

## Chemical Tools for the Study of Polysialic Acid

## ポリシアル酸研究のための化学的手法

Samuel, Jomy<sup>†</sup>; and Bertozzi, Carolyn R.<sup>†‡\*\*\*</sup>

The Departments of <sup>†</sup>Chemistry and <sup>‡</sup>Molecular and Cell Biology and the <sup>\*\*\*</sup>Howard Hughes Medical Institute, University of California, Berkeley, California 94720 and the <sup>\*\*</sup>Center for Advanced Materials, Materials Science Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California 94720, USA  
FAX: 1-510-643-2628, E-mail: crb@berkeley.edu

**Key Words:** polysialic acid, neural cell adhesion molecule, conformational epitope, glycoconjugate, metabolic labelling

## Abstract

Polysialic acid (PSA) is a versatile biopolymer. PSA can be detected in a wide range of eukaryotes, including higher invertebrates and vertebrates, and also some prokaryotes, such as the neuroinvasive bacteria *Neisseria meningitidis* B. In mammals, PSA expression is developmentally regulated and plays significant roles in both neural development and in cancer. In bacteria, PSA is responsible for virulence. Spectroscopic methods, combined with immunological analysis, have played a significant role in understanding the relationship between PSA's structure and its biological functions. Chemical tools, including unnatural sialic acid analogs, have facilitated modulation of PSA's structure in cell culture and *in vivo*. The use of unnatural sialic acids has led to the development of vaccines for meningitis and cancer.

## 要約

ポリシアル酸 (PSA) は、多機能バイオポリマーである。PSA は高等な無脊椎動物や脊椎動物などの真核生物、および、神経侵襲性細菌である *Neisseria meningitidis* B のような原核生物など、広い範囲にわたって検出される。哺乳類において、PSA の発現は発生過程により制御され、神経発生、および、細胞の癌化に重要な役割を果たしている。細菌においては、PSA は毒性の原因となる。分光学的手法と免疫学的分析を組み合わせることで、PSA の構造と、その生物学的機能の関連性に対する理解が非常に深まった。天然には存在しないシアル酸類似体を含めた化学的手法の利用は、培養細胞、もしくは、*in vivo* において、PSA 発現の調節を容易にした。非天然型シアル酸の利用が、髄膜炎菌、さらに、癌に対するワクチンの開発につながった。

## A. Introduction

Polysialic acid (PSA) is a cell surface carbohydrate comprising a linear homopolymer of *N*-acetylneuraminic acid (NeuNAc or sialic acid). PSA plays critical roles in cell-cell interaction and recognition events. PSA expression in mammals is developmentally regulated: in the embryo, PSA is found in heart, muscle, kidney, and brain tissue (1–3), while in the adult, PSA is restricted to two regions of permanent plasticity, regenerating neural and muscle tissues (4–6). The protein scaffold found to bear PSA include the neural cell adhesion molecule (NCAM),  $\alpha$ -subunit of the voltage-gated sodium channel in adult rat brain (7), CD36 in milk (8) and the polysialyltransferases, PST and STX (9). NCAM appears to be the primary substrate for polysialylation in adult tissues: the absence of NCAM expression almost completely abrogates PSA immunoreactivity (10). A critical player in cell adhesion events in the central nervous system (CNS), NCAM is thought to operate by promoting cell-cell interactions via homophilic binding of NCAM molecules on apposing membranes (11). Polysialylation of NCAM disrupts its ability to mediate cell-cell interactions and facilitates cell migration during development and neurite outgrowth (12–14). The anti-ad-

## A. はじめに

ポリシアル酸 (PSA) は *N*-acetylneuraminic acid (NeuNAc、もしくは、シアル酸) の直鎖状ポリマーからなる細胞表面糖鎖である。PSA は細胞-細胞間相互作用、および、認識に重要な役割を果たす。哺乳類における PSA の発現は発生段階において制御されている。胎児では、PSA は心臓、筋肉、腎臓、および、脳組織に発現している (1–3)。一方、成体において、PSA の発現は、常に可塑性を持つ、再生可能な神経と、筋組織の 2 つの部位に限られている (4–6)。PSA の担体タンパク質は、神経細胞接着分子 (NCAM)、ラット脳に存在する膜電位依存性ナトリウムチャンネル  $\alpha$  サブユニット (7)、ミルク中の CD36 (8)、そしてポリシアル酸転移酵素の PST と STX (9) である。成体組織においては、神経細胞接着分子 (NCAM) が、最も主要なポリシアル化の基質となっているようである。NCAM 発現の欠損は、ほぼ完全に、PSA の免疫反応性を消失させる (10)。中枢神経系 (CNS) での細胞接着において、重要な役割を持つ NCAM は、向かい合った細胞膜上の NCAM 分子同士のホモフィリックな結合を介して、細胞-細胞間相互作用を促進すると考えられている (11)。ポリシアル化された NCAM は、細胞-細胞間相互作用を仲介する能力を失い、神経発生と神経突起伸長における細胞移動を容

hesive nature of polysialylated NCAM has been attributed to both its large hydrated volume and its negative charge (15). Neo-expression of polysialylated NCAM is observed in certain metastatic tumors, including lung carcinomas (16-19), neuroblastoma (20,21), medulloblastoma (22), pancreatic cancer (23), pituitary tumors (24), and Wilms' tumor (25,26). Analogous to its role during development, neo-expression of polysialylated NCAM in tumors may interfere with cell-cell interactions and thereby enhance cells' metastatic potential (27,28).

The functions of PSA are not limited to mammalian systems, as evidenced by its production in neuroinvasive bacteria (29,30), fish (31,32), sea urchin eggs (33), and *Drosophila* embryos (34). In fact, the sialic acid homopolymer was first isolated from the culture fluid of *E. coli* K235-L. This bacterial compound was dubbed colominic acid (35). Subsequently, homopolymers of sialic acid were isolated from other strains of *Escherichia coli* and *Neisseria meningitidis* serogroup B and C (36,37). Polysialic acids isolated from *N. meningitidis* serogroup B and C were designated group B meningococcal polysaccharide (GBMP) and group C meningococcal polysaccharide (GCMP), respectively. In bacteria, PSA is associated with the capsule and plays a significant role in virulence. PSA may aid in evasion of the host immune system by allowing the bacteria to masquerade as "self" (38). This lack of immunogenicity has hindered development of meningitis vaccines.

PSA's involvement in neural plasticity, cancer and meningitis infection has motivated structural and immunological studies aimed at deciphering the molecular basis of PSA's roles in human biology. Physical methods like nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and infrared spectroscopy (IR) spectroscopy have been used to characterize the structure of PSA and correlate physical features with immunological properties. Knowledge of PSA's structure-function relationship has been employed in development of vaccines against meningitis and cancer. One critical step in vaccine development has been the use of PSA containing unnatural sialic acids as a means to circumvent self-tolerance. Unnatural sialic acids have also been exploited as chemical tools for probing and modulating PSA biosynthesis in mammalian cells. Here we provide an overview of the use of spectroscopic and chemical methods to illuminate the roles of PSA in human biology.

## B. Spectroscopy in Understanding the Structure of PSA

### B-1. Linkage between Sialic Acid Residues

Initial structural characterization of PSA employed homopolymers isolated from bacteria. Although polysaccharides from meningitis causing bacteria *N. meningitidis* group B and C both contain sialic acid exclusively, they differ in their chemical and immunological properties (36). While group C polysaccharide is immunogenic in humans, group B polysaccharide is not (39-41). Periodate oxidation of polysaccharides isolated from

易にする (12-14)。ポリシアリル化された NCAM の抗接着性は、その水和物の大きな容量と、負電荷に起因する (15)。ポリシアリル化された NCAM は、肺癌 (16-19)、神経芽細胞腫 (20、21)、髄芽細胞腫 (22)、膵臓癌 (23)、下垂体腫瘍 (24)、そして、ウィルムス腫瘍 (25、26) を含む、特定の転移性腫瘍においても発現する。発生においてける役割と同じように、腫瘍におけるポリシアリル化された NCAM の発現は、細胞-細胞間相互作用を阻害し、それゆえ、腫瘍細胞の転移能力を増強するすると考えられる (27、28)。

PSA は、神経侵襲性細菌 (29、30)、魚類 (31、32)、ウニ卵 (33)、および、ショウジョウバエ胚 (34) においても発現しており、その機能は、哺乳動物に限られていない。実際、シアル酸ホモポリマーは、*E. coli* K235-L 株の培養液中から最初に単離された。この細菌由来の化合物は、コロミン酸と名付けられた (35)。続いて、他の *E. coli* 株、および、*Neisseria meningitidis* serogroup B と C からシアル酸ホモポリマーが単離された (36、37)。*Neisseria meningitidis* serogroup B と C から単離された PSA は、それぞれ、グループ B 髄膜炎菌多糖 (GBMP)、および、グループ C 髄膜炎菌多糖 (GCMP) と名付けられた。細菌において、PSA は莢膜に結合しており、細菌毒性に重要な役割を持つ。PSA が存在する細菌は、宿主にとって自己であるのように装い、宿主の免疫系を回避する (38)。この抗原性の欠如のため、髄膜炎菌のワクチン開発が遅れていた。

PSA は神経可塑性、癌、髄膜炎菌感染に関与するため、ヒトの生物学における PSA の機能の分子基盤を解明するための、構造学的、および、免疫学的研究が盛んに行われた。核磁気共鳴 (NMR) や赤外線スペクトロメトリー (IR) のような物理学的手法が、PSA の構造解析に使われ、PSA の物理学的特徴と免疫学的性質を関連づけた。PSA の構造と機能の相関関係に対する知識が、髄膜炎菌、および、癌に対するワクチン開発に利用されている。ワクチン開発において一つの重要なことは、自己に対する免疫寛容を回避するために、非天然型のシアル酸を持つ PSA を使用することである。また、非天然型シアル酸は、哺乳動物細胞における PSA の生合成過程を追跡し、調節するための化学的道具としても利用できる。今回、我々は、ヒトの生物学における PSA の機能解明のための分光学的、および、化学的手法の利用について概観する。

## B. PSAの構造を理解するための分光学

### B-1. シアル酸残基間の結合様式

PSA の最初の構造解析には、細菌から単離されたシアル酸ホモポリマーが使われた。髄膜炎を引き起こす *N. meningitidis* group B と C の多糖は、どちらもほとんどシアル酸のみから成るが、化学的、および、免疫学的性質が異なっている (36)。group C の多糖がヒトにおいて免疫原性を持つものに対して、group B の多糖は持たない (39-41)。 *N. meningitidis* serogroup B、

*N. meningitidis* serogroup B (GBMP) and *E. coli* K1 (colominic acid) suggested that both are homopolymers of  $\alpha$ -2,8-linked sialic acid (Fig. 1A) (36,42).  $^{13}\text{C}$  NMR confirmed this hypothesis (43). Similarly, periodate oxidation and  $^{13}\text{C}$  NMR indicated that the polysaccharide isolated from *N. meningitidis* serogroup C (GCMP) is a homopolymer of  $\alpha$ -2,9-linked sialic acid residues (Fig. 1B).

In addition to the linkage difference, GBMP and GCMP differ in their modification by acetyl groups. Group C meningococcal polysaccharide contains both *N*- and *O*-acetyl groups and is much more susceptible to acid-catalyzed cleavage and methanolysis. The group B meningococcal polysaccharide, on the other hand, contains only *N*-acetyl groups (36). The presence of *O*-acetyl groups is responsible for GCMP's resistance to neuraminidase isolated from *Vibrio cholerae* and *Clostridium perfringens*; GBMP is completely hydrolyzed by these enzymes. However, de-acetylation of the group C meningococcal polysaccharide is not sufficient to render it non-immunogenic in humans (44,45). Taken together, these observations suggest that the linkage between sialic acids is critical to the different immunological properties of group B and C meningococcal polysaccharides.

The lack of immunological response to  $\alpha$ -2,8-linked polysialic acid isolated from *N. meningitidis* serogroup B (GBMP) and *E. coli* K1 (colominic acid) suggested that a similar epitope might be present in mammals. Discovery of  $\alpha$ -2,8-linked polysialic acid in chicken, rat and human embryonic brain

および、*E. coli* K1 から単離された多糖 (GBMP、および、コロミン酸) の過ヨウ素酸化は、これらが両方とも、 $\alpha$ -2,8 結合したシアル酸ホモポリマーであることを示唆した (図 1A) (36, 42)。 $^{13}\text{C}$  NMR 解析はこの仮説を確定した (43)。同じように、過ヨウ素酸化と  $^{13}\text{C}$  NMR 解析によって、*N. meningitidis* serogroup C から単離された多糖 (GCMP) は、 $\alpha$ -2,9 結合したシアル酸ホモポリマーであることが示された (図1B)。

結合様式の違いに加えて、GBMP と GCMP ではアセチル基による修飾も異なっている。GCMP は *N*-、および、*O*-アセチル基の両方を含んでおり、酸による分解、およびメタノリシスに対する感受性が高い。一方、GBMP は *N*-アセチル基のみを含む (36)。*O*-アセチル基の存在のため、GCMP は *Vibrio cholerae*、および、*Clostridium perfringens* から単離されたノイラミニダーゼに対して抵抗性を示す。GBMP はこれらの酵素によって完全に加水分解される。しかし、GCMP の脱アセチル化は、それがヒトにおいて免疫原性を消失させるのには、不十分である (44、45)。これらの結果は、GBMP と GCMP の免疫学的性質の違いには、シアル酸残基間の結合様式が重要であることを示している。*N. meningitidis* group B、および、*E. coli* K1 から単離された  $\alpha$ -2,8 結合 PSA (GBMP、および、コロミン酸) に対する免疫応答性の欠如から、似たようなエピトープが哺乳動物にも存在することが示唆された。ニワトリ、ラット、および、ヒト胎児脳組織における  $\alpha$ -2,8 結合 PSA の発見は、この理論を確固たるも

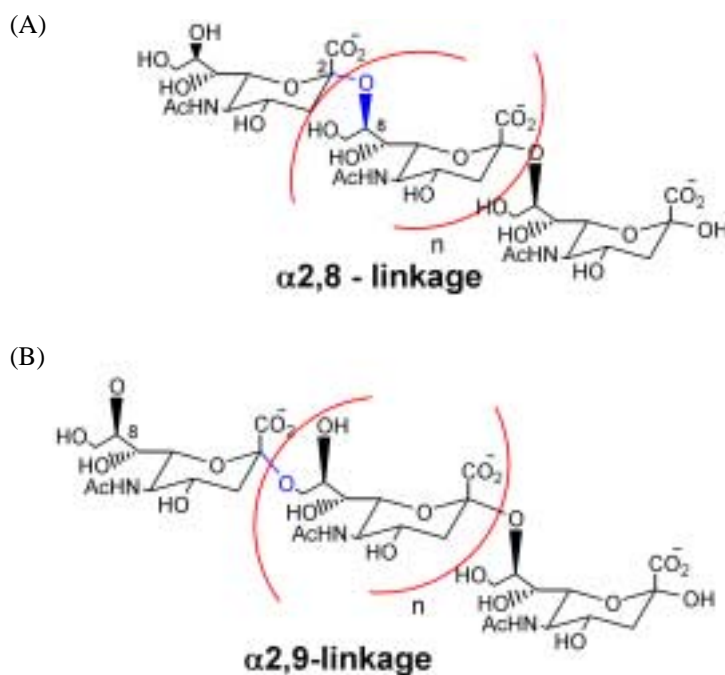


Fig. 1. Structure of (A)  $\alpha$ -2,8- and (B)  $\alpha$ -2,9-linked polysialic acid.

tissues confirmed this theory. (2,46-49). An antibody raised against the polysaccharide of *E. coli* K1 (colominic acid) cross-reacts with glycopeptides isolated from human and rat brain (50,51), underscoring the similarity of prokaryotic and eukaryotic PSA.

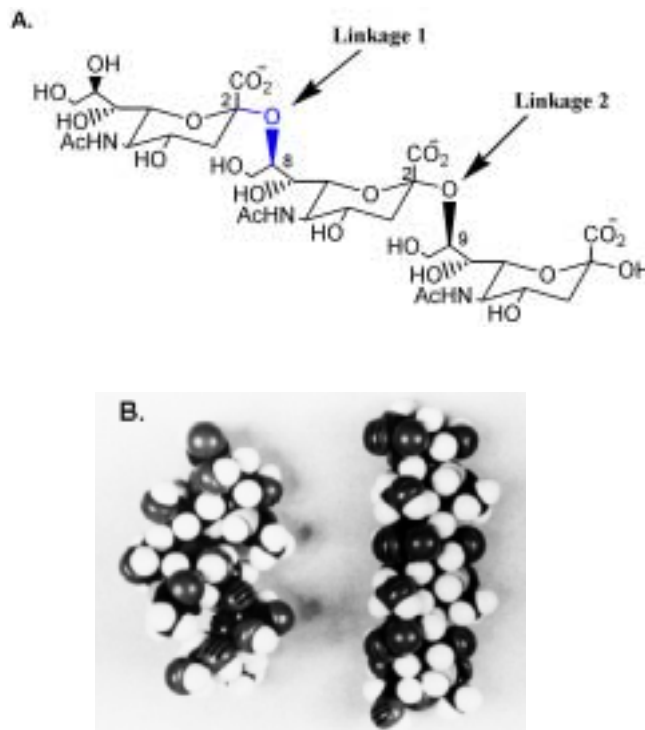
**B-2. Lactonization**

Another structural difference between the immunologically distinct GBMP and GCMP is the presence of ester linkages in GBMP and lack thereof in GCMP (52). GCMP showed evidence for lactonization only upon its *O*-deacetylation (53). The occurrence of ester linkages in GBMP is pH sensitive, increasing at lowered pH and virtually disappearing after mild alkali treatment. The relatively low molecular weight of partially esterified GBMP implied the formation of intra- rather than intermolecular ester linkages. Structural verification was again provided by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, which indicated that the carboxyl group of one sialic acid residue could be cross-linked to 9-OH of an adjoining residue. A detailed IR and NMR study of lactonization in group B meningococcal polysaccharide and its correlation with the immunogenicity showed that < 20% esterification was sufficient to abolish antibody recognition (54). The sensitivity of this antibody to chemical changes in its antigen was far greater than would be expected for an antibody that recognized a linear (*i.e.* structural) determinant, but was consistent with the presence of conformational determinant(s). Furthermore, low molecular weight GBMP is poorly antigenic both

のにした (2,46-49)。 *E. coli* K1 の多糖 (コロミン酸) に対して作製された抗体が、ヒトおよびラット脳から単離された糖ペプチドと交差反応したことから、原核生物と真核生物の PSA の類似性が示された。

B-2. ラクトン形成

免疫学的に異なった GBMP と GCMP との間で、もう一つの構造的差異は、GBMP にはエステル結合が存在するが、GCMP には存在しないという点である (52)。GCMP は脱 *O*-アセチル化した場合のみ、ラクトンを形成する (53)。GBMP に存在するエステル結合は pH に感受性があり、低 pH 条件では増加し、緩和アルカリ処理によって消失する。部分的にエステル化した GBMP の分子量が比較的小さいことから、エステル結合は分子間というよりはむしろ、分子内で形成されることが示唆された。<sup>13</sup>C NMR 解析によって、構造的な確証が得られ、一つのシアル酸残基のカルボキシル基と、それに結合している残基の 9 位のヒドロキシル基との間で、エステル結合が形成されることが示された。GBMP 中のラクトン形成についての詳細な IR、および、NMR 解析と、その免疫原性との関連性についての研究が行われた結果、20% 以上のエステル化が、抗体による認識を消失させるのに十分であることが示された (54)。この抗原の化学的変化に対する抗体の感受性は、抗体が抗原の直線的 (例えば 1 次構造的) な決定基を認識していると考えた場合より大きい、立体配座的な抗原決定基が存在すると考えた場合とは



**Fig. 2. (A) Linkages in (Sia)<sub>3</sub> trisaccharide. (B) 3D models of a free and internal trisaccharide.**

before and after lactonization, indicating the presence of conformational determinants on group B meningococcal polysaccharide.

### B-3. Conformation of Polysialic Acid

Further evidence for a conformational antigenic determinant comes from experiments designed to identify the minimal oligosaccharide necessary for antibody recognition. The deca-saccharide (NeuNAc)<sub>10</sub> is the smallest oligosaccharide able to bind group B meningococcal polysaccharide-specific antibodies (49,51,55); however, the antigen recognition site on GBMP antibody is only 6-7 residues long (56). This discrepancy was resolved by comparative NMR studies of the trisaccharide (NeuNAc)<sub>3</sub> and colominic acid that diagnosed a key structural feature of  $\alpha$ -2,8-linked polysialic acid. The two linkages of the trisaccharide differ in conformation from each other and from the inner linkages of colominic acid (57) (Fig. 2A). Furthermore, these conformational differences are present in the ultimate and penultimate linkages at either end of larger oligosaccharides. Thus, in a deca-saccharide, the inner six residues differ in conformation from the terminal disaccharides and are likely to be the antigenic part of the polysaccharide. Based on the NMR studies, Michon *et al.* (57) created a model of a free trisaccharide and an equivalent internally located trisaccharide in a sequence of colominic acid (Fig. 2B). Two dominant features indicative of the structural differences between the free and internal trisaccharides were (a) the end-to-end distance of the free trisaccharide is much shorter than that of the internal trisaccharide, (b) the carboxylate and acetamido groups of the free trisaccharide are randomly arranged, whereas those of the internal trisaccharide are essentially lined up on opposite sides of the molecule. Alignment of the carboxylate groups places them in close proximity to 9-OH groups and may explain the ease of lactone formation in GBMP and colominic acid.

Conformational analysis of PSA by NMR and molecular modeling indicates that  $\alpha$ -2,8-polysialic acid can adopt a wide range of energetically favorable helices, one of which is an extended helix with  $n=9$  (58,59) (Fig. 3). Interestingly, the PSA-specific antibody cross-reacts with polyadenylate, poly(A) (60), which is known to form helices of  $n=8-10$  (61,62). At  $n=9$ , poly(A) and polysialic acid helices adopt similar conformations. Along with supplying an explanation for the cross-reactivity of the PSA antibody, the helical model of PSA structure provides further support for the presence of conformational epitope. The weak affinity of anti-PSA antibodies for smaller  $\alpha$ -2,8-linked oligosaccharides may be due to increased flexibility of these shorter oligomers and their consequent inability to adopt the ordered conformational epitope.

In the extended helical structure, the carboxylate and acetamido groups of PSA are aligned (Fig. 3). <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR chemical shifts and potential energy calculations were used to compare the conformations of *N*-propionyl, *N*-butanoyl, *N*-

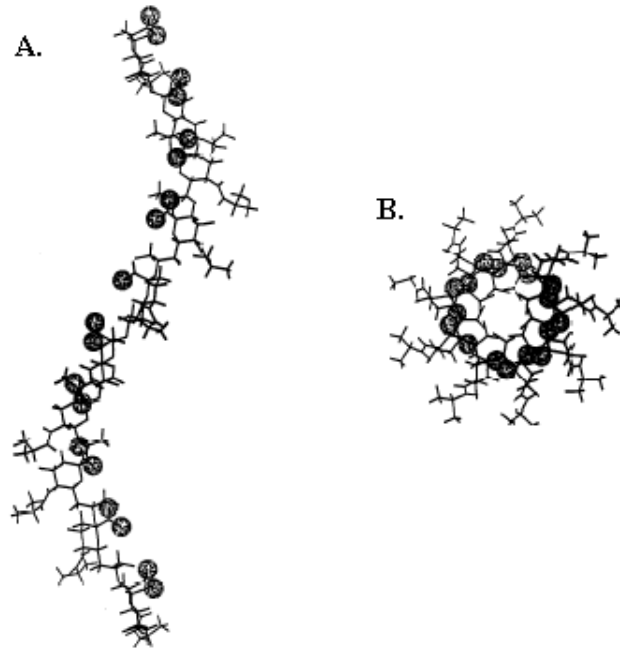
矛盾しない。さらに、ラクトン形成前後においても、低分子量 GBMP は抗原性に乏しいことが、GBMP 中の立体配座的な決定基の存在を示唆している。

### B-3. PSA の立体配座

抗体認識に必要な最小オリゴ糖単位を同定した実験によって、立体配座的な抗原決定基のさらなる証拠が得られている。10糖構造 {(NeuNAc)<sub>10</sub>} が GBMP 特異的抗体認識に必要な最小オリゴ糖単位である (49,51,55)。しかしながら、GBMP 特異的抗体による認識領域は、6~7 残基に過ぎない (56)。この矛盾は、3糖構造 {(NeuNAc)<sub>3</sub>} と  $\alpha$ -2,8 結合 PSA の構造的特徴をもつコロミン酸の NMR の比較から解決された。3糖構造中の2つの結合は、コロミン酸の内側のそれぞれの結合とは、立体配座が異なっている (57) (図 2A)。さらに、オリゴ糖の両末端と、両末端から 2 番目の結合にも立体配座的の違いが存在する。つまり、10糖構造において、内側の6残基は、末端の2残基 (両末端4残基) とは立体配座的に異なっており、内側の部分が多糖の抗原性を担っていると考えられる。Michon らは NMR 解析に基づいて、遊離の3糖とコロミン酸の内側に位置する3糖のモデルを提唱した (57) (図 2B)。遊離の3糖と内側に位置する3糖の間には、それらの構造的違いを示す2つの大きな特徴がある。(a) 1つ目は3糖の端から端までの距離が、遊離の3糖では、コロミン酸の内側に位置する3糖よりも短い点であり、(b) 2つ目として、遊離3糖のカルボキシル基とアセトアミド基は、ランダムに位置しているのに対して、コロミン酸の内側に位置する3糖中のそれらの官能基は、分子の反対側に整列している点である。カルボキシル基が隣の9位の水酸基と隣接していることは、GBMP とコロミン酸中でラクトンが形成されやすいことを説明する。

NMR と分子モデリングによる PSA の立体配座解析は、 $\alpha$ -2,8 結合 PSA が広範囲のエネルギー的に安定なヘリックスをとっており、その内の1つは、 $n=9$  の伸びたヘリックスであることを示した (58,59) (図 3)。興味深いことに、PSA 特異的抗体は、 $n=8-10$  のヘリックスを形成するポリアデニン {poly(A)} (60) と交差反応する (61,62)。 $n=9$  において、poly(A) と PSA のヘリックスは類似の立体配座をとる。PSA 特異的抗体の交差反応性の説明と同様に、PSA 構造のヘリックスモデルは、立体配座的なエピトープの存在をさらに支持している。抗 PSA 抗体の短い  $\alpha$ -2,8 結合オリゴ糖への弱い親和性は、短いオリゴ糖において柔軟性が増すことと、秩序ある立体配座的エピトープを形成できないことによると考えられる。

伸びたヘリックス構造中では、PSA のカルボキシル基とアセトアミド基は整列している (図 3)。<sup>13</sup>C と <sup>1</sup>H NMR の化学シフト、および、位置エネルギー計算を用いて、 $\alpha$ -2,8 結合 PSA の



**Fig. 3. Extended helical structure of PSA. (A) Side-view (B) Top-view.**

isobutanoyl, *N*-pentanoyl, *N*-hexanoyl and *N*-glycolyl derivatives of  $\alpha$ -2,8-polysialic acid. Despite their bulkiness, none of these substituents disrupted the extended helical conformation. Hence, the negatively charged carboxylate groups play a significant role in determining the conformational behavior of  $\alpha$ -2,8 polysialic acid.

The crystal structure of the PSA-binding fragment of the murine polyclonal antibody mAb735 provides further evidence that PSA must adopt a distinct conformation for antibody recognition. Modeling studies based on this structure suggest that PSA adopts a helical conformation with  $n = 6$  residues per turn and a pitch of  $n \times h = 36 \text{ \AA}$ . Such a structure would project the *N*-acetyl groups into the observed groove on the surface of the antibody. The antibody's recognition surface displays a shape and distribution of charges complementary to the predicted oligosaccharide conformation (63).

### C. Modulation of Polysialic Acid Structure Using Oligosaccharide Engineering

#### C-1. Chemical Modification of PSA and Application in Immunotargeting

The poor immunogenicity of the group B meningococcal polysaccharide and the structurally identical colominic acid (40,64,65) preclude their use as vaccines against meningitis B. Chemical conjugation of the group B polysaccharide to tetanus toxoid also failed to elicit an immune response (65). Tolerance of the group B meningococcal polysaccharide is likely due to its similarity to  $\alpha$ -2,8-linked polysialic acid found in human

*N*-プロピオニル、*N*-ブタノイル、*N*-イソブタノイル、*N*-ペンタノイル、*N*-ヘキサノイル、および、*N*-グリコリル誘導体の立体配座が比較された。これらがかさ高いにも関わらず、いずれの置換も伸びたヘリックス構造を破壊しなかった。従って、負電荷を持ったカルボキシル基が  $\alpha$ -2,8 結合 PSA の立体配座を決定するのに重要だと考えられる。

マウスモノクローナル抗体 735 の PSA 結合断片の結晶構造解析は、PSA が抗体による認識のための独特な立体配座をとっていることへのさらなる証拠を与える。この構造に基づいたモデリング解析は、PSA が 1 ターンにつき 6 残基で  $n \times h = 36 \text{ \AA}$  のピッチのヘリックス立体配座をとることを示している。この構造によると、*N*-アセチル基が抗体表面の溝にはまりこんでいる。抗体の認識表面は、予想されるオリゴ糖の立体配座と相補的な形と電荷の分布を示す (63)。

### C. オリゴ糖鎖工学技術を用いたポリシアル酸構造の調節

#### C-1. PSA の化学的修飾と免疫標的への応用

GBMP とコロミン酸の低い免疫原性のため (40, 64, 65)、それらを髄膜炎菌グループ B に対するワクチンとして使用することができない。GBMP と破傷風菌毒素の化学的複合体も、免疫反応を誘起することはできなかった (65)。GBMP に対する寛容は、ヒト胎児、および、成体組織に存在する  $\alpha$ -2,8 結合 PSA との類似のためだと考えられる (50)。宿主の免疫系が GBMP と自

embryonic and adult tissues (50). To circumvent the problem of the host immune system identifying group B antigen as “self,” Jennings *et al.* replaced the *N*-acyl group of sialic acid in group B meningococcal polysaccharide with *N*-propionyl groups: *in vitro* *N*-deacetylation of GBMP with a strong base yielded a precursor, which was then *N*-propionylated to give PSA containing unnatural *N*-propionylated sialic acid. Conjugation of the resultant *N*-propionylated GBMP to tetanus toxoid yielded an antigen that, when injected in mice, induced production of high levels of cross-reactive GBMP-specific IgG antibodies (66). Following this initial report on the use of unnatural sugars for therapeutics, further studies demonstrated that using *N*-propionyl, but not *N*-acyl polysialic acid, it was possible to produce antibodies that were bactericidal but not cross-reactive with human tissues (67,68). More recently, *N*-propionylated polysialic acid has been used to develop vaccines against small cell lung cancer (69,70).

In the above examples, PSA structure was modified *in vitro* and the altered PSA used in the production of antibodies. Over the past decade, there has been an increasing interest in

己を同一視してしまう問題を回避するために、Jennings らは GBMP 中のシアル酸の *N*-アシル基を *N*-プロピオニルの基に置換した。*In vitro* での GBMP の脱 *N*-アセチル化は強塩基下で行い、その前駆体を *N*-プロピオニル化し、非天然の *N*-プロピオニル化シアル酸を持った PSA を合成した。*N*-プロピオニル化 GBMP と破傷風菌毒素の複合体を抗原として使いマウスに注射すると、交差反応性を持つ GBMP 特異的 IgG 抗体が高レベルで生産された (66)。治療に非天然糖鎖を用いるというこの初めの報告に続いて、さらなる研究が行われ、*N*-アシル化ではなく、*N*-プロピオニル化 PSA を用いることによって、殺菌性で、しかも、ヒト組織とは交差反応しない抗体を生産できることが証明された (67,68)。より最近になって、*N*-プロピオニル化 PSA は小細胞肺癌に対するワクチン開発にも利用されている (69,70)。

上の例においては、PSA の構造を *in vitro* で改変し、それを抗体生産に利用した。過去 10 年間で、複合糖質の生物学的機能

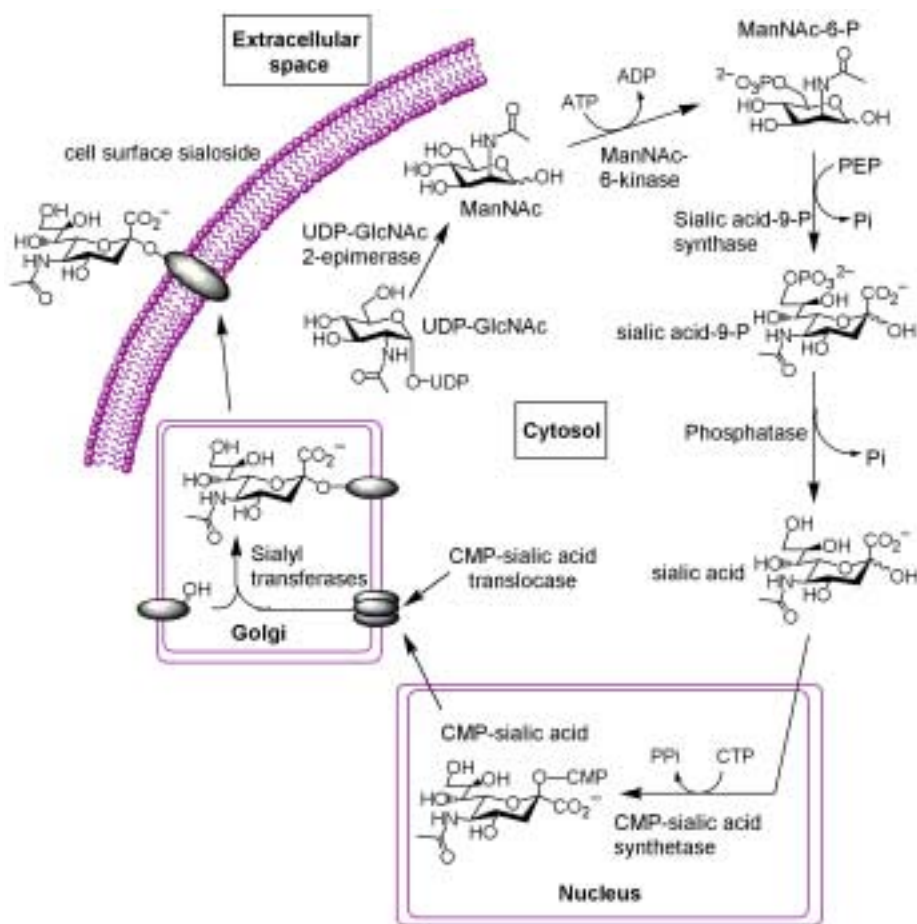


Fig. 4. Sialic acid biosynthetic pathway.

the *in vivo* introduction of unnatural sugars into glycoconjugates for studying their biological functions and for breaking immunological barriers. This technique has proven especially useful for sialic acid-containing glycoconjugates that are known to play a significant role in processes including cell adhesion and recognition, transport processes and antigenicity. The following sections provide a brief overview of the progress made in this direction with an emphasis on the study of PSA.

### C-2. Sialic Acid Biosynthesis in Mammalian Cells

In mammalian cells, sialic acid glycoconjugates are synthesized through a series of enzymatic steps starting from *N*-acetylmannosamine (ManNAc) or uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) (Fig. 4). Biosynthesis is initiated by the phosphorylation of ManNAc and subsequent condensation with phosphoenolpyruvate (PEP) to yield sialic acid 9-phosphate. After hydrolysis of the phosphate monoester by a specific phosphatase, sialic acid is transported into the nucleus where it is activated by condensation with CTP to give CMP-sialic acid (71). The activated sugar donor is transported into the Golgi compartment by CMP-sialic acid transporter. Membrane-bound sialyltransferases then catalyze transfer of the sugar residue onto the termini of oligosaccharide chains (72). In mammals, two polysialyltransferases are known to carry out this final step in PSA biosynthesis – STX (ST8SiaII) and PST (ST8SiaIV) (73). STX is expressed predominantly during development, whereas PST is the major polysialyltransferase expressed in the adult CNS (20,74–78).

### C-3. Promiscuity in the Polysialic Acid Biosynthesis and Its Use in Metabolic Labeling

Several *in vitro* studies have hinted at the permissive nature of the enzymes in the sialic acid biosynthetic pathway, especially with regard to the *N*-acyl substituent on ManNAc. Reutter and co-workers were the first to show that cells will convert unnatural ManNAc precursors into the corresponding unnatural sialic acid derivatives. They introduced *N*-propanoyl, *N*-butanoyl and *N*-pentanoyl sialic acids into both membrane and serum glycoproteins (79–81) (Fig. 5). Jacobs *et al.* further investigated the permissivity of the sialic acid biosynthetic pathway towards structural alterations of the *N*-acyl substituents of ManNAc (82). A major finding was that the sialic acid biosynthetic pathway is highly sensitive to elongation of the side chain beyond five carbon atoms.

The Bertozzi group took advantage of the promiscuity in sialic acid biosynthesis to develop new methods to study PSA production and function. They showed that mammalian cells were capable of taking *N*-levulinoylmannosamine (ManLev) (Fig. 5) from the media, converting it into *N*-levulinoylsialic acid (SiaLev) and incorporating it into PSA (83,84). The advantage of using the *N*-levulinoyl substituent is that it contains the biologically orthogonal keto-group, whose reactivity can then be exploited. Cells treated with *N*-levulinoylmannosamine

の解析、もしくは、免疫学的障壁の解決のため、*in vivo* において、非天然単糖を複合糖質に導入することへの注目が高まっている。この技術は、細胞接着、認識、輸送過程、および、免疫原性において、重要な役割を果たすと考えられているシアル酸含有複合糖質の研究において特に有用である。次の章では、PSA の研究を強調しつつ、この技術に関する進歩を概観する。

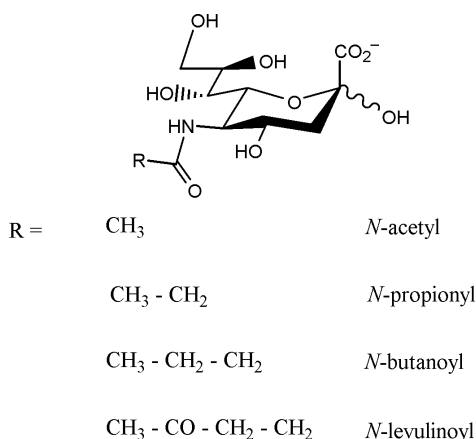
#### C-2. 哺乳動物細胞におけるシアル酸生合成

哺乳動物細胞においては、シアル酸含有複合糖質は *N*-アセチルマンノサミン (ManNAc)、もしくは、ウリジン 2 リン酸 *N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) から、一連の酵素反応によって合成される (図 4)。ManNAc のリン酸化によって生合成が開始し、続くフォスホエノールピルビン酸 (PEP) との縮合によってシアル酸 9-リン酸ができる。特異的な脱リン酸化酵素によってリン酸モノエステルが加水分解されると、シアル酸は核内に輸送され、そこで CTP と縮合し CMP-シアル酸となり、活性化される (71)。活性型糖供与体は CMP-シアル酸輸送体によって、ゴルジ体に運ばれる。そして、膜結合型シアル酸転移酵素が、シアル酸残基をオリゴ糖の末端に転移する反応を触媒する (72)。哺乳動物においては、PSA 生合成の最後の段階を担う 2 つのポリシアル酸転移酵素、STX (ST8SiaII) と PST (ST8SiaIV) が知られている (73)。STX は発生段階において優先的に発現し、一方 PST は成体の CNS において主に発現するポリシアル酸転移酵素である (20,74–78)。

#### C-3. PSA 生合成の改変とその代謝標識への利用

*In vitro* のいくつかの実験は、シアル酸生合成に関わる酵素が、特に ManNAc の *N*-アシル置換体に関して、寛容な性質も持つことを示した。Reutter らは、細胞が非天然型 ManNAc 前駆体をそれに対応する非天然型シアル酸誘導体に変換できることを最初に示した。彼らは、*N*-プロピオニル化、*N*-ブタノイル化、および、*N*-ペンタノイル化シアル酸を、細胞膜上、および、血清中の糖タンパク質に導入した (79–81) (図 5)。Jacobs らは、ManNAc の *N*-アシル置換体の構造的変化に対するシアル酸生合成経路の寛容性をさらに研究した (82)。大きな発見は、シアル酸生合成経路は、5 位の炭素以外の伸長には感受性が高いことが分かった点である。

Bertozzi らのグループは、PSA の生合成と機能研究における新しい方法の開発のため、シアル酸生合成を改変させるという点で多くの結果を出している。彼らは、哺乳動物細胞が培養液に入れた *N*-レプリノイルマンノサミン (ManLev) (図 5) を取り込んで、*N*-レプリノイルシアル酸 (SiaLev) に変換し、PSA に組み入れる能力を持つことを示した (83,84)。*N*-レプリノイル置換体を用いることの利点は、それが生物学的に対応するケト基を持ち、その反応性を後で利用できることである。ManLev で処



**Fig. 5. N-substituted analogs of unnatural sialic acid.**

(ManLev) express the corresponding keto-sialic acid in cell surface glycoconjugates. Ketones can then be selectively ligated with hydrazide-, hydroxylamine-, or thiocarbazine-conjugated molecules, allowing the cell surface to be chemically modified with a variety of epitopes (85). For example, Charter *et al.* was able to introduce *N*-levulinoyl sialic acid (SiaLev) into the polysialic acid on NCAM by incubating terminally differentiated NT2 neural cells in the presence of metabolic precursor *N*-levulinoylmannosamine (ManLev) (84). The ketone group within the levulinoyl side chain of SiaLev was then used as a chemical handle for detection using a biotinylated hydrazide probe.

More recently, the permissivity of the sialic acid biosynthetic pathway has been manipulated to introduce the *N*-azido group into cell surface sialic acid. This expands the repertoire of orthogonal functional groups available for cell surface modification (86). The detection of azido sugars in metabolic labeling was made possible by the Staudinger ligation, which involves a highly selective reaction between modified triphosphines and azides to produce an amide-linked product (87,88). The Staudinger ligation provides multiple advantages over the biotin hydrazide reaction with cell surface ketones. Peracetylated *N*-azidomannosamine precursor is less toxic to cells than peracetylated ManLev. In addition, the conditions for the Staudinger ligation reaction are milder than those used for hydrazide conjugation, promoting cell viability. The azide and phosphine are completely abiotic: no comparable functional groups exist on cells that might compete for these coupling partners. Ketones and aldehydes, on the other hand, are present within cells and can potentially compete with exogenous hydrazide probes. Because of these advantages, the use of the *N*-azido chemical handle is preferred for cell surface labeling of sialic acid.

Metabolic labeling of polysialylated NCAM and other neuronal glycoconjugates with SiaLev or SiaNAz offers a method

理した細胞は、対応するケト-シアル酸を細胞表面複合糖質上に発現する。その後、ケトンはヒドラジド-、ヒドロキシルアミン、もしくは、チオカルバジド-複合分子と選択的に連結でき、様々なエピトープによって細胞表面を化学的に修飾可能になる(85)。例えば、Charterらは、分化したNT2神経細胞を代謝前駆体ManLev存在下で培養することによって、NCAM上のPSAにSiaLevを導入可能にした(84)。そして、SiaLevのレヴリノイル側鎖中のケトン基は、ビオチン化ヒドラジドプローブを用いた検出のために使われた。

より最近になって、シアル酸生合成経路の寛容性が、細胞表面シアル酸に*N*-アジド基を導入するために利用されている。このことは、細胞表面修飾のために利用可能な官能基の種類を増加させる(86)。代謝標識中のアジド糖は、修飾されたトリホスフィンとアジドとが選択的に反応し、アミド結合を持った分子を生産するStaudinger反応によって検出可能である(87,88)。Staudinger反応は、細胞表面ケトンのビオチン化ヒドラジド反応と比べて、いくつかの利点がある。過アセチル化*N*-アジドマンノサミン前駆体は、過アセチル化ManLevに比べて細胞毒性が低い。さらに、Staudinger反応条件は、ヒドラジド化合物の反応条件よりも緩和であり、細胞の生存率が高い。アジドとトリホスフィンとは完全に非生物由来であり、これらのカップリングと競合するような官能基は細胞表面には存在しない。一方、ケトンとアルデヒドは細胞にも存在し、外来性ヒドラジドプローブと競合する可能性がある。このような点から、細胞表面シアル酸の標識には、*N*-アジド化合物の利用が有利である。

SiaLev、もしくは、SiaNAzを用いたポリシアル化NCAM、および、他の神経細胞複合糖質の代謝標識は、神経回路の変化を同時に誘導し検出するための方法を提供した。CNSの可塑性は、新たなシナプス構造の形成に関わっている(89,90)。再モデ

to simultaneously induce and detect changes in neuronal networks. Plasticity in the CNS involves the formation of new synaptic structures (89,90). By the nondestructive labeling of structures that have undergone remodeling it may be possible to identify and map neuronal networks involved in synaptic plasticity. However, both the nature and extent of incorporation of unnatural sialic acid into PSA need to be characterized before this method can be used to visualize physiological changes involved in synaptic plasticity. For example, it is not yet known if unnatural sialic acid residues are incorporated into the inner segments of PSA.

#### C-4. Inhibition of PSA Biosynthesis Using Unnatural Sialic Acid

While a variety of unnatural sialic acids can be incorporated into glycoconjugates, these unnatural glycoconjugates produced are not necessarily suitable substrates for further elaboration. NT2 neurons treated with up to 10 mM *N*-propionylmannosamine (ManProp) showed no changes in PSA expression. However, PSA biosynthesis was reduced at 1 mM *N*-butylmannosamine (ManBut) and almost completely abrogated at 3 mM ManBut, indicating that it functions as a metabolic inhibitor of PSA expression (91). A similar effect was observed with SH-SY5Y cells (human neuroblastoma), H345 cells (human small cell lung carcinoma), and HeLa cells (human cervical carcinoma) stably transfected with the 140-kD isoform of NCAM and the human polysialyltransferase STX. An analysis of the total cellular sialoside using periodate-resorcinol assay confirmed that ManBut is not a general inhibitor of sialylation. This led to the conclusion that inhibition of PSA biosynthesis by ManBut was exerted at the level of polysialyltransferase activity.

*In vitro* studies using recombinant protein A fusions of STX and PST catalytic domains and the extracellular domain of NCAM expressed as a Fc fusion (NCAM-Fc) showed that CMP-*N*-butanoylsialic acid (CMP-SiaBut) was used by both the polysialyltransferases less efficiently than either natural CMP-sialic acid or CMP-*N*-propionylsialic acid (CMP-SiaProp). The tolerance of the polysialyltransferases for NCAM primed with unnatural sialic acid was investigated by first incubating NCAM-Fc with either CMP-SiaProp or CMP-SiaBut in the presence of STX and then with native CMP-sialic acid and either STX or PST. Interestingly, STX polysialylated NCAM-Fc primed with SiaBut less efficiently than NCAM-Fc primed with SiaProp, and both primed substrates were inferior to unprimed NCAM-Fc. By contrast, PSA extension catalyzed by PST appeared to be independent of the primer structure on NCAM-Fc indicating that PST is more tolerant of an acceptor substrate containing unnatural sialic acid. This is an important observation for two reasons: (1) the activity of STX is diminished by unnatural *N*-acyl groups within the priming sialic acid residues (2) it highlights the difference in the acceptor substrate specificity of the two

リングする構造を破壊しないように標識することによって、シナプスの可塑性に関わる神経回路を同定し、マッピングすることが可能になるだろう。しかしながら、シナプスの可塑性に関わる生理学的変化の可視化にこの方法を利用する前に、PSAに取り込まれる非天然シアル酸の性質と量を同定する必要がある。例えば、非天然シアル酸残基が、PSAの末端だけでなく内側の部分にまで取り込まれているかどうかは、未だ明らかではない。

#### C-4. 非天然型シアル酸を用いた PSA 生合成の阻害

様々な非天然シアル酸が複合糖質に取り込まれるが、それらの非天然型複合糖質の産生は、必ずしもその後の生合成の適当な基質にはならない。NT2 神経細胞を 10 mM までの *N*-プロピオニルマンノサミン (ManProp) で処理しても、PSA の発現に変化は見られない。しかし、PSA 生合成は 1 mM の *N*-ブチルマンノサミン (ManBut) 処理により減少し、3 mM の ManBut 処理により完全に阻害され、このことは、ManBut が PSA 発現の代謝阻害剤として機能することを示している (91)。似た効果が、NCAM の 140 kDa アイソフォームとヒトポリシアル酸転移酵素 STX を安定的に発現させた、SH-SY5Y 細胞 (ヒト神経芽細胞腫)、H345 細胞 (ヒト小細胞肺癌)、および、HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌) においても観察される。過ヨウ素酸-レゾルシノール法を用いた細胞内全シアロシド解析の結果、ManBut がシアリル化の一般的な阻害剤ではないことが分かった。このことは、ManBut による PSA 生合成阻害は、ポリシアル酸転移酵素活性の程度に影響を及ぼすためであることを示している。

プロテイン A と STX、および、PST との融合組換え体タンパク質、および、NCAM の細胞外領域と Fc の融合タンパク質 (NCAM-Fc) を用いた *in vitro* の実験は、CMP-*N*-ブタノイルシアル酸 (CMP-SiaBut) が、天然型 CMP-Sia、および、CMP-*N*-プロピオニルシアル酸 (CMP-SiaProp) よりも低い効率で、2 つの酵素に利用されることを明らかにした。初めに STX 存在下で、NCAM-Fc と CMP-SiaBut、もしくは、CMP-SiaProp を反応させ、次に天然型 CMP-Sia と STX、もしくは、PST 存在下で反応させた実験から、非天然型シアル酸が結合した NCAM に対するポリシアル酸転移酵素の寛容性が示された。興味深いことに、STX は SiaBut が結合した NCAM-Fc を、SiaProp が結合したもののより低い効率でポリシアリル化し、これら 2 つの基質はシアル酸が結合していない NCAM-Fc よりも劣っている。一方、PST が触媒するポリシアル酸伸長は、NCAM-Fc に結合しているシアル酸構造とは独立しており、PST は非天然型シアル酸を含む供与体基質に対してより寛容であることが示された。これは以下に述べる 2 つの理由から重要な観察である。(1) STX の活性は

polysialyltransferases. Thus, SiaBut-containing acceptors are poor substrates for STX and incorporation of SiaBut eventually leads to the inhibition of PSA biosynthesis.

The use of chemical methods to manipulate biological systems generally provides the advantages of time-dependent and reversible control. In these respects, use of the small molecule ManBut is an effective chemical genetic tool to control PSA biosynthesis. In HeLa cells expressing NCAM and STX, PSA expression was completely inhibited by treatment with 5 mM ManBut for 24 hours, but returned 24 hours after ManBut was removed from the medium. Previously, PSA could be modulated only by genetic manipulations or by enzymatic digestion. Transient disruption of PSA expression by ManBut might be used to study the roles of PSA in modulating cell adhesion, tumor metastasis, synapse formation, and organ development. The correlation of polysialylation with metastatic potential suggests potential applications of ManBut as an anti-metastatic agent (27,92).

#### C-5. Biochemical Engineering of PSA for Immunotargeting Tumor Cells

As mentioned earlier, in adults, PSA expression is restricted to regions of neural plasticity. However, neo-expression is observed in neuroblastoma, medulloblastoma, pituitary, pancreatic and lung cancers. In an effort to develop carbohydrate-based vaccines against tumor, Jennings *et al.* raised antibodies against PSA that contained both natural sialic acid and SiaProp. They treated rat and mouse leukemia cell lines with ManProp, then subjected the cells to antibody-dependent cytotoxicity assays (93). Lysis of cells depended on the length and dose of their exposure to ManProp, suggesting the unnatural PSA antigen effectively targeted cells for antibody-mediated killing. Inoculation of mice with leukemia cell lines followed by treatment with ManProp showed a decrease in tumor growth and size, presumably due to the mice mounting an immune response to unnatural PSA. The same researchers also demonstrated that the metastasis of tumor cells could be controlled by introducing *N*-propionylated sialic acid analogs, followed by immunotherapy using antibodies specific for the modified antigen.

#### D. Conclusions

Polysialic acid plays critical roles in a variety of important roles in the virulence of neuroinvasive bacteria, neuronal development and cancer. PSAs isolated from *N. meningitidis* serogroup B and C differ in their chemical and immunological properties. While GCMP is immunogenic, GBMP is non-immunogenic. This difference in chemical and immunogenic properties of the two polysaccharides was explained by the identification of different linkages between the sialic acid residues in them. While GBMP has sialic acid residues linked by  $\alpha$ -2,8-linkages, the residues in GCMP are linked by  $\alpha$ -2,9-linkages.

NCAM-Fc に結合しているシアル酸残基中の非天然型 *N*-アシル基によって消失する。(2) これは、2つのポリシアル酸転移酵素が異なった供与体基質特異性を持つことを示している。SiaBut 含有供与体基質に対する STX の活性は乏しく、SiaBut の取り込みは最終的には PSA 生合成の阻害を導く。

一般的に、生物システムを操作するための化学的手法の利用は、それが時間依存的にかつ可逆的に制御できることに利点がある。この点に関し、低分子の ManBut の利用は、PSA 生合成を統御するための効果的な化学的かつ遺伝的道具である。NCAM と STX を発現している HeLa 細胞では、PSA の発現は 5 mM の ManBut を 24 時間処理することによって完全に阻害されるが、ManBut を培地から除いて 24 時間後に回復する。以前は、PSA 発現は遺伝学的操作、もしくは、酵素消化によるのみ調節可能であった。ManBut による PSA 発現を一過的に妨害することは、細胞接着、癌転移、シナプス形成、および、組織分化における PSA の役割を研究するのに有用であろう。ポリシアル化と癌転移の関連は、ManBut を抗転移薬剤として応用できる可能性を提示している(27, 92)。

#### C-5. 腫瘍細胞の免疫標的におけるPSAの生化学的工学技術

先に述べたように、成体における PSA の発現は可塑性を持つ神経の領域に限られている。しかし、神経芽細胞腫、髄芽細胞腫、下垂体癌、膵臓癌、および、肺癌などの腫瘍において PSA の発現が観察される。腫瘍に対する糖鎖に基づいたワクチン開発のため、Jennings らは天然型シアル酸、および、SiaProp を含む PSA に対する抗体を作製した。彼らはラットやマウスの白血病細胞を ManProp で処理した後、抗体依存的な細胞障害性の検定を行った (93)。細胞の溶解は、ManProp 処理の時間と濃度に依存しており、非天然型 PSA 抗原が、抗体による細胞死に対する効果的な標的となることを示唆している。マウスに ManProp 処理を行った白血病細胞を接種すると、腫瘍の成長と大きさが減少した。これは非天然型 PSA に対してマウスが免疫反応を起こしたためだと考えられる。彼らはまた、腫瘍細胞の転移が *N*-プロピオニルシアル酸の導入と、その後の非天然型抗原に特異的な抗体を用いた免疫療法によって制御可能であることを証明した。

#### D. 結 論

PSA は、神経侵襲性細菌の毒性、神経発生、および、癌において重要な役割を果たしている。*N. meningitidis* serogroup B と C から単離された PSA は、異なった化学的、免疫学的性質を持つ。GCMP が免疫原性を持つのにに対し、GBMP は持たない。2つの多糖の化学的、免疫学的性質の違いは、それらの異なったシアル酸残基の結合様式の同定によって説明された。GBMP が  $\alpha$ -2,8 結合のシアル酸残基を持つのに対して、GCMP は  $\alpha$ -2,9 結

Chemical assays and NMR and IR spectroscopy played an important role in these studies. The  $\alpha$ -2,8-linkages between the residues in GBMP allow the formation of a conformational epitope in which is recognized by the anti-GBMP antibodies. The identification of  $\alpha$ -2,8-linked PSA in human embryonic and adult tissues explained the non-immunogenicity of GBMP. This immunological barrier was overcome by the introduction of unnatural sialic acid residues into PSA leading to development of vaccine against meningitis B. A similar approach has also been used for the development of vaccine against small cell lung cancer.

Promiscuity in the sialic acid biosynthetic pathway has allowed the incorporation of unnatural sialic acid into PSA in cells. This is done by feeding the cells with the unnatural mannosamine precursor. This technique has been used to study the effect of these unnatural glycoconjugates on cancer(93) and axonal growth (94). The unnatural sugar ManBut has been identified as a modulator of PSA biosynthesis. However, the extent and nature of incorporation of unnatural sialic acid into PSA is not yet fully understood. Once these studies have been done, this technique could be quite useful in gaining better understanding of the role of PSA in cell-cell interaction and tumor metastasis.

### Acknowledgement

We thank Dr. Jennifer Kohler for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants to C.R.B. from the National Institutes of Health (GM 58867).

### References

1. Finne, J., Bitter-Suermann, D., Goridis, C., and Finne, U. (1987) *J. Immunol.* **138**, 4402–4407
2. Finne, J., Finne, U., Deagostini-Bazin, H., and Goridis, C. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**, 482–487
3. Roth, J., Taatjes, D. J., Bitter-Suermann, D., and Finne, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**, 1969–1973
4. Bruses, J. L., and Rutishauser, U. (2001) *Biochimie* **83**, 635–643
5. Edelman, G. M. (1985) *Exp. Cell Res.* **161**, 1–16
6. Rutishauser, U., and Landmesser, L. (1996) *Trends Neurosci.* **19**, 422–427
7. Zuber, C., Lackie, P. M., Catterall, W. A., and Roth, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9965–9971
8. Yabe, U., Sato, C., Matsuda, T., and Kitajima, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 13875–13880
9. Close, B. E., and Colley, K. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34586–34593
10. Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S., and *et al.* (1994) *Nature* **367**, 455–459
11. Hall, A. K., Nelson, R., and Rutishauser, U. (1990) *J. Cell Biol.* **110**, 817–824
12. Rutishauser, U. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 679–684
13. Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A. K., Mann, D. M., and Sunshine, J. (1988) *Science* **240**, 53–57
14. Doherty, P., Cohen, J., and Walsh, F. S. (1990) *Neuron* **5**, 209–219
15. Rutishauser, U. (1998) *J. Cell Biochem.* **70**, 304–312
16. Michalides, R., Kwa, B., Springall, D., van Zandwijk, N., Koopman, J., Hilken, J., and Mooi, W. (1994) *Int. J. Cancer Suppl.* **8**, 34–37
17. Miyahara, R., Tanaka, F., Nakagawa, T., Matsuoka, K., Isii, K., and Wada, H. (2001) *J. Surg. Oncol.* **77**, 49–54
18. Tanaka, F., Otake, Y., Nakagawa, T., Kawano, Y., Miyahara, R., Li, M., Yanagihara, K., Inui, K., Oyanagi, H., Yamada, T., Nakayama, J., Fujimoto, I., Ikenaka, K., and Wada, H. (2001) *Cancer Res.* **61**, 1666–1670
19. Tanaka, F., Otake, Y., Nakagawa, T., Kawano, Y., Miyahara, R., Li, M., Yanagihara, K., Nakayama, J., Fujimoto, I., Ikenaka, K., and Wada, H. (2000) *Cancer Res.* **60**, 3072–3080
20. Hildebrandt, H., Becker, C., Gluer, S., Rosner, H., Gerardy-Schahn, R., and Rahmann, H. (1998) *Cancer Res.* **58**, 779–784
21. Hildebrandt, H., Hammes, S., Bauer, M., Muhlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., and Rahmann, H. (2000) *Eur. J. Neurosci.* **12**, 273–273
22. Dubois, C., Figarella-Branger, D., Rougon, G., and Rampini, C. (1998) *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **192**, 289–296

合である。これらの研究において、化学的、および、NMR と IR を用いた分光学的解析が重要な役割を果たした。GBMP のシアル酸残基間の  $\alpha$ -2,8 結合は、抗 GBMP 抗体によって認識される立体配座のエピトープを形成している。ヒト胎児、および、成体組織における  $\alpha$ -2,8 結合 PSA の同定は、GBMP に免疫原性がないことを説明している。髄膜炎菌グループ B に対するワクチン開発におけるこの免疫学的障壁は、PSA に非天然型シアル酸残基を導入することによって克服された。同じ手法が、小細胞肺癌に対するワクチン開発にも利用されている。

シアル酸生合成経路の改変は、細胞の PSA 中に非天然型シアル酸残基を導入することで可能になった。これは、細胞に非天然型マンノサミン前駆体を与えることで達成される。この技術は、これら非天然型複合糖質の癌 (93)、および、軸索伸長 (94) における効果の研究に利用されている。非天然糖である ManBut は、PSA 生合成における調節分子となることがわかった。しかしながら、PSA に取り込まれる非天然型シアル酸の量や性質は、完全には理解されていない。これらの問題が解決されれば、この技術は、PSA の細胞-細胞間相互作用、および、腫瘍転移における役割を解明する上で非常に有用となるだろう。

名古屋大学大学院生命農学研究科

宮田 真路 記

23. Kameda, K., Shimada, H., Ishikawa, T., Takimoto, A., Momiyama, N., Hasegawa, S., Misuta, K., Nakano, A., Nagashima, Y., and Ichikawa, Y. (1999) *Cancer Lett.* **137**, 201–207
24. Daniel, L., Trouillas, J., Renaud, W., Chevallier, P., Gouvernet, J., Rougon, G., and Figarella-Branger, D. (2000) *Cancer Res.* **60**, 80–85
25. Roth, J., Zuber, C., Wagner, P., Taatjes, D. J., Weisgerber, C., Heitz, P. U., Goridis, C., and Bitter-Suermann, D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**, 2999–3003
26. Roth, J., Zuber, C., Wagner, P., Blaha, I., Bitter-Suermann, D., and Heitz, P. U. (1988) *Am. J. Pathol.* **133**, 227–240
27. Fukuda, M. (1996) *Cancer Res.* **56**, 2237–2244
28. Scheidegger, E. P., Lackie, P. M., Papay, J., and Roth, J. (1994) *Lab. Invest.* **70**, 95–106
29. Robbins, J. B., McCracken, G., Gotschlich, E. C., Orskov, F., Orskov, I., and Hanson, L. A. (1974) *New England Journal of Medicine* **290**, 1216–1220
30. Vimr, E., Steenbergen, S., and Cieslewicz, M. (1995) *J. Ind. Microbiol.* **15**, 352–360
31. Inoue, S., and Iwasaki, M. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 1018–1023
32. Nomoto, H., Iwasaki, M., Endo, T., Inoue, S., Inoue, Y., and Matsumura, G. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* **218**, 335–341
33. Kitazume, S., Kitajima, K., Inoue, S., Troy, F. A., Cho, J. W., Lennarz, W. J., and Inoue, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22712–22718
34. Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., and Gehring, W. J. (1992) *Science* **256**, 673–675
35. Barry, G. T., and Goebel, W. F. (1957) *Nature* **179**, 206
36. Liu, T.-Y., Gotschlich, E. C., Dunne, F. T., and Jonssen, E. K. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 4703–4712
37. Watson, R. G., Marinetti, G. V., and Scherp, H. W. (1958) *J. Immunol.* **81**, 337–344
38. Kahler, C. M., Martin, L. E., Shih, G. C., Rahman, M. M., Carlson, R. W., and Stephens, D. S. (1998) *Infect. Immun.* **66**, 5939–5947
39. Artenstein, M. S., Gold, R., Zimmerly, J. G., Wyle, F. A., Branche, W. C. J., and Harkins, C. (1970) *J. Infect. Dis.* **121**, 372–377
40. Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, B. L., Tramont, E. C., Kasper, D. L., Altieri, P. L., Berman, S. L., and Lowenthal, J. P. (1972) *J. Infect. Dis.* **126**, 514–521
41. Beuvery, E. C., Leussink, A. B., Van Delft, R. W., Tiesjema, R. H., and Nagel, J. (1982) *Infect. Immun.* **37**, 579–585
42. McGuire, E. J., and Binkley, S. B. (1964) *Biochemistry* **170**, 247–251
43. Bhattacharjee, A. K., Jennings, H. J., Kenny, C. P., Martin, A., and Smith, I. C. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 1926–1932
44. Vodopija, I., Baklaic, Z., Hauser, P., Roelants, P., Andre, F. E., and Safary, A. (1983) *Infect. Immun.* **42**, 599–604
45. Glode, M. P., Lewin, E. B., Sutton, A., Le, C. T., Gotschlich, E. C., and Robbins, J. B. (1979) *J. Infect. Dis.* **139**, 52–59
46. Rothbard, J. B., Brackenbury, R., Cunningham, B. A., and Edelman, G. M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11064–11069
47. Hoffman, S., Sorkin, B. C., White, P. C., Brackenbury, R., Mailhammer, R., Rutishauser, U., Cunningham, B. A., and Edelman, G. M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7720–7729
48. Finne, J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11966–11970
49. Finne, J., and Makela, P. H. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 1265–1270
50. Finne, J., Leinonen, M., and Makela, P. H. (1983) *Lancet* **2**, 355–357
51. Hayrinen, J., Bitter-Suermann, D., and Finne, J. (1989) *Mol. Immunol.* **26**, 523–529
52. Lifely, M. R., Gilbert, A. S., and Moreno, C. (1981) *Carbohydr. Res.* **94**, 193–203
53. Cheng, M. C., Lin, C. H., Lin, H. J., Yu, Y. P., and Wu, S. H. (2004) *Glycobiology* **14**, 147–155
54. Lifely, M. R., Gilbert, A. S., and Moreno, C. (1984) *Carbohydr. Res.* **134**, 229–243
55. Jennings, H. J., Roy, R., and Michon, F. (1985) *J. Immunol.* **134**, 2651–2657
56. Kabat, E. A. (1960) *J. Immunol.* **84**, 82–85
57. Michon, F., Brisson, J. R., and Jennings, H. J. (1987) *Biochemistry* **26**, 8399–8405
58. Brisson, J. R., Baumann, H., Imberty, A., Perez, S., and Jennings, H. J. (1992) *Biochemistry* **31**, 4996–5004
59. Henderson, T. J., Venable, R. M., and Egan, W. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 2930–2939
60. Kabat, E. A., Liao, J., Osserman, E. F., Gamian, A., Michon, F., and Jennings, H. J. (1988) *J. Exp. Med.* **168**, 699–711
61. Yathindra, N., and Sundaralingam, M. (1976) *Nucleic. Acids Res.* **3**, 729–747
62. Jeffrey, G. A., and Sundaralingam, M. (1976) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**, 353–384
63. Evans, S. V., Sigurskjold, B. W., Jennings, H. J., Brisson, J. R., To, R., Tse, W. C., Altman, E., Frosch, M., Weisgerber, C., Kratzin, H. D., and *et al.* (1995) *Biochemistry* **34**, 6737–6744
64. Jennings, H. J. (1983) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **41**, 155–208
65. Jennings, H. J., and Lugowski, C. (1981) *J. Immunol.* **127**, 1011–1018
66. Jennings, H. J., Roy, R., and Gamian, A. (1986) *J. Immunol.* **137**, 1708–1713
67. Pon, R. A., Lussier, M., Yang, Q. L., and Jennings, H. J. (1997) *J. Exp. Med.* **185**, 1929–1938
68. Granoff, D. M., Bartoloni, A., Ricci, S., Gallo, E., Rosa, D., Ravenscroft, N., Guarneri, V., Seid, R. C., Shan, A., Usinger, W. R., Tan, S., McHugh, Y. E., and Moe, G. R. (1998) *J. Immunol.* **160**, 5028–5036
69. Krug, L. M. (2004) *Semin. Oncol.* **31**, 112–116
70. Krug, L. M., Ragupathi, G., Ng, K. K., Hood, C., Jennings, H. J., Guo, Z., Kris, M. G., Miller, V., Pizzo, B., Tyson, L., Baez, V., and Livingston, P. O. (2004) *Clin. Cancer Res.* **10**, 916–923
71. Kean, E. L. (1991) *Glycobiology* **1**, 441–447
72. Warren, L. (1994) *Bound carbohydrates in nature*, Cambridge University Press, New York
73. Ong, E., Nakayama, J., Angata, K., Reyes, L., Katsuyama, T., Arai, Y., and Fukuda, M. (1998) *Glycobiology* **8**, 415–424
74. Scheidegger, E. P., Sternberg, L. R., Roth, J., and Lowe, J. B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22685–22688
75. Nakayama, J., Fukuda, M. N., Fredette, B., Ranscht, B., and Fukuda, M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 7031–7035
76. Angata, K., Nakayama, J., Fredette, B., Chong, K., Ranscht, B., and Fukuda, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 7182–7190
77. Seidenfaden, R., Gerardy-Schahn, R., and Hildebrandt, H. (2000) *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 680–688
78. Kojima, N., Kono, M., Yoshida, Y., Tachida, Y., Nakafuku, M., and Tsuji, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 22058–22062
79. Kayser, H., Zeitler, R., Kannicht, C., Grunow, D., Nuck, R., and Reutter, W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16934–16938
80. Keppler, O. T., Horstkorte, R., Pawlita, M., Schmidt, C., and Reutter, W. (2001) *Glycobiology* **11**, 11R–18R

81. Kayser, H., Ats, C., Lehmann, J., and Reutter, W. (1992) *Experientia* **49**, 885–887
82. Jacobs, C. L., Goon, S., Yarema, K. J., Hinderlich, S., Hang, H. C., Chai, D. H., and Bertozzi, C. R. (2001) *Biochemistry* **40**, 12864–12874
83. Mahal, L. K., Yarema, K. J., and Bertozzi, C. R. (1997) *Science* **276**, 1125–1128
84. Charter, N. W., Mahal, L. K., Koshland, D. E., Jr., and Bertozzi, C. R. (2000) *Glycobiology* **10**, 1049–1056
85. Yarema, K. J., Mahal, L. K., Bruehl, R. E., Rodriguez, E. C., and Bertozzi, C. R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 31168–31179
86. Luchansky, S. J., Hang, H. C., Saxon, E., Grunwell, J. R., Yu, C., Dube, D. H., and Bertozzi, C. R. (2003) *Methods Enzymol.* **362**, 249–272
87. Saxon, E., Armstrong, J. I., and Bertozzi, C. R. (2000) *Org. Lett.* **2**, 2141–2143
88. Saxon, E., and Bertozzi, C. R. (2000) *Science* **287**, 2007–2010
89. Toni, N., Buchs, P. A., Nikonenko, I., Bron, C. R., and Muller, D. (1999) *Nature* **402**, 421–425
90. Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G., and Kiss, J. Z. (1996) *Neuron* **17**, 413–422
91. Mahal, L. K., Charter, N. W., Angata, K., Fukuda, M., Koshland, D. E., Jr., and Bertozzi, C. R. (2001) *Science* **294**, 380–381
92. Jimbo, T., Nakayama, J., Akahane, K., and Fukuda, M. (2001) *Int. J. Cancer* **94**, 192–199
93. Liu, T., Guo, Z., Yang, Q., Sad, S., and Jennings, H. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 32832–32836
94. Buttner, B., Kannicht, C., Schmidt, C., Loster, K., Reutter, W., Lee, H. Y., Nohring, S., and Horstkorte, R. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 8869–8875

Received on June 16, 2004, accepted on June 24, 2004

### Profile of the Authors



**Jomy Samuel** received her B.Sc(Chemistry)B.Ed. degree from Regional Institute of Education, Ajmer in 1990 and then taught in high school for two years. She then went back to university and received her degree in M.Sc(Chemistry) in 1992 from University of Roorkee (Indian Institute of Technology, Roorkee) and then her degree in M.E (Polymer Technology) from Delhi University in 1997. After working for a brief period at Reliance Industries Ltd., Bombay, as an Engineer, and at Indian Institute of Technology, Delhi as a Project Associate, she joined the University of British Columbia, Vancouver, in 1998 to pursue her doctorate in Chemistry. Her Ph.D thesis involved investigation of the mechanism of the reactions catalyzed by two sugar epimerases namely, L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase and UDP-GlcNAc 2-epimerase. After receiving her doctoral degree in 2002, Dr. Samuel continued to pursue her research interests in the field of glycobiology and joined the Bertozzi group at the University of California, Berkeley, as a Howard Hughes Post-doctoral Fellow. Currently, she is working on the regulation of polysialyltransferases, PST and STX, using small molecules.

★★★★★★★★★★



Professor **Carolyn Bertozzi** is Professor of Chemistry and Molecular and Cell Biology at UC Berkeley, Faculty of the Materials Sciences and Physical Biosciences Divisions at the Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL), and an investigator of the Howard Hughes Medical Institute. She is also co-founder of Thios Pharmaceuticals, a company in the Bay Area focusing on drug development in sulfation pathways. Prof. Bertozzi's research at UC Berkeley spans the disciplines of chemistry and biology with an emphasis on studies of cell surface glycosylation pertinent to disease states. Her lab focuses on profiling changes in cell surface glycosylation associated with cancer, inflammation and bacterial infection, and exploiting this information for development of diagnostic and therapeutic approaches. At LBNL, Prof. Bertozzi's group works on the design of biomimetic materials for biomedical implant and nanotechnology applications. Prof. Bertozzi's awards include the Irving Sigal Young Investigator Award of the Protein Society, the ACS Award in Pure Chemistry, Merck Academic Development Program Award, Glaxo Wellcome Scholars' Award, Presidential Early Career Award in Science and Engineering, MacArthur Foundation Fellowship, Camille Dreyfus Teacher-Scholar Award, Arthur C. Cope Scholar Award, Horace S. Isbell Award in Carbohydrate Chemistry, Alfred P. Sloan Research Fellowship and the Donald Sterling Noyce Prize for Excellence in Undergraduate Teaching. She is also an elected member of the American Academy of Arts and Sciences.