Complex Formation of Glycosyltransferases and Their Biological Significance

糖転移酵素の複合体形成とその意義

Seko, Akira

Innovation Research Initiatives, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuda 4259, Midori-ku, Yokohama, 226-8503,
and CREST, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama, 332-0012, Japan

FAX: 81-45-921-4308, E-mail: aseko@bio.titech.ac.jp

Key Words: glycosyltransferase, sulfotransferase, complex, oligomer, heteromer

Abstract

Recently, it has become clear that glycosyltransferases (GTs) form complexes in various manners. Some GTs can associate by themselves to form homodimers or homo-oligomers, while other GTs can associate with non-GT proteins to form hetero-oligomers. The biological significance of the complex formation is diverse; activation or stabilization of catalytic activities, alteration of substrate specificities, economical biosynthesis of glycans, localization and transport in the ER or the Golgi apparatus, modification of catalytic activities via certain effector proteins, and so on. Here, I will review a number of studies on GT complexes.

要 約

近年糖転移酵素が種々の様式で複合体を形成することが判ってきた。ある種の糖転移酵素はホモダイマーやホモオリゴマーを形成し、またあるものは糖転移酵素以外のタンパク質と会合し、ヘテロオリゴマーを形成する。糖転移酵素が複合体を形成する生物学的意義として、酵素の触媒機能の安定化や活性化、基質特異性の変化、効率的な糖鎖の合成、細胞内オルガネラにおける局在性や輸送、他のエフェクタータンパク質による触媒機能の調節、などが挙げられる。このように糖転移酵素の複合体は機能的・構造的に多種多様であるが、本稿ではこれら種々の研究例について概観する。

A. Introduction

Glycosyltransferases (GT) catalyze the transfer of sugar residues from activated donor substrates to acceptor ones. Enzyme purification had been the main method at first to confirm whether GTs form complexes or not, but it was difficult to carry out. Since biosynthesis of glycans proceeds stepwise, it has long been believed that GTs responsible for sequential reactions can interact with each other. However, large parts of such interactions remained unclear, although a few forerunning studies had been performed. To date, the advance of analytical methods and genetic studies using microorganisms has helped reveal the complex formation of various GTs and to identify components of the complexes. Many up-to-date studies support that GTs are arranged more combinatorially in the ER and the Golgi apparatus to perform efficient biosynthesis than had been expected.

The reports on homo-complexes are listed in Table I and those on hetero-complexes are in Table II. Here I should note two points. First, where the molecular weight formed by gel filtration or density gradient centrifuge was over twice that of the monomer, I categorized these in Table I as homo-complexes. However, I cannot exclude the possibility of hetero-complexes. Second, it has been proved by immunoprecipitation or tag-affinity purification that some GTs associate with other ones or non-GT proteins. However, this doesn't necessarily mean their direct binding, because of

A. 序 論

糖転移酵素は、活性化された糖供与体から受容体基質へ糖分子を転移する反応を司る酵素である。以前は糖転移酵素が複合体を形成しているか否かについては、酵素の精製によって確かめる方法が主流で、その解析は困難であった。また糖鎖の生合成は各段階の糖転移酵素により逐次的に行なわれるため、連続する反応を担う酵素群が相互作用していることが推測されていた。実際2、3の先駆的研究によりそれが明らかとなっていたが、多くのケースについては謎のままであった。しかしながら近年様々な分析・分離技術が進歩し、また酵母などにおける変異株の単離・解析により種々の糖転移酵素が複合体を形成していることが明らかになった。そしてそれらの構成タンパク質の同定も進んでいる。最近の結果では糖転移酵素は想像以上にゴルジ体や小胞体においてコンビナトリアルに配置されており、効率良く糖鎖が生合成されていることを支持している。

まずはホモ複合体についての報告例を表Iに、ヘテロ複合体についての報告例を表IIにまとめた。ここで分類上注意していただきたいことがある。まず第一に、ゲルろ過や密度勾配遠心によってモノマーの分子量より二倍以上大きな見かけの分子量を示す分子群の存在が示された場合、表Iにホモ複合体として取り扱ったが、これらはヘテロ複合体の可能性を否定するわけではないことである。そして第二に、免疫沈澱やタグを使った精製法により、二種の糖転移酵素もしくは糖転移酵素と他の機能タンパク質とが会合していることが多く報告されている。しかしこれらは分析対象の二つのタンパク質

Table I. Homo-oligomerization of glycosyl- and sulfotransferases.

Enzymes	Complex form	Methods	Source	References
α 1,2-FucT (H type)	Oligomer	148 kDa (GF), 200 kDa (nrSP), 50 kDa (rSP)	Human serum	96
α 1,2-FucT (Se type)	Oligomer	150 kDa (GF), 50 kDa (rSP)	Human serum	97
Xyloglucan α 1,2-FucT	Oligomer	~250 kDa (GF), 63 kDa (rSP)	Pea microsomes	98
α 1,3/4-FucT	Dimer	98 kDa (GF), 44 kDa (SP)	Human milk	99
α 1,3/4-FucT (FUT3)	Dimer-oligomer	50-500 kDa (GF), 45 and 97 kDa (SP)	RC	95
α 1,3-FucT VI (FUT6)	Dimer	94 kDa (nrSP), 47 kDa (rSP)	RC	87
Galactan GalT (GGT)	Oligomer	212 kDa (GF), 48, 60, and 66 kDa (SP)	<i>Ajuga reptans</i> leaves	100
α 1,3-GalT	Oligomer	Void and 43 kDa (GF; G-100)	Calf thymus	101
Core 1 β 1,3-GalT	Dimer	84 and 86 kDa (nrSP), 42 and 43 kDa (rSP)	Rat liver	102
Xylose β 1,4-GalT (GalT I)	Oligomer	Void and retarded (GF; G-200)	Embryonic chick cartilage	103
β 1,4-GalT	Dimer	80 kDa (GF), 49 kDa (rSP)	Human serum	104
β 1,4-GalT	Oligomer	Void, 83 kDa, and 59 kDa (GF; G-100)	Calf thymus	101
β 1,4-GalT	Dimer	90 kDa, 43-46 kDa	Rat mammary gland	105
β 1,4-GalT	Dimer	97 $\pm$ 10 kDa (RI)	Rat liver Golgi	5
β 1,4-GalT	Oligomer	440 kDa (GF), 51 kDa (nrSP)	Rat liver membranes	106
β 4GalT-I	Oligomer	>100 kDa (CL), ~50 kDa (SP)	RC	107
β 4GalT-I	Dimer-oligomer	DGC, IP	RC	64
β 4GalT-I	Dimer	106 and 108 kDa (light-scattering analysis), 55 kDa (SP)	Human milk, RC	108
α 1,3-GalNAcT (blood group A synthesis)	Dimer	100 kDa (nrSP), 46 and 57 kDa (rSP)	Porcine submaxillary glands	109
α 1,3-GalNAcT (blood group A synthesis)	Dimer	90-100 kDa (GF), 52 kDa (rSP)	Human plasma	110
α 1,3-GalNAcT (blood group A synthesis)	Dimer	70-80 kDa (nrSP), 40 kDa (rSP)	Human lung	111
Globoside α 1,3-GalNAcT	Dimer	120 kDa (GF), 56 and 66 kDa (SP)	Canine spleen	112
β 1,4-GalNAcT (GM ₂ /GD ₂ synthase)	Dimer	70 and 120-160 kDa (nrSP), IP	RC	93
β 1,4-GalNAcT (GM ₂ /GD ₂ synthase)	Dimer	Specific fragmentation and mass spectrometry	RC	81
Cyanidin 3-O-GlcT	Dimer	60 and 125 kDa (GF)	Petals of red campion	113
Ecdysteroid GlcT	Oligomer	56 and 260 kDa (GF)	RC	114
Bilirubin GlcAT	Oligomer	28 and 160 kDa (GF)	Rat liver	115
<i>p</i> -nitrophenol/estrone GlcAT	Oligomer	230 kDa (RI)	Rabbit liver	6
Chenodeoxycholic acid/testosterone GlcAT	Oligomer	318 kDa (GF) 54 kDa (SP)	Rat liver	116
Various GlcATs	Oligomer	41.5-175 kDa (RI)	Rat liver microsomes	7
Various GlcATs	Oligomer	91-218 kDa (RI)	Microsomes	8
GlcAT (UGT1A1)	Dimer	DNE	Crigler-Najjar syndrome type II	14
GlcAT (UGT2B1)	Dimer	52 and 110 kDa (SP), complementary analysis, DNE	RC	18
GlcAT	Oligomer	Kinetic analysis	Rat liver	117
GlcAT (UGT1A1)	Dimer	CL, DNE, GF, two-hybrid	RC	17
GlcAT (UGT1A9)	Dimer	Tag-affinity purification	RC	118
β 1,3-GlcAT (HNK-1 synthesis)	Dimer	90 kDa (GF), 45 kDa (rSP)	Postnatal rat forebrain	119
β 1,3-GlcAT (GlcAT-I)	Dimer	Site-directed mutagenesis	RC	88
Peptide O-GlcNAcT (OGT)	Trimer	~360 kDa (GF)	RC	75
β 1,2-GlcNAcT-I (GnT-I)	Oligomer	DGC	RC	79
β 1,2-GlcNAcT-II (GnT-II)	Oligomer	Void (GF; G-200), 43 and 48 kDa (SP)	Rat liver	120
β 1,2-GlcNAcT-II (GnT-II)	Oligomer	DGC	RC	79
β 1,3-GlcNAcT (Fringe)	Dimer	DNE	Drosophila	15
β 1,6-GlcNAcT (GnT-V)	Oligomer	IP, nrSP	RC	91
GlcNAc-1-phosphotransferase	Dimer	CL, DNE	RC	19
Protein O-ManT-4 (Pmt4p)	Oligomer	CL, IP	RC	73
β 1,4-ManT (Alg1p)	Oligomer	DNE, GF, IP	RC	16
(ManGlcNAc ₂ -PP-Dol synthesis)				
α -GalNAc α 2,6-SiaT	Oligomer	55, 100, and ~160 kDa (rSP)	Porcine submaxillary glands	121
α 2,6-SiaT	Dimer	96 and 48 kDa (SP)	Rat hepatoma cells	122
α 2,6-SiaT	Dimer	130 $\pm$ 20 kDa (RI)	Rat liver Golgi	5

α 2,6-SiaT (ST6Gal-I)	Oligomer (STcys isoform) Dimer (STtyr isoform)	Detergent solubilization, SP	RC, rat liver Golgi	Sum. in 1
α 2,8-SiaT (ST8Sia-I, GD ₃ synthase)	Dimer	95 kDa (nrSP), 47 kDa (rSP)	RC	94
α 2,8-SiaT (ST8Sia-I, GD ₃ synthase)	Dimer	170 kDa (nrSP), 85 kDa (rSP)(GFP-fused)	RC	31
Stachyose synthase (GalT)	Oligomer	110 and 253 kDa (GF), 90 kDa (SP)	Adzuki bean	123
Heparan sulfate 2- <i>O</i> -SulT (HS2ST)	Oligomer	130 kDa (GF), 44 and 47 kDa (rSP)	CHO cells	124
Trehalose 2- <i>O</i> -SulT	Dimer	DGC	Mycobacterium tuberculosis	80
Chondroitin 6- <i>O</i> -SulT (C6ST)	Dimer	160 kDa (GF), 75 kDa (rSP)	Chick embryo chondrocytes	125
Chondroitin/keratan sulfate 6- <i>O</i> -SulT	Dimer	150 kDa (GF), 75 kDa (SP)	Chicken serum	126
Gal 6- <i>O</i> -SulT	Dimer	80-90 and 170 kDa (rSP)	Porcine lymph nodes	127
Gal 6- <i>O</i> -SulT	Oligomer	Void (GF; S-300), 80 kDa (rSP)	Porcine serum	128
GlcNAc 6- <i>O</i> -SulT (GlcNAc6ST-1)	Dimer	150-160 kDa (nrSP), 85-90 kDa (rSP)	RC	89
GlcNAc 6- <i>O</i> -SulT (GlcNAc6ST-4, GST5)	Dimer	50 and ~100 kDa (SP)	RC	129
Heparan sulfate 6- <i>O</i> -SulTs (HS6ST-1, -2, and -3)	Oligomer	30-60 and >200 kDa (GF)	RC	90

CL, analysis with cross-linking reagents; DGC, density-gradient centrifugation; DNE, dominant negative effect; FucT, fucosyltransferase; GalT, galactosyltransferase; GalNAcT, *N*-acetylgalactosaminyltransferase; GlcT, glucosyltransferase; GlcAT, glucuronosyltransferase; GlcNAcT, *N*-acetylglucosaminyltransferase; GF, gel filtration; IP, immunoprecipitation using with antibodies against enzymes or tag-peptides; ManT, mannosyltransferase; nrSP, SDS-PAGE in non-reducing condition; PP-Dol, dolichol diphosphate; RC, recombinant proteins with/without tag sequences; RI, radiation inactivation method; rSP, SDS-PAGE in reducing condition; SiaT, sialyltransferase; SP, SDS-PAGE; SulT, sulfotransferase.

Table II. Hetero-complex formation of glycosyl- and sulfotransferases with other transferases or non-transferase proteins.

Complex components	Methods	Sources	References
Chondroitin synthase (ChSy) and ChPF	AC	RC	30
Dol-P-Man synthase (DPM1, DPM2, and DPM3)	IP, tag-affinity purification	Human B-lymphoblastoid cells	Sum. in 130
EXT1 and EXT2 (heparan sulfate polymerization)	AC, IP	RC	25-27
Ceramide GalT and UDP-Gal transporter-1	DGC, IP	RC	58
GalT I and XylT	IP, affinity chromatography	Embryonic chick cartilage	50,51
GalT and GlcNAcT	Activation on liposomes	Porcine liver	37
Core 1 β 1,3-GalT and Cosmc	AC, co-purification	Rat liver	40
β 3Gal-TIV, β 4GalNAc-T1, and COP II complex (Sar1)	IP, FRET, Cytoplasmic tail-peptide affinity purification	RC	54,67
β 4GalT-I and α -lactalbumin	Co-purification	Mammary glands	43,44
β 4GalT-I and α -, β -tubulins	IP	RC	64
β 4GalT-I and G protein complex	Cytoplasmic tail-peptide affinity purification	Mouse sperm	65
β 4GalT-I and SSeCKS scaffolding protein	Two-hybrid, IP	RC	9
β 4Gal-TVI, ST3Gal-V, and ST8Sia-I	IP, FRET	RC	55
β 4GalNAc-T1 and ST8Sia-I	AC, IP, FRET	RC	31
Polypeptide GalNAc-T1 and Sec23p	Cytoplasmic tail-peptide affinity purification	HeLa cells	66
GlcCer synthase (heteromer?)	50, 70, 120kDa, and larger bands (CL, IP), 38 kDa (SP)	Rat liver Golgi	131
Glycoprotein GlcT (BiP, CaBP1, cyclophilin B, ERdj3, ERp72, GRP170, GRP94, SDF2-L1, and protein-disulfide isomerase)	CL, IP, immunoaffinity purification	Mouse lymphoma cells	24
GlcAT (UGT1s and UGT2B1)	CL, IP	Rat liver microsomes	132
GlcAT and COP I or Sec23p	Cytoplasmic tail-peptide affinity purification	HeLa cells	66
GlcAT (UGT2B21 and UGT2B22)	AC	RC	32
GlcAT (UGT1A4 and 1A9)	AC	RC	33
GlcATs (UGT1A1, 1A6, and 2B7) and cytochrome P450 3A4	IP	Human liver microsomes	47
GlcAT (UGT2B7) and cytochrome P450 3A4	Modification of the substrate specificity by co-expression, IP	Human liver microsomes, RC	46
β 1,4-GlcAT (KfiC), α 1,4-GlcNAcT (KfiA), and KfiB	Mutant analysis	<i>Escherichia coli</i> K5	56
GlcNAc-1-phosphotransferase (α ₂ β ₂ γ ₂ subunits)	540 kDa (GF), immunoaffinity purification, SP	Bovine mammary glands	2,3

Peptide <i>O</i> -GlcNAcT (OGT)(heteromer?)	340 kDa (GF), 110 and 78 kDa (SP; 2:1)	Rat liver cytosol	74
Peptide <i>O</i> -GlcNAcT (OGT) and mSin3A (a corepressor)	Two-hybrid, IP, in vitro binding assay	RC	76
Peptide <i>O</i> -GlcNAcT (OGT) and GRIF-1 (GABA _A receptor-associated protein) or its homolog, OIP106	IP, two-hybrid	RC	10,77
Peptide <i>O</i> -GlcNAcT (OGT) and Ser/Thr phosphatases (PP1 β and PP1 γ)	Affinity purification	Rat brain	78
Peptide <i>O</i> -GlcNAcT (OGT) and ataxin-10	IP, two-hybrid	RC	11
α -GlcNAcT (GPI-GnT) and Ras2	IP, inhibition of enzymatic activity	Yeast	69
α -GlcNAcT (GPI-GnT)(DPM2, GPI1, PIG-A, -C, -H, -P, and -Y)	IP, tag-affinity purification	Human B-lymphoblastoid cells	Sum. in 21
β 1,2-GlcNAcT-I (GnT-I) and mannosidase II	Relocation by microscopic analysis, DGC	RC	52,53
β 1,3-GlcNAcTs (β 3Gn-T2 and -8)	GF, activation by <i>in vitro</i> mixing	RC	38
β 1,4-GlcNAcT (Alg13p and Alg14p) (GlcNAc ₂ -PP-Dol synthesis)	IP, complementary analysis	RC	70
Mannan polymerase I (Mnn9p and Van1p)	IP, two-hybrid	RC	72,133, 134
Mannan polymerase II (Anp1p, Hoc1p, Mnn9p, Mnn10p, and Mnn11p)	IP, tag-affinity purification	RC, yeast	20,133, 134
Protein <i>O</i> -ManTs (Pmt1p and Pmt2p)	Immunoaffinity purification, AC	Yeast	34
Protein <i>O</i> -ManTs (Pmt1p and Pmt2p; Pmt3p and Pmt5p)(certain conditions, Pmt1p and Pmt3p; Pmt2p and Pmt5p)	IP	RC	73
Protein <i>O</i> -ManTs (POMT1 and POMT2)	AC	RC	35,36
α 1,4-ManT-I (GPI-MT-I)(PIG-M and -X)	IP	RC	42
β 1,4-ManT (Alg1p) and α 1,6-ManT (Alg2p) or α 1,2-ManT (Alg11p)	IP, DNE, GF	RC	16
Oligosaccharyltransferase (Ost1p, Ost2p, Ost3p, Ost4p, Ost5p, Ost6p, Stt3p, Wbp1p, and Swp1p)	CL, two-hybrid (split ubiquitin system)	Yeast	Sum. in 12
Oligosaccharyltransferase and translocon (Sec61p, Sbh1p, and Sss1p)	CL, two-hybrid	Yeast	Sum. in 22
Oligosaccharyltransferase (Ost1p subunit) and β 1,4-ManT (Alg1p)	CL	Yeast	63
Oligosaccharyltransferase (STT3-A/B, ribophorin I, ribophorin II, OST48, DAD I, Sec61 $\alpha\beta\gamma$, TRAP complex, DC2, and KCP2)	Blue-native PAGE, SP, LC-MS	Canine pancreatic microsomes	Sum. in 23
PolySiaT (KpsC, KpsD, KpsE, KpsF, KpsM, KpsS, KpsT, NeuA, NeuB, NeuC, NeuD, NeuE, NeuS, and Omp)		<i>Escherichia coli</i> K1	Sum. in 59-62
<i>tout-velu</i> (TTV) and <i>sister of tout-velu</i> (SOTV) (heparan sulfate polymerization)	AC, IP	RC	28,29
Uronosyl 2- <i>O</i> -SulT and uronosyl 5-epimerase	IP, relocation by microscopic analysis	RC	57

AC, enzymatic activation by simultaneous expression; CL, analysis with cross-linking reagents; DGC, density-gradient centrifugation; DNE, dominant negative effect; FRET, fluorescence resonance energy transfer; GalT, galactosyltransferase; GalNAcT, *N*-acetylgalactosaminyltransferase; GlcT, glucosyltransferase; GlcAT, glucuronosyltransferase; GlcNAcT, *N*-acetylglucosaminyltransferase; GF, gel filtration; IP, immunoprecipitation using with antibodies against enzymes or tag-peptides; ManT, mannosyltransferase; PP-Dol, dolichol diphosphate; RC, recombinant

a possibility that certain protein(s) mediate the interaction of those proteins.

At any rate, I would like to note according to several functional categories. The most important biological significance of complex formation is about the localization of GTs in the Golgi apparatus, so called 'kin recognition' model. This notion is closely connected with complex formation, but

が必ずしも直接結合していることを意味しない、という点である。なぜならば両者の会合を介在するタンパク質が存在する可能性があるからである。

ともかく幾つかの機能的カテゴリーに分類して話を進めたい。なお糖転移酵素の複合体形成の最も重要な生物学的意義の一つは、糖転移酵素のゴルジ局在に複合体形成が関与していることである。いわゆる kin recognition モデルと複合体形

I only address this briefly, so please refer to other papers (for example, ref 1).

B. Analytical Methods

The complex formation of GTs had been mainly suggested by enzyme purification. Evidence was brought from the detection of molecular forms bearing over twice greater molecular weights than those of monomers, by gel filtration, density gradient centrifugation, and SDS-PAGE in non-reducing condition. Subsets of those GTs form dimers or oligomers through disulfide bonds, because they behave as a monomer by SDS-PAGE in reducing condition. GlcNAc-1-phosphotransferase is one of the most elegant examples in which the occurrence of a complex has been proved by purification. This enzyme is involved in the biosynthesis of Man 6-phosphate residues, a signal targeting lysosome; by this enzyme, GlcNAc-1-phosphate is transferred to the specific Man residue in *N*-glycans and then Man-6-phosphate is exposed by the action of specific α -*N*-acetylglucosaminidase. Bao *et al.*, partially purified the enzyme from bovine mammary glands and prepared several monoclonal antibodies against the enzyme fractions(2). They succeeded in purifying the enzyme complex by using an affinity column conjugated with a monoclonal antibody which inhibited the enzymatic activity. The complex is made up of six subunits($\alpha_2\beta_2\gamma_2$). The α and γ subunits individually form homodimers through disulfide bonds, and two β subunits non-covalently participate in the complex. Recently, Kudo *et al.*, completed the determination of the amino acid sequences of the three subunits(3).

Radiation inactivation is also one of the effective methods to reveal complex formation. This method can evaluate molecular weights of protein complexes by measuring decreased enzymatic activities after application of various doses of radiation to samples(4). The advantage of this method is an ability to measure molecular weights even if target enzymes are in crude membrane fractions. Molecular weights of complexes of β 1,4-galactosyltransferase(β 4GalT)(5), UDP-glucuronosyltransferase(GlcAT)(6–8), or α 2,6-sialyltransferase(SiaT)(5) were determined by this method. However, since it becomes clear that several GTs can catalyze a common reaction, it is necessary to consider carefully whether a target enzyme reaction is attributed to a single enzyme.

The two-hybrid method is popular for analysis of *in vivo* protein-protein interaction. The method has been utilized not only to confirm the binding of two target proteins, but to search for novel GT-binding proteins. For example, unexpected interaction between β 4Gal-TI and SSeCKS scaffolding protein(9), and between peptide *O*-*N*-acetylglucosaminyltransferase(GlcNAcT) and GRIF-1, its homolog OIP106(10), or ataxin-10(11), was found by two-

成は密接な関係にあるが、この話題についてはごく簡単に触れるのみにとどめる。詳細については他の論文を参照された(例えば文献1)。

B. 分析方法

糖転移酵素複合体の存在は古くは転移酵素の精製によって明らかにされてきた。すなわちゲルろ過や密度勾配遠心、還元剤非存在下における SDS-PAGE などにおいてモノマーの分子量に対して二倍以上の分子量を持つ分子種が検出されるという結果から複合体の存在が示唆されてきた。このうち多くの例は SDS-PAGE において還元剤非存在下ではダイマーやオリゴマーであるが、還元剤存在下ではモノマーになることから複合体形成にジスルフィド結合が関与していることが考えられる。精製によって複合体の存在が証明された最もエレガントな例として GlcNAc-1-リン酸転移酵素がある。この酵素はリソソームへの輸送シグナルであるマンノース 6-リン酸の生合成に関わる酵素である。すなわち本酵素によって GlcNAc-1-リン酸が *N*-結合型糖鎖の特定のマンノース残基に転移され、その後に α -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの作用によってマンノース 6-リン酸が形成される。Bao らは本酵素をウシ乳腺より部分精製し、これを抗原として幾つかのモノクローナル抗体を作成した。このうち酵素活性を阻害する抗体を用いてアフィニティークラムを作成し、複合体の完全精製に成功した(2)。複合体は三種(α 、 β 、 γ)のサブユニットがそれぞれ二個ずつ結合したものであった。 α 、 γ はジスルフィド結合でそれぞれホモダイマーを形成し、 β は非共有結合で二分子結合していた。さらに近年 Kudo らによって全てのサブユニットのアミノ酸配列決定が完結した(3)。

Radiation inactivation も複合体の存在を証明する上で有力な手法である。この方法は様々なレベルの放射線をサンプルに照射した際の酵素活性の減少の割合を測定することで会合体の分子量を算出するものである(4)。この方法の長所は膜画分などから酵素を精製すること無しに分子量を測定できることにある。本法によって β 1,4-ガラクトース転移酵素(β 4GalT)(5)、UDP-グルクロン酸転移酵素(GlcAT)(UGT)(6–8)、および α 2,6-シアル酸転移酵素(SiaT)(5)の複合体の分子量がそれぞれ分析された。しかしながら近年同じ反応を触媒する転移酵素が複数存在することが多くの例で明らかになってきたため、膜画分の酵素活性が特定の酵素タンパク質のみに起因するか否かを慎重に判断する必要がある。

Two-hybrid 法はタンパク質間相互作用の解析において最も一般的な方法の一つである。本法は二つのタンパク質の結合を証明する補強データとして使われるほか、転移酵素と結合するタンパク質を広く検索する際にも有力である。例えば β 4GalT-I と SSeCKS scaffolding protein との結合(9)、ペプチド *O*-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(GlcNAcT)(OGT)と GRIF-1 およびそのホモログである OIP106(10)や ataxin10 との結合(11)(後述)など、予想を超えた会合体の存在の解明に

hybrid method. Moreover, split ubiquitin system, a kind of two-hybrid method, is also powerful. In this method, two recombinant target proteins are simultaneously expressed; one construct fused with the N-terminal domain of ubiquitin(Nub) at the N- or C-terminal of one target protein, and the other construct fused with the C-terminal domain of ubiquitin(Cub) and thereafter a reporter protein(transcriptional factors) at the C-terminal of the other target protein. Nub is mutated at Ile¹³ to Gly(NubG) or Ala(NubA) in order to decrease the affinity to Cub, so that NubG/A and Cub can form split ubiquitin only when they are located quite closely by the association of the two target proteins. If both NubG/A and Cub are oriented in the cytosol and the two target proteins are associated with each other, NubG/A and Cub can bind and be recognized by ubiquitin ligase, resulting in the release of the reporter protein and the appearance of its phenotype. This method takes advantage in analyses of the interaction and topology of membrane protein complexes, such as oligosaccharyltransferase(OT)(12).

Methods using fluorescent protein-fused constructs can serve analyses of *in vivo* and *in situ* interaction of proteins. In fluorescence resonance energy transfer(FRET) methods, each two target protein is fused with cyan fluorescent protein(CFP) or yellow fluorescent protein(YFP), alternatively green fluorescent protein(GFP) or red fluorescent protein(RFP), and the constructs are simultaneously expressed. If the target proteins can interact with each other, the fluorescent protein domains are located closely. When CFP(or GFP) is excited, the energy can be nonradiatively transferred to YFP(or RFP), which releases respective fluorescence. On the other hand, a fluorescent protein can be applied directly for a two-hybrid system. Nyfeler *et al.*, reported a method which can reveal the interaction of intracellular proteins using two complementary polypeptide fragments of yellow fluorescent protein(YFP)(13). Two target proteins are fused with different YFP fragments and then the constructs are simultaneously expressed. If the two target proteins bind to each other, fluorescence can be detected by complementary binding of the two YFP fragments. This method will be powerful for analysis of *in vivo* interaction of GTs.

The dominant negative effect should be considered when wild-type and inactive mutant enzymes are simultaneously expressed and the enzymatic activity is quite low as compared with the activity of wild-type alone. The effect is evidence of homo-complex formation because wild-type enzymes can be inactivated by binding to mutant enzymes. The effect has been found in a genetic disease(Crigler-Najjar syndrome, defect in UGT1A1)(14), a *Drosophila* mutant(fringe, defect in a β 1,3-GlcNAcT)(15), and cultured cells with simultaneous expression[Alg1p(16), Alg1p and Alg2p/Alg11p(16), UGT1A1(17), UGT2B1(18),

役立っている。また two-hybrid 法の変法として split ubiquitin system も有力である。この方法では標的タンパク質の N 端もしくは C 端にユビキチンの N 端側領域(Nub)を融合させ、もう一方の標的タンパク質の C 端側にユビキチンの C 端側領域(Cub)およびそれに続くレポータータンパク質(転写因子)を融合させたコンストラクトを作成し、共発現させる。この際、標的タンパク質同士が会合し、Nub と Cub が近接したときのみ結合出来るように、Nub の Ile¹³ を Gly (NubG)もしくは Ala (NubA)に置換し、Nub と Cub のアフィニティーを下げしておく。NubG/A、Cub 領域が共に細胞質側に表出し、かつ両標的タンパク質が会合体を形成した場合、NubG/A と Cub も結合し、これを認識するユビキチンリガーゼによってレポータータンパク質が切断・放出され、表現系が発現される。本法の利点は膜タンパク質に適応出来ること、および膜タンパク質のトポロジー解析が可能であることである。本法によって oligosaccharyltransferase (OT)の複合体解析および構成サブユニットのトポロジーが解析されている(12)。

蛍光タンパク質を融合させたりコンビナント体を用いた手法も *in vivo* および *in situ* でのタンパク質間相互作用の解析に有力である。蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET 法)では2つの標的タンパク質にそれぞれ青色蛍光タンパク質(CFP)および黄色蛍光タンパク質(YFP)、もしくは緑色蛍光タンパク質(GFP)および赤色蛍光タンパク質(RFP)を融合させたコンストラクトを作成し、共発現させる。両者がきわめて近接して存在する場合、CFP もしくは GFP を励起するとそのエネルギーが近傍の YFP もしくは RFP に移動し、最終的に後二者より蛍光が放出されることを利用した解析法である。さらに蛍光タンパク質を two-hybrid 様に応用した例として、最近 Nyfeler らは yellow fluorescent protein (YFP)由来の二つのポリペプチド断片を用いた細胞内タンパク質間相互作用の解析法を報告している(13)。解析対象の二つのタンパク質にそれぞれ異なる YFP 断片を融合させたりコンビナント体を共発現させる。二者が細胞内で会合すると YFP 断片も近接し、相補的に結合し蛍光を発するというエレガントな系である。細胞内における糖転移酵素間の結合解析に威力を発揮するかも知れない。

野生型と活性の無い変異型の二種の酵素タンパク質が共発現しているとき、野生型単独の発現に比べ酵素活性が大きく減少している場合、ドミナント・ネガティブ効果が考えられる。変異型と結合することで野生型の活性も消失しているという可能性が考えられるため、本効果は複合体形成の根拠とされている。遺伝病や変異体として見出された例としてはクリグラー - ナジャー症候群 [Crigler-Najjar syndrome, UDP-GlcAT 1A1(UGT1A1)の欠損] (14)やショウジョウバエの fringe (β 1,3-GlcNAcT の欠損) (15)があり、細胞における共発

and GlcNAc-1-phosphotransferase(19)](described later).

Various tag-proteins and tag-peptides have been exploited. When a tag-fused target enzyme is expressed in cells, complexes bearing the target enzyme can be easily purified by immunoprecipitation or tag-affinity resins, and components of purified complexes can be identified by mass spectrometry or Western blotting. Cross-linking reagents are often used in order to recover weak-binding components with high yield. The occurrence of multimer complexes such as mannan polymerase II(M-Pol II)(Summarized in 20), α 1,6-GlcNAcT(GPI-GnT)(Summarized in 21), and oligosaccharyltransferase(OT)-translocon supercomplex(Summarized in 22) have been shown by these methods. On the other hand, blue native-PAGE method is also valuable for isolation of large molecular weight complexes. This method was utilized for isolation and analysis of canine pancreas OT-translocon supercomplexes(23). α 1,3-glucosyltransferase(GlcT)-containing complexes, which are involved in quality control of new-born ER proteins, were isolated by unique methods(24). Mouse lymphoma Ag8(8) cells express the immunoglobulin(Ig) heavy chains, but not the light chains, and thus accumulate the heavy chains in the ER. The α 1,3-GlcT complexes binding to incompletely folded heavy chains were easily purified by protein A-Sepharose, without expression of any tag-fused protein(24).

C. Changes in Enzymatic Activities by Simultaneous Expression or *in Vitro* Mixing of Two GTs.

Recently the occurrence of many GT families has been clear, based on homology in amino acid sequences. The enzymatic activities of some GTs, however, could not be detected or were quite low even if the enzyme proteins were properly expressed in cultured cells as membrane-bound forms or soluble forms. One reason is that substrates used were not appropriate for enzyme assays, and another reason is that the enzymatic activities appeared only when forming a complex with other GTs or non-GT proteins. Examples are EXT1 and EXT2 in mammals(25–27), and TTV and SOTV in *Drosophila*(28,29), those responsible for elongation of backbone structure of heparan sulfate(4GlcA β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc α 1 $\rightarrow$)_n, chondroitin synthase(ChSy and ChPF) for elongation of backbone structure of chondroitin(4GlcA β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc β 1 $\rightarrow$)_n (30), ST8Sia-I(GD₃ synthase) and β 4GalNAc-T1(GM₂/GD₂ synthase) for biosynthesis of gangliosides(31), UDP-GlcATs for detoxication[UGT2B21 and UGT2B22(32), UGT1A4 and UGT1A9(33)], and protein O-mannosyltransferases(ManT)[Pmt1p and Pmt2p(34), POMT1 and POMT2(35,36)]. These enzymes had weak or no enzymatic activity in single expression, but simultaneous expression of the pair enzymes induced much greater activities. However, the elevated enzymatic activities were not observed when *in*

現で立証された例として Alg1p と Alg2p/Alg11p、Alg1p 単独(16)、UGT1A1(17)、UGT2B1(18)、GlcNAc-1-リン酸転移酵素(19)などがある(後述)。

これまでに様々なタグタンパク質やタグペプチドが開発されている。タグ付きタンパク質を細胞に発現させ、タグを目印にして免疫沈殿もしくはアフィニティークロマトグラフィーによって複合体を精製する。その後構成タンパク質を質量分析やウエスタンブロットで分析するという手法が複合体解析に広く用いられている。このとき複合体をより安定化して回収するため、タンパク質架橋剤がしばしば併用される。このような手法によりマンナンポリメラーゼ II (M-Pol-II) (20 に要約)、 α 1,6-GlcNAcT (GPI-GnT) (21 に要約)、oligosaccharyltransferase (22 に要約)などの高次複合体のサブユニットの解析がなされている。また複合体の精製法として、巨大分子の分離、精製に優れている blue native-PAGE 法も有力であり、これによってイヌ膵臓の oligosaccharyltransferase 複合体の単離・分析がなされている(23)。また特殊例としては、小胞体内の新生タンパク質の品質管理に関わる α 1,3-グルコース転移酵素(GlcT)複合体の精製がある。この例では、不完全な折りたたみ構造を持つイムノグロブリン重鎖を蓄積する細胞株を利用し、プロテイン A-Sepharose で Ig 重鎖-酵素複合体を精製するというユニークな方法がとられている(24)。

C. 二種の糖転移酵素の共発現もしくはインビトロ混合による酵素活性の変化

近年糖転移酵素の遺伝子群がアミノ酸配列の相同性をもとに数多く明らかにされてきた。しかしある種の酵素については、COS 細胞などに膜タンパク質として発現させたり、または分泌型として発現させた場合、タンパク質ができていてもかかわらず酵素活性が検出出来ない。この原因の一つは用いた基質が合っていないためと考えられるが、もう一つの可能性は他の糖転移酵素と複合体を形成することで初めて活性を発現出来るというものである。そのような例としてヘパラン硫酸の基本骨格糖鎖(4GlcA β 1-4GlcNAc α 1-)_nの伸長に関わる EXT1 および EXT2(哺乳類) (25–27)、TTV および SOTV (ショウジョウバエ) (28,29)、コンドロイチンの基本骨格糖鎖(4GlcA β 1-3GalNAc β 1-)_nの伸長に関わるコンドロイチンシンターゼ(ChSy および ChPF) (30)、ガングリオシドの生合成に関わる ST8Sia-I (GD₃ シンターゼ) および β 4GalNAc-T1 (GM₂/GD₂ シンターゼ) (31)、解毒作用の一つであるグルクロン酸抱合を担う UDP-GlcAT [UGT2B21 および UGT2B22(32)、UGT1A4 および UGT1A9(33)]、ポリペプチド鎖の O-マンノシル化に関わるプロテイン O-マンノース転移酵素(ManT) [Pmt1p および Pmt2p (34)、POMT1 および POMT2(35,36)] が

vitro mixing purified enzymes or crude membranes derived from individually transfected cells. This indicates that strict complex formation including disulfide bonds takes place.

On the other hand, it has been reported that *in vitro* mixing of two GTs enhances the catalytic activities. Ivatt reported that a GalT and a GlcNAcT which were purified from porcine liver as membrane-bound proteins, activated each other when concurrently reconstituted on liposomes(37). Although the grade of purification and enzymatic characters were not noted in the report, a possibility that efficient synthesis of Gal→GlcNAc→Man sequence is performed by interaction of GalT and GlcNAcT, is attractive with a view to substrate channeling. The author and Yamashita reported that a mixture at 1:1 ratio of soluble β 1,3-GlcNAcT-2(β 3Gn-T2) and β 3Gn-T8, which were produced by *Pichia pastoris*, bears several times higher enzymatic activity than the sum of the individual activities(38). β 3Gn-T2 and -T8 seem to form a heterodimer, from the result of gel filtration. The substrate specificities of both enzymes are similar. However, the mixture has more similar substrate specificity to β 3Gn-T8 than to β 3Gn-T2, suggesting the activation of β 3Gn-T8, which has much lower specific activity than β 3Gn-T2. Since the expression level of β 3Gn-T8 is significantly elevated in colon cancer(39), the enzyme may be involved in the elongation of poly-*N*-acetylglucosamine moieties in cancer cells. In contrast, a few reports showed that the enzymatic activities of the *in vitro* mixture of wild-type and inactive mutant type are quite a bit lower than that of wild-type alone. Dolichol phosphate GlcNAc-1-phosphotransferase(GPT) is an ER-resident enzyme and responsible for the first step of the biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides. Dan and Lehrman found the dominant negative effect of the enzyme *in vitro*, because the mixture of membrane fractions from wild-type-transfected cells and inactive, mutant-type-transfected cells had lower enzymatic activity than the membrane fractions from wild-type-transfected cells alone(19). Similar results were obtained in the case of UGT1A1, a UDP-GlcAT(17).

Some non-GT proteins can stabilize and/or activate specific GTs. Ju and Cummings showed that Cosmc, which was co-purified with core1 β 1,3-GalT(C1 β 3Gal-T1), strongly enhances C1 β 3Gal-T1 activity when simultaneously expressed(40). They speculated that Cosmc functions as a chaperon molecule to stabilize C1 β 3Gal-T1 protein. Moreover, they reported that Cosmc gene is mutated in patients with Tn syndrome, which is a genetic disease deficient in core 1 structure(41). Similar results were reported for α 1,4-ManT-I(GPI-MT-I), which is responsible for the attachment of the first Man in the biosynthesis of GPI-anchor glycans. Ashida *et al.*, showed that GPI-MT-I is composed of at least two proteins, PIG-M and PIG-X, which work as a catalytic subunit and its stabilizer, respectively(42).

ある。これらの例では、それぞれ単独で発現させた場合では活性が弱いもしくは検出できないのに対し、細胞内で共発現させると酵素活性が劇的に増大する。一方二つのタンパク質をそれぞれ単独で発現させて得られた精製タンパク質もしくは粗膜画分をインビトロで混合した場合、活性増大は見られない。このことからこれらの例ではタンパク質が生合成される際、ジスルフィド結合を含めた複雑な複合体形成が行われるものと考えられる。

対照的に、インビトロで2種の酵素タンパク質を混合することにより触媒活性が増大する例が報告されている。Ivattはブタ肝臓から膜タンパク質として精製したGalTとGlcNAcTをリポソーム上に再構成する実験により、2種の酵素の共存下で各々の触媒活性が増大することを見出した(37)。精製状態や酵素活性の性質についての記述が無いのが残念だが、Gal→GlcNAc→Manの連続する反応過程において両酵素が互いを活性化するという観点はsubstrate channelingの存在を連想させ、興味深い。また著者およびYamashitaらはメタノール産生菌(*Pichia pastoris*)を用いて可溶型の β 1,3-GlcNAcT-2(β 3Gn-T2)および-8(β 3Gn-T8)を調製し、両者を1:1で混合すると単独での合算値に比べ数倍酵素活性が増大することを明らかにした(38)。またゲル濾過の結果から両者はヘテロダイマーを形成すると推測される。両酵素の基質特異性は似ているが、混合物の特異性は β 3Gn-T2より-T8により近く、もともと比活性の低い β 3Gn-T8が活性化されている可能性が考えられるが詳細は明らかでない。大腸癌において β 3Gn-T8の発現量は顕著に増大するため(39)、 β 3Gn-T8は癌細胞におけるポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖の伸長に関与しているかも知れない。これとは逆に不活性な変異酵素と野生型酵素をインビトロで混合すると野生型の酵素活性が大きく減少する例が報告されている。ドリコールリン酸GlcNAc-1-リン酸転移酵素(GPT)は脂質中間体(Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol)の最初の生合成過程(GlcNAc-PP-Dolの合成)に預かる小胞体局在酵素である。DanおよびLehrmanは本酵素の野生型を発現させた細胞由来の膜画分と不活性な変異型を発現させた細胞由来の膜画分を混合すると酵素活性が減少し、ドミナント・ネガティブ効果がインビトロでも見られることを示した(19)。同様の効果がUDP-GlcATの一種、UGT1A1においても見い出されている(17)。

糖転移酵素ではないある種のタンパク質が特定の糖転移酵素の安定化/活性化に寄与することが知られている。JuおよびCummingsはコア1 β 1,3-GalT(C1 β 3Gal-T1)と共に精製されたタンパク質CosmcがC1 β 3Gal-T1と共発現させることによりその酵素タンパク質を安定化することを明らかにした(40)。CosmcはおそらくC1 β 3Gal-T1タンパク質の安定性を高めるシャペロン分子として機能していると考えられている。またCosmcはコア1構造を合成出来ないTn症候群の原因遺伝子であることが最近明らかにされた(41)。同様の結果がGPIアンカー糖鎖の第一Man残基の付加に預かる α 1,4-ManT-I(GPI-MT-I)において報告されている。AshidaらはGPI-MT-Iが少なくともPIG-M、PIG-Xという二つのタンパク質を含む複合体であり、前者が触媒サブユニットとして機能するのに対し、

Substrate specificities of GTs can be modified by other GTs or non-GT proteins. β 4Gal-TI and α -lactalbumin are one of the most dramatic and forerunning examples(43,44). It is well-known that β 4Gal-TI recognizes GlcNAc as a much better substrate than Glc, while on the other hand in the presence of α -lactalbumin, Glc is oppositely much better substrate for β 4Gal-TI. Crystal structure of β 4Gal-TI and α -lactalbumin complex has been revealed(45). On the other hand, some UDP-GlcATs(UGT) act on morphine, a representative analgesic, producing morphine-3-GlcA(M3G) and/or morphine-6-GlcA(M6G). The former has no analgesic activity, while the latter is active as well as free morphine and thus a pharmacologically important metabolite. UGT2B21 preferentially produces M3G, while UGT2B22 had little activity for morphine. However, simultaneous expression of UGT2B21 and UGT2B22 enhanced the production of M6G to an equal level to M3G(32). Similarly, M6G production via UGT2B7 was stimulated by co-expression with cytochrome P450(CYP) 3A4(46). CYP3A4 associates with other UGTs, at least UGT1A1 and 1A6(47), indicating that CYP3A4 may regulate some aspects of glucuronidation in the ER(described later). Further analysis for modification of substrate specificities of UGTs is expected.

D. Substrate Channeling

In certain metabolic pathway, two enzymes responsible for sequential reactions may form a complex. Substrate channeling is a notion that, after the first reaction finishes, a reaction product or an intermediate is brought to the catalytic region of the second enzyme without release into solvent(reviewed in 48,49). The mechanism takes advantage in economical biosynthesis because of exhaustive use of an intermediate. Since glycan biosynthesis is in a stepwise manner, one could speculate that substrate channeling occurs in certain GTs. To date, however, there is no report to clearly show the existence of the substrate channeling mechanism in the biosynthetic pathways of glycans. Therefore we will note about candidates of possible pathways and GTs. Indeed, complex formation of sequential enzymes has been reported.

Schwartz *et al.*, showed the interaction between xylosyltransferase(XylT) and β 1,4GalT(GalT-I), both of which are responsible for the early, sequential steps of glycosaminoglycan biosynthesis(50,51). XylT, but not GalT-I, bound to acceptor-conjugated affinity resin, while GalT-I bound to the resin to which XylT was pre-adsorbed. This result indicated the complex formation of sequentially acting GTs.

There are a few examples with respect to the biosynthetic pathway of *N*-linked glycans. Both GlcNAc-T-I(GnT-I) and α -mannosidase-II are localized in the *medial* Golgi and responsible for sequential steps in the processing of *N*-linked glycans. Nilsson *et al.*, showed elegantly that,

後者は PIG-M の発現を安定化する役割を担っていることを明らかにした(42)。

さらに二つの糖転移酵素の共発現もしくは糖転移酵素ではないある種のタンパク質と糖転移酵素の共発現(または混合)によって、糖転移酵素の基質特異性が変化する例が報告されている。 β 4Gal-TI と α -ラクトアルブミンは最も古く見いだされた複合体の例であり、かつ最も明かな相互作用をする例の一つである(43,44)。周知のように α -ラクトアルブミン非存在下では β 4Gal-TI は GlcNAc を良い受容体基質とし Glc にはほとんど作用しないが、 α -ラクトアルブミンと結合すると逆に Glc を良い基質とする。さらに β 4Gal-TI と α -ラクトアルブミンの結合は X 線結晶構造解析によっても明らかにされた(45)。またある種の UDP-GlcAT (UGT) は代表的な鎮痛剤であるモルヒネのグルクロン酸抱合を行うが、グルクロン酸の修飾型としてモルヒネ -3- グルクロン酸(M3G) とモルヒネ -6- グルクロン酸(M6G) が生成する。前者が鎮痛作用を示さない不活性型であるのに対し、後者は非修飾型同様活性型であり、薬理学的に重要な修飾化合物である。UGT2B21 は単独では M3G をより効率的に生成する。しかし単独では酵素活性の無い UGT2B22 と共発現させると M3G と M6G の両者が同程度に生成することが判った(32)。同様に UGT2B7 はチトローム P450 3A4 と共発現させると単独での発現の場合に比べ M6G 合成に特異性がシフトすることが示された(46)。チトローム P450 3A4 は UGT1A1、1A6 とも会合することが明らかとなっており(47)、小胞体におけるグルクロン酸抱合を調節する重要な役割を担っていることが考えられる(後述)。更なる特異性の解析が期待される。

D. Substrate Channeling

ある代謝経路において、連続する二つの反応を担う酵素同士が複合体を形成している例が知られている。第一の反応が終わった後、反応産物もしくは中間体が酵素タンパク質複合体を離れることなく次の反応の触媒領域へ手渡されるという分子機構が提唱されている(substrate channeling)(総説 48、49)。このような機構の長所として、中間基質が溶液中に分散することが無いため、より速やかで効率的な生合成を行い得る。糖鎖の生合成は逐次的に行われるため、substrate channeling が糖鎖生合成に関わる酵素群においても起こっている可能性が考えられる。しかしながら、現在のところ糖鎖生合成経路について substrate channeling の存在が明かに示された例は無い。よって本章ではその可能性のある経路・酵素について概観したい。実際、連続する反応に携わる酵素の複合体形成が幾例か報告されている。

Schwartz らはグリコサミノグリカン鎖の生合成の初期過程に預かるキシロース転移酵素(XylT)と続く β 1,4-GalT (GalT-I) が相互作用することを示した(50,51)。受容体基質を固定したアフィニティー樹脂に XylT は結合するが GalT-I は結合しない。しかし予め XylT を吸着させたアフィニティー樹脂には GalT-I は結合した。この結果から連続する反応を触媒する二

when one enzyme fused with an ER-retaining sequence was expressed, a subset of the other wild-type enzyme was also localized in the ER, suggesting the interaction between the two enzymes(52,53). These experiments provided a kin recognition model. This model is that Golgi-resident enzymes responsible for sequential 'kin' reactions form large molecular weight complexes, by which the enzymes are retained there(52,53).

Alg1p is a β 1,4-mannosyltransferase(ManT) acting on GlcNAc₂-PP-Dol. Gao *et al.*, reported the association between Alg1p and α 1,6-ManT(Alg2p) or α 1,2-ManT(Alg11p)(16). There are at least two hetero-complexes containing Alg1p; one further includes Alg2p and the other includes Alg11p. They also showed that Alg1p can form homo-oligomer, too. Although Alg1p and Alg11p are not involved in sequential reactions, they speculated that Alg1p serves to present Man-PP-Dol to Alg11p by binding to the dolichol moiety, otherwise to directly activate Alg11p activity.

Biosynthesis from GlcCer to GD₃ requires sequential reactions by β 1,4-GalT(β 4Gal-TVI), α 2,3-SiaT(ST3Gal-V), and α 2,8-SiaT(ST8Sia-I). Similarly, β 1,4-GalNAcT(β 4GalNAc-T1) and β 1,3-GalT(β 3Gal-TIV) are responsible for the biosynthesis from GM₃ to GM₁. Giraudo *et al.*, showed that there exist at least two complexes concerning ganglioside biosynthesis, one containing β 4Gal-TVI, ST3Gal-V, and ST8Sia-I, and the other containing β 4GalNAc-T1 and β 3Gal-TIV(54,55). In the complex of the former three enzymes, it was suggested that β 4Gal-TVI and ST8Sia-I are not directly associated with each other and that ST3Gal-V mediates the association of the both enzymes, in accordance with the biosynthetic sequence of GD₃. They also showed that their N-terminal regions including the cytoplasmic tail, transmembrane region, and stem region are sufficient for both the complex formations. In contrast, Bieberich *et al.*, showed the association of β 4GalNAc-T1 and ST8Sia-I. The two enzymes can enhance the enzymatic activities of each other, by simultaneous expression(31).

Hodson *et al.*, showed the association between β 1,4-GlcAT(KfiC) and α 1,4-GlcNAcT(KfiA), both of which cooperatively synthesize capsule polysaccharides(4GlcA β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc α 1 $\rightarrow$)_n in *E. coli* K5(56). The biosynthesis of this polymer differs from that of chondroitin or backbone glycans of heparan sulfate, since the latter were polymerized by hetero-complexes, each subunit of which contains two catalytic regions with different substrate specificities.

Pinhal *et al.*, showed the association between uronosyl 2-O-sulfotransferase(SuIT) and uronosyl 5-epimerase, both of which are responsible for modification of backbone glycans of heparan sulfate(57). When one enzyme was fused with an ER-retaining signal and the construct was expressed, the other wild-type was also retained in the ER. Since the enzymatic

つの酵素の複合体形成が示唆された。

N結合型糖鎖の生合成過程においても、連続する反応を担う酵素タンパク質同士が複合体を形成している例が示されている。 β 1,2-GlcNAcT-I (GnT-I)と α -マンノシダーゼ-IIは medial ゴルジに局在し、N結合型糖鎖のプロセッシング過程の連続する反応を担う酵素である。Nilsson らは片方のタンパク質に小胞体局在タグを融合させたりコンビナントを発現させると、もう一方の野生型タンパク質の局在性も小胞体に移行するという巧妙な実験によって複合体形成を明らかにした(52,53)。これは kin recognition モデルを支持する重要な知見となっている。kin recognition モデルとはゴルジ体に局在する酵素タンパク質が類縁反応を触媒するもの同士互いに大きな複合体を形成することによって局在性を維持するというものである(52,53)。

Alg1p は GlcNAc₂-PP-Dol に作用する β 1,4-ManT である。Gao らは Alg1p とその後の反応を担う α 1,6-ManT (Alg2p)、 α 1,2-ManT (Alg11p) との複合体形成を示している(16)。彼らは Alg1p を含む少なくとも二種類の複合体が存在し、一方はさらに Alg2p を含み、もう一方はさらに Alg11p を含むことを示した。また Alg1p が単独でホモオリゴマーを形成し得ることも明らかになった。ただ Alg1p と Alg11p については連続する反応を担っているわけではないが、Alg1p の役割として、オリゴ糖-PP-Dol のドリコール残基を認識し Alg11p へ受容体基質を提示する可能性もしくは Alg11p の活性化の可能性が推測されている。

グルコシルセラミドから GD₃ への生合成には β 1,4-GalT (β 4GalT-VI)、 α 2,3-SiaT (ST3Gal-V)、および α 2,8-SiaT (ST8Sia-I) による連続した反応が必要である。また GM₃ から GM₁ への生合成には β 1,4-GalNAcT (β 4GalNAc-T1) および β 1,3-GalT (β 3Gal-TIV) の作用が必要である。Giraudo らは細胞内で前三者および後二者がそれぞれ別個の会合体を形成していることを明らかにした(54,55)。なお前三者の会合体については β 4GalT-VI と ST8Sia-I は直接会合せず、ST3Gal-V を介して複合体を形成していることが示唆されている。また、これら会合体の形成には細胞質領域、膜貫通領域およびステム領域を含む N 端側領域が関わっているらしい。一方で、Bieberich らは β 4GalNAc-T1 と ST8Sia-I の会合体形成を示している。両者は共発現することにより互いの酵素活性を増大させ得ることが証明されている(前述)(31)。

また、Hodson らは大腸菌 K5 株の夾膜多糖(GlcA β 1-4GlcNAc α 1-4)_n の合成に関わる β 1,4-GlcAT (KfiC) と α 1,4-GlcNAcT (KfiA) が会合体を形成することを示した(56)。この例では二種の酵素タンパク質が交互に作用しポリマーを合成すると考えられるが、コンドロイチンやヘパラン硫酸の主鎖の生合成では一つの酵素タンパク質が二つの転移酵素領域を持っている点で異なっている。

Pinhal らはヘパラン硫酸主鎖の修飾に関わるウロノシル 2-O-硫酸転移酵素(SuIT)とウロノシル 5-エピメラーゼが会合していることを明らかにした(57)。両者はゴルジ局在酵素で

activity of the 5-epimerase was enhanced by simultaneous expression of uronosyl 2-*O*-SulT, the SulT could directly stabilize and/or activate the 5-epimerase.

Sugar-nucleotides, one of the substrates for GTs, are translocated from cytosol to the inner side of the ER or the Golgi apparatus by specific transporters. However, little is known whether transported sugar-nucleotides diffuse in the lumen and then they are captured by GTs, or they are passed by transporters to GTs directly. Sprong *et al.*, reported the association of ceramide GalT(GalT-I) and UDP-Gal transporter1(UGT1)(58). GalT-I is a type I membrane protein, arranging the catalytic domain in the luminal side of the ER and an ER-resident signal in the cytoplasmic region. Usually UGT1 resides in the Golgi apparatus, but when GalT-I was simultaneously expressed, a subset of UGT1 was shifted to locate in the ER, indicating the association of the two proteins.

Cytochrome P450(CYP) and UDP-GlcAT(UGT) are important for the detoxication system of cells. Toxics and chemical compounds invading or produced in cells are primarily oxidized by CYPs on the cytosolic face of the ER, and are driven outside of cells following glucuronidation via UGTs or sulfation. Since in rare cases, oxidatives produced by CYPs are toxic or carcinogenic, they should be immediately detoxified by UGTs or SulTs. From this viewpoint, the interaction between CYPs and UGTs has been tested, and in fact, CYP3A4 exhibits the association with several UGTs and can modify the substrate specificity of UGT2B7(46,47). However, since catalytic domains of UGTs is oriented to the luminal side of the ER, it would be a prerequisite that there exist certain transporter(s) to translocate oxidized intermediates across the ER membrane.

At any rate, to assess the existence of a substrate channeling system in the biosynthetic pathways of glycans, ultrastructural studies for GT complexes are indispensable. It is quite an attractive subject to assess how kin enzymes recognize their partners, and how catalytic regions of component enzymes are arranged in complexes. In addition, it should be clarified by *in vitro* enzymological studies whether intermediates are liberated from complexes after the earlier reaction or not, although these studies will be hard to solve because all target enzymes are membrane-integrated.

The occurrence of large machinery containing about a dozen subunits and involved in complicated biological processes has been reported. (i) With regard to polysialic acids, one of the capsular polysaccharides in *E. coli* K1 and K5 strains, large supercomplexes synthesize sialic acids and polymerize them on the inner face of cytoplasmic membrane, and further translocate the new-born polymers to outside across the inner and outer membranes(59–62). (ii) Meunier *et al.*, showed that α 1,3-GlcT which is involved in quality control for new-born proteins, is observed in complexes

あるが、一方に小胞体局在タグをつけて発現させるともう一方も小胞体局在に移行した。また5-エピメラーゼ活性はウロノシル 2-*O*-SulT の共発現によって増大することから、ウロノシル 2-*O*-SulT が5-エピメラーゼの安定化、活性化に寄与していることが示唆された。

糖転移酵素の基質である糖ヌクレオチドは特異的トランスポーターによって細胞質から小胞体またはゴルジ体内腔側へ輸送される。内腔側へ移行した糖ヌクレオチドは一度拡散した後に糖転移酵素に捕捉され利用されるのか、もしくはトランスポーターから糖転移酵素へ直ちに渡され利用されるのかは現在明らかでない。しかし Sprong らはセラミド GalT (GalT-1) と UDP-Gal トランスポーター 1 (UGT1) の会合を報告している(58)。GalT-1 は I 型膜タンパク質で小胞体内腔側に触媒領域を持ち、細胞質領域に小胞体局在シグナルを持っている。UGT1 はゴルジ体に局在するトランスポーターであるが GalT-1 と複合体を形成し、一部が小胞体へ留まることが示唆されている。

チトクローム P450 と UDP-GlcAT (UGT) は共に細胞の解毒機構において重要な酵素である。細胞内の外来性・内因性の毒物や薬物は小胞体の細胞質側に存在するチトクローム P450 によって酸化され、さらに UGT によるグルクロン酸抱合や SulT による硫酸抱合が施され細胞外へ排出される。チトクローム P450 によって生じた酸化物の中には癌原性など毒性の高い物質も存在し、次のグルクロン酸化が速やかに為されることが重要である。この視点からチトクローム P450 と UGT の相互作用が研究され、実際に複合体形成や前述のような基質特異性への影響が見い出された(46,47)。ただ UGT は小胞体の内腔側に触媒領域を持つため両者のみでは連続反応は考えにくく、さらに酸化物の膜透過に関わるトランスポーターの介在が推測される。

以上のように substrate channeling の存在を明らかにしていく上で今後必要なことはやはり複合体の立体構造解析に尽きるであろう。類縁タンパク質が互いをどのペプチド領域でどのように認識し結合するのか、そして複合体における触媒領域の位置関係はどのようになっているか興味深い課題である。また同時にインビトロでの酵素学的解析、すなわち中間体基質は第一の反応後複合体を離れるのか否かについて明らかにしなければならない。ただ相手が膜タンパク質であるだけに大変困難な課題である。

さらに、十数種のタンパク質から成り、より複雑な生物過程を担う巨大複合体の存在が示唆されている。(i) *E. coli* K1 株や K5 株の莢膜多糖の一種であるポリシアル酸の生合成であるが、まず細胞膜内面においてシアル酸自体の合成からシアル酸の重合までが一連の酵素の複合体によって行われ、生成したポリマーは内膜および外膜を併せ貫くポリシアル酸輸送複合体を通じて外膜外側へ輸送される。これら一連の合成、輸送システムの存在が示唆されている(59–62)。(ii) Meunier らは新生タンパク質の品質管理に関わる UDP-GlcT が、小胞体内腔の種々のシャペロンタンパク質から成る複合体に存在

of several chaperon proteins in the lumen of the ER(24). Interestingly, they noted that the complexes do not contain calnexin/calreticulin. (iii) Oligosaccharyltransferase(OT) is well-known to be made up of multiple subunits. Lennarz's laboratory has extensively clarified the association and topology of OT subunits by *in vitro* cross-linking experiments and *in vivo* split ubiquitin system(summarized in 12). They suggested that the results obtained from the former methods reflect the organization of OT complexes in a condition without nascent protein substrates, and those from the latter method reflect in a working condition with substrate-binding. It has been recently shown that OT complexes associate with translocon complexes, which are the machinery to translocate nascent polypeptides into the lumen of the ER(22,23). (iv) In addition, by using cross-linking reagents, Yan *et al.*, showed that Ost1p, a subunit of OT complexes in yeast, are located close to Alg1p(β 1,4-ManT)(63). They provided the possibility that lipid-linked oligosaccharides($\text{Glc}_3\cdot\text{Man}_9\cdot\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) may be synthesized in close proximity to OT complexes and immediately be passed to them.

E. Proteins Binding to the Cytoplasmic Tails of Golgi-Resident GTs

Golgi-resident GTs generally possess a short cytoplasmic tail. To assess the biological roles of the short peptides, it is important to search for proteins binding to them. Yamaguchi and Fukuda prepared chimera proteins, which contain the cytoplasmic tail, transmembrane region, and stem region of β 4Gal-TI, and replaced its catalytic domain with the extracellular domain of transferrin receptor or human chorionic gonadotropin α subunit. They showed that the chimera proteins associate with α - and β -tubulins(64). Since tubulins are cytosolic proteins, the cytoplasmic tail would be involved in the association. This result implied that the cytoskeletal system may control transporting and/or retaining of β 4Gal-TI to the Golgi. On the other hand, using a cytoplasmic tail-conjugated affinity column, Shur's laboratory showed that G protein complex binds to the peptide region of β 4Gal-TI(65). They proposed the possibility that when β 4Gal-TI on the cell surface of mouse sperm binds to egg coat protein ZP3 and forms aggregates itself, G protein complex attached to the cytoplasmic tail is then activated and transmits signals leading to acrosome reaction. Moreover, they identified SSeCKS(Src suppressed C kinase substrate) scaffolding protein as a binding protein to the cytoplasmic tail of β 4Gal-TI by two-hybrid method(9). The SSeCKS resides in perinuclear sites and the inner surface of cytoplasmic membrane, and is involved in the control of the cytoskeletal system. One attractive possibility is that the SSeCKS could serve to bring Golgi-resident β 4Gal-TI to the cell surface.

COP I- and COP II-coated vesicles are responsible for

することを示した(24)。興味深いことにこの複合体にはカルネキシン/カルレティキュリンは含まれていない。(iii) oligo-saccharyltransferase (OT)は最も良く研究されているタンパク質複合体の一つである。Lennarz のグループは、*in vitro* における架橋剤を用いた実験、および *in vivo* における split ubiquitin system を用いた実験により、OT のサブユニット間の会合およびトポロジーについて多くの知見を得た(12)。彼らは前者は新生タンパク質基質を持たない状態の高次構造を、そして後者は基質を結合した活動状態の高次構造を反映していると推測している。また、小胞体において新たに合成されたポリペプチド鎖を内腔側へ移すトランスロコン複合体と OT 複合体が会合していることが最近示された(22,23)。(iv) Yan らは架橋剤を用いた実験により、酵母の OT 複合体の構成サブユニットの一つ Ost1p が Alg1p (β 1,4-ManT) と近接していることを示した(63)。このことから脂質中間体($\text{Glc}_3\cdot\text{Man}_9\cdot\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$)の生合成が OT の近傍で行われ、オリゴ糖が効率良く新生タンパク質へ転移されるシステムの存在が推測されている。

E. 糖転移酵素の短い細胞質領域に結合するタンパク質

ゴルジ体に局在する糖転移酵素は通常細胞質側に短いペプチド部分を持っている。このペプチドの生理的意義を調べるには結合タンパク質を見つけることが肝要である。Yamaguchi および Fukuda は β 4Gal-TI の細胞質領域からステム領域までを持ち、触媒領域をトランスフェリンの細胞外領域もしくはヒト chorionic gonadotropin α サブユニットに置換したキメラタンパク質が α -, β - チューブリンと会合することを見出した(64)。チューブリンは細胞質タンパク質であることから、細胞質領域が結合に関与すると考えられる。このことは β 4Gal-TI のゴルジ体への移行、保持に細胞骨格が関わっていることを推測させる。一方 Shur のグループは β 4Gal-TI の細胞質領域ペプチドを結合させたアフィニティークラムを用い、G タンパク質複合体がその細胞質領域に結合することを明らかにした(65)。彼らはマウス精子表面に存在する β 4Gal-TI が卵子の被覆タンパク質 ZP3 に結合し会合体を形成すると、細胞質側に結合している G タンパク質複合体が活性化され、先体反応につながるシグナル伝達を行なうという仮説を提唱している。さらに彼らは two-hybrid 法により β 4Gal-TI の細胞質領域と結合するタンパク質をマウス精巣 cDNA ライブラリーから探し、SSeCKS (Src suppressed C kinase substrate) scaffolding タンパク質を同定した(9)。SSeCKS は細胞膜内面や perinuclear sites に局在するタンパク質で細胞骨格系の制御に関与している。SSeCKS は β 4Gal-TI をゴルジ体から細胞表面へ移行させることに関わっていることが推測されている。

小胞体とゴルジ体の間の小胞輸送には COP I および COP II 被覆小胞が関与する。前者はゴルジスタック間もしくはゴルジ体から小胞体への逆行輸送に関わり、後者は小胞体から

cargo transport between the ER and the Golgi. The former acts on retrograde transport between the Golgi stacks or from the Golgi to the ER, while the latter acts on anterograde transport from the ER to the Golgi. Both COP I and COP II consist of several proteins. COP II complex is composed of a G protein Sar1 and two heterodimers, Sec23p/Sec24p and Sec13p/Sec31p. Dominguez *et al.*, showed that the cytoplasmic tail of a UDP-GlcAT(UGT, ER-resident and type I membrane protein) associates with COP I complex and Sec23p, whereas that of polypeptide GalNAc-T1(Golgi-resident and type II membrane protein) associates only with Sec23p(66). The cytoplasmic tail of the UGT bears a KKXX motif, which is important for COP I to recognize type I membrane proteins. This can explain the ER-residence of the UGT. On the other hand, Giraudo and Maccioni reported that the cytoplasmic tails of β 4GalNAc-T1 and β 3Gal-TIV, enzymes responsible for GM₁ synthesis, exhibit the association with Sar1(67). They pointed out a dibasic motif in cytoplasmic tails, [RK](X)[RK], which is positioned closely proximal to transmembrane regions and present in almost all type II, Golgi-resident GTs. They showed that localization of the two enzymes is shifted from the Golgi to the ER by deletion of this motif, and that the cytoplasmic peptides lacking this motif fail to bind to Sar1. These results suggested that Golgi-resident GTs bearing the dibasic motif exit from the ER by binding to COP II complex.

As described above, cytoplasmic tail-binding proteins are involved in the transport of GTs, and with a view to GTs as a cell-surface receptor, the cytoplasmic tails work as an element to transmit extracellular glycan signals into cytoplasm.

F. Biological Roles of Other GT Complexes

To reveal functional differences between monomer and oligomer is an important approach for considering the biological significance of complex formation. Ma and Colley showed that α 2,6-SiaT(ST6Gal) prepared from rat and bovine liver exists as a monomer and dimer(68). Interestingly, when the two forms are partially separated by glycerol density-gradient centrifugation, little enzymatic activity is detected in dimer fractions. Both the monomer and dimer bind to galactose-Sepharose and asialofetuin-Sepharose, but the dimer fails to bind to CDP-hexanolamine-agarose, as not in the case of monomer. From these results, it was speculated that ST6Gal dimer, which has quite a lower affinity for CMP-Neu5Ac than the monomer, loses the catalytic activity and functions as a galactose-binding lectin.

GPI-GlcNAcT(GPI-GnT) complex catalyzes the addition of α 1,6-GlcNAc to phosphatidylinositol, which is the first step in the production of GPI-anchor(21). The reaction is performed on the cytosolic face of the ER. In mammals, GPI-GnT is composed of at least seven proteins(DPM2, GPI1, PIG-A, -C, -H, -P, and -Y), while in yeast, of at least

ゴルジ体への輸送に関わるとされている。COP IおよびCOP IIはそれぞれ複数のタンパク質からなる複合体である。このうちCOP II複合体はGタンパク質Sar1とSec23p/Sec24p、Sec13p/Sec31pの二種のヘテロダイマーから構成される。DominguezらはUDP-GlcAT(UGT, 小胞体局在、I型膜タンパク質)の細胞質領域ペプチドがCOP I複合体やSec23pと会合するのに対し、ポリペプチドGalNAc-T1(ゴルジ局在、II型膜タンパク質)の細胞質領域ペプチドはSec23pとのみ会合することを示した(66)。UGTの細胞質領域は、COP IがI型膜タンパク質を認識するためのKKXXモチーフを持っており、その小胞体局在が説明された。一方GiraudoおよびMaccioniはGM₁合成に関与する β 4GalNAc-T1と β 3Gal-TIVの細胞質領域がCOP II複合体の構成ユニットの一つSar1と結合することを示した(67)。彼らはII型膜タンパク質であるゴルジ局在糖転移酵素のほとんどが膜貫通領域近傍の細胞質領域にdibasic motif: [RK](X)[RK]を持っていることに着目し、このモチーフを欠失させると酵素の局在性がゴルジ体から小胞体へシフトすることを明らかにした。またこのモチーフを欠失させた細胞質領域ペプチドはSar1への結合能を失った。これらの結果から糖転移酵素は細胞質領域に存在するシグナルをもって小胞輸送に関与する細胞質タンパク質と結合し、小胞体もしくはゴルジ体への局在が保持されていることが示唆された。

以上のように細胞質領域結合タンパク質は糖転移酵素の局在性に深く関わっている例が多い。また糖転移酵素が受容体基質を認識・結合する細胞表面レセプターとして機能している場合、細胞質領域は外界からの糖鎖情報を細胞内に送るエレメントとして捉えられる。

F. その他の糖転移酵素複合体の意義

複合体形成の意義を考える上で、モノマーとオリゴマーの機能的相違を明らかにすることは大変重要なアプローチである。MaおよびColleyらはラットおよびウシ肝臓から調製した α 2,6SiaTはダイマーおよびモノマーとして存在することを示した(68)。興味深いことに両者をグリセロール密度勾配遠心で分画した際、モノマーには酵素活性が見られるがダイマーには活性がほとんど見られなかった。またモノマーおよびダイマーは共にガラクトース-Sepharoseやアシアロフェツイン-Sepharoseカラムに結合する。しかしCDP-ヘキサノールアミン-agaroseカラムに対しては、モノマーは結合するがダイマーは結合しなかった。以上の結果から α 2,6SiaTダイマーはCMP-Neu5Acへの結合能が減弱することで酵素活性を失い、細胞内でガラクトース結合レクチンとして機能していることが推測された。

ホスファチジルイノシトールへの α 1,6-GlcNAc付加はGPIアンカー生合成の最初の過程であるが、この反応はGPI-GlcNAcT(GPI-GnT)複合体によって触媒される(21)。本酵素は小胞体に存在し、反応は細胞質側で行われる。哺乳類では

five proteins(Gpi1p, Gpi2p, Gpi3p, Gpi15p, and Eri1p). Considering amino acid sequences, PIG-A and Gpi3p are deduced as catalytic subunits. Interestingly, Sobering *et al.*, showed that Eri1p and Gpi2p associate with constitutively active(GTP-bound) form of Ras2, and that the enzymatic activity of GPI-GnT is suppressed in the presence of the active Ras2(69). In contrast, Murakami *et al.*, showed that PIG-Y, putative ortholog of Eri1p in mammals, does not associate with H-ras, K-ras, R-ras, and Rap1, and that GPI-GnT activity is unaffected by excess expression of the Ras proteins(21). This discrepancy was explained to be the difference in necessity of GPI-anchor proteins, because in yeast, GPI-anchor proteins are essential for maintaining rigid cell wall, and their biosynthesis should be regulated strictly according to the growth of cells.

Gao *et al.*, reported that β 1,4-GlcNAcT, which acts on GlcNAc-PP-Dol, consists of at least two proteins, Alg13p and Alg14p(70). From the amino acid sequences, Alg13p is likely to bear catalytic activity, but curiously, this protein contains no transmembrane region. In contrast, Alg14p contains three potential transmembrane regions, but doesn't have any consensus motif for GTs. They showed that suppression of expression level of Alg14p causes relocation of Alg13p from the ER membrane to cytosol, suggesting that Alg14p anchors soluble Alg13p on the cytosolic surface of the ER. When searching for new GTs in various databases, one could encounter GT-like proteins having no transmembrane region. In these cases, it should be primarily considered whether the sequence data are devoid of N-terminal sequences probably including transmembrane regions, otherwise whether those soluble proteins associate with certain anchor components.

Mannan biosynthesis in *S. cerevisiae* starts in the Golgi apparatus from the addition of one α 1,6-Man to the α 1,3Man residue[$\rightarrow$ 2Man α 1 $\rightarrow$ 3(Man $_4$ $\rightarrow$ 6)Man β 1 $\rightarrow$ 4] in Man $_8$ -GlcNAc $_2$ glycans via α 1,6-ManT(Och1p)(71). Next, mannan polymerase I(M-Pol I) adds ~10 α 1,6-Man residues linearly to the α 1,6-Man introduced by Och1p, and thereafter mannan polymerase II(M-Pol II) synthesizes polymers of 50~100 α 1,6-Man residues. Finally, α 1,2-Man and α 1,3-Man residues are attached to the linear α 1,6-Man polymers as side chains. In contrast, in the cases of proteins destined not to bear mannan, α 1,6-Man elongation doesn't occur because of the alternative addition of α 1,2-Man and α 1,3-Man residues to the α 1,6-Man introduced by Och1p. Jungmann *et al.*, showed that M-Pol II is a large complex with molecular weight, >1,000 kDa, and composed of five kinds of proteins(Mnn9p, Mnn10p, Mnn11p, Anp1p, and Hoc1p)(Summarized in 20). All the five proteins contain DXD sequences as a GT motif, and among them, Mnn10p and Mnn11p may mainly contribute to the α 1,6-ManT activity of M-Pol II. Elongation of α 1,6-Man polymers is terminated by capping of α 1,2-Man

GPI-GnT は少なくとも 7 種類のタンパク質(DPM2, GPI1, PIG-A, -C, -H, -P, -Y)から成り、酵母では少なくとも 5 種類のタンパク質(Gpi1p, Gpi2p, Gpi3p, Gpi15p, Eri1p)から成る。アミノ酸配列の分析から触媒サブユニットはそれぞれ PIG-A および Gpi3p であると推測されている。興味深いことに Sobering らは酵母の GPI-GnT のサブユニット Eri1p および Gpi2p が活性型(GTP 結合型)Ras2 と会合すること、そして活性型 Ras2 存在下で GPI-GnT 活性が顕著に抑制されることを示した(69)。一方哺乳類における Eri1p のオーソログは hydropathy plot から PIG-Y であると考えられているが、Murakami らは PIG-Y が H-ras, K-ras, R-ras や Rap1 とは会合せず、また Ras の過剰発現によっても GPI-GnT 活性は減少しないことを示した(21)。この違いは生物種によって GPI アンカータンパク質の必要性の度合いが異なることに基づいていると考えられている。すなわち酵母では GPI アンカータンパク質は細胞壁を構成する必要かつ重要な成分であり、細胞の生育過程において厳密な生合成制御が必要とされるためと考えられる。

Gao らは GlcNAc-PP-Dol に作用する β 1,4-GlcNAcT が少なくとも Alg13p, Alg14p の二つのタンパク質の複合体であることを示した(70)。アミノ酸配列から Alg13p が触媒活性を持つと考えられるが、不思議なことに Alg13p は膜貫通領域を持たない。一方 Alg14p は膜貫通領域を 3 ヶ所持っているが触媒作用を示す配列を持っていない。Alg14p の発現を抑制すると Alg13p が細胞質へ移行することから、膜タンパク質 Alg14p は細胞質タンパク質 Alg13p を小胞体膜(細胞質側)上につなぎ止める役割を担っていると考えられた。我々はデータベースを検索している際時折膜貫通領域を持たない糖転移酵素らしきタンパク質に出くわすことがあるが、これらのデータ配列の 5' 側が欠けている(膜貫通領域の部分のデータが欠けている)可能性以外に、何らかの膜タンパク質と会合して複合体を形成し機能している可能性をも考える必要があろう。

S. cerevisiae のマンナンの生合成は、ゴルジ体において Man $_8$ GlcNAc $_2$ 糖鎖の α 1,3Man 残基 [$\rightarrow$ 2Man α 1 $\rightarrow$ 3(Man $_4$ $\rightarrow$ 6)Man β 1 $\rightarrow$ 4] へ α 1,6-ManT (Och1p) (71) がマンノースを一残基付加することで始まる。続いてこの Man 残基にマンナンポリメラーゼ I (M-Pol I) の作用で十個前後の α 1,6-Man が直鎖状に付加し、さらにマンナンポリメラーゼ II (M-Pol II) の作用で、50 ~ 100 残基の α 1,6 結合ポリマンノース鎖が伸長される。その後直鎖ポリマンノースへ側鎖として α 1,2-Man、 α 1,3-Man が付加し、マンナンが完成する。一方マンナンを持たざる運命のタンパク質では Och1p による α 1,6-Man 付加の後、 α 1,2-Man および α 1,3-Man が付加し、マンナンの伸長は起こらない。Jungmann らは M-Pol II が分子量 1,000 kDa 以上の巨大複合体であり、五種のタンパク質(Mnn9p, Mnn10p, Mnn11p, Anp1p, Hoc1p)から構成されていることを示した(20 に要約)。この五種のタンパク質はすべて DXD 配列を持ち、糖転移酵素である可能性を有しており、特に Mnn10p, Mnn11p が M-Pol II 複合体の α 1,6-ManT 活性に主に寄与しているらしい。マンナンの伸長は α 1,2-Man が非還元末端に付加することで停止するが、彼

residue. They speculated that other subunit(s) of M-Pol II is involved in the α 1,2-mannosylation. It's interesting that both elongation and termination are performed by single complex. On the other hand, Stolz and Munro showed that M-Pol I is a heterodimer of Mnn9p and Van1p. They also suggested that Mnn9p adds the second α 1,6-Man to the α 1,6-Man residue introduced by Och1p, and that thereafter Van1p polymerizes ~10 α 1,6-Man residues(72). Surprisingly, Mnn9p exhibits both α 1,2- and α 1,6-ManT activities *in vitro*. They speculated that Mnn9p can distinguish non-mannan proteins in some way and act as α 1,2-ManT to stop initiation of α 1,6-Man polymer synthesis. Although it should be confirmed whether single enzyme can introduce two distinct linkages, the possibility is very attractive that Mnn9p can recognize which substrate glycoproteins are destined to have mannan, and can introduce different linkages of Man, perhaps by certain conformational change.

Girrbach and Strahl revealed complex formation among the members of yeast protein *O*-ManT(Pmt) family(73). From amino acid sequence similarity, Pmt family is divided into Pmt1 subfamily(Pmt1p and Pmt5p), Pmt2 subfamily(Pmt2p, 3p, and 6p), and Pmt4 subfamily(Pmt4p). They showed that Pmt1p and Pmt5p make complexes with Pmt2p and Pmt3p, respectively, and that Pmt4p forms a homooligomer. Further, as minor constructs, Pmt1p and Pmt5p associate with Pmt3p and Pmt2p, respectively, indicating that hetero-complexes can be formed only between Pmt1 subfamily members and Pmt2 subfamily members. In wild-type yeast, protein *O*-ManT activity seems to be mainly attributed to Pmt1p-Pmt2p complex, and Pmt3p-Pmt5p complex serves complementally. However, precise substrate specificities of these complexes should be clarified, because of the possibility that these complexes could act on distinct Ser/Thr residues in clustered *O*-mannosylation sites.

O-GlcNAcT(OGT) introduces GlcNAc to Ser/Thr residues of various cytosolic and nuclear proteins. Hart's laboratory has purified OGT and identified it as 2:1 hetero-complex of 110 kDa and 78 kDa(74), and further showed that recombinant trimer of 110 kDa alone has enough enzymatic activity(75). OGT bears ~11 TPR sequences(tetratricopeptide repeats) in the N-terminal half and a catalytic region in the C-terminal. Kreppel and Hart showed that a construct lacking three TPRs from the N-terminal is enzymatically active and can form a trimer, while a construct lacking six TPRs is similarly active but fails to form any complex(Δ 6 monomer)(75). TPR is present in various proteins and involved in protein-protein interaction. In the case of OGT, TPR is required for the trimer formation. Next, they evaluated the kinetic parameters of trimer and Δ 6 monomer, and found that the reaction velocity of trimer is greater in a relatively high concentration of UDP-GlcNAc than that of

らは M-Pol II の他のサブユニットがこの α 1,2 付加に関わっている可能性を示唆している。すなわち伸長と停止を一複合体で行ない得る可能性を示唆しており興味深い。また Stolz および Munro によると M-Pol I は Mnn9p と Van1p のヘテロダイマーであり、Och1p による α 1,6-Man 付加の後、二番目の α 1,6-Man の付加に Mnn9p が、その後の約十残基の α 1,6-Man の伸長に Van1p が関与していると示唆されている(72)。興味深いことに、彼らは Mnn9p がインビトロで α 1,2- および α 1,6-ManT 活性を持つことを示し、一つの可能性としておそらくマンナンを持たないタンパク質に対しては Mnn9p の働きで α 1,2-Man が入り、 α 1,6-Man オリゴマー鎖の生合成が停止すると推測している。同一の酵素が α 1,2、 α 1,6 の異なる結合位置を導入できるかどうかさらに明らかにされなければならないが、基質タンパク質がマンナンを付加すべき標的か否かを Mnn9p が識別し、 α -Man の結合位置の使い分けを行っている可能性があり、大変興味深い。

Girrbach および Strahl らは酵母のタンパク質の *O*-マンノシル化に預かるプロテイン *O*-ManT (Pmt) ファミリーの複合体形成について調べている(73)。Pmt ファミリーはそのアミノ酸配列の類似性から Pmt1 サブファミリー (Pmt1p と Pmt5p)、Pmt2 サブファミリー (Pmt2p、3p および 6p)、Pmt4 サブファミリー (Pmt4p) に分類される。彼らは Pmt1p は Pmt2p と、Pmt3p は Pmt5p とそれぞれ会合体を形成し、Pmt4p はホモオリゴマーを形成することを示した。またマイナー成分として Pmt1p と Pmt3p、そして Pmt2p と Pmt5p の会合体の存在も示された。すなわち Pmt1 および Pmt2 サブファミリー間でのヘテロ複合体の形成のみが見られた。通常では Pmt1p-Pmt2p が主要な活性に預かり、Pmt3p-Pmt5p は補助的であるらしい。ただ *O*-マンノシル化はペプチド上にクラスターとして付加されやすく、これら複合体が *O*-マンノシル化の順序などで機能的に使い分けられている可能性も否定できない。詳しい特異性の解析が待たれる。

O-GlcNAc 転移酵素(OGT)は特定の細胞質および核タンパク質の Ser/Thr 残基に *O*-GlcNAc を付加する酵素である。Hart のグループによって OGT の精製品は 110 kDa と 78 kDa の 2:1 ヘテロ複合体であることが示されたが(74)、リコンビナント体では 110 kDa のトリマーで十分な酵素活性を示すことが判った(75)。OGT は N 端側に 34 アミノ酸からなる TPR 配列(tetratricopeptide repeats)の繰り返しを 11 個有しており C 端側に触媒領域を持っている。Kreppel および Hart は TPR のうち N 端から 3 個までを削除した変異体はトリマー形成能を保持しているが、6 個まで削除するとトリマー形成能を失い、モノマーになることを示した(Δ 6 モノマー)(75)。ただし両変異体とも酵素活性は保持されている。TPR 配列は様々なタンパク質に存在し、タンパク質間相互作用に関わるエレメントである。OGT においても TPR はトリマー形成に重要な役割を果たしていることが示された。次に彼らは野生型トリマーと Δ 6 モノマーの酵素学的解析を行い、比較的高濃度の UDP-GlcNAc に対する反応速度はトリマーの方が大きいことを明らかにし

$\Delta 6$ monomer(75). From these results, they speculated that expression levels of *O*-GlcNAc in substrate proteins could be affected by UDP-GlcNAc concentration or complex formation. Recently, OGT-associated proteins have been found, including mSin3A(76), GRIF-1 and its homolog OIP106(10,77), Ser/Thr phosphatases(PP1 β and PP1 γ)(78), and ataxin-10(11). Among them, at least mSin3A, GRIF-1, and OIP106 bind to the TPR region of OGT. Additionally, using two-hybrid methods, Iyer *et al.*, have found many candidates which can interact with OGT, indicating the occurrence of novel OGT-associated proteins(10). We don't address all the studies of OGT here, but these are medically valuable because complex formation of OGT with other proteins may be related to molecular mechanisms of Alzheimer's disease and diabetes.

G. Molecular Mechanisms Underlying Complex Formation

As GT complexes individually play distinct biological roles, molecular mechanisms underlying complex formation are diverse, too. First I will address the studies that catalytic domains are critical for the association. Several reports in Table I showed that a soluble form of GTs prepared from serum or cultured media can associate as dimers or oligomers, suggesting the involvement of catalytic regions and/or stem regions in complex formation. Opat *et al.*, showed that a recombinant soluble form of $\beta 1,2$ -GlcNAcT-I(GnT-I) associates with high molecular weight fractions, similarly indicating the involvement of the catalytic and/or stem regions(79). Mougous *et al.*, analyzed the crystal structure of a SulT acting on trehalose, and showed that the SulT forms dimer which arranges each trehalose-binding site in close proximity(80).

The existence of disulfide bonds in catalytic regions has been clearly shown in the case of GM₂ synthase. Li *et al.*, analyzed peptide fragments which were produced by several kinds of site-directed cleavages of GM₂ synthase dimer, and determined the positions of disulfide bonds(81). Consequently, there exist four disulfide bonds between two subunits; the Cys⁸⁰ and Cys⁸² of one subunit are linked with the Cys⁴¹² and Cys⁵²⁹ of the other. Therefore the dimer structure of this enzyme should be more stable than that of other GTs described below, which are bridged by disulfide bond(s) in the stem and/or transmembrane regions. The complex formation of GM₂ synthase should be essential for the enzymatic activity.

Colley's laboratory showed that there exist two types(STcys and STtyr) of $\alpha 2,6$ -SiaT-I, which bear Cys and Tyr at position 123, respectively, and that the former tends to form insoluble oligomers more than the latter(82). Since disulfide linkage at Cys¹²³ is not concerned with the oligomer formation, difference in the conformation of the catalytic domains is likely to influence their ability to form insoluble oligomers.

UDP-GlcATs(UGT) serving intracellular detoxication

た(75)。この結果は細胞内の UDP-GlcNAc 濃度および OGT の会合状況によって細胞内タンパク質の *O*-GlcNAc 化のレベルが変化する可能性を示唆している。最近、OGT と会合するタンパク質が見つかった。例えば mSin3A (76)、GRIF-1 とそのホモログである OIP106(10,77)、Ser/Thr ホスファターゼ (PP1 β , PP1 γ) (78)、ataxin-10(11) などがある。これらのうち mSin3A、GRIF-1、OIP106 は OGT の TPR 領域と結合することが明らかになっている。また Iyer らは two-hybrid 法により OGT と結合するクローンを多数見出し、OGT と結合するタンパク質の種類は今後さらに増えると思われる(10)。OGT の研究領域は広いのでここでは詳しく触れないが、これらの複合体形成はアルツハイマー病や糖尿病との関連性が示唆されており、医学的見地からも大変興味深い。

G. 複合体形成の分子機構

複合体がそれぞれのケースで異なった役割を示すように、会合の分子機構も多様である。まずは触媒領域が会合に関わる例について述べたい。表 I に示したいいくつかの例は可溶性酵素がダイマーもしくはオリゴマーとして存在することを示しており、複合体形成に触媒領域やステム領域が重要であることを示唆している。Opat らは可溶性 GnT-I を発現させた際、これが高分子画分に会合していることを示し、その触媒領域もしくはステム領域が複合体形成に重要であることを示した(79)。また Mougous らはトレハロースの硫酸化に関わる硫酸転移酵素の X 線結晶解析を行い、二つの触媒領域がトレハロース結合サイトを近接させる形で結合していることを示した(80)。

触媒領域におけるジスルフィド結合の存在は GM₂ シンターゼの例で明かに示されている。Li らは GM₂ シンターゼのダイマーに対し、種々の限定分解を施してその産物の分析を行い、ジスルフィド結合の位置を同定した(81)。その結果、一方のサブユニットの Cys⁸⁰、Cys⁸² は他方のサブユニットの Cys⁴¹²、Cys⁵²⁹ とジスルフィド結合を形成し、合計 4 本のジスルフィド結合がサブユニット間に存在していることを示した。この酵素は後で述べるステム領域や膜貫通領域の Cys のジスルフィド架橋を持つ酵素群と比べより強固で安定なダイマー構造をとっており、酵素活性にダイマー構造が必須であることを示唆している。

Colley のグループは $\alpha 2,6$ -SiaT I には触媒領域内の 123 番目のアミノ酸残基が異なる二つの型(STcys と STtyr)が存在することを明らかにしているが、前者の方が後者より不溶性オリゴマーを形成しやすいことを示した(82)。なお、この形成には Cys¹²³ 同士のジスルフィド結合は関与しないことから、触媒領域のコンホメーションの違いが不溶性オリゴマー形成能に関わっていると考えられる。

細胞内の解毒反応に関与する UDP-GlcAT (UGT) は小胞体に局在する I 型膜タンパク質であり、N 端側から触媒領域(小胞体内腔側)、膜貫通領域、短い細胞質領域からなる。触

are ER-resident, type I membrane proteins, and are made up of the catalytic domain in the luminal side of the ER, transmembrane region, and short cytoplasmic tail. The catalytic domains are divided into two regions; highly conserved (UGT2 family) or common (UGT1 family) C-terminal region and less conserved N-terminal region. It has been believed that the former recognizes UDP-GlcA, while the latter recognizes acceptor substrates. Meech and Mackenzie showed that the N-terminal region of UGT2B1 is essential for the dimer formation (18). Similarly, Ghosh *et al.*, showed the importance of the N-terminal region for dimerization of UGT1A1 (17). UGT1A1 is a cause gene for Crigler-Najjar syndrome which exhibits complete or partial deficiency in hepatic glucuronidation, resulting in hyperbilirubinemia. It has been shown that mutant UGT1A1 has a dominant negative effect (14,17).

In some cases, Cys residue(s) in transmembrane regions is critical to forming dimers. Yamaguchi and Fukuda showed that both Cys²⁹ and His³² residues in the transmembrane region of β 4Gal-TI are required for the dimer formation, because the point mutant at the two residues failed to form a dimer (64). Aoki *et al.*, showed that the two residues are important for the Golgi retention of β 4Gal-TI (83). They noted that if the transmembrane domain forms α -helix structure, Cys²⁹ and His³² are likely to be located on one side, so that β 4Gal-TI forms a dimer by disulfide linkage and hydrophilic interaction of these residues. Besides GTs, it has been shown that the first transmembrane domain of M glycoprotein of avian coronavirus bears at least four hydrophilic amino acid residues (Asn⁴⁶⁵, Thr⁴⁶⁹, Thr⁴⁷⁶, and Gln⁴⁸⁰) responsible for the Golgi retention of M glycoprotein (84,85). Among them, at least Gln⁴⁸⁰ was shown to be involved in the oligomer formation of M glycoprotein. If the transmembrane domain forms α -helix structure, the four residues seem to be clustered on one side. Considering these results and the fact that many GTs bear Cys residue(s) (described later) and hydrophilic residue(s) in the transmembrane domains, it should be studied further whether these residues mediate oligomer formation of GTs.

As described above, STtyr, possesses lower ability to form insoluble oligomers, but at least it can form a dimer. Qian *et al.*, showed the requirement of transmembrane Cys residue for dimer formation of STtyr (86). With regard to α 1,3-fucosyltransferase-VI (FUT6), Borsig *et al.*, showed that the full length, membrane-bound form can dimerize via disulfide bond(s), while the soluble form behaves as a monomer (87). This indicated that FUT6 can form a dimer via Cys residue(s) present in the cytoplasmic tail and/or the transmembrane region. In addition, many GTs bear Cys residue(s) in the transmembrane and/or cytoplasmic regions. Table III shows the presence of Cys residues in these regions of various glycosyl/sulfotransferases. Among 47 transferases surveyed,

膜領域はさらに相同性の極めて高い (UGT2 群) もしくは共通の (UGT1 群) C 端側領域とやや相同性の低い N 端側領域に分けられる。前者は UDP-GlcA の認識に、後者はアクセプター基質の認識に関わると考えられている。Meech および Mackenzie は UGT2B1 のダイマー形成に関わる領域を調べ、アクセプター認識に関わるとされる N 端側領域が重要であることを示した (18)。また Ghosh らも同様に UGT1A1 のダイマー形成に N 端側領域が関与していることを明らかにした (17)。なお UGT1A1 はグルクロン酸抱合欠如のため高ビリルビン血症を呈する遺伝病であるクリグラー-ナジャー (Crigler-Najjar) 症候群の原因遺伝子であり、変異型 UGT1A1 はドミナントネガティブ効果を示すことが知られている (14,17)。

一方膜貫通領域内の Cys 残基がダイマー形成に重要であることが報告されている。Yamaguchi および Fukuda は β 4Gal-TI のダイマー形成に関わるアミノ酸残基について調べ、膜貫通領域内の Cys²⁹ および His³² 残基の変異型がダイマーを形成しないことから、両残基がダイマー形成に重要であることを示した (64)。また Aoki らはこの二つの残基は同時に β 4Gal-TI のゴルジ体局在に重要であることを示している (83)。彼らは膜貫通領域が α -ヘリックス構造をとる場合、Cys²⁹ および His³² 残基が同じ側面に向く可能性を指摘しており、膜貫通領域内の親水性残基同士が会合することにより (ジスルフィド結合を含めて)、ダイマーが形成されることが推測される。なお、糖転移酵素ではないが、avian coronavirus の M glycoprotein の第一膜貫通領域に存在する少なくとも 4 つの親水性アミノ酸 (Asn⁴⁶⁵, Thr⁴⁶⁹, Thr⁴⁷⁶, Gln⁴⁸⁰) がゴルジ局在に重要であり、この領域が α -ヘリックス構造をとる場合、同一側面にこれらの残基が並ぶことが指摘されている (84,85)。また少なくとも Gln⁴⁸⁰ が M glycoprotein のオリゴマー形成に重要であることが示された。糖転移酵素の膜貫通領域にはしばしば Cys 残基や親水性残基が見られるが、これらの残基と複合体形成の関係についてはさらに詳しく調べる必要があると思われる。

また、上記の STtyr は不溶性オリゴマーの形成能は低いですが、ダイマー形成能を持つ。Qian らは同じく膜貫通領域内の Cys 残基が STtyr のダイマー形成に重要であることを示した (86)。さらに、直接的な証拠は無いが、Borsig らによると α 1,3-フコース転移酵素 VI (FUT6) は細胞内でジスルフィド結合によるダイマーを構成し得るが、可溶型を発現させるとモノマーのみ生成されることから、細胞質領域もしくは膜貫通領域の Cys がダイマー形成に関わっていることが考えられた (87)。ちなみに膜貫通領域や細胞質領域に Cys 残基を持つ糖転移酵素は以外と存在する。表 III にいくつかの糖/硫酸転移酵素群の細胞質領域および膜貫通領域に存在する Cys 残基

Table III. Occurrence of Cys residues in the cytoplasmic tails (CT) and transmembrane regions (TM) of members of several glyco/sulfotransferase families (human).

Glyco/sulfotransferases	CT	TM
FUT1~9	3, 5, 6(2)	1(2), 3, 4(3), 5, 6, 9(3)
β 3Gal-T1~T6	1, 2(2)	1, 5(2), 6
β 4Gal-TI~TVII	I, II, III, VI, VII	I, II, IV, VII
GnT-I~V	None	II, III(2), IVb(2)
β 3Gn-T2~T8	4, 6, 8(2)	4(2), 5, 6, 7, 8
ST3Gal-I~V	II, IV, V	III
GlcNAc6ST1~5, Gal6ST, C6ST1	4, Gal6ST, C6ST1	1, 3

Arabic and roman numerals indicate individual members of these families.

Parentheses indicate the presence of two or three Cys residues.

19 enzymes(40 %) have Cys in the cytoplasmic tails and 24 enzymes(51 %) in the transmembrane regions. Some enzymes contain a few Cys residues in one region. It should be noted that many Cys residues in cytoplasmic tails are positioned near the boundary to transmembrane regions. Little is known of whether these Cys residues participate in disulfide bonds or not, but some of them might serve complex formation.

Several studies support the involvement of stem regions. Nilsson *et al.*, showed that part of the stem region of β 1,2-GlcNAcT-I(GnT-I) is essential for the association with α -mannosidase-II, and that especially Asp⁷⁷, Arg⁸³, and Arg⁸⁵ charged residues in the stem region are indispensable(53). Ouzzine *et al.*, showed that Cys³³ present in the stem of a β 1,3-GlcAT(GlcAT-I) is involved in the dimer formation(88). GlcAT-I acts on the early step of glycosaminoglycan biosynthesis. A mutant enzyme in which Cys³³ is converted to Ala, fails to dimerize, and its Km value is 2~3 times greater than that of wild-type dimer. This result indicated the enhancement of the catalytic ability by dimerization. de Graffenried and Bertozzi showed that Cys³⁹ present in the stem of GlcNAc 6-O-SulT-1(GlcNAc6ST-1) is involved in the dimer formation(89). Additionally, there exists one more Cys¹² in the transmembrane region of this enzyme, which also contributes to the dimerization. Nagai *et al.*, showed that three heparan sulfate 6-O-SulTs cannot form oligomers when lacking the stem regions(90). Sasai *et al.*, showed that β 1,6-GlcNAcT-V(GnT-V) fails to form oligomers when lacking the stem region(Met⁴⁵-Ser¹⁸⁴)(91). This oligomerization seems to be mediated by both a hydrophobic amino acid cluster in the stem region and disulfide linkage(s). Part of the stem region can form α -helix structure, which assembles hydrophobic amino acid residues on one side(Leu⁸⁶-Val¹⁰⁸). This hydrophobic cluster could promote the oligomerization. On the other hand, Weinstein *et al.*, showed that a mutated GnT-V, which replaces Leu¹⁸⁸ with Arg, exhibits similar levels of stability and enzymatic activity with the wild-type enzyme, but it is retained in the ER(92). Since there exists a cluster of several hydrophobic amino acids near Leu¹⁸⁸(Phe¹⁸⁴-Leu¹⁸⁸), they noted the possibility that aberrant retention of the mutated GnT-V in the ER is caused by conformational change

数についてまとめた。調べた 47 種の酵素のうち細胞質領域に Cys 残基を持つものは 19 種(40%)、膜貫通領域に持つものは 24 種(51%)であった。同じ領域に Cys を 2 残基以上持つものも存在する。また細胞質領域に存在する Cys 残基の特徴として膜結合領域のすぐ近傍に位置する例が多い。これらの Cys 残基の架橋の有無についてはほとんどの例で不明であるが、何らかのかたちで複合体形成に関与していることが推測される。

ステム領域の重要性もいくつかの例で示されている。Nilsson らは β 1,2-GlcNAcT-I (GnT-I)のステム領域の一部が α -マンノシダーゼ II との複合体形成に必要であることを示した(53)。この領域のうち特に Asp⁷⁷、Arg⁸³、Arg⁸⁵ といった電荷を持つ残基の重要性が示唆された。Ouzzine らはグリコサミノグリカンの生合成初期に関わる β 1,3-GlcAT (GlcAT-I)のダイマー形成にステム領域の Cys³³ が関与していることを示した(88)。興味深いことに Cys $\rightarrow$ Ala とした変異型(モノマー型)は酵素活性を有するが、野生型(ダイマー)に比べ Km が 2 ~ 3 倍大きくなっており、ダイマー化による触媒機能の増大が示唆された。また、de Graffenried および Bertozzi は GlcNAc 6-O-SulT-1(GlcNAc6ST-1)のダイマー形成にステム領域の Cys³⁹ が重要であることを示した(89)。膜貫通領域にも Cys¹² が存在するがこれもダイマー化に寄与していた。また Nagai らは三種のヘパラン硫酸 6-O-SulT はいずれもオリゴマー形成能を持つが、ステム領域の削除により形成能を失うことを示した(90)。Sasai らは β 1,6-GlcNAcT-V (GnT-V)のオリゴマー化機構について調べ、Met⁴⁵-Ser¹⁸⁴ のステム領域を欠損させるとオリゴマーを形成しないことを示した(91)。このオリゴマー化にはジスルフィド結合に加えステム領域に存在する疎水性アミノ酸が関与するらしい。ステム領域の一部は α -ヘリックス形成能を有するが、ある側面に疎水性アミノ酸が集中することから(Leu⁸⁶-Val¹⁰⁸)、疎水性残基のクラスター同士が結合することが推測された。一方 Weinstein らは 188 番目の Leu が Arg に置換した変異型 GnT-V は野生型と同様の安定性と酵素活性を持つが、ゴルジ体へ輸送されず ER にとどまることを示した(92)。この Leu¹⁸⁸ の近傍には数残基の疎水性アミノ酸がかたまっていることから(Phe¹⁸⁴-Leu¹⁸⁸)、彼らはゴルジから ER

in the hydrophobic region including Leu¹⁸⁸. This region is distinct from the position of the hydrophobic cluster which Sasai *et al.*, pointed out, and it is expected to assess whether the Arg¹⁸⁸-type GnT-V can form oligomers or not.

Pmt4p, a protein *O*-ManT, bears seven transmembrane regions and can form homooligomers as described above. Pmt4p loses the ability to oligomerize and the enzymatic activity when an Arg residue, present in the boundary between the first ER-luminal domain and the following second transmembrane region, is converted to Glu(73). Pmt1p also possesses Arg residue in the same position, and its substitution to Ala results in disrupting the association with Pmt2p and losing the enzymatic activity. These results indicate that complex formation of Pmts is intimately related to the enzymatic activities, and that specific Arg residue proximal to the transmembrane region is important for the biochemical functions.

Alg1p bears at least four transmembrane regions in the N-terminal side and the following catalytic domain oriented to the cytosolic face of the ER. Gao *et al.*, reported homooligomer formation of Alg1p as described above, and further showed that the C-terminal 16 amino acids are critical for oligomer formation(16). Since there is no Cys residue in this sequence, certain non-covalent interaction may occur for the association.

Where does the oligomerization of Golgi-resident GTs take place? Various investigators have performed several experiments such as (i) inhibition of the transport of GTs from the ER to the Golgi by the removal of ER-exit signals, the addition of inhibitory reagents, or low-temperature treatment, (ii) pulse-chase experiments, and (iii) the ER-retention of GTs forced by fusion with an ER-retained protein at their cytoplasmic tails. From these experiments, GnT-I and mannosidase II(52,53), β 4GalNAc-T1(GM₂ synthase)(93), ST8Sia-I(GD₃ synthase)(94), ST6Gal-I(86), and β 3Gal-TIV and β 4GalNAc-T1(55) were shown to form respective oligomers in the ER. In contrast, Sousa *et al.*, suggested that α 1,3FucT-III(FUT3) exists in the Golgi in an equilibrium of monomer and dimer, because of the presence of both forms(95). At present, evidence for this possibility is limited to *in vitro* biochemical studies, so further investigation will be expected. In addition, Fenteany and Colley suggested that the oligomerization of α 2,6-SiaT-I(STcys-type) is the secondary event caused by the high concentration of the enzyme in the Golgi(1).

H. Conclusion

Recent progress in analytical methods greatly promotes the studies for enzyme complexes. Although complex studies had been dependent on classical purification methods, they became easier and clearer by exploitation of several

への局在性の変化はこの領域のコンホメーション変化に起因する可能性を指摘している。この領域は Sasai らの指摘した疎水性クラスターとは異なる領域であり、R¹⁸⁸ 型 GnT-V がオリゴマーを形成しうるか否か興味深い。

プロテイン *O*-ManT 群(Pmt)は前述のようにホモ複合体やヘテロ複合体を形成することが知られている。Pmt4p は7つの膜貫通領域を持つタンパク質であり、ホモ複合体を形成するが、N 端から二番目の膜貫通領域とその N 端側の小胞体内腔側領域の境界に存在する Arg 残基を Glu に置換するとホモ複合体を形成出来できなくなり、酵素活性を失う(73)。また Pmt1p も同様の位置に Arg を持つがこれを Ala に置換すると Pmt2p と会合できなくなり、同様に酵素活性を失う。このことは Pmt の複合体形成と酵素活性が相関しており、特定の膜貫通領域近傍のアミノ酸が重要であることを示唆している。

Alg1p (前述)は少なくとも4つの膜貫通領域を N 端側に持ち、C 端側に小胞体の細胞質側に表出した触媒領域を有している。Gao らは Alg1p のホモ複合体について報告しているが、この複合体形成には C 末端の 16 アミノ酸残基が必要であることを示した(16)。ちなみにこの 16 残基中には Cys 残基は存在しないため、この配列を含む領域の高次構造が複合体形成に必要であることが考えられる。

ところでゴルジ局在性糖転移酵素のオリゴマー化はどこで起こるのであろうか? これまでに(i)ER exit シグナルの除去、薬剤処理、もしくは低温操作による ER からゴルジ体への輸送の阻害実験、(ii)パルス-チェイス実験、(iii)ER 局在タンパク質を融合させたりコンビナント体を作成し、標的酵素を強制的に ER 局在にする実験などにより、GnT-I とマンノシダーゼ II (52,53)、 β 4GalNAc-T1(GM₂ シンターゼ)(93)、ST8Sia-I (GD₃ シンターゼ)(94)、ST6Gal-I (86)、 β 3Gal-TIV と β 4GalNAc-T1 (55) は ER でホモもしくはヘテロ会合体をそれぞれ形成することが示唆されている。一方、Sousa らは α 1,3FucT-III (FUT3) について、ジスルフィド結合を介したダイマーとモノマーが共に存在することから、ゴルジ体においてダイマーとモノマーが平衡状態で存在することを推測している(95)。ただ実験的根拠が *in vitro* での生化学的解析にとどまっており、更なる証明が期待される。また Fenteany および Colley らは STcys のオリゴマー形成はゴルジ体において酵素タンパク質が濃縮されたときに起こる二次的結果であることを推測している(1)。

H. 終わりに

複合体の解析には分析技術の進歩によるところが大きい。当初は酵素の精製に依存していたがやがて種々のタグが開発され、解析がより容易で明快なものになった。そして今日では極微量のタンパク質も質量分析で決定できるようになり、

tag elements. Lately, very small amounts of proteins or subunits can be identified by mass spectrometry. Analyses of components in enzyme complexes will be performed rapidly. Thereafter two big issues would arise. One is to clarify individual functions of all subunits in complexes; for example, which subunit(s) bear catalytic activities, whether the other subunits activate, inactivate, or stabilize the enzymatic activities, whether biological functions of complexes are modified in the presence of certain effector proteins, and so on. The other is to clarify molecular mechanisms whereby individual subunits recognize each other. For this issue, *in vitro* reconstitution of complexes and X-ray crystal structure studies will be required. Although studies on the relationship between GT complexes and diseases are limited to genetic ones to date, it will be expected with the progress of studies that GT complexes are associated with certain diseases and targeted for medical application.

複合体の構成員を明らかにする試みは今後急速に為されていくであろう。そしてその後には二大テーマが待っていると思われる。一つは複合体における各構成員の機能をそれぞれ明らかにすることである。すなわち、反応を行うのはどのサブユニットか、また他のサブユニットは複合体を活性化するか不活性化するか、それとも安定化するか、さらに特定のサブユニットの有無が生理的機能に影響するかどうか、などである。もう一つは複合体を形成する分子機構、つまりどのような分子的結合様式に基づいて互いに結合すべき相手を識別するか、を明らかにすることである。これらを調べるためには複合体の再構成実験や立体構造解析などが重要になるであろう。また複合体形成と疾患との関連性が明らかになったものは現在のところ遺伝病の範囲に留まっている感があるが、研究の進展に伴い種々の疾患との関連性が明らかになってくる可能性が考えられる。

References

1. Fenteany, F.H., and Colley, K.J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 5423–5429
2. Bao, M., Booth, J.L., Elmendorf, B.J., and Canfield, W.M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31437–31445
3. Kudo, M., Bao, M., D'Souza, A., Ying, F., Pan, H., Roe, B.A., and Canfield, W.M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 36141–36149
4. Kempner, E.S., and Fleischer, S. (1989) *Methods Enzymol.* **172**, 410–439
5. Fleischer, B., McIntyre, J.O., and Kempner, E.S. (1993) *Biochemistry* **32**, 2076–2081
6. Tukey, R.H., and Tephly, T.R. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **209**, 565–578
7. Peters, W.H.M., Jansen, P.L.M., and Nauta, H. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11701–11705
8. Gschaidmeier, H., and Bock, K.W. (1994) *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1545–1549
9. Wassler, M.J., Foote, C.I., Gelman, I.H., and Shur, B.D. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 2291–2300
10. Iyer, S.P.N., Akimoto, Y., and Hart, G.W. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 5399–5409
11. Andrali, S.S., Marz, P., and Ozcan, S. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 149–153
12. Yan, A., Wu, E., and Lennarz, W.J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 7121–7126
13. Nyfeler, B., Michnick, S.W., and Hauri, H.-P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 6350–6355
14. Koiwai, O., Aono, S., Adachi, Y., Kamisako, T., Yasui, Y., Nishizawa, M., and Sato, H. (1996) *Hum. Mol. Genet.* **5**, 645–647
15. Correia, T., Papayannopoulos, V., Panin, V., Woronoff, P., Jiang, J., Vogt, T.F., and Irvine, K.D. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6404–6409
16. Gao, X.-D., Nishikawa, A., and Dean, N. (2004) *Glycobiology* **14**, 559–570
17. Ghosh, S.S., Sappal, B.S., Kalpana, G.V., Lee, S.W., Chowdhury, J.R., and Chowdhury, N.R. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 42108–42115
18. Meech, R., and Mackenzie, P.I. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26913–26917
19. Dan, N., and Lehrman, M.A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14214–14219
20. Jungmann, J., Rayner, J.C., and Munro, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 6579–6585
21. Murakami, Y., Siripanyaphinyo, U., Hong, Y., Tashima, Y., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 5236–5246
22. Chavan, M., Yan, A., and Lennarz, W.J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 22917–22924
23. Shibatani, T., David, L.L., McCormack, A.L., Frueh, K., and Skach, W.R. (2005) *Biochemistry* **44**, 5982–5992
24. Meunier, L., Usherwood, Y.-K., Chung, K.T., and Hendershot, L.M. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 4456–4469
25. McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K.T., and Tufaro, F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 668–673
26. Senay, C., Lind, T., Muguruma, K., Tone, Y., Kitagawa, H., Sugahara, K., Lidholt, K., Lindahl, U., and Kusche-Gullberg, M. (2000) *EMBO Rep.* **1**, 282–286
27. Kim, B.-T., Kitagawa, H., Tanaka, J., Tamura, J., and Sugahara, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 41618–41623
28. Han, C., Belenkaya, T.Y., Khodoun, M., Tauchi, M., Lin, X., and Lin, X. (2004) *Development* **131**, 1563–1575
29. Izumikawa, T., Egusa, N., Taniguchi, F., Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 1929–1934
30. Kitagawa, H., Izumikawa, T., Uyama, T., and Sugahara, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 23666–23671
31. Bieberich, E., MacKinnon, S., Silva, J., Li, D.D., Tencomnao, T., Irwin, L., Kapitonov, D., and Yu, R.K. (2002) *Biochemistry* **41**, 11479–11487
32. Ishii, Y., Miyoshi, A., Watanabe, R., Tsuruda, K., Tsuda, M., Yamaguchi-Nagamatsu, Y., Yoshisue, K., Tanaka, M., Maji, D., Ohgiya, S., and Oguri, K. (2001) *Mol. Pharmacol.* **60**, 1040–1048
33. Kurkela, M., Hirvonen, J., Kostianen, R., and Finel, M. (2004) *Biochem. Pharmacol.* **68**, 2443–2450
34. Gentzsch, M., Immervoll, T., and Tanner, W. (1995) *FEBS Lett.* **377**, 128–130
35. Manya, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis, R.U., and Endo, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 500–505
36. Ichimiya, T., Manya, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Takahashi, K., Ueda, R., Endo, T., and Nishihara, S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 42638–42647

37. Ivatt, R.J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4021–4025
38. Seko, A., and Yamashita, K. (2005) *Glycobiology* **15**, 943–951
39. Ishida, H., Togayachi, A., Sakai, T., Iwai, T., Hiruma, T., Sato, T., Okubo, R., Inaba, N., Kudo, T., Gotoh, M., Shoda, J., Tanaka, N., and Narimatsu, H. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 71–78
40. Ju, T., and Cummings, R.D. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16613–16618
41. Ju, T., and Cummings, R.D. (2005) *Nature* **437**, 1252
42. Ashida, H., Hong, Y., Murakami, Y., Shishioh, N., Sugimoto, N., Kim, Y.U., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 1439–1448
43. Brodbeck, U., and Ebner, K.E. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 762–764
44. Brew, K., Vanaman, T.C., and Hill, R.L. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**, 491–497
45. Ramakrishnan, B., and Qasba, P.K. (2001) *J. Mol. Biol.* **310**, 205–218
46. Takeda, S., Ishii, Y., Iwanaga, M., Mackenzie, P.I., Nagata, K., Yamazoe, Y., Oguri, K., and Yamada, H. (2005) *Mol. Pharmacol.* **67**, 665–672
47. Fremont, J.J., Wang, R.W., and King, C.D. (2005) *Mol. Pharmacol.* **67**, 260–262
48. Miles, E.W., Rhee, S., and Davies, D.R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12193–12196
49. Huang, X., Holden, H.M., and Raushel, F.M. (2001) *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 149–180
50. Schwartz, N.B., Roden, L., and Dorfman, A. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 717–724
51. Schwartz, N.B. (1975) *FEBS Lett.* **49**, 342–345
52. Nilsson, T., Hoe, M.H., Slusarewicz, P., Rabouille, C., Watson, R., Hunte, F., Watzele, G., Berger, E.G., and Warren, G. (1994) *EMBO J.* **13**, 562–574
53. Nilsson, T., Rabouille, C., Hui, N., Watson, R., and Warren, G. (1996) *J. Cell Sci.* **109**, 1975–1989
54. Giraudo, C.G., Daniotti, J.L., and Maccioni, H.J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1625–1630
55. Giraudo, C.G., and Maccioni, H.J.F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 40262–40271
56. Hodson, N., Griffiths, G., Cook, N., Pourhossein, M., Gottfridson, E., Lind, T., Lidholt, K., and Roberts, I.S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 27311–27315
57. Pinhal, M.A.S., Smith, B., Olson, S., Aikawa, J., Kimata, K., and Esko, J.D. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12984–12989
58. Sprong, H., Degroote, S., Nilsson, T., Kawakita, M., Ishida, N., van der Sluijs, P., and van Meer, G. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 3482–3493
59. Troy, F.A. (1992) *Glycobiology* **2**, 5–23
60. Steenbergen, S.M., and Vimr, E.R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15349–15359
61. Vann, W.F., Daines, D.A., Murkin, A.S., Tanner, M.E., Chaffin, D.O., Rubens, C.E., Vionnet, J., and Silver, R.P. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 706–712
62. McNulty, C., Thompson, J., Barrett, B., Lord, L., Andersen, C., and Roberts, I.S. (2006) *Mol. Microbiol.* **59**, 907–922
63. Yan, A., Ahmed, E., Yan, Q., and Lennarz, W.J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 33078–33087
64. Yamaguchi, N., and Fukuda, M.N. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12170–12176
65. Gong, X., Dubois, D.H., Miller, D.J., and Shur, B.D. (1995) *Science* **269**, 1718–1721
66. Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J.-P., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J.M., and Nilsson, T. (1998) *J. Cell Biol.* **140**, 751–765
67. Giraudo, C.G., and Maccioni, H.J.F. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 3753–3766
68. Ma, J., and Colley, K.J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 7758–7766
69. Sobering, A.K., Watanabe, R., Romeo, M.J., Yan, B.C., Specht, C.A., Orlean, P., Riezman, H., and Levin, D.E. (2004) *Cell* **117**, 637–648
70. Gao, X.-D., Tachikawa, H., Sato, T., Jigami, Y., and Dean, N. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 36254–36262
71. Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J., and Jigami, Y. (1992) *EMBO J.* **11**, 2511–2519
72. Stolz, J., and Munro, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 44801–44808
73. Girrbach, V., and Strahl, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 12554–12562
74. Haltiwanger, R.S., Blomberg, M.A., and Hart, G.W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9005–9013
75. Kreppel, L.K., and Hart, G.W. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32015–32022
76. Yang, X., Zhang, F., and Kudlow, J.E. (2002) *Cell* **110**, 69–80
77. Iyer, S.P.N., and Hart, G.W. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 24608–24616
78. Wells, L., Kreppel, L.K., Comer, F.I., Wadzinski, B.E., and Hart, G.W. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 38466–38470
79. Opat, A.S., Houghton, F., and Gleeson, P.A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 11836–11845
80. Mougous, J.D., Petzold, C.J., Senaratne, R.H., Lee, D.H., Akey, D.L., Lin, F.L., Munchel, S.E., Pratt, M.R., Riley, L.W., Leary, J.A., Berger, J.M., and Bertozzi, C.R. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 721–729
81. Li, J., Yen, T.-Y., Allende, M.L., Joshi, R.K., Cai, J., Pierce, W.M., Jaskiewicz, E., Darling, D.S., Macher, B.A., and Young, W.W.Jr. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 41476–41486
82. Chen, C., Ma, J., Lazic, A., Backovic, M., and Colley, K.J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 13819–13826
83. Aoki, D., Lee, N., Yamaguchi, N., Dubois, C., and Fukuda, M.N. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4319–4323
84. Machamer, C.E., Grim, M.G., Esquela, A., Chung, S.W., Rolls, M., Ryan, K., and Swift, A.M. (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 695–704
85. Weisz, O.A., Swift, A.M., and Machamer, C.E. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 1185–1196
86. Qian, R., Chen, C., and Colley, K.J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 28641–28649
87. Borsig, L., Katopodis, A.G., Bowen, B.R., and Berger, E.G. (1998) *Glycobiology* **8**, 259–268
88. Ouzzine, M., Gulberti, S., Netter, P., Magdalou, J., and Fournel-Gigleux, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28254–28260
89. de Graffenried, C.L., and Bertozzi, C.R. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 40035–40043
90. Nagai, N., Habuchi, H., Esko, J.D., and Kimata, K. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 3331–3341
91. Sasai, K., Ikeda, Y., Tsuda, T., Ihara, H., Korekane, H., Shiota, K., and Taniguchi, N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 759–765
92. Weinstein, J., Sundaram, S., Wang, X., Delgado, D., Basu, R., and Stanley, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 27462–27469
93. Zhu, G., Jaskiewicz, E., Bassi, R., Darling, D.S., and Young, W.W.Jr. (1997) *Glycobiology* **7**, 987–996

94. Daniotti, J.L., Martina, J.A., Giraudo, C.G., Zurita, A.R., and Maccioni, H.J. (2000) *J. Neurochem.* **74**, 1711–1720
95. Sousa, V.L., Costa, M.T., Palma, A.S., Enguita, F., and Costa, J. (2001) *Biochem. J.* **357**, 803–810
96. Sarnesto, A., Kohlin, T., Thurin, J., and Blaszczyk-Thurin, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15067–15075
97. Sarnesto, A., Kohlin, T., Hindsgaul, O., Thurin, J., and Blaszczyk-Thurin, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 2737–2744
98. Faik, A., Bar-Peled, M., DeRocher, A.E., Zeng, W., Perrin, R.M., Wilkerson, C., Raikhel, N.V., and Keegstra, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 15082–15089
99. Eppenberger-Castori, S., Lotscher, H., and Finne, J. (1989) *Glycoconj. J.* **6**, 101–114
100. Haab, C.I., and Keller, F. (2002) *Physiol. Plant* **114**, 361–371
101. Blanken, W.M., and Van den Eijnden, D.H. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 12927–12934
102. Ju, T., Cummings, R.D., and Canfield, W.M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 169–177
103. Schwartz, N.B., and Roden, L. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 5200–5207
104. Fujita-Yamaguchi, Y., and Yoshida, A. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 2701–2706
105. Navaratnam, N., Ward, S., Fisher, C., Kuhn, N.J., Keen, J.N., and Findlay, J.B. (1988) *Eur. J. Biochem.* **171**, 623–629
106. Bendiak, B., Ward, L.D., and Simpson, R.J. (1993) *Eur. J. Biochem.* **216**, 405–417
107. Teasdale, R.D., Matheson, F., and Gleeson, P.A. (1994) *Glycobiology* **4**, 917–928
108. Malissard, M., Borsig, L., DiMarco, S., Grutter, M.G., Kragl, U., Wandrey, C., and Berger, E.G. (1996) *Eur. J. Biochem.* **239**, 340–348
109. Schwyzer, M., and Hill, R.L. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 2338–2345
110. Nagai, M., Dave, V., Kaplan, B.E., and Yoshida, A. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 377–379
111. Clausen, H., White, T., Takio, K., Titani, K., Stroud, M., Holmes, E., Karkov, J., Thim, L., and Hakomori, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1139–1145
112. Taniguchi, N., Yokosawa, N., Gasa, S., and Makita, A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10631–10637
113. Kamsteeg, J., van Brederode, J., and van Nigtevecht, G. (1978) *Biochem. Genet.* **16**, 1045–1058
114. Evans, O.P., and O'Reilly, D.R. (1999) *J. Gen. Virol.* **80**, 485–492
115. Chowdhury, J.R., Chowdhury, N.R., Bhargava, M.M., and Arias, I.M. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 8336–8339
116. Matern, H., Matern, S., and Gerok, W. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7422–7429
117. Bruni, S., and Chang, T.M. (1999) *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **27**, 343–356
118. Kurkela, M., Garcia-Horsman, J.A., Luukkanen, L., Morsky, S., Taskinen, J., Baumann, M., Kostinen, R., Hirvonen, J., and Finel, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3536–3544
119. Terayama, K., Seiki, T., Nakamura, A., Matsumori, K., Ohta, S., Oka, S., Sugita, M., and Kawasaki, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 30295–30300
120. Bendiak, B., and Schachter, H. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 5775–5783
121. Sadler, J.E., Rearick, J.I., and Hill, R.L. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5934–5941
122. Bosshart, H., and Berger, E.G. (1992) *Eur. J. Biochem.* **208**, 341–349
123. Peterbauer, T., and Richter, A. (1998) *Plant Physiol.* **117**, 165–172
124. Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., and Kimata, K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 7645–7653
125. Habuchi, O., Matsui, Y., Kotoya, Y., Aoyama, Y., Yasuda, Y., and Noda, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21968–21974
126. Sugumaran, G., Katsman, M., and Drake, R.R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22483–22487
127. Shailubhai, K., Huynh, Q.K., Boddupalli, H., Yu, H.H., and Jacob, G.S. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 170–176
128. Huynh, Q.K., Shailubhai, K., Boddupalli, H., Yu, H.H., Broschat, K.O., and Jacob, G.S. (1999) *Glycoconj. J.* **16**, 357–363
129. Bhakta, S., Barts, A., Bowman, K.G., Kao, W.-M., Polsky, I., Lee, J.K., Cook, B.N., Bruehl, R.E., Rosen, S.D., Bertozzi, C.R., and Hemmerich, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 40226–40234
130. Ashida, H., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 896–904
131. Marks, D.L., Wu, K., Paul, P., Kamisaka, Y., Watanabe, R., and Pagano, R.E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 451–456
132. Ikushiro, S., Emi, Y., and Iyanagi, T. (1997) *Biochemistry* **36**, 7154–7161
133. Jungmann, J., and Munro, S. (1998) *EMBO J.* **17**, 423–434

Received on February 22, 2006, accepted on March 29, 2006

Profile of the Author

Akira Seko graduated from the Faculty of Science, University of Tokyo (1988) and received his PhD from the same university (1993). The thesis was about characterization of two types of PNGases in the eggs of medaka fish, under the direction of Dr. Yasuo Inoue. Next, he worked at Taiyo Kagaku Co., Ltd (Yokkaichi, Japan)(1993–1995) and studied about a sialoglycopeptide (SGP) and free glycans in hen's eggs. Within this period, he went to the laboratory of Dr. Chi-Huey Wong and Dr. Tetsuya Kajimoto in the Frontier Program in RIKEN (Saitama, Japan) in six months. In 1995, he moved to the laboratory of Dr. Katsuko Yamashita in Sasaki Institute (Tokyo, Japan), and studied about expression profiles of glycosyltransferases in cancer and their substrate specificities. He received Young Scientist Awards from the JSCR (The Japanese Society of Carbohydrate Research) in 2005.