Glycobiology of Sialyl 6-Sulfo Lewis x, a New Carbohydrate Ligand for Selectins

新規セレクトインリガンド、シアリル 6 -スルホルイスxのグリコバイオロジー

Kannagi, Reiji; and Kanamori, Akiko

Aichi Cancer Center, Department of Molecular Pathology, Kanokoden,
Chikusa-ku, Nagoya 464-8681, Japan
FAX:81-52-763-5233, E-mail: rkannagi@aichi-cc.pref.aichi.jp**Key words:** *fucosyltransferase, sialyltransferase, 6-O-sulfotransferase, high endothelial venule (HEV), helper memory T lymphocyte*

Abstract

Selectin is a family of cell adhesion molecules expressed on endothelial cells, leukocytes and platelets. It is implicated in extravasation of leukocytes, homing of lymphocytes, and infiltration or metastasis of malignant cells including leukemia cells and cancer cells. Sialyl Lewis x, sialyl Lewis a and several other carbohydrate determinants have been known to serve as carbohydrate ligands for selectins. The most-recently described selectin ligand is sialyl 6-sulfo Lewis x. This determinant was first described as a major lymphocyte homing receptor for L-selectin expressed on high endothelial venules of human lymph nodes, and later found to be expressed on certain subsets of lymphocytes and on some cells of epithelial origin, also serving as a ligand for E- and/or P-selectin. Expression of sialyl 6-sulfo Lewis x is regulated differently from that of conventional sialyl Lewis x in that it is metabolized through a distinct metabolic pathway involving the cyclization of sialic acid moiety. In this article we will review the distribution, synthesis and metabolic fate of this new selectin ligand, and discuss its physiological significance.

要 約

セレクトインは血管内皮細胞、白血球、血小板などに発現する細胞接着分子のファミリーであり、白血球の血管外脱出、リンパ球のホーミング、悪性細胞の浸潤や転移に関与するとされている。これまでにシアリルルイスx、シアリルルイスaなどがセレクトインの糖鎖リガンドであることが判明している。最も新しくセレクトインのリガンドであることが判明した糖鎖はシアリル 6 -スルホルイスxである。シアリル 6 -スルホルイスxは、はじめはヒト末梢リンパ節の高血管内皮細静脈の内皮細胞に発現するホーミングリセプターで、L-セレクトインと結合するリガンドとして見出された。その後、一部のリンパ球サブセットや上皮細胞にも発現し、E-セレクトインやP-セレクトインのリガンドとしてもはたらくことが判明している。シアリル 6 -スルホルイスxの発現の調節機構は、通常シアリルルイスxと大きく異なり、シアリル酸部分の環状化を介したユニークな経路で代謝される。本稿では、この新規のセレクトインリガンドについて、その発現の分布や合成・異化の機構を紹介し、その生理的意義を考察してみたい。

A. Selectins and Their Carbohydrate Ligands

The selectin family consists of three glycoprotein members: E-, P- and L-selectin. Each selectin has a calcium-dependent carbohydrate binding domain (C-type lectin domain) in its amino terminus, followed by an epidermal growth factor (EGF)-like domain, a varying number of complement-binding protein-like repeats, a transmembrane domain and a short cytoplasmic domain. Sialyl Lewis x determinant was first reported to be a carbohydrate ligand for E-selectin (1-3), and later its anomeric determinant sialyl Lewis a was found to serve as another carbohydrate ligand for E-selectin (4-6). Because the C-type lectin domains of the three members of the selectin family had been known to be considerably homologous, it had been predicted that sialyl Lewis x and/or sialyl Lewis a could also serve as ligand for P- and L-selectins, and the significant *in vitro* binding of P- and L-selectins to sialyl Lewis x/a determinants was reported by several groups of researchers.

A. セレクトインとその糖鎖リガンド

セレクトインファミリーの細胞接着分子には、E-、P-およびL-セレクトインの三者があり、いずれもアミノ末端から順に、糖鎖結合ドメイン（C-タイプレクチンドメイン）、EGF様ドメイン、数個の補体結合タンパク様ドメイン、膜貫通ドメインおよび短い細胞質ドメインを持つ。まずはじめにE-セレクトインの糖鎖リガンドがシアリルルイスxであることが判明し(1-3)、続いてシアリルルイスaもまたE-セレクトインのリガンドであることが見出された(4-6)。C-タイプレクチンドメインはセレクトインファミリーの三者間で相同性が高いため、シアリルルイスxやシアリルルイスaは、E-セレクトインのみならずP-およびL-セレクトインの糖鎖リガンドである可能性があると考えられていたので、やがてこれらの糖鎖がP-およびL-セレクトインのリガンドでもあるとする報告がいくつかあらわれた。

However, there are differences in binding specificity among these three species of selectins. Recently it has become increasingly clear that each selectin member has its own distinct ligand specificity. For instance, L-selectin is supposed to bind to the carbohydrate ligand expressed on the endothelial cells lining the high endothelial venules (HEV) of peripheral lymph nodes. However, most of the anti-sialyl Lewis x or anti-sialyl Lewis a antibodies, which readily detect E-selectin ligand on other cells and tissues, fail to react to HEV endothelial cells (7). This suggests that the ligand on HEV endothelial cells recognized by L-selectin is different from conventional sialyl Lewis x or sialyl Lewis a defined by those antibodies. These findings led to the identification of the sialyl 6-sulfated Lewis x determinant as a ligand for L-selectin on human HEV (8-10). In this article we will review recent progress in the study of the ligand activity of this newly found carbohydrate ligand for each member of the selectin family cell adhesion molecules.

B. Characteristics of L-Selectin-Mediated Cell adhesion

L-selectin (LAM-1, LECAM-1, gp90^{mel}, or CD62L) is constitutively expressed on leukocytes. L-selectin was first described as a lymph node receptor involved in the homing of lymphocytes to peripheral lymph nodes (11,12). High endothelial venules (HEV) are known to serve as an entrance for those lymphocytes homing into peripheral lymph nodes. Thus, endothelial cells of HEV should constantly express carbohydrate ligands for L-selectin, such as sialyl Lewis x or sialyl Lewis a. Subsequently, L-selectin was also implicated in the leukocyte-leukocyte interaction and/or neutrophil-endothelial interaction at the site of inflammation (13,14). If L-selectin is involved in the adhesion of leukocytes to vascular endothelial cells at the site of an inflammatory lesion, the putative L-selectin ligand on endothelial cells should be inducibly expressed by the inflammatory stimuli.

In immunohistochemical studies using anti-sialyl Lewis x antibodies, the HEV endothelial cells in human lymph nodes showed a peculiar staining pattern. These cells were stained by only a limited group of anti-sialyl Lewis x antibodies, but not by other anti-sialyl Lewis x antibodies (Table I). The group of antibodies that stained HEV endothelial cells included 2H5, 2F3 and HECA-452 (7,8). Some of these antibodies inhibited the L-selectin-dependent cell adhesion to HEV (7). The group of antibodies which did not stain HEV endothelial cells included CSLEX-1, SNH-3 and FH-6, the three well-known classical anti-sialyl Lewis x antibodies. These findings indicated that a unique sialyl Lewis x-like determinant, but not the authentic sialyl Lewis x, was present on HEV endothelial cells, and served as a ligand for L-selectin. This was further supported by the finding that most of the anti-Lewis x antibodies failed to stain the sialidase-treated HEV endothelial cells. The genuine sialyl Lewis x, after sialidase treatment, should have yielded conventional Lewis x,

しかし、セレクトインファミリーの三者間には糖鎖との結合の特異性に多くの点で相違があり、それぞれが独特の結合特異性をもつことがだんだん判明してきた。例えばL-セレクトインの糖鎖リガンドは、末梢リンパ節の高血管内皮細静脈(HEV)の内皮細胞に発現しているはずである。しかし、ほとんどの抗シアリルルイスx抗体や抗シアリルルイスa抗体は、他の細胞や組織のE-セレクトインのリガンドを容易に検出するにもかかわらず、HEVとは反応しない(7)。このことは、HEV上のL-セレクトインリガンドが、通常のシアリルルイスxやシアリルルイスaとは異なることを示している。このことが、のちにシアリル6-スルホルイスxがHEV上のL-セレクトインリガンドであると同定されるきっかけとなった(8-10)。この新規のセレクトインリガンドであるシアリル6-スルホルイスxは、L-セレクトインをはじめ三つのセレクトインに対してリガンド活性を有する。本稿では、この点についての研究の最近の展開を紹介したい。

B. L-セレクトインを介した細胞接着の特徴

L-セレクトイン(LAM-1, LECAM-1, gp90^{mel}, CD62Lともいう)は、白血球に構成的に発現しており、はじめ、リンパ球のリンパ節へのホーミングを媒介する接着分子として記載された(11, 12)。リンパ球は、末梢リンパ節の高血管内皮細静脈を通過してリンパ節へホーミングする。もしL-セレクトインがリンパ球のリンパ節へのホーミングを媒介するならば、ホーミングの入り口にあたるリンパ節の高血管内皮静脈(HEV)の血管内皮細胞には、L-セレクトインに対応する糖鎖リガンドが発現されているのでなければならない。また、L-セレクトインが、炎症時の白血球の血管内皮細胞への接着に関与する(13,14)とすれば、さらにHEV以外の一般組織の血管内皮細胞にも、少なくとも炎症時には、L-セレクトインの糖鎖リガンドが発現されていることになる。

抗シアリルルイスx抗体でヒトの末梢リンパ節を染色すると、HEVは、一部の抗シアリルルイスx抗体でのみ染色され、他の抗シアリルルイスx抗体では染色されない。抗シアリルルイスx抗体のうち、2H5、2F3やHECA-452はヒトHEVとの反応性を有する(7,8)。これらの抗体の一部は、HEVへのL-セレクトイン依存性の接着を阻止する(7)。これに対して、古典的な抗シアリルルイスx抗体であるCSLEX-1、FH-6、SNH-3はいずれもHEVとほとんど反応しない。こうして抗シアリルルイスx抗体は、HEVと反応するものとししないものの二群に分類できる(表I)。この成績は、HEV上のL-セレクトインリガンドが、通常のシアリルルイスxとは異なる糖鎖であり、しかもシアリルルイスxに近縁の糖鎖であることを示唆するものであった。また、HEVをシアリダーゼ処理しても、ほとんど全ての抗ルイスx抗体と反応しないことも明らかになった。もしHEVに通常のシアリルルイスxが発現していたら、これはシアリダーゼ処理によって通常のルイスxに変

Table I. Reactivity of six anti-sialyl Lewis x antibodies and newly generated anti-sialyl 6-sulfo Lewis x antibodies to human HEV endothelial cells, helper memory T cells, and pure 6- or 6'-sulfated Lewis x

	Classical-type anti-sialyl Lewis x			Variant-type anti-sialyl Lewis x			Anti-sialyl 6-sulfo Lewis x	
	SNH-3	FH-6	CSLEX-1	2H5	2F3	HECA-452	G152	G72*
Reactivity to HEV endothelial cells	—	—	—	+	+	+	+	+
Reactivity to helper memory T cells	—	—	±	+	+	+	+	+
Reactivity to sialyl 6-sulfo Lewis x	—	—	—	+	+	+	+	+
Reactivity to sialyl 6'-sulfo Lewis x	+	—	+	+	+	+	—	—

* G72 cross-reacts to sialyl 6-sulfo lactosamine.

which would have been readily detected by the usual anti-Lewis x antibodies.

Expression of sialyl Lewis x and/or sialyl Lewis a on vascular endothelial cells other than HEV is controversial. Cultured human umbilical vein endothelial cells, and also the endothelial cells of other origin, usually lack the sialyl Lewis x or sialyl Lewis a determinant on the surface. Expression of these determinants is not effectively induced by the treatment of cells with inflammatory cytokines such as IL-1 and/or TNF- α , while these stimuli induce significant expression of E-selectin and other cell adhesion molecules on endothelial cells. The carbohydrate determinants have remained virtually undetected in the immunohistochemical examination of inflamed human tissue samples, with rather rare exceptions mainly chronic-type inflammation accompanied by vigorous infiltration of lymphocytes.

We observed significant reactivity of vascular endothelial cells to an anti-sialyl Lewis x antibody in two animal experimental systems, one of which is a special type of skin inflammation in rats induced by the modulation of complement activity (15), and the other is the ischemia-reperfusion injury model of the heart in rats (16). These two experimental systems are exceptional in that we could detect sialyl Lewis x-like molecules on endothelial cells. In both systems, the sialyl Lewis x-like molecule was detectable only with the 2H5 antibody, and was not detectable with other well-known anti-sialyl Lewis x antibodies including CSLEX-1, SNH-3 or FH-6. This again indicated that the sialyl Lewis x-like determinant appearing in these experimental models was significantly different from the usual authentic sialyl Lewis x determinant, which should have been readily detected by the CSLEX-1, SNH-3 and FH-6 anti-

化し、抗Lewis x抗体によって容易に検出されるはずである。

HEV以外の一般血管にシアリルLewis xやシアリルLewis aが発現するかどうかについては、まだ研究者間の見解が一致していない。ヒト臍帯静脈などに由来する培養血管内皮細胞は、通常、シアリルLewis xもシアリルLewis aも発現していない。IL-1 や TNF- α のような炎症サイトカインで刺激しても、E-セレクトリンやその他の細胞接着分子の発現は誘導できるが、これら糖鎖の発現はあまりはかばかしく誘導されない。炎症性病変を免疫組織学的に観察しても、これら糖鎖の発現は、リンパ球浸潤の強い慢性炎症において、ごくまれに検出されるにとどまる。

動物実験においても、ラットの皮膚炎モデル(15)や心臓の虚血再灌流実験(16)においては、抗シアリルLewis x抗体で血管内皮の染色が観察される。これらの実験系は、ともかくHEV以外の血管内皮細胞にシアリルLewis x様糖鎖が検出されると言う点では、むしろ例外的である。このシアリルLewis x様糖鎖は、2H5抗体のみで検出され、他の抗シアリルLewis x抗体では検出されにくい。この成績は、こうしたモデル実験において血管内皮に出現するシアリルLewis x様糖鎖もまた、通常のシアリルLewis xとは異なる糖鎖であることを示唆する。血管内皮には通常のシアリルLewis xが出現することはまずなく、血管内皮細胞のL-セレクトリンリガンドは、どうやら通常のシアリルLewis xとは

bodies as well as the 2H5 antibody. These findings indicated that the genuine sialyl Lewis x determinant is rarely expressed on vascular endothelial cells, and that the ligand for L-selectin on endothelial cells, if any, must be somehow different from authentic sialyl Lewis x.

C. Specificity and Cross-Reactivity of Anti-Sialyl Lewis x Monoclonal Antibodies

With this in mind, we studied the specificity of hitherto-known anti-sialyl Lewis x monoclonal antibodies against a panel of pure carbohydrate determinants having a structure related to sialyl Lewis x (17). All anti-sialyl Lewis x antibodies significantly reacted with the authentic sialyl Lewis x determinant, and all of them also reacted with the carbohydrate determinant, NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4[Fuc α 1 $\rightarrow$ 3]GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 6Gal β 1 $\rightarrow$ R (sialyl Lewis x on the GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 6Gal β branch), indicating the linkage between the β -GlcNAc and the second β -Gal is not strongly recognized by these antibodies.

These anti-sialyl Lewis x antibodies exhibited various cross-reactivity to the sialyl Lewis x-related structures. The antibodies 2F3, HECA-452 and 2H5 significantly cross-reacted with sialyl Lewis a, having the structure NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3[Fuc α 1 $\rightarrow$]GlcNAc β 1 $\rightarrow$ R, whereas other antibodies did not. In contrast, the antibodies CSLEX-1, SNH-3 and FH-6 never cross-reacted with sialyl Lewis a. The antibodies SNH-3 and FH-6 were found to be heavily cross-reactive even with the VIM-2 ganglioside, with the structure NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4[Fuc α 1 $\rightarrow$ 3]GlcNAc β 1 $\rightarrow$ R, which lacks the fucose residue at the penultimate β -GlcNAc moiety.

Hence, these antibodies can be classified into the two groups (Fig. 1). One group (classical-type antibodies) includes the antibodies CSLEX-1, SNH-3 and FH-6, which recognize the type 2 chain backbone, Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β , and therefore never cross-react with sialyl Lewis a having the type 1 chain back-

異なるものであると考えられる。

C. 抗シアリルルイスx抗体の特異性と交差反応性

こうした事情から、我々は純品糖鎖を用いてこれらの抗シアリルルイスx抗体の反応特異性を調べてみることにした(17)。当然ながら、全ての抗シアリルルイスx抗体が純品シアリルルイスxと良く反応し、GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 6Gal β 枝上のシアリルルイスx糖鎖(NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4[Fuc α 1 $\rightarrow$ 3]GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 6Gal β 1 $\rightarrow$ R)とも良く反応した。この事は、 β -GlcNAcのさらに還元末端側の β -Galは、これらの抗体によってあまり強く認識されていない事を示す。

抗シアリルルイスx抗体によって、シアリルルイスx類似糖鎖にたいする交差反応性に大きなちがいが見られた。2F3、HECA-452、2H5などの抗体はシアリルルイスA糖鎖NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3[Fuc α 1 $\rightarrow$]GlcNAc β 1 $\rightarrow$ Rとの交差反応性を示した。他方、CSLEX-1、SNH-3、FH-6はシアリルルイスa糖鎖との交差反応性を示さない。しかしこのうちSNH-3抗体とFH-6抗体とは、垂末端の β -GlcNAcがフコシル化されていないVIM-2 ガングリオシドNeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4[Fuc α 1 $\rightarrow$ 3]GlcNAc β 1 $\rightarrow$ Rと強い交差反応性を示した。

この結果から、これらの抗体は図1のような二つのグループに分類できることが判明した。CSLEX-1、SNH-3、FH-6からなる古典的な抗シアリルルイスx抗体のグループは、2型基幹構造Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β を強く認識し、1型基幹構造のシアリルルイスa糖鎖と交差反応性を示さない。これらの抗体のうちでは

Fig. 1. Schematic representation of the reactivity of two groups of anti-sialyl Lewis X antibodies.

bone, Gal β 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc β . Among these antibodies, CSLEX-1 seems to be relatively specific to sialyl Lewis x, while the other two antibodies do not appear to strictly recognize the α -Fuc moiety on the penultimate GlcNAc β , judging from their heavy cross-reactivity against VIM-2 ganglioside.

The other group (variant-type antibodies) includes the antibodies 2F3, HECA-452 and 2H5, which do not recognize the type 2 chain backbone, Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β , while they recognize terminal α -Fuc as well as α -NeuAc moieties, and never cross-react with structures devoid of α -Fuc moiety on the penultimate β -GlcNAc.

The ligand for L-selectin on HEV endothelial cells reacts only with the variant group antibodies, and not to the classical group antibodies. This indicates the ligand for L-selectin on HEV endothelial cells could be the sialyl Lewis x determinant modified at the Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β backbone structure, yet retains terminal α -Fuc and α -NeuAc moieties. It is easily deduced that the classical group antibodies, which strongly recognize the Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β backbone, would be very sensitive to the modification at the backbone structure, while the reactivity of the variant group antibodies, which do not recognize the Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β backbone, would not be affected by the modification.

D. Sialyl 6-sulfo Lewis x as the Major L-Selectin Ligand on HEV

It has long been known that L-selectin, as well as P-selectin, significantly binds to sulfated carbohydrates such as fucoidin, but E-selectin does not. This led to the hypothesis that sulfated carbohydrate determinants may be a specific ligand for L-selectin on HEV (18–20). The antibody MECA-79, which recognizes still undefined sulfated carbohydrate ligands, strongly labels the HEV endothelial cells irrespective of animal species, and significantly inhibits L-selectin-dependent cell adhesion on HEV endothelial cells. It was therefore a good tool with which to study the L-selectin ligand on HEV. The results of studies using this antibody suggest that several sulfated sialyl Lewis x determinants were present on murine HEV endothelial cells (21,22). These included the sialyl Lewis x determinant sulfated at C-6 position of β -Gal (sialyl 6'-sulfo Lewis x) and the sialyl Lewis x determinant sulfated at β -GlcNAc (sialyl 6-sulfo Lewis x).

Since these modifications occur at the Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β backbone structure, we thought they could be the determinants that had been specifically recognized by the variant group antibodies in HEV of human lymph nodes, and studied the reactivity of these sulfated compounds against the set of anti-sialyl Lewis x monoclonal antibodies. The results showed that sialyl 6'-sulfo Lewis x was reactive to a wide variety of antibodies including 2F3, 2H5, SNH-3, HECA-452 and CSLEX-1 (8). Only the antibody FH-6 lost its reactivity to sialyl Lewis x upon the

CSLEX-1が比較的シアリルルイスx糖鎖に特異的であるが、他の二つの抗体は、VIM-2 ガングリオシドとの交差反応性から、フコースに対する認識が弱いと考えられた。

一方、2F3, HECA-452, 2H5からなるバリエーション型抗シアリルルイスx抗体のグループは、2型基幹構造の認識が甘く、むしろシアル酸とフコースを強く認識し、垂末端にフコースを欠く構造とは交差反応が見られない。

HEV上のL-セレクトインリガンドは、バリエーション型抗シアリルルイスx抗体のグループとのみ反応し、古典的な抗シアリルルイスx抗体のグループとは反応しない。このことから、HEV上のL-セレクトインリガンド糖鎖は、通常のシアリルルイスxのGal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 部分にさらに修飾が加わったものであり、かつ、シアル酸とフコースは保たれたような構造である可能性が強く示唆された。古典的な抗シアリルルイスx抗体のグループは、Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 部分を強く認識しており、この部分が修飾されると反応性を失うであろうこと容易に推察できる。一方、バリエーション型抗シアリルルイスx抗体のグループの場合には、基幹のGal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 部分をほとんど認識していないので、この部分にさらに修飾が起こっても、反応性は大きな影響を受けないと考えられた。

D. HEV上のL-セレクトインリガンドとしてのシアリル6-スルホルイスx

L-セレクトインはP-セレクトインと同様に、フコイジンなどの硫酸基を持つ糖鎖と良く反応する点が、E-セレクトインと異なることが古くから知られていた。このことから、リガンドとして硫酸基を有する糖鎖に着目する研究の流れが形成された(18–20)。この流れの研究では、リガンド研究手段として、MECA-79抗体が良く用いられてきた。この抗体は構造不明の硫酸化糖鎖を認識し、動物種を問わずHEVとよく反応し、HEVに対するリンパ球のL-セレクトイン依存性接着を強く阻害する。これは、L-セレクトインの糖鎖リガンドが硫酸化糖鎖である事を強く支持する。MECA-79抗体をもちいた研究の結果、マウスリンパ節HEVには β -Galの6位が硫酸化されたシアリル6'-スルホルイスx、および β -GlcNAcの6位が硫酸化されたシアリル6-スルホルイスxが存在する可能性を示唆する成績が報告された(21,22)。

これらの糖鎖は、硫酸基でGal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 部分が修飾されたシアリルルイスxであるため、我々がヒトHEVのL-セレクトインリガンドの検出に用いた一連の抗シアリルルイスx抗体と反応する可能性が考えられた。そこで純品のシアリル6-スルホルイスxおよびシアリル6'-スルホルイスxと一連の抗体との反応性を検討した。その結果、シアリル6'-スルホルイスxは2F3, 2H5, SNH-3, HECA-452, CSLEX-1など、ほとんどの抗体と反応し、FH-6のみが β -Galの6位が硫酸化によって反応性を失うことがわかった(表I)(8)。一方、シアリル6-スルホルイスxは、2F3, 2H5、

6'-sulfation of its β -Gal moiety (Table I). In contrast, sialyl 6-sulfo Lewis x was reactive to the antibodies 2F3, 2H5, HECA-452, but not to SNH-3, FH-6 and CSLEX-1, the very same reaction pattern of HEV in human lymph nodes (Table I) (8).

These findings indicated that the sialyl 6-sulfo Lewis x determinant, having the structure $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3][\text{SO}_4-6]\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$, is a good candidate for the putative ligand for L-selectin on HEV. The inability of most conventional anti-Lewis x antibodies to sialidase-treated HEV endothelial cells further supported this, since these anti-Lewis x antibodies are not reactive to 6-sulfo Lewis x, yet readily reactive to 6'-sulfo Lewis x determinant (9).

On the contrary, sialyl 6'-sulfo Lewis x determinant cannot be the major component of the L-selectin ligand on human HEV. If so, HEV endothelial cells should have been reactive to the SNH-3 and CSLEX-1 antibodies, as well as 2H5, 2F3 and HECA-452. They should have been reactive to most of the anti-Lewis x antibodies as well, after sialidase treatment.

We subsequently generated a monoclonal antibody, G152, specifically directed to sialyl 6-sulfo Lewis x determinant (9). This antibody is reactive only to the sialyl 6-sulfo Lewis x determinant, and not to the sialyl 6'-sulfo Lewis x- or genuine sialyl Lewis x determinants. The antibody strongly stained HEV endothelial cells in human peripheral lymph nodes and nearly completely inhibited the binding of recombinant L-selectin to the HEV endothelial cells (9). We have also generated several antibodies directed to 6-sulfo Lewis x determinant, which do not cross-react to 6'-sulfo Lewis x or conventional Lewis x determinant. These antibodies clearly labeled HEV endothelial cells after sialidase treatment. These findings confirmed that the sialyl 6-sulfo Lewis x determinant is significantly expressed, and serves as a major ligand for L-selectin on HEV endothelial cells.

Our conclusion is in line with the observation of the substrate specificity of Fuc-T VII (23), which indicated that the enzyme can act on the β -GlcNAc-sulfated substrate, thus preferentially producing sialyl 6-sulfated Lewis x, while it could not utilize the β -Gal-sulfated oligosaccharide as substrate, and probably does not contribute to the direct production of sialyl 6'-sulfo Lewis x. From their examination of the substrate specificity of a sulfotransferase which transfers sulfate residues to the C-6 position of the β -Gal moiety, Habuchi *et al.* concluded that the enzyme worked much less efficiently when the β -GlcNAc moiety was not pre-sulfated (24). This suggests that the 6'-sulfation at β Gal mainly occurs after the 6-sulfation of the β -GlcNAc moiety.

Thus, our results are at variance with a report (25) that, whereas sialyl 6'-sulfo Lewis x is reactive to L-selectin, sialyl 6-sulfo Lewis x is not. Our results are also different from a report of the exact opposite results, namely that recombinant L-selectin binds to sialyl 6-sulfo Lewis x, but not to sialyl 6'-sulfo Lewis x in ELISA (26). In assays using recombinant L-selectin, the sialyl

HECA-452と反応し、SNH-3、FH-6、CSLEX-1と反応しないという点で、HEVと全く同じ反応のパターンを示した(表 I)(8)。

このことから、 $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3][\text{SO}_4-6]\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$ の構造を有するシアリル6-スルホルイスxが、HEV上のL-セレクトインリガンドである可能性が高いと考えられた。また、通常の抗Lewis x抗体のほとんどはシアリダーゼ処理HEVと反応しないが、6-スルホルイスxもこれらの抗体とは反応しない。他方、6'-スルホルイスxは、これら通常の抗Lewis x抗体と良く反応する。この所見も、シアリル6-スルホルイスxが、HEV上のL-セレクトインリガンドであることをさらに支持する成績と考えられた(9)。

一方、シアリル6'-スルホルイスxがHEV上のL-セレクトインリガンドである可能性はきわめて低いと判断せざるを得ない。もしそうであったら、SNH-3やCSLEX-1抗体は2H5、2F3、HECA-452と同様にHEVと良く反応したはずであり、またシアリダーゼ処理HEVはほとんど全ての抗Lewis x抗体と反応したはずだからである。

次に我々は、シアリル6-スルホルイスxに特異的な単クローン抗体G152を作成した(9)。この抗体は、シアリル6-スルホルイスxとのみ反応し、シアリル6'-スルホルイスxや通常のシアリルホルイスxとは交差しない。この抗体G152はリンパ節HEVときわめて強く反応し、リコンビナントL-セレクトインのヒトリンパ節凍結切片上のHEVへの結合をも阻止する(9)。また我々は、6-スルホルイスxに特異的な一連の抗体を新たに作成した。これらの抗体は、6-スルホルイスxとのみ反応し、6'-スルホルイスxや通常のホルイスxとは交差しない。この抗体はシアリダーゼ処理後のリンパ節HEVときわめて強く反応した。これらの所見から、シアリル6-スルホルイスxがヒトHEV上に強く発現され、L-セレクトインの糖鎖リガンドとなっていることがさらに確認された。

我々のこの結論は、フコシルトランスフェラーゼFuc-TVIIが、 β -GlcNAcの6位が硫酸化された基質にはたらいてシアリル6-スルホルイスxを合成できるが、 β -Galの6位が硫酸化された基質に対しては働かず、シアリル6'-スルホルイスxを合成できないとする報告(23)と良く一致する。またHabuchiらは、 β -Galの6位を硫酸化するスルトランスフェラーゼの特異性を調べ、隣の β -GlcNAcの6位が硫酸化された基質に対してはよく働くが、 β -GlcNAcが硫酸化されていない場合には活性が低いことを報告した。このことは、 β -Galの6位の硫酸化が、 β -GlcNAcの6位の硫酸化のあとに起こることを示唆している(24)。

一方、リコンビナントL-セレクトインとの結合を*in vitro*で見た実験結果では、シアリル6'-スルホルイスxは結合するがシアリル6-スルホルイスxは結合しないとする研究者もいる(25)。これは我々の得ていた結論と反対である。また、逆にリコンビナントL-セレクトインはシアリル6-スルホルイスxには結合するがシアリル6'-スルホルイスxには結合しないとする研究者もいる(26)。これも我々の得た結果とは異なる。*In vitro*で見る限りでは、リ

6-sulfo Lewis x and sialyl 6'-sulfo Lewis x determinants are both reactive to L-selectin in our hands as reported previously by Yoshino *et al.* (27). What we wish to emphasize is that the sialyl 6'-sulfo Lewis x determinant is so far not detectable as far as human lymph nodes are concerned, and that only the sialyl 6-sulfo Lewis x determinant seems to be present and serves as a major L-selectin ligand in HEV of human peripheral lymph nodes.

E. Reconstitution of L-Selectin Ligand by Transfection of Fucosyltransferase and Sulfotransferase

The sialyl 6-sulfo Lewis x determinant must be synthesized through the concerted action of a GlcNAc β : 6-*O*-sulfotransferase (6-Sul-T) and a fucosyltransferase. More recently, we obtained a cDNA clone which encodes a sulfotransferase (28), and succeeded in reconstituting functional L-selectin ligands on COS-7 cells or a cultured human endothelial cell line ECV304 by transfecting the $\alpha 1 \rightarrow 3$ fucosyltransferase VII (Fuc-T VII) and/or the cloned 6-Sul-T cDNAs (10) (Fig. 2).

The ECV304 cells were reportedly established from human umbilical vein endothelial cells (29), and lacked the expression of sialyl 6-sulfo Lewis x, conventional Lewis x, and L-selectin ligand activity. When the cells were transfected with Fuc-T VII, conventional sialyl Lewis x appeared at the cell surface, but the transfectant cells did not adhere to the cells expressing L-selectin (Fig. 2), indicating conventional sialyl Lewis x was not sufficient to confer L-selectin mediated cell adhesion. When the cells were transfected with 6-Sul-T, sialyl 6-sulfo lactosamine appeared on the cell surface, but the transfectant cells did not adhere to the cells expressing L-selectin (Fig. 2). Interestingly, a significant reactivity to the MECA-79 antibody appeared on the transfectant cells. MECA-79 antibody was originally raised against murine lymph node stroma, and has long been used to detect L-selectin ligand on HEV endothelial cells, since the antibody strongly stains the cells, and inhibits L-selectin-mediated adhesion on HEV endothelial cells. It has been suggested that the antigen recognized by this antibody is sulfation-dependent, but not dependent on sialic acid or fucose. Thus this antibody recognizes products of 6-Sul-T, but the 6-sulfation *per se* was not sufficient to confer L-selectin mediated cell adhesion.

The sialyl 6-sulfo Lewis x determinant as detected by the G152 antibody appeared only on the ECV304 cells doubly transfected with Fuc-T VII and 6-Sul-T, and only these double transfectant cells showed significant adhesion of cells expressing L-selectin (Fig. 2) (10). Reactivity of the doubly transfected cells against anti-sialyl Lewis x antibodies such as SNH-3, FH-6 and CSLEX-1 was significantly suppressed, while these antibodies strongly reacted to the Fuc-T VII single transfectant cells. In contrast, reactivity of the antibodies 2F3, 2H5 and HECA-

コンビナントL-セレクトインは、シアリル6'-スルホLewis xにもシアリル6-スルホLewis xにも結合する。この点は以前にYoshinoら(27)が報告したとおりである。我々が強調したい点は、実際に糖鎖リガンドが発現しているはずのヒトリンパ節HEVにおいて、シアリル6-スルホLewis xが発現して主要な内在性のリガンドとなっている証拠は得られるが、シアリル6'-スルホLewis xは検出されなかったという点である。

E. フコシルトランスフェラーゼおよびスルホトランスフェラーゼcDNAのトランスフェクションによるL-セレクトイン糖鎖リガンドの再構成

シアリル6-スルホLewis xの合成には、フコシルトランスフェラーゼ(Fuc-T)とGlcNAc β : 6-*O*-スルホトランスフェラーゼ(6-Sul-T)が関与すると考えられる。我々はフコシルトランスフェラーゼ Fuc-TVIIと、最近得られた 6-Sul-TのcDNA(28)を同時にあるいはそれぞれ単独にCOS-7細胞やヒト血管内皮細胞株 ECV304 に導入して、これに対するL-セレクトイン発現細胞の接着を観察した(10)(図2)。

ECV304細胞は、HUVECから樹立したとされ(29)、シアリル6-スルホLewis xも通常のシアリルLewis xも発現せず、L-セレクトインにも接着しない。これにFuc-TVIIのみを単独導入した細胞は、シアリルLewis xを強く発現し、2H5抗体と反応するが、L-セレクトインへの接着は観察されない(図2)。シアリルLewis xを発現するだけでは、L-セレクトインとの結合には十分でないことが判明した。また、6-Sul-Tのみを単独導入した細胞では、6-スルホラクトサミンを強く発現するが、これもL-セレクトインへの接着は観察されない(図2)。ただし、このトランスフェクタントは、MECA-79抗体と反応するようになった。MECA-79抗体はマウスリンパ節ストローマを免疫して得られた抗体であり、HEVと強く反応し、L-セレクトイン依存性接着を阻止することから、HEV上のL-セレクトインリガンドの検出に良く使われてきた。この抗体の認識抗原は硫酸化糖鎖で、シアル酸やフコースは抗体の反応性には関与していないとされていた。このトランスフェクタント細胞がMECA-79と反応するようになったことは、この抗体の認識糖鎖が、6-Sul-Tの反応産物である事を示している。ただし、この抗体の認識糖鎖の出現のみでは、L-セレクトインとの結合には十分でないことも明らかになった。

ECV304細胞に6-Sul-TとFuc-TVIIとをダブルトランスフェクトすると、はじめてシアリル6-スルホLewis xが細胞表層に発現し、L-セレクトインとの接着能が誘導された(図2)(10)。ダブルトランスフェクトした細胞は、SNH-3、FH-6、CSLEX-1抗体との反応性がFuc-TVII単独トランスフェクタント細胞に比べて低下した。一方、2F3、2H5、HECA-452抗体との反応性には差が見られなかった。このことから、ダブルトランスフェクト細胞には、シアリル6-スルホLewis xが強く発現し、通常のシアリルLewis xは抑制されていると考えられた。

Fig. 2. Binding of L- and E-selectin-expressing cells to ECV304 and COS-7 cells transfected with fucosyltransferase VII (Fuc-T VII) and/or GlcNAc β : 6-sulfotransferase (6-Sul-T) cDNAs.

452 to the double transfectant cells was not altered compared to that against Fuc-T VII single transfectant cells. In other words, the doubly transfected cells mainly express sialyl 6-sulfo Lewis x, but a much smaller amount of conventional sialyl Lewis x.

Essentially the same results were obtained by the transfection of these cDNAs to COS-7 cells (Fig. 2). The COS-7 cells transfected with Fuc-T VII cDNA expressed conventional sialyl Lewis x but not sialyl 6-sulfo Lewis x, and the cells transfected with 6-Sul-T cDNA expressed sialyl 6-sulfo lactosamine but not sialyl 6-sulfo Lewis x. The sialyl 6-sulfo Lewis x appeared only on the COS-7 cells transfected by cDNAs of both enzymes, and only these cells conferred L-selectin-mediated cell adhesion. The only difference between ECV304 and COS-7 transfectant cells was that the MECA-79-defined epitope appeared on the 6-Sul-T-transfected ECV304 cells but not on the 6-Sul-T-transfected COS-7 cells. This suggested the need for additional factor (s) for the expression of MECA-79 epitope in addition to 6-Sul-T, which was present in ECV304 but not in COS-7 cells.

F. Roles of Core Proteins in Selectin Mediated Cell Adhesion

The above-described findings further confirmed that sialyl 6-sulfo Lewis x is a preferred ligand for L-selectin. The experiments also indicated interesting differences among the binding specificity of the three selectins. L-selectin bound only to the cells doubly transfected with Fuc-T VII and 6-Sul-T, which express sialyl 6-sulfo Lewis x. On the other hand, cells expressing E-selectin strongly adhered to the Fuc-T VII single transfectant cells as well as the doubly transfected cells, again confirming that E-selectin requires only the sialyl Lewis x structure for binding (10). Unexpectedly, P-selectin failed to show significant bind-

COS-7細胞を用いた実験からも、ほぼ同様の結果が得られた(図2)。すなわち、これにFuc-TVIIのみを単独導入した細胞は、通常のシアリルルイスxを強く発現するがシアリル6-スルホルイスxは発現せず、6-Sul-Tのみを単独導入したCOS-7細胞では、6-スルホラクタサミンを強く発現するが、シアリル6-スルホルイスxは発現しない。シアリル6-スルホルイスxは6-Sul-TとFuc-TVIIとをダブルトランスフェクトすると、はじめて発現し、この細胞にのみL-セレクトインとの接着能が誘導された(図2)(10)。ECV304細胞とCOS-7細胞との違いは、6-Sul-Tを導入したECV304細胞ではMECA-79の認識抗原が出現したのに、6-Sul-Tを導入したCOS-7細胞には出現しなかったことである。このことは、MECA-79の認識抗原の発現には、6-Sul-Tに加えてさらにほかの要因が必要であり、これがECV304細胞には備わっていたが、COS-7細胞には欠如していたことを示唆する。

F. セレクチンを介した細胞接着における糖鎖のコアタンパク質の役割

以上の結果から、シアリル6-スルホルイスxがL-セレクトインの糖鎖リガンドであることが確認された。この再構成実験によって、三つのセレクチンが、それぞれ異なるリガンド特異性を持つことが明らかになった。L-セレクトインは6-Sul-TとFuc-TVIIとをダブルトランスフェクトした細胞のみに結合したが、E-セレクトインはFuc-TVIIを単独導入した細胞と、Fuc-TVIIと6-Sul-Tをダブルトランスフェクトした細胞に対してよく接着した(10)。これにより、従来から主張されているとおり、E-セレクトインにとっては、シアリルルイスx糖鎖が存在するだけで十分である事が判明した。他方、P-セレクトインは、ダブルトランスフェクトを含め、いずれの細胞にも有意の接着が認められなかった(10)。これは、ECV304細胞やCOS-7細胞に、P-セレクト

ing to any of these transfectant cells including the doubly transfected ones (10). This suggested that the core protein PSGL-1 was specifically required for P-selectin, since the ECV304 and COS-7 cells both lacked the expression of PSGL-1.

These findings shed light on the significance of core proteins, which have been supposed to optimize L-selectin ligand activity. The above-mentioned results indicate that just the co-transfection of two glycosyltransferase cDNAs suffices to make cells adherent to L-selectin, yet not to P-selectin. This finding on the cells, which express identical profiles of carbohydrates, argues strongly that the protein backbone requirements of at least these two selectins are quite distinct.

Several specific core proteins proposed for L-selectin ligands to date include GlyCAM-1, CD34, Sgp150/>200, and more recently, podocalyxin (30-33). However, as yet there is no definitive evidence to support an absolute requirement for a specific core protein for the L-selectin ligand activity. GlyCAM-1 has not been described for humans yet; it seems to be a rodent-specific protein, and the ECV304 or COS-7 cells lacked glycoproteins with the same molecular weight range as GlyCAM-1. Lymphocyte homing is reportedly not impaired in CD34 knock-out mice (34). PSGL-1, originally described as a specific core protein for P-selectin, was found to be also required for the high affinity binding of L-selectin (14,35-37). Since endothelial cells generally lack expression of PSGL-1, this must be limited to the L-selectin mediated leukocyte-leukocyte interaction, and may not be involved in the L-selectin mediated leukocyte-endothelial cell interaction. The ECV304 and COS-7 cells also did not express CD34 and PSGL-1, but still adhered to L-selectin. Lack of the hitherto-proposed specific core proteins in the ECV304 cells is a compelling argument against the absolute requirement for these core proteins in L-selectin-mediated cell adhesion. Even the transfection of COS-7 cells, which are generally assumed to lack such specific core proteins, with glycosyltransferase genes generated the L-selectin ligand activity.

One must mention here a certain ambiguity that has consistently remained in the discussion of the biological significance of core proteins for selectin ligands. Most researchers agree on the importance of carbohydrate determinants in ligands for three selectins. We know that these determinants in any case need supporting molecules to be expressed on cell membranes with a certain density and in appropriate conformation. In this sense, there is no way of denying the requirement of protein backbones to optimize ligand activity. However, we think some evidence indicating the specific recognition of a particular portion of the concerned peptide backbone by selectins would be needed, before one may call the protein a specific core protein. The sulfated tyrosine residues in PSGL-1 for P-selectin would be a case in point. Otherwise, a core protein may indirectly affect the binding activity to some extent, but it would be easy to find other similar surrogate (substitute) proteins, and such a

ンとの結合に必要なPSGL-1ないしはそれに代替できるコアタンパク質が存在しなかったためと考えられる。

この再構成実験はL-セレクトインのリガンド分子の糖鎖部分と、その糖鎖を担うコアタンパク質の意義について、面白い問題を投げかけている。この実験結果は、二種の糖転移酵素cDNAのトランスフェクションによって、L-セレクトインとの結合能は再構成できるが、P-セレクトインの結合能は再構成できないことを示す。このことから、L-セレクトインとP-セレクトインとは、コアタンパク質に対する要求性が異なることがわかる。

これまでに、GlyCAM-1、CD34、Sgp150/>200、ポドカリキシンなどがHEVにおけるL-セレクトインの特異的コアタンパク質として記載されている(30-33)。しかし、L-セレクトインを介した接着に、これらのタンパク質うちどれかが必須であるという証拠はない。GlyCAM-1は、マウスで報告されているが、ヒトには存在が報告されていない。CD34ノックアウトマウスで、特にリンパ球のホーミングの異常は記載されていないようである(34)。ECV304細胞もCOS-7細胞も、GlyCAM-1を欠き、CD34も発現していない。それにもかかわらず、トランスフェクタント細胞には有意のL-セレクトインへの接着が観察できる。PSGL-1は、はじめP-セレクトインの特異的コアタンパク質として報告されたが、L-セレクトインを介した接着でも必須とされるようになった(14、35-37)。通常、血管内皮細胞にはPSGL-1は発現されていないから、PSGL-1は白血球-白血球相互作用に関与しているのであろう。ECV304細胞やCOS-7細胞にも、PSGL-1は発現されていない。このように、我々が実験に使った細胞には、これまでに報告されたL-セレクトインのコアタンパク質が存在しないのに、糖転移酵素および硫酸基転移酵素のトランスフェクションだけでL-セレクトインへの有意の結合が見られたわけである。L-セレクトインとの結合においては、コアタンパク質はあまり重要な意義をもっていないことを示唆する所見であると思われる。

セレクトインの糖鎖リガンドのコアタンパク質についての議論には、常にある種のあいまいさが伴っている。セレクトインのリガンドとして糖鎖が重要であることはだれしも否定しない。糖鎖が細胞膜上にちょうど良い密度やコンフォーメーションで発現されるには、ともかく支持分子として何らかのムチン様タンパク質が必要である。この意味では、コアタンパク質の必要性は否定できない。しかし、そのタンパク質が「特異的コアタンパク質」と呼ばれる資格があるのは、そのタンパク質のペプチド部分のどこかにセレクトインによって特異的に認識される部分がある場合ではなからうか。P-セレクトインに対するPSGL-1の硫酸化チロシン残基が好例である。そうでない場合には、コアタンパク質は、ほかの類似タンパク質でいくらかでも代替えが可能な、単なるムチン型糖鎖の担体に過ぎないものであり、その細胞接着への影響も、糖鎖の密度などを通した間接的影響にと

protein would not qualify as a specific core protein.

Moreover, there is no published research suggesting that up- or down-regulation of the hitherto-described core proteins would regulate L-selectin ligand activity at the surface of cells under physiological conditions. In contrast, Fuc-T VII, which is supposed to be involved in the synthesis of L-selectin ligand in endothelial cells, is quite actively regulated transcriptionally. Recently, we have shown that the enzymatic activity of 6-Sul-T is subject to the regulation mediated by cytokines such as IL-1, though not so pronounced as Fuc-T VII (10).

G. Synthesis of Sialyl 6-Sulfo Lewis x in Endothelial Cells, Leukocytes and Epithelial Cells

Molecular cloning of cDNA for the 6-Sul-T responsible for the synthesis of sialyl 6-sulfo Lewis x was first reported by Uchimura *et al.* for both murine and humans (28, 38). The message of this isozyme is significantly expressed in HEV, and several other organs including brain, placenta, spleen and bone marrow (28, 38, 39). This isozyme was shown to be able to synthesize both sialyl 6-sulfo Lewis x and MECA-79-defined epitope (10). This enzyme incorporates 6-sulfo residues into O-glycan precursors as well as N-linked glycan precursors, and of course into keratan sulfate precursors. It seems to prefer O-glycan precursors to N-linked glycan precursors. More recently Bistrup *et al.* (40) reported another human 6-Sul-T isozyme, which is more strictly localized in HEV. The ability of this enzyme to synthesize sialyl 6-sulfo Lewis x was ascertained by the induction of G72 antibody-defined epitope on transfected cells (40). Later a murine version of this isozyme was also reported (41). Both isozymes are known to be expressed on HEV, and at this writing no definitive information is available as to whether both or only one of these isozymes is responsible for sialyl 6-sulfo Lewis x expression in HEV endothelial cells.

Since the expression of the MECA-79-defined epitope is strictly confined to HEV endothelial cells, the MECA-79-defined L-selectin ligand has been thought to be synthesized by HEV-specific enzyme(s). Expression of sialyl 6-sulfo Lewis x is, however, not restricted to HEV endothelial cells. The sialyl 6-sulfo Lewis x determinant is also expressed on leukocytes, such as helper memory T cells, NK cells, monocytes, and weakly on granulocytes. The determinant may have some role in L-selectin-mediated leukocyte-leukocyte interactions in these cells. Since sialyl 6-sulfo Lewis x can bind to E-selectin as well as conventional sialyl Lewis x, the determinant expressed on these leukocyte populations would also bind to E-selectin. We were able to demonstrate in a preliminary study that sialyl 6-sulfo Lewis x can also serve as a ligand for P-selectin, when leukemic cells expressing PSGL-1 were used for cell adhesion experiments. Sialyl 6-sulfo Lewis x on leukocytes may serve as ligand for all three selectins. It is not clear which isozyme of 6-Sul-T is responsible for the synthesis of sialyl 6-sulfo Lewis x in leu-

どまるであろう。こうしたものには、とても「特異的」コアタンパク質の名を冠することはできないように思われる。

さらに、L-セレクトリンとの結合能が、コアタンパク質のアップあるいはダウンレギュレーションによって生理的に調節されているという証拠もいまのところ知られていない。これに反して、糖鎖部分については、血管内皮のL-セレクトリンリガンドの合成に関与するとされるFuc-TVIIが活発な転写調節を受けていることは良く知られているし、最近我々は、Fuc-TVIIほど著明にはないが、6-Sul-TもまたIL-1などの炎症性サイトカインによって調節されることを見出している(10)。

G. 血管内皮細胞、白血球および上皮細胞におけるシアリル6-スルホルイスxの合成

シアリル6-スルホルイスxの合成に関与するマウスおよびヒトの6-Sul-TのcDNAクローニングは、はじめUchimuraらによって報告された(28,38)。この酵素はHEV以外にも、脳や胎盤、脾や骨髄にも発現されており(28,38,39)、シアリル6-スルホルイスxの合成やMECA-79認識抗原の合成を行うことが明らかになっている(10)。O-グリコシド糖鎖のみならず、N-グリコシド糖鎖やケラタン硫酸の合成前駆体を基質としてはたらく、N-グリコシド糖鎖よりも、O-グリコシド糖鎖をより活発に硫酸化することが知られる。また最近、Bistrupら(40)は、もうひとつ6-Sul-Tのアイソザイムを報告した。HEVに局在し、やはりシアリル6-スルホルイスxの合成能を持つことが、トランスフェクション細胞のG72抗体との反応性から明らかになっている(40)。遅れて、同じ酵素のマウス版も報告されている(41)。以上の二つのアイソザイムは、いずれもHEVに発現しているとされ、これらの両方か、あるいはどちらか片方がHEVのシアリル6-スルホルイスxの合成に関与するのか、現時点ではまだ明らかでない。

MECA-79抗体は、高いHEV特異性を持ち、HEVの血管内皮細胞と強く反応するが、一般血管の内皮細胞とはほとんど反応しない。また、血管内皮細胞以外の組織・細胞との反応もほとんど報告されていない。このため、この抗体が認識する硫酸化糖鎖は、HEVに特異的に存在する糖鎖であり、その合成に関与するスルホトランスフェラーゼもまた、HEVにきわめて特異的な酵素であるにちがいないと考えられてきた。しかし、シアリル6-スルホルイスxの発現は、HEVには限定されていない。シアリル6-スルホルイスxは白血球の一部、すなわちヘルパーメモリーT細胞、NK細胞、単球、および、弱いけれども顆粒球にも発現されている。白血球では、シアリル6-スルホルイスxは、L-セレクトリン依存性の白血球-白血球相互作用に関与しているのであろう。またシアリル6-スルホルイスxは、E-およびP-セレクトリンとも結合するので、白血球のシアリル6-スルホルイスxは、E-セレクトリンのリガンドとしても機能するであろう。また我々は、PSGL-1を発現するような白血球系細胞では、シアリル6-スルホルイスxは、P-セレクトリンとも結合することを見出した。このように、白血球系細胞では、シアリル6-スルホルイスxは、三者の全てのセレクトリンのリガンドとして働く可能性がある。白血球でシアリル6-スルホルイスxの合成に関与するスルホトラン

kocytes as the transcripts of both isozymes were detected in leukemic cell lines in our preliminary experiments.

Sialyl 6-sulfo Lewis x is also expressed even on some epithelial cells and several cultured epithelial cancer cells. This may be synthesized through the action of the most-recently described third isozyme of 6-Sul-T, which is reportedly expressed preferentially in the intestine (42). When colon cancer tissues were investigated, normal colonic epithelia were found to express the determinant, while the cancer cells tended to be largely negative. This was in clear contrast to the preferential expression of conventional, non-sulfated sialyl Lewis x in cancer cells compared to non-malignant colonic epithelium, and suggested the occurrence of significant down-regulation of 6-sulfation upon malignant transformation of colonic cells. Decreased sulfation and increased sialylation have long been known to occur upon malignant transformation of colonic tissues, and these findings are in line with the classical notion.

Our preliminary cell transfection experiments indicated that Fuc-T VII has an ability to synthesize sialyl 6-sulfo Lewis x, while Fuc-T VI can synthesize sialyl 6-sulfo Lewis x and 6-sulfo Lewis x, and Fuc-T IV synthesizes only 6-sulfo Lewis x among the isozymes of fucosyltransferases. These findings are compatible with the known specificity of these enzymes for non-sulfated substrates. The sialyl 6-sulfo Lewis x determinant in endothelial cells and leukocytes must be synthesized mainly by Fuc-T VII. Since sulfated type 2 chain determinants seemed to be poor substrates for Fuc-T III, Fuc-T VI may play a major role in the synthesis of the sialyl 6-sulfo Lewis x determinant in epithelial cells.

It has long been a difficult task to assay the enzymatic activity of 6-Sul-T. Internal GlcNAc β residues in the substrate oligosaccharides are not efficiently 6-sulfated by the enzyme under *in vitro* conditions. It was only in 1996 that this enzyme was shown to require the substrate GlcNAc β residue to be located at the non-reducing end of acceptor oligosaccharides (43). The galactosyltransferase which acts on the resulting 6-sulfo GlcNAc β residue is proposed to be a distinct enzyme different from conventional galactosyltransferases (44, 45). These findings, together with known specificities of fucosyltransferase isozymes, suggest that sialyl 6-sulfo Lewis x is synthesized through the sequence illustrated in Fig. 3.

H. Distinct Metabolic Pathway of Sialyl 6-Sulfo Lewis x Involving Cyclic Sialic Acid

During the course of study of sialyl 6-sulfo Lewis x expressed on human peripheral blood leukocytes, we noticed that expression of the determinant is very unstable upon manipulation of cells. We soon obtained several lines of evidence indicating that sialyl 6-sulfo Lewis x on leukocytes is rapidly metabolized through a distinct and previously-unknown pathway. The hypothetical metabolic pathway consists of three metabo-

スフェラーゼは、まだわかっていない。上記の二つのアイソザイムは両方とも白血球系細胞に発現しているようである。

一部の上皮性細胞や培養癌細胞株にも、シアリル6-スルホルイスxが発現されている。これらはおそらく、つい最近記載された、消化管に良く出現するとされるスルホトランスフェラーゼ(42)によって合成されるのであろう。大腸癌で調べると、癌周囲の非癌上皮細胞にはしばしばシアリル6-スルホルイスxが発現されているのに、癌細胞には陰性であることが多い。通常のシアリルホルイスxが、癌に多く、非癌部に少ないのとの良い対照をなす。細胞のがん化にともなって、6-硫酸化が低下すると考えられる。古くから大腸癌では、非癌上皮細胞にはスルホムチンが多いのに対し、癌細胞ではシアロムチンが増量することが知られていたが、この6-硫酸化の変化は、この古くからの概念に良く一致する。

我々は、フコシルトランスフェラーゼのトランスフェクション実験から、Fuc-TVIIはシアリル6-スルホルイスxの合成能を持ち、Fuc-TVIはシアリル6-スルホルイスxとアシアロ体の6-スルホルイスxを合成し、Fuc-TIVは6-スルホルイスxの合成能を持つことを見出した。これらの結果は、これまでに知られたこれらフコシルトランスフェラーゼの基質特異性と合致している。血管内皮細胞と白血球系細胞のシアリル6-スルホルイスxは主にFuc-TVIIによって合成されると思われる。また、Fuc-TIIIは、6-硫酸化された2型糖鎖に対しては働きにくいとみられるので、上皮性細胞のシアリル6-スルホルイスxは、主としてFuc-TVIによって合成されると考えられる。

もともと、ラクトサミンのGlcNAcの6位を硫酸化する6-スルホトランスフェラーゼは、その酵素活性の測定すら困難であった。この酵素が、基質としてGlcNAcが非還元末端に露出していることを要求するとわかってきたのは、ようやく1996年になってからである(43)。こうして生じた6-スルホGlcNAc末端にガラクトースを転移して6-スルホラクトサミンを合成するガラクトシルトランスフェラーゼも、通常のガラクトシルトランスフェラーゼとは異なる特別の酵素である事が示唆されている(44, 45)。これらの報告は、まずポリラクトサミン基幹の合成時に6-硫酸化とガラクトースの付加が起こり、そのあとシアル酸の転移が行われ、最後にフコシルトランスフェラーゼによってシアリル6-スルホルイスxが生じるという合成系路(図3)が、現在のところは妥当な考え方である事を示唆する。

H. シアル酸の環状化によるシアリル6-スルホルイスxのユニークな不活化代謝経路

白血球におけるシアリル6-スルホルイスxの研究の過程で、我々はこの糖鎖の発現がきわめて不安定で、細胞を操作することにより容易に消失することを見出した。のちになって、これはシアリル6-スルホルイスxが、これまで知られていなかった独特の経路で代謝されるためであることが判明した。この経路は、図4に示すように、シアリル6-スルホルイスxのシアル酸残基を

Fig. 3. Proposed synthetic pathway for sialyl 6-sulfo Lewis x.

lite members shown in Fig. 4; genuine sialyl 6-sulfo Lewis x, de-*N*-acetyl sialyl 6-sulfo Lewis x, and cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x (46).

The first evidence for the presence of cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x was obtained by a monoclonal antibody approach (46). The MoAb G159 (IgG₁), which was obtained from the same fusion as G152, was initially shown to be incidentally directed to one of the minor and heterogenous by-products of organo-chemical synthesis, contaminated in the synthetic sialyl 6-sulfo Lewis x preparation (46). The by-products had been accidentally produced by the excessive deacetylation under anhydrous conditions at the final step during the organo-chemical synthesis of sialyl 6-sulfo Lewis x, and therefore they were predicted to be produced by deacetylation and/or dehydration of the target compound. The by-product defined by the G159 antibody was sialidase-resistant, suggesting that sialic acid moiety is modified in this by-product. The by-product had a much higher TLC mobility than the target compound, compatible with the formation of an intramolecular ring, such as lactone or lactam structure, by dehydration. The remarkable stability of the G159-defined by-product against alkaline treatment supported the presence of a lactam structure, rather than a lactone ring in the sialic acid moiety. However, further characterization of the synthetic contaminants was not possible, since they were highly heterogeneous. The synthetic sialyl 6-sulfo Lewis x glycolipid contained three minor contaminants which migrated faster than the authentic substance, and the G159 antibody was reactive to the second fast-migrating component. The amount of the G159-defined contaminant was very small and highly lot-dependent.

For the elucidation of the antigenic structure recognized by the G159 antibody, we designed an intentional *de novo* synthesis of de-*N*-acetyl sialyl 6-sulfo Lewis x, the first candidate for the excessively deacetylated products (47), and dehydrated

de-*N*-アセチルシアル酸に変え、さらにサイクリックシアル酸に変化させる経路である。

この問題は、抗シアリル6-スルホLewis x抗体を樹立する過程で副産物として得られた抗体G159によって解決の糸口が見つかった(46)。G159抗体(IgG₁)は、先に述べたG152抗体と同じフュージョンから得られた抗体で、単クローン抗体作成の際に抗原として用いた有機合成シアリル6-スルホLewis xにたまたま含まれていた、極めて微量な合成副産物に対して生じた抗体である(46)。この合成副産物は、合成の最終段階で、無水条件下での脱アセチル反応が過度であったために生じたと考えられたので、本来の化合物が、脱アセチル化と脱水を受けたものと推定された。G159抗体と反応する合成副産物はシアリダーゼ耐性なので、この変化はシアル酸部分に起こっていると考えられた。その反応バンドは、本来のシアリル6-スルホLewis xよりも大きなTLC易動度を持つので、脱水反応によりラクトン環あるいはラクタム環が形成されていると考えられたが、アルカリに耐性であることから、ラクタム環の可能性が高いと推定された。しかし、それ以上の解析は、合成副産物の組成が複雑であるために不可能であった。この合成品は、本来の化合物よりも大きなTLC易動度を持つ合成副産物を少なくとも三種含んでおり、G159抗体が認識するのは、そのうちの二番目のTLC易動度をもつ物質だったのである。この抗原はたいへん少量であり、しかも、ロットによって含量が異なっていた。

有機合成した抗原中の合成副産物は、無水条件下での過度の脱アセチル化によって生じたと推定されたので、シアル酸の*N*-アセチル基を欠くデ-*N*-アセチルシアリル6-スルホLewis xをあらためて有機合成し(47)、これをWSC (water-soluble

Fig. 4. Hypothetical metabolic pathway of sialyl 6-sulfo Lewis x by cyclization of sialic acid; the cyclic sialic acid pathway.

the synthetic product with a water-soluble carbodiimide reagent. This quantitatively yielded a G159-reactive substance having the same TLC mobility as the initial by-product defined by the G159 antibody. By mass-spectrometric analysis, it was confirmed that the antigenic determinant recognized by the G159 antibody was the dehydration product of de-N-acetyl sialyl 6-sulfo Lewis x (48). The remarkable resistance of the *de novo* synthesized genuine G159-defined substance to alkaline treatment confirmed again that a lactam ring was formed within the sialic acid moiety by the dehydrative condensation with the carbodiimide reagent (46).

I. Physiological Significance of Cyclic Sialyl 6-Sulfo Lewis x and Cyclic Sialic Acid Pathway

The cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x determinant defined by the G159 antibody is produced *in vitro* from de-N-acetyl sialyl 6-sulfo Lewis x by an enzyme called sialic acid cyclase, which is a calcium-dependent neutral enzyme (46). Activation of cultured lymphoid cells with TPA strongly induces expression of cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x and a proportional decrease of genuine sialyl 6-sulfo Lewis x expression, which is accompanied with an increment of sialic acid cyclase activity (46). This suggested that the conversion of genuine sialyl 6-sulfo Lewis x to cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x through the pathway illustrated in Fig. 4

carbodiimide) で脱水処理した。すると、先の合成不純物とおなじTLC易動度を持ち、G159抗体と良く反応する産物が得られた。FAB-MAS解析によって、G159の認識抗原は、デ-N-アセチルシアリル6-スルホLewis xが脱水されたものであることが確認され(48)、環の構造は、産物がアルカリ耐性であることからラクタム環である可能性が一層高くなった(46)。

1. サイクリックシアリル6-スルホLewis xとサイクリックシアル酸経路の生理的意義

G159抗体の認識抗原サイクリックシアリル6-スルホLewis xは、中性領域に至適 pHを持つカルシウム依存性酵素、シアル酸シクラーゼのはたらきによって、デ-N-アセチルシアリル6-スルホLewis xから*in vitro*で形成される(46)。リンパ球系細胞をTPAで活性化すると、サイクリックシアリル6-スルホLewis xの発現が誘導され、これに比例してシアリル6-スルホLewis xの発現が逆に減少して行くのが観察される。このときシアル酸シクラーゼの活性も上昇する(46)。この実験結果は、リンパ球系細胞のTPA刺激によって図4の経路がはたらき、シアリル6-スルホLewis xがサイクリックシアリル6-スルホLewis xに変えられたことを強く示唆する。サイクリックシアリル6-スルホLewis xは、

occurs in TPA-stimulated lymphocytes. The cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x determinant has virtually no binding activity to selectins because the modification occurred at the carboxyl residue of the sialic acid moiety essential for the interaction with selectins, while genuine and de-*N*-acetyl sialyl 6-sulfo Lewis x retain their binding activity to selectins. This indicates that the sialic acid cyclase pathway has physiological significance as a negative feedback system for the selectin ligand activity on leukocytes.

On the other hand, expression of conventional sialyl Lewis x is known to increase through the TPA stimulation of lymphocytes, that is known to accompany induction of Fuc-T VII mRNA (49,50). When human peripheral lymphocytes are stimulated by TPA, expression of sialyl 6-sulfo Lewis x is diminished, and a remarkable induction of conventional sialyl Lewis x is observed (Ohmori, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Kurata-Miura, K., Sasaki, K., Nishi, T., Uchimura, K., Muramatsu, T., and Kannagi, R., manuscript in preparation). This is a good example indicating that the expression of sialyl 6-sulfo Lewis x is regulated differently from conventional sialyl Lewis x.

Both genuine and cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x determinants defined by the G152 and G159 antibodies are preferentially expressed on a part of helper memory T cells and NK cells. The characteristics of helper memory T cells which express these determinants coincided with those of previously-reported skin homing T lymphocytes [(46), and Ohmori, K., *et al.*, manuscript in preparation]. This suggests that the sialic acid cyclase pathway would be functional in these cell populations. It is noteworthy that the resting helper memory T cells, which undergo skin homing in normal individuals, significantly expressed the determinant, without any sign of inflammatory diseases. This finding suggests that the determinant may serve as a ligand for selectins in routine trafficking of leukocytes in healthy individuals. The presence of a distinct metabolic pathway to inactivate the adhesive activity of the determinant through the conversion to cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x implies that this routine trafficking is under a strict control system which effectively prevents excessive accumulation of leukocytes. The disappearance of the determinant upon stimulation of the cells suggests that the determinant may not have a positive role in inflammation, whereas conventional sialyl Lewis x would play a major role as its expression is strongly induced upon inflammatory stimulation. It is noteworthy that the sialyl 6-sulfo Lewis x determinant expressed on the HEV endothelial cells mediates homing of lymphocytes to lymph nodes, which is also an example of routine trafficking of lymphocytes, occurring in healthy individuals without any sign of inflammatory diseases. One may thus assume that sialyl 6-sulfo Lewis x is mainly engaged in the routine trafficking of leukocytes, and conventional sialyl Lewis x is involved in the extensive and irreversible mobilization of leukocytes in inflammation.

セレクトインとの結合に最も大切とされるカルボキシル基が修飾を受けたため、リガンド活性をもたない。これに対し、デ-*N*-アセチルシアリル6-スルホルイス_xやもとのシアリル6-スルホルイス_xには、細胞接着活性が保持されている。このことから、シアリル酸シクラーゼ経路は、白血球のセレクトインへの結合活性を不活化するネガティブ・フィードバック機構としての意義を持つと思われる。

一方、通常のシアリルルイス_xの発現は、TPA刺激によってむしろ強く誘導されることが知られている。この時、Fuc-TVIIのmRNAの誘導が起こることも良く知られている(49,50)。このため、ヒト末梢血リンパ球をTPAで刺激すると、シアリル6-スルホルイス_xの発現が消失し、かわりに通常のシアリルルイス_xの発現が強く誘導される(Ohmori, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Kurata-Miura, K., Sasaki, K., Nishi, T., Uchimura, K., Muramatsu, T., and Kannagi, R., 投稿準備中)。このように、シアリル6-スルホルイス_xと通常のシアリルルイス_xの発現は、その調節機構に大きな差異がある。

シアリル6-スルホルイス_xもサイクリックシアリル6-スルホルイス_xも、リンパ球ではヘルパーメモリーT細胞とNK細胞に発現している。これらを発現するヘルパーメモリーT細胞の特徴を解析すると、以前に皮膚へホーミングするT細胞とされていたサブセットの特徴と一致する(46、および Ohmori, K., ほか、投稿準備中)。すなわち、シアリル酸シクラーゼ経路は、皮膚へホーミングするT細胞ではたらいっているように思われる。シアリル6-スルホルイス_xが、炎症などの病変とは無関係に、健康人において皮膚へホーミングするヘルパーメモリーT細胞に発現している点は注目される。シアリル6-スルホルイス_xは、炎症ではなくむしろ健康人における日常的なリンパ球の移動に関与している可能性が高いと考えられる。この糖鎖が、独特な代謝経路で不活化されることも、日常的な皮膚へのホーミングにおいて白血球の過度な集積を避けるためであろうと考えられる。シアリル6-スルホルイス_xは、炎症性刺激によって消失するので、炎症時の白血球の動員にはあまりかかわっていないであろう。一方、通常のシアリルルイス_xは、炎症時に強く発現が誘導され、炎症時の白血球動員の主役を演じると考えられる。リンパ節のHEVに発現するシアリル6-スルホルイス_xが媒介するのまた、リンパ球のリンパ節へのホーミングであり、これも炎症などの病的状態とは関わりなく、日常的に行われる移動である。このように、シアリル6-スルホルイス_xは、主として健康人の体内で日常的小こるリンパ球の正常な移動においてはたらくリガンドであると考えられる。これに対して、通常のシアリルルイス_xは、炎症時の不可逆的でしかも大規模な白血球の非常時動員において働くリガンドであると考えられる。

References

1. Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, R.P., Larsen, R.D., Berhend, T.L., and Marks, R. M. (1990) *Cell* **63**, 475–484
2. Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A. K., Hakomori, S., and Paulson, J.C. (1990) *Science* **250**, 1130–1132
3. Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M., and Seed, B. (1990) *Science* **250**, 1132–1135
4. Takada, A., Ohmori, K., Takahashi, N., Tsuyuoka, K., Yago, K., Zenita, K., Hasegawa, A., and Kannagi, R. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 713–719
5. Tyrrell, D., James, P., Rao, N., Foxall, C., Abbas, S., Dasgupta, F., Nashed, M., Hasegawa, A., Kiso, M., Asa, D., Kidd, J., and Brandley, B.K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10372–10376
6. Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M., and Kannagi, R. (1993) *Cancer Res.* **53**, 354–361
7. Sawada, M., Takada, A., Ohwaki, I., Takahashi, N., Tateno, H., Sakamoto, J., and Kannagi, R. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 337–347
8. Mitsuoka, C., Kawakami-Kimura, N., Kasugai-Sawada, M., Hiraiwa, N., Toda, K., Ishida, H., Kiso, M., Hasegawa, A., and Kannagi, R. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 546–551
9. Mitsuoka, C., Sawada-Kasugai, M., Ando-Furui, K., Izawa, M., Nakanishi, H., Nakamura, S., Ishida, H., Kiso, M., and Kannagi, R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11225–11233
10. Kimura, N., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Hiraiwa, N., Uchimura, K., Muramatsu, T., Tamatani, T., Kansas, G.S., and Kannagi, R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4530–4535
11. Gallatin, W.M., Weissman, I.L., and Butcher, E.C. (1983) *Nature* **304**, 30–34
12. Geoffroy, J.S. and Rosen, S.D. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 2463–2469
13. Walcheck, B., Kahn, J., Fisher, J.M., Wang, B.B., Fisk, R.S., Payan, D.G., Feehan, C., Betageri, R., Darlak, K., Spatola, A.F., and Kishimoto, T.K. (1996) *Nature* **380**, 720–723
14. Walcheck, B., Moore, K.L., McEver, R.P., and Kishimoto, T. K. (1996) *J. Clin. Invest.* **98**, 1081–1087
15. Akahori, T., Yuzawa, Y., Nishikawa, K., Tamatani, T., Kannagi, R., Miyasaka, M., Okada, H., Hotta, N., and Matsuo, S. (1997) *J. Immunol.* **158**, 5384–5392
16. Seko, Y., Enokawa, Y., Tamatani, T., Kannagi, R., Yagita, H., Okumura, K., and Yazaki, Y. (1996) *J. Pathol.* **180**, 305–310
17. Kannagi, R. (1998) in *Leukocyte Typing VI* (Kishimoto, T., Kikutani, H., von dem Borne, E.G. Kr., Goyert, S.M., Mason, D.Y., Miyasaka, M., Moretta, L., Okumura, K., Shaw, S., Springer, T.A., Sugamura, K., and Zola, H., eds) pp. 352–355, Garland Publishing Inc., New York
18. Streeter, P.R., Rouse, B.T., and Butcher, E.C. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 1853–1862
19. Imai, Y., Lasky, L.A., and Rosen, S.D. (1993) *Nature* **361**, 555–557
20. Hemmerich, S., Butcher, E.C., and Rosen, S.D. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 2219–2226
21. Hemmerich, S., Leffler, H., and Rosen, S.D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12035–12047
22. Hemmerich, S., and Rosen, S.D. (1994) *Biochemistry* **33**, 4830–4835
23. Maly, P., Thall, A. D., Petryniak, B., Rogers, G.E., Smith, P.L., Marks, R.M., Kelly, R.J., Gersten, K.M., Cheng, G.Y., Saunders, T.L., Camper, S. A., Camphausen, R. T., Sullivan, F. X., Isogai, Y., Hindsgaul, O., Von Andrian, U.H., and Lowe, J.B. (1996) *Cell* **86**, 643–653
24. Habuchi, O., Suzuki, Y., and Fukuta, M. (1997) *Glycobiology* **7**, 405–412
25. Tsuboi, S., Isogai, Y., Hada, N., King, J.K., Hindsgaul, O., and Fukuda, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 27213–27216
26. Galustian, C., Lawson, A.M., Komba, S., Ishida, H., Kiso, M., and Feizi, T. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 748–751
27. Yoshino, K., Ohmoto, H., Kondo, N., Tsujishita, H., Hiramatsu, Y., Inoue, Y., Kondo, H., Ishida, H., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1997) *J. Med. Chem.* **40**, 455–462
28. Uchimura, K., Muramatsu, H., Kadomatsu, K., Fan, Q.W., Kurosawa, N., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Habuchi, O., and Muramatsu, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22577–22583
29. Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J., Mukai, K., and Goto, T. (1990) *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**, 265–274
30. Lasky, L.A., Singer, M.S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W. J., Grimley, C., Fennie, C., Gillett, N., Watson, S.R., and Rosen, S.D. (1992) *Cell* **69**, 927–938
31. Baumhueter, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S.D., and Lasky, L.A. (1993) *Science* **262**, 436–438
32. Derry, C.J., Faveeuw, C., Mordsley, K.R., and Ager, A. (1999) *Eur. J. Immunol.* **29**, 419–430
33. Sasseti, C., Tangemann, K., Singer, M.S., Kershaw, D.B., and Rosen, S.D. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 1965–1975
34. Tu, L., Delahunty, M.D., Ding, H., Luscinskas, F.W., and Tedder, T.F. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 241–252
35. Spertini, O., Cordey, A.S., Monai, N., Giuffrè, L., and Schapira, M. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 523–531
36. Guyer, D.A., Moore, K.L., Lynam, E.B., Schammel, C.M.G., Rogelj, S., McEver, R.P., and Sklar, L.A. (1996) *Blood* **88**, 2415–2421
37. Tu, L.L., Chen, A.J., Delahunty, M.D., Moore, K.L., Watson, S.R., McEver, R.P., and Tedder, T.F. (1996) *J. Immunol.* **157**, 3995–4004
38. Uchimura, K., Muramatsu, H., Kaname, T., Ogawa, H., Yamakawa, T., Fan, Q.W., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Habuchi, O., Yokoyama, I., Yamamura, K., Ozaki, T., Nakagawara, A., Kadomatsu, K., and Muramatsu, T. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)* **124**, 670–678
39. Fan, Q.W., Uchimura, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Muramatsu, H., Kadomatsu, K., and Muramatsu, T. (1999) *Glycobiology* **9**, 947–955
40. Bistrup, A., Bhakta, S., Lee, J.K., Belov, Y.Y., Gunn, M. D., Zuo, F.–R., Huang, C.–C., Kannagi, R., Rosen, S.D., and Hemmerich, S. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 899–910
41. Hiraoka, N., Petryniak, B., Nakayama, J., Tsuboi, S., Suzuki, M., Yeh, J.–C., Izawa, D., Tanaka, T., Miyasaka, M., Lowe, J.B., and Fukuda, M. (1999) *Immunity* **11**, 79–89
42. Lee, J.K., Bhakta, S., Rosen, S.D., and Hemmerich, S. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 543–549
43. Spiro, R. G., Yasumoto, Y., and Bhoyroo, V. (1996) *Biochem. J.* **319**, 209–216
44. Degroote, S., Lo-Guidice, J. M., Strecker, G., Ducourouble, M. P., Roussel, P., and Lamblin, G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29493–29501
45. Seko, A., Hara-Kuge, S., Yonezawa, S., Nagata, K., and Yamashita, K. (1998) *FEBS Lett.* **440**, 307–310
46. Mitsuoka, C., Ohmori, K., Kimura, N., Kanamori, A., Komba, S., Ishida, H., Kiso, M., and Kannagi, R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1597–1602

47. Komba, S., Galustian, C., Ishida, H., Feizi, T., Kannagi, R., and Kiso, M. (1999) *Angew. Chem. (Engl)* **38**, 1131–1133
48. Kannagi, R., Mitsuoka, C., Ohmori, K., Kanamori, A., Khoo, K. -H., and Inoue, Y. (1999) in *Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosylation* (Inoue, Y., Lee, Y.C., and Troy, F.A., eds) pp. 37–43, Gakushin Publishing Co., Osaka, Japan
49. Knibbs, R.N., Craig, R.A., Natsuka, S., Chang, A., Cameron, M., Lowe, J.B., and Stoolman, L. M. (1996) *J. Cell Biol.* **133**, 911–920
50. Hiraiwa, N., Hiraiwa, M., and Kannagi, R. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 183–186

Received on October 25, 1999, accepted on December 3, 1999

Profile of Authors

Reiji Kannagi

Graduated Kyoto University, School of Medicine (in 1974), and obtained Ph.D. from Kyoto University, Graduate School of Medicine (in 1982). The title of his thesis was "Limited hydrolysis of platelet membrane phospholipids: On the proposed phospholipase-susceptible domain in platelet membranes."

He started his professional career at Fred Hutchinson Cancer Research Center, Program of Biochemical Oncology, Seattle, Washington, USA (1980–1982), then became Assistant Professor at Kyoto University, School of Medicine (1982–1985) and Lecturer at Kyoto University, School of Medicine (1985–1991). He is presently chief of Department of Experimental Pathology at Aichi

Cancer Center Research Institute.

Main themes: Studies of cell-to-cell interaction and adhesion, biochemistry of carbohydrates, and medical oncology.

★★★★★★★

Akiko Kanamori

Graduated from Ochanomizu University (in 1985), followed by graduate studies and obtained a Ph.D. in Biochemistry from the University of Tokyo (in 1990). The title of her thesis was "Deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein (KDN-gp) in rainbow trout egg vitelline envelope and ovarian fluid: Occurrence of a novel α 2,8-linked oligo/poly (KDN) structure in O-Linked glycan chains and its function in fertilization"

After becoming fellow of the Japan Society for the Promotion of Science for Japanese Junior Scientists (1991–1993), she became a research worker at the Laboratory for Glyco-Cell Biology in the Frontier Research Program, RIKEN (1993–1998) and visiting investigator at La Jolla Cancer Research Foundation (April–October 1994). She is presently a researcher of Program of Experimental Pathology at the Aichi Cancer Center Research Institute.

She has been studying the biological function and structure of glycoconjugates, especially in modification of sialic acid. Now she is investigating the mechanism of cell adhesion mediated by selectins and their ligands, sialoglycoconjugates using molecular biological methods.