

## Glucuronyltransferases Involved in the HNK-1 Carbohydrate Epitope Biosynthesis

### HNK-1糖鎖抗原の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素

Yamamoto, Shoji; and Oka, Shogo

Department of Biological Chemistry and CREST (Core Research for Educational Science and Technology) Project, Japan Science and Technology Corporation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan  
FAX: 81-75-753-4605, E-mail: shojiyam@pharmsun.pharm.kyoto-u.ac.jp

**Key Words** : glucuronic acid, glucuronyltransferase, glycosyltransferase, HNK-1 carbohydrate epitope, molecular cloning

#### Abstract

Over the past decade glucuronyltransferases (GlcATs) involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope have been identified and cloned successively. The structure of the HNK-1 carbohydrate epitope is characterized by terminal sulfated glucuronic acid, and GlcATs are thought to be the key enzyme in the biosynthesis pathway of this epitope. Following isolation of several GlcAT cDNAs, structural comparison of GlcATs has proposed a new glucuronyltransferase family characterized by four conserved modules in the catalytic region. In mammals GlcAT-P and GlcAT-S are involved in the biosynthesis of the HNK-1 epitope, and their expression were mainly localized in the neural tissues. These two enzymes however expressed in the different region of the neural tissues and exhibit different acceptor specificity. Cloned cDNAs of these GlcATs are able to induce expression of the HNK-1 epitope on the surface of HNK-1 negative cells. GlcATs are powerful tools for investigating the biological function of the HNK-1 carbohydrate epitope.

#### 要約

この十年の間に、HNK-1糖鎖抗原の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素(GlcAT)が相次いで見出され、またその遺伝子が単離された。HNK-1糖鎖抗原は構造的に末端の硫酸化グルクロン酸によって特徴づけられ、グルクロン酸転移酵素はこの糖鎖の生合成経路における律速酵素と考えられている。いくつかのグルクロン酸転移酵素cDNAが単離されたのに続き、それらグルクロン酸転移酵素の構造比較により、触媒領域における四つの保存されたモジュール構造によって特徴づけられる新しいグルクロン酸転移酵素群が提唱されることとなった。哺乳類においてはGlcAT-PとGlcAT-SがHNK-1糖鎖の生合成に関与しており、それらの発現は主に神経組織に局在していた。しかし、二つの酵素はそれぞれ神経組織中で異なった部位に発現し、さらに異なる受容体基質特異性を有していた。これらのGlcATのcDNAは通常HNK-1糖鎖を持たない細胞表面上に、HNK-1糖鎖抗原の発現を誘導することができる。グルクロン酸転移酵素はHNK-1糖鎖抗原の生理的機能を調べるに当たって強力なツールであると言える。

#### A. Introduction

The HNK-1 carbohydrate epitope recognized by a monoclonal antibody HNK-1 was originally reported as a specific antigen for human natural killer cells (1). The HNK-1 epitope is expressed on a series of neural cell adhesion molecules such as NCAM, P0, L1, MAG, telencephalin, and others (2–5), as well as on some glycolipids (6, 7) in the nervous system over a wide range of species from insects (8) to mammals. The expression of the HNK-1 epitope is spatially and temporally regulated in the nervous system (9, 10). This carbohydrate epitope is presumed to be involved in cell-to-cell and cell-substrate interactions such as cell adhesion, migration, and neurite extension (11–14). The structure of the HNK-1 epitope is demonstrated to be a sulfated trisaccharide  $\text{HSO}_3\text{-3GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}$ , which is shared with glycolipid and glycoprotein epitope (6, 7, 15). Since  $\text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}$  is commonly found on various glycoproteins and glycolipids, glucuronyltransferase or

#### A. はじめに

HNK-1糖鎖はモノクローナル抗体HNK-1によって認識される糖鎖抗原で、始めはヒトナチュラルキラー細胞に特異的な抗原として発見された(1)。その後HNK-1糖鎖抗原は幅広い生物種の神経系において、NCAM、P0、L1、MAGといった一連の神経細胞接着分子の糖タンパク質上(2–5)またある種の糖脂質上(6、7)に発現している事が示された。HNK-1糖鎖抗原の発現は神経系において、時期ないし部位特異的に厳密に制御されている(9、10)。また本糖鎖抗原は細胞接着、細胞の移動、神経突起の伸展などに関与していることが示唆されている(11–14)。本糖鎖抗原のエピトープは硫酸化四糖構造 $\text{HSO}_3\text{-3GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}$ であることが分かっており、この構造は糖タンパク質、糖脂質に共通である(6、7、15)。 $\text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}$ という構造は種々の糖タンパク質及び糖脂質において広汎に見られる構造であることからHNK-1糖鎖抗原の生合成の律速酵素はグルクロ



human GlcAT-P and it was mapped to q25 region of human chromosome 11 (23). The deduced amino acid sequences of GlcATs is highly conserved between GlcAT-P and GlcAT-S or among the species. Based on the strong homology found in the C-terminal catalytic domain between two enzymes, GlcAT-I, another glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the linkage region of proteoglycans, was cloned (24, 25). Including enzymes in *C. elegans* (26) and *S. mansoni* (27) that exhibit high homology to GlcAT-P, the idea of a novel GlcAT family has been proposed (Table I).

Transfection of GlcAT-P or GlcAT-S cDNAs into COS-1 cells could induce expression of the HNK-1 epitope on the cell surface. Surprisingly, marked morphological changes with long and branched processes were also induced (17, 20). These results indicated that GlcAT-P and GlcAT-S regulate expression of the HNK-1 epitope on cell adhesion molecules and modify their biological function.

This review summarizes our current understanding of the structures, the enzymatic properties, and the biological functions of GlcATs and the applications of the cloned GlcATs for investigation of the biological function of the HNK-1 epitope.

## B. Glucuronyltransferase Activities in Mammalian Brain

Glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 epitope is defined as the enzyme transfers glucuronic acid from uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDP-GlcA) to the terminal *N*-acetylglucosamine structure of glycoproteins and glycolipid. Since this enzyme requires high specificity to the *N*-acetylglucosamine structure (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) as an acceptor, it is distinguishable from another glucuronyltransferase involved in the glucuronide conjugation in the liver (18) and olfactory epithelium (19). In 1991 and in 1992, embryonic chicken and rat brain extracts were shown to contain the glucuronyltransferase activity involved in the biosynthesis of the HNK-1 epitope, which transfers glucuronic acid from UDP-GlcA to glycolipid acceptors (28-30). A glycolipid neolactotetraosylceramide (nLc-Cer) was used as an acceptor in the assay.

Thereafter our group established assay systems for measuring the glucuronyltransferase activity to glycoprotein acceptors as well as glycolipid acceptors, and also showed that the glucuronyltransferase activity in rat brain extract could be separated into two groups by UDP-GlcA-Sepharose CL-6B column chromatography (31). The effluent fraction mainly contained the enzyme activity to transfer glucuronic acid to glycolipid acceptors, whereas the activity recovered in the eluate fraction with 1M NaCl transferred glucuronic acid predominantly to glycoprotein acceptors. This result implied that two or more glucuronyltransferases exist in rat brain and exhibit different acceptor specificity. The glucuronyltransferase specific for glycoproteins recovered in the eluate fraction was termed GlcAT-

GlcAT-PのcDNAクローニングに成功し、本遺伝子がヒト染色体上の11q25領域に存在することを明らかにしている(23)。予想されたアミノ酸配列は、GlcAT-PとGlcAT-S、もしくは種間ホモログの間で非常に良く保存されていた。両酵素の相同性はC末側の活性領域においては更に高くなっており、このことを利用してプロテオグリカンの生合成に関する別のグルクロン酸転移酵素GlcAT-Iがクローニングされている(24, 25)。そして*C. elegans* (26)や*S. mansoni* (27)に存在する相同性が高い酵素なども含めて、新しいグルクロン酸転移酵素のファミリーの存在が考えられている(表I)。

GlcAT-PないしGlcAT-SのcDNAをCOS-1細胞に導入することでその細胞表面上にHNK-1糖鎖の発現を誘導することが出来る。このとき驚くべき事に複雑な突起を有した明らかな細胞形態の変化が観察された(17, 20)。これらの結果は、グルクロン酸転移酵素が接着分子上にHNK-1糖鎖抗原を発現することで、それら接着分子の生理的機能を調節するという可能性を示唆するものと思われる。

本総説では我々によって単離され、解析が行われているHNK-1糖鎖抗原の生合成に関するグルクロン酸転移酵素(GlcAT-P、GlcAT-S)の構造、酵素学的性質、生理的機能について、さらにHNK-1糖鎖の機能解析への応用などについて概説する。

## B. 哺乳類の脳におけるグルクロン酸転移酵素活性

HNK-1糖鎖の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素は、UDP-グルクロン酸から糖タンパク質および糖脂質における末端の*N*-アセチルラクトサミン構造にグルクロン酸を転移する酵素として定義できる。この酵素活性には受容体基質としてラクトサミン構造 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) に高い特異性が要求される。肝臓(18)や嗅上皮(19)に発現する別種のグルクロン酸転移酵素は低い受容体基質特異性しか示さないことから、それらと区別できる。1991年と1992年に、ニワトリとラットの胎児期の脳抽出物にHNK-1糖鎖抗原の生合成に関するグルクロン酸転移酵素が含まれていることが報告され、その活性はUDP-グルクロン酸を供与体として糖脂質性受容体基質にグルクロン酸を転移するものであった(28-30)。このとき活性測定に用いられた受容体基質はネオラクトテトラオシルセラミド(nLc-Cer)であった。

その後我々のグループにより糖タンパク質性基質に対するグルクロン酸転移活性の測定方法が確立され、さらにラット脳抽出物のグルクロン酸転移活性がUDP-グルクロン酸を固定化したカラムを用いたクロマトグラフィーにより2種類に分離されることが明らかとなった(31)。カラムの素通り画分は主に糖脂質に特異性を持ったグルクロン酸転移活性を示し、1M NaClによる溶出画分にはより糖タンパク質性基質に特異性を有する酵素活性を示した。この結果は、異なる受容体基質特異性を持つグルクロン酸転移酵素がラット脳内に複数存在する可能性を示すものと思われた。また、カラムクロマトグラフィーの溶出画分に含まれていた糖タンパク質性基質に高い特異性を示すグルクロン

P. Using asialoorosomucoid (ASOR) as an acceptor, the distribution of GlcAT-P activity in rat tissues was examined (31). The whole brain showed the highest activity followed by sciatic nerve fibers, whereas the thymus, spleen, lung, kidney, and liver showed only very weak or undetectable activity. GlcAT-P required  $Mn^{2+}$  for the enzymatic activity and the optimum pH of GlcAT-P activity was pH 6-6.5 (31).

The glucuronyltransferase activity toward glycolipids recovered in the effluent fraction was also characterized (30). Divalent cations were essential for the enzymatic activity and  $Mn^{2+}$  at 10mM gave the highest activity. This enzymatic activity exhibited dual pH optimum at pH 4.5 (MES or sodium acetate buffer) and at 6.0 (sodium cacodylate buffer). This enzyme was highly specific for neolactoglycolipid as an acceptor. This enzymatic activity was localized specifically in the brain, and barely detected in other tissues including sciatic nerve fibers. Phosphatidylinositol and phosphatidylserine stimulated the enzymatic reaction, while phosphatidylcholine affected the reaction negatively. The glucuronyltransferase activity toward glycolipids in cerebral cortex increased rapidly to a maximum at two weeks after birth, and decreased gradually thereafter. The activities in the cerebellum reached maximum just after birth and then disappeared rapidly (30).

### C. Purification and Characterization of Rat GlcAT-P

Recently Terayama *et al.* succeeded in purifying the GlcAT-P involved in the biosynthesis of the HNK-1 epitope from rat brain to an apparent homogeneity (16). The GlcAT-P was extracted with Nonidet P-40 from microsomal fraction of 2-week postnatal rat forebrain and purified by sequential chromatographies on CM-Sepharose CL-6B cation exchange chromatography, UDP-GlcA-Sepharose 4B, asialoorosomucoid-Sepharose 4B, Matrex gel Blue A, Mono Q, HiTrap chelating, and HiTrap heparin columns. By mean of these chromatographies, GlcAT-P was purified with 1,200,000-fold purification and 4.0 % overall recovery. The molecular weight of the purified GlcAT-P was estimated to be 45 kDa by SDS-PAGE under reducing conditions, but GlcAT-P was eluted as a 90-kDa protein on Superose gel filtration in the presence of NP-40, suggesting that this enzyme exists as homodimers under non-denatured conditions. GlcAT-P transferred glucuronic acid to various glycoprotein acceptors bearing terminal *N*-acetylglucosamine structure such as asialoorosomucoid, asialofetuin and asialo-NCAM. This enzyme exhibited high specificity for the terminal *N*-acetylglucosamine structure of the glycoprotein acceptors because the enzymatic activity was almost completely inhibited by *N*-acetylglucosamine (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) while lacto-*N*-biose (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) had no effect on the activity (16).

During purification of GlcAT-P from rat brain, we noticed that the enzyme had lost most of its catalytic activity. However, the addition of a lipid extract of rat brain to the assay

酸転移酵素はGlcAT-Pと名付けられた(31)。受容体基質にアシアロオロソムコイドASORを用いてGlcAT-Pのラットにおける臓器分布を検討したところ、全脳がもっとも高い活性を示し、それに次ぐ活性を示したのは座骨神経であったがであったが、その他の臓器、胸腺、脾臓、肺、腎臓、肝臓などはほとんど活性を示さなかった。またGlcAT-Pは活性に  $Mn^{2+}$  イオンを要求し、至適pHは6~6.5であることが分かっている(31)。

素通り画分に回収され糖脂質性基質により高い活性を示すグルクロン酸転移酵素についてもその解析が行われた(30)。活性にはやはり  $Mn^{2+}$  イオンが要求され、至適pHは活性測定に用いる緩衝液の組成により異なり、MESもしくは酢酸緩衝液で4、カコジル酸緩衝液で6と二重の至適pH条件が存在することが明らかとなった。最も高い活性を示したのはMES緩衝液pH4.5の条件においてであった。また受容体基質としてはネオラクト糖脂質に高い特異性を示し、酵素活性のラット内分布は脳に限局しており座骨神経を含む他の臓器にはほとんど見られなかった。またフォスファチジルイノシトールやフォスファチジルセリンの添加により酵素活性の上昇が見られ、フォスファチジルコリンでは逆に活性が弱まった。糖脂質に対するグルクロン酸転移活性は、ラット大脳皮質において生後直後より急速に上昇し生後2週で最高値に達した後、ゆるやかに減少する。また小脳では生後直後が最高値で以後消失していくことがわかっている(30)。

### C. ラットグルクロン酸転移酵素GlcAT-Pの単離精製

数年前、寺山らにより、HNK-1糖鎖抗原の生合成に関与するグルクロン酸転移酵素GlcAT-Pがラット脳から、単一にまで精製された(16)。生後2週齢のラット前脳のNP-40抽出物を酵素源として、精製は種々のカラムクロマトグラフィーを組み合わせで行われた。CM-セファロース陽イオン交換樹脂から始まり、UDP-グルクロン酸-セファロース、アシアロオロソムコイド-セファロース、Matrex gel Blue A、Mono Q、HiTrap chelating、HiTrap-ヘパリンカラムが順に用いられた。これら一連のクロマトグラフを経てGlcAT-Pは120万倍にまで精製され、回収率は4.0%であった。GlcAT-Pの分子量は還元条件下のSDS-PAGEで45 kDaと推定されたが、NP-40存在下Superoseゲルによるゲル濾過では90 kDaのタンパク質として溶出された。このことからGlcAT-Pは非変性条件下ではホモ二量体の状態で存在する事が示唆された。GlcAT-Pはアシアロオロソムコイド、アシアロフェチュイン、アシアロNCAMといった*N*-アセチルラクトサミン構造を末端に有する様々な糖タンパク質に対してグルクロン酸を転移した。また酵素活性が*N*-アセチルラクトサミン(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc)で完全に阻害される一方、ラクト*N*-ビオース(Gal $\beta$ 1-3GlcNAc)では全く影響がなかったことから、本酵素は末端*N*-アセチルラクトサミン構造に非常に高い特異性を有することが示された(16)。

我々はラット脳よりGlcAT-Pを精製する過程で、酵素の触媒活性がほとんど失われることに直面した。しかしながら、酵素活性は反応液中にラット脳の脂質抽出物を添加することで回復

mixture restored the activity completely (16). Further studies indicated that sphingomyelin (SM) is required for the expression of the enzymatic activity. As for the length of the acyl group, stearol-SM(18:0) was the most effective, followed by palmitoyl-SM (16:0) and lignoceroyl-SM (24:0). More interestingly, activity was demonstrated only for SM with saturated fatty acid, *i.e.* not for that with an unsaturated fatty acid, regardless of the length of the acyl group (16).

#### D. cDNA cloning of GlcAT-P

Based on the amino acid sequences determined by sequencing tryptic peptides of the purified GlcAT-P protein, the full length cDNA encoding rat GlcAT-P was cloned (17). The mature protein is composed of 347 amino acid residues of a predicted molecular mass of 39,706 Da with three potential *N*-glycosylation sites. This is consistent with the apparent molecular mass of purified enzyme estimated previously from SDS-PAGE of 45 kDa. Hydropathy analysis indicated that GlcAT-P is a typical type II transmembrane protein as well as many other glycosyltransferases (32). GlcAT-P has a short N-terminal region, which is a putative cytoplasmic tail, a hydrophobic transmembrane region and a large C-terminal catalytic domain. About 60 amino acid residues next to the transmembrane region were characterized by their high proline content (15%), as it seen in several other glycosyltransferases (33, 34). A database search revealed that GlcAT-P has high homology (overall amino acid identity of 35% and 38%, respectively) with putative proteins encoded in chromosome II of *C. elegans* (26) and that in *S. mansoni* (27). The computer alignment of these three sequences revealed that four highly conserved motifs, modules I-IV, were present in the large catalytic region. In particular modules IV of all three species contain a conserved cysteine residue that is thought to be essential for the activity (Fig. 2).

Northern blot analysis of GlcAT-P in adult rat tissues showed that GlcAT-P transcripts are detected as major 4.0 kb and minor 9.1 kb bands. The expression is localized specifically in the neural tissues such as the whole brain, cerebral cortex and cerebellum but not in other tissues such as the lung, liver, kidney, ileum, testis, lymphoid nodule, thymus, spleen, heart, and macrophages (17). *In situ* hybridization analysis of rat postnatal day 8 brain revealed that GlcAT-P mRNA expressed widely in rat brain and strongly in the cerebral cortex, olfactory bulb, hippocampus and pontic nuclei (unpublished result).

The enzymatic activity of the GlcAT-P cDNA product was confirmed by the transient expression of the gene fragment encoding from Asp-75 to Ileu-347 was expressed as a fusion protein with protein A in COS-1 cells. The glucuronyltransferase activity was detected in the culture medium using asialoolosomuroid as an acceptor. The fusion protein could be purified from the medium by IgG-Sepharose column. Exposing the purified enzyme to the SH-blocking agent, *N*-

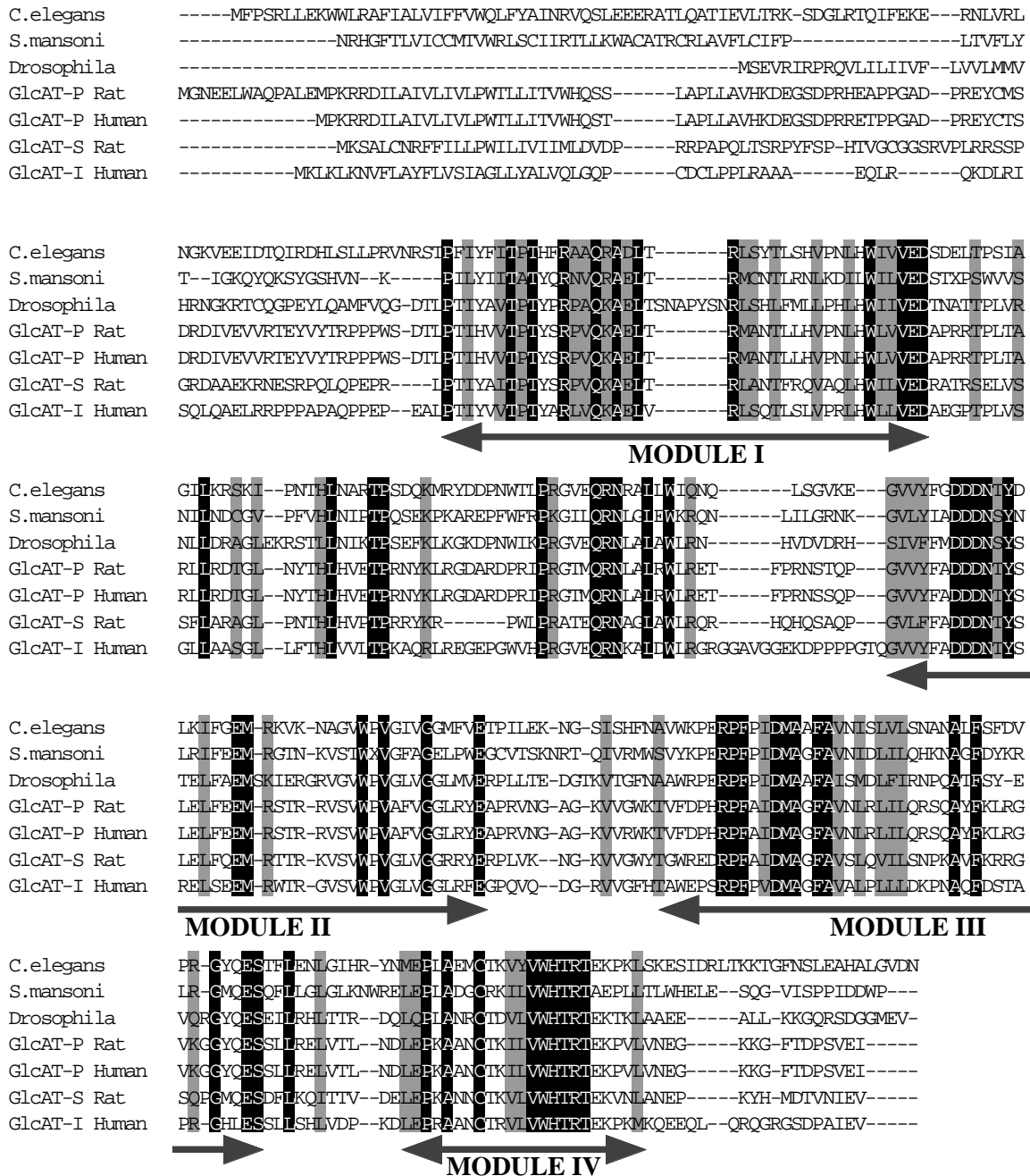
することが見出された(16)。その後の解析から酵素活性にはスフィンゴミエリン(SM)が必要であることが示された。また、このときアシル基の長さが影響し、ステアロールSM(18:0)が最も効果的で、パルミトイルSM(16:0)、リグノセロイルSM(24:0)がそれに次いだ。しかし更に興味深いことにその活性は飽和脂肪酸を有するSMによってのみ回復し、長さに関わらず不飽和脂肪酸を有する場合には効果がなかった(16)。

#### D. GlcAT-PのcDNAクローニング

精製したグルクロン酸転移酵素のトリプシン消化物のシーケンスからGlcAT-Pの部分アミノ酸配列を決定し、得られた情報をもとにラットGlcAT-Pの全長cDNAが単離された(17)。GlcAT-Pは347アミノ酸からなり、分子量は39,706 Daと予想され、三カ所のN結合型糖鎖の結合部位を有していた。これは先にSDS-PAGEで見積もられていた精製酵素の分子量45 kDaと良く対応した。ハイドロパシー解析により、GlcAT-Pは他の多くの糖転移酵素と同様に(32)典型的なII型膜タンパク質であることが示唆された。GlcAT-PはN末側には短い細胞質領域を持ち、疎水性の高い一回膜貫通領域をはさみ、C末側に大きな触媒領域を有している。膜貫通部位に続く約60アミノ酸の領域ではプロリンの含有度が高い(15%)ことが特徴的で、このプロリンに富む領域は他のいくつかの糖転移酵素で同様に見ついている(33, 34)。データベース検索の結果、GlcAT-Pに相同性の高いタンパク質が、*C. elegans* (26)の2番染色体上、さらに*S. mansoni* (27)で見つかった。これらのアミノ酸配列をGlcAT-Pのものと比較してみると、触媒領域中にさらによく保存された四つの領域(モジュールI~IV)が存在していた。特にジュールIVでは活性に必須と思われるシステイン残基が三種類のタンパク質全てにおいて保存されていた(図2)。

ノザンプロット解析により成体ラットにおいてGlcAT-P転写物は、より強い4.0 kbのバンドと弱い9.1 kbのバンドとして検出された。またその発現は、全脳、大脳皮質、小脳といった神経組織に特異的であり、肺、肝臓、腎臓、回腸、精巣といったその他の組織では検出されなかった(17)。また生後8日齢ラット脳に対する*in situ*ハイブリダイゼーションを行った結果、GlcAT-PのmRNAは脳内に広く分布し、なかでも大脳皮質、嗅球、海馬、橋核に特に強く発現していることが明らかとなった(unpublished result)。

続いて、75番目のアスパラギンから347番目のイソロイシンまでをProteinAとの融合タンパク質としてCOS-1細胞に発現させることでGlcAT-P cDNAの翻訳物の酵素活性を検討した。アシアロオロソムコイドを受容体基質に用いて、培養上清中のグルクロン酸転移酵素活性が確認され、また培養上清をIgGセファロースカラムにかけることで融合タンパク質の精製も可能となっ



**Fig. 2. Sequence alignment of GlcAT family.** The following sequences are compared: putative protein of *C.elegans*, *S.mansoni*, and *Drosophila melanogaster*, rat GlcAT-P, human GlcAT-P, rat GlcAT-S and human GlcAT-I. Black and meshed backgrounds indicate completely conserved amino acid and homologous substitution, respectively. Dashes indicate gaps introduced for maximal alignment. Locations of conserved modules I-IV are indicated by arrows.

ethylmaleimide, completely inhibited the enzymatic activity indicating that a free Cys-317 may be essential for the catalytic activity (17).

To investigate the enzymatic activity of cDNA in living cells, Lec2 cells are transfected the full length GlcAT-P. Lec2, a CHO mutant, cells have little activity to transport CMP-sialic acid into the Golgi apparatus and express glycoproteins bearing

た。精製した融合タンパク質の酵素活性は-SH基修飾試薬*N*-メチルマレイミドを処理すると完全に阻害され、317番目のシステインが触媒活性に必須であることが示された(17)。

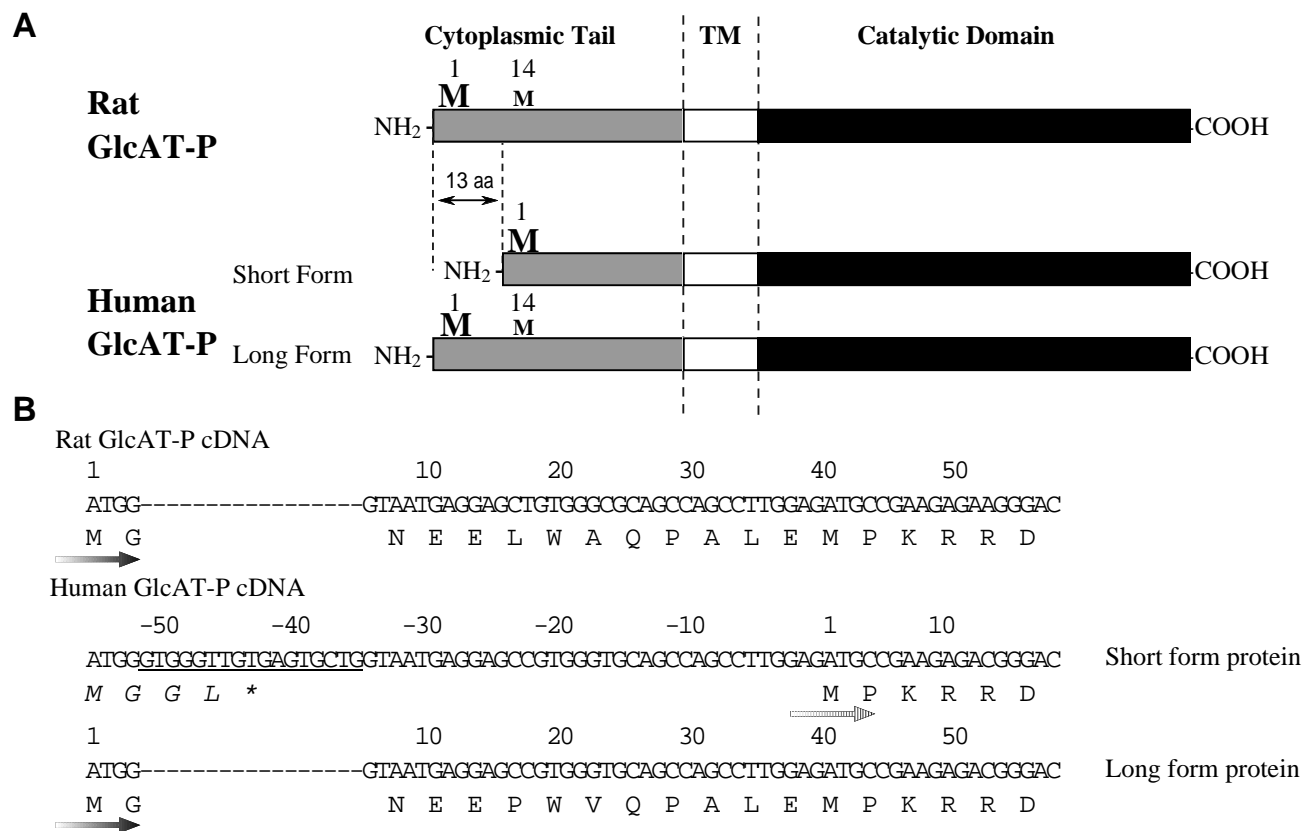
生細胞中での酵素活性を検討するため、CHO細胞の変異株であるLec-2細胞に全長GlcAT-Pを導入した。Lec-2細胞はCMP-シアル酸をゴルジ装置に輸送する機能を欠損しており、細胞表

*N*-acetylglucosamine residue without terminal sialic acid on the cell surface (35). The transfected cells were analyzed by flow cytometer after staining with HNK-1 (36) and M6749 (37) monoclonal antibodies. M6749 can react with terminal nonsulfated glucuronic acid as well as sulfated GlcA. Lec2 cells transfected with the GlcAT-P cDNA were stained with M6749, indicating that cloned cDNA encodes GlcAT-P, which is indeed active in the living cells. However, the transfected cells were not stained with HNK-1 antibody, indicating that Lec2 cells lack the sulfotransferase which transfers sulfate to the glucuronyl-*N*-acetylglucosamine residues (17).

In contrast to Lec2 cells, COS-1 cells transfected with GlcAT-P cDNA were stained not only with M6749 but also HNK-1. These results suggest that COS-1 cells express the sulfotransferase which is involved in the biosynthesis of the HNK-1 epitope. Surprisingly, COS-1 cells, with induced expression of the HNK-1 epitope by the transfection of GlcAT-P cDNA, exhibited a dramatic morphological change. The HNK-1 expressing cells had long and branched processes with a number of microspikes, such shapes are apparently unusual compared with mock-transfected COS-1 cells (17). A series of re-

面上にはシアル酸を持たない*N*-アセチルグルコサミンを末端に有した糖タンパク質が発現している(35)。GlcAT-P cDNAを導入した細胞はHNK-1抗体(36)もしくはM6749抗体(37)を用いてフローサイトメーターによる解析をおこなった。M6749は末端の硫酸化グルクロン酸だけでなく、硫酸化していないグルクロン酸に対しても反応する抗体である。GlcAT-P cDNAを導入した細胞はM6749で染色されたことから、確かに単離したcDNAがGlcAT-Pであり、さらに生細胞内でも活性を持つことが確認された。しかしながら、これらの細胞はHNK-1抗体では染色されず、Lec2細胞ではグルクロン酸が結合した*N*-アセチルグルコサミン構造に硫酸基を転移できる硫酸基転移酵素を欠いているものと考えられた(17)。

Lec2細胞とは対照的に、COS-1細胞にGlcAT-Pを導入するとM6749、HNK-1抗体のいずれによっても染色された。このことはCOS-1細胞はHNK-1糖鎖抗原の生合成に参与する硫酸基転移酵素を発現していることを示していた。驚くことに、GlcAT-P cDNAの導入によりHNK-1糖鎖の発現が誘導されたCOS-1細胞では同時に劇的な形態の変化が観察された。HNK-1発現細胞は長い分岐した突起をのばしていた。そのような形態はmock導入細胞と比較して明らかに異なるものであった(17)。これらの一連の



**Fig. 3. Structural and sequence comparison of rat and human GlcAT-P.** A, methionine (M) in the Cytoplasmic tail are indicated. Cytoplasmic, transmembrane (TM) and catalytic region are shown by hatched, open and closed boxes respectively. B, the nucleotide sequences of rat and human GlcAT-P cDNA. Insertion sequence (17 bp) is underlined. The transcription initiation sites are shown by arrows.

sults revealed that cloned cDNA is indeed GlcAT-P and involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope in living cells. Furthermore the HNK-1 epitope induced by GlcAT-P was supposed to have the ability to modulate the cell-substratum interaction and reorganize cytoskeletal proteins in cells.

Our group also cloned the human GlcAT-P by screening of human brain cDNA library (23). Comparison of deduced amino acid sequences between rat and human GlcAT-P revealed that only 6 amino acids are different from each other, therefore human GlcAT-P is 98.2% identical with rat GlcAT-P at the amino acid level. GlcAT-P is highly conserved between rodent and human, suggesting the biological importance of this enzyme.

However the N-terminal region as cytoplasmic tail of human GlcAT-P was found to be 13 amino acids shorter than that of rat GlcAT-P (23). Alignment of the nucleotide sequences around initiation sites of human and rat GlcAT-P cDNA indicates that an extra 17 nucleotides, which are not observed in rat GlcAT-P cDNA, are inserted in the upstream of the initiation codon of human GlcAT-P cDNA. Because of this insertion, a stop codon appears at 10 bp downstream of the translation initiation codon corresponding to that of rat GlcAT-P cDNA, thus human GlcAT-P is transcribed from the next initiation codon (Fig. 3). RT-PCR analysis of human cerebellum mRNA reveals that two forms of transcripts of GlcAT-P gene exist in human brain. The major one has the 17 bp insertion and its product is the enzyme with shorter cytoplasmic region. The minor one doesn't have such an insertion, and its product should be the longer enzyme in the cytoplasmic region as in rat GlcAT-P (23). The existence of two such isoforms that differ in the length of their cytoplasmic region by 13 amino acid is also well-known in  $\beta$ 1,4-GalTase (GalT-I) (38). As the two isoforms of GalT-I were proposed to exhibit different functions or distribution in cells, the two isoforms of GlcAT-P may also differ in biological function.

Northern blot analysis revealed that human GlcAT-P expressed specifically in the brain, but a weak expression is also detected in the liver (23). The biological significance of GlcAT-P expression in human liver is unclear. The HNK-1 carbohydrate epitope was originally reported as a specific antigen for human natural killer cells and called CD57 in immunology (1). As it has been reported that CD57<sup>+</sup> T cell subset is present mainly in the bone marrow and liver (39), human GlcAT-P in liver may be responsible for the biosynthesis of HNK-1 epitope on CD57<sup>+</sup> T cells.

Furthermore human GlcAT-P was found to be located on human chromosome 11 (region 11q25) by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis using human GlcAT-P cDNA as a probe (23).

結果から、単離したcDNAが確かにGlcAT-Pであり、実際の細胞においてHNK-1糖鎖の生合成に関与するものであることが明らかとなった。さらにGlcAT-Pによって細胞表面に発現したHNK-1糖鎖は、細胞と細胞外基質の相互作用や、細胞骨格タンパク質の再構成に関与する事が想定された。

また我々のグループによりさらにヒトGlcAT-Pもヒト脳由来cDNAライブラリーのスクリーニングから単離された(23)。ラットとヒトのGlcAT-Pについて予想されるアミノ酸配列を比較したところ、全体で6アミノ酸だけが異なり、ヒトGlcAT-PとラットGlcAT-Pはアミノ酸レベルで98.2%の相同性を有していた。このようにGlcAT-Pが齧歯類とヒトの間で非常に良く保存されていることは、本酵素の生物学的な重要性を示唆しているものと考えられる。

しかしながら、ヒトGlcAT-PはラットGlcAT-Pと比較してN末端の細胞質内領域が13アミノ酸だけ短くなっていることがわかった(23)。ヒト及びラットGlcAT-P cDNAの翻訳開始点付近の塩基配列を比較検討したところ、ラットでは見られないような17 bpの配列がヒトGlcAT-Pの開始コドンの上流に挿入されていることが明らかとなった。この挿入配列のためにヒトGlcAT-Pでは、ラットの翻訳開始点に相当する開始コドンの10 bp下流で終始コドンが生じる。よってヒトではそれに続く二番目の開始コドンから翻訳が行われることになる(図3)。ヒト小脳mRNAを用いたRT-PCRによる解析から、ヒトではGlcAT-P遺伝子の転写物が2種類存在することが分かった。より主要な転写物は17 bpの挿入配列を含んでおり翻訳される酵素は細胞質領域が短いものである。残りの転写物はこの挿入配列を含まず、ラットのGlcAT-Pと同じような、細胞質内領域が長い酵素が翻訳されるものと考えられる(23)。このような細胞質領域で13アミノ酸分の長さの違いを有する二種のアイソフォームの存在は、 $\beta$ 1,4-GalTase (GalT-I)でも良く知られている(38)。GalT-Iの二つのアイソフォームはそれぞれ異なった機能と細胞内分布を示すことが提唱されており、GlcAT-Pについても同じように二つのアイソフォームで酵素の機能が異なることもあるかも知れない。

ノザンプロット解析により、ヒトGlcAT-Pは脳に特異的に発現していることが確認されたが、さらに弱い発現が肝臓においても検出された(23)。GlcAT-Pがヒト肝臓で発現していることの意味は不明である。HNK-1糖鎖抗原はもともとヒトNK細胞のマーカーとして報告された抗原で免疫学的にはCD57とも呼ばれる(1)。CD57陽性T細胞は主に骨髄と肝臓に存在することが報告されているので(39)、肝臓で発現するGlcAT-PはCD57陽性T細胞上のHNK-1の生合成に関与しているのかもしれない。

さらにGlcAT-P cDNAをプローブとしたFISH法により、ヒトGlcAT-Pの染色体上の位置は11番染色体上11q25領域に決定された(23)。

### E. Cloning of HNK1-Sulfotransferase. Is GlcAT-P a Key Enzyme in the Biosynthesis of the HNK-1 Epitope?

Following cDNA cloning of rat GlcAT-P, two groups independently succeeded in cloning rat (40) and human (22) sulfotransferase (HNK1-ST) involved in the biosynthesis of the HNK-1 epitope. In both cases, the expression cloning strategy with Lec2 cells (or its derivative line, CHOP2) was used for the cloning of HNK1-ST cDNA. The brain cDNA library was cotransfected with GlcAT-P cDNA, then HNK-1 expressing cells were screened and HNK1-ST cDNA was isolated. Cloned HNK1-ST was shown to add a sulfate group to the terminal glucuronic acid on both glycoproteins and glycolipids (22, 40).

The characteristic structure of the HNK-1 carbohydrate epitope is the terminal sulfated glucuronic acid, as the inner structure, *N*-acetylglucosamine, is very common on the cell surface. HNK1-ST, as well as GlcAT, is also essential for the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope (Fig. 1). Which glycosyltransferase is the key enzyme in the biosynthesis of the HNK-1 epitope? Following the cloning of HNK1-ST, its expression in human tissues was investigated (22). HNK1-ST mRNA was strongly detected in various tissues including the brain, testis, ovary and spleen, while the expression of GlcAT-P mRNA was almost specific for the nervous system. This result suggests that the expression pattern of GlcAT-P corresponds more to that of the HNK-1 epitope almost specific in the neural tissues. The expression patterns of GlcAT-P, HNK1-ST and HNK-1 epitope were investigated in rat embryo (41) and postnatal brain (unpublished result). *In situ* hybridization analysis and immunostaining at the limb bud level of the rat embryo revealed that the GlcAT-P expression was localized in the HNK-1 positive cells but HNK1-ST was ubiquitously observed and not corresponding to the HNK-1 epitope (41). In postnatal day 8 brain, strong expression of GlcAT-P was also detected in the same specific regions corresponding to the expression pattern of the HNK-1 epitope, though HNK1-ST was ubiquitously expressed throughout the brain. These lines of evidence suggested that the expression of HNK-1 carbohydrate is regulated by the GlcAT-P expression, and that GlcATs including GlcAT-P, rather than HNK1-ST, are the key enzyme in the biosynthesis of HNK-1 epitope.

### F. Structure-Function Relationship of GlcAT-P

As described above, GlcAT-P contains four conserved regions in the catalytic domain, named modules I-IV, which are presumed to be required for the enzymatic activity (17). To understand the biological significance of these modules, our group investigated the structure-function relationship of GlcAT-P by the combination of site-directed mutagenesis and computer 3D-modeling (42).

A series of substitution mutants of the GST-GlcAT-P fusion protein was prepared. For each mutation, an amino acid

E. 硫酸基転移酵素HNK1-sulfotransferaseのクローニング。GlcAT-PはHNK-1糖鎖抗原合成の律速酵素なのか

ラットGlcAT-PのcDNAクローニングに続いて、二つのグループよりそれぞれラット(40)及びヒト(22)のHNK-1糖鎖抗原の生成に関わる硫酸基転移酵素(HNK1-ST)のcDNAクローニングが報告された。どちらの場合も、クローニングに際してLec2細胞もしくはその類縁株CHOP2細胞を用いた発現クローニングの方法が採用された。脳由来cDNAライブラリーをGlcAT-PのcDNAと共に導入することによりHNK-1糖鎖抗原を発現した細胞のみを選択して、そこからHNK1-STのcDNAが単離された。得られたHNK1-STは、糖タンパク質もしくは糖脂質両方に対してその末端グルクロン酸に硫酸基を付加することが示された(22、40)。

HNK-1糖鎖抗原の構造的特徴は末端の硫酸化グルクロン酸であり、それ以前の構造である*N*-アセチルラクタミンは細胞上でごくありふれた構造である。そしてHNK1-STもまたグルクロン酸転移酵素同様、HNK-1糖鎖の生成に必要である(図1)。では実際にはどちらの糖転移酵素がHNK-1合成の律速酵素なのであろうか。クローニングに続いてHNK1-STのヒト各臓器での発現が調べられた(22)。GlcAT-Pがほぼ脳特異的に発現するのに対し、HNK1-STは脳や精巣、卵巣、脾臓を含む様々な臓器で強い発現が見られた。この結果はGlcAT-Pの発現様式の方が神経系にほぼ特異的なHNK-1糖鎖抗原の発現とよりよく対応することを示している。さらに、GlcAT-P及びHNK1-STとHNK-1糖鎖の発現分布が胎児期(41)及び生後のラット脳を用いて調べられた。肢芽領域の切片に対する*in situ*ハイブリダイゼーションおよびHNK-1抗体による免疫染色から、GlcAT-Pの発現はHNK-1陽性の細胞に局在し、HNK1-STはHNK-1糖鎖の分布に関係なく広汎に発現することが明らかとなった(41)。同様に生後8日齢のラット脳においても、GlcAT-PはHNK-1糖鎖の発現部位に対応した特異的な領域に強い発現が見られたが、HNK1-STはやはり脳全体に広汎に発現していた(unpublished result)。これらの結果からHNK-1糖鎖の発現はグルクロン酸転移酵素の発現により調節されていることが考えられ、さらに言えばGlcAT-Pを含むグルクロン酸転移酵素がHNK-1合成の律速酵素であるということも出来るであろう。

### F. GlcAT-Pの構造と酵素活性の相関関係

先述したようにGlcAT-Pは触媒領域にモジュールIからIVと名付けられた四つの保存された領域があり酵素活性に必要な領域であると想定されていた(17)。これらのモジュールの生物学的意義を明らかにするために、我々は点変異作成とコンピューターによる3次元モデルを用いてGlcAT-Pの構造活性相関を検討した(42)。

まずGST-GlcAT-P融合タンパク質について一連の置換変異体を調製した。それぞれの変異体では極性側鎖を有するアミノ

with a polar side chain of GlcAT-P was substituted with alanine. Twenty-seven substitutions were tested, and the activities of the mutants were compared to that of the wild-type GlcAT-P fusion protein. Most of the substitutions within four modules dramatically reduced the transferase activity to less than 5%, and all of the essential amino acids for the activity were conserved across species from nematoda to vertebrates. On the other hand, the substitutions in non-conserved regions between modules had no significant effect on the activity. These results indicated that the amino acid residues required for the catalytic activity were widely distributed in these four modules in C-terminal catalytic domain. These four modules must equally contribute to the minimum activity of GlcAT-P (42). Furthermore, these substitution mutants were subjected to the acceptor substrate binding assay using ASOR. The results were consistent with those of the transferase activity test, suggesting that most of the polar amino acids within the four modules contribute to either the interaction with ASOR or the proper folding of the catalytic domain (42).

In order to provide clues as to how the modules are positioned and function, a 3D model of GlcAT-P was constructed by computer simulation with the 3D structure of adenylate kinase (1AKE) as a template (43). This model predicted that the catalytic domain of GlcAT-P forms a globular shape with a Rossmann-fold motif consisting of five  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet repeats. The putative catalytic pocket consists mainly of modules I–III and is surrounded by a cluster of polar amino acids essential for the transferase activities and also for the binding to the acceptor substrate. In the catalytic pocket of this model, UDP-GlcA is held via the interaction with Ser228 and Arg222, and the *N*-acetylglucosamine is held *via* Phe258 by the  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction. The catalytic center is assumed to be Asp267. These four amino acids are sure to be essential residues in the activity assay. The second cluster of essential amino acids is present on the surface of GlcAT-P molecule that is opposite to the catalytic pocket. This cluster contains an aspartic acid repeat (DDD) which is considered to be involved in the common functional features of many glycosyltransferases (44), such as in the binding to a divalent cation. Thus the second cluster may be associated to interact with essential modulation molecules such as  $Mn^{2+}$  and membrane phospholipids (42).

More recently, Pedersen *et al.* reported the crystal structure of GlcAT-I in the presence of donor substrate product UDP,  $Mn^{2+}$  and the acceptor substrate analog Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl (45). GlcAT-I is also  $\beta$ 1,3-glucuronyltransferase, exhibits high homology to rat GlcAT-P (Table I) and is involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan (GAG)-protein linkage region (24, 46, 47). In their report, GlcAT-I contains a seven-stranded mixed  $\beta$ -sheet, which can be divided into two subdomains and the active site exists in a cleft extending across both subdomains. Residue Glu281 is thought to be the catalytic center and deprotonating the acceptor substrate. The conserved DDD mo-

酸が一つずつアラニン置換された。27種類の変異体を用意し、野生型のGlcAT-P融合タンパク質の酵素活性と比較した結果、4つのモジュール中の1アミノ酸置換ではそのほとんどが5%以下にまで酵素活性が減弱した。また、それらは全て線虫から脊椎動物まで保存されたアミノ酸であった。一方、モジュール間に存在する非保存領域での置換は活性にほとんど影響しなかった。これらの結果から、活性に必要なアミノ酸はC末側触媒領域中のこれらの四つのモジュール内に広く分布していることが示された(42)。さらに、これらの置換変異体について受容体基質アシアロオロソムコイドに対する結合活性が検討された。結果は先のグルクロン酸転移活性測定に完全に対応するものであったため、このことから、モジュール中の極性アミノ酸はそのほとんどが、受容体基質との相互作用と酵素触媒領域の適切な折り畳みの両方に関与することが示唆された(42)。

これらのモジュールが酵素分子中でどのように配置し機能しているかについてのヒントを得る目的で、アデニル酸キナーゼ(1AKE)の三次元構造(43)を元に、GlcAT-Pの三次元モデルがコンピューターによるシミュレーションから作成された。このモデルから、GlcAT-Pの触媒ドメインは $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ シートの五回繰り返し構造からなるRossmann-foldモチーフに則った球体構造を形成することが予想された。また、想定された触媒領域のポケット構造は、主にモジュールIからIIIによって形成され、そのポケット部は転移活性や受容体基質との結合に必須であった極性アミノ酸の集合体で囲まれていた。このモデルにおける触媒ポケットではUDP-グルクロン酸は主に228番目のセリン、222番目のアルギニンとの相互作用を介して結合し、*N*-アセチルラクトサミンは主に258番目のフェニルアラニンとの相互作用で結合していると想定された。また触媒活性の中心は267番目のアスパラギン酸によって担われていると予測された。これら四つのアミノ酸は確かに活性測定で必須とされたアミノ酸である。また活性に必須なアミノ酸の集合部位がもう一つ、酵素上でポケット構造の反対側にあたる面に存在している。そこには多くの糖転移酵素で二価カチオンとの結合などに関与すると想定されている(44)アスパラギン酸リピート(DDD)配列が含まれており、この領域はマンガンや膜リン脂質といった酵素活性に必須な分子と相互作用するのかもしれない(42)。

また更にごく最近、Pedersenらは供与体基質UDP、マンガンイオン、受容体基質のアナログGal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xylの存在下におけるGlcAT-Iの結晶構造解析を行った(45)。GlcAT-IはGlcAT-Pと高い相同性を示す $\beta$ 1,3-グルクロン酸転移酵素であり、グリコサミノグリカン(GAG)タンパク質結合領域の生合成に関与する(24, 46, 47)。彼らの報告では、GlcAT-Iは7つの $\alpha$ 鎖を含んだ $\beta$ シート構造をとると考えられた。さらにその構造は2つのサブドメインに分けることができ、それらの間に活性領域があるとされている。また281番目のグルタミン酸残基が受容体基質の脱プロトンを行う活性中心と考えられ、保存されたDDD配列は

tif is suggested to have direct interaction with the ribose of the UDP molecules as well as with  $Mn^{2+}$  (45).

### G. The Cloning of the Second Glucuronyltransferase, GlcAT-S

In 1999, our group and others (Shimoda *et al.*) independently succeeded in cloning a second glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope and termed GlcAT-S and GlcAT-D, respectively (20, 21). However, the cDNA clones isolated by the two groups were completely identical. We isolated rat GlcAT-S cDNA by screening of rat embryonic cDNA library using the cDNA corresponding to the catalytic domain of rat GlcAT-P as a probe (20). Rat GlcAT-S is composed of 324 amino acids including two potential *N*-glycosylation sites. The expected molecular weight of this protein is 37,219 Da. Hydropathy analysis revealed a single potential transmembrane region consisting of 17 amino acids, and GlcAT-S also appeared to be a typical type II transmembrane protein as well as many other glycosyltransferases (32). The domain next to the transmembrane region was characterized by its high proline content as seen in several glycosyltransferases including GlcAT-P (17, 33, 34). Amino acid sequence comparison of GlcAT-S and GlcAT-P revealed that the overall identity is 49% and the C-terminal catalytic domain exhibits the highest identity of 58.6%. Moreover the amino acid sequences of four modules in the catalytic domain are highly conserved, suggesting cloned cDNA encodes a novel glucuronyltransferase (20).

The expression of GlcAT-S mRNA in the adult rat tissue was examined by northern blot analysis. Two transcripts 2.3 kb and 1.1 kb were detected in the cerebral cortex, cerebellum, and whole brain, in which the HNK-1 epitope was specifically expressed. No transcripts were detected in other tissues such as the lung, liver, kidney, ileum, testis, lymphoid nodule, thymus, spleen, heart, and macrophages (20). The transfection of the full length GlcAT-S cDNA into Lec2 cells (see above) induced expression of the carbohydrates with the terminal glucuronic acid, which was recognized by M6749 antibody, on the cell surface. GlcAT-S cDNA was also transfected into COS-1 cells. Transfected COS-1 cells were intensely stained by HNK-1 antibody and exhibited morphological changes as reported for the transfection of GlcAT-P cDNA (17). These results suggest that GlcAT-S cDNA produces active glucuronyltransferase in living cells and that GlcAT-S is a second glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope (20). Membrane fractions prepared from COS-1 cells transfected either GlcAT-P cDNA or GlcAT-S cDNA were subjected to western blot analysis using the HNK-1 antibody. Both showed similar profiles of several bands ranging from 70 kDa to over 200 kDa, indicating that the acceptor specificity of GlcAT-S toward glycoproteins is similar to that of GlcAT-P (20).

Shimoda *et al.* also isolated cDNA encoding GlcAT-S,

UDP分子内のリボース及びマンガンと直接相互作用するものと考えられた(45)。

### G. 第二のグルクロン酸転移酵素GlcAT-Sのクローニング

1999年に我々ともう一つのグループ (Shimoda *et al.*) が独立して、HNK-1糖鎖抗原の生合成に関わる第二のグルクロン酸転移酵素のクローニングに成功し、それぞれGlcAT-S、GlcAT-Dと名付けた(20, 21)。が、両グループによって単離されたcDNAは同一のものであった。我々はラットGlcAT-Pの触媒領域をプローブとして用い、ラット胎児のcDNAライブラリーをスクリーニングする事でGlcAT-S cDNAを単離した(20)。ラットGlcAT-Sは324アミノ酸からなり、ニカ所の*N*-結合型糖鎖の結合部位を含んでいた。この酵素の分子量は32,219 Daと予想される。ハイドロパシー解析により17アミノ酸からなる膜貫通領域が存在することが明らかとなりGlcAT-Sもまた、他の多くの糖転移酵素と同様にII型膜タンパク質であると考えられた。膜貫通領域にはGlcAT-Pを含むいくつかの糖転移酵素で見受けられるプロリンに富む領域が特徴的なドメインとして存在していた(17, 33, 34)。GlcAT-SとGlcAT-Pのアミノ酸配列を比較したところ、全体の相同性は49%でありC末側の触媒領域に限ればその相同性は58.6%とさらに高い値を示した。さらにその触媒領域中の四つのモジュールにおけるアミノ酸配列は非常に良く保存されており、単離されたcDNAが新規なグルクロン酸転移酵素をコードしていると考えられた(20)。

GlcAT-S mRNAの成体ラット各臓器における発現は、ノザンプロットにより検討された。2.3 kbと1.1 kbの長さの異なる二つの転写物は、脳皮質、小脳、全脳といったHNK-1糖鎖抗原が特異的に発現している臓器において検出された。しかし、肺、肝臓、心臓といった調べられた他の臓器からは全く検出されなかった(20)。Lec2細胞(上記を参照)にこのGlcAT-Sの全長cDNAを導入すると、細胞表面上に末端にグルクロン酸をもつような糖鎖が発現し、M6749抗体で染色されるようになった。さらにCOS-1細胞にGlcAT-Sの全長cDNAを導入したところ、トランスフェクトされた細胞はHNK-1抗体により強く染色されるようになり、先にGlcAT-Pを導入した場合で報告されたのと同様の形態変化を生じた。これらの結果は、GlcAT-S cDNAが生きている細胞中で確かに活性をもったグルクロン酸転移酵素を産生できることを示しており、GlcAT-SはHNK-1糖鎖抗原の生合成に関与する第二のグルクロン酸転移酵素であることを確認するものであった(20)。続いてGlcAT-PとGlcAT-Sの各cDNAを導入したCOS-1細胞から膜画分を調製し、HNK-1抗体によるウエスタンプロットを行った。どちらのcDNAを導入した細胞でもバンドの出方は似通っており、70 kDaから200 kDa以上にわたるいくつかのバンドが観察された。この結果はGlcAT-Sの糖タンパク質性基質に対する基質特異性はGlcAT-Pと大きな差がないことを示しているものと考えられた(20)。

ShimodaらはラットGlcAT-Pの触媒領域中の保存されたモ

they termed GlcAT-D, by PCR strategy using degenerate primers to conserved modules in the catalytic domain of GlcAT-P (21). In their study, the full length of GlcAT-S (D) cDNA was transfected into COS-7 cells and cell homogenate was prepared, then its glucuronyltransferase activities toward glycoprotein and glycolipid were measured using asialo orosomucoid and lacto-*N*-neotetraosylceramide as acceptors. As a result, significant enzymatic activity toward glycolipid was detected in addition to the activity toward glycoprotein (21), suggesting that GlcAT-S (D) is a glucuronyltransferase with dual specificity for both glycolipid and glycoprotein acceptors.

Shimoda *et al.* and our group performed *in situ* hybridization and immunohistochemistry of the rat embryonic (21) and postnatal (unpublished result) brain. Both results revealed that the regions expressed GlcAT-S (D) and/or GlcAT-P were always stained with HNK-1 antibody, suggesting that both GlcATs are involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope *in vivo*. The expression patterns of two enzymes were different from each other. The expression of GlcAT-P was detected more abundantly and more widely, suggesting that GlcAT-P is a major GlcAT involved in the biosynthesis of the HNK-1 epitope.

In rat embryo GlcAT-S was expressed in the pallidum subventricular zone and retina where GlcAT-P was not expressed (21). In rat postnatal day 8 brain, GlcAT-S mRNA was localized in the cerebellum, olfactory bulb, hippocampus and thalamus. In the cerebellum, GlcAT-S mRNA was expressed in the internal and external granule layers, on the other hand, the expression of GlcAT-P was mainly localized in the purkinje cell layer, though the HNK-1 epitope was expressed overall in the cerebellum. These results suggested that GlcAT-P and GlcAT-S synthesized the HNK-1 epitope complementarily in specific regions of rat brain.

## H. Glucuronyltransferase Family

Several GlcATs have so far been cloned or identified on the basis of the homology to rat GlcAT-P. They contained four conserved motifs (module I-IV) in the catalytic domain (Fig. 2). In the case of sialyltransferases, the sialyltransferase family is postulated and the members are characterized with the sialyl motif (48). According to this idea, we may postulate the glucuronyltransferase (GlcAT) family characterized with conserved modules in the catalytic region. GlcAT-P, GlcAT-S, and related enzymes found in *D. melanogaster* (pointed out in Ref. 21), *C. elegans* and *S. mansoni* have been proposed members of GlcAT family (Table I). Furthermore, two genes (accession number AE003625 and AE003545) that exhibit high homology to rat GlcAT-P are found in the database of the drosophila genome at present.

Recently the cDNA of human GlcAT-I was cloned by PCR method using degenerated primers based on the sequence of GlcAT-P (24). GlcAT-I had been partially purified from em-

ジュール内に設計した縮重プライマーを用いてPCR法により GlcAT-D、我々が呼ぶところのGlcAT-Sを単離した(21)。彼らの研究ではGlcAT-Sの全長cDNAをCOS-7細胞に導入した後、細胞溶解物を調製し、その糖タンパク質性および糖脂質性基質に対するグルクロン酸転移活性を受容体基質にアシアロオロソムコイドおよびラクト-*N*-ネオテトラオシルセラミドをそれぞれ用いて測定した。その結果、糖タンパク質性基質に対する酵素活性に加え、有意な活性が糖脂質を受容体基質とした場合でも測定された(21)。このことはGlcAT-Sが糖タンパク質および糖脂質の両方を受容体基質とするようなグルクロン酸転移酵素であることを示唆している。

Shimodaらと我々のグループはそれぞれ胎児ラット(21)及び生後ラット脳についての*in situ*ハイブリダイゼーションと免疫染色を行い、どちらの結果からもGlcAT-S (D)とGlcAT-Pの一方もしくは両方が発現する領域はHNK-1抗体により染色されることが分かっており、これらのGlcATが*in vivo*においてHNK-1糖鎖抗原の生合成に関与していることが示唆された。GlcAT-Pの発現はより強く、広い範囲に及んでいたことから、HNK-1糖鎖の生合成に関わる主要なGlcATはGlcAT-Pであると考えられた。

ラット胎児ではGlcAT-Sは淡蒼球、網膜といったGlcAT-Pの発現が見られない領域で特異的に発現していることが分かった(21)。また生後8日齢のラット脳では小脳、嗅球、海馬、視床においてGlcAT-S mRNAの強い発現が観察された。小脳ではGlcAT-Sは内顆粒層、外顆粒層に発現していたが、一方GlcAT-Pの発現は主としてプルキンエ細胞層に局在していた (unpublished result)。またHNK-1糖鎖抗原は小脳全体で発現が見られた。これらの結果はGlcAT-PとGlcAT-Sがラット脳内の特異的な領域で相補的にHNK-1糖鎖の生合成に関与することを示唆している。

## H. グルクロン酸転移酵素ファミリー

これまでいくつかのグルクロン酸転移酵素がラット GlcAT-Pに対するホモロジーをもとに単離、確認されている。それらは共通してその触媒領域に四つの保存領域モジュールIからIVを有している(図2)。シアル酸転移酵素の場合、シアル酸転移酵素ファミリーが想定され、それに属する酵素はシアルリモチーフによって特徴づけられている(48)。このアイデアに従うと、触媒領域の保存された四つのモジュールによって特徴づけられるグルクロン酸転移酵素群GlcATファミリーの存在が想定できるであろう。GlcAT-P、GlcAT-Sに加え*D. melanogaster*、*C. elegans*、*S. mansoni*においても相同性の高い酵素が見出されており、これらは全てGlcATファミリーに属する分子と考えられる(表I)。現在ではこれら以外にも、GlcAT-Pと高い相同性を示すような2つの遺伝子(accession number AE003625、AE003545)がショウジョウバエのゲノムデータベースに登録されている。

最近になり、GlcAT-Pの配列を元にした縮重プライマーによるPCRからヒトGlcAT-IのcDNAが単離された(24)。それまでにGlcAT-Iは鳥類の胎児脳から部分精製されており、プロテオグリ

bryonic chick brain and characterized as a glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan (GAG)-protein linkage region, GlcA $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl of proteoglycans (46, 47). The enzymatic properties of cloned GlcAT-I were investigated by two groups (24, 25). They revealed that GlcAT-I transfers the glucuronic acid specifically to the trisaccharides Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl, which is the characteristic structure contained in GAG-protein linkage region. GlcAT-I, however, has no or only little activity to Gal $\beta$ 1-4GlcNAc which is a good acceptor for GlcAT-P (24, 25). Though GlcAT-I exhibited the distinct acceptor specificity from GlcAT-P, deduced amino acid sequence of human GlcAT-I exhibited 56% identity to rat GlcAT-P, and the highest sequence identity and four conserved modules were found in the C-terminal catalytic region (Table I, Fig. 2). Considering that GlcAT-I is indeed the  $\beta$ 1,3-glucuronyltransferase including conserved modules as well as GlcAT-P and GlcAT-S, GlcAT-I should be regarded as a member of GlcAT family pronounced here. To compare the sequences of modules I-IV in these enzymes may provide information about the structures that determine their acceptor specificities.

Furthermore, neither GlcAT-P nor GlcAT-S was detected in some regions expressing HNK-1 epitope (41), suggesting that the possibility of the presence of another GlcAT involved in the synthesis of the HNK-1 epitope exists in the vertebrate brain. It may be possible to clone such a new member of the GlcAT family in the future on the basis of the homology to known GlcATs.

## I. Biological Function of GlcATs

As described above, GlcAT-P and GlcAT-S are the key enzymes for the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope, transfection of these GlcATs into COS-1 cells results in inducing the expression of the HNK-1 epitope on the cell surface (17, 20). In this aspect, GlcATs are regarded as glycosyltransferases that enable the remodeling of carbohydrates on the cell surface. Therefore GlcATs must be powerful tools in the investigation of the biological roles of the HNK-1 epitope. For example, COS-1 cells transfected of GlcAT-P or GlcAT-S exhibited dramatic changes in their morphology (17, 20). These results suggested that the HNK-1 epitope is involved in the cell-substratum interaction and reorganization of cytoskeletal proteins.

Recently, several genes that caused abnormality of the vulval invagination in *C. elegans* were analyzed, and one of them, *sqv-8*, was found to be a  $\beta$ 1,3-glucuronyltransferase bearing significant similarity to rat GlcAT-P (49). Previously this gene had been pointed out as GlcAT by Terayama *et al* (17). Two other genes, *sqv-3* and *sqv-7*, were similar to vertebrate  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase and nucleotide sugar transporter, respectively (49). These genes are thought to be components of a glycosylation pathway conserved from nematode to vertebrates. Recent study have demonstrated that human homologue of *sqv-3* gene is galactosyltransferase I involved in the biosynthesis of

カンにおけるグリコサミノグリカン(GAG)とタンパク質部分との結合領域の生合成に関与するグルクロン酸転移酵素であると考えられていた(46, 47)。単離されたGlcAT-Iの酵素学的性質は二つのグループによって調べられ、GlcAT-IはGAG-タンパク質結合領域に含まれる特徴的な三糖構造であるGal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xylに特異的にグルクロン酸を転移することが示された(24, 25)。しかしGlcAT-IはGlcAT-Pにとってのよい基質であるGal $\beta$ 1-4GlcNAcに対しては活性がないか、あってもわずかであった(24, 25)。GlcAT-IはGlcAT-Pとは異なる基質特異性を示すものの、ヒトGlcAT-Iのアミノ酸配列はラットGlcAT-Pと43%の相同性を示し、さらに高い相同性と四つの保存されたモジュールがC末側の触媒領域に見出された(表I、図2)。GlcAT-IがGlcAT-PやGlcAT-S同様、確かに保存モジュールを持つ $\beta$ 1,3-グルクロン酸転移酵素であることを考慮すると、GlcAT-Iはここで提唱するGlcATファミリーのメンバーに加えておくべきだろう。これらの酵素の四つのモジュールにおけるアミノ酸配列を比較すれば、それぞれの基質特異性を決定する構造に関する情報が得られるかもしれない。

さらに、神経組織の領域にはHNK-1糖鎖抗原は発現するがGlcAT-PやGlcAT-Sを共に発現していない領域があることが見出されており(41)、このことはHNK-1糖鎖抗原の生合成に関わるもう一つのグルクロン酸転移酵素が脊椎動物の脳内に存在する可能性を示唆している。将来的にはGlcATファミリーに属する新しいグルクロン酸転移酵素が、これまでに単離されたグルクロン酸転移酵素との相同性に基づき単離出来るかもしれない。

### I. グルクロン酸転移酵素の生理学的意義

先述したように、GlcAT-PおよびGlcAT-SはHNK-1糖鎖抗原の生合成における律速酵素なので、COS-1細胞にそれらを導入することで、細胞表面へのHNK-1糖鎖の発現が誘導される(17, 20)。この点で言えば、GlcATは細胞表面上糖鎖のリモデリングを可能にする糖転移酵素とみなせるであろうし、GlcATはHNK-1糖鎖の生理学的な役割を調べる上で、有力な道具にちがいない。例えば、GlcAT-PやGlcAT-Sを導入したCOS-1細胞はその形態に劇的な変化が見られたが(17, 20)、これらの結果によりHNK-1糖鎖抗原が細胞と基質間の相互作用や細胞骨格タンパク質の再配置に関与することが示唆された。

近年、線虫における産卵孔の陥入に異常を生じる原因遺伝子がいくつか調べられ、そのうちの一つ*sqv-8*がラットGlcAT-Pと明らかな相同性を有した $\beta$ 1,3-グルクロン酸転移酵素であることが分かった(49)。この遺伝子はそれ以前にTerayamaらによってグルクロン酸転移酵素と指摘されていたものであった(17)。またそれ以外の二つの遺伝子*sqv-3*と*sqv-7*はそれぞれ $\beta$ 1,4-ガラクトース転移酵素、糖ヌクレオチドトランスポーターの相同体と考えられた。これらの遺伝子は線虫から脊椎動物まで保存されたある糖鎖合成経路の構成酵素であると考えられた(49)。ごく最近の研究からSQV-3のヒトにおけるホモログはプロテオグリカンのGAG-タンパク質結合領域の生合成に関与する

the GAG-protein linkage region of proteoglycans (50). Furthermore, Bulik *et al.* reported that SQV-8 expressed in COS-7 cells produced glucuronyltransferase activity with higher acceptor specificity to Galb1-3Gal-R (51). Though the actual structures of carbohydrates synthesized by these genes in *C. elegans* still remain uncertain, the glycan synthesized by SQV-8 must be required for the vulval invagination and normal oocyte development in *C. elegans*.

In mammalian brain, the functions of GlcAT-P and GlcAT-S could be different from each other. Each enzyme may have different acceptor specificity and may be responsible for the biosynthesis of the HNK-1 epitope on a different acceptor molecule (21). Nagase *et al.* reported differential expression of GlcAT-P and GlcAT-S in the sublineages of the rat myogenic progenitors (41). In embryonic day 11.5 rat embryo, HNK-1 epitope was observed in myotomal cells and migrating myoblast in the limb bud. GlcAT-P gene expression was found in the myotomal cells, while on the other hand, GlcAT-S gene expression was observed in the limb bud myoblast (41). Different expressions of GlcAT genes seemed to relate to migrating or non-migrating cell properties. These results suggested that the HNK-1 epitope synthesized by each enzyme has a distinct function. The HNK-1 epitope may have different roles corresponding to each molecule on which the HNK-1 epitope expresses, and the cells may select the HNK-1 positive molecules by regulation of the expression of GlcAT-P and GlcAT-S.

## J. Future Perspects

Cloning of GlcATs allowed us to investigate the biological function of the HNK-1 carbohydrate epitope in detail. We can easily prepare cell adhesion molecules or cells expressing the HNK-1 epitope using these genes. By means of evaluating the properties of these molecules or cells, the function of the HNK-1 epitope will be revealed at molecular or cellular level.

Further, as GlcATs are key enzymes in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope, a study of the regulation of GlcATs gene expression will provide information about the mechanism for the strict regulation of HNK-1 expression.

In order to study the biological function of the HNK-1 epitope *in vivo*, we are now generating GlcAT-P deficient mice by gene targeting. GlcAT-P deficient mice are expected to lack the HNK-1 epitope widely and should shed new light on the biological roles of the HNK-1 epitope.

## References

1. Abo, T., and Balch, C.M. (1981) *J. Immunol.* **127**, 1024–1029
2. McGarry, R.C., Helfand, S.L., Quarles, R.H., and Roder, J.C. (1983) *Nature* **306**, 376–378
3. Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C., and Schachner, M. (1984) *Nature* **311**, 153–155
4. Schachner, M., and Martini, R. (1995) *Trends Neurosci.* **18**, 183–191
5. Yoshihara, Y., Oka, S., Nemoto, Y., Watanabe, Y., Nagata, S., Kagamiyama, H., and Mori, K. (1994) *Neuron* **12**, 541–553
6. Chou, D.K., Ilyas, A.A., Evans, J.E., Costello, C., Quarles, R.H., and Jungalwala, F.B. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 11717–11725

Galactosyltransferase Iであることが示され(50)、さらにSQV-8はCOS-7細胞で発現させた場合、受容体基質Galβ1-3Galに高い特異性を示すグルクロン酸転移酵素であることが報告された(51)。これらの遺伝子によって合成される実際の線虫内の糖鎖構造は依然不明であるが、グルクロン酸転移酵素によって合成される糖鎖が、線虫の産卵孔の陥入や正常な卵形成などに必要であることは間違いないようだ。

哺乳類脳においては、GlcAT-PとGlcAT-Sの機能がそれぞれ異なる可能性がある。それぞれの酵素は独立した受容体基質特異性を有し、異なる受容分子上にHNK-1糖鎖抗原を合成しているかもしれない(21)。Nagaseらはラット筋原細胞系列においてGlcAT-PとGlcAT-Sが異なった発現様式を示す事を報告している(41)。胎生11.5日目のラット胎児において、HNK-1糖鎖抗原は筋板にある細胞と枝芽の移動中の筋原細胞に発現していた。GlcAT-Pは筋板に発現が見られたがその一方で、GlcAT-Sは枝芽の筋原細胞に発現していた(41)。GlcAT遺伝子のこのような発現の違いは細胞の移動する、移動しないとといった性質に関連しているのかもしれない。この結果よりそれぞれの酵素によって合成されるHNK-1糖鎖はそれぞれ異なった機能を有していることが示唆される。HNK-1糖鎖抗原はそれが付加するそれぞれの分子に対応して異なった役割を持っているのかもしれないし、細胞はGlcAT-PとGlcAT-Sの発現を調節することで、HNK-1糖鎖が付加される分子を選択しているのかもしれない。

## J. 展 望

グルクロン酸転移酵素のクローニングによりHNK-1糖鎖抗原の生理的機能がより詳細に調べられるようになった。これらの遺伝子を発現系で用いることで我々はHNK-1糖鎖抗原を持つ接着分子、細胞を容易に調製することができる。さらに、それらの分子や細胞の性質を調べることでHNK-1糖鎖の機能について分子レベルまたは細胞レベルでの解析が可能となるだろう。

グルクロン酸転移酵素はHNK-1糖鎖抗原生合成の律速酵素であるので、グルクロン酸転移酵素の発現調節について調べることはHNK-1糖鎖抗原の厳密な発現の調節機構についても何らかの示唆を与えるだろう。

また、生体内でのHNK-1糖鎖抗原の機能を研究するために、我々はジーンターゲティング法によるGlcAT-P欠損マウスを作成中である。GlcAT-P欠損マウスはHNK-1糖鎖を広汎に欠くことが予想され、HNK-1糖鎖抗原の機能に関する重要な知見を与えてくれるであろう。

7. Ariga, T., Kohriyama, T., Freddo, L., Latov, N., Saito, M., Kon, K., Ando, S., Suzuki, M., Hemling, M. E., Rinehart, K.L., Kusunoki, S., and Yu, R.K. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 848–853
8. Dennis, R.D., Antonicek, H., Wiegandt, H., and Schachner, M. (1988) *J. Neurochem.* **51**, 1490–1496
9. Schwarting, G.A., Jungalwala, F.B., Chou, D.K., Boyer, A.M., and Yamamoto, M. (1987) *Dev. Biol.* **120**, 65–76
10. Yoshihara, Y., Oka, S., Watanabe, Y., and Mori, K. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 731–744
11. Keilhauer, G., Faissner, A., and Schachner, M. (1985) *Nature* **316**, 728–730
12. Künemund, V., Jungalwala, F.B., Fischer, G., Chou, D.K., Keilhauer, G., and Schachner, M. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 213–223
13. Bronner-Fraser, M. (1986) *Dev. Biol.* **115**, 44–55
14. Martini, R., Xin, Y., Schmitz, B., and Schachner, M. (1992) *Eur. J. Neurosci.* **4**, 628–639
15. Voshol, H., van Zuylen, C.W.E.M., Orberger, G., Vliegthart, J.F.G., and Schachner, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 22957–22960
16. Terayama, K., Seiki, T., Nakamura, A., Matsumori, K., Ohta, S., Oka, S., Sugita, M., and Kawasaki, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 30295–30300
17. Terayama, K., Oka, S., Seiki, T., Miki, Y., Nakamura, A., Kozutsumi, Y., Takio, K., and Kawasaki, T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6093–6098
18. Ritter, J.K., Crawford, J.M., and Owens, I.S. (1992) *J. Biol. Chem.* **266**, 1043–1047
19. Lazard, D., Zupko, K., Poria, Y., Nef, P., Lazarovits, J., Horn, S., Khen, M., and Lancet, D. (1991) *Nature* **349**, 790–793
20. Seiki, T., Oka, S., Terayama, K., Imiya, K., and Kawasaki, T. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 182–187
21. Shimoda, Y., Tajima, Y., Nagase, T., Harii, K., Osumi, N., and Sanai, Y. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 17115–17122
22. Ong, E., Yeh, J.C., Ding, Y., Hindsgaul, O., and Fukuda, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 5190–5195
23. Mitsumoto, Y., Oka, S., Sakuma, H., Inazawa, J., and Kawasaki T. (2000) *Genomics* **65**, 166–173
24. Kitagawa, H., Tone, Y., Tamura, J., Neumann, K., Ogawa, T., Oka, S., Kawasaki, T., and Sugahara, K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 6615–6618
25. Wei, G., Bai, X., Sarkar, A.K., and Esko, J.D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7857–7864
26. Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., Coulson, A., Craxton, M., Dear, S., Du, Z., Durbin, R., Favello, A., Fraser, A., Fulton, L., Gardner, A., Green, P., Hawkins, T., Hillier, L., Jier, M., Johnston, L., Jones, M., Kershaw, J., Kirsten, J., Laisster, N., Latreille, P., Lightning, J., Lloyd, C., Mortimore, B., O’Callaghan, M., Parsons, J., Percy, C., Rifken, L., Ropra, A., Saunders, D., Showneken, R., Sims, M., Smaldon, N., Smith, A., Smith, M., Sonhammer, E., Staden, R., Sulston, J., Thierry-Mieg, J., Thomas, K., Vaudin, M., Vaughan, K., Waterston, R., Watson, A., Weinstock, L., Wilkinson-Sproat, J., and Wohldman, P. (1994) *Nature* **368**, 32–38
27. Davis, R.E., Hardwick, C., Tavernier, P., Hodgson, S., and Singh, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21813–21819
28. Das, K.K., Basu, M., Basu, S., Chou, D.K.H., and Jungalwala, F.B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 5238–5243
29. Chou, D.K.H., Flores, S., and Jungalwala, F.B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17941–17947
30. Kawashima, C., Terayama, K., Ii, M., Oka, S., and Kawasaki, T. (1992) *Glycoconjugate J.* **9**, 307–314
31. Oka, S., Terayama, K., Kawashima, C., and Kawasaki, T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22711–22714
32. Paulson, J.C., and Colley, K. J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17615–17618
33. Shaper, N.L., Shaper, J.H., Meuth, J.L., Fox, J.L., Chang, H., Kirsch, I.R., and Hollis, G.F. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1573–1577
34. Nishikawa, A., Ihara, Y., Hatakeyama, M., Kangawa, K., and Taniguchi, N. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18199–18204
35. Stanley, P. and Siminovitch, L. (1977) *Somatic Cell Genet.* **3**, 391–405
36. Ilyas, A.A., Chou, D.K.H., Jungalwala, F.B., Costello, C., and Quarles, R.H. (1990) *J. Neurochem.* **55**, 594–601
37. Obata, K., and Tanaka, H. (1988) *Neurosci. Res.* **6**, 131–142
38. Shaper, N.L., Hollis, G.F., Douglas, J.G., Kirsch, I.R., and Shaper, J.H. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10420–10428
39. Okada, T., Iiai, T., Kawachi, Y., Moroda, T., Takii, Y., Hatakeyama, K., and Abo, T. (1995) *Clin. Exp. Immuno.* **102**, 159–166
40. Bakker, H., Friedmann, I., Oka, S., Kawasaki, T., Nifant’ev, N., Schachner, M., and Mantei, N. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29942–29946
41. Nagase, T., Shimoda, Y., Sanai, Y., Nakamura, S., Harii, K., and Osumi, N. (2000) *Mech. Dev.* **98**, 145–149
42. Ohtsubo, K., Imajo, S., Ishiguro, M., Nakatani, T., Oka, S., and Kawasaki, T. (2000) *J. Biochem. (Tokyo)* **128**, 283–291
43. Berry, B.B., Meador, B., Bilderback, T., Liang, P., Glaser, M., and Phillips, G.N., Jr. (1994) *Struct. Funct. Genet.* **19**, 183–198
44. Yuan, Y.P., Schultz, J., Mlodzik, M., and Bork, P. (1997) *Cell* **88**, 9–11
45. Pedersen, L.C., Tsuchida K., Kitagawa H., Sugahara K., Darden T.A., and Negishi M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34580–34585
46. Helting, T., and Roden, L. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 2799–2805
47. Brandt, A.E., Distler, J., and Jourdan, G.W. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **64**, 374–380
48. Wen, D.X., Livingston, B.D., Medzihradzky, K.F., Kelm, S., Burlingame, A.L. and Paulson, J.C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 21011–21019
49. Herman, T., and Horvitz, H.R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 974–979
50. Okajima, T., Yoshida, K., Kondo, T., and Furukawa, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22915–22918
51. Bulik, D.A., Wei, G., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Waldrip, W.R., Esko, J.D., Robbins, P.W., and Selleck, S.B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10838–10843

*Received on February 1, 2001, accepted on February 26, 2001*

**Profile of the Authors**



**Shoji Yamamoto** is currently a Ph.D. student in the Department of Biological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences at Kyoto University, Japan. Since 1999, he has been a research fellow of the Japan Society for the Promotion of Science. His recent research interests focus on the biological function of the HNK-1 carbohydrate epitope and the regulatory mechanism of the HNK-1 expression.

★★★★★★★★



**Shogo Oka** graduated from the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University in 1982 and received a Ph.D. at Kyoto University in 1987. He is associate professor in the Department of Biological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University. He is interested in the molecular and cellular mechanism underlying the formation of neural networks. Currently his particular research interest is focused on the roles of the HNK-1 carbohydrate epitope on the cell-to-cell interactions in the nervous system.