人工糖鎖プローブの結合を調べたところ、セレクトインと糖鎖リガンドの結合と同様に結合および解離速度が著しく早い反応であることが判明した。また神経細胞上の糖鎖受容体と糖鎖プローブの結合も比較的反応速度の速いものであった。シグレックは主に血球細胞で発現されておりセレクトイン同様血流中で働くために早い反応速度が必要なのかもしれない。一方神経細胞の受容体は、当初細胞間接着（シナプス形成）に関連するかもしれないと考えていたが、真のリガンドは神経刺激によって放出される糖鎖（糖蛋白質あるいは糖脂質）なのかもしれない。すなわち神経伝達物質としての糖鎖を想定すべきかもしれない。一般に糖鎖依存性結合は弱い結合親和性しか示さず、生理的な意義をもち得ないとみなされてきたが、これは静的なパラメーターである解離定数（Kd）のみに注目しているからではないかと思われる。少数の実験例で推論する危険を顧みずに個人的な印象を述べれば、糖鎖依存性結合の特徴の1つは、早い結合と解離の速度にあるように思われる。今

後は速度定数をも考慮した解析が必要であろう。いずれにしても神経細胞上の未知の糖鎖受容体やシグレックのような研究の途上にあるものの生理機能を解明することを通じて、細胞間コミュニケーションにおける糖鎖の意義を理解してゆきたいと考えている。

文 献

- 1) M. Fukuda, N. Hiraoka, J.-C. Yeh : *J. Cell Biol.*, **147**, 467-470 (1999)
- 2) A. Etzioni, C. M. Doerschuk, J. M. Harlan : *Blood*, **94**, 3281-3288 (1999)
- 3) P. R. Crocker, E. A. Clark, M. Filbin, S. Gordon, Y. Jones, J. H. Kehrl, S. Kelm, N. Le Douarin, L. Powell, J. Roder, R. L. Schnaar, D. C. Sgroi, K. Stamenkovic, R. Schauer, M. Schachner, T. K. Van den Berg, P. A. Van der Merwe, S. M. Watt, A. Varki : *Glycobiology*, **8**, v (1998)
- 4) M. Falco, R. Biassoni, C. Bottino, M. Vitale, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Moretta, A. Moretta : *J. Exp. Med.*, **190**, 793-801 (1999)
- 5) T. L. O'Keefe, G. T. Williams, S. L. Davies, M. S. Neuberger : *Science*, **274**, 798-801 (1996)
- 6) K. L. Otipoby, K. B. Andersson, K. E. Draves, S. J. Klaus, A. G. Farr, J. D. Kerner, R. M. Perlmutter, C. L. Law, E. A. Clark : *Nature*, **384**, 634-637 (1996)
- 7) H. Higashi, K. Sato, A. Omori, M. Sekiguchi, A. Ohtake, Y. Kudo : *NeuroReport*, **7**, 2695-2700 (1996)
- 8) H. Higashi, K. Sato, A. Ohtake, A. Omori, S. Yoshida, Y. Kudo : *FEBS Lett.* **414**, 55-60 (1997)