A Half Century of Blood-Group Antigen Research Some Personal Recollections

血液型抗原研究の半世紀—ある個人的回想

Watkins, Winifred M.

Department of Haematology, Imperial College School of Medicine,
Hammersmith Hospital, London, W12 ON, UK
FAX:44 181-742-9335, E-mail: w.watkins@ic.ac.uk

Key words: human blood-group antigens, ABO, Lewis, P_I, Sd^a

Abstract

The author describes investigations on ABO and Lewis blood-group antigens from the time in the 1940s when practically nothing was known about their chemical structure until today when the genes ultimately responsible for the appearance of the antigens on the red blood cell surface have been defined in molecular terms. The early work was carried out on glycoproteins in secretions that have the same serological specificity as the A, B, H, and Lewis antigens on red cells. Indirect methods of inhibition of haemagglutination with simple sugars and inhibition of degradation with exo-glycosidases led to the identification of the immunodominant sugars in the determinant structures. The sequential degradation with exo-glycosidases established the precursor-product relationship of A and B to H and showed that a single sugar masked the underlying specific H structure. Fragmentation of the purified glycoproteins with mild acid or alkali led eventually to defined structures for the five specificities A, B, H, Le(a) and Le(b). Knowledge of the chemical basis of the blood-group reactions enabled schemes to be proposed for the genetic control and biosynthesis of the glycoproteins that explained the interactions at the phenotypic level between the ABO, H, Secretor and Lewis genes. The proposal that the primary protein products of the blood-group genes are glycosyltransferase enzymes that transfer the immunodominant sugar to complete the determinant structures was confirmed and the characterization of these glycosyltransferases has enabled the blood-group genes to be cloned and sequenced by others. Studies on the P_I determinant in the blood-group P system and the Sd(a) determinant in the Sid system were also performed on soluble sources of material that carried the same specificity as the antigens on the red cell surface. A glycoprotein isolated from sheep hydatid cyst fluid yielded the structure of the P_I determinant and the structure of the Sd(a) determinant was identified amongst fragments released from Tamm-Horsfall glycoprotein which is secreted in soluble form in human urine.

要 約

ABO式およびルイス式血液型抗原について、実際にはその化学構造について何もわかっていなかった1940年代から、赤血球表面へ抗原を発現させる究極の遺伝子を分子の言葉で明瞭に定義するに至った今日までの研究の経過について述べる。初期の仕事は、赤血球表面のA、B、H、ルイス抗原と同じ血清学的な特異性を有する分泌型糖タンパク質についてすすめられた。単糖による血球凝集阻害やエキソグリコシダーゼによる分解の阻害の間接的方法を用いて、血液型決定基構造中の免疫学的優位な糖を同定した。エキソグリコシダーゼで逐次的に分解することによりAとBがHへと変化する、前駆体と生成物の関係を明らかにし、一つの糖がその下にある特異的な構造をマスクすることを示した。精製した糖タンパク質を弱酸やアルカリで断片化することにより、結果的には、A、B、H、Le(a)、Le(b)の5種類の特異性に対する化学構造の決定につながった。血液型反応の基礎となる化学的知見を得て、ABO、H、分泌型とLewis遺伝子間の表現型レベルの関係を説明する、遺伝子レベルの制御と糖タンパク質の生合成機構を提案した。血液型遺伝子により作られる最初のタンパク質産物が糖転移酵素であり、免疫学的優位な糖を転位し血液型決定基構造を完成させる、という考えが確認された。これらの糖転移酵素の特性づけによって、血液型遺伝子のクローニングとその塩基配列決定が可能になった。P式血液型のP_I決定基とSid式血液型のSd(a)決定基の研究は、赤血球表面抗原と同じ特異性を有する可溶性物質を使って行われた。ヒツジ胞虫嚢腫液から分離された糖タンパク質からP_I決定基とSd(a)決定基の構造が得られ、ヒト尿に分泌される可溶性のTamm-Horsfall糖タンパク質から遊離された断片中にも同一の構造が同定された。

A. Introduction

My introduction to human blood-group antigens came in 1942 when in a very junior capacity I joined Walter Morgan's laboratory in the Biochemistry department at the Lister Institute of Preventive Medicine, London. He had initiated a programme of research on these antigens in the early 1940s, influenced by the setting up of the Emergency Blood Transfusion Service in the U.K. at the outbreak of World War 2. The ABO, MN, P and Rhesus systems of blood-group antigens were the only systems described at that time and the ABO polymorphism was the one that had been most thoroughly investigated in terms of serology and genetics and known to be clinically important in blood transfusion practice.

B. The ABO Blood-Group System

In the early 1940s very little was known about the chemical nature of the antigens associated with the human ABO blood-group system. These first serological differences in human blood had been discovered in 1900 by Landsteiner (1) and extensive family studies in the ensuing years had demonstrated that the antigens were inherited characters. In 1924 Bernstein (2) correctly predicted that the mechanism of inheritance involved three alleles at the ABO locus. The presence in secretions of substances with the same serological specificities as the antigens on the red cell was shown in the 1930s (3) and preliminary studies on these materials by Landsteiner and colleagues (4) suggested that they were carbohydrate-amino acid complexes. Carbohydrate, however, was not at that time recorded in analyses of red cell membranes and because extraction of red cells with ethanol destroyed the blood-group activity the idea was prevalent that these antigens were lipid (5). Attempts to isolate the antigens from red cells had been abandoned by the time I entered the laboratory because methods were not available in the 1940s for the extraction and identification of membrane components present in minute amounts. Attention was therefore turned to blood-group active substances from epithelial secretions and by 1944 human ovarian cyst fluids had become the starting material of choice because they could be obtained from individuals of known blood-group and secretor status and were frequently of a sufficient size for grams of freeze dried material to be obtained from one cyst (6). The aim from the beginning was to correlate the chemical nature of the antigens with the blood-group genes and hence it was important to use individual samples of known blood-group status rather than pooled materials. It should perhaps be pointed out that when this work was started the central dogma of the genetic code had not yet been enunciated so that references to the blood-group genes rather vaguely suggested that they could be templates for the antigens.

One of the first problems to be tackled was whether there is a product of the O gene analogous to that of the A and B genes. In the original Landsteiner definition of the ABO sys-

A. はじめに

私のヒト血液型抗原の世界との出会いは、1942年にロンドンの Lister 予防医学研究所生化学教室 Walter Morgan 研究室に下級研究員として入ったことに始まった。第二次世界大戦の勃発によりイギリスにおいて緊急輸血体制が確立し、その影響で彼は1940年代始めにヒト血液型抗原の研究を始めていた。ABO、MN、P、Rh式血液型抗原しか、当時わかっておらず、特にABO多型性が血清学的、遺伝学的に最も徹底的に研究され、輸血において臨床的に重要であることが知られていた。

B. ABO式血液型

1940年代初めには、ABO式血液型と関連がある抗原の化学的性質は、まだほとんど知られていなかった。最初のヒト血液における血清学的な違いの発見は、1900年Landsteinerによりなされた(1)。その後数年で、集中的な家族調査が行われ、その抗原が遺伝的性質を有することが示された。1924年にBernstein(2)が、この遺伝の仕組みが、ABO 遺伝子座の3対立遺伝子に関係することを正確に予測した。1930年代には、赤血球表面抗原と同じ血清学的な特異性を伴う分泌型物質の存在が示された(3)。Landsteiner ら(4)の予備実験によれば、これらの物質は糖質とアミノ酸の複合体であることが示唆された。しかしながら、糖質は、当時の赤血球膜の分析では検出されず、赤血球のエタノール抽出により血液型が壊れることから、血液型抗原は脂質であるという考えが一般的だった(5)。私が研究室に入った頃は、赤血球からこの抗原を分離する試みは放棄されていた。なぜならば、わずかにしか存在しない膜成分を抽出、同定することは1940年代にはできなかったからである。それゆえ上皮系分泌物由来の血液型活性物質に注目が集まり、1944年までにヒト卵巣嚢腫液が、研究対象として最初に選択された。なぜならば、それは、嚢胞が得られる患者の血液型やその分泌状態がわかるのに加えて、しばしば十分な大きさがあって、一つの嚢胞からグラム単位の凍結乾燥試料がとれるからである(6)。抗原の化学的性質と血液型遺伝子に関係づけることを最初からねらっていたので、プールされた試料より血液型が既知の個人からの試料を使うことが重要であった。この仕事が始まった頃、まだ遺伝暗号の中心教義が発表されていなかったのも、血液型遺伝子に関する文献は、遺伝暗号が抗原の鋳型になりうることをむしろぼんやり、示唆していたことを指摘しておくべきであろう。

最初に直面した課題の一つは、A、B 遺伝子産物に相当するO遺伝子産物が存在するかどうかであった。LandsteinerのABO式血液型の元々の定義では、Oは単にAとBの欠損としてみられ

tem O was seen simply as the absence of A and B but in the 1930s a number of reagents of human and animal origin had been described which reacted preferentially with group O cells; these were referred to as anti-O reagents. However we found that thorough serological testing of these reagents with cells of known genotype revealed that, although they did react preferentially with O cells, they also reacted, to a much lesser extent, with known homozygous AA and BB cells as well as with heterozygous AB cells. The donors of these cells could not be carrying the product of the O gene since an individual inherits only one of the three ABO alleles from each parent. We therefore concluded that the antigen detected on O cells was the product of an independent genetic system which we named H (7). Further, following certain ideas of Hirszfeld and Amzel (8) and Witebsky and Klendshoj (9) we proposed that H is the precursor of A and B antigens and is present to greater extent on O cells than on cells of other groups because it appears unchanged on these cells (10). The discovery of the Bombay O_h phenotype in 1952 (11) which was characterised by a lack of A, B and H antigens on the individual's red cells and the occurrence of antibodies to A, B and H in their sera, led to the proposal that these individuals were homozygous for a null allele of H, namely h , and lacked A and B antigens because of the absence of H precursor substance (10). In the late 1940s the discovery of Le^a (12) and Le^b (13) antigens introduced two more determinants that occurred both on red cells and in secretions. These two antigens were shown to be related to ABH when Grubb (14) and Brendemoen (15) made the surprising observations that individuals who have Le^a antigen on their red cells are non-secreters of ABH, whereas those who have Le^b antigen are ABH secretors. Hence we knew by 1949 that in secretions there were five inter-related blood-group specificities that awaited chemical identification.

Substances with different ABH and Lewis specificities were extensively purified from ovarian cyst fluids; all were found to be macromolecules composed of 85-90% carbohydrate, made up of four sugars, D-galactose, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine and L-fucose, and a peptide moiety comprising some 15 amino acids (6). Sialic acid was later also shown to be a component of these substances but this sugar was ill-defined in the early 1950s. The macromolecules were then classified as mucopolysaccharides, although they would now be called highly glycosylated mucin-type glycoproteins, with O-linked oligosaccharide chains. We were disappointed at the time to find that the compositions of different preparations were all so similar that they did not provide any clues as to the factors controlling the distinctive specificities. Few methods were then available for structural analysis of carbohydrates that were readily applicable to such large complex macromolecules. We therefore embarked on some indirect methods of structural analysis in attempts to find out more about the specificity differences.

ていたが、1930代にO型細胞に優先的に反応するヒトや動物起源の試薬が多く発表された。すなわち、これらは、抗O試薬としてみなされた。しかしながら、我々は遺伝型が既知の細胞を使って血清学的に調べてみると、それらはよくO型細胞に反応するが、ずっと弱くABヘテロ接合体細胞と同様にAAやBBホモ接合体細胞にも反応することを明らかにした。個体が各々の親から3種類のABO対立遺伝子の1つを受け継いでいるから、これらの細胞の供与者は、O遺伝子産物を有し得ない。それゆえ、我々は、O型細胞で検出される抗原は、我々がHと名付けた独立した遺伝系の産物であると結論づけた(7)。さらに、Hirszfeld、Amzel (8)、Witebsky、Klendshoj (9)の考えを加えて、我々はH物質は、A型、B型抗原の前駆体であり、それはO型細胞では、変化していないので、他の細胞よりも非常に多く存在していると提唱した(10)。1952年には個体の赤血球上にA、B、H抗原が欠損していることが特徴的なボンベイ O_h 表現型が発見され(11)、その患者の血清中にA、B、Hに対する抗体が生じていることから、これらの個体はHの不活化対立遺伝子(h 遺伝子)のホモ接合体であり、H前駆体物質の欠損のためA、B抗原も欠損している(10)。1940年代後半には、ルイス a (Le^a)(12)とルイス b (Le^b)(13)抗原が発見され、赤血球と分泌物両方に存在する2種類の決定基が加わった。Grubb (14)やBrendemoen (15)が、赤血球に Le^a 抗原を持つ個体がABH非分泌型で、 Le^b 抗原をもつ個体が分泌型であるという驚くべき観察をしたことで、これらの2種類の抗原はABHと関係があることが示された。よって1949年までに我々は、分泌物に5種類の相互関係にある血液型特異性を認め、その化学的な同定を待つこととなった。

相違するABHとルイス特異性を有する物質を卵巣嚢腫から徹底的に精製したところ、すべてが85-90%の糖質からなる高分子であることが判明し、D-ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、L-フコースの4種類の糖からなる糖質部分と、15アミノ残基からなるペプチド部からなっていた(6)。のちに、シアル酸もこれらの物質の構成成分であることが判明したが、1950年代初期には、この糖ははっきりわからなかった。当時その高分子はムコ多糖類と分類されたが、今日ではO結合糖鎖を伴う高度にグリコシル化されたムチン型糖鎖とよばれている。別々の調製試料でも、すべて組成が非常に似ていたため、特異性を制御する因子に関して、なにも手がかりを得られなかった時は、我々はがっかりした。当時、そのように大きく複雑な高分子にすぐ応用できる糖質の構造解析方法はなにもなかった。そのため、我々は特異性の違いをより多く見つけだすために、いくつかの間接的な構造解析法を始

An early observation of Landsteiner (4) had established that for artificial antigens a simple substance with a structure closely related to, or identical with, the immunologically determinant (haptenic) group of the antigen can combine with the antibody and thereby competitively inhibit the reactions between antigen and antibody. Although this principle is employed today in many forms of inhibition test, in the 1950s it had not been used to find the determinants in naturally occurring antigens. By 1952 we had accumulated a large selection of anti-H reagents of human and animal origin and we decided, with no great expectation of the outcome, to screen them for inhibition of the agglutination of O cells with the component sugars present in the blood-group active substances. Somewhat to our surprise one of the many reagents, that from the eel, *Anguilla anguilla*, was quite strongly inhibited by L-fucose and to a greater extent by α -methyl L-fucoside and not by the other monosaccharides (16). Our conclusions were somewhat tentative at first because this was an isolated result with a rather exotic reagent, but the inference that L-fucose in α -linkage is more important than the other sugars for H specificity was reinforced when we were given some plant agglutinins (later called lectins) which had recently been shown to be specific for certain blood-group antigens (17,18). Extracts of *Lotus tetragonolobus* seeds preferentially agglutinated O cells and this agglutination was inhibited by H-active glycoprotein and also by L-fucose and its α -methyl glycoside (19). Moreover, other plant reagents specifically agglutinating A cells were inhibited by N-acetylgalactosamine, indicating for the first time that this sugar is an important part of the A determinant (19). The failure of many human anti-H and anti-A antibodies to be inhibited by the simple sugars told us that the complete determinant structures recognised by these antibodies must be larger than the monosaccharides to which the lectins bound. Nevertheless, these simple experiments pointed to the carbohydrate nature of the blood-group determinants and gave the first indications that for each specificity one of the component sugars was playing a more dominant role than the others. Until that time the complete substances had been seen as the blood-group antigens but now we were able to perceive that probably only a small part of the macromolecule was involved in the blood-group specific properties. These experiments also simultaneously disclosed the carbohydrate specificity of plant lectins but as the main drive was to establish the structures of the blood-group determinants we did not pursue this aspect further and it was left to others to open up what was to become a very important branch of glycoscience (reviewed in 20). Elvin Kabat and his group in New York also started work on blood group substances in the late 1940s and in 1955 confirmed the role of N-acetylgalactosamine in A-specificity by precipitation inhibition experiments with human sera and by similar methods indicated a role for D-galactose in B-specificity (21).

Soon after the inhibition tests had revealed the associa-

めた。Landsteiner(4)の初期の観察によると、人工的な抗原として、単純な物質が免疫学的な抗原決定基(ハプテン)群と構造的に関係が深いか同一である場合、それは抗体と結合可能であり、それによって抗原抗体反応を競争的に阻害できる。この原理は今日でも多くの阻害試験に採用されているが、1950年代には天然抗原の決定基の発見にはまだ使われていなかった。1952年までに、我々はヒトや動物起源の抗H試薬を多く選び出していたので、あまり大きな期待はしていなかったが、それらを血液型活性物質に存在する糖成分を使ったO型細胞凝集阻害試験でスクリーニングしてみることにした。幾分驚いたことに、多くの試薬のなかの1つの、ウナギ(*Anguilla anguilla*)由来のものは、非常に強力にL-フコースにより阻害され、 α -メチルL-フコシドではある程度強く阻害され、他の単糖では阻害されなかった(16)。我々の結論は、かなり風変わりな試薬による隔絶した結果だったので、最初は幾分暫定的であったが、最近ある血液型抗原に特異性があることが示されたいくつかの植物凝集素(のちにレクチンと命名)を手に入れたとき、 α 結合のL-フコースは、H特異性に対して他の糖よりも重要であるという推論が強められた(17,18)。ミヤコグサ(*Lotus tetragonolobus*)の種子抽出液は、優先的にO型細胞を凝集させ、この凝集はH活性糖タンパク質、さらにL-フコース、その α -メチルグリコシドでも阻害された(19)。その上、他の特異的にA型細胞を凝集させる植物試薬は、N-アセチルガラクトサミンにより阻害され、この糖がA決定基の重要な部分であることが始めて示された(19)。単糖により多くのヒト抗H、抗A抗体が阻害されないことは、これらの抗体で認識される完全な決定基構造が、レクチンが結合する単糖よりも大きいことを我々に教えた。それにもかかわらず、これらの単純な実験は血液型決定基の糖質の性質に注意を向けさせ、構成糖の一つが各特異性に対して他の糖よりも主要な役割を演じていることを初めて示唆した。その時まで、物質まるごとが血液型抗原として考えられていたが、今ではおそらく高分子のごく小さな一部が血液型特異的な性質に関与すると認めることができる。これらの実験は、同時に植物レクチンの糖質特異性も明らかにしたが、その本流は血液型抗原決定基の構造を確立することなので我々はその方向を追究せずに、糖鎖科学のとても重要な枝となる分野を開くことは他に引き継がれた(20で総説)。Elvin Kabatのグループもニューヨークで1940年代後半に血液型物質の仕事を始めて、1955年にはA型特異性に対するN-アセチルガラクトサミンの役割をヒト血清による沈降阻害実験により確認した。同様の方法でB型特異性に対するD-ガラクトースの役割を示した(21)。

阻害試験によりH抗原特異性とL-フコースの関連が明らかに

tion of L-fucose with H-specificity the distinguished chemist Richard Kuhn in Heidelberg started an investigation on the structures of a series of fucose-containing oligosaccharides that occur in human milk. He kindly supplied these compounds and they gave such clear cut inhibition results in Lewis haemagglutination inhibition tests that it was possible, from the established structures of the oligosaccharides, to delineate in 1957 the complete trisaccharide determinant responsible for Le^a specificity, Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc, and to predict the difucosyl structure for Le^b (22). The involvement of α -linked fucose in three distinct specificities, H, Le^a and Le^b, re-inforced our view that the nature of the terminal non-reducing sugar and the anomeric linkage could not be entirely responsible for the immunological properties and that other sugars in the macromolecules must be involved in the different antibody combining sites.

It had been known since the 1930s that certain bacterial extracts destroyed the A, B or H specificity of secreted substances but their mode of action was unknown. Treatment of the blood-group active glycoproteins with the crude bacterial extracts usually resulted in extensive release of all the component monosaccharides but by attempting to inhibit enzymic loss of blood-group activity with simple sugars we found a second method that strengthened our conclusions about the nature of the immunodominant sugars in the determinants. Destruction of A-specificity by certain bacterial or protozoan extracts, was inhibited by N-acetylgalactosamine, destruction of B specificity by D-galactose, and destruction of H specificity by L-fucose (23). We therefore deduced that the degradative enzymes were, respectively, an α -N-acetylgalactosaminidase, an α -galactosidase and an α -fucosidase that split off terminal sugars (and hence are what would now be termed exo-glycosidases) and that they were being inhibited by an excess of the products of their own action.

Biochemical confirmation of the precursor-product relationship of H to A and B was obtained from enzyme degradation experiments. Iseki and Masaki (24) made the important observation in 1953 that treatment of A substance with an enzyme preparation from *Clostridium tertium* made the A specificity disappear with the apparent production of O(H) substance. In our laboratory, using partially purified enzymes from the protozoan *Trichomonas foetus*, we showed that the loss of B activity was accompanied by the release of galactose, and the loss of A activity was accompanied by the release of N-acetylgalactosamine; in each instance there was a development of H activity (25). These results therefore substantiated the proposed precursor-product relationship of H to A or B and revealed that addition of only one monosaccharide was required to bring about the conversion. Subsequent treatment of the exposed H structures with an H-destroying enzyme released fucose and increased Le^a activity, (which we now know derives from re-

なった直後、ハイデルベルクの著名な化学者 Richard Kuhnは、ヒト母乳の一連のフコース含有多糖類の構造に関する研究を開始した。彼が親切にもこれらの化合物を供給してくれたため、非常に明快なルイス血球凝集阻害試験の結果が得られ、多糖類の確立している構造から、1957年にはLe^a特異性を決める完全な三糖決定基(Gal β 1,3[Fuc α 1,4]GlcNAc.)を明らかにし、Le^bのジフコシル構造を推測した(22)。H、Le^a、Le^bという3種類の異なる特異性に対する α -結合フコースの関与は、我々の見方を裏づけるものであった。すなわち、非還元末端糖とそのアノマー結合の状態は、抗原の免疫学的な性質を必ずしも決定するものではなく、高分子内の他の糖も、さまざまな抗体結合部位に関与している。

1930年代以来、ある細菌抽出液は、分泌物のABH特異性を破壊することが知られていたが、その機序は不明であった。血液型活性糖タンパク質を未精製の細菌抽出液で処理すると、普通はすべての単糖類成分が遊離したが、単糖で血液型活性の酵素的消失を阻害する試みによって、我々は決定基における免疫学的優位な糖についての我々の結論を強化する2番目の方法論をみつけた。ある細菌や原虫抽出液によるA抗原特異性の破壊は、N-アセチルガラクトサミンにより阻害され、B抗原特異性はD-ガラクトース、H抗原特異性はL-フコースにより阻害された(23)。それゆえ我々はそれら分解酵素は、それぞれ α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 α -フコシダーゼであると推論し、これらは末端の糖をはずす(ゆえに今ではエキソグリコシダーゼと命名された)酵素であって、その作用はそれ自身の過剰な生成産物で阻害された。

HがA、B抗原の前駆体であるという生化学的な確認は、酵素による分解実験によりなされた。1953年IsekiとMasaki (24)は、*Clostridium tertium* から調製された酵素でA物質を処理するとA型特異性が消失し、O(H)物質が明らかに生成されたという重要な観察をした。我々の研究室では、原生動物*Trichomonas foetus* から部分精製した酵素を用いて、B型活性の消失がガラクトースの遊離を伴い、A型活性の消失がN-アセチルガラクトサミンの遊離を伴うこと、そして、双方ともH活性が発現することを示した(25)。これらの結果は、それゆえ、HはAまたはBに対し前駆体-生成物の関係にあるという考えを実証し、ただ一つの単糖の追加で変換することを示した。露出したH構造をひき続きHを破壊する酵素で処理すると、フコースが遊離しLe^a活

removal of the fucose from an Le^b structure) and further treatment with an Le^a -destroying enzyme released more fucose and left reactivity with horse anti-pneumococcal Type XIV serum which contains an antibody that combines with *N*-acetylglucosamine (Gal β 1-4GlcNAc-R) end-groups (25)]. These experiments therefore gave us information about the sequence of sugars in the determinant structures. The conclusions reached concerning the order in which the *H* and *Le* gene-encoded enzymes act have needed revision in the light of later work but the main inferences that the sugars are added sequentially and that the addition of each sugar confers a new specificity which masks the previously exposed specific determinant enabled us to speculate in the late 1950s on the pathways of biosynthesis of the blood-group antigens (26) and hence on the enzymic nature of the primary blood-group gene products (26, 27). The idea that proteins are the only primary translated products of genes was just beginning to penetrate into general biochemical thought and therefore it became apparent that, since the antigenic structures were carbohydrate, they must be secondary products of the blood-group genes. The pioneering work of Leloir and his colleagues (28) on nucleotide sugars and their role as sugar donors in glycosylation reactions had also recently been described in plants and bacteria; although at that time no mammalian glycosyltransferases had been identified, we proposed that the primary products of the blood-group genes were glycosyltransferases that added the final sugar to complete the determinant structures (26, 27, 29). Thus the product of the *A*-gene was proposed as an α 1,3-*N*-acetylgalactosaminyl transferase, the product of the *B*-gene an α 1,3-galactosyltransferase, and the product of the *H*-gene an α 1,2-fucosyltransferase (29). As the difference between secretors and non-secretors was deduced to be the presence or absence of H structures that provided the necessary precursor for the additions catalysed by the *A*- and *B*- gene products, the secretor gene, *Se*, was proposed as a regulator gene controlling the expression of the *H*-gene. We now know that the step involving the production of H structures is indeed the crucial one determining ABH secretor status but the gene responsible for the formation of H structures in epithelial tissues is a second tissue-specific α 1,2-fucosyltransferase rather than a regulator gene (30, 31). Since fucose in α 1,4-linkage to *N*-acetylglucosamine had been shown to be an important part of the Le^a determinant the product of the *Le* gene was predicted to be an α 1,4-fucosyltransferase (29).

At the same time as the biosynthetic pathways were being formulated from the enzyme degradation experiments Walter Morgan and colleagues were making different approaches to the structure of the blood-group determinants. The arrival of a French Canadian worker, Raymond Côté, saw the beginnings of a serious chemical attack on structure applying the newly introduced techniques of charcoal column and paper chromatography to separate the acid degradation products of purified

性が増加する。(今では Le^b 構造からのフコースを除去したものであることがわかった)さらに Le^a を破壊する酵素で処理するとフコースがさらに遊離し、*N*-アセチルラクトサミン (Gal β 1,4GlcNAc-R)末端基に結合する抗体を含有するウマ抗肺炎双球菌Type XIV 血清に対する反応性が残った(25)。それゆえ、これらの実験から我々に抗原決定基構造の糖鎖配列について情報がもたらされた。*H*や Le 遺伝子がコードする酵素が働く順序に関して到達した結論は、後の仕事で訂正が必要になったが、糖が逐次的に付加することで、かつて外部にさらされていた特異性を隠して、新たな特異性をうむという主要な結論は、1950年代後半に我々が血液型抗原の生合成経路を推定する事を可能にした(26)。そして、これゆえ血液型遺伝子の一次産物の酵素学的な性状を推定できた(26, 27)。タンパク質が唯一の最初の遺伝子翻訳産物であるという考えは、一般的な生化学的思考にちょうど浸透し始めたところで、それに照らすと、血液型抗原構造が糖質であるため、それらは血液型遺伝子の二次的な産物に違いないということになった。糖ヌクレオチドやその糖転位反応における糖供与体としての役割についてのLeloirらの先駆的な仕事(28)も、植物や細菌で詳しく述べられていた。当時哺乳類以外の糖転移酵素は一つも同定されていなかったけれども、我々は血液型遺伝子の最初の産物が糖転移酵素であり、それが最後の糖を付加して抗原決定基構造を完成させると提唱した(26, 27, 29)。従って、*A*遺伝子産物は α 1,3-*N*-アセチルガラクトサミン転移酵素として、*B*遺伝子産物は α 1,3-ガラクトース転移酵素、*H*遺伝子産物は α 1,2-フコース転移酵素として提唱された(29)。分泌型、非分泌型の違いが、*A*と*B*遺伝子によって触媒される糖転位に必要な前駆体であるH構造の有無によると推論されたので、*H*遺伝子の発現をコントロールする調節遺伝子として分泌型酵素遺伝子(*Se*)が提唱された。H構造の産生に関わる段階が、実際にはABH分泌状態を決める重要な段階であり、上皮系組織におけるH構造の形成に責任のある遺伝子は、調節遺伝子というよりもむしろ2番目の組織特異的な α 1,2-フコース転移酵素であることが今日わかっている(30, 31)。*N*-アセチルグルコサミンに α 1,4-結合しているフコースは、 Le^a 決定基の重要な部分であると示されたので、*Le*遺伝子産物は α 1,4-フコース転移酵素であると推測された(29)。

生合成経路が酵素分解実験で系統立てられようとしていた同じ頃、Walter Morganらは、血液型抗原決定基に対する別のアプローチを行っていた。到着したフランス系カナダ人研究者 Raymond Côtéは、精製した卵巣嚢腫糖タンパク質から酸分解物質を分離するため、活性炭カラムやペーパークロマトグラフィーの手法を新たに取り入れて、果敢に化学的に構造解析に

ovarian cyst glycoproteins. The isolation of the first disaccharide from A-substance that was serologically active, GalNAc α 1-3Gal confirmed the α -linkage of the terminal sugar and showed that it was joined to the O-3-position of a subterminal galactose residue (32). In time other workers, including, T.J.Painter and A.S.R.Donald, joined the team and made substantial contributions to the isolation and identification of oligosaccharide fragments. Characterisation of two A-active trisaccharides based on two different sub-terminal disaccharide structures (33) heralded the existence of different peripheral core structures bearing the determinants. The Type 1 (Gal β 1-3GlcNAc) and Type 2 (Gal β 1-4GlcNAc) sequences were subsequently found to be present in all the purified blood-group substances irrespective of specificity (34) and have since been shown to be peripheral core structures of ligands in both N- and O-linked oligosaccharide chains of many glycoproteins. The A-active trisaccharides did not contain fucose but the precursor-product relationship of H to A led us to believe that this sugar must be attached to the subterminal galactose residue in the A determinant. The lability of fucosyl linkages to acid hydrolysis necessitated the introduction of an alkaline degradation technique for the isolation of the complete A, B, H, Le^a and Le^b determinants. The β -elimination procedure involving alkaline degradation followed immediately by reduction with sodium borohydride to stabilise the chains yields large oligosaccharide fragments but, as we were convinced that the determinant structures were at the non-reducing termini of the chains, we used alkaline conditions and allowed "peeling" to occur in order to obtain fragments of a size that could be more easily identified by compositional analysis and methylation. In 1965 a tetrasaccharide (GalNAc α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1-4GlcNAc) bearing the A determinant complete with the fucose residue (35) was isolated from A substance. Similar products of acid and alkaline degradation of B substance yielded oligosaccharides in which terminal α 1,3-linked galactose replaced N-acetylgalactosamine; culminating with the isolation of the B-active tetrasaccharide (Gal α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1-4GlcNAc) (35). Degradation of H-active glycoprotein led to the liberation of two H-active trisaccharides proving that the H precursor structure also occurs on both Type 1 and Type 2 chain endings (36) whereas fragmentation of Le^a substance yielded, as expected, only one Le^a-active trisaccharide based on a Type 1 chain (37). The final phase of the isolation of oligosaccharides from acid and alkaline degradation products of the ovarian cyst substances at the Lister Institute came in 1967, with the identification of an Le^b-active pentasaccharide, Fuc α 1-2Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal (38). Many other structural fragments had been isolated during the course of these investigations but the characterisation of the Le^b fragment completed our goal to chemically identify the five blood-group active determinants found in secreted glycoproteins. The Le^b structure was of particular interest because it was a clear example of a hybrid sequence bear-

取り組みはじめた。A型物質から血清学的にA型陽性のGalNAc α 1-3Galという最初の二糖を分離し、最末端の糖の α 結合を確認するとともに、末端から2番目のガラクトース残基のO-3-位に結合することが示された(32)。時を同じくして、T.J.PainterやA.S.R.Donaldを含む他の研究者もそのチームに参加して、オリゴ糖断片の分離同定に重要な貢献をした。2種類の異なる副末端二糖構造に基づく2種類のA型活性三糖類の特徴を調べることで(33)、決定基を担う異なる末梢コア構造の存在が予見された。その後1型糖鎖(Gal β 1,3GlcNAc)と2型糖鎖(Gal β 1,4GlcNAc)配列が、特異性に関わりなく全ての精製血液型物質に存在することがわかった(34)。そして、多くの糖タンパク質のN結合、O結合糖鎖両方においてリガンドの末梢コア構造であることが示された。A型活性三糖は、フコースを含んでおらず、HとAの前駆体-生成物の関係から考えると、フコースはA決定基の副末端ガラクトース残基に付くと信じるに至った。フコース結合が酸に不安定であることから、完全なABH、Le^a、Le^b決定基を単離するには、アルカリ分解法を導入することが必要だった。アルカリ分解による β 脱離は、鎖を安定させるため、すぐに水酸化ホウ素ナトリウムで還元する操作を含み、それにより大きなオリゴ糖鎖断片になってしまう。しかし、我々は決定基構造が非還元末端にあると確信していたので、我々はアルカリ条件を使用してピーリング反応を起こさせ、構造解析とメチル化でより容易に同定できる大きさの断片を得た。1965年にはフコース残基(35)を持つ完全なA抗原決定基を有する四糖(GalNAc α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1,4GlcNAc)がA型物質より単離された。B型物質を酸およびアルカリで分解させて得た類似生成物は、末端 α 1,3-結合ガラクトースがN-アセチルガラクトサミンで置換された糖鎖で、B-活性な四糖(Gal α 1,3[Fuc α 1-2]Gal β 1,4GlcNAc)の単離に成功した(35)。H-活性糖タンパク質を分解すると、2種類のH-活性な三糖の遊離に成功し、H前駆体構造もまた1型、2型糖鎖末端をもつことが証明された(36)。一方、Le^a物質の断片化により、期待通り、ただ1種類の1型糖鎖に基づくLe^a-活性三糖が得られた(37)。1967年、Lister Instituteで、卵巣嚢腫物質の酸およびアルカリ分解生成物からの糖鎖単離の最終局面が訪れ、Le^b-活性五糖(Fuc α 1-2Gal β 1,3[Fuc α 1,4]GlcNAc β 1,3Gal)が同定された(38)。この研究の途上で多くの他の構造を有する断片が単離されたが、Le^b断片の解析で、分泌された糖タンパク質5種類の血液型活性決定基を化学的に同定するという目標を達成した。Le^b構造は、Ceppellini (39)によって推定さ

ing a distinctive specificity that was synthesised, as predicted by Ceppellini (39), by two gene products, *H(Se)* and *Le*, giving a compound in which the specificity of each was masked by the addition of the second fucose residue. The completed identification of the chemical structures of the five determinants coincided with the official 'retirement' of Walter Morgan from his University post in 1968 although this by no means signified the end of his research career. Meanwhile Kenneth Lloyd and others, in Elvin Kabat's laboratory in New York, employing the β -elimination procedure, were also isolating blood-group active oligosaccharides from ovarian cyst substances and identified a branched pentasaccharide carrying both Type 1 and Type 2 chains, that could accommodate all the characterised blood-group active sequences (40).

It was not until the 1970s that ABH antigens on red cells were isolated through the pioneering efforts of Yamakawa in Japan, Koscielak in Poland and Hakomori in the USA. These first compounds were shown to be glycosphingolipids and thus appeared to fulfil the earlier predictions concerning the lipid nature of the antigens on the red cell surface but later investigations revealed that *N*-linked glycoproteins, also carry ABH activity on the red cell (reviewed in 41). *Le^a* and *Le^b* determinants on red cells were shown to be associated with glycolipids that are taken up from the plasma in which the cells circulate (42). However, irrespective of the carrier molecules, the minimal terminal sequences responsible for A, B, H, *Le^a* and *Le^b* activity are identical with those established for the determinants in the ovarian cyst glycoproteins; these terminal sequences can be found on a variety of glycoproteins, glycolipids and free oligosaccharides in different tissues. The expression of the antigens is developmentally regulated and loss of expression in tumour cells can give a poor prognosis (43) but no precise functions have as yet been assigned to the antigens.

The prediction that the primary products of the blood group genes are glycosyltransferases prompted me in 1960 to spend a sabbatical year in the laboratory of William (Zev) Hassid in the University of California, Berkeley, where much pioneering work was being carried out on plant glycosyltransferases. As my interest was in mammalian enzymes I was asked to look at the mechanism of lactose synthesis and had the good fortune, with the help of the expertise in that laboratory, to be associated with the discovery of lactose synthetase (44). Armed with this training I returned to London and set up a small group to begin a search for the enzymes we had predicted to be involved with blood-group ABH and Lewis biosynthesis. Initial studies were carried out with post-mortem samples from baboon and human stomachs and human submaxillary glands; tissues that were known to be rich in blood-group activity. With colleagues Caroline Race, Veronica Hearn and Zeenat Gunja Smith, we identified the A-gene-associated α 1,3-*N*-acetylgalactosaminyl-transferase in the tissues of blood-group A and AB individuals (45)

れたように、*H(Se)*と*Le*という2種類の遺伝子により合成され、それぞれの元来の特異性は2番目のフコース残基付加によりマスクされた化合物で、異なる特異性を有するあいこの配列の例だったので、特に興味深かった。5種類の決定基の化学構造の完全な同定は、1968年Walter Morganの大学ポストからの公式の引退(決して研究を終えたわけではなかったが)と時を同じくした。その間、ニューヨークのElvin Kabat研究室で β -脱離操作に携わっていたKenneth Lloydらが、卵巣嚢腫物質から血液型活性糖鎖を単離し、1型、2型糖鎖両方を伴う分枝した五糖を同定した。その糖鎖は、同定されているすべての血液型活性配列を乗せられるものだった(40)。

赤血球上のABH血液型抗原が、日本のYamakawa、ポーランドのKoscielak、アメリカのHakomoriの先駆的な努力により単離されたのは1970年代になってからだった。これらの最初の化合物はスフィンゴ糖脂質であることが示され、赤血球上の抗原が脂質性であるという初期の推測を満たしているように思えたが、後の研究では、*N*-グリコシド結合型糖タンパク質もまた赤血球上でABH型活性をもつことが示された(41で総説)。赤血球上の*Le^a*と*Le^b*決定基が、血球細胞が流れている血漿中から吸収された糖脂質に結合していることが示された(42)。しかし、キャリア分子がなんであろうと、ABH、*Le^a*、*Le^b*活性を示す最小の末端糖鎖配列は卵巣嚢腫糖タンパク質で決定基として同定されたのと同じである。すなわち、これらの末端糖鎖配列は、異なる組織のさまざまな糖タンパク質、糖脂質、遊離のオリゴ糖鎖で見つけられる。抗原の発現は発生に関連して制御され、腫瘍細胞での発現の喪失は予後不良を意味したが(43)、正確な機能は未だにわかっていない。

血液型遺伝子の最初の産物が糖転移酵素であるという推測が、1960年、私をカリフォルニア大学Berkeley校のWilliam (Zev) Hassidの研究室で休暇年度を費やすことに駆り立てた。そこでは、植物の糖転移酵素について多くの先駆的な仕事が行われていた。私の興味は、哺乳類の酵素だったので、ラクトース合成機構を調べる様に頼まれ、幸運にもその研究室の専門的な技術に助けられてラクトース合成酵素の発見にかかわれた(44)。この技術を携えて、私はロンドンに戻り、ABHとルイス血液型合成に関与すると推測されている酵素の研究を始めるため、小さな研究グループを作った。最初の研究は、ヒヒとヒトの胃、ヒトの顎下腺からの死体材料で行われた。それらは、血液型抗原が豊富であると知られている組織である。共同研究者であるCaroline Race、Veronica Hearn、Zeenat Gunja Smithとともに我々は、A型、AB型の組織にA-遺伝子に関連した α 1,3-*N*-アセチル

and the *B*-gene-associated α 1,3-galactosyltransferase in the tissues of group B and AB individuals (46). We were reassured to find that the *A* and *B* transferases are expressed in epithelial tissues of both secretors and non-secretors; thus confirming that absence of *A* and *B* activity in secretions is not due to failure of expression of the *A* or *B* genes but to a deficiency of H precursor structures.

In the 1950s there was comparatively little interest in aspects of the subject that would now be called glycobiology or glycoscience but by the late 1960s the field was beginning to gain momentum and we suddenly became aware that our laboratory was not the only one searching for the proposed blood-group gene encoded enzymes. In Bethesda, USA, Victor Ginsburg and colleagues began an investigation which led first to the identification of an α 1,2-fucosyltransferase that was present in human milk from ABH secretors but absent from non-secretors (47); this work thus gave support to the idea that expression of a gene adding on α 1,2-linked fucose to form H structures constitutes the basis of the secretion phenomenon. The same workers identified an α 1,4-fucosyltransferase in the milk of Lewis-positive donors that was absent from the milk of those whose blood-group was Le(a-b-) (48). At the Lister Institute Alan Chester similarly found that α 1,2-fucosyltransferase activity was present only in submaxillary glands and mucosal tissue of ABH secretor individuals and α 1,4-fucosyltransferase activity that was detectable only in the tissues of Lewis-positive individuals (49). Akira Kobata also joined Victor Ginsburg's laboratory at this time and identified the predicted *A*- and *B*-transferases in milk from individuals of the appropriate blood-group phenotypes (50, 51) in the same year as we found them in mucosal tissue at the Lister Institute. Subsequently the *A*, *B* and *H* transferases were found in many tissues and examination of the plasma of Bombay O_h individuals allowed us to demonstrate that, as predicted, α 1,2-fucosyltransferase activity was absent (52) whereas the *A* and *B* transferases were expressed normally and could be used to determine the true ABO phenotype of the donors (53).

In 1975 the Lister Institute closed and I moved with a small group of co-workers to the Medical Research Council's Clinical Research Centre, Harrow, on the outskirts of London. The discovery of the blood-group *A*, *B*, *H* and *Le* gene-associated glycosyltransferases had provided us with new genetic tools, and the aims in our new laboratory were: 1) to investigate how they regulated the expression of the carbohydrate cell surface antigens, 2) to determine the properties of the purified glycosyltransferases and 3) to obtain more information about the underlying causes of rare ABO and Lewis blood-group anomalies and weak subgroups.

Inevitably some of the work that was done after the glycosyltransferases were identified has become redundant now that the *ABO* gene locus has been cloned (54). For example we now have irrefutable proof that Bernstein (2) was correct in his

ガラクトサミン転移酵素を同定し(45)、*B*型、*AB*型の組織に*B*-遺伝子に関連した α 1,3-ガラクトース転移酵素を同定した(46)。我々は、*A*、*B*転移酵素が、分泌型と非分泌型の両方の上皮組織で発現していることを見つけて安心した。それによって分泌物中の*A*、*B*抗原の欠如は*A*、*B*遺伝子の発現がないのではなく、*H*前駆体構造の欠如によることを確認したからである。

1950年代には、今日、糖鎖生物学(glycobiology)、糖質科学(glycoscience)と呼ばれる見方には比較的関心が注がれなかったが、1960年後半になると、この分野が勢いを得始めて、我々の研究室が血液型遺伝子がコードしている酵素を探索している唯一の研究室ではないことに突然気付いた。アメリカのBethesdaでは、Victor Ginsburgらが、ABH分泌者には存在するが、非分泌者には存在しない、ヒト母乳中の α 1,2-フコース転移酵素の初めての同定につながる研究を始めていた(47)。すなわち、この仕事は、 α 1,2-結合でフコースをつけてH構造を形成する遺伝子の発現が分泌現象の基礎を構成するという考えに支持を与えるものだった。同じく彼等は、ルイス陽性のドナーの母乳中に α 1,4-フコース転移酵素を同定し、それはLe(a-b-)の血液型の母乳には存在しなかった(48)。Lister InstituteのAlan Chesterも同様に α 1,2-フコース転移酵素活性がABH分泌者の顎下腺、粘膜組織にのみ存在し、 α 1,4-フコース転移酵素活性がルイス陽性者の組織にのみ検出されることを見つけた(49)。Akira Kobataもまたその時Victor Ginsburgの研究室に参加して、推定されていた*A*、*B*転移酵素をそれぞれの血液型陽性者由来の母乳より同定した(50, 51)。同年、我々もLister Instituteで粘膜組織中にそれらを見つけた。引き続き、*A*、*B*および*H*転移酵素が多くの組織で見つけられ、我々はBombay O_h 型者の血漿中に予想通り α 1,2-フコース転移酵素活性が欠損していることを示すことができた(52)。一方、*A*、*B*転移酵素は正常に発現し、ドナーの真のABO発現型を決定するのに利用できた(53)。

1975年、Lister Instituteは閉鎖され、私は共同研究者と小グループでロンドン郊外のHarrowのMedical Research Council's Clinical Research Centreに移った。*A*、*B*、*H*、*Le*遺伝子関連糖転移酵素の発見は、我々に新たな遺伝学的手法を与えてくれた。我々の研究室の目的は、(1)それらが、細胞表面の糖鎖抗原発現をどのように操作しているか解明すること、(2)精製した糖転移酵素の性状を決定すること、(3)稀なABOとルイス血液型異常、および弱発現の亜集団の生じる根本的な原因についてより多くの情報を得ることだった。

糖転移酵素が同定された後なされた仕事のいくつかは、必然的に冗長になったが、今はもう*ABO*遺伝子座がクローニングされた(54)。例えば、Bernstein(2)の考えた*ABO*遺伝子における3対

predicted three allele model of inheritance of *ABO* but before the locus was cloned there was doubt in some geneticists minds about whether two enzymes with qualitatively different specificities could be the products of allelic genes: hence they suggested that either the glycosyltransferases were not the direct products of the *A* and *B* genes or Bernstein's theory was wrong and *A* and *B* were not alleles. It appeared to us that the structural relationship between D-galactose and N-acetyl-D-galactosamine, differing as they do only by a substituent, OH or NHCOCH_3 , at the O-2 position of the galactose ring, is so close that the amino acid differences in the enzyme proteins necessary to accommodate the alternative donor nucleotide sugars would not necessarily have to be very great (55). In order to find evidence to support this idea we decided to look more closely at the specificities of the two enzymes to discover whether they were really as distinct as they appeared. Pamela Greenwell and Alan Yates found that *in vitro* it was possible with the *B*-transferase to make A determinants using UDP-N-acetyl-galactosamine as the sugar donor and with the *A*-transferase as the enzyme source to make B determinants using UDP-galactose as donor (56). Although the amount of product formed is very small when the 'wrong' nucleotide sugar is used, these experiments demonstrated that the glycosyltransferases do indeed have overlapping specificities. Unexpectedly, the advent of very strong blood-grouping reagents provided further evidence by revealing that certain monoclonal anti-A sera reacted weakly, but specifically, with a subset of group B red blood cells; indicating that even *in vivo* the *B* transferase does synthesise some A sequences (57). Support for the allelic status of the *A* and *B* genes also came from the production of antibodies to partially purified preparations of the *A* transferase which cross-reacted with the *B* transferase indicating homology of the enzyme proteins (58, 59). Had the overlapping specificity of normal *A* and *B* genes been known earlier the rare *cisAB* phenotype, in which individuals appear to have inherited both *A* and *B* genes from one of their parents, would perhaps not have presented such an apparent challenge to the Bernstein model of *ABO* inheritance (60). Now that the *ABO* locus has been cloned the allelic status of *A* and *B* is no longer in doubt and it has been demonstrated by artificial manipulation of *ABO* cDNAs that mutant enzyme forms can be made that transfer both galactose and N-acetylgalactosamine to precursor H structures (61). To my knowledge however *ABO* is still the only identified mammalian locus with alleles encoding glycosyltransferases that use different nucleotide sugars as donor substrates.

In the years from 1976 to 1989 much laboratory time was given to examination of rare *ABO* anomalies and weak subgroups (62, 55) and it became clear that there were probably a large number of mutant alleles at the *ABO* locus expressing modified forms of the *A* and *B* transferases. Many kinetic mutants were found that encoded transferases that differed in $V_{\max}$

立遺伝子モデルが正しいことは、今日反ばくできない証拠があるが、遺伝子座がクローニングされる前は、質的に違う特異性をもつ2種類の酵素が対立遺伝子の産物であるかどうかについて疑問をもつ遺伝学者もいた。ゆえに、糖転移酵素が*A*、*B* 遺伝子の直接の産物ではないか、Bernstein理論は誤りで、*A*と*B*は対立遺伝子ではないと示唆していた。私達には、D-ガラクトースとN-アセチル-D-ガラクトサミンの間の構造上の違いは、ガラクトース環のO-2位における置換基がOHか NHCOCH_3 かという極めて小さなもので、酵素が別のドナー糖ヌクレオチドに適応するためのアミノ酸配列の変更は、必ずしも大きい必要はないと思われた(55)。この考えが正しいことを証明する目的で、2種類の酵素が本当にそんなに違うのかを調べるため、2種類の酵素の特異性をもっと詳しく見てみることにした。Pamela GreenwellとAlan Yatesは、*in vitro*で*B*-転移酵素が糖供与体としてUDP-N-アセチルガラクトサミンで*A*決定基を作ることが可能で、*A*-転移酵素が糖供与体としてUDP-ガラクトースを使って*B*決定基を作ることが可能であることを見つけた(56)。「間違った」糖ヌクレオチドが使われたとき、産生量は非常に少ないが、糖転移酵素に実際に特異性の重複があることが示された。思いがけず、非常に強力な血液型分類試薬の到来が、さらなる証明をしてくれた。すなわち、ある抗Aモノクローナル抗体が弱い、しかし特異的にB型赤血球のあるサブセットに反応し、*in vivo*でさえも*B*転移酵素は、*A*糖鎖配列を合成していることを示したのである(57)。*A*、*B* 遺伝子が対立遺伝子であることは、*A*転移酵素の部分的に精製された試料に対する抗体が、*B*転移酵素と交叉反応し、酵素タンパク質が似ていることから支持された(58, 59)。もし、正常な*A*、*B*遺伝子の重複した特異性をもっと早くわかっていれば、稀な*cisAB*型という、両親の一人から*A*、*B*遺伝子両方を遺伝したかのような表現型は、Bernsteinの*ABO*遺伝モデルの反証として示されなかったであろう(60)。*ABO*遺伝子座がクローニングされて、*A*、*B*遺伝子が対立遺伝子であることがもはや疑う余地がなくなり、*ABO* cDNAを人工的に操作することで、ガラクトースとN-アセチルガラクトサミン両方をH前駆体に転位する変異体酵素を作成できることも示された(61)。しかしながら、私の知る限り*ABO*遺伝子は、依然として、異なる糖ヌクレオチドをドナー基質にする糖転移酵素をコードする対立遺伝子をもつ、明らかになっている唯一の哺乳類遺伝子座である。

1976年から、1989年にかけて稀な*ABO*変異体と弱発現亜集団の試験に多くの時間をさいた(62, 55)。*ABO*遺伝子座には、*A*、*B*転移酵素の変異型を発現するおそらく非常に多くの変異対立遺伝子が存在することが明らかになった。供与体や受容体基質に対する $V_{\max}$ 値や K_m 値に違いのある転移酵素をコードした速

or K_m for donor or acceptor substrate and were reflected in weak expression of the antigens on the red cell surface (55, 63). Attempts to utilise glycosyltransferase activities to unravel the true ABO genotypes of twin and tetragametic chimeras provided interesting challenges (64, 65). Studies on certain AB phenotypes also revealed how apparent gene domination could arise through competition of the enzymic products for a common substrate. AB individuals who had abnormally strong *B* transferases with a high V_{max} were found to express both *A* and *B* enzymes in their plasma at levels appropriate to their subgroup, but the strong *B*-transferase appeared to assume dominance over, and largely suppress, a weaker *A* transferase at the level of expression of the cell surface antigens. The enzyme encoded by an *A'* allele, for example, would have the properties expected of an *A'*-transferase in plasma but on the red cell surface the antigen might appear as an *A*² or an *A*^{weak} (66). Solving anomalies of this kind proved of value in paternity cases where the serological evidence alone appeared to preclude parenthood. This type of competition is similar to that now under investigation as a means of artificially down-regulating the surface expression of the epitope Gal α 1-3Gal on animal tissues destined for transplantation into humans (67). Naturally occurring antibodies (68) in humans would lead to immediate acute rejection of a xenotransplant unless expression of this epitope is modified.

In order to pursue further the pathway from the antigens to the blood-group genes it was obviously necessary to purify the glycosyltransferases with the aim of producing antibodies, or obtaining amino acid sequence information that would allow either an antibody or a nucleotide probe to be made that could be used to screen appropriate cDNA libraries. Over the years we made several attempts to purify the *A* and *B* transferases, as did workers in other laboratories, but the low abundance of the enzyme in the more readily available sources, such as human plasma, made it difficult to obtain the pure enzyme proteins in quantities sufficient to assess purity and obtain amino-acid sequence analysis. Polyclonal antibodies were raised to a partially purified preparation of the *A* transferase (59) but attempts by Pamela Greenwell and colleagues (69) to clone the *A* gene by screening a human jejunum λ gt11 library did not meet with success, probably because of contaminating antibodies in the polyclonal preparation. Whitehead *et al.* (70) had earlier introduced a very useful purification method that depended on the fortuitous affinity of the *A*-transferase for agarose, that we, and others, frequently used to obtain this enzyme free from other glycosyltransferases, but it is doubtful, judging by the specific activities quoted, whether any of the preparations described up until the late 1980s were anywhere near homogeneous. In 1989 Naveenan Navaratnam in our group succeeded in purifying an active *A* -transferase from human gut mucosa to homogeneity in a yield sufficient to determine some of its enzyme properties and to obtain a short peptide sequence (71). At approximately

度論的変異体が見つかり、赤血球表面の弱い抗原発現に反映している(55, 63)。双児や四配偶子キメラの真のABO遺伝型を解明するために糖転移酵素活性を利用する試みは、興味深い挑戦だった(64, 65)。あるAB表現型の研究は、共通基質に対する酵素性の産物の競合により、見かけの遺伝子優位がどのように起きるかを明らかにした。 V_{max} が高値で強力な*B*転移酵素を有するAB型個体が、その血漿にAB型集団として適当量の*A*、*B*酵素両方を発現しているが、細胞表面の抗原発現レベルでは強い*B*転移酵素が優勢で、より弱い*A*転移酵素はほとんど抑制されていた。例えば*A'*対立遺伝子でコードされる酵素は、血漿中では*A'*-転移酵素に期待される特性を示すが、赤血球表面では抗原が*A*²か*A*^{weak}として現れるかもしれない(66)。この種の変異を解明すると、血清学的証拠だけが否定的にみえる父系の親子関係の場合に、有用性が示された。この種の競合は、ヒトへの移植を目的とした動物組織細胞表面に発現するGal α 1,3Galエピトープを人工的に抑制させる手段として今日研究されている方法と同様である(67)。もしエピトープの発現が修飾されなければ、自然にできたヒトの抗体のために(68)、異種移植片はすぐに急性の拒絶反応に至る。

抗原から血液型遺伝子にいたる経路を追跡するために、適当なcDNAライブラリーをスクリーニングするために、抗体が核酸プローブを得なければならず、そのための抗体作成やアミノ酸配列の情報を得るために、糖転移酵素を精製する必要があった。何年間かは、他の研究室で行われたように、我々も*A*、*B*転移酵素を精製しようといろいろ試みた。ヒト血漿などはいつでも使える酵素源だが、含まれている酵素量が足りずアミノ酸配列解析には十分でなかった。*A*転移酵素の部分精製物に対してポリクローナル抗体が作られたが(59)、Pamela Greenwellら(69)は、それを使ってヒト空腸の λ gt11ライブラリーをスクリーニングしたのでは*A*遺伝子をクローニングできなかった。たぶん、ポリクローナル抗体の純度のせいだろう。さらに早い時期に、Whiteheadら(70)は、*A*-転移酵素のアガロースに対する親和性を偶然みつけ、それを酵素精製に導入した。我々も他の人々もこの方法で、この酵素を他の糖転移酵素から分離したが、引用された比活性から判定すると、1980年後半までは、その精製物は多少とも純度に疑問が残った。1989年に、我々のグループのNaveenan Navaratnamが、活性のある*A*転移酵素をヒト腸粘膜から、酵素の性状を決めるためや、短いペプチド配列を得るのに十分な量を純度よく精製することに成功した(71)。ほぼ同じ頃、

the same time Clausen and colleagues isolated in greater yield a homogeneous preparation from human lung (72) which, although enzymically inactive, yielded more amino-acid sequence information; a comparison showed that the short sequence found in the mucosal gut preparation was identical with a sequence occurring in the lung enzyme. Time, however, was running out for our group and on my official 'retirement' in 1989 the Division at the Clinical Research Centre was closed and members of the group were scattered. In 1990, the amino acid sequence of the A-transferase purified from human lung tissue (72) was successfully used by Yamamoto and colleagues, in Sen Hakomori's laboratory, as a basis for cloning and sequencing the ABO gene locus (54). Thus the pathway from the antigens on the red cell to the blood-group genes was completed ninety years after Landsteiner's discovery of the ABO blood-group system.

C. Fucosyltransferases and the Larger Family of Lewis Antigens

Inevitably in the course of investigations on the structure and biosynthesis of the Le^a, Le^b and H antigens we encountered the Type 2 structures with α 1,3-fucosyl-linkages. The trisaccharide structure, now known as Le^x (SSEA1 or CD15), Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc, was first isolated from an Le^a ovarian cyst glycoprotein at the Lister Institute in 1968 (73). The structure was later given the name X when Yang and Hakomori (74) isolated a glycosphingolipid bearing the same terminal unit; the Type 2 difucosyl isomer of Le^b, Fuc α 1-2Gal[Fuc α 1-3]1-4GlcNAc, then became known as Y. Gradually the Type 2 antigens came to be called Le^x and Le^y and to be grouped together with Type 1 Le^a and Le^b antigens as part of the Lewis system. Structures with α 1,3-linked fucose do not occur on the red cell and therefore Le^x, Le^y and sialyl-Le^x are not strictly blood-group antigens and, for reasons discussed below, they are probably not the products of the *Le* (*FUT3*) blood-group gene, or alleles of that gene. However as antigens that, in other tissues, are present as terminal sequences on the same macromolecules and/or cell surfaces as A, B, H, Le^a and Le^b, and as structural isomers of the *Le*-gene products, the fucosylated Type 2 structures have probably now become inextricably linked to the Lewis system of blood-group antigens. Today because of the role of Le^x and, to an even greater extent, its sialylated derivative, sialyl-Le^x, as tumour antigens (75) and as ligands for the Selectin class of adhesion molecules (76) the fucosyltransferase products with fucose α 1,3-linked to *N*-acetylglucosamine are currently the subjects of greater interest than the polymorphic blood-group antigens.

Early work indicated that, although all tissues with α 1,4-fucosyltransferase activity also exhibited α 1,3-fucosyltransferase activity, the converse was not true, indicating that the α 1,3-enzyme activity derives from the expression of a gene(s) independent of the Lewis *Le* gene (47,49). Subsequently Philip Johnson

Clausenらもヒト肺から大量の均一な精製物を分離した(72)。それは、酵素活性はなかったが、アミノ酸配列情報をもっと多く得られ、腸粘膜精製物で得られた短い配列と同じ配列が肺の酵素にもあることがわかった。しかしながら、我々のグループの期間が終了し、1989年の私の公式の「引退」とともにClinical Research Centreの部局は閉鎖され、グループは解散した。1990年、ヒト肺組織から精製したA-転移酵素のアミノ酸配列(72)が、Yamamotoらにより上手に活用されて、Sen Hakomoriの研究室で、ABO遺伝子座のクローニングと配列分析がなされた(54)。このようにして、LandsteinerのABO式血液型の発見後90年を経て、赤血球上の抗原から血液型遺伝子への道筋が完結した。

C. フコース転移酵素とLewis抗原大ファミリー

当然のことながら、Le^a, Le^b, H抗原の構造や生合成についての研究の過程で、 α 1,3-フコシル結合を持つ2型構造を見つけた。Le^x(SSEA1またはCD15)、すなわちGal β 1,4[Fuc α 1,3]GlcNAcとして知られる三糖が、1968年にLister大学において、Le^a型卵巣嚢腫糖タンパク質から最初に単離された(73)。この構造は、後に同じ末端ユニットを持つスフィンゴ糖脂質をYangとHakomoriが単離したときにXと名付けられた(74)。Le^bの2型ジフコシル異性体、Fuc α 1-2Gal[Fuc α 1-3]1-4GlcNAcはその後Yとして知られるようになった。そのため次第に2型抗原は、Le^x, Le^yと呼ばれるようになり、Lewis系の一部として1型Le^a, Le^b抗原の一群にまとめられるようになった。 α 1,3結合フコースを持つ構造は赤血球にはなく、厳密にはLe^x, Le^y, シアリルLe^xは血液型抗原ではない。そしてこれから説明するように、たぶんこれらはLe(*FUT3*)血液型遺伝子やその対立遺伝子の産物ではない。しかしほかの組織では、ABH、Le^a, Le^bなどと同じ高分子や細胞表面上の末端配列として存在する抗原として、またLe遺伝子産物の構造異性体として、フコシル化された2型構造は血液型抗原のLewis系にしっかり含まれているのである。今日では、Le^xの役割、またそれ以上にそのシアル酸誘導体であるシアリル-Le^xの腫瘍抗原(75)、および接着分子セレクトリン群のリガンドとして(76)の役割のため、*N*-アセチルグルコサミンに α 1,3結合したフコースをもつフコース転移酵素生成物が多形血液型抗原よりも興味ある対象となっている。

初期の研究では α 1,4-フコース転移酵素活性をもった組織はどれも α 1,3-フコース転移酵素活性も持っているが、その逆は真ではないとされた。これは α 1,3-酵素活性がLewis Le遺伝子とは独立の遺伝子の発現により生ずることを示す。その後我々のグループのPhilip Johnsonが既知のLewis表現型をもつ個人から

in our group studied the fucosyltransferase activities in saliva from individuals of known Lewis phenotypes and made an observation that was surprising at the time, that is, in addition to the expected transfer of fucose to the O-4 position of *N*-acetylglucosamine in Type 1 chains, saliva from those carrying an *Le* gene also transfer fucose to the O-3 position of glucose in lactose-based oligosaccharides (77). Transfer to the O-3 position of *N*-acetylglucosamine in Type 2 acceptors occurred with all the saliva samples including those from *Le* (a-b-) donors, indicating again the existence an α 1,3-fucosyltransferase encoded by a gene independent of the *Le* gene. At about the same time the capacity of a highly purified fucosyltransferase from human milk to transfer fucose to both Type 1 and Type 2 acceptors led Prieels *et al.* (78) to conclude that the *Le*-gene encodes an α 1,3/1,4-fucosyltransferase that can make both Le^a and Le^x determinants. However, Philip Johnson found that, a large proportion of the enzyme activity responsible for the transfer of L-fucose to Type 2 sequences could be removed from a similarly purified milk preparation on further fractionation on Sephacryl-S-200 (79); the specificity of the resultant α 1,4/1,3-fucosyltransferase suggested that it would have little capacity to synthesise Le^x structures, although it retained the capacity to utilise glucose in lactose-based structures (80). A closely related enzyme purified from human A431 cells exhibited similar properties (81). The failure of these enzymes to utilise Type 2 structures is rather confusing because *FUT3*, believed to be the Lewis blood-group associated gene *Le*, was cloned via cell surface expression of the Type 2 Le^x structure (82). Others, however, found that transfection of recombinant *FUT3* into COS (83) or BHK cells (84) resulted in expression of enzymes that resembled the purified fucosyltransferases (80,81) in that they had little, if any, activity with Type 2 acceptors. While the original observations are puzzling it seems improbable that *FUT3* makes much, if any, contribution to the appearance of Le^a , Le^y or sialyl- Le^x on normal cell surfaces *in vivo*.

In the early 1980s the pathway of biosynthesis of sialyl- Le^x was unclear. It had been demonstrated that Le^x is not a substrate for 3'- and 6'-sialyltransferases (85); at the same time 3'- and 6'-sialyllactosamine structures had been reported not to function as acceptors for the α 1,3/1,4-fucosyltransferase in human milk (78). The reason for the latter result is not clear but Philip Johnson in 1985 found that the α 1,3-fucosyltransferases in both human milk and serum utilised 3'-sialyllactosamine as a substrate and thus had the potential to synthesise sialyl- Le^x sequences; 6'-sialyllactosamine was not a substrate (86). Although these results demonstrated that the pathway of biosynthesis of sialyl- Le^x is first the formation of the sialylated *N*-acetylglucosamine and then the addition of fucose to complete the determinant it soon became apparent that not all sources of α 1,3-fucosyltransferase had the capacity to utilise the sialylated substrate. Purification of α 1,3-fucosyltransferases from neutro-

とった唾液中のフコース転移酵素活性について研究し、当時としては驚くべき発見をした。それは1型鎖の*N*-アセチルグルコサミンのO-4位へのフコースの転移に加え、*Le*遺伝子を持つものの唾液では、ラクトース型オリゴ糖中のグルコースのO-3位へフコースを転移するというものである(77)。2型受容体の*N*-アセチルグルコサミンのO-3位への転移は、*Le*(a-b-)供与者からのものも含めてすべての唾液試料でおこったことから、*Le*遺伝子とは独立な遺伝子によってコードされた α 1,3-フコース転移酵素が存在することがわかる。ほぼ同時に人乳から高度に精製したフコース転移酵素がフコースを1型や2型受容体へ転移する能力から、Prieelsらは*Le*遺伝子は Le^a や Le^x の抗原決定基を作ることのできる α 1,3/1,4-フコース転移酵素をコードしているとの結論を得た(78)。しかしPhilip JohnsonはL-フコースを2型配列へ転移させる酵素活性は、同様に乳から得た精製品をSephacryl S-200でさらに分画するとかなり減ってしまうことを見つけた(79)。残った α 1,4/1,3-フコース転移酵素の特異性から、これは、ラクトース骨格構造中のグルコースを利用する能力は保持しているが、 Le^x 構造を合成する能力はほとんどないこともわかった(80)。ヒトA431細胞から精製した関連酵素も同様の性質を示した(81)。これらの酵素が2型構造を利用することができないかどうかは、確実ではない。というのもLewis血液型と関連した遺伝子*Le*であると信じられてきた*FUT3*が2型 Le^x 構造の細胞表面発現を介してクローニングされた(82)からである。しかし組み替え*FUT3*をCOS(83)やBHK細胞(84)へトランスフェクションすることにより、精製したフコース転移酵素(80、81)と似た酵素が発現し、これらは2型アクセプターに対してはほとんど活性を持たなかった。問題はあがあるが、とにかく*FUT3*が*in vivo*では正常細胞表面上の Le^a 、 Le^y 、シアリル- Le^x の発現に大きく関わっていることはなさそうである。

1980年代初め、シアリル- Le^x の生合成経路についてはよくわかっていなかった。 Le^x は3'-および6'-シアリルトランスフェラーゼ(85)の基質ではないとされてきた。同時に3'-および6'-シアリルラクトサミン構造は人乳中の α 1,3/1,4-フコース転移酵素のアクセプターとして機能しないと報告されていた(78)。後者の結果がなぜ得られたのかははっきりしないが、Philip Johnsonは1985年に人乳および血清の両方の α 1,3-フコース転移酵素が基質として3'-シアリルラクトサミンを用いており、シアリル- Le^x 配列を合成することができること、6'-シアリルラクトサミンは基質ではないことを示した(86)。これらの結果はシアリル- Le^x の生合成経路が最初は、シアリル化*N*-アセチルラクトサミンの生成、次にフコースの付加がおこり、抗原決定基が出来上がるということを示しているが、またすぐに全ての α 1,3-フコース転移酵素がシアリル化した基質を利用できるわけではないことも明らかになった。健康なヒトの好中球および慢性骨髄性白血病患者からの好

phils from a healthy individual and from a patient with chronic myeloid leukaemia yielded preparations that were similar in most of their properties but differed strikingly in their ability to utilise 3'-sialyllactosamine; indeed the enzyme isolated from the leukaemic cells had virtually no activity with this substrate (87). These results suggested the presence of more than one α 1,3-fucosyltransferase in myeloid cells which we now recognise as the products of the cloned *FUT4* (88) and *FUT7* (89) genes. Antibodies raised against the α 1,3/4-fucosyltransferase from human milk neutralised the homologous enzyme and also the α 1,3-fucosyltransferases in serum and liver but failed to react with the transferases detected in either the normal or leukaemic myeloid cells (90). These findings therefore heralded the complexities that were to be revealed when the family of five different α 1,3-fucosyltransferase genes were cloned (91). In pursuit of changes that might be related to leukaemia Pat Skacel and colleagues in our laboratory continued with investigations on myeloid cells and found that the levels of α 1,3-fucosyltransferase activity in leukaemic blasts were much higher than in normal neutrophils (92). However, the finding of high levels of α 1,3-fucosyltransferase activity in normal bone marrow cells suggested that the differences observed between leukaemic and mature cells might be related to the maturation stage at which the leukaemic cells were arrested and not to the leukaemic process. The difficulty of obtaining sufficient cells from normal bone marrow to carry out detailed studies made us decide to pursue this line of investigation using leukaemic cell lines arrested at different maturation stages. High levels of α 1,3-fucosyltransferase and α 2,6-sialyltransferase activity in the promyelocytic cell line HL60 was found to correlate with a decrease in cell surface expression of sialyl-Le^x that was reversed when the HL60 cells were induced to differentiate along the granulocytic pathway (92). The suggestion implicit in these results that a number of changes were taking place in the expression of the fucosyl- and sialyl-transferase genes in the course of normal myeloid cell maturation led me to continue with this line of research when, after my official retirement, I was given hospitality in 1990 in the Haematology department at the Royal Postgraduate Medical School (now part of Imperial College School of Medicine), Hammersmith Hospital, London. Work carried out with Julia Clarke on a series of leukaemic cell lines arrested at different maturation stages from early myeloblasts to promyelocytes, studied in conjunction with differentiated HL60 cells and mature granulocytes, have enabled us to conclude that the depression of sialyl-Le^x expression which occurs at the promyelocyte stage on cells in normal human bone marrow (93) does not arise from a change in expression of *FUT7*, the enzyme in myeloid cells responsible for the synthesis of sialyl-Le^x, but most probably from increased expression of two other glycosyltransferase genes (94, 95 and unpublished observations). We believe that the higher levels of the enzymes encoded by the

中球および α 1,3-フコース転移酵素を精製すると、性質は似ているが3'-シアリルラクトサミンを利用する能力が非常に異なるものが得られた。事実、白血病細胞から単離された酵素は3'-シアリルラクトサミンには活性をもたなかった(87)。この結果から、骨髓細胞中の α 1,3-フコース転移酵素が1種類以上あることを示しており、現在、クローニングされた*FUT4* (88)と*FUT7* (89)遺伝子の生成物であることがわかっている。人乳から得られた α 1,3/4-フコース転移酵素に対する抗体は相同酵素および血清や肝臓中の α 1,3-フコース転移酵素を中和するが、正常または骨髄性白血病細胞のいずれかから検出されるトランスフェラーゼとは反応しない(90)。異なる5種の α 1,3-フコース転移酵素遺伝子がクローニングされて、その時予見された複雑性が明らかになった(91)。白血病に付随した変化の研究において、われわれの研究室のPat Skacelらは、骨髓細胞についての研究を続け、白血病の幼弱化細胞では正常好中球よりも α 1,3-フコース転移酵素活性が高いということを発見した(92)。しかし、正常骨髄でも α 1,3-フコース転移酵素活性が高いことがあることがわかり、白血病と成熟細胞の違いは、白血病細胞が分裂停止し、白血病に至らない成熟化の段階と関係があることが考えられた。正常骨髄から詳細な実験ができるだけの量の細胞を得るのが難しいことから、われわれはこの段階の研究を異なる成熟段階で分裂停止した白血病細胞を用いて行うことにした。前骨髓細胞系HL60では、 α 1,3-フコース転移酵素および α 2,6-シアリルトランスフェラーゼの活性が高い。これはシアリル-Le^xの細胞表面での発現が減少することと相関があり、HL60細胞が顆粒球経路での分化により誘導された時に逆転することがわかった(92)。正常骨髓細胞の成熟の過程でフコース転移酵素遺伝子、シアル酸転移酵素遺伝子の発現変化が数多くおこっているという結論の重大性を考え、私は公的な退職後も、この系の研究を続けることにした。1990年にロンドンのHammersmith病院・王立大学院医学部の血液学科(現在のインペリアルカレッジ医学部)へ迎えられたのである。そこでJulia Clarkeと共に初期骨髓母細胞から前骨髓細胞への異なる成熟段階で分裂停止した一連の白血病細胞系について、分化したHL60細胞や成熟顆粒球とともに研究を行い、正常ヒトの骨髓細胞の前骨髓細胞でおこるシアリル-Le^x発現の抑制(93)が、骨髓細胞においてシアリル-Le^xの合成を行う酵素、*FUT7*の発現の変化により起こるのではなく、おそらく他の二種類の糖転移酵素遺伝子の発現増加によるという結論に達した(94, 95および未発表の観察)。 α 1,3-フコース転移酵素遺伝子*FUT4*によりコードされた酵素、およびシアル酸転移酵素遺伝子*ST6Gal1*により

α 1,3-fucosyltransferase gene, *FUT4*, and the sialyltransferase gene *STG6a11*, leads to use of the Type 2 acceptor substrate at the expense of the α 2,3-sialyltransferase and thereby blocks the formation of the precursor 3'-sialyllactosamine structures necessary for the cell surface expression of sialyl-Le^x. The functional significance of the lowering of sialyl-Le^x expression is not yet known but the dip occurs at a maturation stage just before the myeloid cells cease to proliferate and hence may have significance in relation to adherence or release events within the bone marrow microenvironment that are necessary for the cells to proceed to full maturation.

D. The P Blood Group System

The possibility that other blood-group antigens on the red cell surface might also be carbohydrate led us over the years to make minor excursions into systems other than ABO and Lewis. The human blood-group P system was discovered by Landsteiner and Levine in 1927 as a result of immunising rabbits with human red cells (96). The system was initially defined by one antibody, anti-P, that reacted with red cells of about 80% of all individuals. However, two other antigens, P and P^k, were later added and the original antigen was renamed P₁ (97). A rare null phenotype, p, binds the system together because all three antigens are missing in this phenotype (97). The first real clue to the chemical nature of the P₁ determinant structure came from specific haemagglutination tests with relatively simple mono- and di-saccharides which indicated that D-galactose in α -linkage was the immunodominant sugar in the determinant and that the subterminal sugar was probably also galactose (98, 99). These haemagglutination results related to the nature of P₁ sites on the red cell since the sugars were competing with the red cell antigens for the P₁ antibodies. However, in the light of the seminal information on ABH and Lewis active determinants obtained from materials in secretions carrying the same specificity as the red cell antigens we became interested in a soluble source of P₁ active substance. Cameron and Staveley (100) demonstrated in 1957 that fluids from hydatid cysts in sheep's livers inhibited the agglutination of P₁ red cells by anti-P₁ sera and therefore these fluids appeared to be a good starting material to find out more about the chemical nature of the P₁ determinant. Application of the phenol-extraction procedure (101) to the hydatid cyst yielded a residue that was 100–200 times more active in P₁ tests than the original material; this residue also had P^k but not P activity. Further purification yielded a glycoprotein that contained galactose and N-acetylglucosamine as the major sugar components (102). The enzymic destruction of the P₁ activity of the hydatid cyst material by a crude extract of *T.foetus* was inhibited by galactose (98) and subsequently, the action of a purified linkage-specific α 1,4-D-galactosidase from *T.foetus* was shown to liberate only galactose from the hydatid cyst glycoprotein (103) and to destroy both P₁ and P^k activity. Application of acid

コードされた酵素が高濃度になることによって α 2,3-シアル酸転移酵素を犠牲にして2型受容体基質を利用し、それによりシアリル-Le^xの細胞表面での発現に必要な3'-シアリルラクトサミン構造の前駆体の形成をブロックすると考えられる。シアリル-Le^xの発現が低下することの機能的な重要性は、まだわかっていないが、骨髓細胞が増殖を止める直前の成熟段階で、下降がおり、細胞が完全に成熟するのに必要な骨髓の微視的環境において起こる接着や脱離に重要であるらしい。

D. P式血液型

赤血球表面上の他の血液型抗原も糖である可能性を求めて、ABOやLewis以外の系についても何年か調べてきた。ヒト血液型P系は1927年にLandsteinerとLevineがウサギをヒト赤血球細胞で免疫することにより発見した(96)。この系は最初は1種類の抗体、抗-Pによって定義されていた。これは全てのヒトの約80%の赤血球と反応する。しかし後になってPとP^kの2種類の抗原が付け加えられ、もとの抗原はP₁と名を変えた(97)。稀なヌル表現型、pには3種の抗原が全て無いため、系を結び付けている(97)。P₁決定基構造の化学的性質への最初の鍵は、比較的単純な単糖や二糖を用いる特異的血球凝集試験により得られた。その構造は、 α -結合したD-ガラクトースが決定基において、免疫的に優位な糖であり、また末端の次の糖も多分ガラクトースという構造である(98, 99)。これらの血球凝集の結果は赤血球上のP₁サイトの性質と関係している。これは糖がP₁抗体に対して、赤血球抗原と競合するからである。しかし赤血球抗原と同じ特異性を持つ分泌物中の物質から得られるABHやLewis活性決定基について考えるうちに、われわれは可溶性のP₁活性物質源に興味を持つようになった。CameronとStaveley(100)が1957年に羊肝臓の胞虫嚢腫液が、抗-P₁血清によるP₁赤血球の凝集を阻害することを示した。これによりこの液体がP₁決定基の化学的性質についてさらに調べるのに好都合な材料であると思われた。フェノール抽出法(101)を胞虫嚢腫液に適用したところ、P₁試験においてもその物質よりも100~200倍も活性な残渣が得られた。この残渣もP^k活性を持っているがP活性はない。更に精製することにより、主な糖成分としてガラクトースとN-アセチルグルコサミンをもつ糖タンパク質が得られた(102)。胞虫嚢腫液物質のP₁活性に対する*T.foetus*粗抽出物による酵素分解は、ガラクトースにより阻害された(98)。結局*T.foetus*より精製した結合特異的な α 1,4-D-ガラクトシダーゼの作用は、胞虫嚢腫液糖タンパク質からガラクトースのみを遊離して(103)、P₁およびP^k活性の両方を破壊するということがわかった。酸水解とペーパークロマトグ

hydrolysis and paper chromatographic procedures to the hydatid cyst glycoprotein enabled two small serologically active fragments to be isolated and structurally identified. Both the disaccharide Gal α 1-4Gal and trisaccharide Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc were active inhibitors of P^k agglutination but only the trisaccharide was a strong inhibitor of agglutination of P_i red cells by human, rabbit or goat anti-P_i sera (104, 99). We therefore concluded that the trisaccharide constitutes the P_i-active structure and that the third sugar, N-acetylglucosamine, is an essential part of the determinant. In the same year Naiki and Marcus (105) made the striking observation that P antigenic activity is associated with the well-defined glycosphingolipid globoside, GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc-CER, and moreover that P^k activity is associated with, ceramide trihexoside, Gal α 1-4Gal β 1-4Glc-CER, the immediate synthetic precursor of globoside. Earlier, Marcus (106) had isolated a neutral glycosphingolipid from human erythrocyte membranes with P_i activity and when in 1975 the active component was purified to homogeneity the carbohydrate moiety was shown to consist of a pentasaccharide chain in which the terminal non-reducing trisaccharide identified as the P_i-active determinant was attached to lactosylceramide, Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-CER (107). It is evident that as precursor and product, P^k and P_i are not synthesised by alternative forms of enzymes encoded by alleles at the same locus but the precise genetic relationship between the glycosyltransferases synthesising P^k and P_i is still not entirely clear.

E. The Sid blood Group System

The last blood group antigen investigated at a structural chemical level in our laboratory was the Sd^a antigen in the Sid system. Walter Morgan had joined us at CRC and, with Cecilia Soh and A.S.R. Donald, actively participated in this project. The Sid blood group system was defined in 1967 when two independent groups (108, 109) recognised that a number of human red cell antibodies belonged to a single system, which has only two phenotypes, Sd(a+) and Sd(a-). The strength of Sd(a+) activity on red cells can vary from very weak to relatively strong in different individuals and in different ethnic groups (110). Strongly reacting Sd(a+) red cells react with the plant lectin *Dolichos biflorus* (111) and haemagglutination of Sd(a+) cells by human anti-Sd^a serum is inhibitable by N-acetylgalactosamine (111,112). These two facts were intriguing because hitherto *Dolichos biflorus* lectin had been considered to be specific for blood group A determinants on erythrocytes (113). Since A and Sd^a are quite distinct serological specificities it was apparent that the antigenic determinants must have unique structures despite the apparent similarities. Once again the possibility of a soluble source that could be tapped for Sd^a active material had been signalled by the demonstration of Sd^a activity in human urine (114). Molecular sieve chromatography revealed that the Sd^a

ラフィー法をこの糖タンパク質に対して行くと、二種類の小さな、血清学的に活性な断片が単離され、構造的に同定された。二糖Gal α 1-4Galと三糖Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAcはP^k凝集に対する活性な阻害剤であるが、三糖だけがヒト、ウサギ、ヤギの抗-P_i血清によるP_i赤血球の凝集の強力な阻害剤であった(104, 99)。そこでわれわれは、三糖がP_i活性構造を構成し、三番目の糖、N-アセチルグルコサミンが決定基の主要な部分であると結論づけた。同年、NaikiとMarcus(105)が驚くべき発見をした。P抗原活性は既知のスフィンゴ糖脂質グロボシド、GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc-CERに結合していて、さらにP^k活性は、グロボシドの生合成前駆体、セラミドトリヘキソシド、Gal α 1-4Gal β 1-4Glc-CERと関連しているというものである。以前に、Marcus (106)はヒト赤血球膜からP_i活性を持つ中性スフィンゴ糖脂質を単離した。1975年に活性成分が均一に精製された時に、糖質部分はP_i-活性決定基として同定された非還元末端三糖が、ラクトシルセラミドに結合した五糖鎖、Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-CER (107)からなることがわかった。前駆体と生成物であるP^kとP_iが同じ遺伝子座の対立形質によりコードされたそれぞれの型の酵素により合成されるのではないことは明らかである。しかし、P^kとP_iを合成する糖転移酵素の正確な遺伝的関係もまだ完全には明らかではない。

E. Sid式血液型

われわれの研究室で構造化学的レベルで研究した最後の血液型抗原は、Sid系のSd^a抗原である。Walter Morganが、Cecilia SohとA.S.R. Donaldと共に、CRCのわれわれのグループに加わり、このプロジェクトで活躍した。Sid血液型は、1967年に定義された。ふたつの独立なグループが(198, 109)が、ヒト赤血球抗体が二種類の表現型、Sd(a+)とSd(a-)の2種類しかない一つの系に属するという事を見つけた。赤血球上のSd(a+)活性の強さは個人により、また民族により、非常に弱いから比較的強いまで異なる。強く反応するSd(a+)細胞は植物レクチン*Dolichos biflorus* (111)と反応し、ヒト抗-Sd^a血清によるSd(a+)細胞の血球凝集はN-アセチルガラクトサミンにより阻害される(111, 112)。これら二つの事実は興味のあるものである。というのもこれまで、*Dolichos biflorus*レクチンは赤血球上の血液型A決定基に特異的であると考えられてきたからである(113)。AおよびSd^aは明確に区別される血清特異性であるので、抗原決定基は見かけ上似ていても、各々独自の構造を持っていなければならないことが明らかである。再度Sd^a活性物質の可溶性源の可能性についてヒト尿中のSd^a活性を調べるにより示された(114)。分子ふるいクロマトグラフィーにより、Sd^a活性はTamm-Horsfall(T-H)尿

activity was associated with a macromolecule that was identified (115) as the much studied Tamm-Horsfall (T-H) urinary glycoprotein (116). T-H glycoproteins from different individuals had not previously been shown to have different compositions but analysis of carefully purified preparations from Sd(a+) and Sd(a-) donors revealed that these differed in their content of *N*-acetylgalactosamine; the Sd(a+) samples contained 1-2% of *N*-acetylgalactosamine whereas the Sd(a-) samples had less than 0.2% (117). Precipitation experiments with *Dolichos biflorus* lectin distinguished sharply between the Sd(a+) and Sd(a-) T-H preparations whereas rabbit antibodies directed towards peptide epitopes in the glycoprotein reacted equally with both types (115). Further characterisation of the determinant was achieved by application of both chemical and enzymic degradation techniques. Hydrazinolysis of an Sd(a+) T-H glycoprotein gave a mixture of oligosaccharides that were Sd^a active in haemagglutination tests and acid hydrolysis of these products yielded, among other fragments, a disaccharide with the structure GalNAc β 1-4Gal (118). This compound was inactive in Sd^a tests, but was weakly inhibitory with *Dolichos biflorus* and the method of isolation, together with the yield, suggested that it was the terminal disaccharide of the Sd^a determinant. We were, nevertheless surprised to find that the *N*-acetylgalactosamine was β -linked in view of the known specificity of *Dolichos biflorus* lectin (119) and the fact that until then β -linked *N*-acetylgalactosamine had been described only in glycosphingolipids, although subsequently different terminal β -*N*-acetylgalactosaminyl linkages have been demonstrated in other glycoproteins (120,121). The failure of the disaccharide to inhibit human anti-Sd^a reagents suggested that a larger structure was required for recognition by the human antibody and an enzymic approach was therefore used in order to obtain fragments with all substituents intact. Digestion with endo- β -galactosidase yielded a dialysable fragment that was strongly inhibitory in Sd^a haemagglutination tests. This compound was characterised as a pentasaccharide, GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-3]Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal (122, 123). Removal of sialic acid by mild acid hydrolysis yielded a tetrasaccharide that was inactive in Sd^a inhibition tests; thus demonstrating that both the *N*-acetylgalactosamine and sialic acid residues are essential for binding to the human Sd^a antibody (124). Experiments with a β 1,4-*N*-acetylgalactosaminyl transferase from guinea pig kidney as the enzyme source and 3'-sialyllactosamine as the acceptor enabled the tetrasaccharide GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-3]Gal β 1-4GlcNAc to be synthesised and tested in comparison with the isolated pentasaccharide; the inhibitory activity of the two compounds was the same indicating that the tetrasaccharide sequence constituted the complete determinant (125). The capacity of endo- β -galactosidase to release the pentasaccharide fragment implies the existence in the T-H molecules of polylactosamine structures and we were perhaps fortunate in

糖タンパク質(116)として同定されている(115)高分子と関係があることがわかった。異なる個人からのT-H糖タンパク質は異なる組成は持たないが、Sd(a+)およびSd(a-)の供与者から注意深く精製した調製品を分析すると、これらは、*N*-アセチルガラクトサミンの含量が異なることが明らかとなった。Sd(a+)は1~2%の*N*-アセチルガラクトサミンを含み、Sd(a-)は0.2%以下である(117)。*Dolichos biflorus*レクチンとの沈降実験によりSd(a+)とSd(a-)T-H調製品は明確に区別することができるが、糖タンパク質のペプチドエピトープに対するウサギ抗体は、どちらの型とも同様に反応する(115)。化学的および酵素的分解法の両方の方法を適用することにより、決定基の特徴をさらに明らかにすることができた。Sd(a+)T-H糖タンパク質のヒドラジン分解により、血球凝集試験でSd^a活性のオリゴ糖の混合物が得られ、これらの生成物の酸加水分解により、他のフラグメントとともに、GalNAc β 1-4Gal構造の二糖が得られた(118)。この化合物はSd^a試験では不活性であるが、*Dolichos biflorus*に対する弱い阻害剤である。さらに収量と単離法からこれがSd^a決定基の末端二糖であることが示唆された。にもかかわらず、*Dolichos biflorus*レクチンの特異性(119)を考えると、*N*-アセチルガラクトサミンが β 結合であるという発見は驚くべきものである。それまでは、 β 結合した*N*-アセチルガラクトサミンはスフィンゴ糖脂質のみに見られるものだったからである。結局その後、他の糖タンパク質でも β -*N*-アセチルガラクトサミン結合がある事が示されることとなった(120, 121)。二糖がヒト抗-Sd^a試薬を阻害しないことから、ヒト抗体による認識にはさらに大きな構造が必要であることが分かる。そこでそのままの置換基をすべてもつフラグメントを得るために、酵素法を用いた。エンド- β -ガラクトシダーゼ消化により、透析されるフラグメントが得られ、これはSd^a血球凝集試験で強い阻害をした。この化合物は五糖、GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-3]Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal(122, 123)であることがわかった。弱酸水解によりシアル酸を除くと、Sd^a阻害試験で不活性な四糖が得られた。このことからヒトSd^a抗体への結合には*N*-アセチルガラクトサミンとシアル酸残基の両方が必須であることがわかった(124)。酵素として、モルモット肝臓からの β 1,4-*N*-アセチルガラクトサミン転移酵素を用い、受容体として3'-シアリルラクトサミンを用いると、四糖GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-3]Gal β 1-4GlcNAcが合成され、単離された五糖との比較試験ができた。二種類の化合物の阻害活性は同じであることから、四糖配列には決定基を完全に含んでいることがわかった(125)。エンド- β -ガラクトシダーゼが五糖フラグメントを遊離することから、ポリラクトサミン構造のT-H分子が存在することがわかる。われわれの単離法に対する試料の選択は幸運であった。というのもポリ

the specimen we selected for the isolation procedure because the amount of polylactosamine chains appears to vary in different individuals (126). One T-H glycoprotein subjected to detailed structural study seemed not to have any oligosaccharide chains that would have been susceptible to endo- β -galactosidase although it contained chains terminating with the Sd^a tetrasaccharide directly linked to mannose residues of the internal core structure of the N-linked chains (127). Sd^a antigen does not normally cause transfusion problems but the finding that T-H glycoprotein exists in two forms, Sd(a+) and Sd(a-), suggested (115) that the polymorphism in this system might be a factor to be considered in the selection of kidneys for transplantation. Most donors will be Sd^a-positive whereas the rare Sd^a-negative recipients could have preformed antibodies to the Sd^a determinant. To date, however, no studies have appeared on the role of the Sd^a antigen in the survival of renal allografts.

F. Concluding Remarks

This is a brief account of little over 50 years of blood-group antigen research. In attempting this summary I realise how fortunate I have been to have had the opportunity to follow the progress from the time when practically nothing was known about the chemistry or mechanism of biosynthesis of any of the antigens on the red cell until today when for both carbohydrate and protein antigens the chemical structures and the genes encoding the antigens are now identified or within easy grasp of being identified. The methods in use for the characterisation of oligosaccharides, and the time scale required for characterisation of fragments, have changed out of all recognition since the 1950s and 1960s. The amounts of purified ovarian cyst glycoprotein used as starting materials were seldom less than 10–20 grams and the charcoal columns employed for separating the products of hydrolysis were sometimes run for a year with successive concentrations of aqueous ethanol in order to elute and characterise all the liberated oligosaccharide fragments! Paper chromatography was an invaluable tool for the identification of the isolated oligosaccharides and reagents such as, the now banned, benzidine gave very reliable colour distinctions that enabled different linkages to be ascertained. Charcoal columns and paper chromatography have of course been replaced by HPLC and other automated separation systems for the speedy isolation of the oligosaccharides and the use of mass spectrometry and NMR has greatly reduced the amounts needed for identification of the products. Fortunately, however, the methods used that now seem rather primitive enabled structures to be defined that have withstood the test of time

The failure to ascribe a definite function to the polymorphic carbohydrate blood-group antigens appears for the time being to lessen their importance in relation to other cell surface sequences with defined functions and safe blood transfusion can still be carried out by clinicians who have little or no knowledge

ラクトサミン鎖の量は、ヒトにより異なるからである(126)。詳細な構造研究を行ったT-H糖タンパク質は、N-結合鎖の内部コア構造のマンノース残基に直接結合したSd^a四糖を末端鎖に持っていたが、エンド- β -ガラクトシダーゼに感受性のオリゴ糖鎖を持たないようである(127)。Sd^a抗原は通常は輸血の問題をおこさないが、T-H糖タンパク質には二種類の形Sd(a+)とSd(a-)が存在することがわかったこと(115)から、この系の多形を移植用腎臓の選択の際に考慮しなければならない因子である可能性が考えられる。ほとんどの提供者はSd^a陽性であり、まれに見られるSd^a陰性の患者はSd^a決定基に対する抗体を持つかも知れない。しかし、今日まで、腎臓の同種移植による生存に対するSd^a抗原の役割についての研究はなされていないようである。

F. 結 語

これは50年以上にわたる血液型抗原の研究の簡単な解説である。このまとめを書きながら、赤血球上の抗原の化学も生合成の機構も何もわかっていない時から今日まで、その進歩とともに歩む機会を得たことがいかに幸せなことであるかを実感している。今日では、糖質とタンパク質抗原の両方に対して、化学構造と抗原をコードする遺伝子が同定され、またまさに同定されようとしている。オリゴ糖の特性付けに用いる方法とフラグメントの特性付けに必要な時間スケールは1950年代と1960年代に考えていたものとは大きく変化した。出発物質として用いた精製卵巣囊腫糖タンパク質の量は、10–20グラムを下ることはなく、加水分解生成物の分離に用いた活性炭カラムは、エタノール水溶液連続濃度勾配で、遊離オリゴ糖フラグメントをすべて溶出し、特性付けするために、一年間も稼動することもあった! 単離されたオリゴ糖やの同定のためにペーパークロマトグラフィーは、非常に貴重な道具であり、ベンジジン(現在は禁止されている)のような試薬により異なる結合を確実に区別出来るような色の違いがえられた。活性炭カラムとペーパークロマトグラフィーはもちろんオリゴ糖をより速く単離するためにHPLCや他の自動分離装置にとって替わられた。また質量分析法やNMRにより生成物の同定のために必要な量が非常に少なくてすむようになった。しかし幸運なことに、今となっては原始的と思える方法により時の経過を経ても正しいものと認められる構造を決定することができた。

多型糖質血液型抗原に対する明確な機能については帰属できなかったが、さしあたり、明確な機能を持つ他の細胞表面配列との関係で、血液型抗原も重要であることを示した。抗原の生化学の知識のない臨床医でも安全に輸血ができていのも事実である。にもかかわらず、構造、生合成、遺伝子的な基礎の

of the biochemistry of the antigens. Nevertheless the elucidation of their structure, biosynthesis and genetic basis serves as an example of how well defined carbohydrate structures can be synthesised in the absence of a template when the sequence formed by one glycosyltransferase constitutes the specific substrate for the next enzyme. The ABH and Lewis determinants were the first mammalian carbohydrate antigens to be characterised and to be recognised as only secondary products of the blood-group genes despite the clear cut manner of their inheritance. Moreover, the unravelling of their mechanism of biosynthesis by the sequential addition of sugars has enabled us to understand how immunologically active structures appear and subsequently disappear in the course of normal development and how normally covered epitopes re-appear when there is failure of expression of glycosyltransferases in malignancy. Now that the *ABO* and *Lewis* genes are cloned new vistas have opened up for practical application of DNA methods for accurate blood-grouping and for obtaining a deeper understanding of the regulation and tissue specific expression of the products of the glycosyltransferase genes.

解明が、一種類の糖転移酵素が次の酵素に対する特異的基質を作り出す時、鋳型がなくてもいかにきちんとした糖質の構造が合成されるかという例として用いられる。ABHとLewis決定基が哺乳類の糖抗原としてははじめて特性付けされ、またその遺伝的性質がはっきりしているにも関わらず、血液型遺伝子の二次生成物に過ぎないことがわかったものである。更に糖の逐次付加による生合成機構を解明することにより、われわれは正常な発達の段階で免疫学的に活性な構造がどのようにして現われ、またその後消えてゆくのか、また悪性化により糖転移酵素の発現がないと、通常は隠されていたエピトープがどのようにして再出現するのかについて理解が進んだ。今日では*ABO*および*Lewis*遺伝子がクローニングされるようになり、正確な血液の分類や糖転移酵素遺伝子の産物の組織特異的発現や調節を深く理解するために、DNA法の実用的応用への展望が開けてきた。

創価大学生命科学研究所 中山 文昭 共訳

東京大学スペクトル科学研究センター 小林 明子 共訳

References

1. Landsteiner, K. (1900) *Zbl.Bakt.* **27**, 357–362
2. Bernstein, F. (1924) *Klin.Wochenschr.* **3**, 1495–1497
3. Schiff, F., and Sasaki, H. (1932) *Klin. Woch.* **11**, 1426–1429
4. Landsteiner, K. (1943) *The specificity of serological reactions*, Harvard University Press, Cambridge, Mass.
5. Friedenreich, V., and Hartmann, G. (1938) *Z.Immunitätsforsch.* **92**, 141
6. Morgan, W.T.J. (1960) *Proc.Royal.Soc .B*, **151**, 308–347
7. Morgan, W.T.J., and Watkins, W.M. (1948) *Brit.J.Exp.Path.* **29**, 159–173
8. Hirsfeld, L., and Amzel, R. (1940) *Ann.Inst.Pasteur* **65**, 251–386
9. Witebsky, E., and Klandshoj, N.C. (1941) *J.Exp.Med.* **73**, 655–667
10. Watkins, W.M., and Morgan, W.J.M. (1955) *Vox Sang*, **5** (old series) 1–14
11. Bhende, Y.M., Deshpande, C.K., Bhatia, H.M., Sanger, R., Race, R.R., Morgan, W.T.J., and Watkins, W.M. (1952) *Lancet* **i**, 903–904
12. Mourant, A.E. (1946) *Nature*, **158**, 237
13. Andresen, P.H. (1948) *Acta. Path.Microbiol.Scand.* **25**, 728–731
14. Grubb, R. (1948) *Nature*, **162**, 933.
15. Brendemoen, O.J. (1949) *J. Lab. Clin. Med.* **36**, 335–341
16. Watkins, W.M., and Morgan, W.T.J. (1952) *Nature*, **169**, 825–826
17. Renkonen, K.O. (1948) *Ann.Med.Exp.Fenn.* **26**, 66–72
18. Boyd, W.C., and Reguera, R.M. (1949) *J.Immunol.* **62**, 333–339
19. Morgan, W.T.J., and Watkins, W.M. (1953) *Brit. J.Exp.Path.* **34**, 94–103
20. Sharon, N., and Lis, H. (1989) *Science* **246**, 227–234
21. Kabat, E.A., and Leskowitz, S. (1955) *J.Am.Chem.Soc.* **77**, 5159–5164
22. Watkins, W.M., and Morgan, W.T.J.(1957) *Nature, Lond.* **180**, 1038–1040
23. Watkins, W.M., and Morgan, W.T.J.(1955) *Nature*, **175**, 676–677
24. Iseki, S., and Masaki, S. (1953) *Proc.Acad. Japan* **29**, 460–465
25. Watkins, W.M. (1962) *Immunology* **5**, 245–266
26. Watkins, W.M., and Morgan W.T.J. (1959) *Vox Sang* **4**, 97–119
27. Watkins, W.M. (1959) In *Ciba foundation Symposium on Biochemistry of Human Genetics*, Churchill, London, pp.217–238
28. Caputto, R., Leloir, L.F., Cardini I., and Paladini A.C. (1950) **184**, 333–350
29. Watkins, W.M. (1967) In: *Proc. 3rd Int .Congr. Hum. Genet., Chicago, (1966)* (J.F.Crow and J.V.Neel, eds) Johns Hopkins Press, Baltimore, pp.171–187
30. Oriol, R., Danilov, J., and Hawkins, B.R. (1981) *Am.J.Hum.Genet.* **33**,421–431
31. Kelly, R.J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.G., and Lowe, J.B, (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 4640–4648
32. Côté, R.H., and Morgan, W.T.J. (1956) *Nature* **178**, 1171–1172
33. Cheese, I.A.F.L., and Morgan, W.T.J. (1961) *Nature* **191**, 149–150
34. Rege, V.P, Painter T.J. Watkins, W.M., and Morgan W.T.J. (1963) *Nature* **200**, 532–534
35. Painter, T.J., Watkins, W.M., and Morgan, W.T.J. (1965) *Nature* **206**, 594–597

36. Rege, V.P., Painter T.J., Watkins, W.M., and Morgan W.T.J. (1964) *Nature* **203**, 360–363
37. Rege, V.P., Painter T.J., Watkins, W.M., and Morgan W.T.J. (1964) *Nature* **204**, 740–742
38. Marr, A.M.S., Donald, A.S.R., Watkins, W.M. and Morgan, W.T.J. (1967) *Nature* **215**, 1345–1349
39. Ceppellini, R. (1955) In *Proc. 5th Congr.Int. Soc.Blood Transfus.*, Paris, 1954, pp.207–211
40. Lloyd, K.O., Kabat, E.A., Layug, E.J., and Gruezo, F. (1966) *Biochemistry* **5**, 1489–1501
41. Watkins, W.M. (1995) In *Glycoproteins* (J.Montreuil, J.G.F.Vliegthart and Schachter, H., eds.) Elsevier, Amsterdam, pp.313–390
42. Marcus, D.M., and Cass L.E. (1969) *Science* **164**, 553–555
43. Ichikawa, D., Handa, K., Withers, D.A., and Hakomori, S. (1977) *Cancer Res.* **57**, 3092–3096
44. Watkins W.M., and Hassid W.Z. (1962) *J.Biol.Chem.* **237**, 1432–1440
45. Hearn, V.M., Smith, Z.G., and Watkins, W.M. (1968) *Biochem.J.* **109**, 315–317
46. Race, C., Zideman, D., and Watkins, W.M. (1968) *Biochem.J.* **107**, 733–735
47. Shen, L., Grollman, E.F., and Ginsburg, V. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 224–230
48. Grollman, E.F., Kobata A., and Ginsburg V. (1969) *J.Clin.Invest.* **48**, 1489–1494
49. Chester, M.A., and Watkins, W.M. (1969) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **34**, 835–842
50. Kobata, A., Grollman, E.F., and Ginsburg (1968) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **32**, 272–277
51. Kobata, A., Grollman, E.F., and Ginsburg (1968) *Arch.Biochem.Biophys* **124**, 609–612
52. Schenkel-Brunner, H., Chester, M.A., and Watkins, W.M. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **30**, 269–277
53. Race, C., and Watkins, W.M. (1972) *FEBS Lett.* **27**, 125–130
54. Yamamoto, F., Clausen, H., White, T., Marken, J., and Hakomori, S. (1990) *Nature* **345**, 229–233
55. Watkins, W.M. (1980) *Adv.Hum.Genet.* **10**, 1–136
56. Watkins, W.M., Greenwell P., Yates A.D., and Johnson, P.H. (1988) *Biochemie* **70**, 1597–1611
57. Voak, D., Sonneborn, H., and Yates, A.D. (1992) *Transfus. Med.* **2**, 119–127
58. Yoshida, A., Yamaguchi, Y.F., and Dave, V. (1979) *Blood* **54**, 344–350
59. Cook, G.A., Greenwell, P., and Watkins, W.M. (1982) *Biochem.Soc.Trans.*, **10**, 446–447
60. Yamaguchi, H. (1973) *Jpn. J. Hum.Genet.* **18**, 1–9
61. Yamamoto, F., and Hakomori, S. (1996) *J.Biol.Chem.* **265**, 19257–19262
62. Watkins, W.M. (1978) *Rev.Trans Immunohematol.* **21**, 201–228
63. Greenwell, P. (1983) PhD Thesis, Council for National Academic Awards, U.K.
64. Wrobel, D.M., McDonald, I., Race, C., and Watkins, W.M. (1974) *Vox Sang.* **283**–287
65. Watkins, W.M., Yates, A.D., Greenwell, P., Bird, G.W.G., Gibson, M., Roy, T.C.F., Wingham, J., and Loeb, W. (1981) *J.Immunogenet.* **8**, 113–128
66. Fredrick, J., Hunter, J., Greenwell, P. Winter, K., and Gottshall, J.L. P. (1985) *Transfusion* **25**, 30–33
67. Sandrin, M.S., Fodor, W.L., Mouhtouris, E., Osman, N., Cohney, S., Rollins, S.A., Guilmette, S.A., Setter, E.R., Squinto, S.P., and Mackensie I.F.C. (1995) *Nat.Med.* **1**, 1261–1267
68. Galili, U. (1993) *Immunol. Today* **14**, 480–483
69. Greenwell, P., Edwards, Y.H., Williams, J., and Watkins, W.M. (1987) *Biochem. Soc.Trans.* **15**, 601–603
70. Whitehead, J.S., Bella, A., and Kim, Y.S. (1974) *J.Biol.Chem.* **249**, 3442–3447
71. Navaratnam, N., Findlay, J.B.C., Keen, J.N., and Watkins W.M. (1990) *Biochem. J.* **271**, 93–98
72. Clausen, H., White, T., Takio, K., Titani, K., Stroud, M., Holmes, E., Karkov, J., Thim, L., and Hakomori, S. (1990) *J.Biol. Chem.* **265**, 1139–1145
73. Marr, A.M.S., Donald, A.S.R., and Morgan, W.T.J. (1968) *Biochem.J.* **110**, 789–791
74. Yang, H., and Hakomori, S. (1971) *J.Biol.Chem.* **246**, 1192–1200
75. Hakomori, S., and Kannagi, R. (1983) *J.Natl. Cancer Inst.* **71**, 231–252
76. Paulson, J. (1992) In *Adhesion :Its role in inflammatory disease* (Harlan, J., and Liu, D., eds) W.H. Freeman, New York, pp.19–42
77. Johnson, P.H., Yates, A.D., and Watkins, W.M. (1981) *Biochem.Biophys. Res.Comm.* **100**, 1611–1618
78. Prieels, J-P., Monnom, D., Dolmans, M., Beyer, T.A., and Hill, R.L. (1981) *J.Biol.Chem.* **256**, 10456–10463
79. Johnson, P.H., and Watkins, W.M. (1982) *Biochem. Soc. Trans* **10**, 1119–1120
80. Johnson, P.H., Donald, A.S.R., Feeney, J., and Watkins W.M. (1992) *Glycoconjugate J.* **9**, 251–264
81. Johnson, P.H., Donald, A.S.R., and Watkins, W.M. (1993) *Glycoconjugate J.* **10**, 152–164
82. Kukowska-Latallo, J.F., Larsen, R.D., Nair, R.P., and Lowe, J.B. (1990) *Genes Dev.* **4**, 1288–1303
83. de Vries, T., Palcic, M.P., Sdchoenmaker, P., van den Eijnden, D.H., and Joziassse, D.H (1997) *Glycobiology* **7**, 921–927
84. Costa, J., Grabenhorst, E., Nimtz, M., and Conradt, H.S. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 11613–11621
85. Beyer, T., Rearick, J. I., Paulsen, J.C., Prieels, J-P., Evan-Sadler, and Hill, R.L. (1979) *J.Biol.Chem.* **254**, 12531–12541
86. Johnson, P.H., and Watkins, W.M. (1985) *Biochem.Soc.Trans.* **13**, 1119–1120
87. Johnson, P.H., and Watkins, W.M. (1987) *Biochem.Soc.Trans.* **15**, 396
88. Goelz, S.E., Hession, C., Goff, D., Griffiths, B., Tizard R., Newman B, Chi-Rosso G., and Lobb, R. (1990) *Cell* **63**, 1349–1356.
89. Natsuka, S., Gersten, K.M., Zenita, K., Kannagi, R., and Lowe, J.B. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 1679–1674
90. Watkins, W.M., Skacel, P.O., and Johnson, P.H. (1993) In: *Carbohydrate Antigens*, ACS, Symposium series 519, (Garegg, P., and Lindberg, A.A. eds) pp.34–65
91. Weston, B.W., Nair, R.P., Larsen, R.D., and Lowe, J.B. (1992) *J.Biol.Chem.* **267**, 4152–4160
92. Skacel, P.O., Edwards, A.J., Harrison, C.T., and Watkins, W.M. (1991) *Blood* **78**, 1452–1460
93. Lund-Johansen, F., and Terstappen, L.W.M.M. (1993) *J.Leuk.Biol.* **54**, 47–55
94. Clarke, J.L., and Watkins, W.M. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 10317–10328
95. Clarke, J.L., and Watkins, W.M. (1997) *Glycobiology* **7**, 835–846
96. Landsteiner, K., and Levine, P. (1927) *Proc.Soc.Exp.Biol. N.Y.* **24**, 941–942
97. Bailly, P., and Bouhours, J-F. (1995) In: *Blood Cell Biochemistry* (Cartron, J-P and Rouger, P. eds) Vol.6, pp 300–329

98. Watkins, W.M., and Morgan, W.T.J. (1964) Proc. 9th Congr.Int.Soc.Blood Transfus. Mexico, 1962, pp. 230–234
99. Watkins, W.M., and Morgan, W.T.J. (1976) J.Immunogenetics **3**, 15–27
100. Cameron, G.L., and Staveley, J.M. (1957) Nature, **179**, 147–148
101. Morgan, W.T.J (1965) Methods in Carb.Chem. **5**, 95–98
102. Morgan, W.T.J., and Watkins, W.M. (1964) Proc.9th Congr.Int.Soc.Blood Transfus., Mexico, 1962, pp. 225–229
103. Yates, A.D., Morgan, W.T.J., and Watkins, W.M. (1975) FEBS Lett. **60**, 1289–1295
104. Cory, H.T., Yates, A.D., Donald, A.S.R., Watkins, W.M., and Morgan, W.T.J. (1974) Biochem.Biophys. Res.Comm. **61**, 1289–1295
105. Naiki, M., and Marcus, D.M. (1974) Biochem.Biophys. Res.Comm. **60**, 1105–1111
106. Marcus, D.M. (1971) Transplantation **11**, 16–18
107. Naiki, M., and Marcus, D.M. (1975) Biochemistry **14**, 4837–4841
108. McVie, S.I., Morton, J.A., and Pickles, M.M. (1967) Vox Sang. **13**, 485–492
109. Renton, P.H., Howell, P., Ikin, E., Giles, C.M., and Goldsmith K.L.G. (1967) Vox Sang. **13**, 493–501
110. Race, R.R., and Sanger, R. (1975) Blood Groups in Man, 6th edition, Blackwell, Oxford, pp.395–405
111. Sanger, R, Gavin, J., Teesdale, P., and Eldon, K. (1971) Lancet **i**, 1130
112. Bird, G.W.G., and Wingham, J. (1971) Vox Sang. **20**, 55–61
113. Bird, G.W.G. (1952) Nature, **170**, 674
114. Morton, J.A., Pickles, M.M., and Terry, A.M. (1970) Vox Sang. **19**, 151–161
115. Morgan, W.T.J., Soh, C.P.C., Donald, A.S.R., and Watkins, W.M. (1981) Blood Transfus. Immunohaematol. **24**, 37–51
116. Tamm, I., and Horsfall, F.L. (1950) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **74**, 108–114
117. Soh, C.P.C., Morgan, W.T.J., Watkins, W.M., and Donald, A.S.R. (1980) Biochem.Biophys. Res.Comm. **93**, 1132–1139
118. Donald, A.S.R., Soh, C.P.C., Watkins, W.M., and Morgan, W.T.J. (1982) Biochem.Biophys. Res.Comm. **104**, 58–65
119. Etzler, M.E., and Kabat, E.A. (1970) Biochemistry, **9**, 869–877
120. van den Eijnden, D.H., Van der Nieuwenhof, I.M., Neeleman A.P., Bakker H., and Van Die, I. (1997) Glycoconjugate J. **14**, (Supplement S29
121. Bielinska, M., and Boime, I. (1995) In Glycoproteins (Montreuil, J., Vliegthart, J.G.F., and Schachter, H., eds) Elsevier, Amsterdam, pp. 565–587
122. Donald, A.S.R., Yates, A.D., Soh, C.P.C., Morgan, W.T.J., and Watkins, W.M. (1983) Biochem.Biophys.Res.Comm. **115**, 625–631
123. Donald, A.S.R., and Feeney, J. (1986) Biochem.J. **236**, 821–828
124. Donald, A.S.R., Soh, C.P., Yates, A.D., Feeney, J., Morgan, W.T.J., and Watkins, W.M. (1987) Biochem. Soc.Trans. **15**, 606–608
125. Donald, A.S.R., and Feeney, J., Morgan, W.T.J., and Watkins, W.M. (1989) Glycoconjugate J. **6**, 319–332
126. van Rooijen, J.J.M., Kamerling, J.P., and Vliegthart, J.F.G. (1968) Glycobiology, **8**, 1053–1064
127. Hard, K., Zadelhoff, G., Moonen, P., Kammerling, J.P., and Vliegthart, J.F.G. (1992) Eur.J.Biochem. **209**, 895–915

Received on August 27,1999, accepted on November 4,1999

Profile of the Author

Winifred Watkins is an Honorary Senior research Fellow in the Haematology department at Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, London, U.K. She first joined Walter Morgan's group in the Biochemistry

Department at the Lister institute of Preventive Medicine in 1942 where she began work on blood group antigens and studied part-time for a BSc degree in Chemistry, which she obtained in 1947. Her PhD degree studies were carried out in the Biochemistry Department of St Bartholomew's Hospital Medical School, London, under the supervision of Professor A.Wormall FRS and on completion of her degree she returned to the Lister Institute where she resumed work on the immunochemistry and genetics of blood group antigens. In 1960–61 she spent a sabbatical year at the University of California, Berkeley working in the laboratory of Professor W.Z.Hassid

on the newly discovered glycosyltransferase enzymes. She obtained a London University D.Sc. degree in 1963 and became Professor and Head of the Biochemistry Department at the Lister institute on the retirement of Professor Walter.T.J.Morgan FRS in 1968. The Lister Institute closed in 1975 and she then moved to the Medical Research Council's Clinical Research Centre, Harrow, U.K. to head a new Division of Immunochemical Genetics where work was continued on the biosynthetic enzymes that are the primary products of the genes responsible for the carbohydrate blood-group antigens. She 'retired' from the MRC in 1989 and was given an honorary appointment in the Haematology Department of Hammersmith Hospital, where she continues to work on glycosyltransferase gene expression in developing myeloid cells. Her contributions to immunochemistry and glycoscience have been recognized by a number of medals and awards, Fellowship of the Royal Society, London, foreign membership of the Polish and Royal Swedish Academies of Sciences, honorary fellowship of the Royal College of Physicians, London, an honorary D.Sc. from the University of Utrecht and honorary membership of the International Blood Transfusion Society and the Japanese Biochemical Society.