

## 細胞間認識に関与する機能的複合糖質分子に関する研究

左 一八

## Functional Glycoconjugates Involved in Cellular Interaction

Kazuya IPJ HIDARI

Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences, Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation, and COE Program in the 21<sup>st</sup> Century, 52-1 Yada, Shizuoka City 422-8526, Japan

(Received January 22, 2003)

We first examined the involvement of the complex sphingolipids in cell-substratum adhesion using GM-95, a mutant cell line deficient in glycosphingolipids (GSLs) due to the lack of ceramide glucosyltransferase activity. We determined the adhesion of the mutant cells and stable transfectants expressing GSLs, which were established by transfection of GlcT-1 cDNA into GM-95 cells under neutral sphingomyelinase (sm) treatment. We confirmed that complex sphingolipids play critical roles in cell-substratum adhesion, and the presence of either GSLs or SM is sufficient for the adhesion. We also investigated intracellular signaling (glycosignaling) mediated by endogenous GM<sub>1a</sub> involved in the neuronal differentiation of PC12 cells using the cholera toxin B subunit (CTB) that specifically binds to ganglioside GM<sub>1a</sub>. Treatment with CTB induced neuron-like differentiation of PC12 cells. Biochemical analyses demonstrated that the tyrosine phosphorylation induced by CTB was responsible for neuron-like differentiation of PC12 cells and that the MEK-ERK cascade is a part of the biological signals mediated by endogenous ganglioside GM<sub>1a</sub> on PC12 cells. We further demonstrated that glycosignaling is mediated through a high-affinity ligand, PSGL-1, for P-selectin on neutrophils. In this case, engagement of PSGL-1 on the cell surface strongly induced tyrosine phosphorylation of several cellular proteins including ERKs and activated a canonical MAP kinase pathway. Tyrosine phosphorylation induced by engagement of PSGL-1 is responsible for the secretion of interleukin-8 from neutrophils, suggesting that PSGL-1-mediated glycosignals are involved in the progression of the inflammatory response. In this review, we mainly discuss the biological and pathological significance of glycoconjugates in relation to the above issues.

**Key words**—glycoconjugates; cell adhesion; glycosignaling; selectin; neurotrophic action

## 1. はじめに

細胞膜にはコレステロール、リン脂質などの脂質成分及び膜に結合した多種のタンパク質が存在している。これらの物質は単に膜の構成物質のみでなく、外界からの種々の刺激、化学物質、微生物などとダイナミックに相互作用する機能的物質でもある。膜脂質の微量成分であるスフィンゴ糖脂質及び糖タンパク質などを含む複合糖質分子は、そのほとんどが細胞膜上に存在しており、それぞれの細胞に特徴を与えている。これら複合糖質分子中の糖鎖の多様性が分化した細胞の特徴、すなわち細胞分化の

マーカーをなしていることがこれまでに多く報告されている。<sup>1)</sup> さらに一部のスフィンゴ糖脂質やスフィンゴリン脂質が、シグナル伝達のさまざまな場面で動的な反応に関わっていることが近年知られている。<sup>2-4)</sup>

シアル酸含有スフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは高等動物における脳神経系、免疫系にその含量が高いこと、また神経細胞のみならずこれを支持するグリア細胞のどちらにも他の組織に比べて多量に含まれており、神経系、免疫系を構築する主要な構造物質の1つである。一方、個体発生時、神経系を始めとしてガングリオシドはその分布、構成が大きく変化することが知られており、細胞間コミュニケーションに関わる高次の重要な機能を持つことが推測されている。<sup>5,6)</sup>

著者らは、生体内において微量に存在する複合糖

静岡県立大学薬学部生化学教室 (〒422-8526 静岡市谷田 52-1)

e-mail: hidari@u-shizuoka-ken.ac.jp

\*本総説は、平成14年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

質分子の構造，生合成及びその生物学的機能に関する研究を生化学的及び細胞生物学的手法を用いて行ってきた。さらにこれまでの研究を発展させて，細胞膜複合糖質糖鎖分子を介した細胞内情報伝達系を新たに見出し，その生物学的，病理学的意義に関する研究を行ってきた。紙面の都合上，ここでは，特にスフィンゴ（糖）脂質とセレクトインの糖鎖性リガンドタンパク質分子を中心にして，免疫系，神経系におけるこれらの細胞膜複合糖質分子が持つ生物学的機能及び病理学的意義に関して最近の知見を基に論述する。著者らがこれまでにやってきた生体内微量複合糖質分子の構造及び複合糖質糖鎖生合成に関する研究に関しては，文献を参照いただきたい。<sup>7-21)</sup>

## 2. スフィンゴ脂質の生物学的機能に関する研究

糖脂質の一種であるスフィンゴ糖脂質は，細胞膜に特徴的に局在することから細胞-細胞及び細胞-基質間の相互作用，特に細胞-基質間接着に関与していると考えられ，これまでに多くの研究がなされてきた。しかしながらどれも直接機能を証明したのではなく，スフィンゴ糖脂質の細胞接着現象への寄与は依然として不明であった。著者らは，Nozueら<sup>22)</sup>によって確立されたマウスメラノーマ細胞由来のスフィンゴ糖脂質欠損変異培養細胞株 GM-95 細

胞を用いて細胞接着に対するスフィンゴ糖脂質の寄与を検討し，その生物学的機能を明らかにした。<sup>23)</sup> スフィンゴ脂質は，細胞外膜に存在する脂質分子の総称で，その分子内にセラミドと呼ばれる脂質部分とそれに糖鎖残基が結合した多種のスフィンゴ糖脂質，及びセラミドにリン酸コリン残基が結合したスフィンゴミエリンからなる (Fig. 1)。GM-95 細胞は，スフィンゴ糖脂質合成の最初のステップであるセラミド部分にグルコースを転移する反応を司るグルコース転移酵素活性を欠損している (Fig. 1)。<sup>24,25)</sup> このためこの細胞には，すべてのスフィンゴ糖脂質が存在しておらず，スフィンゴ脂質としてリン脂質であるスフィンゴミエリンのみが存在することが予想された。実際，脂質分析から GM-95 細胞は，スフィンゴ脂質として，リン脂質の一種である（唯一のスフィンゴリン脂質でもある）スフィンゴミエリンのみを持つことが明らかになった。興味深いことに，親株である MEB-4 細胞と GM-95 細胞とでは，スフィンゴ脂質総量（スフィンゴ糖脂質とスフィンゴミエリンの合計）に差がなく，GM-95 細胞では，消失したスフィンゴ糖脂質量を補うようにしてスフィンゴミエリン量の上昇が観察された (Table 1)。両細胞の種々の細胞外基質に対する接着性を調べたところ，GM-95 細胞のフィブロネク

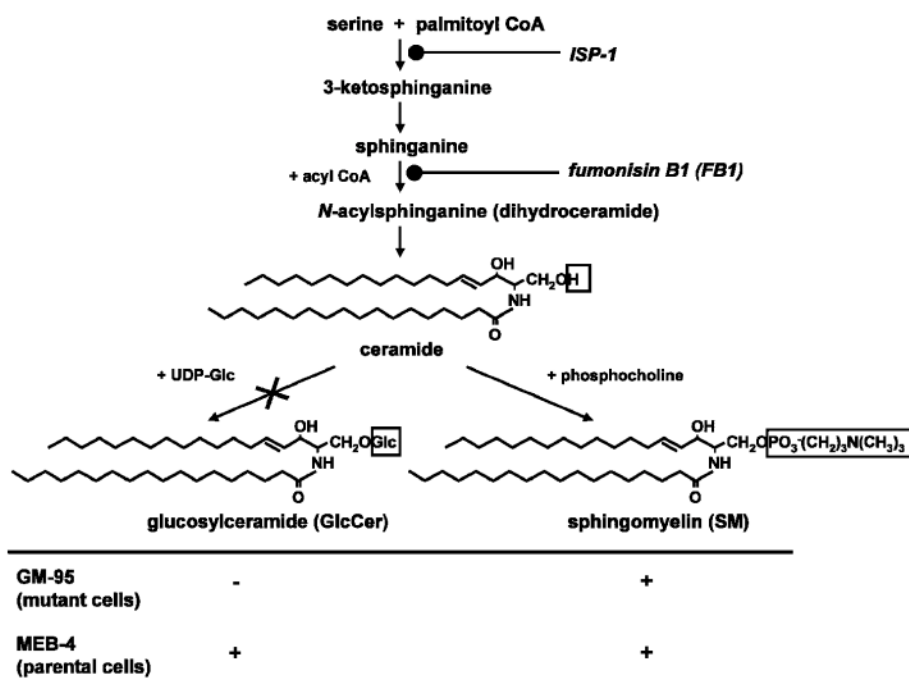


Fig. 1. Characterization of a GSL-Deficient Cell Line, GM-95

Table 1. Lipid Composition of Melanoma Cells

Lipid	MEB-4 (parent)		GM-95 (mutant)	
	<i>pmol/nmol Chol.</i>	%	<i>pmol/nmol Chol.</i>	%
PE	1362	38.3	1336	42.4
PS/PI	252	7.1	268	8.5
PC	1750	49.2	1374	43.6
SM	107	3.0	172	5.5
GlcCer	50	1.4	0	0.0
GM3	38	1.0	0	0.0
Total	3559	100.0	3150	100.0

Chol.: cholestrol, PE: phosphatidylethanolamine, PS: phosphatidylserine, PI: phosphatidylinositol, PC: phosphatidylcholine, SM: sphingomyelin, GlcCer: glucosylceramide. Sphingolipids detected on TLC are shown in the blank column.

チン, コラーゲン, ラミニンに対する接着性が MEB-4 細胞に比べていずれも減少していた. フローサイトメーターによる解析から, 2 種の細胞上に発現されているインテグリン量には差が認められなかった. これは従来の研究から得られていたスフィンゴ糖脂質が細胞外基質のレセプターであるインテグリンの接着能を変化させるという知見を支持するものであった.<sup>26,27)</sup> 次にスフィンゴミエリン分解酵素を細胞外から作用させて, GM-95 細胞表面からスフィンゴミエリンを除く処理を行うと (すべてのスフィンゴ脂質を除くことになる), その生存率には全く影響はないにもかかわらず, 処理細胞は調べたすべての細胞外基質に対してその接着能をほぼ完全に喪失していた. 親株である MEB-4 細胞からスフィンゴミエリン分解酵素によりスフィンゴミエリンを除いてもその接着能に全く変化はなかった (Fig. 2). この時, スフィンゴミエリン分解酵素処理 MEB-4 細胞中にはスフィンゴミエリンは全く検出されず, 細胞内スフィンゴ脂質はスフィンゴ糖脂質のみになっていた. スフィンゴミエリン分解酵素の作用は可逆的であり, 培養液中から酵素を洗い流して一定時間後, すなわち再びスフィンゴミエリン量を回復させると GM-95 細胞は, 再び細胞外基質へ接着した. GM-95 細胞の細胞外基質に対する低接着性は, Ichikawa ら<sup>25)</sup> によってクローニングされたグルコース転移酵素 cDNA (GlcT-1) をこの細胞に導入することにより, MEB-4 細胞と同レベルに完全に回復した. この時, GlcT-1 導入細胞内のスフィンゴ糖脂質の細胞膜上での発現も MEB-4 細胞と同レベルに回復していた. さらに GlcT-1 導

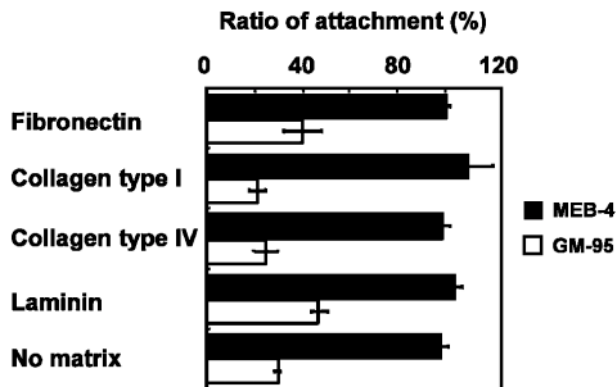


Fig. 2. Effect of Neutral Sphingomyelinase on Cell Adhesion to Extracellular Matrix (ECM)

MEB-4 and GM-95 cells were pre-cultured on 96-well plates coated with ECM and then treated with or without neutral sphingomyelinase (1 unit/ml medium) at 37°C for 1.5 h. Adhesion assay was performed as described previously.<sup>23)</sup> Solid and blank columns represent MEB-4 and GM-95 cells, respectively. The bars show standard deviation. Values are indicated as ratios relative to data without neutral sphingomyelinase treatment.

入細胞に対してスフィンゴミエリン分解酵素処理を行い, スフィンゴミエリンを除いても親株と同レベルに回復した細胞外基質に対する接着能のいかなる低下も認められなかった.

以上の知見から, スフィンゴ脂質は細胞-基質間接着にとって必須であること, さらにスフィンゴ糖脂質とスフィンゴミエリンは細胞の細胞外基質への接着能に対して相補的に機能しており, 細胞膜上の接着斑と呼ばれる部位にどちらか一方が局在することにより細胞-細胞外基質間接着が維持されることが明らかとなった. これまでその生理的機能が明らかにされず, 細胞膜の一構成成分に過ぎないと考えられていたスフィンゴ脂質が, 細胞-細胞外基質間

接着に必須であるということが細胞レベルで初めて証明された。

### 3. 細胞膜スフィンゴ糖脂質を介した情報伝達系の同定及びその神経栄養因子作用に関する研究

スフィンゴ糖脂質は神経細胞及びこれを支持するグリア細胞を含めた脳神経系にその含量が顕著に高く、神経系を構築する主要な構造物質である。これらは神経系において重要な機能を持つことが予想されている。<sup>5,6)</sup> 実際、神経繊維の損傷、あるいはある種の遺伝性疾患における神経細胞の変性、脱落に対して外来性のスフィンゴ糖脂質が防御的に機能すること、神経繊維再生を促進することなどの神経成長因子様作用が報告されてきた。<sup>28,29)</sup> しかしながらその作用機序は依然として明らかにされていない。そこで内在性スフィンゴ糖脂質が有する神経系細胞における機能を明らかにする目的で、スフィンゴ糖脂質に極めて特異的かつ高親和性を有するプローブを用い、スフィンゴ糖脂質糖鎖—リガンド（あるいはレセプター）の結合によって誘起される神経繊維伸展に関するシグナル伝達系の分子機構の解析を試みた。

著者らは、従来の外来性ガングリオシドを用いた研究とは全く異なるアプローチとして、神経系組織に特徴的に分布している  $GM_{1a}$  と呼ばれるスフィンゴ糖脂質に極めて特異的かつ高親和性を有する CTB (Cholera toxin B subunit) をプローブとして用い、<sup>30)</sup> 内在性スフィンゴ糖脂質糖鎖—リガンドの結合によって、ラット副腎髄質クロム親和性細胞由来 PC12 細胞に誘起されるシグナル伝達系及びその神経栄養因子作用の解析を行った。<sup>31)</sup> CTB 刺激により神経成長因子である NGF と同様に PC12 細胞が交感神経節細胞様に分化誘導されること、さらに CTB 刺激による分化誘導に細胞内タンパク質のチロシンリン酸化が関与していることが明らかとなった (Fig. 3)。これは内在性スフィンゴ糖脂質が誘起する糖鎖シグナルにチロシンリン酸化が関与している初めての報告となった。また、 $GM_{1a}$  糖鎖を介した細胞内シグナル伝達系に MAP キナーゼカスケードが存在していること、さらにそのカスケードが PC12 細胞の神経細胞様分化に関与していることが明らかとなった。

以上、細胞膜外層に存在するスフィンゴ糖脂質とそのリガンド分子との直接的な結合により細胞内で

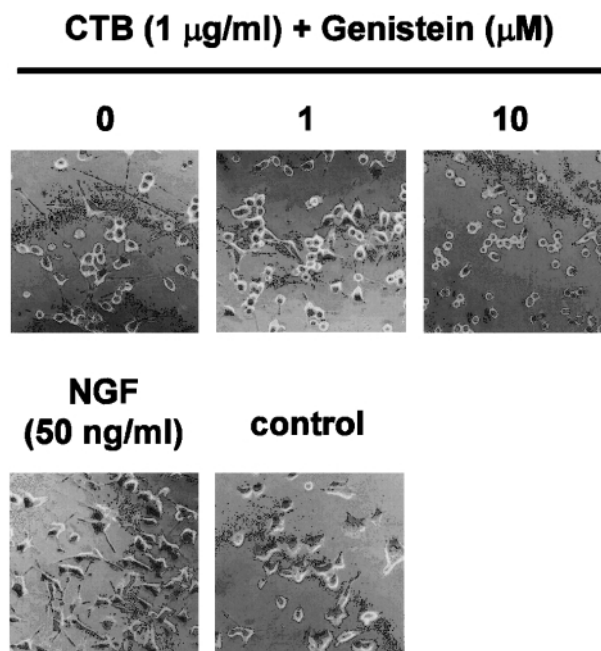


Fig. 3. Morphological Alterations of PC 12 Cells Induced with CTB are Inhibited by Treatment with Tyrosine Kinase Inhibitor, Genistein

PC 12 cells were pre-treated with or without genistein for 30 min at the indicated concentrations and then cultured in the medium containing CTB or NGF for 72 h.<sup>31)</sup> Control, not stimulated with either CTB or NGF.

誘起される情報伝達系が神経栄養因子作用にとって必要であることを示した。さらに細胞膜スフィンゴ糖脂質  $GM_{1a}$  を介した神経系特異的な機能的情報伝達系には、スフィンゴ糖脂質を含む細胞膜上の微小ドメイン内に存在する未知のタンパク質リン酸化酵素群が関与している可能性を示された。これまで難溶性、免疫原性により、動物個体へのスフィンゴ糖脂質の投与は困難なものであったが、これに代わるアプローチとしてスフィンゴ糖脂質に対する特異的な可溶性プローブの投与により、神経変性疾患等での神経組織の脱落、変性を防御できる可能性が示された。

### 4. P-セレクトリンの高親和性糖鎖リガンド分子 PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) を介した情報伝達系の同定及びその生物学的機能に関する研究

PSGL-1 分子は、高度に O 型糖鎖を持つムチンタイプの分子量 110 kDa の膜蛋白質で、細胞膜上でホモ 2 量体として白血球 (顆粒球, 単球, T 細胞, 一部の B 細胞) の表面に発現されており、血管内皮細胞あるいは血小板上に発現された P-セレ

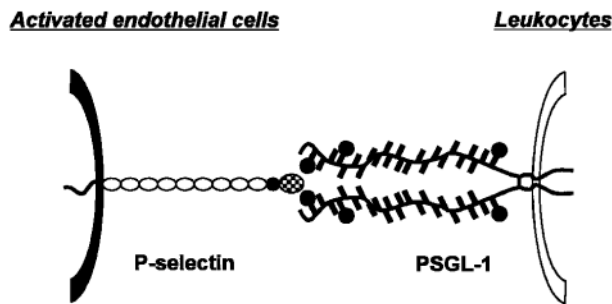


Fig. 4. P-Selectin Expressed on the Activated Endothelial Cells Interacts with a High Affinity Ligand, PSGL-1 on Leukocytes

クチンの生理的糖鎖性リガンドであり、P-セレクチンとの結合に関わっている (Fig. 4).<sup>32,33)</sup> この結合が、血流下での白血球—血小板、白血球—血管内皮細胞間の相互作用を引き起こし、炎症反応を促進することが明らかにされている。<sup>32,33)</sup> P-セレクチン (血管内皮細胞、血小板)-PSGL-1 (白血球) 結合は、細胞—細胞間接着にのみ関わっているのみならず、この2分子間の結合特異的に、白血球の化学炎症誘起物質に対する感受性が上昇するという報告がなされ、白血球上のPSGL-1を介した情報伝達系の存在が示唆された。<sup>34—38)</sup> そこで、著者らはこの情報伝達系の同定及びその生物学的機能の解明を試みた。<sup>39)</sup>

白血球をP-セレクチンがコートされた表面上に結合させると非常に早いレスポンス (1分以内) で、P-セレクチンとPSGL-1分子間の結合特異的に白血球内蛋白質がチロシンリン酸化されることが観察された。このリン酸化の上昇は、チロシンリン酸化酵素阻害剤で阻害されたが、アクチン重合を阻害するような薬剤では阻害されなかった。このことから、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化は、アクチン分子の会合を伴うインテグリンと呼ばれる他の細胞接着分子を介した情報伝達系とは異なることが示唆された。チロシンリン酸化される蛋白質のうちで、40—50 kDaの分子量を示したものは、MAPキナーゼ (ERK1 & ERK2) であり、これらのリン酸化酵素の活性は、チロシンリン酸化に伴い一過性に上昇した (Fig. 5)。さらにMAPキナーゼの活性化に先行してMEK (MAPキナーゼキナーゼ) 及びRasの活性化が観察された。以上のことから、白血球がP-セレクチンに結合することにより、PSGL-1を

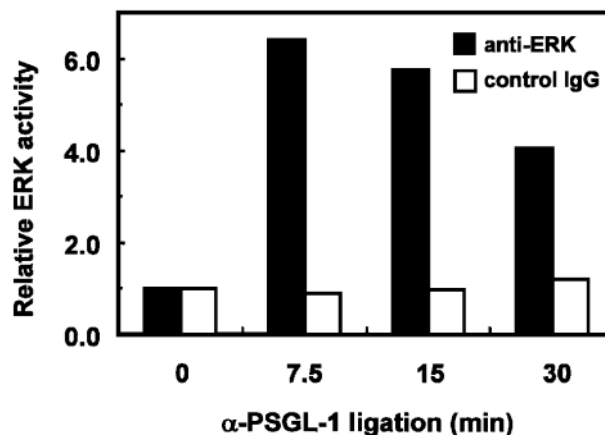


Fig. 5. Ligation of PSGL-1 on the Cell Surface Induces MAP Kinase Activation of Neutrophils

Neutrophils were incubated with  $\alpha$ -PSGL-1 mAb for the indicated times and then lysed. The cell lysates were subjected to the immunocomplex-kinase assay of MAP kinases as described previously.<sup>39,41)</sup> Solid and blank columns represent anti-ERK antibody and control IgG precipitations, respectively. Values are indicated as ratios relative to data at time 0.

介して白血球チロシンリン酸化が引き起こされ、さらにはRas, MEK, ERKという一連のMAPキナーゼカスケード<sup>40)</sup>が活性化されることが明らかとなった。Rasの活性化については、細胞増殖因子レセプターを介したシグナル系におけるShc, Grb2, Sos1等のアダプター蛋白質の関与<sup>40)</sup>が認められなかったことから、未知の因子が関与している可能性が示唆された。次に、白血球とP-セレクチンとの結合により、PSGL-1依存的にケモカインの一種であるIL-8の分泌が観察された。この分泌は、チロシンリン酸化酵素阻害剤で完全にブロックされた。

以上の知見から、白血球が血管内皮細胞や血小板表面上のP-セレクチンに結合することにより、PSGL-1を介して細胞 (白血球) 内にシグナルが伝わること、そしてそのシグナルの中でもチロシンリン酸化がIL-8の分泌に関与しているということが明らかとなった。インテグリンを始めとする他の接着分子と同様にセレクチン—糖鎖性リガンド結合によっても細胞内にシグナルが誘起されることが示された。糖鎖性リガンド分子PSGL-1を介したシグナルは、他の炎症性サイトカインやPAFなどの炎症性メディエーターを介したシグナルと協調して、白血球における細胞骨格の再編成、他の接着分子の発現制御、炎症性サイトカインの分泌制御などを行い、それらを通じて炎症時の白血球—活性化血管内皮細胞との相互作用を制御している可能性が考えら



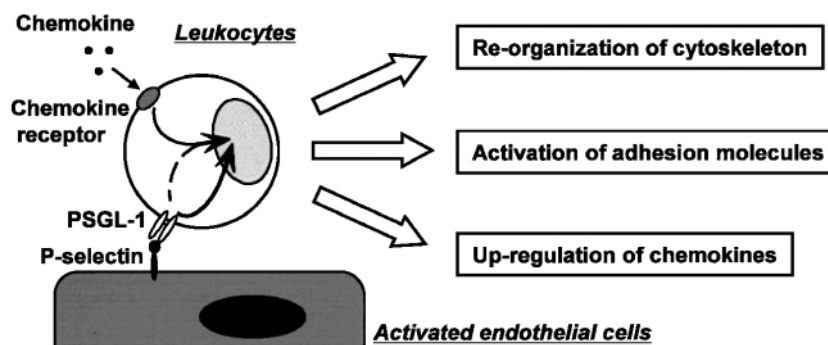


Fig. 6. Progression of Inflammation by both P-Selectin-Mediated Adhesion and Juxtacrine Activation

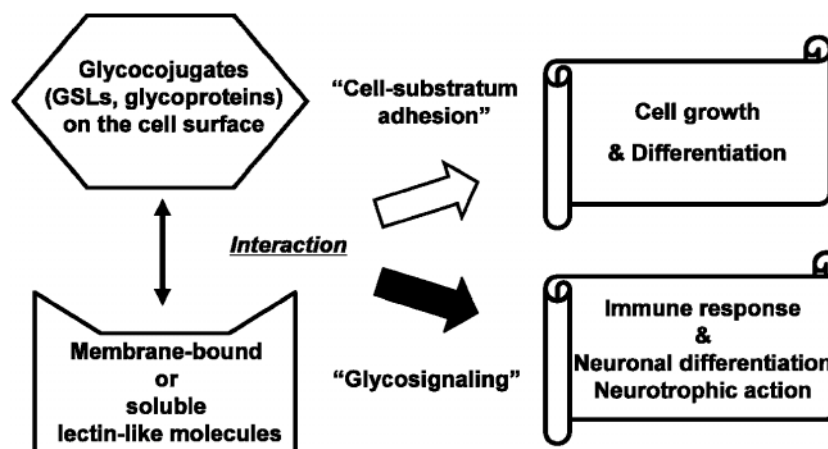


Fig. 7. Conclusion and Perspective

れる (Fig. 6). PSGL-1 分子の細胞質領域には、これまでに知られている情報伝達に関わるような特徴的なアミノ酸配列が認められないこと、Ras の活性化に未知の因子が関与している可能性が示唆されたこと、さらには PSGL-1 分子自体には白血球を刺激した状態においてもいかなるリン酸化も認められなかったことなどから、PSGL-1 を介したシグナルは、これまでに報告されているシグナル伝達系とは異なる複数の未知の因子が重要な働きをしていることが示された。

##### 5. まとめ

以上、本研究は、生化学的、分子生物学的、及び細胞生物学的手法を用いて、これまで生体膜の一構成成分と考えられていた複合糖質及び複合脂質の構造、生合成及びその生物学的、病態生化学的意義を明らかにした (Fig. 7)。また、細胞膜複合糖質糖鎖を介して引き起こされる細胞内シグナルについても研究を行い、その生理学的意義の解明を行った

(Fig. 7)。本研究で得られた研究成果は、単に基礎研究に留まらず、免疫疾患、神経疾患を始めとする様々な疾病の発症機序の解明あるいは、新たな治療薬に結びつくことが期待できると考えられる。

本研究で明らかとなった細胞膜複合糖質糖鎖が有する生物学的機能は未だ一部であり、その全体像は明らかとなっていない。近年、特定の複合糖質糖鎖を欠損したマウスが、遺伝子工学的に作製され、その機能が個体レベルで解析されるようになってきた。これらの遺伝子欠損マウスは、個体レベルでの高次活動にとって複合糖質糖鎖が不可欠の働きをしていることを示すのみならず、本研究を含めたこれまでの細胞レベルの研究で得られた知見をはるかに超える、予期していなかったような表現系も相次いで報告され始めている。今後は、細胞レベルの研究のみならず、これらの遺伝子欠損マウスを疾患等のモデル動物として、合わせて解析して行く予定である。特に神経系においては、神経繊維の再生、学習

機能を始めとする高次行動に細胞膜上の糖質分子が関わっていることが示唆されており、本研究で示された神経細胞モデルにおける複合糖質分子を介したシグナル伝達系の寄与が大きいと予想される。今後は、このシグナル伝達系の詳細な解析を進めるとともに、生体内での複合糖質糖鎖認識分子、すなわち糖鎖に対するリガンド（あるいはレセプター）の同定が必要であろう。本研究を含めた一連の研究は、現代において、医学的、社会的な問題の1つである神経変性疾患等の治療、予防に応用できることが期待できると思われる。

**謝辞** 本研究は著者が理化学研究所、米国オクラホマ大学医学部及び静岡県立大学薬学部生化学教室にて、多くの方たちとの共同研究によってなされたものである。ここで共同研究者の方たちに深謝いたします。また、著者が研究を始めて以来、一貫して適切な助言、指導を賜りました静岡県立大学薬学部鈴木康夫教授に心より感謝いたします。

#### REFERENCES

- 1) Iwamori M., *Saibou Kougaku*, **5**, 566-572 (1986).
- 2) Buckley N. E., Su Y., Milstien S., Spiegel S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1256**, 275-283 (1995).
- 3) Saito M., Yu R. K., *J. Neurosci. Res.*, **36**, 127-132 (1993).
- 4) Nozawa Y., *Saibou Kougaku*, **14**, 1255-1263 (1995).
- 5) Yu R. K., Macala L. J., Taki T., Weinfield H. M., Yu F. S., *J. Neurochem.*, **50**, 1825-1829 (1988).
- 6) Seyfried T. N., Yu R. K., Saito M., Albert M., **47**, 3538-3542 (1987).
- 7) Hidari K. I. P. J., *RIKEN Review*, **8**, 31-32 (1995).
- 8) Hidari K. I. P. J., Ichikawa S., Furukawa K., Amasaki M., Hirabayashi Y., *Biochem. J.*, **303**, 957-966 (1994).
- 9) Hidari K. I. P. J., Nagai Y., Sanai Y., *FEBS Lett.*, **353**, 25-28 (1994).
- 10) Hidari K. I. P. J., Sanai Y., Kawashima I., Tai T., Inagaki F., Nagai Y., *Eur. J. Biochem.*, **221**, 603-609 (1994).
- 11) Irie F., Hidari K. I. P. J., Tai T., Li Y-T., Seyama Y., Hirabayashi Y., *FEBS Lett.*, **351**, 291-294 (1994).
- 12) Hidari K. I. P. J., Irie F., Suzuki M., Kon K., Ando S., Hirabayashi Y., *Biochem. J.*, **296**, 259-263 (1993).
- 13) Hatanaka Y., Hashimoto M., Hidari K. I. P. J., Sanai Y., Teezuka Y., Nagai Y., Kanaoka Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1111-1114 (1996).
- 14) Hatanaka Y., Hashimoto M., Hidari K. I. P. J., Sanai Y., Nagai Y., Kanaoka Y., *Heterocycles*, **43**, 531-534 (1996).
- 15) Hatanaka Y., Hashimoto M., Hidari K. I. P. J., Sanai Y., Teezuka Y., Nagai Y., Kanaoka Y., *Bioorg. Medicin. Chem. Lett.*, **5**, 2859-2862 (1995).
- 16) Nomura K., Nakajo N., Hidari K. I. P. J., Nomura H., Murata M., Suzuki M., Yamana K., Hirabayashi Y., *Biochem. J.*, **306**, 821-827 (1995).
- 17) Hidari K., Itonori S., Sanai Y., Ohashi M., Kasama T., Nagai Y., *J. Biochem. (Tokyo)*, **110**, 412-416 (1991).
- 18) Suzuki Y., Nishi H., Hidari K., Hirabayashi Y., Matsumoto M., Kobayashi T., Watarai S., Yasuda T., Nakayama J., Maeda H., Katsuyama T., Kanai M., Kiso M., Hasegawa A., *J. Biochem. (Tokyo)*, **109**, 354-360 (1991).
- 19) Itonori S., Hidari K., Sanai Y., Taniguchi M., Nagai Y., *Glycoconjugate J.*, **6**, 551-560 (1989).
- 20) Suzuki Y., Hidari K., Matsumoto M., Ikeda M., Tsuchida N., *J. Biochem. (Tokyo)*, **106**, 34-37 (1989).
- 21) Suzuki Y., Hirabayashi Y., Matsumoto N., Kato H., Hidari K., Tsuchiya K., Matsumoto M., Hoshino H., Tozawa H., Miwa M., *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 1112-1120 (1987).
- 22) Nozue M., Sakiyama H., Tsuchiya K., Hirabayashi Y., Taniguchi M., *Int. J. Cancer*, **42**, 734-738 (1988).
- 23) Hidari K. I. P. J., Ichikawa S., Fujita T., Sakiyama H., Hirabayashi Y., *J. Biol. Chem.*, **271**, 14636-14641 (1996).
- 24) Ichikawa S., Nakajo N., Sakiyama H., Hirabayashi Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 2703-2707 (1994).
- 25) Ichikawa S., Sakiyama H., Suzuki G., Hidari K. I. P. J., Hirabayashi Y., *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U.S.A.*, **93**, 4638–4643 (1996).
- 26) Varki A., *Glycobiology*, **3**, 97–130 (1993).
- 27) Hakomori S.-I., *J. Biol. Chem.*, **265**, 18713–18716 (1990).
- 28) Geisler F. H., Dorsey F. C., Coleman W. P., *N. Engl. J. Med.*, **324**, 1829–1838 (1991).
- 29) Schneider J. S., Pope A., Simpson K., Taggart J., Smith M. G., DiStefano L., *Science*, **256**, 843–846 (1992).
- 30) Sixma T. K., Pronk S. E., Kalk K. H., Wartna E. S., van Zanten B. A., Witholt B., Hol W. G., *Nature*, **351**, 371–377 (1991).
- 31) Hidari K. I. P. J., Kimura M., Suzuki T., Miyamoto D., Suzuki Y., *Glycobiology*, **11**, 335–343 (2001).
- 32) McEver R. P., Moore K. L., Cummings R. D., *J. Biol. Chem.*, **270**, 11025–11028 (1995).
- 33) Suzuki Y., Hidari K. I. P. J., *Rinsho Men-eki*, **34**, 393–397 (2000).
- 34) Lorant D. E., Patel K. D., McIntyre T. M., McEver R. P., Prescott S. M., Zimmerman G. A., *J. Cell Biol.*, **115**, 223–234 (1991).
- 35) Lorant D. E., Topham M. K., Whatley R. E., McEver R. P., McIntyre T. M., Prescott S. M., Zimmerman G. A., *J. Clin. Invest.*, **92**, 559–570 (1993).
- 36) Cooper D., Butcher C. M., Berndt M. C., Vadas M. A., *J. Immunol.*, **153**, 3199–3209 (1994).
- 37) Weyrich A. S., McIntyre T. M., McEver R. P., Prescott S. M., Zimmerman G. A., *J. Clin. Invest.*, **95**, 2297–2303 (1995).
- 38) Weyrich A. S., Elstad M. R., McEver R. P., McIntyre T. M., Moore K. L., Morrissey J. H., Prescott S. M., Zimmerman G. A., *J. Clin. Invest.*, **97**, 1525–1534 (1996).
- 39) Hidari K. I. P. J., Weyrich A. S., Zimmerman G. A., McEver R. P., *J. Biol. Chem.*, **272**, 28750–28756 (1997).
- 40) Seger R., Krebs E. G., *FASEB J.*, **9**, 726–735 (1995).
- 41) Chen Q., Kinch M. S., Lin T., Burrridge K., Juliano R. L., *J. Biol. Chem.*, **269**, 26602–26605 (1994).