Structural Control of Sugar Chains in Animal Cells

動物細胞における糖鎖構造制御

Fukuta, Kazuhiro ; Asanagi, Mineko ; and Makino, Tadashi

Life Science Laboratory, Mitsui Chemicals, Inc., 1144 Togo, Mobara, Chiba 297-0017, Japan

FAX: 81-475-25-6553, E-mail: kazuhiro.fukuta@mitsui-chem.co.jp

Key Words : *animal cell, sugar chain, glycosyltransferase, interferon- γ , immunoglobulin M***Abstract**

Sugar chains are synthesized in cells by sequential reactions of glycosylation enzymes. These sugar chains do not have uniform structure, but rather constitute a mixture of various structures which correspond to the intermediates of maturation. Sugar chains on recombinant glycoproteins produced by animal cells also contain various forms. A method of producing uniform glycoproteins with specific sugar chain structure is required. We have been studying biosynthetic control of sugar chains on glycoproteins using animal cells. In the present review, we present the results of our research, focusing on the following two subjects: remodeling branch structures of complex-type sugar chains on interferon- γ (IFN- γ); control of addition of bisecting GlcNAc to immunoglobulin M (IgM). In the investigation into sugar chains on IFN- γ , we used Chinese hamster ovary cells as hosts for recombinant production of IFN- γ , and overexpressed genes for *N*-acetylglucosaminyltransferases IV and V, thereby changing sugar chains on IFN- γ to highly branched types. In the investigation into sugar chains on IgM, we controlled addition of bisecting GlcNAc to sugar chains on IgM by regulating intracellular activity of β 1,4-galactosyltransferase and *N*-acetylglucosaminyltransferase III. Our results show that regulation of the expression of glycosylation enzymes can be effectively used to control sugar chain structures.

要 約

細胞内における糖鎖の生合成は、糖鎖生合成酵素群による逐次反応であることから、生成物である糖鎖の構造は一様でなく、糖鎖成熟途上の色々な段階のものを含む混合物となる。動物細胞を宿主としてつくった組換え糖タンパク質の糖鎖もやはり不均一で、特定の糖鎖構造を有する糖タンパク質を均一性高くつくる技術の確立が望まれる。このため、我々は動物細胞を用いて糖タンパク質の糖鎖構造を制御することに取り組んで来た。ここでは、インターフェロン- γ (IFN- γ)を用いて複合型糖鎖の分岐構造を改変した例と、イムノグロブリンM (IgM)を用いてバイセクティングGlcNAcの付加を制御した例を中心に我々の研究を紹介する。IFN- γ をモデルとした研究では、宿主細胞としてチャイニーズハムスター卵巣細胞を用い、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素IVおよびVの遺伝子を高発現させることによって、IFN- γ の糖鎖を多分岐化させることができた。IgMを用いた研究では、B細胞内の β 1,4-ガラクトース転移酵素と*N*-アセチルグルコサミン転移酵素IIIの活性バランスを調節することにより、IgMの糖鎖に対するバイセクティングGlcNAcの付加を制御できた。糖鎖生合成酵素群の発現制御により、糖鎖構造をかなり有効に制御できるようなのである。

A. Introduction

Sugar chains are initially added to proteins in the endoplasmic reticulum (ER), and subsequently they are modified in the ER and Golgi complex (through processing by enzymes involved in sugar chain biosynthesis) until they achieve maturity (Fig. 1). Such processing of sugar chains is catalyzed by enzymes such as glycosidases and glycosyltransferases, which are distributed in the ER and Golgi complex according to the order of the glycosylation pathway. The reactions catalyzed by these enzymes do not occur to an equal degree to all the glycoprotein molecules; thus, the extent of branching or elongation of sugar chains differs among glycoproteins from molecule to molecule. Thus, in contrast to DNA and proteins (which are biosynthesized according to a template), sugar chains are synthesized in step-

A. はじめに

糖鎖は細胞内の小胞体で付加され、さらに引き続き小胞体およびゴルジ体のなかで糖鎖生合成酵素群により修飾を受けて成熟する(図1)。このような糖鎖修飾は、小胞体からゴルジ体にかけて順々に分布する各種のグリコシダーゼや糖転移酵素などの糖鎖生合成酵素群の間を糖タンパク質が通過する間に各酵素の反応によって行われる。この一連の反応は、糖タンパク質分子すべてに均一には働かないので、糖鎖の分岐度や糖鎖末端までの伸長度は各々の分子でまちまちとなる。このように糖鎖の生合成は、鋳型を用いるDNAやタンパク質の場合とは異なり、糖鎖生合成酵素群による逐次反応によって行われることから、

Fig. 1. Biosynthesis of N-linked sugar chains in animal cells.

by-step reactions catalyzed by glycosylation enzymes. Hence, sugar chains do not have a uniform structure, but rather have various structures which correspond to the intermediates of the maturation process.

Animal cells are the main cell type used for recombinant production of glycoproteins. Sugar chains on glycoproteins produced by animal cells also contain various forms. More than ten different sugar chain structures have been observed for a single glycoprotein. The glycosylation profiles of glycoproteins produced by mammalian cells other than human cells resemble the profiles of human glycoproteins rather than those of lower species (for example, yeasts, plants, and insects). However, sugar chains produced by mammalian cells other than human cells often have structures that are not observed in human glycoproteins, and they are immunogenic in the human body (1, 2). Overcoming this impediment to the use of animal cells is an important issue in the development of pharmaceuticals. Furthermore, when we intend to study and use glycoproteins with sugar chains of specific structures (glycoforms), it is required to establish a method that selectively produce specific glycoforms. Currently available information regarding the relationship between the structure of a sugar chain and its biological activity is inadequate. However, in the case of erythropoietin (an erythropoietic factor), for example, a highly branched glycoform is known to show high activity *in vivo*(3).

We conducted research into production of glycoproteins using mammalian cells, with the aim of uniformly producing specific glycoforms. Specifically, we attempted to control the

生成物である糖鎖の構造は一様でなく、糖鎖成熟途上の色々な段階のものを含む混合物となる。

糖タンパク質の組換え生産においては、宿主として主に動物細胞が用いられているが、動物細胞の作る糖タンパク質糖鎖もやはり不均一で、同じ一つのタンパク質に付加する糖鎖から十数種以上の糖鎖型が見いだされる。ヒト以外の動物細胞の生産する糖タンパク質の糖鎖パターンは、系統の離れた生物種(例えば酵母、植物、昆虫)に比べればヒトの糖鎖パターンに近いといえるが、実際にはヒト糖タンパク質の糖鎖に見られない構造も出現し、また中にはヒトに対して抗原性を示す糖鎖構造もある(1, 2)。したがって、医薬品開発を考える場合、動物細胞におけるこのような不具合を改善することは重要な課題である。また、特定の糖鎖構造を有する糖タンパク質(glycoform)の有用性を検証し、その応用を考えるためには、特定の glycoformを選択的に生産する技術が必要となる。糖鎖型と糖タンパク質の生理活性との関係についての情報は充分ではないが、赤血球増殖因子であるエリスロポエチンの場合では、分岐の多い糖鎖型を有する glycoformにおいて *in vivo* 活性が高いことが知られている(3)。

以上のことから、我々は動物細胞を用いて糖タンパク質を生産するにあたり、多様な glycoform の中から特定の glycoform を均一性高くつくことを目指して研究を進めてきた。この目的のために、我々は生体内における細胞表面認識のためのシグ

biosynthesis of asparagine-linked (*N*-linked) sugar chains that are thought to play important roles as signals for cell-surface recognition in the body.

B. Strategy for Structural Control of *N*-linked Sugar Chains

In *N*-glycosylation, a block of oligosaccharides (which serves as a precursor) is initially synthesized on the dolichol in the ER. This whole oligosaccharide block is then transferred *en bloc* to the Asn residue of a protein which has been imported into the ER. While proteins to which sugar chains are added in this manner move through the ER and Golgi complex toward secretion, the sugar chains are brought to maturity through various modifications. Along the way, these sugar chains, which are initially high-mannose-types, are eventually converted to complex types via hybrid types. Thus, complex-type sugar chains are the most mature among *N*-linked sugar chains, and structural control of complex-type sugar chains is important.

A glycosylation profile is considered to reflect, to some extent, the expression profile of enzymes (located in the ER and Golgi complex) that are involved in glycosylation. Actually, even for a single glycoprotein, glycosylation profiles vary, depending on the organs producing the glycoprotein. Species-specific glycosylation profiles are also observed (4, 5). Also, glycosylation profiles can vary among glycoproteins produced by a single cell. In the case of a glycoprotein that contains multiple sugar chains, the structures of sugar chains sometimes differ among glycosylation sites (6-8). Thus, there are two major factors in the structural regulation of sugar chains added to proteins: glycosylation machinery in cells, and the backbone structure of a protein. These factors suggest two strategies for control and remodeling of sugar chains. One is to modify the glycosylation machinery in cells, and the other is to change the sequence of amino acids of the protein of interest. The former strategy is considered more practical than the latter, because it preserves the function of the glycoprotein and avoids immunogenicity. Therefore, we attempted to control intracellular activities of glycosyltransferases, by regulating the expression of these enzymes in cells using genetic engineering.

The cloning of genes for glycosyltransferases is critical for such a procedure. However, at the beginning of the 1990s, when we started our research, only a small number of glycosyltransferase genes had been cloned. Therefore, despite the availability of genetic technology, remodeling sugar chains was difficult. However, during the decade that followed, there were great advances in cDNA cloning of glycosyltransferases (9, 10). Current situation makes possible the introduction of glycosyltransferase genes into cells. Our research was thus greatly aided by recent advances in cDNA cloning of glycosyltransferases.

ナル分子としての機能が重要視されるアスパラギン結合型 (*N*-結合型)糖鎖の生合成を制御することに取り組んだ。

B. *N*-結合型糖鎖の構造制御戦略

N-結合型糖鎖の生合成では、まず小胞体で糖鎖前駆体となるオリゴ糖ブロックがドリコール上に合成され、小胞体に送り込まれたタンパク質のAsn残基に、前もって合成されたこのオリゴ糖ブロックがブロックごと転移される。このようにして糖鎖付与を受けたタンパク質が小胞体からゴルジ体を通して分泌されるまでの間に、糖鎖は様々な修飾を受けて成熟型へと成長する。この過程で糖鎖は最初、高マンノース型と呼ばれる構造をとっているが、途中、ハイブリッド型と呼ばれる構造を経て、最後に複合型と呼ばれる構造に至る。すなわち、複合型糖鎖は最も成熟した型の糖鎖であり、複合型糖鎖の構造を制御することが *N*-結合型糖鎖の構造制御において重要と考えられる。

糖鎖パターンは小胞体・ゴルジ体に分布している糖鎖生合成酵素群の発現状態をある程度反映している。実際、同種のタンパク質であっても、付加される糖鎖のパターンは、そのタンパク質を生産する臓器によって異なることが知られており、動物種による差異も見られる(4, 5)。しかし、同一の細胞が生産するタンパク質では必ず同一の糖鎖パターンを示すということでもない。一つのタンパク質に複数の糖鎖が付加されている場合でも、糖鎖の結合位置によって構造が異なることもある(6-8)。このように、タンパク質に付加される糖鎖の構造に影響を与える因子としては、宿主細胞内にある糖鎖生合成機構に関わる因子と、糖鎖が付加されるタンパク質の構造に関わる因子の2種類が挙げられる。従って、糖鎖構造を制御したり改変したりするためには、宿主細胞の糖鎖生合成機構に手を加えるか、または、目的のタンパク質のアミノ酸配列を変更するか、という2つの方法が考えられる。しかし、タンパク質の機能を維持することや、抗原性の問題を考慮した場合、前者の方法がより実際的と考えられる。そこで我々は、宿主細胞の糖転移酵素群の発現量を遺伝子工学的的手法により調節し、各酵素の活性バランスを制御する研究に取り組んだ。

ところが、このためには糖転移酵素群の遺伝子クローニングが必須である。我々が研究を開始した1990年初頭は、限られた種類の糖転移酵素でしか遺伝子クローニングが成功していなかったため、遺伝子工学的的手法をもってしても糖鎖を改変することは容易ならざる状況であった。しかし、その後今日に至る10年の間に糖転移酵素遺伝子のクローニングが爆発的に進んだ(9, 10)ことから、現在では、多種類の糖転移酵素の遺伝子を細胞に導入することが可能となっており、このことは、我々の研究を進展させる上で強力な追い風となった。

C. Relationship between the Expression of Glycosyltransferases in a Host Cell and Sugar Chain Structure

When we started our research into controlling expression of glycosyltransferases, the number of cloned genes encoding glycosyltransferases was limited. To overcome this problem, we attempted to modify glycosylation machinery in cells using cell fusion. In this procedure, we established a hybridoma, 3-4, by fusing human B cell line No.12 [which produces immunoglobulin M (IgM) against *Pseudomonas aeruginosa*] with human myeloma P109 (11). We compared the sugar chain structures of IgM molecules produced by parental No.12 cells with those produced by hybridoma 3-4 cells (12). The μ -chain of IgM contains five *N*-glycosylation sites; we analyzed sugar chain structures at each site. Sugar chains at sites Asn171, Asn 332 and Asn395 were complex-type, and those at Asn 402 and Asn563 were high-mannose-type, as reported previously (7, 8). In comparing IgM molecules produced by parent cells and hybridoma cells, differences were observed among complex-type structures. These differences were related to the percentage of sugar chains containing bisecting GlcNAc (Fig. 2). In the case of IgM derived from parental cells, the percentages of sugar chains containing bisecting GlcNAc were 49.9% at Asn171, 67.8% at Asn332, and 81.3% at Asn395. In the case of IgM from hybridoma, the respective percentages were 3.7%, 8.7% and 15.3%; significantly less than the values for parental cells. Activity of GnT-III (which adds bisecting GlcNAc to *N*-glycans) in hybridomas was found to be less than 1/10 of that observed in parental No.12 cells. This decrease was due to the lack of GnT-III in P109, the human myeloma that was the other parent of the hybridoma. The decreased GnT-III activity in the hybridoma was reflected in the decrease in addition of bisecting GlcNAc. We also measured β 1,4-galactosyl-transferase (β 1,4-GalT) activity in each cell line. The hybridoma showed activity intermediate between that of parent cells (No.12 < 3-4 < P109). β 1,4-GalT activity in the hybridoma was 1.8-fold higher than in No.12 cells, although the activity of β 1,4-GalT in No.12 cells was sufficient for complete galactosylation. The results of this experiment showed that we can modify glycosylation machinery using cell fusion, and that the expression of glycosyltransferases in cells is reflected in the structures of sugar chains on glycoproteins they produce.

C. 宿主細胞の糖転移酵素発現量と糖鎖構造の関係

糖転移酵素遺伝子の発現制御に関する研究を進めるにあたり、初期の研究段階では、利用できる糖転移酵素遺伝子の種類が限られていたという問題があった。そこで、当初、我々は細胞融合を利用し、細胞の糖鎖生成機構を改変することに取り組んだ。この実験では、抗緑膿菌IgM抗体を生産するヒトB細胞(No.12株)にヒトミエローマ(P109株)を融合してハイブリドーマ(3-4株)を取得した(11)。親細胞であるNo.12株とハイブリドーマ3-4株の生産するIgMにおいて、糖鎖構造を比較した(12)。IgMの μ 鎖には*N*-結合型糖鎖の付加部位が5カ所存在するが、本実験では、これらの部位別に糖鎖構造を解析した。その結果、従来知られているように(7, 8)、IgMの μ 鎖における5カ所の糖鎖付加部位のうち、Asn171, Asn332, Asn395に付加されているものは複合型、Asn402, Asn563に付加されているものは高マンノース型であった。親細胞のIgMとハイブリドーマのIgMとの比較では、複合型糖鎖の構造に差異が見られた。この差異は、バイセクティングGlcNAc(図2)と呼ばれる構造を持つ糖鎖の存在比率に起因した。親細胞ではバイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖の割合がAsn171, Asn332, Asn395においてそれぞれ49.9%、67.8%、81.3%であったが、ハイブリドーマにおいては、それぞれ3.7%、8.7%、15.3%と大きく低下していた。バイセクティングGlcNAcは、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素III (GnT-III) の作用によって糖鎖に付与されるが、ハイブリドーマのGnT-III活性は、親細胞No.12株に比べて1/10以下に低下していた。このことは、細胞融合におけるもう一方の親細胞として用いたヒトミエローマP109がGnT-III活性を有していないことによるものであるが、このようにして低下したGnT-III活性を反映して、ハイブリドーマではバイセクティングGlcNAcの付加が減少したことが確認できた。また、各細胞の β 1,4-ガラクトース転移酵素(β 1,4-GalT)の活性についても測定したところ、ハイブリドーマは、両親細胞の中間(No.12 < 3-4 < P109)の活性を示し、No.12株に比べると約1.8倍に増加していた。ただし、IgMの糖鎖にガラクトースを付加するという点では、No.12株の β 1,4-GalT活性で充分であった。この実験において、細胞融合によって糖鎖生成機構を改変できることが示されたとともに、細胞の糖転移酵素発現量が、生産する糖タンパク質の構造に反映されることも確認できた。

Fig. 2. Reaction of GnT-III.

β 1,4-linked GlcNAc attached to β 1,4-Man in the trimannosyl core is termed bisecting GlcNAc.

D. Remodeling of Sugar Chains into Highly Branched Structures

In complex-type sugar chains, branches are constructed by addition of GlcNAcs by various *N*-acetylglucosaminyltransferases (GnTs) (Fig. 3), and this forms the skeleton of the sugar chain. In the complex-type sugar chains in mammals, including humans, branch structures with a maximum of four antennae are observed (Fig. 4). In complex-type sugar chains, the branch structures form a skeleton on which the side chains are elongated. The enzymes responsible for the formation of tri- and tetra-antennary structures are GnT-IV and GnT-V. The above-

D. 複合型糖鎖の高分岐化による改変

複合型糖鎖の骨格は、各種の*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(GnT)によって付与されるGlcNAcによって形成される分岐構造(図3)で成り立っている。ヒトを含む哺乳類の複合型糖鎖では、4分岐型までの分岐構造が知られている(図4)。複合型糖鎖では、この分岐構造が糖鎖の基本骨格となり、この骨格の先に側鎖が形成される。3分岐型や4分岐型の糖鎖形成に必須なGnT酵素はGnT-IVとGnT-Vである。GnTによって付加されるGlcNAcでも、上述のGnT-IIIによって付加されるバイセクティングGlcNAcに関しては、その先に側鎖が形成されることがない。そのため

Fig. 3. Classification of GnTs.

Fig. 4. Reactions of GnT-IV and GnT-V.

described bisecting GlcNAc (which is added by GnT-III) is not considered a branch, because side chains are not formed on it. Even so, bisecting GlcNAc could possibly be considered a small branch. Although GnTs have been known to exist for many years, cDNA cloning and clarification of their sequences were not achieved until the 1990s. The cDNA sequence of GnT-III was reported by Nishikawa *et al.* in 1992 (13), and the cDNA sequence of GnT-V was reported by Shoreibah *et al.* in 1993 (14) and Saito *et al.* in 1994 (15). The cDNA sequence of GnT-IV (the last of the GnTs to be cloned) was reported by Minowa *et al.* in 1998(16).

With these developments in cDNA cloning of GnTs, we attempted to remodel biantennary sugar chains into highly branched chains using GnT-IV and GnT-V. We used human interferon- γ (IFN- γ) as a model glycoprotein for this experiment. Chinese hamster ovary (CHO) cells, which we used as host cells, are convenient tools for expression of recombinant proteins, because genes introduced into these cells can be amplified by the gene amplification technique using dihydrofolate reductase (DHFR). Consequently, CHO cells are widely used for recombinant production of glycoproteins. In addition, CHO-derived glycoproteins show glycosylation profiles similar to those of human glycoproteins, so CHO cells are useful in the industrial production of glycoproteins for human therapy.

The human IFN- γ we used as a model glycoprotein consists of 143 amino acids, and contains sugar chains at Asn 25 and Asn 97. Sugar chains on natural human IFN- γ are of biantennary structure. CHO cells normally express GnT-IV and GnT-V, but their levels of expression are low. Thus, when IFN- γ is produced by normal CHO cells, the sugar chains on the IFN- γ are mainly biantennary. We introduced cDNAs for GnT-IV and/or GnT-V into CHO cells, and isolated clones which expressed high levels of GnT-IV and/or GnT-V (17). Structural analysis of sugar chains on IFN- γ produced by each clone revealed that they had been changed to primarily tri- and tetra-antennary structures, depending on the level of intracellular activity of GnT-IV and GnT-V (Table I). About 60% of all the sugar chains were of the target branch structure. Thus, the branch structures of sugar chains on IFN- γ were changed, without significant difficulty, by overexpressing GnT-IV and/or GnT-V. These results might seem unsurprising. However, the branch structure has been believed to depend on the protein backbone, because the number of glycoproteins carrying tri- or tetra-antennary sugar chains is small. Our results have overturned such a previous belief. We also analyzed sugar chains on cellular proteins other than IFN- γ that were produced by CHO cells transfected with GnT-IV and/or GnT-V, and most of these sugar chains had been converted to highly branched types. Thus, it was demonstrated that changing the expression of glycosyltransferases in cells mostly results in remodeling of sugar chain structure.

にバイセクティングGlcNAcは複合型糖鎖の分岐としては見なされていないが、小さな分岐と考えることもできる。これらGnTの存在は、かなり以前から知られていたが、遺伝子が単離され配列が明確になったのは1990年代になってからである。GnTのうち、GnT-IIIのcDNA配列は1992年にNishikawaら(13)によって報告され、GnT-VのcDNA配列は1993年にShoreibahら(14)および1994年にSaitoら(15)によって報告された。また、GnT群の中で、最後までクローニングがなされずに残っていたGnT-IVは、1998年にMinowaらにより報告された(16)。

こうして各GnTの遺伝子が揃ったことにより、我々はGnT-IVおよびGnT-V利用による2分岐型糖鎖の多分岐型への改変に取り組んだ。この実験ではヒトインターフェロン- γ (IFN- γ)をモデルとして用いた。細胞宿主として用いたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)を用いた遺伝子増幅系の利用により、ホスト内で目的遺伝子のコピー数を増幅できるので、組換え糖タンパク質を発現させるための宿主細胞として好適である。また、つくられる糖鎖のパターンがヒトのものに近いので、医療用糖タンパク質の生産にも用いられ、産業的にも価値の高い細胞である。

モデルとして用いたヒトIFN- γ は143個のアミノ酸残基から成り、糖鎖は25番目と97番目のアスパラギンに付加される。天然のヒトIFN- γ には2分岐型糖鎖が結合している。CHO細胞はもともGnT-IVやGnT-Vを発現してはいるが、その発現量は低いことから、通常のCHO細胞でIFN- γ を生産しても、糖鎖は主として2分岐型である。我々は、このCHO細胞にGnT-IVおよびGnT-Vの片方または両方の遺伝子を導入し、それぞれを高い活性で発現する細胞株を単離した(17)。生産されるIFN- γ の糖鎖構造を調べたところ、それぞれ細胞内のGnT-IVやGnT-Vの活性に対応して、主要な糖鎖構造は3分岐型や4分岐型へと変換されていた(表I)。目的的分岐を持った糖鎖は全糖鎖のほぼ60%前後の割合に達していた。このように、IFN- γ をモデルとして用いた実験では、GnT-IVやGnT-Vの高発現により、比較的容易に糖鎖の分岐度を改変できた。このことは、一見当然の結果に見える。しかし、3分岐型や4分岐型の糖鎖を持つ糖タンパク質の種類が限られていたことから、これまでは糖鎖の分岐度はタンパク質の種類で決まるという見方が強かった。今回の結果はそれをくつがえしたことになる。我々は、上記のGnT-IVまたはGnT-Vを導入したCHO細胞において、IFN- γ 以外の、細胞全体の糖鎖を解析してみたが、全般的に糖鎖の分岐度が増加していることも確認した。したがって、糖転移酵素の発現状態を変えることによって、かなりの程度、糖鎖の構造改変が可能であると考えられた。

Table I. N-glycan structures of human IFN- γ produced by CHO transfectants.

	Cell line				
	Parent	Transfectants			
		GnT-IV	GnT-V (moderate level)	GnT-V (high level)	GnT-IV GnT-V
	%	%	%	%	%
Biantennary	63.8	11.0	48.4	14.2	7.6
Triantennary (β 1,4-branched)	2.5	66.9	0.7	1.0	9.3
Triantennary (β 1,6-branched)	12.8	2.6	23.6	55.7	10.1
Tetraantennary	1.0	12.4	3.3	8.7	56.2

E. Control of Addition of Bisecting GlcNAc by Regulating the Intracellular Activity of Galactosyltransferase

In addition to remodeling sugar chains, we attempted to control formation of sugar chain structures. For this purpose, we utilized the competitive behavior of glycosyltransferases involved in sugar chain biosynthesis. Sometimes, more than one glycosyltransferase can react with a particular sugar chain structure, and these enzymes compete for sugar chains of this structure. In such a case, the structure a sugar chain is converted to depends on which enzyme reacts with it first. Regulating activity of these competitive glycosyltransferases is an important means of structural control of sugar chains.

Suppression of the formation of Gal α 1-3Gal (which is known to be a xenoantigen) is an example of the application of competition between glycosyltransferases. Sugar chains containing Gal α 1-3Gal are commonly observed in mice and swine, but not in humans. If a glycoprotein containing Gal α 1-3Gal were used in human therapy, or if tissues containing Gal α 1-3Gal were transplanted to a human body, immunological rejection would occur. To remove this xenoantigen, some attempts are reportedly made to introduce genes for glycosyltransferases which compete with α 1,3-galactosyltransferase (α 1,3-GalT) into mouse and swine cells, with the aim of suppressing the action of α 1,3-GalT (which catalyzes formation of the Gal α 1-3Gal linkage). As shown in Fig.5, α 1,3-GalT competes with α 1,2-fucosyltransferase, α 2,3-/ α 2,6-sialyltransferase, and GnT-III. When one of these enzymes was overexpressed, formation of Gal α 1-3Gal was suppressed (18-23).

In our study, we addressed the effects of galactosylation. When a sugar chain is galactosylated, actions of many glycosyltransferases are inhibited. We examined this effect using the above-described human B cell line, No.12, which produces IgM. We attempted to disrupt the genes for β 1,4-GalT in these cells using a gene targeting technique. We isolated a clone (single knockout clone) in which one of the β 1,4-GalT alleles, on the chromosome 9, was disrupted (24). The level of β 1,4-GalT activity in the single knockout clone was about half that of

E. ガラクトース転移酵素の活性調節によるバイセクティング GlcNAc残基の付加制御

我々は、糖鎖の構造改変に加え、さらに、糖鎖構造を制御することに取り組んだ。細胞内において糖鎖構造を制御している因子は多々あると考えられるが、我々は、糖転移酵素どうしの拮抗作用を糖鎖構造制御に利用することを考えた。糖転移酵素群の中には、同じ構造の糖鎖を共通の基質とするものがあり、これらの酵素は共通の基質糖鎖に対して競合し、どちらの酵素が作用するかによって、糖鎖構造は別々の構造へ導かれることになる。このような競合性を有する糖転移酵素の活性バランスを制御することも糖鎖構造を制御する上で重要である。

このような糖転移酵素の競合を糖鎖改変に用いた例として、移植抗原として知られる Gal α 1-3Gal結合の形成を抑制する試みがある。Gal α 1-3Gal 結合単位を含む糖鎖は、マウスやブタなどで普通に見られるが、人の体内では合成されない。Gal α 1-3Gal構造を含む糖タンパク質をヒトに対する薬剤として用いたり、Gal α 1-3Gal構造を有する組織をヒトに移植すれば、拒絶反応を惹起することになる。この様な移植抗原を除くため、Gal α 1-3Gal 結合をつくる α 1,3-ガラクトース転移酵素(α 1,3-GalT)の作用を抑制することを目的として、 α 1,3-GalTと競合する糖転移酵素の遺伝子をマウスやブタの細胞に導入することが試みられている。図5の様に、 α 1,3-GalTは、基質となる糖鎖に対して、 α 1,2-フコース転移酵素、 α 2,3-または α 2,6-シアル酸転移酵素、GnT-IIIと競合しており、これらの競合酵素のどれかを大量に発現させると、Gal α 1-3Gal結合の生成は抑制されることが報告されている(18-23)。

我々は、糖鎖がガラクトシル化されると他の糖転移酵素の作用が阻害されるという点に着目した。ここでは、上述のIgM生産B細胞を用いて実験を行った。我々は、上述のヒトB細胞No.12株において、ジーンターゲティングによる β 1,4-GalTの遺伝子破壊を試みた。その結果、第9染色体上にコードされる一対の β 1,4-GalT遺伝子のうち、一方だけを不活化(シングルノックアウト)した細胞を得た(24)。得られたシングルノックアウト

Fig. 5. Glycosyltransferases which compete with α 1,3-GalT.

parent cells, as expected. Structural analysis of sugar chains on the IgM produced by this cell clone showed that the extent of galactosylation was almost complete as seen in the parent cells. This result was interpreted as meaning that β 1,4-GalT activity in the single knockout clone was sufficient for full galactosylation. However, an increase in the percentage of sugar chains containing bisecting GlcNAc was observed in IgM from the single knockout cells. GnT-III (which catalyzes the addition of bisecting GlcNAc) has been observed not to react with galactosylated sugar chains *in vitro* (25-29) (Fig. 6). Once the acceptor sugar chain is galactosylated, GnT-III does not react with the resultant sugar chain. Thus, GnT-III and β 1,4-GalT compete for the same sugar chains. We consider the above result a reflection of this behavior by enzymes. We also overexpressed β 1,4-GalT in No.12 B cells, and isolated clones expressing different levels of β 1,4-GalT. In these clones, addition of bisecting GlcNAc was suppressed inversely at elevated levels of β 1,4-GalT activity. Thus, we demonstrated control of addition of bisecting GlcNAc by regulating the activity of GnT-III and β 1,4-GalT, by making use of their competitive behavior.

It has previously been thought that competition between GnT-III and β 1,4-GalT occurs only *in vitro*. It is known that glycosyltransferases are compartmentalized in Golgi complex in the order in which they act. β 1,4-GalT is localized to the trans-Golgi and the trans-Golgi network (30-34). GnT-III is thought to be distributed in the medial-Golgi (35, 36). Thus, β 1,4-GalT and GnT-III have previously been believed to have different distribution patterns. In contrast, we demonstrated competition between β 1,4-GalT and GnT-III in cells. Recently, it has been demonstrated that glycosyltransferases are not compartmentalized

株の β 1,4-GalT活性を測定すると、予想される通り、酵素活性がほぼ半分に低下していた。この細胞の生産するIgMの糖鎖構造を解析したところ、ガラクトースの付加率はほぼ100%に保たれており、 β 1,4-GalT活性は半減してもガラクトース付加にまだ十分な量が残存していると解釈できた。一方、この細胞の生産するIgMの糖鎖においては、バイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖の割合が増加していることが見出された。バイセクティングGlcNAcはGnT-IIIによって付加されるが、GnT-IIIは、ガラクトース付加を受けた糖鎖を基質としないことが *in vitro* の実験において知られている(図6)(25-29)。すなわち、ひとたびアクセプター糖鎖にガラクトース残基が付加されると、このガラクトシル化された糖鎖に対し、GnT-IIIは反応できない。つまり、GnT-IIIと β 1,4-GalTは、同一の糖鎖を基質として競合する。したがって、上記の現象はこのような酵素の特性が反映されたものと考えられる。我々は、上記B細胞No.12株に β 1,4-GalT遺伝子を高発現させる実験も行い、 β 1,4-GalT活性の発現の程度が異なる細胞株を数種単離したが、この場合は、細胞内の β 1,4-GalT活性の増加と相反して、バイセクティングGlcNAcの付加が抑制されていた。このように、細胞内における両酵素活性の比を調節することにより、GnT-IIIと β 1,4-GalTの競合を利用してバイセクティングGlcNAcの付加を制御することができた。

しかし、このようなGnT-IIIと β 1,4-GalTの競合は *in vitro* のみ起こるというのが従来の認識である。ゴルジ体内において、糖転移酵素は、それらが作用する順に局在していることが知られているが、 β 1,4-GalTはトランスゴルジおよびトランスゴルジネットワークに存在し(30-34)、GnT-IIIはメディアルゴルジに存在するとされてきた(35,36)。すなわち、GnT-IIIと β 1,4-GalTは細胞内の存在場所が異なると考えられてきたのである。これ

Fig. 6. Reactions of GnT-III and $\beta 1,4$ -GalT.

in a strict manner in the Golgi complex, but are localized in overlapping distributions (32, 33, 37). $\beta 1,4$ -GalT and GnT-III will also have overlapping localizations.

Thus, competitive behavior among glycosyltransferases is an important factor (in addition to the individual function of each glycosyltransferase) in controlling sugar chain structure. $\beta 1,4$ -GalT is known to compete with many glycosyltransferases *in vitro*, but this behavior has not been examined *in vivo*. $\beta 1,4$ -GalT may also compete with GnT-IV and GnT-V in cells. We feel that $\beta 1,4$ -GalT should be evaluated as a factor in the regulation of sugar chain processing.

F. Concluding Remarks

In the present review, we demonstrated that sugar chain structures are controllable, to a significant extent, through regulation of the expression of glycosyltransferases. Sugar chains on glycoproteins now produced industrially are not strictly controlled in detail. Techniques like those described above will be useful for quality control of industrially produced glycoproteins, by reducing heterogeneity of sugar chains. Furthermore, functions of glycoproteins may be improved by using such techniques. The present study was performed according to an engineering approach. However, applying these techniques to glycobiology research will be useful for clarifying the relationship between structure and function of sugar chains.

The following are suggestions for future investigation into detailed control of sugar chains. In addition to transfer of monosaccharides by glycosyltransferases in the Golgi complex, biosynthesis of nucleotide-sugars and transport of these nucleotide-sugars into the Golgi complex are involved in sugar chain biosynthesis. Manipulation of overall biosynthetic machinery involved in attachment of individual monosaccharides to sugar

に対し、実際の細胞内でも GnT-III と $\beta 1,4$ -GalT の競合が起こるという事実は、我々の研究において明らかにされたものである。最近、ゴルジ体において、糖転移酵素は厳密に区画されて存在しているのではなく、ある程度、分布の重なりをもって存在することがわかってきた(32, 33, 37)。 $\beta 1,4$ -GalT と GnT-III も、厳密に分かれて存在しているのではなく、ある程度分布の重なりがあると推測される。

このように、糖鎖構造を制御する上で、糖転移酵素の単独の作用以外に、糖転移酵素どうしの拮抗作用も重要なファクターである。 $\beta 1,4$ -GalT は、*in vitro* において多くの他の糖転移酵素と競合することが知られているが、細胞内での検証は行われていない。 $\beta 1,4$ -GalT は GnT-IV や GnT-V とともに細胞内で競合する可能性があり、糖鎖修飾の制御因子の一つとして $\beta 1,4$ -GalT の機能を評価する必要があると推測される。

F. おわりに

本稿では糖転移酵素群の発現制御により、糖鎖構造をかなり有効に制御できることを示した。現在のところ、商業的に生産されている糖タンパク質糖鎖の構造は、必ずしも細部まで制御されているとは言えず、ここに示したような糖鎖構造を制御する技術は、糖鎖の不均一性を抑制する意味で工業的な品質管理に役立つものと考えられる。また、このような技術を利用することにより、糖タンパク質の機能を向上させることも期待できる。ここで述べた研究は、かなりエンジニアリング的なアプローチと言えるが、このような手法を糖鎖生物学の領域で用いれば、糖鎖の構造と機能の関係を明らかにすることにも役立つであろう。

さらに糖鎖構造を精細に制御するための今後の問題としては次のことが言える。元来、糖鎖の生合成には、ゴルジ体内における糖転移酵素による単糖の付加だけでなく、基質である糖クレオチドの合成、ゴルジ内への糖ヌクレオチド輸送なども含まれている。個々の単糖を糖鎖に結合させるまでの一連の道筋

chains is necessary for improvement of the level and efficiency of fine control of sugar chain structures.

Acknowledgments

We thank Dr. Makoto Takeuchi of Kirin Brewery Co., Ltd. for bovine GnT-IVa cDNA. We would also like to thank the following: Professor Naoyuki Taniguchi, of Osaka University Medical School, for rat GnT-III cDNA; Dr. Michiko N. Fukuda, of The Burnham Institute, for human β 1,4-GalT-I cDNA.

を全体的に整備する事が、より糖鎖構造制御の精度、効率を向上させるために必要であろう。

謝 辞

ウシGnT-IVa cDNAを提供していただきましたキリンビール株式会社の竹内誠博士に厚く御礼申し上げます。また、ラットGnT-III cDNAを提供していただきました大阪大学医学部の谷口直之教授、ヒト β 1,4-GalT-I cDNAを提供していただきましたThe Burnham Instituteの福田道子博士に深く感謝いたします。

References

- Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J., and Shohet, S.B. (1985) *J. Exp. Med.* **162**, 573–582
- Noguchi, A., Mukuria, C.J., Suzuki, E., and Naiki, M. (1995) *J. Biochem.* **117**, 59–62
- Takeuchi, M., Inoue, N., Thomas, W., Strickland, T.W., Kubota, M., Wada, M., Shimizu, R., Hoshi, S., Kozutsumi, H., Takasaki, S., and Kobata, A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7819–7822
- Yamashita, K., Tachibana, Y., Shichi, H., and Kobata, A. (1983) *J. Biochem.* **93**, 135–147
- Yamashita, K., Hitoi, A., Tateishi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., and Kobata, A. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* **225**, 993–996
- Parekh, R.B., Dwek, R.A., Thomas, J.R., Opdenakker, G., Rademacher, T.W., Wittwer, A.J., Howard, S.C., Nelson, R., Siegel, N.R., Jennings, M.G., Harakas, N.K., and Feder, J. (1989) *Biochemistry* **28**, 7644–7662
- Monica, T.J., Williams, S.B., Gooch, C.F., and Maiorella, B.L. (1995) *Glycobiology* **5**, 175–185
- Leibiger, H., Kersten, B., Albersheim, P., and Darvill, A. (1998) *Glycobiology* **8**, 497–507
- Field, M.C. and Wainwright, L.J. (1995) *Glycobiology* **5**, 463–472
- Fukuda, M., Bierhuizen, M.F.A., and Nakayama, J. (1996) *Glycobiology* **6**, 683–689
- O’oka, H., Chonan, E., Mizutani, K., Fukuda, T., Kuroiwa, Y., Ono, Y. and Shigeta, S. (1992) *Microbiol. Immunol.* **36**, 1305–1316
- Fukuta, K., Abe, R., Yokomatsu, T., Kono, N., Nagatomi, Y., Asanagi, M., Shimazaki, Y. and Makino, T. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 142–150
- Nishikawa, A., Ihara, Y., Hatakeyama, M., Kangawa, K., and Taniguchi, N. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18199–18204
- Shoreibah, M., Perng, G.S., Adler, B., Weinstein, J., Basu, R., Cupples, R., Wen, D., Browne, J.K., Buckhaults, P., Fregien, N., and Pierce, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15381–15385
- Saito, H., Nishikawa, A., Gu, J., Ihara, Y., Soejima, H., Wada, Y., Sekiya, C., Niikawa, N., and Taniguchi, N. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 318–327
- Minowa, M.T., Oguri, S., Yoshida, A., Hara, T., Iwamatsu, A., Ikenaga, H., and Takeuchi, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11556–11562
- Fukuta, K., Abe, R., Yokomatsu, T., Kono, N., Asanagi, M., Omae, F., Minowa, M.T., Takeuchi, M. and Makino, T. (2000) *Glycobiology* **10**, 421–430
- Sandrin, M.S., Fodor, W.L., Mouhtouris, E., Osman, N., Cohn, S., Rollins, S.A., Guilmette, E.R., Setter, E., Squinto, S.P., and McKenzie, I.F.C. (1995) *Nature Med.* **1**, 1261–1267
- Sharma, A., Okabe, J., Birch, P., McClellan, S.B., Martin, M.J., Platt, J.L., and Logan, J.S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7190–7195
- Tanemura, M., Miyagawa, S., Koyota, S., Koma, M., Matsuda, H., Tsuji, S., Shirakura, R., and Taniguchi, N. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 16421–16425
- Tanemura, M., Miyagawa, S., Ihara, Y., Mikata, S., Matsuda, H., Shirakura, R., and Taniguchi, N. (1997) *Transplant. Proc.* **29**, 891–892
- Tanemura, M., Miyagawa, S., Ihara, Y., Nishikawa, A., Suzuki, M., Yamamura, K., Matsuda, H., Shirakura, R., and Taniguchi, N. (1997) *Transplant. Proc.* **29**, 895–896
- Koma, M., Miyagawa, S., Honke, K., Ikeda, Y., Koyota, S., Miyoshi, S., Matsuda, H., Tsuji, S., Shirakura, R., and Taniguchi, N. (2000) *Glycobiology* **10**, 745–751
- Fukuta, K., Abe, R., Yokomatsu, T., Omae, F., Asanagi, M., and Makino, T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 23456–23461
- Schachter, H. (1986) *Biochem. Cell. Biol.* **64**, 163–181.
- Schachter, H., Narasimhan, S., Gleeson, P. and Vella, G. (1983) *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **61**, 1049–1066
- Schachter, H. (1991) *Glycobiology* **1**, 453–461
- Gleeson, P.A. and Schachter, H. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 6162–6173
- Fujii, S., Nishiura, T., Nishikawa, A., Miura, R., and Taniguchi, N. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6009–6018
- Roth, J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **906**, 405–436
- Berger, E.G., Mandel, T., and Schilt, U. (1981) *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 364–370
- Nilsson, T., Pyper, M., Hoe, M.H., Slusarewicz, P., Berger, E.G., and Warren, G. (1993) *J. Cell Biol.* **120**, 5–13
- Rabouille, C., Hui, N., Hunte, F., Kieckbusch, R., Berger, E.G., Warren, G., and Nilsson, T. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 1617–1627
- Roth, J. and Berger, E.G. (1982) *J. Cell Biol.* **92**, 223–229
- Ihara, Y., Senda, T., Nishikawa, A., Miyoshi, E., Yoshimura, M., Zhang, N.-Z. and Taniguchi, N. (1995) *Glycoconj. J.* **12**, 447
- Nagai, K., Ihara, Y., Wada, Y. and Taniguchi, N. (1997) *Glycobiology* **7**, 769–776
- Colley, K.J. (1997) *Glycobiology* **7**, 1–13

Received on March 1, 2001, accepted on June 10, 2001

Profile of the Authors

Kazuhiro Fukuta is a Chief Researcher in the Pharmaceuticals Group, Life Science Laboratory, Mitsui Chemicals, Inc. He graduated from the Faculty of Agriculture, Kyoto University, in 1989. He obtained his Master's degree from the Faculty of Agriculture, Kyoto University, in 1991. His current research focuses on application of glycotechnology to industry.

★★★★★★★★★

Mineko Asanagi is a Manager in the Pharmaceuticals Group, Life Science Laboratory, Mitsui Chemicals, Inc. She graduated from the Faculty of Chemistry, Tokyo Science University. She obtained a Ph.D. degree in Biochemistry from Chiba University School of Medicine in 1989. Her thesis was entitled, "Characterization and purification of thymidylate synthetase in the liver of the mouse bearing Ehrlich ascites tumor" (supervisor, Prof. Shinji Fujimura). She has worked on the NEDO project "Technologies for Production and Utilization of Complex Carbohydrates" since 1997. Her recent research has focused on the

biological function of *N*-glycans. She is now interested in the industrial production of useful glycoproteins through remodeling of *N*-glycan structures.

★★★★★★★★★

Tadashi Makino is a Senior Chief Researcher in the Pharmaceuticals Group, Life Science Laboratory, Mitsui Chemicals, Inc. He graduated from the Faculty of Engineering, Tokyo University. He obtained a Ph.D. degree in Synthetic Chemistry from Tokyo University in 1979. His current research focuses on interaction of glycosyltransferases.