解説

動物細胞に作らせるオリゴ糖鎖のライブラリー

佐藤 智典[§]

慶應義塾大学理工学部生命情報学科

Construction of Oligosaccharide Libraries using Mammalian Cells

Toshinori Sato

Department of Biosciences and Informatics, Keio University

1. はじめに

食品の分野では、澱粉のような高分子からブドウ糖や果糖などの低分子量の糖に至るまで、多くの糖質が材料として利用されている。また最近では、オリゴ糖は機能性食品の大部分を占めており、大きな注目を集めるようになった。食品分野では、オリゴ糖鎖は遊離の状態で作られることが多いが、生体中に存在している機能性のオリゴ糖鎖は糖脂質や糖タンパク質などの複合糖質として存在している。食品として摂取した糖鎖が生体内での複合糖質の生合成の原料としても使われている場合もある。細胞の表層は糖鎖で覆われていることから、細胞間の相互作用にとって糖鎖の役割は大きい。糖鎖が血液型抗原であることを初めとして、細胞の分化、増殖、アポトーシス、組織形成、免疫、あるいは毒素やウイルスの受容体など様々な分野での糖鎖の役割が明らかになってきている(表1)。このように糖鎖の機能が明らかになることで、糖鎖の総合的な研究であるグライコミクスの研究概念が提唱されている。グライコミクスでは、構造グライコミクス、機能グライコミクス、およびバイオテクノロジーや医薬品への応用といった三つの研究が総合的に推進することが望まれている。しかしながら、動物細胞で発現しているようなオリゴ糖鎖の構造やその機能解析といった研究が飛躍的に進むには技術的に大きな障壁がある。遺伝子やタンパク質の研究では、ライブラリー、シーケンサー、自動合成機、あるいは大腸菌などによる増幅システムなどが重要な技術基盤となっている。しかしながら、糖鎖の研究ではこれらの手法は実用化されていないことが研究の大きな障害となっている。これらの障害を解決するための新しい技術が要求される。そこで、本総説では動物細胞を糖鎖の生産工場として用いた糖鎖ラ

イブラリーの構築に焦点を当てる。

2. 糖鎖ライブラリーを得るには

糖鎖の材料として自由に利用できるのは資源として豊富なデキストラン、セルロース、キチン、キトサン、プルラン、マンナンといった多糖体を中心である。またオリゴ糖鎖の多くは多糖体の加水分解物として作られている。しかしながら、高等生物で見られるようなオリゴ糖鎖は、自然界からの抽出、有機合成、あるいは酵素合成法により手に入れることができるが、入手が困難であることも多い。自然界からの抽出においては、自然界での存在量の少ないオリゴ糖鎖の供給源は多くの場合、動物の臓器であり、種類や供給量には限りがある。例えば、生化学の研究によく用いられているシアル酸を含んだガングリオシドは、ウシやクジラの脳が原料として用いられていた。このような臓器は供給源として限りがあり、市場に安定に供給することは困難である。有機合成や酵素合成では供給源の問題点は解決される。しかし、一般に糖鎖は分子内に水酸基を複数有していることから、立体構造を制御したオリゴ糖鎖の有機合成には熟練した技術が必要である。有機合成の技術の進歩により多くの種類のオリゴ糖鎖を合成することが可能になってきているが、糖鎖がひとつ長くなる毎に収率も急激に低下し、さらに熟練した技術が要求される。一方、酵素を用いる方法では、立体構造を制御した合成が可能になってくる。生物界に存在するオリゴ糖鎖は糖転移酵素により作られるために、糖転移酵素を用いれば、有機合成よりは簡単にオリゴ糖鎖を合成することが可能である。しかし、現在は用いることのできる糖転移酵素は種類が限られており高価である。しかも酵素合成には糖ヌクレオチドのような糖ドナーも必要になってくる。現在、糖鎖合成酵素の遺伝子を全て見つけだすプロジェクトも行われており、ゲノム研究の進展に伴って、近い将来その全容が明らかにされ

表 1 オリゴ糖鎖の関与している生体内での機能

- 1) 血液型…O 型, A 型および B 型などの抗原は糖鎖である.
- 2) 受容体…コレラ毒素, ペロ毒素, インフルエンザウィルス, エイズウィルスなどのウィルスは糖鎖を受容体として細胞内に侵入する.
- 3) 細胞の増殖…ガングリオシド GM3 は EGF の活性を調節している.
- 4) 細胞の分化…Notch の活性は糖転移酵素である Fringe による糖鎖伸長により調節されている. 神経細胞の軸索発芽, シナプス形成, ミエリン形成にはそれぞれガングリオシドが関与している.
- 5) 癌化…大腸癌ではシアリルルイス X 抗原が発現し, Tn 抗原は糖鎖不全による癌関連抗原であり, 多くのガングリオシドが癌のマーカーとして知られる.
- 6) アポトーシス…ガングリオシド GM3 や GD3 はアポトーシスの誘導に関与している.
- 7) 神経系の形態と修復…複数のガングリオシドのノックアウトマウスにより, ガングリオシドが出生後の神経系の形態の維持や損傷時の修復に関わっていると考えられている.

図 1 糖鎖合成経路の例 (ガングリオ a 系列)

図 2 糖鎖プライマーの設計概念

るであろう。その後、遺伝情報に基づいて糖転移酵素を生産することで、生体中のオリゴ糖鎖を自由に作れる日はいずれくるかもしれない。

筆者らはこれら 3 つのオリゴ糖鎖の生産法に代わる 4 つ目の手法として、細胞にオリゴ糖鎖を生産させる研究を行っている。次に、その原理と可能性について紹介する。

3. オリゴ糖鎖を細胞に作らせる

細胞で発現している糖脂質や糖タンパク質のオリゴ糖鎖を人間の手で作るには先に述べたような技術的な困難がある。しかしながら、細胞はそれを簡単に合成するためのシステムを粗面小胞体やゴルジ装置として持っている。遺伝子には糖鎖合成のための酵素の情報が保存されており、翻訳された糖転移酵素は小胞体やゴルジ装置に運ばれ、糖鎖の生合成に使われる。糖鎖合成経路の例を図 1 に示した。糖脂質の糖鎖生合成経路では、セラミドにグルコースが結合し、続いてガラクトースが結合する。この脂質をラクトシルセラミドと呼び、多くの糖脂質の生合成経路の共通の前駆体となっている。ラクトシルセラミドの先に結合する

糖鎖の違いにより種々の合成経路が存在しており、ガングリオ a 系列ではシアル酸が結合して GM3 となり、N-アセチルガラクトサミンが結合して GM2 となり、さらにガラクトースが結合すると GM1 となる。GM3 は細胞の増殖、インスリン受容体の機能制御あるいはインフルエンザウィルスの感染にも関与していることが知られている。GM1 は神経伝達経路に関与しているが、コレラ毒素の受容体として知られており、最近ではアミロイド線維の形成にも関与している可能性が指摘されている。

このような細胞の糖鎖生合成能力を利用することで、人工的にオリゴ糖鎖を作ることが可能である。そのためには、糖脂質の合成経路の前駆体となる糖脂質の疑似構造を有する「糖鎖プライマー (saccharide primer)」を用いる。遺伝子研究の基本技術である PCR 法ではプライマーを起点に特定の塩基配列を伸長している。それと同様に、オリゴ糖鎖の糖鎖伸長反応も一定の規則に従って行われていることから、プライマーとして機能する糖鎖構造が存在する。図 2 に示したように糖脂質の多くはラクトシルセラミドが前駆体となり、ガングリオ系列の糖鎖が伸長してい

図 3 糖鎖プライマー法による細胞での糖鎖合成の原理とバイオコンビナトリアル合成法の概念

る。それ以外にもラクトシルセラミドからは、グロブ系列、ラクト系列、あるいはネオラクト系列の糖鎖へ伸長する。一方、O-グリカンではセリンにキシロースが結合するとプロテオグリカン鎖が、N-アセチルグルコサミンが結合すると糖タンパク質の糖鎖が伸長ようになる。このように、特定の糖鎖構造はその後の糖鎖伸長反応を決定する。そこで図2の様な糖脂質の生合成経路においてはラクトシドの配列がプライマー領域であると考えることが出来る。このような糖鎖プライマーは構造が簡単であり、合成が容易で高収率で得ることが出来る。細胞は糖転移酵素の宝庫であり、糖ドナーも自前で作っている。細胞を生きたまま利用することにより、糖鎖プライマーのみ準備すれば、高価な糖転移酵素や糖ドナーを準備する必要がないことが最大の利点である。

糖鎖プライマー法の原理は図3aに示した。モノアルキル型糖鎖プライマーは、培地中に添加すると細胞内に取り込まれたのち、ゴルジへ運ばれて糖鎖伸長を受ける。プライマーへの糖鎖伸長により、1分子ずつ段階的に伸長した生成物が得られる。糖鎖伸長反応効率は1日～2日程度で飽和になるので短時間で生成物を得ることが出来る。生成物の大部分は細胞外に分泌されるので、内在性の糖脂質との分離が簡単になり、単離と構造解析を非常に簡略化することが出来る。細胞内でのオリゴ糖鎖の生合成経路に関しては多くの文献があるので、プライマーに伸長した糖鎖の配列や結合様式を予測することが出来る。また、得られたオリゴ糖鎖の分子配列は質量分析装置(MALDI-TOF-MS/MSやESI-MS/MS)を用いることで解析することが出来る。さらに、加水分解酵素による基質特異性、糖認識タン

パク質との結合特異性、あるいはNMR分析を併用することで質量分析装置でも明らかにできなかった結合様式など詳細な構造決定が可能である。

4. バイオコンビナトリアル合成法

コンビナトリアルケミストリーにより医薬品を中心として多くの有機化合物のライブラリーを作製する試みがなされている。これにより、医薬品の構造と機能相関の研究は飛躍的に時間短縮されるようになった。有機合成による糖鎖ライブラリーの開発でもコンビナトリアルケミストリーの手法は大変有効である。このように組合せの原理によるライブラリーの作製原理は、糖鎖プライマー法にも適用できる。特にラクトース型の糖鎖プライマーは異なった糖鎖合成経路を有する細胞で糖鎖伸長生成物を与えた^{1)~3)}。ラクトース以外の糖鎖プライマーでも、細胞内での糖鎖伸長が起きることを明らかにしており、多くの系列のオリゴ糖鎖を得ることが出来ることを実証している。株としては培養可能な細胞株の由来も多岐にわたっている。図3bに示しているように、細胞と糖鎖プライマーの種類をいろいろと掛け合わせることで、原理的には自然界に存在するあらゆるオリゴ糖鎖を作り出すことが出来る。これが「バイオコンビナトリアル合成法」の原理である⁴⁾⁵⁾。通常培養細胞では特定の糖鎖生合成経路を過発現している。例えばマウスのB16メラノーマ細胞は、GM3という糖脂質を過発現している。サルの腎臓細胞であるCOS7細胞ではガングリオa系列の糖鎖を発現している。またヒト白血病細胞HL60細胞は、血液型抗原や細胞の接着因子として知られるシアル化ルイスXが含まれるネオラクト系列の糖鎖を発現してい

図 4 マイクロキャリアー (Cytodex-1) に接着している COS-7 細胞の顕微鏡観察

る。これらの細胞に糖鎖プライマーを導入すると、各々の細胞に発現されているオリゴ糖鎖の伸長がみられる。

5. 細胞での糖鎖の生産

細胞にオリゴ糖鎖を作る原理について述べてきたが、工業的に利用するには大量培養する技術が必要である。通常の実験室での細胞培養は単層培養である。単層培養では、培養する面積を増やすためには培養フラスコをたくさん重ねることになり、多大な労力を要する。それを解決するのがマイクロキャリア法である。これは市販のマイクロキャリアに細胞を接着させ、培養液中に懸濁させて培養する方法である。DEAE デキストランやコラーゲンで被覆したビーズが市販されており、細胞の種類に応じて使い分けることが出来る。図 4 にはマイクロキャリアに付着している細胞の顕微鏡像を示した。糖鎖プライマー法では、生成したオリゴ糖鎖は培地中に存在するために、培養液を回収したあと、細胞は何度も繰り返し使うことが可能である。細胞内に生成物が留まっていると、反応後に細胞をホモジナイズして生成物を回収しなくてはならないが、細胞外に分泌されるとその必要がない。筆者の用いている糖鎖プライマーの最大の特徴はここにある。さらにプライマーの種類、細胞の種類、あるいは細胞の培養方法を検討することで、オリゴ糖鎖の生産効率を向上させることができる。よって、目的のオリゴ糖鎖の収率に優れた組合せにより、生産効率を向上することができる。オリゴ糖鎖の生産には、分離・精製法の技術も改良していく必要がある。構造の少し異なる糖鎖を簡便に迅速に分離する技術の開発も必要になってくるが、逆相クロマトグラフィーと HPLC を利用することで多くの糖鎖伸長生成物を分離することが可能になってきている。

現在の技術では動物細胞の大量培養による物質生産は不可能ではない。しかし、細胞でのオリゴ糖鎖の生産効率を向上するには、細胞のことをもっと知る必要がある。糖鎖生産にふさわしい培養方法を考える必要もある。例えば糖鎖の生合成の原料となる単糖を培地に加えることで糖転移

図 5 アジド化糖鎖の基板への固定化とマイクロアレイとしての利用

(A) アミンに還元した後縮合反応で固定化. (B) トリフェニルホスフィン誘導体をリンカーとし Staudinger 反応で固定化.

効率を高めることも可能である。また、糖鎖合成遺伝子の解析が進めば、ある特定の糖鎖合成経路を作り出すこともできる。ゲノム解析の成果は本研究の発展を協力にサポートしてくれると期待される。

6. 糖鎖マイクロアレイ

DNA のマイクロアレイの開発においては、小さいサイズで大きな情報量を扱うための技術革新はめざましい。同様に、糖鎖のマイクロアレイの開発のための基礎研究もこの数年で急速に増えてきている。糖鎖のマイクロアレイの開発においては、オリゴ糖鎖を基板に吸着もしくは化学的に固定化する方法が報告されている。

生体中のオリゴ糖鎖の研究が進んできたとはいえ、我々が知っている糖鎖の機能は抗原、受容体、あるいは細胞間相互作用に関与している糖鎖の機能もその全貌を明らかにしたわけではない。糖鎖のマイクロアレイの完成により、生物界に存在する糖鎖を認識する分子を網羅的に検出することができるようになる。固定化法に関してはこれまでの技術を利用することが可能であるが、新たな発展が要求されているのはマイクロアレイに固定化するオリゴ糖鎖のライブラリーの種類を揃えることである。筆者らは基板に固定化するために、糖鎖プライマーにアジド基の様な官能基を導入した誘導体を作製する手法を開発している。アジド基を有したアルキルグルコシドの基板への固定化は、図 5 に示しているように、アジド基をアミノ基に還元して縮合する方法、あるいはトリフェニルホスフィン誘導体をリンカーとして Staudinger 反応により固定化する方法を行っている。いずれの方法でも固定化した糖鎖はレクチンや抗体分子と特異的に結合することが示されている⁶⁾。

7. おわりに

DNA やたんぱく質のマイクロアレイの開発は診断や医薬品の分野での利用が見込めることで、大きな注目を浴びている。同様に、糖鎖ライブラリーが構築されて、糖鎖のマイクロアレイを開発できれば、その利用価値は計り知れない。糖鎖のマイクロアレイが完成すれば、抗原や受容体としてだけでなく、細胞中に微量にしか存在しないタンパク質や食品中の種々の毒素の検出が可能になるかもしれない。分子生物学や生物化学の基礎的な研究分野だけではなく、医薬品開発にとっても糖鎖チップは重要な技術になると期待される。生体における糖鎖の役割に対する理解は十分ではない。糖鎖ライブラリーとマイクロアレイ技術の確立は、糖鎖研究を加速するのに不可欠である。さらには、本研究では動物細胞固有の糖鎖合成能力を利用しているが、動物細胞以外でも糖鎖プライマー法により糖鎖を作る事ができることから、広範囲に生体機能を利用した糖鎖合成に活用する事が可能である。よって、糖鎖プライマー法により新たな産業プロセスの開発へと発展できるものと期待している。

謝 辞

糖鎖プライマーによる糖鎖ライブラリーの構築に関する研究は、生物系特定産業技術推進機構（生研機構）による「細胞に作らせる糖鎖ライブラリーと機能性糖鎖高分子」（平成10～14年度）として、また文部科学省、科学技術振興調整費による「システム生物学者育成プログラム」（平成13～16年度）として行われました。

文 献

- 1) Miura, Y. and Yamagata, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **241**, 698-703 (1997).
- 2) Nakajima, H. *et al.*, *J. Biochem.*, **124**, 148-156 (1998).
- 3) Miura, Y. *et al.*, *Glycobiol.*, **9**, 957-960 (1999).
- 4) 佐藤智典, 化学フロンティア 4「生命化学のニューセントラルドグマ」—テラーメイドバイオケミストリーのめざすもの—化学同人, pp. 171-179 (2002).
- 5) 佐藤智典, 山形達也, 蛋白質核酸酵素増刊, 共立出版, vol. **48**, pp. 1213-1219 (2003).
- 6) Sato, T. *et al.*, *Chem Lett.*, **33**, 580-581 (2004).

(平成17年11月10日受理)