Recognition of Endogenous Ligands by C-Type Lectins: Interaction of Serum Mannan-binding Protein with Tumor-associated Oligosaccharide Epitopes

レクチンによる内因性リガンドの認識：血清マンナン結合タンパク質と
腫瘍関連糖鎖エピトープの相互作用

Kawasaki, Nobuko; and Kawasaki, Toshisuke

Research Center for Glycobiotechnology, Ritsumeikan University, Shiga 525-8577, Japan

FAX: 81-77-561-3496, E-mail: tkawasak@fc.ritsumei.ac.jp

(Received on May 7, 2010, accepted on May 15, 2010)

Key Words: C-type lectin, Mannan-binding protein, cancer-associated antigen, innate immunity

Abstract

Animal lectins have contributed greatly to understanding of the physiological significance of glycans in man and animals. Mannan-binding protein (MBP) binds to mannose, *N*-acetylglucosamine and L-fucose via the carbohydrate binding sites in its carbohydrate recognition domain (CRD). In pathogenic microorganisms, manno-oligosaccharides on the cell surface appear to be the major glycans involved in the interaction with MBP, whereas in human colorectal carcinoma SW1116 cells, which are endogenous target cells of MBP, Lewis (Le)-type oligosaccharides with the type I structure appear to play a major role in the interaction with the lectin. In fact, MBP ligand oligosaccharides (MLO), which have complex type *N*-glycans with at least 4 Fuc(Hex-HexNAc) units, have been isolated with an MBP affinity column, whereas complex type *N*-glycans having 3 or less Fuc(Hex-HexNAc) units as well as high-mannose type structures (Man5 to Man8) did not bind to the MBP affinity column. The structures of MLO are very unique and distinct from those of other previously reported tumor-specific carbohydrate antigens, and thus should be considered as representative of a new family of tumor-associated carbohydrate antigens. The reasons why and how MLO exhibits such strong affinity to MBP are not clear at present but computer modeling suggested the possibility that a MBP-Lewis oligosaccharides complex may be formed between the trimeric structure of the carbohydrate recognition domain (CRD) and $\text{Le}^b\text{-(Le}^a\text{)}_{x4}\text{-Le}^x$, a typical example of the nonreducing terminal oligosaccharide structure of MLO.

要 約

動物レクチンはヒトや動物に含まれる糖鎖の生理的役割の解明に大きく貢献してきた。マンナン結合タンパク質(MBP)は、その糖鎖認識ドメイン(CRD)に存在する糖結合部位を介してマンノース、*N*-アセチルグルコサミン、L-フコースに結合する。病原微生物では、細胞表層のマンノオリゴ糖がMBPに結合する主要な糖鎖である。これに対し、内在性の標的であるヒト結腸癌細胞株SW1116の場合、I型のルイス型オリゴ糖鎖がMBPの主要な結合相手となる。すなわち、SW1116細胞の可溶化物オリゴ糖鎖をMBPカラムにかけると、4個以上のFuc(Hex-HexNAc)ユニットをもつ複合型糖鎖(MLO)がカラムに結合するのに対して、3個以下のFuc(Hex-HexNAc)ユニットを持つ複合型糖鎖および高マンノース型糖鎖(Man5 to Man8)はMBPカラムに結合しない。これらの結果は、MLOがこれまで報告のない新規な癌関連糖鎖であることを示している。なぜMLOがこのように高い親和性を示すのか、今後の研究課題であるが、コンピュータモデリングによるとMBPの3量体と $\text{Le}^b\text{-(Le}^a\text{)}_{x4}\text{-Le}^x$ 糖鎖の間に興味深い複合体の形成が可能なが示されている。

A. Introduction

In retrospect, the last few decades have been devoted to revealing the “raison d’être” of glycans in life

A. 序

振り返ってみると、糖鎖の研究は、これまでの数十年間、地球上の生命における“糖鎖の存在意義”を明らかにするた

Abbreviations: CRD, carbohydrate-recognition domain; Hex, hexose; HexNAc, *N*-acetylhexosamine; Le^a , Lewis a; Le^b , Lewis b; Le^x , Lewis x; mAb, monoclonal antibody; MBP, mannan-binding protein; MLO, MBP-ligand oligosaccharides.

on earth by studying their structures, biosynthesis and the functions. Carbohydrate-binding proteins in animals (animal lectins) comprise a family of proteins that play key roles in establishing the biological significance of glycans by mediating the specific recognition of glycans in various situations in vital phenomena.

Studies on animal lectins started in the late 1970s with the isolation of a hepatic lectin in Dr. Gilbert Ashwell's laboratory (1,2). This hepatic lectin is galactose-specific and functions as a receptor for carbohydrate-mediated endocytosis by hepatocytes. A few years later the second hepatic lectin, which is specific for *N*-acetylglucosamine, was isolated from chicken liver (3). These lectins require calcium for their binding and are designated as C-type lectins (4). With this background, a systematic investigation was carried out to find a third hepatic lectin specific for mannose, since Sia-Gal-GlcNAc-Man is a common sequence at the non-reducing ends of *N*-linked glycans. After a number of trials, we discovered the third hepatic lectin in rabbit liver, which we called mannan-binding protein (MBP), since it was isolated successfully with an affinity column of yeast mannan taking advantage of the calcium dependency of its sugar binding activity (5). However, it was soon realized that MBP is a soluble protein and not a transmembrane protein like the first two hepatic lectins. In addition, to our surprise, a mannan-binding protein was detected in rabbit serum during the course of the preparation of antibodies toward rat liver MBP by injecting it into a rabbit (6). MBP isolated from the liver is called L-MBP and that from serum is called S-MBP. They are encoded by separate genes

め、その構造、生合成、機能に関して、進められてきた。動物体内に含まれる糖結合タンパク質は、動物レクチンと呼ばれ、重要な生命現象の様々な局面において特定の糖鎖の認識を仲介することにより、糖鎖の生物学的意義を確立する上で重要な役割を果たしてきた。

動物レクチンの研究は、1970年代後半 Gilbert Ashwell 研究室 (1,2) におけるウサギ肝臓からのレクチンの分離で開始された。このレクチンは、ガラクトースを特異的に認識する膜貫通タンパク質であり、肝細胞による糖媒介エンドサイトーシスの受容体である。その後間もなく、*N*-アセチルグルコサミンに特異的な 2 番目の肝レクチンが鶏の肝臓より単離された (3)。これらのレクチンは結合にカルシウムを必要とするところから C 型レクチン (4) と総称されている。このような背景のもと、筆者らは、Sia-Gal-GlcNAc-Man が *N*-結合型糖鎖の非還元末端に共通のシーケンスであるところから、3 番目の肝レクチンとしてマンノースに特異的なレクチンの存在を想定して、体系的な探索を始めた。やがて、酵母マンナンを固定化したアフィニティーカラムを作成し、結合のカルシウム依存性を利用することにより、ウサギの肝臓より 3 番目の肝レクチンを単離することに成功し、これを、マンナン結合タンパク質 (MBP) と名付けた (5)。しかし、その後 MBP は、先の 2 つの肝レクチンのような膜貫通タンパク質ではなく、可溶性タンパク質であることが判明した。さらに、ラット肝臓 MBP に対する抗体の作成の過程で、驚いたことに、肝臓に加えてウサギの血清中にも MBP が存在することを見出した (6)。肝臓からのレクチンを L-MBP、血清からのものを S-MBP と呼

Fig. 1. Host defense functions of the mannan-binding protein. This figure is cited, with slight modifications, from Ref. 25.

(*MBL2* and *MBL1*, respectively) in mouse (7), rat (8), rhesus monkey (9), and pig (10). On the other hand, only a single cDNA has been cloned for man (11,12), cow (13), rabbit (14), and chicken (15). It should be noted that despite the presence of a single message, almost equal amounts of MBP proteins were isolated from human liver and serum, respectively (16). These two MBP proteins can be distinguished as to the degree of oligomerization through disulfide bonds (16,17), which occurs as a post-translational modification. The following studies demonstrated that S-MBP plays a pivotal role in host defense, particularly in the innate immune system, such as in complement activation via the lectin pathway (18–25) (see Fig.1) and tumor cell recognition (26), while L-MBP (or I-MBP) appears to serve as a cargo receptor in the intracellular transport of glycoproteins (27–29). In this review article, we would like to discuss the sugar binding specificity of S-MBP with regard to tumor cell recognition.

B. Oligomer Structure and Carbohydrate Recognition Domain (CRD) of MBPs

MBP is a homo-oligomer of a ~31kDa subunit, each subunit containing a carbohydrate recognition domain (CRD) of ~115 amino acids in its COOH-terminal domain, followed by a short neck region and a collagen-like domain, which consists of 18–20 Gly-Xaa-Yaa repeats, followed by a short amino-terminal region (cysteine-rich region) (30). Three subunits form a structural unit, and S-MBP normally consists of 3–6 structural units (21,22) joined through disulfide bonds at their amino termini, the total molecular mass being 300–600 kDa (31), whereas L-MBP consists mainly of 2 structural units (32). Lines of evidence indicate that a high degree of MBP oligomerization is required for the activation of complement (22,31). The lectin bind to mannose, *N*-acetylglucosamine and L-fucose (33,34) via the carbohydrate binding sites in the CRD (35). It should be noted, however, that the lectin binding affinity to any kind of monosaccharide is not high enough for *in vivo* recognition. Biologically significant binding can be demonstrated to occur only to high molecular weight ligands with multiple mono- or oligosaccharides on a high-molecular weight carrier molecule. This mode of recognition appears to be common to most animal lectins, being particularly remarkable for MBP, and is called the cluster effect (36) or pattern recognition (37).

C. Isolation and Characterization of Tumor-Associated Oligosaccharide Ligands for S-MBP

The most unique characteristic of this host defense system is the distinction of pathogenic microorganisms from the host cells due to nature of their cell surface carbohydrates. MBP binds to manno-oligosaccharides, which are frequently the natural ligands on pathogenic microorganisms,

んだ。マウス (7)、ラット (8)、アカゲザル (9)、ブタ (10) などでは、これらの MBP はそれぞれ別の遺伝子 (*MBL2* と *MBL1*) によりコードされている。一方、ヒト (11, 12)、ウシ (13)、ウサギ (14)、ニワトリ (15) では一種類の cDNA しか検出されていない。ヒトでは 1 つの MBP 遺伝子 (*MBL2*) の産物であるにもかかわらず、肝臓および血清から、ほぼ同じ量のタンパク質が単離される (16)。これら 2 つの MBP は翻訳後修飾の過程で生じるジスルフィド結合を介するオリゴマーの形成の度合いが異なる (16, 17)。その後の研究により、S-MBP は自然免疫系、特にレクチン経路 (18–25) と呼ばれる経路を介して補体系を活性化し、生体防御に重要な役割を持つこと (図 1 参照)、さらに内在性異物としての腫瘍細胞を認識することが明らかにされた (26) 一方、L-MBP (または I-MBP) は糖タンパク質の細胞内輸送 (27–29) の積み荷受容体としての機能を持つとされている。このレビューでは、S-MBP の糖鎖結合特異性を腫瘍細胞の認識の面から紹介したい。

B. MBP のオリゴマー構造と糖認識ドメイン (CRD)

MBP は約 31kDa サブユニットのホモオリゴマーである。各サブユニットは C 末端ドメインに約 115 アミノ酸よりなる糖鎖認識ドメイン (CRD) を含む。ついで短い頸部、18–20 個のグリシン-X-Y の 3 アミノ酸の繰り返し構造よりなるコラーゲン様ドメインが続いて、最後は短いアミノ末端領域 (システインの豊富な地域) となる (30)。3 個のサブユニットは一つの構造単位を形成する。S-MBP は通常 3–6 個の構造単位 (21, 22) がアミノ末端でジスルフィド結合により架橋され、全体の分子量が 300 から 600 kDa を示す (31)。これに対し、L-MBP は 2 個の構造単位 (32) で構成されている。一連の研究により、S-MBP による補体系の活性化には、高度のオリゴマー形成が必要であることが示されている (22,31)。本レクチンは CRD の糖鎖結合部位 (35) を介してマンノース、*N*-アセチルグルコサミンおよび L-フコースと結合する (33,34)。しかし、それはそれぞれの単糖がそれ自身、レクチンに結合するのに十分に高い親和性を持つということではない。生体認識において有効な高親和性の結合は、複数の単糖やオリゴ糖が高分子キャリア分子上に配置された場合にのみ観察される。このような認識の仕組みは、多くの動物レクチンに共通と思われるが、特に MBP の場合に顕著に示されており、クラスター効果 (36) あるいはパターン認識 (37) と呼ばれている。

C. S-MBP による癌関連糖鎖リガンドの単離とその性質

この生体防御システムのユニークな特徴は、細胞表面の糖鎖の性質によって宿主細胞から病原微生物を区別することである。MBP は病原微生物表面に頻繁に見られる自然リガンドであるマンノオリゴ糖鎖と結合する。これに対し、哺乳類

whereas most mammalian cells are covered with complex oligosaccharides with sialic acids at their non-reducing termini, which precludes the binding of MBP to the cells. However, we and others previously noticed that MBP binds to some human tumor cell lines, suggesting the possibility that MBP also functions as a defense factor against abnormal cells produced in host animals (38,39). In a subsequent study, we demonstrated that the vaccinia virus carrying the human MBP gene exhibited potent growth inhibitory activity toward human colorectal carcinoma SW1116 cells in nude mice via a complement-independent mechanism. We proposed calling this activity MBP-dependent cell-mediated cytotoxicity (MDCC) (26). In order to elucidate the mechanism of interaction between MBP and tumor cells, the presumptive MBP ligands on the surface of SW1116 cells were characterized. Initial experiments involving plant lectins as inhibitors of MBP binding to SW1116 cells indicated that AAL (Aleuria aurantia lectin), a Fuc-binding lectin, inhibited the binding strongly, whereas Con A (Concanavalin A) and LCA (Lens culinaris agglutinin), Man-binding lectins, did not inhibit the binding significantly. Subsequent experiments involving anti-Lewis (Le) antibodies as inhibitors indicated that anti-Le^b mAbs inhibited the binding most effectively and dose-dependently, followed by anti-Le^a mAbs, whereas anti-Le^x and anti-Le^y mAbs did not inhibit the binding significantly. These results indicated that manno-oligosaccharide structures are not associated with tumor recognition and, instead, fucose-containing oligosaccharides, in particular type I sugar chains, play crucial roles in the tumor recognition by MBP.

To understand in more detail the properties of MBP ligands on the surface of SW1116 cells, we attempted to isolate MBP ligands. Pronase glycopeptides were prepared from whole lysates of SW1116 cells and oligosaccharides were liberated by hydrazinolysis. After being tagged by pyridylamination, PA-oligosaccharides were applied to an MBP affinity column. Approximately 6% of the PA-oligosaccharides bound to the column in the presence of calcium and were eluted with EDTA. This was a big surprise for us in view of the fact that there had been no report of the successful isolation of oligosaccharides with an MBP affinity column, suggesting that the isolated oligosaccharides should have some characteristic structural features as to their high affinity to an MBP column. The isolated fraction was called MBP ligand oligosaccharides (MLO), and the sequences of the MLO were determined by mass spectrometry (40). First, we estimated the sizes of the ligand oligosaccharides by MALDI-MS after permethylation. A cluster of signals was observed between m/z 4200 and 9000, the average being 6200, and throughout this region, peaks of materials differing by a Fuc or Fuc-(Hex-HexNAc) unit difference were observed. The m/z 9000 peak corresponds to 13 repeats of Hex-HexNAc with 11

細胞は一般に複雑な糖鎖で覆われており、その非還元末端はほとんどの場合、シアル酸に覆われている。このため、通常MBPは宿主細胞へは結合しない。しかしながら、私たちを始め、他の研究者も以前より、MBPがいくつかのヒト腫瘍細胞に結合することに気付いており(38, 39)、MBPが生体内で生じた異常細胞にたいする生体防御因子として機能する可能性が指摘されていた。そこで、私達はヌードマウスにヒト結腸癌細胞株、SW1116細胞を移植させて作成した腫瘍塊に、ヒトMBPの遺伝子をワクシニアウイルスに組み込んだ発現ベクターを注射したところ、腫瘍は急速に退縮することを見出した。この作用は補体非依存性機構であるところから、我々はこのMBPの働きをMBP依存的細胞性細胞傷害作用(MDCC)呼ぶことを提案している(26)。そこで、次に、MBPと腫瘍細胞との相互作用のメカニズムを知る目的で、SW1116細胞の表面に存在が推定されるMBPリガンドの特徴を調べた。最初、MBPのSW1116細胞への結合に対する植物のレクチンの阻害効果を調べた。その結果、AAL(ヒドロチャワンタケレクチン)、フコース結合レクチン、は強く結合を抑制したのに対して、ConA(コンカナバリン)とLCA(レンズマメレクチン)など、マンノース結合レクチンは、ほとんど結合を阻害しなかった。次に、阻害剤として、種々の抗ルイス抗体の阻害効果を調べたところ、抗Le^b抗体は、最も効果的かつ用量依存的に阻害を示した。続いて、抗Le^a抗体により阻害が見られた。一方、抗Le^x抗体、抗Le^y抗体は、阻害を示さなかった。これらの結果は、MBPによる腫瘍の認識においては、マンノオリゴ糖構造は関与せず、代わりに、フコースを含むオリゴ糖、中でもI型の糖鎖に結合したフコース残基が重要な役割を果たしていることを示していた。

そこで、より詳細にSW1116細胞表面のMBPリガンドの性質を理解するために、MBPリガンド糖鎖の単離を試みた。まず、SW1116細胞可溶化物をプロナーゼ消化して糖ペプチドを調製し、次いでヒドラジン分解により糖鎖を遊離した。遊離した糖鎖は、PA(ピリジルアミノ化)標識したのち、PA-オリゴ糖を、MBPアフィニティークラムにかけた。PA-オリゴ糖の約6%はカルシウムの存在下でカラムに結合し、EDTAで溶出された。この結果は、筆者らに取っては大きな驚きだった。というのは、これまでにMBPアフィニティークラムによりオリゴ糖を単離したという報告は皆無だったからである。すなわち、このMBPアフィニティークラムにより単離されたオリゴ糖鎖は、MBPカラムに高親和性で結合するためのいくつかの構造的特徴を持っていると考えられた。単離された画分をMBPリガンドオリゴ糖鎖(MLO)と呼び、その糖鎖配列を質量分析法により解析した(40)。まず、完全メチル化の後、MALDI-MSによりリガンド糖鎖の大きさを推定した。シグナルピークは m/z 4200と9000の間に広く分布し、平均値は6200付近に認められた。さらに、この幅広いピークを通じて見られるシグナルには、FucあるいはFuc(Hex-HexNAc)単位の規則的な差が認められた。 m/z 9000のピークは、13リピートのHex-HexNAcと11個のFucを持つ構造に対応した。

Fig.2. Proposed structures of MBP-ligand oligosaccharides (MLO).

The MBP ligands on SW1116 cells are mostly composed of tetraantennary core fucosylated *N*-glycans with highly fucosylated polylactosamine type structures. The overall carbohydrate structures of the neutral and acidic MBP ligands are very similar except at the nonreducing termini. The acidic ligands are capped with sialic acid to form the sialyl Le^a structure. The MBP ligands in SW1116 cells are mostly expressed on the CD26 molecule. This figure is cited, with slight modifications, from Ref. 41.

Fuc residues. Analysis of the fragment ions by off-line nano-ESI-MS and MALDI-MS indicated the presence of a series of fucosylated, non-reducing terminal fragment ions including up to 5 Hex-HexNAc units. From these results together with those of endo- β -galactosidase digestion and chemical defucosylation, the sequences of the endogenous MBP ligands were proposed to be as shown in Fig. 2. The ligands are large, multiantennary *N*-glycans each carrying a highly fucosylated polylactosamine type structure. At their nonreducing termini, Le^b/Le^a or tandem repeats of the Le^a structure prevail, a substantial proportion of which are attached *via* internal Le^x or *N*-acetylglucosamine units to the trimannosyl fucosylated core. The structures of MLO are very unique and distinct from those of other previously reported tumor-specific carbohydrate antigens. First, MLO are present as *N*-glycans, not as glycolipids or *O*-glycans. Second, the tandem repeat region of MLO is much longer than the dimeric or trimeric structure. Third, the tandem repeats consist of the Le^a structure rather than the Le^x structure, particularly at or near the nonreducing termini. Because of these characteristics, the MLO should be considered as representative of a new family of tumor-associated carbohydrate antigens (40). With respect to the MBP recognition of Le^a tandem repeat structures, we have confirmed similar effects on glycolipid specimens isolated from COLO205 cells (42).

D. Identification of CD26 as a Major MLO Carrier Protein in SW1116 Cells

In the next experiment, we attempted to identify the

さらに、オフラインナノ ESI-MS および MALDI-MS によるフラグメントイオンの解析では、一連のフコシル化された非還元末端断片イオン、Hex-HexNAc として 5 個までの繰り返し構造の存在が示された。これらの結果をエンド- β -ガラクトシダーゼ消化および化学的フコース除去実験などの結果と合わせて判断し、MBP のリガンド糖鎖の配列を図 2 に示すように提案した。リガンドは、高度にフコース置換を受けたポリラクトサミン型の糖鎖をもつ多分岐 *N* 型糖鎖であった。非還元末端は、Le^b/Le^a、または Le^a のタンデムな繰り返し構造を持つ。その内側はかなりの割合で Le^x または *N*-アセチルラクトサミンを介してトリマンノシルフコシルコアユニットに接続している。MLO は非常にユニークな構造で、これまで報告にある腫瘍特異的糖鎖抗原とははっきりと区別される特徴を持つ。すなわち、まず、MLO は *N* 型糖鎖であり、糖脂質や *O* 型糖鎖ではない。第二に、Le^a のタンデムリピートは報告のある 2 量体または 3 量体の枠を遥かに超え長い。第三に、タンデムリピートは Le^x 構造ではなく、Le^a 構造であり、特に非還元末端付近に含まれる。これらの特性のため、MLO は、従来の腫瘍関連糖鎖抗原とは別に、新規腫瘍関連糖鎖抗原ファミリーの代表として見なされるべきであろう (40)。なお、MBP による Le^a タンデムリピート構造の認識に関しては COLO205 細胞より単離した糖脂質試料について同様の効果を確認している (42)。

D. SW1116 細胞の主要な MLO 担体タンパク質としての CD26 分子の同定

次に SW1116 細胞に含まれる MLO 担体タンパク質の同定

carrier proteins of MLO in SW1116 cells. Utilizing an MBP affinity column, we succeeded in the isolation of the major MBP-ligand glycoproteins from cell lysates, and identified them as CD26/dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) (110 kDa) (43) and CD98 heavy chain (CD98hc)/4F2hc (82 kDa) (44). PNGase F and endo β -*N*-acetylglucosaminidase H digestion of these proteins together with MBP-blot analysis suggested that CD26 contained complex-type *N*-glycans (MLO) that appear to mediate the MBP binding, whereas the CD98 heavy chain consisted almost exclusively of high-mannose type or hybrid type glycans. MALDI-MS of the *N*-glycans released from CD26 by PNGase F demonstrated conclusively that CD26 is the major MLO-carrying protein. Thus, the major molecular ion signals observed on MALDI-MS analysis of permethylated *N*-glycans correspond to a hybrid type *N*-glycan with 1 Fuc(Hex-HexNAc) terminal, followed by complex type *N*-glycans with 2 Fuc(Hex-HexNAc) termini, and then ones with increasing numbers of Fuc(Hex-HexNAc) termini in multiples of up to six. The majority of the signals appeared to also reflect core fucosylation and a bisecting GlcNAc (42).

E. Characterization of MBP-binding and Non-binding Glycopeptides Derived from CD26

In subsequent studies, MBP-binding and non-MBP-binding glycopeptides were prepared from chymotrypsin digests of a CD26 sample, and the *N*-glycans and de-*N*-glycosylated peptides were analyzed by MS separately. The *N*-glycan profiles for the non-MBP-binding fraction contained a major signal at m/z 3460, corresponding to 3 Fuc(Hex-HexNAc) units, components with a total of 4-6 Fuc(Hex-HexNAc) units giving only very weak signals. In contrast, the MBP-binding fraction afforded major signals above m/z 3900, corresponding to 4 Fuc(Hex-HexNAc) units, and extending up to about m/z 6400, corresponding to 5 to 7 Fuc(Hex-HexNAc) units. This striking pattern demonstrated clearly that glycopeptides derived from CD26 that could bind efficiently to an MBP column carried mostly complex type *N*-glycans with at least 4 Fuc(Hex-HexNAc) units. As a consequence of these larger glycopeptides being preferentially enriched in the binding fraction, the non-binding fraction in turn contained less of them relative to smaller ones. Conversely, the glycopeptides with bi- and tri-antennary complex type *N*-glycans were found mostly in the non-binding fraction. It should be further noted that glycopeptides carrying high-mannose type structures (Man5 to Man8) were also clearly not MLO, as these glycans were prominently detected only in the non-binding fraction (42). These findings indicate clearly that the mode of recognition of endogenous ligands by endogenous lectins is more highly sophisticated than previously was believed.

The heterogeneity of glycan structures on CD26

を試みた。SW1116 細胞の可溶化物を MBP カラムにかけ、主要な MBP リガンド糖タンパク質の分離に成功した。それらは CD26/dipeptidylpeptidase 4(DPPIV)(110 kDa)(43) および CD98 重鎖 (CD98hc)/4F2hc(82 kDa)(44) と同定された。PNGase F 消化物およびエンド β -*N*- アセチルグルコサミニダーゼ H 消化物を MBP プロットで解析することにより、CD26 分子は、MBP との結合を仲介する複合型 *N* 型糖鎖 (MLO) を含んでいるが、CD98 重鎖はほぼすべて高マンノース型またはハイブリッド型糖鎖よりなることが示された。さらに、CD26 分子の PNGase F 処理により遊離した *N* 型糖鎖を MALDI-MS 分析することにより CD26 分子が主要な MLO 担体タンパク質であることを確認できた。すなわち、完全メチル化 *N* 型糖鎖を MALDI-MS 分析したところ、主要な分子イオンシグナルは、1Fuc(Hex-HexNAc) 末端を持つハイブリッド型 *N* 型糖鎖であり、次いで 2Fuc(Hex-HexNAc) をもつ複合型 *N* 型糖鎖、そして、最大 6Fuc(Hex-HexNAc) まで続く複合型 *N* 型糖鎖に対応した。また、シグナルの大部分はコアフコースおよびバイセクティング GlcNAc の存在を示唆していた (42)。

E. CD26 分子から得られた MBP 結合画分と MBP 非結合画分の性質

次に、CD26 分子のキモトリプシン消化物を MBP カラムにかけると結合画分と非結合画分に分離した。それぞれの画分について、*N* 型糖鎖の構造と *N* 型糖鎖を遊離させた残りのペプチド部分の構造を MS により解析した。MBP 非結合画分の *N* 型糖鎖は 3 Fuc(Hex-HexNAc) に対応する m/z 3460 に主要なシグナルを与え、4-6 Fuc(Hex-HexNAc) に相当する部分には非常に弱いシグナルが見られたにすぎなかった。一方、MBP 結合画分は対照的に 4 Fuc(Hex-HexNAc) に対応する m/z 3900 に主要なシグナルを与え、5-7 Fuc(Hex-HexNAc) に対応する m/z 6400 までシグナルが観察された。この印象的なパターンは明らかに MBP カラムに結合する CD26 分子の糖ペプチドは、ほとんどすべてが少なくとも 4 個の Fuc(Hex-HexNAc) を持つ複合型糖鎖を含むことを示している。これらの大きな糖鎖が選択的に MBP 結合画分に回収される結果、MBP 非結合画分では、小型糖鎖に比べてこれらの大型糖鎖は少なくなる。逆に、bi- および tri- アンテナ型の複合型 *N* 型糖鎖はほとんどすべてが MBP 非結合画分に回収された。また、高マンノース型糖鎖 (Man5-Man8) はほとんどすべてが MBP 非結合画分に回収されており、明らかに MBP との結合性は弱いことが明らかとなった (42)。以上の結果は内在性レクチンによる内在性リガンドの糖鎖認識が従来考えられていた以上に高度に制御されたものであることを示している。

CD26 分子の糖鎖構造に著しい不均一性が見られるので、次

molecules prompted us to study the distribution of binding and non-binding glycans at the respective glycosylation sites. Thus, the PNGase F-treated (de-*N*-glycosylated) peptides in the binding and non-binding fractions were subjected to automated nanoLC-ESI-MS/MS analyses separately and the resulting MS/MS data were matched with the CD26 protein sequence by means of a Mascot search. The PNGase F-treated peptides carrying NXS/T sites all exhibited conversion of Asn to Asp, with a mass increment of 1 unit. The results obtained indicated that 7 out of the 9 potential sites were originally *N*-glycosylated and the high affinity MLO were expressed preferentially at some *N*-glycosylation sites, but this site preference was not so stringent (42).

F. Computer Modeling of the Tandem Repeat Structure of Le^a Oligosaccharides and the MBP-Lewis Oligosaccharides Complex

The observations that the MBP column-binding glycopeptides carried mostly complex type *N*-glycans with at least 4 Fuc(Hex-HexNAc) units, while the non-binding fraction contained *N*-glycans with 2 or 3 Fuc(Hex-HexNAc) units and ones with high-mannose type structures suggested the possibility that 4 Fuc(Hex-HexNAc) units may have a certain unique conformation preferable for high affinity binding to MBP. Computer modeling suggested the possibility that the tandem repeat structure of the Le^a unit can form a right-handed helix in which equivalent positions recur every 8 Le^a units, as shown in Fig. 3A. In addition, as can be seen on

に、それぞれの糖鎖付加部位について、結合型糖鎖と非結合型糖鎖の分布を検討した。すなわち、結合型画分と非結合型画分の糖ペプチドを PNGase F で処理した後、自動 nanoLC-ESI-MS/MS 分析にかけ、得られた MS / MS データをマスコット検索による CD26 分子のタンパク質に対する配列と比較検討した。NXS/T を含むペプチドを PNGase F 処理すると Asn が Asp に変換するため、1 ユニットの質量の増加が見られる。その結果、9 個の潜在的な *N* 型糖鎖結合部位の内、7 箇所実際に糖鎖修飾が観察された。またある部位では優先的に高親和性糖鎖 MLO の存在が見られたが、この部位選択性はそれほど厳密ではなかった (42)。

F. Le^a のタンデム繰り返し構造と MBP- ルイスオリゴ糖鎖複合体のコンピュータモデリング

MBP カラム結合性画分には少なくとも 4 つの Fuc(Hex-HexNAc) 単位をもつ *N* 型糖鎖が含まれているのに対して、非結合性画分には、2-3Fuc(Hex-HexNAc) 単位を含む複合型 *N* 型糖鎖および高マンノース型糖鎖が含まれている。これらの結果は、4Fuc(Hex-HexNAc) ユニットは、MBP に結合するに望ましい特定の立体構造を持つことができることを示唆しているようにも思われる。コンピュータモデリングによりこの点を検討した。その結果、Le^a のタンデム繰り返し構造は、8 個の Le^a ユニットごとに同等の位置にもどる右巻らせんを形成することが示唆された (図 3A)。また、Le^a *a* ヘリックス

Fig. 3. 3D model of tandem repeats of the Le^a unit. A, Side view of a right-handed helix of eight tandem repeats of the Le^a unit. The tandem repeat structure of the Le^a unit can form a right-handed helix in which equivalent positions in the helix recur every 8 tandem repeats. The structure is depicted as a ball-and-stick model except for L-fucose, which is shown as a CPK model; B, View from the top of the four tandem repeats of the Le^a unit. The lower left fucose faces the front and the lower right fucose is the most remotely located. These figures are cited, with slight modifications, from Ref. 42.

Fig. 4. 3D model of the MBP-Lewis oligosaccharide complex. A, 3D model of the trimeric MBP-Lewis oligosaccharide complex. The crystal structure of the trimeric mannan (mannose)-binding protein (pdb code: 1kww) was used to build the complex model with the oligosaccharide fragment. The ribbon model of an MBP-trimer is represented by light gray, dark gray, and black ribbons, and the Lewis oligosaccharides by ball and stick models. Le^b: dark gray balls and sticks, Le^a: light gray balls and sticks, Le^x: black balls and sticks; B, Close-up view of the area corresponding to the boxed area in A. White sticks represent amino acids. A Ca ion interacts with L-Fuc in Le^b (dark gray). L-Fuc in Le^a (light gray) adjacent to the terminal Le^b may also interact at the 2nd site with Lys183 (black arrow) and Asp184 (not shown). These figures are cited, with slight modifications, from Ref. 41.

viewing of the Le^a α helix from the top, fucose residues extend away from the long axis of the chain and every fourth fucose residue recurs at an equivalent position (Fig. 3B). This unique topology of fucose residues in the Le^a α helix may be relevant as to the high affinity binding of MLO to MBP (41).

Fig. 4A presents a model of the MBP-Lewis oligosaccharides complex between the trimeric structure of the carbohydrate recognition domain (CRD) and Le^b-(Le^a)_{x4}-Le^x, a typical example of the non-reducing terminal oligosaccharide structure of MLO (see Fig. 2). Of the two Fuc residues in the Le^b unit, the one in the Le^a unit appears to contribute to the protein binding *via* a calcium ion, and the other fucose residue in the penultimate Le^a unit feasibly interacts with Lys183 and Asp184 in the MBP molecule (Fig. 4B). In addition, the binding of each oligosaccharide chain to the trimeric protein structure resulted in the formation of a bundle of three oligosaccharide chains with fucose-fucose and galactose-galactose interactions in the three Le^a units at the Le^x end. Since the bundle formation occurred in the Le^a unit at the Le^x end, the five tandem structure of the Le^a units (or four Le^a and one Le^b unit) appears to be important for bundle formation (42).

G. Perspective and Future Directions

Revealing the modes of recognition of natural or endogenous ligand glycans by animal lectins provides a critical clue for understanding the functions of glycans in

を上から見ると、フコース残基は長軸から離れて飛出したような場所に位置し、また、すべての4番目のフコースは同等の位置に有ることが分った(図3B)。Le^a α ヘリックスにおけるフコースのこのユニークなトポロジーは、MBPに対して高親和性の結合を示す理由と関連するものかも知れない(40)。

図4Aは、MBPの糖鎖認識ドメイン(CRD)の3量体とルイス糖鎖 Le^b-(Le^a)_{x4}-Le^xとの複合体モデルを示しています。Le^b-(Le^a)_{x4}-Le^xは、代表的な MLO の非還元末端の糖鎖構造(図2参照)です。Le^bユニットの2つのフコースの内、Le^aユニットのフコースがカルシウムイオンを介するタンパク質との結合に関与している。また、最後から2番目の Le^a のフコース残基も MBP の Lys183 と Asp184 との相互作用(図4B)に関与している可能性がある。さらに、各ルイスオリゴ糖鎖が3量体タンパク質に結合すると、3つのルイスオリゴ糖鎖の Le^x 末端の隣の3個の Le^a ユニットの間にフコースとフコース、ガラクトースとガラクトースの相互作用が働き、その結果、3つの糖鎖ユニットが束を形成すると考えられる。束形成には5つの Le^a タンデムユニット(または4つの Le^a と1つの Le^b 単位)が重要であることが示されている(42)。

G. 展望と今後の方向

動物レクチンによる天然のリガンド糖鎖や内因性のリガンド糖鎖の認識のモードを明らかにすることは、糖鎖の機能を理解するための重要な手掛かりを得ることになる。しかし

nature. However, the extensive complexity and heterogeneity of most natural ligand glycan structures prevent closer investigation of the mechanism underlying the recognition in detail. New advanced technologies for glycochemistry to synthesize glycans with sophisticated structures in reasonable amounts are imperative in the further pursuit of this issue. In this respect, it would be interesting if a series of structural MLO mimics are chemically synthesized and then the interaction of these compounds with MBP can be investigated by high-resolution NMR or X-ray crystallography. Hopefully, we may be able to obtain more detailed knowledge on the unique topology of fucose residues in the tandem repeat structures of the Le^a epitope in solution and also those in the MBP-ligands complex.

On the other hand, it has become clearer and clearer that some C-type lectins such as MBP and DC-SIGN (45, 46) recognize certain types of human tumor cells. It may be reasonable to assume that these lectins or modifications of them may have potential clinical use as novel cancer diagnostic and therapeutic agents for cancer patients. In addition, antibodies raised against these lectin ligands may be useful as well for the same purpose. Chemically synthesized structural MLO mimics may serve as antigens or haptens to raise antibodies that recognize tumor cells, and also as a tumor vaccine.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Kay-Hooi Khoo of Academia Sinica, Taipei, Taiwan, for the mass spectrometry analyses of the glycans and glycopeptides, Dr. Nana Kawasaki of the National Institute of Health Science, Tokyo, for identification of proteins by LC-MS/MS, Dr. Toshihiko Sawada of Gifu University, Gifu, for 3D modeling of tandem repeats of the Le^a unit, and Dr. Masaji Ishiguro of the Suntory Institute for Bioorganic Research, Osaka, for modeling of the MBP-Lewis oligosaccharide complex. The authors also extend their appreciation to all the co-authors of their papers listed in the references, in particular, Drs. Bruce Yong Ma and Motohiro Nonaka, and Ms. Risa Inoue for their respective contributions. The authors also thank Drs. Tomio Kotani, Yatsuki Aratake, and Kazumi Umeki of the University of Miyazaki for preparation of the anti-CD26 mAbs, and Ms. Tomoko Tominaga for the secretarial assistance.

References

1. Ashwell, G., and Morell, A.G. (1974) *Adv. Enzymol.* **41**, 99–128.
2. Kawasaki, T., and Ashwell, G. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 1296–1302.
3. Kawasaki, T., and Ashwell, G. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 6536–6543.
4. Drickamer, K. (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 585–90.
5. Kawasaki, T., Etoh, R., and Yamashina, I. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 1018–1024.
6. Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 658–664.
7. Sastry, K., Zahedi, K., Lelias, J.M., Whitehead, A.S., and Ezekowitz, R.A. (1991) *J. Immunol.* **147**, 692–697.
8. Drickamer, K., Dordal, M.S., and Reynolds, L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 6878–6887.

ながら、一般に、天然のリガンド糖鎖は非常に複雑な構造を持ち、また、多くの場合不均一性を備えているため、レクチンによる認識の詳細なメカニズムの解明を妨げている。一方、最近の糖鎖合成化学の高度な新技術は、洗練された構造を持つ糖鎖を然るべき規模で合成することを可能としており、天然物のもつ欠点を克服しつつ新たな成果をもたらす段階に入ってきていると思われる。この点、一連の MLO 分子の分子ミミックを化学合成でき、これらの化合物と MBP との相互作用を高分解能 NMR や X 線結晶構造解析などにより検討することができれば、それは大変興味深いものになると思われる。うまくいけば、溶液中での Le^a のタンデム繰り返し構造のフコース残基のトポロジーに関するより詳細な知識を得ることができ、MBP との相互作用の詳細を理解できるものと期待している。

一方、同じ C-型レクチンの仲間である MBP と DC-SIGN は良く似た糖結合性を持っているが、最近、ある種の癌細胞を認識することが明らかになりつつある (45, 46)。これらのレクチンやこれらをシイズとして開発された新規化合物は新しい癌の診断や治療に利用される可能性がある。また、レクチンの内在性リガンドに対する抗体は、レクチンと同じ目的のために有効に利用される可能性がある。化学合成した MLO ミミックは、抗原またはハプテンとして腫瘍細胞を認識する抗体を産生する手段としてばかりでなく、腫瘍ワクチンの一つの手段として利用される可能もあると考えている。

9. Mogues, T., Ota, T., Tauber, A.I., and Sastry, K.N. (1996) *Glycobiology* **6**, 543–550.
10. Ma, B.Y., Nakamura, N., Dlabak, V., Naito, H., Yamaguchi, S., Ishikawa, M., Nonaka, M., Ishiguro, M., Kawasaki, N., Oka, S., and Kawasaki, T. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 12963–12975.
11. Sastry, K., Herman, G.A., Day, L., Deignan, E., Bruns, G., Morton, C.C., and Ezekowitz, R.A. (1989) *J. Exp. Med.* **170**, 1175–1189.
12. Taylor, M.E., Brickell, P.M., Craig, R.K., and Summerfield, J.A. (1989) *Biochem. J.* **262**, 763–771.
13. Kawai, T., Suzuki, Y., Eda, S., Ohtani, K., Kase, T., Fujinaga, Y., Sakamoto, T., Kurimura, T., and Wakamiya, N. (1997) *Gene* **186**, 161–165.
14. Kawai, T., Suzuki, Y., Eda, S., Ohtani, K., Kase, T., Sakamoto, T., Uemura, H., and Wakamiya, N. (1998) *Glycobiology* **8**, 237–244.
15. Laursen, S. B., Dalgaard, T.S., Thiel, S., B. L., Lim, T., Jensen, V., Juul-Madsen, H.R., Takahashi, A., Hamana, T., Kawakami, M., and Jensenius J.C. (1998) *Immunology* **93**, 421–430.
16. Kurata, H., Sannoh, T., Kozutsumi, Y., Yokota, Y., and Kawasaki, T. (1994) *J. Biochem.* **115**, 1148–1154.
17. Kawasaki, N., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1983) *J. Biochem.* **94**, 937–947.
18. Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 7451–7454.
19. Super, M., Thiel, S., Lu, J., Levinsky, R.J., and Turner, M.W. (1989) *Lancet* **2**, 1236–1239.
20. Ohta, M., Okada, M., Yamashina, I., and Kawasaki, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1980–1984.
21. Lu, J., Thiel, S., and Wiedemann, H. (1990) *J. Immunol.* **144**, 2287–2294.
22. Kawasaki, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 186–195.
23. Takahashi, K., Ip, W. E., Michelow, I.C., and Ezekowitz, R.A. (2005) *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 16–23.
24. Dommert, R.M., Klein, N., and Turner, M.W. (2006) *Tissue Antigens* **68**, 193–209.
25. Kawasaki, N., Nakagawa, T., and Kawasaki, T. (2005) Book of Gene and Medicine 3, pp.227–233, MEDICAL DO CO. Osaka (in Japanese)
26. Ma, Y., Uemura, K., Oka, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, N., and Kawasaki, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 371–375.
27. Mori, K., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **232**, 223–233.
28. Mori, K., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 647–656.
29. Nonaka, M., Ma, B.Y., Ohtani, M., Yamamoto, A., Murata, M., Totani, K., Ito Y., Miwa, K., Nogami, W., Kawasaki, N., and Kawasaki, T. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 17908–17920.
30. Drickamer, K., and Taylor, M.E. (1993) *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 237–264.
31. Yokota, Y., Arai, Y., and Kawasaki, T. (1995) *J. Biochem.* **117**, 414–419.
32. Mizuno, Y., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 4247–4252.
33. Childs, R. A., Drickamer, K., Kawasaki, T., Thiel, S., Mizuochi, T., and Feizi, T. (1989) *Biochem. J.* **262**, 131–138.
34. Lee, R.T., Ichikawa, Y., Fay, M., Drickamer, K., Shao, M.C., and Lee, Y.C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4810–4815.
35. Weis, W. I., Drickamer, K., and Hendrickson, W.A. (1992) *Nature* **360**, 127–134.
36. Connolly, D.T., Townsend R.R., Kawaguchi, K., Bell, W.R., and Lee, Y.C. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 939–945.
37. Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999) *Science* **284**, 1313–1318.
38. Ohta, M., and Kawasaki, T. (1994) *Glycoconjugate J.* **11**, 304–308.
39. Muto, S., Sakuma, K., Taniguchi, A., and Matsumoto, K. (1999) *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 317–352.
40. Terada, M., Khoo, K.H., Inoue, R., Chen, C.I., Yamada, K., Sakaguchi, H., Kadowaki, N., Ma, B. Y., Oka, S., Kawasaki, T., and Kawasaki, N. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 10897–10913.
41. Kawasaki, N., Ma, B.Y., and Kawasaki, T. (2008) in *Experimental Glycoscience, Glycobiology* (Taniguchi, N., *et al.* eds.), pp.162–166, Springer Japan, Tokyo.
42. Kawasaki, N., Lin, C.W., Inoue, R., Khoo, K.H., Kawasaki, N., Ma, B.Y., Oka, S., Ishiguro, M., Sawada, T., Ishida, H., Hashimoto, T., and Kawasaki, T. (2009) *Glycobiology* **19**, 437–450.
43. Aertgeerts, K., Ye, S., Shi, L., Prasad, S.G., Witmer, D., Chi, E., Sang, B-C., Wijnands, R. A., Webb, D.R., and Swanson, R.V. (2004) *Protein Science* **13**, 145–154.
44. Kucharzik, T., Lugerinig, A., Yan, Y., Driss, A., Charrier, L., Sitaraman, S., and Merlin, D. (2005) *Lab. Invest.* **85**, 932–941.
45. van Gisbergen, K.P.J.M., Aarnoudse, C.A., Meijer, G.A., Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2005) *Cancer Res.* **65**, 5935–5944.
46. Nonaka, M., Ma, B.Y., Murai, R., Nakamura, N., Baba, M., Kawasaki, N., Hodohara, K., Asano, S., and Kawasaki, T. (2008) *J. Immunol.* **180**, 3347–3356.

Profile of the Authors

Nobuko Kawasaki graduated from the Department of Biological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University in 1965, received an MS degree in 1967 and a Ph.D. degree in 1971 from the same Department (Prof. Ikuo Yamashina). 1970–1977: Assistant Professor at the Department of Medical Chemistry, Kansai Medical University; 1977–1996: Associate Professor, 1996–2003: Professor, at the College of Medical Technology, Kyoto University; 2003–2006: Professor at the School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Kyoto University; 2006-present: Visiting Professor at the Research Center for Glycobiotechnology, Ritsumeikan University. Her current research is focused on the structures and functions of endogenous-ligand glycans to an endogenous serum lectin, mannan-binding protein (MBP), in association with anti-tumor activity.

Toshisuke Kawasaki is Director of the Research Center for Glycobiotechnology in Ritsumeikan University and Professor Emeritus of Kyoto University. He graduated from the Department of Biological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University in 1964, received an MS degree in 1966 and a Ph.D. degree in 1971 from the same department (Prof. Ikuo Yamashina). He worked for the Department of Biological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University from 1969 to 2005, first as an Assistant Professor (1969–1981), then as a Associate Professor (1981–1988), and as a Professor (1989–2005). Meanwhile, he worked as a Visiting Fellow in Dr. Gilbert Ashwell's laboratory in NIH (1974–1976). He moved to the present position in 2005 with some of his group members. His current research interest is focused on the roles of mannan-binding protein (MBP) and DC-SIGN in tumor recognition and immune regulation, and on the roles of glycan epitopes in reprogramming and regeneration technologies.