薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
112 (6) 375-392 (1992)

糖タンパク質の *N*-結合糖鎖の癌性変化とその臨床応用. 形質膜糖タンパク質の問題を中心に

木幡 陽

東京大学医科学研究所, 〒108 東京都港区白金台 4-6-1

Structural Alterations of the *N*-Linked Sugar Chains of Glycoproteins Produced by Tumor Cells and Their Clinical Application

Akira KOBATA

*Institute of Medical Science, University of Tokyo, Shirokanedai,
Minato-ku, Tokyo 108, Japan*

Enrichment of complex type *N*-linked sugar chains containing the Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 6(Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 2)Man group was found to be the structural background of Warren-Glick phenomenon. This alteration is induced by enhanced expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in malignant cells. The phenomenon is positively correlated with the tumorigenicity and the potency of blood-borne metastasis of tumor cells. Further investigation of the surface sugar chains of lectin mutants of mouse B16 melanoma revealed that the occurrence of sialylated tetraantennary sugar chains is essential for the metastasis of tumor cells.

Keywords—tumor; plasma membrane glycoprotein; *N*-linked sugar chain; B16 melanoma; *N*-acetylglucosaminyltransferase; fibroblast; metastasis; tumorigenicity; lectin mutant; lysosome-associated membrane protein-1; fibronectin receptor

1. はじめに

1969 年に Meezan ら¹⁾はマウス 3T3 細胞とこれを SV40 で悪性化した SV-3T3 細胞をラジオアイソトープ標識グルコサミンで代謝標識したのち形質膜画分をとり, これをプロナーゼで徹底的に消化して得た糖ペプチドをセファデックス G-50 のカラムで分析すると, SV-3T3 の方が分子量の大きい糖ペプチドが検出されることを報告した. その後 Warren のグループは, アイソトープ標識した細胞をまず緩やかなトリプシン消化にかけて膜糖タンパク質の大半を細胞から遊離させ, これをプロナーゼで徹底消化するという便法を使っても上記の現象を観察出来ることを見出し, この手法で様々な培養細胞とそれらを悪性化したものの比較分析を行った. その結果, いずれも細胞の癌化に伴い分子量の大きな糖鎖が出現すること, この現象がグルコサミン標識よりフコース標識法を用いた方がより顕著に観察されることなどが判明した²⁻⁵⁾ (Fig. 1).

この高分子のフコース含有糖鎖の出現は, ウイルスで悪性化した細胞に限らず化学発癌剤で悪性化した細胞や, 自然に癌化した培養細胞でも認められる.⁶⁾ またラウス肉腫ウイルス (RSV) の温度変異株で悪性化した細胞では, 許容温度においてのみ高分子糖鎖の出現が認められることから, この現象は細胞の癌化のプロセスと密接につながっているものと考えられ, この現象を最も手広く研究して来た研究者達の名を冠して, Warren-Glick 現象の名で呼ばれるようになった.

さて Warren らは Fig. 1 に示された溶出パターンの違いが糖ペプチドをシアリダーゼで消化す

本総説は, 平成 4 年度日本薬学会学術賞の受賞業績の一部を中心に記述したものである.

ると消失することを根拠に、糖鎖のシアル酸含有量の差が両細胞の糖ペプチドパターンの違いを生み出していると結論した.⁷⁾ すなわち癌細胞では正常細胞に比べてシアル酸転移酵素の活性が高く、このために癌細胞の糖タンパク質糖鎖のシアル酸含量が正常のものより高くなり、高分子量糖ペプチドとして検出されるというわけである。

Warren らのこの仮説を証明するために、癌細胞と正常細胞のシアル酸転移酵素活性を比較する研究がいくつかの研究室で進められた。しかし得られた結果はまちまちで、細胞の癌化に伴いシアル酸転移酵素活性が上昇するという結論は得られていない。

2. 高分子量糖ペプチドの実態. Con A セファロースカラムによる解析

Concanavalin A (Con A) は Fig. 2 に示すような構造に親和性を示す.⁸⁾ したがって糖タンパク質の糖鎖に含まれる Man α 1 $\rightarrow$, Glc α 1 $\rightarrow$, GlcNAc α 1 $\rightarrow$ 残基が Con A と結合することになる。我々は糖タンパク質の *N*-結合糖鎖が Man α 1 $\rightarrow$ 残基を含むことから、この糖鎖の構造研究に Con A-セファロースカラムを使うことを目論んで、同カラムにおける *N*-結合糖鎖群の挙動を調べる系統的な研究を進めた。その結果判明した重要な事実、Con A と反応する残基が分子内に 2 つ以上無いとカラムに結合しないということである。⁹⁾ Fig. 3 に代表的な *N*-結合糖鎖が示してあるが、この中で下線を付したマンノース残基が Con A と親和性を持っている。これらの糖鎖群で 2 ケ以上の結合残基を持った 1 本鎖と 2 本鎖は Con A-セファロースカラムに結合するが、3 本鎖以上はカラムを素通りするわけである。この Con A カラムの結合特性は、以来多くの研究室で *N*-結合糖鎖の分画や構造決定に広く用いられるようになった。

我々は代謝標識法を利用して Fig. 1 の GP-I と GP-II がマンノースを含む *N*-結合糖鎖であることを確認した後に、これら糖ペプチドの Con A カラムにおける挙動を調べて見た。¹⁰⁾ まず baby hamster kidney (BHK) 細胞及びこれをポリオーマウイルスで悪性化した Py-BHK 細胞から得た GP-I を Con A-セファロースカラムにかけると、ともに約 70% がカラムに結合し、0.1 M α -メチルマンノピラノシドで溶出された (Fig. 4a, b)。これに対し Py-BHK から得た GP-II はカラムを素通りした (Fig. 4c)。次に両糖ペプチドをシアリダーゼで消化した後に再び Con A-セファロースカラムにかけると、GP-I は相変わらずカラムに結合するが、GP-II はカラムを素通りした (Fig. 4d)。この結果は GP-I と GP-II の間にはシアル酸を除いた部分に明白な構造上の違いがあることを示すもので、その違いがシアル酸の含量にあるとした Warren らの推論を完全にくつがえすものである。さきにのべた Con A カラムの結合特性をもとに考えると、GP-I は 2 本鎖複合型で、GP-II は 3 本鎖以上の複合型と予想された。しかし Warren-Glick 現象を引き起こしている具体的な糖鎖構造の変化を解明するには、新しい *N*-結合糖鎖の構造解析技術の開発を待たねばならなかった。

Fig. 1. Gel Permeation Chromatography of Radioactive Glycopeptide Fractions Obtained from Fucose Labeled Cell Surface Glycoproteins by Exhaustive Pronase Digestion⁹⁾

●---●, BHK cells; ○---○, Py-BHK cells. Arrows indicate the elution positions of authentic samples: V₀, void volume; Glc, glucose.

Fig. 2. Structure Recognized by Con A

Fig. 3. Branching Structures of Complex Type Sugar Chains
Underlined mannose residues can interact with Con A.

3. 糖タンパク質 N-結合糖鎖構造解析技術の確立

糖タンパク質の糖鎖構造決定が糖脂質の場合と大きく異なる点は、糖脂質が1分子に1本の糖鎖しか含まないのに対し、糖タンパク質の多くは複数の糖鎖を持っており、しかも糖鎖構造にミクロ不均一性が存在していることである。このために、精製された糖タンパク質は異なる構造の糖鎖を持った分子の混合物であり、構造決定のためにはまず個々の糖鎖を分離する必要がある。

O-結合糖鎖の場合はこの目的のために高濃度の NaBH_4 の共存下でアルカリ分解にかけて、糖鎖を少糖アルコールとして遊離する β -脱離反応¹¹⁾ (β -elimination) が考案され広く使われて来た。N-結合糖鎖にはこのような便利な方法が無いため、もっぱら Warren-Glick 現象の発見に使われたプロナーゼで徹底的に消化して得た糖ペプチドを分画し、糖鎖の構造研究に供する方法が使われて来た。しかしこの方法の問題点はプロナーゼによる消化が不完全で、得られる糖ペプチドがペプチド部分の不均一なものの混合物である点にあった。糖鎖部分とペプチド部分に不均一性が存在する糖ペプチドの混合物から均一な糖鎖を持ったサンプルを得ることは極めて難しい。我々はこの問題を解決するために、N-結合糖鎖の根本に共通に存在する $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}$ 部分を水解切断する様々なエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ群を使って糖鎖を少糖として遊離し、これを $\text{Na-B}^3\text{H}_4$ で定量的に還元標識して分画し、個々の少糖について構造解析を進めた。¹²⁻¹⁵⁾ この一連の研

Fig. 4. Con A-Sepharose Column Chromatography of Radioactive Glycopeptide Fractions Shown in Fig. 1⁹⁾

The column was first eluted with 0.01 M Tris-HCl buffer, containing 0.1 M NaCl, pH 7.5, and then with the same buffer containing 0.1 M α -methylmannopyranoside (MM). a, Fraction GP-I from BHK cells; b, GP-I from Py-BHK cells; c, GP-II from Py-BHK cells; d, GP-II digested with sialidase (dotted line) and then with a mixture of jack bean β -galactosidase and β -N-acetylhexosaminidase (solid line).

Fig. 5. Subgroups of N-Linked Sugar Chains

1, Complex type sugar chain; 2, high mannose type sugar chain; 3, hybrid type sugar chain. Structures within the solid line are common trimannosyl core and that within the dotted line is the common core of high mannose type sugar chains.

究によって Fig. 5 に示す 3 群の N-結合糖鎖のサブグループのうち、高マンノース型 (high mannose type) と混成型 (hybrid type) に属する糖鎖群の構造的特徴の全貌が明らかになった。高マンノース型糖鎖には $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ という 7 糖が共通の母核として含まれており、一番大きいものが $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ という 11 糖であるという重要な知見もこうして得られたものである。しかしこれら酵素群には厳密な基質

特異性があるために、*N*-結合糖鎖の大半を占める複合型糖鎖 (complex type) の構造研究には使えないことも判明した。¹⁶⁾ そこで改めて化学的な *N*-結合糖鎖遊離法の研究が進められ、ヒドラジン分解法が確立された。¹⁷⁾ この方法は精製した糖タンパク質ばかりでなく、サンプルの脱水方法さえ工夫すれば細胞や組織からもすべての *N*-結合糖鎖を定量的に少糖として遊離することが出来るので、細胞の分化や癌化に伴う糖鎖パターンを調べる上で極めて有効な技術となった。

ヒドラジン分解法で遊離する少糖群もすべて *N*-アセチルグルコサミンを還元末端に持っているので、 NaB^3H_4 で還元して定量的に ^3H 標識少糖アルコールに変えることにより、以後の分画や構造研究における検出を容易にすることが出来る。この段階のサンプルは ^3H 標識少糖の混合物であるから、構造研究に先立ってまず個々の少糖を分離する必要がある。この目的のために糖鎖に含まれるシアル酸や硫酸基、リン酸基などの荷電を利用した沝紙電気泳動法やイオン交換クロマトグラフィー、糖鎖のサイズや物性を利用したゲル沝過法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などが開発された。これに加えて不溶化レクチン群のカラムを使った親和性クロマトグラフィーが極めて有効な少糖分画手段として使われはじめている。¹⁸⁾ Table I に結合特異性が明確に解明されているレクチンカラム群の認識構造がまとめてある。少糖群のこれらレクチンカラムにおける挙動は、Table I に示された構造要求性さえ満たされておれば他の部分の構造にはほとんど左右されないので、適切なレクチンカラムの組み合わせによって個々の少糖を単一にまで精製することも可能である。

TABLE I. Carbohydrate Binding Specificities of Immobilized Lectin Columns

Lectins	Binding specificities
RCA	Complex type sugar chains with more than two $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ outer chains > those with one $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ outer chain
DSA	<p>Strong binding</p> $\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \begin{array}{l} \nearrow 6 \\ \searrow 2 \end{array} \text{Man} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \begin{array}{l} \nearrow 2 \\ \searrow 4 \end{array} \text{Man} \end{array}$ <p>($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3$)_n - $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$</p> <p>Weak binding</p> $\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \begin{array}{l} \nearrow 4 \\ \searrow 2 \end{array} \text{Man} \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \begin{array}{l} \nearrow 2 \\ \searrow 4 \end{array} \text{Man} \end{array}$
E ₄ -PHA	<p>Column operation at 20°C</p> $\begin{array}{c} \text{R} \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \nearrow 6 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R} \\ \text{R} \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \begin{array}{l} \nearrow 4 \\ \searrow 2 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \nearrow 3 \\ \searrow 2 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R} \end{array}$ <p>Column operation at 2°C</p> $\begin{array}{c} \text{R} \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \nearrow 6 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R} \\ \text{R} \rightarrow 4\text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R} \\ \text{R} \begin{array}{l} \nearrow 3 \\ \searrow 2 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \nearrow 3 \\ \searrow 2 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R} \end{array}$
AAL	Complex type and hybrid type sugar chains with fucosylated trimannodyl core
Allo A	<p>Strong binding</p> $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$ <p>Weak binding</p> $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$

R represents either hydrogen or sugars.

分画された少糖の構造解析はエキソグリコシダーゼ群による逐次消化法, メチル化分析法, スミス分解法などを適宜組み合わせることにより的確に進めることが出来る.¹⁹⁾

4. Warren-Glick 現象の構造的実態とその酵素学的背景

ヒドラジン分解法の開発によって細胞表面糖タンパク質の糖鎖パターンを調べることが可能となったのを機に, 我々は Warren-Glick 現象の構造的実態の解明にとりかかった. BHK 細胞と Py-BHK 細胞の形質膜をとり, これからアセトン粉末を調製してヒドラジン分解にかけ, 遊離した少糖群を比較分析した.²⁰⁾

乾燥粉末 90 mg から得られた ^3H 標識少糖の放射活性は, BHK 細胞で 1.2×10^6 cpm, Py-BHK 細胞で 1.1×10^6 cpm とほぼ等しかった. これら少糖画分を分画後構造解析した結果を Table II に

TABLE II. Proposed Structures of *N*-Linked Oligosaccharides Liberated from Membrane Glycoproteins of BHK and Py-BHK Cells and Their Percent Molar Ratio²⁰⁾

Oligosaccharide structures	BHK	Py-BHK
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	26%	22%
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	10%	> 4%
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	3%	< 6%
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	5%	< 15%
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	16%	< 25%

R = $4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 (\pm \text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6) \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$

Fig. 6. *N*-Acetylglucosaminyltransferases (GnTs) Responsible for the Formation of Complex Type Sugar Chains

TABLE III. (Continued)

B

Acceptors	GnTs	BHK	Py-BHK	Py-BHK/BHK
M ₂ ·GN	I	100	100	1.0
M ₅ ·GN	I	1470	1436	0.98
M ₃ ·GN	I and II	1480	1635	1.10
GN ₂ ·M ₃ ·GN	IV	43	40	0.93
	V	13	44	3.38
GN ₃ ·M ₃ ·GN	V	24	69	2.82
G ₄ ·GN ₄ ·M ₃ ·GN	VI	45	48	1.07

まとめてある。両細胞の糖鎖構造に質的な違いは認められなかったが、次のような注目すべき事実が明らかになった。すなわち複合型の糖鎖において 2 本鎖や 2,4-分岐を持った 3 本鎖の量が減少し、逆に 2,6-分岐を持つ 3 本鎖と 4 本鎖の量が 2—3 倍に増えていたのである。また、側鎖部分に Galβ1→4GlcNAc の繰り返し構造を持つものもわずかながら上昇していた。

N-結合糖鎖の生合成機構の研究により、複合型糖鎖の枝分れや側鎖の伸長には Fig. 6 に示すような様々な N-アセチルグルコサミン転移酵素群 (GnT) が関与していることが判明している。そこで我々は Warren-Glick 現象の酵素学的背景をさぐる目的で、BHK 細胞及び Py-BHK 細胞のホモジネート中の各種 GnT 活性を比較分析した。²¹⁾ この目的のためには個々の酵素を精製することなく、ホモジネート中の酵素活性を正しく測定する必要がある。幸い糖転移酵素群には極めて高い基質特異性があるので、適当な構造の少糖を基質に選べば特定の糖転移酵素の活性をかなり正確に測定することが出来る。

Table III A に示した 6 種類の少糖はいずれも マンノシド²²⁾や G_{M1} ガングリオシド²³⁾等の先天性グリコシダーゼ欠損症患者の尿から分離精製した少糖、及びこれらを β-ガラクトシダーゼ消化して得たものである。これらの少糖を基質にして細胞のホモジネートを酵素源にし、uridine diphosphate-[³H]GlcNAc からの [³H]N-アセチルグルコサミンの転移を調べると、Table III A の第 3 列に示したような産物が得られる。すなわち個々の少糖を基質に使うと Table III B の第 2 列に示した GnT 活性を選択的に測定することが出来るわけである。そこで BHK 細胞と Py-BHK 細胞のホモジネート中の個々の GnT の活性を測定すると、Table III B の第 3 列以下のようなデータが得られた。なお、両細胞とも GnT III の活性は検出されなかった。両細胞の個々の GnT 活性の比をとると、GnT I, II, IV, VI には差が認められないが、GnT V は Py-BHK 細胞で活性が増大していることが判明した。

Fig. 7 に複合型 N-結合糖鎖生合成のネットワークが示してある。Table III の結果は、このネットワークの中で GnT V の関与する 2 つの経路 (太矢印で示してある) が Py-BHK 細胞で促進されていることを示すものである。したがってこの悪性化細胞では GlcNAcβ1→6Manα1→6 グループを持った複合型糖鎖の比率が増大することになる。

一方 Van den Eijnden と Schiphorst²⁴⁾ は側鎖の伸長に関与する GnT-VI の基質特異性を詳しく調べて、この酵素が Galβ1→4GlcNAcβ1→6 (Galβ1→4GlcNAcβ1→2)Man という 5 糖構造に最も良く働いて、末端のガラクトースの C-3 位に N-アセチルグルコサミンを転移することを明らかにした。したがって Py-BHK 細胞で起こる GlcNAcβ1→6Manα1→6 グループを持った糖鎖の増加は、Galβ1→4GlcNAc の繰り返し側鎖の比率の増加をも引き起こすことになる。こうした状況は、N-結合糖鎖構造の比較分析で得た Table II の違いをうまく説明するものである。

その後、Pierce と Arango²⁵⁾ が RSV で悪性化した BHK 細胞における Warren-Glick 現象も、Py-BHK と全く同様に GnT V の活性上昇のみによって引き起こされていることを示した。した

Fig. 7. Pathway Showing the Synthesis of Complex Type Sugar Chains

Enclosed GlcNAcs are the *N*-acetylglucosamine residues added by the GnT. Gal T, β -galactosyltransferase.

がって GnT V の活性上昇は広く Warren-Glick 現象の酵素学的背景をなしていると考えてよからう。

5. 癌細胞の造腫瘍性と Warren-Glick 現象の相関

ところで Warren-Glick 現象が細胞の悪性化と密接に関係することは広く知られているが、悪性細胞と考えられている形質転換細胞のすべてにこの現象が認められるわけではない。例えばマウス線維芽細胞 NIH3T3 に SV40 の初期遺伝子断片を導入して得られた形質転換細胞株 MT1 は、軟寒天培地で増殖する性質からは悪性細胞と判断されるが、Warren-Glick 現象はほとんど認められない。こうした事実から、我々はこの現象が細胞の悪性化の指標として癌遺伝子群の探索に使われて来た静置培養での細胞の重なり合いや、軟寒天培地での増殖といった性質ではなく、造腫瘍性や転移性といったより高次の悪性度と関連しているのではないかと考えた。

そこで細胞の悪性化に最小限必要なポリオーマウイルス属の初期遺伝子断片のみを NIH-3T3 に導入して得た形質転換細胞群^{26,27)}の中から、MT1 とは腫瘍形成能の異なる MTPy と MTA_g を選り出し、その表面糖タンパク質の糖鎖を比較分析した。これらの細胞は共に軟寒天培地で同様に増殖するが、ヌードマウスの皮下に移植したときにみられる造腫瘍能を調べると、Fig. 8 に示すような顕著な違いが認められた。また、これらの細胞をマウスの尾静脈に注入した後に各種臓器を調べたところ、MTA_g 細胞の場合にのみ肺への転移巣形成を認めた。そこで肺転移の細胞数依存性を調べたところ、 2.0×10^5 細胞注入では 24 日目に 4 例すべてに、 8.0×10^4 細胞注入でも 32 日目で 3 例

すべてに肺転移が認められた。一方 2.0×10^5 ケの MTPy, MT1, 又は NIH3T3 細胞を注入したマウスでは転移巣の形成は一切認められなかった。このように造腫瘍性、転移性の面で顕著な違いのある 3 種の形質転換細胞の *N*-結合糖鎖を比較分析したところ、2,6-分岐を持った複合型糖鎖の比率が NIH3T3 と MT1 では 20% とほとんど差が認められなかったが、MTPy では 31%, MTA_g では 39% と悪性度の増加に相関して増加していることが明らかになった。⁴²⁾

Fig. 8. Growth Rates of Malignant Cells

形質転換細胞の悪性度と Warren-Glick 現象の相関の普遍性を探るため、我々はさらにラットの線維芽細胞 3Y1 にアデノウイルス 12 型 (Ad12) の deoxyribonucleic acid (DNA) の分削を導入して得た軽度から重度の悪性度を示す一連の形質転換細胞を材料に、この問題を探って見た。²⁸⁾ 強い悪性化能を持つヒト癌ウイルスの 1 つである Ad12 の DNA には、初期遺伝子領域に *E1A* と *E1B* という 2 つの癌遺伝子が含まれている。*E1A* は細胞の悪性化のイニシエーターとして働き、*E1B* は悪性化形質の発現とその維持の役割を果している。しかし 3Y1 細胞にこの 2 つの癌遺伝子を導入しても、Ad12 の全 DNA を導入した細胞に比べると悪性度が不完全である。このことから Ad12 のほかの遺伝子の悪性化に対する役割が探索された結果、*E4* 遺伝子の発現も細胞の悪性化に必要であることが判明した。²⁹⁾

3Y1 細胞に *E1A* と *E1B* を含む Ad12 の DNA 分削を導入した E1Y 細胞と、*E1A*, *E1B*, *E4* を含む分削を導入した CY1 細胞の性質をまとめたのが Table IV である。*E1A* 遺伝子と *E1B* 遺伝子の発現している E1Y 細胞では低血清培地での増殖は 3Y1 細胞より大きく亢進しているが、軟寒天培地ではコロニーを形成出来ず、造腫瘍性もほとんど見られない。一方、*E1A*, *E1B*, *E4* 遺伝子群の発現している CY1 細胞では、軟寒天培地でも盛んなコロニー形成が見られ、また造腫瘍性も高い。

これら細胞群と親細胞株 3Y1 の形質膜糖タンパク質 *N*-結合糖鎖のパターンを比較分析すると、2,6-分岐を持つ複合型糖鎖群の増大が E1Y では余り顕著ではないが、CY1 では極めて強く起こっ

TABLE IV. Characteristics of Cell Lines²⁸⁾

Cell lines	mRNA ^{a)}				Growth in 2% serum ^{b)}	Colonies in soft agar ^{c)}	Tumor formation in rats ^{d)}
	<i>E1A</i>	<i>E1B</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>			
3Y1	—	—	—	—	1.0	—	—
E1Y	+	+	—	—	4.6	—	±
CY1	+	⦚	+	+	5.6	⦚	⦚

a) Transcription of the gene is either detected (+), strongly detected (⦚), or not detected (—) by the gene-specific probes.

b) Growth rates at logarithmic phase are relatively expressed by taking the value of 3Y1 cells as 1.0.

c) Transformed cells were cultured in soft agar at 10^2 , 10^3 , 10^4 cells per dish, and colony formation was observed at 3 weeks after cell seeding. (—), No colony formation; (⦚), formation of colonies larger than 1 mm in diameter.

d) Transformed cells (2×10^6 cells) were transplanted subcutaneously into newborn Fischer rats within 24 h after birth; (±), no tumor formation at 60 d after transplantation but formation of tumors in about 20% of rats at 240 d; (⦚), tumor formation in more than 50% of the rats at 60 d; (—), no tumor formation at 240 d.

ていることが判明した (Table V). すなわち正常細胞への Ad12DNA の様々な分削の導入は細胞形質膜糖タンパク質の *N*-結合糖鎖の形成に色々な影響を与えるが, GnTV の発現上昇には *E1* 領域と *E4* 領域の遺伝子の発現が必要で, これが形質転換細胞の造腫瘍性と密接に関連しているわけである.

6. 癌細胞の転移性と Warren-Glick 現象の相関

Dennis ら³⁰⁾ はマウスの乳癌細胞群の転移性と蛍光標識した赤インゲン豆の白血球凝集素 (L-PHA) による染色性の間に, 高い正の相関があることを報告した. L-PHA は 2,6-分岐を持った複合型糖鎖と特異的に反応するので, この結果は癌細胞の転移性が Warren-Glick 現象と密接に関連していることを示すものである.

そこで我々もコロニー形成能や転移能が異なる多くのクローンが作り出されているマウス B16 メラノーマを材料に選んでこの問題を研究して見ることにした. 癌の転移機構を考えて見ると, Fig. 9 に示すように 1, 癌化した細胞の親組織からの離脱; 2, 癌細胞の循環系への侵入; 3, 癌細胞の循環系よりの脱出; 4, 癌細胞の他組織への定着と増殖という一連の要素が考えられる. 我々が研究対象に選んだのは F1, F10, BL6, W1-4, C4-1 の 5 種の株である.³¹⁾ これらメラノーマ細胞株の転移能をマウスに, 尾静脈注射 (実験 1) 及び, 足裏に注射 (実験 2) して一定期間後に肺に形成したコロニー数で調べたデータが Table VI にまとめてある. 実験 1 では Fig. 9 の要素 3 以降の過程を調べたものであり, また実験 2 では要素 2 以降の過程を追ったことになる. F10 は Fidler らによって F1 の中から血行性転移能の高いものとして選び出されたもので,^{32,33)} 確かに実験 1 では高い肺転移を示すが 2 の実験では弱い転移能しか示さない. BL6³⁴⁾ は同じく Fidler らによって F10 から

TABLE V. Characteristics of *N*-Linked Sugar Chains Liberated from 3Y1 Cells and the Transformed Cells²⁸⁾

Oligosaccharides	Percentage molar ratios		
	3Y1	E1Y	CY1
High mannose type	25.2	31.8	24.9
Complex type			
Biantennary	45.6	28.4	28.1
Triantennary			
2,4-Branched	8.0	12.4	9.8
2,6-Branched	2.4	3.9	6.1
Tetraantennary	3.5	5.9	10.6
Tetraantennary ^{a)}	5.9	5.5	6.6

a) Containing *N*-acetylglucosamine repeating units.

Fig. 9. Metastatic Process of Malignant Cells

TABLE VI. Metastatic Ability of B16 Melanoma Clones⁸¹⁾

Cell	No. of pulmonary colonies/mouse		
	1×10 ⁵ cells i.v. injection ^{a)}	1×10 ⁶ cells i.v. injection ^{a)}	1×10 ⁶ cells i.f.p. injection ^{b)}
F1	0, 1, 2, 4	17, 35, 59	0, 0, 0
F10	22, 86, 94, 163, >200	N.E. ^{c)}	0, 2, 6
BL6	70, 85, 117, 131, 157	N.E.	6, 11, 34
W1-4	0, 0, 0, 0, 0	0, 2, 2	0, 0, 0
C4-1	0, 0, 1, 1, 2	10, 14, 52	0, 2, 2

a) Mice were given injections of 1×10⁵ or 1×10⁶ viable cells in the tail vein, and killed 15 d later.

b) Mice were given injections of 1×10⁶ viable cells in the footpad of the right foreleg. The forelegs were amputated 15 d later, and the mice were killed 4 weeks later.

c) N.E., not examined.

TABLE VII. Comparison of Sugar Chains among Five Clones⁸¹⁾

Sugar chain	Percent molar ratio ^{a)}				
	F1	F10	BL6	W1-4	C4-1
Acidic sugar chains					
Tetraantennary					
Without repeating	11	15	17	6	9
With repeating ^{b)}	2	3	2	2	3
Incomplete ^{c)}	6	6	5	8	9
Triantennary					
2,4-Branched	6	8	8	5	7
2,6-Branched	3	2	3	3	3
Incomplete ^{c)}	2	2	2	3	3
Biantennary	8	6	6	9	6
Neutral sugar chains					
High mannose type	48	46	47	50	46

a) Percent molar ratio to the total *N*-linked sugar chains. The fractions which were not fully analyzed because of low contents are not included in the table.

b) Oligosaccharides in this fraction have *N*-acetylglucosamine repeating units on their outer chains.

c) Oligosaccharides in these fractions are partially galactosylated. Since "incomplete" tetra- or triantennary sugar chains in the DSA⁻AAL⁻ fractions were too small to analyze, they were not included.

誘導された細胞株で、親株より 2 の実験で肺への転移能が高いものである。W1-4 は基生研の江口ら³⁵⁾によって F1 から得られた転移能の低い株であり、C4-1 は W1-4 のサブクローンで、実験 1 の転移能が再上昇した株である。³⁶⁾ これら細胞株の *N*-結合糖鎖を比較分析して見ると、5 種類の細胞間で細胞当りの糖鎖の本数にはほとんど差が無く、また定性的な違いも認められないが、量的には Table VII に示すような違いが検出された。

まず中性糖鎖の大半を占める高マンノース型糖鎖の含量にはほとんど差が認められなかった。また、Table には示していないがシアル酸を含む糖鎖の比率やシアル酸の結合にも違いが認められなかった。これらの結果は F1, F10 並びに B16 細胞の転移性及び非転移性のサブクローン間に *Vibrio cholerae* のシアリダーゼやニューカッスル病ウイルスのシアリダーゼ (Neu5Aca2→3Gal のみを水解する) によるシアル酸の遊離量に差が無いとした Passaniti と Hart³⁷⁾ の報告とよく一致するものである。

これに対し、複合型糖鎖には違いがあり、側鎖部分に Galβ1→4GlcNAc の繰り返し構造が無い

4本鎖複合型糖鎖の含量が、メラノーマ細胞の実験1による肺転移能との間に密接な相関を持って増加していることが分かる。すなわちコロニー形成能の高いF10とBL6細胞では、形成能の低いW1-4に比べると2.5—2.8倍の含量を示している。これに対し、コロニー形成能が中程度のF1細胞ではW1-4の1.8倍である。W1-4からコロニー形成能がF1並みに復帰したC4-1細胞では、やはりこの4本鎖の量が1.5倍に上昇していた。

興味深いことにGal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ を側鎖に含みぬ4本鎖複合型糖鎖の量は、実験2による肺転移能とは必ずしも相関しない。同転移能の高いBL6は転移能の低いF10とほぼ同じレベルの糖鎖を含むにすぎないし、F10と同程度の転移能を示すC4-1では同糖鎖の含量は転移能の無いF1よりもむしろ低いのである。これらの結果は、繰り返し側鎖の無い4本鎖複合型糖鎖の増加が、癌細胞の循環系への侵入とは関係が無く、むしろ肺という場でのコロニー形成と直接関係していることを示すものと思われる。

ところでこれまでのべて来た糖鎖構造の解析はシアル酸を除去したものについて行われて来た。以下に紹介する研究結果は癌細胞の転移に関して、シアル酸を持った4本鎖複合型の発現が重要であることを示すものである。

レクチンを細胞の培養系に加えると、細胞間に架橋が起こるために、細胞は増殖出来ず死滅する。細胞を適当な変異剤を加えた培地で培養後、レクチンを含む培地に移すと、表面糖タンパク質の糖鎖構造に変化を起こしてレクチンとの反応性を失った変異株だけが増殖して来る。このようにして得た変異株には糖鎖生合成経路に異常を起こしたものが多いので、糖鎖の機能的役割を探る上で良い材料となる。

TaoとBurger^{88,89)}はB16メラノーマのF1株から得たWGA抵抗株Wa4-b1やヒマレクチン(RCA)抵抗株,R4c-aで肺やリンパ節への転移能が顕著に低下していることを見出した。Finneら⁴⁰⁾はWa4-b1細胞をプロナーゼ消化して得た糖ペプチドを調べて、X抗原を含む糖鎖が存在する

TABLE VIII. Proposed Structures of Neutral and Asialo-oligosaccharides from B16-F1 Cells and Their Mutants

Structures	Molar ratio (%)				
	Parent	WGA-R	Ricin-R		
$(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow)_{4-n}$	$n=0$	28	3	15	
$(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow)_n$ $\text{Fuc}\alpha 1 \nearrow^3$	$\left\{ \begin{array}{l} \begin{array}{c} \text{6} \\ \text{2} \end{array} \text{Man}\alpha 1 \nearrow \begin{array}{c} \text{6} \\ \text{3} \end{array} \text{Man}\beta 1\rightarrow 4\text{R} \\ \begin{array}{c} \text{4} \\ \text{2} \end{array} \text{Man}\alpha 1 \nearrow \end{array} \right.$	1	—	3	—
	2	—	6	—	
	3	—	7	—	
	4	—	6	—	
$(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow)_{3-n}$ $(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow)_n$ $\text{Fuc}\alpha 1 \nearrow^3$	$n=0$				
	$\left\{ \begin{array}{l} \text{2,6-tri} \\ \text{2,4-tri} \end{array} \right.$	4	1	5	
		10	1	8	
	and				
$(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow)_{3-n}$ $(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow)_n$ $\text{Fuc}\alpha 1 \nearrow^3$	$\left\{ \begin{array}{l} \begin{array}{c} \text{6} \\ \text{2} \end{array} \text{Man}\alpha 1 \nearrow \begin{array}{c} \text{6} \\ \text{3} \end{array} \text{Man}\beta 1\rightarrow 4\text{R} \\ \begin{array}{c} \text{2} \\ \text{4} \end{array} \text{Man}\alpha 1 \nearrow \end{array} \right.$	1	—	3	—
	2	—	5	—	
	3	—	4	—	
	$\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \nearrow \begin{array}{c} \text{6} \\ \text{3} \end{array} \text{Man}\beta 1\rightarrow 4\text{R}$		8	9	17
$\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \nearrow \begin{array}{c} \text{6} \\ \text{3} \end{array} \text{Man}\beta 1\rightarrow 4\text{R}$					
hybrid		4	4	5	
high mannose		42	46	46	

R=GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 4($\pm$ Fuc α 1 $\rightarrow$ 6)GlcNAc

Fig. 10. Alteration of the *N*-Linked Sugar Chains of Surface Glycoproteins of the Two Lectin Mutants Obtained from F1 Cell Line

こと、シアル酸を含む糖鎖が減少していること等を見出した。

我々は Warren-Glick 現象と癌の血行性転移能のつながりを更に詳しく解明する目的で、Wa4-b1 と R4c-a 並びに親株 F1 細胞の形質膜糖タンパク質の *N*-結合糖鎖パターンを比較分析して見た。^{41,42)} 結果は Table VIII に示す通りである。まず Wa4-b1 細胞であるが、高マンノース型並びに、2 本鎖、3 本鎖、4 本鎖複合型糖鎖を F1 細胞と同じ比率で含んでいた。しかしこの細胞の 3 本鎖並びに 4 本鎖複合型糖鎖の側鎖部分には、Finne らが指摘した通り大量の X 抗原決定基が含まれており、シアル酸含量が低下していた。

一方、R4c-a 細胞では高マンノース型糖鎖の比率は親株と同じで、複合型糖鎖の側鎖部分の構造にも変化が認められなかったが、2 本鎖複合型糖鎖の比率が著明に増大しており、逆に 4 本鎖複合型糖鎖の含量が著しく低下していた。以上のデータをまとめると、両レクチン変異株には Fig. 10 に示すような *N*-結合糖鎖の変化が起きていることになる。したがってこれら変異株の転移能消失の背景には、 $\text{Neu5Ac}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6(\text{Neu5Ac}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6$ という 7 糖グループの *N*-結合糖鎖からの消失ということが共通に横たわっていることになる。

7. Warren-Glick 現象を起している糖タンパク質の同定

さて以上のべて来たように、シアル酸を含む 2,6-分岐を持った複合型 *N*-結合糖鎖が癌の悪性度と相関して上昇していることが確実となったが、このような糖鎖構造の変化は形質膜の全糖タンパク質に均等に起きているのか、それとも特定の糖タンパク質に起きているのかという疑問が生じて来る。そこで第 5 節にのべた悪性度の高い MTA_g 細胞とその親株である NIH3T3 細胞について形質膜糖タンパク質レベルでの解析を行った。⁴²⁾ 両細胞の形質膜糖タンパク質を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis で分離したのちに、ニトロセルロース膜に転写し、これをビオチン化した 3 種のレクチン (Con A, シロバナチョウセンアサガオレクチン (DSA), L-PHA) と反応させ、アビジンペルオキシダーゼで染色した。その結果、2,6-分岐糖鎖を認識する DSA や L-PHA と反応する糖タンパク質は 130K, 110K, 及び 90K のバンドとして検出され (GP130, GP110, GP90), 問題の糖鎖の高分岐化が特定の糖タンパク質で起きていることが明ら

かとなった。それではこれら糖タンパク質はどのような機能を持つのであろうか？ この疑問に答えるために、形質膜からタンパク質を可溶化し、種々の不溶化レクチンカラムを用いて分画を試みた結果、高分岐化糖鎖を持った糖タンパク質が **WGA**-アガロースカラムに結合し、**0.2 M N**-アセチルグルコサミンを含む緩衝液で溶出する画分に定量的に回収されることが判明した。そこで [³⁵S]-メチオニンと [³⁵S]システインの混合物で **NIH3T3** 細胞と **MTAg** 細胞を代謝標識し、その形質膜糖タンパク質を可溶化後、**WGA**-アガロースのカラムにかけて ³⁵S 標識 **GP130**, **GP110**, **GP90** の混合物を採取した。これを細胞表面に存在する様々な機能分子に対する抗体を用いて免疫沈降させたところ、**GP110** は抗 **LAMP-1** (lysosome-associated membrane protein-1⁴³⁾) 抗体で、**GP130** は抗フィブロネクチン受容体抗体で沈降することが判明した。⁴⁴⁾

LAMP-1 は **NIH3T3** と **MTAg** 細胞の両方で発現されているが、一定量の形質膜タンパク質から抗 **LAMP-1** 抗体で沈降する放射活性を測定すると、**NIH3T3** の発現量は **MTAg** の半分以下であることが判明した。さらに両細胞から精製した **LAMP-1** をビーズに固定した **L-PHA** に結合させた後、濃度の異なる **N**-アセチルガラクトサミンを含む緩衝液で段階的に洗ってやると、**MTAg** 細胞由来のものは **NIH3T3** 細胞由来のものより高い濃度で溶離して来た。この結果は **MTAg** 細胞の **LAMP-1** が **NIH3T3** のものより多くの **2,6**-分岐糖鎖を持っていることを示すものである。すなわち細胞の悪性化に伴い、**LAMP-1** は形質膜で発現量が増加すると共に、糖鎖に構造変化を起こしていることになる。

一方、**MTAg** 由来のフィブロネクチン受容体はすべて **WGA** 結合画分に回収されているが、**NIH3T3** 細胞のものは主に **WGA** 素通り画分に回収されることも判明した。すなわち **NIH3T3** のフィブロネクチン受容体は糖鎖の分岐が少ないことによって 1 分子当りのシアル酸含量が低く **WGA** に結合しにくいのであろう。

GP 90 は現在までに調べたいずれの抗体とも反応せず、その実態は不明である。

糖鎖生成阻害剤で処理した細胞から精製したフィブロネクチン受容体がフィブロネクチンへの結合活性を消失していることが報告されている。⁴⁵⁾ そこで細胞の悪性化に伴ってフィブロネクチン受容体に生じる糖鎖の構造変化によって、このタンパク質の機能がどう修飾されるかを調べて見ることにした。

フィブロネクチンをコートした培養皿上に **NIH3T3** 及び **MTAg** 細胞を接着させ、これに濃度の異なる抗フィブロネクチン受容体抗体を添加して、抗体による細胞の伸長の阻害度を調べた。その結果、**NIH3T3** 細胞の伸展阻害には **MTAg** 細胞の 2 倍以上の濃度の抗体の添加が必要であった。

両細胞におけるフィブロネクチン受容体の発現量はほぼ等しいので、この差は **MTAg** 細胞の受容体が糖鎖の高分岐化によりフィブロネクチンに対する親和性の低下を起こしたことを意味している。糖鎖の癌性変化によるこうした細胞形質膜糖タンパク質の機能低下は、組織における癌細胞の接着性の低下をうまく説明するものであり、**Fig. 9** に示した癌細胞の転移要因 1 として働いているのであろう。

8. おわりに

すでに第 6 節でのべたように、**B16** メラノーマの変異株の研究からは循環系への侵入 (**Fig. 9** の 2) に関する糖鎖の問題に対する解答が得られていない。しかし癌が未だ小さいにもかかわらず全身に転移を起こしているような極めて悪性度の高い癌では、循環系への侵入の問題が極めて重要である。

血液の中には様々な細胞が含まれているが、この中でリンパ系の細胞が循環系から外に出て来ることが知られている。これはリンパ系の細胞が毛細血管を構築している内皮細胞を通り抜けることが出来るためである。^{46,47)}

最近このリンパ球の特異な挙動が同細胞の表面に存在する Neu5Ac α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4(Fuca1 $\rightarrow$ 3)-GlcNAc という 4 糖構造を内皮細胞表面の ELAM-1 (endothelial-leukocyte-associating molecule) が認識することによって引き起こされていることが判明した.⁴⁸⁻⁵⁰⁾ また ELAM-1 が Neu5Ac α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4(Fuca1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc という 6 糖構造と反応することも報告されている.^{51,52)} したがって糖鎖の癌性変化によって細胞の表面糖鎖にこれらの糖鎖構造が発現して来るなら, その癌細胞は容易に循環系に入りこみ, また自由に循環系から出ていく筈である. 上記 4 糖構造が様々な癌で発現していることは, 抗シアリル X 抗体を使った検索で確かめられている事実であり,⁵³⁻⁵⁵⁾ この知見を Warren-Glick 現象と結びつけて考えると, ELAM-1 のリガンドを側鎖に持ったような 2,6-分岐複合型糖鎖の発現が Fig. 9 の転移の全プロセスの完成につながるのではないかと考えられる. この仮説の検証には, 癌の血行性転移に関するもっと多様な変異株群の糖鎖について研究を進める必要がある. このような研究によって Fig. 9 の要素 2 に直接に関与する糖鎖構造が特定出来るならば, 外科手術で除いた癌の生化学的悪性度を調べ, 予後の方針を与えることも可能となろう.

紙数の関係から本稿では糖タンパク質の N-結合糖鎖の癌性変化の問題を形質膜糖タンパク質にしばって紹介した. しかし糖鎖の癌性変化は各種の腫瘍マーカーを含めた非膜系の糖タンパク質にも起こっている現象であり, 癌の診断に極めて有効であることが示されている. これら非膜系糖タンパク質の話題については, 既に幾つかの総説⁵⁶⁻⁵⁹⁾にまとめてあるので, 関心のある読者はそれを参照していただきたい. これら一連の研究で明らかになった重要な事実は, 糖タンパク質糖鎖の癌性変化が極めて多様であるにもかかわらず, 癌と糖タンパク質を特定すると, 極めて再現性の高い変化が検出されることである. このことは糖鎖の癌性変化が癌の臨床を考えていく上で重要な生化学的指標であることを示すものである.

謝辞 本研究は筆者が神戸大学医学部在任中より現在まで 18 年間にわたって続けて来たもので, この間, 村松 喬博士 (現鹿児島大医学部教授), 山下克子博士 (現佐々木研部長), 高崎誠一助教授, 古川清助手, 遠藤玉夫助手を中心とした数多くの教室員並びに白木和子博士 (医科研癌ウイルス研究部), 瀬川 薫博士 (現慶応大医学部助教授), 三島 豊 神戸大医学部教授, T.-W. Tao スタンフォード大医学部助教授ら共同研究者の御協力を得た. また研究費の一部は文部省科学研究費 (がん特別研究並びに重点研究「バイオがん」) によった. ここに記して深く感謝する.

引用文献及び注

- 1) E. Meezan, H. C. Wu, P. H. Black, P. W. Robbins, *Biochemistry*, **8**, 2518 (1969).
- 2) C. A. Buck, M. C. Glick, L. Warren, *Biochemistry*, **9**, 4567 (1970).
- 3) C. A. Buck, M. C. Glick, L. Warren, *Biochemistry*, **10**, 2176 (1971).
- 4) C. A. Buck, M. C. Glick, L. Warren, *Science*, **172**, 169 (1971).
- 5) L. Warren, D. Critchley, I. Macpherson, *Nature* (London), **235**, 275 (1972).
- 6) W. P. Van Beek, L. A. Smets, P. Emmelot, *Cancer Res.*, **33**, 2913 (1973).
- 7) L. Warren, J. P. Furer, C. A. Buck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1838 (1972).
- 8) I. J. Goldstein, C. E. Hollerman, J. M. Merrick, *Biochim. Biophys. Acta*, **97**, 68 (1965).
- 9) S. Ogata, T. Muramatsu, A. Kobata, *J. Biochem.*, **78**, 687 (1975).
- 10) S. Ogata, T. Muramatsu, A. Kobata, *Nature* (London), **259**, 580 (1976).
- 11) D. M. Carlson, *J. Biol. Chem.*, **243**, 616 (1968).
- 12) T. Tai, K. Yamashita, A. M. Ogata, N. Koide, T. Muramatsu, S. Iwashita, Y. Inoue, A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, **250**, 8569 (1975).

- 13) S. Ito, K. Yamashita, R. G. Spiro, A. Kobata, *J. Biochem.*, **81**, 1621 (1977).
- 14) T. Tai, K. Yamashita, S. Ito, A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, **252**, 6687 (1977).
- 15) K. Yamashita, Y. Tachibana, A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3862 (1978).
- 16) A. Kobata, *Anal. Biochem.*, **100**, 1 (1979).
- 17) S. Takasaki, T. Mizuochi, A. Kobata, *Methods Enzymol.*, **83**, 263 (1982).
- 18) 木幡 陽, “新生化学実験講座,” 第3巻上, 東京化学同人, 東京, 1990, pp. 197—213.
- 19) A. Kobata, “Biology of Carbohydrates,” Vol. 2, ed. by V. Ginsburg, P. Robbins, John Wiley and Sons, New York, 1984, pp. 87—161.
- 20) K. Yamashita, T. Ohkura, Y. Tachibana, S. Takasaki, A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, **259**, 10834 (1984).
- 21) K. Yamashita, Y. Tachibana, T. Ohkura, A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3963 (1985).
- 22) K. Yamashita, Y. Tachibana, K. Mihara, S. Okada, H. Yabuuchi, A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, **255**, 5126 (1980).
- 23) K. Yamashita, T. Ohkura, S. Okada, H. Yabuuchi, A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, **256**, 4789 (1981).
- 24) D. H. Van den Eijnden, W. E. C. M. Schiphorst, “Glycoconjugate,” ed. by M. A. Chester, Rahms 1 Lund, 1983, p. 760.
- 25) M. Pierce, J. Arango, *J. Biol. Chem.*, **261**, 10772 (1986).
- 26) K. Segawa, N. Yamaguchi, *Virology*, **155**, 334 (1986).
- 27) S. Sugano, N. Yamaguchi, *J. Virol.*, **52**, 884 (1984).
- 28) S. Hiraizumi, S. Takasaki, K. Shiroki, N. Kochibe, A. Kobata, *Arch. Biochem. Biophys.*, **280**, 9 (1990).
- 29) K. Shiroki, S. Hashimoto, I. Saito, Y. Fukui, Y. Fuki, H. Kato, H. Shimojo, *J. Virol.*, **50**, 854 (1984).
- 30) J. W. Dennis, S. Laferté, C. Waghorne, M. L. Breitman, R. S. Kerbel, *Science*, **236**, 582 (1987).
- 31) K. Yamamura, S. Takasaki, M. Ichihashi, Y. Mishima, A. Kobata, *J. Invest. Dermatol.*, **97**, 735 (1991).
- 32) I. J. Fidler, *Nature New Biol.*, **242**, 148 (1973).
- 33) I. J. Fidler, D. M. Gersten, M. B. Budmen, *Cancer Res.*, **36**, 3160 (1976).
- 34) G. Poste, J. Doll, I. R. Hart, I. J. Fidler, *Cancer Res.*, **40**, 1636 (1980).
- 35) T. Takeuchi, H. Yamanaka, G. Eguchi, *Dev. Growth Differ.*, **27**, 505 (1985).
- 36) Y. Funasaka, Y. Mishima, M. Ichihashi, T. Sugiyama, *Dermatol.*, **177**, 200 (1988).
- 37) A. Passaniti, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.*, **263**, 7591 (1988).
- 38) T.-W. Tao, M. M. Burger, *Nature (London)*, **270**, 437 (1977).
- 39) T.-W. Tao, M. M. Burger, *Int. J. Cancer*, **29**, 425 (1982).
- 40) J. Finne, T.-W. Tao, M. M. Burger, *Cancer Res.*, **40**, 2580 (1980).
- 41) T. Kawano, S. Takasaki, T.-W. Tao, A. Kobata, *Glycobiology*, **1**, 375 (1991).
- 42) 浅田真弘, 古川 清, 瀬川 薫, 遠藤玉夫, 木幡 陽, 生化学, **60**, 614 (1988).
- 43) J. W. Chen, T. L. Murphy, M. C. Willingham, I. Pastan, J. T. August, *J. Cell Biol.*, **101**, 85 (1985).
- 44) 浅田真弘, 古川 清, 瀬川 薫, 木幡 陽, 生化学, **63**, 755 (1991).

- 45) S. K. Akiyama, S. S. Yamada, K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.*, **264**, 18011 (1989).
- 46) J. L. Gowans, D. D. McGregor, *Prog. Allergy*, **9**, 1 (1965).
- 47) I. Goldschneider, D. D. McGregor, *J. Exp. Med.*, **127**, 1 (1968).
- 48) J. B. Lowe, L. M. Stoolman, R. P. Nair, R. D. Larsen, T. L. Berhend, R. M. Marks, *Cell*, **63**, 475 (1990).
- 49) M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. Hakomori, J. C. Paulson, *Science*, **250**, 1130 (1990).
- 50) G. Walz, A. Aruffo, W. Kolanus, M. Bevilacqua, B. Seed, *Science*, **250**, 1132 (1990).
- 51) E. L. Berg, M. K. Robinson, O. Mansson, E. C. Butcher, J. L. Magnani, *J. Biol. Chem.*, **266**, 14869 (1991).
- 52) M. Tiemeyer, S. J. Swiedler, M. Ishihara, M. Moreland, H. Schweingruber, P. Hirtzer, B. K. Brandley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 1138 (1991).
- 53) Y. Fukushima, R. Kannagi, S. Hakomori, T. Shepard, B. G. Kulander, J. W. Singer, *Cancer Res.*, **45**, 3711 (1985).
- 54) S. D. Hoff, T. Irimura, Y. Matsushita, D. M. Ota, K. R. Cleary, S. Hakomori, *Arch. Surg.*, **125**, 206 (1990).
- 55) S. D. Hoff, Y. Matsushima, D. M. Ohta, K. R. Cleary, T. Yamori, S. Hakomori, T. Irimura, *Cancer Res.*, **49**, 6883 (1989).
- 56) A. Kobata, *J. Cellular Biochem.*, **37**, 79 (1988).
- 57) 木幡 陽, 薬誌, **104**, 823 (1984).
- 58) 木幡 陽, 代謝, **27**, 263 (1990).
- 59) A. Kobata, K. Totani, T. Endo, M. Kuroki, Y. Matsuoka, K. Yamashita, "The Carcinoembryonic Antigene Gene Family," ed. by A. Yachi, J. E. Shively, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1989, pp. 12—22.