The Role of N-Linked Carbohydrates in Antigen Presentation

Jacques J. NEEFJES and Hidde L. PLOEGH

The Netherlands Cancer Institute, Antoni van Leeuwenhoekhuis,
Plesmanlaan 121, 1066 CX Amsterdam, The Netherlands
FAX: 31-2017-2625

The products of the major histocompatibility complex (MHC) fulfill a central role in the immune system. MHC Class I and MHC Class II molecules serve to present processed antigen (peptides) to T lymphocytes. MHC antigens display tremendous allelic variation (polymorphism), a phenomenon thought to be selected for in the course of evolution to allow the presentation of a large array of different processed antigens (peptides) to T cells (1). MHC Class I molecules contain 1 (human) or 2 (mouse) N-linked glycans located on the heavy-chain (H-

chain) near the peptide binding site (see Fig 1) (2-4). The light chain, β_2 -microglobulin (β_2m), is not glycosylated. MHC Class II molecules, proposed to have an overall structure similar to that of Class I molecules (6), consist of two glycosylated chains: the α -chain contains two, and the β -chain a single N-linked glycan (5). The proposed model for the Class II molecule implies that its N-linked carbohydrate chains are also located in close proximity of the peptide binding pocket (6) (Fig 1).

N-linked glycans are transferred

Fig. 1. Upper view to the MHC Class I molecule including the projected area that can be covered by the single N-linked glycan present on human Class I molecules. This N-linked glycan is also present on mouse MHC Class I molecules and on the proposed structure of MHC Class II molecules. The position of the second glycan present on mouse MHC Class I molecules (I) and present on the proposed structure of MHC Class II molecules (II) are indicated. Peptides (projected as the white object occupying the central portion of the groove) can easily be covered partially by the N-linked glycan.

抗原提示における Asn-結合型 (N 結合型) 糖鎖の役割

J. J. NEEFJES, H. L. PLOEGH

【編集部による解説】

私達の身体の中での免疫応答は、細胞免疫を司る T 細胞によるものと抗体産生を行う B 細胞によるものに大別できる。現在では、免疫応答は抗原が抗原提示細胞 (APC: antigen presenting cells) により T 細胞に提示されることから始まると考えられている。この APC として抗原提示機能を持つ細胞としてはマクロファージのほか、血管内皮細胞、樹枝状細胞などが知られている。外来蛋白抗原はこれらの細胞内である程度分解を受けてペプチドとなり、この APC の表面のクラス II の MHC 産物と複合体となった形で (つまりこれが抗原提示) T 細胞の T 細胞リセプターにより認識を受けると考えられている。一方、殆ど全ての体細胞はウィルス蛋白も含め、細胞内で合成される蛋白由来のペプチド断片をクラス I MHC 産物との複合体として細胞表面に提示する。この結果、T 細胞は活性化されて、例えばヘルパー T 細胞は B 細胞と協同して B 細胞に抗体を生産させたり、細胞傷害性 (キラー) T 細胞による標的細胞の攻撃が始まる。

主要組織適合性抗原 (MHC) は免疫系に於ける中心的役割を満たしている。MHC クラス I 分子と MHC クラス II 分子は分解を受けた抗原 (ペプチド) を提示するのに役立っている。MHC 抗原は非常に多くのアレルック変異 (多型とも言う) を示すが、これは数多くの様々の分解を受けた抗原 (ペプチド) を T 細胞に提示することを可能にする為に、進化の過程の間で選択を受けた結果の現象と思われる [1]。MHC クラス I 分子は、ペプチド結合部域の近

くの H 鎖にヒトでは 1 本の、マウスでは 2 本の N 結合型グリカンが付いている (図 1 参照) [2-4]。L 鎖つまり β_2 -ミクログロブリン (β_{2m}) には糖鎖は付いていない。MHC クラス II 分子は、全体としてはクラス I 分子と似ていると思われていて [6]、2 本の N 結合型糖鎖を持つ α 鎖と 1 本の N 結合型糖鎖を持つ β 鎖で出来ている [5]。クラス II 分子のモデルによると、ペプチドが結合するポケットに非常に近いところに、N 結合型糖鎖は位置している

to proteins co-translationally. When N-linked glycosylation is blocked by the drug tunicamycin, some allelic forms of human MHC Class I antigens fail to assemble with β_2m . Interestingly, the dependency of assembly of Class I molecules on the presence of N-linked glycans is most pronounced for HLA-B locus products (7). Probably, the presence of a glycan influences the conformation of nascent B-locus H-chains and thereby their assembly with the light chain (β_2m) and peptide, which in turn controls intracellular transport. The influence of N-linked glycans on the conformation of MHC H-chains is further suggested by the observation that the MoAb HC-10, preferentially recognizing HLA-B,C locus H-chains (8), recognizes the HLA-A locus H-chain only in its non-glycosylated form (7). Although inhibition of N-linked glycosylation is clearly not physiologically relevant, these data do show that N-linked glycans contribute to the conformation of MHC H-chains.

After (co-translational) addition of the N-linked glycan to the MHC encoded polypeptide in the ER, further processing (as an intermediate step) to high-mannose type glycans takes place by removal of glucose residues. Ultimately they are converted to complex type glycans following transport of the glycoproteins through the Golgi [reviewed by Kornfeld & Kornfeld (9)]. Complex type N-linked glycans display heterogeneity with respect to extent of branching, sialic acid content and other glycan modifications (10). The extent of glycan branching is dependent on cell type: activation of T- and B-cells has been reported to result in decreased branching (11) whereas (malignant) transformation often results in increased branching (12-14). Each branch usually contains a terminal (negatively charged) sialic acid, and

therefore more extensive branching can produce an increase in the net negative charge of the cell (15).

What are the consequences of glycan heterogeneity in structural terms? Although glycans may have preferred conformations in solution or in protein surroundings, they also display considerable rotational flexibility. Only in exceptional cases can the glycan structure on a protein be elucidated by X-ray diffraction, such as when the glycans interact with the protein backbone and lose their structural flexibility (eg. immunoglobulins) (16). This is certainly not the case for HLA-Class I antigens where the glycan cannot be observed in the electron density map (2). A biantennary glycan structure can cover an area of $55 \times 24 \text{ \AA}$ (17) (the Class I antigen binding groove measures $\sim 25 \times 10 \text{ \AA}$ (2-4)). A tetra-antennary glycan can cover a similar area, but the space occupied is obviously filled more densely. Assuming that the N-linked glycan is pointing away from the Class I molecule (2), the mannose $\alpha 1-6$ branch (the most flexible branch (17)) can still shield a considerable part of the Class I peptide binding groove (see Fig 1). The proposed class II structure contains two N-linked glycans located around the antigen binding groove that could presumably cover the antigen binding site even more efficiently than in Class I molecules (Fig 1).

Binding of peptide to Class I molecules takes place in the endoplasmic reticulum (18-20), where their high-mannose N-linked glycans do not display any substantial heterogeneity. In contrast, Class II molecules are transported in the course of biosynthesis through the Golgi apparatus to endocytotic structures (21), where they take up exogenously added antigen. Thus, Class II molecules carry complex

[6] (図1)。

N結合型糖鎖はタンパク質の上にタンパク質の翻訳と同時に移される。N結合型糖鎖のグリコシル化がツニカマイシンで阻害されると、ヒトの MHCクラス I 抗原のアレリック型の幾つかは β_{2m} とアSEMBルできなくなる。クラス I 分子のアSEMBリーがN結合型糖鎖に依存しているということが HLA-B遺伝子座の産物についてよく判っている[7]。多分、糖鎖の存在が出来たばかりのB-遺伝子座のH鎖のコンフォメーションに影響を与え、その為にL鎖 (β_{2m}) およびペプチドとのアSEMBリーも影響を受け、その結果細胞内の輸送も制御されることになる。更に、HLA-B や C-遺伝子座のH鎖を選択的に認識するモノクローン抗体の HC-10[8]がグリコシル化されていない時だけ HLA-A 遺伝子座のH鎖を認識するという観察[7]から、N結合型糖鎖が MHC のH鎖のコンフォメーションに影響することが示されている。N結合型糖鎖のグリコシル化を阻害しても生理的には影響ないが、これらのデータはN結合型グリカンが MHC のH鎖のコンフォメーションに確かに役立っていることを示している。

小胞体 (ER: endoplasmic reticulum) の中でN結合型糖鎖が MHC でコードされたポリペプチドに付加 (これは翻訳と同時に起こることだが) された後で、グルコース残基が外されることで高マンノース型糖鎖へとプロセッシングされるが、これもさらにプロセッシングされる中間体である。N結合型糖鎖はゴルジを通りながらさらにプロセッシングを受け

最後には複合型糖鎖となる (Kornfield and Kornfield の総説[9]参照)。複合型糖鎖には、分岐構造、シアル酸含量、その結合様式、そしてシアル酸以外の糖残基の修飾に関して沢山の変異がある[10]。糖鎖の分岐の程度は細胞の種類による。T細胞やB細胞が活性化されると分岐が減り[11]、一方悪性の形質転換では分岐が増えることが多い[12-14]。分岐構造の先には通常陰性に荷電したシアル酸が付いていることが多く、そのため分岐が増加すると細胞の陰性荷電総量が増加することになる。

構造という視点で見ると、糖鎖構造がヘテロ (多様) であるとうなるだろう。糖鎖は溶液中であるいはタンパク質の中で ある特定のコンフォメーションをとり易いだろうが、分子内でローテーションによる自由度はかなりある筈である。糖鎖がタンパク質骨格と反応する時とか、構造上のフレキシビリティを (免疫グロブリンのように[16]) 失った時のように、かなり例外的な場合にタンパク質上の糖鎖構造がX線回折で示されている。HLA-クラス I 抗原の場合には糖鎖が電子密度マップ上で観察できないのだから[2]、当然構造がわからないわけである。2本側鎖N結合型糖鎖は $55 \times 24\text{\AA}$ の面積を占める[17] (クラス I 分子の抗原結合溝は約 $25 \times 10\text{\AA}$ の大きさである[2-4])。4本側鎖糖鎖も略同じ面積を占めるが、その中の密度は当然高いことになる。N結合型糖鎖がクラス I 分子から突き出ているとすると[2]、マンノース $\alpha 1 \rightarrow 6$ 分岐 (最もフレキシブルな枝である[17]) はクラ

type N-linked carbohydrates at the time they first encounter peptide. Therefore heterogeneity of complex-type N-linked glycans could readily influence interaction of peptide with Class II molecules but it is less likely that a similar effect is manifested on the interaction of peptide with Class I molecules.

Removal of terminal sialic acids of N-linked glycans of MHC Class I or -II molecules improves their affinity for most anti-MHC antibodies (22-24), most of which bind around the peptide binding groove (3). It has been proposed that T cell receptors have a structure similar to that of the Fab portion of immunoglobulins (25). When a T cell receptor approaches a MHC molecule, it may well first contact its glycans before it interacts with the MHC protein structures that includes bound peptide. It is therefore possible that the affinity of the T cell receptor for MHC molecules (and thereby the recognition of presented peptide) is likewise affected by modifications of N-linked glycans on MHC molecules. Whether the glycan on Class I molecules can also influence the interaction of CD8 with the $\alpha 3$ -domain of the Class I molecule (26-28) is at present unclear. Furthermore, the contribution of the glycans carried by CD4/8 (29) or the T cell receptor (25) to their interaction with MHC molecules remains to be established.

How could alterations in the glycan structure on MHC molecules modify their functional properties? Based on the premises formulated above, a "smaller", less charged glycan structure (as may be produced by desialylation with neuraminidase or by prolonged culture of antigen presenting cells in the presence of trimming glycosidase inhibitors) might favorably affect interactions of the T cell receptor

with MHC-peptide combinations. Indeed, this has been observed in a number of systems (22,30-38). We recently showed that the outcome of a response directed against MHC antigens themselves was dependent on the type of N-linked glycans carried by the stimulator cells, and that the magnitude of the ensuing response was inversely correlated with the amount of sialic acids on N-linked glycans located on antigen presenting cells (30). However, it is unclear whether the immunological effects of glycan alterations are due solely to improved recognition of unique MHC-peptide combination(s), or whether adhesion phenomena are enhanced in a more general sense.

Changes in glycan structure can occur under physiological circumstances. Transformed cells usually have more (12-14), and activated B- and T cells less extensively branched (11) N-linked carbohydrates than their "normal" counterparts. As stated, N-linked glycan modifications can modulate an immune response. Consequently, transformed cells may be recognized by the immune system less efficiently than normal or activated cells. Indeed, Humphries *et al.* (39) described that melanoma cells treated with the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine (resulting in hybrid-type N-linked glycans with at most a single sialic acid) can be successfully eliminated *in vivo* as opposed to their untreated counterparts, suggesting that the glycan type on tumor cells can contribute to their escape from the immune system.

The opposite situation arises when cells are infected with neuraminidase-expressing viruses such as influenza virus. The target cells will be desialylated by viral neuraminidase in a later stage of infection (24) which could make the already infected

ス I ペプチド結合溝のかんりの部分を覆ってしまう。クラス II に対して提出されたモデルでは 2 本の N 結合型糖鎖は抗原結合溝の近くに位置していて、クラス I 分子の場合よりもより効果的に抗原結合サイトを覆ってしまえそうである。

クラス I 分子に抗原ペプチドが結合するのは ER で起こるが[18-20]、ER ではクラス I 分子の高マンノース型糖鎖には殆んど多型が存在しない。しかし、クラス II 分子は生合成の途上ゴルジ装置を経てエンドサイトーシス構造[21]に運ばれそこで抗原と一緒になる。したがって、クラス II 分子の場合はペプチドに初めて出合う時は複合型糖鎖を既に備えている。それ故、N 結合型の複合型糖鎖の多型（ヘテロジェニティ）はペプチドとクラス II 分子との相互作用に容易に影響しうるだろうが、一方クラス I 分子とペプチドとの反応にはこのような効果は出難いと思われる。

MHC クラス I 又は II 分子の N 結合型糖鎖から末端シアル酸を除くと殆んどの抗 MHC 抗体がより結合しやすくなる[22-24]。これらの抗体は大部分ペプチド結合溝の近くに結合するのである[3]。T 細胞レセプターは免疫グロブリンの Fab 部分の構造とよく似ていると言われている[25]。T 細胞レセプターが MHC 分子に近付くと、レセプターは提示された抗原ペプチドを含む MHC タンパク質構造と反応する前に、MHC 分子の糖鎖と先ず接触してもいいのではないだろうか。したがって、T 細胞レセプターの MHC 分子に対する親和性（つまり提示された抗原ペプチドを認識する能力）は、

MHC 分子の N 結合型糖鎖の修飾の程度により同じように影響を受けるだろう。クラス I 分子の糖鎖が CD8 とクラス I 分子の $\alpha 3$ ドメインとの反応[26-28]に影響するかどうかは、現在は不明である。更に、CD 4/8 [29]又は T 細胞レセプター[25]上にある糖鎖が MHC 分子と反応するときに役立っているかどうかは、今後調べなくてはならない問題である。

MHC 分子の中の糖鎖構造が変化するとどのようにその機能が変わるだろう？ 前述のような前提に基くと、シアリダーゼでシアル酸を除去した時や、プロセッシングに關与するグリコシダーゼの阻害剤を加えて抗原提示細胞を長く培養した時に見られるような、“小さくて” 荷電の小さい糖鎖構造は T 細胞レセプターと MHC-ペプチド複合体との相互作用の促進に多分役立つであろう。実際、このことは沢山の実験系で観察されている[22, 30-38]。MHC 抗原に対する反応の強さは刺激細胞の持っている N 結合型糖鎖の種類によること、および反応の程度は抗原提示細胞の上の N 結合型糖鎖のシアル酸の量と反比例していることを、最近私達は示したのである[30]。しかし、糖鎖構造の変わることによる免疫応答上の効果が、ユニークな MHC-ペプチド複合体に対する認識が改良されたためだけなのか、又はもっと一般的な現象として接着が強くなったためなのかは、まだ判らない。

糖鎖構造の変化は生理的な条件で起こることである。形質転換された細胞の場合には正常なその対象細胞と較べて分岐 N 結合型糖鎖が多いし[12-14]、活性化された B 細胞や T 細

cells a better target for cytotoxic T cells. Although this behavior hardly appears of selective advantage to the virus (it would actually make the virus an accomplice in its own destruction), the virus does not really have a viable alternative since it requires expression of its neuraminidase for the formation of new infectious viral particles.

Glycosylation is often discounted as a modification that can influence immune responses. Although it is unlikely there will ever be a grand unification theory to explain the biological role of glycosylation, it is clear that in immune responses variations in N-linked glycan structures cannot be ignored.

References

1. Townsend, A., and Bodmer, H. (1989) *Ann. Rev. Immunol.* **7**, 601-624.
2. Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987) *Nature* **329**, 506-512.
3. Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987) *Nature* **329**, 512-518.
4. Garrett, T.P.J., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1989) *Nature* **342**, 692-696.
5. Shackelford, P. and Strominger, J. (1983) *J. Immunol.* **130**, 274-282.
6. Brown, J.H., Jardetzkey, T., Saper M.A., Samraoui, B., Bjorkman, P.J., and Wiley, D.C. (1989) *Nature* **332**, 845-850.
7. Neefjes, J.J., and Ploegh, H.L. (1988) *Eur. J. Immunol.* **18**, 801-810.
8. Stam, N.J., Spits, H., and Ploegh, H.L. (1986) *J. Immunol.* **137**, 2299-2306.
9. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
10. Schachter, H. (1986) *Biochem. Cell Biol.* **64**, 161-181.
11. Landolfi, N.F., and Cook, R.G. (1986) *Mol. Immunol.* **23**, 297-309.
12. Bolscher, J.G.M., van der Bijl, M.M.W., Neefjes, J.J., Hall, A., Smets, L.A., and Ploegh, H.L. (1988) *EMBO J.* **7**, 3361-3368.
13. Takasaki, S., Ikehira, H., and Kobata, A. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 735-742.
14. Van Beek, W.P., Smets, L.A., and Emmelot, P. (1973) *Cancer Res.* **33**, 2913-2922.
15. Schauer, R. (1985) *Trends Biochem. Sci.* **10**, 357-360.
16. Sutton, B.J., and Phillips, D.C. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 130-132.
17. Montreuil, J. (1984) *Biol. Chem.* **51**, 115-132.
18. Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H.G., Foster, L., and Kaerre, K. (1989) *Nature* **340**, 443-448.
19. Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (1989) *Science* **224**, 1072-1075.
20. Nuchtern, J.G., Bonifacio, J.S., Biddison, W.E., and Klausner, R.D. (1989) *Nature* **339**, 223-226.
21. Neefjes, J.J., Stollorz, V., Peters, P.J., Geuze, H.G., and Ploegh, H.L. (1990) *Cell* **61**, 171-183.
22. Liberti, P.A., Hackett, C.J. and Askonas, B.A. (1979) *Eur. J. Immunol.* **9**, 751-757.
23. Boog, C.J.P., Neefjes, J.J., Boes, Ploegh, H.L., and Melief, C.J.M. (1989) *Eur. J. Immunol.* **19**, 537-542.
24. Rotteveel, F.T.M., Neefjes, J.J., Ploegh, H.L., and Lucas, C.J. (1989) *Human Immunol.* **26**, 199-213.
25. Novotny, J., Tonegawa, S., Saito, H., Kranz, D.M., and Eisen, H.N. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 742-746.
26. Salter, R.D., Norment, A.M., Chen, B.P., Clayberger, C., Krensky, A.M., Littman, D.R., and Parham, P. (1989) *Nature* **338**, 345-347.
27. Connolly, J.M., Potter, T.A., Wormstall, E.-M., and Hansen, T.H. (1988) *J. Exp. Med.* **168**, 325-341.
28. Salter, R.D., Benjamin, R.J., Wesley, P.K., Buxton, S.E., Garrett, T.P.J., Clayberger, C., Krensky, A.M., Norment, A.M., Littman, D.R., and Parham, P. (1990) *Nature* **345**, 41-46.

胞では分岐糖鎖が活性前のそれと比して少ない[11]。既に述べたように、N結合型糖鎖の修飾をすると免疫応答が変化する。その結果、形質転換した細胞は正常な又は活性化された細胞よりも弱くしか免疫システムによって認識されないのである。Humphriesらはオリゴ糖プロセッシングの阻害剤であるスワインソニンでメラノーマを処理すると、プロセッシングが一番すすんでも1個のシアル酸残基を持つハイブリッド型N結合型糖鎖しかできず、このメラノーマは未処理の対照細胞とは異なり *in vivo* で効率よく除去されたと報告している[39]。このことは腫瘍細胞上の糖鎖構造の型が、免疫システムからこれらの細胞が逃れるのに役立っていることを意味しているだろう。

インフルエンザウィルスのようなシアリダーゼを発現しているウィルスに細胞が感染すると、この逆のことが起こる。ウィルスの標的となった細胞は感染後しばらくするとウィルスの

シアリダーゼで脱シアリル化を受けるので[24]、キラーT細胞のよい標的となってしまう。このような現象はウィルス自身をも一緒に殺してしまうのでウィルスにとって都合のよいこととはとても思えない。しかし、インフルエンザウィルスは新しく感染性のウィルス粒子を生産するためにはシアリダーゼをどうしても発現しなくてはならないので、このウィルスには他に試みてみる可能性はないのである。

グリコシル化は免疫反応に影響するだけの単なる修飾として軽く見られることが多い。グリコシル化の生物学的役割を十分に説明する壮大な統一学説が将来成立するとはとても考え難いが、それでも免疫応答でN結合型糖鎖構造の変化は明らかに無視できないのである。

三菱化成生命科学研究所・複合糖質研究室
山形 達也 訳

29. Camerini, D., and Seed, B. (1990) *Cell* **60**, 747-754.
30. Neefjes, J.J., DeBruyn, M.L.H., Boog, C.J.P., Nieland, J.D., Boes, J., Meliet, C.J.M., and Ploegh, H.L. (1990) *J. Exp. Med.* **171**, 583-588.
31. Hirayama, Y., Inaba, K., Inaba, M., Kato, T., Kitaura, M., Hosokawa, T., Ikehara, S., and Muramatsu, S. (1988) *J. Exp. Med.* **168**, 1443-1456.
32. Powell, L.D., Whiteheart, S.W., and Hart, G.W. (1987) *J. Immunol.* **139**, 262-270.
33. Frohman, M., and Cowing, C. (1985) *J. Immunol.* **134**, 2269-2275.
34. Powell, L.D., Bause, E., Legler, G. Molyneux, R.J., and Hart, G.W. (1985) *J. Immunol.* **135**, 714-724.
35. Hart, G.W. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 151-158.
36. Cullen, S.E., Kindle, C.S., Shreffler, D.C., and Cowing, C.J. (1981) *J. Immunol.* **127**, 1478-1484.
37. Cowing, C., and Chantrelaine, J.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6000-6004.
38. Taiara, S., Kahiuchi, T., Minotti, M., and Nariuchi, H. (1986) *J. Immunol.* **137**, 2448-2454.
39. Humphries, M.J., Matsumoto, K. White, S.L., and Olden, K. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1752-1756.