

特別寄稿

# 私の教育・研究ノートより

—糖鎖を見つめ続けて—

川 寄 伸 子

平成18年2月2日 定年退職 最終講義

## はじめに

私は1965年に京都大学薬学部、1970年に同大学院を卒業するまで、京都生まれの京都育ちで、京都市内を出たことがなかったのですが、大学院修了後、関西医大に助手として就職いたしましたのを機に、枚方市に住むようになり、毎日大阪守口市の滝井まで7年間、京阪電車で大阪向きに通っておりました。そして、1977年にここ京都大学医療技術短期大学部に移り、今度は京都に向かってせせと通い続けました。京阪電車の鴨東線が開通しましたのが1989年のことですが、丸太町駅ができましたときはうれしかったですね。京阪電車と共にきょうまで、という感さえいたします。そして、この3月に医療短大の最後の卒業生の皆さんと共に卒業することになりました。医療短大、次いで保健学科に勤務した年月は28年半という長い月日になり、私自身、実に長い間、ここで過ごさせていただいたものだと改めて、思います。

さて、本日は、最終講義の機会をいただきまして、講義タイトルを「私の教育・研究ノートより」とさせていただきます。最初にこれまで私が携わってきた研究について、かいつまんでお話しをさせていただきます。研究テーマの大部分が糖鎖科学の領域でしたので、糖鎖を見つめ続けて、というサブタイトルを付けさせていただきます。

## I. 研究ノートより

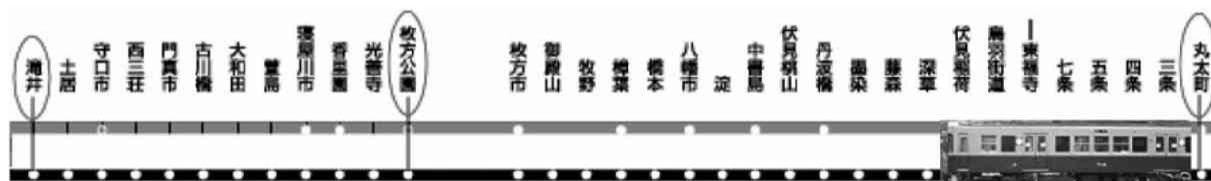
### 1. 京都大学薬学部 学生・院生の頃

#### 1) モルモット $\gamma$ -グロブリンの不均一性の研究

薬学部では、4回生になったとき、当時12講座ぐらいあったと思いますが、各講座に配属し、特別実習(卒業研究)を行います。私は、生物化学講座を志望しました。この時の生物化学講座の教授は山科郁男先生とおっしゃいまして、38歳の若さで金沢大学より赴任されたばかりの、新進気鋭の教授でした。先生が糖タンパク質の生化学の第一人者でいらっしゃるということぐらいしか知らなかったのですが、とても若き颯爽たる教授で「あのネクタイの柄が素敵」というような動機でこの講座への分属を希望したのでした。この年の生物化学への分属希望者はたいへん人数が多く、最後は“じゃんけん”をして、私は勝ち残り、ここに配属が決まりました。4回生から修士課程1年の途中まで、助教授の小山次郎先生、免疫化学の非常に優秀な先生でしたが、に師事し、「モルモットの  $\gamma$ -グロブリンの不均一性」というテーマで、生化学の実験のイロハから、いろいろ教えていただきました。このことは私にとってほんとうに有り難いことでした。

#### 2) 肝細胞ミクロソーム膜の糖タンパク質の化学的性質の研究—私の糖鎖研究のはじまり

修士課程1年の後半、小山先生がカナダに留学されましたので、山科先生の直接の指導を受けることにな



り、細胞の膜系に存在する糖、とくに糖タンパク質について調べなさい、ということで仕事を始めました。

ここでちょっと糖質についてのイントロダクションをさせていただきます。皆さん、糖質といいますと、どのようなモノを思い浮かべられるでしょうか？まずはグルコース、スクロース、デンプン、セルロースなど、そういうものだと思うのです。昔、Carbohydrates というのは炭水化物と訳されておりまして、主要なエネルギー源物質とのみ考えられていたのですが、最近糖の意義、とらえ方が変わってきてまして、その日本語の用語も“糖質”となっております。では、糖質はどのようなところにどのような形で存在し、どのような生物学的役割を担っているのでしょうか？糖質はもちろん、単糖、オリゴ糖、多糖など糖質単独として存在していますが、そのほかに自然界ではタンパク質や脂質と共有結合した複合糖質 Glycoconjugates として存在しています。たとえば糖タンパク質には糖は鎖のようにいくつかがつながって結合しており、つまり糖鎖が結合していますが、この糖鎖を構成している単糖の種類はわりあいと限られております。グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、これらは炭素数が6個のヘキソースです。さらにヘキソースのOH基の一つがアミノ基に変わっているアミノ糖とよばれるN-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンもありますが、その他にカルボキシ基をもつ酸性の糖であるシアル酸なども糖鎖の構成成分としてあります。

また糖鎖はどのような形で存在するかといいますと、たとえば、エイズウイルスの表面にありますGP120という糖タンパク質には、マンノースばかりが連なったハイマンノース型糖鎖が結合していますし、赤血球を増やすホルモンで、貧血の治療薬であるエリスロポエチンにはシアル酸、ガラクトースなどがついた複合型とよばれる糖鎖がついています。ここで、ちょっと覚えておいていただきたいのは、N-アセチルグルコサミン2つとマンノース3つからなる部分は、コア構造と呼ばれ、N-グリコシド型糖タンパク質（この用語はまたあとで説明しますが）に付いているどのタイプの糖鎖にも共通に見られます。

糖鎖の生物学的役割ですが、細胞表面での認識と接着において様々な役割を果たしていることが解明されてきております。たとえば、インフルエンザウイルスと細胞表面の糖タンパク質との結合、コレラ毒素と細胞表面の糖脂質との結合、*Helicobacter pylori*のような細菌と細胞内糖鎖への付着と感染、セレクチンとT-リンパ球表面糖鎖との相互作用、などです。

さて、細胞の膜の糖タンパク質について調べるといふ話に戻りますが、当時細胞の膜系については糖タンパク質が存在するらしい、ということぐらいのほか

は、ほとんど何もわかっていない状態でした。ご存じのように、細胞の膜には、小胞体(ER)といわれる細胞の内部の膜系と、外側の細胞膜(原形質膜)つまり表面の膜があります。そこで、私はこの細胞の中の膜と外側の膜において、糖タンパク質の存在状態の違いがあるのかどうか、またどう違うかについて調べたいと思いまして、膜の分離から始めました。ラットの肝臓を取り出し、ホモジネートしますと、中の膜系であるERも表面の膜である原形質膜もこまかく寸断され、ベジクル状になり、超遠心機で分別遠心しますと、ミクロソーム画分として沈殿してきます。一方、ラットに放射性炭素14で標識したグルコサミンを腹腔内に注射します。糖鎖を代謝的に放射標識したわけです。そうしましてこのラットの肝臓から、当時、細胞の原形質膜だけを単離する新しい方法として報告された、Nevilleの方法で、密度勾配遠心法により細胞の表面膜だけを分離しました。ですから、糖鎖が放射標識されているのは細胞の表面の膜だけということになります。そして、この両者を混ぜて、プロテアーゼで徹底的に消化し、糖鎖を含みペプチド部分が少し残っている糖ペプチドをとりました。毎日々々、ラットから肝臓をとって、低温室でホモジネートして超遠心して、とたいへん寒い生活を送っていたことを思い出します。

そしてまずゲル濾過法でサイズを調べました。カウントの分布が表面膜にある糖鎖に由来しており、また、オルシノール法という化学的方法で測った中性糖量の分布は細胞の表面と中の膜両方の糖鎖を含みます。その結果、細胞の表面膜の糖鎖は大きく、中の膜の糖鎖の方が小さいということがわかりました。また電荷を比べますと、大きい方の糖鎖はほとんど酸性のものばかりで、小さい方の糖鎖はほぼ中性のものであり、明らかに違いがあることがわかりました。すなわち、肝細胞の原形質膜にはシアル酸を含む酸性の糖鎖のみが存在し、中性の糖鎖は、ERおよびERに近縁の細胞内構造にのみ由来する、ということが明らかになりました<sup>1)</sup>。

私はこの細胞膜系に存在する糖の性質、組成、量、構造、および分布(局在性)について調べた仕事を中心に「ラット肝細胞ミクロゾーム膜の糖タンパク質に関する化学的研究」というタイトルで学位論文を書き、薬学博士号を授与されました。

この糖鎖の局在性の意味を糖鎖生合成経路より考えてみたいと思います。ご存じのように、糖鎖というのは、遺伝子の情報によりタンパク質が合成されてからあとに、糖鎖を合成する糖転移酵素により単糖が次々と付加され合成されます。翻訳後修飾と呼ばれるプロセッシングを受けます。今では、N-グリコシド型糖鎖は最初簡単なマンノースばかりのような糖鎖が合成さ

れ、それらがゴルジ体を輸送されて、細胞の表面に出る直前にトランスゴルジ体あたりで、ガラクトースやフコースが付加し、最後に酸性のシアル酸が付加することがわかっております。このプロセッシングから考えまして、私が40年前に得ました結果は納得のいくものとなります。

## 2. 関西医大医化学教室にいた頃

—*Penicillium notatum* ホスホリパーゼ B の精製とその作用機構の研究

その後、博士課程を終えたあと、関西医科大学に助手としてまいりました。行き先の医化学講座 齋藤國彦教授は脂質生化学の専門家であり、私はホスホリパーゼ B という酵素を精製することになりました。当時、脂質の世界でも脂質そのものの研究に加えて脂質の生合成や分解にかかわる酵素を生化学的に調べようとする研究がさかんになり始めた頃でした。

ホスホリパーゼはグリセロリン脂質を分解する酵素の総称でありまして、加水分解する部位により、ホスホリパーゼ A1, A2, C, D があります。B は、グリセロールの C1 と C2 にエステル結合している脂肪酸を両方とも切る酵素に対して付けられた名前です、ペニシリンを産生するカビの一種 *Penicillium notatum* 由来の酵素の粗標品をジアシル体に乗せると、両方の脂肪酸が切れてきます。ほんとうに一つの酵素タンパク質が2箇所のエステル結合を切るのかどうかについて、当時、controversial であったのですが、酵素を単一タンパク質にまで精製し、この点を明らかにしようということになりました。この仕事は私が初めて学生という身分を離れ、就職してからの最初の仕事であったわけで、*P. notatum* の菌体のイーストに似た“かおり”と共に、仕事にも職場にも思い出深いものがありますが、時間の関係で詳しいことは省かせていただき、結果だけを、まとめます。

*P. notatum* 菌から当時の生化学的手法で単一タンパク質にまで酵素を精製した結果、1) ホスホリパーゼ B という単一の酵素が実際に存在し、グリセロホスホリピドの1位と2位にエステル結合している脂肪酸を二つとも加水分解する。その水解順序は C2→C1 である。2) この酵素タンパク質はホスホリパーゼ B 活性とリゾホスホリパーゼ活性の両方をもつ。3) 分子量約 95K の糖タンパク質 (糖含量30%) である、ということがわかりました<sup>2)</sup>。

## 3. 京大医療短大に来てから今までの研究

—血清レクチンとその糖鎖リガンドの研究

1) ヒト血清レクチン、マンナン結合タンパク質 (MBP) の精製と性質

医療短大にまいりましてからしばらくは様子もよくわからず研究を離れていたのですが、母校の薬学部の山科研究室が近くにあり、当時、そこで血清中のレクチンに関する、おもしろい研究が展開されはじめていましたので、それに加わって研究を始めることになりました。この最初の研究対象はマンナン結合タンパク質 Mannan-binding Protein と呼ばれる、血清中のレクチンで、MBP と略します。これは最近マンノース結合タンパク質、またはマンナン結合レクチン (MBL) とも呼ばれますが、これらはすべて同じものです。このタンパク質は酵母の細胞壁に非常に高い親和性でもって結合するタンパク質として、最初、ウサギの肝臓に見いだされ単離されましたが、ウサギの血清中にも存在することがわかりました。ここで、先ほど血清中のレクチン、と申しましたが、レクチンとは何か、について簡単に説明します。レクチンは特定の糖鎖の構造を認識して特異的に結合するタンパク質であります。糖鎖を認識して結合するタンパク質としては、糖鎖をエピトープとする抗体や糖転移酵素がありますが、これらは、レクチンに含めません。先ほど、細胞の表面にはいろいろな糖鎖が存在し、生物情報をもっていることが知られ始めていると述べましたが、レクチンはその糖鎖のもつ生物情報シグナルを受けとめる受容体分子といえます。

さて、植物由来のレクチンは旧くより血球凝集素として知られ、今でも試薬として利用されますが、1974年にウサギ肝臓にアジアロ糖タンパク質結合タンパク質が発見されたのを最初として、動物の組織や体液中にも糖鎖に特異的に結合するタンパク質が存在することが知られ、動物レクチンと呼ばれています。動物レクチンは、今ではC型レクチン、ガレクチン、P型レクチン、など8種類に分類されています。この中で私が研究しましたレクチンは糖鎖との結合にカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) を必要とするC型レクチンと呼ばれるグループに属する、MBP とコングレルチニンという二つのレクチンです。

まず、MBP に関する仕事からお話しします。このタンパク質は最初ウサギ血清中に見いだされたと申しましたが、ヒトの血清中にも存在するかどうか、既知のタンパク質のどれかと同じものであるのか、あるいは新規のタンパク質であるかどうか、を明らかにするために、ヒトの血清から MBP の精製を始めました。マンナンを固定化したカラムにヒトの血清を流

し、アフィニティクロマトを行いましたところ、大部分の血清タンパク質はカラムを素通りしますが、結合したタンパク質をカルシウムキレート剤である EDTA を含む緩衝液で溶出しますと、マンナンに結合したタンパク質が溶出されてきます。2回も同様にアフィニティクロマトを繰り返し、3回目ではマンノースを含む緩衝液で、結合したタンパク質を溶出します。さらにゲル濾過で精製し、得られた画分を還元条件下で SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) しますと最終的に約 31 kDa の単一バンドを示すタンパク質が得られました。ヒトの血清 1 リットルから約 1 mg の MBP が、もとの血清に比べて精製倍率約 1 万 8 千倍で得られました<sup>3)</sup>。このレクチンの性質ですが、分子量は、未変性のタンパク質はゲル濾過で大体 65 万、サブユニットが 3 万 1 千、マンナンと MBP の結合はマンノース、*N*-アセチルグルコサミン、フコースを加えると阻害されますので、これらの糖に結合特異性があることがわかりました。血清中の濃度ですが、当時ラジオイムノアッセイで調べたものですが、健康人血清 1 ml あたりの平均濃度が  $1.86 \pm 1.16 \mu\text{g}$  (平均値  $\pm$  SD) と非常に幅広い分布であることがわかりました。

## 2) MBP の補体依存性殺菌作用

次に、MBP のもつ補体依存性殺菌作用の話をごささせていただきます。ちょうどこの頃、1987年に、同じ MBP 研究グループによりマンナンをコートした赤血球に MBP を結合させ、補体を加えると、加えた補体量、マンナン量、MBP 量に依存して溶血する、つまり受身溶血反応で調べたとき MBP が補体を活性化する作用をもつことが見いだされました<sup>4)</sup>。そこで、次に、MBP は実際にバクテリアを補体依存的に殺すのかどうかを調べたいと思いました。まず、微生物学の実験手法を習いに阪大微研の井上公蔵先生の研究室にまいりました。大腸菌の K12 株と B 株、どちらもストレプトマイシン耐性にした菌株をいただき、それらを用いて、コロニー数を数えて殺菌作用を調べますと、MBP を加えた系では、補体量依存的に大腸菌が死ぬことを示すことができました<sup>5)</sup>。この二つの大腸菌株の Rough 型の細胞壁コアオリゴ糖鎖は、*N*-アセチルグルコサミンや、*L*-グリセロ-D-マンノヘプトースを含みますので、MBP はこれらの糖鎖を認識して結合し、補体を活性化し、溶菌すると考えられました。また、この結果は Rough 型大腸菌が哺乳動物においては病原性を示さない、ということと合致します。その後、この MBP による補体の活性化に特異的な補体系セリンプロテアーゼ (MASPs) が見いだされ、この活性化経路の独自性が確立されています。皆さんご存じの補体活性化古典経路、第 2 経路とならん

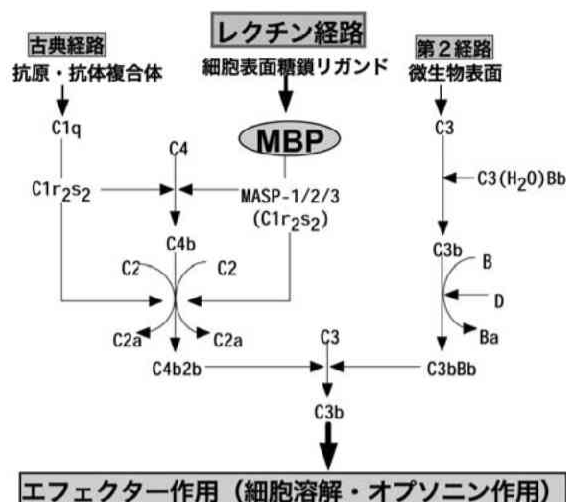


図 1 補体活性化経路におけるレクチン経路

「免疫生物学—免疫系の正常と病理—」原書第 5 版  
2003 年 12 月 健彦監訳 p. 45 より改変して引用<sup>6)</sup>。

で、これらとは別の第 3 の経路、レクチン経路と称されています。MBP は生体内に侵入した病原菌等の菌体表面のリガンド糖鎖を認識して結合し、補体の C4 を介して、補体活性化のカスケード反応を引き起こし、膜傷害複合体 (MAC) が形成され、殺菌する経路として、今では免疫学の教科書に記載されています (図 1)<sup>6)</sup>。また、MBP はその翻訳領域の中のコラーゲン領域に、3 種類の点突然変異が知られ、これらの変異体 MBP を持つ人は、血清中の MBP 濃度が低く、易感染症、つまりオプソニン不全症となることがとくに小児科領域で知られています<sup>7)</sup>。

## 3) ウシ血清レクチン、コングルチニンの単離と分子構造

次に、コングルチニンというウシの血清中のレクチンについて研究をしておりましたので、これについて簡単に述べます。コングルチニンというのはウシの血清中に存在するタンパク質で、不活化補体第 3 成分と結合した感作赤血球 (EAI-C3b) に  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で結合し、コングルチネーションと呼ばれる凝集反応を起こさせる、一種の血球凝集素で 1909 年にすでに報告されており、有名な免疫学者 E. A. Kabat の免疫化学の教科書にも記載されています。そして、コングルチニンによる凝集は *N*-アセチルグルコサミンを加えると阻害されることを 1964 年の Science に Leon, Yokohari が報告していました。先ほど、動物レクチンは 1970 年代頃より見いだされてきた、と申しましたが、このコングルチニンは抗体の発見された頃とほぼ同時期に見いだされており、動物レクチンとしては最初のタンパク質、つまり元祖動物レクチンであったわけです。コングルチニンはウシの血清中の MBP に相当するものであるのか、あるいは MBP とは別のタンパク質であることを明らかにしたいと思ひ、私は

このレクチンをウシの血清から精製し、その性質を調べてみました。当時、コングルチニンの精製は酵母細胞壁多糖のチモーズンに吸収させて遊離させるという方法が報告されていたので、私はヒト血清から MBP を精製したと同様の方法を用いて生化学的にウシの血清からコングルチニンを精製しました。

その結果、ウシの血清中にはコングルチニンとは別のタンパク質として MBP もあるということがわかりました<sup>8)</sup>。コングルチニン分子のサブユニットは MBP のそれよりも大きく、45 kDa、ネイティブ分子の大きさは100万くらいであることがわかりました。糖の結合特異性を調べますと、ウシ血清 MBP とマンナンとの結合は、やはり *N*-アセチルグルコサミン、マンノースなどによって阻害されますが、コングルチニンとマンナンとの結合は、ほとんど *N*-アセチルグルコサミンによってのみ阻害されました。

また、コングルチニンがウシ血清中の内在性セリンプロテアーゼで加水分解され、3個のシステイン残基を含むアミノ末端側から54番目までのペプチドが除かれて短くなると、EAiC3b への結合性を失うけれども、マンナンへの結合活性は保持されている、という分子構造とレクチン活性の関係について興味ある結果も得ました<sup>9)</sup>。

#### 4) コングルチニン遺伝子の構造解析—cDNA 構造とゲノムオーガニゼーションの決定、プロモーター解析

コングルチニンに関しましては部分アミノ酸配列をもとにして、cDNA のヌクレオチド配列を決めました。その結果、成熟タンパク質は351アミノ酸からなり、グリシン (Gly) が三つ目ごとに繰り返される、いわゆるコラーゲンというタンパク質に見られる特徴的な一次構造を持つ部分を含むことがわかりました。これをコラーゲン様構造と呼んでいます。次に、この cDNA 構造のヌクレオチド配列を基に、コングルチニンのゲノム遺伝子をクローニングし、エクソン、イントロン

の配置、すなわちゲノムオーガニゼーションを調べました。そして、翻訳部分が9個のエクソンに分かれており、サブユニットペプチドの構造と対応させると、シグナルペプチド、システインリッチなアミノ末端、コラーゲン領域の一部がエクソン1によってコードされており、残りのコラーゲン領域はさらに4個のエクソンに分かれており、CRD (糖認識ドメイン、C型レクチンに共通に保存されている18個のアミノ酸を含み、ここに糖鎖が結合する、C末端側にある)、さらにコラーゲン領域と CRD のつなぎ目 (ネック領域) はそれぞれ別の一つのエクソンでコードされている、という配置を明らかにすることができました (図2)<sup>10)</sup>。

こういった構造の特徴を共通にもつ一群のレクチンがあり、MBP、コングルチニンのほかに肺表面活性物質のアポタンパク質DやAといったレクチンも似たような分子構造をしております。つまりサブユニット

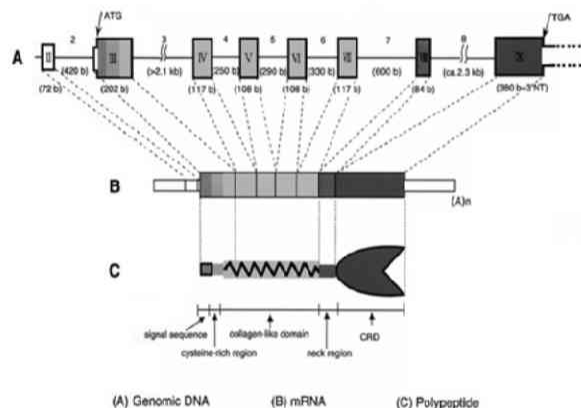


図2 コングルチニンの遺伝子、mRNA、ポリペプチドの比較モデル図

コングルチニンのサブユニットポリペプチドのドメイン構造に対応させてゲノム遺伝子、mRNA の構造を模式的に比較した。(A) ;ゲノム遺伝子、(B) ; mRNA、(C) ; ポリペプチドの特徴的なドメイン構造。翻訳領域のエクソンは四角形で、5'-、3'-非翻訳領域のエクソンは縦巾の小さい四角形で、イントロン部分はエクソン間の直線で表わす。エクソン番号はローマ数字で、イントロン番号はアラビア数字で付す。最も薄い網掛け部分はコラーゲン領域を示す。

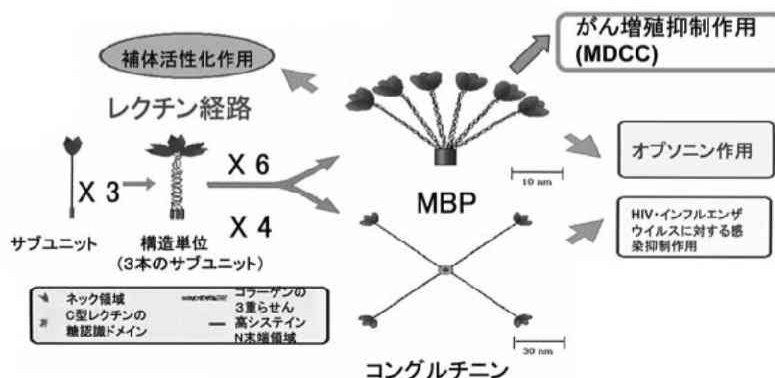


図3 コレクチン (MBP とコングルチニン) の分子構造と生物活性

が3本寄り集まって基本構造単位を形成し、さらにその基本構造単位が束ねられ、コングルチニンやSP-Dは十字型の構造、MBPとSP-Aは3量体の基本構造単位が最大6つ集まって、花束型をとっております(図3)。これらはコラーゲン領域を持っていてCRDをもっているのです、コレクチン Collectins (Collagen-like lectins) と総称されておまして、それぞれ先天性の生体防御因子として抗体産生以前に働いていることがわかってきております<sup>11)</sup>。当時、いくつかのグループにより、コレクチンのゲノム構造が次々と明らかにされてきたのですが、これらのゲノムオーガニゼーションを並べて見てみますと、図2(A)で示した配置と非常によく似た配置をしています。このことから、これら一群のコレクチンは共通祖先遺伝子からできてきたものであることが推定されました。

5) 血清 MBP によるがん増殖抑制作用とがん細胞表面に発現する MBP リガンドオリゴ糖鎖の構造解析最後にここ数年の研究の成果についてお話しさせていただきます。

また MBP に戻りますが、MBP のがん増殖抑制作用に関与するがん細胞上の糖鎖リガンドの解析という仕事です。MBP は先に述べましたように、バクテリア、ウイルス、真菌、寄生生物など広範な外来性微生物の細胞表面に含まれる糖鎖リガンドの特定のパターンを識別し、結合します。一方、これらの糖鎖パターンは通常、正常な動物組織上には発現されていません。正常な哺乳動物細胞はその表面がシアル酸を末端に持つ複合型糖鎖で覆われており、通常MBPはこれらの細胞には結合しません。一方、がん化やウイルス感染により、細胞の糖タンパク質や糖脂質に異常な糖鎖付加が発現し、細胞表面のオリゴ糖鎖の構造が変化することが知られています。そこで、SW1116 というヒトの結腸がん細胞由来の培養細胞株に、FITC という蛍光色素で標識した MBP を反応させて共焦点レーザー顕微鏡で観察しました。Ca<sup>2+</sup> 存在下で MBP は細胞表面に結合し、細胞は光ります。EDTA を加えた系では、細胞は光りません。しかし、Ca<sup>2+</sup> があっても、マンノースやフコースや N-アセチルグルコサミンを加えると、MBP は細胞に結合しません。一方、MBP に結合しない N-アセチルガラクトサミンを加えた場合は、MBP の細胞への結合を阻害せず、細胞は光るといことがわかりまして、SW1116 の細胞表面には MBP のリガンド糖鎖が発現しているということがわかりました。

この頃、1999年のことですが、薬学部の共同研究者の Ma 博士により、MBP が腫瘍増殖抑制作用をもつことがわかりました<sup>12)</sup>。すなわち、まず SW1116 細胞をヌードマウスに打って腫瘍を作らせたところへ、

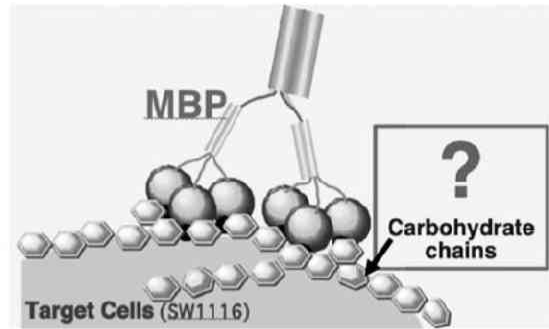


図4 MDCC に関与するがん細胞表面の MBP 糖鎖リガンド

MBP を発現する遺伝子を組み込んだワクシニアウイルスベクターを腫瘍に直接、あるいは皮下に投与し、一種の遺伝子治療なのですが、3週間ぐらい観察していますと、著しい腫瘍の退縮が見られました。当初、これは補体の活性化を通じて増殖が抑制されると考えられたのですが、MBP 遺伝子のコラーゲン領域でアミノ末端から54番目のグリシンがアスパラギン酸に変わっている変異体 (G54D)、これは補体の活性化能がないことがわかっておりますが、この変異体遺伝子を組み込んだウイルスを入れても野生型 MBP の場合と同様に、がんの増殖が抑制されることがわかりました。それで、これを MBP-dependent Cell-mediated Cytotoxicity (MDCC) と名付けました。

そこで次に、どのような構造をもった糖鎖が MBP のリガンドとして存在しているのか、調べてみたいと思ひまして、その研究に着手いたしました(図4)。まず、SW1116 への FITC 標識 MBP の結合を植物レクチンを用いてフローサイトメトリーによって解析しました。植物レクチンにはいろいろな糖鎖認識のタイプのもがあります。Ca<sup>2+</sup> 存在下で細胞が光っているところへ、AAL (フコース認識レクチン) を加えますと、結合が非常に強く阻害され、結合にはフコース残基が重要であることがわかりました。次に血液型関連の糖鎖抗原としましてルイス式の糖鎖抗原というのがありますが、これは糖鎖のバックボーンの構造の違いにより、二つのタイプに分類されます。タイプ1といえますのは、ガラクトースと N-アセチルグルコサミンの結合が  $\beta$ 1-3 結合であり、これにフコースが1つ付いたルイス a と2つ付いたルイス b があります。臨床検査で癌マーカーに使われております CA19-9 は、ルイス a にさらにシアル酸がついているシアリルルイス a です。もう一つはタイプ2といひましてバックボーンのガラクトースと N-アセチルグルコサミンが  $\beta$ 1-4 結合しており、これにフコースが1つ付いたルイス x と2つ付いたルイス y があります(図5参照)。FITC 標識 MBP と SW1116 細胞の結合実験の系に、これらのルイス抗原に対するモノクローナル抗体を加えますと、抗ルイス b 抗体、抗ルイス a 抗体

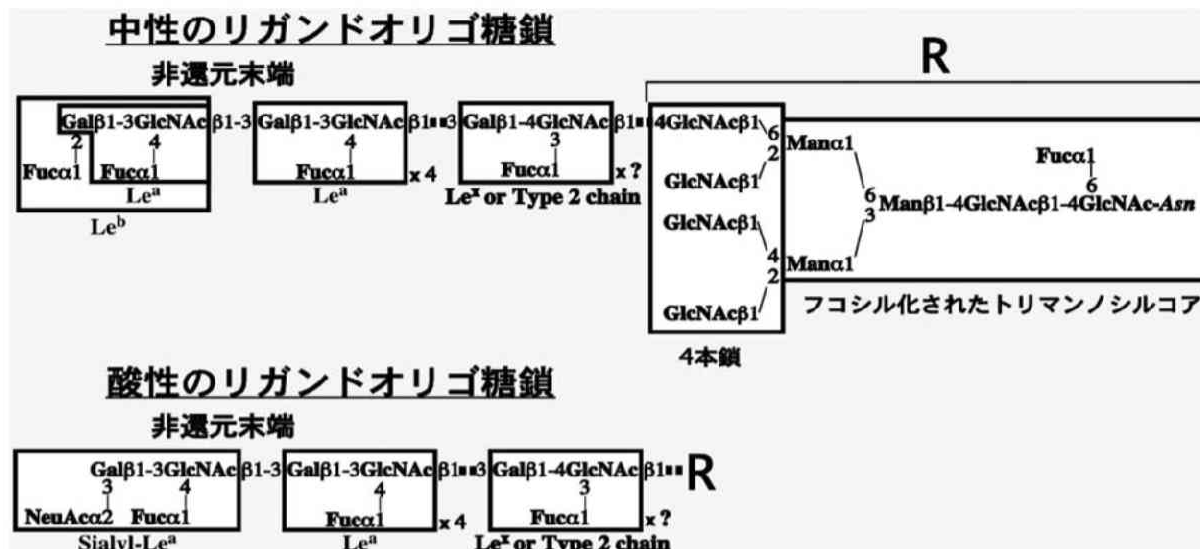


図5 SW1116 細胞上に発現している MBP 糖鎖リガンドの構造  
 中性のオリゴ糖鎖の非還元末端は、ルイス b またはルイス a であり、さらに内側に最大 4 個のルイス a ユニットの繰り返しを検出された。還元末端はコアがフコシル化された 4 本鎖 N-グリカンである。酸性のオリゴ糖鎖は非還元末端にシアリルルイス a をもつ。MBP はシアリルルイス a には結合せず、その内側の糖鎖に結合する。コア近辺に存在するタイプ 2 鎖 (ルイス x) のユニット数は不明である。R は還元末端側のコア構造をあらわす。

で結合が阻害されますが、抗ルイス x や抗ルイス y 抗体では阻害されない、つまり、MBP が結合する糖鎖は、タイプ 1 構造をもつことが推定されました。

このようにリガンド糖鎖の構造についていくつかの知見が得られてきましたので、実際に細胞から MBP の結合相手になるオリゴ糖鎖を分離して構造を解析することをめざして実験を進めました。このリガンド糖鎖の単離の方法についてはいろいろ試行錯誤し、細胞は 175 cm<sup>2</sup> の培養フラスコ 600 個分くらい培養して集めました。集めた細胞を、界面活性剤を含む緩衝液で溶かし、細胞の可溶化物を調製しました。そのあと、可溶化物をプロナーゼで消化し、糖ペプチドにします。次に、糖ペプチドから、オリゴ糖鎖を切り離します。さらに、そのオリゴ糖鎖がペプチドに結合していた根元の部分に、蛍光を発するピリジルアミノ (PA) 基という標識をつけます。このように調製した PA 標識オリゴ糖鎖を MBP 固定化カラムにかけてアフィニティクロマトにより、MBP に結合するものを分離しました。つまり、PA 標識 MBP リガンド糖鎖が分離できたことになります。このとき、一方では、細胞を培養するときに、トリチウムで標識したグルコサミンを加えて細胞の糖鎖を代謝標識し、これらの細胞から、同様の操作により、トリチウムで標識した MBP リガンド糖鎖を分離するという実験もしています。アイソトープで標識したものを用いますと、いろいろな段階での定量的な解析もできますので、そのような実験もしています。しかし、最終的にはマスペクトル分析で糖鎖の構造解析を行いますので、アイソトープで標識しないリガンド糖鎖を大量に調製する必要があります。次にイオン交換カラムで、リガンド糖鎖

を酸性の糖鎖、中性の糖鎖に分離しました。先ほど、細胞膜の糖タンパク質は酸性であるというお話しをしましたが、カルボキシ基をもつシアル酸などを含んでいる糖鎖は酸性になります。そしてこれらの糖鎖をそのまま質量 (MS) 分析にかける、あるいは、さらにいろいろな処理で分けてから MS 分析にかけました。ここで先ほどから、O-グリコシド、N-グリコシドなどと申していますが、その説明を加えておきます。これは糖タンパク質に糖鎖が付いているときの付加部位の様式のこととして、N-グリコシドというのはペプチド中のアスパラギンのアミノ基に窒素原子を介して N-アセチルグルコサミンが付いています。O-グリコシドというのは、ペプチド中のトレオニン、セリンのヒドロキシ基の酸素原子を介して N-アセチルガラクトサミンが付いています。私たちは N 型糖鎖のみを切り出す条件で、ヒドラジン分解でオリゴ糖鎖を糖ペプチドから切り離しました。得られたリガンド糖鎖について、まず、還元末端、ペプチドに付いているところの根元の糖を分析したところ、ほとんど N-アセチルグルコサミンばかり、つまり N 型の糖鎖であることが確認されました。また、糖組成は、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコースといった糖が主なもので、還元末端の N-アセチルグルコサミン 1 モルあたり、それぞれ 26 モル、22 モル、15 モルと測定されました。通常のオリゴ糖鎖は 10~20 糖ぐらいであることが多いのですが、MBP のオリゴ糖鎖は、ガラクトースと N-アセチルグルコサミンからなる長い糖鎖、これをポリラクトサミンといいますが、ポリラクトサミン様型の長い糖鎖にフコースが付いているものだということがわかりました。ここまで大体わかった

のですが、その後、実際の糖鎖の構造がどのようなものであるのかを明らかにしたいと研究を進めていたのですが、なかなか構造を究めることが出来ず、大変いろいろ苦労しました。2002年の夏、ケアンズで、国際糖質シンポジウムがあり、ここで、私たちの糖鎖の場合と非常によく似た、高マスレンジ、つまり高分子の領域に糖のイオンスペクトルを示しているポスターがありました。私たちと興味が似ているのではないかと、その時すぐ思いました。その発表が台湾台北市のアカデミアシニカの Khoo 博士の仕事であることがわかり、Khoo 博士にそこでお会いしました。このことがこの仕事のブレークスルーとなり、それ以来、学会では“勉強すべし”と思っております。Khoo 博士に私たちのオリゴ糖鎖について MS 分析で調べていただきますと、まず、MALDI-MS という分子サイズを調べるマススペクトル、田中耕一氏がノーベル賞を受賞された、あの MALDI-MS で調べますと、 $m/z$  が 4,500~9,000 に分布する、分子量の少しづつ異なる連続したピークの非常にサイズのヘテロなもの集まりであることを示すスペクトルとなりました。これをよくよく見ますと、ピークとピークの間は、先ほど構造を示しましたルイス抗原の糖鎖ユニットの大きさの差を示し、またさらに細かいピーク間の距離はフコース残基の差で分かれていることが推定されました。これらの糖鎖の大きさを概測しますと、 $m/z$  の平均6,000 くらいのところ、ラクトサミン構造が13回くらい繰り返されており、フコースが11個くらいついている構造が推定されました。この MS 分析というのは、一回目の分析で得られたフラグメントをもう一回フラグメントにして MS/MS 分析、さらに得られたフラグメントイオンをこわしてさらに小さいフラグメントにして MS/MS/MS 分析という具合に繰り返していきますと、構造を詳しく調べることができます。先ほど MALDI-MS または ESI-MS で検出したイオンをプリカーサーイオンとして、MS/MS 分析にかけ、非還元末端部分の構造、つまり糖鎖の、糖タンパク質に結合していない側の構造をさらに解析しました。

次に、還元末端、タンパク質に付いている側の構造は、生化学の実験と組み合わせまして調べました。すなわち、まず、これらの PA 化リガンド糖鎖をエンド  $\beta$ -ガラクトシダーゼという酵素、ガラクトースと N アセチルグルコサミンが  $\beta$ 1-4 で結合しているとき、つまりタイプ 2 の糖鎖のガラクトース-N アセチルグルコサミン間のグリコシド結合を加水分解する酵素で消化し、消化物を C18 のカートリッジカラムで分画しました。このカラムは、試料を疎水性の程度で分けるのに使いますが、最初、水で溶出されてくるフラクションには PA タグの付いていない糖鎖が出てきます。PA タグ付きの糖鎖はその疎水性のためにカラム

に結合して残りますので、それらを次に50%のアセトニトリル水溶液でカラムから溶出します。酵素で消化する前は、糖鎖はすべて C18 のカラムに結合しますが、消化後は約30%が水で溶出されてきます。このようにして、PA タグの付いていない非還元末端側の糖鎖とタグの付いているコア部分の糖鎖に分けることができますので、それぞれを完全メチル化後、MS 分析で解析しました。その結果、コアの部分は4本鎖、もしくは3本鎖に分け入るような形で1本の糖鎖が付いている、このような付き方の糖鎖はバイセクティングといいますが、そのいずれかであること、つまり糖鎖はマルチアンテナの糖鎖であることがわかりました。これらの MS 分析結果とレクチンカラムを用いるアフニティクロマトによる分析を組み合わせた結果からコア部分の構造は、4本に分岐したフコシル化トリマンノシル構造であることがわかりました。4本に分岐したコア部分の非還元末端側のほとんどが N-アセチルグルコサミンであることから、ここにタイプ 2 糖鎖が存在し、エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼによる消化を受け、非還元末端部分を含む糖鎖と還元末端部分を含む糖鎖とに分かれたものと推測されます。

以上の実験により、最終的に、がん細胞に発現している、MBP のリガンドオリゴ糖鎖は図 5 に示すような構造であることを明らかにすることができました。すなわち、中性糖鎖の非還元末端にルイス b またはルイス a エピトープをもち、その内側に最大4個のルイス a ユニットの繰り返しを検出されました。還元末端側コアは4本鎖のマルチアンテナ糖鎖であることが明らかになりました。また酸性の糖鎖には、非還元末端にシアリルルイス a が付いています。すなわち、MBP はこれまでに報告のない非常にユニークな、高度にフコシル化された長鎖のポリラクトサミン様構造をもつ N-型糖鎖と結合することが明らかになりました<sup>13)</sup>。

この構造の特徴と意義ですが、N-グリコシド型で、ルイス a が繰り返されている高分子糖鎖は、これまでの糖鎖の構造の常識を破るような珍しい、がん関連の糖鎖構造であること、また MBP が実際のがん細胞上の糖鎖を認識するときに、どのような構造の糖鎖を認識しているか、MBP の内在性リガンドの構造をはじめて明らかにすることができた、という二つの意義があると思います。今後は、このがん関連糖鎖が新しい分子標的になるのではないかと、がんとの関連で、その生物学的な意義をさらに明らかにしたいと考えております。

## II. 教育ノートより

ここで教育ノートより、ということで、思い出すこ



とを二、三述べさせていただきます。

私は、保健学科に改組になりますまでの8年間、医療技術短期大学の総合教育の教員の組織に属しておりました。その頃、カリキュラムの大綱化ということがなされ、それまで医療技術短期大学部一般教育として開講されていたカリキュラムを今一度見直そうということになりました。当時、私は総合教育の主任をしておりました事務的教務的なとりまとめのお世話をしていましたため、特に印象深いのですが。総合教育に所属していらっしゃる先生がたと一緒に考えまして、まず、一般教育科目という名前を総合教育科目と改めました。それまで人文・社会・自然科学、外国語、保健体育という分類にしておりましたが、新たに健康科学系を作り、ここに、体育実技のほか、「健康人間学原論」、「ライフサイクル論」、「コミュニケーション学」、「医学医療概論」「健康運動学」などの新科目を学科の先生がたの協力も得て、開講しました。これらは現在の保健学科の健康科学系科目の基礎となったものです。その他の新科目として、人文科学系で「芸術学」を開講し、ピアニストの河野美砂子先生にご出講いただきました。保健学科になるまでの4年間、5Fの大講義室で授業の一環として、美砂子先生のピアノや御夫君の河野文昭先生のチェロなどのコンサートを開いていただきました。教職員や近隣の方々も一緒に楽しんで聴かせていただいたことを思い出します。この3月で卒業される方々が最後の受講生になりますが、コンサートを聴いていただいた学生さんがここにもいらっしゃると思います。また自然科学系では、分子生物学が医療科学に必須でありますので、「分子生物学の基礎」を開講し、看護学科では選択科目に、理学・作業療学科では必修科目にいたしました。また、衛生では生化学の一部であった分子生物学を専門基礎科目として独立した科目としました。外国語科目ではそれまでの英語、ドイツ語に加えて、バジェル先生に「英語会話」を開講していただきまして、また、「中国語」も開講しました。そのほか、少人数教育科目として「総合教育セミナー」という科目を総合教育の先生がたの担当で始めました。私がこの科目を担当いたしましたとき、“ポストゲノム時代の糖鎖生物学”というテーマで開講しましたら、思いがけなく理学療学科の学生さんが3名来てくださいました。そして、毎週いろいろなテーマの主要な糖鎖科学の論文を順番に読んでいただき、若干の実験も入れて半年間、この三人の受講生は思いがけなく熱心に勉強していただいたので、私も一緒に楽しんで勉強しました。このように医療技術短期大学の総合教育のカリキュラムを少し充実させることができました。これに比べますと、今の保健学科の学生さんは、比べものにならないほどのバラエティに富んだ全学共通科目を

受講できるわけですから、いろいろなことに興味と好奇心をもって、積極的に学んでほしいと思います。

衛生技術学科では1回生の後期に「化学実験」があり、その中の項目の一つに、生体関連有機化合物の同定という実習を行っていました。これは私の前任者の化学の浅野先生が始められたものですが、どのようなことをやっていたかと言いますと、試験管約20本にいろいろな生体関連の化合物、例えばアミノ酸あり、タンパク質あり、糖質、核酸、脂質、ビタミン、等々を入れておきまして、学生さんにはどの試験管に何が入っているかを知らせず、この20種の物質リストのみを渡しておきます。それらを半日の実習、5、6回で同定していただくというものです。その中でわかったことは、学生達が思いのほか、よく考えてくれ、また、こちらが考えつかなかったような方法も考え出してくれるということです。この実習の初回に、グループでディスカッションをして同定のプロトコルを作っていたときにも、個々の物質の性質にとらわれず、まず全体を見渡してどのような分類をしていけばよいかを考えるように助言しておりました。これは衛生技術学科の学生さんだけへのメッセージになるかも知れませんが、こういった実験をするときには、最初に、全体を見通してよく考える、全体のイメージをつかむ、ということをお心掛けてほしいということです。このことはどのような仕事をする場合でも大切なことではないかと思えます。そして、また生体分子の多様性についても認識を深めてほしいと思っておりました。私自身を考えましても、今まで、多様な生体分子、とくに糖鎖を含む分子に興味をもち、その実体を究めたい、という動機で研究を進めてきたように思えます。

衛生技術学科では、三回生になりますと、学科内、学内のいろいろな専門の先生がたの研究室に配属して半年間の卒業研究ゼミというのをを行います。医療短大衛生技術学科の最初の卒業生は1979年卒になりますが、一期生だけは、学内外の病院に実習に出るということを行いました。次の年からはこの形に、つまり、三回生の半年は京大病院での実習、残りの半年は、卒業研究を行うということになりました。その卒業研究ゼミで私のゼミに来てくださった方々は、この3月に私と同時に卒業されるゼミ生を入れますと、全部で102名になりました。きょうも私の早口講義の聴き納めということで、つたない最終講義を聴きにきていただいている卒業生が、30名ほどいらして下さっています。これらのかたがたが、現在、検査技師として、あるいは研究者として、いろいろな領域で立派に活躍していらっしゃるのですが、私の何よりのよるこびであり、誇りであります。

## 謝 辞

最後になりましたが、謝辞を述べさせていただきます。恩師である、山科郁男先生（京都大学名誉教授）、小山次郎先生（北海道大学名誉教授）、齋藤國彦先生（関西医科大学名誉教授）に、賜りましたご指導とご鞭撻に対しまして深く感謝申し上げます。故村地孝先生（京都大学医療技術短期大学部初代主事・京都大学医学部教授）は、医療短大の創設に力を尽くされた先生ですが、私に、京大医療短大へのご縁をいただきましたことを感謝いたしております。浅野仁子先生は、私の先輩の先生ですが、旧検査技師学校の校舎から、医療短大の新しい校舎に、今の建物ですが、移りました時からご退官されるまで化学準備室と一緒に実験をさせていただきました。

それから、真っ先に御礼申し上げるべきところ後になりましたが、京都大学の医療技術短期大学部衛生技術学科、総合教育および現在の医学部保健学科検査技術科学専攻の先輩や同僚の先生がた、また、もちろん、他学科、他専攻の先生がたにも教育・研究両面で大変お世話になりました。あまりに多くの先生にお世話になりましたので、お一人ずつお名前を挙げさせていただくことができず失礼をいたしますが、心より感謝申し上げます。ここ十数年あまりの間、私と一緒に仕事をしていただいた、科学技術振興機構、CREST 技術員等の里中美都子さん、井上理抄さん、山田加奈子さん、坂口裕美さん、寺田剛基君に謝意を表します。共同研究者としまして、京都大学薬学研究所生体分子認識学分野の教職員、大学院生のかたがた、MS 分析で共同研究をしていただきました K-H. Khoo 博士（台北、アカデミアシニカ）、川崎ナナ博士（国立医薬品食品研）、それから伊藤信行教授（京都大学薬学研究科）、今川正義教授（名古屋市立大学薬学部）には、レクチンの遺伝子構造解析の研究においていろいろ教えていただきました。お世話になりました皆様方に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

1) Miyajima (Kawasaki) N, Kawasaki T, Yamashina I:

- Glycopeptides from plasma membranes and microsomes of rat liver. *FEBS Lett.*, 1970; 11(1): 29-32
- 2) Kawasaki N, Saito K: Studies on a phospholipase B from *Penicillium notatum* Purification, properties, and mode of action. *J. Biochem.*, 1975; 77(6): 1233-1244
- 3) Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I: Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J. Biochem.*, 1983; 94(3): 937-947
- 4) Ikeda K, Sannoh T, Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I: Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262(16): 7451-7454
- 5) Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I: Serum lectin (mannan-binding protein) has complement-dependent bactericidal activity. *J. Biochem.*, 1989; 106(3): 483-489
- 6) Janeway CA: 免疫生物学—免疫系の正常と病理 原著 第5版; 笹月健彦監訳. 東京, 南江堂, 2003; 43-64
- 7) 川崎伸子, 中川知明, 川崎敏祐: 第2章 医療技術の基礎 第9節 血清マンナン結合タンパク質と生体防御 谷口直之・伊藤幸成編, 糖鎖科学の新展開. 東京, エヌ・ティー・エス, 2005; 281-288
- 8) Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I: Mannan-Binding Protein and Conglutinin in Bovine Serum. *J. Biochem.*, 1985; 98(5): 1309-1320
- 9) Kawasaki N, Yokota Y, Kawasaki T: Differentiation of Conglutination Activity and Sugar-Binding Activity of Conglutinin after removal of NH<sub>2</sub>-Terminal 54 Amino Acid Residues by Endogenous Serine Protease (s). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993; 305(2): 533-540
- 10) Kawasaki N, Ito N, Kawasaki T: Gene organization and 5'-flanking region sequence of conglutinin; A C-type mammalian lectin containing a collagen-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994; 198(2): 597-604
- 11) 川崎伸子: 生体防御因子コレクチン Collectins and their Roles in Host Defense. *FCGA (Forum: Carbohydrates Coming of Age): GlycoForum/GlycoScience/Glycoword*, 1998 URL; <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA06J.html>
- 12) Ma Y, Uemura K, Oka S, Kozutsumi Y, Kawasaki N, Kawasaki T: Antitumor activity of mannan-binding protein *in vivo* as revealed by a virus expression system: Mannan-binding protein dependent cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1999; 96(2): 371-375
- 13) Terada M, Khoo K-H, Inoue R, Chen C-I, Yamada K, Sakaguchi H, Kadowaki N, Ma BY, Oka S, Kawasaki T, Kawasaki N: Characterization of oligosaccharide ligands expressed on SW1116 cells recognized by mannan-binding protein. A highly fucosylated poly(lactosamine) type N-glycan. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280(12): 10897-10913