Chain Length Diversity of Sialic Acids and Its Biological Significance

ジシアル酸・オリゴシアル酸・ポリシアル酸の生物学的機能

Sato, Chihiro

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, JAPAN

FAX: 81-52-789-5228, E-mail: chi@agr.nagoya-u.ac.jp

Key Words: *disialic acid, oligosialic acid, polysialic acid, sialyltransferase, siglec***Abstract**

Sialic acids are commonly present as monosialyl residues at the non-reducing terminal end of glycoconjugates. In some cases, $\alpha 2 \rightarrow 8$ linked di/oligosialic acid chains with DP 2 or 3 sialic acid residues are common structural units of gangliosides, and involved in various biological processes, such as cell adhesion, cell differentiation, signal transduction, and surface expression of stage specific antigen. In contrast, little attention has been paid to the occurrence and functions of such short sialyl di/oligomers on glycoproteins, while polysialic acid (DP ≥ 8) in embryonic NCAM has been extensively studied as a regulator of cell adhesion in neurogenesis. As analytical methods to detect di/oligosialic acid structures have been improved, several glycoproteins containing di/oligo/polysialic acid chains have been identified. It is thus hypothesized that these di/oligosialic acid residues on glycoproteins may have similar important functions in common with those proposed for the gangliosides or may have new functions. Currently, several studies showing the importance of di/oligosialic acid-containing glycoproteins have emerged. In this review, recent advances in such studies of di/oligosialic acid residues on glycoproteins, including analytical methods, occurrence, biosynthetic pathways, and functions, are described.

The sialic acids are a family of 9-carbon carboxylated sugars. *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) and deaminoneuraminic acid (KDN: 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonoic acid) whose 5-C is substituted by the acetoamide, hydroxyacetoamide, and hydroxyl group, respectively, are the three major sialic acids in nature (Fig.1). Diversity in these structures arises by acetylation, sulfation, methylation, lacylation, and lactonization and almost 50 members have been so far identified (1,2). In most cases, the sialic acids are present as monosialyl residues at the non-reducing terminal position of glycan chains of glycoproteins and glycolipids. Sialic acids play important roles in ligand-receptor binding and cell-cell and cell-extracellular matrix interactions during fertilization, embryogenesis, and differentiation (1,3). Recent discoveries of sialic acid-binding animal lectin family

要 約

糖鎖末端には通常 1 残基のシアル酸が存在するが、そのシアル酸残基の上にさらに数残基のシアル酸が直鎖状に縮重合してシアル酸重合体を形成する場合がある。 $\alpha 2 \rightarrow 8$ 結合ジシアル酸 (重合度 DP=2) 構造はガングリオシドの構成成分としてよく知られており、細胞接着、細胞分化、シグナル伝達、時期特異的発現など、多くの生物学的機能を果たしている。また重合度が 8 以上のポリシアル酸構造は神経細胞接着分子上に存在しており、発生や分化に関わることが知られている。しかし、重合度が 2 から 7 程度のジ・オリゴシアル酸構造をもつ糖タンパク質の存在や機能についてはこれまでほとんど注目されて来なかった。しかし近年、ジ・オリゴ・ポリシアル酸 (シアル酸重合体) 構造を微量検出する手法が改良され、天然にジ・オリゴ・ポリシアル酸含有糖タンパク質がこれまで知られている以上に数多く存在することが明らかにされてきている。そのため糖タンパク質上のシアル酸重合体構造が、既にガングリオシドにおいて明らかにされてきた機能の一端を担う可能性が、また従来考えられてきたこととは全く異なる新たな機能を担っていること、さらには新たなポリシアル酸の機能が明らかになってくるかもしれない。この総説ではシアル酸重合体の分析法、生合成、存在、機能における最近の知見を述べる。

シアル酸は 9 炭糖の一員であり、5 位の置換基が *N*-アセチル基である *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、*N*-ヒドロキシアセトアミド基である *N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、水酸基で置換されたデアミノノイラミン酸 (KDN; 2-ケト-3-デオキシ-D-グリセロ-D-ガラクト-ノノ酸) が 3 大分子種である。またシアル酸の置換体は、水酸基のアセチル化、硫酸化、メチル化、ラクチル化あるいはラクトン形成など、これまでにほぼ 50 種類同定されている (1,2) (図 1)。一般的に、シアル酸は糖タンパク質や糖脂質において糖鎖の非還元末端部位にモノシアル基として存在しており、受精、発生、分化過程においてリガンド-受容体および細胞-細胞間相互作用において重要な機能を果たしていることが明らかになっている (1,3)。特に最近のシアル酸結合性動物レクチンファミリーであるシグレックの発見 (4) とその

(siglec) have further emphasized the biological function of sialic acids (4,5). The functional importance of sialic acids has been also demonstrated by the fact that mice deficient in UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine, which is the key enzyme in the *de novo* synthesis of sialic acids are embryonic lethal (6).

Sialic acids are commonly present as monosialyl residues at the non-reducing terminal end of glycoconjugates. In rare cases, the sialic acids are linked to each other to form a polymerized structure, polysialic acid (7). Polysialic acid chains in nature usually have a degree of polymerization (DP) ranging from 8–200 sialyl residues. Only four glycoproteins have been identified as polysialic acid-containing glycoproteins until recently (7). Polysialic acid is first identified in the glycocalyx of neuroinvasive bacteria (8) and considered to be involved in the invasion into the brain. In vertebrates, neural cell adhesion mol-

クローニング (5) によって、シアル酸の機能的重要性に対する認識はさらに高まっている。さらに近年の、シアル酸 *de novo* 合成を司る UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase の遺伝子改変マウスが胎生致死 (6) であるとの結果からもシアル酸が発生に果たす役割の大きさがうかがえる。

シアル酸残基は通常、1 残基が糖鎖の最外部に結合したモノシアル酸として存在するが、まれにその末端シアル酸残基の上にさらにシアル酸の直鎖ポリマーが結合するポリシアル酸構造として存在する場合がある (7)。重合度が 8 以上のポリシアル酸にをもつ分子として最近まで 4 種類のみが知られていた (7)。初めに見つけたのは、神経侵襲性バクテリア (脳髄膜炎細菌) の莢膜多糖であり (8)、ポリシアル酸は脳への侵入に関与する。また、脊椎動物では、神経形成期における神経細胞接着分子 (NCAM) (9)、電気ウナギの電圧感受性ナトリウムチャンネル (10) および魚卵の分泌顆粒局在糖タンパク質であるポリシア

Fig. 1. Structure of sialic acids and definition of mono/di/oligo/polysialic acid. DP, degree of polymerization.

Fig. 2. Functions of polysialic acid chain linked to NCAM. In neural cell-cell interaction in embryonic brain, NCAM bearing the polysialic acid chain cannot bind to NCAM and prevents other CAMs from binding with each other due to the bulky space occupied by polysialic acid chain (anti-adhesive effect). Therefore, in the embryonic brain, neurons can reach ideal zones without formation of an ectopic synapse. In the adult brain, NCAM and other CAMs can restore their binding abilities and cells settle as a result. Thanks to the expression of polysialic acid chain at a spacio-temporally specific stage, normal neurogenesis and synaptic function are facilitated and learning, memory and circadian rhythm are maintained normally.

ecule (NCAM) (9), a voltage-gated sodium channel of eel (10), and fish egg polysialoglycoprotein (PSGP) (11) are known to be modified by polysialic acid residues. Studies on NCAM showed that polysialic acid chains are regulatory molecules in cell-cell/matrix interaction via anti-adhesive effect during neurogenesis (12) (Fig.2). Polysialylation occurs in some tumors and is involved in metastasis (13).

On the other hand, little is known about glycoproteins containing the short sialyl oligomer, whose DP is between mono and poly, i.e., disialic acid (DP=2) and oligosialic acid (DP=3-7) (Fig.1). In recent years, we have developed sensitive chemical methods to detect the sialyloligo/polymer (14-16), and have shown the presence of di/oligo/polysialyl residues in nature (16,17). In this minireview, the latest topics of di/oligo/polysialic acid on glycoproteins will be introduced.

A. Development of Sensitive Chemical and Immunochemical Detection Methods

When samples containing 10-100 µg of di/oligo/polysialic acid structures are analyzed, conventional methods including methylation analysis (18), nuclear magnetic resonance (NMR)(19), and mild acid hydrolysis-thin-layer chromatography (TLC) (20) can be applied. For samples containing a very small amount of the di/oligo/polysialic acid residues (less than 1 µg), as is often the case, conventional methods (described above) cannot be applied. Instead, the following highly sensitive, chemical and biochemical methods are useful, and these methods have successfully confirmed the ubiquitous occurrence of tiny amounts of di/oligosialic acid (fmol) in glycoproteins.

A-1. Chemical Analyses

Fluorometric C_7/C_9 Analysis (14): When an oligo/polymer of $\alpha 2 \rightarrow 8$ -linked *N*-acylneuraminic acid (Neu5Ac or Neu5Gc) residue is subjected to periodate oxidation, the non-reducing terminal residue is oxidized to the C_7 analogue of *N*-acylneuraminic acid, C_7 (Neu5Ac) (5-acetoamido-3,5-dideoxy-L-arabino-2-hepturosonic acid), or C_7 (Neu5Gc) (5-hydroxyacetoamido-3,5-dideoxy-L-arabino-2-hepturosonic acid) from Neu5Ac or Neu5Gc residues, respectively. On the other hand, internal residues of Neu5Ac (C_9 (Neu5Ac)) or Neu5Gc (C_9 (Neu5Gc)) remain intact (21). Accordingly, the detection of C_7 -compounds in the periodate oxidation products would strongly suggest the presence of internal sialyl residues or oligomeric structure of $\alpha 2 \rightarrow 8$ -linked *N*-acylneuraminic acid therein. Fluorescent-labeled C_7 - and C_9 -compounds with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) (22), which is an α -keto acids-specific labeling reagent, are quantified by fluorometric high performance liquid chromatography (HPLC) (23).

Mild Acid Hydrolysis-Fluorescent HPLC Analysis (15): A series of oligo/polymers produced by mild acid hydrolysis of an oligo/polySia chain are directly labeled with DMB and analyzed on an anion-exchange HPLC. The DMB-labeling is ap-

ロ糖タンパク質 (PSGP) (11) にその存在が知られている。現在、NCAM を中心にした研究の結果から、ポリシアル酸は、細胞と細胞、細胞と細胞外マトリックスの間の接着を阻害的に制御して神経形成に関与する分子であると認識されている (12) (図 2)。またある種の腫瘍細胞で発現しており、癌転移にも関与することが示されている (13)。

一方、モノシアル酸とポリシアル酸の中間的な鎖長をもつシアル酸鎖、ジ (重合度 2)・オリゴシアル酸 (重合度 3~7) 構造 (図 1) の存在は、糖タンパク質においてはほとんど知られていなかった。しかし近年、我々がその微量検出法を開発して (14-16) 存在検索を行った結果、様々な組織の糖タンパク質において広く存在することが明らかになった (16,17)。

本稿では、タンパク質上におけるジ・オリゴ・ポリシアル酸を中心に最新のトピックスを紹介し、このようなシアル酸の鎖長多様性の生物学的意義と今後の研究課題について述べる。

A. 微量検出法の開発

マイクログラム程度のシアル酸重合体エピトープを持つサンプルを解析するときは、メチル化分析法 (18)、NMR 測定法 (19)、緩和水解-TLC 分析法 (20) といった従来法を用いることができる。しかしこのようなエピトープを持つ糖タンパク質は、しばしば非常に微量であるため従来法では解析が難しいことがある。そこで我々はこれらの糖鎖エピトープを検出する高感度な化学的手法と免疫化学的手法を開発し、化学的手法と免疫化学的手法を組み合わせることで、fmol 程度の微量なジシアル酸、オリゴシアル酸、ポリシアル酸糖鎖エピトープの解析が可能にした。

A-1. 化学的検出法

蛍光 C_7/C_9 分析法 (14): $\alpha 2 \rightarrow 8$ 結合 *N*-アシルノイラミン酸 (Neu5Acyl) の重合体構造を過ヨウ素酸酸化すると、非還元末端残基は酸化され *N*-アシルノイラミン酸の C_7 -アナログを生じる。つまり Neu5Ac および Neu5Gc からそれぞれ C_7 (Neu5Ac) (5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-L-アラビノ-2-ヘプツロソン酸) または C_7 (Neu5Gc) (5-ヒドロキシアセトアミド-3,5-ジデオキシ-L-アラビノ-ヘプツロソン酸) が生じる。一方、内部の残基はインタクトな Neu5Ac (C_9 (Neu5Ac)) または Neu5Gc (C_9 (Neu5Gc)) のままである (21)。したがって過ヨウ素酸酸化物において C_7 化合物が検出されるということは、その試料に、内部の $\alpha 2 \rightarrow 8$ 結合 *N*-アシルノイラミン酸残基の存在、すなわち $\alpha 2 \rightarrow 8$ 結合シアル酸重合体の存在を強く示唆する。 α ケト酸を特異的に標識する試薬である 1,2-ジアミノ 4,5-メチレンジオキシベンゼン (DMB) (22) で蛍光標識した C_7 化合物および C_9 化合物は、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離・定量される (23)。

緩和水解-蛍光 HPLC 分析 (15): シアル酸重合体の緩和水解によって生成される一連のジ・オリゴ・ポリマーを DMB 試薬を用いて直接ラベルし、陰イオン交換 HPLC によって分析す

plicable to detection of various types of oligo/polymers of sialic acids found in glycoconjugates, which differ in the component sialic acid species, the inter-residual linkage, and DP. These analyses can be applied to glycoproteins blotted on the PVDF membrane.

A-2. Biochemical Analyses

Specific Antibody: Antibodies are powerful tools for the structural and functional analyses of various glycotopes. It is most important to understand the precise specificity of the antibody recognition, if the antibody is used for structural determination of carbohydrates. We determined the immunospecificity of so-called anti-polysialic acid antibodies and newly developed antibodies by an ELISA-based method using a series of oligo/polysialic acid-conjugated phosphatidylethanolamine with the defined sialic acid composition and DP as the test antigens (24). Using this method, the precise immunospecificity of various anti-di/oligo/polysialic acid antibodies has been successfully separated into 3 groups based on the DP and non-reducing terminal end for antibody recognition (16,17). Group I antibodies are the "anti-polysialic acid antibodies" that recognize chains of $\alpha 2 \rightarrow 8$ -linked sialic acid with DP 8 or greater sialic acid residues, including fully extended polysialic acid chains. These antibodies recognize the helical conformation formed by sialic acid residues within the internal region of the polysialic acid chains. The non-reducing terminal residues are not involved in antigen recognition. Group II antibodies, designated "anti-oligo+polysialic acid antibodies," recognize both oligosialic acid with DP 2-7 and polysialic acid chains. These antibodies recognize the distal portion of oligo/polysialic acid chains, including the non-reducing termini. Group III antibodies, designated "anti-oligosialic acid antibodies," recognize oligosialic acid with DP 2-4, but do not bind polysialic acid. These antibodies appear to recognize specific conformations of di/oligosialic acid with DP 2-4.

Specific Enzyme: Endo-sialidase (Endo-N-acylneuraminidase, Endo-N) that selectively cleaves $\alpha 2 \rightarrow 8$ -linked polysialic acid chains (25), and linkage-specific exo-sialidases that hydrolyze the sialic acid residue from the non-reducing termini are two enzymatic probes. The Endo-N can cleave the pentamer of sialic acid. There are another two endo-N-acylneuraminidases whose specificities are $DP \geq 11$ and $DP \geq 3$ (26,27). Recently, the linkage-specific sialidases are easily available (for example, $\alpha 2,3$ -specific sialidase and $\alpha 2,3/\alpha 2,6$ -specific sialidase) (28). We can determine di/oligo/polysialyl structure more precisely by the combinational application of specific antibodies and specific enzymes.

B. Occurrence of Di- and Oligosialic Acid Structures on Glycoproteins

We searched for the di/oligo/polysialic acid residues on glycoproteins in mammalian tissues and cells using these sensitive chemical and immunochemical methods. An extremely large

number of sialic acid residues was found in glycoproteins. This method is very simple and applicable to various types of oligo/polymers of sialic acids found in glycoconjugates, which differ in the component sialic acid species, the inter-residual linkage, and DP. These analyses can be applied to glycoproteins blotted on the PVDF membrane.

A-2. 免疫化学的分析 (特異的抗体と酵素)

多くの糖鎖エпитオプの構造的、機能的な研究に抗体は有用である。しかしそのためには厳密な抗体の特異性の解析が必要である。これまでに開発された抗体の精密な特異性を、一連の重合度をもつ共通な合成脂質結合ジ・オリゴ・ポリシアロ糖抗原 (24) を用いて調べた結果、抗体認識に必要な重合度と非還元末端残基の必要性に基づいて、3つのグループに分けることができる (16,17)。実際、それぞれを用いて、重合度を予測することが可能になった。グループ I 抗体は長く伸長した、DP が 8 以上のポリシアル酸鎖を認識する「抗ポリシアル酸抗体」である。これらの抗体はポリシアル酸構造の内部領域のシアル酸残基によって形成されるヘリックス構造を認識する。非還元末端は抗体の認識に関与しない。グループ II 抗体は DP 2-7 のオリゴシアル酸とポリシアル酸鎖の両方を認識する「抗オリゴ+ポリシアル酸抗体」である。これらの抗体は非還元末端を含むオリゴ・ポリシアル酸構造の末端部位を認識する。グループ III 抗体は DP 2-4 のジ・オリゴシアル酸のみを認識し、ポリシアル酸を認識しない「抗オリゴシアル酸抗体」である。これらの抗体は DP 2-4 のオリゴシアル酸の特異的立体構造を認識することがわかっている。

シアル酸重合体に高い特異性を持つ酵素として、エンド-N-アシルノイラミニダーゼ (Endo-N) (25) と結合位特異的シアリダーゼがある。N-アシルノイラミン酸のペンタマー構造が Endo-N の認識に必要な最小単位である。他にも基質特異性が異なる二種類のエンドシアリダーゼ (切断に必要な最少重合度はそれぞれ $DP \geq 11$ 、 $DP \geq 3$) (26,27) が現在までに見つかっている。また、近年では基質特異性が異なるエキソシアリダーゼ ($\alpha 2,3$ 、 $\alpha 2,6$ -特異的シアリダーゼ、 $\alpha 2,3$ 、 $\alpha 2,6$ 、 $\alpha 2,8$ 特異的シアリダーゼなど) (28) が利用可能となり、これらの酵素と抗体を用いることによって、シアル酸重合体の厳密な構造決定が可能になった。

B. 糖タンパク質におけるシアル酸重合体の普遍的存在

これらの方法を用いて、哺乳類の種々の臓器や細胞においてジ・オリゴ・ポリシアル酸構造を検索した。その結果、シアル酸重合体構造を持つ糖タンパク質が天然に広く存在分布することが明らかになり、さらに種々の担体タンパク質が同定された。脳においては、成体型 NCAM (17)、CD166 (29) にジシアル酸構造が存在する。また、血清では、フェッツイン (30)、 α_2 -マクログロブリン (30)、脂肪の代謝や動脈硬化、糖尿病の発病に深く関わる脂肪細胞由来の新しいホルモンであるアディポ Q (ACRP30、アディポネクチンとも呼ばれる) (31) がある。また、ヒトメラノーマにおいてはインテグリン α_5 サブユニットがオリゴシアル酸をもつ (32)。さらにごく最近、ヒトミルク CD36 に

number of glycoproteins in mammals have been shown to bear di/oligo/polysialic acid structures and several carrier glycoproteins were identified. In the brain, NCAM from adult (17), CD166 (29), and synaptophysin are disialic acid-containing glycoproteins. In serum, fetuin (30), α_2 -macroglobulin (30), and adipoQ (adiponectin, ACRP30) (31) a new adipocytokine, which controls the metabolism of lipids and is involved in arteriosclerosis and diabetes are disialic acid-containing glycoproteins. In human melanoma, α -subunit of integrin is identified as an oligosialic acid-containing glycoprotein (32). Recently, we identified CD36 in human milk as a polysialic acid-containing glycoprotein (33). In sea urchin, α 2,9-linked polysialic acid occurs in sperm flagellum(34). As shown here, identification of these di/oligo/polysialoglycoprotein demonstrated the occurrence and diversity of oligo/polymeric structure of sialic acids (Table I).

C. Newly Identified Glycoproteins Modified by the Di/Oligo/Polymer of Sialic Acids

C-1. Disialic Acid Residues on CD166 during Neurite Out-Growth (29) and T Cell Activation (35)

CD166 is a member of the immunoglobulin superfamily and mainly exists in neural cells. CD166 is known to be a cell adhesion molecule via homophilic interaction between CD166 and CD166 and heterophilic interaction between CD166 and CD6. We demonstrated that disialic acid residues are linked to the O-linked chain of CD166 and that ST8Sia III whose substrate is unknown would be an enzyme responsible for the production of disialic acid residues. Neuro2A cells differentiate into

ポリシアル酸構造の存在が明らかとなった(33)。また、ウニ精子では α 2→9結合のポリシアル酸が鞭毛に発現していることを証明した(34)。このように新しいポリシアル酸含有糖タンパク質および数多くのジシアル酸、オリゴシアル酸含有糖タンパク質の同定がなされたことによって、シアル酸重合体の遍在性とその鎖長多様性の存在がはっきりと証明されてきた(表 I)。

C. 新規シアル酸重合体修飾糖タンパク質

C-1. CD166上に存在するジシアル酸構造と神経突起形成(29)およびT細胞活性化(35)

CD166は免疫グロブリンスーパーファミリーの一種で、主に神経細胞に存在する。CD166はホモフィリックな相互作用とCD6などのリガンドとのヘテロフィリックな相互作用を介した細胞接着に関わる分子として知られている。我々は、この分子のO-型糖鎖上にジシアル酸が存在すること、このジシアル酸構造の形成には、 α 2,8-シアル酸転移酵素の中でも、これまであまりその働きが分かっていなかったST8SiaIIIが関与していることを証明した。特に興味深いのは、Neuro2A神経芽腫細胞の例である。Neuro2Aはレチノイン酸処理すると神経分化して突起形成する細胞である。この細胞に、外からGD3やGQ1cのようなガングリオシドを加えたり、ST8Sia I (GD3合成酵素)の遺伝子導入によって強制的にGD3を発現させたりすると、レチノイン酸処理なしでも分化が開始されることから、神経突起形成におけるGD3などのガングリオシドの重要性が示されている。しかしながら、Neuro2A細胞には、もともとジシアル酸構造をもつガングリオシドもその合成酵素も存在しない。また、我々は、

Table I. Di/oligo/polysialic acid-containing glycoconjugates identified so far.

Carrier molecule	Origin	DP	Ref.
Glycocalyx	Neuroinvasive bacteria	100-200	7,8
Neural cell adhesion molecule (NACM)	Vertebrate embryonic brain, hippocampus, olfactory bulb	2-50	7,12
Polysialoglycoprotein (PSGP)	<i>Salmonidae</i> fish egg	2-24	11
Sodium channel	Eel, Rat brain	≥ 8	10,58
CD36	Milk in mouse and human	2-18	33
Integrin (α_5 -subunit)	Human melanoma, fibroblast, leukemia cell	5-7	32
Megalin	Rat kidney	2-?	59
Ceruloplasmin	Various tissues in rat	2-?	60
Ganglioside	Various tissues from deuterostome	2-4	61
Sperm binding protein	Sea urchin egg	2-3	62
Chromoglanin	Bovine medulla of suprarenal gland	2	63
Band-3	Red blood cell from human	2	64
Glycophorin	Red blood cell from human	2	65
Synaptophysin	Mouse brain	2	66,67
Fetuin	Bovine serum	2	30
α_2 -Macroglobulin	Bovine serum	2	30
AdipoQ	Bovine serum, 3T3-L1 cell	2	31
CD166	Mouse brain, Neuro2A, Mouse T cell	2	29,35

neurons under retinoic acid and neurites are formed. It was shown that GD3 is important for neural differentiation because Neuro2A cells can differentiate into neurons without retinoic acid after the addition of exogenous GD3 or GQ1c or forced expression of GD3 synthetase. However Neuro2A cells have neither GD3 nor GD3 synthetase. We also showed that retinoic acid did not induce the GD3 expression. We hypothesize that disialic acids are expressed on glycoproteins after the addition of retinoic acid and that the disialic acid on glycoproteins is the major player in neural differentiation like that on glycolipid. Actually, the expression of disialic acid on CD166 was at a low level before differentiation and the amounts of disialic acid residues increased after stimulation with retinoic acid. Furthermore, the disialic acid-specific antibody inhibited the neurite elongation. These results clearly showed that the disialic acid on CD166 is involved in neural differentiation (Fig.3).

Gangliosides are involved in the signal transduction pathway of T cell activation. It is known that T cell proliferation is induced by cross-linking of CD3/CD4 using the anti-CD3/CD4 antibody. Co-treatment of rat T cells with anti-ganglioside antibody AC1 ($\alpha 2 \rightarrow 8$ -linked diNeu5Gc, see Table IV) and anti-CD4 resulted in a marked stimulation of T cell proliferation, although both these antibodies failed to activate the rat T cells (42). It is worthy of note here that the AC1 epitope was the common epitope of a glycolipid (Neu5Gc)GD1c and the 100 kDa glycoprotein on rat T cells. Recently, we identified the 100 kDa-glycoprotein as CD166 in mouse T cells. These results suggest a novel regulatory pathway of T cell activation involving CD4 and the diNeu5Gc glycotopes possibly on CD166 as well as glycolipids.

レチノイン酸で突起形成誘導しても、それらのガングリオシド発現は誘導されないことをつきとめた。これらのことから、我々は、レチノイン酸で突起形成誘導すると、ガングリオシド上ではなく糖タンパク質上にジシアル酸構造が発現して、そのジシアル酸残基がガングリオシドと同等の機能を果たしているのではないかと考えた。実際に調べてみると、レチノイン酸処理による分化の進行にともなって、もともと低レベルのジシアル酸構造をもつ CD166 上で、ジシアル酸構造の量が大幅に増加することが見いだされた。また、ジシアル酸構造特異的な抗体存在下で分化誘導すると、神経の突起伸長が抑制されることがわかった。以上のことから、CD166 上のジシアル酸構造が神経細胞の分化に関わっていることが示された (図 3)。

また、T 細胞の活性化において、ガングリオシドがシグナル伝達経路に関与していることが知られている。T 細胞の活性化は T 細胞受容体を刺激することによって引き起こされ、*in vitro* では T 細胞受容体の一部である CD3 を抗体により架橋させると、特に CD4 抗体との共存下で架橋させると強く活性化される。一方、ラット T 細胞を $\alpha 2 \rightarrow 8$ 結合 Neu5Gc のダイマー構造に特異的な抗体 AC1 (糖脂質抗原で作製) と抗 CD4 抗体の共存下で培養すると著しい活性化が起こることも知られている。ラット T 細胞上には AC1 反応性糖脂質 (Neu5Gc) GD1c が存在することから、T 細胞活性化においてジシアル酸をもつガングリオシドの重要性が議論されてきた (42)。興味深いことは、ラット T 細胞において、AC1 エピトープは糖脂質上だけでなく 100 kDa 糖タンパク質上にも存在する共通糖鎖抗原であるという点である。そして我々は、最近、マウスでこの 100 kDa 糖タンパク質が CD166 であると同定した。すなわち、糖脂質だけでなく糖タンパク質 CD166 上に存在するジシアル酸構造が、CD4 と共同して T 細胞の活性化を調節する可能性を示唆しており、その分子機構はきわめて興味深い。

Fig. 3. $\alpha 2,8$ -Linked disialic acid is involved in neurite outgrowth. Right: Forced expression of disialoganglioside (exogenous addition of GD3 and GQ1c or stable expression of GD3 synthetase (ST8Sia I)) induces neurite outgrowth in Neuro2A cell without retinoic acid. Left: Retinoic acid induces the expression of ST8Sia III in Neuro2A cell and the disialic acid residue on CD166 increases. However, the disialoganglioside is not expressed. The anti-disialic acid antibody inhibits the neurite outgrowth of Neuro2A cell. These results indicate that the disialic acid on CD166 is important in neurite formation in Neuro2A cell.

C-2. Serum Glycoprotein

Highly sensitive chemical methods allow us to search for di/oligosialic acid-containing glycoproteins in serum. We have recently demonstrated that fetuin, α_2 -macroglobulin (α_2 M), and adipoQ from bovine serum are members of diSia-bearing glycoproteins (30,31). However, these glycoproteins do not always contain disialic acid structures on the molecules, and 1% of fetuin, 4% of α_2 M and several % of adipoQ molecules were estimated to contain disialic acid structures. These results suggest that a small population of these glycoproteins is specifically terminated by the $\alpha_2 \rightarrow 8$ -linked disialic acid glycotope depending on developmental and physiological changes. It should be noted here that α_2 M and adipoQ are known to change their levels in blood in response to inflammation and some hormones, respectively. Furthermore, most of the disialic acid-containing species of α_2 M appear to have a nick scission along the 170kDa-polypeptide chain to form 110 kDa- and 60 kDa-polypeptide chains. Interestingly, this type of nick in α_2 M is usually formed when the α_2 M inhibits some protease activities, which may be induced in response to inflammation. Therefore, it can be speculated that diSia structures on the α_2 M may possibly have some role in inflammatory responses. In the same way, the disialic acid glycotope on fetuin and adipoQ may also modify physiological roles of these serum glycoproteins. AdipoQ in particular, is one of the cytokines secreted from adipose tissue and its receptor is a seven-times transmembrane-type receptor. The importance of the posttranslational modification of adipoQ is also pointed out because of the difference of biological effects between intact and recombinant adipoQ as is often the case with hormone-like molecules.

Recently, we have shown that a 32kDa-glycoprotein is identified as an acute phase glycoprotein induced by the inflammation stimulated by LPS or turpentine oil (36). The expression of disialic acid-containing glycoprotein increased after the inflammation stimuli, indicating that the disialic acid on the 32 kDa-glycoprotein may be involved in inflammation.

C-3. Oligosialylation of the $\alpha 5$ -Subunit of Integrin (32)

Integrin is widely distributed as the receptor for fibronectin. Recently, it has been shown that the integrin on human melanoma cells, fibroblast cells and leukemia cells is oligosialylated. It was demonstrated that removal of the oligosialic acid from the integrin by linkage-specific sialidase digestions inhibited the adhesion toward fibronectin. Colominic acid (average DP=15) could not inhibit the integrin-fibronectin interaction. The binding of an antibody recognizing the fibronectin binding domain of the integrin was weakened after oligosialic acid depletion. These results indicate that oligosialic acid on integrin maintains the conformation in which fibronectin can bind strongly and promotes the adhesion to fibronectin. Notably, another group shows that the disialic acid residue on gangliosides (GT1b, GD3) interacts with high mannose-type *N*-

C-2. 血清糖タンパク質

微量分析が可能となり、血清中のジシアル酸含有糖タンパク質を検索したところ、ウシ血清中でフェツイン、 α_2 マクログロブリン (α_2 M)、およびアディポ Q (アディポネクチン) がジシアル酸含有糖タンパク質であることが明らかとなった (30,31)。しかしながら、これらの分子が 100 % ジシアル化修飾をうけているのではなく、フェツインでは 1 %、 α_2 M では 4 %、アディポ Q の数 % がジシアル化修飾を受けていた。これらの結果は、発生段階や生理学的変化に呼応して、 $\alpha_2 \rightarrow 8$ 結合ジシアル酸構造が結合した糖タンパク質が発現してくるため、ごく一部の分子だけがジシアル酸を特異的に結合するようになるとも考えられる。 α_2 M やアディポ Q の血中レベルが、炎症時およびあるホルモンの作用によって変化するという事実は注目に値する。また、ジシアル酸構造をもつ α_2 M 糖タンパク質のほとんどは 170 kDa ポリペプチド鎖に切断がおり、110 kDa および 60 kDa のポリペプチド鎖を生じている。興味深いことに、 α_2 M のこの種の切断は普通、炎症時などで誘起されるある種のプロテアーゼ活性を α_2 M が抑える際に起こることが知られている。そのため、 α_2 M 上のジシアル酸構造は炎症反応の際に α_2 M の機能を制御する役割を果たしていることが考えられる。同様に、フェツインやアディポ Q においても、ジシアル酸鎖が血清糖タンパク質の生理学的役割を修飾しているかも知れない。特にアディポ Q は脂肪細胞が分泌するアディポサイトカインといわれるホルモンの一種であり、近年 7 回膜貫通型の受容体が明らかにされてきたが、組換え体とインタクトな分子での作用が完全には一致しないことから、翻訳後修飾されることの重要性が示されている。

近年、ジシアル酸の炎症における役割を調べる目的で、マウスに LPS やテレピン油刺激で炎症を誘発したところ、血清中のジシアル酸含有糖タンパク質である 32 kDa-糖タンパク質が急性期タンパク質として同定された (36)。ジシアル酸修飾をうけた糖タンパク質が発現上昇するという事は、炎症時における生理機構に関わっていることを示唆しており興味深い。

C-3. インテグリン $\alpha 5$ サブユニットのオリゴシアル酸修飾 (32)

インテグリンはフィブロネクチン受容体として広く生体内に存在している。近年、ヒトメラノーマ細胞、線維芽細胞、白血球細胞上のインテグリン $\alpha 5$ サブユニットが重合度 5~7 のオリゴシアル化を受けていることが明らかになった。インテグリン $\alpha 5$ に存在するオリゴシアル酸のフィブロネクチンへの接着への関わりは、結合特異的なシアリダーゼ消化によるフィブロネクチンセファロースによるブルダウン法によって行われ、オリゴシアル酸が除去されることにより接着が阻害される事が分かった。また、オリゴシアル酸のフィブロネクチンへの接着の機序に関しては、シアル酸の重合体 (平均重合 15) であるコロミン酸によって阻害がかからないこと、 $\alpha 5$ 上のフィブロネクチンとの接着に関わる領域をエピトープにする抗体は、オリゴシアル酸の除去により $\alpha 5$ との反応性が低下したことから、オリ

linked glycan chains on the α -subunit of integrin and regulates the adhesion to fibronectin. Thus, the di/oligosialic acid residues are important in the interaction between integrin and extracellular matrix.

C-4. Polysialylation of CD36 in Human Milk (33)

Milk is very important for a mammalian newborn baby because milk is the only source of nutrition and it plays a central role in protection from infection via trapping the bacteria from the environment. Milk is the perfect food that contains various nutritious and immunity-related molecules. Milk attracts many researchers because of its multifunctional aspects including nutrition and protection. On the other hand, little attention has been paid to the significance of sialic acid in milk, although there are some interesting observations: Sialic acids are rich in colostrum (38); The amount of gangliosides in the brain of sialic acid-fed rats increased and the learning ability of the rats improved as compared with rats fed on a sialic acid-free diet (39,40).

Using the sensitive chemical methods (described above), we first detected polysialic acid in human milk. The chain length of the polysialic acid residues was of at least 18 sialic acid residues (Fig.4). The polysialic acid-containing glycoprotein was identified as CD36. Polysialic acid was linked to the *O*-linked glycan chain(s). Not all CD36 molecules were polysialylated, but 5% of CD36 was modified by this unique sugar chain. The developmental profile of the polysialylated CD36 expression shows that the level of polysialic acid on CD36 in milk reaches its maximum at 1-month post-parturition, decreases to that in the colostrum, and later remains unchanged for 6 months (Fig. 4). Not only human milk but also mouse milk contains

ゴシアル酸の存在により、 $\alpha 5$ はフィブロネクチンにより強く親和性を示すような高次構造を維持することが可能となり、その結果、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ のフィブロネクチンへの接着が促進されることが考えられている。また、これとは別に、ジシアリル ganglioside (GT1b と GD3) は $\alpha 5$ サブユニットのハイマンノース糖鎖と相互作用し、上皮細胞とフィブロネクチンの相互作用を調節している可能性も示されている (37)。このように、細胞と細胞外マトリックスとのインテグリンを介した相互作用にもジ・オリゴシアル酸が密接に関わっているのである。

C-4. ヒトミルク CD36 のポリシアル酸修飾 (33)

哺乳動物の新生児にとって、ミルクは唯一の栄養源であること、免疫系が完成されていない新生児において、外界からの病原体を捕捉するという感染防御の役割を果たすことから非常に重要なものである。このようにミルクは、様々な分子が巧みに調合されている完全食品である。その中でも、ミルクオリゴ糖は栄養源と感染防御の両方の役割をもつ多機能分子であり、盛んに研究されている。一方、ミルク中に含まれるシアル酸に関しては、初乳に非常に多く含まれていること (38) や、シアル酸を投与したラットでは、脳での ganglioside 量が増加し、投与していないラットと比べて学習機能が向上した (39,40) という報告もあるが、シアル酸の機能に関しては不明な点が多い。

そこで近年開発された微量分析法により、ミルク中のシアル酸の重合度を分析したところ、重合度 18 までのシアル酸重合体が検出された。この担体タンパク質を同定したところ、CD36 であることが判明した (図 4)。ポリシアル酸は CD36 の *O*-型糖鎖上に結合している。すべての CD36 がポリシアル酸修飾を受

Fig. 4. $\alpha 2,8$ -Linked polysialic acid in human milk. Fluorometric anion-exchange HPLC profiles of (a) authentic DMB-labeled $\alpha 2,8$ -linked oligo/polysialic acid chains and (b) free oligo/polysialic acid chains derived from mild acid hydrolysate of human milk, followed by labeling with DMB. The fluorometric anion-exchange chromatography was performed with a linear gradient of 0–0.3M NaCl and monitored on a fluorescence detector (set at wavelength of 373 nm excitation and 448 nm emission). The number on the peak indicates the DP. (c) Developmental changes of sialic acid content in milk (●) and the polysialic acid on CD36 (□) in colostrum and milk of up to 6 months after parturition. N indicates the number of samples.

polysialylated CD36.

CD36 is one of the scavenger receptors and expressed on the platelets, macrophage, and milk. The multiple functions of CD36 are known. For example, CD36 activates platelets when collagen and thrombospondin bind to CD36. Binding of acidic phospholipids to CD36 triggers the removal of apoptotic cells. CD36 is involved in the removal of oxidized LDL and glycated proteins from serum by trapping them. It is also shown to be involved in the transport of fatty acids (40). CD36-knock out mice exhibit no obvious phenotypes, and the function of CD36 in milk is still unknown. An interesting observation about a function of the carbohydrate part of CD36 was made, showing that *N*-linked carbohydrate chains altered the binding ability of CD36 to fatty acids (41). Our original finding that *O*-linked carbohydrate chains are modified by the unique polysialic acid residues implicates a new function of CD36 in milk. For example, it can be speculated that DP of di/oligo/polysialic acid chains regulates the binding ability of CD36 toward various molecules described above. It was previously reported that sialic acids were most enriched in colostrum. However, we demonstrated that the expression of polysialic acid residues on the milk CD36 was transiently up-regulated at 1 month post-parturition. As the milk consists of the components which help a baby to grow, the polysialic acid residue might be the (carbohydrate) material which is used for the construction of the neural system. It would be interesting to reveal a new function of polysialic acid other than its anti-adhesive character.

C-5. Discovery of a New Type of Polysialic Acid in Sea Urchin Sperm Flagellum (34)

Lipid rafts are a hot spot for signal transduction. Based on our own finding described below, we are considering that rafts are also a hot spot for the presentation and functioning of the rafts-localized glycotopes on glycoproteins and glycolipids. We demonstrated that the rafts are enriched in the glycotopes that are shared by both glycolipids and glycoproteins. We have been focusing on the raft-mediated interactions in sea urchin fertilization as a microscopic model of sperm and egg interactions. In sea urchin sperm, we developed monoclonal antibodies against glycolipids localized in the rafts and one of them exhibited immunospecificity to $\text{HSO}_3 \rightarrow 8\text{Neu5Ac}$ structure ($\text{HSO}_3 \rightarrow 8\text{Neu5Ac}$). This glycotope exists not only in glycolipids but also in glycoproteins. The non-reducing terminal end of the 40–80kDa-glycoprotein, a major sialoglycoprotein in sperm, was capped by the $\text{HSO}_3 \rightarrow 8\text{Neu5Ac}$ residue. Interestingly, the internal sialyl chain consists of a new type of polysialic acid, i.e., a polymer of $\alpha 2,9$ -linked Neu5Ac (Fig. 5). This new type of polysialic acid structure was unequivocally determined by the chemical methods (mild/hydrolysis-fluorometric HPLC (Fig. 5), fluorometric C_7/C_9 analysis, methylation analysis, and GC-MS) attentively. This structure is exclusively localized on the flagellum. It is interesting to note that the $\alpha 2,9$ -linked Neu5Ac-

けているわけではなく、ごく一部 (5 % 程度) の分子が修飾されている。また、このポリシアル酸構造は、泌乳期が始まってから 1 ヶ月後にピーク量を迎え、その後、初乳と同レベルまで減少し、そして、6 ヶ月間一定になるという分化段階特異的な発現をしている (図 4)。さらに、ヒトだけではなく、マウスミルク CD36 もポリシアル酸修飾を受けていることも判明した。

CD36 はスカベンジャーレセプターの一種で、血小板、マクロファージ、ミルクに存在することが知られている。機能は多岐にわたっており、コラーゲンやトロンボスポンジンの受容体として働いて、血小板の活性化を引き起こしたり、酸性リン脂質に結合して、アポトーシスを起こした細胞を除去したり、酸化 LDL や糖化タンパク質に結合して、血中からそれらを除去する作用がある。また、長鎖脂肪酸の輸送に関わることも明らかにされている (40)。ノックアウトマウスの解析も進められているが、ミルク中の CD36 の機能については、ほとんどわかっていない。特に CD36 の糖鎖の機能に関しては、脂肪酸との結合性にそれ自身の *N*-型糖鎖の存在が重要であることが示唆されているにとどまっている (41)。CD36 の *O*-型糖鎖上にポリシアル基が発見されたことは、CD36 の新機能 (特にミルク中での) の発見に繋がるものと期待される。例えば上述の特に CD36 の様々な分子に対する接着活性が、シアル酸の重合度の違いで厳密に制御される可能性を追求することは興味深い。また、初乳にはシアル酸が多量に含まれていることは知られていたが、その重合体であるポリシアル酸は泌乳期開始の 1 ヶ月後に一過的に増加するという現象が初めて明らかになった。ミルクには新生児の免疫学的、栄養学的な見地だけでなく、その成長を支える材料成分が備わっていることを考えると、ポリシアル酸が新生児における神経系構築のための材料 (糖鎖) 源として機能している可能性もある。ポリシアル酸のミルクにおける機能を探る中で、反接着作用以外の新機能が見いだされることが期待される。

C-5. ウニ精子鞭毛における新規ポリシアル酸修飾の発見 (34)

我々は、糖タンパク質と糖脂質の共通糖鎖エピトープの存在とその機能発現の場としてのラフトの役割に注目している。そのモデルケースとしてウニの受精における精子と卵の相互作用の研究を行っている。我々はこれまでに、ウニ精子上のラフト成分に含まれる糖脂質の解析を行う過程で、 $\text{HSO}_3 \rightarrow 8\text{Neu5Ac}$ 構造に対する抗体を作成し、それを用いて検索したところ、この構造が糖脂質のみならず、ラフト上の糖タンパク質上にも存在することをつきとめた。そしてその主な担体タンパク質が 40 ~ 80 kDa の未同定のムチン様糖タンパク質上に存在することを明らかにした。この 40 ~ 80 kDa 糖タンパク質において、ポリシアル酸構造は *O*-型糖鎖上存在しており、その非還元末端は硫酸化シアル酸によってキャップされている。この新規ポリシアル酸構造 (図 5) は詳細な化学的分析 (緩和水分解/蛍光 HPLC 分析 (図 5)、蛍光 C_7/C_9 HPLC 分析、メチル化分析、GC-MS) によって厳密な、 $\alpha 2 \rightarrow 9$ 結合であることが証明された。この糖タ

Fig. 5. Sulfated $\alpha 2,9$ -linked polysialic acid in sea urchin sperm. Upper, HPLC of DMB-derivatives of the mild acid hydrolysate of sea urchin sperm glycopeptides. The hydrolysate was derivatized with DMB and applied to an anion-exchange HPLC with a gradient from 0–0.4 M NaCl (straight line). The elution profile was monitored on a fluorescence detector (set at wavelength of 373 nm excitation and 448 nm emission). Bottom, A proposed structure of the O-linked glycan chains of sea urchin sperm. n, on average 15; N, 4–5; Xaa, unidentified amino acid.

bearing molecule and the $\alpha 2,8$ -linked Neu5Ac-bearing molecule is co-localized in the same rafts. It is also suggestive of biological functions that the polysialic acid potentially possesses Ca-binding ability and anti-adhesive effect, and these properties are greatly strengthened by the clustered structure along the mucin-type 40–80 kDa glycoprotein, which is also localized in the rafts in cluster. Studies on the biological functions of the $\alpha 2,9$ -polysialic acid and the $\text{HSO}_3 \rightarrow 8\text{Neu5Ac}$ epitopes are underway in our laboratory.

C-6. $\alpha 2 \rightarrow 9$ -Linked Polysialic Acid on Mouse Neuroblastoma Cell Lines

In 1985, Fukuda *et al.* showed the Neu5Ac $\alpha 2,9$ Neu5Ac structure on the lactosaminoglycan in human teratocarcinoma cells (PA1) by the methylation analysis and FAB-MS (43). Recently, Inoue *et al.* showed the $\alpha 2,9$ -linked polysialic acid in C-1300 mouse neuroblastoma cells (NB41A3) by the mild acid hydrolysis/fluorometric HPLC analysis and fluorometric C_7/C_9 analysis (44). Identification of carrier protein and functional analyses are interesting subjects to be solved.

D. Sialyltransferases Responsible for the Biosynthesis of Di/Oligo/Polysialic Acids

Since the expression of $\alpha 2,8$ -linked di/oligosialic acid on glycoproteins is glycoprotein species-specific, cell-type- and tissue-type-specific, developmental stage-dependent, and differentiation-associated, the biosynthesis of these sialyl glycotopes must be strictly regulated. Sialyltransferases are the enzymes that transfer sialic acid to the glycoconjugates. Linkage-specific sialyltransferases are localized in the Golgi apparatus and use CMP-Sia as a donor substrate. Sialyltransferases responsible for

ンパク質は精子の頭部ではなく、鞭毛部に局在していることがわかった。ガングリオシドと共通な末端部分(硫酸化シアル酸)を持つこと、ポテンシャルにカルシウム結合能をもち、かつ反接着作用をもつポリシアル酸が一つの糖の鎖に組み込まれ、その分子がムチン様糖タンパク質上でクラスター化していること、さらにラフトという部位に同居して局在することから、ラフト機能の制御的役割を果たすものと考えられる。 $\alpha 2,9$ -結合ポリシアル酸と $\text{HSO}_3 \rightarrow 8\text{Neu5Ac}$ エピトープの生物学的機能の解析は、現在我々のグループで進めている。

C-6. マウス培養細胞上の $\alpha 2 \rightarrow 9$ 結合ポリシアル酸構造

1985年に、福田らはヒトテラトカルシノーマ細胞(PA1)上のラクトサミノグリカンには、Neu5Ac $\alpha 2,9$ Neu5Ac ジシアル酸構造が存在していることを、メチル化分析、FAB/MS分析により証明した(43)。その後、井上らはC-1300マウスニューロblastoma細胞(NB41A3)上に、 $\alpha 2,9$ -結合ポリシアル酸構造を緩和酸加水分解/蛍光HPLC分析、蛍光 C_7/C_9 HPLC分析法により検出した(44)。今後、 $\alpha 2 \rightarrow 9$ 結合ポリシアル酸構造をもつ担体分子の同定および生物学的機能の解明が待たれる。

D. シアル酸重合体を生合成する糖転移酵素

糖タンパク質上の $\alpha 2 \rightarrow 8$ 結合シアル酸重合体の発現は糖タンパク質の分子種に特異的であり、細胞種や組織、発生段階あるいは分化過程に特異的であり、これらのシアロ糖鎖エピトープの生合成は厳密に制御されている。複合糖質上へのシアル酸の転移は、一般的にシアル酸転移酵素によって担われている。ゴルジ装置に存在する結合様式特異的なシアル酸転移酵素は、シアル酸供与体であるCMP-シアル酸を用いて、シアロ複合糖質を生合成する。これまでクローニングされてきた $\alpha 2,8$ -結合シア

the biosynthesis of $\alpha 2,8$ -linked sialic acid residues consist of six members, ST8Sia I-ST8Sia VI, as far as clones until now (45,46). ST8Sia I and ST8Sia V are enzymes responsible for the biosynthesis of gangliosides. ST8Sia II (STX) and ST8Sia IV (PST) are known to be involved in the biosynthesis of the polysialic acid (DP = up to 50) at least *in vitro*. These enzymes appear to be more specific to NCAM and polysialoglycoprotein (PSGP) in fish egg (46,47) than any other glycoproteins tested so far. The deletion experiment of polysialic acid chain by Endo-N digestion and the masking experiment by anti-polysialic acid antibodies would demonstrate the function of polysialic acid chain indirectly. Recently, knock-out and knock-down experiments of the enzyme genes which are responsible for the biosynthesis of polysialic acid or carrier protein bearing the polysialic acid chain have given legible results on the function of polysialic acid residue. Very recently, mice lacking in the ST8Sia IV gene decreased the expression of polysialic acid in specific brain regions and are impaired in LTD and LTP in the hippocampus CA1 region (48). However, no decrease in CA3 LTP was observed unlike the NCAM-deficient mice (48). On the other hand, mice lacking in the ST8Sia II gene did not exhibit impairment of the hippocampus synaptic plasticity, but instead resulted in the misguidance of infrapyramidal mossy fibers and the formation of ectopic synapses in the hippocampus (49). The ST8Sia II-deficient mice exhibited higher exploratory drive and reduced behavioral responses (49). ST8Sia II and ST8Sia IV are expressed in different special and temporal pattern among neural tissues and mice deficient in either ST8Sia II or ST8Sia IV showed different phenotypes. These results indicate that each enzyme is able to synthesize the polysialic acid chain, but plays different roles in brain. Studies on mice of double knock-out of ST8Sia II and ST8Sia IV would be informative.

ST8Sia III (50) and ST8Sia VI (51) can form short sialyl di/oligomer. Little is known about the acceptor glycoproteins of these structure in nature and the mechanism for stopping or continuing the synthesis of the dimer. ST8Sia III has the ability to synthesize the disialic acid from monosialylated glycoproteins and glycolipids (50), and might be important in the formation of the common disialic acid glycotope on glycoproteins and glycolipids. ST8Sia VI is shown to synthesize the disialic acid structure on O-linked glycan chains in glycoproteins (51).

E. Di/oligosialic Acid-Binding Molecules

It is well known that many bacteria and viruses have hemagglutinins and some of them recognize the sialic acid residues on host cells (52). Recently, it has been shown that sialic acid-recognizing molecules are present on animal cells and consist of a lectin family, sialic acid-binding-immunoglobulin like lectin (siglecs) (5). Siglecs 1 to 11 and a siglec-like molecule (siglec 12) have been cloned. Siglec is the type-I membrane protein present on blood and neural cells. Siglec consists of a V-

ル酸構造を生合成するシアル酸転移酵素は ST8Sia I~ST8Sia VI の 6 種類である (45,46)。その中で、ST8Sia I と ST8Sia V は糖脂質の生合成に関わっている。また、ST8Sia II (STX) と ST8Sia IV (PST) は *in vitro* で重合度 50 程度のポリシアル酸を生合成することがわかっており、NCAM と魚卵に存在するポリシアル酸鎖の生合成に関わっていることが明らかになった (46,47)。これまでポリシアル酸の機能解析には、細胞表面上のポリシアル酸構造を酵素により特異的に除去する方法 (Endo-N)、特異的抗体でエピトープをブロックする方法を用いていたが、近年では、酵素や担体分子遺伝子発現などのノックアウトやノックダウンの手法を用いることにより、直接的に機能を明らかにすることが可能になってきている。ポリシアル酸の機能を直接的に探るために、ポリシアル酸転移酵素のノックアウトマウスが作製されている。ST8Sia IV ノックアウトマウスでは、脳の広範囲な領域で、ポリシアル酸の発現量が減少し、海馬 CA1 領域では LTP や LTD の減少が見られるが、NCAM ノックアウトマウスで見られる CA3 領域での LTP の減少は観察されなかった (48)。また ST8Sia II 遺伝子のノックアウトマウスでは、海馬のシナプスの可塑性に変化はなかったが、錐体苔状繊維の誤った誘導により、海馬に異所シナプスが形成されていた。またこのマウスは冒険心が旺盛で、恐怖心が減少していた (49)。ST8Sia IV と ST8Sia II はその発現場所や発現時期が異なること、またノックアウトマウスの表現系が異なることから、同じポリシアル酸を合成する酵素でも、担っている役割が異なることが明らかになった。今後、ポリシアル酸の機能をより明確にするためには方法の一つとして、ST8Sia IV と ST8Sia II のダブルノックアウトマウスの解析は興味深い。

ST8Sia III (50) と ST8Sia VI (51) は、短いシアル酸重合体を形成する。基質となる糖タンパク質の同定や重合体形成のメカニズムはほとんど解析されていない。特に、ST8Sia III は、糖タンパク質糖鎖も、糖脂質糖鎖もジ・オリゴシアル化することができる (50) ため、ガングリオシドと糖タンパク質上の共通糖鎖エピトープを考える上でも、重要な役割を果たすことが考えられる。また ST8Sia VI は O 型糖鎖上のジシアル酸構造の生合成を担っていることが示されている (51)。

E. シアル酸重合体結合分子

多くのバクテリアやウイルスでは、その上にあるヘマグルチニンなどが宿主のシアル酸残基を介して結合することがよく知られている (52)。しかし近年、動物細胞上にもシアル酸を認識する分子が存在し、一群のレクチンファミリーを形成していることが明らかにされている (5)。シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン (シグレック) と呼ばれる分子である。これまでに、シアル酸結合能をもつシグレック 1 からシグレック 11 までの

domain, responsible for the sialic acid binding, 1 to 16 repeats of the C2-domain (the number is different among siglecs), and a cytosolic domain. Most siglecs have ITIM motifs (inhibitory motif) and they are considered to play regulatory roles in signal transduction on the sialic acid binding. Please refer to an outstanding review in this issue. In this review, I just describe the specificity on the sialic acid binding. Siglecs mostly bind to the α 2,3- or α 2,6-monosialyl residue, however, siglec 1, 5, 7, 10 and 11 show the affinity toward the α 2,8-linkage (53). Siglec 7 (54–56) and siglec 11 (57) in particular have the ability to bind to the α 2,8-linkages with high affinity. Although it is considered that natural ligand of siglecs that recognizes the disialic acid is gangliosides such as GD3, the di/oligosialic acid-containing glycoproteins described in this review might be candidates for natural ligands.

Conclusion and perspective

Many glycoproteins have now been demonstrated to contain di/oligo/polysialic acid structures and the functional implication of these glycotopes during fertilization, embryogenesis, differentiation, neurogenesis, inflammation, and immune response has been gradually revealed. Fig. 6 shows the world of sialoglycoconjugates viewed in terms of the chain length of sialic acid residues. Various aspects related with the di/oligo/polysialic acid world including structures of carbohydrates and carrier proteins, biosynthesis, recognition molecules have been well studied, but still more effort will have to be made before understanding the biological functions of these unique glycan struc-

分子とシグレック 12 というシグレック様分子がクローニングされている。シグレックは主に血球細胞や神経細胞に存在するタイプ I 膜糖タンパク質で、シアル酸に結合する V ドメインと、シグレック間で長さが異なる 1–16 個の C2 ドメインおよび細胞内ドメインからなる。ほとんどのシグレックの細胞内には ITIM (免疫レセプターチロシン依存性抑制性モチーフ) が存在しており、シアル酸リガンドとの結合により、細胞内へのシグナル伝達を制御していると考えられている。詳細は Crocker 博士らの総説を参照していただきたい。その中で特筆すべき点は、シグレックのシアル酸の結合様式に対する特異性についてである。シグレックのほとんどは非還元末端にシアル酸が α 2,3 または α 2,6 で結合した構造を認識するが、シグレック 1, 5, 7, 10, 11 のように α 2,8 結合シアル酸に親和性を持つものがあることが明らかになってきた (53)。特に合成化合物などを用いた解析からシグレック 7 (54–56) や 11 (57) はジシアル酸構造と強く結合することが明らかにされている。シアル酸ダイマーを認識するシグレックのリガンドは、ジシアロガングリオシドと考えられているが、本稿でも示したように、我々が見いだしている種々のジシアル酸やオリゴシアル酸をもつ糖タンパク質分子がリガンドとなる可能性は高く、その検証は重要な課題である。

おわりに

糖タンパク質上のジ・オリゴ・ポリシアル酸糖鎖の存在が証明され、受精、発生、分化、神経形成、炎症、免疫の諸現象に関与することが示唆されてきている。これらの糖鎖の生物学的重要性がさらに解明されるためには、精密な糖鎖構造解析とその担体タンパク質の同定、ジ・オリゴ・ポリシアル酸構造の

Fig. 6. The world of di/oligo/polysialic acid-containing glycoconjugates. Next to the large asialo- and monosialoglycoconjugate worlds, di/oligo/polysialic acid-containing glycoconjugate worlds extend. Sialyltransferases responsible for the biosynthesis of mono/di/oligo/polysialic acid residues are aligned at the top of the panel. Molecules involved in specific recognition of the asialo/mono/di/oligo/polysialic acid residues are aligned at the bottom of the panel. To understand this world more clearly, structural elucidation of carbohydrate and carrier parts of the glycoconjugates, searching for the specific recognition molecules and elucidation of the recognition mechanism, investigation of biosynthetic mechanism, and finally understanding of biological functions need to be done.

tures. The first thing is to elucidate structures of glycan chains containing these glycotopes and identification of the carrier proteins. The second thing is to demonstrate the presence of molecules that specifically recognize and bind to the di/oligo/polysialic acid glycotopes. More importantly, such “di/oligo/polysialic acid recognition proteins” should be searched for and identified in the context of biological phenomena. The binding mechanism is also to be elucidated. The third thing is to investigate the mechanism that signals from the outside through the binding between di/oligo/polysialic acid chains and its binding counterpart enter the inside. Advanced research on the di/oligo/polysialic acid chain will also give a clear answer why a cell has to decrease valuable energy by forming various di/oligo/polysialic acid chains by several sialyltransferases. Furthermore, once we understand how the degree of polymerization of di/oligo/polysialic acid chains controls the function of the glycoproteins, an easy extension of the use of these attractive molecules to the glycotechnological field would be promising.

Studies described in this review by the author are supported in part by the Mizutani Foundation.

認識分子や結合分子の検索と結合様式の解明、およびそれらの相互作用が細胞内へと伝わる機構を明らかにする必要がある(図6)。今後、シアル酸重合体の研究がさらにすすめば、何故細胞はシアル酸をモノシアル酸としてだけではなく、幾つもの酵素を用意し、貴重なエネルギーを用いて、多様なシアル酸の重合体を形成する必然性があったのかという問いの答えを得ることができるであろう。そして、「シアル酸の重合度が精緻に制御されることによって糖タンパク質の機能が制御される」という、新たな糖タンパク質機能調節メカニズムが明らかになれば、「シアル酸の重合度を人為的に制御することによって、ある生理活性分子の機能をコントロールできる」可能性を示唆しており、糖鎖工学的見地からも魅力的な分子となろう。

本稿で紹介した筆者の研究の一部は(財)水谷糖質科学振興財団の助成を受けている。

References

- Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P., and Shaw, L. (1996) in *Biology of the Sialic Acids* (Rosenberg, A., ed.) pp.7–67, Plenum Press, New York and London
- Angata, T., and Varki, A. (2002) *Chem. Rev.* **102**, 439–469
- Shauer, R. (2004) *Zoology* **107**, 49–64
- Crocker, P. R., Kelm, S., Dubois, C., Martin, B., McWilliam, A. S., Shotton, D. M., Paulson, J. C., and Gordon, S. (1991) *EMBO J.* **10**, 1661–1669
- Crocker, P. R. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 609–615
- Schwarzkopf, M., Knobloch, K. P., Rohde, E., Hinderlich, S., Wiechens, N., Lucka, L., Horak, I., Reutter, W., and Horstkorte, R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 5267–5270
- Troy, F. A. II (1996) in *Biology of the Sialic Acids* (Rosenberg, A., ed.) pp.95–144, Plenum Press, New York and London
- Robbins, J. B., McCracken, G. H., Gotschlich, E. C., Ørskov, F., Ørskov, I., and Hanson, L. A. (1974) *N. Engl. J. Med.* **290**, 1216–1220
- Finne, J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11966–11970
- James, W. M., and Agnew, W. S. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 817–826
- Inoue, S., and Iwasaki, M. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**, 162–165
- Bruses, J. L., and Rutishauser, U. (2002) *Biochimie* **83**, 635–643
- Fukuda M. (1996) *Cancer Res.* **56**, 2237–2244
- Sato, C., Inoue, S., Matsuda, T., and Kitajima, K. (1998) *Anal. Biochem.* **261**, 191–197
- Sato, C., Inoue, S., Matsuda, T., and Kitajima, K. (1999) *Anal. Biochem.* **266**, 102–109
- Sato, C., and Kitajima K. (1999) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **11**, 371–390
- Sato, C., Fukuoka, H., Ohta, K., Matsuda, T., Koshino, R., Kobayashi, K., Troy F. A. II, and Kitajima K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 15422–15431
- Finne, J., Krusius, T., Rauvala, H., and Hemminki, K. (1977) *Eur. J. Biochem.* **77**, 319–323
- Michon, F., Brisson, J. R., and Jennings, H. J. (1987) *Biochemistry* **26**, 8399–8405
- Kitazume, S., Kitajima, K., Inoue, S., and Inoue, Y. (1992) *Anal. Biochem.* **202**, 25–34
- Rohr, T. E., and Troy, F. A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2332–2342
- Nakamura, M., Hara, S., Yamaguchi, M., Takemori, Y., and Ohkura, Y. (1987) *Chem. Parma. Bull.* **35**, 687–692
- Hara, S., Takemori, Y., Yamaguchi, M., Nakamura, M., and Ohkura, Y. (1987) *Anal. Biochem.* **164**, 138–145
- Sato, C., Kitajima, K., Inoue, S., Seki, T., Troy, F. A. II, and Inoue, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18923–18928
- Hallenbeck, P. C., Vimer, E. R., Yu, F., Basseler, B., and Troy, F. A. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3553–3561
- Pelkonen, S., Perkonen J., and Finne, J. (1989) *J. Virol.* **63**, 4409–4416
- Miyake, K., Muraki, T., Hattori, K., Machida, Y., Watanabe, M., Kawase, M., Yoshida, Y., and Iijima, S. (1997) *J. Ferm. Bioeng.* **84**, 90–93
- Saito, M., and Yu, R. K. (1995) in *Biology of the Sialic Acids* (Rosenberg, A., ed.) pp.261–313, Plenum Press, New York and London
- Sato, C., Matsuda, T., and Kitajima K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 45299–45305
- Kitajima, K., Sato, C., Honda, N., Matsuda, T., Yokoyama, M.-H., Close, B. E., and Colley K. J. (1999) in *Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosylation* (Inoue, Y., Lee, Y. C., and Troy, F. A., eds.), pp.69–76, Gakushin Publishing Co., Osaka, Japan

31. Sato, C., Yasukawa, Z., Honda, N., Matsuda, T., and Kitajima, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 28849–28856
32. Nadanaka, S., Sato, C., Kitajima, K., Katagiri, K., Irie, S., and Yamagata T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 33657–33664
33. Yabe, U., Sato, C., and Kitajima, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 13875–13880
34. Miyata, S., Sato, C., Kitamura, S., Toriyama, and Kitajima, K. (2004) *Glycobiology* **14**, 827–840
35. Sato, C., Matsuda, T., and Kitajima K. (2004) in preparation
36. Yasukawa, Z., Sato, C., and Kitajima, K. (2004) submitted
37. Wang, X., Sun, P., Al-Qamari, A., Tai, T., Kawashima, I., and Paller, A.S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 8436–8444
38. B.Wang, J.Brand-Miller, P. McVeagh & P. Petocz (2001) *Am. J. Clin. Nutr.* **74**, 510–515
39. B.L.G.Morgan & M.Winick (1980) *J. Nutr.* **110**, 416–424
40. I.H.Mather (2000) *J. Dairy Sci.* **83**, 203–247
41. J.Han, D.P.Hajjar, M.Febbraio & A.Nicholson (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21654–21659
42. Nohara, K., Kunimoto, M., and Fujimaki, H. (1998) *J. Biochem.* **124**, 194–199
43. Fukuda, M. N., Dell, A., Oates, J. E., and Fukuda, M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 6623–6631
44. Inoue, S., Poongodi, G. L., Suresh, N., Jennings, H. J., and Inoue, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 8541–8546
45. Tsuji, S. (1999) in *Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosylation* (Inoue, Y., Lee, Y. C., and Troy, F. A., eds.) pp.145–154, Gakushin Publishing Co., Osaka
46. Angata, K., and Fukuda, M. (2003) *Biochimie* **85**, 195–206
47. Asahina, S., Matsuno, M., Sato, C., and Kitajima, K. (2004) in preparation
48. Eckhardt, M., Bukalo, O., Chazal, G., Wang, L., Goridis, C., Schachner, M., Gerardy-Schahn, R., Cremer, H., and Dityatev, A. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 5234–5244
49. Angata, K., Long, J. M., Bukalo, O., Lee, W., Dityatev, A., Wynshaw-Boris, A., Schachner, M., Fukuda, M., and Marth, J. D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, in press
50. Yoshida, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Hamamoto, T., and Tsuji, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14628–14633
51. Takashima, S., Ishida, H. K., Inazu, T., Ando, T., Ishida, H., Kiso, M., Tsuji, S., and Tsujimoto, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 24030–24038
52. Varki, A. (1999) in *Essentials of Glycobiology* (Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J. eds.) pp.195–209, Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York)
53. Rapoport, E., Mikhalyov, I., Zhang, J., Crocker, P., and Bovin, N. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 675–678
54. Angata, T., Kerr, S. C., Greaves, D. R., Varki, N. M., Crocker, P. R., and Varki, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **277**, 24466–24474
55. Ito, A., Handa, K., Withers, D. A., Satoh, M., and Hakomori, S. (2001) *FEBS Lett.* **504**, 82–86
56. Yamaji, T., Teranishi, T., Alphey, M. S., Crocker, P. R., and Hashimoto, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 6324–6332
57. Angata T, Kerr SC, Greaves DR, Varki NM, Crocker PR, and Varki A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 24466–24474
58. Zuber, C., Lackie, P. M., Catterall, W. A., and Roth, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9965–9971
59. Ziak, M., Kerjaschki, D., Farquhar, M. G., and Roth, J. (1999) *J. Am. Soc. Nephrol* **10**, 203–209
60. Ziak, M., Meier, M., Novak-Hofer, I., and Roth J. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 597–602
61. Nagai, Y., and Iwamori, M. (1995) Cellular biology of gangliosides. in *Biology Sialic Acids* (Rosenberg, A. ed.) pp.194–241
62. Kitazume-Kawaguchi, S., Inoue, S., Inoue, Y., and Lennarz, W. J. (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**, 3650–3655
63. Kiang, W. K., Krusius, T., Finne, J., Margolis, R. U., and Margolis, R. K. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1651–1659
64. Fukuda, M., Dell, A., and Fukuda, M. N. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 4782–4791
65. Fukuda, M., Lauffenburger, M., Sasaki, H., Roger, M. E., and Dell, A. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11952–11957
66. Zhang, G., Ji, L., Kurono, S., Fujita, S. C., Furuya, S., and Hirabayashi, Y. (1997) *Glycoconjugate J.* **14**, 847–857
67. Sato, C., Matsuda, T., and Kitajima K. (2004) in preparation

Received on June 3, 2004, accepted on June 7, 2004

Profile of the Author

Chihiro Sato Graduated from the Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo in 1992. She obtained a Ph. D. degree in 1997. Now she is working in the laboratory of Dr. Ken Kitajima in Nagoya University as an assistant professor. Her recent research focuses on the biological significance of disialic acid, oligosialic acid, and polysialic acid.