Dynamic Cytoskeletal Glycosylation and Neurodegenerative Disease

ダイナミックな細胞骨格のグリコシル化と神経変性疾患

Arnold, C. Shane ; and Hart, Gerald W.*

Dept. of Biological Chemistry The Johns Hopkins University School of Medicine

Baltimore, Maryland 21205, USA

FAX: 1-410-614-8804, E-mail: gwhart@bs.jhmi.edu

Key words: Alzheimer's disease, cytoskeleton, *O*-GlcNAc, tau, phosphorylation, protein glycosylation

Abstract

O-GlcNAcylation of nucleoplasmic and cytoplasmic proteins is a ubiquitous and highly dynamic modification. It entails the attachment of a single *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) moiety *O*-glycosidically linked to side-chain hydroxyls of serine and threonine residues. The rapidly expanding list of *O*-GlcNAcylated proteins includes RNA Polymerase II, nuclear pore, heat shock, and tumor suppressor proteins, nuclear oncogenes, and numerous cytoskeletal and membrane associated proteins. Many sites of *O*-GlcNAc addition are similar to consensus sites of protein phosphorylation, and in some cases identical. Accordingly, *O*-GlcNAcylation and *O*-phosphorylation appear to be reciprocally related on some proteins. All *O*-GlcNAcylated proteins are phosphoproteins which assemble into tightly regulated reversible multi-protein complexes. Several *O*-GlcNAcylated proteins are key components involved in cytoskeletal assembly and organization, and defects in their regulated multimerization are implicated in several neurodegenerative disorders. Thus, abnormal cytoskeletal *O*-GlcNAcylation may promote defects in regulated protein multimerization and potentiate disease.

要約

核や細胞質タンパク質の *O*-GlcNAc 化は、偏在する高度にダイナミックな修飾である。それは、1 個の *O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) が、*O*-グリコシド結合によって、Ser または Thr 残基の側鎖の水酸基に結合することである。急速に増加している *O*-GlcNAc 化タンパク質のリストには、RNA ポリメラーゼ II、核孔タンパク質、熱ショックタンパク質、腫瘍抑制タンパク質、核癌遺伝子産物、および膨大な数の神経細胞骨格および膜結合型のタンパク質がある。*O*-GlcNAc が結合する多くの部位は、タンパク質のリン酸化のコンセンサス部位に類似しており、一致している場合もある。したがって、いくつかのタンパク質において、*O*-GlcNAc 化とリン酸化に相反する関係があるように見える。すべての *O*-GlcNAc 化タンパク質はリン酸化タンパク質であり、集合して厳密に調節された、複数タンパク質の可逆的な複合体を形成する。いくつかの *O*-GlcNAc 化タンパク質は、細胞骨格の集合や構成に携わる鍵となる成分であり、それらの調節された多量体化における欠陥は、いくつかの神経変性異常に関与している。それゆえに、細胞骨格の異常な *O*-GlcNAc 化は、調節されたタンパク質の多量体形成を損ない、疾患を進行させるであろう。

A. Introduction

The serendipitous discovery of *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc)¹ while probing the cell surface of T-lymphocytes with $\beta(1, 4)$ -galactosyltransferase ($\beta(1, 4)$ GT) has dramatically expanded the realm of protein glycosylation. Unlike secretory or luminal *N*-linked glycoproteins, *O*-GlcNAc is attached to serine and threonine residues of nuclear and cytoplasmic proteins (For reviews see: 1–6). The diverse and wide-

A. 序

$\beta(1, 4)$ -ガラクトース転移酵素 ($\beta(1, 4)$ GT) を用いて T リンパ球細胞表面を研究している時、*O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) が思いがけなく発見され、タンパク質のグリコシル化の分野がめざましく発展した。分泌型の、または腔の *N*-結合型糖タンパク質とは異なり、*O*-GlcNAc は核や細胞質タンパク質の Ser または Thr 残基に結合する (総説1–6を参照)。*O*-

* To whom correspondence should be addressed.

¹ The abbreviations used are: *O*-GlcNAc, *O*-linked *N*-acetylglucosamine; $\beta(1, 4)$ GT, $\beta(1, 4)$ galactosyltransferase; Con A, Concanavilin A; PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate; PUGNAc, *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-*N*-phenylcarbamate; MAP, microtubule-associated protein; AP3, assembly protein 3; HPAEC-PAD, high pH anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection; RP-HPLC, reverse phase-high pressure liquid chromatography; OGT, *O*-GlcNAc transferase; TPR, tetra-*tr*icopeptide repeat; CaMKII, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II; GSK-3 β , glycogen synthase kinase-3 β ; PKC, protein kinase C; PKA, protein kinase A; cAMP-PK, cAMP dependant protein kinase; IF, intermediate filament; NF, neurofilament; ESMS, electrospray mass spectrometry; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time of flight; AD, Alzheimer's disease; NFT, neurofibrillary tangle; β -APP, β -amyloid precursor protein; PHFs, paired helical filaments; PHF-Tau-paired helical filament tau; FTDP-17, frontotemporal dementia-17.

spread distribution of *O*-GlcNAcylated proteins is represented by its presence in diverse organisms such as: viruses, fungi, and protozoa. Among the *O*-GlcNAcylated proteins identified to date are a family of dynamic filamentous phosphoproteins which constitute the cytoskeleton. Phosphorylation regulates their interactions within the cell, however, their abnormal hyperphosphorylation leads to the formation of insoluble filamentous aggregates and is associated with the pathology of a number of neurodegenerative disorders. Interestingly, phosphorylation and glycosylation appear to be reciprocally related within the cytoskeleton. In this review the following focal points will be discussed: the dynamic and widespread distribution of *O*-GlcNAc, the enzymatic regulation of protein *O*-GlcNAcylation, (Ser,Thr)-*O*-GlcNAcylation and (Ser,Thr)-*O*-phosphorylation, *O*-GlcNAcylated cytoskeletal proteins, and ultimately how *O*-GlcNAcylation of the cytoskeleton may be important in many neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease.

B. *O*-GlcNAc Is Dynamic and Abundant

Unlike the addition of *N*-linked and *O*-linked oligosaccharides, the *O*-GlcNAcylation of proteins is a highly dynamic process (Fig. 1). For instance, in pulse-chase experiments with U373-MG astrogloma cells, 100% of the *O*-linked GlcNAc on α B-crystallins turned over in 20h while the polypeptide core levels remained unchanged over a 40h chase (7). Likewise, acid hydrolysis of keratins (K8, K18) purified from [3 H]glucosamine-labeled HT29 human colonic cells revealed that both the biosynthesis and degradation rates of *O*-GlcNAc were much faster than the polypeptide (8). *O*-GlcNAc levels also change in response to various cellular stimuli. Kears and Hart observed a rapid reduction in the *O*-GlcNAcylation of cytoplasmic proteins released from digitonin permeabilized T-lymphocytes when stimulated with Concanavalin A (Con A) (9). Additionally, *O*-GlcNAcylation of nuclear proteins rapidly increased in T cell

GlcNAc 化タンパク質の、多様で広範囲に及ぶ分布は、その他の生物、例えばウイルスや菌類、原生動物類などにおける存在によって示される。今まで同定された *O*-GlcNAc 化タンパク質は、細胞骨格を構成するダイナミックな繊維状リン酸化タンパク質の一群である。リン酸化は、それらのタンパク質の細胞内での相互作用を調節するが、異常な過度のリン酸化は不溶性の繊維状凝集体の形成を引き起こし、多くの神経変性異常の病理に関係する。興味深いことに、リン酸化とグリコシル化は細胞骨格内で相反関係があるようだ。この論文では、*O*-GlcNAc のダイナミックで広範囲な分布、*O*-GlcNAc 化タンパク質の酵素的調節、(Ser,Thr)-*O*-GlcNAc 化と (Ser,Thr)-*O*-リン酸化、*O*-GlcNAc 化細胞骨格タンパク質、ならびに最終的には細胞骨格の *O*-GlcNAc 化がアルツハイマー病のような多くの神経変性異常において、どれほど重要かについて焦点を当てて議論する。

B. ダイナミックで豊富な *O*-GlcNAc

タンパク質の *O*-GlcNAc 化は、*N*-や *O*-結合型オリゴ糖鎖の付加と違い、非常にダイナミックな過程である(図 1)。例えば U373-MG 血管神経腫細胞を用いたパルスチェイス実験では、ポリペプチドコアのレベルは 40 時間にわたって変化しなかったのに対し、 α B-クリスタリン上の *O*-結合型 GlcNAc は 20 時間以内に 100% 変換した(7)。同様に、[3 H]グルコサミン標識 HT29 ヒト結腸細胞から精製したケラチン (K8,K18) の酸加水分解では、*O*-GlcNAc の生合成と分解の両方の速度がポリペプチドよりもかなり速いことが明らかになった(8)。*O*-GlcNAc のレベルはさまざまな細胞刺激に応じて変化する。Kears と Hart は、ジギトニン透過性 T リンパ球から分泌される、細胞質タンパク質の *O*-GlcNAc 化が、コンカナバリン A (ConA) の刺激により急速に減少することを見いだした(9)。その上、T 細胞ハイブリ

Fig. 1. The dynamics of protein *O*-GlcNAcylation. The *O*-GlcNAc modification occurs on serine and threonine residues, and turns over more rapidly than the protein backbone.

hybridomas stimulated with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and the calcium ionophore, ionomycin. Furthermore, treatment of HT29 cells with *O*-(2 acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-*N*-phenylcarbamate (PUGNAc), a potent inhibitor of the enzyme responsible for the removal of *O*-GlcNAc, caused an approximate two fold increase in *O*-GlcNAc levels (10). Changes in the *O*-GlcNAcylation of proteins also occur during the cell cycle. For example, the amount of *O*-GlcNAc on human keratin K18 increases seven fold in mitotically arrested HT29 cells, whereas during S-phase, its glycosylation is unchanged (11). Collectively, these data clearly illustrate the dynamics of *O*-GlcNAcylation, and establish this as a unique form of protein glycosylation. In addition, this evidence suggests that *O*-GlcNAc is a regulatory modification.

The number of proteins known to be modified with *O*-GlcNAc is continuously growing. The majority of eukaryotic *O*-GlcNAcylated proteins reside within the nucleus. In fact, approximately 54% of *O*-linked GlcNAc (pmol/mg) is in the nucleus of an average liver cell (12). RNA Polymerase II and its associated transcription factors are a few of the many nuclear glycosylated proteins (13). Nuclear pore proteins, including the heavily glycosylated nucleoporin p62, are also modified with *O*-GlcNAc (14, 15). Moreover, the tumor suppressor p53 (16), oncoproteins c-myc (17) and v-Erb-a (18), as well as the estrogen receptor (19) and SV40 large T antigen (20), are all *O*-GlcNAcylated.

In addition to nuclear proteins, *O*-GlcNAcylation also occurs on cytoskeletal, cytosolic, and membranous proteins throughout the cytoplasm. Several *O*-GlcNAcylated proteins have been identified within the cytoskeleton (Table I), including a dynamic network of intracellular proteins involved in various functions from muscle contraction, axonal transport, to neu-

ドーマ中の核タンパク質の *O*-GlcNAc 化は、ホルボー 12-ミリスチン酸エステル 13-酢酸 (PMA) やカルシウムイオノホア、イオノマイシンの刺激により急速に増加した。さらに、HT29 細胞を、*O*-GlcNAc を除去する酵素の強力な阻害剤である *O*-(2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコピラノシリデン)アミノ-*N*-カルバミン酸フェニル (PUGNAc) で処理することにより、*O*-GlcNAc レベルでおよそ 2 倍の増加がみられた (10)。細胞周期の間でもタンパク質の *O*-GlcNAc 化の変化は起きる。例えば、HT29 細胞の分裂を停止させると、ヒトケラチン K18 上の *O*-GlcNAc の量は 7 倍に増加するが、一方では S 期の間そのグリコシル化は変化しない (11)。まとめると、これらのデータは *O*-GlcNAc 化のダイナミクスを明瞭に例証しており、これがタンパク質のグリコシル化の独特な形態であることを確立する。さらにこの証拠は、*O*-GlcNAc とは調節修飾であることを示唆している。

O-GlcNAc により修飾されることが知られているタンパク質の数は、継続的に増えている。真核生物の *O*-GlcNAc 化タンパク質の大多数は核内に存在する。実際には *O*-結合型 GlcNAc (pmol/mg) のおよそ 54 % は、普通の肝細胞の核内にある (12)。RNA ポリメラーゼ II とそれに結合した転写因子は、多くのグリコシル化核タンパク質のうちの一部である (13)。グリコシル化を高度に受けた、ヌクレオポリン p62 を含む核膜孔タンパク質もまた、*O*-GlcNAc により修飾される (14, 15)。さらに腫瘍抑制因子 p53 (16)、腫瘍タンパク質の c-myc (17) と v-Erb-a (18) は、エストロゲン受容体 (19)、SV40 の大きな T 抗原 (20) と同様に、すべて *O*-GlcNAc 化を受ける。

核タンパク質に加え、*O*-GlcNAc 化は細胞質中の細胞骨格、細胞質ゾル、膜タンパク質に対しても起きる。いくつかの *O*-GlcNAc 化タンパク質は、細胞骨格内で同定され (表 I)、筋肉の収縮、軸索の輸送から神経筋シナプス形成までの、さまざまな機能に関係する細胞内タンパク質のダイナミックネットワーク

Table I. A list of some *O*-GlcNAcylated proteins found within the cytoskeleton. Among them are intermediate filaments, microtubule-associated proteins, and actin-membrane bridging proteins.

Identified *O*-GlcNAcylated Cytoskeletal Proteins

Ankyrin_G

Cytokeratins 13, 8, 18

Neurofilaments L, H, M

Erythr. Band 4.1

Synapsin I

MAP Proteins:

MAP1, MAP2, MAP4

Tau

Talin

Vinculin

α-Crystallins

β-Amyloid Precursor

Clathrin AP3

romuscular junction formation. Microtubule-associated proteins (MAPs), homologous phosphoproteins (21–23) which facilitate the polymerization of tubulin (24), are among the many *O*-GlcNAcylated proteins which constitute the cytoskeleton. The high molecular weight MAPs: MAP1, MAP2, and MAP4 (25), as well as the lower molecular weight family of tau proteins (26), are all modified with *O*-GlcNAc. The intermediate filament keratins, K13, K8, and K18 which are involved in maintaining the structural integrity of cells, are also *O*-GlcNAcylated. The neurofilaments NF-L, NF-M, and NF-H which are important in nerve conduction velocity and implicated in motor neuron diseases, likewise are *O*-GlcNAcylated (27, 28). In addition, ankyrins which are targeted to Nodes of Ranvier, specific domains within myelinated axons, are modified with *O*-GlcNAc (29). Other glycosylated cytoskeletal proteins include the α A and α B-crystallins (7, 30), the erythrocyte membrane protein Band 4.1 (31), talin (32), vinculin (33), synapsin I (34), and clathrin assembly protein 3 (AP3) (35–37). Cumulatively, it is clearly evident that there are numerous nuclear and cytoskeletal proteins modified with this dynamic post-translational modification. Further investigating these proteins will ultimately reveal the many multi-functional roles of *O*-GlcNAc.

C. The Enzymatic Regulation of *O*-GlcNAc

Studying the metabolism of *O*-GlcNAc first requires an identification and understanding of the enzymes involved. Two enzymatic activities, a UDP-GlcNAc:polypeptide *N*-acetylglucosaminyl-transferase (*O*-GlcNAc transferase) and an *O*-GlcNAc specific β -D-*N*-acetylglucosaminidase (*O*-GlcNAcase) are responsible for the addition and removal of *O*-GlcNAc to and from nuclear and cytoplasmic proteins, respectively. *O*-GlcNAc transferase was originally purified from rat liver (38), and subsequently cloned from a rat liver cDNA library (39) and from *C. elegans* (40). *O*-GlcNAcase has also been recently purified and characterized from rat spleen cytosol (41). Due to the highly dynamic nature of this modification, both enzymes regulating *O*-GlcNAcylation must be tightly controlled, and therefore thoroughly characterized.

The *O*-GlcNAc transferase (OGT) was originally purified to apparent homogeneity from rat liver cytosol, and is a heterotrimeric complex containing one 78 kDa (β) and two catalytic 110 kDa (α) subunits. Both of the enzyme's subunits are *O*-GlcNAcylated as well as tyrosine phosphorylated. The enzyme has an unusual high affinity for the donor substrate UDP-GlcNAc ($K_m = 545$ nM), and appears to have multiple affinities for UDP-GlcNAc across a broad physiological range (42) which gives it a competitive advantage over luminal UDP-GlcNAc transporters. OGT is inhibited by low micromolar concentrations of UDP, UTP, and UDP-GlcNAc. The enzyme has recently been cloned from *C. elegans*, human and rat liver cDNA libraries, and is evolutionarily conserved. However, at the

を含んでいる。相同性を持つリン酸化タンパク質である微小管結合タンパク質 (MAPs) (21–23) は、チューブリンの多量体化を促進するが (24)、細胞骨格を構成する多くの *O*-GlcNAc 化タンパク質の中の一群である。高分子量の MAPs : MAP1, MAP2, MAP4 (25) は、低分子量のタウタンパク質ファミリー (26) と同様に、すべて *O*-GlcNAc 化される。細胞の構造的完全性の維持に関わる、中間フィラメントケラチン、K13, K8, K18 もまた *O*-GlcNAc 化される。神経伝達速度において重要で、運動ニューロン疾患に関するニューロフィラメント NF-L, NF-M, NF-H も同様に *O*-GlcNAc 修飾される (27, 28)。さらに、有髄軸索内の特異的ドメインであるランビエ絞輪に局在するアンキリンも、*O*-GlcNAc 修飾される (29)。その他のグリコシル化細胞骨格タンパク質には、 α A と α B-クリスタリン (7, 30)、赤血球膜タンパク質 Band 4.1 (31)、テーリン (32)、ピンキュリン (33)、シナプシン I (34)、クラスリン集合タンパク質 3 (AP3) (35–37) が含まれる。このダイナミックな翻訳後修飾を受けた多くの核、細胞骨格タンパク質があるという証拠が、徐々に明らかになっていく。これらのタンパク質のさらなる研究により、最終的に、*O*-GlcNAc の多機能な役割が明らかになるだろう。

C. *O*-GlcNAcの酵素調節

O-GlcNAc の代謝について研究するためには、まずはじめに関与する酵素を同定し、理解することが必要である。2つの酵素活性、UDP-GlcNAc : ポリペプチド *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (*O*-GlcNAc 転移酵素) と *O*-GlcNAc 特異的 β -D-*N* アセチルグルコサミニダーゼ (*O*-GlcNAcase) は、それぞれ核や細胞質タンパク質に対する、*O*-GlcNAc の付加または除去を触媒する。*O*-GlcNAc 転移酵素は、もともとラットの肝臓から精製され (38)、その後ラット肝臓 cDNA ライブラリー (39)、および線虫 *C. elegans* (40) からクローニングされた。*O*-GlcNAcase は最近、ラット脾臓の細胞質ゾル (41) から精製され、特徴づけが行われた。*O*-GlcNAc 修飾は非常にダイナミックであるため、これを調節する両酵素は、厳密に制御されているはずであり、徹底的にこれらの性質を調べなければならない。

O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) は、もともとラットの肝臓の細胞質ゾルからほぼ均一に精製され、1つの 78 kDa (β) のサブユニットと、2つの 110 kDa (α) の触媒サブユニットからなる、ヘテロ三量体である。両酵素のサブユニットは、チロシンがリン酸化されると同様、*O*-GlcNAc 化されている。酵素は、ドナー基質 UDP-GlcNAc に対し非常に高い親和性を持っていて ($K_m = 545$ nM)、生理学的に広範囲にわたる複数の親和力を UDP-GlcNAc に対し示すため (42)、管腔の UDP-GlcNAc 輸送体よりも競争的に優位である。OGT は、低 μ M 濃度の UDP, UTP, および UDP-GlcNAc で阻害される。その酵素は最近、*C. elegans* およびヒト・ラット肝臓 cDNA ライブラリーからクローニングされ、また進化上で保存されている。しかしながら、ポリペプチ

polypeptide level it is uniquely unlike any other known glycosyltransferase. OGT contains an uncharacteristically high number of tetratricopeptide repeats (TPR), a structural motif implicated in both intra and inter-molecular protein-protein interactions (43). Consequently, the regulation of the enzyme's substrate specificity may depend upon its TPR-associated factors. OGT message, protein, and activity are present in numerous tissues including: brain, heart, kidney, liver, lung, spleen, pancreas and thymus. Among these, OGT is enriched in brain, thymus, and the pancreas.

The enzyme involved in *O*-GlcNAc removal, *O*-GlcNAcase, has been purified over 20,000-fold from rat spleen cytosol. *O*-GlcNAcase is a heterodimeric enzyme consisting of a 54 kDa (α) subunit and a 51 kDa (β) subunit. Unlike other hexosaminidases, this β -D-N acetylglucosaminidase (*O*-GlcNAcase) has a neutral pH optimum (pH 6.4), and is not inhibited by GalNAc or its analogs. *O*-GlcNAcase is however effectively inhibited by GlcNAc ($K_i = 3.9$ mM) and its analogs 1-azido-GlcNAc ($K_i = 1.14$ mM), 1-amino-GlcNAc ($K_i = 151$ μ M), and PUGNAc ($K_i = 52$ nM). *O*-GlcNAcase activity is present in many rat tissues including: liver, kidney, heart, lung, uterus, and spinal cord, but the enzyme is most enriched in the spleen and brain. The cloning of the rat cytosolic enzyme is in progress.

D. (Ser, Thr)-*O*-GlcNAcylation and (Ser, Thr)-*O*-Phosphorylation

Analogous to (Ser/Thr) protein kinases and protein phosphatases which modulate the phosphorylation state of proteins, OGT and *O*-GlcNAcase regulate the dynamic *O*-GlcNAcylation of proteins (Fig. 2). A large number of *O*-GlcNAcylation sites

ドレベルでは、他の既知の糖転移酵素とは比類なく異なっている。OGTは、分子内および分子間タンパク質-タンパク質相互作用に関係する構造モチーフである、テトラトリコペプチドの繰り返し (TPR) を類まれなほど数多く持っている (43)。したがって、酵素の基質特異性の調節は、その TPR 結合因子に依存している。OGT のメッセージ、タンパク質、ならびに活性は、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、膵臓、胸腺など、多くの組織に存在する。これらの中で OGT は、脳、胸腺、膵臓に豊富に存在する。

O-GlcNAc を除去する酵素の *O*-GlcNAcase は、ラットの脾臓細胞質ゾルから 20,000 倍以上に精製された。*O*-GlcNAcase は、54kDa (α) のサブユニットと 51kDa (β) のサブユニットからなる、ヘテロ二量体酵素である。他のヘキソサミニダーゼと違い、この β -D-N-アセチルグルコサミニダーゼ (*O*-GlcNAcase) は、中性領域 (pH 6.4) に最適 pH を持ち、GalNAc やその類似化合物による阻害を受けない。しかしながら、*O*-GlcNAc は、GlcNAc ($K_i=3.9$ mM) とその類似化合物である 1-アジド-GlcNAc ($K_i=1.14$ mM)、1-アミノ-GlcNAc ($K_i=151\mu$ M)、および PUGNAc ($K_i=52$ nM) により、効果的に阻害される。*O*-GlcNAcase の活性は、ラットの多くの組織、肝臓、腎臓、心臓、肺、子宮、および脊髄に存在するが、最も豊富にあるのは脾臓と脳である。ラットの細胞質ゾルの酵素のクローニングは、進行中である。

D. (Ser, Thr)-*O*-GlcNAc化と (Ser, Thr)-*O*-リン酸化

タンパク質のリン酸化状態を調節する、(Ser/Thr) プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼに類似して、OGT と *O*-GlcNAcase は、タンパク質のダイナミックな *O*-GlcNAc 化を調節する (図2)。多数の *O*-GlcNAc 化部位は、プロリン指向性の

O-GlcNAcylation and Protein Phosphorylation

Fig. 2. Protein *O*-GlcNAcylation and *O*-phosphorylation. A model representing the multiple pathways involved in regulating the post-translational state of *O*-GlcNAcylation of phosphoproteins. Analogous to Ser/Thr protein kinases and phosphatases which attach and remove phosphates, are the *O*-GlcNAc transferase and *O*-GlcNAcase which likewise attach and remove *O*-GlcNAc.

resemble proline-directed (Ser/Thr) protein kinase sites of phosphorylation (5), and lie at or near Pro-Val-(Ser/Thr) sequences. These include sites from the human serum response factor (44), α A and α B crystallins (30, 7), and from the head domains of rat neurofilaments NF-L and NF-M (27). Notably, other *O*-GlcNAcylation sites appear to have no definitive identifiable consensus sequence (5).

Because *O*-GlcNAc levels change rapidly upon stimulation with mitogens as well as during the cell cycle, protein *O*-GlcNAcylation has been proposed to be analogous to protein phosphorylation. For instance, both *O*-GlcNAcylation and phosphorylation of human keratins (K8, K18) increase in G₂/M arrested HT29 cells (11, 45). *O*-GlcNAcylation has also been proposed to regulate the phosphorylation state of proteins by steric hinderance or by blocking access to nearby hydroxyl groups. For example, the glycosylation sites of synapsin I, a synaptic vesicle associated protein, lie within domains involved in actin binding and closely bracket neighboring Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) sites of phosphorylation (34). Likewise, *O*-GlcNAc sites overlap phosphorylation sites within the head domains of neurofilaments NF-M, and NF-H. The neurofilament NF-H is also extensively *O*-GlcNAcyated in a region consisting of 52 Lys-Ser-Pro repeats, a region that is also highly phosphorylated. Although, it is not clear if these forms of neurofilament NF-H molecules, *O*-GlcNAcyated and phosphorylated, exist as two distinct subpopulations. The close proximity of *N*-acetylglucosamine moieties to nearby sites of phosphorylation hints at a novel mechanism by which the overall post-translational state of these proteins might be regulated.

Due to the fact that many sites of *O*-GlcNAcylation are similar to MAP kinase and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) sites of phosphorylation, and in some cases identical, these two modifications have also been suggested to have a reciprocal relationship. For example, the major site of *O*-GlcNAcylation on the oncogenic transcription factor c-myc is within its transactivation domain (17) at Thr-58 (46), a known *in vivo* phosphorylation site and the major mutational "hot-spot" associated with tumorigenic lymphomas. Consistent with the hypothesis of *O*-GlcNAcylation and *O*-phosphorylation reciprocity, mutually exclusive subpopulations of *O*-GlcNAcyated and *O*-phosphorylated forms of RNA Polymerase II have been isolated from calf thymus (13). Furthermore, increased *O*-GlcNAcylation of the transcription factor Sp1 by treatment of HT29 cells with PUGNAc, resulted in a concomitant marked reduction in Sp1 phosphorylation (10).

Investigators have recently addressed the question of *O*-GlcNAcylation and phosphorylation reciprocity by testing the effects of both protein kinase inhibitors and activators on protein *O*-GlcNAcylation in cerebellar neurons (47). After drug treatments, cells were fractionated into a membrane and cytosolic fraction, and a detergent insoluble cytoskeletal fraction. When

(Ser/Thr) プロテインキナーゼによるリン酸化部位に類似しており (5) Pro-Val-(Ser/Thr) 配列、またはその近くに存在している。これらはヒト血清応答因子 (44)、 α A と α B クリスタリン (30, 7)、およびラットニューロフィラメント NF-L と NF-M の頭部ドメイン (27) からの部位を含んでいる。特に、その他の *O*-GlcNAc化部位には、確固とした同定可能な共通配列は見つからないようだ(5)。

O-GlcNAc の量は細胞周期中と同様に、分裂促進因子による刺激によってすばやく変わるので、タンパク質 *O*-GlcNAc 化は、タンパク質リン酸化と類似すると提案されている。例えば、ヒトケラチン (K8, K18) の *O*-GlcNAc 化とリン酸化は、G₂/M 期で停止した HT29 細胞において増加する (11, 45)。*O*-GlcNAc 化はまた、立体障害や隣接水酸基への酵素の近接を妨げることによって、タンパク質のリン酸化状態を調節すると提案されている。例えば、シナプシン I、シナプス小胞結合タンパク質のグリコシル化部位は、アクチン結合に関わるドメイン内に存在し、近傍のCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) リン酸化部位をまとめて含んでしまう。同様に、*O*-GlcNAc 部位はニューロフィラメント NF-M、および NF-H の頭部ドメイン中のリン酸化部位に重複している(34)。ニューロフィラメント NF-H はまた、高度にリン酸化も受けうる 52 回の Lys-Ser-Pro の繰り返しから成る領域で、広範囲に *O*-GlcNAc 化を受ける。けれども、*O*-GlcNAc 化とリン酸化されたニューロフィラメント NF-H 分子の二つの型が、それぞれ別個の集団として存在するかどうかは明らかではない。*N*-アセチルグルコサミン部分が隣接したリン酸化部位の近くにあることは、これらのタンパク質の翻訳後状態が全体として調節されるという、新しい機構があることを暗示している。

O-GlcNAc 化の多くの部位は、MAP キナーゼとグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 β (GSK-3 β) によるリン酸化部位と類似しており、時には全く一致している。これらの修飾はまた、相反関係にあることが示唆されている。例えば、発ガン性転写因子 c-myc 上での *O*-GlcNAc 化を受ける主な部位は転写活性ドメイン内(17)にある Thr-58(46) で、既知の *in vivo* リン酸化部位であり、腫瘍を発生するリンパ腫に関連した主な突然変異の "hot-spot" である。*O*-GlcNAc 化と *O*-リン酸化の反作用仮説と一致して、RNA ポリメラーゼ II の互いに排他的に *O*-GlcNAc 化と *O*-リン酸化された形の副次集団が、子牛胸腺から分離されている(13)。さらに、PUGNAc によって HT29 細胞を処理することにより、転写因子 Sp1 の *O*-GlcNAc 化が増加すると同時に Sp1 リン酸化が著しく減少した(10)。

研究者は最近、*O*-GlcNAc 化とリン酸化の相反性の問題に、小脳神経細胞でのタンパク質 *O*-GlcNAc 化におけるプロテインキナーゼ阻害剤と活性化因子との影響を調べることで取りかかった(47)。薬物処理後、細胞は、膜と細胞質ゾル画分、界面活性剤不溶性の細胞骨格画分に分画された。小脳神経細胞を、

cerebellar neurons were treated with either PMA, a protein kinase C (PKC) activator, or dibutyryl cAMP, a cyclic-AMP dependent protein kinase (PKA) activator, protein *O*-GlcNAcylation within the cytoskeletal fraction decreased by 50–60%. Conversely, inhibition of PKC with bis-indoylmaleimide produced a 45% increase in cytoskeletal *O*-GlcNAcylation, and PKA inhibition doubled the amount of *O*-GlcNAc detected in the cytoskeletal fraction. Consequently, protein phosphorylation and *O*-GlcNAcylation appear to be reciprocally related within the cytoskeleton. Surprisingly, treatment with these compounds appeared to have little effect on cytosolic or membrane *O*-GlcNAcylation in these studies. Clearly, the complexity of the relationship between these two post-translational modifications is dependant upon which proteins are modified as well as which (*O*-GlcNAcylation/ phosphorylation) pathways are either suppressed or activated.

E. The *O*-GlcNAcylated Cytoskeleton

The neuronal cytoskeleton is a composition of dynamic structural proteins important for cellular morphogenesis, organelle transport, and the regulation of neurotransmitter release (22, 23). Cytoskeletal elements also establish neuronal polarity and direct axoplasmic flow of synaptic vesicles to and from the synapse. The cytoskeleton consists of microtubules, intermediate filaments, including neurofilaments, microfilaments, and actin/ membrane bridging proteins. Microtubules (24 nm) are polymers of α , β heterodimer subunits of tubulin, serve as rails for vesicle transport, and are required for the proper positioning of the mitotic spindle and nucleus in many cell types. Linking and bundling microtubules together are a family of proteins known as microtubule-associated proteins, MAPs. MAPs co-purify with microtubules and also facilitate the polymerization of tubulin *in vitro* (24). The major MAPs in the brain include: MAP1, MAP2, and tau, all of which are multiply *O*-GlcNAcylated. The higher molecular weight MAPs including MAP1, MAP2, and MAP4 have approximate molecular weights of 350, 280, and (200–240) kDa respectively. MAP1 and MAP2 are exclusively found in neuronal tissue, whereas MAP4 is ubiquitously expressed and localizes to microtubules of mitotic and interphase cells. MAP2 is found predominately in dendrites, whereas MAP1 is localized in the cell body, dendrites, and axons of neurons.

E-1. Glycosylation of Microtubule-Associated Proteins

MAP1, MAP2, and MAP4 were all demonstrated to be glycosylated by the established method of periodate oxidation followed by detection with biotin hydrazide-streptavidin (25). *O*-GlcNAc was detected on MAP2 by probing for terminal *N*-acetylglucosamine residues with β (1, 4) GT and [3 H]-UDP-Gal followed by gel filtration analysis of the β -eliminated radiolabeled sugars. Reverse-phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) of radiolabeled MAP2 digested with trypsin

PMA すなわちプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化因子、またはジブチリル cAMP、これはサイクリック-AMP 依存性プロテインキナーゼ活性化因子 (PKA) である、のどれかで処理した時、細胞骨格画分中のタンパク質 *O*-GlcNAc 化は、50–60 % 程度も減少した。逆に、ビス-インドールマレイミドによる PKC の阻害は、細胞骨格 *O*-GlcNAc 化を 45 % 増加させ、PKA の阻害は、細胞骨格画分中で検出された *O*-GlcNAc の量を二倍にした。従って、タンパク質リン酸化と *O*-GlcNAc 化は、細胞骨格内で相反関係にあることが示された。驚いたことに、これらの化合物による処理は、これらの研究で、細胞質ゾルや膜 *O*-GlcNAc 化にはほとんど影響しなかった。明らかに、これら二つの翻訳後修飾の関係の複雑性は、(*O*-GlcNAc 化/リン酸化) 経路のどちらが抑制されるか、活性化されるかと同様に、どのタンパク質が修飾されるかにも依存している。

E. *O*-GlcNAc 化された細胞骨格

神経細胞骨格は、細胞形態形成、細胞小器官輸送、神経伝達物質放出の調節にとって重要でダイナミックな構造タンパク質の混合物である(22,23)。細胞骨格要素はまた、ニューロン極性を確立にし、シナプスへ向かい、またシナプスから来るシナプス小胞の軸索原形質中の流れを支配する。細胞骨格は微小管、ニューロフィラメントやミクロフィラメントを含んだ中間フィラメント、アクチン/膜架橋タンパク質から構成される。微小管 (24nm) は、チューブリンの α 、 β ヘテロ二量体サブユニットの重合体であり、小胞輸送のためのレールとして働き、多くの細胞型で有糸分裂紡錘体と核が適切な位置を定めるために必要とされている。微小管を架橋と束化するのは、微小管結合タンパク質 MAPs として知られているタンパク質ファミリーである。MAPs は、微小管とともに精製され、また、*in vitro* においてチューブリンの重合を促進する (24)。脳中の主な MAPs は、いずれも多数の *O*-GlcNAc 化を受ける MAP1、MAP2、タウを含んでいる。MAP1、MAP2、および MAP4 を含むより高分子量の MAP は、それぞれ 350、280、および (200–240) kDa である。MAP1 と MAP2 はもっぱら神経組織中で見つけられるが、MAP4 はいたる所で発現し、有糸分裂細胞と中間期細胞の微小管に局在している。MAP2 は主として、樹状突起で見つけられるが、MAP1 は細胞体、樹状突起、およびニューロンの軸索に局在している。

E-1. 微小管関連タンパク質のグリコシル化

MAP1、MAP2、および MAP4 は、過ヨウ素酸酸化後ビオチンヒドラジド-ストレプトアビジンで検出する方法によってすべてグリコシル化されていることが示された。MAP2 上の *O*-GlcNAc 化は、 β (1,4)GT と [3 H]-UDP-Gal を用いて末端 *N*-アセチルグルコサミン残基を標識化し、その後、 β -脱離した放射能標識糖鎖をゲルろ過分析にかけて検出された。放射能標識された MAP2 をトリプシン消化して逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) にかけることによって、複数の部位が *O*-GlcNAc 化

revealed three distinct peaks indicating multiple sites of *O*-GlcNAcylation. Further digestion of the polypeptide with thrombin indicated the presence of *O*-GlcNAc within the projection domain, a region which blocks abnormal MAP2 axonal transit and is required for proper dendritic targeting (48).

The lower molecular weight MAPs consist of a family of phosphoproteins known as tau which have molecular weights (55–65 kDa) and are generated from the alternative splicing of a single gene (49). Tau regulates tubulin bundling and assembly, and stabilizes the microtubule network in the axons of neurons (50, 51). The phosphorylation of tau regulates its metabolism (52–54), its ability to bind and assemble microtubules (55, 56), and its tendency to self-associate (57). With some 17 (Ser/Thr)-Pro regions, tau is a substrate for numerous protein kinases *in vitro* including: GSK3- β (58, 59), MAP kinase (erk2) (60), a neuronal cdc2 like protein kinase (61), CaMKII (62), casein kinase II (63), PKA (64, 65), and others (66, 67). However, it is still not clear which protein kinases are responsible for the regulation of tau phosphorylation *in vivo*.

O-GlcNAcylation of the low molecular weight family of tau proteins was detected both by blotting with succinylated wheat germ agglutinin, and by enzymatically probing with β (1, 4)GT and [3 H]-UDP-Gal. Structural analysis of the β -eliminated material was confirmed by high pH anion exchange chromatography (HPAEC-PAD). All tau splice variants are *O*-GlcNAcylated with an average stoichiometry of ~ 4 mol GlcNAc/mol protein, similar to the stoichiometry of tau phosphorylation. Tau is *O*-GlcNAcylated at 12 or more sites, suggesting substoichiometric site occupancy. It is unclear what role *O*-GlcNAcylation may have in tau function, but there are a host of possibilities. For instance, *O*-GlcNAc may modulate the phosphorylation state of tau by steric hinderance or direct reciprocity, which in turn would ultimately regulate all of the functions influenced by tau phosphorylation. These might include: regulating the binding and bundling of microtubules, controlling tau degradation, or even governing the localization of tau.

E-2. Glycosylation of Intermediate Filaments

Another family of proteins which contribute to the framework of the cytoskeleton are the intermediate filaments (IFs). IFs are highly dynamic structures composed of interwoven α -helical polypeptides that form coiled-coil dimer subunits creating an array of 10 nm filaments (68). There are five classes of IF proteins. IFs of class I and II are keratins which are broadly expressed in epithelial cells. Keratins K8, K13, and K18 give mechanical integrity to the stratified squamous epithelium. Single layer squamous epithelia predominately express K8 and K18 as obligate noncovalent heteropolymers (K8/K18), whereas K13 is found mostly in esophageal epithelia (69). Several post-translational modifications have been described for keratins including phosphorylation (70), acetylation (71), and *O*-GlcNAcylation (11).

されたことを示す、三つの別々のピークが示された。トロンビンによるポリペプチドのさらなる消化によって、異常な MAP2 軸索輸送を防ぎ適切な樹状突起への送達のために必要とされる領域である突起ドメイン中の *O*-GlcNAc の存在が示された (48)。

より低分子量の MAP は、分子量 (55-65kDa) であり、一つの遺伝子の選択的スプライシングによって生じる、タウとして知られるリンタンパク質ファミリーから構成されている (49)。タウは、チューブリン束化と集合を調節し、神経軸索中の微小管ネットワークを安定化させる。タウのリン酸化は、その代謝 (52-54) や、微小管と結合し集合する能力 (55, 66)、および自己会合の傾向 (57) を調節する。タウは、*in vitro* において、いくつかの 17 個の (Ser/Thr)-Pro 領域で、GK3- β (58, 59)、MAP キナーゼ (erk2) (60)、ニューロン cdc2 様プロテインキナーゼ (61)、CaMKII (62)、カゼインキナーゼ II (63)、PKA (64, 65)、およびその他 (66, 67) を含む多数のプロテインキナーゼの基質になる。しかしながら、どのプロテインキナーゼが、*in vitro* においてタウリン酸化の調節を行うのかは、まだ明らかではない。

タウタンパク質の低分子重量ファミリーの *O*-GlcNAc 化は、スクシニル化された小麦胚レクチンを用いるブロッティング、および β (1,4)GT と [3 H]-UDP-Gal で酵素的に標識することによって検出された。 β -脱離された物質の構造分析は、高 pH におけるアニオン交換クロマトグラフィー (HPAEC-PAD) によって確認された。タウスプライス変異型すべてが、タウリン酸化の化学量論と類似して、タンパク質 1 モル当たり平均 ~ 4 モルの GlcNAc を含む化学量論で *O*-GlcNAc 化された。タウは 12 またはそれ以上の部位で *O*-GlcNAc 化を受け、ほぼ全ての部位が占有されたことが示唆された。タウの機能において *O*-GlcNAc 化が果たす役割は不明であるが、多数の可能性がある。例えば、*O*-GlcNAc は、立体障害や直接の交換によって、タウのリン酸化状態を調節し、その結果最終的にタウのリン酸化によって影響される機能のすべてを調節する。これらは、微小管の結合と束化の規制、タウの分解調節、またはタウの局在支配さえ含んでいるかもしれない。

E-2. 中間フィラメントのグリコシル化

細胞骨格の骨組に寄与する他のタンパク質ファミリーが、中間フィラメント (IFs) である。IFs は、編み合わされた α -ヘリカルポリペプチドから成り立っていて、らせんがらせんに巻き付いた二量体サブユニットを形成し、これが整列した 10nm フィラメントを生じる (68)。IF タンパク質は 5 クラスある。クラス I と II の IFs は広範囲に上皮細胞で発現されるケラチンである。ケラチン K8、K13、K18 は、層をなす鱗片状の上皮に機械的完全性を与える。単一層の鱗片状上皮は主として、必然的に非共有結合したヘテロポリマー (K8/K18) として K8 と K18 を発現するが、K13 はほとんど食道上皮中に見出される (69)。リン酸化 (70)、アセチル化 (71)、*O*-GlcNAc 化 (11) を含むいくつかの翻訳後修飾がケラチンについて述べられている。

O-GlcNAc was first detected on keratins (K8/K18) by the established method of probing for terminal *N*-acetylglucosamine residues with $\beta(1,4)$ GT in the presence of [3 H] UDP-Gal, and analyzing the structure of the labeled sugars by β -elimination and thin layer chromatography. Keratins (K8/K18) were demonstrated to contain $\sim(1.5-2)$ mol *O*-linked GlcNAc/mol protein by chemical analysis. After digesting radiolabeled K8 and K18 with trypsin and elastase respectively, peptide mapping demonstrated the presence of multiple glycopeptides. As described previously, *O*-GlcNAc turnover on keratins (K8/K18) was shown to be much faster than polypeptide turnover. Additionally, cell cycle arrest caused a dramatic increase in the *O*-GlcNAcylation of threonine residues on K18, and an increase in the serine phosphorylation of K8, the obligate partner of K18 in filament assembly. Simultaneously with IF reorganization, keratin *O*-GlcNAcylation increased within head and proximal rod domains. However, mutational analysis suggests that *O*-GlcNAcylation is not required for keratin filament assembly (72). *O*-GlcNAcylation of keratins might nonetheless regulate keratin degradation, localization, or mediate IF-protein interactions.

Class IV IF proteins include neurofilaments NF-L, NF-H, and NF-M, the most abundant structural components in large myelinated axons. Neurofilaments assemble as obligate heteropolymers of NF-L (62 kDa), and either NF-H (115 kDa), or NF-M (100 kDa), and are essential for the development of axon diameter, a crucial factor in the velocity of nerve conduction (73). Each polypeptide shares a 310 amino acid α -helical rod domain essential for the assembly of normal filaments, as well as a globular head domain, and variable length tail domain. Regions within both the NH_2 -terminal head and carboxyl-terminal domains are required for the proper networking of neurofilaments. All neurofilaments are post-translationally modified by phosphorylation. A majority of the sites of phosphorylation are located within the C-terminal domains, albeit a small percentage also exist within the NH_2 -terminal head domains. Phosphorylation within the head domain of neurofilaments has been demonstrated to induce the disassembly of filaments (74), as well as inhibit filament assembly (75, 76). Neurofilaments are also *O*-GlcNAcylated within the head domains adjacent to sites of NF phosphorylation.

The *O*-GlcNAcylation of neurofilaments NF-H, NF-L, and NF-M purified from rat spinal cord was first identified by probing for terminal GlcNAc residues with $\beta(1,4)$ GT in the presence of [3 H] UDP-Gal, and analyzing the structure of the β -eliminated radiolabeled sugars by HPAEC-PAD. Purification of glycopeptides after proteolysis identified four major sites of glycosylation in the head domain of NF-L: Thr-21, Ser-27, Ser-34, and Ser-48. Three out of four *O*-GlcNAcylation sites on NF-M were found in the head domain including Thr-19, Ser-34, and Thr-48, whereas the other, Thr-431, is located in the tail

[3 H] UDP-Gal 存在下、 $\beta(1,4)$ GT を用いて末端 *N*-アセチルグルコサミン残基を標識化し、 β -脱離と薄層クロマトグラフィーによって標識された糖の構造を分析する確立された方法によって、*O*-GlcNAc はケラチン (K8/K18) について初めて検出された。ケラチン (K8/K18) は、化学分析によってタンパク質 1 モル当り $\sim(1.5-2)$ モルの *O*-GlcNAc を含むことが示された。放射能標識された K8、K18 をそれぞれトリプシン、エラスターゼで消化した後、ペプチドマッピングによって、複数の糖ペプチドの存在を証明した。前に述べたように、ケラチン (K8/K18) での *O*-GlcNAc 代謝回転は、ポリペプチド代謝回転よりずっと速いことが示された。さらに、細胞周期の停止によって、K18 でのトレオニン残基の *O*-GlcNAc が急激に増加し、フィラメント集合において K18 の必須の相手である K8 のセリンリン酸化も増加した。IF 再編成と同時に、ケラチン *O*-GlcNAc 化は、頭部とこれに隣接した桿状体ドメイン中で増加した。しかしながら突然変異分析によって、*O*-GlcNAc 化はケラチンフィラメント集合に必要なことが示された (72)。それでもなお、ケラチンの *O*-GlcNAc 化は、ケラチンの分解、局在、または IF-タンパク質相互作用を調節しているかもしれない。

クラス IV の IF タンパク質は、ニューロフィラメント NF-L、NF-H、および NF-M という大きな有髄軸索中の最も豊富な構成成分を含んでいる。ニューロフィラメントは、NF-L (62kDa) と NF-H (115kDa)、または NF-M (100kDa) の必然的なヘテロポリマーとして集合し、神経伝達速度の重大な因子である軸索直径の成長にとって必須である (73)。どのポリペプチドも、正常な繊維形成に必要である 310 アミノ酸残基からなる α -ヘリックス桿状体ドメインを、球状頭部ドメインや可変長尾部ドメインと同様に共有している。N-末端頭部ドメイン、C-末端ドメインのどちらの領域も神経繊維の正常なネットワークングに必要である。すべての神経繊維はリン酸化により翻訳後修飾をうける。N-末端頭部ドメインにも一部存在するものの、大部分のリン酸化部位は、C-末端ドメインに局在している。神経繊維の頭部ドメインにおけるリン酸化によって、繊維の分解 (74) が繊維形成の阻害と同様に引き起こされることが証明された (75, 76)。神経繊維は、NF リン酸化部位に近隣した頭部ドメインで *O*-GlcNAc 化もうける。

ラットの脊髄から精製された NF-H、NF-L や NF-M など神経繊維の *O*-GlcNAc 化は、まず [3 H] UDP-Gal 存在下で $\beta(1,4)$ GT を用いて末端 GlcNAc 残基を修飾し、さらに β -脱離して得た放射能標識された糖鎖の構造を HPAEC-PAD で分析することにより同定された。タンパク質分解後の糖ペプチドの精製から、NF-L の頭部ドメインにある 4 つの主なグリコシル化部位: Thr-21、Ser-27、Ser-34、Ser-48 が確認された。NF-M の *O* 型グリコシル化の 4 つ部位のうち 3 つは Thr-19、Ser-34、Thr-48 を含む頭部ドメインに見つけられている。一方、残りの Thr-431 は、尾部領域に局在している。同様に、NF-H の *O*-グリコシル化は Thr-

region. The *O*-GlcNAcylation of NF-H likewise contains three sites of *O*-GlcNAc attachment in the head domain of the protein, including: Thr-53, Ser-54, and Ser-56. In addition, NF-H is multiply *O*-GlcNAcylated in the rod domain, a region consisting of 52 Lys-Ser-Pro repeats known to be highly phosphorylated. In accord with mutational studies, the presence of *O*-GlcNAc within the head domains has been proposed to regulate proper filament assembly. For instance, deletion of amino acids 18-30 from NF-L, including both *O*-GlcNAcylation sites Thr-21 and Thr-27, caused a disruption of wild-type NF formation in transfected cells (77). Moreover, NH₂-terminal deletion through the first site of *O*-GlcNAcylation on NF-M caused perinuclear aggregation instead of a proper formation of filament networks (78).

E-3. *O*-GlcNAcylation of Actin-Membrane Bridging Proteins

Another collection of *O*-GlcNAcylated cytoskeletal proteins tether the plasma membrane to the underlying network of spectrin-actin filaments. One of the first *O*-GlcNAcylated proteins identified, erythrocyte protein Band 4.1, or protein 4.1, is a member of this family. Band 4.1 is an 80 kDa protein required for the formation of a spectrin-actin-4.1 ternary complex essential for the maintenance of proper red blood cell shape. *O*-GlcNAcylation of Band 4.1 has been demonstrated by $\beta(1,4)$ GT labeling erythrocyte ghosts in the presence of [³H]-UDP-Gal. Chemical cleavage and digestion with α -chymotrypsin has revealed that Band 4.1 is glycosylated within the carboxyl terminal 117 amino acids. Interestingly, mutations in this C-terminal region of the molecule, the actin-spectrin binding domain (79), can cause hereditary elliptocytosis resulting in hemolytic anemia (80). Moreover, Band 4.1 knockout mice have neurological defects in movement, coordination, balance and learning, in addition to hematological abnormalities (81). Related to Band 4.1 is a 215 kDa cytoskeletal protein, talin, expressed in many different tissues. Talin is targeted to focal contacts (82), the postjunctional membrane of neuromuscular junctions (83), and interacts with vinculin and the cytoplasmic face of integrins (84). Talin purified from chicken gizzard and porcine stomach is modified with *O*-GlcNAc (32). Two glycosylation sites were identified and are located in the tail domain. *O*-GlcNAcylation of this region may play a role in regulating talin's interaction with vinculin, another *O*-GlcNAcylated protein, or other cytoskeletal proteins.

Recently, ankyrin_G was also identified as another *O*-GlcNAcylated protein which bridges the membrane to the spectrin-actin network. Ankyrin_G is targeted to Nodes of Ranvier, regions within myelinated axons where ion fluxes of action potentials are propagated (85). Ankyrin_G is essential for the proper localization of voltage-dependent sodium channels, and for normal firing in Purkinje neurons (86). Ankyrins also bind the cytoplasmic domains of a family of immunoglobulin/

53, Ser-54, Ser-56 を含むタンパク質の頭部ドメインに、*O*-GlcNAc 結合の 3 つの部位を含んでいる。さらに加えて、NF-H は高度にリン酸化を受けることで知られる Lys-Ser-Pro の 52 回のくり返しから成る領域である桿状ドメインで多数のリン酸化を受ける。変異体実験と一致して、頭部ドメインにおける *O*-GlcNAc の存在は、適切な繊維形成を調節することが提案された。例えば、NF-L から *O*-GlcNAc 化部位である Thr-21 と Thr-27 を含む 18 ~ 30 のアミノ酸残基を除去すると、形質転換された細胞での野生型の NF 形成の阻害がおこる(77)。さらに、NF-M の第一の *O*-GlcNAc 化部位の N-末端の除去により、正常な繊維ネットワークの形成の代わりに核周辺での凝集がおこる(78)。

E-3. アクチン-膜架橋タンパク質の *O*-GlcNAc 化

O-GlcNAc 化をうけた細胞骨格タンパク質の他の集合は、スペクトリン-アクチン繊維の内在するネットワークに形質膜をつなぐ。初めに同定された *O*-GlcNAc 化タンパク質の 1 つである赤血球タンパク質 Band 4.1、またはタンパク質 4.1 はこのファミリーの 1 つである。Band 4.1 は赤血球を正しい形に保つのに必須な、スペクトリン-アクチン-4.1 の三者複合体形成に必要な 80 kDa のタンパク質である。Band 4.1 の *O*-GlcNAc 化は、[³H]-UDP-Gal 存在下で赤血球ゴーストを $\beta(1,4)$ GT 標識することにより証明された。化学的切断や α -キモトリプシンによる分解により、Band 4.1 は C-末端の 117 アミノ酸残基内でグリコシル化を受けることが明かとなってきた。興味深いことに、分子中の C-末端領域、アクチン-スペクトリン結合ドメイン(79)に突然変異が加わると、遺伝性のだ円赤血球症を引き起こし、その結果溶血性貧血となる(80)。さらに、Band 4.1 ノックアウトマウスは血液学的異常に加えて運動、筋肉運動の協同、バランスや学習において神経学的欠陥をもっている(81)。Band 4.1 に関連して、さまざまな組織で発現される 215kDa の細胞骨格タンパク質であるテーリンがある。テーリンは神経筋結合の接合後の膜状態(83)である巣状接着に送達され(82)、ビンキュリンやインテグリンの細胞質側と相互作用する(84)。ニワトリの砂嚢とブタの胃から精製されたテーリンは *O*-GlcNAc で修飾されている(32)。2 つのグリコシル化部位が同定され、それらは尾部ドメインに局在している。この領域での *O*-GlcNAc 化は、テーリンのビンキュリン、他の *O*-GlcNAc 化をうけたタンパク質または他の細胞骨格タンパク質との相互作用を調節するのに何らかの役割をはたしているだろう。

最近、アンキリン G が、膜をスペクトリン-アクチンネットワークに架橋するもう一つの *O*-GlcNAc 化タンパク質として同定された。アンキリン G は活動電位のイオン流量が伝達される有髄軸索内の領域であるランビエ絞輪に送達される(85)。アンキリン G は電位依存的 Na⁺チャネルの正しい局在やブルキンエニューロンの正常な発火に必須である(86)。アンキリンはニューロファシン、NrCAM、L1、NgCAM を含む免疫グロブリ

fibronectin type III cell adhesion molecules including: neurofascin, NrCAM, L1, and NgCAM (87). Due to the presence of a 40 kDa Ser/Thr rich domain unique to ankyrin_G (85), its glycosylation was investigated.

480 kDa ankyrin_G extracted from brain membranes bound wheat germ agglutinin affinity columns, was labeled by $\beta(1,4)$ GT and [3 H]-UDP-Gal, and cross-reacted with an *O*-GlcNAc specific antibody (29). The nodal mucin-like Ser/Thr rich domain was determined to be *O*-GlcNAcylated, and mutational analysis indicated this region contributes to the prevention of the lateral diffusion of ankyrin-neurofascin complexes (88). Additionally, cerebellar ankyrin_G knockout mice develop ataxia, sodium-channel mistargeting and progressive Purkinje neuron degeneration (86). Thus, *O*-GlcNAc may modulate the proper development and arrangement of protein-ankyrin complexes at the Nodes of Ranvier required for normal firing in Purkinje cells.

Nerve terminals also contain cytoskeletal membrane bridging proteins. There exists a mechanism that requires vesicle targeting and membrane fusion within neurons for the proficient uptake and release of neurotransmitters. This process of synaptic transmission involves the rapid recycling of synaptic vesicles at the synapse. Concentrated within the nerve terminal are cytoskeleton bridging proteins known as synapsins. Synapsin I sequesters fusion competent vesicles by anchoring them to the proximal cytoskeletal network in a phosphorylation dependent manner (89). Synapsin I is also multiply *O*-GlcNAcylated near neighboring phosphorylation sites within domains dedicated to binding synaptic vesicles (90), and domains required for binding (91), and nucleating (92) actin. Seven *O*-GlcNAcylation sites have been identified on synapsin I using a combination of RP-HPLC, electrospray mass spectrometry (ES-MS), and matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI TOF) mass spectrometry (34). The localization of *O*-GlcNAc residues within these domains suggests that *O*-GlcNAcylation of synapsin I may modulate directly, or by regulating synapsin I phosphorylation, its ability to bind and anchor synaptic vesicles to the actin cytoskeleton.

The mechanism of synaptic vesicle re-uptake is considered similar to clathrin-coated pit mediated endocytosis, an internalization process common to all cells. Important for the assembly of clathrin-coated vesicles (93), as well as for synaptic vesicle recycling (94, 95), is the 160 kDa clathrin-assembly protein AP3. *O*-GlcNAcylation of AP3 was demonstrated when peptide *N*-glycosidase F (PNGase F) treated human brain homogenates were probed with $\beta(1,4)$ GT and [3 H]-UDP-Gal, and a radiolabeled 160 kDa AP3 immunoreactive band with the appropriate corresponding isoelectric point was identified (36). Since bacterially expressed AP3 is capable of clathrin binding and assembly (96), and in vitro galactosylated AP3 is clathrin assembly competent (97), it is unclear how *O*-GlcNAc affects the function of AP3. However, since both Synapsin I and clathrin

in/fibronectin type III cell adhesion molecules family of the cell adhesion domain also binds (87). 40 kDa of Ser/Thr rich domain in ankyrin G is unique from (85) its glycosylation about it.

Competition assay with affinity column to bind the membrane from which 480 kDa of ankyrin G was $\beta(1,4)$ GT and [3 H]-UDP-Gal labeled, *O*-GlcNAc specific antibody was used to cross-react (29). The nodal mucin-like Ser/Thr rich domain is *O*-GlcNAcylated and determined, and sudden mutation analysis, this domain in ankyrin-neurofascin complex side diffusion inhibition to participate in (88). In addition, small ankyrin G knockout mouse is functional impairment, Na⁺ channel mis-targeting, and progressive Purkinje neuron degeneration (86). Therefore, *O*-GlcNAc is Purkinje cell normal firing required in Purkinje cells. In the Nodes of Ranvier required for normal firing in Purkinje cells.

Neuronal terminals also contain cytoskeletal membrane bridging proteins. There exists a mechanism that requires vesicle targeting and membrane fusion within neurons for the proficient uptake and release of neurotransmitters. This process of synaptic transmission involves the rapid recycling of synaptic vesicles at the synapse. Concentrated within the nerve terminal are cytoskeleton bridging proteins known as synapsins. Synapsin I sequesters fusion competent vesicles by anchoring them to the proximal cytoskeletal network in a phosphorylation dependent manner (89). Synapsin I is also multiply *O*-GlcNAcylated near neighboring phosphorylation sites within domains dedicated to binding synaptic vesicles (90), and domains required for binding (91), and nucleating (92) actin. Seven *O*-GlcNAcylation sites have been identified on synapsin I using a combination of RP-HPLC, electrospray mass spectrometry (ES-MS), and matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI TOF) mass spectrometry (34). The localization of *O*-GlcNAc residues within these domains suggests that *O*-GlcNAcylation of synapsin I may modulate directly, or by regulating synapsin I phosphorylation, its ability to bind and anchor synaptic vesicles to the actin cytoskeleton.

The mechanism of synaptic vesicle re-uptake is considered similar to clathrin-coated pit mediated endocytosis, an internalization process common to all cells. Important for the assembly of clathrin-coated vesicles (93), as well as for synaptic vesicle recycling (94, 95), is the 160 kDa clathrin-assembly protein AP3. *O*-GlcNAcylation of AP3 was demonstrated when peptide *N*-glycosidase F (PNGase F) treated human brain homogenates were probed with $\beta(1,4)$ GT and [3 H]-UDP-Gal, and a radiolabeled 160 kDa AP3 immunoreactive band with the appropriate corresponding isoelectric point was identified (36). Since bacterially expressed AP3 is capable of clathrin binding and assembly (96), and in vitro galactosylated AP3 is clathrin assembly competent (97), it is unclear how *O*-GlcNAc affects the function of AP3. However, since both Synapsin I and clathrin

AP3 are enriched at the synapse, *O*-GlcNAcylation may play a role in maintaining their localization. *O*-GlcNAc might also regulate the dynamic recycling of vesicles to and from the membrane.

F. Neurodegenerative Diseases Involving *O*-GlcNAcylated Cytoskeletal Proteins

Neurodegenerative diseases encompass a large number of disorders. Yet, many have a common etiology that is characterized by the formation of filamentous lesions composed of highly phosphorylated cytoskeletal proteins. Alzheimer's disease (AD), for example, is a progressive neurodegenerative disease which has a distinct pathology (98). Two neuropathological hallmarks found in AD brains are neurofibrillary tangles (NFTs) composed of paired helical filaments (PHFs) (99), and amyloid plaques composed of peptides generated from the abnormal processing of the β -amyloid precursor protein (β -APP) (100-102). Biochemical characterization of PHFs has determined that they are composed primarily of abnormally hyperphosphorylated tau protein (PHF-Tau) (103-106). NFTs are also found in a multitude of other neurodegenerative disorders including: frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17), Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and others (107) (Table II). The presence of NFTs in many pathologies, and its correlation with cognitive impairment (108, 109), indicate that the abnormal hyperphosphorylation of tau is a central event in neuron death. Deciphering the mechanism of hyperphosphorylated tau formation, therefore, is crucial to our understanding of the etiology of neurodegeneration.

Since their enzymatic activities are diminished in Alzheimer brains (110), a possible mechanism may include al-

うに影響するのか、ということは今だ明かとなっていない。しかしながら、シナプシン I と、クラスリン AP3 がどちらもシナプスに多く存在することから、*O*-GlcNAc 化はそれらの局在維持に何らかの役割を持つものと考えられる。加えて、AP3 の *O*-GlcNAc 化は、クラスリン被覆集合と小胞再吸収の動力学にも何らかの役割を持つかもしれない。

F. *O*-GlcNAc化細胞骨格タンパク質に関連した神経変性疾患

神経変性疾患は数多くの障害をもたらす。しかし、その多くは高度にリン酸化を受けた細胞骨格タンパク質からなる繊維病巣の形成に特徴づけられる共通の病因をもっている。例えば、アルツハイマー病 (AD) は、異った病状を示す進行性の神経変性疾患である (98)。AD の脳で見つけられた 2 つの神経病理上の特徴は、ヘリックス対繊維 (PHFs) (99) から成る神経繊維のもつれ (NFTs) と、 β -アミロイド前駆体タンパク質 (β -APP) の異常なプロセッシングにより生じるペプチドから成るアミロイドブラークである (100-102)。PHFs の生化学的特徴づけにより、それらが異常に過度なリン酸化をうけたタウタンパク質 (PHF-Tau) により主に形成されていることが決定された (103-106)。NFTs は同様に前頭葉側頭部麻痺や染色体 17 (FTDP-17) に関連したパーキンソン病、ピック病や進行性核上麻痺など (107) 他の多くの神経変性疾患でも見受けられる (表 II)。多くの病変での、NFTs の存在や知覚損傷との相互関係により (108, 109) タウタンパク質の異常な過度のリン酸化はニューロン死の中心的な出来事であることが示された。それゆえ、過度なリン酸化をうけたタウタンパク質が形成されるメカニズムの解明が、神経変性の病因を解釈するのに必須なのである。

アルツハイマー脳で、タンパク質ホスファターゼ PP2A と PP2B の酵素的活性が減少することから (110)、タウタンパク質に

Table II. Examples of the numerous neurodegenerative diseases in which the microtubule associated protein tau is involved.

Neurodegenerative Diseases with Abundant Tau Filamentous Lesions

Alzheimer's disease
Down's syndrome
Corticobasal Degeneration
Dementia pugilistica
Dementia with tangles
Frontotemporal dementias
Parkinsonism linked to chrom. 17
Myotonic dystrophy
Niemann-Pick disease type C
Parkinsonism-dementia complex of Guam
Pick's disease
Postencephalitic Parkinsonism
Prion diseases with tangles
Progressive supranuclear palsy
Subacute sclerosing panencephalitis

Fig. 3. Tau O-GlcNAcylation and Alzheimer's Disease. A model depicting the outcome of defective tau O-GlcNAcylation on neurofibrillary tangle formation, and ultimately neuron death.

terations in protein phosphatases PP2A and PP2B activities toward tau. Another scenario could include the activation of protein kinase pathways. PHF-Tau isolated from AD brains is phosphorylated on at least twenty-five sites (111). Tau is a substrate for protein kinases *in vitro* including : GSK-3 β , p34cdc2, CaMKII, PKA, MAP kinase, and numerous others. The concerted activation of multiple phosphorylation pathways would likely be required in order to achieve the extraordinary phosphorylation state of tau found in NFTs. Regardless, these kinases phosphorylate a majority, but not all of the sites identified in tau from AD brain (112, 113). However, due to the fact glucose metabolism is significantly impaired in Alzheimer brains (114, 115), and UDP-*N*-acetylhexosamine biosynthesis is sensitive to the availability of glucose (116), a drastic reduction in UDP-GlcNAc levels would be eminent. This could ultimately reduce the O-GlcNAcylation of proteins AD brain. Such an observation has already been documented for the cytoskeletal protein AP3 (36, 37). Reduced tau O-GlcNAcylation might therefore ultimately unmask potential phosphorylation sites unique to AD brain and result in NFT formation.

G. Summary

The nervous system is a rich source of filamentous proteins critical in maintaining proper neuronal morphology and function. Numerous cytoskeletal proteins have been shown to be modified by O-GlcNAc and are involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. The highly phosphorylated forms tend to precipitate as insoluble filamentous inclusions (NFTs) which leads to blocked axonal transport,

対するそれらの活性変化を含むメカニズムが考えられる。プロテインキナーゼ経路の活性化を含む、別のシナリオも考えられる。AD 脳から得られた PHF-タウタンパク質は、少なくとも 25 の部位でリン酸化を受ける(111)。タウは、*in vitro* で GSK-3 β 、p34cdc2、CaMKII、PKA、MAP キナーゼなど多くのプロテインキナーゼの基質となる。複数のリン酸化経路の協調した活性化は、NFTs で見られるタウタンパク質の異常なリン酸化状態を達成するのに必要らしく思われる。それとは関係なく、これらキナーゼは AD 脳から得られたタウタンパク質において同定された部位の大半をリン酸化するが、すべての部位ではない(112、113)。しかしながら、アルツハイマー脳でグルコース代謝が激減し(114、115)、かつ UDP-*N*-アセチルヘキソサミンの生合成はグルコースが得られるかどうかによって影響をうけやすい(116)という事実から、UDP-GlcNAc 量の激減は著しいことだろう。これは、結果的に AD 脳のタンパク質 O-GlcNAc 化を減少することになる。このような観察はすでに、細胞骨格タンパク質 AP3 でなされている(36、37)。よって、タウタンパク質の O-GlcNAc 化の減少は、AD 脳特有な潜在的リン酸化部位を露出し、その結果 NFT を形成する。

G. 結論

神経システムは、正確な神経の形態と機能の維持に必須な繊維状タンパク質に富んだ源である。多数の骨格タンパク質は、O-GlcNAc による修飾をうけ、アルツハイマーなどの神経変性疾患の発病に必要であることが示された。高度にリン酸化された型は、不溶性の繊維状封入物(NFTs)として沈澱する傾向があり、軸索輸送の妨害、神経伝達物質の吸収と放出の障害を導

inhibition of neurotransmitter uptake and release, and ultimately massive neuron death. The reciprocal relationship between *O*-GlcNAcylation, and *O*-phosphorylation may ultimately be a causative link in the mechanism of pathogenesis for several neurodegenerative disorders.

き、最後は大規模なニューロン死をもたらす。*O*-GlcNAc 化と *O*-リン酸化の相反関係が、いくつかの神経性疾患の発病メカニズムにおいて究極の原因となる繋がりかもしれない。

お茶の水女子大学理学部化学科

鈴木 理沙、浅沼 公恵、田中 亮子 共訳

References

- Hart, G. W., Kreppel, L.K., Comer, F. I., Arnold, C. S., Snow, D. M., Ye, Z., Cheng, X., DellaManna, D., Caine, D. S., Earles, B. J., Akimoto, Y., Cole, R. N., and Hayes, B.K. (1996) *Glycobiology* **6**, 711–716
- Snow, D. M., and Hart, G. W. (1998) *Internat. Rev. of Cytology* **181**, 43–74
- Hayes, B. K., and Hart, G. W. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 692–696
- Hart, G. W. (1997) *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 315–335
- Hart, G. W., Greis, K. D., Dong, D. L.-Y., Blomberg, M. A., Chou, T.-Y., Jiang, M. S., Roquemoire, E. P., Snow, D. M., Kreppel, L. K., Cole, R. N., and Hayes, B. K. (1995) *Pure Appl. Chem.* **67**, 1637–1645
- Haltiwanger, R. S., Kelly, W. G., Roquemoire, E. P., Blomberg, M. A., Dong, D. L. Y., Kreppel, L. K., Chou, T.-Y., and Hart, G. W. (1992) *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 264–269
- Roquemoire, E. P., Chevrier, M. R., Cotter, R. J., and Hart, G. W. (1996) *Biochem.* **35**, 3578–3586
- Chou, C.-F., Smith, A. J., and Omary, M. B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3901–3906
- Kearse, K. P., and Hart, G. W. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1701–1705
- Haltiwanger, R. S., Grove, K., and Phillipsberg, G. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3611–3617
- Chou, C.-F., and Omary, M. B. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4465–4472
- Holt, G. D., and Hart, G. W. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 8049–8057
- Kelly, W. G., Dahmus, M. E., and Hart, G. W. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10416–10424
- Holt, G. D., Snow, C. M., Senior, A., Haltiwanger, R. S., Gerace, L., and Hart, G. W. (1987) *J. Cell. Biol.* **104**, 1157–1164
- Starr, C. M., and Hanover, J. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6868–6873
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., and Iggo, R. (1996) *Oncogene* **12**, 921–930
- Chou, T.-Y., Dang, C. V., and Hart, G. W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4417–4424
- Privalsky, M. L. (1990) *J. Virol.* **64**, 463–466
- Jiang, M.-S., and Hart, G. W. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2421–2428
- Medina-Vera, L., and Haltiwanger, R. S. (1994) *Mol. Biol. Cell* **5**(S), 340a
- Matus, A. (1988) *Ann. Rev. Neurosci.* **11**, 29–44
- Hirokawa, N. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 74–81
- Hirokawa, N. (1993) *Neuronal Cytoskeleton: Morphogenesis, Transport and Synaptic Transmission: Japan Scientific Societies Press.*
- Cleveland, D. W., Hwo, S.-Y., and Kirschner, M. W. (1977) *J. Mol. Biol.* **116**, 207–225
- Ding, M., and Vandre, D.D. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 12555–12561
- Arnold, C. S., Johnson, G.V.W., Cole, R.N., Dong, D.L.-Y., Lee, M., and Hart, G. W. (271) *J. Biol. Chem.* **271**, 28741–28744
- Dong, D. Y.-L., Xu, Z.-S., Chevrier, M. R., Cotter, R. J., Cleveland, D.W., and Hart, G.W. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16679–16687
- Dong, D. Y.-L., Xu, Z.-S., Hart, G.W., and Cleveland, D.W. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20845–20852
- Zhang, X., and Bennett, V. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31391–31398
- Roquemoire, E. P., Dell, A., Morris, H. R., Panico, M., Reason, A. J., Savoy, L.-A., Wistow, G. J., Zigler, S. Jr., Earles, B. J., and Hart, G. W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 555–563
- Holt, G. D., Haltiwanger, R. S., Torres, C.-R., and Hart, G. W. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14847–14850
- Hagmann, J., Grob, M., and Burger, M. M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 14424–14428
- Vostal, J. G., and Kransnewich, D. M. (1996) *Mol. Biol. Cell* **5**(S), 263a
- Cole, R. N., and Hart, G.W. (1999) *J. Neurochem.* **73**, 418–428
- Murphy, J.E., Hanover, J.A., Froelich, M., Dubois, G., and Keen, J. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21346–21352
- Yao, P.J., and Coleman, P.D. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 2399–2411
- Yao, P.J., and Coleman, P.D. (1998) *Neurosci. Lett.* **252**, 33–36
- Haltiwanger, R. S., Blomberg, M.A., and Hart, G.W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9005–9013
- Kreppel, L.K., Blomberg, M.A., and Hart, G.W. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 9308–9315
- Lubas, W. A., Frank, D. W., Krause, M., and Hanover, J.A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 9316–9324
- Dong, D. L.-Y., and Hart, G.W. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19321–19330
- Kreppel, L. K., and Hart, G.W. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32015–32022
- Lamb, J. R., Tuggendreich, S., and Hieter, P. (1995) *Trends. Biochem. Sci.* **20**, 257–259
- Reason, A.J., Morris, H.R., Panico, M., Marais, R., Treisman, R.H., Haltiwanger, R.S., and Hart, G.W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16911–16921
- Chou, C.-F., and Omary, M. B. (1994) *J. Cell Sci.* **107**, 1833–1843
- Chou, T.-Y., Hart, G. W., and Dang, C.V. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18961–18965B
- Griffith, L. S., and Schmitz, B. (1999) *Eur. J. Biochem.* **262**, 824–831
- Kanai, Y., and Hirokawa, N. (1995) *Neuron* **14**, 421–432
- Goedert, M., Spillaantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989) *Neuron* **3**, 519–526

50. Drubin, D. G., and Kirschner, M. W. (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 2739–2746
51. Lee, G. (1990) *Cell Motil. Cytoskel.* **15**, 199–203
52. Litersky, J. M., and Johnson, G. V. W. (1995) *J. Neurochem.* **65**, 903–911
53. Mercken, M., Grynsan, F., and Nixon, R. A. (1995) *FEBS Lett.* **368**, 10–14
54. Preuss, U., Doring, F., Illenberger, S., and Mandelkow, E.-M. (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 1397–1410
55. Bramblett, G. T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S. E., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1993) *Neuron* **10**, 1089–1099
56. Iqbal, K., Zaidi, T., Bancher, C., and Grundke-Iqbal, I. (1994) *FEBS Lett.* **349**, 104–108
57. Paudel, H. K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28328–28334
58. Hanger, D. P., Hughes, K., Woodgett, J. R., Brion, J. P., and Anderton, B. H. (1992) *Neurosci. Lett.* **147**, 58–62
59. Mandelkow, E. M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J. R., and Mandelkow, E. (1992) *FEBS Lett.* **314**, 315–321
60. Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Doring, F., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M., and Mandelkow, E. (1992) *EMBO J* **11**, 2131–2138
61. Paudel, H. K., Lew, J., Ali, Z., and Wang, J. H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23512–23518
62. Steiner, B., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Gustke, N., Meyer, H. E., Schmidt, B., Mieskes, G., Soling, H. D., Dreschel, D., and Kirschner, M. W. (1990) *EMBO J* **9**, 3539–3544
63. Greenwood, J. A., and Johnson, G. V. W. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4373–4380
64. Pierre, M., and Nunez, J. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **115**, 212–219
65. Litersky, J. M., and Johnson, G. V. W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 1563–1568
66. Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H. E., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7679–7688
67. Paudel, H. K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1777–1785
68. Fuchs, E. (1996) *Annu. Rev. Genet.* **30**, 197–231
69. Franke, W. W., Schieller, D. L., Moll, R., Winter, S., Schmid, E., Engelbrecht, I., Denk, H., Krepler, R., Platzer, B. (1981) *J. Mol. Biol.* **153**, 933–959
70. Gilmartin, M. E., Mitchell, J., Vidrich, A., and Freedberg, I. M. (1984) *J. Cell. Biol.* **98**, 1144–1148
71. Steinert, P. M., and Idler, W. W. (1975) *Biochem. J.* **151**, 603–614
72. Ku, N.-O., and Omary, M. B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11820–11827
73. Lee, M. K., and Cleveland, D. W. (1996) *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 187–217
74. Chou, C. H., Rosevear, E., and Goldman, R. D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1885–1889
75. Hisanaga, S., Gonda, Y., Inagaki, M., Ikai, A., and Hirokawa, N. (1990) *Cell Regul.* **1**, 237–248
76. Hisanaga, S., Matsuoka, Y., Nishizawa, K., Saito, T., Inagaki, M., et al. (1994) *J. Neurochem.* **63**, 387–389
77. Gill, S. R., Wong, P. C., Monteiro, M. J., and Cleveland, D. W. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 2005–2019
78. Wong, P. C., and Cleveland, D. W. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 1987–2003
79. Correas, I., Leto, T. L., Speicher, D. W., and Marchesi, V. T. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 3310–3315
80. Delaunay, J. (1995) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **19**, 79–110
81. Walensky, L. D., Shi, Z. T., Blackshaw, S., DeVries, A. C., Demas, G. E., Gascard, P., Nelson, R. J., Conboy, J. G., Rubin, E. M., Snyder, S. H., and Mohandas, N. (1998) *Curr. Biol.* **8**, 1269–1272
82. Burridge, K., and Connell, K. L. (1983) *J. Cell Biol.* **97**, 359–367
83. Sealock, R., Paschal, B., Beckerle, M. C., and Burridge, K. (1986) *Exp. Cell Res.* **163**, 143–150
84. Horowitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M. C., and Burridge, K. (1986) *Nature* **320**, 531–533
85. Kordeli, E., Lambert, S., and Bennett, V. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2352–2359
86. Zhou, X., Lambert, S., Malen, P. L., Carpenter, S., Boland, L. M., and Bennett, V. (1998) *J. Cell Biol.* **143**, 1295–1304
87. Davis, J. Q., Lambert, S., and Bennett, V. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 1355–1367
88. Zhang, X., and Bennett, V. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 1571–1581
89. Greengard, P., Benfenati, F., and Valtorta, F. (1994) *Adv. Sec. Messenger Phosphoprot. Res.* **29**, 31–45
90. Schiebler, W., Jahn, R., Doucet, J.-P., Rothlein, J., and Greengard, P. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 8383–8390
91. Bahler, M., and Greengard, P. (1987) *Nature* **326**, 704–707
92. Jovanovic, J. N., Benfenati, F., Siow, Y. L., Sihra, T. S., Sanghera, J. S., Pelech, S. L., Greengard, P., and Czernik, A. J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3679–3678
93. Linder, R., and Ungewickell, E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16567–16573
94. Lafer, E. M., Womack, M., Zhao, X., Prasad, K., and Augustine, G. J. (1997) *Soc. Neurosci. Abstr.* **23**, 361
95. Maycox, P. R., Link, E., Reetz, A., Morris, S. A., and Jahn, R. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 1379–1388
96. Ye, W., and Lafer, E. M. (1995) *J. Neurosci. Res.* **41**, 15–26
97. Murphy, J. E., Hanover, J. A., Froelich, M., Dubois, G., and Keen, J. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21346–21352
98. Alzheimer, A. (1907) *All. Z. Psychiatr.* **64**, 146–148
99. Wisniewski, H. M., Narang, H. K., and Terry, R. D. (1976) *J. Neurol. Sci.* **27**, 173–181
100. Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **120**, 885–890
101. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4245–4249
102. Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987) *Nature* **325**, 733–736
103. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M. et al. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 6084–6089
104. Yen, S.-H., Dickson, D. W., Crowe, A. et al. (1987) *Am. J. Pathol.* **126**, 63–73
105. Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A. et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4051–4055
106. Kosik, K. S., Orecchio, L. D., Binder, L., et al. (1988) *Neuron* **1**, 817–825
107. Spillantini, M. G., and Goedert, M. (1998) *Trends Neurosci.* **21**, 428–433

108. Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-White, E.T., and Hymann, B.T. (1992) *Neurology* **42**, 631–639
109. Neve, R. L., and Robakis, N. K. (1998) *Trends Neurosci.* **21**, 15–19
110. Lee, V.M.Y. (1996) *Ann. NY Acad. Sci.* **777**, 107–113
111. Hanger, D.P., Betts, J. C., Loviny, T.L., Blackstock, W. P., and Anderton, B. H. (1998) *J. Neurochem.* **71**, 2465–2476
112. Johnson, G.V.W., and Jenkins, S.M. (1996) *Alzheimer's Dis. Rev.* **1**, 38–54
113. Johnson, G.V.W., and Hartigan, J.A. (1998) *Alzheimer's Dis. Rev.* **3**, 125–141
114. Sims, N.R. (1990) *Ann. Neurol.* **6**, 691–693
115. Marcus, D.L., de Leon, M. J., Goldman, J., Logan, J., Christman, D. R., Wolf, A. P., Fowler, J. S., Hunter, K., Tsai, J., Pearson, J., et al. (1989) *Ann. Neurol.* **1**, 91–94
116. Yki-Jarvinen, H., Vogt, C., Iozzo, P., Pipek, R., Daniels, M.C., Virkamaki, A., Makimattila, S., Mandarino, L., DeFronzo, R.A., McClain, D., and Gottschalk, W.K. (1997) *Diabetologica* **40**, 76–81

Received on September 10, 1999, accepted on October 17, 1999

Profile of Authors

Shane Arnold is a graduate student in the Department of Biochemistry and Molecular Genetics at the University of Alabama at Birmingham. He is completing his doctoral work on the dynamics of cytoskeletal O-GlcNAcylation and the O-GlcNAcylation of the microtubule-associated protein tau with Dr. Hart at the Johns Hopkins University School of Medicine. Shane received his Bachelor's degree in Cell and Molecular Biology from Tulane University in May of 1993. Prior to joining Dr. Hart's group, he investigated the signalling of the growth hormone receptor with Dr. Stuart Frank at the University of Alabama at Birmingham in addition to studying the metabolism of oxidatively modified lipoproteins with Dr. John DeLamatre at Louisiana State University Medical Center.

★★★★★★★★

Gerald W. Hart is Director and Professor of Biological Chemistry at Johns Hopkins University School of Medicine. He received his Ph.D. in Developmental Biology at Kansas State University, USA in 1977, and did postdoctoral work in the laboratory of William J. Lennarz at Johns Hopkins prior to joining the faculty there in 1979. He is the founding Editor-In-Chief of *Glycobiology* and serves on the editorial board of *The Journal of Biological Chemistry*. His research is focused on elucidating the biological significance of the dynamic glycosylation of nuclear and cytoplasmic regulatory proteins.