

## Enzymatic Properties and Biological Functions of $\beta$ 1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III

### 1,4-GlcNAc転移酵素IIIの酵素学的性質と生物学的機能

Ikeda, Yoshitaka ; and Taniguchi, Naoyuki

Department of Biochemistry, Osaka University Medical School, Room B1, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan  
FAX: 81-6-6879-3429, E-mail: proftani@biochem.med.osaka-u.ac.jp

**Key Words :** *Asn-linked oligosaccharide,  $\beta$ 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III, bisecting GlcNAc, GnT-III, N-glycan*

#### Abstract

$\beta$ 1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) is known to be a key glycosyltransferase which plays an important role in regulating the biosynthesis of Asn-linked oligosaccharides on glycoproteins. The regulatory role of the enzyme is based on effects of a reaction product, namely the bisecting GlcNAc structure, on the biosynthetic process. This unique structure is not tolerated by other enzymes involved in the formation of the core structures, and, as a result, prevents further reactions which are catalyzed by these enzymes. This inhibitory regulation is the result of the broad specificity of GnT-III, as well as the properties of the bisecting GlcNAc. The overexpression and ectopic expression of GnT-III lead to a variety of significant alterations in the cellular functions. Although it is not known, except for a few cases, whether the direct involvement of the bisecting GlcNAc residue or the inhibition of the synthesis of a biologically important structure of the sugar chain results in these alterations, it seems certain that marked structural changes by GnT-III catalysis result in the biological alterations in the cells. These findings suggest that GnT-III and the bisecting GlcNAc play an important role in cellular functions and that N-glycans are associated with a variety of biological events.

#### 要約

1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素III (GnT-III) は糖タンパク質アスパラギン結合型糖鎖の生合成を制御する重要な役割を担う鍵糖転移酵素として知られている。この酵素が担う調節の役割は、その反応産物すなわちバイセクティングGlcNAcの糖鎖生合成に対する効果に基づいている。このユニークな構造はコア構造の形成に關する他の酵素に許容されないため、これらの酵素の反応が阻害されてしまう。このような抑制的な制御は、バイセクティングGlcNAcの性質やGnT-IIIの広い基質特異性のために起こるのである。GnT-IIIの過剰発現や異所性発現は細胞機能に様々な重要な変化をもたらすが、いくつかの場合を除き、これがバイセクティングGlcNAc残基の直接的な關与であるか、あるいは生物学的に重要な糖鎖構造の合成阻害によるものであるかはわかっていない。しかし、GnT-IIIによる著しい構造的な変化が細胞に生物学的な変化を引き起こすことは確かなようである。このような知見は、GnT-IIIやバイセクティングGlcNAcが細胞の機能に重要な役割をもつということや、N-グリカンが様々な生物学的な現象と關係していることを示唆する。

#### A. Introduction

The formation of complex and hybrid types of Asn-linked oligosaccharides involves the participation of a variety of glycosyltransferases. In the biosynthesis, a series of the reactions are initiated by the addition of a  $\beta$ 1,2GlcNAc residue to  $\alpha$ 1,3Man by N-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I) (1, 2). Subsequent modifications, such as the trimming of mannose residues by  $\alpha$ -mannosidase II and the transfer of  $\beta$ 1,2GlcNAc to  $\alpha$ 1,6Man by GnT-II result in the formation of complex type oligosaccharide. In addition, the absence of the action of the mannosidase leads to the hybrid type structure (1, 3). Complex type sugar chains may also be further processed by other GlcNAc transferases, GnT-IV and GnT-V, which form a  $\beta$ 1,4-branch at  $\alpha$ 1,3Man and a  $\beta$ 1,6-branch at  $\alpha$ 1,6Man, respectively (1-5). Thus, the relative abundance of hybrid type, bi-, tri- and tetra-

#### A. はじめに

コンプレックスタイプやハイブリッドタイプのアスパラギン結合型糖鎖の生成には様々な糖転移酵素が關与している。これらの生合成における一連の反応はGlcNAc転移酵素I (GnT-I) による 1,3Man残基への 1,2GlcNAcの転移により開始される(1, 2)。引き続いて、マンノシダーゼIIによるマンノースのトリミングやGnT-IIによる 1,6Man残基への 1,2GlcNAcの転移といった修飾によってコンプレックスタイプの糖鎖が生成する一方、そのマンノシダーゼの作用がない場合にはハイブリッドタイプの糖鎖が形成されることになる(1, 3)。コンプレックス型糖鎖はさらに他のGlcNAc転移酵素、GnT-IVやGnT-Vによってプロセスを受け、それぞれ 1,3Manに 1,4分岐と 1,6Manに 1,6分岐を形成する(1-5)。したがって、ハイブリッドタイプ、2

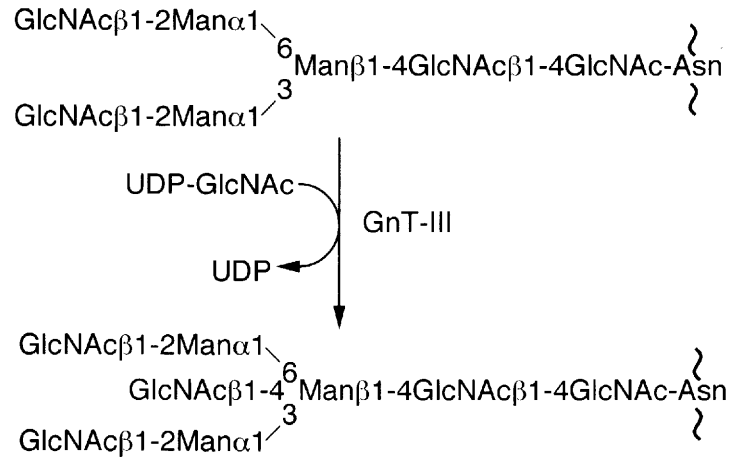


Fig. 1. A reaction catalyzed by GnT-III.

antennary sugar chains (complex type) depend, at least in part, on the expression levels of these enzymes.

It is known that during the early stages of N-glycan biosynthesis, the formation of the core structures can be regulated by the addition of a  $\beta 1,4$ -GlcNAc residue to a core  $\beta$ -Man residue (1, 3). This reaction is catalyzed by  $\beta 1,4$ -N-acetylglucosaminyltransferase III ( $\beta$ -1,4-mannosyl-glycoprotein  $\beta 1,4$ -N-acetylglucosaminyltransferase, GnT-III; EC 2.4.1.144) (6) (Fig. 1). The transferred  $\beta 1,4$ GlcNAc residue is referred to as a bisecting GlcNAc (7, 8), and is known to have unique features. Of the possible five GlcNAc residues linked to the trimannose core, only the bisecting GlcNAc contains no antennae. Furthermore, the formation of the bisecting GlcNAc residue prevents  $\alpha$ -mannosidase II and GnTs-II, IV and V from acting on the oligosaccharide (1–5). In addition to the effects on the formation of core structures, the presence of the bisecting GlcNAc also affects the elongation of the antennae (9). The reduction in the extent of branching and elongation by the bisecting GlcNAc leads to a significant alteration in the sugar chains, both in terms of their structure and size. Therefore, it has been suggested that GnT-III plays a regulatory role in the biosynthesis of N-glycans. If this is true, then the enzyme would be expected to be a key glycosyltransferase that may modulate the cellular functions via its effect on cell surface oligosaccharides.

In this paper, we would describe the enzymatic properties of GnT-III and the roles of the product, the bisecting GlcNAc residue.

## B. General Features of GnT-III

The activity of GnT-III was first observed in hen oviduct by Narasimhan (6). In mammals, the activity is abundant in kidney and brain while being nearly undetectable in the normal liver (10, 11). However, the activity and gene expression of GnT-III increase during hepatocarcinogenesis (11, 12), and it

本鎖、3本鎖、4本鎖糖鎖の相対的な量は、少なくとも部分的にはそれらの酵素の発現レベルに依存している。

初期段階におけるアスパラギン結合型糖鎖の生合成すなわちコア構造の形成はコアマンノースへの1,4GlcNAc残基の付加によって制御されることが知られている(1, 3)。この反応は1,4GlcNAc転移酵素III (GnT-III、EC 2.4.1.144)によって触媒される(6)(図1)。これによって転移される1,4GlcNAc残基はバイセクティングGlcNAcとよばれユニークな性質をもつことが知られている(7, 8)。トリマンノースコアに結合が可能な5つのGlcNAcのうち、バイセクティングGlcNAcだけが側鎖を持たない。さらに、バイセクティングGlcNAcの形成によりマンノシダーゼII、GnT-II, IV, Vがオリゴ糖に作用するのが妨げられる(1–5)。このコア構造形成に対する効果に加えて、バイセクティングGlcNAcの存在によって側鎖の伸長も影響を受ける(9)。このようなバイセクティングGlcNAcによる分岐の減少や伸長の低下は糖鎖の構造や大きさという点で著明な変化を引き起こす。このようなことから、GnT-IIIはアスパラギン結合型糖鎖の生合成の制御をになっていることが示唆されており、もしそうであれば細胞表面糖鎖を変化させることにより細胞機能をモジュレートする鍵糖転移酵素と考えられる。

本論文では、GnT-IIIの性質やバイセクティングGlcNAcの役割について述べたい。

## B. GnT-IIIの概略

GnT-IIIの活性はNarasimhanによりはじめてトリ輸卵管に観察された(6)。哺乳類では、腎臓、脳に活性が高く、正常肝ではほとんど検出されない(10, 11)。ところが、肝がんでは活性および遺伝子発現が上昇し(11, 12)、このGnT-III発現増加によ

has been suggested that this enhanced expression of GnT-III leads to an elevation in the levels of the bisecting GlcNAc content in the oligosaccharide moieties of glycoproteins which are produced in the liver, such as transferrin (13). An increase in the levels of the bisected sugar chain is often considered to be one of the "cancer-associated alterations" of sugar chains (14). GnT-III was purified from rat kidney to homogeneity, and the cDNA for the rat enzyme was then cloned, in an attempt to investigate the molecular basis of this structural alteration and the biological significance of the bisecting GlcNAc (15). The primary structure, which has been deduced from the cloned cDNA, indicates that GnT-III is a typical type II membrane protein, consisting of a short N-terminal cytoplasmic tail, a transmembrane domain, a stem region and a large catalytic domain (15, 16). These structural features are quite similar to those of a large number of other glycosyltransferases (17). The enzyme requires a divalent metal ion such as  $Mn^{2+}$  for activity, as is the case for many other glycosyltransferases. Genomic analysis revealed that the coding region is encoded by a single exon, and that the human gene is localized at chromosome 22q.13.1 using fluorescence *in situ* hybridization (16). An investigation of the promoter region of the GnT-III gene has shown that the enzyme is expressed by multiple promoters, which appear to confer tissue-specific expression (18).

### C. Kinetic Properties and Substrate Specificity of GnT-III

In earlier studies, the enzymatic properties and the substrate specificity of GnT-III were investigated using crude or partially purified preparations. Apparent kinetic parameters were also determined using a crude preparation of the enzyme for the donor and some acceptor oligosaccharides. The recombinant rat GnT-III was produced in a secretable soluble form via the use of a baculovirus-insect cell expression system, and a kinetic analysis using the purified recombinant GnT-III was carried out in order to analyze its kinetic properties more accurately (19). The findings revealed that the reaction catalyzed by GnT-III follows a sequential mechanism, consistent with the fact that the reaction involves an inversion in the anomeric configuration of the transferred monosaccharide, and a random or partially random mechanism appears to be likely.

Substrate specificity, with respect to the acceptor, has been intensively examined, in an attempt to characterize the enzymatic properties of GnT-III (1-6). These studies have shown that: (i) High mannose type oligosaccharides are not active as the substrate, and that  $\beta$ 1,2GlcNAc linked to  $\alpha$ 1,3Man, which is a product of GnT-I, is required for the action of GnT-III. (ii) A  $\beta$ 1,2GlcNAc residue linked to  $\alpha$ 1,6Man is not required, and, thus, a hybrid type oligosaccharide which is formed immediately after the action of GnT-I is able to serve as the substrate for GnT-III. (iii) Any agalacto form of the bi-, tri- and tetra-antennary sugar chains is capable of serving as an acceptor sub-

リトランスフェリンのような肝臓で産生される糖タンパク質糖鎖中のバイセクティングGlcNAc含量が増加することが示唆されている(13)。バイセクティッド糖鎖レベルの上昇はよく糖鎖の“癌性変化”の一つとして考えられている(14)。この構造変化の分子基盤とバイセクティングGlcNAcの生物学的意義を調べる目的のためにラット腎臓よりGnT-IIIが均一に精製され、そのcDNAもクローニングされた(15)。クローン化されたcDNAより得られた一次構造より、GnT-IIIは短いアミノ末端細胞質部分、膜貫通ドメイン、大きな触媒ドメインからなる典型的なII型膜タンパク質であることがわかった(15, 16)。この構造的な特徴は、大多数の糖転移酵素のものと同様である(17)。他の多くの糖転移酵素で必要性がみられるように、この酵素は活性に $Mn^{2+}$ のような2価金属イオンを要求する。ゲノムの解析により、コーディング領域は単一エクソンによりコードされており、ヒト遺伝子はFISH法によって染色体22q.13.1に存在することがわかった(16)。GnT-III遺伝子のプロモーター解析によってこの酵素の発現は多重プロモーターによって発現することが示され、これにより組織特異的な発現が可能になっているようである(18)。

### C. GnT-IIIの速度論的な性質と基質特異性

以前の研究では、酵素学的性質や基質特異性は精製していないあるいは部分精製のものを用いて調べられ、みかけの速度論的パラメーターもこのような酵素を使って決定された。ラットGnT-IIIのリコンビナント酵素がバキュロウイルス昆虫細胞発現系を用いて可溶性の分泌型として産生され、動力学的性質をより正確に解析するためにこの精製酵素を使った速度論的解析が行われた(19)。これにより、GnT-IIIの反応は、転移される糖のアノメリック配置の反転と矛盾しないシーケンシャル機構に従うことがわかり、おそらくランダムなあるいは部分的にランダムな機構のようである。

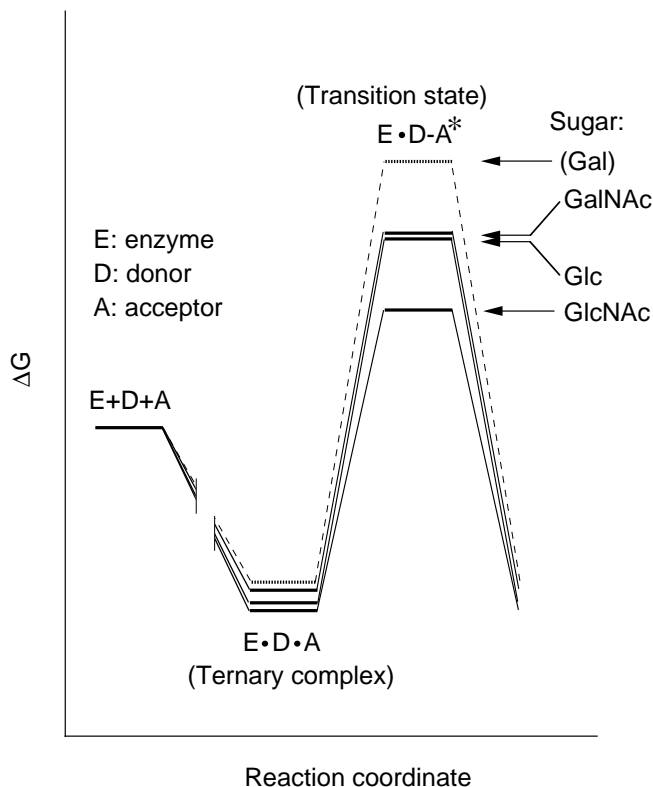
酵素的な性質を明らかにすることを目的として、受容体基質に対する特異性はよく調べられており(1-6)、これらの研究によって以下のようなことがわかった。(i) ハイマンノース型糖鎖は基質とはならず、GnT-Iの反応生成物である、1,3Manに結合した1,2GlcNAcはGnT-IIIが作用するのに必要であること。(ii) 1,6Manに結合した1,2GlcNAcは必要ではなく、GnT-Iが作用した直後のハイブリッド型糖鎖もGnT-IIIの基質となる。(iii) 2本鎖、3本鎖、4本鎖のいずれのアガラクト型もGnT-IIIの受容体基

strate for GnT-III. (iv)  $\beta$ 1,4Galactosylation of the GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-3 branch inhibits the action of GnT-III. (v) An  $\alpha$ 1,6fucosyl residue at the innermost GlcNAc has no effect on the enzyme reaction. These characterizations of GnT-III in terms of acceptor substrate specificity have permitted the structural requirements for the acceptor to be defined in a reasonably precise manner. A synthetic oligosaccharide acceptor has also been developed, indicating that a pentasaccharide, which consists of a tri-mannose core, with  $\beta$ 1,2GlcNAc residues linked to the  $\alpha$ -mannose residues is active as a substrate (20-22). It also appears that methylation of the 4-OH of  $\alpha$ 1,3-linked Man and the 6-OH of  $\alpha$ 1,6-Man to give methyl ethers is tolerated by the enzyme, which is consistent with the ability of GnT-III to act on tri- and tetra-antennae.

The specificity of GnT-III toward the donor had not been investigated in great detail, probably because the purified enzyme was unavailable. A specificity study using the purified enzyme has shown that the enzyme is also capable of catalyzing the transfer of Glc and GalNAc from the corresponding UDP-sugars (19). Although these reactions proceed *via* the same reaction mechanism as that for the natural donor, UDP-GlcNAc, the maximal velocities of the reactions are much slower;  $1 \times 10^{-3}$  and  $2 \times 10^{-3}$ , respectively. When UDP-Gal was used as the donor, no transfer was observed. On the other hand,  $K_m$  values for UDP-GlcNAc, UDP-Glc and UDP-GalNAc were determined to be 0.42 mM, 1.0 mM and 3.6 mM, suggesting that the difference in the monosaccharide moiety of the donor nucleotide-sugar

質として働くことが出来る。(iv) GlcNAc 1-2Man 1,3の枝の1,4ガラクトシル化はGnT-IIIの作用を抑える。(v) コアの1,6 Fuc残基によって酵素の反応は影響をうけない。GnT-IIIの、このような受容体基質特異性という点からの性質の検討により、どのような構造が受容体基質として要求されるかが明らかにされてきた。合成糖鎖受容体基質も開発され、これによってトリマノースコアと( マノースに結合する ) 1,2GlcNAc残基からなる5糖が基質として働くことがわかった(20-22)。さらに、1,3Manの4位 OH基、1,6Manの6位 OH基のメチル化は影響しないようであり、このことはGnT-IIIが3本鎖や4本鎖にも作用できるという能力と合致している。

GnT-IIIの供与体に対する特異性については、おそらく精製酵素がなかったためと考えられるが、よく調べられていなかった。精製酵素をもちいた特異性に関する研究で、この酵素はグルコースやGalNAcもそれぞれ対応するUDP糖から転移できることが示された(19)。これらの反応は本来の基質であるUDP-GlcNAcの場合と同じ反応機構にしたがって進行するが、反応の最大速度はずっと遅く、それぞれ GlcNAcの  $1 \times 10^{-3}$  および  $2 \times 10^{-3}$  である。UDP-Galの場合は転移が観察されなかった。一方、UDP-GlcNAc、UDP-Glc、UDP-GalNAcに対する  $K_m$  値はそれぞれ 0.42 mM, 1.0 mM, 3.6 mM と決定され、供与体の単糖部分の違



**Fig. 2. Possible energy profiles for the reactions with UDP-sugars.** It is assumed that the reactions by GnT-III follow a typical random mechanism.

does not significantly affect the binding of the substrate. Thus, the specificity toward the sugar moiety of the donor appears to be critically determined during the catalytic process but not during binding with the enzyme in the ground state (Fig. 2).

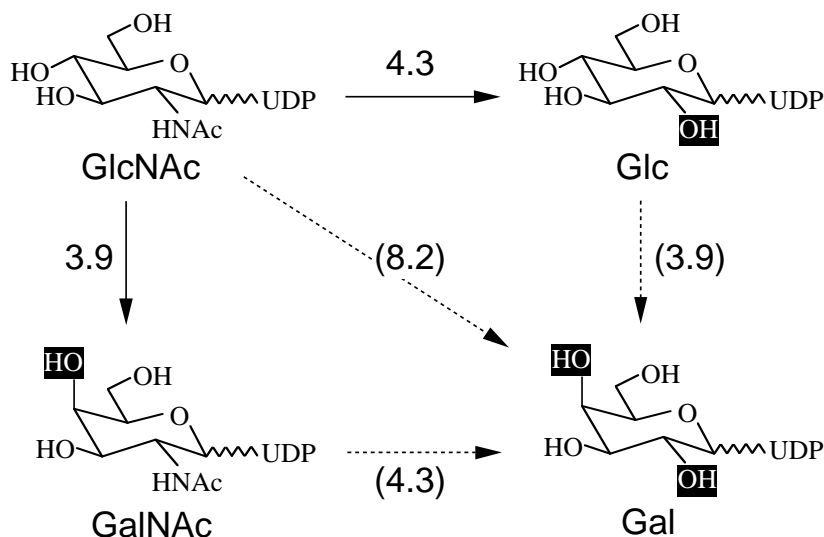
Contributions of the structural factors to the catalysis, calculated based on the comparison of the kinetic parameters obtained, are shown in Fig. 3. These effects of the configuration at a C-4 position of the monosaccharide and the presence of the 2-N-acetyl group would be explained, for example, by the possible formation of a hydrogen bond and the induction of polarization of the amide of the acetyl group. This glycosyltransferase utilizes these interactions for stabilizing the transition state, rather than binding of the donor, and would thereby exert a strict specificity toward the monosaccharide moiety of the donor. As calculated from the  $k_{cat}/K_m$  values, specificity for UDP-GlcNAc was estimated to be more than 2,000 times higher, compared to UDP-Glc and UDP-GalNAc.

On the other hand, GnT-III exclusively prefers the uridyl nucleotide as an aglycon of the donor since ADP-, GDP-, CDP- and TDP-sugars do not serve as substrates for the enzyme (19). However, since these inactive nucleotide-sugars bind to the donor subsite to a similar extent, the enzyme does not appear to distinguish the nucleotide portion of its natural substrate from that of other nucleotide-sugars at the binding step. Thus, although GnT-III indiscriminately binds various nucleotide-sugars, the subsequent chemical step would involve several structural factors and only the uridyl nucleotide, thus conferring specificity to the natural donor, UDP-GlcNAc.

いが基質の結合にそれほど影響しないことが示唆された。このようなことから、供与体の糖部分に対する特異性というのは、基底状態での結合においてではなく、触媒過程で決定されると思われる(図2)。

実験的に得られた速度論的パラメーターに基づいて求められた、構造要素の触媒への寄与を図3に示した。単糖の4位の配座や2位のN-アセチル基の存在による効果は、例えば、水素結合の形成やアセチル基アミドの分極の誘起によるもので説明できるだろう。この糖転移酵素は、これらの相互作用を供与体の結合よりもむしろ、遷移状態の安定化に利用しており、それによって供与体の糖部分に対する厳密な特異性を発揮すると考えられる。 $k_{cat}/K_m$ の値から計算すると、UDP-GlcNAcに対する特異性はUDP-GlcやUDP-GalNAcに比べて2000倍高いと見積もられた。

一方、ADP-, GDP-, CDP- および TDP糖は酵素の基質とならないことから、供与体のアグリコンとしてウリジンヌクレオチド以外は利用されない(19)。しかし、これらの不活性な糖ヌクレオチドは供与体サブサイトへ同程度に結合するので、GnT-IIIは結合段階で基質のヌクレオチド部分を他のそれと見分けていないのではないようである。このように、GnT-IIIはいろいろな糖ヌクレオチドを区別なく結合するが、引き続き化学的なステップに基質のいくつかの構造的な要因が関与し、これにより本来の基質であるUDP-GlcNAcに特異性を示すのであろう。



**Fig. 3. Contributions of the 4-OH and 2-N-acetyl groups to catalysis.** Numbers indicate  $\Delta G$  of destabilization (kcal/mol), which were calculated on the basis of the difference in  $k_{cat}$ . The numbers in parentheses are the values for the case where no interaction between the two groups is assumed.

#### D. Requirement of N-Glycosylation in the Function of GnT-III

Three potential sites for N-glycosylation, Asn-X-Thr/Ser, exist in the amino acid sequence of rat GnT-III, and it has been shown that these sites are all fully glycosylated. The loss of one or two potential sites by site-directed mutagenesis led to a decrease in enzyme activity *via* the alteration of its kinetic properties. The elimination of N-glycans from all three sites by tunicamycin treatment and mutagenesis led to the complete loss of activity, and, thus, it can be concluded that glycosylation is required for activity (23). In some glycosyltransferases, the N-glycan plays no essential role in the formation of an active enzyme, as indicated by mutational analysis, experiments using glycosylation inhibitors and successful expression in *E. coli* (24-26). In the case of GnT-III, however, N-glycosylation must be closely associated with the formation of fully active GnT-III, and this requirement for N-glycosylation may be one of the factors which prevents the bacterial production of the recombinant enzyme. Furthermore, the removal of the N-glycans from GnT-III alters the intracellular localization of the enzyme, suggesting that the sugar chains are also involved in the retention of GnT-III by the Golgi (23). N-glycosylation is essential for the functional expression of GnT-III, and allows the enzyme to participate in the biosynthesis of N-glycans.

#### E. Role of Bisecting GlcNAc, a Product of GnT-III

As described above, the addition of the bisecting GlcNAc by GnT-III prevents  $\alpha$ -mannosidase II, GnTs-II, IV and V from acting on the oligosaccharide substrates (1-6), and thus it has been generally thought that GnT-III plays a role in the regulation of N-glycan biosynthesis. The action of GnT-III prior to  $\alpha$ -mannosidase II on the product of the reaction by GnT-I commits the biosynthetic pathway to the hybrid type of oligosaccharides because  $\alpha$ -mannosidase II, whose action is a prerequisite step for the formation of complex type sugar chains, cannot act on the bisected oligosaccharide (Fig. 4). Therefore, the relative levels of the activities of GnT-III and  $\alpha$ -mannosidase II would be predicted to direct the pathway toward the formation of complex or hybrid types. GnT-III also shares oligosaccharide acceptor substrates with any of the GnT-II, -IV and -V, and is able to inhibit all reactions by these enzymes via the addition of the bisecting GlcNAc (Fig. 4). If GnT-III acts on the substrate oligosaccharide before these GnTs, the resulting bisected oligosaccharides are no longer able to serve as substrates for these GnTs, thus leading to a reduction in the extent of branch formation. Thus, it is conceivable that the relative dominance of GnT-III against each of the  $\alpha$ -mannosidase, GnTs-II, -IV and -V affects the assembly of the oligosaccharides. On the other hand, the order of the actions in the Golgi apparatus is also an important factor in determining the ultimate structure of the oligosaccharides, and it is possible that sublocalization in the Golgi deter-

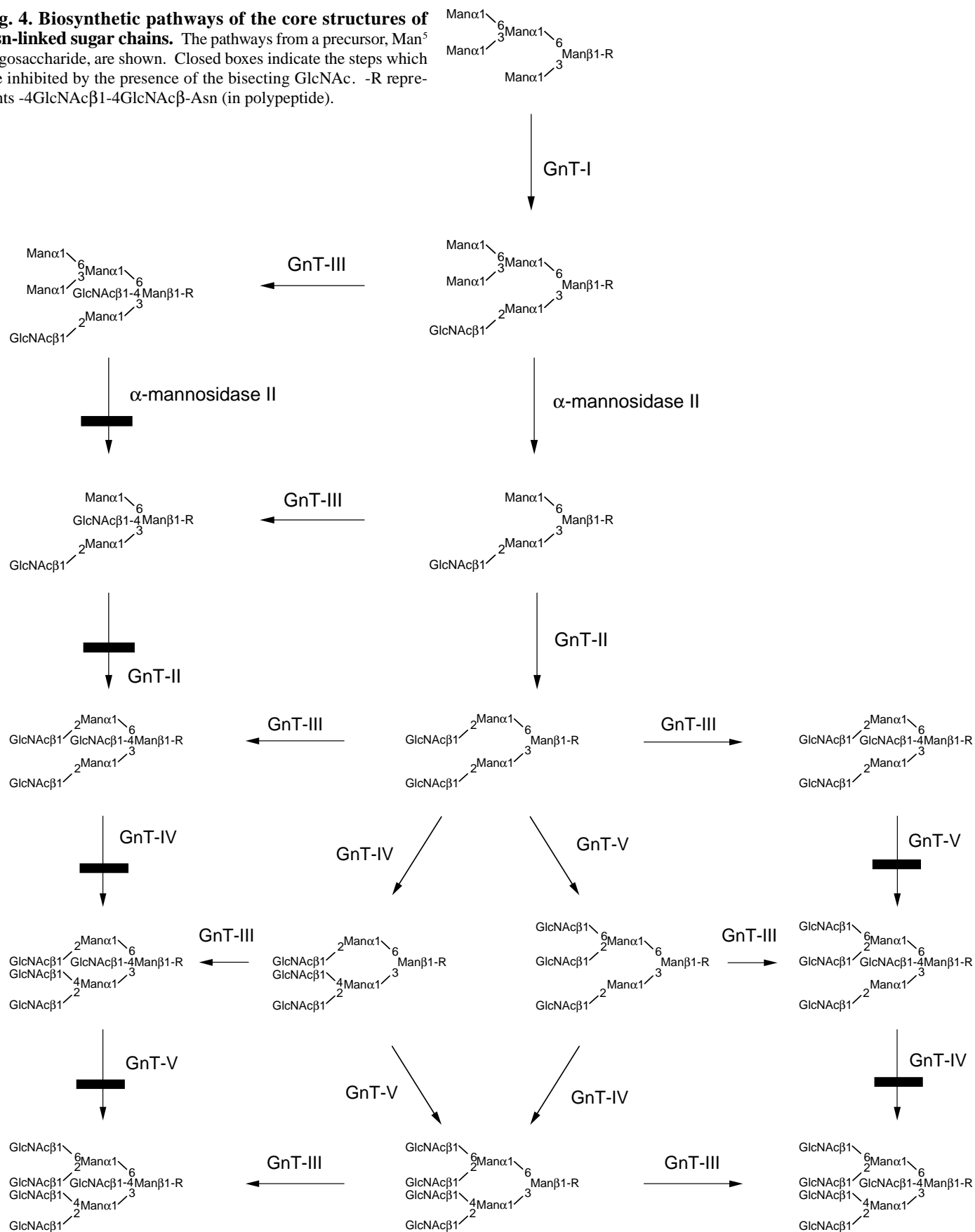
#### D. GnT-IIIの機能におけるN-グリコシル化の必要性

ラットGnT-IIIのアミノ酸配列中に三つのN-型糖鎖付加可能部位があり、これらすべてに糖鎖付加が起こっていることが示されている。部位特異的変異による1箇所あるいは2箇所の糖鎖欠失は速度論的な性質を変化させ、活性を減少させた。ソニカマイシン処理や変異導入によってこれら3箇所の糖鎖をすべて欠失させると酵素活性は完全に消失するので、糖鎖付加は活性に必要だということが出来る(23)。いくつかの糖転移酵素では、変異による解析やグリコシレーション阻害剤を用いた実験、大腸菌における発現(24-26)により示されるように、活性な酵素を形成するのにN-グリカン是不可欠ではない。しかし、GnT-IIIの場合ではN-グリコシル化は活性なGnT-IIIの形成に密接に関係しており、このようなN-グリコシル化の必要性はリコンビナント酵素のバクテリアにおける発現を妨げる要因の一つになっているかもしれない。さらに、GnT-IIIからN-グリカンを取り除くとこの酵素の細胞内での局在が変化することから、糖鎖はGnT-IIIのゴルジ局在化にも関与することが示唆された(23)。N-グリコシル化はGnT-IIIの機能的発現に必要不可欠であり、これがないとN型糖鎖生成に関わることが出来ない。

#### E. GnT-IIIの反応生成物、バイセクティングGlcNAcの役割

先に述べたように、バイセクティングGlcNAcの付加によってマンノシダーゼII、GnT-II、-IV、-Vがオリゴ糖基質に作用するのを妨げることから(1-6)、GnT-IIIはN-グリカンの生合成を調節する役割があると考えられてきた。マンノシダーゼIIの作用はコンプレックスタイプ糖鎖の生成に必要なステップであるが、この酵素はバイセクティッド糖鎖には作用しないために、GnT-Iの反応生成物に対してマンノシダーゼIIよりも先にGnT-IIIが作用すると生合成の経路はハイブリッドタイプ糖鎖の方へ進むことになる(図4)。このことから、GnT-IIIとマンノシダーゼIIの相対的な活性レベルによって、生合成経路がコンプレックス型あるいはハイブリッド型へと方向づけられると考えられる。GnT-IIIはまた、GnT-II、IV、Vとも共通のオリゴ糖受容体を基質とし、バイセクティングGlcNAcの付加を通してこれらの酵素のすべての反応を阻害することが出来る(図4)。もし、GnT-IIIがそれらのGnTよりも先に基質オリゴ糖に作用すると、出来たバイセクティッド糖鎖はもうこれらのGnTの基質とはならず、分岐が減ることになる。このように、マンノシダーゼII、GnT-II、IV、Vのそれぞれに対しGnT-IIIが相対的に優位であると、糖鎖の構築が影響をうけてしまうと考えられる。一方、ゴルジ装置内での作用の順序も最終的な糖鎖構造を決定する重要な要因であり、ゴルジ内における局在が作用の順序を決定する

**Fig. 4. Biosynthetic pathways of the core structures of Asn-linked sugar chains.** The pathways from a precursor, Man<sup>5</sup> oligosaccharide, are shown. Closed boxes indicate the steps which are inhibited by the presence of the bisecting GlcNAc. -R represents -4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Asn (in polypeptide).



mines the order of action. Although it has been suggested that a cytoplasmic tail, a transmembrane domain and a stem region, collectively referred to as the CTS region, are involved in controlling the order of actions of glycosyltransferases in the Golgi (27), the mechanism for regulating this is not known in sufficient detail.

The relatively broad range of specificity of GnT-III toward oligosaccharide acceptors enables the enzyme to act on a variety of intermediate oligosaccharides in the formation of core structures. In addition to these enzymatic properties of GnT-III, the bisecting GlcNAc *per se* is involved in the regulation of the actions of  $\alpha$ -mannosidase II and GnT-s. NMR studies suggest that the addition of the bisecting GlcNAc induces a conformational change in the oligosaccharide (28–30). It appears that the inhibition of the action of GnT-V by the bisecting GlcNAc is, in part, due to the induction of a conformational change in the oligosaccharide, because the presence of the bisecting GlcNAc more greatly affects the conformation of an  $\alpha$ 1,6-linked moiety (31).

#### F. Biological Functions of GnT-III and Bisecting GlcNAc

As shown by DNA transfection experiments with GnT-III cDNA, the increase in the level of bisected sugar chains gives rise to a variety of significant alterations in cells. The  $\beta$ 1,6-branching structure in the core of the N-glycans is due to the action of GnT-V and has been suggested to be associated with metastatic potential (32, 33). Since the formation of this structure can be inhibited by the addition of the bisecting GlcNAc, the issue of whether inhibition by GnT-III transfection affects metastatic potential was examined. The overexpression of GnT-III in highly metastatic melanoma cells led to a reduction in  $\beta$ 1,6-branches in cell surface N-glycans, in parallel with the increase in the bisecting GlcNAc, and suppressed lung metastasis of the melanoma cells (34). It was also found that E-cadherin accumulate on the cell surface in the GnT-III-transfected cells, due to the inhibition of the release from the surface (35). Recently, it was reported that aberrant glycosylation of E-cadherin by GnT-III down-regulates the tyrosine phosphorylation of  $\beta$ -catenin (36).

When K562 cells were transfected with GnT-III, the cells became resistant to the cytotoxicity of natural killer cells and developed spleen colonization in athymic mice (37). It has also been suggested that an overexpression of GnT-III impairs the functions for epidermal growth factor and nerve growth factor receptors (38, 39). Furthermore, transgenic mice which express GnT-III specifically in the liver were established, in order to investigate the biological significance of the enzyme in hepatocytes (40). Histological examination revealed that the hepatocytes in the transgenic mice adopted a swollen oval-like morphology, and abnormal lipid accumulation was also observed within the cells. This lipid storage appeared to be associated

可能性がある。細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、幹領域、総称してCTS領域と呼ばれるが、これがゴルジ内における糖転移酵素の作用の順序をコントロールするのに関与していることが示唆されているが(27)、これを制御するメカニズムの詳細については十分にはわかっていない。

オリゴ糖基質に対するGnT-IIIの比較的広い基質特異性のために、この酵素はコア構造形成における様々なオリゴ糖中間体に働くことができる。このようなGnT-IIIの性質に加えて、バイセクティングGlcNAc自体がマンノシダーゼIIやGnTの働きを制御するのに関与している。NMRを用いた研究により、バイセクティングGlcNAcの付加が糖鎖のコンフォメーション変化を引き起こすことが示唆されている(28–30)。バイセクティングGlcNAcが存在することによって、1,6結合した枝のコンフォメーションがより大きく影響を受けることから、バイセクティングGlcNAcによるGnT-Vの作用の抑制は少なくとも部分的には糖鎖に起きたコンフォメーション変化のためのようである(31)。

#### F. GnT-IIIとバイセクティングGlcNAcの生物学的機能

GnT-III cDNAの細胞導入実験が示すように、バイセクテッド糖鎖レベルの増加によって細胞に様々な重要な変化が引き起こされる。N-グリカンコアの1,6分岐はGnT-Vの作用によるが、癌の転移能と関連していることが示唆されてきた(32, 33)。この構造の形成はバイセクティングGlcNAcの付加によって阻害されうることから、GnT-IIIの細胞導入によって癌の転移能が影響をうけるかどうか検討された。高転移性メラノーマ細胞にGnT-IIIを高発現させると、バイセクティングGlcNAcの増加とともに細胞表面N-グリカンの1,6分岐が減少し、メラノーマ細胞の肺転移を抑制した(34)。GnT-III導入細胞では、E-カドヘリンの細胞からの遊離が抑制されているために、細胞表面に蓄積することもわかった(35)。最近、GnT-IIIによるE-カドヘリンの糖鎖変化により、 $\beta$ -カテニンのチロシンリン酸化が抑えられることが報告された(36)。

K562細胞にGnT-IIIをトランスフェクトした場合には、細胞がナチュラルキラー細胞の細胞障害作用に対して抵抗性を示すようになり、無胸腺マウス脾臓にコロニーを形成するようになった(37)。また、GnT-IIIの過剰発現は上皮増殖因子や神経成長因子の受容体の機能を損なうこともわかった(38, 39)。さらに、肝細胞におけるGnT-IIIの生物学的意義を調べるために、GnT-IIIを肝臓特異的に発現するトランスジェニックマウスが作製された(40)。組織学的な検討では、トランスジェニックマウスの肝細胞は膨化した楕円形の形態を示し、細胞内に脂質の異常蓄積が認められた。この脂質蓄積は、生化学的な解析によ

with an impaired apolipoprotein B secretion, as evidenced by biochemical analyses. As shown by these results, such “forced” and “unphysiological” alterations in N-glycans by the overexpression and ectopic expression of GnT-III led to marked alterations in the cellular functions.

In the analyses involving the GnT-III-knockout mice, on the other hand, although no bisected sugar chains were found in the deficient mice, growth and development of the GnT-III-deficient mice were normal (41). When treated with diethylnitrosamine, however, the suppression of hepatocarcinogenesis was observed in the deficient mice (42). It has also been suggested that this suppression of carcinogenesis involves a serum glycoprotein(s) which is biosynthesized in other tissues and is possibly due to a structural alteration in the oligosaccharide moiety of the responsible glycoprotein (43).

Although the physiological roles of GnT-III remain unclear, it seems likely that GnT-III plays an important role in diseases, such as carcinogenesis and cancer metastasis. In order to understand the role of GnT-III in more detail, a further analysis and study of the phenotypes of the GnT-III-deficient mice under pathological conditions, such as infection and carcinogenesis, rather than in a healthy state will be needed.

## G. Concluding Remarks

As shown by the evidence that significant alterations are caused in cells by the ectopic expression and overexpression of GnT-III, it can be concluded that the enzyme plays a key role in the alteration of cellular functions. It is conceivable that the structure of the bisecting GlcNAc *per se* is directly involved in such alterations. However, since it is also possible that the synthesis of biologically active and functional structures of the sugar chains is regulated by the action of GnT-III, some of the alterations must be due to the loss or decrease of these important oligosaccharide structures of some glycoproteins. To elucidate the molecular basis for these alterations, identification of “target glycoproteins” whose functions can be regulated by the addition of the bisecting GlcNAc would also be important. Further investigations of the mechanism by which the structural change caused by GnT-III alters the character of the cells is clearly called for.

## References

1. Schachter, H. (1986) *Biochem. Cell Biol.* **64**, 163–181
2. Schachter, H. (2000) in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Vol. 3 (Ernst, B., Hart, G.W., and Sinay, P., eds.) pp145–173
3. Schachter, H., Narasimhan, S., Gleeson, P., and Vella, G. (1982) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 1049–1066
4. Longmore, G.D. and Schachter, H. (1982) *Carbohydr. Res.* **100**, 365–392
5. Gu, J., Nishikawa, A., Tsuruoka, N., Ohno, M., Yamaguchi, N., Kangawa, K., and Taniguchi, N. (1993) *J. Biochem.* **113**, 614–619
6. Narasimhan, S. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10235–10242
7. Carver, J.P., Grey, A.A., Winnik, F.M., Hakimi, J., Ceccarini, C., and Atkinson, P.H. (1981) *Biochemistry* **20**, 6600–6606
8. Carver, J.P., and Grey, A.A. (1981) *Biochemistry* **20**, 6607–6616
9. Easton, E.W., Bolscher, J.G., and van den Eijnden, D.H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 21674–21680
10. Nishikawa, A., Fujii, S., Sugiyama, T., and Taniguchi, N. (1988) *Anal. Biochem.* **170**, 349–354

り、アポリipoprotein Bの分泌障害と関連があると思われた。これらの結果が示すように、GnT-IIIの過剰発現や異所性発現によるN-グリカンの強制的かつ非生理的な変化は細胞機能に著しい変化を引き起こす。

一方、GnT-IIIノックアウトマウスを使った解析では、GnT-III欠損マウスにバイセクティッド糖鎖は見られないにもかかわらず、発生や成長は正常であった(41)。しかし、ジエチルニトロサミン処理された時には、欠損マウスでは肝発癌の抑制が観察された(42)。さらにこの発癌抑制は他組織で生合成される血清中の糖タンパク質が関与しており、おそらくこのタンパク質の糖鎖の構造変化によるものであることが示唆されている(43)。

GnT-IIIの生理的役割はいまなお不明であるが、発癌や癌転移のような疾患において重要な役割をになっているらしいことがわかった。さらに詳しくGnT-IIIの役割を理解するには、健康状態よりもむしろ感染や発癌などの病的状態下でのGnT-III欠損マウスの表現型をさらに解析する必要があるだろう。

## G. おわりに

GnT-IIIの異所性発現や過剰発現によって細胞に重要な変化が引き起こされるという事実が示すように、この酵素が細胞機能を変化させるのに鍵となる役割を演じていると結論出来よう。バイセクティングGlcNAcという構造自体がこのような変化に関与する可能性も考えられる一方、生物学的に重要なあるいは機能のある糖鎖構造の合成がGnT-IIIの作用によって制御される可能性があり、ある糖タンパク質上にあるこのような重要な糖鎖構造の消失あるいは減少によるものもあるにちがいない。その分子基盤を明らかにするのに、バイセクティングGlcNAc付加により機能が制御される「標的糖タンパク質」の同定も重要であると考えられる。そして、GnT-IIIによる糖鎖構造の変化がどのようにして、細胞の性質を変えるのかという点は今後さらに検討される必要があろう。

11. Nishikawa, A., Fujii, S., Sugiyama, T., Hayashi, N., and Taniguchi, N. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 107–112
12. Narasimhan, S., Schachter, H., and Rajalakshmi, S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 1273–1281
13. Yamashita, K., Koide, N., Endo, T., Iwaki, Y., and Kobata, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 2415–2423
14. Yamashita, K., Hitoi, A., Taniguchi, N., Yokosawa, N., Tsukada, Y., and Kobata, A. (1983) *Cancer Res.* **43**, 5059–5063
15. Nishikawa, A., Ihara, Y., Hatakeyama, M., Kangawa, K., and Taniguchi, N. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18199–181204
16. Ihara, Y., Nishikawa, A., Tohma, T., Soejima, H., Niikawa, N., and Taniguchi, N. (1993) *J. Biochem.* **113**, 692–698
17. Taniguchi, N. and Ihara, Y. (1995) *Glycoconj. J.* **12**, 733–738
18. Koyama, N., Miyoshi, E., Ihara, Y., Kang, R., Nishikawa, A., and Taniguchi, N. (1996) *Eur. J. Biochem.* **238**, 853–861
19. Ikeda, Y., Koyota, S., Ihara, H., Yamaguchi, Y., Korekane, H., Tsuda, T., Sasai, K., and Taniguchi, N. (2000) *J. Biochem.* **128**, 609–619
20. Kaur, K.J., and Hindsgaul, O. (1992) *Carbohydr. Res.* **226**, 219–231
21. Alton, G., Kanie, Y., and Hindsgaul, O. (1993) *Carbohydr. Res.* **238**, 339–344
22. Khan, S.H., Compston, C.A, and Palcic, M.M. (1994) *Carbohydr. Res.* **262**, 283–295
23. Nagai, K., Ihara, Y., Wada, Y. and Taniguchi, N. (1997) *Glycobiology* **7**, 769–776
24. Boeggeman, E. E., Balaji, P. V., Sethi, N., Masibay, A.S., and Qasba, P. K. (1993) *Protein Eng.* **6**, 779–785
25. Nakazawa, K., Furukawa, K., Narimatsu, H., and Kobata, A. (1993) *J. Biochem.* **113**, 747–753
26. Galili, U., and Anaraki, F. (1995) *Glycobiology* **5**, 775–782
27. Grabenhorst, E. and Conradt, H. S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36107–36116
28. Brisson, J.R., and Carver, J.P. (1983) *Biochemistry* **22**, 3671–3680
29. Brisson, J.R., and Carver, J.P. (1983) *Biochemistry* **22**, 3680–3686
30. Brisson, J.R., and Carver, J.P. (1983) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 1067–1078
31. Taniguchi, N., Yoshimura, M., Miyoshi, E., Ihara, Y., Nishikawa, A., and Fujii, S. (1996) *Glycobiology* **6**, 691–694
32. Dennis, J. W., Laferte, S., Waghorne, C., Breitman, M.L., and Kerbel, R.S. (1987) *Science* **236**, 582–585
33. Demetriou, M., Nabi, I.R., Coppelino, M., Dedhar, S., and Dennis, J.W. (1995) *J. Cell Biol.* **130**, 383–392
34. Yoshimura, M., Nishikawa, A., Ihara, Y., Taniguchi, S., and Taniguchi, N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8754–8758
35. Yoshimura, M., Ihara, Y., Matsuzawa, Y., and Taniguchi, N. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13811–13815
36. Kitada, T., Miyoshi, E., Noda, K., Higashiyama, S., Ihara, H., Matsuura, N., Hayashi, N., Kawata, S., Matsuzawa, Y., and Taniguchi, N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 475–480
37. Yoshimura, M., Ihara, Y., Ohnishi, A., Ijuhin, N., Nishiura, T., Kanakura, Y., Matsuzawa, Y., and Taniguchi, N. (1996) *Cancer Res.* **56**, 412–418
38. Ihara, Y., Sakamoto, Y., Mihara, M., Shimizu, K., and Taniguchi, N. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 9629–9634
39. Rebbaa, A., Yamamoto, H., Saito, T., Meuillet, E., Kim, P., Kersey, D.S., Bremer, E.G., Taniguchi, N., and Moskal, J.R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 9275–9279
40. Ihara, Y., Yoshimura, M., Miyoshi, E., Nishikawa, A., Sultan, A.S., Toyosawa, S., Ohnishi, A., Suzuki, M., Yamamura, K., Ijuhin, N., and Taniguchi, N. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2526–25230
41. Priatel, J.J., Sarkar, M., Schachter, H., Marth, J.D. (1997) *Glycobiology* **7**, 45–56
42. Bhaumik, M., Harris, T., Sundaram, S., Johnson, L., Guttenplan, J., Rogler, C., and Stanley, P. (1998) *Cancer Res.* **58**, 2881–2887
43. Yang, X., Bhaumik, M., Bhattacharyya, R., Gong, S., Rogler, C.E., and Stanley, P. (2000) *Cancer Res.* **60**, 3313–3319

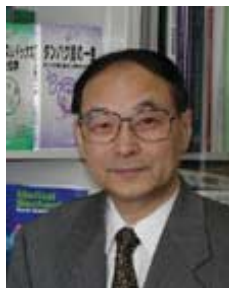
Received on February 28, 2001, accepted on March 20, 2001

## Profile of the Authors



**Yoshitaka Ikeda** graduated from Jikei University School of Medicine in 1989, and obtained his Ph.D from Osaka University Medical School in 1993. He is currently a research associate of the Department of Biochemistry, Osaka University Medical School. His research interests have been focused on active site chemistry and regulation of enzymes.

★★★★★★★★



**Naoyuki Taniguchi** graduated from the Hokkaido University School of Medicine in 1967, and obtained his Ph.D. from the Hokkaido University School of Medicine in 1972.

Since 1986 he has been a Professor and Chairman, Department of Biochemistry, Osaka University Medical School. He serves on the editorial board of *J. Biol. Chem.*, *Glycobiology*, *Glycoconjugate J.*, etc. He will receive the International Glycoconjugate Organization Award in 2001. His research is directed at understanding the function and structure of the enzymes involved in the biosynthesis of glycoproteins at the cellular and molecular level, and his research interest is also focused on cancer and age-associated changes in the enzymes related to glutathione metabolism and free radicals. He is the president for the 74th Annual Meeting of Japanese Biochemical Society in 2001.