MINIREVIEW (TIGG-09/02/90-MR-3)

Association of Ganglioside with the TSH Receptor

Wojciech KIELCZYNSKI, Peter J. LEEDMAN and Leonard C. HARRISON

Burnet Clinical Research Unit,
The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research,
PO Royal Melbourne Hospital, Victoria 3050, Australia
FAX: 61-3-347-0852

Thyroid stimulating hormone (thyrotropin, TSH), a pituitary glycoprotein hormone, binds to receptors on thyroid follicular cell membranes. The TSH receptor (TSH-R) mediates the effect of TSH to stimulate thyroid hormone synthesis and release and thyroid growth (1), and is the target of polyclonal autoantibodies that mimic or inhibit these bioeffects of TSH in Graves' disease (2-4).

It was suggested, 15 years ago, that the TSH-R is a protein-glycolipid complex (5). The protein component was cloned recently from dog (6) and human (7,8) cDNA libraries and found to belong to the GTP binding protein family of receptors. It has a molecular weight of ~85 kD (unglycosylated) and contains a 400 amino acid extracellular domain with 5 possible glycosylation sites, followed by ~350 amino acids including seven transmembrane domains and an 80 amino acid intracellular domain.

The first indication that gangliosides (sialic acid-containing glycolipids) may be involved in the binding of TSH to its receptor came from studies by Mullin *et al.* (5) in 1975. They showed that gangliosides purified from bovine brain could inhibit the binding of TSH to solubilized bovine thyroid plasma membranes. The best inhibitor was GD1b, followed by GM2, GM3 and GM1. Inhibition was considered to result from interaction of ganglio-

side with TSH itself rather than with TSH-R (5), based on gel chromatography experiments, fluorescence changes of the TSH molecule and ganglioside pre-incubation studies with TSH and receptor proteins. At that time, binding studies were performed in high salt

Fig. Model of the TSH receptor showing possible ganglioside binding sites.

ガングリオシドがしっかりと付いている TSH レセプター

W. KIELCZYNSKI, P. J. LEEDMAN, L. C. HARRISON

甲状腺刺激ホルモン（サイトロロビン、TSH）は脳下垂体から分泌される糖タンパク質ホルモンで、甲状腺の小嚢細胞膜上のレセプターに結合する。TSHレセプター（以下TSH-Rと略記）はTSHの作用を伝えて甲状腺ホルモンの合成と分泌および甲状腺の成長を促進するが(1)、一方Graves病ではTSHの生物効果を模倣したり阻害したりするポリクローンの自己抗体の標的でもある(2-4)。

TSH-Rはタンパク質-糖脂質複合体であることが、15年前に報告された(5)。タンパク質部分は最近になってイヌ(6)およびヒト(7, 8)のcDNAライブラリーからクローニングされ、GTP結合タンパク質レセプターファミリーに属することが判った。分子量は糖鎖なしで約85kDであり、糖鎖の付き得る5ヶ所の部位を含む400アミノ酸から成る細胞外ドメイン、7ヶ所の膜貫通ドメインを含む350ヶ所のアミノ酸および80アミノ酸から成る細胞内ドメインから出来ている。

TSHがTSH-Rに結合する時にガングリオシド（シアル酸を含む糖脂質）が関与しているのではないかということは、1975年に Mullin らの研究により示された(5)。彼等は、ウシの脳から精製したガングリオシドを加えると、可溶化したウシ甲状腺形質膜へのTSHの結合が

阻害されることを示した。最も強く阻害するのは GD1b であり、以下 GM2, GM3, GM1 の順であった。ゲルクロマトグラフィー実験、TSH分子の蛍光変化、ガングリオシドをTSHとレセプタータンパク質と前処理する実験に基づいて、ガングリオシドによる阻害はガングリオシドがTSH-Rではなく、TSH自身と反応する為であると考えられた(5)。当時は、pH 6.0 で高塩濃度の緩衝液中で結合実験が行なわれたが、これは後に批判の対象となった。同じ研究者達から GD1b よりもTSH結合を強力に阻害するウシ甲状腺由来の新しいガングリオシドについての報告がなされた(9)。このガングリオシドはウシ甲状腺ガングリオシドの0.015% 含まれ、TLCプレート上では GM3 と同じ移動度を示し、DEAE クロマトグラフィーによるとシアル酸を2モル含んでいると判定された。Vibrio cholerae シアリダーゼに感受性がある GD1b ガングリオシドと矛盾しないが、これ以上の同定はされなかった。

TSH-Rにガングリオシドが存在することを支持する別の報告がある。Gardas ら(10, 11)は、アルカリ分解のあとでもジシアロガングリオシドが、弱まったとは言え、TSHの結合を阻害することを見出した。TSHがガングリオシドを含むリボソームに結合することや、TSHがガン

buffers at pH 6.0, conditions which later became the subject of criticism. Further report from the same investigators (9) described a novel bovine thyroid ganglioside which was a much more potent inhibitor of TSH binding than GD1b. This ganglioside constituted 0.015% of bovine thyroid gangliosides, migrated with GM3 on TLC plates and had two sialic acid molecules as detected by DEAE chromatography. It was sensitive to *Vibrio cholerae* sialidase treatment, consistent with GD1b ganglioside, but was never characterized further.

There are other reports consistent with the presence of ganglioside in the TSH-R. Thus, Gardas *et al.* (10,11) found that even after alkaline degradation disialylated gangliosides can still inhibit the binding of TSH, although to a lesser extent. It has been shown also that TSH binds to liposomes containing gangliosides and that TSH alters the membrane conductance of lipid bilayers containing gangliosides (12,13).

Kohn (14) has proposed a model of the TSH-R incorporating both protein and ganglioside components. According to this model, the β subunit of TSH binds to the receptor protein causing a conformational change in hormone; the α subunit then penetrates the membrane and interacts with the ganglioside which mediates activation of adenylate cyclase. The model was based on the action of *Vibrio cholerae* toxin, whose B subunit binds to the ganglioside GM1 and A subunit penetrates the membrane (15-17). It was not supported by others who found no inhibition of TSH binding by gangliosides (18-21) and either no effect (22,23) or an increase (18,24) of TSH binding after neuraminidase treatment of the receptor, leading to their categorical conclusion that gangliosides had no role in the binding

to TSH to intact thyroid cells under physiological conditions (24).

The first monoclonal antibodies (MCab) to the TSH-R described in 1981 by Yavin *et al.* (25) failed to stimulate adenylate cyclase and were not directed towards ganglioside molecules. Later, the same group (26) generated MCab which reacted with thyroid gangliosides and inhibited TSH binding. However, the glycoprotein component of the TSH-R also appeared to react with these MCab. It was concluded therefore that reactivity of the anti-ganglioside MCab with receptor protein was due to the intimate association of TSH-R ganglioside and protein.

The first systematic analysis of bovine thyroid gangliosides was reported in 1982 by Iwamori *et al.* (27). There was a complex pattern of gangliosides containing N-acetylneuraminic acid (NeuAc) or N-glycolylneuraminic (NeuGc) acid, or both, in the case of polysialylated gangliosides. In order of abundance GM3 > GD1a > GM1 > FucGM1 > GD3; GD1b was not detected. Subsequently, a detailed analysis of human thyroid gangliosides by Svennerholm (28) revealed that GM3 >> GD3 > DG1a > 3'LM1 > GD1b > GT1b > GQ1b > GM1 = 6'LM1 = GD2 > 3'LD1 > FucGM1, NeuAc was the only sialic acid present in human thyroid. He also reported the presence of N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid in monosialogangliosides (10% of total sialic acid) and traces of other O-acetylated sialic acids in GD1b, GT1b and GQ1b. Systematic analyses of rat thyroid gangliosides have not been reported, but gangliosides from a normal rat thyroid cell line (FRTL-5) (29) showed a much simpler pattern in TLC (W. Kielczynski *et al.* - unpublished). GM2 was the most prominent and migrated as a doublet, followed by GM3 (doublet) and GD1a. A rat thyroid tumor cell line insensitive to TSH was

グリオシドを含む脂質二重層の膜透電率を変化させることも知られている(12, 13)。

Kohn はタンパク質とガングリオシドを両者とも含むTSH-Rのモデルを提出している(14)。このモデルによると、TSHの β サブユニットはレセプタータンパク質に結合してホルモン分子内にコンフォメーション変化を惹き起し、その結果 α -サブユニットは膜に貫入してガングリオシドと反応し、それがアデニルシクラーゼを活性化するという。このモデルは、*Vibrio cholerae* トキシンのBサブユニットがガングリオシド GM1 に結合してAサブユニットが膜を通過するというコレラ毒素の作用機作(15-17)に基づいていた。しかし、TSHの結合がガングリオシドにより阻害されない(18-21)とか、レセプターをノイラミニダーゼ処理することでTSHの結合が影響を受けない(22, 23)とか増加する(18, 24)という他の研究者による研究により否定され、生理的条件下ではTSHの結合にガングリオシドは全く関与していないという明確な結論が導き出されたのである(24)。

1981年 Yavin らにより記載された最初のTSH-Rに対するモノクローン抗体(MCAb)はアデニルシクラーゼを活性化することはできず、ガングリオシド分子には反応しなかった(25)。後年、同じ研究グループは甲状腺ガングリオシドと反応する MCAb を作製したが、これはTSH結合を阻害した(26)。しかし、TSH-Rの糖タンパク質成分もこの MCAb と反応するみたいだった。それで、この抗ガングリオシド MCAb とレセプタータンパク質との反応性は

TSH-Rガングリオシドとタンパク質が密接に関わっているからであると考えられた。

ウシ甲状腺ガングリオシドの最初の組織的な分析は1982年に岩森らにより行なわれた(27)。ポリシアリルガングリオシドの場合、N-アセチルノイラミン酸(NeuAc)かN-グリコリルノイラミン酸(NeuGc)のどちらかか、或いは両方を含んでいるという複雑なガングリオシドのパターンであった。多い順に書くと、GM3 > GD1a > GM1 > FucGM1 > GD3 で、GD1bは検出されなかった。引き続いて、Svennerholm による詳しいヒト甲状腺ガングリオシドの分析が出され、それによると、GM3 >> GD3 > GD1a > 3'LM1 > GD1b > GT1b > GQ1b > GM1 = 6'LM1 = GD2 > 3'LD1 > FucGM1 であった。ヒト甲状腺のシアル酸はNeuAcのみであった。彼はモノシアログガングリオシド(全シアル酸の10%)中にはN-アセチル-9-O-アセチルノイラミン酸の存在すること、GD1b, GT1b, GQ1b 中には他のO-アセチル化シアル酸が微量に含まれていることも報告した。ネズミ甲状腺ガングリオシドの体系的分析はまだなされていないが、正常ネズミ甲状腺細胞株(FRTL-5)(29)のガングリオシドはTLCプレート上ではもう少し単純なパターンである(W. Kielczynski ら、未発表)。GM2 が最も多く、TLC上ではダブルットであり、次に多いのが GM3 (ダブルット)と GD1a であった。TSHに反応しないネズミの甲状腺腫瘍細胞株には GM3 があるだけで、他のすべてのガングリオシドが欠けていた(30)。しかし、TSHに反応するネズミの甲状腺腫瘍細胞株から抽出した

devoid of gangliosides except GM3 (30). However, when incubated in gangliosides extracted from rat thyroid tumor cells which were sensitive to TSH, the cells exhibited TSH binding and stimulation of adenylate cyclase (31).

The most widely used methods for detecting gangliosides are resorcinol or thiobarbituric acid (32,33), which can detect micrograms of glycolipids. Introduction of the overlay technique on TLC plates by Magnani (34) facilitated detection of nanograms of gangliosides of defined structure, by monoclonal antibodies (35), cells (36) or cholera toxin (37). To further improve the sensitivity of detection of all gangliosides we employed the ^{125}I -labelled, sialic acid-specific lectin, *Limax flavus* agglutinin (LFA), as a probe to screen crude glycolipid extracts for sialic acid containing components (38). LFA has a molecular weight of 44,000 and consists of two equal-sized subunits, does not display an absolute requirement for Ca^{2+} and is easily labelled and stable for 3 weeks after iodination at a specific activity of less than 35 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. LFA probing was used for the preliminary characterization of gangliosides associated with the purified human TSH-R. TSH-R was obtained from human thyroids by solubi-

lization in Triton X-100 and sequential affinity chromatography on wheat germ agglutinin (*Triticum vulgaris*) and TSH columns (39,40). A 50 kD protein was eluted in 3M NaCl, which bound TSH as well as immunoglobulins from patients with autoimmune thyroid disease. Glycolipids were extracted by Folch partition from purified receptor eluted from TSH affinity column (41) and were sensitive to ceramide glycanase digestion. This enzyme cleaves bonds between the ceramide moiety and glucose (42,43).

The ganglioside co-purified with human TSH-R migrated between GM1 and GD3 on TLC. It was not sensitive to *Vibrio cholerae* sialidase but was sensitive to *Arthrobacter ureafaciens* sialidase (W. Kielczynski *et al.* - submitted) which implies that it belongs to the GM1 family of gangliosides. This family, taking into consideration the carbohydrate moiety only, includes GM1, GM1b, FucGM1, LM1(lacto-series ganglioside), O-acetylated gangliosides(4,7,8,9-O-acetylated - from each of the above groups) as well as O-methylated and sulphated gangliosides. Additionally, sialic acid can be linked via 2 $\rightarrow$ 3 or 2 $\rightarrow$ 6 bonds to galactose and possibly to galactosamine (44). Because the exact

ガングリオシドを加えてインキュベートすると、この細胞はTSH結合を示しアデニルシクラーゼの活性化が起こった(31)。

ガングリオシドの検出に最も広く用いられている方法はレゾルシノール法とチオバルビットール酸法(32, 33)であり、この方法でマイクログラムの糖脂質が検出できる。Magnani ら(34)によるモノクローン抗体(35)、細胞(36)やコレラ毒素(37)を用いるTLCプレートの重層法により、特定の構造を持つガングリオシドはナノグラムレベルでの検出が容易になった。私達はすべてのガングリオシドの検出感度を更に上げるために、 ^{125}I -標識のシアル酸特異的レクチン、Limax flavus アグルチニン

(LFA) をシアル酸を含むガングリオシド粗抽出液のスクリーニングのプロープとして用いることにした(38)。LFA の分子量は44,000で等しい大きさの2つのサブユニットから成り、 Ca^{2+} を絶対的に要求することはない、ヨードで $35\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の比放射能まで標識することが容易であり、これは3週間は安定に用いることができる。精製したヒトTSH-Rに含まれるガングリオシドの第一次同定のために LFA プロープ法を用いてみた。TSH-Rはヒト甲状腺からトリトン X-100 の可溶化と、小麦胚アグルチニン (Triticum vulgare の WGA) およびTSHのアフィニティカラムクロマトグラフィーで得られたものである(39, 40)。50kD のタンパク質が 3M NaCl で溶出されたが、これはTSHならびに自己免疫疾患甲状腺病の患者の免疫グロブリンに結合した。TSHアフィニティカラムで精製したレセプター(41)から Folch 分

配により糖脂質を抽出したが、これらはセラミドグリカナーゼ(42)、エンドグリコセラミダーゼ(43)で分解できた。これらの酵素は糖脂質のオリゴ糖とセラミドの間のグリコシド結合を開裂する。

ヒトTSH-Rと一緒に精製されたガングリオシドはTLC上で GM1 と GD3 の間に移動した。このガングリオシドは Vibrio cholerae シアリダーゼには感受性がなく Arthrobacter ureafaciens シアリダーゼで分解されたが、これはこのガングリオシドが GM1 系列に属することを意味している(W. Kielczynski ら、投稿中)。糖部分だけを考慮に入れているわけであるが、この系列には GM1, GM1b, Fuc GM1, LM1 (ラクト系列ガングリオシド)、0-アセチル化ガングリオシド(上記の各ガングリオシドのそれぞれ 4, 7, 8, 9-0-アセチル体)、これらの 0-メチル化体、硫酸化体が含まれる。更に、シアル酸は 2-3 又は 2-6 でガラクトースに、そしてガラクトサミンに結合していることもある(44)。このTSH-Rの正確なガングリオシドの構造は不明なので、糖鎖構造のみ推測するしかない。フコースの付いた GM1 がウシ(27)とヒト(10, 32)の甲状腺から 0-アセチルガングリオシド(32)のような微量ガングリオシドとして見出されているのは興味深い。ヒトのTSH-Rガングリオシドはポリシアルガングリオシドのラクトンである可能性もあるが、これは LFA で検出できる(W. Kielczynski, 未発表)。ガングリオシドの未精製品は、徹底的に純化したガングリオシド標品よりもラクトンを含むことが多い。ウシ GD1b はTSH結

structure of this TSH-R ganglioside is not known we can only speculate about its carbohydrate composition. It is of interest that fucosylated GM1 was described in bovine (27) and human (10,32) thyroids as a minor ganglioside, as were O-acetylated gangliosides (32). The human TSH-R ganglioside could also be a lactone of a polysialylated ganglioside, which can be detected by LFA (W. Kielczynski - unpublished). Crude ganglioside preparations are more likely to contain labile lactones than those obtained after extensive purification. GD1b was originally found to be the strongest bovine ganglioside inhibitor of TSH binding (5), and GD1b lactone migrates below GM1 (45). Ganglioside lactones have been shown to occur naturally in the nervous system of rodents (46) and in human brain (45). GD1b lactone would also be Vibrio cholerae sialidase resistant due to its blocked carboxyl group vicinal to the α -ketosidic linkage, but in contrast to our finding with the purified TSH-R ganglioside, it should be resistant to Arthrobacter ureafaciens sialidase (45).

The fact that gangliosides can be strongly bound to protein by covalent (47) or non-covalent (48,49) interactions is well documented, but the exact sites of interaction are unknown. We have analyzed the recently published sequence of the dog TSH-R to deduce a possible site for its interaction with ganglioside. In the extracellular domain, close to the first transmembrane domain, there is a 52 amino acid sequence specific for the TSH-R not present in other glycoprotein hormone receptors (6). In this sequence there is an 11 amino acid stretch with 80% homology to the sequence of Arachis hypogaea (peanut) lectin. This lectin only binds GM1 (49). On the other hand, similar sequences are found in

calcium binding proteins and calcium binding and carbohydrate binding are usually to different sites in proteins (49). We therefore searched for another sequence which might interact with ganglioside, based on a knowledge of cholera toxin binding to gangliosides. Cholera toxin binding to ganglioside induces a "shift" in the fluorescence emission spectrum of the protein (5) and because chemical modification of tryptophan residues abolishes cholera toxin binding to ganglioside (50) it has been suggested that tryptophan is crucial in the interaction. There are only two tryptophan residues in the extracellular sequence of the TSH-R. One, position 238, is not present in other glycoprotein hormone receptors (6); the other is highly conserved and is placed on a loop between the second and the third transmembrane domains only 5 amino acids from cell membrane. This 21 amino acid loop is also rich in residues which have been implicated in cholera toxin-ganglioside binding (50), ie tyrosine (3), histidine (2), asparagine and aspartic acid (3) and glutamine and glutamic acid (2).

Our direct demonstration of the intimate association of a specific ganglioside with the TSH-R glycoprotein implies a critical role for this ganglioside in TSH-R structure and function, as suggested previously. The availability of cloned TSH-R and techniques for identifying and analyzing the ganglioside should enable questions about the nature of its interactions and its role to be answered.

References

1. Field, J.B. (1986) In: Werner's The Thyroid eds. Ingbar, S.H. and Braverman, L.E. (J.B. Lippincott, Philadelphia), pp 288-304.
2. Ress-Smith, B., McLachlan, S.M.

合を最も強く阻害するガングリオシドとして初めて記載されたが(5)、この GD1b ラクトンは TLC で GM1 の下に移動する(45)。天然には、このラクトン化されたガングリオシドは齧歯類の神経系(46)とヒト脳(45)で見出されている。GD1b ラクトンは α -ケト基の隣のカルボキシル基が塞がっている為に Vibrio cholerae シアリダーゼに抵抗性があると思われるが、精製したTSH-Rガングリオシドで私達が見出したことに反して、Arthrobacter ureafaciens シアリダーゼ(45)にも抵抗性がある筈である。

ガングリオシドが共有結合で(47)あるいは非共有結合で(48, 49)タンパク質にしっかりと結びついていることは良く理解されているが、正確な相互作用の場合は判っていない。ガングリオシドと反応し得る場所を推測するために、最近報告されたイヌのTSH-Rの配列を解析して見た。最初の膜貫通ドメインに近い細胞外ドメインの中に、他の糖タンパク質ホルモンレセプター(6)には決して見られない 52 アミノ酸から成るTSH-Rに特異的な配列がある。この配列の中の11ヶのアミノ酸配列は Arachis hypogea (ピーナツ) レクチンの配列と 80% のホモロジーがある。このレクチンは GM1 のみ結合する(49)。一方、類似の配列がカルシウム結合タンパクでも見付かっているが、カルシウム結合と糖結合とはタンパク質の中では別々の部位であるのが普通である(49)。従って、ガングリオシドに結合するコレラ毒素における知識に基づいて、ガングリオシドと結合するかも知れない別の配列を探してみ

た。コレラ毒素はガングリオシドに結合するとタンパク質の蛍光放射スペクトルに「変位」が生じるし(5)、トリプトファン残基を化学修飾するとコレラ毒素のガングリオシドに対する結合能が失われるので(50)、トリプトファンがこの相互作用で決定的に重要であると思われた。TSH-Rの細胞外ドメイン配列にはたった2個のトリプトファン残基しかない。その1つ、Trp238、は他の糖タンパク質ホルモンレセプターには見出されず(6)、もう1つは他のレセプター同様よく保存されていて、細胞膜からアミノ酸5個分離れて第2および第3の膜貫通ドメインの間のループに存在している。この21個のアミノ酸から成るループは、コレラ毒素でガングリオシド結合に関与していると思われる部位(50)に多いアミノ酸、つまり、チロシン(3)、ヒスチジン(2)、アルバラギンおよびアスバラギン酸(3)、グルタミンとグルタミン酸(2)、を多く含んでいる。

TSH-R糖タンパク質と特別なガングリオシドが密接な関係にあるという私達の直接的な証拠は、以前言われたように、ガングリオシドがTSH-Rの構造と機能に於て決定的役割を果たしていることを暗示する。クローニングされたTSH-Rが使えるようになったし、ガングリオシドを分析し同定する技術も進んだので、この相互作用の本態や役割についての疑問に答えられるようになるだろう。

三菱化成生命科学研究所・複合糖質研究室
山形 達也 訳

- and Furmaniak, J. (1988) *Endocrine Rev.* **9**, 106-120.
3. Drexhage, H.A., Bottazzo, G.F. and Doniach, D. (1983) In: *Cytochemical Bioassays, Techniques and Clinical Applications* eds. Chayen, J. and Bitensky, L. (Marcel Dekker, New York), pp 153-172.
4. Zakarija, M. and McKenzie, J.M. (1980) *Endocrinology* **107**, 2051-2054.
5. Mullin, B.R., Fishman, P.H., Lee, G., Aloj, S.M., Ledley, F.D., Winand, R.J., Kohn, L.D. and Brady, R.O. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 842-846.
6. Permantier, M., Libert, F., Meanhaut, C., Lefort, A., Gérard, C., Perret, J., Van Sande, J., Dumont, J.E. and Vassart, G. (1989) *Science* **246**, 1620-1622.
7. Nagayama, Y., Kaufman, K.D., Seto, P. and Rapoport, B. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 1184-1190.
8. Misrahi, M., Loosfelt, H., Atger, M., Sar, S., Guiochon-Mantel, A., and Milgrom, E. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 394-403.
9. Mullin, B.R., Pacuszka, T., Lee, G., Kohn, L.D., Brady, R.O. and Fishman, P.H. (1978) *Science* **199**, 77-79.
10. Gardas, A. and Nauman, J. (1981) *Acta Endocrinol. (Copenh)* **98**, 549-555.
11. Gardas, A., Adler, G., Lewartowska, A., Faryna, M. and Nauman, J. (1983) *Acta Endocrinol. (Copenh)* **104**, 333-339.
12. Aloj, S.M., Lee, G., Grollman, E.F., Beguinot, F., Consiglio, E. and Kohn L.D. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9040-9049.
13. Poss, A., Deleers, M. and Ruysschaert, L.M. (1978) *FEBS Lett.* **86**, 160-162.
14. Kohn, L.D. (1978) In: *Receptors and Recognition* eds. Cuatrecasas, P. and Greaves, M.F. (Chapman and Hall, London) Ser. A, Vol. 5, pp. 135-211.
15. Moss, J., Fishman, P.H., Richards, R.L., Alving, C.R., Vaughan, M. and Brady, R.O. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **73**, 3480-3483.
16. Moss, J., Richards, R.L., Alving, C.R. and Fishman, P.H. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 797-798.
17. Ludwig, D.S., Ribí, H.O., Schoolnik, G.K. and Kornberg, R.D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8585-8588.
18. Pekonen, F. (1980) *Horm. Metab. Res.* **12**, 310-314.
19. Powell-Jones, C.H.J., Thomas, C.G. and Nayfey, S.N. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 4001-4010.
20. Friedman, Y., Hladis, P., Babiarczyk-Crowell, D. and Burke, G. (1979) *Endocr. Res. Commun.* **6**, 71-92.
21. Holmes, G.D., Titus, G., Chou, M. and Field, J.B. (1980) *Endocrinology* **107**, 2076-2081.
22. Moore, W.V. and Feldman, L. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 4247-4253.
23. Amir, S.M., Goldfine, I.D. and Ingbar, S.H. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 4693-4699.
24. Beckner, S.K., Brady, R.O. and Fishman, P.H. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4848-4852.
25. Yavin, E., Yavin, Z., Schneider, M.D. and Kohn, L.D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3180-3184.
26. Valente, W.A., Vitti, P., Yavin, Z., Yavin, E., Rotella, C.M., Grollman, E.F., Toccafondi, R.S. and Kohn, L.D. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6680-6684.

27. Iwamori, M., Sawada, K., Hara, Y., Nishio, M., Fujisawa, T., Imura, H. and Nagai, Y. (1982) *J. Biochem.* **91**, 1875-1887.
28. Svennerholm, L. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **835**, 231-235.
29. Ambesi-Impombato, F.S., Parks, L.A.M. and Coon, H.G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3455-3459.
30. Meldolesi, M.F., Fishman, P.H., Aloj, S.M., Kohn, L.D. and Brady, R.O. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 4060-4064.
31. Lacceti, P., Grollman, E.F., Aloj, S.M. and Kohn, L.D. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **110**, 772-778.
32. Svennerholm, L. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 604-611.
33. Aminoff, D. (1961) *Biochem. J.* **81**, 384-392.
34. Magnani, J.L., Smith, D.F. and Ginsburg, V. (1980) *Anal. Biochem.* **109**, 399-402.
35. Brockhaus, M., Magnani, J.L., Blaszczyk, M., Steplewski, Z., Koprowski, H., Karlsson, K.A., Larsson, G and Ginsburg, V. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 13223-13225.
36. Hansson, G.C., Karlsson, K.A., Larsson, G., Stromberg, N. and Thurin, J. (1985) *Anal. Biochem.* **146**, 158-163.
37. Fishman, P.H. (1986) *Chem. Phys. Lipids* **42**, 137-151.
38. Kielczynski, W. and Harrison, L.C. (1990) *Glycoconjugate J.* **7**, 75-84.
39. Leedman, P.J., Newman, J.D. and Harrison, L.C. (1989) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **69**, 134-141.
40. Leedman, P.J. and Harrison, L.C. (1990) In: *Receptor Purification*, ed. Litwack, G. (Humana Press, Philadelphia), (in press).
41. Kielczynski, W., Leedman, P.J. and Harrison, L.C. (1989) *Proceedings of the Xth International Symposium on Glycoconjugates*, Jerusalem, Israel, No 258; p 370.
42. Li, S.-C., DeGasperi, R., Muldrey, J.E. and Li, Y.-T. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 346-352.
43. Ito, M. and Yamagata, T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9510-9519.
44. Schauer, R. (1982) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **40**, 131-234.
45. Riboni, L., Sonnino, S., Acquotti, D., Malesci, A., Ghidoni, R., Egge, H., Mingrino, S. and Tettamanti, G. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 8514-8519.
46. Gross, S.K., Williams, M.A. and McCluer, R.H. (1980) *J. Neurochem.* **34**, 1351-1361.
47. Ji, T.H. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 7841-7847.
48. Sharom, F.J. and Grant, C.M.W. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **507**, 280-293.
49. Chersh, D.A., Pytela, R., Pirschbacher, M.D., Klier, F.G., Ruoslahti, E. and Raisfeld, R.A. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 1163-1173.
49. Goldstein, I.J. and Poretz, R.D. (1986) In: *The Lectins*, eds. Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstein, I.J. (Academic Press, Inc., Orlando, FL), pp. 35-247.
50. De Wolf, M., Bastiaens, G., Lagrou, A., Van Dessel, G., Hilderson, H. and Dierich, W. (1987) In: *Membrane receptors, dynamics and energetics*, ed. Wirtz, K.W.A. (Plenum Press, New York, NY) NATO ASI Series A, Life Sciences, Vol. 133, pp 149-159.