魚卵に学ぶ：*N*-グリコシド型糖タンパク質の構造と機能^{*1}北 島 健^{*2}

東京大学大学院理学系研究科

多細胞生物における細胞間認識、接着現象に糖タンパク質、糖脂質などの複合糖質が重要な役割を果たすことが近年明らかにされているが、その分子機構の理解はまだ不十分である。我々は、複合糖質の糖鎖が関与する生物学的現象の分子機構を解明する糖鎖生物学を志向しており、これまで主として魚卵を研究材料にして取り組んできた。生体分子の機能を知るうえで分子総体の構造の理解は不可欠であるが、糖鎖の構造を微量で正確に解析することが困難である現状を鑑みると、複合糖質の関与する生物学的現象を生化学的に解析する目的には、卵や胚など均質な細胞が比較的大量に入手できる魚類が優れた実験系であるといえる。実際、我々は、魚卵糖タンパク質の構造と機能研究を行う途中で、いくつかの興味深い観察と糖鎖生物学上重要な意義をもつ現象に遭遇することができた。

ここでは、その一例として、我々が派遣し研究を展開してきた魚卵表層細胞に局在する主要糖タンパク質の構造と受精・発生過程におけるユニークな構造変化および生物学的機能について概説する。

魚類未受精卵の細胞膜直下には、表層細胞 (cortical alveoli) と呼ばれる分泌性顆粒が並んでおり、受精・発生過程において機能する糖タンパク質などの物質群を含むことが知られている。この顆粒は動物卵において普遍的に存在し、魚類以外では表層顆粒と呼ばれる。受精時、卵活性化に伴う開口分泌によって表層細胞内容物は、細胞膜と受精膜の間隙である囲卵腔 (perivitelline space) に分泌される。我々は、種々の魚卵表層細胞中に、きわめて糖含量が高く (重量で 80-90%) ユニークな構造をもつ糖タンパク質を見出し、hyosophorin と命名した。^{1,2)} hyosophorin は、以下のような特徴をもつ。

(1) 未受精卵にあっては、種特異的な配列をもつヘpta-トリデカペプチドを反復単位として、それが数個から十数個つながった完全タンデム繰返し構造からなるポリプロテインであり (H-hyosophorin)^{2,3)}、受精時、表層細胞開口分泌と同調して特異的なプロテアーゼ (hyoso-

phorinase) によって反復単位構造 (L-hyosophorin) まで低分子化される⁴⁻⁶⁾ (図 1)。

(2) ヒラメ、アユ、ウグイ、インドメダカ、ニホンメダカ、海水産メダカの魚種では、反復単位あたり 1 つの Asn 残基に *N*-グリコシド型糖鎖が結合している。⁷⁻¹⁰⁾ hyosophorin の *N*-グリコシド型糖鎖は、分子量 7-14 K の高分子量糖鎖である。我々は、これらの巨大糖鎖の精密な構造決定に取り組み、hyosophorin 糖鎖が 4 本または 5 本鎖の多本鎖構造、また多分岐構造をもつことによって、かさだかい構造を形成していることを明らかにした。ペリフェラル部分の構造は種によって異なり、多本鎖・多分岐構造によってその種特異的構造がクラスター状に発現しており、細胞表面にあって自己の胚

図 1 魚卵 hyosophorin の受精・発生過程における構造変化。

^{*1} Structure and Function of *N*-Glycosylated Glycoprotein in Fish Eggs and Embryos.

^{*2} Ken Kitajima (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113, Japan).

細胞同士あるいは外来性細菌との相互作用の媒介など認識分子として、胚発生調節あるいは防御に関与すると考えられる。また、特に淡水産卵性の hyosoporphin の糖鎖はシアル酸残基、硫酸基をもつ酸性糖鎖であり、それがカルシウムイオンなど二価陽イオンに対する結合性をもつこと、また低イオン強度下において浸透圧を高める作用をもつことが示されている。^{2,11)} 胚を取り巻く環境を一定に保持することは、自己防御機構を十分にもち合わせていない初期胚にとって重要である。このように、hyosoporphin は多機能分子として位置付けられる。

(3) hyosoporphin は、受精時に低分子化された後、胚早期あたりで糖鎖が脱離 (de-*N*-glycosylation) される第二の構造変化を受ける。^{7,11)} 我々は、この反応を触媒するペプチド: *N*-グリカナーゼ (PNGase) の存在を動物細胞としては初めてメダカ初期胚から単離・同定することに成功した。¹³⁾ この酵素の作用によって糖鎖が脱離して生成するペプチドが機能性分子として胚細胞に作用することが示唆されている。このことは、hyosoporphin が分子構造変化することによって新たな機能性分子へと変換することを示しており、hyosoporphin が多機能分子であることを示すとともに、de-*N*-glycosylation によってタンパク質の機能発現あるいは機能変化が起こることを示すきわめて興味深い現象である。最近我々は“glycosylation/de-*N*-glycosylation”というタンパク質の新しい翻訳後修飾/再修飾反応が、タンパク質の機能発現の分子機構として普遍的に存在するという糖鎖生物学上重要な仮説を提唱しており、^{7,14,15)} 本研究はその仮説提出の契機となった大きな流れのひとつである。このような機構の存在は、現在は魚類に限らず、哺乳類、鳥類においても証明されるに至っている。¹⁵⁾

このように、我々は、魚類を材料にして研究を進め、他の脊椎動物では研究材料の量的制約から見逃されていた現象を明確に証明してきており、魚類を対象にした研究を突破口とする糖鎖生物学の発展は今後も大いに期待できるものと考えている。

本研究は、井上康男 (東京大学・理)、井上貞子 (昭和大学・薬) 両博士の指導のもとで、氏名は割愛させていただくが、多くの博士研究員、大学院生、卒業研究生によって推進された研究である。メダカを用いる実験については、岩松鷹司博士 (愛知教育大学・生物) のご指導をいただいた。特に、群馬県、東京都、埼玉県、神奈川県、千葉県の水産試験場の方々には、研究材料の供与に快く協力していただいた。ここに深謝致します。

文 献

- 1) K. Kitajima, S. Inoue, and Y. Inoue: Isolation and characterization of a novel type of sialoglycoproteins (hyosoporphin) from the eggs of medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Biol.*, **132**, 544-553 (1989).
- 2) 北島 健, 井上貞子: 魚卵表面胞局在主要糖タンパク質 (hyosoporphin) の構造と機能. 比較生理生化学, **7**, 125-132 (1990).
- 3) K. Kitajima, Y. Inoue, and S. Inoue: Polysialoglycoproteins of Salmonidae fish eggs. *J. Biol. Chem.*, **261**, 5262-5269 (1986).
- 4) S. Inoue and Y. Inoue: Fertilization (Activation)-induced 200- to 9-kDa depolymerization of polysialoglycoprotein, a distinct component of cortical alveoli of rainbow trout eggs. *J. Biol. Chem.*, **261**, 5256-5261 (1986).
- 5) K. Kitajima and S. Inoue: A proteinase associated with cortices of rainbow trout eggs and involved in fertilization-induced depolymerization of polysialoglycoproteins. *Dev. Biol.*, **129**, 270-274 (1988).
- 6) S. Inoue, K. Kitajima, Y. Inoue, and S. Kudo: Localization of polysialoglycoprotein as a major glycoprotein component in cortical alveoli of the unfertilized eggs of *Salmo gairdneri*. *Dev. Biol.*, **123**, 442-454 (1987).
- 7) A. Seko, K. Kitajima, M. Iwasaki, S. Inoue, and Y. Inoue: Structural studies of fertilization-associated carbohydrate-rich glycoproteins (hyosoporphin) isolated from the fertilized and unfertilized eggs of flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 15922-15929 (1989).
- 8) T. Taguchi, A. Seko, K. Kitajima, S. Inoue, T. Iwamatsu, K.-H. Khoo, H. R. Morris, A. Dell, and Y. Inoue: Structural studies of a novel type of tetraantennary sialoglycan unit in a carbohydrate-rich glycopeptide isolated from the fertilized eggs of Indian medaka fish, *Oryzias melastigma*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 2353-2362 (1993).
- 9) T. Taguchi, A. Seko, K. Kitajima, Y. Muto, S. Inoue, K.-H. Khoo, H. R. Morris, A. Dell, and Y. Inoue: Structural studies of a novel type of pentaantennary large glycan unit in the fertilization-associated carbohydrate-rich glycopeptide isolated from the fertilized eggs of *Oryzias latipes*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 8762-8771 (1994).
- 10) T. Taguchi, K. Kitajima, Y. Muto, S. Inoue, K.-H. Khoo, H. R. Morris, A. Dell, R. A. Wallace, K. Selman, and Y. Inoue: A precise structural analysis of a fertilization-associated carbohydrate-rich glycopeptide isolated from the fertilized eggs of euryhaline killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Glycobiology*, **5**, 611-624 (1995).
- 11) Y. Shimoda, K. Kitajima, S. Inoue, and Y. Inoue: Calcium ion binding of three different types of oligo/polysialic acids as studied by equilibrium dialysis and circular dichroic methods. *Biochemistry*, **33**, 1202-1208 (1994).
- 12) A. Seko, K. Kitajima, S. Inoue, and Y. Inoue: Identification of free glycan chain liberated by de-*N*-glycosylation of the cortical alveolar glycoprotein (hyosoporphin) during early embryogenesis of the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 1165-1171 (1991).
- 13) A. Seko, K. Kitajima, Y. Inoue, and S. Inoue: Peptide: *N*-glycosidase activity found in the early embryos of *Oryzias latipes* (medaka fish). The first demonstration of the occurrence of peptide: *N*-glycosidase in animal cells and its implication for the presence of a de-*N*-glycosylation system in living organisms. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22110-22114 (1991).
- 14) K. Ishii, M. Iwasaki, S. Inoue, P. T. M. Kenny, H. Komura, and Y. Inoue: Free sialooligosaccharides found in the unfertilized eggs of a freshwater trout, *Plecoglossus altivelis*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1623-1630 (1989).
- 15) T. Suzuki, K. Kitajima, S. Inoue, and Y. Inoue: *N*-Glycosylation/deglycosylation as a mechanism for the post-translational modification/remodification of proteins. *Glycoconjugate J.*, **12**, 183-193 (1995).