Physical Interactions among Human Glycosyltransferases Involved in Dolichol-Linked Oligosaccharide Biosynthesis

ドリコール中間体生合成に関与するヒト糖転移酵素間の物理的相互作用

Takahashi, Tetsuo¹; and Gao, Xiao-Dong²

¹Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University, Hiratsuka, Kanagawa 259-1292, Japan

²The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu Province 214122, China

FAX: 81-463-50-2506, E-mail: tetsuo@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

(Received on February 3, 2012, accepted on February 13, 2012)

Key Words: glycosyltransferase, dolichol-linked oligosaccharide, physical interaction, split-ubiquitin system

Abstract

In eukaryotic glycoproteins, the *N*-glycan plays an important role with respect to both their structure and function. On the rough endoplasmic reticulum (rER) membrane, the *N*-glycan precursor is biosynthesized as a dolichol-linked oligosaccharide (DLO), which consists of fourteen sugars linked to pyrophosphoryl- dolichol. For completion of full-length DLO (Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-dolichol), activities of at least eleven glycosyltransferases localized on the rER membrane are essential. Although twelve human genes for these enzymes have been identified, any physical interactions among them have not yet been systematically analyzed. In this review, we describe several physical interactions among them that were uncovered using the yeast split-ubiquitin system. Moreover, on the basis of observations obtained by this technique, novel models for networking among human glycosyltransferases can be proposed.

要 約

真核細胞が有する糖タンパク質において、*N*-グリカン (*N*-結合型糖鎖) は、構造と機能の両面に関して重要な役割を果たしている。*N*-グリカンの前駆体は、粗面小胞体 (rER) 膜上において、ドリコールピロリン酸に結合した 14 糖からなるドリコール中間体 (DLO) として生合成されている。完全長の DLO (Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-ドリコール) の完成には、rER 膜に局在する少なくとも 11 種類の糖転移酵素の活性が必要不可欠である。これらの酵素に関する 12 種類のヒト遺伝子は既に同定されてはいるものの、酵素間の物理的相互作用は、未だに体系的に解析されてはいない。そこで本稿では、これら酵素間における幾つかの物理的相互作用を述べる。それらは酵母 split-ubiquitin システムを用いることにより明らかにされたものである。さらに、この技法により得られた観察結果に基づくと、ヒト糖転移酵素間のネットワーク形成に関する新たなモデルが提案可能である。

A. Introduction

In eukaryotic cells, the *N*-glycans on glycoproteins play a critical role in their structure and function, influencing various biological phenomena. The *N*-glycan precursor, dolichol-linked oligosaccharide (DLO), is comprised of fourteen sugars that are linked to dolichol via pyrophosphate. The biosynthesis of DLO is an essential process to normal and adaptive behavior of eukaryotic cells, where each monosaccharide is sequentially added to dolichol-phosphate by eleven glycosyltransferases localized on the rough endoplasmic reticulum (rER) membrane. In humans, various deficiencies in this process cause congenital disorder of glycosylation type I (CDG-I), where the number of *N*-glycans per *N*-glycoprotein is diminished (1, 2).

As shown in Fig. 1, early assembly of half-length DLO (Man₅GlcNAc₂-PP-dolichol) on the cytosolic side of the rER membrane involves one *N*-acetylglucosamine

A. はじめに

真核細胞では、糖タンパク質上の *N*-グリカンが、糖タンパク質の構造及び機能については様々な生命現象に重要な役割を果たしている。この *N*-グリカンの前駆物質であるドリコール中間体 (DLO) は、ドリコールに対してピロリン酸を介して結合した 14 の単糖から構成されている。DLO の生合成は、粗面小胞体 (rER) 膜上に局在している 11 種類の糖転移酵素によってドリコールリン酸に対して各単糖が連続的に付加されていく、真核細胞の通常及び適応的な挙動にとって必須な過程である。ヒトにおいてこの過程における様々な不全是、*N*-結合型糖タンパク質あたりの *N*-グリカンの数が減少してしまう先天性グリコシル化異常症 I 型 (CDG-I) を引き起こす (1, 2)。

図 1 に示す通り、rER 膜の細胞質側での半分長 DLO (Man₅GlcNAc₂-PP-ドリコール) の前期集合には、1 種類の *N*-アセチルグルコサミン-1-P 転移酵素 (GPT)、Alg13p と

Fig. 1. The biosynthetic pathway of dolichol-linked oligosaccharide (DLO) on the rough endoplasmic reticulum (rER) membrane in human cells. The first seven steps of DLO biosynthesis are carried out on the cytoplasmic side of the rER membrane. This early DLO assembly involves five glycosyltransferase activities from UDP-GlcNAc and GDP-Man donors to dolichol-phosphate acceptors, including GPT (hAlg7p), NAGT (hAlg13p/hAlg14p complex), and three MTs (hAlg1p, hAlg2p, and hAlg11p). The half-completed DLO assembled on the cytosolic side is then translocated (flipped) to the luminal side of the rER membrane by a putative flippase (hRft1?). The last seven steps of DLO biosynthesis are conducted by three MTs (hAlg3p, hAlg9p, and hAlg12p) and three GTs (hAlg6p, hAlg8p, and hAlg10p) that catalyze the transfer of mannosyl and glucosyl residues from dolichol-P-Man and dolichol-P-Glc donors, respectively.

phosphotransferase (GPT), one *N*-acetylglucosaminyltransferase (NAGT) consisting of Alg13p and Alg14p, and three mannosyltransferases (MT-I, MT-II/III, and MT-IV/V). Then this DLO is translocated from the cytosolic side to the ER luminal side by a putative flippase including the Rft1 protein. Finally, full-length DLO (Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-dolichol) is assembled by three mannosyltransferases (MT-VI, MT-VII/IX, and MT-VIII) and three glucosyltransferases (GT-I, GT-II, and GT-III) on the luminal side of the rER membrane.

Although the human glycosyltransferases mentioned above are all localized on the rER membrane and are considered to coordinately act with each other in order to build up DLO, a comprehensive analysis of the physical interactions among them remains to be reported. Thus, we clarified the possible glycosyltransferase network on the rER membrane by investigating their physical interactions using the yeast split-ubiquitin system, a kind of yeast two-hybrid technique (3).

B. The Yeast Split-Ubiquitin System

For a series of cooperative reactions by several glycosyltransferases in an ordered manner, it is thought that there might be transient and/or stable interactions among

Alg14p から構成される 1 種類の *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (NAGT) 及び 3 種類のマンノース転移酵素 (MT-I、MT-II/III 及び MT-IV/V) が関連している。次に、この DLO は、Rft1 タンパク質を含む仮想的フリッパーゼにより細胞質側から ER 内腔側に転送される。最終的に、完全長 DLO (Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-ドリコール) が、rER 膜の内腔側で 3 種類のマンノース転移酵素 (MT-VI、MT-VII/IX 及び MT-VIII) と 3 種類のグルコース転移酵素 (GT-I、GT-II 及び GT-III) により集合する。

上記のヒト糖転移酵素はいずれも rER 膜に局在する膜タンパク質であり、DLO を作り上げるために互いに協調して働いているものと考えられているものの、酵素間の物理的相互作用に関する包括的な解析は、これまで報告されていなかった。そこで私たちは、酵母ツーハイブリッド技法の 1 種である酵母 split-ubiquitin システム (3) を利用して、*N*-グリカン (DLO) 生合成に関連する rER 膜局在ヒト糖転移酵素間の相互作用を調査することにより、これらの酵素間で考えられる rER 膜上でのネットワークを明らかにした。

B. 酵母 split-ubiquitin システム

幾つかの糖転移酵素による秩序だった一連の協調的な反応には、それらの間に一過のあるいは安定的な相互作用が存在している可能性が考えられる。膜結合した糖転移酵素間の

them. In order to sensitively detect possible interactions among membrane-associated glycosyltransferases *in vivo*, we applied the yeast split-ubiquitin system, a powerful technology that was specially devised for the detection of physical interactions between two membrane proteins (4–6). Using this methodology, various physical interactions among membrane proteins, including enzymes or subunits of an enzymatic complex residing on the rER membrane, have been revealed (7–10).

B-1. Principal for Detection of Physical Interactions between Two Membrane Proteins

In the system, one membrane protein of interest is fused with the Cub-LexA/VP16 (Cub-LV) cassette, the C-terminal half of ubiquitin followed by transcriptional activators LexA and VP16, and expressed in yeast host cells, as seen in Fig. 2. For tagging of the Cub-LV cassette, pBT-N or pBT-STE expression vectors are used to prepare bait constructs (see below). Another membrane protein of interest is fused with Nub, the N-terminal half of ubiquitin, and used as a prey that is co-expressed with the bait in the same cell (Fig. 2).

If the Cub-LV cassette fused to the bait is co-expressed with NubI, a wild-type Nub, of the positive control prey (pAI-Alg5) together in the cytoplasmic side of the rER membrane, Cub and NubI spontaneously associate with each other, thereby forming split-ubiquitin, which in turn is recognized by ubiquitin-specific proteases (UBPs) present in the cytosol. As a result, the LV portion is cleaved from the bait to automatically

*in vivo*における潜在的な相互作用を鋭敏に検出するために私たちは、酵母 split-ubiquitin システムを適用した。このシステムは2つの膜タンパク質間の物理的相互作用を検出するために特別に考案された強力な技術である(4–6)。この方法を利用して、rER膜に局在する酵素または酵素複合体のサブユニットを含む膜タンパク質間の様々な物理的相互作用が、今までに明らかにされている(7–10)。

B-1. 2つの膜タンパク質間の物理的相互作用を検出する原理

図2に見られるように、このシステムにおいて、対象となる膜タンパク質の1つは、ユビキチンのC末端側半分に転写活性化因子 LexA 及び VP16 を連結した Cub-LexA/VP16(Cub-LV) カセットと融合したうえで宿主の酵母細胞で発現される。Cub-LV カセットのタグ付加には、pBT-N 及び pBT-STE 発現ベクターが利用され、ベイトコンストラクトが調製される(以下参照)。もう1つの対象となる膜タンパク質は、ユビキチンのN-末端側半分である Nub と融合して、同一細胞中でベイトと共に発現されるプレイとして使用される(図2)。

仮に rER 膜の細胞質側でベイトに融合した Cub-LV カセットを、陽性コントロールプレイ pAI-Alg5 中の NubI (野生型 Nub) とともに共発現すると、Cub と NubI は自発的に互いと会合し、それによって split-ubiquitin が形成される。形成された split-ubiquitin は、細胞質に存在するユビキチン特異的のプロテアーゼ群(UBPs)により認識され、その結果、LV の部分はベイトから切断された後に自動的に核に移行して、2つのレ

Fig. 2. The yeast split-ubiquitin system. In this system, the yeast ubiquitin gene is artificially split into two segments, one of which codes for the N-terminal half of ubiquitin (Nub), and the other for the C-terminal half of ubiquitin (Cub). NubI (wild-type Nub) and Cub can spontaneously form split-ubiquitin *in vivo*, whereas NubG (mutant Nub) and Cub cannot. However, if NubG is forced to position near Cub, they can associate into split-ubiquitin. In the yeast host cells of the NMY51 strain, bait membrane protein terminally fused with Cub-LexA/VP16 (Cub-LV) is co-expressed with the prey membrane protein terminally fused with NubG. If the bait does not physically interact with a prey such as pDL-Alg5, a negative control prey prepared in this system (left side in the figure), the two reporter genes are not activated because the transcription factor LexA/VP16 (LV) portion of the bait remains to be anchored to the membrane. Conversely, if the bait interacts with the prey (center in the figure), wild-type Cub and mutant NubG can be made into a split-ubiquitin, which is in turn recognized by ubiquitin-specific proteases (UBPs), and the LV portion is released from the bait. Free LV translocates to the nucleus and consequently induces HIS3 and ADE2 expression. However, for this reporter activation, both Cub-LV and NubG portions must be co-expressed on the cytosolic side because UBPs act only in the cytosol (center in the figure). To ascertain whether the Cub-LV portion of the bait is positioned on the cytosolic side, the bait fusion is first co-expressed with pAI-Alg5, a positive control prey prepared in this system. As NubI in pAI-Alg5 can spontaneously associate with Cub without interaction between bait and prey to form split-ubiquitin, only if Cub-LV is expressed in the cytosol, reporters become activated, whereas if it is expressed in the ER lumen, they do not (right side in the figure).

translocate into the nucleus and then transactivate two reporters, *HIS3* and *ADE2* (right side in Fig. 2). Expression of the reporters is detectable by growth examination of co-transformants with bait and prey on synthetic dextrose (SD) minimum medium lacking histidine and adenine (upper in Fig. 2).

In contrast, if the Cub-LV cassette fused to the bait is co-expressed with NubG, a mutant Nub, of the negative control prey (pDL2-Alg5) together in the cytoplasmic side of the rER membrane, Cub and NubG are not able to spontaneously associate with each other, consequently resulting in non-expression of the reporters (left side in Fig. 2).

However, only if the prey itself physically interacts with the bait so that NubG fused to the prey is positioned near Cub fused to the bait, both can complex into split-ubiquitin, leading to reporter expression (center in Fig. 2). For NubG tagging, pPR-N and pPR-STE expression vectors are available to prepare prey constructs (see below). On the basis of reconstitution of split-ubiquitin dependent on the bait-prey interaction and subsequent activation of reporter genes, the yeast split-ubiquitin system detects interactions between two membrane proteins *in vivo*.

B-2. Experimental Procedures

At the beginning of analyses with the yeast split-ubiquitin system, bait constructs were prepared by cloning each human glycosyltransferase gene, described in Fig. 1, into pBT-N and pBT-STE vectors. The pBT-N and pBT-STE vectors are designed for expression of bait proteins, which are N- and C- terminally fused with the Cub-LV cassette, respectively.

Next, to test whether the Cub-LV portion of the bait protein expressed in yeast cells is present in the cytosol, a bait construct was co-expressed with pAI-Alg5, a positive control prey prepared in this system. As NubI in pAI-Alg5 is located in the cytosol and can spontaneously associate with Cub without interactions between the bait and prey to form split-ubiquitin, if Cub-LV of the bait is expressed in the cytosol, reporters in the yeast cell are activated, whereas if it is expressed in the ER lumen, they are not (right side in Fig. 2).

These membrane topological assays of bait termini allow us to select bait and prey constructs available for further analyses of physical interactions with the yeast split-ubiquitin system. Prey constructs were prepared by subcloning each gene from bait constructs to prey vectors, pPR-N and/or pPR-STE. The pPR-N and pPR-STE vectors are designed for expression of prey proteins, which are N- and C- terminally fused with NubG, respectively.

Out of the bait and prey constructs obtained through the process mentioned above, any two (bait and prey) were chosen, and the NMY51 strain, a yeast host cell harboring reporter genes, was co-transformed with their combination.

ポーター遺伝子 *HIS3* 及び *ADE2* を転写活性化する (図2の右側部分)。レポーター発現は、ヒスチジンとアデニンを欠如する合成デキストロース (SD) 最少培地上でのベイト・プレイの共発現株の増殖試験により検出可能である (図2の上部)。

対照的に、もし rER 膜の細胞質側でベイトに融合した Cub-LV カセットを、陰性コントロールプレイ pDL2-Alg5 の NubG (変異型 Nub) とともに共発現する場合は、Cub と NubG は自発的に互いと会合できないため、レポーターの発現は生じない (図2の左側部分)。

しかしながら、プレイ自身がベイトと物理的に相互作用して、その結果、プレイに融合した NubG がベイトに融合した Cub の近傍に配置される場合に限り、両者は split-ubiquitin へと複合体形成してレポーター発現を誘導可能である (図2の中央部分)。NubG タグ付加には pPR-N 及び pPR-STE 発現ベクターが利用可能であり、プレイコンストラクトが調製される (以下参照)。このベイト・プレイ間の相互作用に依存した split-ubiquitin の再構成とその後に生じるレポーター遺伝子の活性化に基づいて、酵母 split-ubiquitin システムは、2つの膜タンパク質間の物理的相互作用を *in vivo* で検出している。

B-2. 実験の手順

まず酵母 split-ubiquitin システムによる解析を開始するにあたり、図1に記載された各ヒト糖転移酵素遺伝子を2種のベクター (pBT3-N 及び pBT3-STE) ヘクローニングすることによってベイトコンストラクトを調製した。なお pBT3-N ベクターは N- 末端に、pBT3-STE ベクターは C- 末端に、Cub-LV カセットを融合したベイトタンパク質を発現するためにそれぞれ設計されている。

次に、酵母細胞内で発現しているベイトタンパク質の Cub-LV 部分が細胞質内に存在しているかどうか調べるため、ベイトコンストラクトをこのシステムで用意されている陽性コントロールプレイ pAI-Alg5 と共発現させた。pAI-Alg5 中の NubI は細胞質中に位置し、ベイト・プレイ間の相互作用が無い状態でも自発的に Cub と結合して split-ubiquitin を形成できるので、もしベイト中の Cub が細胞質で発現するならば酵母細胞内のレポーターは活性化される。一方、それが ER 内腔で発現するならば、レポーターは活性化されない (図2の右側部分)。

ベイト末端についてのこの膜配向性の試験により、酵母 split-ubiquitin システムを用いた物理的相互作用に関するその後の解析に利用可能なベイトコンストラクト及びプレイコンストラクトを選択することが可能になっている。プレイコンストラクトは、ベイトコンストラクトからプレイベクターである pPR-N または pPR-STE へのサブクローニングによって調製された。pPR-N 及び pPR-STE ベクターは、それぞれ N- 末端及び C- 末端に NubG を融合したプレイトタンパク質を発現するために設計されている。

上記の過程を通して取得されたベイトコンストラクト及びプレイコンストラクトから、任意の2つ (ベイトとプレイ) を選び、それらの組み合わせを用いて、レポーター遺伝子を内

Fig. 3. Analyses of physical interactions among glycosyltransferases involved in early (panel A) and late (panel B) assembly of DLO. Red and pink enclosures show strong and weak interactions, respectively. Combinations of each bait construct (pBT-x) with negative control prey (pDL2-Alg5), each prey construct (pPR-x), or positive control prey (pAl-Alg5), were introduced into yeast NMY51 cells harboring two reporter genes (*HIS3* and *ADE2*). Co-transformant cells expressing both bait and prey proteins were selected on synthetic dextrose (SD) minimal medium lacking leucine and tryptophan (SD-LW), then transferred onto SD medium lacking leucine, tryptophan, histidine (SD-LWH), and to SD medium lacking leucine, tryptophan, histidine, and adenine (SD-LWHA), and incubated at 30 °C for 3 days.

we also recently demonstrated that the N-terminal domain of yeast Alg14p is essential for the formation of this enzymatic complex (17), strongly suggesting that the first two steps that initiate DLO synthesis are tightly coupled with each other, and that this process is highly conserved between yeast and humans.

The observation that co-transformants with two components of NAGT, hAlg14p bait and hAlg13p prey, strongly grew on both selective media (Fig. 3A) agrees well with previous reports in which it was demonstrated that they associate with each other with high affinity to form a tight complex, using co-immuno-precipitation assays by ourselves (18) and pull-down assays by another group (19).

C-2. hAlg1p, hAlg2p, and hAlg11p Form a First MT Complex

酵母 Alg14p の N- 末端ドメインがこの酵素複合体の形成に必須であることを実証しており (17)、DLO 合成を開始する最初の 2 段階が互いに強く共役していることと、この過程が酵母とヒトの間で高度に保存されていることが強く示唆される。

NAGT の 2 つの構成成分である hAlg14p ベイトと hAlg13p プレイの二重形質転換株が両選択培地上で強く増殖したという観察結果 (図 3A) は、私たち自身による免疫共沈試験 (18) ともう 1 つのグループによるプルダウン試験 (19) を用いて、それらが高い親和性で互いに会合して強固な複合体を形成していることを実証した以前の報告と良く一致していた。

C -2. hAlg1p, hAlg2p 及び hAlg11p は第 1 の MT 複合体を形成する

前期 DLO 集合に関連する 3 種類のマンノース転移酵素 (hAlg1p, hAlg2p 及び hAlg11p) をベイトとして用いた解析に

In analyses with three mannosyltransferases (hAlg1p, hAlg2p, and hAlg11p) involved in early DLO assembly as baits, each co-transformant with hAlg1p prey grew on SD-LWH medium (Fig. 3A). Moreover, only co-transformants of hAlg1p bait with hAlg1p prey exhibited growth on SD-LWHA medium (Fig. 3A), suggesting stronger interaction of hAlg1p with itself than with hAlg2p or hAlg11p. Furthermore, this observation is completely in accordance with physical interactions among yeast Alg1p, Alg2p, and Alg11p, which were detected with our co-immunoprecipitation experiments (20). Taken together, we found that these mannosyltransferases can associate with each other to form an MT complex that includes hAlg1p, hAlg2p, and hAlg11p in a ratio of 2:1:1, respectively.

C-3. Physical Interaction between the GT/NAGT Complex and the First MT Complex

In the analyses described above, hAlg13p prey, a NAGT component, weakly and equally interacted with four enzyme baits (hAlg7p, hAlg1p, hAlg2p, and hAlg11p) aside from the hAlg14p bait, the original partner (Fig. 3A). These observations suggest that NAGT should physically interact with not only GPT but also the MT complex on the rER membrane. Interestingly, the hAlg11p bait, one enzyme in the MT complex, weakly interacted with hAlg7p prey (Fig. 3A), suggesting that GPT might also physically interact with the MT complex.

D. Human Glycosyltransferases Involved in Late DLO Assembly

In humans, three MTs and three GTs participate in late biosynthesis of full-sized DLO (Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-dolichol) on the luminal side of the rER membrane, like in yeast. These glycosyltransferases are multi-spanning membrane proteins and face the catalytic domain toward rER lumen because they utilize dolichol-phosphate sugars present within the rER as donor substrates (dolichol-P-Man for MTs and dolichol-P-Glc for GTs).

As a result of our analysis of membrane topology, the N-termini of six glycosyltransferase baits were shown to all be localized in the cytosol (note that co-transformants of each bait with positive control prey pAI-Alg5 could grow on both selective media as shown in Fig. 3B). These observations were coincident with a previous report of membrane topological predictions for these enzymes (21). Thus, for these enzymes, pBT-N-based bait constructs were used for further analyses of physical interactions (Fig. 3B).

D-1. hAlg3p, hAlg9p, and hAlg12p Form a Second MT Complex

When three mannosyltransferases (hAlg3p, hAlg9p, and hAlg12p) involved in late DLO assembly were used as baits, each co-transformant with hAlg3p prey grew on SD-

において、hAlg1p プレイとの各二重形質転換株は、SD-LWH 培地上で増殖した (図 3A)。さらに、hAlg1p ベイトの hAlg1p プレイとの二重形質転換株のみは、SD-LWHA 培地上でも増殖性を示した (図 3A)。この結果は、hAlg1p の自身との相互作用の方が hAlg2p または hAlg11p との相互作用よりも強いことを示唆している。さらにこの観察結果は、以前私たちが免疫共沈降実験により検出した酵母の Alg1p、Alg2p 及び Alg11p 間の物理的相互作用 (20) と完全に符合している。総合すると、これらのマンノース転移酵素は互いに相互作用して hAlg1p、hAlg2p 及び hAlg11p をそれぞれ 2:1:1 の割合で含む MT 複合体を形成する可能性があることを私たちは見出した。

C -3. GT/NAGT 複合体と第 1 の MT 複合体の間の物理的相互作用

上記の解析において NAGT の構成成分の 1 つである hAlg13p プレイは、本来のパートナーである hAlg14p ベイトの他に、4 種類の酵素 (hAlg7p、hAlg1p、hAlg2p 及び hAlg11p) ベイトに対して弱くそして同程度に相互作用していた (図 3A)。これらの観察結果は、rER 膜上で NAGT が GPT に対してのみならず、MT 複合体とも物理的に相互作用している可能性が高いことを示唆している。興味深いことに、MT 複合体中の 1 つの酵素である hAlg11p ベイトは、hAlg7p プレイと弱く相互作用しており、これは GPT もまた、MT 複合体と物理的に相互作用している可能性があることを示唆している。

D. 後期 DLO 生合成に働く糖転移酵素

酵母と同様にヒトにおいて、3 種類の MT と 3 種類の GT が、rER 膜の内腔側における全長サイズの DLO(Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-ドリコール)の後期生合成に関与している。これらの糖転移酵素は、複数回膜貫通タンパク質であり、供与体基質として rER 内に存在するドリコールリン酸糖を利用するため (3 種類の MT はドリコールリン酸マンノースを、3 種類の GT はドリコールリン酸グルコースを利用)、触媒ドメインを rER 内腔に向けている。

膜配向性に関する解析の結果、全長サイズの DLO(Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-ドリコール)の後期生合成に働く 6 種類の糖転移酵素ベイトの N-末端は、すべて細胞質に局在化していることが示された (図 3B において、各ベイトの陽性コントロールプレイである pAI-Alg5 との二重形質転換株が、両選択培地上で増殖可能であったことに注目)。これらの観察結果は、以前に報告されたこれらの酵素に関する膜配向性性の予測と完全に一致していた (21)。したがって、これらの酵素に関して、pBT-N に基づいたベイトコンストラクトがさらなる物理的相互作用の解析に使用された (図 3B)。

D-1. hAlg3p、hAlg9p 及び hAlg12p は第 2 の MT 複合体を形成する

後期 DLO 集合に働く 3 種類のマンノース転移酵素 (hAlg3p、hAlg9p 及び hAlg12p) をベイトに使用した場合、hAlg3p プレイとの各二重形質転換株は、SD-LWH 培地上で増殖した

LWH medium (Fig. 3B), indicating that they form a second MT complex (The first one consists of hAlg1p, hAlg2p, and hAlg11p). In addition, it might consist of at least 2:2:2 of each enzyme, because every bait also interacted with the prey of itself (Fig. 3B). Interestingly, only the hAlg9p bait interacted with all three preys (Fig. 3B). The Alg9p catalyzes two steps of four reactions for mannose addition in late DLO biosynthesis (22), suggesting its central role in the complex.

D-2. hAlg6p, hAlg8p, and hAlg10p Form a GT Complex

In analyses with three glucosyltransferases (hAlg6p, hAlg8p, and hAlg10p) involved in late DLO assembly as baits, all co-transformants with each prey grew on SD-LWH medium (Fig. 3B). These observations indicate a closely related relationship among the three GTs, suggesting that this GT complex is firmer than the second MT complex.

D-3. Physical Interaction between the Second MT Complex and the GT Complex

Interestingly, each GT bait tightly interacted with the hAlg3p mannosyltransferase prey, a component of the second MT complex (Fig. 3B). Moreover, hAlg9p and hAlg12p baits weakly interacted with hAlg8p and hAlg10 preys, respectively (Fig. 3B). This evidence suggests that the GT complex should physically associate with the second MT complex to form one supra-complex composed of all enzymes involved in late DLO biosynthesis.

E. Conclusion

E-1. The Significance of Complexes in DLO Biosynthesis

It has been demonstrated that biosynthesis of DLO is essential for maintaining fundamental functions of eukaryotic cells, such as the cell cycle and signaling (23–25). In addition, DLO synthesis is well known to be closely related to the unfolded protein response (UPR). As soon as cellular proteins suffer from physical or chemical stress, the UPR is triggered in rER. In the UPR, ER-associated degradation (ERAD) is quickly induced in order to exclude proteins severely damaged (26), whereas DLO biosynthesis is accelerated in order to refold again and repair mildly damaged proteins (27).

For immediate performance of a series of enzymatic reactions in the UPR, related enzymes should be as cooperative and efficient as possible, and reversibly controlled. One way to achieve such enzymatic conduct is to assemble related enzymes into a complex. With an enzymatic complex system, against one substrate, several enzymes are accessible and capable of acting reciprocally in an extremely short time period. In addition, integrative regulation of several catalytic reactions is able to be easily carried out by forming/deforming a complex or separating certain enzymes from a complex.

E-2. The DLO Assembly Process Possesses Two Potential Supra-Complexes

Considering that fourteen enzymatic reactions catalyzed

(図 3B)。このことは、それらが第 2 の MT 複合体を形成していることを示している (第 1 の MT 複合体は hAlg1p, hAlg2p 及び hAlg11p からなる)。さらにそれは少なくとも 2:2:2 の各酵素から構成されている可能性がある。というのは、すべてのベイトはまた自身のプレイとも相互作用したからである (図 3B)。興味深いことに、hAlg9p ベイトのみが 3 つ全てのプレイと相互作用していた (図 3B)。Alg9p は、後期 DLO 生合成における 4 段階のマンノース付加反応のうちの 2 段階を触媒しており (22)、この複合体における中心的な役割が示唆される。

D-2. hAlg6p, hAlg8p 及び hAlg10p は GT 複合体を形成する

後期 DLO 集合に関連する 3 種類のグルコース転移酵素 (hAlg6p, hAlg8p 及び hAlg10p) をベイトに用いた解析において、各プレイとの二重形質転換株は、すべて SD-LWH 培地上で増殖した (図 3B)。これらの観察結果は、3 種類の GT 間の密接に関連付けられた連携を示しており、GT 複合体が第 2 の MT 複合体よりも強固であることを示唆している。

D-3. 第 2 の MT 複合体と GT 複合体の間の物理的相互作用

興味深いことに、各 GT ベイトは、第 2 の MT 複合体の構成成分の 1 つである hAlg3p マンノース転移酵素プレイと密接に相互作用していた (図 3B)。さらに、hAlg9p 及び hAlg12p のベイトは、それぞれ hAlg8p 及び hAlg10 のプレイと弱く相互作用していた (図 3B)。この証拠は、GT 複合体が第 2 の MT 複合体と物理的に会合し、DLO 生合成後期に関連する全ての酵素から構成される 1 つの超複合体を形成している可能性を示唆している。

E. まとめ

E-1. DLO 生合成における複合体形成の意義

DLO の生合成は、細胞周期、シグナル伝達といった真核細胞の根本的な機能を維持するために必須であることが既の実証されている (23–25)。さらに DLO 合成は、小胞体ストレス応答 (UPR) に密接に関連していることが良く知られている。細胞のタンパク質が物理的あるいは化学的なストレスを被るとすぐに、rER において UPR が誘発される。UPR では、重度の傷害を受けたタンパク質を除去するために小胞体関連分解 (ERAD) が迅速に誘導され (26)、一方で DLO 生合成は、軽度の傷害を受けたタンパク質を再度フォールドして修復するために加速される (27)。

UPR 時の一連の酵素反応の迅速な実行のために、関連する酵素は、可能な限り協調的で効率的であり、かつ可逆的に制御されなければならないであろう。このような酵素の挙動を達成するための 1 つの方法は、関連する酵素を集めて 1 つの複合体を形成することである。酵素による複合体システムを用いると、1 つの基質に対して、極めて短い時間内に、複数の酵素が接触可能であり、かつ相互に作用可能である。さらに、幾つかの触媒反応の統合的な調節は、複合体の形成 / 脱形成あるいは特定の酵素の複合体からの離脱によって容易に実行可能である。

E-2. DLO 集合過程は 2 つの潜在的な超複合体を有する

DLO 生合成が 11 種類の糖転移酵素により触媒される 14

Fig. 4. The network model for human glycosyltransferases involved in DLO biosynthesis on the rER membrane. Arrows of solid and dotted lines indicate strong and weak interactions, respectively. Stacked objects of enzymes represent dimerization (or oligomerization).

by eleven glycosyltransferases constitute DLO biosynthesis, we speculated that there exists one or more complex system(s) for modulating DLO assembly on the rER membrane. In Fig. 4, all the results of our analyses of physical interactions of eleven human glycosyltransferases, revealed with the yeast split-ubiquitin system, are summarized. Based on this model of an enzymatic network, we propose that two supra-complexes exist for regulation of the DLO biosynthetic pathway: one of that comprises an hAlg7p/hAlg14p/hAlg13p complex and an hAlg1p/hAlg2p/hAlg11p complex, and another that includes an hAlg3p/hAlg9p/hAlg12p complex and an hAlg6p/hAlg8p/hAlg10p complex. As the former and the latter should regulate early and late DLO assembly, respectively, we advocate calling the former and the latter supra-complex for early DLO assembly (SCED) and supra-complex for late DLO assembly (SCLD), respectively.

E-3. Possible Regulators in SCED

As described in section C-3, hAlg13p, which associates with hAlg14p, also weakly but equally interacted with hAlg7p, hAlg1p, hAlg2p, and hAlg11p. This suggests that NAGT, composed of hAlg14p and hAlg13p, might be physically located centrally in SCED. Its central positioning proximal to all of the other four enzymes of SCED raises the possibility that it might serve as functional regulator in early DLO assembly. Notably, hAlg13p might play a key role in regulation of SCED, because it can assemble all enzymes involved in SCED, as well as supply hAlg14p localized on the

の酵素反応から成り立っていることを考えると、DLO 集合を調整するための1つまたは複数の複合体システムが、rER 膜上に存在していることが想定された。図4には、酵母 split-ubiquitin システムを用いて私たちが明らかにした、11種類のヒト糖転移酵素に関する物理的相互作用の解析結果のすべてが要約されている。この酵素のネットワークモデルに基づいて、DLO 生合成経路を調節するために2つの超複合体が存在することを、私たちは提案する。その1つは、hAlg7p/hAlg14p/hAlg13p 複合体と hAlg1p/hAlg2p/hAlg11p 複合体から構成され、もう1つは、hAlg3p/hAlg9p/hAlg12p 複合体と hAlg6p/hAlg8p/hAlg10p 複合体を含んでいる。前者は前期、後者は後期の DLO 集合をそれぞれ調節しているに違いないので、私たちは、前者を前期 DLO 集合用超複合体 (SCED)、後者を後期 DLO 集合用超複合体 (SCLD) とそれぞれ呼ぶことを提唱する。

E-3. SCED における可能な調節因子

C-3の項目中で述べた通り、hAlg14p と会合している hAlg13p はまた、hAlg7p、hAlg1p、hAlg2p 及び hAlg11p とも弱いながらも等しく相互作用していた。このことは、hAlg14p と hAlg13p からなる NAGT が物理的に SCED の中心に位置づけられている可能性を示唆している。SCED の他の4種類すべての酵素に対して近位となるその中心的な位置取りは、前期 DLO 集合においてそれが機能的な調節因子として働いている可能性を想起させる。特に、hAlg13p は、rER 膜に局在する hAlg14p に細胞質に存在する UDP-GlcNAc を供給すると同時に、SCED に関与するすべての酵素を集合可能なことから、

rER membrane with UDP-GlcNAc present in the cytoplasm. As discussed in section E-1, the behavior of hAlg13p is considered to be suitable for regulating the rapid formation/deformation of SCED. Indeed, we have also demonstrated that the C-terminus of yeast Alg13p is important for both targeting for proteasomal degradation (28) and interacting with yeast Alg14p (29).

In contrast, hAlg14p interacted with none of the three MTs, though its physical interaction with hAlg13p and hAlg7p was strong (Fig. 3A), suggesting that SCED might be transiently formed *via* hAlg13p in the physiological environment.

As an alternative regulatory mechanism of SCED, feedback regulation of GPT by an MT complex may exist, because we detected a weak interaction between hAlg11p bait and hAlg7p prey (Fig. 3A). It is noteworthy that only hAlg11p, which acts in the final two steps of early DLO assembly, out of three MTs was proximal to hAlg7p that initiates DLO synthesis. It has been demonstrated that GlcNAc2-PP-dolichol, a product by NAGT, competitively inhibits GPT activity in chicks' microsomes (30). To address whether a similar regulatory mechanism by hAlg11p exists, investigation of the enzyme kinetics should be performed.

E-4. Possible regulator in SCLD

In contrast to SCED, it seems that SCLD is stably maintained on the rER membrane, because there were more interactions detected by the split-ubiquitin system in SCLD than in SCED, and each interaction also tended to be relatively strong. In section D-3, we pointed out that all glycosyltransferases in SCLD interacted with hAlg3p. This observation raises the possibility that hAlg3p serves not only as an initiator, but also as a regulator of late DLO assembly. If hAlg3p in SCLD monitors each step during late DLO biosynthesis, quite efficient and accurate regulation might be accomplished.

E-5. Other Possible Regulator(s) in SCED and SCLD

Probably SCED and/or SCLD include enzymes (or proteins) other than the glycosyltransferases examined above as components. In the human DLO assembly pathway, a variety of enzymes (or proteins) such as the dolichol-P-Man synthase (DPMS) complex, which consists of hDPM1, hDPM2, and hDPM3, the proteins dolichol-P-Glc synthase, hRft1 protein, hMPDU1 protein, dolichol kinase, and dolichyl pyrophosphate phosphatase are indirectly involved. In particular, hRft1 protein could serve as a bridge between SCED and SCLD. In addition, the DPMS complex and hMPDU1 protein are also involved in both the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and the *O*-mannosylation pathway, which are present on the luminal side of the rER membrane, as well as in DLO biosynthesis, in order to supply dolichol-P-Man as a donor substrate. Thus,

SCED の調節において鍵となる役割を果たしている可能性がある。E-1 の項目で論じた通り、hAlg13p の挙動は、SCED の迅速な集合 / 脱集合を調節するのに適していると考えられる。実際に私たちはまた、酵母 Alg13p の C-末端が、プロテアソーム分解への標的化 (28) 及び酵母 Alg14p との相互作用 (29) の両方にとって重要であることも既の実証している。

予想に反して、hAlg14p は、hAlg13p や hAlg7p との物理的相互作用は強かったものの、3 種類の MT のどれとも相互作用しなかった (図 3A)。これは、生理的環境下で SCED は hAlg13p を介してただ一過的に形成されるだけなのかもしれないことを示唆している。

SCED の別の調節機構として、MT 複合体による GPT のフィードバック調節が存在するかもしれない。なぜならば私たちは、hAlg11p ベイトと hAlg7 プレイ間の弱い相互作用を検出したからである (図 3A)。3 種類の MT のうちで、前期 DLO 集合の最終 2 段階に働く hAlg11p のみが DLO 合成を開始する hAlg7p に対して近位であったことは注目に値する。NAGT による生成産物である GlcNAc2-PP-ドリコールは競合的に GPT 酵素活性を阻害することが、ヒヨコのミクロソームを用いて既の実証されている (30)。hAlg11p による同様な調節機構が存在するかどうかに取り組むためには、酵素反応論の調査が実行されなければならない。

E-4. SCLD における可能な調節因子

SCED とは対照的に、SCLD は rER 膜上で比較的安定に維持されているように見える。というのは、split-ubiquitin システムにより検出された相互作用は、SCED 中よりも SCLD 中の方が多く存在し、また各相互作用も比較的強い傾向にあったからである。D-3 の項目で私たちは、SCLD 中の糖転移酵素すべてが hAlg3p と相互作用していることを指摘した。この観察結果は、hAlg3p が後期 DLO 集合の開始因子としてのみならず、調節因子としても働いている可能性を提起している。仮に SCLD 中の hAlg3p が後期 DLO 集合の期間に各段階を監視しているとすれば、極めて効率的で正確な調節が達成されるであろう。

E-5. SCED 及び DCLD における他の可能な調節因子

おそらく SCED または SCLD は、上で調べられた糖転移酵素以外の酵素 (あるいはタンパク質) を構成成分として含んでいるであろう。ヒトの DLO 集合経路には、hDPM1、hDPM2 及び hDPM3 からなるドリコールリン酸マンノース合成酵素 (DPMS) 複合体、ドリコールリン酸グルコース合成酵素、hRft1 タンパク質、hMPDU1 タンパク質、ドリコールキナーゼ及びドリコールピロリン酸ホスファターゼといった酵素 (あるいはタンパク質) が、間接的に関与している。特に hRft1 タンパク質は、SCED と SCLD の間の仲立ちとして機能している可能性がある。加えて、DPMS 複合体と hMPDU1 タンパク質は、rER 膜の内腔側に存在するグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー生合成と *O*-マンノシル化経路の両方にも DLO 生合成と同様に関与しており、供与体基質とし

more extensive analyses of physical interactions should be applied to rER resident enzymes related to the three types of glycosylation pathway to elucidate the regulatory mechanisms in glycan biosynthesis that occur in the rER. Screening for unknown physical interactions among these enzymes with the yeast split-ubiquitin system is in progress and has already identified several interesting ones (our unpublished observations).

E-6. Perspectives

In section A, we mentioned the human hereditary disease CDG-I. Any defect in human glycosyltransferase activities involved in the DLO biosynthetic pathway can lead to CDG-I. We previously identified the *HMT-1* gene, orthologous to the yeast *ALG1* (31), which encodes human MT-I (32). Since then, it has been demonstrated by several groups that dysfunction of *HMT-1* results in CDG-Ik (33–36). Of seven substitutional mutations reported to drastically decrease MT-I activity, S150R and G145D mutations are notable, because Ser¹⁵⁰ and Gly¹⁴⁵ residues of human MT-I are neither conserved nor located within a conserved domain. If these substitutions do not severely impair the substrate recognition domain, the transmembrane domain, or the overall structure and stability of the enzyme, they might impair a local domain crucial for physical interactions with itself or other enzymes. Our analyses with the yeast split-ubiquitin system will help to elucidate the effects of such mutations where the pathogenic nature remains to be explained.

Depending on the necessity of *N*-glycans or *N*-glycoproteins, eukaryotic organisms appear to have different demands for DLO biosynthesis (37). We have also performed similar analyses for the yeast glycosyltransferases involved in DLO assembly. Yeast mutants defective in DLO assembly have been reported to have increased sensitivities toward antifungal drugs (38). In comparison between human and yeast enzymatic networks, there exist differences in the intensity of several physical interactions (our unpublished observations). By focusing on such differences and further analyzing them in detail, such as defining the domains necessary for interaction and determining their conformation, we can develop basic antifungal agents that can specifically inhibit certain fungal glycosyltransferase activities on the basis of blocking optional physical interactions between two membrane proteins (39).

Acknowledgments

We thank Dr. Kazuya Kabayama (Institute of Glycoscience, Tokai University) for giving us the opportunity of writing this review. We also thank Dr. Hiroyuki Tachikawa (Graduate School of Agricultural and Life Science, University of Tokyo) for supporting this work in various aspects. This work was partially supported by two subsidies for activating educational institutions of Tokai University.

でのドリコールリン酸マンノースを供給している。したがって、rER で生じている糖鎖生合成における調節機構を解明するためには、物理的相互作用に関するより一層広範な解析が、3 種類のグリコシル化経路に関連する rER 局在酵素に対して適用されるべきであろう。酵母 split-ubiquitin システムを用いたそれら酵素間の未知の物理的相互作用に関するスクリーニングは現在進行中であり、既に幾つかの興味深い相互作用を同定している (私たちの未公表の観察結果による)。

E-6. 展 望

A の項目で私たちは、ヒト遺伝病である CDG-I 型について触れた。DLO 生合成経路に関連する ヒト糖転移酵素活性におけるいかなる欠陥も CDG-I を導きうる。私たちは、ヒト MT-I をコードし、酵母 *ALG1*(31) の相同遺伝子である *HMT-1* 遺伝子を以前に同定した (32)。それ以来、幾つかのグループにより *HMT-1* の機能不全は、CDG-Ik を生じることが実証されている (33–36)。MT-I 活性を劇的に減少させることが報告されている 7 つの置換変異の中で、S150R 変異及び G145D 変異は注目値する。というのは、ヒト MT-I の Ser¹⁵⁰ 残基及び Gly¹⁴⁵ 残基は、保存されてもおらず、保存性のドメイン内にも位置していないからである。仮にこれらの置換が、酵素の基質認識ドメイン、膜貫通ドメインあるいは全体の構造及び安定性を重度に障害しないとすれば、それらは自身あるいは他の酵素との物理的相互作用に重要な局所的なドメインを障害している可能性がある。酵母 split-ubiquitin システムを利用した私たちの解析は、病因となる本質が未だ充分説明されていない、このような変異の効果を解明するのに役に立つであろう。

N-グリカンまたは *N*-型糖タンパク質の必要性に応じて、真核生物は、DLO 生合成に関する要求性が異なっていると考えられる (37)。私たちはまた、DLO 集合に関連する酵母の糖転移酵素に関しても同様の解析を行ってきた。DLO 集合に欠陥を有する酵母変異株は、抗真菌剤に対する感受性を増大させていることが報告されている (38)。ヒトと酵母の間で、酵素ネットワークを比較すると、幾つかの物理的相互作用の強度に差異が存在している (私たちの未公表の観察結果による)。今後これらの違いに着目し、相互作用に必要なドメインの限定やその高次構造の決定などのより詳細な解析をさらに行うことによって、2 つの膜タンパク質間の任意の物理的相互作用の封鎖に基づいて特定の真菌糖転移酵素活性を特異的に阻害可能な抗真菌剤の開発が可能になるであろう (39)。

謝 辞

本稿の執筆の機会を与えていただいた東海大学糖鎖科学研究所の樺山一哉博士に感謝いたします。また、この研究を様々な局面で支えていただいた東京大学大学院農学生命科学研究科の舘川宏之博士にも感謝いたします。なお本研究は、遂行にあたり、二回の東海大学学部等研究教育補助金のご援助を頂きました。

References

1. Cantagrel, V., and Lefeber, D. J. (2011) *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 859–867.
2. Haeuptle, M., and Henner, T. (2009) *Hum. Mutat.* **30**, 1628–1641.
3. Johnsson, N., and Varshavsky, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10340–10344.
4. Stagljär, I., Korostensky, C., Johnsson, N., and te Heesen, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5187–5192.
5. Fetchko, M., and Stagljär, I. (2004) *Methods* **32**, 349–362.
6. Thaminy, S., Miller, J., and Stagljär, I. (2004) *Methods. Mol. Biol.* **261**, 297–312.
7. Dünwald, M., Varshavsky, A., and Johnsson, N. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 329–344.
8. Massaad, M. J., and Herscovics, A. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 4629–4635.
9. Scheper, W., Thaminy, S., Kais, S., Stagljär, I., and Römisch, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 37998–38003.
10. Yan, A., and Lennarz, W. J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 7121–7126.
11. Dan, N., Middleton, B., and Lehrman, M. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30717–30724.
12. Averbek, N., Keppler-Ross, S., and Dean, N. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 29081–29088.
13. Kämpf, M., Absmanner, B., Schwarz, M., and Lehle, L. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 11900–11912.
14. Absmanner, B., Schmeiser, V., Kämpf, M., and Lehle, L. (2010) *Biochem. J.* **426**, 205–217.
15. Dan, N., and Lehrman, M. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14214–14219.
16. Noffz, C., Keppler-Ross, S., and Dean, N. (2009) *Glycobiology* **19**, 472–478.
17. Lu, J., Takahashi, T., Ohoka, A., Nakajima, K. I., Hashimoto, R., Miura, N., Tachikawa, H., and Gao, X. -D. (2012) *Glycobiology* **22**, 504–516.
18. Gao, X. -D., Tachikawa, H., Sato, T., Jigami, Y., and Dean, N. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 36254–36262.
19. Bickel, T., Lehle, L., Schwarz, M., Aebi, M., and Jakob, C. A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 34500–34506.
20. Gao, X. -D., Nishikawa, A., and Dean, N. (2004) *Glycobiology* **14**, 559–570.
21. Oriol, R., Martinez-Duncker, I., Chantret, I., Mollicone, R., and Codogno, P. (2002) *Mol. Biol. Evol.* **19**, 1451–1463.
22. Frank, C. G., and Aebi, M. (2005) *Glycobiology* **15**, 1156–1163.
23. Benton, B. K., Plump, S. D., Roos, J., Lennarz, W. J., and Cross, F. R. (1996) *Curr. Genet.* **29**, 106–113.
24. Kukuruzinska, M. A., and Lennon-Hopkins, K. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 359–372.
25. Mendelsohn, R. D., Helmerhorst, E. J., Cipollo, J. F., Kukuruzinska, M. A. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1723**, 33–44.
26. Bagola, K., Mehnert, M., Jarosch, E., and Sommer, T. (2011) *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 925–936.
27. Shang, J., Korner, C., Freeze, H., and Lehrman, M. A. (2002) *Glycobiology* **12**, 307–317.
28. Averbek, N., Gao, X. -D., Nishimura, S., and Dean, N. (2008) *Mol. Biol. Cell* **19**, 2169–2178.
29. Gao, X. -D., Moriyama, S., Miura, N., Dean, N., and Nishimura, S. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 32534–32541.
30. Kean, E. L., Wei, Z., Anderson, V. E., Zhang, N., and Sayre, L. M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 34072–34082.
31. Couto, J. R., Huffaker, T. C., and Robbins, P. W. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 378–382.
32. Takahashi, T., Honda, R., and Nishikawa, Y. (2000) *Glycobiology* **10**, 321–327.
33. Schwarz, M., Thiel, C., Lubbehusen, J., Dorland, B., de Koning, T., von Figura, K., Lehle, L., and Korner, C. (2004) *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 472–481.
34. Kranz, C., Denecke, J., Lehle, L., Sohlbach, K., Jeske, S., Meinhardt, F., Rossi, R., Gudowius, S., and Marquardt, T. (2004) *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 545–551.
35. Grubenmann, C. E., Frank, C. G., Hulsmeier, A. J., Schollen, E., Matthijs, G., Mayatepek, E., Berger, E. G., Aebi, M., and Henner, T. (2004) *Hum. Mol. Genet.* **13**, 535–542.
36. Dupre, T., Vuillaumier-Barrot, S., Chantret, I., Yaye, H. S., Le Bizec, C., Afenjar, A., Altuzarra, C., Barnerias, C., Burglen, L., de Lonlay, P., Feillet, F., Napuri, S., Seta, N., and Moore, S. E. H. (2010) *J. Med. Genet.* **47**, 729–735.
37. Samuelson, J., Banerjee, S., Magnell, P., Cul, J., Kelleher, D. J., Gilmore, R., and Robbins, P. W. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1548–1553.
38. Juchimiuk, M., Pasikowska, M., Zatorska, E., Laudy, A. E., Smoleńska-Sym, G., and Palamarczyk, G. (2010) *Yeast* **27**, 637–645.
39. Fetchko, M., Auerbach, D., and Stagljär, I. (2003) *BioDrugs* **17**, 413–424.

Profile of the Authors

of glycosyltransferase.

Tetsuo Takahashi graduated from the Faculty of Agriculture, the University of Tokyo in 1988 and received his Ph.D. in 1993 at the Graduate School of Agricultural and Life Science, the University of Tokyo (Prof. Kazukiyo Onodera). He worked in the Department of Industrial Chemistry, School of Engineering, Tokai University, as a research associate in 1993, as a lecturer from 1994 to 1998, and then as an assistant professor from 1999 to 2000. Due to restructuring of undergraduate faculties and departments, he belonged to the Department of Applied Biochemistry in the same institution from 2001 to 2006, and has worked as an associate professor since 2007. His current research interests are structural and regulatory mechanisms of eukaryotic *N*-glycosylation pathway in ER, in particular behavior

of the Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University at Wuxi. His research interests focus on the biosynthesis pathway of *N*-linked glycosylation in eukaryotic cells

Xiao-Dong Gao received his Ph.D. in 1994 at the Graduate School of Agricultural and Life Science, University of Tokyo (advisor: Prof. Kazukiyo Onodera), and then joined the laboratory of Prof. Yoshifumi Jigami as a postdoctoral fellow at National Institute of Bioscience and Human Technology. From 1998 to 2002, he worked as a research scientist in the laboratory of Prof. Neta Dean at State University of New York at Stony Brook (SUNY), USA, and became an assistant professor at SUNY in April of 2002. In 2003, he returned to the Research Institute for Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) as a senior research scientist, and then in 2006, moved to Hokkaido University where he has been working for 5 years as an associate professor in the Graduate School of Life Science. Recently, he returned home to China where he is the deputy director