

酸性糖鎖ポリシアル酸の新機能の発見とその応用展開



名古屋大学生物機能開発利用研究センター 佐藤 ちひろ

はじめに

糖鎖はタンパク質、核酸に次ぐ第3の生命鎖といわれており、その構造と機能を解明することは生命を理解する上で必須な課題である。特に細胞表面では、細胞膜や細胞外に存在するタンパク質のほぼ全てが糖鎖修飾を受けており、その結果100-200 nm程度の厚いGlycocalyx (糖衣)により覆われている。従って糖鎖は細胞の顔として細胞外とのコミュニケーションに深く関わる重要な生体高分子と位置づけられている。このような外界に向かって最先端に存在する糖鎖の最末端構造(非還元末端)は、糖の中でも特に特徴的な酸性9炭糖、シアル酸によりキャップされている。このシアル酸は外界からの変化を最先端で鋭敏に受けとり変化させることができる機能性糖残基であり古くから注目されて研究されてきている。これまでに受精・発生・分化・免疫・脳機能・疾患など多岐にわたる生物学的現象において重要な役割を担っていることが明らかにされている。また、ウイルスが細胞に進入する際の足場としても用いられており、細胞表面のシアル酸を制御することは医薬・食品開発において重要な課題であり、ターゲット分子として注目されている。シアル酸は通常、1残基が1本の糖鎖の最外部(非還元末端)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(polySia, PSA)構造として存在する場合がある。polySiaはその発現のほとんどが胎児脳および癌細胞であったことから、癌胎児性抗原として古くから注目され、特にpolySia修飾をうけた神経細胞接着分子(NCAM)(polySia-NCAM)を中心に世界的に研究が進んでいる。これまでにNCAM上のpolySia構造は、そのほとんどが胎児脳に一過的な発現をすること、成体脳では神経の可塑性が保たれている領域、海馬や嗅球などに偏在していること、その巨大な排除体積によって接着分子の接着能を負に制御し、細胞間相互作用を抑えるような反発性の空間を提示することにより、脳の正常な発達を促し、学習・記憶、行動、体内時計の正常な維持に関わると考えられて来た。しかし、以下の我々自身の4つの研究成果から、シアル酸重合体(di/oligo/polySia)構造の超多様性と新機能が明らかになりつつあり、polySia鎖が及ぼす機能の底流となる分子メカニズムを再度検証する必要性に迫られている。またその新機能に基づく応用研究も展開中である。

1. ポリシアル酸鎖の構造多様性の発見

ポリシアル酸が豊富に含まれる海産動物卵サンプルを用い、化学的、生化学的、免疫化学的手法を組み合わせた詳細な構造解析を行い、polySiaが構成シアル酸、重合度、結合位によって多様な構造を呈することを明らかにし、これまで均一な構造と考えられてきたpolySia鎖が「構造超多様性」を持つことを世界で初めて証明した¹⁻³⁾。

2. シアル酸重合体の検出法の開発をもとにした、ジ・オリゴ・ポリシアル酸鎖の普遍的存在証明

次に、哺乳動物に目を向け、これまでpolySiaの構造多様性が見出されていない現状に疑念を抱き、その理由は「微量検出方法がなかったに過ぎない」と考え、この考えを証明するために、シアル酸重合体構造を微量で検出できる化学的方法⁴⁻⁵⁾と特異的抗体と特異的な酵素を合わせて用いる免疫化学的手法^{2,3,6)}を世界で初めて開発した。それらの方法を用いて、哺乳動物の種々の臓器や細胞においてdi/oligo/polySia構造を検索し、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を初めて明らかにした^{2,3,7,8)}。これらの一連の研究によって「ポリシアル酸の構造多様性は様々な動物種において普遍的に存在する」ことを証明した^{2,3)}。また、このdi/oligo/polySiaによる修飾が、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も明らかにしてきた。新たにdi/oligoSia構造の存在と機能的重要性が明らかになったことによって、現在、「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」という糖タンパク質機能調節メカニズムの提唱に至っている⁹⁾。

3. ポリシアル酸の新機能の発見

polySia鎖含有糖タンパク質の探索過程で、脳内ミクログリア細胞の細胞表面にpolySia-NCAMを発見し、そのpolySia構造が炎症刺激後素早く消失する現象を発見した¹⁰⁾。この素早いpolySia鎖の消失の原因は、炎症刺激に伴い放出されるエキソソーム上のシアリダーゼであること、このシアリダーゼがNeulであること、中性領域で働き、ラフトを介して放出されることなどを明らかにした。またミクログリアの神経細胞保護機能を鑑み、polySia鎖が神経栄養因子など様々な神経作用因子を保持し制御する新機能を持つことを仮定し、polySia構造が神経系細胞表面にあって様々な神経作用因子を保持する微小糖鎖空間を作り出すこと、その空間は脳内環境の変化によって形成・消失し、その変化に応じた神経作用因子の提示が実現されるという「Retain and Release仮説」を提唱するに至った³⁾。この仮説を証明するために、これまで神経作用因子の中でpolySiaに保持される神経作用因子を探索し、脳由来神経栄養因子(BDNF)などのニューロトロフィン類¹¹⁻¹⁵⁾、増殖因子(FGF-2)¹³⁻¹⁶⁾、カテコールアミン系神経伝達物質(ドーパミン(DA))¹³⁾などのいずれも脳機能に深く関わる液性因子を同定してきている。これらの液性因子とpolySia-NCAM上のpolySia鎖の分子間力を表面プラズモン共鳴法(SPR)やフロンタルアフィニティークロマトグラフィーなどの手法を用いて解析する技術を開発した^{3,15,17)}。それらの方法によって、これらの因子はpolySiaの重合度特異的に結合していること、polySiaは親和的な空間を形成しており、神経作用因子とその受容体との相互作用が関わるシグナル伝達を、既知のヘパラン硫酸鎖のよう

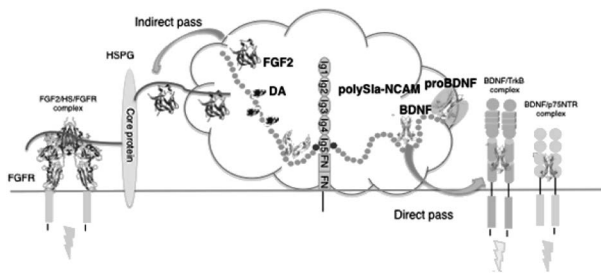


図1 Retain and Releasing mechanism of polySia-NCAM

なグリコサミノグリカン鎖とは異なる機構で制御していることを世界で始めて示した³⁾。さらに polySia 鎖からの分子の放出メカニズムに関してはエキソソーム上のシアリダーゼによる polySia 鎖の分解によるものだけでなく¹⁰⁾、FGF2 の場合は、FGFR に受け渡す前にヘパラン硫酸に受け渡し機構があること¹⁶⁾、native な FGF2 構造特異的に結合することでプロテアーゼ消化から分子を保護する機構があることを明らかにした¹⁵⁾。BDNF の場合は TrkB や p75NTR が polySia 鎖に近づくことによって、アフィニティーの違いで分子を放出すること¹²⁾、前駆体物質である proBDNF の plasmin によるプロセッシング機構に参与する¹⁵⁾ 可能性を提唱した。

4. 精神疾患とポリシアル酸鎖の関連性の証明

polySia 鎖における retain and release 機能を鑑み(図1)、この polySia 鎖が醸し出す空間はきわめて厳密に制御され、この空間の不全が疾患を導くという仮説を立て^{3,18)}、その仮説を証明するために精神疾患に着目してきた。近年、ゲノムワイドな研究からポリシアル酸を生成する酵素 ST8SIA2 遺伝子の一塩基多型 (SNPs) が精神疾患、特に統合失調症、双極性障害、自閉症と関連性があることが示唆されている^{3,18,19)}。しかしこれまでの研究は、ゲノム配列と疾患の統計学的な関連性の報告しかなく、生化学的な解析は全く手つかずであった。そこで、統合失調症患者で見つかったアミノ酸置換を伴う変異 (cSNP) と伴わない変異 (sSNP)¹³⁻¹⁵⁾、双極性障害患者および自閉症での関連性が示唆されるイントロン領域の変異 (iSNP)²⁰⁾、日本人と中国人の統合失調症患者で示唆される制御領域の rSNP に着目して、その酵素発現および反応産物の構造及び分子結合性に対する機能解析を詳細に行ってきた。その結果、いずれの疾患に関わる SNPs も、酵素の発現量および反応産物の機能が損われる事が明らかになり、polySia 鎖の破綻が疾患の原因の一端を担う可能性を示すことができた。

おわりに

これまで polySia 鎖は、重合度や構成シアル酸に対する特異性も不明な抗 polySia 抗体で認識される構造として定義され、その全ての機能は polySia 鎖の反接着作用に起因すると解釈されてきた。しかし、一連の研究によって、polySia 鎖には構造超多様性が存在し、特定の分子に特異的に結合することによって、その分子機能を制御する多分子制御糖鎖であることを明らかにしてきた。加えて、そのユニークな酸性多糖が提示する反

発性の場と分子誘因性の場は遺伝的に厳密に制御され、その破綻は疾患を引き起こす可能性があることを示してきた。特に成体脳において polySia 鎖は可塑的な領域に発現する神経新生マーカーであり、その発現は記憶や脳機能に関わることが明らかにされている。現在は、これまでの知見と技術を総動員して、食品や医薬品の摂取等における polySia 鎖の発現制御を評価し、それらの生体での有用性の検証を行うことで、食や健康を関連づけつつ社会還元することを目指している。

(引用文献)

- 1) Sato C, *et al. J. Biol. Chem.* 268, 23675-23684 (1993).
- 2) Sato C, *et al. J. Biol. Chem.* 275, 15422-15431 (2000).
- 3) Sato C, and Kitajima K. *J. Biochem.* 154, 115-136 (2013).
- 4) Sato C, *et al. J. Biol. Chem.* 273, 2575-2582 (1998).
- 5) Sato C, *et al. Anal. Biochem.* 267, 102-109 (1999).
- 6) Sato C, *et al. J. Biol. Chem.* 270, 18923-18928 (1995).
- 7) Sato C, *et al. J. Biol. Chem.* 273, 2575-2582 (1998).
- 8) Inoko E, *et al.* and Sato C. *Glycobiology* 20, 916-928 (2010).
- 9) Sato C. *Trends Glycosci. Glycotech.* 16, 331-344 (2004).
- 10) Sumida M, *et al.* and Sato C. *J. Biol. Chem.* 290, 13202-13214 (2015).
- 11) Kanato Y, Kitajima K and Sato C. *Glycobiology* 12, 1044-1053 (2008).
- 12) Kanato Y, *et al.* and Sato C. *Biosci. Biotech. Biochem.* 73, 2735-2741 (2009).
- 13) Isomura R, *et al.* and Sato C. *J. Biol. Chem.* 286, 21535-21545 (2011).
- 14) Hane M, *et al.* and Sato C. *Pure Appl. Chem.* 84, 1895-1906 (2012).
- 15) Hane M, *et al.* and Sato C. *Glycobiology* 10, 1112-1124 (2015).
- 16) Ono S, *et al.* and Sato C. *J. Biol. Chem.* 287, 3710-3722 (2012).
- 17) Sato C *et al. Methods in Enzymology* (Minoru Fukuda ed. in glycomics) Elsevier Science, 478, pp. 219-232 (2010).
- 18) Sato C and Kitajima K. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 61(1-11) (2013).
- 19) Sato C, Hane M and Kitajima K. *Biochim. Biophys. Acta.* 1860, 1739-1752 (2016).
- 20) Hane M, Kitajima K and Sato C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 1123-1129 (2016).

謝 辞 学生時代から現在に至るまで、一般常識では計り知れない生活と見えているであろう私の研究(大学)生活を暖かく見守ってくれた両親に深く感謝します。また研究を共に行ってきた名古屋大学生物機能開発利用研究センター動物細胞機能研究分野に所属した全ての方々に感謝いたします。研究を継続することを可能にしてくれた名古屋大学大学院生命農学研究科松田幹先生をはじめとする応用生命化学講座の先生方、生物機能開発利用研究センターの先生方に感謝いたします。Frederick Troy教授、Jürgen Roth教授、Karen Colley教授、Ajit Varki教授、Yann Gérardel博士には様々な点でお世話になりました。最後になりましたが名古屋大学生物機能開発利用研究センター・北島健教授には研究全般に対してご指導・ご支援、そしてなによりも時代がとりまく様々な事象について深い理解を示していただきました。この場をかりて感謝いたします。