Let's Explore Glycoland !

いざ糖の国の探検へ！

Kasai, Kenichi

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko, Japan

FAX: 81-426-85-3742, E-mail: kasai-k@pahrm.teikyo-u.ac.jp

Summary

Although involvement of informational sugar chains has proved essential in extensive biological phenomena, explanations given for understanding the true meaning of sugar recognition are not satisfactory except in a limited number of cases. Comprehension of the peculiar nature of sugar recognition is essential for understanding the true roles of sugar chains in life. This article is intended to give some clue for better understanding of sugar recognition, completely different from recognition of nucleic acids and proteins, on the basis of three key words, non-linear, fuzzy, and weak.

A considerable portion of biological phenomena influenced by informational sugar chains is still mysterious. They are not subjected to direct control of the gene, and therefore seem to be prepared for situations not programmed in advance by the gene, and are a source of flexibility, adaptability, and diversity of living organisms. It is still hard to understand the principles and mechanisms underlying such so-called "organized chaos". Sugar chains carrying messages are often called glycodes. Their messages are received by cells, materialized by appropriate deciphering systems and finally result in switching a cell's fate. Strictly speaking, the meaning of the term glycodes is not the same as that of triplet codes composed of nucleotides. The triplet codes function to relate two macromolecules having no structural relationship with each other, that is, between polynucleotide and polypeptide. The polynucleotide transfers only information on the amino acid sequence via a process of translation, and there exists no physical complementarity between these two species. In contrast, transfer of information by glycodes does not involve the translation process, but is executed by physical complementarity, that is, recognition by appropriate binding partners. Therefore, glycodes can be regarded as message carriers based on a non-digital and mechanical principle. Biological phenomena involving recognition of glycodes are diverse and complicated, and have features very different from those controlled only by nucleic acids and proteins. Accordingly, it will be possible to get valuable clues to solve many fundamental problems in life sciences remaining after the era of genomics and proteomics. We can expect to get various new concepts on life, which will

要 約

多くの生命現象に情報分子としての糖鎖の関与が欠かれないことは今や疑いの余地はないが、その意味するところを本当にわかったといえるものはごく一部にすぎない。生命における糖鎖の働きを真に理解するためには、糖鎖情報の特殊性の把握が欠かせない。核酸やタンパク質の場合には見られないその特殊性を、非直線性、ファジー、弱い、という3つのキーワードで説明することを試みた。

情報糖鎖の影響下にある生命現象のかなりのものは未だ謎に満ちている。遺伝子の直接支配を受けないので、遺伝子が予定していない状況にも対応し、生物の柔軟性、適応性、多様性の源泉と考えられる。このような「秩序ある混沌」を支える原理および機構は未だに理解困難である。メッセージを担う糖鎖は糖鎖コードと呼ばれることが多い。そのメッセージは、細胞が受け取って、しかるべき解読システムにより実体化されて、最終的には細胞の運命を決める。厳密には、糖鎖コードという語句が意味するものは、ヌクレオチドが作る3文字コードのそれとは異なる。3文字コードにはお互いに構造的な関連性をもたない2つの高分子、ポリヌクレオチドとポリペプチド、を関係づける機能がある。ポリヌクレオチドは翻訳という手段で、アミノ酸配列という純粋な情報のみを伝達し、2つの分子間には物理的相補性は存在しない。それに対して、糖鎖コードによる情報伝達には翻訳過程はなく、物理的相補性、つまり適切な結合パートナーによる認識、によって行われる。したがって糖鎖コードは、非デジタル、かつ機械的原理にもとづく情報運搬者と言える。糖鎖コードの認識を含む生命現象は多様かつ複雑で、核酸やタンパク質で制御されるものとは著しく異なっている。それゆえゲノミクスおよびプロテオミクスの時代が過ぎてもまだ解決されていない、生命科学にとって根本的な課題を解決する有用な鍵を得られる可能性がある。生命に関するさまざまな新しい概念を獲得して、未知の生命原理を発見できる期待が持てる。本

finally enable us to discover some unknown principles of life. The present article aims to extract and analyze the peculiar points of sugar recognition in order to stimulate glycobiology.

What is the inconvenience for a glycoprotein if it fails to acquire the appropriate sugar chains? Such a protein, for example, will fail to fold correctly, form a proper oligomeric structure, find a proper trafficking route, reach its final destination, acquire resistance to protease, recognize and interact with its counterpart, and so on. It is inevitable that such a protein will become incompetent.

Therefore, a glycoprotein that has failed to be appropriately modified with sugar chains, can be compared to a naked James Bond. Although James Bond is one of the most competent spies and has attained success all over the world, it is essential for him to be equipped with his special gear in order to fulfill his mission. He needs a variety of items, *e.g.*, a suit ordered on Savile Row, a bullet-proof jacket, a gun, maps, a special watch, a set of fake passports, a rope with a hook, a false mustache for disguise, etc. Unless he is equipped with these items, his activity will be minimized. Therefore, naked James Bond without his gear is only a weak and incompetent guy (nevertheless, he will meet no difficulty in playing with Bond girls).

Similarly, it is not until proteins or cells are modified with appropriate sugar chains, that their mission can start. Modification with sugar chains makes the function of proteins and cells multidimensional, and consequently the mission impossible possible.

Three key words seem to be useful in understanding the distinct features of recognition of informational sugar chains; that is, non-linear, fuzzy, and weak. 1) Generation of glycodes is unique because they are generated by a different rule from that for polynucleotides or polypeptides. The adopted rule is comparable to that for the generation of Kanji (Chinese character). 2) Due to microheterogeneity of sugar chains, transfer of information is always on a fuzzy basis. 3) Sugar recognition is generally based on weak interactions.

The first key word is "non-linear". One of the peculiar features of the signals made with sugars is their non-linear nature. Such codes are in sharp contrast to simple linear codes made with nucleotides. Such a non-linear nature results in the generation of an enormous number of complicated codes, causing difficulties in reading and understanding. The rule applied for generating glycodes is similar to that for generating Kanji. This rule is completely different from that of writing western words, which is based on a simple procession of Roman characters, that is, linear combination of alphabets.

文では、糖の認識にまつわる特殊事情を抽出して分析を加え、糖鎖生物学の発展を促すことを目指した。

ある糖タンパク質がしかるべき糖鎖を結合できなかったとしたら、どのような不都合が生じるであろうか。そのタンパク質は、正しく折り畳まれなくなり、正しいオリゴマー構造もとれず、細胞内輸送路も見つけられず、最終目的地へも到達できず、プロテアーゼ抵抗性も獲得できず、結合すべき相手分子とも出会えず、役立たずにならざるをえない。

しかるべき糖鎖で修飾されなかった糖タンパク質は、裸のジェームズ・ボンドのようなものである。ジェームズ・ボンドはスパイとして最高で、世界中で手柄を立てているが、彼の使命をまっとうするには、特製の道具一式が絶対に必要である。たとえば極上仕立てのスーツ、防弾チョッキ、拳銃、地図、特製の時計、偽造パスポート一式、鉤つきロープ、変装用つけひげ、等々。こうした道具一式がなくては、ほとんど活動できない。つまり道具を持たない裸のジェームズ・ボンドは、ふぬけの役立たずにすぎない(それでもボンド・ガールといちゃつくにはちっとも困らないが)。

それと同じように、タンパク質や細胞は、しかるべき糖鎖で修飾されないうちは、仕事を始めることができない。糖鎖による修飾がタンパク質や細胞の機能を多次元化し、成功する見込みのない指令を成功に導くのである。

情報糖鎖の認識現象のもつ特殊性を理解するには、3つのキーワード、非直線性、ファジー、弱さ、が役に立つだろう。1)糖鎖コードを生成させる規則は独特で、ポリヌクレオチドやポリペプチドを生成させる規則とは異なっている。いわば漢字(中国の文字)を組み立てる規則と同じものが使われている。2)糖鎖のミクロ不均一性が原因で、情報は常にファジーに伝達される。3)糖鎖認識は弱い相互作用に基づくのがふつうである。

第一のキーワードは「非直線性」である。糖によるシグナルは直線的ではないところに特徴がある。ヌクレオチドが作る単純な直線的コードとは際立って違う。このような非直線性のために、無数の複雑なコードが生成され、読んだり理解するのが難しくなる。糖鎖コードを生成させる規則は、漢字を組み立てる規則と似ている。この規則は、ローマ字を単純に並べる、つまりアルファベットを直線的につなげるという、西欧の単語を書くときの規則とまるで違う。

(a) Dragon

(b) Sugar

Fig. 1. Two-dimensional nature of Kanji. (a) The Kanji meaning dragon is composed of five parts arranged two-dimensionally. (b) The Kanji meaning sugar is composed of two parts each having own meaning.

Kanji are ideograms. Each Kanji has its own meaning in addition to its sound, and generated by two-dimensional arrangement of parts, each of them being also ideogram. People using phonograms and not familiar with the ideograms certainly feel difficulty when they face Kanji. Glycocodes also cause difficulty in grasping their meaning because they can be compared to ideograms. Although the word “dragon” is written in English with six Roman letters placed one-dimensionally, it is expressed with only one character in the Kanji system (Fig. 1(a)). The character meaning dragon is composed of five simpler parts arranged two-dimensionally, each of which is also a Kanji. Therefore, it is based on a non-linear combination of parts, and the relative position of each part should be correct.

Since the Kanji meaning dragon seems to be rather complicated to explain the rule of Kanji system, a simpler example will suit. Figure. 1(b) shows the Kanji meaning sugar. This is composed of two parts. The character on the right side is the name of one of the ancient empires of China (Tang, A.D. 618–907). The character on the left side is used in Japan as an abbreviation of the United States of America because of similarity in sound, though its original meaning is rice. Therefore, the character meaning sugar is generated when a good relationship between China and USA is established, and they nestle up to each other. Consequently, peace will be brought to our world, and we will be able to enjoy sweet life (the original meaning of the character is a candy made from rice).

When we write a Kanji, the correct arrangement of the parts is critical. They should be placed in the two-dimensionally correct positions. In the present case, China and USA should be placed on the right and left, respectively (opposite to the real world!). There are several possible ways to place these two parts (Fig. 2) besides the one shown in Fig. 1(b). For example, China can be placed on the left and USA on the right. Alternatively, China can be placed on the top, and USA to the bottom, and vice versa. However, these

漢字は表意文字である。それぞれの漢字が音に加えて意味を持ち、いくつかの部分が二次元的に配置されてできていて、それぞれの部分もまた表意文字である。表音文字の使用者で、表意文字にはなじみのない人が漢字を見たら困惑するだろう。いわば表意文字である糖鎖コードも、意味を把握するには困難がつきまとう。英語では dragon という言葉を 6 つのローマ文字を一次元に並べて書くが、漢字システムではただひとつの文字で表す(図 1(a))。龍という字はもっと簡単な 5 つの部分(いずれもやはり漢字)が、二次元的に配置されて成り立っている。つまり非直線的な結合であり、それぞれの位置関係が正確でなければならない。

漢字システムの規則を説明するには、龍という漢字はやや複雑なので、もっと簡単な例を使おう。図 1(b)は糖を表す漢字である。これは 2 つの部分からなる。右側の文字は古代中国の帝国のひとつの名前である(唐、A.D. 618-907)。左側の文字は日本ではアメリカ合衆国の略号として使われる(本来の意味は米)。つまり中国とアメリカの関係が良好になり、お互いに寄り添えば、糖を表す文字ができる。この結果、世界に平和がもたらされ、甘い人生を謳歌できるようになるだろう(米から作った飴が本来の意味)。

漢字を書くときには、部分の正しい配置が不可欠である。二次元的に正しい位置に各部分を置かねばならない。糖という文字の場合、中国を右に、アメリカを左に置かねばならない(現実の世界とは反対に!)。2 つの部分の配置としては、図 1(b)に示した以外にもいくつかの可能性がある(図 2)。たとえば、中国を左に、アメリカを右に置くやり方がある。あるいは中国を上、アメリカを下に置くやり方、またその逆もある。

Fig. 2. Analogy between glycode and Kanji. Top: Only a disaccharide formed by an appropriate linkage (circled) is recognized by a sugar-binding protein. Bottom: Only a Kanji generated by correct arrangement of parts (circled) can transfer a proper message.

three arrangements do not work. These resultant Kanji-like characters do not carry any meaningful message. They do not induce any concept in our brains. Our brains do not have any receptor for these Kanji-like characters. On the contrary, once we see a correct Kanji written by proper arrangement of the parts (circled), the concept of sugar occurs immediately in our mind, because the receptors in the brain immediately respond to this character and generate an image of sugar. Therefore, placement of parts must be correct from the two-dimensional viewpoint.

This two-dimensional nature of the Kanji system is analogous to glycodes. They are also generated by the appropriate arrangement of monosaccharides. If disaccharides composed of a galactose and a glucose are taken as examples, there are several possible linkage isomers; for example, 1-2, 1-3, 1-4, and 1-6. Suppose there is a lectin that exclusively binds lactose. It will recognize only the one having 1-4 linkage (circled), and neglect the other three disaccharides. Such a feature is almost the same as the recognition of the correct Kanji performed in our brains.

European words can be written by a simple procession of Roman letters, that is, a one-dimensional arrangement of the alphabet. This process is analogous to the generation of the linear genetic codes, which are generated by a one-dimensional procession of nucleotides. This made it easier to comprehend the genetic codes. Polypeptides are also formed by one-dimensional procession of amino acids, and this also made it easier to assign various motifs. In contrast, the two-dimensional principle and non-linear nature of both Kanji and the glycode result in the generation of an enormous number of codes and cause extreme complexity (the number of Kanjis used in daily life in Japan reaches as many as 5,000), but, at the same time, it is certainly such nature that serves a rich source of possibility, flexibility and development in living organisms. It is recommended that glycobiologists become familiar with Kanji to gain valuable knowledge that will

りうる。しかしこのような3つの配置は通らない。これで出来た漢字もどきは、意味あるメッセージを持たない。なんの概念も頭に浮かばない。私たちの脳には、これらの漢字もどきを受け取るレセプターが存在しない。それに対して、部分を正しく配置して書かれた漢字(丸で囲んだもの)を見たときは、直ちに意識の中に糖という概念が浮かぶ。脳内のレセプターが直ちに反応して、糖のイメージを発生させるからである。つまり部分の配置は二次元的に正しくなければならない。

このような漢字の二次元的性質は糖鎖コードにも共通である。糖鎖コードも単糖の適切な配置により生成する。ガラクトースとグルコースからなる二糖を例として考えると、1-2結合、1-3結合、1-4結合、1-6結合など、結合様式が異なるいくつもの異性体がある。もしも乳糖だけを認識するレクチンがあるとする、1-4結合したもの(丸で囲んだもの)だけを認識して、他は無視するだろう。脳内で正しい漢字だけが認識されるのとほとんど同じである。

ヨーロッパの単語はローマ文字を単純に並べたもの、つまりアルファベットの一次元的配置として書かれる。このやり方はヌクレオチドを一次元的に並べる直線的遺伝コードの作り方と同じである。そのため遺伝コードの方がわかりやすい。ポリペプチドもアミノ酸を一次元的に並べて作られるので、さまざまなモチーフを簡単に見分けられる。一方、漢字と糖鎖コードの二次元的原理と非直線性により、膨大な数のコードが生み出され、とてつもなく複雑になる(日本で日常使われる漢字の数は約5,000にのぼる)。しかしこれこそが、生命の可能性、柔軟性、発展性の豊かな源泉となるのである。漢字に親しみ、研究の推進に役立つ知識を獲得するよう糖鎖

Table I. Comparison of characteristics of informational molecules.

Nucleic acid/protein	Sugars
Roman letter	Kanji
One dimensional	Two dimensional
Homogeneous	Heterogeneous
Strict	Rough
Digital	Analogue
Definite	Ambiguous
Clear	Fuzzy
Regular army	Guerilla
Monophony	Polyphony
Rigid	Flexible
Western	Japanese

promote their research.

The second keyword is “fuzzy.” There is a sharp contrast between sugar-based information and polynucleotides/polypeptide-based information (Table I). Messages carried by polynucleotides and polypeptides are strict, digital, definite and clear-cut. On the contrary, due to the heterogeneity of sugar chains, messages carried by glycodes are rather rough, analogous, and ambiguous, because too many kinds of sugar chains having widely different affinities serve as possible ligands for a given sugar-recognizing protein. Such a situation makes the overall consequence of recognition difficult to predict. Therefore, decision-making based on glycodes becomes necessarily fuzzy. Such a contrast can also be expressed by other words, for example, regular army vs. guerilla, monophony vs. polyphony, rigid vs. flexible, and so on. Generally speaking, such fuzzy nature of sugar recognition is compared to the Japanese mentality, while recognition based on nucleic acids and proteins is compared to the mentality of western people.

In contrast to western people, Japanese are not good at giving a definite answer to questions demanding answers of “yes or no,” “black or white,” or “good or bad,” etc. It is difficult for Japanese to respond to such direct questions because there exist so many intermediate states between “yes” and “no” in their mind. Their answers often look fuzzy and not clear for western people, but such a tendency is rooted deeply in Japanese culture and mentality. They tend to avoid a clear-cut conclusion for difficult problems, and prefer to leave the conclusion as an ambiguous state. Since decision-making by Japanese is similar to that of sugar-binding proteins, Japanese can share the same feeling with lectins.

Recently, it has become easier to obtain profiles of the sugar binding specificity of lectins. Accumulated results have indicated that each lectin generally binds so many kinds of oligosaccharides with different binding strengths. A lectin recognizes a group of sugar chains having a common back-bone. However, binding strength

生物学研究者にお勧めしたい。

第二のキーワードはファジーである。糖に基づいた情報と、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドに基づいた情報には際立った違いがある(表I)。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドが担う情報は、厳密、デジタル、確定的、明解である。それに対して、糖鎖の不均一性のために、糖鎖が担う情報は、粗く、アナログ、あいまいである。あるひとつの糖認識タンパク質に対して、多種類の糖鎖が幅広い親和性を示してリガンドとなりうる。そのため認識の最終結果を予測するのは難しくなる。したがって糖鎖コードに基づく決定はファジーにならざるをえない。このような対比を別の言い方ですれば、正規軍対ゲリラ、単旋律対複旋律、硬直対柔軟、などになる。言うなれば、糖認識のこのようなファジーな特性は、日本人の心的傾向に似ており、核酸やタンパク質に基づく認識は西欧人のそれに似ている。

西欧人に比べて、日本人は「イエスかノーか?」、「黒か白か?」、「善か悪か?」というような答えを求められる質問にははっきり答えるのは不得意である。日本人の意識の中には、イエスとノーの間に沢山の中間段階があるので、このような断定的な質問に答えるのは難しい。西欧人にとって日本人の答えはファジーで不明確に映るが、こうした傾向は日本人の文化と心的傾向に深く根付いたものである。日本人は難しい問題に対して、一刀両断の結論を出すのを避けがちで、むしろ結論をあいまいにしておく。こうした決断のやり方は糖結合タンパク質と似ているので、日本人はレクチンに親近感が持てる。

最近、レクチンの糖鎖結合特性プロファイルを求めるのが容易になってきた。それらの結果から、それぞれのレクチンが多種類のオリゴ糖鎖にさまざまな結合力で結合することがわかってきた。ひとつのレクチンは共通の骨格をもつ糖鎖

varies significantly depending on substitutions on the backbone. Measured values of dissociation constants (K_d) are distributed continuously from very large to very small. It seems reasonable that sugar chains having strong affinity are regarded as biologically significant. However, it is not fair to conclude immediately that sugar chains having weak binding affinity are of less importance. Even a sugar chain having weak affinity can have significant influence if its concentration or density *in vivo* is adequately high to saturate the binding site of the lectin. True biological significance of a sugar chain cannot be judged only from its binding strength measured *in vitro*. Therefore, it is almost impossible to determine a definite boundary that allows to discriminate biologically significant oligosaccharides from insignificant ones. Evaluation of the significance of sugar chains is highly dependent on context, that is, *in vivo* circumstances and conditions, and therefore, the answer will become necessarily fuzzy.

The third keyword is “weak.” Results from most experiments have demonstrated that recognition of glycodes is mainly based on rather weak interactions (K_d values of greater than $\sim 10^{-5}$ M). A significant portion of biological processes such as cell-to-cell interactions seems to be controlled by not only strong interactions but also rather weak interactions. Sometimes, weak interactions become more important than strong ones. Why are weak interactions important in biological systems? One of the main reasons is that this allows interacting molecules to dissociate rapidly, because such a system has a large dissociation rate constant (k_{OFF}).

Although the majority of scientists tend to consider that strong interactions are more important than weak ones, it is a prejudice. Life should not be based on only strong interactions such as those between antigen and antibody. It is possible that antigen-antibody interaction may be rather a special case in which a dissociation process is not expected. On the contrary, in many interacting systems, not only the binding process but also the dissociation process are important. In order to assure dynamic rearrangement of molecules and cells, it is essential to make use of weak interactions. In living systems, how to divorce is as important as how to marry. Therefore, specific interactions with medium and weak affinity should also be needed to drive such a complicated life system.

に結合する。しかし結合力は骨格に対する置換に大きく影響される。解離定数(K_d)の測定値は非常に小さいものから非常に大きいものまで連続的に移り変わる。結合力が大きい糖鎖が生物学的に重要とみなされても不思議ではない。しかし親和性が小さい糖鎖は重要ではないと直ちに判断するのは妥当とは言えない。弱い親和性しかない糖鎖であっても、生体内においてレクチンの結合部位を飽和させるだけの濃度あるいは密度で存在すれば、十分な影響を持ちうる。試験管内で測定された結合力だけからは、糖鎖の真の生物学的重要性は判定できない。したがって生物学的に重要なオリゴ糖鎖と、重要でないオリゴ糖鎖をはっきり区別できるような境界線を決めるのは不可能に近い。糖鎖の重要性の評価は、生体内の環境、条件などに大きく依存するので、その答えはファジーにならざるを得ないだろう。

第三のキーワードは弱いということである。多くの実験結果から、糖鎖コードの認識は主として相対的に弱い相互作用(K_d が 10^{-5} M程度以上)に基づくことがわかってきた。細胞と細胞の相互作用のような生物学的過程のかなりのものは、強い相互作用ばかりでなく、相対的に弱い相互作用によっても制御されているらしい。弱い相互作用の方が強いものより重要になる場合もある。それではなぜ弱い相互作用が重要なのだろうか。大きな理由のひとつは、弱い相互作用系は解離速度定数(k_{OFF})が大きいので、相互作用している分子が早く離れることができるからである。

ほとんどの科学者は弱い相互作用よりも強い相互作用の方が重要だと考えがちであるが、それは偏見である。生命は抗原抗体反応のような強い相互作用のみを基盤とするのではない。むしろ抗原抗体反応が、解離を前提としない特殊例とも言ってよい。それに対して、多くの相互作用系では、結合過程だけでなく、解離過程も重要である。分子や細胞を活発に再編成できるためには、弱い相互作用の利用が不可欠である。生体系では、どうやって結婚するのかに劣らず、どうやって離婚するのもかも重要問題なのである。したがって、かくも複雑な生命系を動かすには、中間的あるいは弱い親和性に基づく特異的相互作用が必要になる。

Table II. Comparison of strong and weak interactions.

Strong interaction	Weak interaction	
Selectivity	High	Low
Dissociation constant (K_d)	Small	Large
Dissociation rate constant (k_{OFF})	Small	Large
Concentration	Low	High
Participating molecule	A few	Numerous
Nature	Strict	Fuzzy

Table II shows a comparison of the characteristics of strong and weak interactions. It is obvious that the selectivity of strong interactions is superior to that of weak interactions. Dissociation constants for strong interactions are small, but those for weak interactions are large. Strong interactions can occur at very low concentrations but weak interactions practically occur and become significant only at high concentrations. Therefore, the number of molecules participating is small for strong interactions but large for weak interactions. The most important point is that values of k_{OFF} of the complex are large for weak interactions in contrast to strong ones.

Weak interactions, which are characterized by rapid dissociation, are more efficient than strong ones in detecting very subtle differences existing in molecules and cells, though such a view might sound odd and contradictory. However, comparison of efficiency of chromatographic modes described below will provide readers with a clue to understand. Affinity chromatography and reversed-phase chromatography are both efficient and essential research tools for life science. However, these two modes are almost opposite from various viewpoints (Table III). The basis of separation in affinity chromatography is bioaffinity, which is specific and intelligent. On the contrary, the basis of reversed-phase chromatography is hydrophobic interactions, which is non-specific and less intelligent. Affinity chromatography takes advantage of relatively strong interactions, while reversed-phase chromatography is based on very weak interactions. However, in the case of reversed-phase chromatography, the number of interacting points on the adsorbent is extremely large. Though selectivity of reversed-phase chromatography is very low, resolution is usually very high, and the number of theoretical plates is very large, for example, more than ten thousands for a 10 cm column. On the contrary, the number of theoretical plates for a column for affinity chromatography is usually very low (sometimes, practically almost one). Although selectivity of affinity chromatography is excellent, its resolution is the poorest. For example, although affinity chromatography can separate specific antibodies from non-specific antibodies, it cannot separate each monoclonal antibody included in a mixture of specific polyclonal antibodies raised against the

表 II は強い相互作用と弱い相互作用を比較している。強い相互作用は、弱い相互作用に比べて、選択性では明らかに勝っている。強い相互作用の解離定数は小さく、弱い相互作用の解離定数は大きい。強い相互作用は非常に低濃度でも起こりうるが、弱い相互作用は実質的には高濃度で初めて起こり、意味を持ってくる。したがって関与する分子数は、強い相互作用では小さく、弱い相互作用では大きい。もっとも重要な点は、複合体の解離速度定数が、弱い相互作用では大きい、強い相互作用では小さいことである。

解離が速いという特徴を持つ弱い相互作用は、分子や細胞の微妙な違いを検出するには、強い相互作用よりも効率が良い。これは奇妙で矛盾しているように見えるかも知れないが、以下に述べるようにクロマトグラフィーモードの効率を比較すると、理解の手がかりになる。アフィニティークロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーは、いずれも生命科学にとって不可欠な研究手段である。しかしいろいろな点から、このふたつは正反対である(表 III)。アフィニティークロマトグラフィーの分離基盤は、特異的で知的な生物学的親和性である。それに対して逆相クロマトグラフィーの基盤は、非特異的で知的でない疎水性相互作用である。アフィニティークロマトグラフィーは比較的強い相互作用を利用するが、逆相クロマトグラフィーは非常に弱い相互作用を土台にする。しかし、逆相クロマトグラフィーの場合、吸着体上の相互作用点の数はいちじるしく大きい。逆相クロマトグラフィーは、選択性は非常に低いが、分解能は非常に高いのがふつうで、理論段数は非常に大きく、たとえば 10 cm のカラムで 10,000 を越える。それに対して、アフィニティークロマトグラフィーのカラムの理論段数は非常に小さいのがふつうである(実質上 1 段ということもある)。アフィニティークロマトグラフィーは選択性にかけては素晴らしいが、分解能は貧弱そのものである。たとえば特異的な抗体を非特異的な抗体から分離することはできても、同じエピトープを認識する特異的なポリクローナル抗体群からモノクローナル抗体を相

Table III. Comparison of affinity chromatography and reversed-phase chromatography.

	Affinity chromatography	Reversed-phase chromatography
Principle	Bioaffinity	Hydrophobic interaction
Intelligence	High	Low
Interaction	Strong	Very weak
Ligand density	Low	High
Selectivity	High	Low
Resolution	Low	High
Theoretical plate number	Small	Large
Peak sharpness	Bad	Good

same epitope. On the contrary, when we apply reversed-phase chromatography for separation of a complex mixture of oligosaccharides or peptides, we will be able to obtain many very sharp and well-separated peaks. Although selectivity is very low, resolving power of reversed-phase chromatography is far superior to affinity chromatography.

Therefore, affinity chromatography and reversed-phase chromatography are complementary to each other. Affinity chromatography is extremely efficient for discrimination and separation of a target molecule from other unrelated molecules. It is a separation system based on all-or-none discrimination, or yes-or-no discrimination. On the other hand, reversed-phase chromatography is useful for separation of molecules resembling each other. In another word, reversed-phase chromatography is superior in detecting very subtle differences between molecules resembling each other.

Then, why is resolution attained by reversed-phase chromatography so high? This is because it uses very weak interactions, that is, dissociation occurs very rapidly. Consequently, when various molecules pass through a column of reversed-phase chromatography, both adsorption and desorption occur many times in a very short period. Such an enormous number (more than ten thousand times throughout the column) of repeated checking processes make it possible to discriminate molecules having only slight differences between them, though each individual checking process is not so rigorous. Reversed-phase chromatography is not intelligent, but the accumulation of honest and simple operations makes it superior to affinity chromatography in terms of resolution. On the contrary, since affinity chromatography uses strong interactions, once interacting molecules bind to the immobilized ligands, it takes a long time to dissociate. Therefore, checking can be carried out only a limited number of times during the passage through a column, and this results in poor resolution.

Such a circumstance can be considered from another standpoint. Imagine a situation where you have friends who are identical twins, and you have to distinguish them from each other. Characteristic parts of their faces, such as eyes, nose and mouth, may not be so helpful, because these parts will be too similar for them. Therefore, it is better for you to give up adhering to these major parts and check other very minor appearances of their faces, such as wrinkles, moles and freckles, etc. One of the twins may have three wrinkles above the right eye, while another may have a mole near the nose, and then, you can reach a conclusion. It is more efficient for you to neglect and leave the major parts, and examine as many minor points as possible in a limited time. Similar situations apply in living systems, when the need for selecting a certain cell from a population on the basis of subtle differences occurs.

互分離することはできない。それに対し、オリゴ糖鎖やペプチドの複雑な混合物を逆相クロマトグラフィーにかけると、多数のシャープなピークとして分離することができる。選択性は低くても、分解能に関しては、逆相クロマトグラフィーはアフィニティークロマトグラフィーよりもはるかに優れている。

したがってアフィニティークロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーは相補的である。アフィニティークロマトグラフィーは、標的分子を無関係な分子群から区別して分離するにはきわめて効果的である。いわば一刀両断、あるいは是か非かという区別に基づく分離法である。一方、逆相クロマトグラフィーは、よく似た分子同士を分離するのに役立つ。言い換えれば、似ている分子同士の微妙な差を検出するには逆相クロマトグラフィーの方が優れている。

ではなぜ逆相クロマトグラフィーの分解能はそれほど高いのだろうか。それは非常に弱い相互作用を利用している、つまり解離が非常に速いからである。その結果、逆相クロマトグラフィーのカラムをいろいろな分子が通過するとき、吸着と脱着が短時間内に多数回起こる。このように多数回の(カラムを通過する間に 10,000 回以上)チェックの繰り返しによって、1 回ごとのチェックはそれほど厳密ではなくても、互いに微妙な違いしか持たない分子を区別できることになる。逆相クロマトグラフィーは知的ではないが、実直に単純作業を積み重ねることで、分解能に関してはアフィニティークロマトグラフィーをしのぐことができる。それに対してアフィニティークロマトグラフィーは、強い相互作用を利用するので、いったん分子が固定化リガンドに結合してしまうと、離れるまでに長時間を要する。したがってカラムを通過する間にごく限られた回数のチェックしかできないために、似たもの同士を十分に区別できない。

べつの視点から見てみよう。もしも友達に一卵生双生児のきょうだいがいたとして、2 人を区別しなければならないとしよう。彼らの顔の特徴的な部分である、目、鼻、口などは、ほとんど同じなので、あまり手がかりにならない。そこでこうした部分にこだわるのは止めて、もっと些細な違い、しわとか、ほくろとか、そばかすなどをチェックの方が賢明だろう。片方は右目の上にしわが 3 本あり、もう片方は鼻のそばにはほくろがあるので、どっちだかわかる。顔の主要部分を無視して相手にせず、出来るだけ沢山の些細な点を制限時間内に点検の方が効率的である。生体においても、たとえば微妙な違いをもとに集団中から特定の細胞を選びだす必要が生じた場合などで、同じ状況がありうる。

A demerit of strong interactions for the purpose of repeated checking processes is attributable to their low rate constant of dissociation (k_{OFF}). Suppose an interacting system where the dissociation constant K_d is about 10^{-7} M. If k_{ON} is ca. $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, k_{OFF} is the order of 10^{-2} s^{-1} . Then, the half-life of the complex is about 70 seconds ($0.693/k_{\text{OFF}}$), assuming that no reassociation occurs. This means that more than 50% of the complexes still remain after 1 minute. This may take too long if a protein or a cell has to dissociate from its counterpart rapidly. On the contrary, weak interactions are advantageous for rapid checks. Suppose an extremely weak interaction having K_d of 10^{-2} M. If k_{ON} is also ca. 10^5 M^{-1} , k_{OFF} is the order of 10^3 s^{-1} , and then, half-life of the complex is only 0.7 millisecond. After 1 millisecond, more than 50% of the complexes will be dissociated. Therefore, association and dissociation can occur more than a thousand times during one second, and an extremely large number of checking processes will be made, if a sufficient number of molecules or sites are available. Column packings for reversed-phase chromatography, or cell membrane composed of gangliosides should be suitable for such purposes, because for these systems, k_{OFF} will be much more than 10^5 s^{-1} .

It is irrelevant that only strong interactions have long been regarded as important in living systems. Weak and fuzzy interactions especially in multicellular organisms should receive much attention and be fairly estimated. The accumulation of weak interactions can provide signals as significant as, or more important than those provided by strong interactions. Weak interactions are essential to distinguish closely resembling biomolecules or cells, facilitate cancellation of partnership on the kinetic basis, and also assure dynamic reorganization of cells or molecules. Weak and fuzzy interactions probably make biological systems more flexible, adaptable, diverse and versatile, and invest them with the capability of responding to unexpected circumstances and changing environment. The importance of research on weak interactions is not limited in glycobiology, and should be pursued in all areas of future biosciences. For such purposes, we need to establish an appropriate methodology and develop various efficient research tools that are barely available at present.

Glycobiology is a reservoir of gemstones that is waiting for someone to discover and polish to turn into jewels. Although a lot of difficulties to be overcome still exist, it is promising to have a chance of discovering some unknown principles that greatly promote our understanding of life. It is hopeful that more researchers become aware of such an attractive and challenging field, and contribute to the development of life science.

チェックを繰り返すという目的に強い相互作用が向かない理由は、解離速度定数が小さいためである。解離定数 K_d がほぼ 10^{-7} M であるような相互作用系を考えてみよう。もしも k_{ON} が $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ くらいだとすると、 k_{OFF} は 10^{-2} s^{-1} くらいになる。解離だけが起これ再結合はしないと仮定すると、複合体の半減期はほぼ 70 秒 ($0.693/k_{\text{OFF}}$) と計算され、1 分経っても半分以上はまだ結合状態にある。もしもタンパク質あるいは細胞が相手から早く離れたい場合には、これではあまりに時間がかかりすぎる。それに対し弱い相互作用はチェックには向いている。解離定数 K_d がほぼ 10^{-2} M であるような非常に弱い相互作用系を考えてみよう。もしも k_{ON} が同じく $10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ くらいだとすると、 k_{OFF} は 10^3 s^{-1} くらいになり、複合体の半減期はほぼ 0.7 ミリ秒、つまり 1 ミリ秒後には半分以上が解離してしまう。したがって十分な数の分子あるいは部位が存在すれば、1 秒間に会合解離が 1000 回以上行われて、チェック回数はいちじるしく増える。逆相クロマトグラフィーのカラム、あるいは細胞表面のガングリオシドは、 k_{OFF} がおそらく 10^5 s^{-1} 以上と思われるので、このような目的に適している。

生体において強い相互作用のみが重要とみなされてきたのは不当である。特に多細胞生物については、弱くてファジーな相互作用がもっと注目され、正当に評価されねばならない。弱い相互作用の積み重ねは、強い相互作用がもたらすものと同様、あるいはそれ以上に意味あるシグナルをもたらさう。弱い相互作用は、酷似した生体分子あるいは細胞を区別するために不可欠で、動力的観点から連帯解消を容易にし、細胞や分子の再構成を可能にしている。弱くてファジーな相互作用は、生体の柔軟性、適応性、多様性、発展性を高め、予期せぬ事態、あるいは環境変化に対応できる能力を付与しているのであろう。弱い相互作用の研究の重要性は糖鎖生物学に限られるわけではない。これからの全ての生命科学で追求されるべきである。こうした目的に向けて、現時点ではまだ欠けている、適切な方法論および各種の効率的な研究手段が開発される必要がある。

糖鎖生物学は、見出だされて宝石に磨き上げられるのを待っている原石の宝庫である。克服すべき困難も山積みであるが、生命の理解を大いに促進しうる未知の生命原理を発見するチャンスがきっとある。この魅力的で挑戦意欲をそそる領域に注目し、生命科学の発展に貢献する研究者が輩出することを願っている。

Profile of the Author

Ken-ichi Kasai is Professor of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University. He graduated from Tokyo University (Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Sciences) in 1962. Before he started the research on lectins, he mainly worked on the functions of enzymes. At the graduate school of Tokyo University (Professor Fujio Egami's lab) and Institut de Biologie Physico Chimique in Paris (Dr. Marianne Grunberg-Manago's lab), he investigated on nucleic acid hydrolyzing enzymes. Since 1967, at the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University (Professor Shin-ichi Ishi's lab), he has studied the various aspects of serine proteases, and recognized the versatility of affinity chromatography as an analytical tool. He applied this method to the elucidation of the specific recognition of carbohydrates by concanavalin A, and this led to the present research project on the galectins. He received his PhD. from Tokyo University by the work on affinity chromatography of serine proteases. In 1979, he moved to Teikyo University, and began the work on galectins. His main scientific interest is in the specific interaction between biomolecules, e.g., enzymes and substrates, lectins and carbohydrates, etc. He is also interested in the creation of analytical procedures for such interactions. Examples of new investigative tools developed by his group are frontal affinity chromatography, affinophoresis, slalom chromatography and glyco catch method. He served two terms as the Chief Executive Secretary of FCCA and Editor-in-Chief of TIGG.