

- 56, 1919–1925.
- 8) Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Harmsen, H.J.M., Schut, F., Akkermans, A.D.L., & de Vos, W.M. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4225–4232.
 - 9) Lay, C., Sutren, M., Rochet, V., Saunier, K., Doré, J., & Rigottier-Gois, L. (2005) *Environ. Microbiol.*, **7**, 933–946.
 - 10) Lay, C., Rigottier-Gois, L., Holmström, K., Rajilic, M., Vaughan, E.E., de Vos, W.M., Collins, M.D., Thiel, R., Namsolleck, P., Blaut, M., & Doré, J. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4153–4155.
 - 11) Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M.C., Clavel, T., Koebnick, C., Zunft, H.-J.F., Doré, J., & Blaut, M. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1027–1033.
 - 12) Dinoto, A., Marques, T.M., Sakamoto, K., Fukiya, S., Watanabe, J., Ito, S., & Yokota, A. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7739–7747.
 - 13) Takada, T., Matsumoto, K., & Nomoto, K. (2004) *J. Microbiol. Methods*, **58**, 413–421.
 - 14) Fallani, M., Rigottier-Gois, L., Aguilera, M., Bridonneau, C., Collignon, A., Edwards, C.A., Corthier, G., & Doré, J. (2006) *J. Microbiol. Methods*, **67**, 150–161.
 - 15) Matsuda, K., Tsuji, H., Asahara, T., Kado, Y., & Nomoto, K. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 32–39.

吹谷 智, 横田 篤

(北海道大学大学院農学研究院微生物生理学研究室)

FISH-flow cytometry, a new tool for the analysis of intestinal microbiota

Satoru Fukiya and Atsushi Yokota (Laboratory of Microbial Physiology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita-9 Nishi-9, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan)

消化管のがん性変化に伴い消失する血液型抗原 Sd^a 糖鎖

1. はじめに

がん化に伴い、細胞表面の糖鎖構造が変化することは古くから知られている。実際、がんで発現が増加している糖鎖抗原 CA19-9 や SLX 等は腫瘍マーカーとして臨床的に広く利用されている。これらのがん抗原の一部は、「糖鎖不全現象」、すなわち正常組織に発現する複雑な構造の糖鎖を合成する経路が部分的に破綻することで、合成過程にあるより単純な構造や、途中より分枝合成された構造が出現しているものと考えられる。本稿では、胃がん・大腸がんで見られる糖鎖不全現象として、ヒト正常消化管に発現

が認められる血液型抗原 Sd^a 糖鎖のがん化に伴う消失機構と、Sd^a 合成不全ががん細胞のふるまいに及ぼす影響について述べる。

2. 血液型抗原 Sd^a 糖鎖と合成酵素の同定

Sd^a 糖鎖は、1967年にコーカサス地方の住民に見出された血液型抗原であり、大部分のヒトの赤血球上に発現している。その構造は、GalNAcβ1-4[NeuAcα2-3]Galβ1-4GlcNAc-R であり、CAD 抗原 (GalNAcβ1-4[NeuAcα2-3]Gal) と共通の構造を有している。末端のβ1,4結合したN-アセチルガラクトサミンが免疫原糖であり、N-アセチルガラクトサミンを付加する糖転移酵素は、2003年にMontielらにより同定された¹⁾。Sd^a 抗原の合成を担うβ1,4N-アセチルガラクトサミン転移酵素2 (β4GalNAc-T2) は他の糖転移酵素と同じ2型の膜貫通型タンパク質であるが、先にクローニングされたG_{M2}合成酵素 (β4GalNAc-T1) と同じくβ1,4結合を触媒するガラクトース/N-アセチルガラクトサミン転移酵素に共通のGWGGEDモチーフを有さない^{1,2)}。Sd^a 合成酵素にはその遺伝子構造より二つのスプライシングバリエーションの存在が示唆されている。エクソンE2-E12は共通で、エクソンE1_sを用いる短型は細胞内ドメインが6アミノ酸よりなり、一方エクソンE1_Lを使用する長型は66アミノ酸もの非常に長い細胞内ドメインを持つが、両者共に酵素活性を有することが明らかとなっている。Sd^a 合成酵素はG_{M2}合成酵素とは異なり、G_{M3}ガングリオシドを基質としない。また、α2,3シアル化基質のみにN-アセチルガラクトサミンを付加し、非シアル化基質やα2,6シアル化基質はアクセプターとしないことも分かっている^{1,3)}。

3. Sd^a 糖鎖の組織特異的発現

Sd^a 糖鎖の発現は、ヒトでは赤血球以外にも腎臓および消化管 (胃、大腸) で認められる。腎臓では遠位尿細管、集合管、及び近位尿細管上皮細胞の刷子縁に発現が見られる。尿中にも分泌され、尿中に最も多量に存在するTamm-Horsfallタンパク質上にもN-結合型糖鎖として見出される⁴⁾。胃では主として糖脂質糖鎖として発現しており、Sd^a 糖脂質およびSd^a 糖鎖合成酵素活性はどちらも幽門部より胃体部前庭で多く検出された^{5,6)}。胃には胃酸の産生を担う壁細胞や、ペプシノーゲンを分泌する主細胞等、高度に分化した細胞が存在しており、その局在が部位により異なる。そこで我々は、Sd^a 糖鎖が特定の分化細胞にのみ発現しているのではないかと考え、ヒト胃組織より得られた細

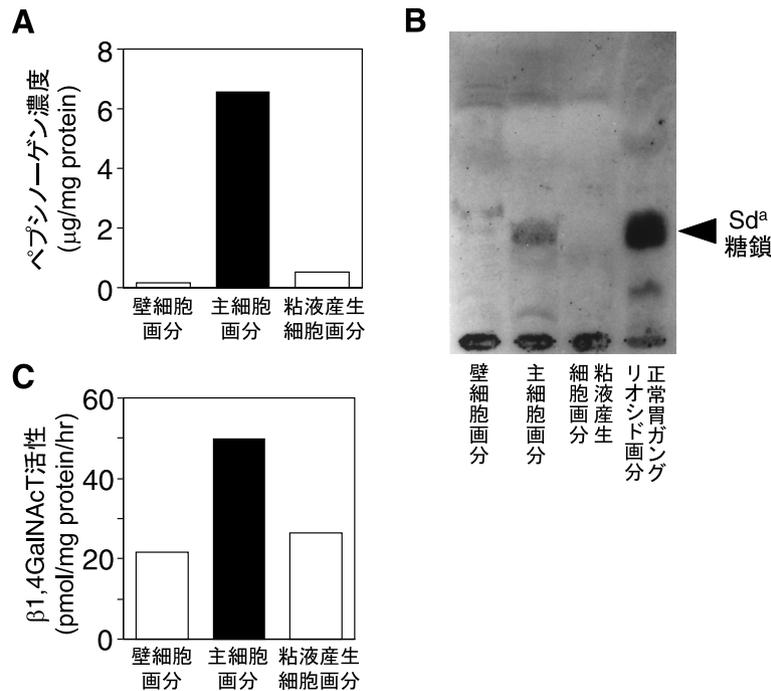


図1 ヒト胃における Sd^a 糖鎖の発現

ヒト胃粘膜より分離した細胞を密度勾配遠心法により、壁細胞画分、主細胞画分、粘液産生細胞画分に分離した。各画分における、(A)ペプシノーゲン濃度、(B)Sd^a糖脂質、(C)Sd^a合成酵素活性、を測定した結果、正常胃においてはペプシノーゲンを産生する主細胞が主たる Sd^a糖鎖発現細胞であることが示唆された(文献7より改変)。

胞を密度勾配遠心分離法により1) 壁細胞画分、2) 主細胞画分、3) 粘液産生細胞画分に分離し、各々における Sd^a糖脂質と Sd^a糖鎖合成酵素の発現を調べた⁷⁾。その結果、主細胞画分において Sd^a糖脂質と β4GalNAc-T 活性が検出された(図1)。免疫組織化学的検討においても、ペプシノーゲン陽性細胞に Sd^a糖鎖の特異的発現が認められたことから、ヒト正常胃においては主細胞が主たる発現細胞であることが明らかとなった。一方、大腸では Sd^a抗原は杯細胞の産生するムチン上に O-結合型糖鎖として存在している。Sd^a抗原の発現量及び Sd^a合成酵素活性は、近位部から遠位部に向けて減少することが報告されている^{8,9)}。この発現パターンは古くから消化管に発現することが知られている他の血液型糖鎖(ABO血液型抗原やLewis抗原)と同様である。以上のように Sd^a糖鎖の発現は細胞・組織特異的であり、各々で発現様式も異なっているが、これらの違いに Sd^a合成酵素のスプライシングバリエントがどのように関与しているのかは、現時点では明らかとなっていない。

4. 消化器癌における Sd^a糖鎖の合成不全

がん化に伴い、細胞表面の糖鎖構造は著しく変化するが、消化管における Sd^a抗原の発現もがん化の影響を大きく受ける。Pillerらは正常大腸粘膜に発現している Sd^a糖鎖が、大腸がん組織において著しく減少していることを見出した¹⁰⁾。また、大腸がんにおける Sd^a合成酵素活性を近傍正常粘膜と比較した結果、がん組織における β4GalNAc-T 活性が著しく減少していた^{9,11)}。Dohiらは、正常胃に存在するが、胃がんでは発現していない糖脂質を見出した。この糖脂質の構造は GalNAcβ1-4 [NeuAcα2-3] Galβ1-4 GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer であり、その末端に Sd^a構造を有していた⁵⁾。彼らは、非常に早期の胃がんや前がん段階である萎縮性胃炎でも Sd^a糖鎖の消失が起こっていること、同時に Sd^a合成酵素活性も著しく低下していることを見出し、1996年には Sd^a合成酵素遺伝子の部分塩基配列を報告している¹²⁾。これらの結果は、胃がん・大腸がんにおける Sd^a糖鎖の発現減少が、がん化に伴う Sd^a合成酵素活性の低下によることを示唆している。がんにおける Sd^a

合成酵素の発現低下機構はこれまで不明であったが、Sd^a合成酵素遺伝子のプロモーター領域にはCpGアイランドと呼ばれるメチル化を受けやすい配列が存在することから、筆者らはこの領域の異常メチル化により転写が抑制されているのではないかと考えた。実際に、胃がん・大腸がん細胞株をDNAメチル化酵素阻害剤である5-aza-2'-deoxycytidine処理すると、Sd^a合成酵素 mRNA 発現が誘導され(図2A)、がん細胞表面のSd^a糖鎖発現が回復した。DNAメチル化を検出する方法としてcombined bisulfite restriction analysis (COBRA)法がある。DNAをbisulfite処理すると通常シトシンはウラシルに変換されるが、メチル化シトシンは変換されないことを利用し、生じる配列の違いを見分ける制限酵素を組み合わせてメチル化を定量的に検出する方法である。図2Bに示すように、正常粘膜ではSd^a合成酵素遺伝子のCpGアイランド領域はメチル化を受けていないが、がん組織では高頻度にメチル化が検出された¹³⁾。以上より、がん組織で見られるSd^a糖鎖の合成不全には、DNA高メチル化による合成酵素遺伝子のサイレンシングが関与していることが明らかとなった。

胃がん・大腸がんでは、正常型糖鎖であるSd^a抗原の発現が減少する一方で、がん抗原シアリルルイス a (sLe^a, CA19-9) やシアリルルイス x (sLe^x, SLX) の発現は増加している。興味深いことに、これらのがん抗原とSd^a糖鎖は共通の前駆構造より合成され、Sd^a合成酵素はsLe^{a/x}合成フコース転移酵素と基質を競合する関係にある(図3A)。従って、がん化に伴うSd^a合成酵素活性の低下は、Sd^a糖鎖の消失のみならず、sLe^{a/x}抗原の発現増強にも関与している可能性が示唆された。

5. Sd^a合成酵素によるがん転移抑制

上述のように、Sd^a合成酵素の発現はがん化に伴い負の制御を受けており、胃がん・大腸がん細胞株では殆ど発現が見られない。Sd^a糖鎖を発現していないヒト大腸がん細胞株HT29にSd^a合成酵素活性を導入した結果、Sd^a糖鎖の発現に伴い、sLe^{a/x}発現が激減した(図3B)。sLe^{a/x}糖鎖は、活性化血管内皮に誘導される接着分子セレクトインのリガンドとして機能することが知られており、血行性転移の成立時に有利に働くと考えられている。細胞表面糖鎖構造の変化より予想されたように、Sd^a合成酵素導入細胞では活性化臍帯静脈内皮細胞に対するセレクトイン依存性接着の著しい減少が認められた(図3C)。また、ヌードマウスの脾臓にがん細胞を移植し、肝転移能を評価した結果、Sd^a合成酵素導入細胞では肝転移能が顕著に低下していた(図3D)。従って、Sd^a合成酵素活性の導入により、がん細胞上のsLe^{a/x}糖鎖の発現を抑制できること、その結果としてセレクトイン依存性接着やがん転移を抑制可能なことが示唆された。

6. Sd^a糖鎖の生理学的機能

共通の前駆構造を有するsLe^{a/x}と異なり、Sd^a構造は接着分子セレクトインのリガンドとして機能しなかった(図3C)。Sd^a糖鎖と同じく正常大腸にのみ発現し、大腸がんでは消失する正常型糖鎖ジシアリルルイス a 抗原や6-硫酸化シアリルルイス x 構造は、シアル酸認識レクチン・シグレックのリガンドとして機能することが報告されている¹⁴⁾。Sd^a構造も末端にシアル酸を有するが、我々の検討では、Sd^a糖鎖とシグレックの特異的結合は見出されな

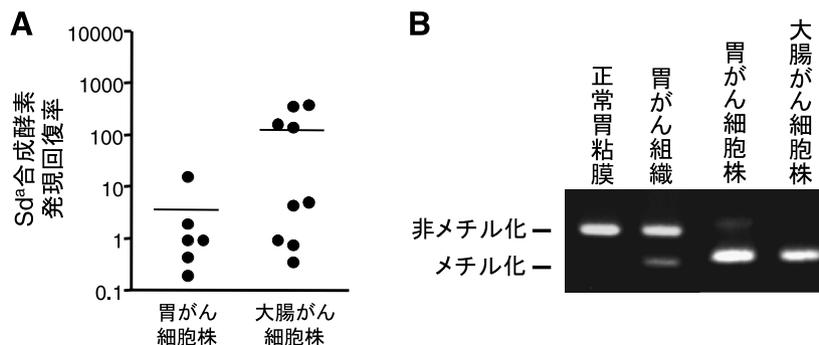


図2 DNAメチル化によるSd^a合成酵素遺伝子の発現抑制
(A)6種のヒト胃がん細胞株, 9種の大腸がん細胞株にメチル化阻害剤5-aza-2'-deoxycytidine処理を行った後のSd^a合成酵素のmRNA発現回復率。
(B)COBRA法によるSd^a合成酵素遺伝子プロモーター領域のメチル化の検出。

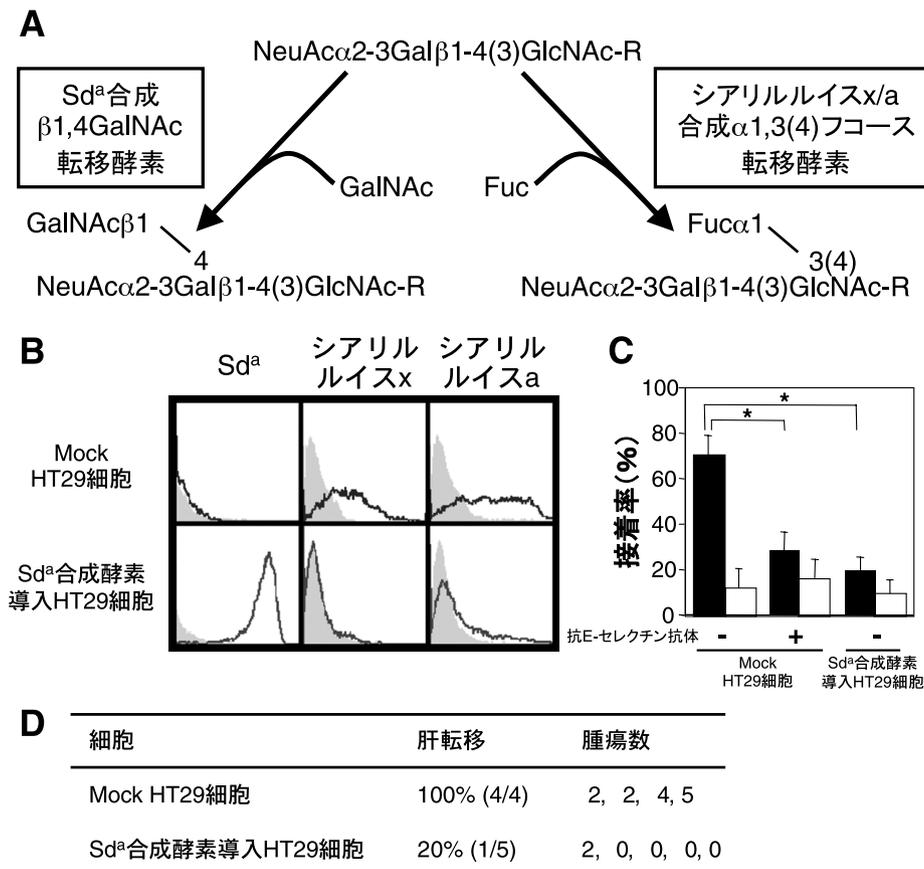


図3 Sd^a合成酵素のヒト大腸がん細胞株 HT29 への導入

(A) Sd^a合成酵素とシアリルルイス x/a 合成フコース転移酵素は基質を競合する。(B-C) ヒト大腸がん細胞株 HT29 に Sd^a合成酵素を導入した安定発現株を作製した。(B) 細胞表面の糖鎖発現。(C) TNF α 刺激 (■) ないし非刺激 (□) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞への E-セレクチン依存性接着。(D) ノドマウスにおける肝転移能。(文献7より改変)。

かった⁷⁾。血液型糖鎖 Sd^a 抗原は、これまで述べてきたように正常胃の主細胞や大腸、腎臓の遠位尿管といった特定の組織に局限して発現している組織・分化抗原であるが、これらの組織においてどのような働きをしているのか現在まで明らかとなっていない。大腸や腎臓の遠位部の尿管は細菌感染の起きやすい場所であることから、抗感染に働いている可能性が考えられる。実際、腸毒素産生や腎盂腎炎発症に関わる大腸菌株の接着受容体アドヘシンは Sd^a合成酵素の基質である NeuAc α 2-3Gal-構造を認識するという報告があり、この構造を Sd^a修飾によりマスキングすることで大腸菌の結合を妨げているのかもしれない。ラットでは Sd^a合成酵素活性は胚および新生仔大腸では検出されないが、授乳中に微増し、離乳後に急増する¹⁵⁾。ある種のシアリ化糖鎖高親和性大腸菌株も、出生後 Sd^a合成酵素が

発現するまでの時期のみに腸上皮に接着するとの報告があり、この考えを支持している。

7. おわりに

糖鎖抗原は複数の糖転移酵素により協同的に生合成されているため、その発現を制御することは容易ではない。Sd^a合成酵素は、単一の糖転移酵素活性の導入によりがん細胞表面の sLe^a糖鎖と sLe^x糖鎖の両方を正常型抗原 Sd^aへと変換できることから、本酵素を利用したがん転移の抑制は有望である。実際、筆者らは Sd^a合成酵素を用いた遺伝子治療によりマウスモデルにおける遠隔転移を抑制することに成功しており(投稿中)、臨床への応用が期待される。

謝辞

本稿に紹介した筆者らの研究は、国立国際医療センター研究所・消化器疾患研究部で土肥多恵子先生の御指導のもと行われました。また、愛知県がんセンター研究所・分子病態部の神奈木玲児先生、札幌医科大学・豊田実先生をはじめ、本研究を支えてくださいました諸先生方に心より感謝申し上げます。

- 1) Montiel, M.D., Krzewinski-Recchi, M.A., Delannoy, P., & Harduin-Lepers, A. (2003) *Biochem. J.*, **373**, 369-379.
- 2) Nagata, Y., Yamashiro, S., Yodoi, J., Lloyd, K.O., Shiku, H., & Furukawa, K. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 12082-12089.
- 3) Dohi, T., Nishikawa, A., Ishizuka, I., Totani, M., Yamaguchi, K., Nakagawa, K., Saitoh, O., Ohshiba, S., & Oshima, M. (1992) *Biochem. J.*, **288**, 161-165.
- 4) Morton, J.A., Pickles, M.M., & Vanhegan, R.I. (1988) *Immunol. Invest.*, **17**, 217-224.
- 5) Dohi, T., Ohta, S., Hanai, N., Yamaguchi, K., & Oshima, M. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 7880-7885.
- 6) Dohi, T., Hanai, N., Yamaguchi, K., & Oshima, M. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 24038-24043.
- 7) Kawamura, Y.I., Kawashima, R., Fukunaga, R., Hirai, K., Toyama-Sorimachi, N., Tokuhara, M., Shimizu, T., & Dohi, T. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 6220-6227.
- 8) Morton, J.A., Pickles, M.M., & Vanhegan, R.I. (1988) *Immunol. Invest.*, **17**, 217-224.
- 9) Malagolini, N., Dall'Olio, F., Di Stefano, G., Minni, F., Marano, D., & Serafini-Cessi, F. (1989) *Cancer Res.*, **49**, 6466-6470.
- 10) Piller, F., Cartron, J-P., & Tuppy, H. (1980) *Blood Transf. Immunohaematol.*, **23**, 599-611.
- 11) Capon, C., Maes, E., Michalski, J.C., Leffler, H., & Kim, Y.S. (2001) *Biochem. J.*, **358**, 657-664.
- 12) Dohi, T., Yuyama, Y., Natori, Y., Smith, P.L., Lowe, J.B., & Oshima, M. (1996) *Int. J. Cancer*, **67**, 626-631.
- 13) Kawamura, Y.I., Toyota, M., Kawashima, R., Hagiwara, T., Suzuki, H., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., Kannagi, R., & Dohi, T. (2008) *Gastroenterology*, in press.
- 14) Miyazaki, K., Ohmori, K., Izawa, M., Koike, T., Kumamoto, K., Furukawa, K., Ando, T., Kiso, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Yoshida, A., Takeuchi, M., & Kannagi, R. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 4498-4505.
- 15) Dall'Olio, F., Malagolini, N., Di Stefano, G., Ciambella, M., & Serafini-Cessi, F. (1990) *Biochem. J.*, **270**, 519-525.

河村 由紀

(国立国際医療センター研究所・消化器疾患研究部)

Sd^a blood group carbohydrate antigen, exclusively expressed in normal gastrointestinal mucosa but not in cancer tissues
Yuki I. Kawamura (Department of Gastroenterology, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan)

CCA 付加反応のダイナミクス

1. トランスファー RNA (tRNA) の3'末端 CCA 配列

大腸菌からヒトにいたるあらゆる生物で、タンパク質はリボソームと呼ばれるタンパク質合成工場において、遺伝子情報に基づいてアミノ酸をつなげて作られることが分かっている。遺伝子の情報は、一旦、遺伝子 (DNA) から RNA ポリメラーゼによって RNA に転写して書き換えられ、メッセンジャー RNA (mRNA) が作られる。この mRNA がリボソームと結合し、アミノ酸を先端に結合させたトランスファー RNA (tRNA) が mRNA と次々と結合していき、tRNA の先端についたアミノ酸が順々につながってタンパク質が完成する。さらに細かく言うならば、mRNA 上のコドン (3 塩基からなる遺伝情報の 1 単位) が、tRNA を介して、1 アミノ酸に変換されることで、タンパク質が合成されていく。したがって、tRNA はコドンというヌクレオチド配列の情報をアミノ酸配列の情報に変換するアダプター分子として働く。L 字型の高次構造をした tRNA の一方の末端には、アンチコドンという領域があり、コドンと塩基特異的に水素結合を形成する。一方、tRNA のもう一方の末端である 3'末端に活性部位は CCA (C74-C75-A76) という決まった配列があり、アミノアシル tRNA 合成酵素が末端のアデノシンに特異的なアミノ酸を結合させる。

tRNA の 3'末端の CCA 配列は、興味深いことに、大腸菌からヒトに至るまで全ての生物において保存されている。この CCA 配列は、アミノ酸を受容するためだけではなく¹⁾、リボソーム上で、リボソーム RNA のペプチジル転移反応部位に水素結合を介して認識されるためにも必須である²⁾。真性細菌と古細菌の一部では tRNA の遺伝子に CCA 配列がコードされている。しかし、古細菌の多くと真核生物においては、ゲノム上に tRNA の CCA 配列はコードされていない。そこで、CCA 付加酵素という RNA ポリメラーゼが存在し、tRNA の 3'末端に新規に CCA 配列を付加する。また、真性細菌にも CCA 付加酵素が存在し、その遺伝子を欠失させると菌の増殖が悪くなる。その理由は、tRNA は最初 RNA ポリメラーゼによって 3'末端にトレーラー配列という余分な配列を含んだ前駆体として転写され、この配列を RNase PH というエキソヌクラー