

総 説

N-結合型糖鎖による細胞接着分子インテグリンの機能調節

顧 建国

N-glycan-based regulation of integrin functions

Jianguo Gu

(Received November 20, 2008)

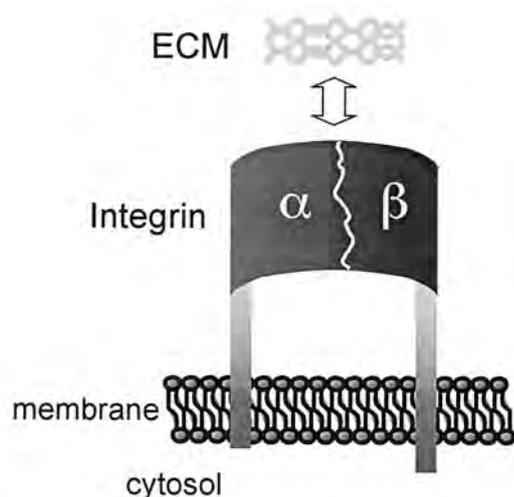
はじめに

インテグリンは細胞と細胞外マトリックス (ECM), 細胞-細胞間, 細胞と病原菌などの結合を媒介する細胞接着分子である。インテグリンは, α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマーで, 海綿のような単純な後生動物類の生物からヒトに至るまで広く存在するECMの受容体である。ヒトでは, 現在までに α 鎖18種, β 鎖8種類が知られており, その組み合わせにより, 少なくとも24種類のヘテロ二量体が存在する (Fig. 1).^{1,2)} インテグリンは細胞接着や細胞内シグナル伝達に寄与すると共に, 他の増殖因子受容体との複合体を形成し, 増殖因

子受容体を介したシグナルの制御を行う。¹⁾

インテグリンはそのリガンド認識特異性によって, RGD (Arg-Gly-Asp) 型と非 RGD 型に大別される。RGD 型インテグリンは, RGD 配列を認識するインテグリンで, このインテグリンを介する細胞接着は RGD 配列を含む合成ペプチドで強く阻害される。フィブロネクチン (fibronectin, FN) レセプター ($\alpha 5 \beta 1$) やビトロネクチンレセプター ($\alpha v \beta 3$) がこのタイプに属する。一方, 非 RGD 型インテグリンは, RGD 配列を認識しない (RGD ペプチドで阻害されない) インテグリンで, ラミニンレセプター ($\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$ など) やコラー

A



B

Integrin		ECM or major ligands
$\alpha 1$	$\beta 1$	laminin, collagen
$\alpha 2$		laminin, collagen, thrombospondin
$\alpha 3$		laminin
$\alpha 4$		fibronectin, VCAM-1
$\alpha 5$		fibronectin
$\alpha 6$		laminin
$\alpha 7$		laminin
$\alpha 8$		nephronectin, fibronectin, tenascin
$\alpha 9$		tenascin, VCAM-1
$\alpha 10$		collagen, laminin
$\alpha 11$		collagen
αV	$\beta 2$	fibronectin, osteopontin
αL		ICAM-1,2,3
αM		ICAM-1, fibronectin, iC3b, factor X
αX		ICAM-1, fibronectin, iC3b, factor X
αD	$\beta 3$	VCAM-1, ICAM, fibrinogen
αIIb		fibrinogen
αV	$\beta 4$	fibronectin, vitronectin
$\alpha 6$		laminin
αV	$\beta 5$	vitronectin
αV		vitronectin, fibronectin, latent TGF- β
$\alpha 4$	$\beta 7$	MAcAM-1, fibronectin, VCAM
αE		E-cadherin
αV	$\beta 8$	vitronectin, laminin, TGF- β -LAP

Fig. 1. The integrin receptors and ECM or their ligands

A, Integrins are $\alpha\beta$ heterodimers. Each subunit has a large extracellular region and a short cytoplasmic tail (except for $\beta 4$ integrin).
 B, Twenty-four integrins and their ligands. Only major ligands are shown.

ゲンレセプター ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ など) がこちらのタイプである。また、コラーゲンレセプターや血球系のインテグリンは、 α 鎖にリガンドを認識する I (inserted) ドメインを持つインテグリンとしても分類されている。

糖タンパク質は糖鎖とタンパク質が共有結合した生体分子である。タンパク質上の糖鎖の結合様式は一般的には2種類ある。Asn-X-Ser/Thr の Asn-NH₂ に C-N 結合で GlcNAc を還元末端とする糖鎖が付く *N*-結合型糖鎖 (Asn 結合型糖鎖) と Ser ま

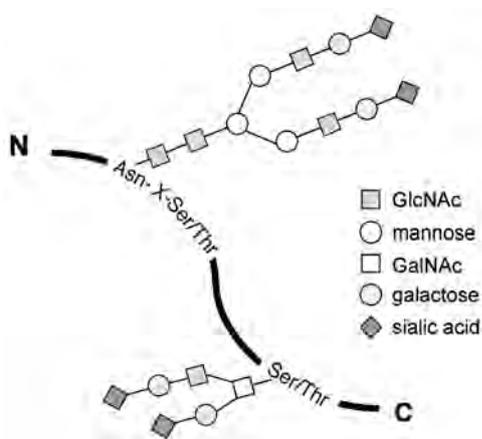


Fig. 2. Two major types of protein glycosylation

N-glycans are covalently linked to asparagine (Asn) residue of proteins, specifically the Asn-X-Ser/Thr motif. In contrast, *O*-glycans are attached to a subset of glycosidically linked hydroxyl groups of the amino acids serine (Ser) and threonine (Thr).

たは Thr の-OH に GalNAc, Man, Fuc, Glu などが C-O 結合で付加する *O*-結合型糖鎖である (Fig. 2). 細胞表面に発現するインテグリンは *N*-結合型糖鎖の主なキャリアータンパク質の一種として知られている。 *N*-結合型糖鎖の付加はインテグリン α 鎖と β 鎖のアセンブリに不可欠である。また、糖転移酵素遺伝子の導入または欠損によって糖鎖構造を人為的に改変させることにより、インテグリンの機能を制御できることが明らかとなった。本稿では、 *N*-結合型糖鎖によるインテグリンの機能制御およびその機能発現に糖鎖付加の重要性について紹介する。

本 論

I インテグリンを介するシグナル伝達

インテグリンは細胞と ECM との結合に最も重要な接着分子の受容体である。インテグリンを介する細胞の接着は、まず focal adhesion kinase (FAK) を含む様々な細胞内タンパク質のチロシン酸化を活性化する (Fig. 3)。その結果、細胞増殖を制御する mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの活性化、細胞生存を制御する PI 3-キナーゼ-Akt 経路の活性化、さらに細胞内骨格系の再編成を制御する Rho ファミリー低分子 G タンパク質活性化を引き起こす。³⁾ これらの経路は、細胞表面のレセプター型チロシンキナーゼを介するシグナル中にも同様に使われている。実際、インテグリン

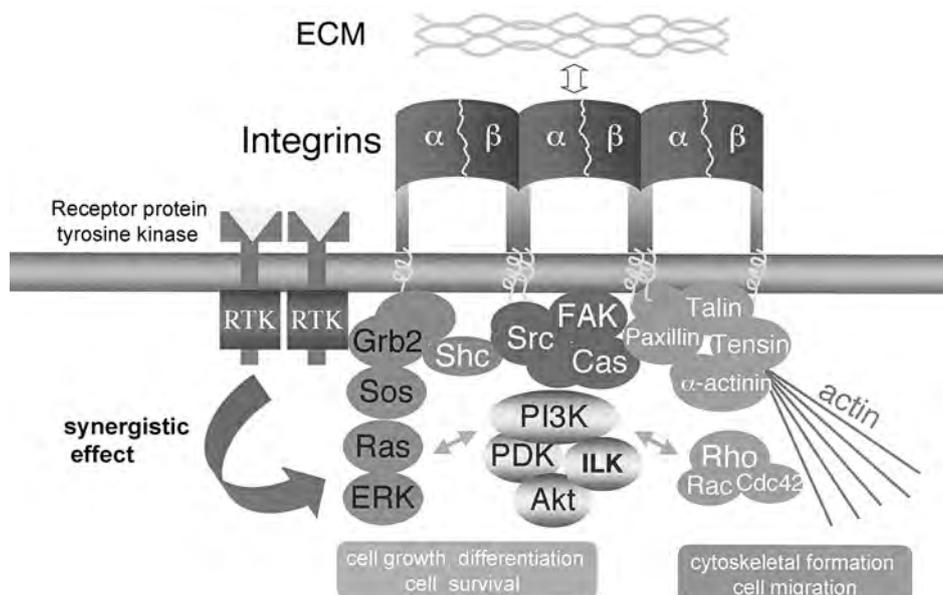


Fig. 3. Integrin-mediated intracellular signalings

The association of integrin and ECM can activate several signaling pathways, and subsequently affect cell shape, migration, proliferation and differentiation. It has been also reported that integrin synergizes with other cell surface receptors such as receptor protein tyrosine kinases (RPTKs) to activate these signaling pathways.

を介する細胞接着は増殖因子受容体を介するシグナルをも制御する。その根拠としては、インテグリンを集積させた場合のみに増殖因子受容体がインテグリンの複合体に集積することである。⁴⁾ 接着系細胞が浮遊した状態では増殖因子を添加しても瞬時的でしかも弱い MAPK の活性化しか起こらないが、細胞が適当な ECM に接着すると持続的かつ強い MAPK の活性化が起こる。⁵⁾

インテグリンを介するシグナル伝達機構の研究は、当初 $\alpha 5 \beta 1$ と FN との相互作用の解析を中心に進められて、 $\alpha 5 \beta 1$ は細胞接着・移動だけではなく、細胞の分化・生存を制御することが明らかになった。⁶⁾ しかし、その後、リガンドの特異性によって、インテグリンを介するシグナルが異なることが明らかとなった。即ち、FN に接着した内皮細胞は増殖因子の刺激によって増殖活性を示すが、同様な細胞がラミニンに接着すると、増殖活性がなくなり、逆に増殖抑制を示す。⁷⁾ また、ラミニンから $\alpha 3 \beta 1$ を介するシグナルは、FN から $\alpha 5 \beta 1$ を介するシグナルと異なり、がん細胞の運動を強く促進することや、血清飢餓によるアポトーシスを強く回避する効果を示す。^{8,9)}

II インテグリンの N-結合型糖鎖

細胞表面に発現するインテグリンは N-結合型糖鎖の主なキャリアータンパク質である。インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ または $\alpha 5 \beta 1$ の α 鎖と β 鎖には、それぞれ 14カ所と 12カ所の推定される N-結合型糖鎖付加部位を持つ。 α 鎖は未だはっきりしていないが、 $\beta 1$ 鎖の 12カ所の中に 10カ所に糖鎖付加されることが確認されている。¹⁰⁾ 胎盤から精製した $\alpha 5 \beta 1$ には、10 種類の中性糖鎖、6 種類の mono-sialyl, 10 種類の di-sialyl および 7 種類の tri-sialyl 糖鎖を合わせて 33 種類のオリゴ糖が同定された。¹¹⁾ また、含有の比率から見ると、中性と酸性の複合糖鎖はそれぞれ 20.8% と 77.7% であったのに対して高マンノース型糖鎖は合計のたった 1.5% しか含まれなかった。一方、質量分析計を用いヒトの尿管上皮がん細胞 (HCV29) から精製した $\alpha 3 \beta 1$ の糖鎖構造の解析結果は、 $\alpha 5 \beta 1$ の糖鎖構造と同様にわずかの高マンノース型糖鎖を除いて、大部分が 2 本鎖、3 本鎖および 4 本鎖の複合糖鎖を示した。¹²⁾ また、ヒト胃がん細胞 MKN54 から精製した $\alpha 3 \beta 1$ の主要な糖鎖構造には、 $\alpha 1,6$ フコース糖鎖がすべて含まれていることが分かった。¹³⁾ こ

れらの結果は、ゴルジ装置を通じてインテグリンに完全な複合型糖鎖が付加されることが示唆された。一般的に適切な糖鎖の付加はタンパク質の正しいフォールディング (折りたたみ) に必要であると考えられる。¹⁴⁾ 実際、 $\beta 1$ 鎖に高マンノース型のような不完全な糖鎖が多く付加されると、これらの糖鎖が分解のシグナルとしてユビキチン分解系の複合体に認識されて、分解されてしまう。¹⁵⁾

III 糖鎖リモデリングによるインテグリンの機能制御

インテグリンを介する細胞接着・遊走はがんの浸潤・転移の過程に必須である。従って、インテグリンの質的、量的な変化は細胞接着の異常を通して、がんの浸潤・転移に重要な役割を果たすことが想定されている。N-結合型糖鎖はインテグリンの活性化を制御する一種の regulator とも考えられる。¹⁶⁾ 精製した $\alpha 5 \beta 1$ から N-glycosidase F で糖鎖を切り出すと、 α 鎖と β 鎖が解離されるとの報告があった。¹⁷⁾ ヒト繊維芽細胞の培地に α -mannosidase II のインヒビターである 1-deoxymannojirimycin を添加すると、未成熟 $\alpha 5 \beta 1$ が細胞表面に多く発現し、細胞の FN への接着が著しく阻害された。¹⁸⁾ また、シアル酸の付加によって、インテグリンの機能が大きく変化することも知られている。¹⁶⁾ ここでは、分岐型糖鎖の生合成糖転移酵素である N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III (GnT-III), GnT-V および $\alpha 1,6$ フコース転移酵素 (Fut8) の働きに注目し、それらの糖転移酵素によって改変された N-結合型糖鎖がインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ および $\alpha 5 \beta 1$ の機能への影響について紹介する。

A) GnT-V によるインテグリンを介するがん細胞移動・浸潤の促進

GnT-V の産物である $\beta 1,6$ GlcNAc 分岐型糖鎖 (Fig. 4) は木幡ら、Dennis らにより転移性のがん細胞に発現することから、転移とのかかわりが予測されていた。^{19,20)} また、Ets-1 などの Proto-oncogene により GnT-V の発現が高まること；²¹⁾ GnT-V の欠損マウスではがん転移が強く抑制されること；²²⁾ さらに非転移性のがん細胞に GnT-V 遺伝子を導入するとがん転移が著しく高まることから、²³⁾ GnT-V はがん転移と深く関わることが明らかとなった。しかしながらこの分子メカニズムやどのようなタンパク質が GnT-V によって修飾されることでがん転移が促進するのかは不明であっ

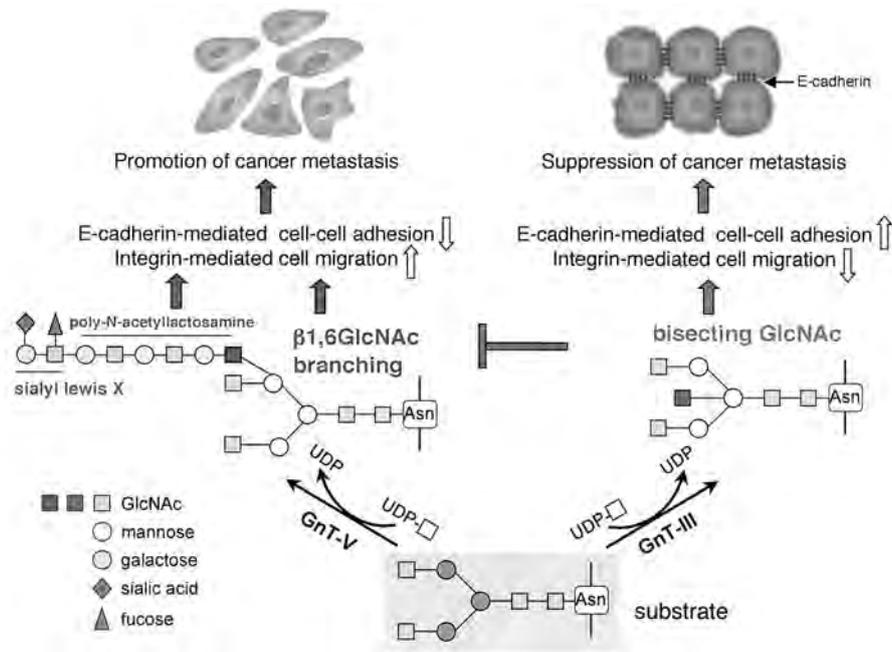


Fig. 4. Effects of sugar remodeling by the action of glycosyltransferase GnT-III and GnT-V

The remodeled *N*-glycans regulate cell adhesion and migration. Enhanced expression of GnT-V in epithelial cells results in a loss of cell-cell adhesion, increasing integrin-mediated cell migration. In contrast, overexpression of GnT-III strengthens cell-cell interaction, and down regulates integrin-mediated cell migration, which may contribute to suppression cancer metastasis. The β 1,6 GlcNAc branching is preferentially modified by poly-lactosamine and other sugar motifs such as sialyl Lewis X, which also contribute to promotion of cancer metastasis. It is worth mentioning that GnT-III could be proposed as an antagonistic of GnT-V, since GnT-V cannot utilize the bisected oligosaccharide as a substrate.

た。面白いことに、がん遺伝子 Ras で形質転換した NIH3T3 細胞の α 5 β 1 インテグリンには、野生型の細胞に比べ β 1,6 GlcNAc を持つ 3 本鎖および 4 本鎖が顕著に増加していた。²⁴⁾ 同様に、転移性を持たないがん細胞と比較して、転移性がん細胞から精製された α 3 β 1 には β 1,6 GlcNAc 糖鎖構造が多く見られた。²⁵⁾ さらに、Guo らは、GnT-V を導入した HT1080 細胞では、FN による α 5 β 1 の過剰な集積や微小繊維へのアクチン重合が抑制され、細胞の遊走・浸潤が促進されることを報告している。²⁶⁾ このことは、インテグリンを介する中程度の接着が細胞の移動にとって最適な条件という仮説を強く裏付けることになった。²⁷⁾ 同様に、GnT-V は、 α 3 β 1 の機能を高め、ラミニンへ細胞浸潤活性が著しく増加することが観察された。²⁸⁾

最近、Dennis らは、 β 1,6 GlcNAc 糖鎖の付加による細胞表面受容体の turn over の制御機構を提示した。即ち、 β 1,6 GlcNAc 分枝型糖鎖上の poly-lactosamine がガレクチンと結合することにより増殖因子受容体の endocytosis が抑制され、細胞表面でのリテンション時間が長くなるため、がん細胞増殖・転移に positive に働くと考えられた。²⁹⁾

イ) GnT-III によるインテグリンを介するがん細胞移動・浸潤の抑制

GnT-III は bisecting GlcNAc を持つユニークな分岐型糖鎖構造形成を触媒する糖転移酵素である (Fig. 4)。bisecting GlcNAc が付加されるとほかの分岐型糖転移酵素 (例えば、GnT-V) が立体障害により、この bisected 糖鎖を基質としないため、糖鎖の伸長反応ができなくなる。したがって、GnT-III は GnT-V のアンタゴニストであろうと考えられていた。最近、インテグリン α 3 β 1 を用いて、その仮説が同一分子で証明された。²⁸⁾ ラミニン上での α 3 β 1 を介したがん細胞浸潤は、GnT-III の導入によって阻害されたのに対して、GnT-V によって促進された。その GnT-V によるがん細胞浸潤の促進は GnT-III の発現によって著しく抑制された。逆に、siRNA 実験で内在性 GnT-III の発現レベルを抑えると β 1,6 GlcNAc 分枝型糖鎖が増加したことも観察された。²⁸⁾ 実際、その拮抗作用は in vivo でも証明された。吉村らは、GnT-V 活性が高くかつ高転移性の悪性黒色腫細胞に GnT-III を導入すると肺転移が著しく抑えられることを見出した。³⁰⁾ そのがん転移の抑制機序としては、E-カドヘリンに

bisecting GlcNAc 糖鎖が付加されると、細胞表面の E-カドヘリンの turn over が遅延し、細胞間の接着が強まると考えられた。^{31,32)} 面白いことに、GnT-III の発現は E-カドヘリン依存的な細胞間接着によって誘導されることも見出している。^{33,34)} これらの結果より、GnT-III と E-カドヘリンの発現調節は互いに positive feedback loop にあることが示唆された。³⁵⁾ 一方、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の機能においては、bisecting GlcNAc の修飾によって FN との親和性が低下したため、細胞接着・移動および細胞内シグナル伝達が抑制されることが観察された。³⁶⁾ 最近、我々は、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の特異的なリガンドであるラミニン-332 (旧名ラミニン-5) が bisecting GlcNAc の修飾によって $\alpha 3 \beta 1$ のクラスタリングの機能が低下したことを見出した。³⁷⁾ 従って、GnT-III の高発現によるがん転移抑制は、細胞-細胞間の接着の亢進と細胞-ECM 間接着の低下という少なくとも 2 つのメカニズムによるものと考えられる。¹⁶⁾ 面白いことに、Fiala らは、カレー色素であるクルクミンがアルツハイマー病で低下していた GnT-III の発現を誘導し、単核細胞の持つアミロイド β ペプチドの貪食能を促進することを報告した。³⁸⁾ 実際、インテグリン $\alpha V \beta 3$ は単核細胞のアポトーシス細胞の貪食に大事であること

がすでに知られている。³⁹⁾ 従って $\alpha V \beta 3$ の活性化と GnT-III の発現調節に大変興味を持たれている。

ウ) Fut8 によるインテグリンの機能調節

$\alpha 1,6$ フコースは糖タンパク質の N-結合型糖鎖の根元の GlcNAc に Fut8 によって作られる構造である。これまでの研究から、この $\alpha 1,6$ フコースは多くの糖タンパク質の機能制御に大きく関わることが予想されている。実際 $\alpha 1,6$ フコースが EGF 受容体および TGF- β 受容体の機能制御に必須であることは Fut8 ノックアウトマウスの機能解析から分かってきた。^{40,41)}

一方、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ および $\alpha 5 \beta 1$ の糖鎖には、 $\alpha 1,6$ フコースが多く付加されている。野生型細胞に比べ Fut8 欠損細胞における $\alpha 3 \beta 1$ を介する細胞移動や細胞内シグナル伝達は著しく抑制されたのに対して、その Fut8 欠損細胞に Fut8 遺伝子を再導入すると、その抑制が解除された。⁴²⁾ また、Fut8 ノックアウトマウスでは、タンパク質尿や電子顕微鏡で腎臓足細胞の形成異常などが観察された (未発表)。一方、 $\alpha 3 \beta 1$ ノックアウトマウスの機能解析から $\alpha 3 \beta 1$ は足細胞の形態形成に重要な役割を果たしていることがわかった。⁴³⁾ これらの結果を統合的に考えると、 $\alpha 1,6$ フコースはインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の機能に必須である。

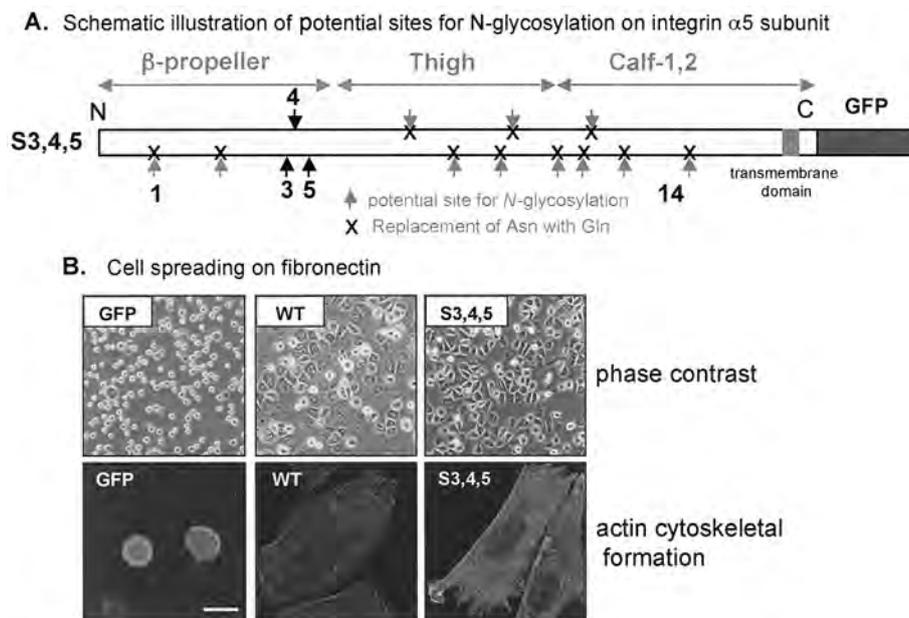


Fig. 5. Important N-glycosylation sites on the β -propeller domain of integrin $\alpha 5$ subunit

A, Schematic illustration of Potential sites for N-glycosylation on integrin $\alpha 5$ subunit containing a green fluorescence protein (GFP) tag. The crosses represent the unglycosylation of each N-glycan site by site-directed mutagenesis, Asn to Gln. The S3,4,5 means that the removal of all sites other than indicated sites Asn297/Asn307/Asn316 of $\alpha 5$ subunit. B, The abilities of cell spreading and actin cytoskeletal formation on FN of the S3,4,5 mutant were comparable to wild-type (WT). The $\alpha 5$ subunit deficient-CHO-B2 cells expressing GFP tag only, do not spread on FN-coated dishes.

IV インテグリンに糖鎖付加の意義

上述のように細胞表面に存在する糖鎖構造の変化により、インテグリンの機能は調節されることが明らかとなった。インテグリンの α 鎖と β 鎖には、多数N-結合型糖鎖付加サイトを持っているゆえ、インテグリン上のどのサイトが糖鎖で修飾されるか、どの糖鎖が重要であるか、または特定の糖鎖を持つインテグリンがどの分子と結合するかを同定することが必要である。実際、 $\alpha 5$ 鎖の機能糖鎖部位が解析された。⁴⁴⁾ その結果、14カ所の糖鎖付加部位の中に1カ所の糖鎖がインテグリン $\alpha 5$ と $\beta 1$ のヘテロダイマーの形成、3カ所の糖鎖がその機能発現に重要であることが示された (Fig. 5)。最近、我々は、その3カ所の内にサイト4がGnT-IIIによって特異的に修飾され、機能制御されることを明らかにした (Sato Y., *et al.* 投稿中)。一方、 β 鎖にもインテグリンの機能発現に重要サイトが同定された (Isaji T., *et al.* 投稿中)。また、他の部位の糖鎖は他の受容体との複合体形成に必要であろうと考え、現在検討している。実際、Hakomoriらのグループは糖脂質 GM3 が EGF 受容体のN-結合型糖鎖の非還元末端の GlcNAc と結合し、EGF 受容体を介するシグナルを制御することを報告している。⁴⁵⁾ 一方、我々は、同じ細胞内のインテグリン $\beta 1$ 鎖に付く糖鎖構造が形成される各々の二量体の間で異なること、さらに $\beta 1$ 鎖に $\alpha 1,6$ フコースが付加されないと、 $\beta 1$ 鎖とEGF受容体との結合性が著しく低下することを見出している (未発表)。また、GnT-IIIを高発現したPC12神経細胞では、インテグリンと増殖因子受容体間の相互作用が弱く、樹状神経突起の形成が強く抑制されることが観察された。⁴⁶⁾ それらの知見から、N-結合型糖鎖は、インテグリンの持つ細胞接着、細胞内シグナル伝達、他の受容体との相互作用において重要な役割を演じることが強く示された。

おわりに

本稿で紹介した分岐型糖鎖の以外にも、シアル酸の付加は、インテグリンの機能制御に大きな影響を与えることも知られている。¹⁶⁾ インテグリンのN-結合型糖鎖の機能解析は、生理的な分子間相互作用を含め細胞内シグナリングの調節、また炎症、感染、がん、さらにはがん転移などの病理的な過程をより良く理解するのにあって不可欠と言える。

インテグリンは血液凝固、がん、感染、および

分化・発生に関わる重要なレセプターであるため、立体構造を明らかにしようと世界中の研究者が躍起になって研究している。しかし、例えば $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの結晶構造に関しては10年以上も前から精力的に研究し、グラムオーダーで精製できているものの、未だ結晶化に成功していない。一つの理由としては、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ に約20カ所以上のN-結合型糖鎖修飾があることで、糖鎖の不均一性を生じ、それが結晶化を困難にしている原因と考えられる。今後、 $\beta 1$ 鎖を含めたインテグリンの持つ最小限糖鎖を同定し、さらにそれらの糖鎖を単一化することでその結晶構造解析の道が開けるかもしれない。

REFERENCES

- 1) Alam N., Goel H. L., Zarif M. J., Butterfield J. E., Perkins H. M., Sansoucy B. G., Sawyer T. K., Languino L. R., *J. Cell. Physiol.*, **213**, 649-653 (2007).
- 2) Takagi J., *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **19**, 557-564 (2007).
- 3) Giancotti F. G., Ruoslahti E., *Science*, **285**, 1028-1032 (1999).
- 4) Yamada K. M., Even-Ram S., *Nat. Cell. Biol.*, **4**, E75-76 (2002).
- 5) Renshaw M. W., Ren X. D., Schwartz M. A., *Embo J.*, **16**, 5592-5599 (1997).
- 6) Frisch S. M., Ruoslahti E., *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **9**, 701-706 (1997).
- 7) Wary K. K., Mainiero F., Isakoff S. J., Marcantonio E., Giancotti F. G., *Cell*, **87**, 733-743 (1996).
- 8) Gu J., Fujibayashi A., Yamada K. M., Sekiguchi K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 19922-19928 (2002).
- 9) Gu J., Sumida Y., Sanzen N., Sekiguchi K., *J. Biol. Chem.*, **276**, 27090-27097 (2001).
- 10) Seales E. C., Shaikh F. M., Woodard-Grice A. V., Aggarwal P., McBrayer A. C., Hennessy K. M., Bellis S. L., *J. Biol. Chem.*, **280**, 37610-37615 (2005).
- 11) Nakagawa H., Zheng M., Hakomori S., Tsukamoto Y., Kawamura Y., Takahashi N., *Eur. J. Biochem.*, **237**, 76-85 (1996).
- 12) Litynska A., Pochec E., Hoja-Lukowicz D., Kremser E., Laidler P., Amoresano A., Monti C., *Acta Biochim. Pol.*, **49**, 491-500 (2002).
- 13) Zhao Y., Itoh S., Wang X., Isaji T., Miyoshi E., Kariya Y., Miyazaki K., Kawasaki N., Taniguchi N., Gu J., *J.*

- Biol. Chem.*, 281, 38343-38350 (2006).
- 14) Wormald M. R., Dwek R. A., *Structure Fold Des.*, **7**, R155-160 (1999).
 - 15) Yoshida Y., Chiba T., Tokunaga F., Kawasaki H., Iwai K., Suzuki T., Ito Y., Matsuoka K., Yoshida M., Tanaka K., Tai T., *Nature*, **418**, 438-442 (2002).
 - 16) Gu J., Taniguchi N., *Glycoconj. J.*, **21**, 9-15 (2004).
 - 17) Zheng M., Fang H., Hakomori S., *J. Biol. Chem.*, **269**, 12325-12331 (1994).
 - 18) Akiyama S. K., Yamada S. S., Yamada K. M., *J. Biol. Chem.*, **264**, 18011-18018 (1989).
 - 19) Kobata A., *Glycoconj. J.*, **17**, 443-464 (2000).
 - 20) Dennis J. W., Pawling J., Cheung P., Partridge E., Demetriou M., *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 414-422 (2002).
 - 21) Ko J. H., Miyoshi E., Noda K., Ekuni A., Kang R., Ikeda Y., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **274**, 22941-22948 (1999).
 - 22) Granovsky M., Fata J., Pawling J., Muller W. J., Khokha R., Dennis J. W., *Nat. Med.*, **6**, 306-312 (2000).
 - 23) Ihara S., Miyoshi E., Ko J. H., Murata K., Nakahara S., Honke K., Dickson R. B., Lin C. Y., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **277**, 16960-16967 (2002).
 - 24) Asada M., Furukawa K., Segawa K., Endo T., Kobata A., *Cancer Res.*, **57**, 1073-1080 (1997).
 - 25) Pochec E., Litynska A., Amoresano A., Casbarra A., *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, 1-3 (2003).
 - 26) Guo H. B., Lee I., Kamar M., Akiyama S. K., Pierce M., *Cancer Res.*, **62**, 6837-6845 (2002).
 - 27) Palecek S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger D. A., Horwitz A. F., *Nature*, **385**, 537-540 (1997).
 - 28) Zhao Y., Nakagawa T., Itoh S., Inamori K., Isaji T., Kariya Y., Kondo A., Miyoshi E., Miyazaki K., Kawasaki N., Taniguchi N., Gu J., *J. Biol. Chem.*, **281**, 32122-32130 (2006).
 - 29) Partridge E. A., Le Roy C., Di Guglielmo G. M., Pawling J., Cheung P., Granovsky M., Nabi I. R., Wrana J. L., Dennis J. W., *Science*, **306**, 120-124 (2004).
 - 30) Yoshimura M., Nishikawa A., Ihara Y., Taniguchi S., Taniguchi N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 8754-8758 (1995).
 - 31) Kitada T., Miyoshi E., Noda K., Higashiyama S., Ihara H., Matsuura N., Hayashi N., Kawata S., Matsuzawa Y., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **276**, 475-480 (2001).
 - 32) Yoshimura M., Ihara Y., Matsuzawa Y., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **271**, 13811-13815 (1996).
 - 33) Akama R., Sato Y., Kariya Y., Isaji T., Fukuda T., Lu L., Taniguchi N., Ozawa M., Gu J., *Proteomics*, **8**, 3221-3228 (2008).
 - 34) Iijima J., Zhao Y., Isaji T., Kameyama A., Nakaya S., Wang X., Ihara H., Cheng X., Nakagawa T., Miyoshi E., Kondo A., Narimatsu H., Taniguchi N., Gu J., *J. Biol. Chem.*, **281**, 13038-13046 (2006).
 - 35) Gu J., Sato Y., Kariya Y., Isaji T., Taniguchi N., Fukuda T., *J. Proteome Res.*, **8**, 431-435 (2009).
 - 36) Isaji T., Gu J., Nishiuchi R., Zhao Y., Takahashi M., Miyoshi E., Honke K., Sekiguchi K., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **279**, 19747-19754 (2004).
 - 37) Kariya Y., Kato R., Itoh S., Fukuda T., Shibukawa Y., Sanzen N., Sekiguchi K., Wada Y., Kawasaki N., Gu J., *J. Biol. Chem.*, **283**, 33036-33045 (2008).
 - 38) Fiala M., Liu P. T., Espinosa-Jeffrey A., Rosenthal M. J., Bernard G., Ringman J. M., Sayre J., Zhang L., Zaghi J., Dejbakhsh S., Chiang B., Hui J., Mahanian M., Baghaee A., Hong P., Cashman J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 12849-12854 (2007).
 - 39) Hanayama R., Tanaka M., Miwa K., Shinohara A., Iwamatsu A., Nagata S., *Nature*, **417**, 182-187 (2002).
 - 40) Wang X., Gu J., Ihara H., Miyoshi E., Honke K., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **281**, 2572-2577 (2006).
 - 41) Wang X., Inoue S., Gu J., Miyoshi E., Noda K., Li W., Mizuno-Horikawa Y., Nakano M., Asahi M., Takahashi M., Uozumi N., Ihara S., Lee S. H., Ikeda Y., Yamaguchi Y., Aze Y., Tomiyama Y., Fujii J., Suzuki K., Kondo A., Shapiro S. D., Lopez-Otin C., Kuwaki T., Okabe M., Honke K., Taniguchi N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 15791-15796 (2005).
 - 42) Zhao Y., Itoh S., Wang X., Isaji T., Miyoshi E., Kariya Y., Miyazaki K., Kawasaki N., Taniguchi N., Gu J., *J. Biol. Chem.*, **281**, 38343-38350 (2006).
 - 43) Kreidberg J. A., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 548-553 (2000).
 - 44) Isaji T., Sato Y., Zhao Y., Miyoshi E., Wada Y., Taniguchi N., Gu J., *J. Biol. Chem.*, **281**, 33258-33267 (2006).
 - 45) Hakomori Si S. I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 225-232 (2002).
 - 46) Gu J., Zhao Y., Isaji T., Shibukawa Y., Ihara H., Takahashi M., Ikeda Y., Miyoshi E., Honke K., Taniguchi N., *Glycobiology*, **14**, 177-186 (2004).