

Jacques Monod Conference on "Chemistry, Biochemistry and Molecular Biology of Glycoconjugates" - Aussois, France (October 22-27, 1990) -

Jacques Monod コンファレンス "複合糖質の化学、生化学、分子生物学" Aussois France、1990年10月22-27日

Nathan SHARON¹⁾ and Johannes F. G. VLIEGENTHART²⁾

The Weizmann Institute of Sciences¹⁾, Israel, FAX: 972-8-4669, and Bijvoet Center for Biomolecular Research²⁾, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, FAX: 31-30-540980

Sixty-two scientists, from France and other European countries as well as North America and Asia, participated in the above conference. There were 33 lectures, usually of 45 minutes each (including discussion), most of which were by invited speakers. In addition, some 25 posters were presented.

The field of glycoconjugates, more recently referred to as glycobiology, is one of the fastest growing areas of biomedical research; the number of papers published annually in this field approaches the 10,000 mark. To summarize the conference, it is convenient to deal separately with structure, biosynthesis and functions of glycoconjugates, always remembering that knowledge of structure is required for understanding biosynthesis (and degradation), which together provide a basis for elucidation of the biological functions of glycoconjugate glycans in health and disease.

Structure

There have been remarkable advances in techniques for separation of glycoprotein glycans and for their structural analysis, especially by instrumental methods such as the various forms of mass spectrometry (Fournet) and NMR (Vliegenthart). Current methodology permits the structural elucidation of glycans at the nanomole, and sometimes even picomole, level. One result of this is the discovery of new monosaccharide constituents of glycoconjugates, and the realization of the wide occurrence of sugars considered to be a rarity. The latter include furanose forms, such as galactofuranose (Kamerling, Ferguson), that are usually ignored by biochemists; in this context, it should be recalled that arabinofuranose is a common constituent of many plant glycoproteins such as potato and tomato lectins. This raises interesting problems of biosynthesis, since nothing is known about the enzymatic formation of such components. *N*-Glycolylneuraminic acid appears to occur much more widely than thought before (Schauer, Bouhours). It contributes to microheterogeneity of glycoproteins, a subject little discussed at the conference (except in relation to heparin). Because it is apparently a strong immunogen, it should be carefully considered by the biotechnological industry. A previously unrecognized 6-*O*-sulfated *N*-acetylglucosamine, located in the vicinity of the carbohydrate-protein linkage region of heparin, has been identified (Sugahara). Other examples of rare constituents include 3-*O*-methyl sugars (Kamerling, Van der Ven), deaminated Sia (Troy), sialic acid in insects reported for the first time (G. Kornfeld), and α -linked *N*-acetylglucosamine

Jacques Monod コンファレンスにはフランスを含むヨーロッパ、北アメリカ、そしてアジアから62名の科学者が参加した。カンファレンスの内容は招待演者による45分間のレクチャー33題と25題のポスターであった。最近、糖生物学とも呼ばれる複合糖質の分野は生物医学研究で最も進展のある分野の一つである。それらに関する研究論文数は毎年1万近くになる。カンファレンスを要約するためには複合糖質の構造、生合成そして機能の3つ分野に分けて述べる方が便利であるが、しかし構造の知識は生合成(と分解)を理解するために必要であり、そして正常と病気における複合糖質グリカンの生物学的機能を理解するための基礎知識であることを常に念頭におかねばならない。

構造

糖タンパクグリカンの分離技術と特に色々なタイプのマススペクトル(Fournet),NMR(Vliegenthart)等の機器分析による構造解析の技術進歩には著しいものがある。最近の方法では、ノナモル、時にはピコモルのレベルのグリカンの構造解析が可能である。この1つの成果は複合糖質の新しい構成糖の発見であり、稀なと思われた糖が広く存在していることが分かった。後者の例としては、生化学者に常に軽視されているガラクトフラノースの様なフラノースタイプの発見が挙げられる(Kamerling, Ferguson);この点に関して、アラビノフラノースはポテトやトマトのレクチンのような植物性糖タンパクの一般的な構成糖であることを思い出すべきだろう。そのような化合物の酵素的生成は全く知られていないので生合成における興味ある課題になる。*N*-グリコリルピラミン酸は以前考えられたより広く存在するらしい(Schauer, Bouhour)。ヘパリン以外このカンファレンスでは殆ど討論されなかったが、それは糖蛋白のマイクロヘテロジェニティーに関係している。それは強い抗原性を有しているため、バイオテクノロジーでは注意すべきであろう。以前には認められなかった6-*O*-硫酸化-*N*-アセチルグルコミンが、ヘパリンと蛋白との結合付近に存在することが確認された(Sugahara)。他に珍しい構成糖としては、3-*O*-メチル化糖(Kamerling, Van der Ven)、デアミノシアル酸(Troy)、昆虫で初めてのシアル酸の報告(G. Konfeld)、そしていくつかの糖タンパクに α -結合のN-

in several glycoproteins.

The variety of structures found in glycoproteins is overwhelming, as exemplified by the mucins (Roussel, Hounsell) and the glycoposphatidyl inositol anchors (Ferguson). In the 1970's, it was commonly believed that, although an immense number of oligosaccharides can theoretically be formed from a dozen or so monosaccharides found typically in glycoconjugates, nature is fortunately quite selective in producing only a small fraction of these. With the unraveling of increasing numbers of new structures, the above belief seems no longer to be justified.

Chemical synthesis is essential for the confirmation of the structures of compounds found in nature or synthesized enzymatically. It is also extremely useful for the investigation of structure-function relationships in studies of enzymes, lectins, antibodies, etc., and for pharmacological purposes. Enormous advances have been made in the area of synthetic carbohydrate chemistry, so that oligosaccharides consisting of up to about 10 units, linear or branched, as well as different glycopeptides can now be synthesized; these include constituents of *N*- and *O*-linked glycoproteins (Paulsen, Van der Ven) and glycolipids (R. Schmidt), of the glycoposphatidyl inositol anchors (Ogawa) and of heparin (Sinaij, van Boeckel). It would appear that any oligosaccharide can now be synthesized by the experts, given the required time and resources. Simple methods for enzymatic synthesis of oligosaccharides, at a hundred milligram scale, using immobilized enzymes, have also recently become available (Auge).

Striking progress has been made in our knowledge of three-dimensional structures of oligosaccharides, based on X-ray, NMR and various modelling techniques. Many more molecular models were shown at this conference than at any past conference on glycoconjugates. The importance of such models is obvious - seeing is believing, and, as an ancient Chinese saying goes, one picture is better than a thousand words. Such models also have an enormous predictive power, as illustrated impressively by studies on the interaction between the active heparin pentasaccharide and antithrombin III (van Boeckel). One result of the modelling has been the design and synthesis of a super-active heparin pentasaccharide with 6-*O*-sulphate at the reducing end glucosamine. These studies also clearly illustrated that the frequently ignored electrostatic interactions may play a key role in the formation of carbohydrate-protein complexes. In fact, nearly all the interactions which bind the heparin pentasaccharide to antithrombin III are electrostatic.

Impressive evidence, based on modelling experiments, was presented to show that oligosaccharides in solution can adopt a large number of conformations (Perez, Spik). Of these, only a few - sometimes very few - are recognized by carbohydrate specific proteins, for example by lectins. Studies of three-dimensional structures of lectins are giving insight into the molecular basis of carbohydrate-protein interactions (Perez, Sharon) as well as of *N*-linked oligosaccharides in glycoproteins (Sharon).

Biosynthesis and Degradation

Considerable progress has been made in the area of bio-

アセチルグルコサミンの存在が挙げられる。ムチン(Roussel, Hounsell), グリコホスファヂルイノシトールアンカー(Ferguson)に見られるように糖蛋白質に見いだされる糖鎖構造の多様性は1970年代では、複合糖質中に見出せる1ダース以上の単糖から出来るオリゴ糖は、理論的に膨大な数になるけれども、自然は幸運にもこれらの中からごく少量の物しか生成されないような選択をすると、一般的に信じられていた。新しい構造の数が増えるとともに、上の様な信念はもはや正しくないだろう。

化学合成は天然物や酵素的な合成物の構造を確認するために重要である。特に酵素、レクチン、抗体などの研究における構造と機能との関係の研究や、薬学的な研究には有効な手段である。糖化学合成の分野にも著しい進歩があった。直鎖、分鎖の10糖以上のオリゴ糖、そして色々なグリコペプチドを今日では合成できるようになった; *N*-および、*O*-結合型糖タンパク糖鎖を含めた糖グリコペプチド(Paulson, Van der Ven)、グリコシルホスファヂルイノシトールアンカー(Ogawa)、糖脂質(R. Schmidt)、そしてヘパリンのオリゴ糖(Sinaij, Van Boeckel)など。あらゆるオリゴ糖はエキスパートと、必要な時間と材料で合成できる時代になった。最近、100ミリグラムのレベルのオリゴ糖ならば簡単な酵素(固相化)を用いた合成法が利用できる(Auge)。

X線、NMRそして種々のモデル化の手法によりオリゴ糖の三次構造の知識は著しく進歩した。今回のカンファレンスでは、過去のどのような複合糖質のカンファレンスよりも分子モデルに関するものが多かった。”百聞は一見にしかず”や古代中国のことわざ”何千の言葉より一枚の画”に引用されるようにモデルの重要性は明かである。活性ヘパリンの5糖とアンチトロンビンIIIとの相互作用に関するモデル研究(van Boeckel)では分子モデルが大きな説得力になった。モデル化の成果の1つは還元末端のグルコサミンに6-*O*-硫酸化された非常に活性の強いヘパリン活性をもつ5糖をデザインし、合成できたことである。このモデル研究から、しばしば無視された静電的作用が糖-タンパクの複合体に重要な役割をしているのが説明された。事実、ヘパリンの5糖をアンチトロンビンIIIに結合させる殆ど全ての相互作用は静電気作用である。

モデル実験による印象的な事実によって、溶液中のオリゴ糖のコンフォメーションは数多く可能であることが示された(Perez, Spik)。これらのコンフォメーションのうち少数のものが、時には極く僅かなものがレクチンのような糖特異的タンパクに認識される。レクチンの三次構造の研究によって糖-タンパクの相互作用(Perez, Sharon)や糖タンパクの*N*-結合のオリゴ糖の分子構造が明かとなる。

生合成と分解

部分的には通常の方法やグリコシル化の欠損のある変異動物細胞の使用により、そして主として新しい遺伝子工学的手法の導入により生合成と分解の分野では著しい進展が見られた。

synthesis and degradation, based in part on the use of conventional methods and of animal cell mutants defective in glycosylation but greatly stimulated by the use of novel techniques of gene cloning and manipulation. Also of great importance is the increasing availability of glycosyltransferase genes and efficient transfection methods (Brockhausen, Lowe). The latter open the way for the biosynthetic fashioning, at will, of the carbohydrate units of glycoproteins and glycolipids. Much has been learned about the mechanism of formation of *N*-glycolylneuraminic acid by enzymatic hydroxylation of CMP-NeuAc and of the large variety of *O*-acetylated sialic acids (Schauer). Further dissection of the cellular machinery of *N*-glycosylation has given a more detailed view of the topography and mechanism of the individual steps involved (Hirschberg). Evidence has been presented to show that the reactions leading to the formation of $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (the early intermediate in the dolichol phosphate cycle), all occur at the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum. The sugar nucleotides required for further glycosylation steps in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus enter into the lumen of these organelles by specific carriers, or antiporters, one of which (that for phosphoadenosylphosphosulfate) has been purified to a high degree (Hirschberg). Novel control mechanisms of *N*-glycosylation, such as the pyrophosphatase cleavage of the dolichol pyrophosphate-linked oligosaccharides, have been described (Verbert). More has been learned about the sequence and sites of *O*-glycosylation, from the transfer to the polypeptide backbone of the first *N*-acetylgalactosamine residue in the *cis* Golgi to the attachment of the "terminating" sialic acid in the *trans* Golgi (Fukuda), the control of fucosylation of glycoproteins (Glick), and the biosynthesis of gangliosides using synthetic neoglycolipids as substrates (Egge). There is little doubt that cloning of additional enzymes required for glycosyltransferases will give a more detailed picture of these processes.

However, in spite of much effort, including the use of genetically engineered protein mutants (mostly of interleukin-2, which has one carbohydrate unit, *O*-linked to Ser-3), no clear picture has yet emerged of the structural features of the protein acceptor required for *O*-glycosylation (Conradt). We still face the important question of how do glycosyltransferases recognize the acceptor protein (or glycoprotein). If we knew this, we could explain why glycosylation is cell specific, and often also protein specific. An important clue comes from studies on the attachment of sulfated *N*-acetylgalactosamine in glycoprotein hormones, such as human gonadotropin and lutropin (Baenziger). Here, genetic engineering has been successfully employed to identify a tetrapeptide sequence required for binding of the special GalNAc transferase which catalyses the first reaction in the formation of the sulfated units. This is the first example of recognition by a glycosyltransferase of features encoded within a primary sequence, in order to produce a unique oligosaccharide product.

The glycoprotein hormones are a recently found example of *O*-sulfation. Classical cases are the proteoglycans known for many years as "mucopolysaccharides". This area was pioneered at Columbia University, New York by Karl Meyer, who passed away last year at the age of 90. Meyer dis-

最も重要なことは糖転移酵素遺伝子の入手が可能となった事と、効果的な遺伝子の導入方法が可能となった事である(Brockhausen, Loweら)。その導入法により糖タンパク、糖脂質の糖ユニットのデザインが可能になった。CMP-NeuAcの酵素的水酸化によるN-グリコリルノイラミン酸の生成やO-アセチルシアル酸の多様性のメカニズムについても多くのことが判った(Schauer)。細胞内のN-グリコシル化のからくりについても、トポロジーと各段階のメカニズムの詳細な発表があった(Hirschberg)。ドリコールリン酸サイクルの初期中間体である $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ の生成がそのサイクルの律速段階であり、すべての反応はERのサイトプラズマ側で起こっている。ERやゴルジ体内で次のグリコシルの段階に必要な糖ヌクレオチドは、特異的なキャリアーまたはアンチポターによりオルガネラのルーメンに運ばれる。そしてホスフォアデノシルホスフォサルファートのキャリアーは高純度に精製された(Hirschberg)。オリゴ糖に結合したドリコールピロリン酸のピロホスファターゼ分解による新しいN-グリコシル化のコントロールメカニズムについて発表された(Verbert)。O-グリコシル化の配列と部位、*cis*-ゴルジ体で最初のN-アセチルグルコサミンが受容体のポリペプチドに結合し、"末端"のシアル酸は*trans*-ゴルジ体で結合すること(Fukuda)、糖タンパクのフコシル化(Glick)、そして合成ネオ糖脂質を用いたガングリオリシドの生合成の研究(Egge)などについて多くのことが判った。糖転移酵素に必要な酵素のクローニングはこれらのプロセスをより詳細に明らかにすることは殆ど疑いないであろう。

しかしながら、遺伝子工学的に作られた変異タンパク(多くはSer-3に1つのO-結合の糖鎖をもつインターロイキン-2)を含め多くの努力にも関わらず、O-グリコシル化に必要な蛋白受容体の構造はまだ明かでない(Conradt)。グリコシルトランスフェラーゼが受容体タンパク(又は糖タンパク)をどの様に認識するかという問題にも解決が見い出せない。もしこの問題が解明できれば、グリコシル化が細胞やそしてしばしばタンパクに特異的であることを説明できる。重要な手がかりは、ヒトのゴナドトロピンやルトロピンの様な糖タンパクホルモンの硫酸化N-アセチルガラクトサミンの結合の研究(Baenziger)に見いだせる。彼らは遺伝子工学的手法により硫酸化されたユニットの生成の最初の反応を触媒する特別な酵素GalNAcトランスフェラーゼの結合に必要なテトラペプチド配列の同定に成功した。これは一次配列のなかにコードされたユニークなオリゴ糖を生成する為の情報の糖転移酵素による認識の最初の例である。

糖タンパクホルモンは最近発見された硫酸化の例である。古典的な例では、古くから知られている"ムコ多糖"であるプロテオグリカンが挙げられる。ニューヨークのコロンビア大学のKarl Meyerがこの分野のバイオニアとして知られていたが、昨年90歳でなくなられた。Meyerは1930年代にヒアルロン酸を発見、構造決定、次いでコンドロイチン硫酸とケラタン硫酸を発見、構造決定した。多くのグリコサミノグリカン(プロテオグリカンの糖成分の総称)のうちで最も複雑なのは高度にhetero-

covered hyaluronic acid in the 1930's and subsequently established its structure as well as the structures of the chondroitin sulfates and keratan sulfate. The most complex of the various glycosaminoglycans (the carbohydrate constituents of the proteoglycans) are the highly heterogenous heparin and heparan sulfate. They are of immense medical interest, although their function *in vivo* is still unknown. Current knowledge of the biosynthesis of these glycosaminoglycans was reviewed at the conference, with special emphasis on *N*-deacetylase (a key enzyme) and *N*-sulfotransferase (Lindahl). Studies of the purified enzymes revealed that both contain the same protein, but that the *N*-sulfatase requires for its activity an additional protein constituent. The latter may be a specifier protein, analogous to lactalbumin which shifts the acceptor specificity of β 1-4 galactosyltransferase from *N*-acetylglucosamine to glucose, thus leading to the synthesis of lactose for milk. There are indications that *N*-acetylneuraminic acid hydroxylase also consists of two proteins - an enzymic one and a specifier.

Glycoproteins formed must also be degraded - otherwise we will end up being stuffed with these compounds. The degradation of their carbohydrates is not random, but a very precisely ordered process, in which both exoglycosidases and endoglycosidases participate (Montreuil). Endoglycosidases may also play a key role in pathological processes, facilitating the migration and spreading of tumor cells and release of growth factors, all of which leads to metastasis (Vlodavsky).

Function

Understanding the function of the carbohydrates of glycoconjugates is the major aim of most, if not all, workers in the field. We want to know what the carbohydrates, linked to proteins or lipids in solution and on membranes surfaces, do. Another question is why and how do the carbohydrate moieties of glycoconjugates change during development, differentiation and malignant transformation? One thing is clear - carbohydrates have multiple functions. In the search for function, there is much emphasis on lectins, since these are carbohydrate recognizing proteins, widely distributed in nature.

One report at the conference dealt with bacterial adhesion mediated by surface lectins of these cells, which combine with glycolipids on the surface of the eukaryotic host cells (Karlsson). There is compelling evidence that such adhesion is prerequisite for infection. A recent demonstration is the finding that the specificity of *Escherichia coli* strains for dogs or humans is dependent on the presence, in the host tissues, of glycolipids to which the bacteria can specifically bind. Also, *E. coli* K99 causes diarrhea in young piglets and not in adult ones because *N*-glycolylneuraminic acid, for which the bacteria are specific, is present in the intestine of the young animals only.

Another presentation described elegant gene cloning and transfection experiments which led to the identification of the carbohydrate units involved in the lectin-like adhesion of leukocytes to endothelial cells, via ELAM-1, the endothelial-leukocyte adhesion molecule (Lowe).

Concluding Remarks

In this report, we have not been able to do justice to other presentations of interest, such as those on: the structure of

genousなヘパリンとヘパラン硫酸である。これらは医学的に興味深いものであるが、生体内での機能は判っていない。このコンファレンスではグルコサミノグリカンの生合成についてはN-deacetylase(キーとなる酵素)とN-Sulfotransferase(Lindahl)に重点を置いて総論的に述べられた。精製された2つの酵素は同一タンパクを有し、N-sulfataseの活性化のためには付加的なタンパク成分が必要である。後者は β 1-4ガラクトシルトランスフェラーゼの受容体の特異性がN-アセチルグルコサミンからグルコースに変わり、ミルクの乳糖を合成するラクトアルブミンに似た特異性タンパクである。N-アセチルノイラミン酸水酸化酵素は酵素部分そして特異性の部分の二つの蛋白からなる。

生成された糖タンパクは分解される必要がある、そうしなければそれらのもので一杯になり、糖鎖の分解はランダムではなく、二つの酵素、エキソグリコシダーゼとエンドグリコシダーゼが関係した正確かつ順序正しいプロセスである(Montreuil)。エンドグリコシダーゼは病理学的プロセスに重要な役割をもっている、つまりガンの悪性化に繋がる転移、拡大そして成長因子の放出を促進する(Vlodavsky)。

機能

この分野の大部分の研究者、それは全てではないにしても、の目的は、複合糖質の糖鎖の機能を理解することである。タンパク、脂質そして細胞膜上に結合した糖鎖は何をするのか私たちは知りたい。他の疑問点は、複合糖質の糖鎖の変化が発生、分化そしてガン化の過程で何故、そして如何に変化するかということである。1つだけ明らかなことは、糖鎖は多様な機能を持つことである。機能性に関する研究では、自然界に広く存在し、糖鎖を認識するタンパクに重点が置かれている。

このコンファレンスの1つの報告によれば、バクテリアはホストの真核細胞表面の糖脂質にバクテリアのレクチンを介して付着する(Karlsson)。その様な付着は感染に必要な条件というまぎれもない事実である。犬、あるいは人に対しての大腸菌の特異性は寄主の組織に大腸菌が特異的に結合する糖脂質の存在に依存している。また、大腸菌K99は子豚だけに下痢を起こさせるが、それはその菌が特異的に結合するN-グリコシルノイラミン酸が幼児期にだけ存在するためである。

他の発表では、エレガントな遺伝子クローニングと導入手法により、内皮細胞と白血球との接着分子、ELAM-1を介した白血球と内皮細胞とのレクチン様の結合に関係する糖鎖が同定された(Lowe)。

まとめ

このレポートにおいて、私達には次のような興味深い発表に関して正しい評価を出来なかった。バクテリアのs-層の糖蛋白の構造とそれのマイクロフィルターへの応用(Messen)、Man-6-Pレセプターの性質と機能(Hoflack, Jourdian)、ロイコシアリンの構造と生合成、そして β 1-6GlcNAcトランスフェラーゼの

bacterial S-layer glycoproteins and their potential industrial applications as microfilters (Messner); the properties and functions of Man-6-P receptors (Hoflack, Jourdian); the structure and biosynthesis of leukosialin and the role of B1-6 GlcNAc transferase in differentiation and malignancy of leukocytes (Fukuda); the polysialic acids (Troy, Brisson); lectins in brain (Zanetta); and in macrophages and the possible use of the latter for drug targeting (Monsigny, Roche).

Together with the other participants, we listened with amazement to many of the lectures, wondering at the striking progress made, and being pleased to hear many unpublished results. Almost all the lectures were followed by lengthy and lively discussions. In addition to the extensive exchange of information, this Monod Conference, like the previous ones in the same series, have undoubtedly achieved another important aim, that of providing a fertile ground for the start of many research collaborations.

All in all, we had a great deal of stimulating discussions, not only in the lecture hall, but also outside it, and the right blend of hard facts, theory and speculations. Still, it is clear that many tantalizing questions remain, some of which have hardly been touched upon at this conference. These include the problem of microheterogeneity - it is random or functional; the inability of most bacteria to synthesize glycoproteins; the fact that *N*-glycosylation is lipid-linked, while *O*-glycosylation is not; and of course the question of function.

Some answers to these questions will undoubtedly emerge at future Monod Conferences, where we shall certainly hear also about new and surprising findings on the chemistry, biochemistry and molecular biology of glycoconjugates.

分化とガン化における役割(Fukuda); ポリシアル酸 (Troy, Brisson); 脳(Zanetta)とマクロファージのレクチンそして後者のドレッジターゲットへの応用(Monsigny, Roche)。

他の参加者と一緒に私達は著しい進歩を驚きながら、多くのレクチャーを拝聴し、そして多くの未発表の結果も聞いた。全てのレクチャーには充実した活発な討論が続いた。情報の幅広い交換以外、以前のコンファレンスと同様にこのJacques Monodコンファレンスは間違いなく、共同研究のスタートに豊かな話題を提供できた。

我々はレクチャーホールだけでなくホールの外でも討論が弾み、そして真実、理論と思索がほど良く溶けあっていた。また、このコンファレンスでも解決できなかった疑問点が残った。Microheterogeneityの問題、すなわち、ランダムか機能性の問題である;多くのバクテリアの糖タンパクの合成不能;N-グリコシル化は脂質にリンクするが、一方O-グリコシル化は脂質にリンクしない;当然ながら、機能への疑問。

将来のJacques Monodコンファレンスでは必ずや、これらの問題への回答が聞けるだろう。又、複合糖質の化学、生化学そして分子生物学の新しく、驚くような発見が聞けるだろう。

ミドリ十字 (株) 中央研究所
大江 泰雄 訳