

## De-N-Acetyl Gangliosides: Do They Exist? If So, How Are They Made? What Do They Do?

デー N - アセチルガングリオシドは存在するか  
あるとするなら、どのように作られ、何をしているのか

Ajit VARKI

Department of Medicine, and the Cancer Center, University of California at San Diego, La Jolla, CA, U.S.A.,  
FAX: 1-619-534-5792

Gangliosides are sialic-acid containing glycosphingolipids that occur predominantly on the outer leaflet of the plasma membrane of the cells of higher animals. The usual type of sialic acid in most gangliosides is N-acetyl-neuraminic acid. This molecule is the probable parent of the diverse family of sialic acids, which now has more than 25 members (1,2). Several of these modified sialic acids have been found on gangliosides, including N-glycolyl-neuraminic acid, mono- and di-O-acetylated molecules and O-methylated molecules (1-6). However, in all sialic acids previously reported on gangliosides, the amino group at the 5-position is substituted with either an acetyl or a glycolyl group. In recent years two reports (7,8) have suggested that gangliosides with free amino groups on the sialic acids ("de-N-acetyl gangliosides") might occur in nature. In this review, I summarize the evidence for the existence of these novel zwitterionic gangliosides, and speculate about their origin, fate and function. Because there is very little published material on this subject, this review is necessarily brief.

### Evidence for the Existence of De-N-acetyl Gangliosides.

In 1988, Hanai *et al.* (7) reported a monoclonal antibody, DH5, that was raised against chemically synthesized de-N-acetyl  $G_{M3}$ . It did not react with any previously known ganglioside, but did react with synthetic de-N-acetyl-sialylparagloboside, and with lipid extracts from A431 cells. Based upon this finding, they made the reasonable prediction that these cells might naturally contain this novel ganglioside. In support of this, a chemical re-N-acetylation study with [ $^{14}C$ ] acetic anhydride produced a radioactive band on TLC that co-migrated with  $G_{M3}$ . These data suggested that very small amounts of de-N-acetyl  $G_{M3}$  were indeed present in the cells. A survey of tissues and tumors using this monoclonal antibody in an immuno-overlay TLC indicated the presence of de-N-acetyl  $G_{M3}$  in A431 cells, B16 melanoma cells and human clonic adenocarcinoma cells, but not in normal rat brain, nor in Swiss 3T3 fi-

ガングリオシドは高等動物細胞の形質膜の外側の膜上に存在するシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質である。殆んどガングリオシドではシアル酸はN-アセチルノイラミン酸である。シアル酸には様々な種類があり、今や25種類以上知られているが[1,2]、このN-アセチルノイラミン酸が元になっているようだ。修飾された形のシアル酸でガングリオシドで見付かっているのは、N-グリコリルノイラミン酸の他に、モノ-、ジ-アセチルおよびO-メチル化体がある[1-6]。それでもガングリオシドで今迄に報告されているすべてのシアル酸は、C-5位にあるアミノ基がアセチル基かグリコリル基で置換されている。最近シアル酸のアミノ基が置換されていないガングリオシド(つまり"デーN-アセチルガングリオシド")が天然に存在することを示唆する報告が2報あった[7,8]。このミニレビューで私は、この新奇な両イオン性のガングリオシドが存在するという事実を述べ、更にその由来、運命、機能を推測して見たい。しかし、この物質についての知見は限られているので、このミニレビューは必然的に短いものとなる。

### デー N - アセチルガングリオシドが存在する証拠

1988年 Hanai らは、化学的に合成したデーN-アセチル  $G_{M3}$  に対して作らせた DH5 というモノクローナル抗体について報告した[7]。この DH5 抗体は既知のいかなるガングリオシドとも反応しなかったが、化学合成したデーN-アセチルシアルパラグロボシドと反応し、さらに A431 細胞のリピド抽出物と反応した。この知見に基づいて、Hanai らはこの A431 細胞がこの新しいガングリオシドを当然含んでいるものと考えた。これを支持するものとして、[ $^{14}C$ ] 無水酢酸を用いる化学的再N-アセチル化を行うと TLC 上で  $G_{M3}$  と同じ挙動をする放射性バンドができたことが挙げられる。これらのデータは非常に少量だがデーN-アセチル  $G_{M3}$  が実際この細胞に存在することを示唆している。色々の組織や腫瘍をこのモノクローナル抗体で免疫染色 TLC 法により調べてみると、A431 細胞の他に、B16 メラノーマ細胞やヒトのアデノカルシノーマ細胞でデーN-アセチル  $G_{M3}$  の存在が示されたが、健常ラット脳や swiss 3T3 線維芽細胞には見出されなかった。Hanai らは  $G_{M3}$

This research was supported by grants GM-32373 and AI-23287 from the USPHS.

Abbreviations used; The various ganglio-series gangliosides are designated according to Svennerholm (41). Other abbreviations used are standard

broblasts. These authors therefore postulated a de-N-acetylation/re-N-acetylation cycle occurring on the sialic acid moiety of  $G_{M3}$ , that might have a role in growth regulation.

We have recently reported direct evidence for such turnover of N-acetyl groups on the sialic acids of both  $G_{M3}$  and  $G_{D3}$  in human melanoma cells (8). Several years ago (9,10), we and others described the melanoma-associated oncofetal glycosphingolipid antigen 9-O-acetyl- $G_{D3}$ , which is now known to be recognized by several monoclonal antibodies (11,12). During recent studies of this O-acetylated molecule, we unexpectedly encountered evidence for de-N-acetyl gangliosides. While studying the biosynthesis and turnover of 7- and 9-O-acetyl- $G_{D3}$  in cultured human melanoma cells, we encountered two anomalous findings (8). First, when metabolic labeling of melanoma cells with [2- $^3$ H]acetate was carried out, we found that the O-acetyl groups of disialogangliosides carried much less of the  $^3$ H-label than the N-acetyl-neuraminic acid residues themselves. Second, when we labeled isolated Golgi-enriched vesicles from these cells with [acetyl- $^3$ H]Acetyl-Coenzyme A (AcCoA), the majority of the label incorporated into disialogangliosides was in an alkali-resistant but sialidase-sensitive form. Thin-layer chromatography showed that the major product of the *in vitro* acetylation reaction was not the expected O-acetylated  $G_{D3}$ , but  $G_{D3}$  itself. By carrying out a "fragmentation analysis" of the labeled  $G_{D3}$ , we showed that the  $^3$ H-label was exclusively in the N-acetyl groups of the two N-acetyl-neuraminic acid residues. Thus, in this *in vitro* reaction,  $^3$ H-label from [acetyl- $^3$ H]AcCoA was being added directly to the amino group at the 5-position of sialic acid residues of endogenous  $G_{D3}$  molecules (8).

Analysis of gangliosides from cells metabolically labeled with [ $^3$ H]acetate and [ $^{14}$ C]glucosamine corroborated and extended this finding. The  $^3$ H-label in the sialic acids was shown to be exclusively in O-acetyl and N-acetyl groups of the ganglioside, and pulse-chase studies indicated that both the O-acetyl and N-acetyl groups were turning over faster than the parent molecule. Taken together, these results indicate the existence of de-N-acetylation and re-N-acetylation reactions involving the sialic acid residues of  $G_{D3}$ . Similar findings were made with the  $G_{M3}$  molecules present in the same cells (8).

The two sialic acid residues of  $G_{D3}$  are distinct: the outer residue is a 2-8 linked to the inner residue, which is in turn a 2-3 linked to a galactose residue. To investigate if the  $^3$ H-N-acetyl groups were being selectively incorporated into the outer or the inner sialic acid residues, we took advantage of the fact that the side chain of the outer residue is susceptible to mild periodate cleavage, whereas the inner one is not (being substituted at the 8-position). This approach showed that both the inner and outer sialic acid residues of  $G_{D3}$  had incorporated  $^3$ H-label in the *in vitro* reaction. Similar analyses showed an almost identical turn-over of N-acetylation between the two residues in

のシアル酸部分に関してデ-N-アセチル化/再-N-アセチル化反応のサイクルがあり、増殖の制御に関わっているだろうと主張した。

私達はヒトのメラノーマ細胞を用いて、GM3 およびGD3のシアル酸のN-アセチル基にこのような代謝回転があるというまことに直接的証拠を最近提出した[8]。数年前に私達および他の研究者達は、メラノーマ特有の痛胎児性のスフィンゴ糖脂質抗原9-O-アセチルGD3を見つけたが[9,10]、今やこれは幾つかのモノクローン抗体で識別できる[11,12]。このO-アセチル化分子を最近調べている時に、デ-N-アセチルガングリオシドが存在する証拠に思いがけずぶつかった。培養ヒトメラノーマ細胞を用いて7-および9-O-アセチルGD3の生合成と代謝回転を研究している時に、私達は2つの変った発見をしたのである[8]。第1に、メラノーマ細胞を代謝的に[2- $^3$ H]酢酸を用いて標識した時に、ジシアロガングリオシドのO-アセチル基がN-アセチルノイラミン酸残基自身よりも $^3$ H-標識が少ない事を見つけた。第2に、これらの細胞から単離したGolgi画分を[アセチル- $^3$ H]アセチルコエンザイムA (AcCoA)を用いて標識した時にジシアロガングリオシドに取り込まれた標識は、アルカリに抵抗性があったがシアリダーゼ感受性だった。薄層クロマトグラフィーで調べると *in vitro* アセチル化反応の主要生成物は期待したようにO-アセチル-GD3でなく、GD3そのものであった。この標識されたGD3を化学的および酵素的にばらばらにして調べることにより、私達は $^3$ H-標識が2個のN-アセチルノイラミン酸残基のN-アセチル基にのみ入っていることを示したのである。つまり、この *in vitro* の反応で[アセチル- $^3$ H]AcCoAの $^3$ H-標識は内在性のGD3分子のシアル酸残基のC-5位のアミノ基に直接付加したのである[8]。

[ $^3$ H]酢酸と[ $^{14}$ C]グルコサミンで同時に代謝的に標識した細胞のガングリオシドを分析することで、この発見が確認された。シアル酸の $^3$ H標識はガングリオシドのO-アセチルおよびN-アセチル基のみにあることが示された。パルス-チェイス実験をすると、このN-アセチルおよびO-アセチル基はそのシアル酸本体よりも速やかに代謝回転を受けていることが判った。これらの事実を合せると、GD3のシアル酸残基のところでデ-N-アセチル化反応と再-N-アセチル化反応が存在することが明らかである。同じ細胞のGM3分子でも同じ現象が見出された[8]。

GD3の2個のシアル酸には明らかな違いがある：外側のシアル酸は内側のシアル酸に $\alpha$ 2-8結合をし、内側のシアル酸は $\alpha$ 2-3結合でガラクトースに結合している。 $^3$ H-N-アセチル基が2個のシアル酸のどちらにより取り込まれ易いか調べるために、外側のシアル酸残基の側鎖は温和な条件下で過ヨウ素酸化を受け易く、内側は(8位で置換されているので)受け難いという事実を利用した。こうやって調べると、GD3のシアル酸残基は内側のも外側のも共に $^3$ H-標識を *in vitro* で取り込んでいることが判った。パルス-チェイス実験においても同じ様な分析で、2個のシアル酸残基でのN-アセチル化反応において代

the pulse-chase study (8).

Taken together, these studies provide *highly suggestive*, but *not conclusive* evidence for the presence of de-N-acetyl gangliosides in certain cell types. Direct proof of their existence will require isolation and positive identification by physical techniques such as FAB-MS (13). With the limited amounts of the material present, this has not so far proven to be an easy task. It is clear that they are not major components of the gangliosides in any cell type so far studied. We are currently working towards identifying and purifying the de-N-acetyl gangliosides from melanoma cells, to directly study their structure in detail. We would also like to know if *both* neuraminic acid residues on the *same* molecule of  $G_{D3}$  can be simultaneously de-N-acetylated (i.e. di-de-N-acetyl  $G_{D3}$ ). It is also not known if  $G_{D3}$  molecules can carry O-acetyl esters and be simultaneously in the de-N-acetyl form (i.e. O-acetyl-de-N-acetyl  $G_{D3}$ ).

To our knowledge, there are no other reports of de-N-acetyl-gangliosides in the literature, nor have there been any reports of non-acetylated neuraminic acid residues on any other glycoconjugates in any other system. In our study, the use of radioisotopic tracer techniques resulted in the identification of these novel gangliosides, while Hanai *et al.* used a specific monoclonal antibody. It is of some interest to discuss why the existence of these molecules may have been previously missed by the many investigators who have worked on gangliosides, including those studying the most minor components of very complex mixtures (14,15). These molecules are likely to be missed during the conventional purification steps used for gangliosides. Thus for example, the use of anion ion-exchange chromatography could result in separation and loss of these zwitterionic compounds, and the migration of such compounds on TLC may be quite anomalous (7). Glycosidically-bound neuraminic acids without N-acetyl groups are resistant to all known neuraminidases (16,17), and thus would not be detected if an enzymatic approach were taken. If on the other hand, acid hydrolysis were used to degrade such molecules, the resulting free neuraminic acid would be very unstable. It would decompose spontaneously into 4-hydroxy-5 (D-arabino-tetritol-1-yl)-1-pyrroline-2-carboxylic acid, and subsequently into insoluble "humic acids" (18). Thus, it might not be surprising if small amounts of de-N-acetyl gangliosides are present in many cell types.

#### How are de-N-acetyl Gangliosides made?

The N-acetyl group at the 5-position of the N-acetyl-neuraminic acid normally originates from AcCoA very early in its biosynthesis (see Figure). The conversion of  $GlcNH_2-6-P$  to  $GlcNAc-6-P$  is catalyzed by glucosamine-6-phosphate: N-acetyltransferase. The latter compound is the precursor of UDP- $GlcNAc$  (19-22) which undergoes irreversible epimerization to

謝回転が同じであることが示された[8]。

以上の結果を総合してみると、これらの実験は、ある特定の細胞でデーN-アセチルガングリオシドが存在することを強く示唆しているが、しかし決定的には証明していない。この存在の直接的証拠は、これを単離してFAB-MS [13] のような物理的手段により同定することである。試料の量が限られているので、これは簡単にできそうもない。今迄調べられたどの細胞でも、デーN-アセチルガングリオシドはガングリオシドの主要成分ではない。その構造の詳細を研究する為に、私達はメラノーマ細胞のデーN-アセチルガングリオシドを精製し同定しようと努力している。GD3 の同じ分子にある両方のノイラミン酸残基が同時にデーN-アセチル化を受けるのか（つまり、ジ-デーN-アセチル GD3 の存在）どうかも知りたいものである。GD3 分子がO-アセチルエステルを持ちながら、同時にデーN-アセチル型となり得るか（つまり、O-アセチル-デーN-アセチル GD3）もまだ判っていない。

私達の知っている限り、デーN-アセチルガングリオシドについての他の報告はないし、非アセチル化ノイラミン酸残基が他の複合糖質にどんな形にせよ存在するという報告はない。私達の研究は、放射性トレーサー技術でこの新しいガングリオシドを同定できたが、一方Hanai らは特異的なモノクローナル抗体を用いている。今迄ガングリオシドの研究をした多くの研究者、特に複雑な混合物中の微量成分を研究した人達[14,15]が、何故これらの分子を見逃したか考えてみるのは一興であろう。デーN-アセチルガングリオシドはガングリオシドの通常の前製法では途中で失われると思われる。たとえば、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いると、この両性イオンの物質はガングリオシドから分離され除かれてしまうし、TLC 上でのこれらの物質の挙動は大変 変っている[7]。グリコシド結合で他の糖残基に付いていて、N-アセチル基のないノイラミン酸は、今迄知られているどのノイラミニダーゼにも抵抗性がある[16,17]なので、酵素的アプローチだと検出されないことになる。一方、酸水解でこの分子を分解すると、生じるフリーのノイラミン酸は非常に不安定である。自動的に分解されて4-ヒドロキシ-5 (D-アラビノテトリール-1-イル)-1-ピロリン-2-カルボキシル酸となり、そして更に不溶性の“フミン酸”となる[18]。したがって、デーN-アセチルガングリオシドがたとえ少量でも多くの細胞種に存在していたとしても、驚くにはあたるまい。

#### デーN-アセチルガングリオシドはどうやって作られるか？

N-アセチルノイラミン酸の5位のN-アセチル基は通常はその生合成の非常に早い段階で AcCoA からとり込まれる（図を参照）。 $GlcNH_2-6-P$  から  $GlcNAc-6-P$  への変換はグルコサミン-6-リン酸：N-アセチル転移酵素で触媒される。 $GlcNA-6-P$  は UDP- $GlcNAc$  となり[19-22]、不可逆的のエピメリ化を受けて  $ManNAc$  となる。更に変換を受けて、 $ManNAc-6-P$ 、N-アセチル-ノイラミン酸-9-P、およびフリーのN-

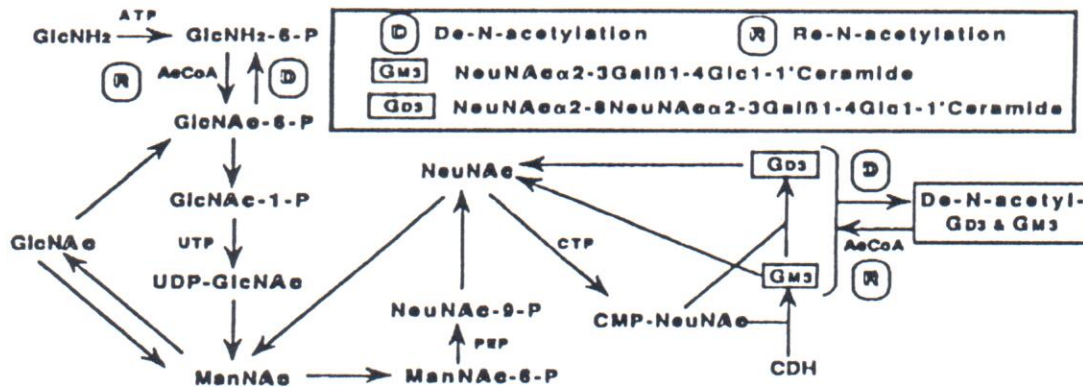


Fig. 1. Two possible sites for removal and re-addition of N-acetyl groups to sialic acids.

The scheme shows previously known pathways for the biosynthesis of CMP-N-acetyl neuraminic acid and its role in the synthesis of disialogangliosides in melanoma cells. Free neuraminic acid (Neu) is unstable, and therefore cannot exist in nature. Thus de-N-acetylation and re-N-acetylation can take place either prior to the synthesis of sialic acid (i.e. on amino sugars) or directly on the glycosidically bound sialic acids of gangliosides. See text for further discussion.

ManNAc, which in turn is eventually converted to CMP-N-acetyl-neuraminic acid via ManNAc-6-P, N-acetyl-neuraminic acid-9-P, and free N-acetyl-neuraminic acid (1,19-21). After N-acetyl-neuraminic acid is transferred to macromolecules from the nucleotide sugar, it can later be released, exported into the cytosol (23-26), and either re-utilized, or degraded to ManNAc and pyruvate (27). The N-acetyl group can also be hydroxylated to an N-glycolyl group, by a specific hydroxylase acting on the nucleotide donor (28,29). Throughout all of these reactions, the N-acyl group of the sialic acid is presumed to remain associated with the rest of the molecule. Since the de-N-acetylated form of sialic acid, neuraminic acid (Neu) is very unstable in the *free* state (18), it has always been assumed that it does not exist in nature. However, the *glycosidically-bound* form of neuraminic acid can be synthesized chemically, and is at least as stable as the N-acetylated compound (30).

Taken together, our results indicate that the major product of incubation of isolated Golgi-enriched vesicles from melanoma cells with [acetyl- $^3\text{H}$ ]AcCoA is the disialoganglioside  $\text{G}_{\text{D}_3}$ , carrying [N-acetyl- $^3\text{H}$ ]Neu5Ac. The most likely explanation is that the  $^3\text{H}$ -acetyl groups were transferred from the nucleotide donor (AcCoA) to a free amino group on endogenous de-N-acetyl  $\text{G}_{\text{D}_3}$ . A much less likely possibility is that an acetyl-displacement reaction occurred on endogenous  $\text{G}_{\text{D}_3}$  i.e. an acetyl group would directly displace another acetyl group. It is hard to imagine a useful purpose for such a "revenue-neutral" reaction in which both the precursor and the product would be the same; however, the current data do not permit us to rule it out. It is also theoretically possible that the acetyl groups from labeled AcCoA are being donated to  $\text{GlcNH}_2$ -6-P, a precursor of CMP-Neu5Ac, which could then be donating sialic acids to endogenous acceptors to generate the observed products. However, this would involve a total of 7 sequential enzymatic reactions catalyzed by cytosolic enzymes that require a variety of co-factors, including several nucleotides and

アセチルノイラミン酸を経て最終的に CMP-N-アセチルノイラミン酸となる。糖ヌクレオチドから N-アセチルノイラミン酸が高分子に転移された後、N-アセチルノイラミン酸は外されてサイトゾルに運ばれ[23-26]、そして再利用されるか、または ManNAc とピルビン酸に分解される[27]。N-アセチル基はヌクレオチド供与体上に特異的に働らくヒドロキシラーゼ[28,29]により水酸化を受けて、N-グリコリル基にも変ることある。これらの一連の反応の間、シアル酸の N-アシル基はそのシアル酸の他の部分と一緒にあったま、と思われる。シアル酸のデ-N-アセチル型、つまりノイラミン酸 (Neu) はフリーでは非常に不安定であり[18]、天然には存在しないものと思われる。しかし、ノイラミン酸をグリコシド結合をした形で化学合成すると、N-アセチル化合物と同じ位安定である[30]。

叙上の知見を考慮にいれると、私達の実験では、メラノーマ細胞の Golgi 画分を [ $^3\text{H}$ ]AcCoA と保温して生成した主要産物は、[N- $^3\text{H}$ ]Neu5Ac を持つジシアロガングリオシド  $\text{GD}_3$  であることを示している。一番可能性の高い説明は、 $^3\text{H}$ -アセチル基がヌクレオチド供与体 (アセチルCoA) から内在性のデ-N-アセチル  $\text{GD}_3$  上のフリーなアミノ基に転移したというものである。内在性  $\text{GD}_3$  上でアセチル基置換反応、つまりアセチル基が他のアセチル基と入れ換るといった反応が起こったとも考えられるが、この可能性は低いだろう。前駆体と生成物が同一であるという「収支なしの」反応に何か有意義な目的を考えると殆んど不可能である。と言っても現在のデータではこの可能性を排除できないが、標識された AcCoA からアセチル基が CMP-Neu5Ac の前駆体である  $\text{GlcNH}_2$ -6-P に渡され、そこからシアル酸を内在性受容体に転移して私達の見たような生成物ができることも理論的には可能である。しかしながら、これには、数種のヌクレオチドや 2 価陽イオンなどの様々な補助因子を要求するサイトゾル酵素により触媒される合計 7 個の連続した酵素反応が含まれている。実験における放射性標識は、単離し洗滌した Golgi 画分を用いて行ったのであって、このよう

divalent cations. Since the labeling was done with isolated washed vesicles, without addition of any of these enzymes or factors, this explanation also appears highly unlikely. Furthermore, the results of the pulse-chase study in intact cells cannot be explained by such a reaction.

Thus, the most likely scenario is the action of a specific de-N-acetylase on intact gangliosides. We are currently searching for such an enzyme in the melanoma cells. We are also in the process of characterizing the N-acetyl-transferase reaction in the Golgi-enriched vesicles. It will be interesting to see if it is similar to the O-acetylation of sialic acids, which we have previously studied in rat liver (31,32). Regardless of the exact enzymatic mechanisms involved, the precise subcellular site(s) of these reactions also require further study. Since the addition of sialic acid itself is felt to occur in the *trans* Golgi apparatus or the *trans* Golgi network (33,34), it is reasonable to assume that the acetylation reactions must occur at some point after this event. Candidate regions include the *trans*-Golgi apparatus itself, the *trans*-Golgi network, the endosomal compartments, and the plasma membrane.

#### What Do De-N-acetyl-gangliosides Do?

The only experiments that deal with possible roles for de-N-acetyl gangliosides are those of Hanai *et al.* (7). Unlike  $G_{M3}$ , which inhibited tyrosine phosphorylation of the EGF receptor, synthetic de-N-acetyl  $G_{M3}$  was shown to have a significant stimulatory effect upon this process. In keeping with this finding, synthetic de-N-acetyl  $G_{M3}$  proved to be a stimulator of growth of several cell types. On the other hand, de-N-acetyl  $G_{M3}$  did not have any effect upon the number of EGF receptors, nor their affinity for EGF. These studies were done by adding gangliosides to isolated membranes in the presence of detergents, and hence have to be interpreted with some caution. However, they do indicate that the endogenous de-N-acetyl ganglioside molecules could be involved in growth regulation.

On a quantitative level, some would argue that even if de-N-acetyl gangliosides do exist, they are extremely minor in amount, and questions could therefore be raised about their biological relevance. However, there are in fact several previous examples in which apparently minor modifications of carbohydrates are known to play major biological roles. In studies of mannose-6-phosphate residues on lysosomal enzymes many years ago we found that a small percentage of the N-linked oligosaccharides carried this modification at steady state (35,36). In spite of this fact, this minor and transient modification has a crucial function in the sub-cellular trafficking of lysosomal enzymes to the lysosome (37). In the case of the heparin molecule, 3-O-sulfation is a minor and rare modification which is however critical in mediating its anticoagulant action (38). In fact the experiments of Hanai *et al.* indicate that small amounts of de-N-acetyl- $G_{M3}$  are sufficient to stimulate tyrosine

な酵素や因子を特に加えてはいないのである。従って、この説明は殆んど成り立つとは思えない。さらに、細胞を用いてのバルスーチェイス実験の結果は、この反応では全く説明がつかない。

従って、最もありそうなシナリオは、ガングリオシドに働らく特異的デ-N-アセチラーゼの作用ということになる。私達は現在メラノーマ細胞を用いて、このような酵素を探している。私達は Golgi 画分でN-アセチル転移酵素反応を同定している最中である。以前私達がラット肝で調べたような[31,32]シアル酸のO-アセチル化反応と同じかどうか興味深い。正確な酵素的メカニズムを知るだけでなく、これらの反応が細胞内のどこで起こるか正確に知ることも必要である。シアル酸の付加は *trans* Golgi 装置内かまたは *trans* Golgi ネットワークで起ると思われているので[33,34]、アセチル化反応は、この付加より少し先の時点で起ると考えるのが当然だろう。この反応の起り得る場所は、*trans*-Golgi 装置そのもの、*trans*-Golgi ネットワーク、エンドソーム区画、および形質膜である。

#### デ-N-アセチルガングリオシドは何をするか？

デ-N-アセチルガングリオシドの役割を考えることのできる唯一の実験は Hanai らによるものだけである[7]。EGF レセプターのチロシンリン酸化を阻害する  $GM3$  と違って、合成デ-N-アセチル  $GM3$ はこのリン酸化を顕著に促進した。実際、合成デ-N-アセチル $GM3$ は数種の細胞で生育を促進したのである。一方、デ-N-アセチル  $GM3$  はEGF レセプターの数にも、EGF へのアフィニティーにも、影響を与えなかった。これらの実験は、単離した膜に界面活性剤の存在下でガングリオシドを加えるというやり方なので、解釈には注意が必要である。しかしともかく、彼等は内在性のデ-N-アセチルガングリオシドが増殖制御に関わっていることを示したのである。

定量的見地からは、デ-N-アセチルガングリオシドが確かに存在したとしても、あまりにも量が少ないのでその生物学的役割に疑問が投げかけられるかも知れない。しかし実際に、炭水化物の見掛け上僅かな修飾の結果、それが主要な生物学的役割を果たすという幾つかの先例が知られている。何年も前のリソゾーム酵素のマンノース-6-リン酸の研究では、私達は僅かなパーセントのN-結合型オリゴ糖が定常的にこの修飾を受けていることを見出した[35,36]。にも拘らず、この僅かなそして一時的な修飾が、細胞内の行先仕分けでリソゾーム酵素がリソゾームに行くために決定的な役割を果たしているのである[37]。ヘパリン分子の場合には、3-O-硫酸化は副次的で珍しい修飾であるが、しかしこれは抗凝固性を与えるのに決定的である[38]。事実 Hanai らの実験はデ-N-アセチル  $GM3$  が少量ありさえすればEGF レセプターのチロシンリン酸化を促進するのに十分であることを示している[7]。従って、私達の記載した見掛け上劣勢のデ-N-アセチル化/再-N-アセチル化

phosphorylation of the EGF receptor (7). Thus, it is possible that the apparently minor de-N-acetylation/re-N-acetylation cycle we have described could have major biological significance. The stoichiometry of the interaction with the EGF receptor is not known, nor its mechanism. If the reaction is catalytic, it would not require a large number of molecules to have a substantial effect upon the growth of a cell. These issues need to be directly addressed in a defined system such as the melanoma cells in culture.

It used to be thought that the gangliosides of human melanoma cells were relatively simple i.e.  $G_{M3}$ ,  $G_{D3}$ , and occasionally some  $G_{D2}$  (39). It is now evident that O-acetylation at different positions, and probably de-N-acetylation create substantial complexity in this matter, and that monoclonal antibodies do not cross-react much between the various structures. Thus, quite apart from the issue of growth control, these novel molecules need to be taken into account in the use of monoclonal antibodies for the diagnosis and therapy of melanoma (40).

サイクルが主要な生物学的重要性を持っていることは大いにある得る。EGF レセプターとの反応における化学量論も、メカニズムも判っていない。もし、その反応が触媒的なものであるなら、細胞の増殖に有効な効果を与えるのに数多くの分子は必要あるまい。この問題は培養メラノーマ細胞のような制御できる系で詳しく調べる必要がある。

ヒトのメラノーマ細胞のガングリオシドは比較的単純で、 $GM3$ 、 $GD3$  およびそれに時々少量の $GD2$  があると思われていた[39]。しかし、今では様々な位置でのO-アセチル化や多分デーN-アセチル化がこれら分子に本質的な複雑性を生み出していることも、また、モノクローナル抗体が異なる構造間でクロス反応をしないことも、明らかである。したがって、細胞増殖の制御に役立っていないとしても、メラノーマの診断や治療にモノクローナル抗体を用いる時は、これらの新しい構造の分子を考慮に入れておく必要がある。

三菱化成生命科学研究所・複合糖質研究室  
山形 達也 訳

## References

- Schauer, R. (1982) Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, Cell Biology Monographs 10, Springer-Verlag, New York
- Manzi, A.E., Dell, A., Azadi, P., and Varki, A. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 8094-8107.
- Sonnino, S., Ghidoni, R., Chigomo, V., and Tettamanti, G. (1982) *Adv. Exp. Med. Biol.* 152, 55-69.
- Miyoshi, I., Higashi, H., Hirabayashi, Y., Kato, S., and Naiki, M. (1986) *Mol. Immunol.* 23, 631-638.
- Hirabayashi, Y., Hirota, M., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Obata, K., and Ando, S. (1989) *Neurosci. Lett.* 106, 193-198.
- Warren, L. (1964) *Biochim. Biophys. Acta.* 83, 129-131.
- Hanai, N., Dohi, T., Nores, G.A., and Hakomori, S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6296-6301.
- Manzi, A.E., Sjoberg, E., Diaz, S.L., and Varki, A. (1990) *J. Biol. Chem.* 265 (22), 13091-13103.
- Cheresh, D.A., Varki, A., Varki, N.M., Stallcup, W.B., Levine, J., and Reisfeld, R.A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7453-7459.
- Cheresh, D.A., Reisfeld, R.A., and Varki, A. (1984) *Science* 225, 844-846.
- Thurin, J., Herlyn, M., Hindsgaul, O., Stromberg, N., Karlsson, K.A., Elder, D., Steplewski, Z., and Koprowski, H. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14556-14563.
- Sparrow, J.R., and Barnstable, C.J. (1988) *J. Neurosci.* 21, 398-409.
- Nores, G.A., Hanai, N., Levery, S.B., Eaton, H.L., Salyan, M.E.K., and Hakomori, S. (1989) *Methods Enzymol.* 179, 242-252.
- Higashi, H., Ito, M., Fukaya, N., Yamagata, S., and Yamagata, T. (1990) *Anal. Biochem.* 186, 355-362.
- Hirabayashi, Y., Hyogo, A., Nakao, T., Tsuchiya, K., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Kon, K., and Ando, S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265 8144-8151.
- Drzeniek, R. (1973) *Histochem. J.* 5, 271-290.
- Rosenberg, A., and Schengrund, C. (1976) in *Biological Roles of Sialic Acid* (Rosenberg, A., and Schengrund, C., eds) pp. 295-359, Plenum Press, New York and London.
- Gielen, W. (1967) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348, 329-333.
- Roseman, S. (1970) *Chem. Phys. Lipids* 5, 270-297.
- Warren, L. and Felsenfeld, H. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 1421-1431.
- Kornfeld, S., Kornfeld, R., Neufeld, E.F., and O'Brien, P.J. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52, 371-379.
- Neufeld, E.F., and Pastan, I. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 188, 323-327.
- Hancock, L.W., Horwitz, A.L., and Dawson, G. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 760, 42-52.
- Hildreth, J. 4th., Sacks, L., and Hancock, L.W. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 838-844.
- Renlund, M., Tietze, F., and Gahl, W.A. (1986) *Science* 232, 759-762.
- Jonas, A.J. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 175-181.
- Warren, L. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 888, 278-281.
- Shaw, L., and Schauer, R. (1988) *Biol. Chem. Hoppe. Seyler*, 369, 477-486.
- Muchmore, E.A., Milewski, M., Varki, A., and Diaz, S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 20216-20223.
- Karkas, J.D., and Chargaff, E. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 949-957.
- Diaz, S., Higa, H.H., Hayes, B.K., and Varki, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 19416-19426.
- Higa, H.H., Butor, C., Diaz, S., and Varki, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 19427-19434.
- Griffiths, G., and Simons, K. (1986) *Science* 234, 438-443.
- Farquhar, M.G. (1990) in *Intracellular Trafficking of Proteins* (Steer, C.J., and Hanover, J., eds) Cambridge Univ. Press, New York.
- Varki, A., and Kornfeld, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10847-10858.
- Varki, A., and Kornfeld, S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2808-2818.
- Kornfeld, S. (1987) *FASEB J.* 1, 462-468.
- Lindahl, U., Backstrom, G., Thunberg, L., and Leder, I.G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6551-6555.
- Thurin, J., Thurin, M., Herlyn, M., Elder, D., Steplewski, Z., Clark, W. Jr., and Koprowski, H. (1986) *FEBS Lett.* 208, 17-22.
- Vadhan Raj, S., Cordon Cardo, C., Carswell, E., Mintzer, D., Dantis, L., Duteau, C., Templeton, M.A., Oettgen, H.F., Old, L.J., and Houghton, A.N. (1988) *J. Clin. Oncol.* 6, 1636-1648.
- Svennerholm, L., Bostrom, K., Fredman, P., Månsson, J.-E., Rosengren, B., and Rymark, R.-M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 607, 100-107.