

## 薬学博士木幡 陽君の「糖タンパク質糖鎖の構造と機能に

## 関する研究」に対する授賞審査要旨

人体などに存在するタンパク質の多くは、それを構成するアミノ酸に糖鎖が付加している糖タンパク質である。糖タンパク質は二大別してO-結合型糖タンパク質、すなわちセリン、トレオニンというような水酸基をもつアミノ酸に糖鎖が結合するグループと、アスパラギンのアミド基の窒素に糖鎖が結合するN-結合型糖タンパク質とが存在する(図1)。

木幡君は東大薬学部の修士課程修了後、武田薬品工業の研究所に入り、一九五八年より母乳や牛乳に含まれるオリゴ糖ヌクレオチドの研究を始め、ヒトの血液型抗原決定基を含むオリゴ糖をもったDIP-オリゴ糖群を発見し、その化学構造を決定したが、これは同君の学位論文となると共に昭和三八年度日本薬学会奨励賞の受賞論文となった。

一九六七年、武田薬品を退社し、アメリカ NIH の Ginsburg 博士の下で、O-結合型糖タンパク質である ABO 式血液型抗原決定基の生合成が DIP-オリゴ糖を介して行われるものではなく、単糖ヌクレオチドが一分子ずつ付加されて行われることを解明し、世界の注目を浴びた。

一九七一年、帰国して神戸大学医学部の生化学の教授になってからは、上記のようなO-結合型糖タンパク質の研究から離れ、独自のN-結合型糖タンパク質の研究に入った。

### N<sub>1</sub>結合型糖鎖の構造決定法の確立

それまではN<sub>1</sub>結合型糖タンパク質は細胞の増殖、癌化、免疫などの生命現象において重要な役割をもつと予想されていたが、構造についての知見は極めて乏しく、オリゴ糖鎖の糖組成が分析されていた程度で、糖鎖の配列、構造については全く不明であった。

木幡君はその複雑な糖鎖構造を解明する手始めとしてタンパク質からオリゴ糖鎖を遊離する酵素であるエンドグリコシダーゼを各種の微生物から分離させる技術を確認したが、更に酵素法に加えて化学的に糖鎖を遊離させる方法としてヒドラジン分解法を開発改良しこれを完成した。遊離させたオリゴ糖の還元末端を定量的にトリチウムで標識し、その混合物を各種のカラムクロマトグラフィーを用いて定量的に分離、純化し、こうして得たオリゴ糖を非還元末端より逐次一分子ずつ遊離させるエキソグリコシダーゼを発見し、糖鎖の順列を決定する一連の方法を確認した。この際使われたエキソグリコシダーゼは主に微生物より得られたが、各酵素の基質特異性は非常に厳密で、それを用いることにより、複雑なオリゴ糖鎖の構造が決定されたのである。

木幡君の確立したこれらの糖鎖解析の技術は画期的なもので、その技術修得のために世界各国の中堅研究者が来日した。この業績により、一九八五年度の東レ科学技術賞を受賞している。

N<sub>1</sub>結合型糖鎖の構造研究…法則性と多様性の発見

木幡君は自ら開発した方法を駆使して、これまでに百数十種に及ぶ自然界の糖タンパク質の糖鎖構造を説明し報告している。

この一連の研究により、従来N-結合型糖タンパク質には高マンノース型と複合型の二群があると考えられていた分類に加えて新たに混成型 (hybrid type) と呼ばれるグループの存在することを明らかにした (図2)。

木幡君の業績は現在世界各国で発展している糖タンパク質研究の基礎をなすもので、多くの国際シンポジウムにおいては開会式直後の特別講演として招待されており、多くの研究者の発表には必ず Kobata の名が引用されている。

以上述べた様に、生体に存在する糖タンパク質糖鎖が多様であることを示したが、それに止まらず、自然が何故にこのような複雑な糖鎖を作っているか、また如何なる機能をもっているかの問題を追求する方向に向かった。

#### N-結合型糖鎖の種ならびに臓器特異性及び部位特異性の発見

まず、哺乳類の臓器に広く存在する  $\gamma$ -GDP ( $\gamma$ -グルタミルトランススベプチダーゼ) をウシ、ラット、マウス、ヒトの肝および腎から分離精製し、そのN-結合型糖鎖の構造を比較研究し、明白な種差と臓器差があることを明らかにした。

また木幡君はヒト絨毛性腺刺激ホルモン (HCG) の糖鎖構造と分布を詳細に調べ、これがいずれも複合型の糖鎖でありながら、HCG分子の四ヶ所のアスパラギン残基によって明らかに異なった構造を持っているという重要な発見をした。この知見は他の例でも見出され、タンパク質部分が糖鎖の成熟を制御しているという重要な概念を提出した。

## 先天性糖質代謝異常症の研究

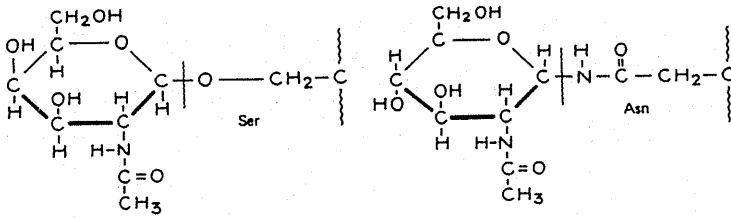
木幡君は、様々なグリコシダーゼが欠損することによって起こる代謝異常症の患者の尿に排泄されるオリゴ糖や糖ペプチドの構造を詳細に調べて、その特徴をもとにN-結合型糖鎖の代謝経路がエキソグリコシダーゼ群と、エンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの協同作用によって行われることを解明した。

## N-結合型糖鎖の病態に関する研究

木幡君は、健常人と様々な疾患患者から得た糖タンパク質の糖鎖を比較分析することにより糖鎖病理学と呼ぶべき新しい学問領域を拓きつつある。

すなわち細胞の癌化に伴って産生する糖タンパク質の糖鎖が変化する事実は一九七〇年代のはじめから広く観察されて来たが、その構造的本態は不明であった。木幡君はラットの肝臓と肝癌から精製した $\gamma$ -GT-Pの糖鎖構造を比較分析して、その糖鎖の癌性変化を具体的に明らかにして反響を呼んだ。また $\alpha$ -CGの糖鎖の癌性変化について研究し、妊婦尿と胞状奇胎患者の尿中 $\alpha$ -CGは共に一本鎖並びに二本鎖複合型糖鎖を一对三の比率で含んでいるが、破壊奇胎患者尿の $\alpha$ -CGは三本鎖複合型糖鎖を、また絨毛癌患者の尿 $\alpha$ -CGはこれに加えて異常二本鎖 (abnormal biantennary) と名付けられる糖鎖を含んでいた。更に木幡君は糖鎖の癌性変化を基にした癌の診断法を開発した。

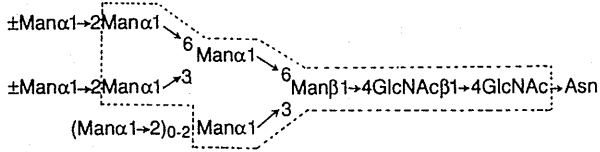
木幡君はヒトの血清ガンマグロブリン IgG についている糖鎖を詳細に分析し、慢性関節リウマチ患者の IgG 糖鎖



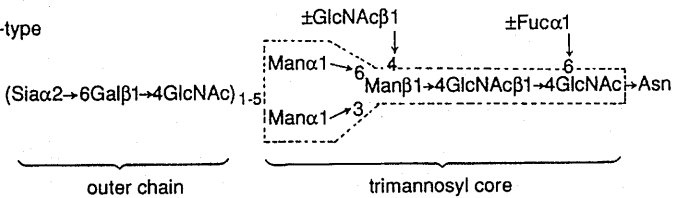
N-アセチルガラクトサミンとセリンならびに  
N-アセチルグリコサミンとアスパラギンとの間の結合

図1. O-結合型糖タンパク質とN-結合型糖タンパク質の結合部位

High mannose-type  
高マンノース型



Complex-type  
複合型



Hybrid-type  
混成型

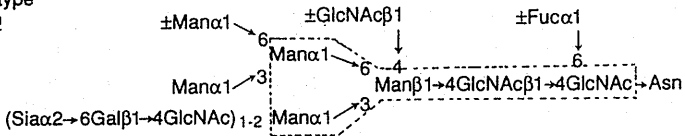


図2. N-結合型糖鎖構造の法則性の発見

1. 木幡君により混成型が加えられた。
2. 側鎖の多様性を発見、解明した。
3. 複合型の側鎖に5本鎖の複雑なものを発見した(図3)。

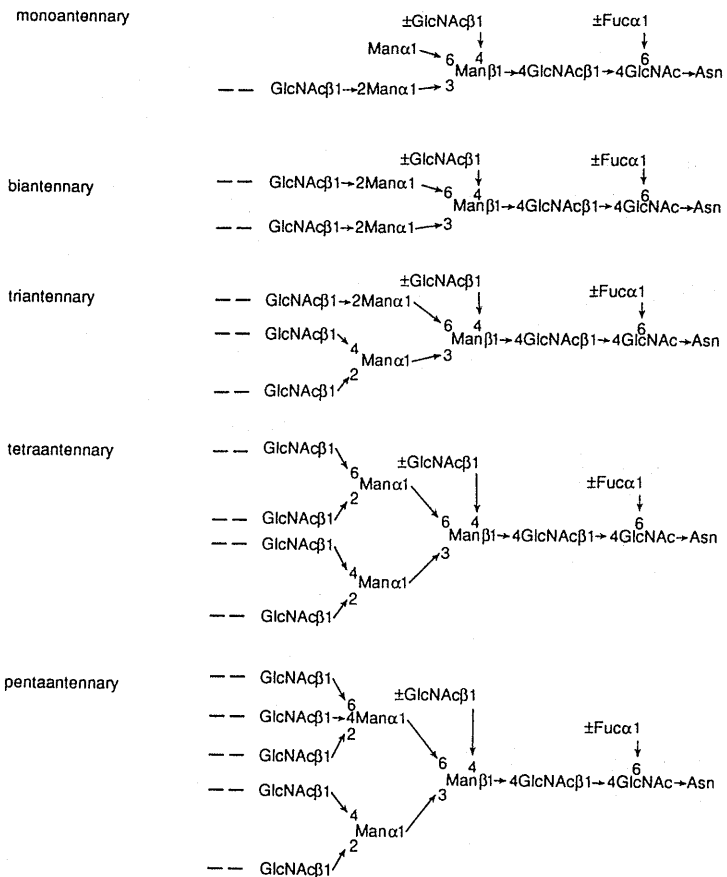


図3. 自然界に存在する N-結合型糖タンパク質の側鎖には 1 本鎖から 5 本鎖まで見出され、5 本鎖は木幡君により発見された。

にはガラクトース残基が欠損していることを見出し、この難病の解明に一步踏み込んだ。

更に木幡君はN-結合型糖タンパク質の糖鎖の機能を探るために糖鎖部分を改変し生体機能に如何に影響するかについて幅広い研究を展開している。

以上述べたように木幡君の研究は近年発展しつつある糖鎖生物学 (Glycobiology) の重要な柱である糖タンパク質のN-結合型糖鎖研究の全領域に亘る広汎なもので、その独創性と開拓性は一九八八年に Rademacher と Dwek によって書かれた有名な総説 Glycobiology (Annual Review of Biochemistry) の引用文献の一割以上が同君の論文によって占められた事実からも明白であり、一九九二年度の日本薬学会学術賞と米国化学会ハドソン賞を受賞することになっているのもこの優れた業績が世界のレベルで認められたものと言える。

#### 過去一〇年間の主要論文 (英文のみ)

##### N-結合糖鎖の構造決定法開発に関する研究

1. Takasaki, S., Mizuochi, T., and Kobata, A.: Hydrizinolysis of asparagine-linked sugar chains to produce free oligosaccharides. *Methods Enzymol.* 83, 263 - 268, 1982.
2. Yamashita, K., Kochibe, N., Ohkura, T., Ueda, I., and Kobata, A.: Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized *Aleuria aurantia* lectin. *J. Biol. Chem.* 260, 4688 - 4693, 1985.
3. Yamashita, K., Totani, K., Ohkura, T., Takasaki, S., Goldstein, I. J., and Kobata, A.: Carbohydrate

- binding properties of complex-type oligosaccharides on immobilized *Datura stramonium* lectin. *J. Biol. Chem.* **262**, 1602 - 1607, 1987.
4. Yamashita, K., Umetsu, K., Suzuki, T., Iwaki, Y., Endo, T., and Kobata, A.: Carbohydrate binding specificity of immobilized *Allomyria dichotoma* Lectin II. *J. Biol. Chem.* **263**, 17482 - 17489, 1988.
  5. Kobata, A. and Yamashita, K.: Affinity chromatography of oligosaccharides on E<sub>4</sub>-phytohemagglutinin-agarose column. *Methods Enzymol.* **179**, 46 - 54, 1989.
  6. Fukumori, F., Takeuchi, N., Hagiwara, T., Ito, K., Kochibe, N., Kobata, A., and Nagata, Y.: Cloning and expression of a functional fucose-specific lectin from an orange peel mushroom, *Aleuria aurantia*. FEBS LETTERS **250**, 153 - 156, 1989.

Ⅲ-糖鎖の糖鎖の糖鎖の糖鎖の糖鎖

7. Mizoguchi, A., Mizuochi, T., and Kobata, A.: Structures of the carbohydrate moieties of secretory component purified from human milk. *J. Biol. Chem.* **257**, 9612 - 9621, 1982.
8. Yamashita, K., Kamerling, J. P., and Kobata, A.: Structural study of the carbohydrate moiety of hen ovomucoid: Occurrence of a series of pentaantennary complex-type asparagine-linked sugar chains. *J. Biol. Chem.* **257**, 12809 - 12814, 1982.
9. Berger, E. G., Buddecke, E., Kamerling, J. P., Kobata, A., Paulson, J. C., and Vliegenthart, J. F. G.: Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans. (Invited Review) *Experientia* **38**, 1129 - 1162, 1982.
10. Yamashita, K., Kamerling, J. P., and Kobata, A.: Structural studies of the sugar chains of hen



- ovomucoid: Evidence indicating that they are formed mainly by the alternate biosynthetic pathway of asparagine-linked sugar chains. *J. Biol. Chem.* 258, 3099 - 3106, 1983.
11. Yamashita, K., Tachibana, Y., Hitoi, A., and Kobata, A.: Sialic acid containing sugar chains of hen ovalbumin and ovomucoid. *Carbohydr. Res.* 130, 271 - 288, 1984.
  12. Taniguchi, T., Adler, A. J., Mizuochi, T., Kochibe, N., and Kobata, A.: The structures of the asparagine-linked sugar chains of bovine interphotoreceptor retinol-binding protein: Occurrence of fucosylated hybrid-type oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 261, 1730 - 1736, 1986.
  13. Takasaki, S. and Kobata, A.: Asparagine-linked sugar chains of fetuin: Occurrence of tetrasialyl triantennary sugar chains containing the Gal $\beta$ 1  $\rightarrow$  3 GlcNAc sequence. *Biochemistry* 25, 5709 - 5715, 1986.
- N-結合糖鎖の糖鎖構造の種特異性に関する研究
14. Yamashita, K., Hitoi, A., Matsuda, Y., Tsuji, A., Katunuma, N., and Kobata, A.: Structural studies of the carbohydrate moieties of rat kidney  $\gamma$ -glutamyltrans-peptidase: An extremely heterogeneous pattern enriched with nonreducing terminal *N*-acetylglucosamine residues. *J. Biol. Chem.* 258, 1098 - 1107, 1983.
  15. Yamashita, K., Hitoi, A., Tateishi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., and Kobata, A.: The structures of the carbohydrate moieties of mouse kidney  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase: Occurrence of X-antigenic determinants and bisecting *N*-acetylglucosamine residues. *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 573 - 582, 1985.

16. Yamashita, K., Hitoi, A., Irie, M., and Kobata, A.: Fractionation by lectin affinity chromatography indicates that the glycosylation of most ribonucleases in human viscera and body fluids is organ specific. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 263 - 266, 1986.
17. Kagawa, Y., Takasaki, S., Utsumi, J., Hosoi, K. Shimizu, H., Kochibe, N., and Kobata, A.: Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human Interferon- $\beta$  1 and recombinant human Interferon- $\beta$  1 produced by three different mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 17508 - 17515, 1988.

ニ一糖合糖鎖の糖鎖工学的考察

18. Mizuochi, T., Nishimura, R., Derappe, C., Taniguchi, T., Hamamoto, T., Mochizuki, M., and Kobata, A.: Structures of the asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin produced in choriocarcinoma: Appearance of triantennary sugar chains and unique biantennary sugar chains. *J. Biol. Chem.* **258**, 14126 - 14129, 1983.
19. Yamashita, K., Ohkura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S., and Kobata, A.: Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis. *J. Biol. Chem.* **259**, 10834 - 10840, 1984.
20. Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L. Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., Takeuchi, F., Nagano, Y., Miyamoto, T., and Kobata, A. (1985) : Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* **316**: 452 - 457.

21. Yamashita, K., Tachibana, Y., Ohkura, T., and Kobata, A.: Enzymatic basis for the structural changes of asparagine-linked sugar chains of membrane glycoproteins of baby hamster kidney cells induced by polyoma transformation. *J. Biol. Chem.* **260**, 3963 - 3969, 1985.
22. Yamashita, K., Totani, K., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Ueda, I., and Kobata, A.: Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens. *Cancer Res.* **47**, 3451 - 3459, 1987.
23. Endo, T., Nishimura, R., Kawano, T., Mochizuki, M., and Kobata, A.: Structural differences found in the asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropins purified from the urine of patients with invasive mole and with choriocarcinoma. *Cancer Res.* **47**, 5242 - 5245, 1987.
24. Kobata, A.: Structures, function, and transformational changes of the sugar chains of glycohor-mones. (Invited Review) *J. Cellular Biochem.* **37**, 79 - 90, 1988.
25. Kobata, A.: Structural changes induced in the sugar chains of glycoproteins by malignant transfor-mation of producing cells and their clinical application. (Invited Review) *Biochimie* **70**, 1575 - 1585, 1988.
26. Yamashita, K., Koide, N., Endo, T., Iwaki, Y., and Kobata, A.: Altered glycosylation of serum trans-ferin of patients with hepatocellular carcinoma. *J. Biol. Chem.* **264**, 2415 - 2423, 1989.
27. Furukawa, K., Matsuta, K., Takeuchi, F., Kosuge, E., Miyamoto, T., and Kobata, A.: Kinetic study on a galactosyltransferase in the B cells of patients with rheumatoid arthritis. *International Immunolo-gy* **2**, 105 - 112, 1990.
28. Hiraiizumi, S., Takasaki, S., Shiroki, K., Kochibe, N., and Kobata, A.: Transfection with fragments of the adenovirus 12 gene induces tumorigenicity-associated alteration of N-linked sugar chains in rat

cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 9-19, 1990.

2-糖付糖類の糖鎖と膜タンパク質

29. Mizoguchi, A., Takasaki, S., Maeda, S., and Kobata, A.: Changes in asparagine-linked sugar chains of human promyelocytic leukemic cells (HL-60) during monocytoid differentiation and myeloid differentiation: Decrease of high-molecular-weight oligosaccharides in acidic fraction. *J. Biol. Chem.* **259**, 11949-11957, 1984.
30. Mizoguchi, A., Takasaki, S., Maeda, S., and Kobata, A.: Changes in asparagine-linked sugar chains of human promyelocytic leukemic cells (HL-60) during monocytoid differentiation and myeloid differentiation: Appearance of high mannose-type oligosaccharides in neutral fraction. *J. Biol. Chem.* **259**, 11943-11948, 1984.
31. Takeuchi, M., Takasaki, S., Miyazaki, H., Kato, H., Hoshi, S., Kochibe, N., and Kobata, A.: Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 3657-3663, 1988.
32. Tsuchiya, N., Endo, T., Matsuta, K., Yoshinoya, S., Aikawa, T., Kosuge, E., Takeuchi, F., Miyamoto, T., and Kobata, A.: Effects of galactose depletion from oligosaccharide chains on immunological activities of human IgG. *J. Rheumatol.* **16**, 285-290, 1989.
33. Amano, J., Sato, S., Nishimura, R., Mochizuki, M., and Kobata, A.: Sialic acids, but not their linkage to galactose residues, are required for the full expression of the biological activity of human chori-

- onic gonadotropin. *J. Biochem. Tokyo* 105, 339 - 340, 1989.
34. Takeuchi, M., Inoue, N., Strickland, T.W., Kubota, M., Wada, M., Shimizu, R., Hoshi, S., Kozutsumi, H., Takasaki, S., and Kobata, A.: Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7819 - 7822, 1989.
35. Takeuchi, M., Takasaki, S., Shimada, M., and Kobata, A.: Role of sugar chains in the *in vitro* biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265, 12127 - 12130, 1990.
36. Asada, M., Furukawa, K., Kantor, C., Gahnberg, C. G., and Kobata, A.: Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell adhesion molecules CD 11 / CD 18. *Biochemistry* 30, 1561 - 1571, 1991.
37. Mori, E., Takasaki, S., Hedrick, J. L., Wardrip, N. J., Mori, T., and Kobata, A.: Neutral oligosaccharide structures linked to asparagines of porcine zona pellucida glycoproteins. *Biochemistry* 30, 2078 - 2087, 1991.