Role of Polypeptide GalNAc-transferase T3 in Familial Tumoral Calcinosis: The Importance of a Single GalNAc-transferase Isoform

家族性腫瘍状石灰化症におけるポリペプチド GalNAc 転移酵素 T3 の役割：GalNAc 転移酵素の
1 アイソフォームの重要性

Kato, Kentaro; and Clausen, Henrik

Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen, Blegdamsvej 3, DK-2200 Copenhagen N, Denmark
FAX: 45-3536-7980, E-mail: kentaro@imb.ku.dk, hc@imb.ku.dk

Key Words: *O*-glycosylation, GalNAc-transferase, GalNAc-T3, FGF23, protein secretion

Abstract

UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase (GalNAc-transferase, GalNAc-T) is the enzyme catalyzing mucin-type *O*-glycosylation (GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr) of proteins. Mutations in the gene encoding the GalNAc-T3 isoform were recently identified as a cause of the autosomal recessive metabolic disorder familial tumoral calcinosis (FTC) (OMIM 211900). FTC is associated with hyperphosphatemia and massive ectopic calcifications. We recently demonstrated that the secretion of the phosphaturic factor FGF23 requires *O*-glycosylation, and that GalNAc-T3 selectively directs *O*-glycosylation in a subtilisin-like proprotein convertase recognition sequence motif, which blocks furin protease processing of FGF23 (1). These results suggest a novel posttranslational regulatory model of FGF23 involving competing *O*-glycosylation and protease processing to produce intact FGF23.

要 約

UDP-GalNAc：ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GalNAc-転移酵素, GalNAc-T) はタンパク質のムチン型 *O*-グリコシレーション (GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr) を触媒する酵素群である。GalNAc-T3 の遺伝子変異が常染色体劣性代謝性疾患である家族性腫瘍状石灰化症 (familial tumoral calcinosis, FTC) (OMIM 211900) の原因となることが近年明らかにされた。FTC は高リン血症および異所性石灰化を伴う。我々はリン酸代謝調節因子である FGF23 の分泌に *O*-グリコシレーションが必要であること、および GalNAc-T3 がスブチリシン様プロプロテインコンベルターゼにより認識される配列を特異的に *O*-グリコシレーションし、その修飾が furin プロテアーゼによる FGF23 のプロセッシングを阻害することを明らかにした (1)。これらの結果は完全長の FGF23 を産生する際の *O*-グリコシレーションとプロテアーゼによるプロセッシングとの競合、という FGF23 の新規翻訳後修飾制御モデルを示唆している。

A. GalNAc-Transferase

The UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-transferase) gene family is the largest mammalian family of glycosyltransferases, which is involved in catalysis of a single glycosidic linkage, GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr, in the Golgi complex (2). The GalNAc-transferase gene family contains 20 genes of which fifteen have been shown to encode functional enzymes so far. *O*-glycosylation imparts unique physicochemical features to glycoproteins and *O*-glycans and has been shown to play important functions in biological processes including intracellular sorting, cell-cell adhesion, and microbial adhesion events. The large number of GalNAc-transferase isoforms available has been interpreted to provide a high degree of redundancy, and in fact ablation studies in mice have not yet provided unambiguous information of unique roles for individual GalNAc-transferase isoforms (3–5), although a recent reinvestigation of GalNAc-T1

A. GalNAc 転移酵素

UDP-GalNAc：ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GalNAc 転移酵素) 遺伝子ファミリーは哺乳類の糖転移酵素ファミリーの中では最大のファミリーであり、ゴルジ体においてグリコシド結合、GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr、を触媒している (2)。GalNAc 転移酵素遺伝子ファミリーには 20 種類の遺伝子が含まれ、現在までにそのうちの 15 種類が機能的な酵素をコードしていることが示されている。*O*-グリコシレーションは糖タンパク質および *O*-結合型糖鎖に独特な物理化学的特性を与え、細胞内選別輸送、細胞間接着、および微生物付着などの生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしていることが示されている。GalNAc 転移酵素に多くのアイソフォームが存在することは冗長性を示すものであると解釈されており、実際にノックアウトマウスを用いた研究においても GalNAc 転移酵素の個々のアイソフォームに独特な役割が存在することは現在までのところ明らかにされていない (3–5)。

ablated mice appears to have defects in lymph node B-cell retention (6). A case for unique *in vivo* functions of GalNAc-transferase isoforms was, however, provided by studies in *D.melanogaster*, where it was found that a single GalNAc-transferase isoform out of 15 putative GalNAc-transferase genes in *Drosophila* was essential for pupal development (7, 8). Although the molecular basis for this is unknown, the result clearly points to unique non-redundant functions of GalNAc-transferase isoforms. Recently, one of the GalNAc-transferase isoforms, GalNAc-T3 was implicated in familial tumoral calcinosis (FTC) (9–17).

B. Secretion of FGF23 Is Dependent on GalNAc O-Glycosylation

In the recent study, we have addressed the functional role of *O*-glycosylation of the phosphaturic factor, fibroblast growth factor 23 (FGF23), by the GalNAc-T3 isoform (1). FGF23 is a key regulator of phosphate homeostasis (18,19). FGF23 is partially processed in the trans-Golgi network by subtilisin-like proprotein convertases (SPC) at the consensus sequence RxxR₁₇₉ (RHTR¹⁷⁹) between Arg¹⁷⁹ and Ser¹⁸⁰ (20–22). This processing step appears to be essential in the regulation of phosphate homeostasis, since mutations in the SPC cleavage sequence prevent processing and result in autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) (18). Conversely, ablation of FGF23 in mice leads to hyperphosphatemia resembling FTC (23), and more recently, FGF23 mutations affecting folding and secretion rather than processing have been identified in FTC patients without mutations in GalNAc-T3 (24–26). FGF23 is an *O*-glycosylated glycoprotein of approximately 32 kDa, and *O*-glycosylation has been identified in proximity to the SPC cleavage signal although the actual site of attachments has not been defined yet (15, 20). GalNAc-T3 and FGF23 were found to be co-expressed in a number of tissues (10). FTC patients with GalNAc-T3 mutations have been reported to have an apparent elevation of FGF23 serum levels (20–40 fold) (9, 27), which is in conflict with the finding that FTC patients can have mutations in FGF23 that blocks secretion (26). However, the immunoassay used to detect FGF23 in these patients detects the processed C-terminal fragment and evidence of increased levels of intact active FGF23 are missing (9, 28).

We considered FGF23 as a prime candidate for specific *O*-glycosylation by GalNAc-T3 based on sequence analysis. We tested this hypothesis using the CHO 1d1D system. CHO 1d1D cells are deficient in the UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase which catalyzes the reaction from UDP-glucose to UDP-galactose and UDP-GlcNAc to UDP-GalNAc. Therefore, CHO 1d1D cells cannot synthesize *O*-glycan on proteins by themselves. The defect can be selectively restored by addition of GalNAc and/or Gal. Interestingly, addition of

しかしながら GalNAc-T1 ノックアウトマウスを再試験した結果、リンパ節における B 細胞保持に異常が認められている (6)。*In vivo* における GalNAc 転移酵素アイソフォームの特性を示す一例は *D.melanogaster* において示されており、推定される 15 種類の GalNAc 転移酵素遺伝子のうちの 1 つが *Drosophila* の蛹形成に必須であることが示されている (7, 8)。この分子機構は明らかでないが、この結果は GalNAc 転移酵素アイソフォームに独特の、冗長ではない機能が存在することを示している。近年、GalNAc 転移酵素の 1 つのアイソフォームである、GalNAc-T3 の家族性腫瘍状石灰化症 (FTC) への関与が示されている (9–17)。

B.FGF23の分泌には GalNAc O-グリコシレーションが必要である

最近、我々はリン酸代謝調節因子である繊維芽細胞増殖因子 23(FGF23) の GalNAc-T3 による *O*-グリコシレーションの機能的役割について検討した (1)。FGF23 は生体リン恒常性維持における重要な因子である (18,19)。FGF23 はトランスゴルジネットワークにおいて部分的にスプチリシン様プロプロテインコンベルターゼ (SPC) により、切断のコンセンサス配列である RxxR₁₇₉ (RHTR¹⁷⁹) が存在する Arg¹⁷⁹ および Ser¹⁸⁰ の間で切断される (20–22)。SPC による切断部位に変異が存在するとプロセッシングが阻害され常染色体優性低リン血症性くる病 (ADHR) の原因となることから (18)、このプロセッシングが生体リン恒常性維持には重要であると考えられる。逆にマウスにおいて FGF23 を欠損させると FTC のような高リン血症状態を引き起こし (23)、さらに GalNAc-T3 に変異が見られない FTC 患者において FGF23 の遺伝子変異が FGF23 のプロセッシングではなくフォルディングや分泌に影響を与えることが報告されている (24–26)。FGF23 は *O*-結合型糖鎖を有する 32 kDa の糖タンパク質であり、SPC による切断部位近傍に *O*-結合型糖鎖の存在が示唆されているが、正確な位置については明らかになっていない (15,20)。GalNAc-T3 と FGF23 はいくつかの組織において共発現することが報告されている (10)。GalNAc-T3 に変異を有する FTC 患者では FGF23 の血清レベルの上昇が認められ (20–40 倍) (9,27)、FTC 患者の中には FGF23 の分泌を抑制する遺伝子変異を有する患者がいることと矛盾する (26)。しかしながら、FGF23 の検出に用いられたイムノアッセイはプロセッシングを受けた C 末端断片も検出することから、完全長の FGF23 の血清レベルも上昇するかは不明である (9,28)。

我々は FGF23 のアミノ酸配列より FGF23 が GalNAc-T3 により特異的に *O*-グリコシレーションされるであろうと考えた。この仮説を検証するために CHO 1d1D 細胞システムを用いた。CHO 1d1D 細胞は UDP-glucose を UDP-galactose、あるいは UDP-GlcNAc を UDP-GalNAc に転換する UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-エピメラーゼを欠損している。したがって、CHO 1d1D 細胞自身はタンパク質上に *O*-結合型糖鎖を合成することができない。この欠損は GalNAc および / あるいは Gal を培地に添加することで選択的に回復させることができる。興味深

Fig.1. Anti-myc SDS-PAGE Western blot analysis of culture medium of CHO Id1D cells (adapted from ref.1). Culture media after 72 hr growth were collected and applied to SDS-PAGE. Intact and cleaved FGF23 were detected by anti-myc antibody. Designations: -G, no sugars added; +G/G, both Gal and GalNAc added.

GalNAc alone results in *O*-glycosylation limited to GalNAc with no apparent elongation or sialylation (29), whereas the substitution of GalNAc and Gal leads to a complete restoration of *O*-glycosylation.

As shown in Fig.1, secretion of FGF23 in CHO Id1D cells requires at least *O*-glycosylation with GalNAc, and the level of secretion is dramatically increased when GalNAc-T3 is co-expressed. All cells were characterized for expression of respective genes by immunocytology and SDS-PAGE Western blot analysis. The control β3GnT6 is the enzyme that resides in Golgi apparatus and has a role in elongation of Tn to core 3 structures (GlcNAcβ1-3GalNAcα1-O-Ser/Thr). CHO Id1D cells grown in both GalNAc and Gal produce sialylated core 1 structures, which should account for the apparent higher molecular weight. A faint band of approximately 14 kDa was also observed in medium from all cells, which represents the C-terminal myc-tagged fragment (20). Levels of secreted FGF23 from CHO Id1D FGF23 and the double FGF23 and β3GnT6 transfectants showed low levels, while the GalNAc-T3 transfectant cells showed a marked increase. This increase was especially significant with cells grown in both GalNAc and Gal, which suggests that GalNAc-glycosylation alone promotes secretion to a lesser degree than the more complex glycosylation achieved with addition of Gal and GalNAc.

C. Unique GalNAc-T3 Mediated *O*-Glycosylation of Peptide Substrates from FGF23

To further explore the role of GalNAc-T3, we tested a panel of recombinant human GalNAc-transferases with peptide substrates designed to cover potential *O*-glycosylation sites in FGF23. Shimada *et al.* (20) found evidence of variable *O*-glycosylation in two peptide fragments (a.a.162-175 (1 site), a.a.176-187 (2 sites)) around the furin protease processing site and also *O*-glycosylation in a more C-terminal fragment

いことに GalNAc のみを添加した場合は *O*-グリコシレーションは糖鎖の伸長およびシアリル化を受けることなく GalNAc で止まる (29) が、GalNAc および Gal を添加することで完全な *O*-結合型糖鎖を合成できるようになる。

図 1 に示したように CHO Id1D 細胞からの完全長の FGF23 分泌には少なくとも GalNAc による *O*-グリコシレーションが必要であり、GalNAc-T3 を共発現させた場合にはその分泌レベルが劇的に上昇した。すべての細胞における遺伝子産物の発現は免疫細胞学的手法ならびに SDS-PAGE ウェスタンブロット法により確認した。対照として導入した β3GnT6 はゴルジ体に存在する酵素で Tn 抗原をコア 3 構造 (GlcNAcβ1-3GalNAcα1-O-Ser/Thr) に伸長する酵素である。GalNAc および Gal 存在下で培養された CHO Id1D 細胞はシアリル化されたコア 1 構造を産生するため、より分子量の大きい分子を分泌する。すべての細胞において観察される分子量約 14kDa のバンドは myc 標識された C 末端断片である (20)。CHO Id1D FGF23 細胞および FGF23 と β3GnT6 を共発現させた細胞における FGF23 の分泌レベルは低い GalNAc-T3 を共発現させた細胞では有意に分泌レベルが上昇した。この上昇は GalNAc および Gal を添加した培地で培養した場合に顕著であり、GalNAc のみの *O*-グリコシレーションでは Gal および GalNAc を添加した場合の高度なグリコシレーションが起きている場合に比べ分泌の促進度合いは低かった。

C.FGF23 由来ペプチド基質に対する GalNAc-T3 の特異性

GalNAc-T3 の役割をさらに検証するために我々は数種類の組換え型ヒト GalNAc 転移酵素と FGF23 の *O*-グリコシレーション部位を網羅するように設計したペプチド基質を反応させた。Shimada ら (20) は PEAKrapid 細胞に発現させた変異型 FGF23(R176Q および R179Q) において、furin プロテアーゼ近傍の 2 つのペプチド断片 (アミノ酸 162-175(1 ケ所)、アミノ酸 176-187(2 ケ所)) に *O*-グリコシレーションが存在することを示しており、さらに C 末端側 (アミノ酸 199-228) にも *O*-グ

Fig.2. Schematic representation of FGF23 peptides used *in vitro* assay and summary of substrate specificities of GalNAc-T1, T2, T3, and T4 toward those peptides. GalNAc-attached sites were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry and furin cleavage assay.

(a.a.199-228) of mutant FGF23 (double R176Q and R179Q) expressed in PEAKrapid cells. The actual sites of attachments have not been defined. We focused on the potential Ser/Thr sites around the RHTR furin protease cleavage signal (Fig. 2). GalNAc-T3 was tested together with three other broadly expressed isoforms, GalNAc-T1, -T2 and -T4, with different acceptor substrate specificities (30, 31). While all isoforms utilized Thr¹⁷¹, only GalNAc-T3 incorporated GalNAc into Thr¹⁷⁸. The site of incorporation was determined by MALDI-TOF analysis of the furin protease cleaved product of FGF23b glycopeptides, where the N-terminal peptide fragment was found as the expected mass plus the saccharide component. The studies of *O*-glycosylation of mutant FGF23 by Shimada *et al.* (20) are in agreement with the *in vitro* *O*-glycosylation of Thr¹⁷⁸ as they found two *O*-glycans in the peptide fragment ¹⁷⁶QHTQSAEDDSER¹⁸⁷ with three potential acceptor sites of which Thr¹⁷⁸ and Ser¹⁸⁰ are most likely sites.

D. Specific *O*-Glycosylation of FGF23 Blocks Furin Protease Cleavage of FGF23 Peptides

The peptide FGF23b, which contain the GalNAc-T3 Thr¹⁷⁸ glycosylation site, was used for further studies of the effect of *O*-glycosylation for *in vitro* furin protease cleavage. To demonstrate the validity of this assay, we tested two mutant peptides based on identified mutations in the furin cleavage signal in patients with autosomal dominant hypophosphatemic rickets (18, 22). The wildtype sequences (¹⁷⁶RHTR¹⁷⁹) were efficiently cleaved to the expected fragments, while the R179Q mutant peptide was completely resistant and the R176Q peptide partially resistant to cleavage. A series of glycopeptides with all the expected *O*-glycan glycoforms, which can be produced in CHO cells, were enzymatically synthesized and tested in the furin cleavage assay. Interestingly, GalNAc alone or Galβ1-3GalNAc did not seem to have significant inhibitory effect, while α2,6sialylation on either core blocked cleavage. The α2,3sialylation of Galβ1-3GalNAc did not significantly block either suggesting that the major inhibitory

リコシレーションが存在することを示している。*O*-結合型糖鎖が存在する正確な位置は明らかではない。我々は furin プロテアーゼ認識部位である RHTR 配列近傍の Ser/Thr 残基に着目した (図 2)。GalNAc-T3 と共に、異なる基質特異性を有し広範に発現が認められている他の 3 つのアイソフォーム、GalNAc-T1、T2、および T4 を用いた (30, 31)。すべてのアイソフォームが Thr¹⁷¹ に GalNAc を転移したが、GalNAc-T3 のみが Thr¹⁷⁸ にも GalNAc を転移した。GalNAc 付加位置は furin プロテアーゼにより切断した産物を MALDI-TOF MS で解析し、N 末端側のペプチド断片が、予想される分子量に GalNAc が付加した分子量であったことから同定した。Shimada ら (20) の変異型 FGF23 の *O*-グリコシレーション部位に関する検討では ¹⁷⁶QHTQSAEDDSER¹⁸⁷ において、可能性のある 3 ケ所のうちの 2 ケ所 (Thr¹⁷⁸ および Ser¹⁸⁰ の可能性が高い) に *O*-結合型糖鎖が付加していることが示されており、我々の *in vitro* における検討で Thr¹⁷⁸ が *O*-グリコシレーションされるという結果と矛盾しない。

D.FGF23 上の特異的な *O*-結合型糖鎖が furin プロテアーゼによる FGF23 ペプチドの切断を阻害する

GalNAc-T3 によるグリコシレーション部位である Thr¹⁷⁸ を有する FGF23b ペプチドを用いて *in vitro* における furin プロテアーゼによる切断に対する *O*-グリコシレーションの効果を調べた。このアッセイの妥当性を調べるために常染色体優性低リン血症性くる病 (ADHR) 患者の furin による FGF23 切断配列に同定された変異 (18, 22) に基づき設計した 2 種類のペプチドを用いた。野生型配列 (¹⁷⁶RHTR¹⁷⁹) は予想された断片に完全に切断されたが、R179Q 変異ペプチドは切断されず、R176Q 変異ペプチドは抵抗性を有していた。CHO 細胞において産生される *O*-結合型糖鎖を有するペプチドをすべて酵素的に用意し、furin 切断アッセイを行った。興味深いことに GalNAc のみあるいは Galβ1-3GalNAc には切断阻害効果はなかったが、両コア構造を α2,6 シアリル化した場合に切断阻害が認められた。Galβ1-3GalNAc を α2,3 シアリル化した場合には有意な切断阻害効果がみられなかったことから内部 STn コ

effect is exerted by the inner STn core structure (NeuAc α 2-6GalNAc α 1-O-Thr).

The initiation step of mucin-type *O*-glycosylation is clearly the single glycosidic linkage covered by the highest degree of potential biosynthetic redundancy. Yet, as found in this study, GalNAc-transferase isoforms may serve unique functions in cells where the repertoire of isoforms does not represent appropriate redundancy. The GalNAc-T3 and -T6 subfamily isoforms have identical substrate specificities as revealed by *in vitro* analysis, however, the two isoforms have markedly different cell and tissue expression patterns (32). The finding that GalNAc-T3 deficiency results in such a limited and defined molecular defect is intriguing and may predict the existence of other distinct diseases associated with deficiencies in polypeptide GalNAc-transferase genes. In summary, the study presents the first molecular basis of a disease, hyperphosphatemia in FTC, associated with mutations in a specific GalNAc-transferase isoform.

ア構造 (NeuAc α 2-6GalNAc α 1-O-Thr) により主に阻害効果が得られると考えられる。

ムチン型 *O*-グリコシル化の開始段階は明らかに最も高い冗長性を有する1つのグリコシド結合である。しかし、本研究で明らかになったように、アイソフォームのレパートリーが完全な冗長性を示さない細胞内においてはGalNAc転移酵素のアイソフォームが独特な機能を有している可能性がある。GalNAc-T3およびT6アイソフォームは*in vitro*では同一の基質特異性を有しているが、全く異なる細胞および組織発現パターンを有している(32)。GalNAc-T3の欠損が限られた分子の欠損につながるという知見は大変興味深く、GalNAc転移酵素遺伝子の欠損に関連した他の疾患の存在も示唆している。本研究は特定のGalNAc転移酵素アイソフォームの変異に関連したFTCにおける高リン血症の分子機構を初めて示したものである。

References

1. Kato, K., Jeanneau, C., Tarp, M. A., Benet–Pages, A., Lorenz–Depiereux, B., Bennett, E. P., Mandel, U., Strom, T. M., and Clausen, H. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 18370–18377
2. Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A., and Tabak, L. A. (2003) *Glycobiology* **13**, 1R–16R
3. Hennet, T., Hagen, F. K., Tabak, L. A., and Marth, J. D. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 12070–12074
4. Zhang, Y., Iwasaki, H., Wang, H., Kudo, T., Kalka, T. B., Hennet, T., Kubota, T., Cheng, L., Inaba, N., Gotoh, M., Togayachi, A., Guo, J., Hisatomi, H., Nakajima, K., Nishihara, S., Nakamura, M., Marth, J. D., and Narimatsu, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 573–584
5. Marth, J. D. (1996) *Glycobiology* **6**, 701–705
6. Tenno, M., Ohtsubo, K., Hagen, F. K., Tabak, L. A., and Marth, J. D., (2005) *Glycobiology* **15**, 1238–1239
7. Schwientek, T., Bennett, E. P., Flores, C., Thacker, J., Hollmann, M., Reis, C. A., Behrens, J., Mandel, U., Keck, B., Schafer, M. A., Haselmann, K., Zubarev, R., Roepstorff, P., Burchell, J. M., Taylor–Papadimitriou, J., Hollingsworth, M. A., and Clausen, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 22623–22638
8. Ten Hagen, K. G. and Tran, D. T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 22616–22622
9. Topaz, O., Shurman, D. L., Bergman, R., Indelman, M., Ratajczak, P., Mizrahi, M., Khamaysi, Z., Behar, D., Petronius, D., Friedman, V., Zelikovic, I., Raimier, S., Metzker, A., Richard, G., and Sprecher, E. (2004) *Nat. Genet.* **36**, 579–581
10. Ichikawa, S., Lyles, K. W., and Econs, M. J. (2005) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 2420–2423
11. Spektor, P., Cooper, J. G., Indelman, M., and Sprecher, E. (2006) *J. Hum. Genet.* **51**, 487–490
12. Ichikawa, S., Imel, E. A., Sorenson, A. H., Severe, R., Knudson, P., Harris, G. J., Shaker, J. L., and Econs, M. J. (2006) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 4472–4475
13. Campagnoli, M. F., Pucci, A., Garelli, E., Carando, A., Defilippi, C., Lala, R., Ingrosso, G., Dianzani, I., Forni, M., and Ramenghi, U. (2006) *J. Clin. Pathol.* **59**, 440–442
14. Garringer, H. J., Fisher, C., Larsson, T. E., Davis, S. I., Koller, D. L., Cullen, M. J., Draman, M. S., Conlon, N., Jain, A., Fedarko, N. S., Dasgupta, B., and White, K. E. (2006) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 4037–4042
15. Frishberg, Y., Ito, N., Rinat, C., Yamazaki, Y., Feinstein, S., Urakawa, I., Navon–Elkan, P., Becker–Cohen, R., Yamashita, T., Araya, K., Igarashi, T., Fujita, T., and Fukumoto, S. (2007) *J. Bone Miner. Res.* **22**, 235–242
16. Ichikawa, S., Guignon, V., Imel, E. A., Courouble, M., Heissat, S., Henley, J. D., Sorenson, A. H., Petit, B., Lienhardt, A., and Econs, M. J. (2007) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 1943–1947
17. Barbieri, A. M., Filopanti, M., Bua, G., and Beck–Peccoz, P. (2007) *J. Hum. Genet.* **52**, 464–468
18. White, K. E., Evans, W. E., O’Riordan, J. L. H., Speer, M. C., Econs, M. J., Lorenz–Depiereux, B., Grabowski, M., Meitinger, T., and Strom, T. M. (2000) *Nat. Genet.* **26**, 345–348
19. Shimada, T., Mizutani, S., Muto, T., Yoneya, T., Hino, R., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., and Yamashita, T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6500–6505
20. Shimada, T., Muto, T., Urakawa, I., Yoneya, T., Yamazaki, Y., Okawa, K., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., and Yamashita, T. (2002) *Endocrinology* **143**, 3179–3182
21. Benet–Pages, A., Lorenz–Depiereux, B., Zischka, H., White, K. E., Econs, M. J., and Strom, T. M. (2004) *Bone* **35**, 455–462
22. White, K. E., Carn, G., Lorenz–Depiereux, B., Benet–Pages, A., Strom, T. M., and Econs, M. J. (2001) *Kidney Int.* **60**, 2079–2086
23. Shimada, T., Kakitani, M., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Tomizuka, K., and Yamashita, T. (2004) *J. Clin. Invest.* **113**, 561–568
24. Araya, K., Fukumoto, S., Backenroth, R., Takeuchi, Y., Nakayama, K., Ito, N., Yoshii, N., Yamazaki, Y., Yamashita, T., Silver, J., Igarashi, T., and Fujita, T. (2005) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 5523–5527
25. Larsson, T., Davis, S. I., Garringer, H. J., Mooney, S. D., Draman, M. S., Cullen, M. J., and White, K. E. (2005) *Endocrinology* **146**, 3883–

3891

26. Benet–Pages, A., Orlik, P., Strom, T., and Lorenz–Depiereux, B. (2005) *Hum. Mol. Genet.* **14**, 385–390
27. Chefetz, I., Heller, R., Galli–Tsinopoulou, A., Richard, G., Wollnik, B., Indelman, M., Koerber, F., Topaz, O., Bergman, R., Sprecher, E., and Schoenau, E. (2005) *Hum. Genet.* **118**, 261–266
28. Ito, N., Fukumoto, S., Takeuchi, Y., Yasuda, T., Hasegawa, Y., Takemoto, F., Tajima, T., Dobashi, K., Yamazaki, Y., Yamashita, T., and Fujita, T. (2005) *J. Bone Miner. Metab.* **23**, 435–440
29. Sorensen, A. L., Reis, C. A., Tarp, M. A., Mandel, U., Ramachandran, K., Sankaranarayanan, V., Schwientek, T., Graham, R., Taylor–Papadimitriou, J., Hollingsworth, M. A., Burchell, J., and Clausen, H. (2006) *Glycobiology* **16**, 96–107
30. Bennett, E. P., Hassan, H., Mandel, U., Mirgorodskaya, E., Roepstorff, P., Burchell, J., Taylor–Papadimitriou, J., Hollingsworth, M. A., Merks, G., van Kessel, A. G., Eiberg, H., Steffensen, R., and Clausen, H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 30472–30481
31. Wandall, H. H., Hassan, H., Mirgorodskaya, E., Kristensen, A. K., Roepstorff, P., Bennett, E. P., Nielsen, P. A., Hollingsworth, M. A., Burchell, J., Taylor–Papadimitriou, J., and Clausen, H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23503–23514
32. Bennett, E. P., Hassan, H., Mandel, U., Hollingsworth, M. A., Akisawa, N., Ikematsu, Y., Merks, G., van Kessel, A. G., Olofsson, S., and Clausen, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25362–25370

Received on October 24, 2007, accepted on November 12, 2007

Profile of the Authors

Kentaro Kato has been a research assistant (supervised by Prof. Henrik Clausen) in the Department of Cellular and Molecular Medicine, The Panum Institute, University of Copenhagen, Denmark since May, 2004. He graduated from Hokkaido University in 1997 and received a Ph.D. in Pharmaceutical Sciences from The University of Tokyo in 2004.