

Regulation of Poly-*N*-Acetylglucosamine Biosynthesis in *O*-Glycans

O-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン生合成の制御機構

Ujita, Minoru^{1,2,3}; and Fukuda, Minoru¹

¹Glycobiology Program, Cancer Research Center, The Burnham Institute, La Jolla, California 92037, USA
FAX: 858-646-3193, E-mail: minoru@burnham-inst.org

²Laboratory of Biological Chemistry, Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture

³Agricultural High-Tech Research Center, Meijo University, Tempaku-ku, Nagoya 468-8502, Japan
FAX: 81-52-835-7450, E-mail: ujita@meijo-u.ac.jp

Key Words : β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase, β 1,4-galactosyltransferase, gene family, core 2- and core 4-branched *O*-glycans, poly-*N*-acetylglucosamine

Abstract

Poly-*N*-acetylglucosamine is a unique carbohydrate composed of *N*-acetylglucosamine (LacNAc) repeats and provides the backbone structure for additional modifications such as sialyl Lewis^x. It is attached to *N*-glycans, *O*-glycans, and glycolipids and synthesized by the alternate addition of β 1,3-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and β 1,4-linked galactose (Gal) by β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (iGnT) and a member of the β 1,4-galactosyltransferase (β 4Gal-T) gene family. Poly-*N*-acetylglucosamines in mucin-type *O*-glycans can be formed in core 2- and core 4-branched oligosaccharides, which are synthesized by core 2 β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT) and core 4 β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C4GnT), respectively.

β 4Gal-TIV was found to be most efficient in the addition of a single Gal residue to core 2-branched oligosaccharides among the members of the β 4Gal-T gene family and to synthesize poly-*N*-acetylglucosamine in core 2-branched *O*-glycans together with iGnT. On the other hand, β 4Gal-TI was shown to be most efficient for poly-*N*-acetylglucosamine synthesis in *N*-glycans. In contrast to β 4Gal-TI, the efficiency of β 4Gal-TIV decreases dramatically as the acceptors contain more LacNAc repeats, consistent with the fact that core 2-branched *O*-glycans contain shorter poly-*N*-acetylglucosamines than *N*-glycans in many cells. Poly-*N*-acetylglucosamines in core 4-branched *O*-glycans were found to be synthesized most efficiently by iGnT and β 4Gal-TI although the synthesis in core 4 branches is less efficient than in core 2 branches because of inefficient addition of GlcNAc to core 4 branches by iGnT. Thus, poly-*N*-acetylglucosamine extension in core 2- and core 4-branched *O*-glycans is differentially controlled by iGnT and different members of the β 4Gal-T gene family.

要約

ポリ-*N*-アセチルラクトサミンは*N*-アセチルラクトサミン (LacNAc) 繰り返し構造を持つ特異な糖鎖であり、また、シアリルLewis^xのような、さらなる糖鎖修飾のためのバックボーンとなる。ポリ-*N*-アセチルラクトサミンは*N*-グリカン、*O*-グリカン、および糖脂質に結合しており、 β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(iGnT)と β 1,4-ガラクトース転移酵素(β 4Gal-T)遺伝子ファミリーのメンバーにより β 1,3結合*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)と β 1,4結合ガラクトース(Gal)が交互に付加して合成される。ムチン型*O*-グリカンにおいてポリ-*N*-アセチルラクトサミンはコア2およびコア4分岐糖鎖上に形成され、コア2およびコア4分岐糖鎖はそれぞれ、コア2 β 1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(C2GnT)およびコア4 β 1,6-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(C4GnT)により合成される。

コア2分岐糖鎖のガラクトースの付加においては β 4Gal-TIVが β 4Gal-T遺伝子ファミリーのメンバーの中で最も効率よく働き、また、iGnTとともに作用してコア2分岐*O*-グリカン上にポリ-*N*-アセチルラクトサミンを合成するということが見出された。一方、*N*-グリカン上のポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成においては β 4Gal-TIが最も効率よく作用するということが示された。 β 4Gal-TIVの働く効率は β 4Gal-TIと対照的に受容体のLacNAc繰り返し構造が増加すると劇的に減少するが、これはいろいろな細胞で見られる、コア2分岐*O*-グリカンのポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖が*N*-グリカンの場合よりも短いという知見とよく合っている。コア4分岐*O*-グリカンのポリ-*N*-アセチルラクトサミンはiGnTと β 4Gal-TIにより最も効率よく合成されるということが見出された。しかし、iGnTはコア4分岐へ効率よくGlcNAcを付加できないため、コア4分岐におけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成はコア2分岐の場合よりも効率が悪い。このようにコア2およびコア4分岐*O*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン伸長はiGnTと β 4Gal-T遺伝子ファミリーの異なるメンバーにより特異的に制御されている。

The abbreviations used are: iGnT, β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase; β 4Gal-T, β 1,4-galactosyltransferase; C2GnT, core 2 β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase; C4GnT, core 4 β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase; IGnT, I-branching β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase; GnTV, *N*-acetylglucosaminyltransferase V; pNP, *p*-nitrophenyl; HPLC, high performance liquid chromatography.

A. Introduction

Poly-*N*-acetylglucosamines are unique glycans having LacNAc repeats ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3$)_n in one side chain (1) and attached to *N*-glycans (2-4), *O*-glycans (5-7) and glycolipids (8-10). Poly-*N*-acetylglucosamines are often modified to express differentiation antigens and functional oligosaccharides. One of these oligosaccharides is sialyl Lewis^x, NeuNAc $\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ discovered in human granulocytes and monocytes (11, 12). Sialyl Lewis^x and its sulfated forms, such as 6-sulfo sialyl Lewis^x, NeuNAc $\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3(\text{sulfo} \rightarrow 6)]\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ in mucin-type glycoproteins, have been shown to be ligands for E-, P-, and L-selectin (13-15).

Since *O*-glycans are present as clusters in mucin-type glycoproteins, mucin-type glycoproteins can present multiple ligands to a selectin. In mucin-type glycoproteins of blood cells, sialyl Lewis^x can be found in core 2-branched oligosaccharides (5, 6, 16). Similarly, 6-sulfo sialyl Lewis^x in L-selectin ligands found in high endothelial venules is synthesized in core 2-branched oligosaccharides such as NeuNAc $\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3(\text{sulfo} \rightarrow 6)]\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha \rightarrow \text{serine/threonine}$ (17-19).

The enzyme responsible for core 2 branching is called core 2 $\beta 1,6$ -*N*-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), and its cDNA has been cloned (20). When C2GnT is inactivated in mice by gene targeting, leucocytes from those mutant mice exhibit much reduced binding to P-, L-, and E-selectin, although the effect on E-selectin binding is less severe than binding to P- and L-selectin (21).

In the gastrointestinal tract, oligosaccharides with core 3, GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$, can be frequently found (22). In these tissues, core 3 is converted to core 4 by core 4 $\beta 1,6$ -*N*-acetylglucosaminyltransferase (C4GnT), forming GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 6(\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3)\text{GalNAc}$ (23, 24).

Recently, a cDNA encoding C4GnT has been cloned (25, 26). This enzyme is unique in having a major C2GnT activity and a minor I-branching $\beta 1,6$ -*N*-acetylglucosaminyltransferase (IGnT) activity in addition to C4GnT activity. The expression profile of this novel C2/C4/IGnT (termed C2GnT-mucin type or C2GnT-2) is consistent with the distribution of core 4 branches in various tissues (22, 25), suggesting that C2GnT-mucin type is probably the enzyme responsible for the formation of core 4-branched oligosaccharides. Since core 4-branched oligosaccharides can be further modified to express sialyl Lewis^x in poly-*N*-acetylglucosaminyl side chains, the synthesis of core 4 and its poly-*N*-acetylglucosaminyl extension also provides a basis for the formation of functional oligosaccharides.

These results indicate that it is crucial to understand the synthesis of poly-*N*-acetylglucosamines in core 2- and core 4-branched *O*-glycans as well as in *N*-glycans. It has been demonstrated (27) that poly-*N*-acetylglucosamines in core 2-branched

A. 序 論

ポリ-*N*-アセチルラクトサミンは1本の側鎖に*N*-アセチルラクトサミン(LacNAc)の繰り返し構造、($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3$)_nが存在する特殊な糖鎖であり(1)、*N*-グリカン(2-4)、*O*-グリカン(5-7)、および糖脂質(8-10)に結合している。ポリ-*N*-アセチルラクトサミンは修飾され、分化抗原や機能性糖鎖が形成されることがある。そのような糖鎖の1つはヒトの顆粒球や単球で見出されたシアリルLewis^x、NeuNAc $\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ である(11、12)。ムチン型糖タンパク質上のシアリルLewis^xや6-スルホシアリルLewis^x、NeuNAc $\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3(\text{sulfo} \rightarrow 6)]\text{GlcNAc} \rightarrow \text{R}$ のような硫酸化シアリルLewis^xはE-、P-、およびL-セレクトインのリガンドであることがわかった(13-15)。

O-グリカンはムチン型糖タンパク質においてクラスターとして存在するのでムチン型糖タンパク質はセレクトインに対して多価のリガンドとなりうる。血液細胞のムチン型糖タンパク質ではシアリルLewis^xはコア2分岐糖鎖上に見出される(5、6、16)。同様に高内皮細静脈に見られるL-セレクトインリガンドの6-スルホシアリルLewis^xは NeuNAc $\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3(\text{sulfo} \rightarrow 6)]\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha \rightarrow \text{serine/threonine}$ のようにコア2分岐糖鎖上に合成される(17-19)。

コア2分岐を形成する酵素はコア2 $\beta 1,6$ -*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(C2GnT)と呼ばれ、そのcDNAがクローニングされている(20)。ジーンターゲットングによりマウスにおいてC2GnT遺伝子をノックアウトした場合、この変異マウスからの白血球ではP-、L-、およびE-セレクトインに対する結合が顕著に弱くなる。ただし、E-セレクトインへの結合における影響はP-およびL-セレクトインの場合に比べ大きくはない(21)。

胃や腸管においてコア3構造、GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$ を持つ糖鎖が数多く見出されている(22)。これらの組織ではコア3はコア4 $\beta 1,6$ -*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(C4GnT)によりコア4、GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 6(\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3)\text{GalNAc}$ へと変化する(23、24)。

最近、C4GnTのcDNAがクローニングされた(25、26)。この酵素はC4GnT活性に加え、強いC2GnT活性と弱いI分岐 $\beta 1,6$ -*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(IGnT)活性を有する点に特徴がある。この新しいC2/C4/IGnT(ムチン型C2GnTあるいはC2GnT-2と名付けられている)の発現様式はいろいろな組織でコア4分岐の分布と一致しており(22、25)、ムチン型C2GnTがコア4分岐糖鎖を形成する酵素であるということを示唆している。コア4分岐糖鎖はさらに修飾され、ポリ-*N*-アセチルラクトサミン側鎖上にシアリルLewis^xを発現しうるのでコア4合成とコア4分岐上でのポリ-*N*-アセチルラクトサミン伸長もまた、機能性糖鎖形成のもととなる。

これらの結果から*N*-グリカンだけでなく、コア2およびコア4分岐*O*-グリカン上でのポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成を解明することがいかに重要であるかがわかる。コア2分岐*O*-グリカンのポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成は $\beta 1,4$ -ガラクトース転移

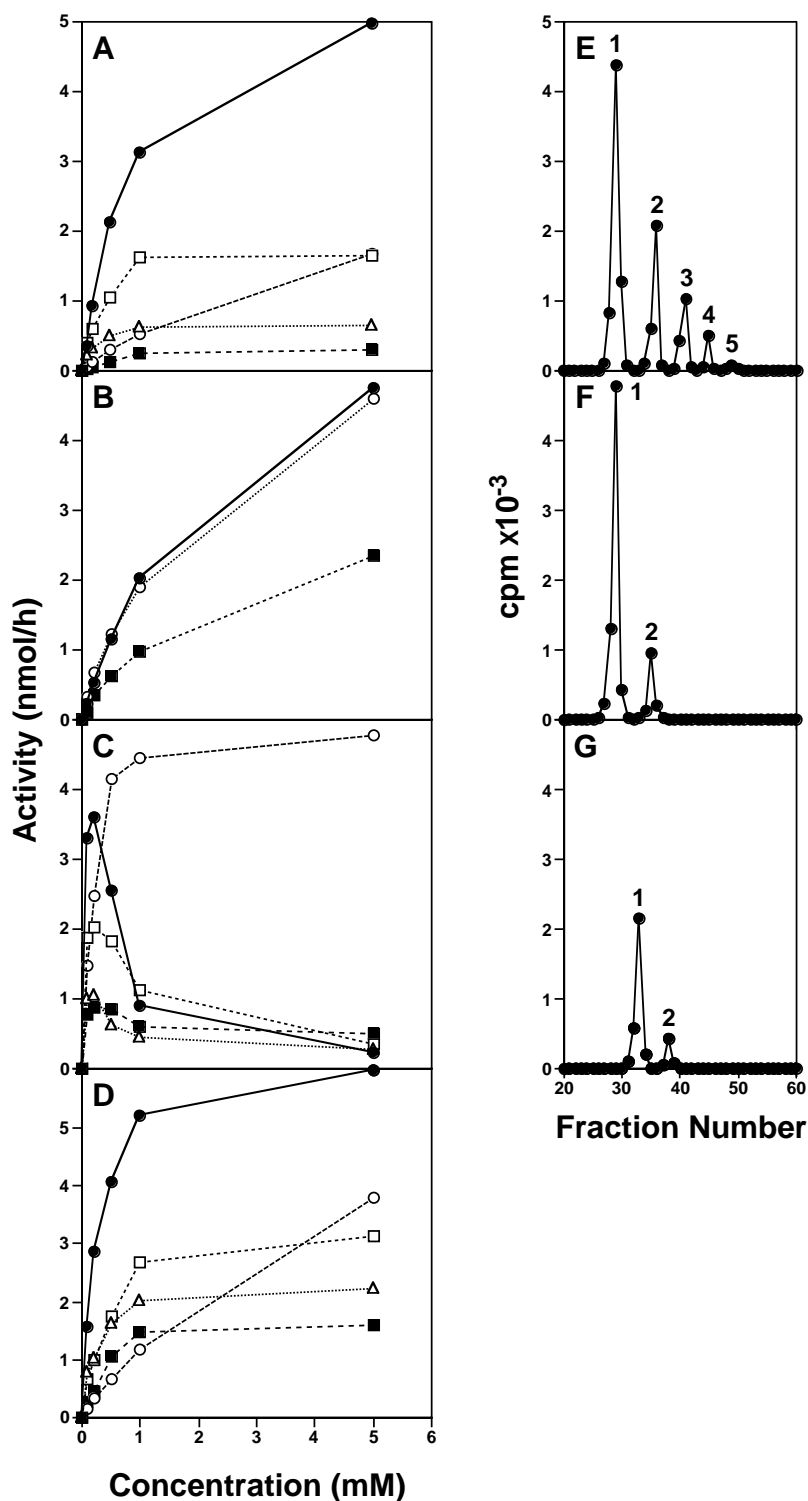


Fig. 1. $\beta 4\text{Gal-T}$ and *iGnT* activity in *N*- and *O*-glycans and HPLC analysis of poly-*N*-acetylactosaminyl *N*- and *O*-glycans. *A*, *C*, and *D*, *N*-glycan acceptor, $\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6\text{Man}\alpha 1\rightarrow 6\text{Man}\beta\rightarrow \text{octyl}$ (*A*), core 2-branched acceptor, $\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha\rightarrow \text{pNP}$ (*C*), or core 4-branched acceptor, $\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6(\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha\rightarrow \text{octyl}$ (*D*) was incubated with $\beta 4\text{Gal-TI}$ (closed circle), $\beta 4\text{Gal-TII}$ (open triangle), $\beta 4\text{Gal-TIII}$ (open square), $\beta 4\text{Gal-TIV}$ (open circle), or $\beta 4\text{Gal-TV}$ (closed square). *B*, *N*-glycan acceptor, $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6\text{Man}\alpha 1\rightarrow 6\text{Man}\beta\rightarrow \text{octyl}$ (closed circle), core 2 $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha\rightarrow \text{octyl}$ (open circle), or core 4 $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6(\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha\rightarrow \text{octyl}$ (closed square) was incubated with *iGnT*. *E*, *F*, and *G*, *N*-glycan acceptor, $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6\text{Man}\alpha 1\rightarrow 6\text{Man}\beta\rightarrow \text{octyl}$ (*E*), core 2 $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha\rightarrow \text{pNP}$ (*F*), or core 4 $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6(\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha\rightarrow \text{octyl}$ (*G*) was incubated with *iGnT* and $\beta 4\text{Gal-T}$, and analyzed by HPLC. $\beta 4\text{Gal-TI}$ (*E* and *G*) and $\beta 4\text{Gal-TIV}$ (*F*) were employed. Peaks 1-5 represent the products containing one (1) to five (5) LacNAc units.

O-glycans are synthesized with a member of the β 1,4-galactosyltransferase (β 4Gal-T) gene family, β 4Gal-TIV (28) and *i*- β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (*i*GnT) (29). It has been also found that β 4Gal-TI, *i*GnT, and *I*GnT are involved in the synthesis of I-branched poly-*N*-acetylglucosamines and the addition of LacNAc repeats to linear LacNAc of I-branched poly-*N*-acetylglucosamines is preferred over the addition of LacNAc to an I branch (30). It has been demonstrated that similar size and amount of poly-*N*-acetylglucosamines are synthesized in both side chains of $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6(\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{R}$ in *N*-glycans, which is performed by the action of *N*-acetylglucosaminyltransferase V (GnTV) (31). It has been recently shown that poly-*N*-acetylglucosamines in core 4-branched O-glycans are synthesized with β 4Gal-TI and *i*GnT (32).

We discuss here how poly-*N*-acetylglucosamine synthesis is regulated in glycoproteins, especially mucin-type O-glycans and describe that intricate interactions between glycan acceptors and specific glycosyltransferases play a critical role in glycan biosynthesis.

B. Poly-*N*-Acetylglucosamine Biosynthesis in *N*-Glycans

B-1. Galactosylation of *N*-Glycan Acceptors

Poly-*N*-acetylglucosamines are synthesized through the alternate actions of *i*GnT (29) and β 4Gal-T. Recently, it has been demonstrated from several laboratories that there exist at least six β 4Gal-Ts in addition to β 4Gal-TI (28, 33–39). First, β 4Gal-TI was found to be most efficient in galactosylation of *N*-glycan acceptors, $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$ and $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$ among members of the β 4Gal-T gene family (Fig. 1A, Table I) (27, 31, 32). These oligosaccharide acceptors are synthetic analogues of the branches in tetraantennary-type *N*-linked glycans, to which *i*GnT preferentially adds GlcNAc. In contrast, β 4Gal-TIV or -TV adds much less Gal to the *N*-glycan acceptors and their K_m is much higher than that for β 4Gal-TI. β 4Gal-TII has much lower V_{\max} than β 4Gal-TI, although its K_m is lower than that of β 4Gal-TI. Similarly, K_m for β 4Gal-TIII is lower than that of β 4Gal-TI, but β 4Gal-TIII has lower V_{\max} than β 4Gal-TI. These data indicate that β 4Gal-TII, -TIII, -TIV, and -TV are inefficient in galactosylation

酵素(β 4Gal-T)遺伝子ファミリーのメンバー、 β 4Gal-TIV(28)と*i*- β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(*i*GnT) (29)によることが証明された(27)。 β 4Gal-TI、*i*GnT、および*I*GnTが1分岐ポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成に関与し、また、1分岐ポリ-*N*-アセチルラクトサミンの1分岐の側鎖よりも主鎖にLacNAcが優先的に付加されるということも見出された(30)。また、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素V(GnTV)の作用により形成される、*N*-グリカンの分岐である $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6(\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{R}$ の両側鎖とも、ほぼ同じ長さと同量のポリ-*N*-アセチルラクトサミンが付加されるということが証明された(31)。最近、コア4分岐O-グリカンではポリ-*N*-アセチルラクトサミンは β 4Gal-TIと*i*GnTにより合成されるということが示された(32)。

我々はこの総説で、糖タンパク質、特にムチン型O-グリカンにおいてポリ-*N*-アセチルラクトサミン生合成がどのように制御されているのかを議論し、それを通じて糖鎖受容体と特異的な糖転移酵素の間の複雑な相互作用が糖鎖生合成において重要な役割を果たしているという知見を明らかにしたい。

B. *N*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミンの生合成

B-1. *N*-グリカン受容体のガラクトース付加

ポリ-*N*-アセチルラクトサミンは*i*GnT(29)と β 4Gal-Tが交互に作用することにより合成される。最近、乳中の主要な β 4Gal-Tである β 4Gal-TI以外に少なくとも6つの β 4Gal-Tが存在するということがいくつかの研究室で示された(28, 33–39)。

まず最初に*N*-グリカン受容体、 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$ と $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$ のガラクトース付加においては β 4Gal-TIが β 4Gal-T遺伝子ファミリーのメンバーの中で最も効率よく働くことが見出された(図1A、表I)(27, 31, 32)。これらの糖鎖受容体はアスパラギン結合型糖鎖の4本鎖複合型糖鎖の側鎖の中で*i*GnTがGlcNAcを優先的に付加する側鎖の合成アナログである。一方、 β 4Gal-TIVあるいは-TVはこれらの*N*-グリカン受容体に対してはガラクトース付加の効率が非常に悪く、両者の K_m 値は β 4Gal-TIよりもずっと高い。 β 4Gal-TIIの V_{\max} は β 4Gal-TIよりもずっと低いが、 K_m 値は β 4Gal-TIよりも低い。同様に β 4Gal-TIIIの K_m 値は β 4Gal-TIよりも低いが、 V_{\max} が β 4Gal-TIよりも低い。これらのデータは*N*-グリカン受容体に対する β 4Gal-TII、-TIII、-TIV、および-TVのガラクトー

Table I. Kinetic properties of *i*GnT and β 4Gal-Ts.

Substrate	<i>i</i> GnT		β 4Gal-TI		β 4Gal-TII		β 4Gal-TIII		β 4Gal-TIV		β 4Gal-TV	
	K_m	V_{\max}	K_m	V_{\max}	K_m	V_{\max}	K_m	V_{\max}	K_m	V_{\max}	K_m	V_{\max}
	mM	Relative values (%)	mM	Relative values (%)	mM	Relative values (%)	mM	Relative values (%)	mM	Relative values (%)	mM	Relative values (%)
$\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$			0.88	100 ^b	0.30	14	0.63	43	5.92	63	2.79	12
$\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$			0.91	96	0.32	13	0.70	46	5.78	65	2.71	11
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$	1.19	100 ^a										
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$	1.20	105										
$\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$			1.14	109	0.37	13	0.66	46	4.76	35	2.65	10
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$	1.06	52										
$\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$			1.08	103	0.38	14	0.72	9	4.98	5	2.68	11
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$	0.85	38										

^a V_{\max} of *i*GnT is compared with the V_{\max} (97.8 nmol/h/ml) obtained using $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$ as an acceptor.

^b V_{\max} for β 4Gal-Ts is compared with the V_{\max} (118.3 nmol/h/ml) obtained for β 4Gal-TI using $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta \rightarrow \text{octyl}$ as an acceptor.

Table II.

	Enzymes involved	Efficiency
<i>N</i> -glycans		
Galactosylation	β 4Gal-TI	+++
Poly- <i>N</i> -acetylactosamine synthesis	β 4Gal-TI, iGnT	+++
<i>O</i> -glycans		
Core 2-branched <i>O</i> -glycans		
Galactosylation	β 4Gal-TIV	++
Poly- <i>N</i> -acetylactosamine synthesis	β 4Gal-TIV, iGnT	+
Core 4-branched <i>O</i> -glycans		
Galactosylation	β 4Gal-TI	+++
Poly- <i>N</i> -acetylactosamine synthesis	β 4Gal-TI, iGnT	+

of *N*-glycan acceptors and β 4Gal-TI is most likely involved in galactosylation in *N*-glycans (Table II). β 4Gal-TVI and -TVII were not included in these studies, since β 4Gal-TVI was shown to synthesize Gal β 1 \rightarrow 4Glc β \rightarrow ceramide from Glc β \rightarrow ceramide (37) and β 4Gal-TVII was reported to attach the first Gal in the proteoglycan linkage region, GlcA β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Xyl β \rightarrow Ser (38, 39).

B-2. Poly-*N*-Acetylactosamine Extension in *N*-Glycan Acceptors

It has been previously shown that iGnT and β 4Gal-TI efficiently form poly-*N*-acetylactosamines in *N*-glycan acceptors *in vitro* (27, 31, 32). iGnT adds GlcNAc in almost identical efficiency to Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl and Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl (Fig. 1B, Table I). These oligosaccharide acceptors are also synthetic analogues of the branches in tetraantennary-type *N*-linked glycans, to which iGnT preferentially adds GlcNAc. To determine if other members of the β 4Gal-T gene family may be also involved in poly-*N*-acetylactosamine formation in *N*-glycans, the *N*-glycan acceptors, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl and Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl, were incubated with iGnT and different members of the β 4Gal-T gene family (32). β 4Gal-TI together with iGnT efficiently formed poly-*N*-acetylactosamines on both Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl and Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl (Fig. 1E). One to five LacNAc units were added to both *N*-glycan acceptors. In contrast, together with iGnT, β 4Gal-TII and -TIII added two LacNAc units as a maximum and β 4Gal-TIV and -TV added only one LacNAc unit. Moreover, the total amount of LacNAc incorporated by iGnT and β 4Gal-TII, -TIII, -TIV, or -TV was less than a half of that incorporated by iGnT and β 4Gal-TI. These results can be explained by acceptor substrate specificity of members of the

ス付加の効率が悪く、 β 4Gal-TIが*N*-グリカンのガラクトース付加に関与しているということを示している(表II)。 β 4Gal-TVIはGlc β \rightarrow ceramideからGal β 1 \rightarrow 4Glc β \rightarrow ceramideを合成することが示され(37)、また、 β 4Gal-TVIIはプロテオグリカンにおけるグリコサミノグリカンとタンパク質の間の結合領域、GlcA β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Xyl β \rightarrow Serの最初のGalを付加することが報告されているので(38, 39)、これらの一連の研究では β 4Gal-TVIと-TVIIの関与は検討されていない。

B-2. *N*-グリカン受容体におけるポリ-*N*-アセチルラクトサミンの伸長

iGnTと β 4Gal-TIが*in vitro*で効率よく*N*-グリカン受容体上にポリ-*N*-アセチルラクトサミンを合成することが以前に示された(27, 31, 32)。iGnTはGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octylとGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octylに、ほぼ同じ効率でGlcNAcを付加する(図1B、表I)。これらの糖鎖受容体もまた、アスパラギン結合型糖鎖の4本鎖複合型糖鎖の側鎖の中でiGnTがGlcNAcを優先的に付加する側鎖の合成アナログである。 β 4Gal-T遺伝子ファミリーの β 4Gal-TI以外のメンバーも*N*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成に関与しているかどうかを知るためにiGnTと β 4Gal-T遺伝子ファミリーのメンバーを用いて*N*-グリカン受容体であるGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octylとGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octylを基質としたポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成反応を行った(32)。 β 4Gal-TIとiGnTはGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octylとGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octylの両方において効率よくポリ-*N*-アセチルラクトサミンを合成した(図1E)。これらの両方の*N*-グリカン受容体には、ともに1から5つのLacNAc単位が付加された。一方、 β 4Gal-TIIと-TIIIはiGnTとともに作用した場合、最大で2つのLacNAc単位を付加し、 β 4Gal-TIVと-TVの場合は、1つだけLacNAc単位が付加された。さらにiGnTと β 4Gal-TII、-TIII、-TIV、あるいは-TVにより受容体に取り込まれたLacNAcの総量はiGnTと β 4Gal-TIによる取り込み量の半分以下だった。これらの結果はLacNAc単位数の異なる、いくつかの

β 4Gal-T gene family with *N*-glycan acceptors containing different numbers of LacNAc units (32).

As shown in Table I, β 4Gal-TI is very efficient in galactosylation of the *N*-glycan acceptors and barely decreases its galactosylation efficiency when the acceptors contain increasing numbers of LacNAc units. In contrast, β 4Gal-TIV or -TV adds much less Gal to the *N*-glycan acceptors because their K_m is much higher than that for β 4Gal-TI (Table I). Moreover, β 4Gal-TIV significantly decreases its V_{max} once the acceptor contains more than one LacNAc unit, while β 4Gal-TV has much lower V_{max} than β 4Gal-TI irrespective of the number of LacNAc units present in the acceptors (Table I). These properties are probably the reason why β 4Gal-TIV or β 4Gal-TV, together with iGnT, adds only one LacNAc unit to Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl or Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl. β 4Gal-TII has as low V_{max} value as β 4Gal-TV although its K_m is lower than that of β 4Gal-TI (Table I). K_m of β 4Gal-TIII is lower than that of β 4Gal-TI, and β 4Gal-TIII has relatively high V_{max} value with shorter acceptors (Table I). However, β 4Gal-TIII decreases its V_{max} significantly once the acceptor contains two LacNAc units. These properties are probably the reason why β 4Gal-TII or β 4Gal-TIII, together with iGnT, manages to add two LacNAc units to Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl or Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl (32). These results, as a whole, indicate that β 4Gal-TI is mainly involved in poly-*N*-acetylactosamine synthesis in *N*-glycans (Table II).

B-3. Regulation of Poly-*N*-Acetylactosamine Synthesis in *N*-glycans

The next question is how poly-*N*-acetylactosamine chain elongation ceases in *N*-glycans when sialylation or fucosylation does not occur. To determine if the efficiency of iGnT changes when the acceptors contain increasing numbers of LacNAc units, the *N*-glycan acceptors containing different numbers of LacNAc units were incubated with iGnT. iGnT was found to become less efficient as the acceptors become longer by having LacNAc repeats, indicating that the termination of chain elongation is due to a decreasing activity of iGnT with increase of chain length (Table I) (32). In contrast, the efficiency of β 4Gal-TI is barely affected by the increasing size of the acceptors as described above. Furthermore, β 4Gal-TI is sufficiently present to form poly-*N*-acetylactosamines in *N*-glycans in various tissues. These results, combined together, indicate that the action of iGnT is probably a rate-limiting step in poly-*N*-acetylactosamine formation in *N*-glycans. However, there are other factors that control poly-*N*-acetylactosamine synthesis in *N*-glycans. For example, it has been demonstrated that membrane glycoproteins contain more and longer poly-*N*-acetylactosamines than soluble, secretory glycoproteins (40). Furthermore, it is necessary for glycoproteins to move slowly through the Golgi apparatus for poly-*N*-acetylactosamine synthesis (41). Otherwise, the for-

N-グリカン受容体に対する β 4Gal-T遺伝子ファミリーのメンバーの基質特異性により以下のように説明できる(32).

表Iに示されているように β 4Gal-TIは*N*-グリカン受容体のガラクトース付加の効率が非常に良く、受容体に存在するLacNAc単位の数が増しても β 4Gal-TIのガラクトース付加の効率はほとんど変化しない。一方、 β 4Gal-TIVあるいは-TVの*N*-グリカン受容体に対する K_m 値は β 4Gal-TIよりもずっと高いので、これらの β 4Gal-Tは*N*-グリカン受容体のガラクトース付加の効率が悪い(表I)。さらに β 4Gal-TIVは受容体に1つ以上のLacNAc単位が存在すると V_{max} が大きく減少し、一方、 β 4Gal-TVは受容体に存在するLacNAc単位の数に関係なく β 4Gal-TIよりも V_{max} がずっと低い(表I)。おそらくこれらの特性がiGnTとともに作用した場合、 β 4Gal-TIVあるいは β 4Gal-TVがGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octylあるいはGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octylにたった1つしかLacNAc単位を付加しない理由であろう。 β 4Gal-TIIの V_{max} は β 4Gal-TVと同じぐらい低いが、その K_m 値は β 4Gal-TIよりも低い(表I)。 β 4Gal-TIIIの K_m 値は β 4Gal-TIよりも低く、また、 β 4Gal-TIIIは長さの短い受容体に対しては比較的高い V_{max} を示す(表I)。しかしながら、受容体に2つのLacNAc単位が存在すると β 4Gal-TIIIの V_{max} は大きく減少する。これらの特性がおそらくiGnTとともに作用した場合、 β 4Gal-TIIあるいは β 4Gal-TIIIがGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octylあるいはGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octylに2つのLacNAc単位を付加することができる理由であろう(32)。全体としてこれらの結果は主に β 4Gal-TIが*N*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成に関与していることを示している(表II)。

B-3. *N*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成の制御

次いでシアル酸やフコースが付加されない場合、*N*-グリカンにおいてどのようにポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖の伸長が停止するのかということ考察した。iGnTの効率が受容体のLacNAc単位数の増加により変化するかどうかを確かめるために異なる数のLacNAc単位を有する、いくつかの*N*-グリカン受容体に対するiGnTのGlcNAc付加反応が調べられた。受容体のLacNAc繰り返し構造が増加し、長さが長くなるにつれ、iGnTの効率が悪くなることを見出された(表I) (32)。これは受容体の長さが長くなるにつれてiGnTの活性が低下することによりポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖の伸長が停止するというを示している。一方、上述したように β 4Gal-TIの効率は受容体の長さが長くなって、ほとんど変化しない。さらに β 4Gal-TIは様々な組織で*N*-グリカンにおいてポリ-*N*-アセチルラクトサミンを合成するのに十分な量が存在する。これらの結果をまとめるとiGnTの作用が*N*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成の律速段階であると言える。しかしながら、*N*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成を制御する他の因子も存在する。例えば、膜糖タンパク質には可溶性分泌タンパク質の場合よりも多くの、また、長いポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖が存在することが証明された(40)。さらにポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成のためには糖タンパク質がゴルジ装置内をゆっくり通過する必要がある(41)。もしそうでなければLacNAc形成に続

mation of LacNAc is immediately followed by sialylation or other modifications that prevent further addition of LacNAc. The biosynthetic oligosaccharide products are a result of the balance between the amount of glycosyltransferases present and the movement of glycoproteins in the Golgi apparatus during glycan biosynthesis. It has been reported that only selected numbers of glycoproteins are enriched with poly-*N*-acetyl-lactosamines. lamp-1 and lamp-2 are always the major carriers for poly-*N*-acetyl-lactosamines in various cells (42–44). It is possible that lamp-1 and lamp-2 satisfy all of the criteria mentioned above.

C. Poly-*N*-Acetyl-lactosamines in Core 2-Branched *O*-Glycans

Mucin-type *O*-glycans are present in a wide variety of cells and play various roles in different cells. Mucin-type glycoproteins are also present in the plasma membrane, and they are often involved in cell-cell interaction (45). For example, *O*-glycans present in eggs were shown to be a receptor for both mouse and sea urchin sperm (46, 47). In granulocytes, monocytes, and certain T lymphocytes, mucin-type *O*-glycans can carry sialyl Lewis^x at their termini (5, 6, 16). Sialyl Lewis^x and its sulfated forms are ligands for E-, P-, and L-selectin (13–15). Importantly, these selectins, in particular P- and L-selectin, preferentially bind to sialyl Lewis^x in a limited number of mucin-type glycoproteins such as PSGL-1 (for P-selectin), GlyCAM-1 and CD34 (for L-selectin) (48–50). As shown previously, sialyl Lewis^x and its derivatives on *O*-glycans in blood cells can be only formed on core 2 branches, Galβ1→4GlcNAcβ1→6(Galβ1→3)GalNAcα→R (5, 16). Recent studies demonstrated that sialyl Lewis^x and sialyl Lewis^a in core 2 branches are highly correlated to tumor invasion of colon carcinoma (51), probably because tumor cells utilize selectin-carbohydrate interaction for their adhesion.

In patients with immunodeficiency such as Wiskott-Aldrich syndrome, AIDS, and leukemia, leukocytes in the peripheral blood express a substantial amount of core 2-branched oligosaccharides, while leukocytes of normal individuals do not express core 2-branched oligosaccharides (52–55). Most recent studies employing transgenic mice demonstrated that the overexpression of core 2-branched oligosaccharides weakens the interactions between T lymphocytes and antigen presenting cells or B lymphocytes, resulting in reduced immune responses (56, 57). It has also been shown that AIDS patients produce antibodies against leukosialin expressing core 2-branched oligosaccharides, possibly causing T lymphocyte depletion in AIDS patients (58, 59). Moreover, the overexpression of a mucin-type glycoprotein carrying core 2-branched oligosaccharides was found to interfere with cell adhesion (60), while knockout of the leukosialin gene in mice resulted in hyperimmune responses most likely due to the decrease in mucin-type *O*-glycans (61).

It has been also shown that poly-*N*-acetyl-lactosamine can

いてすぐにシアル酸の付加あるいは他の修飾が起こり、LacNAcがさらに伸長するのを妨害する。糖鎖の生合成にはゴルジ装置に存在する糖転移酵素の量と糖タンパク質の移動が関与しており、それらの間のバランスにより最終的に合成される糖鎖の構造が決定される。これまでに限られた数の糖タンパク質だけにポリ-*N*-アセチルラクトサミンが多量に存在するということが報告されている。lamp-1とlamp-2は様々な細胞において常に主要なポリ-*N*-アセチルラクトサミンのキャリアーである(42–44)。lamp-1とlamp-2は上記の基準をすべて満たしているのかもしれない。

C. コア 2 分岐 *O*-グリカン上のポリ-*N*-アセチルラクトサミン

ムチン型 *O*-グリカンは多種多様な細胞に存在し、様々な役割を果たしている。ムチン型糖タンパク質は細胞膜にも存在し、細胞間相互作用に関与する(45)。例えば、卵に存在する *O*-グリカンはマウスやウニにおいて精子に対する受容体として機能していることがわかった(46, 47)。顆粒球、単球、およびある種のTリンパ球においてムチン型 *O*-グリカンの末端にシアリルルイスxが存在する(5, 6, 16)。シアリルルイスxと硫酸化シアリルルイスxはE-, P-, およびL-セレクトインのリガンドである(13–15)。これらのセレクトイン、特にP-およびL-セレクトインはPSGL-1(P-セレクトインのリガンド)、GlyCAM-1およびCD34(L-セレクトインのリガンド)のような限られたムチン型糖タンパク質に存在するシアリルルイスxに、より強く結合する(48–50)。上述したように血液細胞の *O*-グリカンではシアリルルイスxとその誘導体はコア2分岐(Galβ1→4GlcNAcβ1→6(Galβ1→3)GalNAcα→R)上のみ形成される(5, 16)。最近の研究によりコア2分岐上に形成されるシアリルルイスxとシアリルルイスaは大腸癌の浸潤との関連性が高いことが証明された(51)。これはおそらく癌細胞の接着にはセレクトイン-糖鎖相互作用が関与しているためであろう。

Wiskott-Aldrich症候群、エイズ、および白血病のような免疫不全症の患者では末梢血の白血球はかなりの量のコア2分岐糖鎖を発現しているが、正常人の白血球はコア2分岐糖鎖を発現していない(52–55)。トランスジェニックマウスを用いた最新の研究ではコア2分岐糖鎖を過剰に発現させるとTリンパ球と抗原提示細胞あるいはBリンパ球の間の相互作用が弱くなり、免疫応答が低下するということが証明された(56, 57)。また、エイズ患者がコア2分岐糖鎖を持つロイコシアリンに対する抗体を産生し、おそらくTリンパ球の減少を引き起こすということもわかった(58, 59)。さらにコア2分岐糖鎖を有するムチン型糖タンパク質の過剰発現が細胞接着を阻害することが見出されたが(60)、逆にロイコシアリン遺伝子のノックアウトマウスではムチン型糖鎖が減少することにより過剰免疫応答となった(61)。

ポリ-*N*-アセチルラクトサミンはコア2分岐から伸長し、ポ

be extended from core 2 branches, forming poly-*N*-acetylglucosaminyl *O*-glycans (5, 6, 16, 62). Poly-*N*-acetylglucosamines are susceptible to endo- β -galactosidase and larger than typical *N*-glycans or *O*-glycans containing only one LacNAc in a side chain. Poly-*N*-acetylglucosamines provide the backbone structure for additional modifications, which are often cell-type specific oligosaccharides, such as sialyl Lewis^x (45). These results, as a whole, indicate that poly-*N*-acetylglucosamines in core 2-branched oligosaccharides play critical roles in cell-cell interaction. These data also suggest that it is crucial to understand the biosynthesis of poly-*N*-acetylglucosamines in core 2-branched *O*-glycans.

D. Poly-*N*-Acetylglucosamine Biosynthesis in Core 2-Branched *O*-Glycans

D-1. Galactosylation of Core 2-Branched Oligosaccharides

The synthesis of poly-*N*-acetylglucosamines in core 2-branched *O*-glycans is regulated by C2GnT (20), iGnT (29), and members of the β 4Gal-T gene family (28, 33-39). The termini are formed by the addition of fucose, sialic acid, and sulfate. C2GnT forms core 2 branches, GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow R from core 1, Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α \rightarrow R and iGnT forms poly-*N*-acetylglucosamines on core 2 branches together with members of the β 4Gal-T gene family (Fig. 2). β 4Gal-TI, -TII, and -TIII were reported to be capable of adding a Gal residue to form LacNAc in both glycoproteins and glycolipids (33). Except for β 4Gal-TVI (37) and β 4Gal-TVII (38, 39), however, the roles of members of the β 4Gal-T gene family have been elusive. It has been recently found that β 4Gal-TIV most efficiently galactosylates a core 2 trisaccharide, GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow pNP among members of the human β 4Gal-T gene family when the same amount of recombinant soluble enzymes is used in the reaction (Fig. 1C, Table III) (27). β 4Gal-TI, -TII, -TIII, and -TV galactosylate the core 2 trisaccharide less efficiently due to substrate inhibition although β 4Gal-TI has a relatively high activity with core 2 structures. This substrate inhibition occurs probably because β -Gal residue in the acceptor competes with UDP-Gal. In contrast, the core 2 branch is efficiently galactosylated by β 4Gal-TIV with a K_m of 0.29 mM. β 4Gal-TIV adds Gal much less efficiently to *N*-glycan acceptors than core 2-branched acceptors as described above. This finding is consistent with the previous report that β 4Gal-TIV adds very little Gal to asialoagalactotransferrin, which contains only *N*-glycans (28). These results are also consistent with the report that β 4Gal-TIV acts inefficiently on asialoagalactofetuin, since *O*-glycans in fetuin lack core 2 branches (28). These data indicate that β 4Gal-TIV is most likely responsible for galactosylation of core 2 branches (Fig. 2, Table II). This study is the first report that a particular β 4Gal-T is exclusively responsible for forming specific oligosaccharide structures among members of the β 4Gal-T gene family cloned

リ-*N*-アセチルラクトサミニル-*O*-グリカンを形成するというこも示された(5, 6, 16, 62)。ポリ-*N*-アセチルラクトサミンはエンド- β -ガラクトシダーゼにより分解され、また、1本の側鎖に1つのLacNAcを有する典型的な*N*-グリカンや*O*-グリカンよりも大きい。ポリ-*N*-アセチルラクトサミンはさらなる糖鎖修飾のためのバックボーンとなり、ポリ-*N*-アセチルラクトサミン上に形成された糖鎖はシアリルルイス^xのように細胞種に特異的な場合もある(45)。以上の結果は全体としてコア2分岐糖鎖上のポリ-*N*-アセチルラクトサミンが細胞間相互作用において重要な役割を果たしていることを示している。また、これらのデータからコア2分岐*O*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミンの生合成を解明することがいかに重要であるかがわかる。

D. コア2分岐*O*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミンの生合成

D-1. コア2分岐糖鎖のガラクトース付加

コア2分岐*O*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成はC2GnT(20)、iGnT(29)、および β 4Gal-T遺伝子ファミリーのメンバー(28, 33-39)により制御されている。そして、フコース、シアル酸、および硫酸が付加して末端構造が形成される。C2GnTはコア1、Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α \rightarrow Rからコア2分岐、GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow Rを合成し、iGnTは β 4Gal-T遺伝子ファミリーのメンバーとともに作用してコア2分岐上にポリ-*N*-アセチルラクトサミンを合成する(図2)。 β 4Gal-TI、-TII、および-TIIIは糖タンパク質と糖脂質の両方においてGal残基を付加し、LacNAcを形成することができると報告された(33)。しかしながら、 β 4Gal-TVI(37)と β 4Gal-TVII(38, 39)を除き、 β 4Gal-T遺伝子ファミリーのメンバーの機能は解明されていない。同量の可溶性組換え体酵素を用いて反応を行った場合、 β 4Gal-TIVがヒト β 4Gal-T遺伝子ファミリーのメンバーの中で最も効率よくコア2糖鎖、GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow pNPにGalを付加するということが最近、見出された(図1C、表III) (27)。 β 4Gal-TI、-TII、-TIII、および-TVは基質阻害のため、コア2糖鎖に効率よくGalを付加できないが、その中で β 4Gal-TIは比較的高い活性を示す。この基質阻害はおそらく受容体の β -Gal残基がUDP-Galと競合することにより起こるのであろう。それに対し、コア2分岐は β 4Gal-TIVにより効率的にGalが付加され、その K_m 値は0.29 mMである。上述したように β 4Gal-TIVはコア2分岐受容体の場合と異なり、*N*-グリカン受容体にはGalを効率よく付加できない。トランスフェリンには*N*-グリカンだけが存在するので、これは β 4Gal-TIVがシアル酸とGalを除去したトランスフェリンにはほとんどGalを付加できないという以前の報告と一致している(28)。フェチュインの*O*-グリカンにはコア2分岐が存在しないので、このことはまた、 β 4Gal-TIVがシアル酸とGalを除去したフェチュインには効率的に作用しないという報告とも一致する(28)。これらのデータは β 4Gal-TIVがコア2分岐のガラクトース付加を行っていることを示している(図2、表II)。この研究はESTデータベースやPCRホモロジークローニング法を用いてクローニングされた β 4Gal-T遺伝子ファミリーのメンバーの中

using expressed sequence tag (EST) data base or by PCR homology cloning.

D-2. Poly-*N*-Acetyllactosamine Extension in Core 2-Branched Oligosaccharides

iGnT can add GlcNAc with almost equal efficiency to a galactosylated core 2-branched oligosaccharide, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octyl (Fig. 1B, Table III) and an *N*-glycan acceptor, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl (Fig. 1B, Table I) (32). To test if iGnT and β 4Gal-TIV together can form poly-*N*-acetyllactosamines on core 2-branched *O*-glycans, a galactosylated core 2-branched oligosaccharide acceptor, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow pNP, was incubated with iGnT and β 4Gal-TIV (Fig. 1F) (27, 32). β 4Gal-TIV together with iGnT added two LacNAc units as a maximum to the galactosylated core 2-branched oligosaccharide acceptor and all of the reaction products contained Gal at the nonreducing termini, as seen in many cells (63-67). In *N*-glycans, only one LacNAc unit was added to *N*-glycan acceptors by β 4Gal-TIV and iGnT as described above. These results indicate that β 4Gal-TIV together with iGnT efficiently forms LacNAc repeats on core 2-branched oligosaccharides but not on *N*-glycan acceptors.

In contrast, β 4Gal-TI together with iGnT inefficiently forms poly-*N*-acetyllactosamines on galactosylated core 2-branched oligosaccharide acceptors (27, 32). From the galactosylated core 2-branched oligosaccharide, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow pNP, GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow pNP and Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow pNP were produced, indicating that only one LacNAc unit is added as a maximum by β 4Gal-TI and iGnT. The structures of the reaction products can be elucidated by endo- β -galactosidase digestion. The total amount of the reaction products by β 4Gal-TI and iGnT is less than half of the reaction products by β 4Gal-TIV and iGnT. In nature, core 2-branched *O*-glycans rarely contain GlcNAc at the nonreducing termini and are almost exclusively terminated with Gal or sialylated Gal (5, 6, 16). Since the majority of the reaction products contained GlcNAc at the nonreducing ends, inefficient galactosylation by β 4Gal-TI is a likely cause for the lack of poly-*N*-acetyllactosamine formation in core 2 branches by β 4Gal-TI and iGnT. This inefficient galactosylation in poly-*N*-acetyllactosamine formation on core 2 branches is probably due to substrate inhibition of β 4Gal-TI toward core 2-branched oligosaccharides as described above.

β 4Gal-TI together with iGnT adds five LacNAc units as a maximum to *N*-glycan acceptors as described above (Fig. 1E). It is noteworthy that the size of poly-*N*-acetyllactosamine in core 2-branched oligosaccharides was much smaller than that in *N*-glycan acceptors, when the same amount of the enzymes was

で特定の β 4Gal-Tだけが特異的な糖鎖構造の形成に関与することを示した最初の報告である。

D-2. コア2分岐糖鎖におけるポリ-*N*-アセチルラクトサミンの伸長

iGnTは末端にGalを持つコア2分岐糖鎖、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octyl(図1B、表III)と*N*-グリカン受容体、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β \rightarrow octyl(図1B、表I)にほぼ同じ効率でGlcNAcを付加する(32)。iGnTと β 4Gal-TIVが協同してコア2分岐*O*-グリカン上にポリ-*N*-アセチルラクトサミンを合成できるかどうかを調べるためにiGnTと β 4Gal-TIVを用いて、末端にGalを持つコア2分岐糖鎖受容体、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow pNPを基質としたポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成反応を試みた(図1F)(27、32)。iGnTとともに作用することにより β 4Gal-TIVは、末端にGalを持つコア2分岐糖鎖受容体に最大で2つのLacNAc単位を付加し、その合成反応産物はすべて、多くの細胞で見られるように非還元末端にGalを持っていた(63-67)。上述したように β 4Gal-TIVとiGnTが*N*-グリカン受容体に作用した場合、付加されるLacNAc単位は1つだけである。これらの結果は β 4Gal-TIVがiGnTとともに作用することにより*N*-グリカン受容体の場合とは異なりコア2分岐糖鎖上に効率よくLacNAc繰り返し構造を形成するというを示している。

それに対し、 β 4Gal-TIはiGnTとともに作用した場合、末端にGalを持つコア2分岐糖鎖受容体上に効率よくポリ-*N*-アセチルラクトサミンを合成できない(27、32)。 β 4Gal-TIとiGnTにより末端にGalを持つコア2分岐糖鎖、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow pNPからGlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow pNPとGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow pNPが合成されたが、これは β 4Gal-TIとiGnTではコア2分岐糖鎖上にLacNAc単位を最大でもたった1つしか付加することができないということを示している。ポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成において反応産物の構造はエンド- β -ガラクトシダーゼ消化により決定することができる。コア2分岐糖鎖を基質とした場合、 β 4Gal-TIとiGnTにより合成されるポリ-*N*-アセチルラクトサミンの総量は β 4Gal-TIVとiGnTによる場合の半分以下である。自然界ではコア2分岐*O*-グリカンは非還元末端にGlcNAcを持つことはほとんどなく、大抵の場合、Galかシアル酸の付加したGalが末端となっている(5、6、16)。このようにコア2分岐糖鎖に β 4Gal-TIとiGnTを作用させた場合、反応産物の大部分は非還元末端がGlcNAcであったので、 β 4Gal-TIによるガラクトース付加の効率の悪さがコア2分岐糖鎖では β 4Gal-TIとiGnTが作用してもポリ-*N*-アセチルラクトサミンが合成されないことの原因であると考えられる。このコア2分岐上のポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成における効率の悪いガラクトース付加は上述したコア2分岐糖鎖における β 4Gal-TIの基質阻害に起因すると考えられる。

β 4Gal-TIはiGnTとともに作用すると上述したように最大で5つのLacNAc単位を*N*-グリカン受容体に付加する(図1E)。それぞれの反応に用いられた酵素量が同一であってもコア2分岐糖鎖上に合成されるポリ-*N*-アセチルラクトサミンの長さが*N*-グリカン受容体の場合よりもずっと短かったということは注目に値す

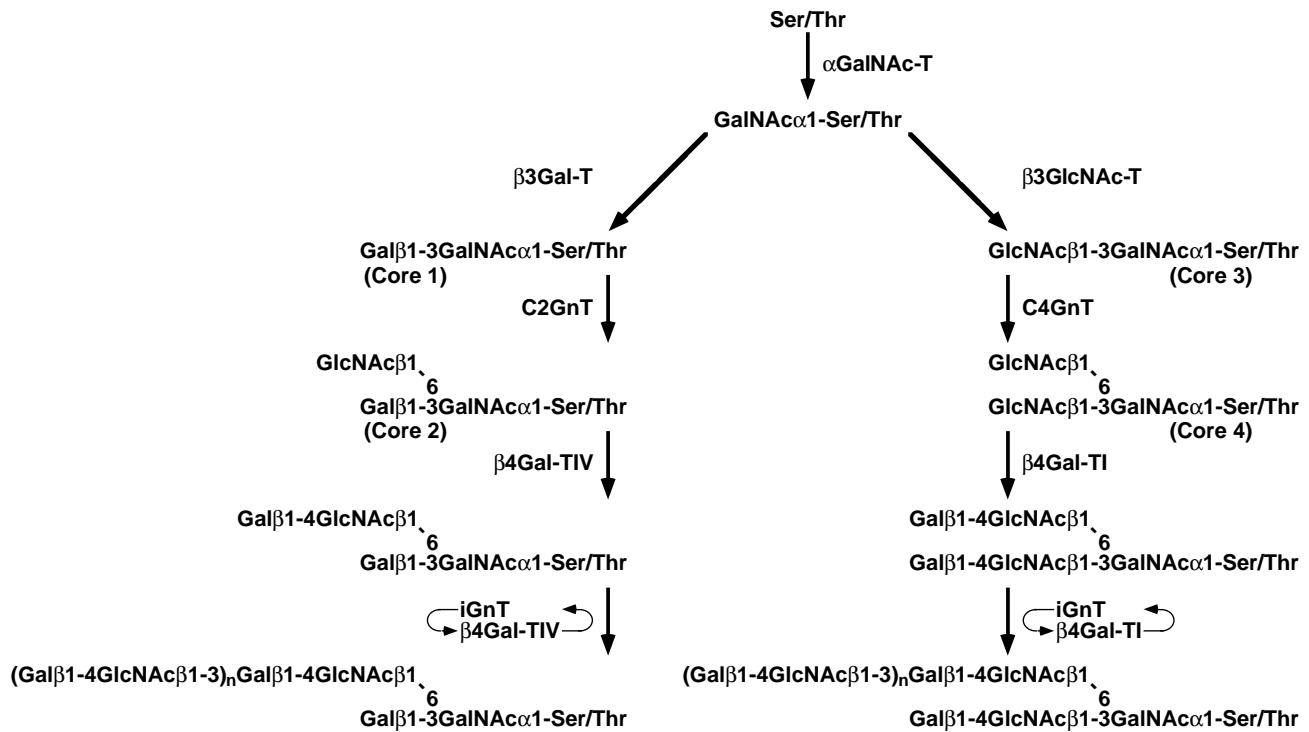


Fig. 2. Proposed biosynthetic pathway of core 2- and core 4-branched *O*-glycans. α -*N*-Acetylgalactosamine is transferred to serine or threonine residues in a polypeptide by α -*N*-acetylgalactosaminyltransferase (α GalNAc-T). This is followed by the action of core 1 β 1,3-galactosyltransferase (β 3Gal-T), forming Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α \rightarrow R (core 1). Core 1 is converted to GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow R (core 2) by core 2 β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT) (left in the figure) and then to Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow R by β 4Gal-TIV. Poly-*N*-acetyllactosamines are added to galactosylated core 2 *O*-glycans by the alternate actions of iGnT and β 4Gal-TIV. Alternatively, GalNAc α \rightarrow R can be extended by core 3 β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (β 3GlcNAc-T), forming GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc α \rightarrow R (core 3) (right in the figure). This is followed by the action of core 4 β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C4GnT) to form GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow R (core 4). Core 4 is galactosylated by β 4Gal-TI, resulting in Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow R. Poly-*N*-acetyllactosamines are added to galactosylated core 4 *O*-glycans by the alternate actions of iGnT and β 4Gal-TI. The cDNAs encoding core 1 forming β 3Gal-T and core 3 forming β 3GlcNAc-T have not yet been cloned.

used in both experiments (Fig. 1, *E* and *F*). These results are consistent with the facts that poly-*N*-acetyllactosamines on core 2-branched *O*-glycans are shorter than those in *N*-glycans and that the majority of poly-*N*-acetyllactosaminyl core 2-branched *O*-glycans contains only one or two LacNAc units, while poly-*N*-acetyllactosaminyl *N*-glycans contain three or more LacNAc units in many cells (5, 6, 16, 64–69). Moreover, it has been reported that core 2-branched *O*-glycans contain shorter and fewer poly-*N*-acetyllactosamine chains than *N*-glycans when *O*-glycans and *N*-glycans are analyzed in the same lamp molecules (70) or the same Chinese hamster ovary (CHO) cells (67, 68, 70).

These results indicate that β 4Gal-TIV is the enzyme involved in poly-*N*-acetyllactosamine extension on core 2 branches (Fig. 2, Table II).

D-3. Regulation of Poly-*N*-Acetyllactosamine Synthesis in Core 2-Branched *O*-Glycans

As described above, the galactosylation efficiency of β 4Gal-TI is barely affected by the increasing size of acceptors, but β 4Gal-TIV dramatically decreases its efficiency as an ac-

る(図1、EおよびF)。これらの結果はコア2分岐-O-グリカン上のポリ-N-アセチルラクトサミン鎖はN-グリカンの場合よりも短く、また、多くの細胞でN-グリカンのポリ-N-アセチルラクトサミンには3つ以上のLacNAc単位が存在するが、コア2分岐-O-グリカンにおけるポリ-N-アセチルラクトサミンの大部分は1つか2つのLacNAc単位を有するだけであるという結果と一致している(5、6、16、64–69)。さらにO-グリカンとN-グリカンが同一のlamp分子(70)あるいは同一のCHO細胞(67、68、70)において分析された場合、コア2分岐-O-グリカンにはN-グリカンの場合よりも短く、少ない量のポリ-N-アセチルラクトサミン鎖が存在することが報告されている。

これらの結果は β 4Gal-TIVがコア2分岐糖鎖におけるポリ-N-アセチルラクトサミン鎖伸長に関与していることを示している(図2、表II)。

D-3. コア2分岐-O-グリカンにおけるポリ-N-アセチルラクトサミン合成の制御

上述したように β 4Gal-TIのガラクトース付加の効率は受容体の長さが長くなってもほとんど変化しないが、 β 4Gal-TIVの効率は受容体のLacNAc単位の数が増すと劇的に減少する。また、

ceptor contains more LacNAc units. β 4Gal-TIV was also shown to act less efficiently on longer lacto-series glycolipids than shorter ones (28). These data suggest that β 4Gal-TI and β 4Gal-TIV differ in efficiency for adding a Gal residue to acceptors containing poly-*N*-acetylglucosamines.

These results, combined together, indicate that the intrinsic nature of β 4Gal-TIV is a likely cause for shorter poly-*N*-acetylglucosamines in core 2-branched *O*-glycans.

E. Poly-*N*-Acetylglucosamine Biosynthesis in Core 4-Branched *O*-Glycans

Core 4 branch, GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow R is formed from core 3, GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc α \rightarrow R by C4GnT (Fig. 2). Since core 4 branch is galactosylated in nature to form Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow R, core 4 branches can be also further modified to form functional oligosaccharides such as sialyl Lewis^x at their termini in addition to core 2 branches. It is thus important to determine how poly-*N*-acetylglucosamine formation in core 4 branches is regulated.

It was recently found that β 4Gal-TI is most efficient in galactosylation of core 4 branches among members of the β 4Gal-T gene family when a core 4-branched oligosaccharide, GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octyl is used as an acceptor (Fig. 1D, Table III) (32). Then, a galactosylated core 4 acceptor, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octyl was incubated with iGnT and β 4Gal-TI (Fig. 1G). The core 4-branched acceptors were converted to those containing one or two LacNAc units, although the amount of the reaction products from the core 4-branched acceptor was less than half of that derived from the core 2-branched acceptor (Fig. 1, F and G).

To determine why the core 4-branched oligosaccharide is a less favorable acceptor than the core 2-branched oligosaccharide, the iGnT activity was tested on the core 4-branched

β 4Gal-TIVでは長さの短いラクト系列の糖脂質よりも長いラクト系列の糖脂質に対する効率の方が悪いということも示された(28)。これらのデータはポリ-*N*-アセチルラクトサミンを有する受容体へのガラクトース付加の効率が β 4Gal-TIと β 4Gal-TIVでは異なるということを示唆している。

これらの結果をまとめると受容体が長くなると活性が低下するという β 4Gal-TIVの固有の性質がコア2分岐 O -グリカンにおいてポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖が短くなる原因になっていると言える。

E. コア4分岐 O -グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミンの生合成

コア4分岐、GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow RはC4GnTによりコア3、GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc α \rightarrow Rから合成される(図2)。自然界ではコア4分岐はGalが付加し、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow Rとなるので、コア2分岐と同様にコア4分岐もさらに修飾され、末端にシアリルLewis^xのような機能性糖鎖が形成される。従ってコア4分岐においてポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成がどのように制御されているのかを解明することは重要なことである。

コア4分岐糖鎖、GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octylを基質とした場合、 β 4Gal-T遺伝子ファミリーのメンバーの中で β 4Gal-TIが最も効率よくコア4分岐にGalを付加するということが最近、見出された(図1D、表III)(32)。さらにiGnTと β 4Gal-TIを用い、末端にGalを有するコア4分岐受容体、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octylを基質としたポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成反応が行われた(図1G)。このコア4分岐受容体には1つあるいは2つのLacNAc単位が付加されたが、コア4分岐受容体を基質とした時の合成反応産物の量はコア2分岐受容体を基質とした時の半分以下であった(図1、FおよびG)。

なぜコア4分岐糖鎖がコア2分岐糖鎖よりもポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成に関して効率の悪い受容体であるのかを解明するためにコア4分岐糖鎖受容体、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6

Table III. Kinetic properties of iGnT and β 4Gal-Ts.

Arrowheads and arrows indicate where GlcNAc and Gal are added, respectively.

Substrate	iGnT		β 4Gal-TI		β 4Gal-TII		β 4Gal-TIII		β 4Gal-TIV		β 4Gal-TV	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
	mM	Relative values (%)	mM	Relative values (%)	mM	Relative values (%)	mM	Relative values (%)	mM	Relative values (%)	mM	Relative values (%)
\rightarrow GlcNAc β 1 \rightarrow ₆ Gal β 1-3GalNAc α -pNP			- ^b	-	-	-	-	-	0.29	70	-	-
\rightarrow GlcNAc β 1 \rightarrow ₆ or \rightarrow GlcNAc β 1-3GalNAc α -octyl			0.31	118 ^c	0.50	38	0.71	46	1.81	66	0.98	29
\blacktriangleright Gal β 1-4GlcNAc β 1 \rightarrow ₆ Gal β 1-3GalNAc α -octyl	0.71	62 ^a										
\blacktriangleright Gal β 1-4GlcNAc β 1 \rightarrow ₆ GlcNAc β 1-3GalNAc α -octyl	0.82	31										

^a V_{max} of iGnT is compared with the V_{max} (97.8 nmol/h/ml) obtained using Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β -octyl as an acceptor.

^b These parameters could not be obtained due to substrate inhibition.

^c V_{max} for β 4Gal-Ts is compared to the V_{max} (118.3 nmol/h/ml) obtained for β 4Gal-TI using GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β -octyl as an acceptor.

oligosaccharide acceptor, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octyl. iGnT was shown to be less efficient toward the core 4-branched acceptor, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octyl than the core 2-branched acceptor, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octyl (Fig. 1B). This inefficient addition of GlcNAc to the core 4-branched acceptor may be due to competition between the nonreducing terminal GlcNAc residue in the acceptor and UDP-GlcNAc. This is most likely the reason why core 4-branched oligosaccharides acquire a lesser amount of poly-*N*-acetylactosamine extension than core 2-branched oligosaccharides.

These results indicate that iGnT and β 4Gal-TI are involved in the synthesis of poly-*N*-acetylactosaminyl core 4-branched *O*-glycans and that iGnT is a rate-limiting factor for short poly-*N*-acetylactosamine extension in core 4-branched *O*-glycans (Fig. 2, Table II).

F. Conclusion

Biosynthesis of *N*- and *O*-glycans is regulated by many specific glycosyltransferases. In *N*-glycans, iGnT and β 4Gal-TI cooperatively form poly-*N*-acetylactosamines and the action of iGnT is a rate-limiting step in poly-*N*-acetylactosamine extension.

However, β 4Gal-TI cannot efficiently galactosylate core 2-branched *O*-glycans. Instead of β 4Gal-TI, β 4Gal-TIV is responsible for galactosylation of core 2 branches and, together with iGnT, can form poly-*N*-acetylactosamines in core 2-branched *O*-glycans. It is also demonstrated *in vitro* that poly-*N*-acetylactosamines formed in core 2-branched *O*-glycans are shorter than those formed in *N*-glycans. β 4Gal-TIV is responsible for short poly-*N*-acetylactosamines in core 2-branched *O*-glycans, because the galactosylation efficiency of β 4Gal-TIV significantly decreases as acceptors contain more LacNAc units.

On the other hand, core 4-branched *O*-glycans are efficiently galactosylated by β 4Gal-TI but are even less efficient in poly-*N*-acetylactosamine formation than core 2-branched *O*-glycans. The inefficient addition of GlcNAc by iGnT is a rate-limiting step for short poly-*N*-acetylactosamine extension in core 4-branched *O*-glycans.

It is noteworthy that substrate inhibition plays important roles in various aspects of poly-*N*-acetylactosamine synthesis in *O*-glycans. These studies thus demonstrate that intricate interactions between a specific glycosyltransferase and an acceptor molecule largely contribute to the control of poly-*N*-acetylactosamine biosynthesis in *O*-glycans.

G. Future Prospects

The formation of core 2-branched *O*-glycans has been found to be critical in many biological processes. In order to understand the regulation of poly-*N*-acetylactosaminyl core 2-

(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octyl)に対する iGnT活性が調べられた。その結果、iGnTではコア2分岐受容体、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octylよりもコア4分岐受容体、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 3)GalNAc α \rightarrow octylに対する効率の方が悪いということがわかった(図1B)。コア4分岐受容体にGlcNAcが効率よく付加されないのは受容体の非還元末端に存在するGlcNAc残基とUDP-GlcNAcが競合するためであると考えられる。おそらくこれがコア4分岐糖鎖にコア2分岐糖鎖の場合よりも少ない量のポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖しか形成されない理由であろう。

これらの結果はコア4分岐*O*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミンの合成にiGnTと β 4Gal-TIが関与し、また、iGnTがコア4分岐*O*-グリカンにおいて短いポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖が合成される際の律速酵素となっていることを示している(図2、表II)。

F. 結論

N-および*O*-グリカンの生合成は多くの特異的な糖転移酵素により制御されている。*N*-グリカンではiGnTと β 4Gal-TIが協同でポリ-*N*-アセチルラクトサミンを合成し、iGnTの作用がポリ-*N*-アセチルラクトサミン伸長の律速段階になっている。

しかしながら、 β 4Gal-TIIはコア2分岐*O*-グリカンに効率よくGalを付加することができない。 β 4Gal-TIIに代わり β 4Gal-TIVがコア2分岐のガラクトース付加に関与し、iGnTとともに作用することによりコア2分岐*O*-グリカン上にポリ-*N*-アセチルラクトサミンを合成する。コア2分岐*O*-グリカン上に合成されたポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖は*N*-グリカンの場合よりも短いということが*in vitro*でも証明された。受容体のLacNAc単位数が増加すると β 4Gal-TIVのガラクトース付加の効率は大きく減少するので、コア2分岐*O*-グリカンにおいて短いポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖が形成されることには β 4Gal-TIVが関係している。

他方、コア4分岐*O*-グリカンは β 4Gal-TIにより効率よくGalが付加されるが、コア2分岐*O*-グリカンの場合よりもポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成の効率はずっと悪い。iGnTはコア4分岐糖鎖には効率よくGlcNAcを付加できず、これがコア4分岐*O*-グリカンにおいて短いポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖が形成される時の律速段階になっている。

いろいろな基質阻害が*O*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成の様々な局面で重要な役割を果たしていることは注目に値する。このようにこれらの研究は特異的な糖転移酵素と受容体分子の間の複雑な相互作用が*O*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン生合成の制御に大きく寄与していることを示している。

G. 展望

コア2分岐*O*-グリカンの形成が多くの生命現象において重要であるということが見出されている。コア2分岐*O*-グリカンにおけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン生合成の制御機構を解明するために、さらに様々な組織において β 4Gal-Tとシアル酸転移酵素

branched *O*-glycan biosynthesis, further studies are needed to analyze the distribution and expression level of β 4Gal-Ts and other glycosyltransferases including sialyltransferases and fucosyltransferases in various tissues. In this regard, it is also critical to determine specific roles of each member of different C2GnTs, C2GnT-1 (leukocyte type) (20), C2GnT-2 (mucin type) (25, 26), and most recently discovered C2GnT-3 (thymus type) (71) in core 2 branch synthesis.

Mucin-type *O*-glycans also include LacNAc extension from core 1 oligosaccharides, Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α \rightarrow R (72, 73). This formation is dependent on a novel iGnT yet to be identified that adds GlcNAc to Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc. Furthermore, the backbone of keratan sulfate is also poly-*N*-acetylglucosamine. Future studies will be significant to identify such a novel iGnT by cDNA cloning and to determine how the poly-*N*-acetylglucosamine extension is regulated in core 1 oligosaccharides and keratan sulfate.

Acknowledgments

The authors thank Drs. Joseph McAuliffe, Anup Misra, and Ole Hindsgaul for providing synthetic oligosaccharide acceptors, Dr. Michiko N. Fukuda for endo- β -galactosidase, Dr. Edgar Ong for critical reading of the manuscript, and the members of our laboratory for useful discussion. The work in our laboratory has been supported by grants R37CA33000, R01CA48737, and P01CA71932.

References

1. Fukuda, M. (2000) in *Molecular and Cellular Glycobiology* (Fukuda, M., and Hindsgaul, O., eds.) pp. 1-61, Oxford University Press, Oxford, U.K.
2. Krusius, T., Finne, J., and Rauvala, H. (1978) *Eur. J. Biochem.* **92**, 289-300
3. Järnefelt, J., Rush, J., Li, Y.T., and Laine, R.A. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 8006-8009
4. Fukuda, M., Fukuda, M.N., and Hakomori, S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3700-3703
5. Fukuda, M., Carlsson, S.R., Klock, J.C., and Dell, A. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 12796-12806
6. Wilkins, P.P., McEver, R.P., and Cummings, R.D. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18732-18742
7. Hanisch, F.G., Uhlenbruck, G., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Dabrowski, J., and Dabrowski, U. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 872-883
8. Fukuda, M.N., and Hakomori, S. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 446-455
9. Zdebska, E., Krauze, R., and Koscielak, J. (1983) *Carbohydr. Res.* **120**, 113-130
10. Dabrowski, U., Hanfland, P., Egge, H., Kuhn, S., and Dabrowski, J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 7648-7651
11. Fukuda, M., Spooncer, E., Oates, J. E., Dell, A., and Klock, J.C. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10925-10935
12. Mizoguchi, A., Takasaki, S., Maeda, S., and Kobata, A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11943-11948
13. Lowe, B.J. (1994) in *Molecular Glycobiology* (Fukuda, M., and Hindsgaul, O., eds.) pp. 163-205, Oxford University Press, Oxford, U.K.
14. McEver, R.P., Moore, K.L., and Cummings, R.D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11025-11028
15. Rosen, S.D., and Bertozzi, C.R. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 261-264
16. Maemura, K., and Fukuda, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 24379-24386
17. Hiraoka, N., Petryniak, B., Nakayama, J., Tsuboi, S., Suzuki, M., Yeh, J. C., Izawa, D., Tanaka, T., Miyasaka, M., Lowe, J.B., and Fukuda, M. (1999) *Immunity* **11**, 79-89
18. Bistrup, A., Bhakta, S., Lee, J.K., Belov, Y.Y., Gunn, M.D., Zuo, F.R., Huang, C.C., Kannagi, R., Rosen, S.D., and Hemmerich, S. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 899-910
19. Fukuda, M., Hiraoka, N., and Yeh, J. C. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 467-470
20. Bierhuizen, M. F., and Fukuda, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9326-9330
21. Ellies, L.G., Tsuboi, S., Petryniak, B., Lowe, J.B., Fukuda, M., and Marth, J.D. (1998) *Immunity* **9**, 881-890
22. Schachter, H., and Brockhausen, I. (1992) in *Glycoconjugates: Composition, Structure, and Function* (Allen, H.J., and Kisailus, E.C., eds), pp. 263-332, Marcel Dekker, Inc., New York
23. Hounsell, E.F., Fukuda, M., Powell, M.E., Feizi, T., and Hakomori, S. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 1143-1150

やフコース転移酵素のような他の糖転移酵素の分布や発現レベルを調べる必要がある。一方、コア2分岐に関与する酵素として3種類のC2GnT-1(白血球型) (20)、C2GnT-2(ムチン型) (25、26)、およびC2GnT-3(胸腺型)(71)が知られている。これらのC2GnTの中の各々がどのように異なった細胞で機能を果たしているのを知ること重要である。

ムチン型*O*-グリカンではコア1糖鎖、Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α \rightarrow Rからポリ-*N*-アセチルラクトサミンが伸長する場合もある(72、73)。このポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖の形成はGal β 1 \rightarrow 3GalNAcにGlcNAcを付加する新奇のiGnT(まだ同定されていない)に依存している。さらにケラタン硫酸のバックボーンもポリ-*N*-アセチルラクトサミンである。そのような新奇のiGnTをcDNAクローニングにより同定し、コア1糖鎖やケラタン硫酸においてポリ-*N*-アセチルラクトサミンの伸長がどのように制御されているのかを解明するための研究は重要で意義深いものとなるだろう。

24. Yang, J. M., Byrd, J.C., Siddiki, B.B., Chung, Y. S., Okuno, M., Sowa, M., Kim, Y.S., Matta, K.L., and Brockhausen, I. (1994) *Glycobiology* **4**, 873–884
25. Yeh, J.-C., Ong, E., and Fukuda, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 3215–3221
26. Schwientek, T., Nomoto, M., Lavery, S.B., Merx, G., van Kessel, A.G., Bennett, E.P., Hollingsworth, M.A., and Clausen, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 4504–4512
27. Ujita, M., McAuliffe, J., Schwientek, T., Almeida, R., Hindsgaul, O., Clausen, H., and Fukuda, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34843–34849
28. Schwientek, T., Almeida, R., Lavery, S.B., Holmes, E.H., Bennett, E., and Clausen, H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 29331–29340
29. Sasaki, K., Kurata-Miura, K., Ujita, M., Angata, K., Nakagawa, S., Sekine, S., Nishi, T., and Fukuda, M. (1997) *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **94**, 14294–14299
30. Ujita, M., McAuliffe, J., Suzuki, M., Hindsgaul, O., Clausen, H., Fukuda, M.N., and Fukuda, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9296–9304
31. Ujita, M., McAuliffe, J., Hindsgaul, O., Sasaki, K., Fukuda, M. N., and Fukuda, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16717–16726
32. Ujita, M., Misra, A. K., McAuliffe, J., Hindsgaul, O., and Fukuda, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 15868–15875
33. Almeida, R., Amado, M., David, L., Lavery, S.B., Holmes, E.H., Merx, G., van Kessel, A. G., Rygaard, E., Hassan, H., Bennett, E., and Clausen, H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31979–31991
34. Shaper, N.L., Meurer, J.A., Joziassse, D.H., Chou, T.-D., Smith, E.J., Schnaar, R.L., and Shaper, J.H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31389–31399
35. Sato, T., Furukawa, K., Bakker, H., Van den Eijnden, D.H., and Van Die, I. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 472–477
36. Lo, N., Shaper, J., Pevsner, J., and Shaper, N. (1998) *Glycobiology* **8**, 517–526
37. Nomura, T., Takizawa, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Wakisaka, E., Yoshizuka, N., Imokawa, G., Dohmae, N., Takio, K., Hattori, M., and Matsuo, N. (1998) *J. Biol.Chem.* **273**, 13570–13577
38. Okajima, T., Yoshida, K., Kondo, T., and Furukawa, K. (1999) *J. Biol.Chem.* **274**, 22915–22918
39. Almeida, R., Lavery, S.B., Mandel, U., Kresse, H., Schwientek, T., Bennett, E.P., Clausen, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26165–26171
40. Fukuda, M., Guan, J.L., and Rose, J.K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5314–5318
41. Wang, W.C., Lee, N., Aoki, D., Fukuda, M. N., and Fukuda, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23185–23190
42. Saitoh, O., Wang, W.C., Lotan, R., and Fukuda, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 5700–5711
43. Laferte, S., and Dennis, J.W. (1989) *Biochem. J.* **259**, 569–576
44. Do, K. Y., Smith, D. F., and Cummings, R.D. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 1123–1128
45. Fukuda, M. (1984) in *Molecular Glycobiology* (Fukuda, M., ed.) pp. 1–52, Oxford University Press, Oxford, U.K.
46. Florman, H. M., and Wassarman, P. M. (1985) *Cell* **41**, 313–324
47. Kitazume-Kawaguchi, S., Inoue, S., Inoue, Y., and Lennarz, W.J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3650–3655
48. Sako, D., Chang, X.-J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., Cumming, D. A., and Larsen, G.R. (1993) *Cell* **75**, 1179–1186
49. Lasky, L. A., Singer, M. S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W.J., Grimley, C., Fennie, C., Gillett, N., Watson, S.R., and Rosen, S.D. (1992) *Cell* **69**, 927–938
50. Baumhueter, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S.D., and Lasky, L.A. (1993) *Science* **262**, 436–438
51. Shimodaira, K., Nakayama, J., Nakayama, N., Hasebe, O., Katsuyama, T., and Fukuda, M. (1997) *Cancer Res.* **57**, 5201–5206
52. Piller, F., Le Deist, F., Weinberg, K., Parkman, R., and Fukuda, M. (1991) *J. Exp. Med.* **173**, 1501–1510
53. Higgins, E.A., Siminovitch, K.A., Zhuang, D., Brockhausen, I., and Dennis, J.W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6280–6290
54. Brockhausen, I., Kuhns, W., Schachter, H., Matta, K.L., Sutherland, D.R., and Baker, M.A. (1991) *Cancer Res.* **51**, 1257–1263
55. Saitoh, O., Piller, F., Fox, R.I., and Fukuda, M. (1991) *Blood* **77**, 1491–1499
56. Tsuboi, S., and Fukuda, M. (1997) *EMBO J.* **16**, 6364–6373
57. Tsuboi, S., and Fukuda, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 30680–30687
58. Ardman, B., Sikorski, M. A., Settles, M., and Staunton, D.E. (1990) *J. Exp. Med.* **172**, 1151–1158
59. Lefebvre, J.-C., Giordanengo, V., Limouse, M., Doglio, A., Cucchiariini, M., Monpoux, F., Mariani, R., and Peyron, J.-F. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 1609–1617
60. Komatsu, M., Carraway, C.A., Fregien, N.L., and Carraway, K. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 33245–33254
61. Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M., and Ardman, B. (1995) *Nature* **377**, 535–538
62. Yousefi, S., Higgins, E., Daoling, Z., Pollex-Kruger, A., Hindsgaul, O., and Dennis, J.W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1772–1782
63. Lee, N., Wang, W.-C., and Fukuda, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20476–20487
64. Fukuda, M., Dell, A., Oates, J.E., and Fukuda, M. N. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 8260–8273
65. Mizoguchi, A., Takasaki, S., Maeda, S., and Kobata, A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11949–11957
66. Fukuda, M.N., Dell, A., Oates, J.E., and Fukuda, M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 6623–6631
67. Merkle, R.K., and Cummings, R.D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16143–16149
68. Bierhuizen, M.F., Maemura, K., and Fukuda, M. (1994) *J. Biol.Chem.* **269**, 4473–4479
69. Fukuda, M.N. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 3900–3905
70. Maemura, K., and Fukuda, M. (1992) *Tetrahedron Asymmetry* **5**, 2093–2121
71. Schwientek, T., Yeh, J.-C., Lavery, S.B., Keck, B., Merx, G., van Kessel, A.G., Fukuda, M., and Clausen, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 11106–11113
72. Brockhausen, I., Williams, D., Matta, K.L., Orr, J., and Schachter, H. (1983) *Can. J.Biochem. Cell Biol.* **61**, 1322–1333
73. Capon, C., Wieruszkeski, J.M., Lemoine, J., Byrd, J.C., Leffler, H., and Kim, Y.S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31957–31968

Received on December 30, 2000, accepted on January 26, 2001

Profile of the Authors



Minoru Ujita graduated from Meijo University (in 1990), and obtained his Ph.D. in biochemistry at Nagoya University (in 1995).

He worked at Aichi Medical University (1995-1997), The Burnham Institute (1997-1999), National Institute for Basic Biology (1999-2000), and Meijo University (2000-2001) as a postdoctoral fellow. Currently he is an assistant professor of biochemistry at Meijo University.

(Main themes)

He found the carbohydrate-binding activity of the lectin domain of PG-M/versican, a large chondroitin sulfate proteoglycan and then determined the biosynthetic pathways of poly-*N*-acetyllactosamines in *N*- and *O*-glycans. He is now interested in the functions of host-defense lectins in insects.

(Hobbies)

His hobbies include aikido (Japanese martial arts), softball, listening to music, shogi (Japanese chess), and reading Japanese historical novels.

★★★★★★★★



Dr. Minoru Fukuda graduated from the University of Tokyo in 1968 and obtained his Ph.D. in Biochemistry from the University of Tokyo in 1973 (mentors; Drs. Egami and Osawa).

He worked as a Research Associate at the University of Tokyo (Dr. Osawa's laboratory) from 1973 to 1975, as a Postdoctoral Associate at the Yale University School of Medicine (Dr. Marchesi's laboratory) from 1975 to 1977, as an Associate at the Fred Hutchinson Cancer Research Center (Dr. Hakomori's laboratory) from 1977 to 1979, and as an Assistant Professor at the University of Washington from 1980 to 1981, before joining The Burnham Institute (previously known as the La Jolla Cancer Research Foundation). Currently, he is a Professor and Leader of the Program Project Grant at The Burnham Institute. He received the Karl Meyer Award from the Society for Glycobiology in 1997.

Dr. Fukuda's major research interest is to determine the structure/function of cell surface carbohydrates attached to glycoproteins under normal and pathological conditions.

His hobbies include tennis, softball, history, music, and talking about many subjects (Zatsudan).