

細胞内で糖鎖はどのように合成されるのか?

How are carbohydrate chains synthesized in vivo?

成松 久 (Hisashi Narimatsu)

分子細胞工学研究部門

Institute of Molecular and Cell Biology

Abstract

Very recently, the human genome project announced that the number of genes found in a human genome is approximately 32,000 that is only twice the number of *Drosophila melanogaster*. Does a man possess only two-fold gene products than a fly? The number of proteins, direct gene-products, must be around 32,000 in human, however almost all proteins are processed by posttranslational modification. Actual functional molecules are not proteins. They are glycoproteins having complex structures of carbohydrate chains. A glycoprotein is not a product by a single gene. Carbohydrate chains on glycoproteins and glycolipids are biosynthesized by stepwise reaction of multiple glycosyltransferases. Golgi apparatus is a factory assembling sugar parts on protein or lipid core, and completing the complex structures of glycoproteins and glycolipids. In a cell, more than 100 glycosyltransferases are localized in Golgi membranes, and involved in the harmonious synthesis of carbohydrate chains. In this sense, a single glycoprotein is a product by cooperative function of multiple genes. Combination of multiple genes must give rise to increase in the number of functional molecules.

1.はじめに

生体のタンパク質、脂質の多くが糖タンパク質、糖脂質として存在する。糖鎖を持つ生体内高分子を複合糖質と総称する。ヒトの遺伝子の塩基配列がほとんど解読された。遺伝子は、DNAからRNAに転写され、メッセンジャーRNAはさらに翻訳されてタンパク質になる。予想をかなり下まわり、ヒトは3万2千種類の遺伝子しか持たないことが発表された。これはショウジョウバエのわずか2倍の数である。1遺伝子-1産物の概念で考えると、ヒトはハエよりわずか2倍の遺伝子産物しか産生しないことになる。果たしてハエのわずか2倍の遺伝子産物でハエとヒトの機能の違いを説明できるのだろうか? 3万2千種類のタンパク質でヒトのすべての生理機能を説明できるのだろうか? 否である。なぜなら生理機能を持つには、タンパク質はさらに翻訳後修飾を受けなければならない。

2.細胞内での糖鎖修飾はゴルジ装置で行われる

2つの代表的な翻訳後修飾は、リン酸化と糖鎖修

飾である。それでは高等生物細胞での糖鎖修飾はどのようにしてなされるのであろうか。図1にあるように、粗面小胞体(endoplasmic reticulum; ER)で合成されたタンパク質は、ドリコール中間体として合成されたN-グリカン前駆体を、まとめて転移される。その後、ゴルジ装置に運ばれ、ここを輸送される間に糖鎖が伸長される。ゴルジ装置は、細胞核に近い方から細胞膜近くに至るまで、何層もの重層構造になっている。核に近い方から、シスゴルジ、メディアルゴルジ、トランスゴルジ、トランスゴルジ・ネットワークとよばれる。便宜上、4つの名称に分けられているが、実際は4層ではなく、もっと多くの多重層からなっている。シスからトランスゴルジネットワークに至る多重膜層に各種の糖転移酵素が局在する。この酵素群が、1つ1つ糖を転移して糖鎖を伸ばしていく。糖鎖の根幹部を合成する糖転移酵素はシスゴルジに局在し、中間部を合成する酵素はメディアルゴルジ、末端部を合成する酵素はトランスゴルジ、およびトランスゴルジネットワークに局在している。このようにタンパク質は、ゴルジ装置を通過してい

表1 糖タンパク質の糖鎖部分の生体内での機能

- 1) 親水性を与える。
- 2) タンパク分解酵素から保護する。
- 3) レクチンと結合する。
- 4) 糖タンパク質の細胞内局在と輸送場所の決定。
- 5) 糖タンパク質が代謝される際、それを決定している。
- 6) 外来微生物の受容体となっている。
- 7) 細胞間相互作用に深く関係。
- 8) ホルモンや増殖因子の受容体機能。

3. 糖鎖の機能

糖鎖が付加された糖タンパク質はどのような性質を持つようになるのか？表1にまとめたように、

1) 糖は多くの水酸基を持つ。したがって糖鎖を持つことにより、水溶性が増す。血中に溶け込んでいるほとんどすべての血清タンパク質は糖タンパク質である。また細胞表面の膜タンパク質も糖タンパク質である。さらに核内の核タンパク質も糖鎖修飾を受けていることが知られる。このようにほとんどすべてのタンパク質は糖鎖による修飾を受けている。

2) 糖鎖は、タンパク分解酵素(プロテアーゼ)からタンパク質を保護する。糖鎖に被覆されたタンパク質はプロテアーゼにより分解されにくくなる。

3) 体内には、レクチンと総称される多くの種類の糖結合タンパク質がある。レクチンは、糖タンパク質や糖脂質の糖鎖部分に結合し、様々な機能を発揮する。

4) 糖鎖構造により、糖タンパク質の細胞内での局在場所が決められている。例えば、細胞内小器官であるリソゾームに輸送される糖タンパク質は特殊な糖鎖構造を持っており、受容体に認識されてリソゾームへ到達する。

5) 糖タンパク質の糖鎖部分の変化することにより、糖タンパク質の代謝が調節されている。

6) 外来微生物の受容体となる。例えば、胃腸管内に常在する細菌叢は菌体外壁の線毛が、胃腸管上皮の糖鎖に結合することにより胃腸管内に常在する。常在菌のみならず病原細菌やウイルスの多くが、糖鎖に結合して体内に侵入することが知られている。

7) 細胞と細胞の接着にも糖鎖が深く関与している。炎症時の白血球が血管内皮細胞と接着したり、癌細胞の転移時にも糖鎖を介して血管内皮細胞と接着することが知られている。

8) ホルモンや増殖因子の受容体も糖タンパク質である。それらが受容体に結合する時に、糖鎖部分が結合に大きく関与することがわかりかけてきた。

以上のように糖鎖が付加されないと、タンパク質は体内での生理的機能を十分に発揮できない。ヒトの遺伝子を大腸菌で発現させても糖鎖は付加されない。したがって天然の生理機能を発揮できないことがしばしばである。

4. 複合糖質の種類

複合糖質には、糖タンパク質と糖脂質がある。糖タンパク質の糖鎖は、N-グリカン、O-グリカン、グリコサミノグリカン(GAG)の3つに大別される。高等生物が持つ単糖の種類は、9種類である。本文では、マンノース;Man、グルコース;Glc、ガラクトース;Gal、キシロース;Xyl、グルクロン酸;GlcA、N-アセチルグルコサミン;GlcNAc、N-アセチルガラクトサミン;GalNAc、フコース;Fuc、シアル酸;SAと略語で表してある。

N-グリカンは、-Asn-X-Thr or Ser- (XはPro以外)の配列を持つペプチドのAsnにN-結合型で糖鎖が転移される。N-グリカンの合成経路は生化学的によく解析され成書に詳述されている。

O-グリカンは、ThrやSer残基に、O-結合で最初の糖が転移される。O-グリカンの最初の糖はGalNAcの場合が最も多く、ついでMan、Fuc、GlcNAcなどがある。最初の糖の後に次から次へと糖が転移され、O-グリカン糖鎖が伸長していく。最初にGalNAcが転移されたO-グリカンのコア構造は、8種類が知られ、番号が付けられている(コア1からコア8まで;図4参照)。このコア構造を元にしてさらに複雑な構造の糖鎖が伸長していく。

プロテオグリカンは、コアタンパクに多本数のき

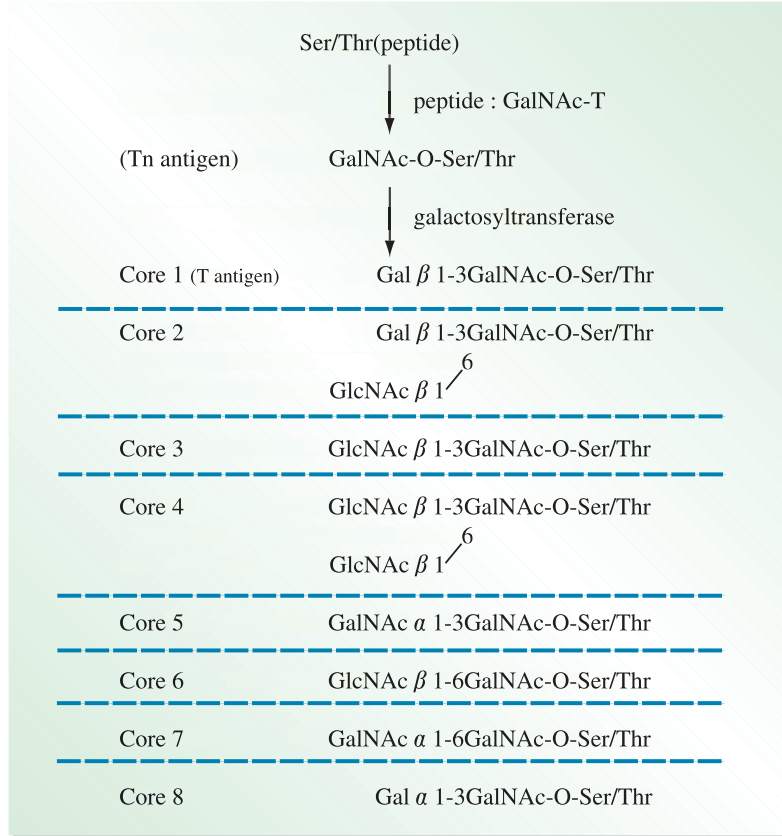


図4 GalNAcが最初に転移されるO-グリカンの8種類のコア部分の構造

わめて長い糖鎖が付加されている。そのアミノ糖 (GlcNAcやGalNAc) を持つ糖鎖部分をグリコサミノグリカン (GAG) と呼ぶ。GAGの特徴は、2糖が1単位となって、その繰り返し構造により、きわめて長い糖鎖となる。その糖鎖がさらに硫酸基により修飾されるのが特徴である。種々のホルモンや増殖因子がGAGと結合していることが、最近次々と発見され大きな話題となっている。長い糖鎖の根幹部は特殊なコアタンパク質に結合している。図5にあるように、

ヘパリンやヘパラン硫酸の糖鎖は、GlcAとGlcNAc、の2糖単位 (-4GlcA β 1-4GlcNAc α 1-) の繰り返しである。コンドロイチン硫酸やデルマタン硫酸は (-4GlcA β 1-3GalNAc β 1-)、ケラタン硫酸は (-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-)、ヒアルロン酸は (-4GlcA β 1-3GlcNAc β 1-) の繰り返しである。前2者のコアタンパク質との結合部分(リンケージ部分)の4糖の糖鎖構造は共通している (GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl-O-Ser)。

プロテオグリカン

コアタンパク質 + グリコサミノグリカン (GAG)

グリコサミノグリカン (GAG) の骨格構造

- ★ヘパリン、ヘパラン硫酸 (-4GlcA β 1-4GlcNAc α 1-) n4-GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl-O-Ser
- ★コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸 (-4GlcA β 1-3GalNAc β 1-) n4-GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl-O-Ser
- ★ケラタン硫酸 (-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-) n-R R:ムチン型コア、アスパラギン結合型
- ★ヒアルロン酸 (-4GlcA β 1-3GlcNAc β 1-) n

図5 プロテオグリカンの種類とその糖鎖構造

表 2 糖鎖構造の特徴

- 1) 細胞分化、癌化に伴い劇的に変化する。
- 2) 初期発生時には糖鎖構造は劇的に変化する。
- 3) 組織により糖鎖構造は異なり、組織特異的な構造がある。
- 4) 個体間で異なる構造がある。
(代表例；ABO式、ルイス式等の血液型)
- 5) 種に特異的な構造がある。異種移植の際の急性拒絶抗原となる。

5. 糖鎖構造の特徴

糖鎖構造は表 2 にまとめたような特徴がある。

1) 細胞分化や癌化により糖鎖構造は激変する。たとえば白血球の分化マーカーである CD 抗原のあるものは糖鎖抗原である(例、CD15やCD57)。医療の臨床現場で癌の診断に使用されている腫瘍マーカーの多くは、癌化により変化した糖鎖構造を認識するモノクロナール抗体である。CA19-9、sTnなどと呼ばれる腫瘍マーカーがある。

2) 初期胚は時々刻々と分化発生するが、その表面糖鎖抗原もそれに伴い変化する。発生段階特異的胚抗原(stage-specific embryonal antigen; SSEA)と名付けられた抗原は、SSEA-1、SSEA-2、SSEA-3のように番号が付けられているが、糖鎖抗原のものが多く。

3) 組織により糖鎖構造は特徴がある。

4) 個体間で異なる抗原構造をアロ抗原という。その代表的なものに赤血球型抗原があるが、そのうちの ABO 式、ルイス式、P 式、Ii 式などの血液型は糖鎖抗原である。赤血球型は輸血の際はもちろん、臓器移植の際にも大きな問題となる。

5) 異種間で異なる糖鎖構造がある。異種間臓器移植の際、最も問題になるのは糖鎖抗原の違いである。例えば、 α -Gal エピトープは、類人猿以上の高等生物には存在しない。したがって、異種移植によく使われるブタ臓器をヒトに移植する際、ヒトには α -Gal エピトープに対する自然抗体が大量に存在しており、臓器片を急性に拒絶する。

表 2 の糖鎖抗原の特徴は、糖転移酵素の遺伝子レベルで次のように説明できる。表 2 の 1)、2)、3) は、糖転移酵素遺伝子の発現が、分化、癌化、初期発生、組織に特異的に発現制御されていることにより、それぞれに特異的な糖鎖抗原が発現する。4) は、糖鎖抗原を合成する糖転移酵素遺伝子に個体間で遺伝的に多型性があり、酵素が遺伝的に失活しているか基質特異性が変化しているか、で説明できる。したがって個体

の体細胞全部に酵素の遺伝的欠損がある。赤血球型は、赤血球表面だけの糖鎖構造が変化しているのではなく、体全体の体細胞でも赤血球型と同じ糖鎖構造となっている。5) 生物の進化とともに、偽遺伝子となってしまう糖転移酵素遺伝子がある。 α -Gal エピトープを合成する α -Gal 転移酵素の遺伝子は、類人猿以上ではすでに偽遺伝子となってしまう。したがって α -Gal エピトープを合成できないが、常在菌に α -Gal エピトープをもつものがあるため、すでに多量の自然抗体ができあがっている。

6. 血液型糖鎖抗原

最後に誰でも知っている身近な ABO 式血液型について。個体間で異なる赤血球表面の抗原を赤血球型と言う。ABO 式以外にも 30 種類くらいの血液型がヒトには発見されている。そのうち、ABO 式、ルイス式、P 式、Ii 式などは糖鎖部分がエピトープとなる糖鎖抗原血液型である。Rh 式や MN 式は糖鎖ではなく、タンパク質部分がエピトープとなる抗原である。1900 年にウィーン大学の Landsteiner 博士が ABO 式血液型の存在を発見しノーベル賞を受賞した。90 年後の 1990 年になって米国シアトルの箱守仙一郎博士らが ABO 式血液型を決定する糖転移酵素遺伝子を発見し、Nature 誌に発表した。我々、成松グループは 1994 年にルイス式血液型を決定する糖転移酵素遺伝子を同定し、遺伝学的に証明した。

図 6 に ABO 式血液型の合成経路を示す。Gal-GlcNAc-R の Gal に α 1-2 結合で Fuc が転移されると H 構造となる。H 構造は ABO 式の O 型抗原である。O 型抗原は、A 型と B 型の前駆体構造である。O 型抗原に α 1-3 結合で GalNAc が転移されると A 型抗原となり、一方、Gal が転移されると B 型抗原となる。A 遺伝子は α 1-3GalNAc 転移酵素遺伝子であり B 遺伝子は α 1-3Gal 転移酵素遺伝子である。 α 1-2 結合で Fuc を転移する酵素 (α 1-2Fuc 転移酵素) つまり O 型合成酵

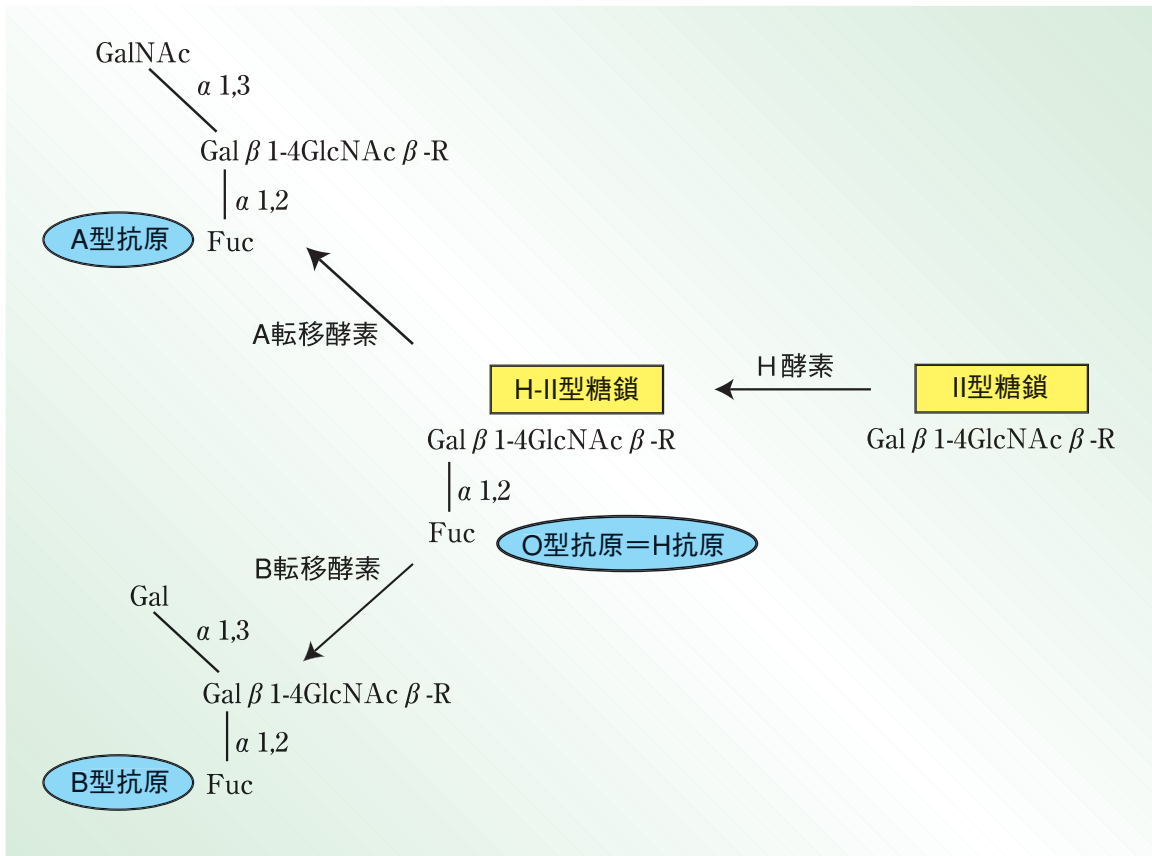


図6 ABO式血液型の合成経路図

素は、ヒトでは2種類あり、ともにO型抗原を合成する。それぞれH酵素(FUT1)、Se酵素(FUT2)と名付けられており、その遺伝子はともに19番染色体にある。H酵素は、赤血球を含む体中のあちこちの組織に発現している。Se酵素は、赤血球には発現していないが、唾液腺上皮を含む主に消化管上皮に発現している。H酵素は赤血球を含む体中あちこちのO型抗原を合成し、Se酵素は唾液腺や消化管から分泌される糖タンパク質のO型抗原を合成している。H酵素を遺伝的に欠損するヒトが30万人に1人の低頻度で存在し(ボンベイ型と呼ばれる)、赤血球上にO型抗原すら存在しない。もちろん前駆体がないからA型もB型抗原もない。このような珍しい血液型のヒトは、同じボンベイ型のヒトからしか輸血を受けられないので、いざ交通事故に会った時、輸血のドナーを捜し出すのは至難の業である。健康なうちから輸血登録しておく必要がある。Se酵素を欠損するヒトは5人に1人存在する(約18%)。彼らは、唾液中や消化管分泌液中の糖タンパク質の糖鎖にO型抗原を持っていない。もちろん、A型もB型もない。犯罪現場に残されたタバコの吸い殻からABO式血液型を検出できないので、「非

分泌型の個体」と呼ばれ、法医学の犯人同定や親子鑑定にしばしば利用される。

A遺伝子とB遺伝子是对立遺伝子であり9番染色体にある。A遺伝子が点変異をおこしB遺伝子を生じた、と考えられている。389個のアミノ酸のうち、わずか2ヶ所の点変異による2個のアミノ酸変異により、A酵素活性がB酵素活性に変化している。A遺伝子の1ヶ所のアミノ酸だけが置換したA-B中間体の遺伝子も見つかっている。この遺伝子は、cis AB遺伝子と呼ばれ、A酵素活性とB酵素活性の両者の活性を持つ。つまり1つの酵素遺伝子が、A型もB型も合成するので、親子鑑定の時にやっかいである。例えば、cis AB/Oの遺伝子型を持った父親は、血液型はAB型であり、O型(O/O)の母親との間に、O型の子供が生まれる可能性がある。この場合、世間の一般常識からして母親の浮気が疑われるので気の毒である。A(B)遺伝子が、1塩基を欠損することにより、アミノ酸の読みとり枠がずれ、A(B)酵素活性が完全に失活したのがO型の個体である。

A酵素からcis AB酵素やB酵素への基質特異性の変化、さらにその酵素活性の失活は、それを合成する

糖転移酵素遺伝子の点変異や1塩基欠失による。その他の血液型(ルイス式、P式、Ii式などの糖鎖抗原血液型)も、それを合成する糖転移酵素遺伝子に点変異がおこっており、酵素活性が失活することにより、個体間に糖鎖構造の多型性が生じている。現在さかんにSNP (single nucleotide polymorphism)が解析されているが、ヒトの血液型はまさしく糖転移酵素遺伝子のSNPにより決定されているのである。

7. ポストゲノム世代から第3世代のグライコプロテオーム世代に向けて

タンパク質の一次アミノ酸配列がわかり、-Asn-X-Thr or Ser-配列やThr or Ser 残基があっても、必ずしもそこに糖鎖が転移されるかどうか、現時点でわかっている糖タンパク質は数少ない。あくまで possible glycosylation site なのである。ポストゲノム世代の研究として、すべてのタンパク質の高次構造と機能を解析しようとする研究(プロテオミクス; proteomics)が始まっている。しかし、ほとんどのタンパク質が糖タンパク質であることを考えれば、

プロテオミクスの後の世代は、1)すべてのタンパク質のどのアミノ酸に糖鎖修飾がなされているか、2)その糖鎖構造はどのような構造をしているか、3)そしてその機能はいかに、を網羅的に解析するグライコプロテオミクス; glycoproteomics 研究世代が、いずれ必ずや訪れるだろう。ゲノミクス; genomicsが第1世代、プロテオミクスが第2世代、グライコプロテオミクスが第3世代の研究動向とすれば、現時点ですでに第3世代を見据えた研究指針を立てる必要を強く感じる。

第3世代を見据えて、第1世代から第2世代への移行期にできる可能な研究とは何か? 数ヶ月前に「ヒトのゲノム配列がほとんどすべて読破された。」との発表があった。バイオインフォマティクス技術を駆使して、ゲノム情報の中から糖鎖合成を担う遺伝子(主に糖転移酵素遺伝子)を網羅的に探しだし、すべての糖鎖合成遺伝子の機能を解析することが現時点で可能となった。これがまさしく「第3世代を見据えた研究」、と思える。



成松 久 (Hisashi Narimatsu)

分子細胞工学研究部門 (Institute of Molecular and Cell Biology)

e-mail: h.narimatsu@aist.go.jp