From Nashville with Sweetness Report on the 21st Annual Meeting of the Society of Complex Carbohydrates

ナッシュビルから「甘さ」をこめて 第21回複合糖質学会年会のレポート

Lee, Y.C., Quesenberry, M., Roseman, S., and Yoshida, T.

Department of Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21218, USA, FAX: 1-410-516-8716

Key Words: annual meeting, Genzyme Award, Glycobiology, Nashville, Society of Complex Carbohydrates,

A. General

The 21st Annual Meeting of the Society of Complex Carbohydrates, organized by Carl Hellerqvist, Vanderbilt Univ. Sch. of Med., was held in Nashville, TN, Nov. 11-14, 1992. The meeting was divided into eight scientific sessions, using a format patterned after the International Glycoconjugate meeting in Toronto, 1991. To the delight of many participants, there were no concurrent sessions. Regrettably, there was no provision for coffee break between sessions and there was no allocation of specific poster viewing time.

There were over 350 participants, including many young "glyco-scientists" who were aided by the 22 travel fellowships of \$300 each issued by the Society to help students and postdoctorals attend the meeting. This is an excellent policy which should be maintained. The abstracts of this meeting were printed by Oxford University Press as a part of the October, 1992, issue of *Glycobiology*.

B. Session I---Interaction and Separation of Carbohydrates

Michael Weitzhandler (Dionex, Sunnyvale, CA) reported a successful procedure for digesting Western-blotted glycoproteins directly with glyco-amidase. Although the results reported were limited to a combination of the Millipore PVDF membranes and glycopeptidase F, the yields of released oligosaccharides, as analyzed by HPAEC, are quite good. Previously, acid hydrolysis or hydrazinolysis of the similarly blotted glycoproteins have been reported, but the glyco-amidase treatment appears to be most effective. No interfering by-products eluted from the membranes have been detected by HPAEC analysis.

Christopher Starr (Glyko) showed the chemical principles as well as sophisticated hardware-software for FACE (Fluorescence-Assisted Carbohydrate Electrophoresis) technique. Oligosaccharides are modified with an anionic fluorescent amine by reductive amination, and the resulting products are analyzed by polyacrylamide electrophoresis, using 20-40% gradient gels. Although the separation is better than expected, and the scanning device is well automated, the attainable resolution appears not as great as that of HPLC. However, the capability of handling multiple samples is an advantage.

A. 概要

第21回複合糖質学会年会がVanderbilt大学医学校Carl Hellerqvist氏主催によって1992年11月11-14日にわたってテネシー州Nashvilleで開催された。会議は、1991年トロントで開かれた国際糖質学会と同様、8つのセッションに分けられていた。また同時開催のセッションがなかったことは、多くの参加者に喜ばれていた。残念なことにセッション間にコーヒーブレイクがなく、ポスターを見るための時間も特に用意されていなかった。

学生やポスドクを支援する当学会から参加費用として\$300を援助してもらった多くの若い"糖科学者"を含め、350人を越える参加者があった。この援助方針は今後も維持していきたいものである。この年会の発表要旨は、*Glycobiology*(1992年10月号)にオックスフォード大学出版会から出版された。

B. セッションI---糖質の相互作用と分離

Michael Weitzhandler(Dionex, Sunnyvale, CA)はウエスタン・ブロットした糖タンパク質をグリコアミダーゼを用いて、直接消化する方法を報告した。この方法は、MilliporeのPVDF膜とグリコペプチダーゼFの組み合わせに限定されるものであったが、HPAECを用いた分析によればオリゴ糖類の収量は極めて良好であった。以前、同様にブロットされた糖タンパク質の酸加水分解やヒドラジン分解が報告されていたが、グリコアミダーゼ処理は最も効率が良いようである。HPAEC分析によっては膜から出てくる妨害物質は、検出されなかった。

Christopher Starr(Glyko)は、FACE(Fluorescence-Assisted Carbohydrate Electrophoresis)の化学原理とそのための精緻なハードウェアとソフトウェアを紹介していた。オリゴ糖類は、還元アミノ反応によって陰性イオン蛍光性アミンで修飾され、生成物は20-40%のグラジエントゲルを用いたポリアクリルアミド電気泳動によって分析された。分離は想像以上によく、スキャン装置は自動化されていたが、得られた分離度はHPLC程ではなかった。しかし、複数のサンプルを扱える能力は利点である。

Russ Granzow (Pharmacia, Uppsala, Sweden) presented the basic theory and application of BIACore based on the principle of surface plasmon resonance. Thanks to the sensitivity of the detection and the microfluidics technology, it requires a relatively small quantity of sample. It is highly automated, and association constants and stoichiometry can be obtained in a single titration in less than an hour. There are shortcomings, however. It is necessary to immobilize one of the two interacting components, which can create some problems with regard to the orientation and accessibility of the immobilized molecules, as well as giving a disperse population of species rather than a homogeneous population as occurs in solution. The detectability is currently limited to molecules of MW ca. 1000, thus excluding the possibility of examining binding of small oligosaccharides to an immobilized lectin. Another drawback of this fabulous instrument is its price. The company spent nearly 100 million dollars for development, and the current unit price of ca. \$130,000 renders it rather unattainable by the average research laboratory.

Kevin Rice (Ohio State Univ., Columbus, OH) reviewed the structure-activity relationship of the asialoglycoprotein receptor, with emphasis on an approach to determine the 3-D structure of the glycopeptide by fluorometry. After attaching a fluorescence donor at the N-terminal amino acid and an acceptor probe at one of the three Gal residues in a triantennary glycopeptide, energy transfer experiments were performed. Most interestingly, by measurement of decay life-time, flexibility of each of the three branches in the glycopeptide could be assessed. Populations of different conformations showed temperature dependency. Such information cannot be obtained by other techniques and is highly useful in interpreting the binding data.

C. Session II --- Analytical Chemistry

Bo Nilsson (Univ. Lund, Lund, Sweden) reported a new application of combining of periodate oxidation with mass spectrometry for structural studies of *O*-glycosides. Periodate oxidation followed by reduction and hydrolysis yields linkage- and residue-specific mass spectrometric patterns, from which the original structure can be deduced. It demonstrates how a combination of an old and a new technique can become an amazingly powerful tool for structural analysis.

Herman van Halbeek (Univ. Georgia, Athens, GA) discussed the analysis of three dimensional structure of carbohydrates by NMR, using determinations of scalar couplings, and inter-glycoside nuclear Overhauser effect in different solvents and at different temperatures. Protons in the OH and NH groups were also utilized in the nOe measurement. The emphasis is on the dynamics of conformation rather than static analysis. In this regard, it shares a common direction with the presentation by Kevin Rice. As simple a compound as sucrose was

Russ Granzow(Pharmacia, Uppsala, Sweden)は、表面プラズモン共鳴の原理に基づいたBIACoreの基本原理と応用に関して発表を行なった。検出感度とマイクロ流体素子工学技術によって、試料の量が比較的少量ですむ。これは自動化されており、会合定数や化学量が一回の測定で1時間以内に同時に得ることができる。しかし欠点もある。2つの相互作用をする分子の一方を固定化する必要があり、これが固定化した分子の方向性と接近のしやすさという問題や、溶液の中でのように均一なものではなく、固定化されたための不均一性といった問題を引き起こすことになる。検出限界は現在分子量約1000以上であって、固定化したレクチンに結合した小さなオリゴ糖類を検出することができない。この画期的な機械で、他に挙げられる欠点としてはその価格がある。ファルマシア社はこの機械の開発に約1億ドルも投資しており、現時点でのユニットあたりの価格の約13万ドルは、平均的な研究室で購入しにくいものとなっている。

Kevin Rice(Ohio State Univ., Columbus, OH)は、アシアロ糖タンパク質レセプターの構造活性相関を、蛍光を用いて糖ペプチドの3次元構造を決定するというアプローチに力点をおいて説明していた。アミノ酸のN末端に蛍光ドナーを結合後、3本鎖糖ペプチドの3つのガラクトース残基の1つをアクセプタープローブとして、エネルギー転移実験を行った。非常に興味深いことに、蛍光減退時間を測定することによって、糖ペプチドの3つの枝のそれぞれの自由度が測定できた。種々のコンフォメーションの割合は、温度依存的であった。このような情報は他の手法によっては得ることができず、結合データを解釈する上で非常に有意義である。

C. セッションII---分析化学

Bo Nilsson(Univ., Lund, Lund, Sweden)は、O-結合型糖鎖の構造解析をするために、質量分析に過ヨウ素酸酸化を組み合わせるという新しい手法を報告していた。過ヨウ素酸酸化の後、還元して加水分解することによって、結合と残基に特異的な質量分析パターンを得ることができ、これから本来の構造を推測することができる。これは、古い手法と新しい手法を組み合わせることで、構造解析に驚くほど強力な手法を作ることができることを示している。

Herman van Halbeek(Univ. Georgia, Athens, GA)は、スカラーカップリングや種々の溶媒や温度での糖間の核オーバハウザー効果を用いた、NMRによる糖の3次元構造の解析について議論していた。OHとNHグループのプロトンもnOe測定に用いられた。静的な解析よりも、動的なコンフォメーションの解析を強調していた。この点では、Kevin Riceの発表したものと同様な方向性を持っていた。ショ糖といった単純な化合物もコ

From Nashville with Sweetness Report on the 21st Annual Meeting of the Society of Complex Carbohydrates

ナッシュビルから「甘さ」をこめて 第21回複合糖質学会年会のレポート

Lee, Y.C., Quesenberry, M., Roseman, S., and Yoshida, T.

Department of Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21218, USA, FAX: 1-410-516-8716

Key Words: annual meeting, Genzyme Award, Glycobiology, Nashville, Society of Complex Carbohydrates,

A. General

The 21st Annual Meeting of the Society of Complex Carbohydrates, organized by Carl Hellerqvist, Vanderbilt Univ. Sch. of Med., was held in Nashville, TN, Nov. 11-14, 1992. The meeting was divided into eight scientific sessions, using a format patterned after the International Glycoconjugate meeting in Toronto, 1991. To the delight of many participants, there were no concurrent sessions. Regrettably, there was no provision for coffee break between sessions and there was no allocation of specific poster viewing time.

There were over 350 participants, including many young "glyco-scientists" who were aided by the 22 travel fellowships of \$300 each issued by the Society to help students and postdoctorals attend the meeting. This is an excellent policy which should be maintained. The abstracts of this meeting were printed by Oxford University Press as a part of the October, 1992, issue of *Glycobiology*.

B. Session I---Interaction and Separation of Carbohydrates

Michael Weitzhandler (Dionex, Sunnyvale, CA) reported a successful procedure for digesting Western-blotted glycoproteins directly with glyco-amidase. Although the results reported were limited to a combination of the Millipore PVDF membranes and glycopeptidase F, the yields of released oligosaccharides, as analyzed by HPAEC, are quite good. Previously, acid hydrolysis or hydrazinolysis of the similarly blotted glycoproteins have been reported, but the glyco-amidase treatment appears to be most effective. No interfering by-products eluted from the membranes have been detected by HPAEC analysis.

Christopher Starr (Glyko) showed the chemical principles as well as sophisticated hardware-software for FACE (Fluorescence-Assisted Carbohydrate Electrophoresis) technique. Oligosaccharides are modified with an anionic fluorescent amine by reductive amination, and the resulting products are analyzed by polyacrylamide electrophoresis, using 20-40% gradient gels. Although the separation is better than expected, and the scanning device is well automated, the attainable resolution appears not as great as that of HPLC. However, the capability of handling multiple samples is an advantage.

A. 概要

第21回複合糖質学会年会がVanderbilt大学医学校Carl Hellerqvist氏主催によって1992年11月11-14日にわたってテネシー州Nashvilleで開催された。会議は、1991年トロントで開かれた国際糖質学会と同様、8つのセッションに分けられていた。また同時開催のセッションがなかったことは、多くの参加者に喜ばれていた。残念なことにセッション間にコーヒーブレイクがなく、ポスターを見るための時間も特に用意されていなかった。

学生やポスドクを支援する当学会から参加費用として\$300を援助してもらった多くの若い"糖科学者"を含め、350人を越える参加者があった。この援助方針は今後も維持していきたいものである。この年会の発表要旨は、*Glycobiology*(1992年10月号)にオックスフォード大学出版会から出版された。

B. セッションI---糖質の相互作用と分離

Michael Weitzhandler(Dionex, Sunnyvale, CA)はウエスタン・ブロットした糖タンパク質をグリコアミダーゼを用いて、直接消化する方法を報告した。この方法は、MilliporeのPVDF膜とグリコペプチダーゼFの組み合わせに限定されるものであったが、HPAECを用いた分析によればオリゴ糖類の収量は極めて良好であった。以前、同様にブロットされた糖タンパク質の酸加水分解やヒドラジン分解が報告されていたが、グリコアミダーゼ処理は最も効率が良いようである。HPAEC分析によっては膜から出てくる妨害物質は、検出されなかった。

Christopher Starr(Glyko)は、FACE(Fluorescence-Assisted Carbohydrate Electrophoresis)の化学原理とそのための精緻なハードウェアとソフトウェアを紹介していた。オリゴ糖類は、還元アミノ反応によって陰性イオン蛍光性アミンで修飾され、生成物は20-40%のグラジエントゲルを用いたポリアクリルアミド電気泳動によって分析された。分離は想像以上によく、スキャン装置は自動化されていたが、得られた分離度はHPLC程ではなかった。しかし、複数のサンプルを扱える能力は利点である。

shown to be quite varied with respect to conformational structures.

Michael McNeil (Colorado State Univ., Ft. Collins, CO) detailed the studies of Mycobacterial cell wall polysaccharides. The arabinose-containing non-repeating structure was dissected by a combination of i) chemical and enzymatic fragmentation; ii) ethylation and methylation; iii) HPLC and GLC; iv) NMR; and v) FAB-MS. Among the oligosaccharides deciphered was a tetra-branched 23mer, containing arabinofuranoside structures.

Brad Bendiak (The Biomembrane Institute, Seattle, WA) proposed a new method for sequential removal of monosaccharides from the reducing end of an oligosaccharide. The key techniques are i) reduction with sodium borohydride; ii) selective oxidation with lead tetraacetate; and iii) treatment with a hydrazino compound for elimination. It is necessary to generate a carbonyl function adjacent to the carbon of glycosidic attachment for the "peeling" reaction. The shortcoming of this approach, in comparison to the classic Edman degradation of peptide, seems to be that the identity of the monosaccharide being eliminated is not readily determined.

D. Session III --- Glycolipids

S. Hakomori (The Biomembrane Institute, Univ. Washington, Seattle, WA) discussed the functions of glycosphingolipids, such as gangliosides, in transmembrane signaling and cell growth. GM₃ inhibits epidermal growth factor receptor kinase. In further studies, he stressed the importance of cationic charge on lipids. Lyso-GM₃ inhibits protein kinase C, and de-N-acetyl-GM₃ stimulates the epidermal growth factor receptor kinase. Similarly, psychosine stimulates src kinases, while an anionic lipid, GM₃, reverses the psychosine effect. Basic lipids in human brain extracts were therefore studied; sphingosine and dimethylsphingosine were detected, but not psychosine. In addition, relatively large quantities of novel glycolipids, plasmalopsychosines, were isolated. These lipids contain aldehydes such as stearaldehyde linked as acetals to C-4,6 and C-3,4 of the galactose moiety of psychosine. The functions of these novel lipids remain to be defined.

N. Radin (Univ. Michigan, Ann Arbor, MI) discussed the biological role(s) of glucosylceramide with special emphasis on its effect in promoting cell growth. In Gaucher's disease, there is a correlation between the accumulation of increased quantities of glucosylceramide and increased cell growth. Similar results were obtained by injecting the glycolipid into mice, blocking its hydrolysis with inhibitors, by the use of phorbol diester, etc. Inhibitors of glucosylceramide synthase (e.g., PDMP) have the reverse effect, i.e., they decrease the rate of cell growth.

K. Sandhoff (Univ. Bonn, Bonn, Germany) presented important data on the degradation of sphingoglycolipids.

ンフォメーション構造という観点からはかなり違ったものとして見えた。

Michael McNeil (Colorado State Univ., Ft. Collins, CO)は、マイコバクテリアの細胞壁の多糖の詳細に関して報告した。アラビノースを含む非繰り返し構造は、i)化学的、酵素的消化、ii)エチル化、メチル化、iii)HPLCとGLC、iv)NMR、v)FAB-MSの組み合わせによって分類できる。解析したオリゴ糖の中には、アラビノフラノサイド構造を持つ、4本鎖の23merのものがあつた。

Brad Bendiak (The Biomembrane Institute, Seattle WA)は、オリゴ糖の還元末端から単糖を順次はずす新しい手法を提案していた。鍵となる手法は、i)NaBH₄による還元、ii)四酢酸鉛による選択的な酸化、iii)ヒドラジン化合物による脱離処理である。"はがす"反応のために、糖の結合していた炭素に隣接するカルボニルの機能を作ることが必要である。この方法の欠点は、旧来のペプチドのエドマン分解と比較して、脱離した単糖が何であるかが直ちに決定できないことである。

D. セッションIII---糖脂質

S. Hakomori (The Biomembrane Institute, Univ. Washington, Seattle, WA)は、ガングリオシドといったスフィンゴ糖脂質の、膜を介したシグナル伝達や細胞増殖における機能に関して議論していた。例をあげれば、GM₃はEGFレセプターキナーゼを阻害する。さらなる解析によって、脂質の陽性の電荷の重要性を強調していた。リゾ-GM₃はプロテインキナーゼCを阻害し、de-N-アセチル-GM₃は、EGFレセプターキナーゼを刺激する。同様にサイコシンは、srcキナーゼを刺激する一方で、陰性脂質のGM₃はサイコシンの効果を逆にした。また、ヒト脳抽出液中で塩基性脂質を調べたところ、スフィンゴシンとジメチルスフィンゴシンが検出されたが、サイコシンは検出されなかった。さらに比較的多量の新しい糖脂質であるプラズマロサイコシンが単離された。これら脂質は、サイコシンのガラクトース残基のC-4,6とC-3,4にアセタールとして結合したステアアルデヒドといったアルデヒドを含んでいた。これらの新しい脂質の機能は分からないままである。

N. Radin (Univ. Michigan, Ann Arbor, MI)は、グルコシルセラミドの生物学的役割を、その細胞成長を促進する効果を強調して議論していた。ゴーシェー病において、グルコシルセラミドの蓄積と細胞成長の間には相関がある。マウスにグリコシルセラミドを注入し、ホルボールジエステルなどを用いてその加水分解を防ぐことで同様の結果が得られた。糖脂質の合成阻害剤(例えばPDMP)は逆の作用、即ち、これによって細胞増殖を抑制した。

K. Sandhoff (Univ. Bonn, Bonn, Germany)は、スフィンゴ糖脂質の分解に関する重要なデータを示した。これらの複合糖質は

While it has long been known that these glycoconjugates are degraded by the sequential action of exoglycosidases, Sandhoff's laboratory has shown that the enzymes cannot hydrolyze glycolipids in membranes or vesicles when the oligosaccharide chains are short unless sphingoglycolipid-binding proteins (SAPs) are added. Apparently, the hydrolases are sterically hindered from approaching the glycosidic bonds to act on them unless the binding proteins are present and in some way make these linkages available to the enzymes. Four different SAPs are known, originating from a single protein precursor. Another unrelated protein, GM₂ activator protein, which permits β -hexosaminidase A to attack this ganglioside has recently been identified. In addition, analysis of atypical lipid storage diseases led to the recognition of 8 different mutations in the SAPs of 7 different affected patients. Finally, a model was presented for the degradation of the glycolipid containing vesicles (arising from endosomal membranes) inside lysosomes.

O. Koul (Shriver Center, Boston, MA) discussed mouse kidney UDP-galactose: globoside galactosyltransferase. The enzyme is found in the microsomal fraction of kidney, and the activity is sex and strain dependent. These differences may result from the presence of endogenous inhibitors in female kidney microsomes. The inhibitors were solubilized and partially purified, and shown to consist of three different components, a heat labile, and two heat stable inhibitors.

B. Gillard (Baylor Coll. Med., Houston, TX) reported that glycosphingolipids (GSLs) are located intracellularly, not just in the outer leaflet of plasma membranes (the most widely held concept). Antibodies against specific GSL's, and indirect immunofluorescence microscopy were used with fixed, permeabilized cells to detect the glycolipid. A given GSL showed different patterns of localization in different cell types. Furthermore, different GSL's were located in different subcellular organelles in a single cell. These results raise questions on specific sorting mechanisms that regulate the intracellular transport and localization of GSLs as well as their potential functions in different subcellular organelles.

E. Session IV --- Glycosyltransferases

One theme in this session was the application of molecular biological techniques to isolation and structural analyses of different enzymes which modify complex carbohydrates. Transfer of sialic acid was a hot topic: sialyltransferases were the subject of three presentations. James Paulson (Cytel, San Diego, CA) discussed recent results of successful cloning strategies based on the polymerase chain reaction (PCR). Application of a PCR strategy requires some prior sequence information to design a pair of oligonucleotides which will prime DNA synthesis of opposite strands, in an orientation each toward the other to create complementary strands of newly synthesized

エキソグリコシダーゼの一連の反応により分解することは知られていたが、Sandhoffの研究室では、スフィンゴ糖脂質-結合タンパク質(SAP)を加えていない場合は、オリゴ糖の糖鎖が短い時、酵素は膜上や小胞では糖脂質を加水分解しないことが示された。結合タンパク質が存在して、何らかの方法でグリコシド結合を加水分解酵素に近づけない限り、明らかにこれらの加水分解酵素は立体的な障害によりグリコシド結合を切断することができない。1つのタンパク質前駆体から由来する4種のSAPが知られている。もう1つの別のタンパク質である、GM₂活性化タンパク質は、 β -ヘキササミニダーゼAがこのガングリオシドに反応できるようにするものであるが、これが最近同定された。さらに脂質貯蔵異常がある疾病を解析すると、7人の個別の患者でSAPに8つの異なった変異が認められた。最後に、リソゾーム内で糖脂質を含む(エンドソーム膜由来の)小胞が分解されるモデルが紹介されていた。

O. Koul(Shriver Center, Boston, MA)は、マウス腎臓のUDP-ガラクトース:グロボシド ガラクトース転移酵素を報告していた。この酵素は腎臓のミクロソーム画分で見い出され、その活性は性別とマウスの系統に依存していることがわかった。これらの違いは、雌マウス腎臓のミクロソームにある内在性の阻害物質に由来するのであろう。この阻害物質は部分的に精製され、1つは熱に弱い、他の2つは耐熱性の阻害物質からなる3つの構成要素からなることが示された。

B. Gillard(Baylor Coll. Med., Houston, TX)は、スフィンゴ糖脂質(GSLs)は、(広く支持されているように)細胞質膜の外側にだけではなく、細胞質内にも存在していることを示した。GSLsに対する特異的な抗体を用い、固定をして透過性を良くした細胞で、間接蛍光抗体法を用いて顕微鏡観察した。この結果、GSLは種々の細胞種で異なった分布パターンを示した。さらにGSLが違うと、1つの細胞内で種々の細胞内小器官に分布することがわかった。これらの結果からGSLsの細胞内輸送や局在の制御機構や細胞内小器官での機能といった問題が提起されるであろう。

E. セッションIV---糖転移酵素

このセッションのテーマの一つは分子生物学の手法を用いて、複合糖質を作る種々の酵素を単離したり、構造解析を行うことであった。シアル酸の転移はホットなトピックであった。シアル酸転移酵素は3つの演題の主題となっていた。James Paulson(Cytel, San Diego, CA)は、PCR(polymerase chain reaction)に基づいたクローニング戦略の最近の知見を紹介していた。PCRを用いた方法は、新しい相補DNA鎖を複製する際に最初となる、対のオリゴヌクレオチドを作るために最初に配列の情報が必要となる。既知のシアル酸転移酵素の3つの配列からモチー

DNA. The identification of a motif from three sequences of known sialyltransferases allowed the Paulson group to base the PCR primer design on the motif, and to identify new sialyltransferase clones. The overall level of sequence identity among these clones ranged from 40% to 60%, and included the motif which Paulson had proposed: -----Cys---Val---Gly--Gly--IleAsp---, where "----" indicates spacing by less-conserved amino acids between the more conserved residues shown here in the three-letter code.

Joseph Lau (Roswell Park Cancer Inst., Buffalo, NY) specifically addressed α 2,6 sialyltransferase mRNA expression. Of two known size classes of mRNA, 4.3 kb and 4.7 kb, the shorter transcript had previously been better characterized. The experiments discussed showed down-regulation of the large mRNA species in response to thyrotropic stimulating hormone in a rat thyroid cell line.

Finally, the *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* infective stage transsialidases, a novel and important group of enzymes, were reviewed by Victor Nussenzweig (New York Univ., New York, NY) in detailed terms of substrate specificity. The sialic acid (SA) transfer is from host SA-containing oligosaccharide termini, not CMP-sialic acid, to other oligosaccharides. These enzymes may be important in parasite resistance to host defense mechanisms.

The fucosyltransferases were discussed by John Lowe (HHMI, Univ. Michigan, Ann Arbor, MI). Five clones have been identified and used to screen Southern blots at high and low stringency. Using the human chromosome 11 α 1,3-fucosyltransferase as a probe, no additional strongly-hybridizing genes were detected, but low stringency-screening suggests that there are distantly-related genes.

Marti Bierhuizen (La Jolla Cancer Res. Found., La Jolla, CA) talked about the expression cloning of β 1,6-GlcNAc transferase. An antibody was used to screen for production of the desired epitope from CHO cells stably expressing polyoma large T antigen in a background which required transient expression of the desired GlcNAc transferase to produce the Gal β 1,3-(GlcNAc β 1,6)-GalNAc antigen.

F. Session VI---Protein Glycosylation and Processing

Early steps in the synthesis of N-linked oligosaccharides were emphasized in this session. Dolichol (dol) derivatives and enzymes catalyzing reactions involving dol derivatives were a common theme. Leading the way, Mark Lehrman (Univ. Texas-Southwestern, Dallas, TX) showed a potential dol-binding site found in two copies in GlcNAc-1-P-transferase (GPT), both required for activity. The motif, Ile/Val-X-Phe/Tyr-XX-IleProPhe-XXD-Phe/Tyr (where X is any residue but not usually Ala or Gly), was later expanded upon by Reid Gilmore (Univ. Mass. Med. School, Worcester, MA). Gilmore's approach to the study of the oligosaccharyltransferase complex

フを見出すことによって、PaulsonらはこのモチーフのPCRのプライマーをもとに、新しいシアル酸転移酵素のクローンを見出した。これらのクローンの配列全体の相同性は40-60%であり、これはPaulsonの提案したモチーフ-----Cys---Val---Gly---Gly---IleAsp---を含んでいた。ここで"----"は、より保存されているアミノ酸(3文字表記)残基間の、あまり保存されていない配列を示している。

Joseph Lau(Roswell Park Cancer Inst., Buffalo, NY)は、 α 2,6 シアル酸転移酵素のmRNAの発現を強調していた。4.3 kbと4.7 kbからなる2つの大きさの既知のmRNAのうち、短い方の翻訳産物は以前に詳細が明らかにされている。ここで議論された実験結果は、大きいmRNAのダウンレギュレーションは、ラット甲状腺細胞株を甲状腺刺激ホルモンで刺激すると起こることを示していた。

最後にTrypanosoma cruziとT. bruceiの感染段階のトランスシアリダーゼは、新しい重要な酵素であり、Victor Nussenzweig (New York Univ., New York, NY) は、この酵素の基質特異性の詳細をまとめて報告した。シアル酸(SA)の他の糖鎖への転移は、ホストのSA-を含む糖鎖の末端から起こり、CMP-SAからではない。これらの酵素はホストの防御機構に対して寄生する側の耐性に重要なのであろう。

フコース転移酵素はJohn Lowe(HHMI, Univ. Michigan, Ann Arbor, MI)によって議論されていた。5つのクローンが見い出され、厳しい条件または緩い条件でサザンブロットが行なわれた。ヒトクロモソーム11の α 1,3フコース転移酵素をプローブとして用いると、厳しい条件下ではハイブリッドする遺伝子はなかったが、緩い条件ではあったため、関連した遺伝子があることを示唆していた。

Marti Bierhuizen(La Jolla Cancer Res. Found., La Jolla, CA)は、 β 1,6-GlcNAc転移酵素の発現クローニングについて説明した。Gal β 1,3-(GlcNAc β 1,6)-GalNAc 抗原を合成する、目的のGlcNAc転移酵素の一次的な発現に必要なポリオマーラージT抗原を安定に発現しているCHO細胞から目標とするエピトープを発現しているものをスクリーニングするために抗体を用いた。

F. セッションVI---タンパク質のグリコシル化とプロセッシング

このセッションでは、N-結合型糖鎖合成の初期の段階が強調されていた。Dolichol(dol)誘導体とdol誘導体を含む反応を触媒する酵素が共通の話題であった。Mark Lehrman(Univ. Texas-Southwestern, Dallas, TX)は、GlcNAc-1-P-転移酵素(GPT)にある2つのdol結合部位の両方が活性に必要であることを示した。Ile/Val-X-Phe/Tyr-XX-IleProPhe-XXD-Phe/Tyr(Xは任意のアミノ酸残基で、通常AlaやGlyではない)といったモチーフは、Reid Gilmore(Univ. Mass. Med. School, Worcester, MA)によって議論が展開された。複合糖転移複合体に関するGilmoreのアプローチ

revealed three subunits, two of which were shown to be ribophorin I and II. Sequencing of ribophorin I revealed the presence of a putative dol-binding site.

In studies of substrate requirements for both Dol-P-Man: Man₅oligosaccharide-P-P-dol and Dol-P-Glc: Man₅oligo-P-P-dol, Crislyn D'Souza-Schorey (Univ. Arkansas, Little Rock, AR) showed polyprenyl-P-Man and polyprenyl-P-Glc to have K_m values less than that of dol derivatives. Jeffrey Rush (Univ. Kentucky Coll. Med., Lexington, KY) could extend the list of criteria to include a preference for the β-Man-P-dol over the α-Man-P-dol, where the first isoprene unit to which Man is attached must be saturated, and 19 isoprenes seem to be optimal.

A detailed description of the murine GlcNAc-1-P transferase gene organization was given by B. Rajput (Univ. Maryland, College Park, MD). The GPT gene covers 9 exons in 7 kb.

G. Session VII---Molecular Events in Cell and Microbial Adhesion

E. Rozdzinski (Rockefeller Univ., Rochester, NY) reported that *Bordetella pertussis* toxin (PT) is used as an adhesin to bind the bacteria to carbohydrates on human cilia and macrophages. The carbohydrate binding domains of PT were localized to subunits S2 and S3 of the protein. S2 and S3 are the first prokaryotic proteins found to have the consensus sequence for eukaryotic C-type lectins. Sequence similarity was strongest with the selectins, a family of lectins involved in leukocyte trafficking. The structural analogy between domains S2 and S3 of PT to selectins was convincingly established by functional assays. These involved the use of neutrophil binding to endothelial cells *in vitro*. Peptides from the putative functional domains of S2, S3 and of selectins competed with the cellular selectins and inhibited the neutrophils from binding to the endothelial cells. Thus, the pertussis toxin contains domains that are structural and functional analogs of selectins.

A. Varki (Univ. California, San Diego, CA) discussed recent findings on the role of sialic acids (SA) in recognition by certain adhesion proteins. The CD22β lectin specifically binds a few lymphoid proteins containing SA-α2,6-lactosamine units on N-linked oligosaccharides, and truncation of the SA side chains abolished binding. P-Selectin binds to a 120 kDa myeloid glycoprotein, but truncation of SA units has no effect. This high affinity binding was destroyed by O-sialoglycoprotease, which cleaves proteins with clustered O-linked oligosaccharides. L-Selectin recognizes a 50 kDa sialylated and sulfated ligand from lymph nodes. Interestingly, limited periodate oxidation (resulting in loss of C8-9 of SA) caused enhanced binding, which was attributed to the interaction between the aldehydic group and lysyl group. Finally, a novel L-selectin ligand was reported in non-lymphoid endothelial cells.

によれば、これは3つのユニットからなり、このうち2つはリボフォリンIとIIであった。リボフォリンIをシーケンスするとdol結合部位と推測されるものの存在があった。

Dol-P-Man:Man₅オリゴ糖-P-P-dolとDol-P-Glc:Man₅オリゴ糖-P-P-dolの基質特異性に関する研究において、Crislyn D'Souza-Schorey(Univ. Arkansas, Little Rock, AR)は、ポリプレニル-P-Manとポリプレニル-P-Glcは、dol誘導体のK_m値より低いことを示した。Jeffrey Rush(Univ. Kentucky Coll. Med., Lexington, KY)は、基質特異性の項目を拡張し、α-Man-P-dolよりβ-Man-P-dolを好むこと、Manが最初につくイソプレニユニットが飽和してはいなくてはならず、19のイソペンが最適であることを含めるようにした。

ネズミのGlcNAc-1-P転移酵素(GPT)の遺伝子の詳細がB. Rajput (Univ. Maryland, College Park, MD)によって述べられた。GPTの遺伝子は7 kbで9つエクソンをから成っていた。

G. セッションVII---細胞と微生物の接着の際の分子レベルでの出来事

E. Rozdzinski(Rockefeller Univ., Rochester, NY)は、バクテリアがヒトの繊毛やマクロファージ上の糖に接着する際にBordetella pertussis toxin(PT)をadhesinとして用いることを報告した。PTの糖結合ドメインはタンパク質のS2とS3サブユニットに局在している。S2とS3は、原核細胞で初めて見出された真核細胞のCタイプレクチンの共通配列を持っている、タンパク質である。配列の相同性は、白血球の循環に関与しているレクチンファミリーである、セレクトインが最も高かった。PTのS2とS3領域間のセレクトインとの構造的類似性は、機能アッセイによって確立された。このアッセイは、*in vitro*で内皮細胞に対する好中球の接着というものも含まれている。S2やS3、セレクトインの機能領域と推定される領域のペプチドは、細胞のセレクトインと競合し、好中球の内皮細胞への接着を阻害した。これより、pertussis toxinはセレクトインの構造や機能と相同性の高い領域を含んでいることがわかった。

A. Varki(Univ. California, San Diego, CA)は、接着分子の認識におけるシアル酸(SA)の役割に関する最近の知見に関して述べた。CD22βレクチンは、N-結合型糖鎖上のSA-α-2,6-ラクトサミンユニットを含むリンパ球タンパク質に特異的に結合し、SA側鎖の脱落により結合しなくなる。P-セレクトインは120 kDa ミエロイド糖タンパク質に結合するが、SAユニットの脱落によってもこの結合が失われぬ。高い親和性結合は、O-結合型糖鎖が集まっているタンパク質を消化する、O-シアログリコプロテアーゼの作用で失われる。L-セレクトインは、50 kDaのリンパ節のシアル化と硫酸化されたリガンドを認識する。面白いことに、限定過ヨード酸化(その結果、SAのC8-9が失われる)は、結合の増強を引き起こした。これはアルデヒド基とリジングループの間の相互作用によるものである。最後に、新しいL-セレクトインのリガンドが非リンパ系の内皮細胞にあることが報告された。

T. Yoshida (Johns Hopkins Univ., Baltimore, MD) presented some results of inhibition of binding of iodo-labelled fucoidan to L-selectin-Fc chimera by various sulfated glycans. It appears sulfated glycans can inhibit this binding without the presence of Fuc, Gal, or GlcNAc in the molecule. The efficacy of inhibition is related to molecular size and the sulfate density.

A. Stone (NIH, Bethesda, MD) reported that a heparin substitute, a chemically sulfated plant xylan, inhibited infectivity of the human HIV-1 virus *in vitro*. The sulfated polymer was fractionated according to size, and 17 fractions (components, Cp) were obtained, ranging from <2,000 to 30,000 apparent molecular weight (MW_{app}). Two assays were used, cytotoxicity induced by HIV-1, and syncytium formation. The most potent toxicity inhibitors were exhibited by two fractions, $MW_{app} > 5,000$ and one of low molecular weight, 8-10 residues. Only the high molecular weight fraction was a potent inhibitor of cell fusion.

H. Session VIII --- Immunomodulation

Laurence Tabak (Univ. Rochester, Rochester, NY) discussed the potential protective functions of salivary mucins. He presented that mucin-glycoproteins can form complexes with secreted IgA, protease inhibitor, albumin, and/or lipid to produce macromolecular coats on mucosal surfaces. Various microbes which are known to possess lectin-like adhesion molecules interact with oral mucin through carbohydrate structures, and binding was virtually inhibited by sialyl-Gal β -Gal. He also suggested a possible motif for complement binding of mucin.

Tony Corfield (Bristol Infirmary, Bristol, GB) discussed more novel aspects of mucins. He found a significant amount of mucin molecules in serum, and interestingly they could be recognized by cytotoxic lymphocytes in an MHC-unrestricted manner. He speculates that mucin may play an inherent role in immunomodulation. Moreover, the epitopes on mucins can be transformed in the cancerous state and may serve therapeutic and diagnostic potentials.

Richard Smith (Alberta Research Council, Alberta, Canada) presented therapeutic applications of sialyl Le^x oligosaccharides against delayed-type hypersensitivity reaction *in vivo*. It was significantly effective for inflammation when injected early enough. He also claimed its effects on long term memory. Although he discussed the possible involvement of suppressor T cell activity, cell-transfer experiments did not support his speculation.

Channe Gowda (Georgetown Univ., Washington, D.C.) showed that cobra venom factor can initiate complement activation by binding factor B. The venom protein, however, possesses Gal α 3Gal structure and should be recognized by human natural serum antibody. It is argued that the carbohydrate molecule faces away from the complement binding site of the gly-

T. Yoshida (Johns Hopkins Univ., Baltimore, MD) は、ヨード標識されたフコイダンのL-セレクトリン-Fc キメラへの結合を種々の硫酸化されたグリカンで阻害をした結果を発表した。これによるとFuc、Gal、GlcNAcが分子内になくてもこの結合は硫酸化グリカンで阻害された。この阻害の効果は、分子の大きさと硫酸の密度に相関していることがわかった。

A. Stone (NIH, Bethesda, MD) は、植物キシランを化学的に硫酸化したヘパリンの類似体が *in vitro* でヒト HIV-1 のウイルスの感染を阻害することを報告した。硫酸化されたポリマーを、大きさによって分画し、おおよその分子量 (MW_{app}) で <2,000 から 30,000 までの間で 17 画分が得られた。HIV-1 による細胞傷害活性と細胞の融合の形成といった、2 つのアッセイ系が用いられた。最も細胞傷害活性を阻害したのは、 MW_{app} が >5,000 の画分と 8-10 残基の低分子量の画分の 2 つの画分であった。高分子量画分のみが細胞融合の阻害剤であった。

H. セッション VIII --- 免疫系の調整

Laurence Tabak (Univ. Rochester, Rochester, NY) は、唾液ムチンの防御機構の可能性に関して議論をした。彼によると、ムチン糖タンパク質は分泌型 IgA やプロテアーゼ阻害物質、アルブミン、場合によっては脂質と複合体を形成し、粘膜表面上の巨大分子のコートを形成する。レクチン様接着分子を持つとされる種々の微生物は、口腔ムチンと糖鎖構造を介して相互作用し、この結合はシアリル-Gal β -Gal で実際に阻害された。彼はまた、ムチン上の補体が結合しうるモチーフを示した。

Tony Corfield (Bristol Infirmary, Bristol, GB) は、ムチンの新しい観点を議論した。彼は血清中に多くのムチン分子があり、興味深いことにこれが細胞障害性細胞によって MHC 非依的な方法で認識されていることを見出した。彼はムチンは本質的に免疫系の調整に関与していると推測している。さらにムチンのエピトープは癌状態で変化し、これは治療や診断に使うことができるかも知れない。

Richard Smith (Alberta Research Council, Alberta, Canada) は、*in vivo* での遅延型過敏症に対してシアリルルイス X オリゴ糖の治療応用についての発表を行なった。これは、炎症のごく初期に十分に投与すればかなり有効であった。また長期にわたる免疫記憶に関してもその効果を強調した。サプレッサー T 細胞活性の関与の可能性を議論していたが、細胞を移植する実験ではこの仮定を支持できなかった。

Channe Gowda (Georgetown Univ., Washington, D.C.) は、コブラ蛇毒の因子がファクター B に結合することによって、補体の活性化を引き起こすことを紹介した。しかし、蛇毒中のタンパク質は Gal α 3Gal 構造を持っており、ヒトの自然血清抗体で認識されてしまう。ここでは、糖分子が糖タンパク質の補体結合部

coprotein.

Carl Hellerqvist (Vanderbilt Univ., Nashville, TN) presented a fascinating story on a *Streptococcus* toxin. *Streptococcus* has been known as a seriously hazardous pathogen in newborn infants, but only in newborn infants. The toxin is apparently recognized only by a receptor which is present in early development. The *Streptococcus* toxin (carbohydrate in nature) binds to lung capillary endothelium and cause inflammatory responses. The astonishing point was that human lung cancer cells behaved similarly. After inoculation of these cells in nude mice, the toxin was found to bind to the growing capillary endothelium within the tumor, leading to destruction of the tumor by inflammatory reactions. It is hypothesized that the fetal phenotype is expressed on the endothelial cells in tumors.

I. Miscellaneous

The annual Genzyme Award for an excellent graduate student's thesis work was awarded to Peter Smith (under the tutelage of Prof. J. Baenziger) of the Washington University. The award was on the studies of GalNAc transferase of glyco hormones of pituitary origin. Unfortunately the 15 min-presentation was after the meeting banquet. A longer presentation given prior to the banquet would have allowed him to do justice to this excellent work.

Two important proposals have come from the Executive Board, which met daily during the meeting. The first is a suggestion for changing the name of "Society for Complex Carbohydrates" to either "Society for Glycobiology" or "Society for Glycosciences." The proposal will be voted by the general membership by mail, and "write-in" nomination can be accepted. The name "Glycobiology" may not sit well with more chemically oriented members, but it does have a higher degree of recognition in other branches of sciences.

The second is a proposal to affiliate the Society with the journal, "Glycobiology" published by Oxford University Press. This will also be voted by the general membership. The affiliation with a journal is regarded to be mutually beneficial. The Society members can subscribe to the Journal at a substantially reduced price, and the journal is expected to expand their subscription. With the Society membership reaching 800, the work loads of the secretary and the treasurer have grown so that it is becoming unmanageable, and inimical to our elected officers.

Acknowledgment

Dr. Carl Hellerqvist deserves a hearty congratulation for this very successful meeting. His effort and the help from his family members are greatly appreciated.

と離れていると結論した。

Carl Hellerqvist (Vanderbilt Univ., Nashville, TN) は *Streptococcus* 毒に関する興味深い話を行なった。*Streptococcus* は、新生児だけに非常に危険な病原体として知られている。この毒素は明らかに初期の発生で発現するレセプターのみに認識される。*Streptococcus* 毒素(糖の性質を持っている)は、肺の毛細血管内皮細胞に結合し、炎症反応を引き起こす。驚くべき点はヒトの肺ガンも同様に振舞ったということである。ヌードマウスでこれらの細胞を注入後、この毒素は腫瘍の中で成長している毛細血管内皮細胞に結合して炎症反応によって腫瘍を破壊していた。胎児のフェノタイプが腫瘍の中の内皮細胞で発現しているという仮説が提出された。

1. その他

優秀な大学院生のドクター論文に対して贈られる本年度の Genzyme 賞は、ワシントン大学の Peter Smith (J. Baenziger 教授指導) に贈られた。この賞は、下垂体由来糖ホルモンの GalNAc 転移酵素の研究に対してのものであった。不幸なことに、15 分間の講演は学会バンケット後であった。バンケット前に長時間の発表ができれば、このすばらしい仕事の真評価が発揮できたであろうに、残念である。

役員会から 2 つ重要な提案がなされた。一つは "Society for Complex Carbohydrates" の名前を、"Society for Glycobiology" か "Society for Glycoscience" に変えようという提案であった。この提案は、一般会員による手紙の投票にかけられ "書き込み投票" が受理される。"Glycobiology" という名前は、化学を基礎としている会員にはしっくりこないが、他の科学分野の人には理解しやすい。

二つ目の提案は、学会をオックスフォード大学出版会の雑誌、"Glycobiology" と提携するというものであった。これも一般会員による投票で行われることとなった。この雑誌との提携は有益であると考えられる。学会会員はこの雑誌を相当安価で購読できるし、雑誌側は購読数を増すことが期待される。学会の会員が 800 人に達している現状では、役員と会計の仕事の負担が手に負えない程大きくなって、事務処理ができなくなり、選任された役員にとっても不都合なものとなったためである。

東京大学・薬学部・生体異物免疫化学教室
水落 茂樹 訳