

Saccharides Involved in Implantation

着床における糖鎖の役割

Fenderson, B. A.

Department of Pathology and Cell Biology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107 USA, FAX: 1-215-955-8703

Key Words: *blastocyst, uterus, implantation, trophectoderm, endometrium, cell adhesion*

Abstract

Implantation is a complex developmental process in which the early embryo becomes embedded in the uterine wall. A key step appears to be transformation of the uterine epithelium from a non-adhesive to an adhesive (hospitable) state under the influence of steroid hormones and cytokines. This period of uterine receptivity is known to be associated with numerous glycosylation changes, including changes in the glycolipid and glycoprotein composition of the uterine epithelium, the size and charge of the apical glycocalyx, and the profile of glycoproteins secreted into the luminal fluid. The embryo also undergoes rapid changes in carbohydrate antigen expression prior to implantation. These stage-specific changes may regulate the time and place of blastocyst attachment within the uterus. Several testable hypotheses concerning the role of saccharides in implantation have emerged, invoking both carbohydrate-protein and carbohydrate-carbohydrate interactions.

要 旨

着床とは哺乳動物の初期胚が子宮壁に接着する発生上の複雑な過程である。ステロイドホルモンおよびサイトカインの影響下で非接着性の子宮上皮が接着性に変わるのが重要である。子宮壁の接着性が変わる間に、子宮上皮の糖脂質や糖タンパク組成の変化、上皮表面の複合糖質分子の大きさや荷電の変化、内腔液に分泌される糖タンパク質のパターンの変化などを含み糖鎖の変化が沢山見られる。胚でも着床に先立って糖抗原の発現が大きく変わる。これらの発生特異的な変化が胚盤胞の子宮への接着の時間や場所を調節しているのかも知れない。着床に伴う糖鎖の役割について幾つかの検証しうる仮説が出されていて、糖鎖-タンパク質相互作用と、糖鎖-糖鎖間相互作用のどちらも有力である。

A. Introduction

Implantation is a critical step in pregnancy involving rapid changes in cell adhesion and migration. After several days within the oviduct, the embryo enters the uterus as a free-floating, compact ball of 8 to 16 cells. Here, the embryo forms a fluid-filled sphere (blastocyst) with an outer epithelium (trophectoderm) surrounding a nest of pluripotent stem cells (inner cell mass). Trophectodermal cells are specialized to mediate embryo-uterus attachment, whereas the inner cell mass gives rise to many extra-embryonic and embryonic cell types, including the primary germ layers.

In the mouse, the blastocyst hatches from its extracellular coat (zona pellucida) at the 64-cell stage and attaches to the intact epithelium of the uterine wall on day 4.5 post-coitum (reviewed in 1, 2). Attachment is not random, but takes place specifically along the anti-mesometrial surface of the uterine wall. Ultrastructural studies have shown that this initial stage of implantation is accompanied by interdigitation of surface microvilli and close apposition of cell membranes (3). Blastocyst adhesion is believed to trigger local degeneration of the uterine epithelium and permit integrin-family receptors on trophectodermal cells to engage extracellular matrix molecules in the

A. はじめに

着床は妊娠における決定的な過程で、細胞接着と移動の急速な変化を含んでいる。卵管中で数日を過ごしたあと胚はコンパクトな8乃至16細胞からなるボールとして自由にたまたまように子宮に入ってくる。この時の胚は全能性の幹細胞の塊(内部細胞塊)を外壁の上皮(栄養外胚葉)が包み液で満たされた球状(胚盤胞)の形をしている。栄養外胚葉の細胞は胚-子宮間接着を仲介することができるように特異的に分化していて、一方、内部細胞塊は数多くの種類の胚体外細胞および始原生殖細胞を含む胚細胞へと分化する。

マウスでは、胚盤胞は64細胞期のときに胚を包んでいる膜(透明帯)から脱け出し、そして交尾後4.5日で子宮の上皮上に接着する(総説1,2を参照)。接着位置は不規則性のものではなく、子宮壁の反間膜側に沿って特異的に起こる。電子顕微鏡的観察によると、この着床の最初の段階のときに細胞表面の微小絨毛が互いにかみあい細胞膜の強い付着が起こる(3)。胚盤胞の接着が子宮上皮の局所的な分解の引き金をひき、その結果、栄養外胚葉上のインテグリンファミリー受容体が子宮上皮の基底膜

basement membrane of the uterine epithelium (4-6). Within 24 hours of contact, the embryo is firmly embedded in the uterus and has begun to form extraembryonic membranes involved in nutrient absorption and secretion.

The cellular and biochemical mechanisms that control uterine receptivity and implantation are largely unknown. How do the embryo and the mother first recognize each other? How is trophoblast invasion of the uterus initially permitted and then abruptly stopped? In this minireview I shall summarize some of the evidence that cell surface and extracellular matrix polysaccharides play an important role in regulating embryo-uterine interactions during implantation.

B. Period of Uterine Receptivity

Adhesion between intact epithelia is uncommon and is permitted in the uterus only during a short window of time in early pregnancy (reviewed in 7). This period of uterine receptivity is known to be regulated by circulating levels of the sex hormones, progesterone and estrogen (8). In the absence of nidatory (nest-building) estrogen, blastocysts in the uterus will not implant; this, despite the fact that implantation-delayed embryos are able to attach to a variety of substrates *in vitro* and ectopic sites *in vivo*. A simple interpretation of these results is that maternal receptivity to implantation is regulated by transformation of the uterine epithelium, from a non-adhesive to an adhesive (hospitable) state under the influence of progesterone and estrogen.

Considerable research has been directed towards identifying the hormonally-regulated molecules that establish uterine receptivity and mediate cell interactions during implantation. Recent studies indicate that leukemia inhibitory factor (LIF) is involved in stimulating uterine receptivity in the mouse (9, 10). LIF is a 50 kD secreted cytokine with many functions, including: inhibition of proliferation in certain hematopoietic cell lines and inhibition of differentiation in cultured embryonic stem cells. Northern blot and *in situ* hybridization studies have revealed that LIF is synthesized by the uterine glandular epithelium on day 4 p.c. (9). Transgenic mice lacking the LIF gene are fertile, but fully incapable of initiating intra-uterine pregnancy (10). Infertility appears to be due to the lack of LIF production by the uterus, as mutant (LIF-less) embryos undergo normal blastocyst formation and hatching in homozygous females, and upon transfer, they implant normally in both wild-type and heterozygous females. Together, the results indicate that LIF plays an essential role in implantation; however, the mechanism of LIF action remains unclear. For example, it is unclear whether LIF induces physiological changes in the uterine epithelium, the blastocyst, or both. The fact that LIF is secreted by the glandular epithelium suggests that this cytokine accumulates in the uterine fluid and provides a differentiation signal to cells expressing cell surface LIF receptors: presum-

内の細胞外マトリックスと反応できるようになると信じられている(4-6)。接触から24時間以内に胚は子宮にしっかり埋め込まれ、栄養の吸収や分泌に関わる胚体外膜を作り始める。

子宮の受容性や着床を制御する細胞学的および生化学的メカニズムの殆どは未知である。胚と母体は互いにどうやって相手を認識するのだろうか？ 栄養外胚葉による子宮壁への侵入が始めるは許されていて、そしてその後は突如として禁止されるのはどうしてだろうか？ このミニレビューでは、細胞表面および細胞外マトリックスの複合糖質が着床の間の胚-子宮間の相互作用を制御するのに重要な役割を果たしているという事実を総括しよう。

B. 子宮の妊娠可能時期

正常な上皮間の接着は普通起るものではないが、妊娠初期の極く限られた時間内だけ子宮内で見られる(7)。この子宮の受容性周期は性ホルモンであるプロゲステロンとエストロゲンの血中濃度により調節されていることが判っている。着床ホルモンであるエストロゲンが欠けていると胚盤胞は子宮内にあっても着床できない；着床遅延胚が*in vitro*では様々な基質に、そして*in vivo*では色々な異所性の場所に接着できるにもかかわらずである。この結果の単純な説明は、母親側の着床への受容性は子宮上皮がプロゲステロンとエストロゲンの作用の下で非接着性から接着受容性へと変容することで制御されているというものである。

ホルモンで制御されて子宮の受容性を決め、着床時の細胞間相互作用を仲立ちする分子を求めて数多くの研究がなされている。最近の研究によると、マウスでは白血球阻止因子(LIF)が子宮の受容性を促進する(9, 10)。LIFは50 kDaのサイトカインで、ある種の造血細胞株の増殖を阻害したり、培養下の胚幹細胞の分化を阻害したりするほか、多くの作用がある。ノーザンブロットと*in situ*ハイブリダイゼーションにより交尾後4日の子宮腺上皮細胞でLIFが合成されることが明らかとなった(9)。LIF遺伝子を欠いたトランスジェニックマウスは不妊ではないが、決して子宮内妊娠を起こすことができない(10)。LIFを欠失した突然変異体の胚でも同型接合体の雌体内で正常な胚盤胞を形成しさらに透明帯から脱け出ることができ、もしそこで野生型かヘテロ接合体の雌の子宮内に移植すれば正常に着床できるので、この不妊は子宮内でLIFを合成できないためであるように思われる。従って、このLIFは着床で重要な働きをしていると思われるが、LIFの作用機作はまだ不明のままである。たとえば、LIFが生理的な変化を子宮上皮に及ぼすのか、胚盤胞に及ぼすのか、あるいは両者に対してかは明確でない。LIFが腺上皮により分泌されるという事実はこのサイトカインが子宮内腔液中に貯り、細胞表面にLIFレセプターを発現している細胞、おそらく子宮上皮および/または栄養外胚葉細胞、に分化シグナルを与え

ably uterine epithelial and/or trophoblastic cells.

Under the influence of steroid hormones and cytokines, the expanded blastocyst and the uterine epithelium become mutually adhesive. Obvious cell adhesion molecules such as laminin, fibronectin, and uvomorulin (E-cadherin) have not been identified on the apical surface of the mouse blastocyst or uterine epithelium (reviewed in 11). On the other hand, uterine receptivity to implantation is known to be associated with numerous glycosylation changes, including changes in: i) the glycoprotein and proteoglycan composition of the surface epithelium (12, 13); ii) the glycolipid composition of the epithelium (14-16); iii) the size and charge of the apical glycocalyx (17-19); and iv) the profile of glycoproteins and proteoglycans secreted into the luminal fluid (13, 20). These changes in polysaccharide expression may be controlled by LIF-induced changes in glycosyltransferase gene expression, and serve to regulate the time and place of blastocyst attachment within the uterus.

C. Carbohydrates of the Uterine Epithelium

A consistent finding among many different mammalian species that have been examined is a dramatic decline in the expression of negatively-charged molecules in the uterine epithelium at the time of implantation. Early studies using cationic dyes revealed a dramatic decline in the thickness and electric charge of the apical glycocalyx during the period of uterine receptivity (17, 18). Lectin histochemical studies corroborated these findings, noting a specific loss of sialic acid and increase in terminal galactose at this stage (12). Our own immunohistochemical analyses of glycosphingolipid expression in the uterus revealed a significant decline in polysialoganglioside and a corresponding increase in neutral glycolipid during early pregnancy in the human (15) and rabbit (16). A quantitative estimate for these biochemical changes was obtained by measuring the adhesion of uterine vesicles to DEAE-coated beads in the presence of increasing amounts of dextran sulfate. In these elegant experiments, Morris and Potter demonstrated a 50% decline in the net-negative charge of the mouse uterine epithelium on day 4.5 p.c. (19). The blastocyst also undergoes a decline in negative surface charge prior to implantation (21). These biochemical changes are believed to facilitate maternal-fetal interaction by reducing electrostatic repulsion between opposing cell surface membranes. This hypothesis is supported by the finding that quantitative changes in polysialic acid expression at the cell surface can dramatically alter the strength of cell-cell adhesion (22).

The regional specificity of blastocyst attachment within the uterus of many species (*e.g.* along the anti-mesometrial surface in the mouse) suggests that local changes in charged or other molecules may be more important than these global changes. In this connection, regional differences in saccharide

るものと推定できる。

ステロイドホルモンとサイトカインの影響下で、後期胚盤胞と子宮上皮は共に互いに接着できるようになる。ラミニン、フィブロネクチン、ウボモルリン(E-カドヘリン)のような既知の細胞接着分子はマウス胚盤胞と子宮上皮の内腔側細胞表面では検出されていない(総説11)。他方で、i)子宮上皮の糖タンパク質やプロテオグリカン組成の変化(12、13)、ii)上皮の糖脂質の変化(14-16)、iii)内腔側複合糖質の大きさと荷電の変化(17-19)、iv)子宮内腔液に分泌される糖タンパク質とプロテオグリカンの組成の変化(13、20)に見られるように、子宮の着床受容性は数多くの糖鎖の変化と対応している。糖鎖におけるこのような変化はLIFで誘導される糖転移酵素遺伝子発現の変化により制御され、そして子宮内での時間的かつ空間的に特異的な胚盤胞の子宮への接着を制御するのに役立っているであろう。

C. 子宮上皮の糖鎖

調べた限りの各種の哺乳動物を通じて一致している発見は、着床時に子宮上皮中の陰性荷電分子の発現が極度に減少することである。陽イオン性色素を用いた初期の研究では、子宮の妊娠可能時期に上皮細胞内腔側糖皮の厚さと電荷が極端に減ることが明らかとなった(17、18)。レクチンによる組織化学的研究はこれを確認しただけでなく、シアル酸が特異的に減少し末端ガラクトースが増加することに気付いた(12)。子宮におけるスフィンゴ糖脂質の発現を調べた私達の免疫組織化学的研究では、ヒト(15)とウサギ(16)の妊娠初期にポリシアロガングリオシドが顕著に減って、代りに中性糖脂質が増加していることが明らかとなった。この生化学的変化を定量化するために子宮小胞をDEAE被覆ビーズにデキストラン硫酸の濃度を変えて吸着させた。このエレガントな実験でMorrisとPotterは交尾後4.5日のマウス子宮上皮では正味の陰性荷電が50%減少していることを示した(19)。胚盤胞も着床に先立って表層の陰性荷電が減少する(21)。これらの生化学的変化が、対応する細胞表面膜の間での静電的な反撥を減少させて母体-胚間相互作用を容易にするものと思われる。この仮説は、細胞表面におけるポリシアル酸の発現を定量的に変化させることが細胞間接着の強度を劇的に変えるという発見(22)で支持されている。

哺乳動物の多くの種で胚盤胞が子宮に接着する場所に部域特異性(マウスでは反間膜側に沿った部域)のあることは、荷電分子又は他の分子の局所的変化がこれら分子の全体での変化よりも重要であることを示唆している。これに関して、糖鎖発現

expression have been observed in the rabbit uterus: differences in lectin staining were observed between the mesometrial and anti-mesometrial surface of the uterine lumen, and between implantation chambers and inter-blastocyst segments (23). If negatively charged molecules do inhibit blastocyst attachment, then future studies on the distribution of sialic acid, glucuronic acid, sulfatide, and sulfated proteoglycans in the uterus may reveal regional differences that correlate inversely with the distribution of implantation sites.

Monoclonal antibodies provide invaluable tools for analyzing the distribution of saccharides in tissues. Using well-characterized monoclonal anti-carbohydrate antibodies, several groups have reported the presence of fucosylated lacto-series glycans in the uterine endometrium (see Table 1 for carbohydrate structures). For example, immunofluorescence assays have shown that Le^x, Le^y, and H type 1 chain are all present on the apical and glandular epithelium in the mouse (24-26). These antigens are not present on uterine stromal cells; however they are found in the luminal fluid (25) where they appear to modify the antigenic properties of preimplantation embryos (27). Experiments using hormone replacement in ovariectomized mice have shown that the expression of these fucosylated glycans in the uterus is controlled by estrogen and progesterone (26). Of further interest, is the finding that the H type 1 chain structure is uniformly distributed in the uterus on days 1-3 of pregnancy, but assumes a patchy distribution at the

における部域差がウサギ子宮で報告されている：子宮内腔の間膜側と反間膜側の表面の間、および着床チェンバーと胚盤胞間部分の間でレクチン染色性が異なっていたというものである(23)。もし陰性荷電分子が本当に胚盤胞の接着を阻害するのならば、子宮内のシアル酸、グルクロン酸、スルファチド、酸性プロテオグリカンの分布を調べれば、着床部位の分布と反比例する部域的な差が明らかになるかも知れない。

単クローン抗体は組織における糖鎖の分布を解析するためにはかり知れぬ程重要な道具である。十分に性質が調べられた単クローン抗糖鎖抗体を用いて、子宮内膜にフコースの付いたラクト系糖鎖が存在することを幾つかの研究グループが報告している(糖鎖構造については表1を参照のこと)。たとえば、免疫蛍光抗体法で、マウスの内腔側上皮および腺上皮にLe^x、Le^y、H1型糖鎖のすべてが存在していることが示されている(24-26)。これらの抗原は子宮のストローマ細胞にはない。しかし、これらの抗原は子宮内腔液にあり(25)、着床前の胚の抗原的性質を変えるかも知れない(27)。卵巣切除をしてホルモンを置換したマウスを用いて、子宮におけるこれらのフコースの付いた糖鎖の発現はエストロゲンとプロゲステロンにより制御されていることが明らかとなった(26)。もっと興味深いことは、H1型糖鎖は妊娠1-3日では子宮に一様に分布しているのに、着床時期になるとパッチ状の分布をとるという発見である(25)。ラクト

Table 1. Carbohydrate differentiation antigens of mouse trophoderm and uterine epithelium

Antigen	Structure	Expression ^a	
		Troph	Epith
Le ^y	Galβ1→4G1cNAcβ1→3Gal $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$ $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$	+++	+++
Le ^x	Galβ1→4GlcNAcβ1→3Gal $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$	-	++
H type 1	Fucα1→2Galβ1→3G1cNAcβ1→3Gal	-	+++
H type 2	Fucα1→2Galβ1→4G1cNAcβ1→3Gal	-	-
SSEA-3	Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Gal	++	-
SSEA-4	NeuAcα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Gal	++	-
Sulfatide	SO ₃ →3Galβ1→Ceramide	-	++

^a Results of indirect immunofluorescence assays on early embryos and uterine frozen sections using monoclonal anti-carbohydrate antibodies. Data are summarized from published results (16, 24-27, 33, 34, 41).

time of implantation (25). Fucosylation of lacto-series glycans may be a general protective mechanism to inhibit the attachment of galactose-specific pathogens to the female reproductive tract (28). On the other hand, there is increasing evidence that fucosylated lacto-series glycans provide ligands for homing receptors and complementary cell surface oligosaccharides. Evidence that Le^y and H are involved in cell recognition during implantation is discussed further below.

Biochemical studies have shown that uterine epithelial cells synthesize many different polysaccharides, including lactosaminoglycans (29) and keratan/heparan sulfate proteoglycans (13, 30). Lactosaminoglycans (large N-linked polymers of galactose and N-acetylglucosamine) have been suggested to regulate the intercellular adhesion of mouse uterine epithelial cells by providing ligands for cell surface $\beta 1 \rightarrow 4$ galactosyltransferase. This hypothesis is supported by the finding that agents which interfere with $\beta 1 \rightarrow 4$ galactosyltransferase activity disrupt the adhesion of uterine epithelial cells, but not stromal cells, in culture (29). Simple sugar modifications of lactosaminoglycans, such as fucosylation, sulfation, or sialylation, could provide a mechanism for rapidly modifying the availability of oligosaccharide acceptors for surface galactosyltransferase during the estrous cycle and early pregnancy, and thereby regulate the strength of cell-cell adhesion. In contrast to lactosaminoglycans, sulfated proteoglycans (PGs) are generally considered to anchor cells to their underlying basement membrane. In this connection, an estrogen-dependent increase in the turnover of heparan sulfate PG at the receptive stage has been suggested to trigger the sloughing of uterine epithelial cells, by reducing the strength of cell-substrate adhesion (13). Increased PG turnover during the period of uterine receptivity may thereby serve to promote the penetration of trophoblastic cells through the uterine epithelium.

D. Carbohydrate Antigens of Early Embryos

The mammalian embryo undergoes a complex program of glycosylation changes that are presumed to prepare it for implantation (reviewed in 31 and 32). When examined with various anti-carbohydrate monoclonal antibodies, cleavage-stage mouse embryos have been found to express several globo-series antigens, including globoside, Forssman, and stage-specific embryonic antigens (SSEAs) 3 and 4 (see Table 1 for carbohydrate structures). SSEA-3 and -4 are synthesized during oögenesis and present in the membranes of eggs and preimplantation embryos (33, 34). These antigens disappear from trophoblastic cells following implantation, but reappear on primitive endoderm and one of its derivatives, extraembryonic visceral endoderm (an absorptive and secretory epithelium that contributes to the placenta), during postimplantation development (35). Unlike SSEA-3 and -4, the Forssman antigen appears on the embryo surface after the third

系糖鎖にさらにフコースが付加することは、雌性生殖管にガラクトースに特異的な病原体が接着するのを阻害するための一般的な防衛メカニズムであろう(28)。一方で、フコースの付いたラクト系糖鎖がセレクチンなどのホーミングレセプターのリガンドや相補的な細胞表層オリゴ糖となっていることが最近次々と判って来ている。Le^yとHが着床時に細胞認識に係わっているという実験事実は後にくわしく述べたい。

生化学的研究で、子宮上皮はラクトサミノグリカン(29)、ケラタン/ヘパラン硫酸プロテオグリカン(13,30)のような多くの互いに異なった多糖を合成していることが示されている。ラクトサミノグリカン(ガラクトースとN-アセチルグルコサミンのN結合型ポリマーである)は細胞表面の $\beta 1-4$ ガラクトース転移酵素に対して基質となることでマウス子宮上皮細胞間同士の接着を制御していると言われている。この仮説は、 $\beta 1-4$ ガラクトース転移酵素活性を阻害する試薬は培養下で上皮細胞の接着を阻止するが、培養ストローマ細胞の接着は邪魔しないという発見(29)で支持されている。フコースの付加、硫酸化、シアル酸付加などのような簡単な糖修飾をラクトサミンに行なうことで、性周期の間や初期妊娠に表面ガラクトース転移酵素のオリゴ糖受容体の供給を急速に変え、その結果細胞間接着の強さを制御するメカニズムが可能となる。ラクトサミノグリカンとは対照的に硫酸化プロテオグリカン(PG)は細胞をその下の基底膜にしっかりと据え付けていると考えられている。これに関連して、妊娠可能期にエストロゲンに依存してヘパラン硫酸PGの代謝回転が増加すると、細胞-基質間接着の強さが減少するために子宮上皮細胞の脱落が引き起こされると言われている(13)。子宮の受け入れ可能期にPGの代謝回転が上昇することは、栄養外胚葉が子宮上皮内を突き抜けることを促進するであろう。

D. 初期胚の糖抗原

哺乳動物の胚はグリコシル化の変化に富んだ複雑なプログラムを示すが、これは着床の準備のためらしい(総説31,32)。抗糖鎖単クローン抗体で調べると卵割期のマウス胚はグロボシド、フォルスマン、発生段階特異的胚抗原であるSSEA3、SSEA4(糖鎖構造は表1を参照のこと)などのグロボ系抗原を発現している。SSEA3とSSEA4は卵子形成の時に合成され、卵子表面および着床前期胚表面に存在する(33,34)。これらの抗原は着床後に栄養外胚葉から消失するが、着床後の発生では、原始内胚葉およびそれから派生した胚体外近位内胚葉(いずれ胎盤となる吸収性かつ分泌性上皮)上に再度発現する(35)。SSEA3およびSSEA4とは異なり、フォルスマン抗原は第3卵割期のあとで胚

cleavage division (day 3 p.c.) and its expression segregates with the inner cell mass during blastocyst formation (36).

We have carefully examined the expression of these globo-series antigens in human embryonal carcinoma (EC) cells during retinoic acid (RA) induced differentiation. EC cells, the malignant stem cells of teratocarcinomas, are believed to resemble early embryonic cells. Our results indicate that glycolipid core structure switching from globo-series to lacto- and ganglio-series is hallmark of EC cell differentiation (37, 38). These membrane changes appear to be mediated by changes in the activity of key enzymes (39). For example, the activities of $\alpha 1 \rightarrow 4$ galactosyltransferase (the key enzyme for synthesis of globotriosyl core structure) and $\beta 1 \rightarrow 3$ galactosyltransferase (the key enzyme for synthesis of SSEA-3 and -4) were both reduced 4-fold during RA-induced differentiation of NTERA-2 EC cells. By contrast, the activities of $\beta 1 \rightarrow 3$ N-acetylglucosaminyltransferase (the key enzyme for synthesis of lactotriosyl core structure) and $\alpha 2 \rightarrow 3$ sialyltransferase (the key enzyme for synthesis of ganglio core structure) were both increased during differentiation. These findings are important, because they relate carbohydrate changes to specific proteins: glycosyltransferases. Since some of these proteins have been well characterized and their respective genes cloned, it will be possible in the near future to relate membrane carbohydrate changes to changes in gene expression. Although the globo-series antigens of mammalian embryos and embryonal carcinoma cells have been characterized as glycolipids, our recent studies using an inhibitor of glycolipid synthesis (PDMP) indicate that some of these epitopes may be carried also on membrane glycoproteins (40).

In addition to globo-series antigens, early mouse embryos have been found to express lacto-series antigens, including Le^x (41), dimeric Le^x (27), Le^y (27), and sialylated N-acetyllactosamine (42). These antigens appear to represent simple sugar modifications of high molecular weight lactosaminoglycans that are present in embryonic cell membranes from fertilization through neurulation (43). We have suggested previously that changes in the terminal structure of "embryoglycans" provide cells with signals necessary for morphogenetic cell interactions (31). In this connection, the Le^x antigen (also referred to as SSEA-1 or CD-15) appears dramatically on the embryo surface at the late 8-cell stage (41). It is lost from the outer tier of blastomeres during trophoblast differentiation at the 32-cell stage, but continues to be expressed by pluripotent stem cells of the inner cell mass. The appearance of Le^x correlates approximately in time with the onset of compaction, and there is evidence to suggest that fucosylated lactosaminoglycans facilitate the close interaction and sorting of blastomeres at this stage (44-46).

Whereas Le^x is the immunodominant carbohydrate epitope of morula-stage mouse embryos, the Le^y antigen ap-

表面にあらわれるが(交尾後3日)、胚盤胞形成時には内部細胞塊に特異的に発現する(36)。

私達はレチノイン酸(RA)で分化誘導したヒト胚性芽腫(EC)でグロボ系抗原の発現を詳しく調べた。テラトカルシノーマの悪性幹細胞であるEC細胞は初期胚に似ていると思われる。私達の実験結果は、糖脂質のコア構造がグロボ系からラクト系およびガングリオ系に変換することが、EC細胞分化の証明となることを示している。このような膜表面の変化は鍵となる酵素活性の変化でもたらされている(39)。たとえば $\alpha 1-4$ ガラクトース転移酵素(グロボ系コア構造を作る鍵となる酵素)と $\beta 1-3$ ガラクトース転移酵素(SSEA3およびSSEA4合成の鍵となる酵素)はNTERA-2 EC細胞のRA誘導による分化の時に共に活性が4分の1となる。これに反して、 $\beta 1-3$ N-アセチルグルコサミン転移酵素(ラクト系3糖構造を作る鍵酵素)と $\alpha 2-3$ シアル酸転移酵素(ガングリオ系コア構造を作る鍵酵素)は共に分化の時に増加する。この発見は糖鎖の変化を特異性の高いタンパク質、つまり糖転移酵素に関連させるので、大変重要である。これらのタンパク質の幾つかはよく性質がわかっているしその遺伝子もクローニングされているので、細胞膜糖鎖の変化を遺伝子発現の変化で語ることが近い将来に可能となるだろう。哺乳動物胚とEC細胞のグロボ系抗原は糖脂質であると同定されているが、糖脂質生合成阻害剤であるPDMPを用いた私達の実験では、このエピトープは膜タンパク質上にもあるらしい(40)。

グロボ系抗原の他にマウス初期胚には、 Le^x (41)、 Le^x が二重につながった抗原(27)、 Le^y (27)などのラクト系抗原やシアリルN-アセチルガラクトサミン(42)が発現している。これらの抗原は受精時から神経胚期までの胚の表層に存在している高分子量のラクトサミノグリカン単糖のレベルで修飾したものと言える(43)。以前私達は「エンブリオグリカン」の末端変化が形態形成時の細胞間相互作用に必要なシグナルとなるだろうと示唆している(31)。これに関連するが、 Le^x 抗原(SSEA1でもあり、CD15とも同じである)は8細胞期後期に胚表面に劇的に現われる(41)。この抗原は32細胞期には栄養外胚葉の分化に伴って胚表層から失われるが、多分化能のある幹細胞である内部細胞塊(ICM)では引き続き発現している。 Le^x の出現はコンパクションの始まりの時期とほぼ一致し、フコースの付加したラクトサミノグリカンがこの時期の割球間同士の密接な相互作用と細胞の行き先の仕分け(ソート)を容易にするという証拠がある(44-46)。

Le^x は桑実胚期のマウス胚では免疫的には一番多い糖鎖抗原であるが、胚盤胞期に優勢な抗原エピトープは Le^y 抗原であると

pears to be the immunodominant carbohydrate epitope of the blastocyst (27). Le^y differs from Le^x by addition of fucose (see Table 1) and appears on both trophoctodermal cells and inner cell mass at the 16-32 cell stage. Of interest, embryos flushed from the uterus on day 4 p.c. are Le^y -positive, whereas embryos flushed from the oviduct and cultured to the blastocyst stage *in vitro* are Le^y -negative (27). These results suggest that cytokines or coating-factors within the uterine fluid regulate the appearance of this antigen on embryos. Early embryos are known to acquire other carbohydrate differentiation antigens from the oviduct or uterus (47). These epigenetic changes may be critically important for embryo development in utero. Indeed, as discussed further below, there is evidence that Le^y interacts with blood group H antigens on the uterine epithelium to initiate blastocyst adhesion during implantation.

E. Carbohydrates Involved in Blastocyst Attachment

The oligosaccharide chains of glycolipids and glycoproteins are believed to play important roles in biological recognition. For example, oligosaccharides provide ligands that are recognized by selectins (reviewed in 48), glycosyltransferases (reviewed in 49), and complementary oligosaccharides (reviewed in 50). Oligosaccharides are also known to modulate the strength of interaction of various cell adhesion molecules (22).

Several hypotheses concerning the role of surface carbohydrates in implantation have been put forward, invoking both protein-carbohydrate and carbohydrate-carbohydrate interactions. For example, Morris and co-workers have suggested that an estrogen-dependent decline in heparan sulfate PG reduces the net-negative charge of the uterine epithelium, permitting trophoctoderm adhesion to proceed (13). Carson and co-workers have proposed a different model, in which heparan sulfate PGs on the trophoctodermal cell surface are recognized by receptors (possibly other PGs) on the apical surface of the uterine epithelium (reviewed in 11). Evidence to support their model is summarized here as follows: i) heparan sulfate PGs have been detected on the apical surface of both uterine epithelial cells and early embryos (5, 13, 30); ii) blastocysts treated with heparinase exhibit reduced attachment to uterine epithelial cells and ECM molecules *in vitro* (5); iii) exogenous heparin and inhibitors of PG biosynthesis have both been reported to inhibit blastocyst attachment and trophoctoderm outgrowth *in vitro* (5). This model is attractive because PGs and their glycosaminoglycan side chains are known to provide multiple ligands for cell attachment, and regulate a variety of developmental processes. A key prediction of this model is that heparan sulfate PGs are re-routed from the basal to the apical surface membrane under the influence of steroid hormones and cytokines: *i.e.*, a hormonally-regulated change in intracellular protein sorting. PGs secreted by the uterine epithelium may

思われる(27)。 Le^y は Le^x にフコースがもうひとつ付加した形で(表1参照)、16-32細胞期の栄養外胚葉と内部細胞塊の両方に発現する。大変面白いことに、交尾後4日目の子宮からフラッシュ(勢いよく緩衝液などで洗い出すこと)した胚は Le^y 陽性だが、卵管からフラッシュして *in vitro*で培養して胚盤胞期にした胚では陰性なのである(27)。このことは子宮内腔液中のサイトカインが被覆因子が胚表面のこの抗原の出現を制御していることを示唆している。初期胚は卵管又は子宮から他の糖鎖分化抗原を獲得することが知られている(47)。これらの後生的変化は子宮内での胚発生にとりわけ重要のように思われる。実際、あとで詳しく述べるように、 Le^y は子宮上皮のH型抗原と反応して着床のための胚盤胞接着をもたらすという証拠がある。

E. 胚盤胞接着にかかわる糖鎖

糖脂質や糖タンパク質のオリゴ糖鎖は生物学的認識において大きな役割を果たしていると思われる。たとえばオリゴ糖は、セレクトリン(48に総説)、糖転移酵素(49に総説)や、相補的なオリゴ糖(50に総説)のリガンドとなっている。オリゴ糖が多くの細胞接着分子の相互作用の強さを調節することも知られている(22)。

タンパク質-糖鎖間相互作用と糖鎖-糖鎖相互作用の二つを含む幾つかの仮説が、着床における表層糖鎖の役割にからんで提出されている。たとえばMorrisらはエストロゲンによるヘパラン硫酸PGの減少が子宮上皮の正味陰性荷電を下げて栄養外胚葉の接着を促がすことを示唆している(13)。Carsonらは違うモデルで提出していて、それによると栄養外胚葉細胞表面のヘパラン硫酸PGは子宮上皮の細胞頭頂部表面にある受容体(おそらく他のPG)により認識されるという(11に総説)。彼等のモデルを支持する証拠は次のようにまとめることができる。即ち、1)ヘパラン硫酸PGは子宮上皮細胞と初期胚細胞の表面どちらにも検出される(5、13、30)、ii)ヘパリンナーゼで胚を処理すると、子宮上皮や *in vitro*でのECM分子への接着性が弱まる(5)、iii)ヘパリンやPG合成阻害剤を加えると胚盤胞の接着や *in vitro*での栄養外胚葉の成育が阻害される(5)。PGやグリコサミノグリカンの側鎖は細胞接着時の多価のリガンドとなることや、多くの発生過程を制御することが知られているので、このモデルは魅力的である。このモデルで予測される重要なことは、ヘパラン硫酸PGがステロイドホルモンおよびサイトカインの影響下で基底部から内腔側細胞表面へと再輸送されること、つまりホルモン制御による細胞内タンパク質輸送の変化が起こることである。子宮上皮により分泌されるPGは着床前の胚と結合し細胞間相互作用の

also bind to preimplantation embryos and either mask or create adhesive ligands for cell interaction. Thus, by several different mechanisms, hormonally-regulated changes in PG synthesis and secretion may serve to define the period of uterine receptivity.

There is increasing evidence that H type 1 chain (Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc) is a receptor (ligand) for blastocyst attachment in the mouse. As mentioned above, this antigen is highly expressed by the uterine epithelium and undergoes rapid changes in localization during the estrous cycle and early pregnancy (25, 26). Lindenberg and co-workers have reported that exogenous H oligosaccharides (lacto-N-fucopentaose I) inhibit blastocyst outgrowth on monolayers of uterine epithelial cells in vitro (51). In these experiments, the presence of 0.1 mM LNF-I in the culture medium reduced blastocyst attachment to 62 % of controls. A variety of similar milk oligosaccharides had no effect on blastocyst attachment, and LNF-I had no effect on the cell-cell or cell-substrate adhesion of uterine epithelial cells. Additional evidence for the involvement of H type 1 chain in implantation was obtained by testing the effects of monoclonal anti-carbohydrate antibodies on blastocyst attachment. In the presence of anti-H hybridoma supernatant (diluted 1:1 with fresh medium), blastocyst attachment to uterine epithelial cells was reduced to 50 % of controls (51). Based on these results, Lindenberg hypothesized that a carbohydrate-binding protein on trophectodermal cells mediates implantation via lock and key recognition of H type 1 chain glycolipids (or glycoproteins) that are present on the apical surface of the uterine epithelium.

An H-specific binding protein has not yet been identified, however mouse blastocysts have been shown to bind fluorescent neoglycoproteins containing LNF-I (52, 53). Lindenberg and co-workers reported that the percentage of embryos labeled with LNF-I-bovine serum albumin increased dramatically on day 5 of development, in parallel with the increasing ability of these embryos to undergo uterine attachment (52). A variety of other fluorescent neoglycoproteins failed to bind peri-implantation embryos. Similar findings were reported by Yamagata and Yamazaki (53), who further demonstrated that fluorescent neoglycoprotein labeling of embryos could be specifically inhibited by non-fluorescent neoglycoprotein (Fig. 1). Of interest, both groups reported that the binding of fluorescent neoglycoproteins took place preferentially over mural trophectoderm on the abembryonic surface of the blastocyst (see Fig. 1). This is important, because it is precisely the region of the embryo that is believed to mediate initial attachment to the uterine epithelium. Yamagata and Yamazaki termed the putative trophectoderm receptor for LNF-I, "MECAM", for mouse embryo cell adhesion molecule. In addition, these authors have suggested that radiolabeled neoglycoproteins could be used as probes to screen cDNA libraries for carbohydrate

接着リガンドを被覆したりあるいは新たに生み出したりするかも知れない。このようにいくつかの異なるメカニズムにより、ホルモンによるPG合成や分泌の変化が子宮の受容性の時期をきめることになるのであろう。

H(1)型鎖(Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc)がマウスにおける胚盤胞接着のための受容体であるという証拠が増えている。既に述べたようにこの抗原は子宮上皮に多く発現し、性周期と妊娠初期に発現位置が急速に変化する(25,26)。LindenbergらはH型オリゴ糖鎖(ラクト-N-フコペンタオースI)を加えると、*in vitro*で子宮上皮細胞の単層培養上での胚盤胞の成育を阻害することを観察した(51)。この実験では培地中の0.1 mMのLNF-I存在下で培養すると胚盤胞の接着はコントロールの62%と減少した。似たような構造の他のミルクオリゴ糖は胚盤胞の接着に影響はなかったし、LNF-Iは子宮上皮の細胞間および細胞-基質間の接着に何の影響も与えなかった。H(1)型糖鎖が着床にかかわっているという別の証拠は、単クローン抗糖鎖抗体胚盤胞接着への影響を調べることで得られた。抗H(1)ハイブリドーマ上清(新鮮培地で1:1に稀釈)を入れて培養すると、胚盤胞の子宮上皮細胞への接着はコントロールの50%に減少する(51)。この結果に基づいて、Lindenbergらは栄養外胚葉細胞にある糖鎖結合タンパク質が、子宮上皮内腔側細胞表面上のH(1)型糖脂質(又は糖タンパク質)を鍵と鍵穴の仕組みで認識して着床を引き起こすという仮説を唱えた。

H特異的結合タンパク質はまだ同定されていないが、マウスの胚盤胞がLNF-I蛍光性色素標識ネオ糖タンパク質と結合することが示されている(52,53)。Lindenbergらは蛍光のついたLNF-I-ウシ血清アルブミンで標識される胚の割合は、発生5日目に胚の子宮接着の割合と平行して劇的に増加することを報告した(52)。他の蛍光ネオ糖タンパク質では胚は染色されなかった。同様の観察が山形と山崎によりなされていて(53)、この時は非蛍光ネオ糖タンパク質により胚の蛍光ネオ糖タンパク質染色が特異的に阻害されることが示されている(第1図)。大変興味深いことは、両グループともに蛍光ネオ糖タンパク質による結合は胚盤胞の胚(内部細胞塊)のない側の栄養外胚葉表面に選択的に起こることを報告していることである(第1図)。このことは、子宮上皮に初めて接着する部分と思われるのはまさに胚のこの部位なので、大変重要である。山形と山崎はこのLNF-Iに対する推定上の受容体にMECAMと命名した。なお、彼等は、放射標識したネオ糖タンパク質でcDNAライブラリーから糖鎖結合タンパク質を探すことができないだろうかと言ってい

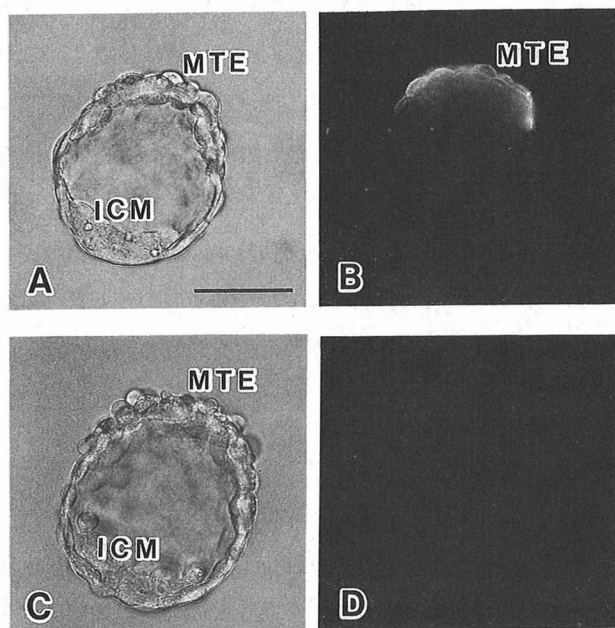


Fig. 1. Staining of mouse embryos at the implantation stage with the fluorescent LNF-I probe. Panels A and C are bright field pictures. Panels B and D are fluorescent photomicrographs of the same specimens as those shown in A and C, respectively. In panels A and B the embryo was treated with rhodamine-labeled LNF-I neoglycoprotein (8 µg/ml). In panels C and D the embryo was treated in a similar way as A and B, but unlabeled LNF-I neoglycoprotein (100 µg/ml) was also present. Abbreviations: MTE, mural side trophectoderm; ICM, inner cell mass. The bar represent 50 µm. From Yamagata and Yamazaki (53) with permission.

binding proteins.

Carbohydrate binding proteins involved in implantation may include selectins and glycosyltransferases. Selectins (also referred to as Lec-CAMs) are a family of transmembrane glycoproteins having a single calcium-dependent lectin site in their extracellular domain (reviewed in 48). They are known to mediate cell interactions between blood cells and activated endothelial cells, and play a central role in lymphocyte recirculation and inflammation. All three members of the selectin receptor family appear to recognize a carbohydrate epitope common to sialyl Le^x and sialyl Le^a. Thus, E-selectin (54, 55) and P-selectin (56) were initially shown to recognize sialyl Le^x. Subsequently, E-selectin (57, 58) and P-selectin (59) were shown to bind sialyl Le^a with similar affinity. Recent studies indicate that L-selectin also binds sialyl Le^x/Le^a (60). Selectins may play an important role in mediating cell interactions during embryonic development; however, immunohistochemical studies using monoclonal antibodies (27) and selectin receptor globulins (61) have not demonstrated the presence of sialyl Le^x/Le^a in mouse embryos. On the other hand, sulfatide (3-O-sulfated galactosylceramide) is known to interact with L-selectin (reviewed in 48), and sulfatide has been identified on the surface of uterine epithelial cells (14-16). Thus, the presence of L-selectin on the outer surface of the blastocyst could provide a basis for specific cell recognition during implantation.

Glycosyltransferases are transmembrane and soluble glycoproteins with a large C-terminal catalytic domain. These enzymes typically catalyze the transfer of a monosaccharide

る。

着床における糖鎖特異的結合タンパク質として、セレクトインや糖転移酵素も考えられる。セレクトイン(Lec-CAMとも言われる)は細胞外ドメインにCa⁺⁺依存性レクチン部位を1個持つ膜貫通型糖タンパク質の一ファミリーである(48に総説)。セレクトインは血液細胞と活性化された血管内皮細胞との間の相互作用を仲立ちし、リンパ球の再循環と炎症において中心的役割を果たしている。3種類のセレクトインはともにシアリルLe^xとシアリルLe^aに共通の糖鎖エピトープを認識すると思われる。つまり、E-セレクトイン(54,55)とP-セレクトイン(56)は最初はシアリルLe^xを認識すると言われた。次いで、E-セレクトイン(57,58)とP-セレクトイン(59)は同じような強さでシアリルLe^aに結合することが示された。最近の研究ではL-セレクトインもシアリルLe^x/Le^aに結合するという(60)。胚発生のときにもセレクトインが細胞間相互作用を仲介する上で大事な役割を担っているが、単クローン抗体(27)やセレクトイン受容体グロブリン(61)を用いた免疫学的研究によるとマウス胚にはシアリルLe^x/Le^aは発現されていない。一方、L-セレクトインと反応することが知られているスルファチド(3-O-硫酸ガラクトシルセラミド)(48に総説)が子宮内膜上皮細胞表面で見付かっている(14-16)。従って、胚盤胞の外側の表面にL-セレクトインが存在すれば、着床時の特異的細胞認識が可能である。

糖転移酵素はC末端側に大きな触媒ドメインをもつ膜貫通型かつ可溶の糖タンパク質であり、単糖(糖ヌクレオチドドナー)を合成途上のオリゴ糖鎖(アクセプター)に転移する反応を

(sugar nucleotide donor) to a growing oligosaccharide chain (acceptor substrate). In addition to their Golgi localization, glycosyltransferases may be found at the cell surface where they bind specific oligosaccharides presented by other cells or extracellular matrix molecules (reviewed in 49). Glycosyltransferases have been claimed to participate in numerous cell interactions during development, including sperm binding to the zona pellucida (62), adhesion of uterine epithelial cells (29), compaction of the morula (63), and adhesion and migration of trophoblastic cells in the postimplantation ectoplacental cone (64). These studies have focused exclusively on cell surface $\beta 1 \rightarrow 4$ galactosyltransferase and its interaction with *N*-acetylglucosaminyl structures. The identification and characterization of additional carbohydrate binding proteins in mammalian embryos and maternal tissues is clearly an important area for future research.

F. Carbohydrate - Carbohydrate Interactions

Recognition molecules for cell surface carbohydrates have been assumed to be proteins such as selectins and glycosyltransferases; however, an alternative possibility has been proposed that recognition molecules for carbohydrates include carbohydrates. For example, we have reported previously that fucosylated $\alpha 1 \rightarrow 3$ lactosamine structures self-aggregate in the presence of calcium (65). In these experiments, Le^x containing glycolipids preferentially bound to Le^x coated plastic surfaces. Le^x liposome binding to Le^x target wells was greater than binding to target wells coated with paragloboside, globoside, or sialyl-paragloboside, and binding was proportional to the amount of Le^x glycolipid loaded in the liposome or coated on the plastic surface. In addition, liposomes containing Le^x were observed to self-aggregate. The results of these and other studies suggested the novel hypothesis that carbohydrate-carbohydrate interactions play an important role in controlling surface interactions between embryonic cells during compaction, the stage at which Le^x first appears, and throughout embryonic development (reviewed in 31).

Other examples of glycolipid-glycolipid interaction have been identified, including ganglioside GM3 interaction with asialo-GM2 and lactosylceramide (reviewed in 50). The possibility that these glycolipid interactions are biologically relevant is supported by cell adhesion assays performed by Naoya Kojima and Sen-itiroh Hakomori at The Biomembrane Institute. In these elegant experiments, B16 melanoma cells expressing high levels of ganglioside GM3 were shown to attach readily to cells or plastic surfaces that contained high levels of asialo-GM2 or lactosylceramide (66). The carbohydrate specificity of this adhesion was demonstrated using enzymes (e.g. neuraminidase), monoclonal anti-glycolipid antibodies (e.g. anti-GM3), and oligosaccharides (e.g., *N*-acetyl-lactosamine) as blocking agents. Glycolipid-glycolipid inter-

触媒する。糖転移酵素はゴルジ体にあるだけでなく、細胞表面にも存在していて、別の細胞表面の特異的なオリゴ糖や細胞外マトリックスと結合するらしい(総説49)。糖転移酵素は、透明帯への精子の結合(62)、子宮上皮細胞の接着(29)、桑実胚のコンパクション(63)、着床後の外胎盤円錐中の栄養外胚葉の接着と移動(64)、などの胚発生時期のさまざまな細胞間相互作用に関与していると言われている。糖転移酵素の中でも、細胞表面の $\beta 1-4$ ガラクトース転移酵素とN-アセチルグルコサミンを末端にもった糖鎖との相互作用がとりわけ研究されている。哺乳動物胚と母体との相互作用でこれ以外の糖結合タンパク質の同定と研究が将来重要であることはいうまでもない。

F. 糖鎖-糖鎖間相互作用

細胞表面糖鎖を認識する分子はセレクチンとか糖転移酵素のようなタンパク質であると思われていたが、糖鎖認識をする分子には糖鎖もあるという可能性が提出されている。たとえば、私達はフコース $\alpha 1-3$ ラクトサミン構造はカルシウムがあると自己凝集を起こすことを報告している(65)。この実験では、 Le^x 構造を持つ糖脂質は、 Le^x をコートしたプラスチックの表面に撰択的に結合した。 Le^x をコートした表面に対する Le^x リポソームの結合力は、パラグロボシド、グロボシド、やシアリルパラグロボシドでコートしたプラスチックの表面に対する結合よりずっと強かった。さらに、結合はリポソーム中の Le^x 糖脂質の量を増やしたり、プラスチック表面にコートする Le^x を増やすとそれに比例して強くなった。また、 Le^x を含むリポソームは自己凝集することが観察された。別の研究も含めてこれらの結果から、 Le^x が最初に胚表面にあらわれる時期、つまりコンパクションの時やそのあとの胚発生の時期を通じて、糖鎖-糖鎖間相互作用が胚細胞間の表面の間の相互作用を制御するうえに重要な役を果たしているという新しい仮説が出された(31に総説)。

糖脂質-糖脂質間の相互作用の別の例も見出されている。これはガングリオシドGM3がアシアロGM2およびラクトシルセラミドと相互作用するというものである(50に総説)。これら糖脂質間の相互認識が生物学的にも意味があるということは、シアトル生体膜研究所の小島直也と箱守仙一郎による細胞接着実験により得られている。このエレガントな実験によると、ガングリオシドGM3を高度に発現しているB16メラノーマ細胞はアシアロGM2又はラクトシルセラミドを沢山含んでいる細胞やプラスチック表面に容易に接着した(66)。この接着の糖特異性は、ノイラミナーゼ処理、抗GM3抗体やN-アセチルラクトサミンを加えることで反応が阻害されることから示されている。糖脂質-糖脂質間の相互作用が、B16メラノーマ細胞を細胞外

actions were shown to potentiate the attachment of B16 melanoma cells to extracellular matrix molecules (66) and non-activated human endothelial cells in a continuous (dynamic) flow system (67).

Blastocyst attachment to the uterine wall is also a type of dynamic flow system, especially in humans, where the uterus is large in comparison to the size of the embryo. Thus, it is reasonable to ask whether implantation of the embryo is mediated by carbohydrate-carbohydrate interactions. As mentioned above, H antigens are highly expressed on mouse uterine epithelial cells, and oligosaccharide inhibition studies have implicated this structure in blastocyst attachment (51-53). Accordingly, we tested the interaction of H with Le^y, a stage-specific surface antigen of mouse trophectoderm. In order to test this hypothesis, Le^y glycolipid was prepared by enzymatic α 1 \rightarrow 3 fucosylation of type 2 chains by Mark Stroud (The Biomembrane Institute), and liposome binding to solid phase glycolipids coated on plastic plates was performed by the method previously described by Naoya Kojima, Ivan Eggens, and Sen-itiroh Hakomori (65-67). In brief, liposomes containing Le^y were labeled with ¹⁴C-cholesterol and incubated with plastic wells coated with increasing quantities of various glycolipid targets. Le^y liposomes were found to bind to both H type 1 and type 2 chain, but not Le^x, Le^s, or paragloboside (68).

Our results suggest the possibility that Le^y structures on trophectoderm interact with H structures on the uterine epithelium to initiate the implantation process. In this model (Fig. 2), a decrease in the negative charge of the uterine epithelium during the receptive stage permits multivalent, carbohydrate-carbohydrate interactions to initiate adhesion between the blastocyst and the apical surface of the uterine epithelium. Although the physical basis of carbohydrate-carbohydrate interactions is unknown, conformational studies have indicated that fucosylated lacto-series glycans are more hydrophobic than related structures. This hydrophobicity appears to be due to the proximity of the *N*-acetyl group of *N*-acetylglucosamine and the methyl group of fucose. It is unlikely that Le^y is the cell adhesion molecule identified using LNF-I neoglycoproteins, because Le^y is uniformly distributed on the blastocyst surface (27), whereas MECAM is restricted to mural trophectoderm (52, 53; see Fig. 1).

G. Glycosaminoglycans and Trophoblast Outgrowth

Following blastocyst attachment, trophectodermal cells penetrate the uterine epithelium and invade the endometrium to establish a substrate for further embryonic development. As trophectodermal cells begin to invade the uterine wall (*i.e.*, endometrium), stromal cells near the site of implantation undergo a rapid process of differentiation, termed decidualization (reviewed in 69). Decidualization of the uterine stroma is accompanied by marked changes in the synthesis of both cytoskeletal

マトリックスへ接着させることを可能にし(66)、そして絶えず流れがある中で、(ダイナミック流体システム)非活性化ヒト内皮細胞に接着させる原理となっていること(67)が示されている。

胚盤胞の子宮壁への接着は、特にヒトでは胚に較べて子宮が大きいので、ダイナミック流体システムとして考えられる。それ故に胚の着床が糖鎖-糖鎖間相互作用でもたらされるかどうか訊ねるのは理にかなってはいよう。既に述べたように、マウス子宮上皮細胞にはH型糖鎖が多く発現していて、オリゴ糖添加による阻害実験からこの構造が着床に効いていることが示唆されている(51-53)。それで私達はマウス栄養外胚葉の発生段階特異的抗原であるLeyとHが相互認識するかどうかを調べた。この仮説を検証するために、Mark Stroud(生体膜研)はH(2)型糖鎖に酵素的にフコースを α 1-3で付けた糖脂質をつくり、小島直也、Ivans Eggens、箱守仙一郎により記述された方法(65-67)でプラスチック表面にコートした糖脂質へのリポソームの結合を調べた。要約すると、Le^yを含むリポソームを¹⁴C-コレステロールで標識し、様々な糖脂質の量を変えてコートしたプラスチックのウエル中で保温した。Le^yリポソームはH(1)型とH(2)型鎖とは結合したが、Le^s、Le^x、パラグロボシドとは結合しなかった(68)。

私達の結果によると栄養外胚葉上のLe^y構造が子宮上皮上のH構造と反応して着床の過程を開始する可能性が示唆される。第2図に示すこのモデルでは、受入期の子宮上皮の陰性荷電の減少が糖鎖-糖鎖間相互認識反応を多価で可能にし、胚盤胞と子宮上皮の表面との間を接着させるというものである。糖鎖間相互作用の物理学的原理は不明であるが、コンフォメーション解析によるとフコース付加ラクト系列糖鎖はかなり疎水的である。この疎水性はN-アセチルグルコサミンのN-アセチル基とフコースのメチル基が隣り合っているためらしい。このLe^yはLNF-Iネオ糖タンパク質により同定されている細胞接着分子とは違うようである。何故なら、Le^yは胚盤胞表面上に均一に分布しているが(27)、一方、MECAMは栄養外胚葉のICMの反対側の細胞表面に限定されている(52, 53; 第1図参照)からである。

G. グリコサミノグリカンと栄養芽層の増殖

胚盤胞の接着にひきつづいて栄養外胚葉は子宮上皮細胞を貫いて子宮内膜に侵入し、胚の発育に必要な場を確立する。栄養外胚葉が子宮壁(子宮内膜)に侵入しはじめると、着床の部位近くのストローマ細胞が急速に分化するが、これは脱落膜形成と名付けられている(69に総説)。子宮ストローマの脱落膜化には細胞骨格および細胞外マトリックス両方の合成における顕著

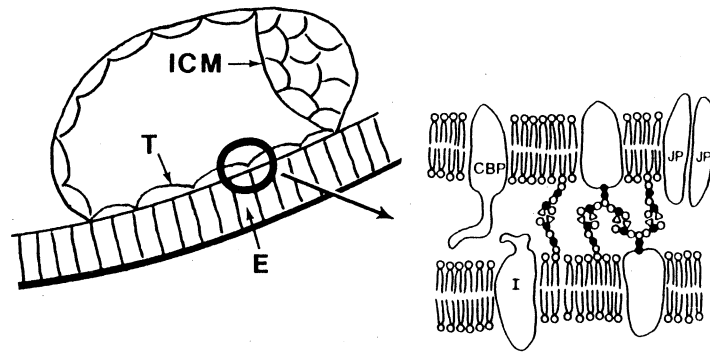


Fig. 2. A model illustrating the possible role of saccharides in mediating interactions between trophodermal and uterine epithelial cells during implantation. A decrease in the negative charge of the uterine epithelium at the receptive stage may permit carbohydrate-carbohydrate interactions, such as Le^x-H, to anchor the blastocyst to the uterine wall. The strength of Le^x to H adhesion could be regulated also by the density of carbohydrates at the cell surface and by the availability of divalent metal cations. Subsequent events in implantation may include activation of relatively non-specific, but stronger cell adhesion molecules, including carbohydrate binding proteins (CBP), gap junction proteins (JP), extracellular matrix proteins, and their integrin receptors (I). Additional abbreviations: ICM, inner cell mass; T, trophoderm; E, uterine epithelium.

and extracellular matrix molecules (5, 70, 71). These changes are believed to: i) regulate trophoblast outgrowth; ii) help establish the hemochorial placenta; and iii) protect the developing embryo from physical and immunological harm.

A major unsolved problem concerns the nature of the uterine factors which limit trophoblast outgrowth during implantation. Trophoblastic cells are able to invade a wide-variety of tissues under experimental conditions (72, 73), yet their migration is curiously restricted in the pregnant uterus. Recent studies suggest that glycosaminoglycans and proteoglycans in the extracellular matrix of decidual cells play an important role in limiting trophoblastic cell invasion of the endometrium. For example, chondroitin sulfate PGs have been shown to inhibit blastocyst outgrowth on fibronectin- and collagen type 1-coated plastic surfaces (74). Sulfated glycosaminoglycans such as chondroitin sulfate are generally believed to inhibit cell migration by steric hinderance of binding sites on cell adhesion molecules. Chondroitin sulfate is known to be synthesized by uterine stromal cells in culture (75), and has been identified recently in the pregnant mouse uterus using immunohistochemical techniques (61). Together, the results suggest that chondroitin sulfate PGs secreted by uterine decidual/stromal cells attenuate trophoblast migration by masking fibronectin and collagen binding sites in the endometrium.

Hyaluronan also appears to play an important role in controlling trophoblast invasion of the endometrium. Hyaluronan consists of a linear polysaccharide chain with repeating glucuronic acid $\beta 1 \rightarrow 3$ N-acetylglucosamine $\beta 1 \rightarrow 4$ structure. It is synthesized at the cell surface and cross-linked to other ECM proteins to form a stable, macro-molecular lattice. Recent localization studies using a fragment of a

な変化が伴っている(5,70,71)。これらの変化は、i) 栄養外胚葉の成育の制御、ii) 血液絨毛膜胎盤形成の支援、iii) 生理学的かつ免疫学的攻撃からの胚の保護のためと思われる。

未解決の大きな問題は着床期の栄養芽層の増殖を制限する子宮要因の本体についてである。栄養芽層は実験条件下では非常に多種類の組織に侵入することができる(72,73)が、不思議にもこの移動は妊娠子宮内に限られている。最近の研究は、胎盤細胞の細胞外マトリックスにおけるグリコサミノグリカンやプロテオグリカンが、栄養芽層細胞の内膜への進入を制御する上で重要であることを示唆している。たとえばコンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、フィブロネクチン又はI型コラーゲンでコートしたプラスチック表面上での胚盤胞の生育を阻害した(74)。コンドロイチン硫酸のような硫酸化グリコサミノグリカンは細胞接着分子との接着を立体的に邪魔することで細胞移動を阻止すると思われる。コンドロイチン硫酸は培養条件下の子宮ストローマ細胞により合成されることが判っていて(75)、最近では免疫組織化学的方法により妊娠マウス子宮内にあることが同定された(61)。これらの結果を総合して考えると、子宮脱落膜あるいはストローマ細胞により合成分泌されるコンドロイチン硫酸PGは、内膜上のフィブロネクチンやコラーゲンの結合部位を隠すことで栄養芽層の移動を抑えていると言える。

ヒアルロン酸も栄養外胚葉の内膜への侵入を制御する上で大きな役割を果たしているようだ。ヒアルロン酸はグルクロン酸 $\beta 1-3$ N-アセチルグルコサミン $\beta 1-4$ のくりかえし構造を持つ直鎖状の多糖である。ヒアルロン酸は細胞表面で合成され他のECM分子とクロスリンクをつくり、安定な高分子の格子を形成する。プロテオグリカンコアタンパク質の断片(76)やCD44受容

proteoglycan core protein (76) and a CD44 receptor globulin (61) indicate that hyaluronan is selectively lost from the anti-mesometrial side of the uterus following implantation. Thus, implantation appears to initiate a polarization of hyaluronan expression in the uterus: hyaluronan continues to be expressed at high levels in the region of angiogenesis and blood sinusoid formation over the ectoplacental cone, but is rapidly cleared from the extracellular matrix of decidual cells on the anti-mesometrial side of the uterus near the embryo. As suggested previously by Brown and Papaioannou (76), hyaluronan clearing may serve to restrict trophoblast invasion of the endometrium by creating a non-permissive environment for cell migration. We have suggested (61) that hyaluronan clearing also serves to direct the growth of extraembryonic ectoderm along a line of least resistance (towards the mesometrium), and thereby orient the embryo and placenta in the uterus. Continued expression of hyaluronan on the mesometrial side of the implantation chamber may serve to localize angiogenic growth factors, such as TGF β and basic FGF, and stimulate capillary growth in the decidua basalis. Future studies on the expression of hyaluronan binding proteins by trophoblastic cells of the ectoplacental cone would seem warranted.

H. Perspectives

Infertility is a significant health issue world-wide, affecting approximately 10 to 15 percent of couples. Among the causes of female infertility is an inability of the normal embryo to implant in the uterine wall. Cell surface carbohydrates are known to be involved in biological recognition, and the evidence summarized here suggests that saccharides of the blastocyst and uterine endometrium are involved in mediating cell interactions during implantation. The results also suggest a hypothesis that aberrant glycosylation in embryos or uterus underlies certain types of female infertility associated with failed implantation.

Saccharides appear to play multiple roles in regulating interactions between embryonic and maternal cells during implantation. The carbohydrate chains of cell surface glycolipids, glycoproteins, and proteoglycans have been reported to regulate the intercellular adhesion of uterine epithelial cells (29), provide receptors for blastocyst attachment to the uterine epithelium (5, 11, 51-53, 68), and control the extent of trophoblast invasion within the uterine endometrium (61, 74-76). In the near future it should be possible to test the receptor role of specific carbohydrates using anti-carbohydrate antibodies as blocking agents in both in vitro and in vivo implantation assays. In addition, it may be possible to test the role of membrane glycolipids in implantation by inhibiting their biosynthesis using the new ceramide analogue, PDMP (40). Finally, given the essential role of LIF in preparing the uterus for blastocyst attachment, it will be important to examine the effects of exogenous

体グロブリン(61)を用いた最近の実験で、着床のあと子宮の反間膜側からのみヒアルロン酸が選択的に失なわれることが示された。つまり、着床は子宮内でのヒアルロン酸発現の局在化を引き起こすらしい。ヒアルロン酸は外胎盤円錐の血管形成部位や洞様血管形成部位では高度に発現しているが、子宮の反間膜側の胚の着床部位に近い脱落膜細胞の細胞外マトリックスからは急速に失なわれる。BrownとPapaioannouが既に述べたように(76)、ヒアルロン酸の消失は細胞移動にとっては非許容的な環境を造り出すことで栄養芽層の内膜への侵入を制限することに役立っているかも知れない。私達はヒアルロン酸の消失は胚体外胚葉の成長を最も抵抗の少ない線に沿って(内膜に向けて)起こさせ、それによって子宮内の胚と胎盤の位置を決めることに効いていると示唆している(61)。着床チャンバーの間膜側でヒアルロン酸が引きつづき発現していることが、TGF β や塩基性FGFのような造血管性成長因子を遍在させ、脱落膜中での毛細血管形成を促進するのに役立っている。外胎盤円錐の栄養芽層におけるヒアルロン酸結合タンパク質の発現をこの先研究することが急務と思われる。

H. 展望

不妊は夫婦の10乃至15%に見られ世界的に重要な問題である。女性側の不妊原因の一つとして正常な胚が子宮壁に接着できないというのがある。細胞表面糖鎖は生物学認識に関わっていて、この総説でまとめた証拠は、胚盤胞と子宮内膜の糖鎖が着床時の細胞間相互作用を仲立ちしていることを示唆している。また、胚又は子宮におけるグリコシル化の異常が着床の失敗という女性側の不妊原因の一部要因となるという仮説をも示唆している。

糖鎖は着床時の胚と母体細胞間の相互作用を制御する上で多岐にわたる役割を果たしているようである。細胞表面の糖脂質、糖タンパク質、プロテオグリカンは、子宮上皮細胞の細胞間接着の調整(29)、胚盤胞の子宮上皮への接着のための受容体の用意(5, 11, 51-53, 68)、栄養芽層の子宮内膜での侵入の程度の制御(61, 74-76)をしていると言われている。ごく近いうちに、in vivoとin vitroの両方での着床検定で、阻害物質としての抗糖鎖抗体を用いて特定の特異的な糖鎖の受容体としての役割を調べるのが可能となろう。さらに、新しいセラミド類似体であるPDMP(40)を使って糖脂質の生合成を乱すことで着床における膜糖脂質の役割を調べることができるだろう。また、子宮に胚盤胞接着の準備をさせると言うLIFの本質的な機能がわかれば、

LIF on glycolipid and glycoprotein expression in uterine epithelial cells and early embryos, to define the essential changes in glycoconjugate expression that precede implantation.

The results of this research may help establish new strategies for identifying and treating female infertility, and lead to improvements in the success of in vitro fertilization/embryo transfer programs for both humans and non-human endangered species. The results may also lead to the development of risk-free contraceptive agents.

Acknowledgements

I am grateful to my colleagues for their assistance, especially Drs. Sen-itiroh Hakomori, Naoya Kojima, Mark Stroud, Tatsuya Yamagata, and Ivan Damjanov. I also thank Drs. Susan Kimber and Zheng-Mei Zhu for their helpful comments on the manuscript. This research was supported by funds from The Biomembrane Institute, Otsuka Pharmaceutical Company, and by a Biomedical Research Support Grant from Thomas Jefferson University.

References

1. Schlafke, S., and Enders, A.C. (1975) *Biol. Reprod.* **12**, 41-65
2. Glasser, S.R. and McCormack, S.A. (1979) *Adv. Biosci.* **25**, 165-197
3. Morris J.E., Potter W., Rynd, L.S., and Buckley, P.M. (1983) *J. Exp. Zool.* **225**, 467-479
4. Armant, D.R., Kaplan, H.A., and Lennarz, W.J. (1986) *Dev. Biol.* **116**, 519-523
5. Farach, M.C., Tang, J.P., Decker, G.L., and Carson, D.D. (1987) *Dev. Biol.* **123**, 401-410
6. Sutherland, A.E., Calarco, P.G., and Damsky, C.H. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 1331-1348
7. Mulholland, J., and Glasser, S.R. (1991) in "Cellular Signals Controlling Uterine Function" (L.A. Lavia, ed.), pp. 81-97, Plenum Press, New York
8. Psychoyos, A., and Casimiri, V. (1980) *Prog. Reprod. Biol.* **7**, 143-157
9. Bhatt, H., Brunet, L.J., and Stewart, C.L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **88**, 11408-11412
10. Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., and Abbondanzo, S.J. (1992) *Nature* **359**, 76-79
11. Carson, D.D., Raboudi, N., and Jacobs, A.L. (1991) in "Cellular Signal Controlling Uterine Functions" (L.A. Lavia, ed.), pp. 107-118, Plenum Press, New York
12. Anderson, T.L., Olson, G.E., and Hoffman, L.H. (1986) *Biol. Reprod.* **34**, 701-720
13. Morris, J.E., Potter, S.W., and Gaza-Bulsecu, G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4712-4718
14. Kubushiro, K., Kojima, K., Mikami, M., Nozawa, S., Iizuka, R., Iwamori, M., and Nagai, Y. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 129-136
15. Zhu, Z., Deng, H., Fenderson, B.A., Nudelman, E., and Tsui, Z. (1990) *J. Reprod. Fert.* **88**, 71-79
16. Zhu, Z.M., Tsui, Z.C., Hakomori, S., and Fenderson, B.A. (1992) *J. Reprod. Fert.* **95**, 813-823
17. Hewitt, K., Beer, A.E., and Grinnell, F. (1979) *Biol. Reprod.* **21**, 691-707
18. Anderson, T.L. and Hoffman, L.H. (1984) *Am. J. Anat.* **171**, 321-334
19. Morris, J.E. and Potter, S.W. (1984) *Dev. Biol.* **103**, 190-199
20. Bell, S.C., Patel, S.R., Kirwan, P.H., and Drife, J.O. (1986) *J. Reprod. Fert.* **77**, 221-231
21. Nilsson, B.O., and Hjerten, S. (1982) *Biol. Reprod.* **27**, 485-493
22. Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A.K., Mann, D.M., and Sunshine J. (1988) *Science*, **240**, 53-57
23. Bukers, A., Friedrich, J., Nalbach, B.P., and Denker, H. (1991) *Troph. Res.* **4**, 285-305
24. Babiarz, B.S., and Hathaway, H.J. (1988) *Biol. Reprod.* **39**, 699-706
25. Kimber, S.J., Lindenberg, S., and Lundblad, A. (1988) *J. Reprod. Immun.* **12**, 297-313
26. Kimber, S.J., and Lindenberg S. (1990) *J. Reprod. Fert.* **89**, 13-21
27. Fenderson, B.A., Holmes, E.H., Fukushi, Y. and Hakomori, S. (1986) *Dev. Biol.* **114**, 12-21
28. Karlsson, K.A. (1989) *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 309-350
29. Dutt, A., Tang, J., and Carson, D.D. (1987) *Dev. Biol.* **119**, 27-37
30. Carson, D.D., Tang, J.Y., Julian, J., and Glasser, S.R. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 2425-2435
31. Fenderson, B.A., Eddy, E.M., and Hakomori, S. (1990) *BioEssays* **12**, 173-179
32. Kimber, S.J. (1990) *Intl. Rev. Cytology* **120**, 53-167
33. Shevinsky, L.H., Knowles, B.B., Damjanov, I., and Solter, D. (1982) *Cell* **30**, 697-705
34. Kannagi, R., Cochran, N.A., Ishigami, F., Hakomori, S., Andrews, P.W., Knowles, B.B., and Solter, D. (1983) *EMBO J.* **2**, 2355-2361
35. Fox, N.W., Damjanov, I., Knowles, B.B., and Solter, D. (1984) *Dev. Biol.* **103**, 263-266
36. Willison, K.R., and Stern, P.L. (1978) *Cell* **14**, 785-793
37. Fenderson, B.A., Andrews, P.W., Nudelman, E., Clausen, H., and Hakomori, S. (1987) *Dev. Biol.* **122**, 21-34

着床に先立つ複合糖質発現の変化を明確にするために、子宮上皮と初期胚の糖脂質と糖タンパク質の発現に対する外因性LIFの効果を調べる事が重要となろう。

この研究の結果は女性不妊の同定と対策のための新しい戦法を生み出すのに役立つし、ヒトおよび絶滅の危機にある種属の試験管中受精と胚移植プログラムの成功率の上昇をもたらすだろう。またこの結果は危険の少ない避妊剤の開発にもつながるであろう。

東京工業大学・生命理工学部・生体分子工学科・糖鎖生命科学講座

山形 達也 訳

38. Andrews, P.W., Nudelman, E., Hakomori, S., and Fenderson, B.A. (1990) *Differentiation* **43**, 131-138
39. Chu, C., Fenderson, B.A., Andrews, P.W., and Hakomori, S. (1989) *Biochemistry* **28**, 2229-2238
40. Fenderson, B.A., Radin N.S., and Andrews, P.W. (1993) *Eur. Urol.* **23**, 30-37
41. Solter, D., and Knowles, B.B. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **75**, 5565-5569
42. Fenderson, B.A., Hahnel, A.C., and Eddy, E.M. (1983) *Dev. Biol.* **100**, 318-327
43. Muramatsu, T., Condamine, H., Gachelin, G., and Jacob, F. (1980) *J. Embryol. Exp. Morph.* **57**, 25-36
44. Bird, J.M., and Kimber, S.J. (1984) *Dev. Biol.* **104**, 449-460
45. Fenderson, B.A., Zehavi, U., and Hakomori, S. (1984) *J. Exp. Med.* **160**, 1591-1596
46. Rastan, S., Thorpe, S.J., Scudder, P., Brown, S., Gooi, H.C., and Feizi, T. (1985) *J. Embryol. Exp. Morph.* **87**, 115-128
47. Kapur, R.P., and Johnson, L.V. (1988) *Anatomic Rec.* **221**, 720-729
48. Aruffo A. (1992) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **4**, 146-151
49. Hathaway, H.J., and Shur, B.D. (1988) *BioEssays* **9**, 153-158
50. Kojima, N. (1992) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **4**, 491-503
51. Lindenberg, S., Sundberg, K., Kimber, S.J., and Lundblad, A. (1988) *J. Reprod. Fert.* **83**, 149-158
52. Lindenberg, S., Kimber, S.J., and Kallin, E. (1990) *J. Reprod. Fert.* **89**, 431-439
53. Yamagata, T., and Yamazaki, K. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **181**, 1004-1009
54. Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S., and Paulson, J.C. (1990) *Science* **250**, 1130-1132
55. Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M., and Seed, B. (1990) *Science* **250**, 1132-1135
56. Polley, M.F., Phillips, M.L., Wayner, E., Nudelman, E., Singhal, A.K., Hakomori, S. and Paulson, J.C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6224-6228
57. Berg, E.L., Robinson, M.K., Mansson, O., Butcher, E.C., and Magnani, J.L. (1991) *J. Biol. Chem.* **265**, 14869-14872
58. Takada, A., Ohmori, K., Takahashi, N., Tsuyuoka, K., Yago, A., Zenita, K., Hasegawa, A., and Kannagi, R. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **179**, 713-719
59. Handa, K., Nudelman, E.D., Stroud, M.R., Shiozawa, T., and Hakomori, S. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **181**, 1223-1230
60. Foxall, C. Watson, S.R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., and Brandley, B.K. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 895-902
61. Fenderson, B.A., Stamenkovic, I., and Aruffo, A. (1993) *Differentiation*, in press
62. Lopez, L.C., and Shur, B.D. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 1163-1670
63. Bayna, E.A., Shaper, J.H., and Shur, B.D. (1988) *Cell* **53**, 145-157
64. Hathaway, H.J., Romagnano, L.C., and Babiartz, B.S. (1989) *Dev. Biol.* **134**, 351-361
65. Eggens, I., Fenderson, B.A., Toyokuni, T., Dean, B., Stroud, M.R., and Hakomori, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9476-9484
66. Kojima, N. and Hakomori, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20,159-20,162
67. Kojima, N., Shiota, M., Sadahira, Y., Handa, K., and Hakomori, S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17,264-17,270
68. Fenderson B., Kojima N., Stroud M., Zhu Z., and Hakomori S. (1991) *Glycoconjugate J.* **8**: 177a..
69. Bell, S.C. (1983) *Oxford Rev. Reprod. Biol.* **5**, 220-271
70. Wewer, U.M., Damjanov, A., Weiss, J., Liotta, L.A., and Damjanov, I. (1986) *Differentiation* **32**, 49-58
71. Glasser, S.R., Lampelo, S., Munir, M.I. and Julian, I. (1987) *Differentiation* **35**, 132-142
72. Cowell, T.P. (1969) *J. Reprod. Fert.* **19**, 239-245
73. Gurchot, C. (1969) *Oncology* **31**, 310-333
74. Carson, D. D., Julian J., and Jacobs, A.L. (1992) *Dev. Biol.* **149**, 307-316
75. Jacobs, A.L. and Carson, D.D. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15,464-15,473
76. Brown, J.J.G. and Papaioannou, V.E. (1992) *Differentiation* **52**, 61-68

Received on April 19th, 1993; accepted on April 22nd, 1993.