

## Biological Significance of *N*-Acetylglucosaminyltransferase-IV-Mediated Protein Glycosylation on the Homeostasis of Cellular Physiological Functions

細胞生理機能の恒常性における

*N*-acetylglucosaminyltransferase-IV による糖鎖修飾の意義

**Key Words:** *protein N-glycosylation, N-acetylglucosaminyl transferase-IV, cell surface residency, lectin*

Protein *N*-glycosylation produces a highly complex structural repertoire and confers a variety of biological features on carrier proteins by forming specific glycan epitopes on *N*-glycan branches, which can be recognized by endogenous lectins. Multi-antennary *N*-glycan possesses high glycan complexity that can be formed by golgi-residing *N*-acetylglucosaminyltransferases (GnTs), which initiate the synthesis of *N*-glycan branch structures. The apparent number of glycan epitopes in a glycoprotein is determined by the number of *N*-glycosylation sites and antennary of individual *N*-glycan. While the number of *N*-glycosylation sites is an intrinsic characteristic coded in primary sequence of a protein, the complexity of antennae of an *N*-glycan is precisely regulated by the portfolio of expressed *N*-glycan processing enzymes, and the dynamic intracellular metabolic flux of their substrates in the producing cells that reflect cellular microenvironments [Lau, K., *et al.* (2007) *Cell* **129**, 123–134; Taniguchi, N. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 34469–34478]. Thereby, the complexity of *N*-glycan branches can be finely tuned for adapting to the dynamically changing cellular environments.

GnT-IV synthesizes the GlcNAc $\beta$ 1-4 branch structure on the Man $\alpha$ 1-3 arm of *N*-glycan core, and is essential for the production of multiantennary *N*-glycans cooperatively with GnT-V. GnT-IV has two isoenzymes; the first isoenzyme was initially purified and cloned from bovine small intestine and subsequently named GnT-IVa (encoded by the *Mgat4a* gene), and the second isoenzyme was cloned from human genome and named GnT-IVb (encoded by the *Mgat4b* gene), which has identical substrate specificities to GnT-IVa. The tissue distribution of GnT-IVa is highly restricted in gastrointestinal organs and peripheral blood leukocytes, while GnT-IVb is ubiquitously and constitutively expressed among tissues in human and mouse. Because of the different tissue distribution of GnT-IVa and GnT-IVb, they presumably have particular biological functions, respectively.

The products of GnT-IV are normally found in many glycoproteins. Some of bioactive substances, like peptide hormones, are glycopeptides, which exert their effects by binding to cell surface receptors. The carried *N*-glycan can be a ligand to the cellular receptor and facilitates receptor binding of carrier glycoproteins, while it may cause a steric hindrance to the receptor binding and attenuates the binding affinity. The multiantennary *N*-glycans of erythropoietin (EPO)

タンパク質の *N*-型糖鎖修飾は内在性レクチンにより認識される非常に多種にわたる糖鎖エピトープを作り出し、これによりキャリアータンパク質は様々な生物学的性状を獲得する。多分岐型 *N*-型糖鎖は高度な構造多様性を持つ。これはゴルジ体に存在する分岐鎖合成を開始する *N*-acetylglucosaminyltransferase (GnT) によって形成される。

糖タンパク質の糖鎖エピトープの数は自身が持つ *N*-型糖鎖修飾部位の数と個々の *N*-型糖鎖の分岐の度合により決定される。*N*-型糖鎖修飾部位の数がタンパク質の1次構造に内包される個々の特性であるのに対し、*N*-型糖鎖の分岐構造の多様性は細胞の微小環境に応じた糖鎖合成関連酵素の発現状況と細胞内の動的な基質代謝の流れにより精密に制御されている [Lau, K., *et al.* (2007) *Cell* **129**, 123–134; Taniguchi, N. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 34469–34478]。これにより、*N*-型糖鎖の分岐鎖の多様性はダイナミックに変化する細胞微小環境に応じて巧妙に調節されている。

GnT-IV は *N*-型糖鎖の  $\alpha$  1-3 コアマンノースに  $\beta$  1-4 結合の GlcNAc 分岐鎖を形成し、GnT-V と協調して多分岐型 *N*-型糖鎖を産生するのに不可欠な糖転移酵素である。GnT-IV には2つのアイソザイムが存在し、その1つは当初ウシの小腸から精製・遺伝子クローニングされた GnT-IVa (遺伝子名 *Mgat4a*)、もう1つは GnT-IVa と全く同じ基質特異性を持ち、ヒトゲノムからクローニングされた GnT-IVb (遺伝子名 *Mgat4b*) である。ヒトやマウスにおいて GnT-IVa の組織分布が消化管や末梢白血球に局限しているのに対し、GnT-IVb は普遍的に恒常的に発現している。これら異なる組織分布から、GnT-IVa と GnT-IVb はそれぞれ特有の生物学的機能を有すると考えられている。

GnT-IV により形成される糖鎖構造は多くの糖タンパク質上に見出されている。ペプチドホルモン等のいくつかの生理活性物質は糖ペプチドであり、細胞表面の受容体に結合することでその効果を発揮する。*N*-型糖鎖は受容体へのリガンドとなりキャリアータンパク質の受容体への結合を促進することがある一方で、受容体結合への立体的障害となって結合親和性を減弱することもある。エリスロポエチン (EPO) のもつ多分岐型 *N*-型糖鎖は *in vitro* では EPO 受容体への結合を減弱

diminish the erythropoietin receptor binding that attenuates *in vitro* erythropoiesis activity, but its bulky structure of *N*-glycan branch retards clearance from blood stream that prolongs *in vivo* erythropoiesis activity [Takeuchi, M. (1991) *Glycobiology* **1**, 337–346]. It's been recently reported that the *Mgat4a* expression is induced under hypoxic conditions [Busch, W., *et al.* (2010) *BMC Genomics* **11**, 65]. This suggests that the physiological systemic hypoxic (ischemic) conditions induce the GnT-IVa expression and should form multiantennary *N*-glycans on EPO that contributes to the efficient erythropoiesis. It has been reported that GnT-IVa expression is aberrantly up-regulated in some type of tumor cells and the altered glycan products can be a biomarker for diagnosing specific tumors. Choriocarcinoma cells have high GnT-IV activity that produces aberrant biantennary *N*-glycan, which has two GlcNAc branches on the core  $\alpha$ 1-3Man, on human chorionic gonadotropin (hCG) [Endo, T., *et al.* (1987) *Cancer Res.* **47**, 5242–5245]. It has been reported that the altered glycosylation of hCG regulates the affinity for receptors and modulates the downstream signal transduction [Hattori, M., *et al.* (1988) *Mol. Cell. Endocrinol.* **57**, 17–23] that seems to be a reason for the hyperthyroidism in choriocarcinoma patients. This aberrant biantennary *N*-glycan structure is also found in the  $\gamma$ -glutamyltransferase produced in human hepatic carcinoma cells, which have extraordinary high GnT-IV activity [Yamashita, K., *et al.* (1989) *J. Biochem. (TOKYO)* **105**, 728–735].

The GnT-IV mediated *N*-glycan branch formation is important to maintain the cell surface residency of glycoproteins and the cellular signaling in normal context via the binding to endogenous lectins using glycan epitopes on glycoproteins. The density of glycan epitope on the *N*-glycan branches is a molecular determinant of the lectin binding. The loss of *N*-glycan branches, therefore, abolishes the lectin-glycoprotein bindings that impairs cellular functions and occasionally results in the severe systemic disorders. Pancreatic  $\beta$  cells express glucose transporter 2 (GLUT2) on cell surface as a glucose sensor, which has a multiantennary *N*-glycans formed by GnT-IV and -V. The *N*-glycan branches have lactosamine structures, which can be preferentially recognized and bound to endogenous lectin, galectins, and thereby GLUT2 is stabilized and its cell surface residency is maintained. This is essential for maintaining glucose stimulated insulin secretion responses of pancreatic  $\beta$  cells. The failure of this mechanism impairs glucose homeostasis. High-fat diet intake attenuates the *Mgat4a* expression and abolishes the  $\beta$  cell surface expression of GLUT2 that subsequently evokes type 2 diabetes [Ohtsubo, K., *et al.* (2005) *Cell* **123**, 1307–1321]. In deed, the *Mgat4a* expression levels were significantly reduced in the pancreatic  $\beta$  cells of type 2 diabetes patients [Gunton, J.E., *et al.* (2005) *Cell*

させるが、*in vivo* では *N*-型糖鎖の分岐鎖がもつその大きな構造により血流からのクリアランスを遅延させ、結果、赤血球産生が長く持続する [Takeuchi, M. (1991) *Glycobiology* **1**, 337–346]. 最近、低酸素状態により *Mgat4a* の発現が誘導されることが報告されている [Busch, W., *et al.* (2010) *BMC Genomics* **11**, 65]。この事実は生理的な全身性の低酸素状態 (虚血状態) により GnT-IVa の発現が誘導され、EPO 上に多分岐型 *N*-型糖鎖が形成され、効果的な赤血球産生に一役買っていることを示唆している。GnT-IVa はいくつかの腫瘍において異常発現することが報告されている。そのため、その変化した糖鎖構造が特異的な腫瘍診断マーカーとなりうる。絨毛上皮ガン細胞は高い GnT-IV 活性を持つため、産生されるヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) 上に  $\alpha$  1-3Man が 2 本の GlcNAc 分岐鎖を持つ異常 2 本鎖 *N*-型糖鎖を形成する [Endo, T., *et al.* (1987) *Cancer Res.* **47**, 5242–5245]。hCG 上の糖鎖構造変化により受容体への親和性が変化することで、下流のシグナル伝達を調節していることが報告されている [Hattori, M., *et al.* (1988) *Mol. Cell. Endocrinol.* **57**, 17–23]。この仕組みが絨毛上皮ガン患者で見られる甲状腺機能亢進の理由と考えられている。この異常 2 本鎖 *N*-型糖鎖は非常に高い GnT-IV 活性を持つヒト肝細胞癌から産生される  $\gamma$ -glutamyltransferase においても観察される [Yamashita, K., *et al.* (1989) *J. Biochem. (TOKYO)* **105**, 728–735]。

GnT-IV による *N*-型糖鎖の分岐鎖の形成は、その分岐鎖上のエピトープと内在性レクチンの結合を介した細胞表面での糖タンパク質の定留性や細胞のシグナルの維持に重要である。この *N*-型糖鎖の分岐鎖上の糖鎖エピトープの密度がレクチンとの結合を決定している。従って、*N*-型糖鎖の分岐鎖が欠失するとレクチンと糖タンパク質との結合ができなくなる。これにより細胞機能が障害され、時には重篤な全身性の疾患を引き起こすことがある。膵臓  $\beta$  細胞はグルコースセンサー分子としてグルコーストランスポーター 2 (GLUT2) を細胞表面に発現しており、GnT-IV および -V により形成される多分岐型 *N*-型糖鎖を持つ。その *N*-型糖鎖分岐鎖にはラクトサミン構造があり、内在性レクチンであるガレクチンにより認識され結合する。これにより GLUT2 は細胞表面に安定的に停留できる。このメカニズムは膵臓  $\beta$  細胞のグルコース刺激によるインスリン分泌応答の維持に不可欠であり、その破綻によりグルコース恒常性が障害される。高脂肪食の摂取は  $\beta$  細胞での *Mgat4a* の発現を減弱させるため、 $\beta$  細胞表面での GLUT2 の発現が低下する。その結果、2 型糖尿病が引き起こされる [Ohtsubo, K., *et al.* (2005) *Cell* **123**, 1307–1321]。事実、2 型糖尿病患者膵臓  $\beta$  細胞では *Mgat4a* の発現が著しく低下しており

122, 337–349]. In consistent with those findings, the human chromosomal positions of the *MGAT4A* and *MGAT4B* genes were indentified in type 2 diabetes susceptible regions by genetic linkage analyses of patients and their families [McCarthy, M.I. (2003) *Curr. Diab. Rep.*, **3**, 159–167; Van Tilburg, J.H.O., *et al.* (2003) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2223–2230; Reynisdottir, I., *et al.* (2003) *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 323–335].

It has been recently reported that metazoans have a compensation system for maintaining the density of glycan epitopes on cell surface at same levels by modulating expression levels of glycosyltransferases [Takamatsu, S., *et al.* (2010) *Glycobiology* **20**, 485–497]. GnT-IVb deficiency induced aberrant GnT-IVa expression corresponding to GnT-IVb distribution pattern that was likely attributed to the increased transcription factor (Ets-1) levels that conceivably activated the *Mgat4a* promoter, and thereafter preserved apparent GnT-IV activity and glycan density in the cells. Therefore, GnT-IVb deficiency had less impact on pathogenesis and showed only mild phenotypic alterations in hematopoietic cell populations and hemostasis [Takamatsu, S., *et al.* (2010) *Glycobiology* **20**, 485–497]. Furthermore, GnT-IVa/-IVb double deficiency completely abolished GnT-IV activity that resulted in the disappearance of the GlcNAc $\beta$ 1-4 branch on the Man $\alpha$ 1-3 arm and eliminated the glycan epitopes on the branch, though the apparent total number of glycan epitopes on an *N*-glycan was preserved by newly generating alternative epitopes (including polylactosamine, Lewis<sup>x</sup>, and sialic acid cap structure) on the relic branches. These were consistent with the increased expression of corresponding glycosyltransferases for the glycan epitope synthesis;  $\beta$ 3GnT-1, -2,  $\beta$ 4GalT-I, -II, -III, ST3Gal-IV, ST6Gal-I, and Fut-4, -7. The altered gene expression profile of glycosyltransferases should be attributed to the defect in the cell surface residency of receptor glycoproteins that consequently altered the cellular signaling and induced cellular responses for compensating the glycan density on cell surface in GnT-IVa/-IVb double deficiency. The induced glycomic compensation, thereby, preserved the apparent endogenous lectin bindings even in the severe defects in the *N*-glycan branch formation. And the fact that the phenotype of GnT-IVa/-IVb double deficiency largely overlapped that of GnT-IVa single deficiency [Takamatsu, S., *et al.* (2010) *Glycobiology* **20**, 485–497]. Those findings suggest that the maintenance of the cell surface glycan density is indispensable for the homeostasis of cellular physiological functions.

Reported by Kazuaki Ohtsubo  
Dept. of Disease Glycomics, The institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University  
Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan  
E-mail: kohtsubo@sanken.osaka-u.ac.jp  
FAX: 81-6-6879-8413

[Gunton, J.E., *et al.* (2005) *Cell* **122**, 337–349], これら知見と一致するように *MGAT4A* および *MGAT4B* のヒト染色体領域が2型糖尿病の感受性領域であることが患者およびその家族の遺伝子連鎖解析から示されている [McCarthy, M.I. (2003) *Curr. Diab. Rep.*, **3**, 159–167; Van Tilburg, J.H.O., *et al.* (2003) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2223–2230; Reynisdottir, I., *et al.* (2003) *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 323–335].

最近、後生動物には糖転移酵素の発現を調節することで細胞表面の糖鎖エピトープの発現レベルを一定に保つ代償機構が存在することが報告された [Takamatsu, S., *et al.* (2010) *Glycobiology* **20**, 485–497]。GnT-IVb 欠損では GnT-IVb の組織分布に一致して GnT-IVa の発現が異所性に誘導される。これは GnT-IVb 欠損により転写因子 Ets-1 の発現が上昇したため *Mgat4a* プロモーターが活性化されたことに起因し、その結果、見かけ上の GnT-IV 活性および細胞での糖鎖密度が維持されたと考えられる。従って GnT-IVb 欠損は病変形成にはあまり関与せず、血球細胞のポピュレーションや血液凝固系への軽度の変化しか及ぼさなかった [Takamatsu, S., *et al.* (2010) *Glycobiology* **20**, 485–497]。さらに GnT-IVa/-IVb のダブル欠損では GnT-IV 活性が完全に消失した結果、 $\alpha$  1-3 コアマンノース上の  $\beta$  1-4 結合 GlcNAc 分岐鎖が消失するため、その分岐鎖上にあった糖鎖エピトープも消失した。しかし、残存する分岐鎖上に (ポリラクトサミン構造や Lewis<sup>x</sup>、末端シアル酸修飾などの) 代わりの糖鎖エピトープが新たに形成され、見かけ上の *N*-型糖鎖のエピトープの総数は保持されていた。この知見と一致して、糖鎖エピトープ合成に対応する糖転移酵素  $\beta$  3GnT-1、-2、 $\beta$  4GalT-I、-II、-III、ST3Gal-IV、ST6Gal-I、Fut-4、-7 の発現の上昇が観察された。GnT-IVa/-IVb ダブル欠損での糖転移酵素の発現プロファイルの変化は細胞表面での受容体糖タンパク質の定留性が障害されたためと考えられる。これにより細胞内シグナルが変化し、細胞表面での糖鎖エピトープの密度を補うように細胞応答が誘導されたものと考えられる。従って、*N*-型糖鎖分岐鎖形成における重大な欠陥においても糖鎖レベルでの代償が誘導され、内在性レクチンとの結合が見かけ上保持されるのである。結果、GnT-IVa/-IVb ダブル欠損の表現系は GnT-IVa 単一欠損のものとほとんど変わりがなかった [Takamatsu, S., *et al.* (2010) *Glycobiology* **20**, 485–497]。これらの知見は細胞表面での糖鎖密度の維持が細胞生理学的機能の恒常性に不可欠であることを示している。

大坪 和明  
大阪大学 産業科学研究所疾患糖鎖学寄附研究部門