β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferases: Enzymes Critically Involved in Oligosaccharide Branching

β 1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素: オリゴ糖分岐に関与する重要な酵素

Bierhuizen, M.F.A., and Fukuda, M.

La Jolla Cancer Research Foundation, Cancer Research Center, La Jolla, California 92037, USA, FAX: 1-619-450-2101

Key Words: β 1,6 *N*-acetylglucosaminyltransferase, branching enzyme, glycosyltransferase, oligosaccharide biosynthesis

Abstract

In recent years β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase activities have been described in numerous mammalian tissues and cell types. From these studies it is clear that alterations in the expression level of these enzymes and their corresponding carbohydrate structures on the cell surface are associated with development, differentiation and oncogenesis. However, the molecular basis for these changes as well as their functional significance remain at present unknown. Recent advances in the molecular cloning and expression of β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase cDNAs will provide exciting new approaches to study their differential expression patterns at the molecular level and to correlate the expression of the corresponding carbohydrates with functionS.

要約

近年、 β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素群の活性が様々な動物組織や色々な細胞で検出された。これらの研究は、これらの転移酵素とそれによって合成される細胞表面糖鎖が、発生、分化及び癌化に伴って大きく変化することを明らかにした。しかしこの変化の分子的な基礎とその機能的意義を明らかにするのはこれからの課題である。ごく最近になって β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素のcDNAがクローンされ、それを発現させることにより、これらの転移酵素系の遺伝子レベルでの発現の制御と、発現された特異的糖鎖の機能との相関が明らかにされるであろう。

A. Introduction

The *N*-acetylglucosaminyltransferases form a group of glycosyltransferases that catalyze the transfer of GlcNAc from UDP-GlcNAc to an acceptor molecule. Although these *N*-acetylglucosaminyltransferases share the property of utilizing the same nucleotide sugar donor, they differ both in the type of GlcNAc linkage transferred as well in their specificity for the acceptor molecule. For instance, four subgroups can now be distinguished only on the basis of the type of GlcNAc linkage formed, namely the β 1-2-, β 1-3-, β 1-4-, and the β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferases. A further subdivision is possible based on the acceptor molecule used to form the linkage. In the case of the β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferases four different β 1-6 GlcNAc linkages can be distinguished: GlcNAc β 1-2(GlcNAc β 1-6)Man, Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc, GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc, and GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal. Since it is generally believed that at least one distinct glycosyltransferase is responsible for the synthesis of each existing glycosidic linkage, this means that there are at least four different β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferases as well. With reference to the above-mentioned respective β 1-6 GlcNAc linkages these enzymes are here named *N*-acetylglucosaminyltransferase V (GnTV), core 2 β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), core 4 β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C4GnT), and I β 1-

A. はじめに

N-アセチルグルコサミン転移酵素群は、UDP-GlcNAcから基質へ*N*-アセチルグルコサミンを転移する酵素群である。これらの酵素群はいずれもUDP-GlcNAcを使うという点で共通しているが、生成する*N*-アセチルグルコサミンの結合と、*N*-アセチルグルコサミンを転移する受容体の構造が異なる。例えば、合成される*N*-アセチルグルコサミンの結合の違いに基づくだけでも、 β -1,2-、 β -1,3-、 β -1,4-それと β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素とに分類される。受容体の構造に基づき、同じ構造を作るものでも更に分類され、 β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン結合では、GlcNAc β 1,2(GlcNAc β 1,6)Man、Gal β 1,3(GlcNAc β 1,6)GalNAc、GlcNAc β 1,3(GlcNAc β 1,6)GalNAcとGlcNAc β 1,3(GlcNAc β 1,6)Galとがある。これらの結合は、各々異なった転移酵素によって生成されと考えられ、上の四つの構造の生成を担う β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素は、それぞれ β -*N*-アセチルグルコサミン転移酵素V(GnTV)、コア2 β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(C2GnT)、コア4 β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(C4GnT)、及びI分岐酵素

6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (IGnT), respectively.

The β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferases are of particular interest due to their association with a number of (onco)developmental processes. An increase in GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β 1-branching of *N*-linked oligosaccharides has been observed in a number of rodent cell lines transformed with diverse tumor viruses (1-3), specific oncogenes (4, 5) or tumorigenic DNA (6) relative to the non-transformed progenitor cells. In the instances for which the enzymes were assayed the increased branching could be accounted for by a relative increase in the specific activity of GnTV (4, 5, 7-11), the enzyme responsible for the formation of this particular GlcNAc β 1-6 branch (12). In several experimental tumor model systems a positive correlation was noticed between increased GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β 1-branched *N*-linked oligosaccharides and the tumorigenic potential of the transformed cells (3, 5, 13). Besides an increase in GnTV activity, in T24H-ras-transfected rat2 fibroblasts and in two metastatic sublines of SP1 mammary carcinoma cells as compared to their non-tumorigenic progenitors also an increase in the activity of C2GnT was noticed (5). C2GnT catalyzes the conversion of the *O*-glycan specific core 1 structure, Gal β 1-3GalNAc, into the core 2 structure, Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc and its expression is developmentally regulated. The appearance of *O*-linked oligosaccharides with the core 2 branch and/or an increase in C2GnT activity have been associated with several biological processes, such as human T-cell activation (14), leukemias (15, 16), and immunodeficiency due to the Wiskott-Aldrich syndrome (17, 18) and AIDS (15). In addition, it has been suggested that β 1-6-branching by GnTV and C2GnT is an important control point in the biosynthesis of polyactosamine in *N*- and *O*-glycans, respectively (5, 19, 20), on the condition that the β 1-4-galactosyl- and β 1-3-*N*-acetylglucosaminyltransferases essential for polyactosamine synthesis are sufficiently expressed (see for example Fig. 1). This is particularly noteworthy since these polyactosaminoglycans may carry oligosaccharide determinants involved in cell-cell adhesion, e.g. the sialyl Le^x or NeuNAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-R structure (21-24, Fig. 1), and thus GnTV and C2GnT may be involved in the control of adhesive events during differentiation and oncogenesis. In this respect, IGnT may play a crucial role as well since this enzyme is directly responsible for the conversion of linear (i antigenic) into branched (I antigenic) polyactosaminoglycans, thus providing the possibility of multiple determinants in one side chain. The i/I relationship can be easily followed with e.g. antibodies directed against the respective antigens (25-27), and differences in this relationship have been noticed in human erythrocytes during embryonic development (28), during mouse embryogenesis (29, 30) and in a murine experimental model system for myeloid cell differentiation (31).

In order to study the differential expression of β 1-

(IGnT)と呼ばれる。

β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素は、それが多くの癌化・分化の過程での変化が注目されてきた。ネズミの系で、癌ウイルス(1-3)や、オンコジーン(4, 5)や、癌原性DNA(6)での転換により、GlcNAc β 1,6Man α 1, 6 Man β 1の分岐が増加することが報告されており(4, 5, 7-11)、この変化はGnTVの増加により GlcNAc β 1,6Man分岐が増加していることによることが分かった(12)。いくつかの実験癌の系で、癌化の悪性度と、GlcNAc β 1,2 Man β 1,分岐の量が関連している(3, 5, 13)。一方、T24H-rasで転換したネズミの繊維芽細胞やSP1乳腺癌で、コア2を作る酵素、C2GnTが増加することが報告されている(5)。C2GnT12は、コア1であるGal β 1,3GalNAcをコア2、Gal β 1,3(GlcNAc β 1,6)GalNAcへの変換を担う酵素で、その発現は、発生に伴って変化する。コア2の分岐を持つオリゴ糖と、C2GnTの活性の増加は、ヒトのT-リンパ球の活性化(14)、白血病(15, 16)とWiskott-Aldrich症候群(17, 18)、AIDS(15)などの免疫不全症のいずれにも伴って生じている。更に、 β 1,4-ガラクトース転移酵素と β -1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素がある細胞では、GnTVとC2GnTによってできるN-グリカンとO-グリカンの β 1,6結合から成る分岐は、いずれもポリ-N-アセチラクトサミンを生合成する起点となっている(5, 19, 20)(図1)。ポリ-N-アセチラクトサミンは、細胞接着に関与しているシアリルLe^x NeuNAc α 2,3 Gal β 1,4(Fuc α 1,3) GlcNAc-Rなどを持つことができ(21-24)、GnTVやC2GnTが分化や癌化において果たす接着の制御している可能性がある(図1)。これに関連して、IGnTは、直鎖(i 抗原)から分岐した(抗原)のポリラクトサミノグルカンを作るので、大事な役割を果たすことがある。直鎖から分岐への転換は、一つの側鎖にたくさんのリガントを作ることができるからである。iとIの量比は、特異的抗体によって検出でき(25-27)、ヒトの赤血球の胎児から成人型赤血球への変換(28)、マウスの初期発生(29, 30)、マウスの顆粒球細胞の分化(31)に伴って変化する。

発生の途上や癌化に伴って変化する β -1,6-*N*-アセチルグル

6-*N*-acetylglucosaminyltransferases and their corresponding carbohydrate structures in development and malignancy, the availability of (c)DNAs encoding these enzymes is essential. In this review we will first summarize the different β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase activities that have been described in the literature. Then we will discuss our recent studies towards the cloning of cDNAs encoding two of these enzymes as well as the emerging concept for the existence of a β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase gene family.

B. β 1-6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase Activities

Several β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase activities have been identified that together can account for the four different β 1-6 GlcNAc linkages described in the literature. Based on the type of β 1-6 GlcNAc linkage formed the enzyme activities have been classified here as either GnTV, C2GnT, C4GnT or IGnT. However, the actual picture is more complicated due to the apparent occurrence of enzyme isoforms which synthesize the same type of β 1-6 GlcNAc linkage but differ in their acceptor specificity. The different β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase activities have been summarized in Table I.

GnTV activity was first detected in membranes of the mouse lymphoma cell line BW5147 and shown to be responsible for the initiation of the β 1-6 GlcNAc branch occurring in tri- and tetraantennary *N*-linked oligosaccharides (12). The preferential acceptor used in this study to measure GnTV activity is shown in Table I, being an asialo/agalacto biantennary glycopeptide; the presence of galactose and, in addition, sialic

コサミン転移酵素と、それによって生成される糖鎖の発現変化を研究するためには、これらの酵素に対するcDNAを得ることが不可欠である。この総説では、まず今まで記述されてきた異なった β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素をまとめてみる。次いで、私達の二つの β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素のcDNAのクローニングの研究とその結果によって浮かび上ってきた、 β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子群について述べる。

B. β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素

これまでいくつかの β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素が記述されてきたが、これらは四つの異なった β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン結合を作っている。上で述べたように、生合成される β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン結合の違いから、これらの酵素は、GnTV、C2GnT、C4GnT、またはIGnTと分類される。ただ、実際には同じ β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン結合を作るのに受容体特異性の異なる酵素がいくつか存在するために、実際にはこれより少し複雑になる。これらの異なった β -1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素を、表Iにまとめてみた。

GnTVは最初マウスのリンパ腫細胞株BW5147で活性が検出され、トリアンテナリーとテトラアンテナリーのN-グリカンを生合成することが示された(12)。この活性を測定する基質はシアル酸とガラクトースを除いたバイアンテナリーであり(表I)、ガラクトースやシアル酸が非還元末端に結合していると、

Fig. 1. G-Glycan biosynthesis. Three different pathways for *O*-glycan biosynthesis are shown. If C2GnT is absent the core 1 structure, Gal β 1-3GalNAc-R, is terminated by the action of two different sialyltransferases resulting in a tetrasaccharide (A, bottom left). If C2GnT is sufficiently expressed the core 1 structure is converted into the core 2 structure, Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-R. This structure is galactosylated and either terminated by sialyltransferases (A, bottom right) or extended by the addition of repeating lactosamine units (B). This figure was reproduced from reference 20.

Table I. Different β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase activities.

Activity	Enzyme source	Acceptor used and linkage formed	Reference
GnTV	mouse lymphoma cell line BW5147	GlcNAcβ1 GlcNAc β 1-2Man α 1 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn Fuc α 1	12
	rat kidney, purified enzyme	GlcNAcβ1 GlcNAc β 1-2Man α 1-6Man β -O-(CH ₂) ₈ -COOCH ₃	32
	human lung cancer cells, purified enzyme	GlcNAcβ1 GlcNAc β 1-2Man α 1 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	33
C2GnT	rabbit small intestinal epithelium; bovine, swine tracheal epithelium; rat, dog submaxillary gland; rat ² , pig, monkey, human colon; rat, pig ² , monkey sheep stomach;	GlcNAcβ1 Gal β 1-3GalNAc α 1-R	34-39
C2GnT or C4GnT	human ovarian tissue	GlcNAcβ1 GalNAc α 1-benzyl	40
C4GnT	rat ² , human, pig, monkey colon; pig ² , rat, monkey, sheep stomach; rat and dog submaxillary gland; Novikoff ascites tumor cells ²	GlcNAcβ1 GlcNAc β 1-3GalNAc α -benzyl	38, 42
IGnT	pig gastric mucosa; Novikoff ascites tumor cells ² rat small intestine;	GlcNAcβ1 GlcNAc β 1-3Gal β 1-R	42-45
	rat small intestine;	GlcNAcβ1 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-R	45
	mouse lymphoma P-1798	GlcNAcβ1 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer	46
	Novikoff ascites tumor cells	GlcNAcβ1 Gal β 1-4GlcNAc β 1-(asialo- α 1-acid glycoprotein)	47
	human serum	GlcNAcβ1 Gal β 1-4Glc	49, 50
C2GnT/ C4GnT/ IGnT	bovine tracheal epithelium, purified enzyme	GlcNAcβ1 Gal β 1-3GalNAc α 1-benzyl GlcNAcβ1 GlcNAc β 1-3GalNAc α 1- <i>p</i> -nitrophenyl GlcNAcβ1 GlcNAc β 1-3Gal β 1-methyl	51
Other	Novikoff ascites tumor cells ²	GlcNAcβ1 Gal β 1-3Gal β 1-4Glc	42, 48
	mouse kidney	GlcNAcβ1 Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	41

¹ Abbreviations used: GnTV, *N*-acetylglucosaminyltransferase V; C2GnT, core 2 β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase; C4GnT, core 4 β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase; IGnT, I β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase.

² Acceptor competition studies have suggested that the different β 1-6-*N*-acetylglucosaminyltransferase activities measured in one particular cell type or tissue are carried by the same enzyme.

acid residues at the non-reducing termini prevented the enzyme activity completely, thus determining the acceptor specificity of the enzyme. Recently, GnTV has been purified from both rat kidney tissue (32) as well as from the human lung cancer cell line QG (33).

C2GnT and C4GnT activities have been detected in a variety of tissues (34-42). The Gal β 1-3GalNAc α 1-R disaccharide by itself (R = H), or linked to a protein (e.g. R = porcine submaxillary mucin) or to a hydrophobic group (e.g. R = benzyl) and the GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-disaccharide linked to a hydrophobic group have been used as specific acceptors for the measurements of C2GnT and C4GnT activity, respectively. Interestingly, a competition study with the two substrates Gal β 1-3GalNAc α 1-benzyl and GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-benzyl suggested that the C2GnT and the C4GnT activities from rat colon mucosa are carried by the same enzyme (38). Yazawa *et al.* (40) noticed an enzyme activity in human ovarian tissue that transferred GlcNAc in β 1-6 linkage to GalNAc α 1-benzyl which was absent in the earlier mentioned rat colon extracts (38). Since, in addition, Brockhausen *et al.* (16) have reported the presence of C2GnT and the absence of C4GnT and IGnT activity in leukocytes from normal donors and patients with leukemia, these results together suggest that there are at least three enzyme isoforms involved in the biosynthesis of the core 2 and/or core 4 structures. In mouse kidney a β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase activity has been characterized that is able to add GlcNAc in β 1-6 linkage to GalNAc in the glycolipid Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1-Cer (41). However, at present it is unclear whether this enzyme is also able to synthesize the core 2 O-glycan structure or whether it represents a completely new β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase activity.

Similarly as mentioned for C2GnT/C4GnT, there appear to be also at least three enzyme isoforms involved in the biosynthesis of the GlcNAc β 1-6Gal branching point (42-50). In pig gastric mucosa, Novikoff ascites tumor cells and rat small intestinal tissue an IGnT enzyme activity has been detected capable of transferring GlcNAc in β 1-6 linkage to the Gal of the GlcNAc β 1-3Gal β 1-R acceptor structure (42-45). Competition studies suggested that the mentioned pig gastric mucosal and the Novikoff ascites tumor cell enzymes were also able to act on acceptors specific for C2GnT and/or C4GnT (42, 44, 48). When the acceptor substrate specificity was determined for the pig gastric mucosa and rat small intestinal enzymes it was shown that the presence of a Gal residue at the non-reducing terminus of the acceptor prevented this enzyme activity (43, 45). However, in the rat small intestinal tissue a separate enzyme was identified that acts exclusively on structures with a non-reducing Gal residue, i.e. this particular enzyme adds GlcNAc in β 1-6 linkage to the internal Gal of Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-R but not of GlcNAc β 1-3Gal β 1-R

基質としては働かず、このように受容体の特異性を決定している。GnTVは最近ラットの腎臓(32)とヒトの肺癌細胞QGから精製された(33)。

コア2とコア4を生合成するC2GnT、C4GnTの各々は色々な組織で検出されている(34-42)。Gal β 1,3GalNAcそのもの、それのタンパク質についたもの(例えば、ブタの顎下腺ムチン)、あるいはそれが疎水性の基についたもの(例えば、ベンジル)がコア2GnTの活性測定に使われる。一方、GlcNAc β 1,3GalNAc α 1-ベンジルが、C4GnTの測定に使われる。Gal β 1,3GalNAc α 1-ベンジルとGlcNAc β 1,3GalNAc α 1-ベンジルを用いた拮抗反応の実験から、この二つの酵素活性がラットの大腸粘膜では同じ酵素で担われていると判断される(38)。一方、Yazawaらは、ラットの大腸では検出されなかった、GalNAc α 1-ベンジルにGlcNAcを β -1,6-結合でつける酵素活性を検出した(40)。一方、Brockhausenらは、白血球にはC2GnT活性があるが、C4GnTやIGnTが無いことを報告している(16)。これらの結果は、コア2とコア4を形成する酵素に少なくとも三つの異なった種類のものがあることを示している。一方、マウスの腎には、糖脂質であるGalNAc β 1,3GalNAc β 1,3Gal α 1,4Gal β 1,4Glc β 1,CerのGalNAcに、 β 1,6GlcNAcを転移する活性がある(41)。現在のところこれがコア2を形成する酵素がこの反応を司るのが、まったく異なった β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素が担っているのか分かっていない。

C2GnT/C4GnTの状況に似て、GlcNAc β 1,6Gal結合を生合成する酵素にも3種類あるようである(42-50)。ブタの胃粘膜、Novikoffの腹水癌細胞とラットの小腸には、N-アセチルグルコサミンをGlcNAc β 1,3Gal β 1,RのGalに β -1,6-結合で転移する酵素活性が検出される(42-45)。ブタの胃粘膜とNovikoffの腹水癌細胞では、これらの酵素はコア2やコア4の酵素の働く基質にも働く(42, 44, 48)。基質受容体を色々変えてみると、ガラクトースが更についたGal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1-Rは受容体として上に述べた酵素は働かない(43,45)。ところが、もっと複雑なことに、ラットの小腸粘膜にはGal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1-Rの内側のガラクトースにGlcNAc β 1,6を転移する酵素があることが見い出された。この酵素はGlcNAc β 1,3Gal β 1-Rを基質としない(45)。一方、マウスT-リンパ腫P-1798、Novikoff腹水癌、及

(45). In addition, in mouse T-lymphoma P-1798, Novikoff ascites tumor cells, and in human serum an enzyme has been identified that incorporates GlcNAc in β 1-6 linkage to the terminal Gal residue of neolactotetraosylceramide (= Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer), asialo- α ₁-acid glycoprotein and lactose, respectively (46, 47, 49, 50). Recently, a β 1-6-N-acetylglucosaminyl-transferase has been purified to apparent homogeneity from bovine tracheal epithelium, and mixed acceptor substrate competition studies indicated that this enzyme adds GlcNAc in β 1-6 linkage to Gal β 1-3GalNAc α 1-benzyl, GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-p-nitrophenyl, as well as to GlcNAc β 1-3Gal β 1-methyl (51).

Besides the transfer of GlcNAc in β 1-6 linkage there appears to be another property that distinguishes the β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferases from the β 1-2-, β 1-3-, and β 1-4-N-acetylglucosaminyltransferases, namely their lack of a stringent requirement for divalent cations and their ability to display significant activity in the presence of low concentrations of EDTA (32-36, 38, 41, 42, 44, 45, 47). In the above-mentioned examples the only notable exceptions are the β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase activities measured in human ovarian tissue and mouse T-lymphoma P-1798, which are dramatically reduced by the absence of Mn²⁺ or the presence of EDTA (40, 46). In addition, it appears that several β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase isoforms may be involved in the biosynthesis of all of the core 2, core 4 and/or I-antigenic structures, suggesting the existence of enzymes with a rather relaxed acceptor specificity. Most of these studies have been performed *in vitro* with crude cellular or tissue extracts as source for the enzyme and synthetic oligosaccharides as acceptor structures; highly purified enzyme preparations and cDNAs encoding particular β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferases are required to account for all of the observed differences in acceptor specificity. In this respect it is interesting to note that *in vitro* the highly purified β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase from bovine tracheal epithelium is able to synthesize the core 2, core 4 as well as the I antigenic structure with a slight preference for the core 2 structure (51). However, the cDNA isolated from a HL-60 cDNA library encodes an enzyme able to synthesize the core 2, but not the core 4 or I antigenic structures (52).

C. Transient Expression Cloning of cDNAs Encoding Human C2GnT and IGnT

A very efficient method for the isolation of cDNAs encoding cell surface proteins is based on the transient expression of a cDNA library in eukaryotic cells, initially not expressing the surface molecule of interest, and selection of cells newly expressing the surface antigen with antigen-specific antibodies (53, 54). COS-1 cells have been the preferred choice for such studies since these cells continuously express the SV40 large T

びヒト血清中には、Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc1-Cerや、シアル酸を除いた α 1-酸性糖タンパク、及びラクトース、Gal β 1,4Glcの非還元末端のガラクトースにGlcNAc β 1,6を転移する酵素活性が見い出されている(46, 47, 49, 50)。最近、牛の気管上皮から、133,800倍までに β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素が精製されたが、色々の拮抗実験から、この酵素は、Gal β 1,3GalNAc α 1-ベンジル(コア2)、GlcNAc β 1,3GalNAc α 1-p-ニトロフェノール(コア4)、及びGlcNAc β 1,3Gal β 1-メチル(I)を最も基質として使うことが分かった(51)。

β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、他の β -1,2-、 β -1,3-、 β -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素と異なり、二価イオンを要求せず、かつ低濃度のEDTAの存在下で活性が下がらないことに特徴がある(32-36, 38, 41, 42, 44, 45, 47)。ただ、ヒトの卵巣とマウスのT-リンパ種P-1798にある β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素は、Mn²⁺を加えなかったり、EDTAの存在下でその活性が著しく下がる(40, 46)。また、コア2、コア4、Iの三つともを合成する β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性が示されているが、それらの酵素は基質特異性がゆるいと考えられる。ただ、これらの基質特異性を決めた研究の大部分は、細胞や組織の粗抽出液にある酵素活性を、合成基質を用いて測定したもので、高度に精製された酵素や、cDNAを発現させて得られた β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素を用いることにより、初めて基質特異性がはっきりしてくる。これに関連して、牛の気管上皮から精製した β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素が、コア2を最も優先的に作るけれども、コア4やI抗原構造も作る点が注目される(51)。ところが、HL-60のcDNAライブラリーから得られたcDNAで作られる酵素は、コア2を合成するのみで、コア4やI抗原は合成しない(52)。

C. ヒトコア2とI抗原を合成する β -1,6-N-アセチルグルコサミンのcDNAの発現によるクローニング

細胞表面タンパクを作るcDNAを単離するとても効率のいい方法として、もともとそれを発現していない細胞を用いて、それを新たに発現した細胞を特異的抗体で選択する方法である(53, 54)。この方法にはCOS-1細胞がよく使われてきたが、それはCOS-1細胞がSV40ウイルスのT抗原を発現しているので、SV40ウイルスの複製起点を含んでいるプラスミドがクロモソーム

antigen and thus allow the extrachromosomal replication of plasmid vectors harboring the SV40 origin of replication (53-55). In an exciting extension of this protocol Larsen *et al.* (56) used COS-1 cells to obtain cDNA encoding murine α 1-3-galactosyltransferase, a Golgi residential protein, by lectin-selection for the product of this glycosyltransferase on the cell surface. Since then, using a variety of antibodies for selection, several other cDNAs encoding glycosyltransferases have been successfully cloned by transient expression in COS-1 cells (57-59). However, the usefulness of COS-1 cells as recipient for this particular purpose is limited since these cells themselves already express a large number of glycosyltransferases. Several laboratories have adjusted the initial transient expression cloning system to their own interests and the cell types that can now be used as recipient cells range *e.g.* from Chinese hamster ovary (CHO), human lymphoid, to murine B16 melanoma and thymoma cells (60-64).

The availability of two carbohydrate-specific antibodies, namely T305 and anti-I antibodies, allowed us to initiate studies towards the transient expression cloning of C2GnT and IGnT, respectively. The monoclonal antibody T305 was originally raised against human T-lymphocytic leukemia cells and believed to specifically bind to the hexasaccharide structure, NeuNAc α 2-3Gal β 1-3(NeuNAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc, but not the tetrasaccharide, NeuNAc α 2-3Gal β 1-3(NeuNAc α 2-6)GalNAc, present on human leukosialin (15, 17, 65). The anti-I antibodies IMA and IStep are specific for the I antigenic structure Gal β 1-4GlcNAc β 1-3 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)Gal β 1-R, but not for the i antigenic structure Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-R (25). For the expression cloning of both C2GnT and IGnT, a CHO cell line (CHO-Py.leu) was established stably expressing human leukosialin as well as the polyoma virus large T antigen, thus allowing the extrachromosomal replication of plasmid vectors harboring the polyoma virus origin of replication, such as the eukaryotic expression vector pcDNAI (60). These cells were judged to possess the oligosaccharide biosynthetic machinery necessary to produce either the hexasaccharide structure on leukosialin or the I antigenic structure upon transfection with cDNA encoding C2GnT or IGnT, respectively. Since the human promyelocytic cell line HL-60 and the human teratocarcinoma cell line PA-1 express significant levels of C2GnT (15) and IGnT (66), respectively, cDNA expression libraries were prepared in pcDNAI using poly(A)⁺ RNA isolated from these cell lines. These libraries were screened for cDNAs determining either the T305 or the I antigen on the cell surface of CHO-Py.leu cells and, after several antibody-selection rounds, cDNA clones were obtained which were designated pcDNAI-C2GnT (52) and pcDNAI-IGnT (67).

ム外で(エピソーム様に)沢山複写するという利点を持っているからである(53-55)。この方法を更に発展した方法として、LarsenらはCOS-1細胞を用いてゴルジ酵素である α -1,3-ガラクトース転移酵素をクローン化した(56)。この時この糖転移酵素による合成される糖鎖をレクチンに結合させることによって細胞を選択した(56)。その後、様々な抗体を用いて選択することにより、COS-1細胞を用いていくつかの他の糖転移酵素のcDNAがクローンされてきた(57-59)。しかし、COS-1細胞は既にたくさんの糖転移酵素を発現しているので、COS-1細胞をcDNAを導入する細胞として使うには限界がある。いくつかの研究室で、それぞれのクローンしたい酵素に従ってこの方法の改良が試みられ、これまでチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、ヒトリンパ球細胞、マウスB16メラノーマ、及び胸腺腫細胞を用いてクローン化が成功した(60-64)。

私達の研究室では、T305と抗I抗体という二つの糖鎖特異的の抗体を用いて、コア2を合成する酵素と、Iを合成する酵素のクローニングを試みた。モノクローナル抗体であるT305は、当初ヒトの白血球T-リンパ細胞に対して作られた抗体で、リユーコシアリンに結合した分岐したオリゴ糖、NeuNAc α 2,3Gal β 1,3(NeuNAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,6)GalNAcに結合するが、分岐していない四糖、NeuNAc α 2,3Gal β 1,3(NeuNAc α 2,6)GalNAcには結合しないことが分かっていた(15, 17, 65)。I抗原に特異的な抗体であるIMAやIStepは、Gal β 1,4GlcNAc β 1,3(Gal β 1,4GlcNAc β 1,6)Gal β 1-Rに特異的であるが、i抗原であるGal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1-Rには結合しない(25)。C2GnTとIGnTの両方の発現によるクローニングは、ヒトリユーコシアリンとポリオーマヴィルスのT抗原を発現しているCHO-Py.leuをまず作り、それを用いた。CHO-Py.leuはpcDNAIのようなポリオーマヴィルスの複写起点を持っているプラスミドをエピソーム様に複写する(60)。またこの細胞は、C2GnTやIGnTのcDNAを細胞に取り込めさせれば、リユーコシアリン上に六糖を合成したり、或はI抗原を合成するのに必要な他の糖転移酵素を持っていると考えられる。ヒトの前骨髄白血球病細胞であるHL-60とヒトの胚奇形細胞であるdPA-1は各々、たくさんのC2GnT(15)とIGnT(66)を持っている。従って、cDNAライブラリーをこれらの細胞からのポリ(A)⁺RNAを用いてpcDNAIに組み込んだ。これらのcDNAライブラリーを導入した後、T305やI抗原を表現しているCHO-Py.leuを抗体を用いることにより、C2GnTを持っているプラスミドと、IGnTを持っているプラスミドを得た。

D. Characterization of pcDNAI-C2GnT and pcDNAI-IGnT

Upon transfection of pcDNAI-C2GnT or pcDNAI-IGnT into CHO-Py.leu cells and examination by immunofluorescence staining with the appropriate antibodies, it was indeed shown that these cDNA clones directed to expression of the T305 or I antigen, respectively, on the cell surface (52, 67). Furthermore, Northern blot analysis of poly (A)⁺ RNA derived from different cell lines revealed that the presence or absence of poly (A)⁺ RNA specific for the isolated cDNAs correlated with the known presence or absence of C2GnT or IGnT in those cell lines. The cDNA inserts of pcDNAI-C2GnT and pcDNAI-IGnT contained single open reading frames for proteins of 428 and 400 amino acids, respectively, in length. Hydropathy analysis of these amino acid sequences predicted in both cases proteins with a short NH₂-terminal, a hydrophobic transmembrane, and a large COOH-terminal segment (see Fig. 2). In this so-called type II membrane topology, a feature common to all the glycosyltransferases cloned to date (68-70), the large COOH-terminal domain most likely contains the catalytic domain and faces the lumen of the Golgi.

Conclusive evidence that pcDNAI-C2GnT indeed encoded C2GnT was obtained as follows. The cDNA sequence corresponding to the putative catalytic domain of C2GnT was fused in-frame with a signal peptide for secretion and with the IgG binding domain of *Staphylococcus aureus* protein A, resulting in the secretory plasmid vector pPROTA-C2GnT_c (52). COS-1 cells were transfected with this vector and, after a sufficient expression period, fusion-protein was purified from the medium using IgG-Sepharose beads. These IgG-Sepharose beads were directly assayed for β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase activities using synthetic acceptor structures specific for either GnTV, C2GnT, C4GnT, or IGnT. The results obtained clearly indicated that the fusion-protein bound to the beads displayed only activity towards the acceptor for C2GnT. Moreover, when the product of the C2GnT specific glycosyl-

D. C2GnT及びIGnTを持っているpcDNAIの特徴づけ

まず、C2GnTやIGnTを持っているpcDNAIをCHO-Py-leuに導入して、各々に特異的な抗体で反応させた後、蛍光顕微鏡下で見た。その結果、確かにこの各々のcDNAはそれぞれT305やI抗原を細胞表面に発現させた(52, 67)。更にこれらcDNAと反応するポリ(A)⁺RNAのあるなしが、酵素活性のあるなしと対応していた。C2GnTとIGnTはそれぞれ428残基と400残基からなるタンパクの配列をコードしている。これらのアミノ酸配列の疎水性度をみると、どちらのタンパクも短いNH₂端側のドメイン、疎水性の膜貫通部分、そしてCOOH端側の比較的大きなドメインから成り立っていることが分かる(図2)。これはいわゆるタイプII膜タンパクのトロポジーで、これまでクローンされた糖転移酵素に共通で(68-70)、比較的大きなCOOH端に近い方のドメインは酵素反応を司る部分を有しており、かつGolgi装置の内腔側に入っていると考えられる。

C2GnTのcDNAが確かにコア2を合成する酵素であることは以下のようにして確認された。C2GnTのcDNA配列を分泌するタンパクのシグナルペプチドの配列と、プロテインAのIgG結合部位と、アミノ酸配列が連なるように結合した(52)。COS-1細胞にこのベクターを導入してタンパクを発現させた後、培養上清からキメラタンパクをIgG-Sephadexで回収した。こうして得られたIgGビーズに結合している β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素の活性をGnTV、C2GnT、またはIGnTに特異的な合成基質を用いて測定した。その結果は、プロテインAと結合させた酵素は、C2GnTの活性を持っているのみであった。またC2GnTに特異的な糖転移酵素であることは、反応産物がGal β

Fig. 2. Schematic representation of the domain structures and homologous regions of IGnT and C2GnT. The alignment of the deduced amino acid sequences of C2GnT and IGnT revealed three homologous regions (hatched boxes)(52, 67). Solid boxes denote the transmembrane signal anchoring domain; Y denotes potential N-glycosylation sites. This figure was originally presented in reference 67.

transferase assay was analyzed by HPLC the expected product, Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc, was identified. These results indicate that the C2GnT present in HL-60 cells is exclusively responsible for the synthesis of the β 1-6 GlcNAc linkage on Gal β 1-3GalNAc and not for any of the other β 1-6 GlcNAc linkages, thus consistent with the properties of the enzyme activity reported by Brockhausen *et al.* (16) in leukocytes from normal donors and patients with leukemia.

In order to obtain evidence that pcDNAI-IGnT encoded I GnT, CHO cells were stably transfected with both pcDNAI-IGnT and pSV2neo or with pSV2neo alone, and selected for G418 resistance. After each transfection clonal cell lines were isolated by limiting dilution and designated CHO-neo.IGnT and CHO-neo cells, respectively. Both cell lines were metabolically labeled with [3 H]galactose and high molecular weight glycopeptides were obtained by pronase digestion and G-50 gel filtration. The glycopeptides derived from CHO-neo.IGnT cells were found to be relatively more resistant to endo- β -galactosidase treatment than the glycopeptides from CHO-neo cells, which is in good agreement with the presence of the branched I structure in these cells (71). Moreover, when the [3 H]galactose-labeled glycopeptides derived from both cell lines were methylated, hydrolyzed and the products analyzed by thin layer chromatography galactose residues substituted at positions 3 and 6 were detected in the case of CHO-neo.IGnT but not of CHO-neo cells (67). These results demonstrate that the CHO-neo.IGnT cells acquired the GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal branching point as a result of transfection with pcDNAI-IGnT.

When the amino acid sequences for C2GnT and I GnT were tested for homology against a protein data base, no significant similarity could be detected with any of the other protein sequences. A direct comparison of the amino acid sequences for C2GnT and I GnT with the corresponding sequences for glycosyltransferases cloned by others, including β 1-2-N-acetylglucosaminyltransferase I (72, 73) and β 1-4-N-acetylglucosaminyltransferase III (74), revealed no significant similarity either. However, when the sequences of C2GnT and I GnT were directly compared three regions of approximately 60% identity were observed on both the cDNA and amino acid level (Fig. 2). Moreover, in situ chromosome hybridization studies localized the genes for both C2GnT and I GnT at the same locus on chromosome 9, band q21, suggesting that C2GnT and I GnT are members of a β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase gene family which evolved from a common precursor gene. Although all N-acetylglucosaminyltransferases utilize the same nucleotide-sugar donor it is unlikely that the observed homologous regions in C2GnT and I GnT represent the UDP-GlcNAc binding site due to the lack of significant homology with β 1-2-N-acetylglucosaminyltransferase I and β 1-4-N-acetylglucosaminyltransferase III. It is

1,3(GlcNAc β 1,6)GalNAcであることをHPLCで同定した。この結果は、HL-60にあるC2GnTはGal β 1,3GalNAcにGlcNAc β 1,6結合を合成するのみで、他のGlcNAc β 1,6結合を合成しないことがわかった。これは、正常の人と白血球癌患者からの白血球に存在するBrockhausenらの報告した酵素活性の性質(16)とよく一致する。

一方、単離したIGnTが確かにI抗原を作る酵素であることを確かめるために、CHO細胞にpcDNAI-IGnTとpsVneoを導入した後、G418で選択した。形質導入された細胞は、希釈法により細胞株を得て、CHO-neo-IGnTとCHO-neoを得た。両方の細胞株に、代謝的に[3 H]ガラクトースを取り込ませ、高分子糖ペプチドをプロナーゼ消化の後、Sephadex G-50のゲルろ過で得た。I酵素を導入して発現しているCHO細胞からの糖ペプチドは、対照のCHO細胞に比べてエンド- β -ガラクトシダーゼによる消化を受け難く、I抗原の分岐構造の存在を示している(71)。更に、[3 H]ガラクトースで標識した糖ペプチドをメチル化後、酸加水分解後、薄層クロマトグラフィーで加水分解物を分離すると、CHO-neo-IGnT細胞からは3位と6位が置換しているガラクトースが得られたが、対照のCHO細胞からはそれが得られなかった。これらの結果は、CHO-neo-IGnT細胞には、IGnTを導入させて発現した結果、GlcNAc β 1,3(GlcNAc β 1,6)Galの分岐ができたことが分かる。

さて上で得られたC2GnTとIGnTのアミノ酸配列をすでに発表されたタンパクと比較してみたが、他のどのタンパクとも相似性が見い出せなかった。またC2GnTとIGnTとのアミノ酸配列を、 β -1,2-N-アセチルグルコサミン転移酵素I(72、73)と β -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素III(74)を含めて他のこれまでクローンされた糖転移酵素のアミノ酸配列と比較してみたが、相似性がまったく見られなかった。ところが、C2GnTとIGnT同士のアミノ酸配列を比較すると、三つの領域でcDNAとアミノ酸配列の両方で60%の配列が同一であるところが見い出された(図2)。更にC2GnTとIGnTの遺伝子もクロソーム上での位置を調べると、どちらの遺伝子もクロソーム9のq21バンドにあることが示され、C2GnTとIGnTは、共通の前駆体遺伝子から進化してできた、 β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子群に属すると考えられる。このアミノ酸配列の相同性が見られた領域に、 β -1,2-N-アセチルグルコサミン転移酵素IやIIIに相同性が見られないことから、UDP-GlcNAcと結合する部位であるとは

more likely that the homologous regions are involved in the transfer of GlcNAc in β 1-6 linkage and/or in the recognition of common features in the acceptor oligosaccharide structure.

The concept of multigene families based on sequence similarities has been introduced before for subgroups of glycosyltransferases. For instance, Joziase *et al.* (75) indicated the relationship between a human α 1-3-galactosyl-transferase pseudogene and the human ABO blood group glycosyltransferases (76). Similarly, four distinct members of a human α 1-3-fucosyltransferase gene family (Fuc-TIII, -IV, -V, and -VI) have now been cloned, three of which (Fuc-TIII, -V, and -VI) are localized on human chromosome 19 (77). Among three different members of the sialyltransferase gene family a homologous region of approximately 55 amino acids, possibly representing the CMP-sialic acid and/or the galactose acceptor binding site, has been identified in the center of the catalytic domain (78). Moreover, in all three sialyltransferase amino acid sequences cysteine residues were found at two conserved positions, which are possibly involved in a disulphide bond (79). Interestingly, the amino sequences for both C2GnT and IGnT also reveal several cysteine residues at conserved positions in the designated homologous regions indicated in Fig. 2 (52, 67).

E. Concluding Remarks

With the molecular cloning of cDNAs encoding C2GnT and IGnT, the molecular tools are now available to study their genomic relationship, the regulation of their expression during development and oncogenesis, and to define the role of their corresponding oligosaccharides in these processes. In the near future the isolation of additional members of the β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase gene family can be expected. The observed sequence similarity between C2GnT and IGnT, for instance, may be used in conjunction with the polymerase chain reaction or in cross-hybridization studies to identify new members of this family. Independently, amino acid sequence data obtained from purified enzyme preparations (*e.g.* rat kidney, human lung GnTV or bovine tracheal epithelial C2GnT/C4GnT/IGnT (32, 33, 51) and cDNA isolation utilizing these obtained amino acid sequences may lead to similar results. In fact, cDNA encoding GnTV was cloned from rat kidney (80) and human lung (81). These results show that GnTV is a relatively large protein with 741 amino acids and not homology was found between this and C2GnT or IGnT. Moreover, the human gene of GnTV was found to reside in chromosome 2. These results indicate that GnTV is a gene product distinct from the C2GnT gene family. Future studies of newly acquired members of the β 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase gene family will further enrich our knowledge in the regulation of their expression and the roles of the various β 1-6-N-acetylglucosamine linked oligosaccharides in develop-

考えにくい。むしろ、この相同性が見られるアミノ酸配列は、GlcNAcを β 1,6で転移することに関わっていたり、受容体の共通構造を認識する部位である可能性が高い。

配列の似ていることに基づいて、多遺伝子群が存在するという考え方は、糖転移酵素についてもすべてに報告が見られる。例えば、Joziaseらはヒトの α -1,3-ガラクトース転移酵素の擬遺伝子と、ABO血液型決定糖転移酵素との関連性を報告している(75)。同様に、 α -1,3-フコース転移酵素の遺伝子群の内の四つがすでにクローンされているが、そのうち三つ(Fuc-T III、V、VI)がヒトクロモソーム19にある(77)。シアル酸転移酵素のgene familyの内の3つの酵素は、アミノ酸の55残基からなる相同性のある領域が反応を司るドメインの真中に見い出されるが、これはCMP-シアル酸や受容体であるガラクトースの結合部位であろう(78)。更に三つのシアル酸転移酵素に共通して、二つのシステイン残基が同じところにあり、多分S-S結合によるループを形成していると考えられる(79)。更に興味深いことに、C2GnTとIGnTは、相同性のある領域で、数個のシステイン残基がやはり同じところにある(図2)(52、67)。

E. おわりに

C2GnTとIGnTのcDNAが得られたことにより、これらの遺伝子での相関や、発生や癌化に伴う遺伝子発現の調節を調べたり、発生や分化の過程で、産物であるオリゴ糖の役割を知ることが可能になってきた。更にごく近い将来に、 β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素群の他の酵素も見い出されることが期待される。例えば、C2GnTとIGnTに見い出された配列の相同性に基づいて、PCRやcross-hybridizationによって、新しい遺伝子を見い出すことができよう。これとは別に、ラットのGnTVやウシの気管支からのC2GnT(これはC4GnTとIGnTの活性を併せ持つ)に示されるように、精製された糖転移酵素のアミノ酸配列に基づいて、cDNAが単離できよう。実際、ラット腎とヒト肺からのGnTVのcDNAが単離された。その結果によると、GnTVは比較的大きく、741アミノ酸残基からなり、かつC2GnTやIGnTとのアミノ酸配列の類似性は認められなかった。更にヒトのGnTVは、クロモソーム2に存在することが分かっており、GnTVは、他の β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素とはまったく別の遺伝子からできていることが分かる。これらの新たに加わる β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素の遺伝子群を更に研究することにより、様々な β -1,6-N-アセチルグルコサミン結合してできるオリゴ糖の発生分化と癌化に伴う発現の調

ment and oncogenesis.

節機構や、その役割を一層明かにされることが期待される。

References

1. Yamashita, K., Ohkura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S. and Kobata, A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10834-10840
2. Pierce, M. and Arango, J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 10772-10777
3. Hiraizumi, S., Takasaki, S., Shiroki, K., Kochibe, N. and Kobata, A. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 9-19
4. Dennis, J.W., Kosh, K., Bryce, D.-M. and Breitman, M.L. (1989) *Oncogene* **4**, 853-860
5. Yousefi, S., Higgins, E., Daoling, Z., Pollex-Krüger, A., Hindsgaul, O. and Dennis, J.W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1772-1782
6. Santer, U.V., Gilbert, F. and Glick, M.C. (1984) *Cancer Res.* **44**, 3730-3735
7. Pierce, M., Arango, J., Tahir, S.H. and Hindsgaul, O. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 679-684
8. Arango, J. and Pierce, M. (1988) *J. Cell. Biochem.* **37**, 225-231
9. Yamashita, K., Tachibana, Y., Ohkura, T. and Kobata, A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3963-3969
10. Dennis, J.W. and Laferté, S. (1989) *Cancer Res.* **49**, 945-950
11. Easton, E.W., Bolscher, J.G.M. and Van den Eijnden, D.H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 21674-21680
12. Cummings, R.D., Trowbridge, I.S. and Kornfeld, S. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13421-13427
13. Fernandes, B., Sagman, U., Auger, M., Demetrio, M. and Dennis, J.W. (1991) *Cancer Res.* **51**, 718-723
14. Piller, F., Piller, V., Fox, R.I. and Fukuda, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15146-15150
15. Saitoh, O., Piller, F., Fox, R.I. and Fukuda, M. (1991) *Blood* **77**, 1491-1499
16. Brockhausen, I., Kuhns, W., Schachter, H., Matta, K.L., Sutherland, D.R. and Baker, M.A. (1991) *Cancer Res.* **51**, 1257-1263
17. Piller, F., Le Deist, F., Weinberg, K.I., Parkman, R. and Fukuda, M. (1991) *J. Exp. Med.* **173**, 1501-1510
18. Higgins, E.A., Siminovitch, K.A., Zhuang, D., Brockhausen, I. and Dennis, J.W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6280-6290
19. Van den Eijnden, D.H., Koenderman, A.H.L. and Schiphorst, W.E.C.M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 12461-12471
20. Maemura, K. and Fukuda, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 24379-24386
21. Fukuda, M., Spooncer, E., Oates, J.E., Dell, A. and Klock, J.C. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10925-10935
22. Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, R.P., Larsen, R.D., Berhend, T.L. and Marks, R.M. (1990) *Cell* **63**, 475-484
23. Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S. and Paulson, J.C. (1990) *Science* **250**, 1130-1132
24. Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M. and Seed, B. (1990) *Science* **250**, 1132-1135
25. Feizi, T., Childs, R.A., Watanabe, K. and Hakomori, S. (1979) *J. Exp. Med.* **149**, 975-980
26. Watanabe, K., Hakomori, S., Childs, R.A. and Feizi, T. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3221-3228
27. Fukuda, M., Fukuda, M.N. and Hakomori, S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3700-3703
28. Marsh, W.L. (1961) *Brit. J. Haemat.* **7**, 200-209
29. Kapadia, A., Feizi, T. and Evans, M.J. (1981) *Exp. Cell Res.* **131**, 185-195
30. Knowles, B.B., Rappaport, J. and Solter, D. (1982) *Dev. Biol.* **93**, 54-58
31. Kannagi, R., Levery, S.B. and Hakomori, S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2844-2848
32. Shoreibah, M.G., Hindsgaul, O. and Pierce, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 2920-2927
33. Gu, J., Nishikawa, A., Tsuruoka, N., Ohno, M., Yamaguchi, N., Kangawa, K. and Taniguchi, N. (1993) *J. Biochem.* **113**, 614-619
34. Wingert, W.E. and Cheng, P.-W. (1984) *Biochemistry* **23**, 690-697
35. Cheng, P.-W., Wingert, W.E., Little, M.R. and Wei, R. (1985) *Biochem. J.* **227**, 405-412
36. Williams, D. and Schachter, H. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 11247-11252
37. Williams, D., Longmore, G., Matta, K.L. and Schachter, H. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 11253-11261
38. Brockhausen, I., Matta, K.L., Orr, J. and Schachter, H. (1985) *Biochemistry* **24**, 1866-1874
39. Sangadala, S., Sivakami, S. and Mendicino, J. (1991) *Mol. Cell. Biochem.* **101**, 125-143
40. Yazawa, S., Abbas, S.A., Madiyalakan, R., Barlow, J.J. and Matta, K.L. (1986) *Carbohydrate Res.* **149**, 241-252
41. Sekine, M., Hashimoto, Y., Inagaki, F., Yamakawa, T. and Suzuki, A. (1990) *J. Biochem.* **108**, 103-108
42. Koenderman, A.H.L., Koppen, P.L. and Van den Eijnden, D.H. (1987) *Eur. J. Biochem.* **166**, 199-208
43. Piller, F., Cartron, J.-P., Maranduba, A., Veyrières, A., Leroy, Y. and Fournet, B. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13385-13390
44. Brockhausen, I., Matta, K.L., Orr, J., Schachter, H., Koenderman, A.H.L. and Van den Eijnden, D.H. (1986) *Eur. J. Biochem.* **157**, 463-474
45. Gu, J., Nishikawa, A., Fujii, S., Gasa, S. and Taniguchi, N. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 2994-2999
46. Basu, M. and Basu, S. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 12557-12562
47. Van den Eijnden, D.H., Winterterp, H., Smeeman, P. and Schiphorst, W.E.C.M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3435-3437
48. Koenderman, A.H.L., Koppen, P.L., Wijermans, P.W., Langenhuijsen, M.M.A.C. and Van den Eijnden, D.H. (1989) *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **108**, 369-373
49. Zielenski, J. and Koscielak, J. (1983) *FEBS Lett.* **158**, 164-168
50. Zielenski, J. and Koscielak, J. (1983) *FEBS Lett.* **163**, 114-118
51. Ropp, P.A., Little, M.R. and Cheng, P.-W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23863-23871
52. Bierhuizen, M.F.A. and Fukuda, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9326-9330
53. Seed, B. and Aruffo, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3365-3369
54. Aruffo, A. and Seed, B. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8573-8577
55. Gluzman, Y. (1981) *Cell* **23**, 175-182
56. Larsen, R.D., Rajan, V.P., Ruff, M.M., Kukowska-Latallo, J., Cummings, R.D. and Lowe, J.B. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8227-8231
57. Kukowska-Latallo, J., Larsen, R.D., Nair, R.P. and Lowe, J.B. (1990) *Genes & Dev.* **4**, 1288-1303

58. Larsen, R.D., Ernst, L.K., Nair, R.P. and Lowe, J.B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6674-6678
59. Goelz, S.E., Hession, C., Goff, D., Griffiths, B., Tizard, R., Newman, B., Chi-Rosso, G. and Lobb, R. (1990) *Cell* **63**, 1349-1356
60. Heffernan, M. and Dennis, J.W. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 85-92
61. De Chasseval, R. and De Villartay, J.-P. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 245-250
62. Nagata, Y., Yamashiro, S., Yodoi, J., Lloyd, K.O., Shiku, H. and Furukawa, K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 12082-12089
63. Inoue, N., Kinoshita, T., Orii, T. and Takeda, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 6882-6885
64. Asselbergs, F.A.M. and Grand, P. (1993) *Anal. Biochem.* **209**, 327-331
65. Sportsman, J.R., Park, M.M., Cheresch, D.A., Fukuda, M., Elder, J.H. and Fox, R.I. (1985) *J. Immunol.* **135**, 158-164
66. Fukuda, M.N., Dell, A., Oates, J.E. and Fukuda, M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 6623-6631
67. Bierhuizen, M.F.A., Mattei, M.-G. and Fukuda, M. (1993) *Genes & Dev.* **7**, 468-478
68. Paulson, J.C. and Colley, K.J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17615-17618
69. Schachter, H. (1991) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 755-765
70. Joiasse, D.H. (1992) *Glycobiology* **2**, 271-277
71. Fukuda, M.N., Watanabe, K. and Hakomori, S. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 6814-6819
72. Kumar, R., Yang, J., Larsen, R.D. and Stanley, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9948-9952
73. Sarkar, M., Hull, E., Nishikawa, Y., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Dunn, R. and Schachter, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 234-238
74. Nishikawa, A., Ihara, Y., Hatakeyama, M., Kangawa, K. and Taniguchi, N. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18199-18204
75. Joiasse, D.H., Shaper, J.H., Jabs, E.W. and Shaper, N.L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6991-6998
76. Yamamoto, F., Clausen, H., White, T., Marken, J. and Hakomori, S. (1990) *Nature* **345**, 229-233
77. Weston, B.W., Smith, P.L., Kelly, R.J. and Lowe, J.B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 24575-24584
78. Wen, D.X., Livingston, B.D., Medzihradzky, K.F., Kelm, S., Burlingame, A.L. and Paulson, J.C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 21011-21019
79. Drickamer, K. (1993) *Glycobiology* **3**, 2-3
80. Schoreibah, M.G., Perng, G.-S., Adler, B., Weinstein, J., Basu, R., Cupples, R., Wen, D., Browne, J.K., Buchkhaults, P., Fregien, N., and Pierce, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15381-15385
81. Sqaito, H., Nishikawa, A., Fu, J., Ihara, Y., Soejima, H., Wada, Y., Sekiyama, C., Niikawa, N., and Taniguchi, N. (1994) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* in press

Received on July 29, 1993, accepted on August 20, 1993