Identification of Target Proteins of Glycosyltransferases Using Functional Glycomics by Gene Expression Regulation

糖転移酵素の発現制御とターゲット糖タンパク質の同定

Kondo, Akihiro

Department of Glycotherapeutics, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan
FAX: 81- 6879-3646; E-mail: kondoa@glycot.med.osaka-u.ac.jp

Key Words: core fucosylation, functional glycomics, knockout, knockdown, lectin

Abstract

Comprehensive analyses of proteins from cells and tissues are the most effective means of elucidating the expression patterns of individual disease-related proteins. On the other hand, the simultaneous separation and characterization of proteins by electrophoresis followed by MS analysis is one of the fundamental approaches to proteomic analysis. However, these analyses do not permit the complete structural identification of glycans in glycoproteins or their structural characterization. Over half of all known proteins are glycosylated and glycan analyses of glycoproteins are requisite for fundamental proteomics studies. The analysis of glycan structural alterations in glycoproteins is becoming increasingly important in terms of biomarkers, quality control of glycoprotein drugs, and the development of new drugs. However, the usual glycomics approach which characterizes and/or identifies glycans, provides some structural information, but it does not provide any information on the functionality of glycans. Therefore, in order to elucidate the function of glycans, functional glycomics which identifies the target glycoproteins of glycosyltransferases and characterizes functional roles of glycans represents a promising approach. In this review, we show examples of a functional glycomics technique using α 1,6 fucosyltransferase gene (Fut8) in order to identify the target glycoproteins.

A. Introduction

The glycosylation of *N*-glycans represents a critically important post-translational modification reaction, and the comprehensive functional analysis of proteins is a target for the next stage of proteomic research. It is common knowledge that over 50% of all in mammalian serum proteins and about 80% of cell membrane proteins are glycosylated and that glycans play crucial roles in various biological events including cell recognition (1), adhesion (2) and cell-cell interaction (3). Glycans of glycoproteins, which are displayed

要 約

細胞や組織からのタンパク質の総合的解析は、個々の疾患関連タンパク質の発現パターンの研究において最も有効な手段である。一方、タンパク質の網羅的分離および同定において、電気泳動の後、質量分析を行う解析方法は、プロテオミクス分析の基本的な方法のひとつである。しかしながら、これらの方法は、必ずしも糖タンパク質糖鎖の同定や構造決定が完全にできるわけではない。現在知られているタンパク質の半数以上は糖タンパク質であるため、基本的なタンパク質解析研究においてその糖鎖解析が要求されるわけである。糖タンパク質の糖鎖構造解析は、バイオマーカー探索、糖タンパク医薬品の品質管理、新薬開発などの分野においてその重要性を増してきている。しかしながら、現在行われているような単なる糖鎖構造を解析するだけの‘グライコミクス’研究では、十分な糖鎖機能解析が行われているとはいえない。よって、糖鎖機能解析を行うためには、解明しようとしている役割を担う機能分子としての糖鎖構造の解析が必要である。

本総説では、 α 1,6 フコース転移酵素 (Fut8) を例に、機能分子としての糖鎖機能解析を紹介する。

A. はじめに

糖タンパク質の *N*-結合型糖鎖付加はタンパク質の翻訳後修飾反応の中でも非常に重要なものであり、糖鎖を含めたタンパク質の網羅的機能解析はプロテオミクス研究の次のステップの課題とも言えるものである。哺乳動物の血清タンパク質の半分以上、膜タンパク質に至ってはその8割以上が糖鎖修飾を受けていることが知られている。そしてその糖鎖が、細胞間認識 (1)、細胞接着 (2)、細胞間相互作用 (3) など様々な

on cell surface membranes, are structurally changed during carcinogenesis and development (4). Functional glycomics is an important strategy for the elucidation of the functions of glycans and this new field promises to provide fundamental answers in the area of functional proteomic research (5, 6). To ascertain the functional relationship between a protein and its glycosylation status, we knockout and knockdown a specific glycosyltransferase gene and characterize the altered products according to the lack of a specific residue. These structural changes may occur as the result of alterations in the expression levels of glycosyltransferases, which are implicated in the biosynthesis and trimming of the glycoforms. Structural analysis of glycans of the whole cell lysate in which glycoproteins are modified by glycosyltransferase gene knockout or knockdown is carried out, the glycan structures are compared with those of wild-type cells: this is referred to as a glycomic analysis.

Glyco-proteomic analysis requires that a sample be purified prior to the glycan structural analysis. When we want to analyze a specific glycan containing a glycoprotein of interest, the cell lysate can be purified or enriched by affinity chromatography using lectin(s) or sugar specific ligands. Then the glycoproteins are analyzed and identified comprehensively. This is “glyco-proteomic” analysis. Glyco-proteomic analysis is useful for identification of target glycoproteins of glycosyltransferase. On the other hand, affinity columns which specifically recognize proteins such as antibody, specific binding proteins or specific ligands, are useful for purification or enrichment of the glycoproteins of interest from a cell lysate and the glycan structures of the binding fraction can be analyzed. This strategy is referred to as a “proteo-glycomic” analysis and is useful for certain types of clinical glycomics, because information can be obtained on glycan structural alterations in the particular protein. Finally the characterization of functional glycans of glycoproteins lacking the components of glycans is analyzed by various cellular and molecular approaches. This is referred to as functional glycomics. Actually functional glycomics are carried out through the combination of glyco-proteomics and proteo-glycomics.

This review will focus on our strategy for functional glycomics using Fut8 knockout mice and knockdown cells to elucidate the function of core fucose (α 1,6 fucose) in *N*-glycan structure. Fut8 has been purified from four different sources, in order to better understand its biological function in biological phenomena (7–10). Voynow *et al.* first partially purified and characterized Fut8 from cultured human skin fibroblasts of cystic fibrosis subjects in 1991 (7). The purification efficacy was dramatically increased via the use of substrate affinity chromatography. In 1996, Uozumi *et al.* succeeded in the purification and cDNA cloning of Fut8

生物学的反応に重要な役目を果たしていることが報告されている。細胞表面に存在する糖タンパク質の糖鎖は、細胞の癌化や癌の進行によってその構造が変化することが知られている (4)。機能グライコミクスは糖鎖の機能を明らかにする重要な研究方法であり、この新たな分野は機能プロテオミクス研究分野において基本的な情報を与えるものである (5,6)。糖転移酵素遺伝子をノックアウトやノックダウンしてその発現量を抑制し、特定の残基を欠失させて得られる構造変化した糖タンパク質の機能を解析することによって、糖タンパク質糖鎖の重要性を確かめることができる。これらの構造変化はグライコフォームの生合成やトリミングに関与する糖転移酵素の発現レベルが変化することによって起こるものと考えられる。糖転移酵素遺伝子をノックアウトやノックダウンさせ糖転移酵素の発現を抑制した細胞と未処理の細胞の全糖鎖の構造を網羅的に比較することをグライコミクス解析と言う。

一方、ある糖タンパク質の糖鎖構造に注目し、レクチンや糖鎖特異的なリガンドなどを用いて細胞溶解液からその構造を持つ糖タンパク質を選別し、それがどのようなタンパク質であるかを網羅的に解析する手法を「グライコプロテオミクス」解析と称する。グライコプロテオミクスは糖転移酵素のターゲット糖タンパク質の同定に有効な方法である。また、ある糖タンパク質のタンパク質部分に注目しその特定の糖タンパク質に対するアフィニティカラムを用いて細胞溶解液から特定の糖タンパク質を精製し、その後、その特定の糖タンパク質の糖鎖どうしを比較する手法を「プロテオグライコミクス」解析と称する。この方法は特定のタンパク質における糖の構造変化に関する情報が得られるため、ある種の臨床グライコミクスとして有効である。糖の構成成分を欠失させた糖タンパク質の機能性糖鎖の分析が細胞あるいは分子からの様々なアプローチによって解析されており、機能グライコミクスと呼ばれている。実際の糖鎖の機能解析研究では、これらの手法を駆使して実験を行うものである。

この総説は、糖鎖の機能解析研究において Fut8 のノックアウトマウスやノックダウン細胞を使って *N*-結合糖鎖の α 1,6 コアフコースの機能を明らかにしてきた我々の研究方法に焦点を当てて紹介する。Fut8 は、これまでに 4 種類の異なる酵素源からそれらの中における生物学的機能を理解するために精製されてきた (7–10)。Voynow らは、1991 年に嚢胞性繊維症の患者の皮膚由来の繊維芽細胞から Fut8 を精製し特性を調べた (7)。精製の際に、基質親和性クロマト法を使い飛躍的に純度の高い酵素の精製に成功している。1996 年には、Uozumi らがブタ脳から Fut8 の精製に成功し、cDNA クローニン

from porcine brain (8). Although no sequence homology was found in the *Fut8* cDNA, compared with other members of the fucosyltransferase family, *Fut8* cDNA contains nine conserved amino acid sequences, which are completely consistent with mammalian H/Se type fucosyltransferase (11). *Fut8* appears to be a type II transmembrane protein, similar to other glycosyltransferases. The expression of *Fut8* mRNA has been detected as a single 3.5 kb band in a variety of rat tissues with the exception of liver and pancreas (12). Yanagidani *et al.* succeeded in the purification and cDNA cloning of FUT8 from a human gastric cancer cell line, MKN45 (9).

B. Glyco-Proteomic Analysis

A comparative method for the analysis of glycans released from serum glycoproteins and for the recovery and identification of proteins with aberrant glycosylation, as a function of cancer diagnosis, is a method of glyco-proteomic analysis. Lectins are very useful tools for the separation of glycoproteins in sample mixtures. In the case of *Fut8* knockout mice or transgenic mice or knockdown cells, several fucose specific lectins are available for these purposes (Table I). There are some recognition specificities. UEA-I and AAnA recognize H-determinants (Fuc α 1, 2-Gal). LTA, AAL, AOL and RSL recognize Fuc α 1, 2-Gal, Fuc α 1, 3-GlcNAc, Fuc α 1, 4-GlcNAc, and Fuc α 1, 6-GlcNAc. Moreover, AAL, AOL and RSL bind to core-Fuc of *N*-glycans (Fuc α 1, 6-GlcNAc) with high affinity. The detection of fucose in glycoproteins involves the use of *Lens culinaris* agglutinin (LCA), which recognizes core-fucosylated biantennary *N*-glycans (13).

Block *et al.* reported on a comparative method for the analysis of *N*-glycans released from serum glycoproteins

グにも成功した (8)。その報告によると *Fut8* の塩基配列は、それまで見つかった他のフコース転移酵素との相同性が無かったが、哺乳類の H/Se 型のフコース転移酵素に保存された 9 アミノ酸と一致する配列を持っていたということである (11)。*Fut8* は、他の糖転移酵素と同じように I I 型膜貫通タンパク質であった。また、*Fut8* の発現を種々のラットの臓器で調べたところ、肝臓とすい臓以外で 3.5kb のバンドとして検出された (12)。Yanagidani らは、ヒトの胃がん細胞株である MKN45 から FUT8 の精製および cDNA クローニングに成功している (9)。

B. グライコプロテオミックス分析

癌の診断法の研究の際などに、正常な血清中の糖鎖と、がん患者の血清中から検出される異常糖タンパク質の糖鎖を比較することをグライコプロテオミックス分析という。レクチンは、試料混合物の中から目的の糖タンパク質を分離する際に非常に有用である。*Fut8* のノックアウトマウス、トランスジェニックマウス、ノックダウン細胞を研究する際、表 1 にあるような様々なフコース結合レクチンを使うことが出来る。(表 1) これらのレクチンにはそれぞれ認識する構造に特性がある。UEA-I と AAnA は、H 抗原と呼ばれる Fuc α 1, 2-Gal 構造を認識する。AAL、AOL および RSL は Fuc α 1, 2-Gal、Fuc α 1, 3-GlcNAc、Fuc α 1, 4-GlcNAc および Fuc α 1, 6-GlcNAc のフコースを認識する。その中でも AAL、AOL および RSL は、糖タンパク質の *N*-結合型のコアフコース (Fuc α 1, 6-GlcNAc) に高い親和性を示す。糖タンパク質のフコースを認識するときによく用いられている *Lens culinaris* agglutinin (LCA) は、*N*-結合複合型糖鎖のうちコアフコースの結合した 2 本鎖糖鎖を強く認識する (13)。

Block らが、フコースに親和性のある *Lens culinaris* agglutinin (LCA)、*Pisum sativum* agglutinin (PSA) および *Vicia faba*

Table I. Fucose Specific Lectins

Linkage Specificity	Lectin
Fuc α 1,2 – Gal	UEA-I, AAnA, LTA, AAL, AOL, RSL
Fuc α 1,3 – GlcNAc	LTA, AAL, AOL, RSL
Fuc α 1,4 – GlcNAc	LTA, AAL, AOL, RSL
Fuc α 1,6 – GlcNAc	AAL, AOL, RSL

UEA-I (*Ulex europaeus* agglutinin), AAnA (*Anguilla anguilla* agglutinin), LTA (*Lotus tetragonolobus* agglutinin),

AAL (*Aleuria aurantia* lectin), AOL (*Aspergillus oryzae* lectin), RSL (*Rhizopus stolonifer* lectin)

and for the recovery and identification of proteins by fucose recognizing lectins from *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Pisum sativum* agglutinin (PSA), and *Vicia faba* agglutinin (VFA) with aberrant glycosylation, for purposes of cancer diagnosis (14). They showed that woodchucks diagnosed with hepatocellular carcinomas (HCC) have dramatically higher levels of serum-associated core-fucose, compared to woodchucks that are diagnosed without HCC. The coupling of the lectins (LCA, PSA, and VFA) selection method with 2-DE gel proteomics has permitted the identification of several glycoproteins with altered glycosylation patterns as a function of cancer. Golgi Protein 73 (GP73) was found to be elevated and hyper-fucosylated in animals with HCC.

C. Proteo-Glycomic Analysis

In the case of proteo-glycomic analysis, one could purify the glycoproteins using specific ligands for proteins such as antibodies, enzyme substrates, inhibitors, binding proteins etc.

Conventional glycan structural analyses are classified in this category and one of the aims of clinical glycomics is finding glycans with altered behavior in disease (with regard to structure, function, interaction or expression), thus forming a starting point for improvements in clinical care for that disease. One of the goals of glycomic technologies is to find disease specific changed glycans, study their structure, function and interactions of a specific glycan or types of glycans, which are derived from disease-associated glycoproteins (e.g. triantennary sugar chains). It is well known that malignant transformation is associated with abnormal glycosylation, resulting in the expression of altered glycan biomarkers. The monoclonal antibodies against tumor marker glycoproteins were widely used for clinical diagnosis and so-called cancer-associated antigens have been studied for over two decades. α -Fetoprotein (AFP) glycans increased fucosylation of glycans occur in certain types of diseases (15). AFP is a glycoprotein produced in the mammalian embryonic liver and is a major serum protein in the developing fetus. AFP is a serum protein, the reappearance of which in mice with hepatomas has been demonstrated (16,17), as well as in patients with hepatocellular carcinomas (HCC) and in rat serum treated with carcinogens (18).

D. Fut8 and TGF β -1 Signaling(19)

To investigate the physiological functions of the core fucose, we generated *Fut8* knockout mice and found that the disruption of *Fut8* induces severe growth retardation and death during postnatal development (19). A histopathological analysis revealed that *Fut8* knockout mice showed emphysema-like changes in the lung, verified by a physiological compliance analysis. Biochemical studies indicate that lungs from

agglutinin (VFA) を用いて、血清糖タンパク質から遊離される *N*-結合糖鎖の分析や血清中のフコース結合糖タンパク質の精製を行い、癌の診断の研究を行っている (14)。彼らは肝細胞癌のウッドチャックの糖鎖を解析し、癌発症の際にコアフコースが劇的に増加することを報告している。前述のフコース結合レクチン (LCA, PSA, VFA) を用いて精製してきた糖タンパク質を 2 次元電気泳動で分離し、数種の糖タンパク質の糖鎖が癌化において変化することを報告している。中でも、ゴルジタンパク質 73(GP73) が肝細胞癌のウッドチャックにおいて発現が亢進し hyper-fucosylation が起こっていることを発見している。

C. プロテオグライコミック分析

プロテオグライコミック分析の場合には、抗体や酵素基質、阻害物質、結合タンパク質などの標的糖タンパク質に特異的に結合する物質を用いて精製する方法を用いる。

従来の糖鎖構造解析はこのカテゴリーに分類され、疾患特異的に変化する糖鎖 (構造、機能、相互作用、発現) を特定するための臨床グライコミクスの目的のひとつであり、疾患に対する臨床ケアの発展のために重要な研究分野である。グライコミクス技術のゴールの一つは、糖鎖構造やその機能、特異的な糖鎖や特定の構造に相互作用するような糖鎖の研究や、疾患特異的に変化する糖鎖の発見である。癌などの悪性変化と糖鎖構造の変化が関係していることは良く知られているが、いくつかの応用例では、この糖鎖構造変化がバイオマーカーとなっている。糖タンパク質腫瘍マーカーに対するモノクローン抗体は臨床診断に広く使われており、このテーマでの癌関連抗原の研究はここ 20 年以上続けられている。 α -フェトプロテイン (AFP) の糖鎖のフコース結合量はある種の疾患で上昇することが知られている (15)。AFP は哺乳類の胎児の肝臓で作られる糖タンパク質で胎児の血清中の主要なタンパク質の一つである。AFP は肝がんマウスでその発現亢進が報告され (16,17)、同様の現象はヒトの肝細胞癌、発がん物質処理したラットでも報告されている (18)。

D. Fut8 と TGF β -1 シグナリング (19)

コアフコースの生理学的機能を調べるために、我々は *Fut8* ノックアウトマウスを作成した。そのマウスは、*Fut8* の発現が無いために非常に重篤な発育遅延を発生したり、出生後程なく死んでしまうという様子が観察された (19)。病理組織学的な解析により *Fut8* ノックアウトマウスの肺は、肺気腫様の障害を起こしていることが観察されたが、これは肺の生理的伸展性分析においても検証された。*Fut8* ノックアウトマ

Fut8 knockout mice exhibit a marked overexpression of matrix metalloproteinases (MMPs), highly associated with lung-destructive phenotypes, and the down-regulation of extracellular matrix (ECM) proteins such as elastin, as well as retarded alveolar epithelia cell differentiation. These changes are consistent with a deficiency in TGF β -1 signaling, a pleiotropic factor that controls ECM homeostasis by down-regulating MMP expression and inducing ECM protein components. In fact, Fut8 knockout mice have a marked dysregulation of TGF β -1 receptor activation and signaling, as assessed by TGF β -1 binding assays and a Smad2 phosphorylation analysis (19).

E. Fut8 and EGFR-Trypsin-PAR-2 Pathway (20)

To investigate the underlying molecular mechanism by which growth retardation occurs, we examined the mRNA expression levels of *Fut8*^{-/-} embryos (18.5 days postcoitum) using a cDNA microarray. The DNA microarray and real-time PCR analysis showed that a group of genes, including trypsinogens 4, 7, 8, 11, 16 and 20 were down-regulated in *Fut8*^{-/-} embryos. Consistently, the expression of trypsinogen proteins was found to be lower in *Fut8*^{-/-} mice in the duodenum, small intestine and pancreas. Trypsin, an active form of trypsinogen, regulates cell growth through a G-protein coupled receptor, the proteinase-activated receptor 2 (PAR-2). In a cell culture system, a *Fut8* knockdown mouse pancreatic acinar cell carcinoma, TGP49-*Fut8*-KDs, showed decreased growth rate similar to that seen in *Fut8*^{-/-} mice, and the decreased growth rate was rescued by the application of the PAR-2 activating peptide (SLIGRL-NH₂) (Fig. 1).

ウスの肺を生化学的に検証したところ、肺障害の現れている部位でのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現亢進が観察され、同時にエラスチンなどの細胞外マトリックスタンパク質 (ECM) 発現抑制や肺胞上皮細胞の分化遅延も観察された。MMP の発現抑制によって誘導され、種々の因子によってその恒常性が保たれている ECM におけるこれらの変化は、TGF β -1 シグナリングの低下によって引き起こされたといえる。実際のところ、*Fut8* ノックアウトマウスは、TGF β -1 受容体の活性化やシグナリングの著しい調節異常を示しており、そのことは、TGF β -1 の結合分析や Smad2 のリン酸化分析によって確かめられている (19)。

E. Fut8 と EGFR-trypsin-PAR-2 経路 (20)

我々は、先の項で述べたような *Fut8* ノックアウトマウスの発育遅延を発生する分子機構を詳しく調べるために、出生前 (妊娠 18.5 日) の胎児の mRNA 発現を cDNA マイクロアレイを用いて解析した。DNA マイクロアレイとリアルタイム PCR 解析によって、*Fut8* ノックアウトマウスの胎児のトリプシノーゲン 4、7、8、11、16、20 が野生型のマウス胎児に比して発現抑制されていることが分かった。さらに、十二指腸、小腸、すい臓におけるトリプシノーゲンタンパク質の発現も抑制されていることが分かった。トリプシノーゲンの活性体であるトリプシンは、G タンパク質共役受容体のひとつである proteinase-activated receptor 2(PAR-2) を介して細胞増殖を制御できることが知られている。このことを確かめるために、培養細胞を使って *Fut8* をノックダウンしたマウス膵がん細胞 (TGP49-*Fut8*-KD) を作成した。その細胞は、*Fut8* ノックアウトマウスの発育遅延と同様ともとれる細胞増殖能の低下がみられたが、その低下した細胞増殖能は、PAR-2 活性化ペプチド (SLIGRL-NH₂) の添加で回復した (図 1)。

Fig.1. The relationship between trypsin (trypsinogen) and the regulation of PAR-2. *Fut8* knockdown decrease the expression of trypsinogens resulting in the attenuation of TGF- β signaling through PAR2 (Filled arrow). PAR-2 activating peptide (SLIGRL-NH₂) can rescue cell proliferation through TGF- β signaling (Hatched arrow).

Fig. 2. The relationship between core-fucosylation and the regulation of the EGFR-trypsin-PAR-2 pathway.

The loss of α 1,6 core fucose (F) on the extracellular domain of EGFR affects cell proliferation by modulating EGFR phosphorylation. The low levels of EGFR signaling in *Fut8*^{-/-} mice are associated with growth retardation, at least in part, by a reduced trypsinogen expression which, in turn, attenuates the PAR-2-mediated growth signaling pathway. The important finding of our study was that α 1,6 core fucose on the extracellular domain of EGFR has an effect on cell proliferation through the regulation of EGFR-trypsin-PAR-2 signaling.

Moreover, epidermal growth factor (EGF) receptor phosphorylation was attenuated in TGP49-*Fut8*-KDs, which was highly associated with a reduction of trypsinogens mRNA levels. The addition of exogenous EGF recovered c-fos, c-jun and trypsinogen mRNA expression in TGP49-*Fut8*-KDs. Again, the EGF induced up-regulation of c-fos and c-jun mRNA expression was significantly blocked by the protein kinase C (PKC) inhibitor. Our findings clearly demonstrate a relationship between *Fut8* and the regulation of EGFR-trypsin-PAR-2 pathway in controlling cell growth, and that the EGFR-trypsin-PAR-2 pathway is suppressed in TGP49-*Fut8*-KDs as well as in *Fut8*^{-/-} mice (Fig. 2).

F. *Fut8* and B Cell Development (21)

Mice with a targeted gene disruption of the *Fut8* (*Fut8*^{-/-}) showed an abnormality in the pro-B to pre-B transition, reduced pre-B cell proliferative responses and a decreased immunoglobulin production. To determine whether the core fucosylated *N*-glycans of ST2 cells (stromal cells) functionally compromised pre-B cell colony formation, we cultivated *Fut8*^{+/+} BM (bone marrow) cells on ST2 cells and on ST2-KD cells. The frequency of B cell progenitors was 1/251 on ST2-KD cells, which was less than half of that on ST2 cells (1/114). These results indicate that *Fut8* in BM stromal cells is involved in pre-B supporting ability. To ascertain the role of the core fucose of VCAM-1, we compared the binding ability of *Fut8*^{+/+} pre-B cells to ST2 and ST2-KD cells. The core fucosylated *N*-glycans of VCAM-1 was abolished in ST2-KD cells, without any effect on total VCAM-1 expression levels. The *Fut8*^{+/+} pre-B cells showed a weaker adhesion to ST2-KD, indicating that *Fut8* in stroma has a positive role in

さらに、TGP49-*Fut8*-KD 細胞におけるトリプシンの発現低下は、上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体のリン酸化の抑制と関係があることが分かった。よって、低下していた TGP49-*Fut8*-KD 細胞の c-fos、c-jun およびトリプシノーゲンの mRNA の発現は、EGF の添加によって回復させることができた。この c-fos および c-jun の mRNA の発現回復は (EGF 経路の下流にある) プロテインキナーゼ C の阻害剤によってほぼ完全に遮断された。我々のこれらの実験結果は、*Fut8* と EGFR-trypsin-PAR-2 経路は細胞増殖を制御しているということを明確に示すことが出来たと考えている。さらに、TGP49-*Fut8*-KD 細胞における EGFR-trypsin-PAR-2 経路の抑制は、*Fut8* ノックアウトマウスと同様であった。(図 2)。

F. *Fut8* と B 細胞の初期分化過程 (21)

Fut8 ノックアウトマウスの B リンパ球の分析によって、プロ B 細胞からプレ B 細胞への移行に異常があり、プレ B 細胞の増殖反応が低下しており、抗体生産量も低下していることが分かった。ST2 細胞 (株化されたストローマ細胞) のコアフコース化された *N*-結合糖鎖が、プレ B 細胞のコロニー形成における機能的な障害を起こさせているのかどうか調べるために、野生型マウスの BM (骨髄細胞) をオリジナルの ST2 細胞および *Fut8* をノックダウンした ST2 細胞 (ST2-KD 細胞) の上で培養した。B 細胞の前駆細胞コロニー数は、ST2 細胞の 1/114 に対して ST2-KD 細胞の上では、半分以下の 1/251 であった。この結果は、BM 中のストローマ細胞の *Fut8* がプレ B 細胞の支持活性に深く関与していることを示している。ストローマ細胞における VCAM-1 のコアフコースの役目を解明するために、野生型マウスのプレ B 細胞と ST2 細胞または ST2-KD 細胞との結合能を比べてみた。ST2-KD 細胞では、VCAM-1 の発現量は ST2 細胞のそれと変わらないが、VCAM-1 にコアフコース化された *N*-結合糖鎖が殆ど存在しない。野生型マ

Fig. 3. Loss of core fucose on VCAM-1 and $\alpha 4\beta 1$ integrin led to a low binding ability of pre-B cells to ST2 and VCAM-1 molecules. A, Reduction in the core fucose of VCAM-1 in ST2-KD was detected by AOL staining. An antibody to VCAM-1 was used in the immunoprecipitation and the immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE on a 7.5% gel, transferred to a PVDF membrane and probed with the AOL and anti-VCAM-1. The immunoprecipitates were treated with Laemmli sample buffer containing 2-ME; B, Inhibition of binding of CD45R⁺IgM⁻ cells to ST2 and VCAM-1 molecules as the result of de-core fucosylation. Quantification of cell numbers attached to the plates was carried out by means of fluorescence microassay. CD45R⁺IgM⁻ cells were GFSE labeled and used in the cell adhesion assay as described in Materials and Methods; C, Expression of Fut8 on 70Z/3 derivative cells. Ten μ g of cell lysates from 70Z/3 and 70Z/3-KD cells were subjected to a western blot analysis using 15C6 antibody; D, Reduction in core fucose of $\alpha 4\beta 1$ integrin in 70Z/3-KD was detected by AOL staining. The surfaces of 70Z/3 and 70Z/3-KD cells were biotinylated, and whole cell lysates were immunoprecipitated with an anti- $\alpha 4\beta 1$ integrin antibody. The immunoprecipitates were treated with Laemmli sample buffer without 2-ME; E, Comparison of the binding ability of 70Z/3 and 70Z/3-KD cells to VCAM-1 molecules. The binding ability of pre-B cells was evaluated by counting the number of B cells bound per well. Monoclonal antibodies (10 μ g/ml) to $\alpha 4\beta 1$ integrin and VCAM-1 were added as indicated. Adherence is expressed as a percentage. Each value represents the mean $\pm$ SD of three experiments.

tethering pre-B cells. On the other hand, *Fut8*^{-/-} pre-B cells showed weaker binding to ST2-KD than *Fut8*^{+/+} pre-B cells. Furthermore, when the recombinant mouse VCAM-1/Fc chimera was used, binding of *Fut8*^{-/-} pre-B cells was weaker than that of *Fut8*^{+/+} pre-B cells, suggesting that the adhesion of pre-B cells themselves by integrin $\alpha 4\beta 1$ was also impaired by defect of *Fut8* in pre-B cells (Fig. 3).

To further examine the importance of the core fucosylated *N*-glycans on integrin $\alpha 4\beta 1$, we stably silenced *Fut8* expression in a pre-B cell line, 70Z/3 cells, and named 70Z/3-KD. *Fut8* expression and the core fucosylated *N*-glycans of integrin $\alpha 4\beta 1$ were ablated in 70Z/3-KD. In a binding assay, 70Z/3-KD cells showed an impaired adhesion to VCAM-1, compared to mock cells. Preincubation of 70Z/3 cells with an anti-integrin $\alpha 4\beta 1$ antibody significantly blocks the binding of 70Z/3 to VCAM-1. Collectively, these results demonstrated that core fucosylation plays a pivotal role in a key event in pre-B cell development; integrin $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1-mediated interactions between pre-B cells and stromal cells (Fig 4).

G. Concluding Remarks

In the coming years, advances in molecular biology and molecular technologies for not only proteomics but also glycomics are likely to have a profound impact on diagnostic pathology. It is well known that large numbers of proteins undergo post-translational modifications with corresponding changes in their structures and functions. Among the various post-translational modification reactions of proteins, glycosylation is the most abundant. However, only glycomics approach does not provide any functional meaning of the glycoproteins as we have lessened already from proteomics

ウスのプレB細胞はST2-KD細胞に弱くしか結合しない。このことは、ストローマ細胞の *Fut8* がプレB細胞を繋ぎとめておくのに役に立っているということを示している。一方、*Fut8* ノックアウトマウスのプレB細胞は、野生型マウスのプレB細胞に比べてST2-KD細胞への結合は弱い。さらに、組換え体マウス VCAM-1/Fc キメラタンパク質と *Fut8* ノックアウトマウスのプレB細胞の結合は、野生型マウスのプレB細胞との結合に比べて弱い。つまり、ストローマ細胞との接着にはプレB細胞の $\alpha 4\beta 1$ インテグリンが関与しているが、*Fut8* ノックアウトマウスのプレB細胞は充分にその機能を果たさないわけである(図3)。

そこで、 $\alpha 4\beta 1$ インテグリンのコアフコース化されたN-結合糖鎖の重要性を調べるために、定常的に *Fut8* の発現をノックダウンしたプレB細胞(70Z/3-KD細胞)を作成した。70Z/3-KD細胞においては、予想通り *Fut8* の発現とコアフコース化されたN-結合糖鎖を持つ $\alpha 4\beta 1$ インテグリンの発現が、抑制されていた。70Z/3-KD細胞のVCAM-1に対する結合は、70Z/3のmock細胞に比べて弱い。70Z/3細胞と抗 $\alpha 4\beta 1$ インテグリン抗体を予め混合した場合、VCAM-1に対する結合は殆どブロックされた。

以上の実験結果から、N-結合糖鎖のコアフコース化はプレB細胞の $\alpha 4\beta 1$ インテグリンとストローマ細胞のVCAM-1双方において必須であり、その相互作用はプレB細胞の分化増殖にきわめて重要であると証明できた(図4)。

G. 結 語

これからの数年間のプロテオミクスのみならずグライコミクス研究のための分子生物学および分子工学の発展は、診断病理学の分野に対して非常に大きな影響を与えるであろう。本文でも述べてきたように、非常に多くのタンパク質が翻訳後修飾を受けており、そのことによって構造や機能に変化が生まれている。その中でも最も一般的なのが、糖鎖修飾である。

Fig. 4. Simplified differentiation diagram for development of B cells. Alpha 1,6-fucosyltransferase (*Fut8*) is responsible for the alpha 1,6 core fucosylation of *N*-glycans, which could modify the functions of glycoproteins. The loss of a core fucose in both very late antigen 4 (VLA-4, integrin $\alpha 4\beta 1$) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) led to a decreased binding between pre-B cells and stromal cells, which impaired pre-B cells generation in *Fut8*^{-/-} mice.

approach which does not give any functional meaning unless functional proteomics have been carried out.

In the functional glycomics methodology presented in this review, we used gene targeting mice and knockdown cells of *Fut8* as a model. As described above, the structural modulation of glycans by *Fut8* could significantly alter a variety of biological functions including cell proliferation and signal transduction.

A strategy for identifying proteins targeted by a glycosyltransferase is not an easy task. Target molecules seem to be different for each glycosyltransferase. The polyacrylamide gel electrophoresis (including two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; 2-D PAGE) followed by a lectin blot described in this review is one of the currently available glyco-proteomic and proteo-glycomics approaches to search for the target molecules. The introduction of a glycosyltransferase gene into specific cells and tissues may open up approaches to the study of glycomics and may lead to functional genomic studies in the post-genome era of research.

Acknowledgements

The author thanks Drs Wenzhe Li, Takatoshi Nakagawa, Katsuhiko Ishihara, Takafumi Yokota, Miyako Nakano, Hideyuki Ihara, Nobuto Koyama, Mutsumi Sano, Ikunoshin Kato, Jianguo Gu, Koichi Honke, Eiji Miyoshi, and Naoyuki Taniguchi for collaboration and special support. And the author has to thank Mses Eriko Sasabe, Mami Nishikawa, and Key Mikami for excellent assistance. The works of *Fut8* study were partly supported by the Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) program of Japan Science and Technology Agency, and the 21st Century Center of Excellence (COE) program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, and Core to Core program (JSPS).

References

1. Varki, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 97–130
2. Isaji, T., Gu, J., Nishiuchi, R., Zhao, Y., Takahashi, M., Miyoshi, E., Honke, K., Sekiguchi, K., and Taniguchi, N. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 19747–19754
3. Stanley, P. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 363–368
4. Hakomori, S. (1989) *Adv. Cancer Res.* **52**, 257–331
5. Taniguchi, N., Ekuni, A., Ko, J. H., Miyoshi, E., Ikeda, Y., Ihara, Y., Nishikawa, A., Honke, K., and Takahashi, M. (2001) *Proteomics* **1**, 239–247
6. Taniguchi, N. (2006) *IUBMB Life* **58**, 269–272
7. Voynow, J., Kaiser, R., Scanlin, T., and Glick, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 21572–21577
8. Uozumi, N., Yanagidani, S., Miyoshi, E., Ihara, Y., Sakuma, T., Gao, C., Teshima, T., Fujii, S., Shiba, T., and Taniguchi, N. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 27810–27817
9. Yanagidani, S., N., U., Ihara, Y., Miyoshi, E., Yamaguchi, N., and Taniguchi, N. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 626–632
10. Kaminska, J., Glick, M., and Koscielak, J. (1998) *Glycoconj. J.* **15**, 783–788
11. Breton, C., Oriol, R., and Imberty, A. (1998) *Glycobiology* **8**, 87–94
12. Miyoshi, E., Uozumi, N., Noda, K., Hayashi, N., Hori, M., and Taniguchi, N. (1997) *Int. J. Cancer* **72**, 1117–1121
13. Toyoshima, S., Osawa, T., and Tonomura, A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 514–521
14. Block, T., Comunale, M., Lowman, M., Steel, L., Romano, P., Fimmel, C., Tennant, B., London, W., Evans, A., Blumberg, B., Dwek, R., Mattu, T., and Mehta, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 779–784

しかしながら、機能的プロテオミクス解析というものが行われてきているが、糖鎖機能解析としては充分ではない。

本総説では、我々の行っている *Fut8* の遺伝子ターゲティングマウスやノックダウン細胞を用いた解析をモデルに糖鎖機能解析法の紹介をおこなった。本稿で述べてきたように、*Fut8* による糖鎖修飾は細胞増殖や情報伝達を含めた生物学的機能を変化させるということが糖鎖機能解析によって判明したのである。

糖転移酵素のターゲットタンパク質を同定する戦略は、そう簡単ではない。この場合のターゲット分子は、それぞれの糖転移酵素で異なっている。PAGE(2-D PAGE も含めて)についてレクチンプロットを行うという本総説でも紹介した方法は、ターゲット分子を探すのに良い方法である。そして今後、糖転移酵素を特異的な細胞や臓器に導入し研究することは、グライコミクス研究の門戸を広く開けることができ、ポストゲノム研究分野において機能的糖鎖解析研究を先導することができるであろう。

謝 辞

著者は、共同研究および特別なご高配を賜りました李文哲、中川孝俊、石原克彦、横田貴史、中の三弥子、井原秀之、小山信人、佐野睦、加藤郁之進、顧建国、本家孝一、三善英知、谷口直之の各博士に深謝いたします。また、篠部衣利子、西川真美、三神恵の素晴らしいサポートに感謝いたします。ここに紹介した *Fut8* の研究は、CREST、COE、JSPS の各プロジェクトのグラントの支援のもとで行われました。

15. Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Igarashi, K., Saitoh, A., Oguro, M., Yokota, T., Mori, S., Suda, T., Isemura, M., and Asakura, H. (1993) *Br. J. Cancer* **67**, 486–492
16. Abelev, G. I., Perova, S. D., Khramkova, N. I., Postnikova, Z. A., and Irlin, I. S. (1963) *Transplantation* **1**, 174–180
17. Deutsch, H. (1991) *Adv. Cancer Res.* **56**, 253–312
18. Nishi, S. (1970) *Cancer. Res* **30**, 2507–2513
19. Wang, X., Inoue, S., Gu, J., Miyoshi, E., Noda, K., Li, W., Mizuno-Horikawa, Y., Nakano, M., Asahi, M., Takahashi, M., Uozumi, N., Ihara, S., Lee, S. H., Ikeda, Y., Yamaguchi, Y., Aze, Y., Tomiyama, Y., Fujii, J., Suzuki, K., Kondo, A., Shapiro, S. D., Lopez-Otin, C., Kuwaki, T., Okabe, M., Honke, K., and Taniguchi, N. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15791–15796
20. Li, W., Nakagawa, T., Koyama, N., Wang, X., Jin, J., Mizuno-Horikawa, Y., Gu, J., Miyoshi, E., Kato, I., Honke, K., Taniguchi, N., and Kondo, A. (2006) *Glycobiology* **16**, 1007–1019
21. Li, W., Ishihara, K., Yokota, T., Nakagawa, T., Koyama, N., Jin, J., Mizuno-Horikawa, Y., Wang, X., Miyoshi, E., Taniguchi, N., and Kondo, A. (2007) *Glycobiology*

Received on December 7, 2007, accepted on December 11, 2007

Profile of the Author

Akihiro Kondo (Ph.D.) Visiting Professor, Department of Glycotherapeutics, Osaka University Graduate School of Medicine. In 1980, he graduated from Gifu University, Department of Agriculture. In 1982, obtained his M.S. at the Graduate School of Agriculture, Gifu University, and started to work at Central Research Laboratories, Takara Shuzo Co., Ltd. as a researcher. In 1986, he became Visiting Researcher at the Department of Science, Osaka University. In 1992, he worked as Senior Scientist at Biotechnology Research Laboratories, Takara Shuzo Co., Ltd, and in 1994, obtained his Ph.D. at the United Graduate School of Agricultural Sciences, Gifu University. In the same year, he became Visiting Researcher at Cytel Corporation in U. S.A. In 2002, he became Senior Researcher at DNA Function Analysis Center of Takara Bio Inc. He has held his current position since 2002 specializing in carbohydrate chemistry and analytical chemistry.