Functional Analysis of β 1,3-*N*-Acetylglucosaminyltransferases and Regulation of Immunological Function by Polylactosamine

β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素の機能解析と ポリラクトサミン糖鎖による免疫機能調節

Togayachi, Akira; and Narimatsu, Hisashi

Functional Glycoproteomics Team, Research Center for Medical Glycoscience (RCMG), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central-2 OSL, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki 305-8568, Japan
FAX: 81-29-861-3201, E-mail: a.togayachi@aist.go.jp

(Received on April 4, 2012, accepted on April 16, 2012)

Key Words: glycogene, glycosyltransferase, polylactosamine, beta-1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase, immunological function

Abstract

We have cloned many genes of β 1,3-glycosyltransferases, which transfer sugars *via* a β 1,3-linkage, and have characterized their biological functions. Among β 1,3-glycosyltransferases, β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferases (β 3GnTs) synthesize a unique carbohydrate structure known as “polylactosamine (poly-*N*-acetylactosamine)”. Polylactosamine is carried on *N*- and *O*-glycans, and on glycolipids. Polylactosamine structures are considered to be integral components serving as a fundamental structure and backbone for carbohydrate structures. However, most of their biological functions are still unknown. To investigate the *in vivo* function of polylactosamine on glycoconjugates, we generated and analyzed two mouse lines of β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (*B3gnt*)-deficient (*B3gnt2*^{-/-} or *B3gnt5*^{-/-}) mice lacking the polylactosamine structure.

First, to investigate the *in vivo* function of polylactosamine on glycoproteins, we analyzed gene knockout mice lacking *B3gnt2*, which synthesizes polylactosamine on glycoproteins. In *B3gnt2*^{-/-} mice, glycan analysis demonstrated that the amount of long polylactosamine chains on *N*-glycan was greatly reduced in the tissues of *B3gnt2*^{-/-} mice. We also examined immunological responses in *B3gnt2*^{-/-} mice. *B3gnt2*^{-/-} lymphocytes showed hyperactivation *via* TCR/CD28 or BCR stimulation.

Next, to investigate the *in vivo* function of polylactosamine on glycosphingolipids (glycolipid), we analyzed *B3gnt5*^{-/-} mice lacking lacto/neolacto-series glycolipids. *B3gnt5*^{-/-} B cells showed an abnormality of glycolipid-enriched microdomains (GEMs; also known as glycolipid rafts) and showed hyperactivation *via* BCR-related molecules in GEMs, as compared with wild-type (WT) B cells.

Polylactosamine deficiency seems to be involved in

要 約

我々は、 β 1,3-結合で糖を転移する糖転移酵素群に属する多数の遺伝子の単離と機能解析を進めてきた。これらの β 1,3-結合糖転移酵素のうち、 β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素群は「ポリラクトサミン(polylactosamine、正式にはポリ-*N*-アセチルラクトサミン: poly-*N*-acetylactosamine と称する)」と呼ばれる特徴的な糖鎖構造を合成する。このポリラクトサミン糖鎖構造は糖タンパク質 (*O*-glycan、*N*-glycan) や糖脂質上に存在している。ポリラクトサミン糖鎖は、糖鎖の基幹的な構造を形成しており、非常に重要な構造のひとつであると考えられている。しかしながら、その生体内における機能はあまりよく分かっていない。そこで、我々はポリラクトサミン鎖合成に関与する β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素のうち、2つの酵素の遺伝子ノックアウトマウス(*B3gnt2*^{-/-}マウス、*B3gnt5*^{-/-}マウス)を作製し、その表現型を中心に解析を行うこととした。

まず、糖タンパク質上のポリラクトサミンの生体内機能を解析するために、糖タンパク質上のポリラクトサミンの合成に関与する、 β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素2 (*B3gnt2*) 遺伝子ノックアウト (*B3gnt2*^{-/-}) マウスを解析した結果、この *B3gnt2*^{-/-} マウスでは糖タンパク質の *N*-glycan 上の長鎖ポリラクトサミン構造が有意に減少しており、*B3gnt2*^{-/-} リンパ球では TCR/CD28 分子あるいは BCR 分子を介した免疫活性化の亢進を起こしていた。

次に、糖脂質上のポリラクトサミンの生体内機能を解析するために、ラクト/ネオラクト系列糖脂質が欠損している、 β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素5 (*B3gnt5*) 遺伝子ノックアウト (*B3gnt5*^{-/-}) マウスを用いて解析を行った。*B3gnt5*^{-/-} マウス由来 B 細胞では、糖脂質マイクロドメイン構造 (GEM: glycosphingolipids-enriched microdomain あるいは糖脂質ラフト構造とも言われている) の形成異常が観察され、*B3gnt5*^{-/-} B 細胞では野生型マウスに比較して GEM 構造内の BCR 関連分子を介した免疫反応性の亢進が確認された。

the immunological disorders observed in these mice. Taken together, these studies suggest that the polylectosamine chain is a putative immune regulatory factor that presumably suppresses excessive responses during immune reactions and has an important biological role in the immune system.

A. Introduction

Polylectosamine-containing repeats of the *N*-acetyllectosamine (LacNAc) unit (Gal[galactose] β 1-4GlcNAc[*N*-acetylglucosamine] β 1-3)_n represent a fundamental structure of glycans carried on *N*-, and *O*-glycans, as well as on glycosphingolipids (glycolipids) (1–3) (Fig. 1A). Polylectosamine is coordinately synthesized by the alternative action of a β 1,4-galactosyltransferase (β 4GalT) and a β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (β 3GnT) (4). It is considered that polylectosamine chains form an important scaffold that serves as a backbone for the carbohydrate structures.

The human blood group i antigen structure and I antigen structure have been characterized as linear and β 1-6-branching polylectosamine structures, respectively (5, 6). It is also known that polylectosamine functions as a ligand for some endogenous lectins such as galectins (7). This indicates that the polylectosamine structure is a biofunctional carbohydrate structure. Furthermore, polylectosamine chains are further modified by the addition of different carbohydrate antigens such as Lewis blood group antigens, including Lewis x (Le^x , CD15, SSEA-1) antigen, HNK-1 (CD57) antigen, and keratan sulfate, which is a glycosaminoglycan containing sulfated polylectosamine. Therefore, it seems that polylectosamine plays many roles in biological processes by bearing various functional carbohydrate antigens on its structure.

For example, it is well known that sialyl Lewis x (sLe^x , CD15s) antigens exist on the non-reducing end of polylectosamine structures. sLe^x structure functions as a ligand for adhesion molecules such as selectin on lymphocyte homing. sLe^x antigen is an important structure for lymphocyte accumulation and infiltration to inflammation sites (8–11). This suggested that the polylectosamine structure might be related to lymphocyte homing. In addition, the length of the polylectosamine chain is also an important factor in immune responses. Polylectosamine inhibits NK cell-mediated cytotoxicity during binding to the target cell (12). On the other hand, it is considered that sLe^x on polylectosamine and the length of the polylectosamine chain is related to malignancy (cancer metastasis). In cancer metastasis, both highly and poorly metastatic tumor cells derived from the same patient were found to express almost the same amount of sLe^x antigens, regardless of different metastatic ability.

ポリラクトサミン糖鎖の欠損がこれらのマウスで観察された免疫異常を及ぼしているようである。本研究により、ポリラクトサミン糖鎖が過剰な免疫反応に抑制的に働いていることが示唆され、ポリラクトサミン糖鎖が免疫システムにおいて重要な機能を担っていることが明らかになった。

A. はじめに

ポリラクトサミン糖鎖構造はガラクトース (Gal) と *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β 1,4 結合した *N*-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3) を 1 ユニットとする繰り返し構造をとり、糖タンパク質 (*N*-glycan、*O*-glycan) あるいは糖脂質上に存在する (1–3) (図 1A)。ポリラクトサミン構造は、 β 1,4-ガラクトース転移酵素 (β 1,4-galactosyltransferase) と β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase) とが交互に糖を転移する協調的な働きにより生合成される (4)。多くの糖鎖構造の中でも、ポリラクトサミン糖鎖構造は、糖鎖の基幹的な構造を形成するものとして、非常に重要であると考えられている。

ポリラクトサミンは血液型 (Ii 式) 関連糖鎖である i 抗原としても知られ、GlcNAc 糖残基で β 1,6-分岐した構造を有する場合には I 抗原と呼ばれる (5, 6)。ポリラクトサミンの構造自体が、ガレクチン (Galectin) のような内在性レクチンのリガンドとして機能 (7) することから、ポリラクトサミン構造は機能糖のひとつであると言える。また、ポリラクトサミン糖鎖の構造上やその非還元末端には、ルイス x (Lewis x: Le^x , CD15, SSEA-1) 抗原などのルイス式血液型関連糖鎖抗原 (63–65)、HNK-1 抗原 (CD57 抗原) (27–29)、ポリラクトサミン糖鎖を母核としたグリコサミノグリカンであるケラタン硫酸糖鎖構造などが形成されることが知られている。従って、ポリラクトサミンは様々な機能性糖鎖構造を担うことで、種々の生命現象に関与するようである。

例えば、ポリラクトサミンの非還元末端にはシアリルルイス x 糖鎖抗原が存在することは良く知られている。シアリルルイス x (sialyl Lewis x: sLe^x , CD15s) 抗原は、接着分子セレクトインのリガンドとして血球細胞のホーミング時に作用する糖鎖構造で、血球細胞の炎症部位への集積、浸潤に必要な分子である (8–11) ので、 sLe^x 糖鎖抗原を担うポリラクトサミンも血球細胞のホーミングに関与すると考えることが出来る。加えて、ポリラクトサミン鎖の長さは免疫反応における重要な因子でもある。NK 細胞の標的細胞の結合過程 (認識過程) において、ポリラクトサミンが NK 細胞の細胞障害活性を抑制することも知られている (12)。また、このポリラクトサミン上の sLe^x 糖鎖抗原や、ポリラクトサミン糖鎖の長さは、がんの悪性度 (転移能) に関係していると考えられている。例えば、同一患者由来の 2 つのがん細胞株では、それぞれ高転移性株あるいは低転移性株として転移性が異なっていたが、発現している sLe^x 糖鎖抗原量はほぼ同じであった。しかしながら、低転移性の細胞株では、より短いポリラクトサミン鎖

However, sLe^x in *N*-glycans with a shorter poly lactosamine chain is more abundant in poorly metastatic colon carcinoma cells (13). These results suggested that both poly lactosamine structure and length might also be important in tumor malignancy and cell–cell interactions. Thus, it is thought that the poly lactosamine structure has various biological functions, either direct or indirect.

At present, many biological functions of poly lactosamine have been identified *in vitro*, but little is known of their functions *in vivo* and their molecular mechanisms.

B. Cloning of a Set of β 1,3-*N*-Acetylglucosaminyltransferases Involved in Synthesis of Poly lactosamine Chains

The first cloned glycosyltransferase gene, β 1,4-galactosyltransferase I (β 4GalT1), was cloned and characterized by Narimatsu *et al.* in 1986 (14). Thereafter, many glycosyltransferase genes have been cloned by enzyme purification, expression cloning, searching for homologous genes by Southern Blot analysis, and PCR cloning with degenerate primers. In addition, the biological functions of glycosyltransferases have been characterized. As a consequence of recent improvements in database construction and bioinformatics technology, *in silico* cloning of glycosyltransferase genes has become the mainstream technique. Currently, over 186 kinds of glycosyltransferase gene have been isolated and characterized by many laboratories. As a result, it has been found that the glycosyltransferase genes form several subfamilies, and that the amino acid sequences in these subfamilies contain well-conserved motifs. It is known that glycosyltransferases have some specificity. The properties conserved in each subfamily reflect their enzymatic character as follows: (1) donor specificity, (2) acceptor specificity (sequence of carbohydrate chains), and (3) anomer specificity (specificity for anomeric bond; *i.e.*, the specific linkage between donor and acceptor).

As described above, gene cloning by database (*in silico*) searching has become mainstream in recent years. Our group and many others have been pursuing the cloning of a novel set of glycosyltransferase genes belonging to the β 3-glycosyltransferase family by searching for a unique sequence specific to β 3-glycosyltransferase (especially the β 3GT motif, Fig. 1B) (15–21).

At present, the β 1,3-galactosyltransferase (β 3GalT), β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (β 3GalNAcT), and β 3GnT groups that have been isolated and reported to date are known form a gene family with a shared (“ β 3GT”) motif (Fig. 1C). The accession numbers of these β 3GT genes and their products are shown in Table I. In addition, a previous

の上の sLe^x 糖鎖抗原量が多かった、との報告がある (13)。

以上のように、シアリルルイス抗原を担うポリラクトサミン自体の構造やその長さは、がんの悪性度や細胞間相互作用において重要であることが示唆されている。このようにポリラクトサミン糖鎖は直接的あるいは間接的に様々な生物機能を有していると考えられる。

しかし、現在までのところ、ポリラクトサミンの機能は *in vitro* での解析により同定されたものが多く、ポリラクトサミンの生体内 (*in vivo*) での生物機能やその分子メカニズムは未だ、十分には解明されていない。

B. ポリラクトサミン糖鎖の合成に関与する糖転移酵素、 β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子群のクローニング

1986年に成松らによって初めて糖転移酵素・ β 1,4-ガラクトース転移酵素 I (β 4GalT1) の遺伝子がクローニング、解析された (14)。その後、現在までに酵素の精製、発現クローニング法、サザンブロット法などによる類似遺伝子の探索、degenerate primer による PCR クローニング法などにより多くの糖転移酵素遺伝子がクローニングされ、それらの機能の解析がなされてきた。また近年、各種データベースの構築・拡充とバイオインフォマティクスにより、*in silico* での糖転移酵素遺伝子の探索が遺伝子発見のメインストリームとなっている。その結果、多くの研究グループにより、現在では186種類以上の糖転移酵素遺伝子が単離、解析されている。また、その結果から、糖転移酵素遺伝子が幾つかの subfamily を形成することが分かってきた。これらの subfamily ごとに、そのアミノ酸配列上よく保存された motif などが存在することが分かってきている。糖転移酵素は以下に挙げる基質特異性を有するが、subfamily ごとに保存された特徴は、これらの特異性を反映しているのではないかと考えられる。(1) 供与体に対する基質特異性、(2) 受容体基質に対する特異性 (受容体糖鎖の糖鎖配列)、(3) アノマー (anomer) に対する特異性 (アノメリック結合。ドナーとアクセプター間の結合様式)、である。

上記のように、近年はデータベース (*in silico*) による遺伝子の探索による遺伝子クローニングが主流になっている。我々のグループを始め、多くの研究グループにより、*in silico* で β 1,3-結合糖転移酵素に特徴的な配列 (特に β 3GT モチーフ。図 1B) を探索することで、その subfamily に属する新規の糖転移酵素遺伝子群がクローニングされ、解析が進められてきた (15–21)。

その結果、現在までのところ、 β 3GalT、 β 3GalNAcT、 β 3GnT 群により、共通のモチーフ配列 (β 3GT モチーフ) を有する遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなっている (図 1C)。各 β 1,3-結合糖転移酵素の遺伝子などのアクセッション番号のほか、合成する糖鎖構造を表 I に示しておく。

review has explained the gene cloning and detailed substrate specificity of these enzymes (22).

Regarding the cloning of β 3GnT enzymes involved in polyactosamine synthesis, iGnT (β 3GnT1) was the first β 3GnT to be isolated (19). Thereafter, a set of β 3GnT genes,

これらの遺伝子クローニングや基質特異性などについての詳細は過去の別稿 (22) にて紹介しているので、参考にして頂きたい。

ポリラクトサミン糖鎖の合成に関与する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素では、始めに iGnT (β 3GnT1) がクローニン

Fig. 1. Polylactosamine structure and subfamily of β 1,3-glycosyltransferase (β 3GT) genes. (A) Illustration of the polylactosamine structure, which consists of *N*-acetylactosamine (Gal β 1-4GlcNAc: LacNAc) repeats. The linear polylactosamine structure is also known as a blood group antigen, i antigen. The β 1-6-branching polylactosamine structure is also known as a blood group antigen, I antigen. (B) The amino acid sequences in the β 3GT subfamily contain well-conserved “ β 3GT” motifs. Glycosyltransferase genes of the β 3GT family contain three conserved β 3GT motifs in their amino acid sequence. In the β 3GT motif, the DXD sequence that is essential for divalent cation binding is underlined. (C) Phylogenetic tree of human β 3GTs constructed by ClustalW on the basis of amino acid sequence. The reaction products of each enzyme are shown on the right. (D) Carbohydrate structures containing polylactosamine chains. Representative glycan structures are synthesized by each β 3GnT. Predicted carbohydrate structures (epitope recognized by LEL) that are possibly lacking in *B3gnt2*^{-/-} mice or *B3gnt5*^{-/-} mice are indicated by rectangles.

Table I. β 1,3-glycosyltransferases (genes and enzymatic activities).

Glycosyltransferase activity	Enzyme Name / Gene Name	Gene Symbol (H.sapiens)	Accession Number		Glycan Structure synthesized by each β 1,3-glycosyltransferase	
			mRNA	Protein	Reaction Product (Enzymatic Activity)	Representative Structure of Reaction Product
N-Acetylglucosaminyltransferases	UDP-GlcNAc- β -Gal β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (known as GNT)	B3GNT1	NM_006876	NP_006867	Polylactosamine	GlcNAc β 1-3Gal β 1-R
	UDP-GlcNAc- β -Gal β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	B3GNT2	NM_006577	NP_006568	Polylactosamine	GlcNAc β 1-3Gal β 1-R
	UDP-GlcNAc- β -Gal β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3	B3GNT3	NM_014256	NP_055071	Polylactosamine on Core 1 O-glycan (Core1-elongated polylactosamine)	GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc-O-Ser/Thr
	UDP-GlcNAc- β -Gal β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4	B3GNT4	NM_030765	NP_110392	Polylactosamine	GlcNAc β 1-3Gal β 1-R
	UDP-GlcNAc- β -Gal β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	B3GNT5	NM_032047	NP_114436	Lacto/Neolacto-series Glycolipid (Lactotriacyceramide)	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer
	UDP-GlcNAc- β -Gal β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6	B3GNT6	NM_138706	NP_619651	Core 3 O-glycan	GlcNAc β 1-3GalNAc-O-Ser/Thr
	UDP-GlcNAc- β -Gal β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 7	B3GNT7	NM_145236	NP_660279	Keratan Sulfate	GlcNAc β 1-3Gal β 1-(SO ₃)GlcNAc β -R
	UDP-GlcNAc- β -Gal β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 8	B3GNT8	AB175895	BAD86525	Polylactosamine	GlcNAc β 1-3Gal β 1-R
	MFNG (Manic Fringe) O-fucosylpeptide β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase	MFNG	NM_002405	NP_002396	Transferring GlcNAc to O-Fucosylglycan on Notch	GlcNAc β 1-3Fuc α 1-O-Ser/Thr
	LFNG (Lunatic Fringe) O-fucosylpeptide β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase	LFNG	XM_166539	Q8NES3	Transferring GlcNAc to O-Fucosylglycan on Notch	GlcNAc β 1-3Fuc α 1-O-Ser/Thr
Glucosyltransferase	RFNG (Radical Fringe) O-fucosylpeptide β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase	RFNG	AF108139	Q9Y644	Transferring GlcNAc to O-Fucosylglycan on Notch	GlcNAc β 1-3Fuc α 1-O-Ser/Thr
	β 1,3-glucosyltransferase	B3GALT	NM_194318	NP_919299	Transferring Glc to O-Fucosylglycan	[Glc β 1-3Fuc-O-peptide (Thrombospondin type 1 repeats)]
	β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1	B3GALNT1	NM_003781	NP_003772	Globotriaosylceramide (Glycoside)	[GalNAc β 1-3Gal β 1-R]
	β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	B3GALNT2	NM_152490	NP_689703	GalNAc β 1-3GlcNAc (Type I LactidNAc) structure on N- or O-glycans	[GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-R]
Galactosyltransferases	β 1,3-galactosyltransferase 1	B3GALT1	NM_020981	NP_066191	Type I chain	[Gal β 1-3GlcNAc β 1-R]
	β 1,3-galactosyltransferase 2	B3GALT2	NM_003783	NP_003774	Type I chain	[Gal β 1-3GlcNAc β 1-R]
	β 1,3-galactosyltransferase 3				Initially, it was predicted that the donor substrate for β 3GalT3 would be UDP-Galactose by the similarity of its amino acid sequence to that of β 3GalTs. However, it was later found to have the enzymatic activity of β 3GalNAcT. This gene (B3GALT3) was renamed to B3GALNT1.	[Gal β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer]
	β 1,3-galactosyltransferase 4	B3GALT4	NM_003782	NP_003773	GM1, GD1b, GA1	[Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer]
Glucuronyltransferases	β 1,3-galactosyltransferase 5	B3GALT5	NM_033171	NP_006048	GB5, SSEA3, CA19-9 (sLe ^x)	[Gal β 1-3GlcNAc β 1-3GalNAc β 1-4Glc β 1-Cer]
	β 1,3-galactosyltransferase 6	B3GALT6	NM_080605	NP_542172	Glycosaminoglycan core region	[Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer]
	Core1 UDP-galactose: N-acetylglucosamine- α -R β 1,3-galactosyltransferase 1	CTGALT1	NM_020156	NP_064541	Core 1, T antigen	[Gal β 1-3GalNAc α 1-R]
	β 1,3-glucuronyltransferase 1	B3GAT1	NM_054025	NP_473361	Precursor structure of HNK-1 antigen	[(SO ₃ -3)GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R]
	β 1,3-glucuronyltransferase 2	B3GAT2	NM_080742	NP_542780	Precursor structure of HNK-1 antigen	[(SO ₃ -3)GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R]
	β 1,3-glucuronyltransferase 3	B3GAT3	NM_012200	NP_036332	Core structure of Glycosaminoglycan	[GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl-O-Thr]
	Chondroitin sulfate glucuronyltransferase	CHPF2 / CSGICA-T	BC064509	BAA92640	Chondroitin Sulfate (CS) (Polymerization)	[GlcA β 1-3GalNAc β 1-4GlcA-R]
N-Acetylglucosaminyltransferase/ Glucuronyltransferase	Chondroitin sulfate synthase 1, glucuronyl-N-acetylglucosaminyl- proteoglycan 4- β -N-acetylglucosaminyltransferase, N- acetylglucosaminyl-proteoglycan 3- β -glucuronyltransferase 1	CHSY1	NM_014918	NP_055733	Chondroitin Sulfate (CS), Dermatan Sulfate (DS)	[GlcA β 1-3GalNAc β 1-4(GlcA β 1-3GalNAc β 1-4) _n ; CS, DS]
	Chondroitin sulfate synthase 2, chondroitin polymerizing factor, glucuronyl-N-acetylglucosaminyl-proteoglycan 4- β -N- acetylglucosaminyltransferase, N-acetylglucosaminyl- proteoglycan 3- β -glucuronyltransferase 2	CHPF	NM_024536	NP_078812	Chondroitin Sulfate (CS), Dermatan Sulfate (DS) (Polymerization)	[GlcA β 1-3GalNAc β 1-4(GlcA β 1-3GalNAc β 1-4) _n ; CS, DS]
	Chondroitin sulfate synthase 3, glucuronyl-N-acetylglucosaminyl- proteoglycan 4- β -N-acetylglucosaminyltransferase, N- acetylglucosaminyl-proteoglycan 3- β -glucuronyltransferase 3	CSS3	AB080682	BAC98832	Chondroitin Sulfate (CS), Dermatan Sulfate (DS) (Activity: CHSY1 > CSS3)	[GlcA β 1-3GalNAc β 1-4(GlcA β 1-3GalNAc β 1-4) _n ; CS, DS]

R : Residue, Thr : Threonine, Ser : Serine, Cer : Ceramide

having sequences similar to those of β 3GalTs, has been isolated effectively using *in silico* bioinformatics analysis (20, 21). Recently, it was reported that β 3GnT1 is involved in the synthesis of glycan on α -dystroglycan, and affects tumor progression (23). Regarding enzymatic activity toward oligosaccharide substrates, β 3GnT2 had clearly stronger activity *in vitro* on oligosaccharide substrates with polylactosamine structures, suggesting that it is the main polylactosamine synthase (21, 24). Yeh *et al.* reported that β 3GnT3 is an enzyme that further elongates the core 1 *O*-glycan structure (25). β 3GnT4 has weak polylactosamine synthetase activity. However, much of the β 3GnT4 substrate specificity is unclear.

Lactotriaosylceramide (Lc_3 Cer) is a precursor structure for lacto/neolacto-series glycolipid and polylactosamine chains elongated on Lc_3 Cer. β 3GnT5 has been isolated as Lc_3 Cer synthase (24, 26). Expression of the HNK-1 and Le^x antigens on the lacto/neolacto-series of glycolipids has been shown to be developmentally and tissue-specifically regulated by β 3GnT5 (synthesizing the lacto/neolacto-series of glycolipids), and this enzyme appears to be closely involved in important functions such as intercellular recognition for the extension of neurons and others (24, 27–29). It has been reported that the β 3GnT6 is an enzyme that synthesizes the core 3 *O*-glycan structure (30). We speculate that this enzyme plays an important role in the synthesis and function of mucin *O*-glycan in the digestive organs.

Gene expression of β 3GnT7 has been reported to be downregulated upon malignant transformation (31), and is known (to some groups) to synthesize the polylactosamine structure in the cell. Seko *et al.* have recently shown that β 3GnT7 exhibits activity for transferring GlcNAc to $Gal\beta 1 \rightarrow 4(SO_3^- \rightarrow 6)GlcNAc\beta 1 \rightarrow 3Gal\beta 1 \rightarrow 4(SO_3^- \rightarrow 6)GlcNAc$ (L2L2 oligosaccharide) of keratan sulfate (32). β 3GnT8 transfers GlcNAc to the non-reducing terminus of the $Gal\beta 1-4GlcNAc$ of tetraantennary *N*-glycan (33). Furthermore, it has been reported that β 3GnT8 and β 3GnT2 can form a hetrocomplex with enhanced enzymatic activity (34). It has been suggested that β 3GnT2 and β 3GnT8 are cooperatively involved in elongation of polylactosamine chains on multiantennary *N*-glycans. The structure of the carbohydrate chain synthesized by each β 3GnT is shown in Fig. 1D.

Thus, at present, various functional analyses using these cloned genes have been performed, as mentioned below, since the cloning of many genes has been successful. However, it has been unclear how these multiple β 3GnTs differentially function *in vivo*.

グされていたが(19)、その後、*in silico*によるバイオインフォマティクス解析を効果的に用いることにより、 β 3GalTに類似の配列を有する β 3GnT遺伝子群についても単離されてきた(20, 21)。近年、 β 3Gn-T1は α -ジストログリカン分子上の糖鎖の合成に関与し、がんの進展に影響を与えることが明らかにされた(23)。ポリラクトサミン構造のオリゴ糖基質に対する*in vitro*での活性では、 β 3GnT2が明らかに強い活性を示しており、このことから β 3GnT2が主たるポリラクトサミン合成酵素であると考えられた(21, 24)。 β 3GnT3はYehらにより、core 1構造をさらに伸長させる酵素であるということが報告された(25)。 β 3GnT4は弱いながらポリラクトサミン合成酵素活性を有しているが、 β 3GnT4の詳細な基質特異性については現在でもあまりよく分かっていない。

ポリラクトサミンが伸張するラクト・ネオラクト系糖脂質の前駆体糖脂質である、Lactotriaosylceramide (Lc_3 Cer)の合成酵素遺伝子として β 3GnT5がクローニングされた(24, 26)。ラクト・ネオラクト系糖脂質上のHNK-1抗原や Le^x 抗原は発生特異的あるいは組織特異的にその発現が制御されており、細胞間認識等を始めとした重要な機能により、神経細胞の伸長などに関与していると思われるが、その発現調節はラクト・ネオラクト系糖脂質を合成する β 3GnT5により行われていることが明らかになった(24, 27–29)。また、 β 3GnT6が*O*-glycanのcore 3構造を合成する酵素であるということが報告された(30)。この酵素は消化器官におけるムチン上の*O*-glycanの合成と機能に重要な役割を担っていると考えられる。

β 3Gn-T7はがん化において遺伝子発現が下がるものとして報告がなされており(31)、一部のグループによって細胞のポリラクトサミン構造を合成することは知られていたが、その後、 β 3GnT7がケラタン硫酸の $Gal\beta 1 \rightarrow 4(SO_3^- \rightarrow 6)GlcNAc\beta 1 \rightarrow 3Gal\beta 1 \rightarrow 4(SO_3^- \rightarrow 6)GlcNAc$ (L2L2オリゴ糖)にGlcNAcを転移する活性を有するということが明らかにされている(32)。 β 3GnT8は4本鎖分岐の*N*-glycanにポリラクトサミン合成活性を示す(33)。その後、 β 3GnT8が β 3GnT2とのヘテロな会合体を形成することで、そのポリラクトサミン合成活性が大幅に亢進されるという報告がなされている(34)。 β 3GnT2と β 3GnT8は協調的に働き、多分岐の*N*-glycan上のポリラクトサミン鎖の伸張を行っているものと考えられる。以上のように、各 β 3GnT酵素は、それぞれ異なる糖鎖構造を合成することが明らかとなってきた(図1D)。

このように、多くの遺伝子がクローニングされてきたことにより、後述のような、遺伝子を使用した種々の機能解析がなされるようになってきている。しかしながら、これら複数の β 3GnT酵素が生体内でどのように使い分けられ、機能しているのかはよく分かっていなかった。

C. Functional Analysis of Glycans Using Glycogene (Glycosyltransferase gene)-Deficient Mice

At mentioned above, more than 186 kinds of glycosyltransferase gene have been cloned. Together with the identification of glycogenes, human diseases caused by abnormalities of glycogenes have become clear. For example, it has been clarified that many diseases such as Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) and congenital muscle dystrophy (Muscle-Eye-Brain Disease and Walker-Warburg Syndrome) are caused by abnormalities of glycosyltransferase genes (35–39).

It is thought that glycan has an important role in biological functions. In the past, functional analysis of glycan was very difficult. By cloning and analyzing glycogenes, however, now we can generate glycogene-deficient mice and investigate the physiological function of a glycan, glycoprotein, and/or glycolipid in cell.

It is thought that polylactosamine is an important structure with various functions. It is still unclear what molecules carry the polylactosamine chain. In addition, the length of polylactosamine chains on various glycans is not known in detail.

Thus, some research groups have attempted to investigate the functions of polylactosamine by analyzing knockout mice lacking this molecule. For example, it has been reported that one knockout (*B3gnt2*^{-/-}) mouse strain lacking polylactosamine exhibits severely disorganized olfactory bulb innervation and defective glomerular formation, resulting in a functional sensory deficit. This suggests that polylactosamine is required for synapse formation in olfactory bulb innervation (40).

In order to clarify the role and biological functions of polylactosamine chains on immunologically relevant sites, we have generated and analyzed two strains of *B3gnt* gene-deficient mouse (41, 42), as outlined below.

D. Analysis of an Immunological Disorder (Phenotype) in the *B3gnt2*-Deficient (*B3gnt2*^{-/-}) Mouse

First, we generated and analyzed *B3gnt2*-deficient (*B3gnt2*^{-/-}) mice lacking β 3GnT2, which is the major polylactosamine synthase (42). The number of (long) polylactosamine structures was markedly lower in *B3gnt2*^{-/-} mice than in WT mice. To detect polylactosamine structures in this study, we used a lectin, *Lycopersicon esculentum* (tomato) agglutinin (LEL), which is known to bind to polylactosamines with at least three repeated lactosamine units, as a probe (43, 44). Flow cytometry using LEL, LEL-blotting analysis and glycan analysis by metabolic labeling demonstrated that the amount of long polylactosamine chains on *N*-glycans was greatly reduced in the tissues of *B3gnt2*^{-/-} mice (42). This

C. 糖鎖遺伝子 (糖転移酵素遺伝子) ノックアウトマウスを利用した糖鎖機能解析

現在では、約 186 種類を超えるヒト糖転移酵素遺伝子の報告がなされている。遺伝子が明らかになるとともに、糖鎖遺伝子が原因となって生じるヒト疾患も明らかとなってきた。例えば、先天性糖鎖合成異常症 (Congenital Disorders of Glycosylation; CDG) やある種の先天性筋ジストロフィー (Muscle-Eye-Brain 病、Walker-Warburg 病) など、糖転移酵素遺伝子が原因となる疾患が数多く存在することが次第に分かってきている (35–39)。

このように、糖鎖は非常に重要な生物機能を有していると考えられる。従来、糖鎖の機能解析は非常に困難であったが、糖鎖遺伝子がクローニング、解析されることによって、遺伝子ノックアウトマウスが作製できるようになり、糖鎖あるいは糖タンパク質、糖脂質の細胞における生理機能が明らかにされつつある。

ポリラクトサミンは様々な機能を担った重要な糖鎖構造であると考えられているが、その一方で、実際にポリラクトサミンがどのような分子の上にどの程度伸張しているのか、あるいはその具体的な機能は何か、といった詳細については未だよく分かっていない。そこで、幾つかの研究グループにより、ポリラクトサミンを欠損させたマウスを解析することでそれを明らかにしようと試みられている。例えば、ポリラクトサミンを欠損させたマウスの 1 系統 (*B3gnt2* 遺伝子ノックアウトマウス) ではシナプス形成不全による嗅感覚の欠損が観察されるので、嗅球神経の神経支配域のシナプス形成に必要であると考えられている (40)。我々もポリラクトサミン糖鎖の生物学的な機能を明らかにしていきたいと考え、ポリラクトサミン鎖合成に関与する 2 系統のノックアウトマウスを作製し、まずは免疫系の表現型から解析を行うこととした (41, 42)。

D. *B3gnt2* 遺伝子ノックアウトマウスにおける免疫機能不全 (表現型) の解析

我々は始めに、主要なポリラクトサミン合成酵素であると考えられる、 β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 2 (*B3gnt2*) 遺伝子のノックアウトマウス (*B3gnt2*^{-/-} マウス) の解析を行った (42)。本 *B3gnt2*^{-/-} マウスでは、野生型 (WT) マウスと比較して、(長鎖) ポリラクトサミン鎖の量が大きく減少していた。本研究ではポリラクトサミン構造を検出するために、*Lycopersicon esculentum* (トマト) レクチン (LEL) を使用した。この LEL は、ラクトサミン構造が 3 回以上繰り返したポリラクトサミン構造に強く結合するため、ポリラクトサミン鎖に対するプローブとして使用出来る (43, 44)。LEL を使用したフローサイトメトリー解析やウェスタンブロット解析、代謝標識による糖鎖解析の結果、*B3gnt2*^{-/-} マウスの組織

suggested that β GnT2 has major polylectosamine synthase activity for synthesizing polylectosamine chains on *N*-glycan.

Next, we predicted that the *B3gnt2*^{-/-} cells would lack polylectosamine chains on *N*-glycans on their cell-surface glycoproteins. We tried to identify cell-surface proteins carrying polylectosamine by using an antibody-overlay lectin microarray analysis (45) (Fig. 2). We screened molecules such as major CD antigens (CD4, CD8 α , CD19, CD28, and others) from WT lymphocytes and *B3gnt2*^{-/-} lymphocytes by lectin microarray analysis. In the case of a polylectosamine-carrier molecule, the immunoprecipitated protein exhibits binding (positive) signals on LEL, STL (*Solanum Tuberosum*, Potato Lectin), and/or others. We screened polylectosamine-carrier molecules by index for a decrease or loss of lectin signals on target molecules derived from the *B3gnt2*^{-/-} mouse. As a result, the LEL signal was decreased on immunoprecipitated CD28 in *B3gnt2*^{-/-} T cells as compared with WT T cells (Fig. 3). Similarly, the LEL signal was decreased on immunoprecipitated CD19 in *B3gnt2*^{-/-} B cells (Fig. 4).

では、糖タンパク質の *N*-glycan 上の長鎖ポリラクトサミン構造が有意に減少していることが明らかとなった (42)。以上より、*in vivo* においては本酵素が糖タンパク質 *N*-glycan 上のポリラクトサミン合成の主たる役割を担っていることが明らかとなった。

次に、我々は *B3gnt2*^{-/-} 免疫細胞では、その細胞表面上の糖タンパク質の *N*-glycan 上でポリラクトサミン鎖が欠損していると予測した。そこで、抗体オーバーレイ・レクチンアレイ法 (45) による、ポリラクトサミンが付加した細胞表面分子の同定を試みた (図 2)。この方法では、主要な CD 抗原 (CD4、CD8 α 、CD19、CD28、その他) などを対象に、抗体を使用して免疫沈降法で分子を濃縮してレクチンアレイに供した (42)。ポリラクトサミンを含有する分子の場合、レクチンアレイ上の LEL あるいは STL (*Solanum Tuberosum*, Potato Lectin) などのレクチンへの結合のシグナルが検出される。このシグナルが *B3gnt2*^{-/-} マウス由来の分子では減少あるいは消失するということを指標にスクリーニングした。その結果、CD28 (T 細胞由来) (図 3) あるいは CD19 (B 細胞由来) (図 4) 分子などを同定した。*B3gnt2*^{-/-} マウスにおいては、それらの分子

Fig. 2. Schema of analysis of glycan profile on cell-surface proteins by antibody-overlay lectin microarray. Cell-surface immunoprecipitated proteins were analyzed using lectin microarrays (45). Surface proteins of isolated T or B cells were labeled with biotin, and target proteins were immunoprecipitated with antibody. To visualize native glycans on cell-surface proteins, interactions of the target protein with lectins immobilized on glass slides were analyzed. Briefly, immunoprecipitated protein was released and then applied to a microarray containing 43 kinds of lectins. A fluorescently-labeled antibody that recognizes target (core) proteins or fluorescently-labeled avidin, which binds to immunoprecipitates of biotinylated target proteins, was used as the probe for lectin microarray analysis (42). The glass slide was scanned by an evanescent-field fluorescence scanner, SC-Profler (GP Biosciences Ltd., Yokohama, Japan). Polylectosamine was identified by LEL (tomato lectin) signals. The LEL-binding epitope consists of more than three repeated lactosamine units. Glycoproteins derived from WT mice give LEL signals for polylectosamine-carrying proteins. By contrast, there were no LEL signals on glycoproteins from *B3gnt2*^{-/-} mice, indicating a loss of polylectosamine chains. WT, wild-type; *B3gnt2*^{-/-}, homozygous null.

We also examined whether immunological abnormalities were present in T cells and B cells of *B3gnt2*^{-/-} mice. CD28 and CD19 molecules are known co-stimulatory receptors in T cells and B cells, respectively. CD28 and CD19 both regulate major immune system signaling, such as T cell receptor (TCR) and B cell receptor (BCR) signaling. Thus, we looked for abnormalities of signal transduction involved in TCR and BCR signaling. As a result, *B3gnt2*^{-/-} T cells were more sensitive to the induction of intracellular Ca²⁺ flux on stimulation with anti-CD3ε/CD28 antibodies and exhibited upregulation of phosphorylation signals. As it is known that cell proliferation occurs after TCR stimulation,

次に、T細胞やB細胞の免疫機能異常が認められるのかについて調査した。これらCD28分子やCD19分子は、T細胞レセプター (TCR) 刺激あるいはB細胞レセプター (BCR) 刺激などのシグナルに関与する (制御する) 共刺激受容体分子 (co-stimulatory receptor) であることが知られている。そこで、TCR や BCR 関連のシグナル伝達に異常が認められるかどうかを確認した。抗 CD3ε および抗 CD28 抗体で T 細胞を刺激したところ、*B3gnt2*^{-/-} T 細胞では細胞内カルシウムシグナルの亢進 (図 3B) やリン酸化シグナルの亢進 (図 3C) が認められた。それらの各種シグナルの亢進の結果として、細胞増殖応答が起こることが知られているが、*B3gnt2*^{-/-} T 細胞では野生型 T 細胞と比較して、細胞増殖応答が大きく亢進されている。

B3gnt2^{-/-} T cells proliferated more strongly than WT T cells. On the other hand, *B3gnt2*^{-/-} B cells also exhibited upregulation of phosphorylation signals on stimulation with anti-BCR antibody (Fig. 4B). *B3gnt2*^{-/-} B cells also showed hyperproliferation on BCR stimulation (Fig. 4C). These studies show that lack of polylectosamine chains on *N*-glycans results in enhanced initiation of immune responses by T cells and B cells.

E. Analysis of Immunological Disorder (Phenotype) in the *B3gnt5*-Deficient (*B3gnt5*^{-/-}) Mouse

Second, we generated and analyzed *B3gnt5*-deficient (*B3gnt5*^{-/-}) mice lacking β3GnT5, which is a lactotriaosylceramide (Lc₃Cer) synthase synthesizing polylectosamine chains on glycolipids (41). *B3gnt5*^{-/-} mice showed loss of the precursor structure for lacto/neolacto-series glycolipids (containing polylectosamine chains). We

ことを明らかにした (図 3D)。

一方、B 細胞を抗 BCR 抗体で B 細胞を刺激したところ、*B3gnt2*^{-/-} B 細胞にリン酸化シグナルの亢進が認められた (図 4B)。B 細胞でも、BCR 刺激に伴う細胞増殖応答が大きく亢進されていることを明らかにした (図 4C)。本研究では、*N*-glycan 上のポリラクトサミン鎖の減少が種々の免疫の刺激に対する免疫応答性を大きく亢進させていることを明らかにした。

E. *B3gnt5* 遺伝子ノックアウトマウスにおける免疫機能不全 (表現型) の解析

次に、糖脂質上のポリラクトサミンの合成に関与する、β1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 5 (*B3gnt5*) ノックアウトマウス (*B3gnt5*^{-/-} マウス) を用いて免疫系の表現型を中心に解析を行った (41)。本 *B3gnt5*^{-/-} マウスでは lactotriaosylceramide (Lc₃Cer) を欠失することで、ラクト・ネオラクト系列糖脂質 (ポリラクトサミン構造が伸張する) が欠

Fig. 4. *B3gnt2*^{-/-} B cells are hypersensitive to stimulation via BCR/CD19. (A) Polylectosamine on *N*-glycans of CD19 molecules in *B3gnt2*^{-/-} lymphocytes is diminished. The immunoprecipitates of WT CD19 molecules were found to have LEL-reactive polylectosamine chains on their *N*-glycans. However, the immunoprecipitates of *B3gnt2*^{-/-} CD19 molecules exhibited a loss of LEL signals on the lectin microarray. By contrast, DSA signals showed no difference between WT and *B3gnt2*^{-/-} mice. DSA recognizes the *N*-glycan core structure. For Western Blotting, immunoprecipitation was carried out with anti-CD19 monoclonal antibody (left), or LEL-agarose (right). The mobility of immunoprecipitated CD19 and on SDS-PAGE differed between WT and *B3gnt2*^{-/-} cells. In addition, these molecules were only marginally detected in LEL-agarose immunoprecipitates from *B3gnt2*^{-/-} mice. These results indicate that the *N*-glycan core shows no alteration, and only the amount of polylectosamine chains on the *N*-glycans of CD28 is decreased in *B3gnt2*^{-/-} mice. CD19 exists on the B cell surface and transfers secondary signals of BCR-related signals as co-stimulatory molecules (bottom). (B) Analysis of phosphorylation status. Resting B cells from the spleen were stimulated by cross-linking anti-BCR antibody for the indicated time. The same volume of lysates was added to each lane. Phosphorylated proteins were analyzed by immunoblots using anti-phospho-tyrosine (Tyr) monoclonal antibody (clone 4G10). *B3gnt2*^{-/-} B cells exhibited significantly upregulated phosphorylation signals. (C) Effect of polylectosamine deficiency on B cell proliferation. Resting B cells were stimulated with anti-IgM and proliferation was assessed after 2 days. A greater proliferation of *B3gnt2*^{-/-} splenic cells than of WT splenic B cells was observed with low concentrations of anti-IgM. WT, wild-type; *B3gnt2*^{-/-}, homozygous null; IP, immunoprecipitation; IB, immuno-blot.

analyzed the glycan structure of glycolipids derived from WT and *B3gnt5*^{-/-} mice. On biochemical analyses, lacto/neolacto-series glycolipids were confirmed to be absent and no Lc₃Cer synthase activity was detected in the tissues of *B3gnt5*^{-/-} mice. In addition, mass spectrometric analysis revealed that lacto and neolacto-glycolipids had disappeared in *B3gnt5*^{-/-} B cells. These results demonstrate that β3GnT5 is the sole enzyme synthesizing Lc₃Cer *in vivo*.

Next, we performed functional analysis (phenotype screening) using immune cells, especially B cells. We screened for phenotypes related to glycolipid-enriched microdomains (GEMs, also known as glycolipid rafts, or detergent-resistant membrane structures, DRMs) (46–49), because the product of β3GnT5 is Lc₃Cer glycolipid and this glycolipid exists in microstructures such as GEMs on the cell surface. GEMs are composed of cholesterol, sphingolipid, glycolipid, and others. In general, GEMs are essential cellular structures for localizing signal transduction (50, 51), and lacto/neolacto-series glycolipids containing polylectosamine are thought to be localized in GEMs. Thus, we thought that these glycolipids might have a function in GEMs.

One glycolipids, GM1 ganglioside, is used as a GEM marker. Thus, we analyzed GEM structure in B cells by GM1 staining with fluorescently labeled cholera toxin B subunit. GM1 staining was significantly upregulated in *B3gnt5*^{-/-} B cells as compared with WT B cells by fluorescence microscopy analysis (Fig. 5A). The GEM-stained puncta on the surface of *B3gnt5*^{-/-} resting B cells were brighter and larger than those of WT cells. These results suggest that structural alteration of GEMs occurs in *B3gnt5*^{-/-} B cells. At present, however, the detailed phenomenon and molecular mechanism are unknown.

The major biological function of B cells is immune response and signal transduction involving the BCR and BCR-related molecules. Many studies reported that the BCR and BCR-related molecules such as CD19 transmit their signals in GEMs on the cell surface. In the case of B cells, BCR and CD19 proteins are found outside of GEMs without stimulation. However, these molecules flow to the inside of GEMs after antigen stimulation. This leads to an accumulation of BCR, CD19 and signal transduction molecules in the GEMs. The intracellular signal is then delivered to each cell.

We therefore examined whether BCR signaling-related proteins, such as the BCR, CD19 and the signaling molecule Lyn, had moved into or out of the GEM fraction. These molecules were enriched in the GEM fraction of *B3gnt5*^{-/-} B cells (Fig. 5B). Moreover, *B3gnt5*^{-/-} B cells were more sensitive to the induction of intracellular phosphorylation signals on BCR stimulation (Fig. 6A), and *B3gnt5*^{-/-} B cells proliferated more vigorously than WT B cells (Fig. 6B). Moreover, T cell-independent antibody production was slightly upregulated at an early stage of the response in *B3gnt5*^{-/-} mice as compared

損する。まず、我々は糖脂質糖鎖構造の解析を行った。生化学的な解析を行った結果、*B3gnt5*^{-/-} マウスではラクト・ネオラクト系列糖脂質が消失しており、また、*B3gnt5*^{-/-} マウス組織抽出物中の Lc₃Cer 合成酵素の活性も検出されなかった。質量分析器による糖鎖構造解析でも、*B3gnt5*^{-/-} B 細胞ではラクト・ネオラクト系列糖脂質糖鎖が消失していることが明らかとなった。これらの結果は、この酵素が生体内で糖脂質上のポリラクトサミン糖鎖の合成を担っている唯一の酵素であるということを示している。

次に、免疫細胞、特に B 細胞を対象に機能解析 (表現型スクリーニング) を行った。生成物が Lc₃Cer 糖脂質であり、これら糖脂質が糖脂質マイクロドメイン (glycosphingolipids-enriched microdomain: GEM、あるいは糖脂質ラフト: glycolipid raft, detergent-resistant membrane structures: DRMs とも言われる) (46–49) のような細胞表面の微細構造内部に局在することから、我々は、GEM (ラフト) 構造と関連する表現型をスクリーニング解析した。GEM 構造はコレステロールやスフィンゴ脂質、糖脂質その他で構成されており、シグナル伝達の場合として必須な細胞構造である (50, 51)。ポリラクトサミン鎖を含有する、ラクト・ネオラクト系列糖脂質も GEM 構造に局在していると考えられる。その為、我々はこれらの糖脂質が GEM において何らかの機能を果たしているのではないかと考えた。

糖脂質の一つである GM1 ガングリオシドが GEM 構造のマーカーとして用いられていることは一般的である。そこで、我々は B 細胞の GEM 構造を蛍光標識されたコレラ毒素で染色して解析を行った。*B3gnt5*^{-/-} B 細胞では、コレラ毒素による GM1 染色性が野生型 B 細胞に比較して大きく亢進していた (図 5A)。マウスの休止 B 細胞では、野生型に比較して、パッチ状の GEM 染色像がより強く且つ大きく観察された。このことから、糖脂質ポリラクトサミンの欠失により糖脂質マイクロドメイン構造に何らかの変化が起きていることが示唆された。しかしながら、現時点では詳細な分子メカニズムなどを含め不明である。

B 細胞の主要な機能は、BCR 分子を中心とした免疫反応であることはよく知られている。それら BCR 分子や関連分子である CD19 分子などは、そのシグナルを細胞膜上の GEM 構造において伝達していることが多数報告されている。例えば B 細胞では、細胞への刺激が無い状態では、BCR や CD19 タンパク質分子は GEM 構造の外側にいるが、抗原による刺激が加わると、これらの分子は GEM 構造内に流入する。そして、GEM 構造内への BCR 分子、CD19 分子、シグナル伝達分子などの集積により、細胞内へとシグナルが伝えられていく。

そこで我々は、BCR や CD19 およびシグナル伝達分子である Lyn などの BCR シグナル関連分子群が GEM 構造内外へどのように移動しているのかを解析した。その結果、GEM 構造へのこれらの分子などの移入 (挙動) に差が見られる (*B3gnt5*^{-/-} マウスでは GEM への局在が亢進する) ことが明らかとなった (図 5B)。また、*B3gnt5*^{-/-} B 細胞では BCR 刺激によるリン酸化シグナルの亢進が認められた (図 6A)。*B3gnt5*^{-/-} マ

with WT mice (Fig. 6C). These results suggested that *B3gnt5*^{-/-} B cells tend to be more easily activated by BCR stimulation as compared with WT B cells.

Together, these results suggest that lacto/neolacto-series glycolipids containing poly-lactosamine play an important role in controlling the clustering and stabilization of GEMs as a platform for signal transduction, and thereby regulate the movement of specific proteins, such as BCR-related molecules, to GEMs.

In addition, some research groups have generated and analyzed different strains of *B3gnt5*-deficient mice (41, 52–54). It has been reported that disruption of the *B3gnt5* gene leads to abnormalities in reproduction function such as preimplantation lethality, sex behavior, and immune response (52–54). There are many differences among the *B3gnt5*-deficient mouse strains. At present, however, it is unclear why these differences were observed.

ウス B 細胞では、野生型マウスに比較して細胞増殖応答の亢進が認められることが分かった (図 6B)。さらに、T 細胞非依存性の抗体産生能を解析した結果、*B3gnt5*^{-/-} マウスでは野生型マウスと比較して初期段階での応答が亢進していた。これらの結果から、BCR 刺激において、*B3gnt5*^{-/-} B 細胞は野生型 B 細胞よりも活性化し易いことが示唆された。

以上より、ポリラクトサミン糖鎖を含有するラクト・ネオラクト系列糖脂質は、シグナル伝達場としての GEM 構造の会合や安定化の制御において重要な役割を担っており、BCR シグナル関連の特定の分子の GEM 構造への移動の制御をしているのではないかと考えられる。

ちなみに、*B3gnt5* 遺伝子のノックアウトマウスについては、幾つかの研究グループによっても、複数のマウス系統が作製され、解析されている (41, 52–54)。その結果、糖脂質上のポリラクトサミンが受精卵の着床などの生殖機能異常や性行動、免疫異常などが報告されている (52–54)。このように、樹立された各々のマウス系統で表現型の違いが見出されているのだが、その系統ごとの違いが何故生じるのかについては現時点ではよく分かっていない。

Fig. 5. Upregulation of cholera toxin B-subunit (CT-B) staining as a glycolipid-enriched microdomain (glycolipid raft) marker and distribution of GEM proteins in *B3gnt5*^{-/-} B cells. (A) Fluorescence microscopy of GEMs on the cell surface. Fluorescence microscopy showed a CT-B-induced punctate pattern indicating GEM structures on the B cell surface (upper panel). Resting or stimulated isolated B cells were stained with FITC-conjugated CT-B. The results shown are representative of several independent experiments revealing markedly stronger staining of *B3gnt5*^{-/-} than of WT B cells. The fluorescence intensity of positive signals for each CT-B-stained punctate region was analyzed by a BZ-Analyzer (KEYENCE) (lower panel). The total value of the positive signals on each cell surface was measured. Statistical analysis of the difference between WT and *B3gnt5*^{-/-} B cells, with or without stimulation, was performed using one-way ANOVA and Tukey testing by GraphPad PRISM4 software. Data are given as each cell and means (bold line) and standard deviation. P values are *1: P<0.01, *2: P<0.01. (B) Distribution of BCR, CD19, and Lyn in GEMs separated into fractions by sucrose density gradient centrifugation. B cells stimulated with anti-BCR and anti-CD19 antibodies were lysed with 1% Triton X-100 solubilization buffer. After sucrose gradient centrifugation, fractions were collected from the top of the gradient. Next, every second fraction was combined starting from the top fraction. GM1, as a GEM marker, was detected using HRP-conjugated CT-B, as shown in the upper panel. After fractionation, immunoprecipitation of the BCR and CD19 was performed using anti-BCR and anti-CD19 antibody, respectively. BCR (sIgM) and CD19 proteins in *B3gnt5*^{-/-} B cells were upregulated in the GEM fraction (fractions 1-4). Lyn protein was also upregulated in the GEM fraction of *B3gnt5*^{-/-} B cells. The results shown are representative of several independent experiments. *: non-specific bands.

F. Regulation of the Immune Response by Polylactosamine

Our work has strongly indicated that the long polylactosamine chains on *N*-glycans are synthesized by $\beta 3\text{GnT}2$ (42). In addition, lacto and neolacto-series glycolipids are synthesized by $\beta 3\text{GnT}5$ (41). These studies suggested that polylactosamine deficiency either on receptor glycoproteins on the cell surface or on glycolipids leads to hyperresponsiveness of lymphocytes to external stimuli.

Our studies also suggested that polylactosamine chains on glycoproteins (*N*-glycans) play important roles in controlling the assembly and stabilization of receptor complexes via an inhibitory mass effect of polylactosamine on molecular interactions. In addition, our study suggested that lacto/neolacto-series glycolipids play an important role in the formation and function of GEM structures. From these studies, we think that the polylactosamine chain is one of the important factors that determines the thresholds for immune responses at a cellular level.

On the cell surface, there seems to be a microstructure known as a lattice structure ((poly)lactosamine-mediated lattice) (55, 56) (Fig. 7A, left side of figure, lattice theory).

F. ポリラクトサミン糖鎖による免疫反応の制御

我々はこれらのノックアウトマウスでの機能解析を通じて、 $\beta 3\text{GnT}2$ が生体内では主として *N*-glycan 上の長鎖ポリラクトサミン鎖の合成に関与していること (42)、 $\beta 3\text{GnT}5$ がラクト・ネオラクト系列糖脂質糖鎖上のポリラクトサミン鎖の合成に関与していることを明らかにした (41)。そしてこれらの研究から、免疫細胞表面の糖タンパク質受容体や糖脂質に結合しているポリラクトサミン鎖の消失は、外部刺激に対するリンパ球の過剰な活性化を引き起こすことが示唆された。

我々の研究より、糖タンパク質 (*N*-glycan) 上のポリラクトサミンが受容体タンパク質の会合や (受容体タンパク質複合体の) 安定化に重要であることが示唆された。これらは分子間相互作用において、受容体タンパク質に結合するポリラクトサミン鎖が、その物理的質量により、受容体タンパク質の会合を抑止する (邪魔をする) ことによるものと思われる。また、ラクト・ネオラクト系列糖脂質が受容体シグナルの伝達の場合である GEM 構造の形成や機能に重要な機能を果たしていることが示唆された。これらの研究から、我々はポリラクトサミン糖鎖が細胞レベルでの免疫応答の閾値を決定する重要な因子の一つなのではないかと考えている。

Fig. 6. Phosphorylation signals with BCR/CD19 cross-linking are upregulated in *B3gnt5*^{-/-} B cells. (A) Analysis of phosphorylation status. Resting B cells from the spleen were stimulated by cross-linking anti-BCR antibody for the indicated time. *B3gnt5*^{-/-} B cells exhibited significantly upregulated phosphorylation signals. (B) Resting B cells from *B3gnt5*^{-/-} mice show enhanced responses to BCR-mediated stimulation. Resting B cells were cultured with the indicated dose of F(ab')₂ anti-IgM. Proliferative responses were detected by [³H]-TdR incorporation. *B3gnt5*^{-/-} B cells showed hyper-proliferation by BCR stimulation as compared with WT B cells. (C) Immune response to T cell-independent type II antigen (as antibody production). We examined the *in vivo* response to the T-independent type II antigen as B cell function. Mice were immunized intraperitoneally with Trinitrophenol (TNP)-Ficoll as immunogen at day 0. The levels of TNP-specific IgM antibody in sera were determined by ELISA. The levels of TNP-specific IgM production were slightly upregulated at an early stage of the response in *B3gnt5*^{-/-} mice as compared with WT mice. The levels of IgM in serum are presented as means (symbols) ± S.E.. P values are *: P<0.05. Open circles: WT mice; closed circles: *B3gnt5*^{-/-} mice.

This lattice structure is formed by cross-linking between glycoproteins (containing multivalent glycan) and endogenous lectins (having multivalent binding sites), such as galectin (57). The lattice structures regulate signal transduction and the threshold of cellular responses by controlling movement and turnover (half-life) of receptor glycoproteins (58–61). In addition, it is thought that lattice structures modulate cellular interactions.

In WT mice, BCR proteins are associated after stimulation and form a GEM structure. This response occurs forcibly under the limitation of molecular actions by the lattice structure. This response results in intracellular signaling to each cell and activation of cells.

In our study on the *B3gnt2*^{-/-} mouse, we found

細胞表面には(ポリ)ラクトサミン糖鎖を介した格子構造(Lattice 構造)という微細な構造(microstructure)が存在すると考えられている(55、56)(図7A、図の左側。Lattice 仮説)。この Lattice 構造は糖タンパク質上の多価の糖鎖が galectin のような多価の内在性レクチンによって他の分子と架橋されて形成される構造として考えられている(57)。Lattice 構造は細胞表面の糖タンパク質分子の動きやターンオーバー(半減期)を制御することで、シグナル伝達や細胞応答の閾値を決めていると考えられている(58–61)。また、Lattice 構造は細胞間相互作用なども調節していると考えられている。

野生型マウスでは、抗原などの刺激によって、BCR タンパク質が会合するとともに、GEM 構造が形成される。これは Lattice による分子の動きが制限された状態で、半ば強制的に

Fig. 7. Biofunction of poly lactosamine chains on the cell surface (hypothetical model). Schema of model for movement of receptor glycoproteins and glycolipids (GEM) on the cell surface in *B3gnt2*^{-/-} (A) and *B3gnt5*^{-/-} (B) cells in a resting or activated state. A hypothesis for the abnormalities observed in each knockout cell is suggested. The glycan structures lacking in each knockout mouse are indicated by rectangles. The lattice structure on the cell surface of the WT cell is illustrated on the left of upper panel. In *B3gnt2*^{-/-} mice, lack of poly lactosamine on glycoproteins induces disappearance of the lattice structure. This makes it easier for receptor glycoproteins to move around on the cell surface. We think that hypoglycosylation of glycoprotein receptors may regulate binding affinity between the receptor and its ligand, or it may regulate association of receptor. In general, GEMs (lipid rafts) are known to be essential for the localization of signal transduction. An important issue in GEM function is aggregation. Under the naïve condition before stimulation, it is known that GEMs are small structures. By clustering GEM-associated proteins, the small individual GEMs cluster into larger, visible and functional units. GEM formation is reversible, and GEMs exist only as transiently stabilized structures. In *B3gnt5*^{-/-} B cells, larger GEM units are made more rapidly as compared with WT B cells. *B3gnt5*^{-/-} B cells showed a marked increase in BCR-related molecules, such as BCR, CD19, and the signaling molecule Lyn, in GEMs as compared with WT mice. There are at least two possible molecular mechanisms that could be responsible for the phenomenon observed in *B3gnt5*^{-/-} B cells. First, BCR/CD19 complexes might be transferred efficiently into GEMs, because many more clustered GEMs are formed in *B3gnt5*^{-/-} B cells than in WT B cells. Second, poly lactosamine on glycolipids might control the behavior of glycoprotein entry into or exclusion from GEMs. Dissecting the detailed mechanisms responsible for enhanced GEM formation in *B3gnt5*^{-/-} B cells is an attractive subject for future study. In summary, these observations suggest that poly lactosamine-deficient cells lead to upregulation of immune responses by abnormal movement of cell-surface proteins and/or formation of the GEM microstructure.

polylactosamine on the immune co-stimulatory molecules CD28 and CD19, and showed that polylactosamine levels on these molecules were reduced in *B3gnt2*^{-/-} immunocytes. In *B3gnt2*^{-/-} mice, a reduction of polylactosamine on glycoproteins leads to a lack of lattice structure. We assume that this makes it easier for receptor proteins such as CD28 or CD19, to move around on the cell surface. Consequently, the clustering of receptor proteins in *B3gnt2*^{-/-} mice occurs at an earlier stage than in the WT mouse (Fig. 7, right of figure). These observations suggest that *B3gnt2*^{-/-} lymphocytes tend to be more easily activated by stimulation as compared with WT lymphocytes. We think that hypoglycosylation of glycoprotein receptors may regulate binding affinity between the receptor and its ligand, or it may regulate association of the receptor.

It has been reported that glycolipid are not essential for formation of GEMs (62). However, from our studies on the *B3gnt5*^{-/-} mouse, we think that polylactosamine on glycolipids may play an important role in forming the GEM structure as a signaling platform on the cell surface. Both the association of receptor complexes and the platform formed by clustered GEMs are important for signaling via GEMs. In *B3gnt5*^{-/-} resting B cells, the small GEMs can easily aggregate into larger units when receptor complexes are formed. Some relations between GEMs and the lattice structure may exist, because it is known that some galectins are localized in the GEM structure. At present, the details of the molecular mechanism are still unclear, but the GEM structure is thought to be stable in *B3gnt5*^{-/-} B cells. In any case, larger GEM units are made more rapidly in *B3gnt5*^{-/-} B cells as compared with WT B cells. Therefore, a larger amount of BCR-related proteins such as the BCR and CD19 molecule, flow into GEMs and activate cells (Fig. 7B). These observations suggest that *B3gnt5*^{-/-} B cells tend to be more easily activated after stimulation as compared with WT lymphocytes.

Taken together, these studies have demonstrated that polylactosamine deficiency on glycolipids causes various abnormalities in cellular function through regulation of receptor function and GEM formation. However, further work is needed to clarify both the mechanism of these phenotypes and the hypothesis in detail.

G. Future Perspective

As a first step to further clarify the function and importance of specific carbohydrate structure, glycogene-deficient mice have been generated and investigated.

In order to elucidate the detailed role of polylactosamine chains on biologically relevant sites, initially we cloned glycosyltransferase genes belonging to the β 1,3-glycosyltransferase family, especially β 3GnTs. Subsequently, many studies have shown that these enzymes have different substrate specificities, synthesize characteristic carbohydrate

起こっていると考えられる。その結果、GEM 構造内において、細胞内へシグナルが伝達され、細胞の活性化を生じる。

一方、*B3gnt2*^{-/-} マウスを用いた研究から、我々は CD28 や CD19 分子などの上にポリラクトサミン鎖が結合していることを見出し、これが *B3gnt2*^{-/-} マウス免疫細胞では減少していることを明らかにした。我々は、糖タンパク質上のポリラクトサミン糖鎖の欠損により、Lattice 構造の消失が誘導され、CD19 を始めとした細胞表面の受容体タンパクが動き易い状態になっているのではないかと (仮説として) 考えている。その結果、野生型マウスよりも早く (受容体タンパク質の) クラスターリング (会合) が起こっていると考えている (図 7A、図の右側)。以上より、*B3gnt2*^{-/-} リンパ球では野生型と比較して、細胞の活性化が非常に起こりやすくなっていると示唆される。我々は、受容体糖タンパク質の糖鎖欠損が受容体タンパク質とそのリガンドとの間の結合親和性を制御するとともに、受容体タンパク質の会合をも制御している可能性を考えている。

糖脂質は GEM 構造の形成には必須ではないとの報告がなされている (62) が、*B3gnt5*^{-/-} マウスの研究から、我々は細胞表面のシグナル伝達の場合としての GEM 構造の形成にポリラクトサミンが重要な役割を担っていると考えている。受容体タンパク質の会合と、集積した GEM から成る場 (構造) は、GEM を介したシグナル伝達に非常に重要である。*B3gnt5*^{-/-} 休止 B 細胞では、元々の小さな GEM 構造が、受容体分子の複合体の形成によって、より大きな単位に凝集し易いようである。GEM 構造内に Galectin が局在するなどしており (66, 67)、GEM 構造と Lattice 構造の間にも何か関連があるのかも知れない。現時点では詳細な分子メカニズムは不明だが、*B3gnt5*^{-/-} マウス B 細胞の GEM 構造は安定的になっているのかも知れない。いずれにせよ、*B3gnt5*^{-/-} マウスでは、野生型マウスよりも早く、大きな GEM 構造が出来ており、その結果、GEM 内により多くの BCR 分子や CD19 分子が流入していると考えられた (図 7B)。以上より、*B3gnt5*^{-/-} マウスでは細胞の活性化が起こりやすくなっていると示唆された。

これらの研究により、糖脂質ポリラクトサミンの異常は、受容体機能や GEM 構造の形成を制御することで様々な異常を引き起こすことが示された。しかしながら、これらの表現型や仮説の詳細について明らかにするためには、さらなる解析を必要としており、将来の課題でもある。

G. おわりに

特定の糖鎖の機能やその重要性をさらに明確にする為の第一歩として、糖鎖遺伝子ノックアウトマウスの作製と解析が盛んに行われてきた。生物機能の作用点におけるポリラクトサミン鎖の詳細な役割を明らかにするために、我々はまず、 β 1,3-結合糖転移酵素群に属する糖転移酵素遺伝子、特に β 3GnT 遺伝子をクローニングした。その後、多くの解析によって、異なる基質特異性を有しそれぞれ特徴的な糖鎖構造を合成すること、そして生物学的に異なる機能を担っているこ

structures, and have biologically different functions. We raise the possibility that the polylactosamine structure on glycoproteins and/or glycolipids might have significant effects on biological function in the immune system.

We believe that gene cloning and analysis of glycogene-deficient mice has laid the basis for further clarification of the importance of functional carbohydrate structures such as polylactosamine.

Acknowledgements

These studies were supported by the “Glycogene Library: GG”, “Structural Glycomics: SG”, “Medical Glycomics: MG” project in the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) of Japan.

References

1. Lee, N., Wang, W. C., and Fukuda, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20476–20487.
2. Renouf, D. V., and Hounsell, E. F. (1993) *Int. J. Biol. Macromol.* **15**, 37–42.
3. Wang, W. C., Lee, N., Aoki, D., Fukuda, M. N., and Fukuda, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23185–23190.
4. Ujita, M., McAuliffe, J., Schwientek, T., Almeida, R., Hindsgaul, O., Clausen, H., and Fukuda, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34843–34849.
5. Yu, L. C., Twu, Y. C., Chang, C. Y., and Lin, M. (2001) *Blood* **98**, 3840–3845.
6. Inaba, N., Hiruma, T., Togayachi, A., Iwasaki, H., Wang, X. H., Furukawa, Y., Sumi, R., Kudo, T., Fujimura, K., Iwai, T., Gotoh, M., Nakamura, M., and Narimatsu, H. (2003) *Blood* **101**, 2870–2876.
7. Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W. E., Yagi, F., and Kasai, K. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 232–254.
8. Arbones, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D. J., and Tedder, T. F. (1994) *Immunity* **1**, 247–260.
9. Ellies, L. G., Tsuboi, S., Petryniak, B., Lowe, J. B., Fukuda, M., and Marth, J. D. (1998) *Immunity* **9**, 881–890.
10. Fukuda, M., Hiraoka, N., and Yeh, J. C. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 467–470.
11. Mitoma, J., Bao, X., Petryniak, B., Schaerli, P., Gauguier, J. M., Yu, S. Y., Kawashima, H., Saito, H., Ohtsubo, K., Marth, J. D., Khoo, K. H., von Andrian, U. H., Lowe, J. B., and Fukuda, M. (2007) *Nat. Immunol.* **8**, 409–418.
12. Gilbert, C. W., Zaroukian, M. H., and Esselman, W. J. (1988) *J. Immunol.* **140**, 2821–2828.
13. Saitoh, O., Wang, W. C., Lotan, R., and Fukuda, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 5700–5711.
14. Narimatsu, H., Sinha, S., Brew, K., Okayama, H., and Qasba, P. K. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4720–4724.
15. Amado, K., Almeida, R., Carneiro, F., Leverly, S. B., Holmes, E. H., Nomoto, M., Hollingsworth, M. A., Hassan, H., Schwientek, T., Nielsen, P. A., Bennett, E. P., and Clausen, H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 12770–12778.
16. Amado, M., Almeida, R., Schwientek, T., and Clausen, H. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 35–53.
17. Hennet, T. (2002) *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 1081–1095.
18. Hennet, T., Dinter, A., Kuhnert, P., Mattu, T. S., Rudd, P. M., and Berger, E. G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 58–65.
19. Sasaki, K., Kurata-Miura, K., Ujita, M., Angata, K., Nakagawa, S., Sekine, S., Nishi, T., and Fukuda, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14294–14299.
20. Zhou, D., Dinter, A., Gutierrez Gallego, R., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F., Berger, E. G., and Hennet, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 406–411.
21. Shiraishi, N., Natsume, A., Togayachi, A., Endo, T., Akashima, T., Yamada, Y., Imai, N., Nakagawa, S., Koizumi, S., Sekine, S., Narimatsu, H., and Sasaki, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3498–3507.
22. Togayachi, A., Sato, T., Iwai, T., and Narimatsu, H. (2007) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **19**, 29–40.
23. Bao, X., Kobayashi, M., Hatakeyama, S., Angata, K., Gullberg, D., Nakayama, J., Fukuda, M. N., and Fukuda, M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12109–12114.
24. Togayachi, A., Akashima, T., Ookubo, R., Kudo, T., Nishihara, S., Iwasaki, H., Natsume, A., Mio, H., Inokuchi, J., Irimura, T., Sasaki, K., and Narimatsu, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 22032–22040.
25. Yeh, J. C., Hiraoka, N., Petryniak, B., Nakayama, J., Ellies, L. G., Rabuka, D., Hindsgaul, O., Marth, J. D., Lowe, J. B., and Fukuda, M. (2001) *Cell* **105**, 957–969.
26. Henion, T. R., Zhou, D., Wolfer, D. P., Jungalwala, F. B., and Hennet, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 30261–30269.
27. Chou, D. K., Henion, T. R., and Jungalwala, F. B. (2003) *J. Neurochem.* **86**, 917–931.
28. Chou, D. K., Prasadara, N., Koul, O., and Jungalwala, F. B. (1991) *J. Neurochem.* **57**, 852–859.
29. Jungalwala, F. B., Chou, D. K., Suzuki, Y., and Maxwell, G. D. (1992) *J. Neurochem.* **58**, 1045–1051.
30. Iwai, T., Inaba, N., Naundorf, A., Zhang, Y., Gotoh, M., Iwasaki, H., Kudo, T., Togayachi, A., Ishizuka, Y., Nakanishi, H., and Narimatsu, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12802–12809.
31. Kataoka, K., and Huh, N. H. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 843–848.

とが明らかになってきた。我々は糖タンパク質や糖脂質上のポリラクトサミン構造が、免疫システムにおける生物学的機能において大きな効果を有しているという可能性を示した。

遺伝子の単離と遺伝子ノックアウトマウスの解析により、ポリラクトサミンのような機能的糖鎖構造の重要性をさらに明確にする為の基礎が築かれたと考えて良いであろう。

謝 辞

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) プロジェクト「糖鎖遺伝子ライブラリーの構築プロジェクト」「糖鎖エンジニアリングプロジェクト」「糖鎖機能活用技術開発」の一環として実施したものである。

32. Seko, A., and Yamashita, K. (2004) *FEBS Lett.* **556**, 216–220.
33. Ishida, H., Togayachi, A., Sakai, T., Iwai, T., Hiruma, T., Sato, T., Okubo, R., Inaba, N., Kudo, T., Gotoh, M., Shoda, J., Tanaka, N., and Narimatsu, H. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 71–78.
34. Seko, A., and Yamashita, K. (2005) *Glycobiology* **15**, 943–951.
35. Endo, T., and Toda, T. (2003) *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1641–1647.
36. Yoshida, A., Kobayashi, K., Manya, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Toda, T., and Endo, T. (2001) *Dev. Cell* **1**, 717–724.
37. Schachter, H., Vajsar, J., and Zhang, W. (2004) *Glycoconj. J.* **20**, 291–300.
38. Hennet, T. (2012) *Biochim. Biophys. Acta* Feb.9(Epub), PMID:22343051.
39. Jaeken, J. (2010) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1214**, 190–198.
40. Henion, T. R., Raitcheva, D., Grosholz, R., Biellmann, F., Skarnes, W. C., Hennet, T., and Schwarting, G. A. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 1894–1903.
41. Togayachi, A., Kozono, Y., Ikehara, Y., Ito, H., Suzuki, N., Tsunoda, Y., Abe, S., Sato, T., Nakamura, K., Suzuki, M., Goda, H. M., Ito, M., Kudo, T., Takahashi, S., and Narimatsu, H. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11900–11905.
42. Togayachi, A., Kozono, Y., Ishida, H., Abe, S., Suzuki, N., Tsunoda, Y., Hagiwara, K., Kuno, A., Ohkura, T., Sato, N., Sato, T., Hirabayashi, J., Ikehara, Y., Tachibana, K., and Narimatsu, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15829–15834.
43. Leppanen, A., Stowell, S., Blixt, O., and Cummings, R. D. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 5549–5562.
44. Nachbar, M. S., Oppenheim, J. D., and Thomas, J. O. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2056–2061.
45. Kuno, A., Kato, Y., Matsuda, A., Kaneko, M. K., Ito, H., Amano, K., Chiba, Y., Narimatsu, H., and Hirabayashi, J. (2009) *Mol. Cell Proteomics* **8**, 99–108.
46. Hakomori, S. (2004) *An. Acad. Bras. Cienc.* **76**, 553–572.
47. Kasahara, K., and Sanai, Y. (1999) *Biophys. Chem.* **82**, 121–127.
48. Kasahara, K., and Sanai, Y. (2003) *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **48**, 1164–1170.
49. Kasahara, K., Sanai, Y., Nakamura, K., and Hashimoto, Y. (2001) *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **46**, 812–820.
50. Simons, K., and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569–572.
51. Simons, K., and Toomre, D. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39.
52. Biellmann, F., Henion, T. R., Burki, K., and Hennet, T. (2008) *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 699–706.
53. Biellmann, F., Hulsmeier, A. J., Zhou, D., Cinelli, P., and Hennet, T. (2008) *BMC Dev. Biol.* **8**, 109.
54. Kuan, C. T., Chang, J., Mansson, J. E., Li, J., Pegram, C., Fredman, P., McLendon, R. E., and Bigner, D. D. (2010) *BMC Dev. Biol.* **10**, 114.
55. Brewer, C. F. (2001) *Adv. Exp. Med. Biol.* **491**, 17–25.
56. Brewer, C. F., Miceli, M. C., and Baum, L. G. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 616–623.
57. Rabinovich, G. A., Toscano, M. A., Jackson, S. S., and Vasta, G. R. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 513–520.
58. Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., and Dennis, J. W. (2001) *Nature* **409**, 733–739.
59. Garner, O. B., and Baum, L. G. (2008) *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1472–1477.
60. Rudd, P. M., Wormald, M. R., Stanfield, R. L., Huang, M., Mattsson, N., Speir, J. A., DiGennaro, J. A., Fetrow, J. S., Dwek, R. A., and Wilson, I. A. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 351–366.
61. Sacchettini, J. C., Baum, L. G., and Brewer, C. F. (2001) *Biochemistry* **40**, 3009–3015.
62. Ostermeyer, A. G., Beckrich, B. T., Ivarson, K. A., Grove, K. E., and Brown, D. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 34459–34466.
63. Ohyama, C., Tsuboi, S., and Fukuda, M. (1999) *Embo J.* **18**, 1516–1525.
64. Renkonen, R., Mattila, P., Majuri, M. L., Rabina, J., Toppila, S., Renkonen, J., Hirvas, L., Niittymäki, J., Turunen, J. P., Renkonen, O., and Paavonen, T. (1997) *Glycoconj. J.* **14**, 593–600.
65. Streit, A., Yuen, C. T., Loveless, R. W., Lawson, A. M., Finne, J., Schmitz, B., Feizi, T., and Stern, C. D. (1996) *J. Neurochem.* **66**, 834–844.
66. Braccia, A., Villani, M., Immerdal, L., Niels-Christiansen, L. L., Nystrom, B. T., Hansen, G. H., and Danielsen, E. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15679–15684.
67. Hsu, D. K., Chernyavsky, A. I., Chen, H. Y., Yu, L., Grando, S. A., and Liu, F. T. (2009) *J. Invest. Dermatol.* **129**, 573–583.

Profile of the Author

Akira Togayachi received his Ph. D. degree from the Laboratory of Cancer Biology and Molecular Immunology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo in 2002. He then worked at Glycogene Function Team of Research Center for Glycoscience (RCG), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST). He is currently working at the Functional Glycoproteomics Team, Research Center for Medical Glycoscience (RCMG), AIST, as a researcher and investigating the biological functions of glycoconjugates and glycosyltransferase genes.