

## Bリンパ球におけるシアル酸修飾の機能解明に向けて

### はじめに

シアル酸は通常糖鎖の末端を占め、その糖鎖が細胞表面を覆っていることから、細胞の最外部に存在する分子であると考えられる。シアル酸は名前の通り酸性のカルボキシル基をもつ9炭糖の総称である<sup>1)</sup>。体内のすべての細胞を覆うシアル酸は生体の生存に必須であり、シアル酸生合成経路を欠損するマウスは胎生4日には死亡する。この表現型はヘテロ変異体母親由来のシアル酸が卵及び胎盤から供給され、シアル酸がある程度補給されているにもかかわらずおこるもので、非常に強いものであると考えられる<sup>2)</sup>。

### 1. シアル酸の機能

シアル酸の機能にはどういったものが考えられるであろうか？ まずシアル酸が細胞表面に発現することで細胞膜に負電荷をもたらす物理化学的な性質が考えられる。一方で、シアル酸は前述のように細胞の外部から細胞にアクセスする状況を考えて場合に、その最前線に存在する分子であり、細胞認識において重要な役割を果たす。例えば、インフルエンザウイルスは宿主細胞を認識するための受容体タンパク質、ヘマグルチニンをもち、これを介して感染すべき宿主を探し当てる。また、内在性のシアル酸認識機構も重要な役割を果たしており、リンパ球などの免疫細胞はシアル酸をエピトープとして含む糖鎖を利用することで、血流中から標的器官へのホーミングが可能となる。シアル酸は膜に電荷的な性状を与えると共に分子認識時のエピトープとしても働く。

シアル酸分子が生体内で上述のような多様な認識機構に応じて働くための分子的な基盤として、シアル酸構造の多様性があげられる。シアル酸はシアル酸転移酵素によって、複数の糖から構成される糖鎖の末端に付加される。シアル酸転移酵素はその内側の糖など結合様式の種類により、大きく4種類に分類され、シアル酸の結合様式はそれぞれの細胞やシアロ化される糖タンパク質で制御されている。これに加えて、シアル酸分子は多様に修飾され、C5位に注目すると、哺乳類では*N*-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc)と*N*-アセチルノイラミン酸(Neu5Ac)が主要な分子種である。一方、C9位の水酸基に注目すると、こ

れがアセチル化しているもの(9-O-Ac)がみられる(図1A)。結合様式と分子種が組み合わさることにより、シアル酸の細胞表面での発現形態は非常に多岐にわたり、生体内ではこれらの組み合わせの使い分けによって適切な分子間認識を達成していると考えられる<sup>3)</sup>。

### 2. B細胞におけるシアル酸認識分子 CD22

B細胞においてもその膜タンパク質の多くがその糖鎖末端にシアル酸をもち、シアル酸を介した分子認識に関わる可能性が考えられる。B細胞上のシアル酸分子の修飾の違いを認識する分子として、CD22 (Siglec-2) 分子が知られている。CD22はB細胞抗原受容体(BCR)からの細胞内シグナル伝達を負に制御する活性をもつ共受容体分子である<sup>4)</sup>。CD22は細胞外領域にレクチンドメインを、細胞内領域にITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) をもち、リン酸化依存的にチロシンホスファターゼ SHP-1 を動員する(図1B)<sup>5)</sup>。CD22はシアル酸結合レクチンである Siglec ファミリーに属し、CD22の認識するリガンド糖鎖の特異性として、ヒト、マウス共に $\alpha$ 2-6結合したシアル酸を末端にもち、ガラクトース(Gal)、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)をもつ三糖を主たるエピトープとすることが明らかにされている。このため、当初 $\alpha$ 2-6結合したシアル酸を生合成するシアル酸転移酵素がそのリガンド発現に優位な機能をもつと考えられていた。マウスCD22はシアル酸分子種としてNeu5Gcをもつものを親和性高く認識するが<sup>6)</sup>、ヒトCD22は内側のGlcNAcが硫酸化された構造に高親和性を示す。そこで、CD22はシアル酸の修飾変化によっても糖鎖リガンドとの相互作用が調節されうる可能性が考えられた。また、CD22分子は糖鎖情報を細胞内シグナル伝達に変換できるという分子的特徴を有するため、シアル酸分子種がその機能制御に影響を及ぼす可能性が考えられたため、CD22のリガンド糖鎖発現がどのように制御されているかについて興味をもたれた。

### 3. マウス CD22 糖鎖リガンド発現は活性化依存的な制御を受ける

CD22の結合特異性に関わる詳細な知見とは対照的に、CD22リガンドの発現制御に関しては多くは知られていなかった。当時筆者らはcDNAマイクロアレイ解析を用いた新たな表現型-遺伝型解析法であるCIRES (correlation index-based responsible enzyme gene screening) 法<sup>7)</sup>を用い、エピトープ未知のままマーカーとして使用されていた単クローン抗体のGL7がNeu5Ac $\alpha$  2-6 Gal $\beta$  1-4 GlcNAc-Rを

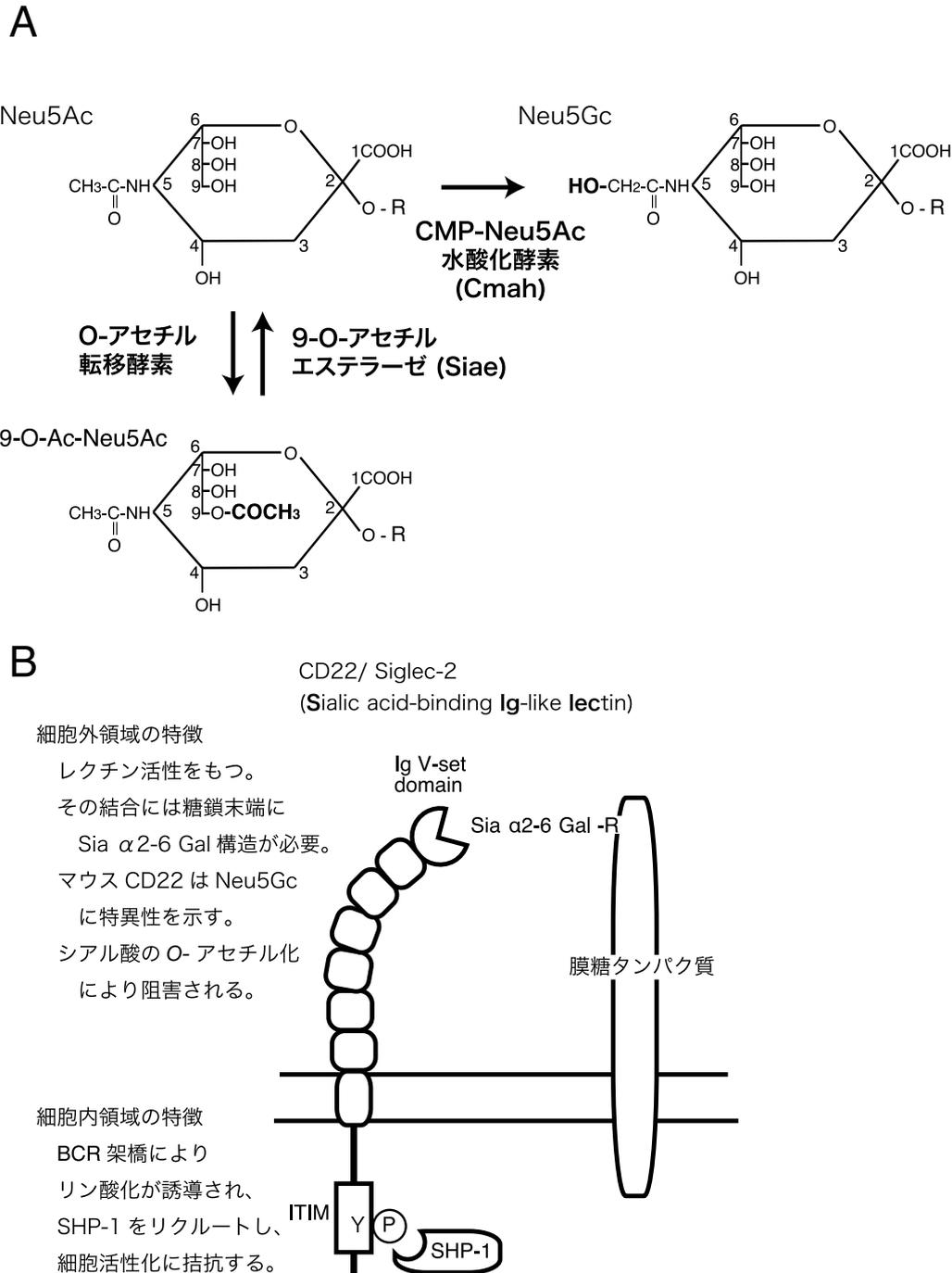


図1 シアル酸分子種とシアル酸結合レクチン CD22 (Siglec-2)

(A) シアル酸分子種の構造 Neu5Ac と Neu5Gc は酸素原子一つの違いをもち、この変換反応は細胞質の CMP-Neu5Ac 水酸化酵素 (Cmah) の反応による。C-5 位の修飾とは独立して C-4, 7, 8, 9 位の水酸基の O-アセチル化がおこる。ここでは C-9 位の水酸基がアセチル化した 9-O-Ac Neu5Ac を示す。O-アセチル化転移酵素により水酸基にアセチル基が付加されエステラーゼにより分解されるが、この反応は主にタンパク質等に付加された糖鎖上でおこると考えられている。

(B) CD22 分子 CD22 は細胞外領域に Siglec ファミリーに共通のシアル酸結合領域を構成するイムノグロブリン V-set ドメインをもち、ここでシアロ糖と結合する。細胞内領域には ITIM モチーフをもつ。BCR 刺激依存的に ITIM 中のチロシンが Src ファミリーのプロテインキナーゼにより一過的にリン酸化されると、チロシンホスファターゼ SHP-1 が動員され、SHP-1 活性によりシグナル伝達が負に制御される。

末端にも糖鎖と反応する抗糖鎖抗体であることを明らかにしていた<sup>8)</sup>。GL7が染色する胚中心は、タンパク質性抗原などのT細胞依存性抗原により免疫刺激が入った場合に、二次リンパ器官内に生じる濾胞であり、特に活性化B細胞がイムノグロブリン遺伝子のクラススイッチ変異や親和性成熟する場であることが知られている。しかしながら、活性化依存的なGL7染色の機能的な意義も明らかになっておらず、B細胞においては $\alpha$ 2-6結合するシアル酸が恒常的に発現することが知られており、GL7の染色特異性はその知見と相反するよう思われた。

そこで、GL7がなぜ胚中心B細胞特異的に染色をもたらすことができるかを明らかにするため、マウスをT細胞依存性抗原であるヒツジ赤血球で免疫し、胚中心反応を誘導し、CD22とGL7の共染色を行った。その結果、胚中心反応にともない、活性化B細胞はGL7の染色を陽性にすると共に、この部位でのCD22リガンド発現が抑制されることを見出した(図2A)。また、GL7陽性胚中心B細胞においては、シアル酸画分中のNeu5Gc含有率が低下しており、これと同時にNeu5Gcの生合成を行う酵素であるCMP-Neu5Ac水酸化酵素(Cmah)の発現も低下していることを明らかとした(図2B)。つまり、GL7は胚中心でのNeu5Gc減少を介したCD22リガンドの減少を検出する抗体であることが明らかとなった。一方、Neu5Gc発現を欠くCmah欠損B細胞はそのBCR刺激に応じた細胞増殖が亢進しており、Neu5GcはB細胞活性化に抑制的に働くことが考えられた。以上まとめると、BCRを介した活性化シグナルを受けたB細胞は活性化依存的にシアル酸分子種のうちNeu5Gcの発現を抑制する。Neu5GcはB細胞の活性化を負に制御することから、シアル酸分子種変化を介したB細胞活性化を制御するポジティブフィードバック機構が存在することが明らかとなった(図2C)。また、B細胞におけるNeu5Gc機能の標的としては、CD22が少なくともその一部には関与することが予想された。

GL7は胚中心のみならず、B細胞の分化成熟段階においてプレB細胞の段階で発現することが知られている。このことは、CD22リガンドの発現がこのリンパ球の共通の幹細胞から分化する段階においても抑制されていることを意味する。プレB細胞と胚中心B細胞の共通点はBCRからのシグナル伝達を受け、生存、増殖に関わる点にある。これらの段階でのCD22リガンドの発現の調節はCD22のBCRシグナル伝達調節能力と相関すると考えられ非常に興味深い。

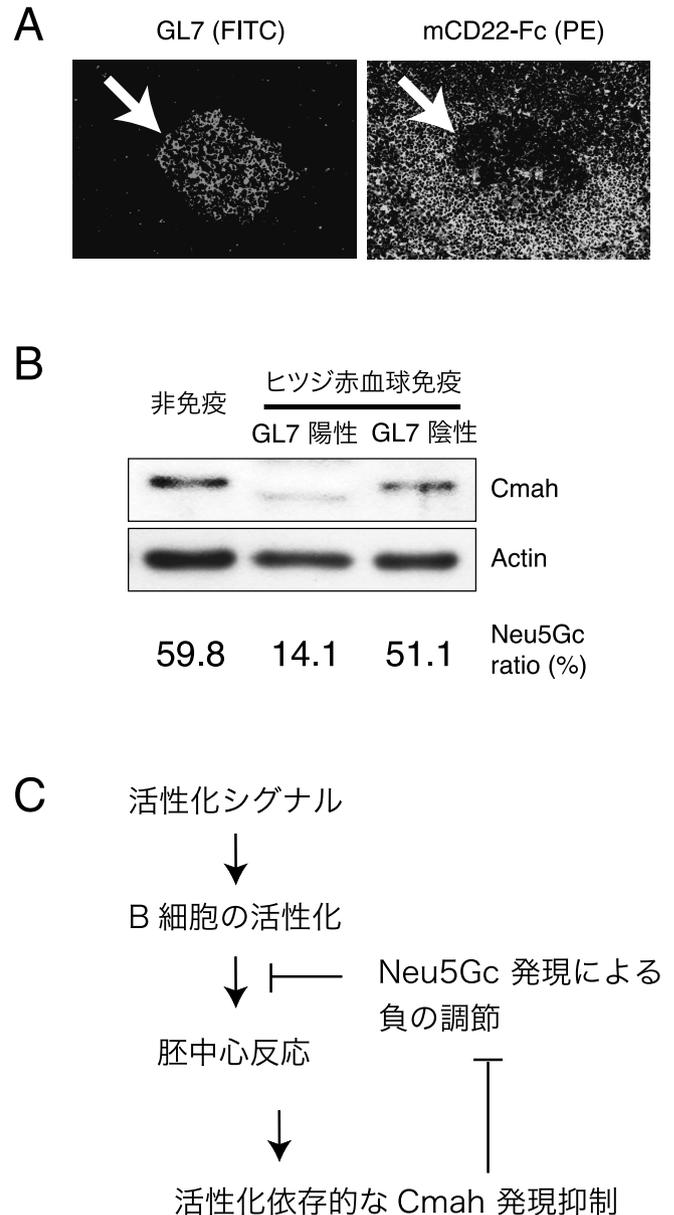


図2 マウス胚中心におけるシアル酸分子種の変化

(A) Neu5Ac 2-6 Gal 1-4 GlcNAc を認識する GL7(左)と Neu5Gc 2-6 Gal 1-4 GlcNAc に高親和性を示す mCD22-Fc プロープ(右)での同一切片の二重染色像を示す。両プロープは T 細胞依存性抗原で免疫することで誘導される胚中心部分(矢印)とその周りの B 細胞領域での対照的な染色パターンを示した。

(B) ヒツジ赤血球で免疫したマウス脾臓由来 GL7 陽性細胞およびコントロール細胞での Cmah 及び Neu5Gc 発現は、それぞれウエスタンブロッティング法及びシアル酸を蛍光標識し定量する DMB 法により検出した。Neu5Gc%はシアル酸中の Neu5Gc の割合を示す。

(C) 活性化 B 細胞における Neu5Gc 発現抑制をともなうポジティブフィードバック的な制御機構。

#### 4. 9-O-アセチル化によるシアル酸の修飾

シアル酸は前述のように水酸基の O-アセチル化によっても修飾される (図 1A)。この修飾は C-5 位の修飾と比較すると、シアル酸がシアル酸転移酵素により糖鎖末端に付加された後に糖鎖上で O-アセチル転移酵素により触媒されておこること、その修飾には脱アセチル化酵素が存在することなど、その性質を異にする<sup>9)</sup>。Neu5Gc の生合成は細胞質で CMP-Neu5Ac を前駆体としておこるが、Neu5Gc から Neu5Ac を生合成する細胞内での酵素反応は知られていないことから、より動的な制御は O-アセチル化により可能であると考えられる。しかしながら、シアル酸 O-アセチル化については未解明な部分が非常に多い。現時点でこの反応に関わる酵素のうちその遺伝子が同定されているものはリソソーム型と細胞質型両者の脱アセチル化酵素を異なるプロモーターから発現する *Siae* 遺伝子のみである<sup>10,11)</sup>。一方で、糖鎖リガンド中のシアル酸に O-アセチル化がおこると、CD22 はこれを認識することができないため、O-アセチル化は CD22 のリガンド発現に対して阻害的に働くことが報告されている<sup>12)</sup>。

そこで、シアル酸 O-アセチル化の生理的意義を明らかにする目的で、*Siae* 遺伝子欠損マウスを作製した。*Siae* 欠損マウスの表現型解析の結果、シアル酸分子の C9 位の水酸基の O-アセチル化 (図 1A) を検出する C 型インフルエンザウイルスヘマグルチニンエステラーゼ Fc プロープ (CHE-FcD) を用いてフローサイトメトリーで検討すると、CHE-FcD による細胞表面での染色の上昇がみられ (図 3A)、このことから、*Siae* はリソソームでの分解のみに関わるというよりは、細胞表面での O-アセチル化の制御に関わることが明らかとなった。未成熟 B 細胞が濾胞 B 細胞と辺縁帯 B 細胞に分化していく際には、BCR (細胞表面 IgM) から入力されるシグナル強度が分化の方向性を決めるというシグナル強度仮説 (図 3B) が Pillai らにより提唱されている。*Siae* 欠損マウス B 細胞においては BCR を介した細胞内シグナル伝達も亢進していたことから、濾胞 B 細胞への分化が辺縁帯 B 細胞への分化に対して減少していることが考えられた (図 3C)。また、B 細胞分化における表現型と共に、*Siae* 欠損マウスにおいては自己免疫反応がみられ、CD22 欠損マウスにおける表現型とも一定の合致を示したため、実験的な検証を待つ必要はあるが、CD22 糖鎖リガンドの制御不全が *Siae* 欠損の表現型の少なくとも一部には関わることが考えられた<sup>13)</sup>。

#### 5. ヒトにおける CD22 リガンド糖鎖の発現制御

糖鎖の発現は動物種特異性を示し、それぞれの動物種のもつ末端糖鎖はその生物がこれまで経てきた進化による選択を反映していると考えられる。糖鎖は細胞の最外部に発現し、病原体からの標的となるという発現部位の性質上、進化的に糖鎖変異を誘導するものとして、主に病原体からの認識が考えられる。一方で、内在性リガンドを認識する動物レクチンの機能は、内在性リガンド糖鎖との相互作用に依存する。そこで、細胞が発現する糖鎖の進化においては、内在性リガンド糖鎖を機能的に保持する選択圧と病原体からの認識から逃れるために変化させる選択圧がかかることが考えられる<sup>14)</sup>。活性化依存的に胚中心 B 細胞で CD22 のリガンド糖鎖が抑制されるというマウスにおける知見の進化的な意義は、他の動物種において同様の制御が行われているかについて検討することで明らかになる。

神奈木らはヒト CD22 が糖鎖リガンドとして Sia $\alpha$  2-6 Gal $\beta$  1-4 (6-SO<sub>3</sub>) GlcNAc-R をもつ糖鎖に高い親和性を示すことに注目した。KN343 抗体は同様の糖鎖をもつ硫酸転移酵素発現細胞株を免疫源にして単離されたモノクローナル抗体で、ヒト CD22 の細胞外領域と IgG の定常領域からなる融合プローブの細胞に対する染色を競合的に阻害する。この抗体を用いてヒトリンパ節の切片を染色すると、リンパ節の皮質の深層に分布する高内皮細静脈が非常に強く染色されると共に、胚中心領域においてその染色強度が著しく低下していることが明らかにされた。また、このとき硫酸化していない Sia $\alpha$  2-6 Gal $\beta$  1-4 GlcNAc-R を認識する GL7 を用いると胚中心が弱く染色されていたことから、KN343 反応性の低下は硫酸化の発現抑制によりもたらされていることが明らかとなった (図 4)<sup>15)</sup>。これらの結果は、使用される機構は異なるものの、動物種にかかわらず B 細胞が活性化すると  $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸をもつ糖鎖の発現は維持しつつ CD22 の糖鎖リガンドの抑制がおこることを示唆するものである。

#### おわりに

本稿ではシアル酸分子の修飾の B 細胞における機能に関して、CD22 に関わる点に焦点を絞りいくつかのトピックを提示したが、シアル酸を介した分子間認識はそれ以外の系 (細胞) においても行われており、ここで挙げられなかったものは機能していないというよりは、実際にはまだまだ不明な部分が多い、というのが筆者の現時点での印象である。これからのこの分野でのさらなる研究の進展によ

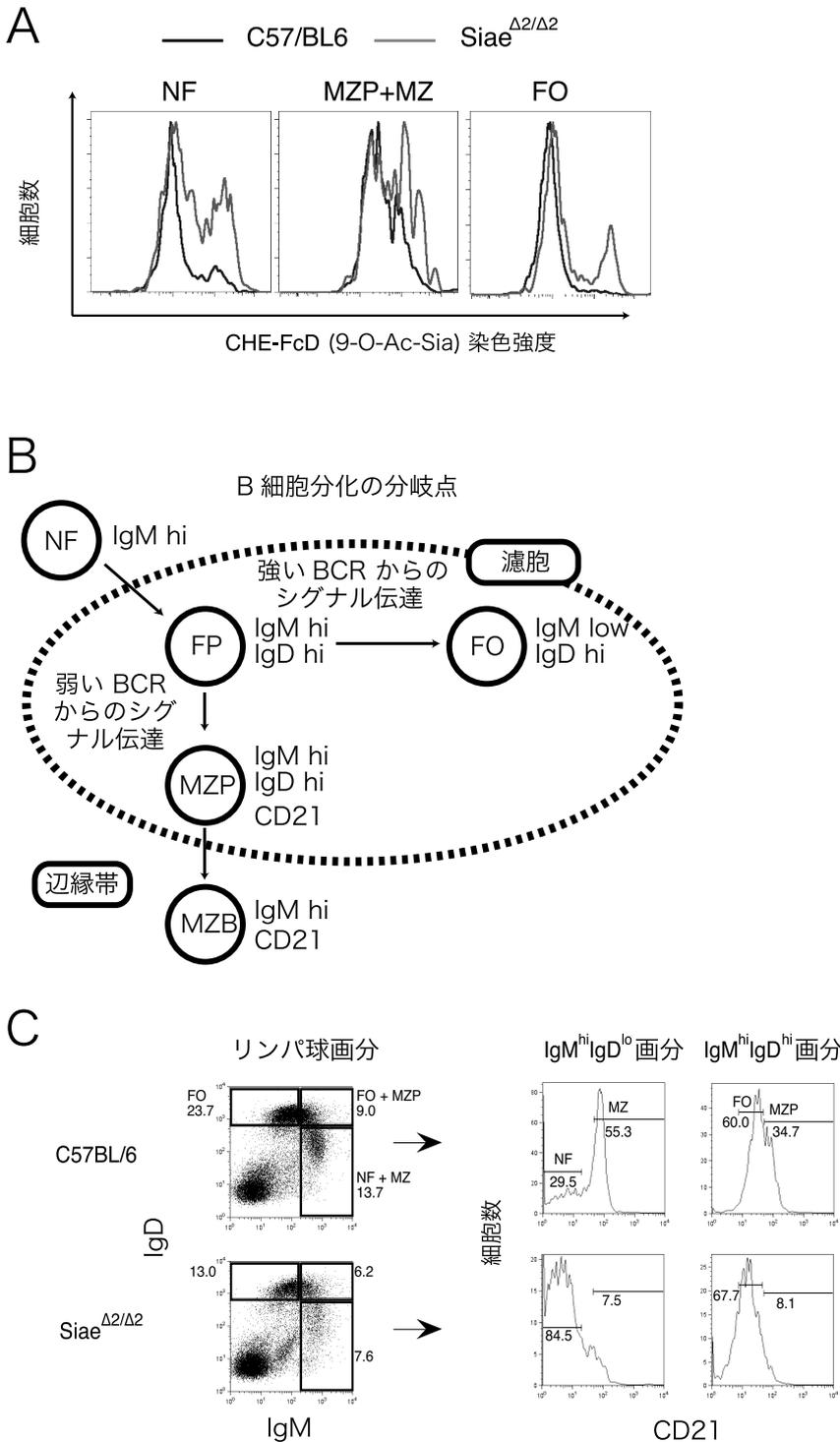


図3 *Siae* 欠損マウスにおけるB細胞に関わる表現型

(A) *Siae* 欠損マウスにおける細胞表面での9-O-アセチル化シアル酸の発現 9-O-Ac-Siaと特異的に結合するCHE-FcDプローブにより、脾臓リンパ球ゲートの細胞を染色した。NF, 新生B細胞, MZP, 辺縁帯B前駆細胞, MZ, 辺縁帯B細胞, FO, 濾胞B細胞. *Siae* 欠損マウス (*Siae*<sup>Δ2/Δ2</sup>) ではコントロールマウス (C57/BL6) 細胞と比較すると、各細胞種において、細胞表面でのCHE-FcD染色の強度が上昇している細胞が検出された。

(B) シグナル強度仮説 B細胞の分化は分化過程で受け取るBCRシグナルの強度により調節される。各細胞種の右側には、これらを同定するときに用いる細胞表面マーカーとIgM, IgDについてはその発現量の強弱 (hi/low) を示す。Annual Review of Immunology; Volume 23, Page 161-196より改変した。

(C) 辺縁帯B細胞及び濾胞B細胞への分化の影響 コントロールマウス (C57/BL6) (上段) と *Siae* 欠損マウス (*Siae*<sup>Δ2/Δ2</sup>) (下段) の脾臓B細胞の分化を(B)で示す細胞表面マーカーを用いて多重染色し、その分化の程度を検証した。リンパ球画分(左)のうちFO細胞に相当する画分における細胞数 (%) を示す。また、複数種類の細胞が混合していると考えられるIgM強陽性画分に関しては、IgDの発現量に応じてゲーティングし、それらの細胞でのCD21の発現を調べることで、各種細胞への分化を検討した(右)。それぞれの細胞種の割合をヒストグラム内での数字で示す。*Siae* 欠損マウスにおいて、顕著な辺縁帯B細胞の減少がみられた。

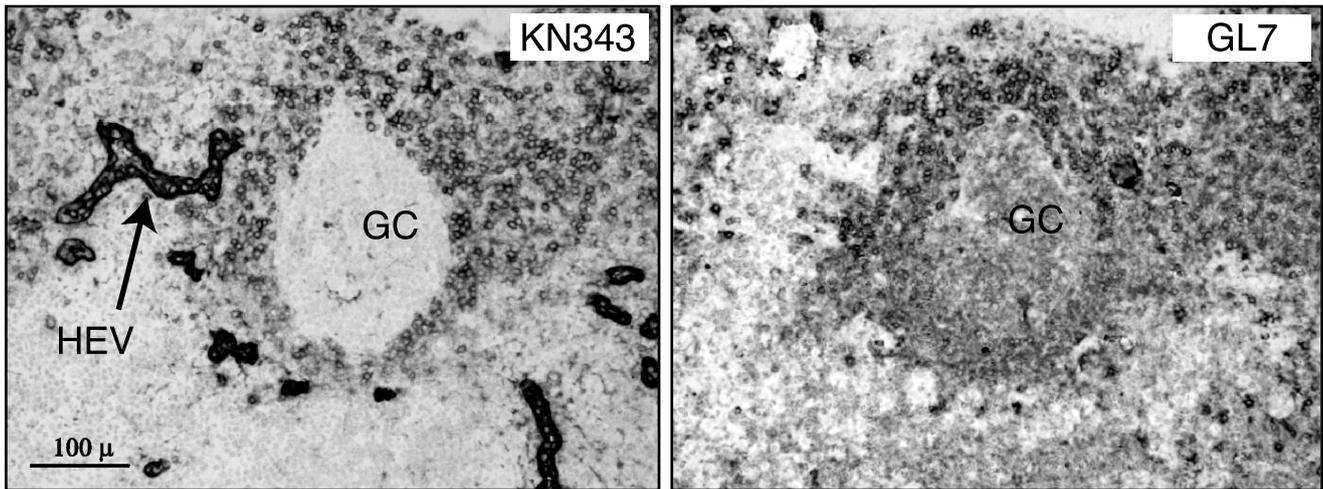


図4 ヒト胚中心におけるシアロ糖鎖の発現  
ヒトリンパ節のKN343 (左) 及びGL7 (右) 染色像 HEVは高内皮細静脈を, GCは胚中心領域を示す。

り, この分からないことだらけの現状を打破できることを期待する。なお, 本稿の脱稿後, Pillaiらにより *SIAE* 遺伝子がヒトの自己免疫発症とリンクする遺伝子であり, シアル酸修飾が末梢におけるトレランスを規定する因子であることが報告されている。(Surolia I, et al, *Nature*, 2010 Jul 8; 466 (7303): 243-7.)

ここで取り上げた仕事は多くの先生との共同研究の結果である。本稿を終わるにあたって, 特に愛知がんセンター 神奈木玲児先生, 東海大学鈴木明身先生, カリフォルニア大学サンディエゴ校 Ajit Varki 先生, ハーバード医学研究所 Shiv Pillai 先生, 京都大学生命科学研究科小堤保則先生に感謝の意を表す。

- Schauer, R. (1982) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40, 131-234.
- Schwarzkopf, M., Knobloch, K.P., Rohde, E., Hinderlich, S., Wiechens, N., Lucka, L., Horak, I., Reutter, W., & Horstkorte, R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 5267-5270.
- Varki, A. (1997) *FASEB J.*, 11, 248-255.
- Sato, S., Tuscano, J.M., Inaoki, M., & Tedder, T.F. (1998) *Semin. Immunol.*, 10, 287-297.
- Crocker, P.R., Paulson, J.C., & Varki, A. (2007) *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 255-266.
- Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M.T., Tang, S., de Bellard, M.E., Schnaar, R.L., Mahoney, J.A., Hartnell, A., Bradfield, P., & Crocker, P.R. (1994) *Curr. Biol.*, 4, 965-972.
- Yamamoto, H., Takematsu, H., Fujinawa, R., Naito, Y., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Suzuki, A., & Kozutsumi, Y. (2007) *PLoS One*, 2, e1232.
- Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto,

- H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Itoharu, S., Kawasaki, T., Suzuki, A., & Kozutsumi, Y. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, 27, 3008-3022.
- Varki, A. (1992) *Glycobiology*, 2, 25-40.
- Guimarães, M.J., Bazan, J.F., Castagnola, J., Diaz, S., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Varki, A., & Zlotnik, A. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 13697-13705.
- Takematsu, H., Diaz, S., Stoddart, A., Zhang, Y., & Varki, A. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 25623-25631.
- Sjoberg, E.R., Powell, L.D., Klein, A., & Varki, A. (1994) *J. Cell. Biol.*, 126, 549-562.
- Cariappa, A., Takematsu, H., Liu, H., Diaz, S., Haider, K., Boboila, C., Kalloo, G., Connole, M., Shi, H.N., Varki, N., Varki, A., & Pillai, S. (2009) *J. Exp. Med.*, 206, 125-138.
- Gagneux, P. & Varki, A. (1999) *Journal.*, 9, 747-755.
- Gagneux, P. & Varki, A. (1999) *Glycobiology*, 9, 747-755.
- Kimura, N., Ohmori, K., Miyazaki, K., Izawa, M., Matsuzaki, Y., Yasuda, Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Moriyama, A., & Kannagi, R. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 32200-32207.

竹松 弘

(京都大学生命科学研究科システム機能学分野)

Regulation and function of sialic acid modifications in B lymphocytes

Hiromu Takematsu (Kyoto University School of Biostudies, Laboratory of Membrane Biochemistry and Biophysics, 46-29 Yoshida-Shimoadachi, Sakyo, Kyoto 606-8501, Japan)