

UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 16 の発現抑制によって引き起こされる細胞死に関する研究

鳥 羽 慎 也
高 田 慎 一
黒 坂 光

(平成 19 年 10 月 10 日提出)

要 旨

ムチン型 O-グリコシド型糖鎖はタンパク質の主要な翻訳後修飾の一つであり, UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T) は, その生合成開始反応を触媒する. 筆者らはこれまでに, 脳・神経特異的に発現する GalNAc-T9 および, それと非常に高い相同性をもつ GalNAc-T 様遺伝子 (putative GalNAc-T, 以降 pt-GalNAc-T と略) をクローニングした. pt-GalNAc-T については, ノーザンプロット解析, *in situ* hybridization 解析により, それが GalNAc-T9 同様, 脳特異的に発現することを見いだしている. pt-GalNAc-T が典型的なムチン型ペプチドに対して糖転移活性を示すことから, pt-GalNAc-T は GalNAc-T ファミリーの新規アイソザイムとみなすことができるので, GalNAc-T16 と呼ぶことにする. 筆者らは, GalNAc-T9 および -T16 の生体内での機能を詳細に解析するため, 胚性腫瘍細胞 P19 を用いた. P19 はレチノイン酸 (RA) 存在下で神経に分化する細胞であり, 神経分化モデル細胞として様々な研究に用いられている. まず, P19 細胞における GalNAc-T ファミリーの発現を解析したところ, 神経特異的に発現する GalNAc-T9, -T13, -T16 の発現が神経分化に伴って亢進することを見いだした. そこで, P19 細胞においてこれらの遺伝子の発現を抑制し, 神経分化に対する影響を解析した. 興味深いことに, GalNAc-T16 の発現を抑制した P19 細胞においてのみ, 神経細胞への分化が見られず細胞死を引き起こした. 筆者らはさらに, カスパーゼ解析, FACS 解析により, GalNAc-T16 ノックダウン細胞における神経分化誘導時にアポトーシスを起こしていることを見いだした. 以上の結果から, GalNAc-T16 は神経分化において重要な機能を持つと考えられた.

キーワード: 糖鎖修飾, ムチン型糖鎖, 神経分化, アポトーシス, RNAi

目 次

1. 序論
 2. 材料と方法
 3. 結果
 4. 考察
- 参考文献

1. 序論

多くのタンパク質は、その生合成過程において様々な修飾を受け、機能を持った成熟タンパク質となる。これらの翻訳後修飾のうち、糖鎖の付加は分泌タンパク質や細胞膜タンパク質で高頻度に見いだされる細胞内での重要な翻訳後修飾の一つである。タンパク質に付加された糖鎖は、上皮組織の保護、細胞接着、細胞表面タンパク質の抗原性や免疫系の制御などの機能をタンパク質に付与する [1-4]。糖とタンパク質との結合にはいくつかの様式が存在するが、N-結合型とO-結合型糖鎖の二種類に大別される。O-結合型糖鎖の中の重要なものの一つに、GalNAc α 1-Ser (または Thr) のタンパク質 糖鎖間の結合様式を持つものがある。この糖鎖は、ムチンと呼ばれる粘液タンパク質中に数多く見いだされることから、ムチン型糖鎖とも呼ばれている。

ムチン型糖鎖の生合成は、脂質上で合成された高マンノース型の糖鎖がタンパク質分子上に転移される N-結合型糖鎖の生合成反応とは異なり、タンパク質上で一残基ずつ糖が転移されて合成が進む。このうち、第一番目の反応となるタンパク質中の Ser/Thr 残基への GalNAc の転移は UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T) により触媒される。GalNAc-T は、タンパク質中のムチン型糖鎖の数と位置を決定する生化学的に非常に重要な酵素である [5]。転移された GalNAc には、次々と異なる糖転移酵素が作用して、糖が付加されて成熟した糖鎖が合成される。GalNAc-T 遺伝子のクローニングは Elhammer らにより最初の報告がなされ、以後これまでに15種類のアイソザイムが見いだされている [6-9]。近年、GalNAc-T はその発現様式、基質特異性からいくつかのタイプがあることが知られており、ムチン型糖鎖の機能・生合成過程を解析する上で非常に重要である [10]。

我々はまず、EST データベースよりヒトおよびラット GalNAc-T9 遺伝子をクローニングした。ノーザンブロット解析により、GalNAc-T9 は脳特異的に発現していること、さらにラット脳切片を用いた *in situ* hybridization 法から、神経細胞にのみ発現することを見いだした [11]。さらに我々は、GalNAc-T9 と非常に高いホモロジーを持つ pt-GalNAc-T をクローニングした。興味深いことに、pt-GalNAc-T は GalNAc-T9 と同様、脳神経系特異的な発現を示した。また、pt-GalNAc-T は成体の脳だけでなく、胎児の脳にも発現していた [11]。pt-GalNAc-T の活性の検出は大変困難であったが、近年我々は組換え pt-GalNAc-T を昆虫細胞で大量に発現させ、均一にまで精製した酵素標品を用いることで、pt-GalNAc-T が弱いながらも典型的なムチン様ペプチドに対して GalNAc 転移活性を持つことを示した [12]。したがって、pt-GalNAc-T を以降、GalNAc-T16 と呼ぶことにする。我々は、GalNAc-T9、および GalNAc-T-16 が脳神経系におけるムチン型糖鎖の生合成機構を解析する上で、非常に有用なアイソザイムであると考え、マウス胚性腫瘍細胞 P19 の神経分化に伴う GalNAc-T の発現、機能の解析を行うこととした。P19 細胞は神経分化モデル細胞として様々な研究に用いられており、レチノイン酸 (RA) 存在下で神経細胞に、ジメチルスルホキシド存在下で骨・筋肉細胞へと分化する細胞である [13, 14]。本論文では、P19 細胞での

GalNAc-T ファミリーの発現，P19 細胞の神経誘導過程での神経細胞特異的 GalNAc-T の機能を解析した。

2. 材料と方法

2.1 P19 細胞の培養と神経分化法

P19 細胞は DS ファーマバイオメディカルより購入し，10% FCS を含む α MEM, 37°C, 5% CO₂ 下で培養した。RA による神経誘導は McBurney らの方法に従った [13]。以下に簡潔に方法を示す。6 cm 細胞培養ディッシュに 5×10^5 個の細胞を 500 nM RA を含む α MEM (5% FCS) で 2 日間培養した。その細胞をトリプシン処理し，10 cm ペトリディッシュに 500 nM RA を含む α MEM (5% FCS) で 2 日間培養することにより，細胞塊を形成させた。次に，細胞塊を回収しトリプシン処理した後，ポリエチレンイミンコートした細胞培養ディッシュに播種した。 α MEM (10% FCS) で培養した細胞を 2 日もしくは 4 日後に回収し，実験に用いた。

2.2 RT-PCR 分析

P19 細胞から Sepasol RNA I (ナカライテスク) を用いて total RNA を調製し，Superscript III 逆転写キットを用いて一本鎖 cDNA を得た。一本鎖 cDNA を鋳型として，AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) を用いて 94°C 20秒，58°C 30秒，72°C 30秒，30サイクルの条件で PCR を行った。用いたプライマーは以下の通りである。GalNAc-T1 (5'-TCCTGCTGGTGACGTTCTA-3', 5'-CCTCACATCTGGTAAGGA-3'), GalNAc-T9 (5'-ATGACAGCCAAGAGACCGAG-3', 5'-AAAGAAGCCAACGATGGG-3'), GalNAc-T13 (5'-CCCTGCTGCCTGCGCTGAG-3', 5'-TCTCACATCCGGCAGACT-3'), GalNAc-T16 (5'-CCCTGTCTGTGATACTTCGGTCAG-3', 5'-AGTTGTCCTGCTTGATGTTGTCG-3'), MAP2 (5'-AACAGCAGAGGAGGTATCTGC-3', 5'-TGTCTTCCAGGTTGGTACCG-3'), G3PDH (5'-TGTTCCAGTATGACTCCACTCACG-3', 5'-TGAAGACACCAGTAGACTCCACGAC-3')

2.3 発現抑制ベクターの調製と遺伝子導入

GalNAc-T1, -T9, -T13, -T16 に対するアンチセンス RNA を発現するベクターを調製するため，それぞれの酵素のステム領域に対する以下のオリゴヌクレオチドを *pSilencer 2.1-U6 neo* ベクター (Ambion) にサブクローニングした；T1KD, 5'-ACCTCATGAAGGTCCTGGGA-3'; T9KD, 5'-GTCGGCTATCCAAGGCGAG-3'; T13KD, 5'-ACCAAGAAGGTCCAGGAGA-3'; T16KD, 5'-GCC TCAGCGCGCACAGCGCC-3'。1 μ g のベクターを FuGENE6 transfection reagent (Roche) を用いて P19 細胞に導入した。導入一日後から 250 μ g/ml の G418 溶液を培養液に添加し，2 週間培養することにより，各ベクターを安定導入した P19 細胞を得た。

2.4 RA により分化誘導した P19 細胞のアポトーシス解析

カスパーゼ経路の活性化を解析するため、RA 誘導した P19 細胞を 50 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA の緩衝液でホモジナイズした。細胞抽出液を 12,000 rpm, 10 分間遠心し、上清を回収した。20 μ g のタンパク質を含む細胞抽出液, Ac-IETD-p-nitroaniline (pNA), Ac-LEHD-pNA, Ac-DEVD-pNA をそれぞれ基質として用いて、37°C, 4 時間反応し、生成した pNA の 405 nm の吸光度をプロットすることでカスパーゼ 3, 8, 9 の酵素活性を測定した。

アポトーシスに伴う細胞の膜構造の変化を解析するため、ホスファチジルセリンに特異的に結合するアネキシン V (AnV) によるアッセイを行った。RA 誘導した P19 細胞を回収し、Vybrant apoptosis assay kit #2 (Molecular Probes) を用いて細胞を染色した。アネキシン V-Alexa488, ヨウ化プロピジウム (PI) により染色した細胞を FACSsort フローサイトメーターで分離、解析した。

3. 結果

3.1 胚性腫瘍細胞 P19 細胞での GalNAc-T ファミリーの発現

マウス胚性腫瘍細胞株である P19 は、いくつかの試薬の作用により異なる細胞種へと分化することが知られている [13, 14]。それらの試薬のうち、RA は P19 の神経系細胞への分化を誘導するため、P19 は神経細胞の分化モデルとして様々な実験系で用いられている。我々は、神経分化における脳特異的 GalNAc-T の役割を解析するため、P19 細胞をモデル細胞として用いることとした。P19 細胞の分化誘導は、500 nM の RA の存在下で P19 細胞を 2 日間培養した後、さらに同濃度の RA の存在下で P19 細胞をペトリ皿中で培養する。この処理により、P19 細胞はその後の神経分化に不可欠な細胞塊を形成する [15]。細胞塊を形成した P19 細胞では、RA の非存在下で神経分化が進行する。細胞塊を形成した P19 細胞をトリプシンで分散し、細胞培養用ディッシュで RA 非存在下で 4 日間培養すると典型的な長い突起を持った神経様細胞を生じる。

神経細胞のマーカーである微小管関連蛋白 2 (MAP2) の発現を調べた。MAP2 は、未誘導 (RA-)、RA 処理 2 日目 (RA2d) では発現していないが、RA により神経誘導された細胞塊 (Agg)、神経分化 2 日目 (2d)、4 日目 (4d) では発現が見られた (図 1)。次に、この神経分化の各段階での GalNAc-T の役割を解析するため、神経特異的な GalNAc-T および代表的なアイソザイムである GalNAc-T1 の各段階での発現を RT-PCR 法により解析した (図 1)。GalNAc-T1 は未誘導の細胞でも高いレベルで発現しており、神経分化誘導時にもその発現量は変化しなかった。興味深いことに、脳特異的 GalNAc-T (GalNAc-T9, -T13, -T16) は RA 処理によって発現が誘導され、神経分化が進むにつれてその発現量が亢進していた。さらに、GalNAc-T9 は細胞塊形成以降に発現が亢進しているのに対し、GalNAc-T13, -T16 は分化のより早い段階 (RA2d) から発現していた。

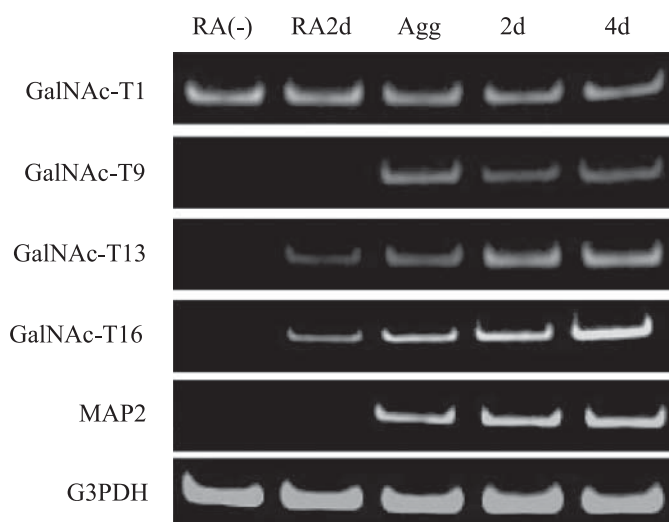


図1 P19細胞の神経誘導に伴うGalNAc-Tの発現

P19細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写して、方法に記述した通りPCRした。RA(-)；未処理のP19細胞，RA2d；RA処理後2日目の細胞，Agg；細胞塊，2d；神経分化2日目の細胞，4d；神経分化4日目の細胞。

3.2 RNAi法によるGalNAc-Tの発現抑制

次に、分化の各段階での神経特異的GalNAc-Tの機能を詳細に解析するため、P19細胞において各GalNAc-T遺伝子の発現抑制実験を行った。GalNAc-T1, -T9, -T13, -T16に対するアンチセンスRNAを発現するベクターを作製し、P19細胞に導入した。抗生物質G418存在下で2週間培養してそれぞれのアンチセンスRNA安定発現細胞株を得た。我々はまず、導入したアンチセンスRNAが特異的にそれぞれのGalNAc-Tを抑制するかどうかをRT-PCRにより解析した。GalNAc-T1, -T13, -T16ノックダウン細胞(T1KD, T13KD, T16KD)はRA処理2日目の細胞から、GalNAc-T9ノックダウン細胞(T9KD)は細胞塊からRNAを抽出し、逆転写したcDNAを鋳型として用いた。図2に示すように、それぞれのノックダウン細胞において、対応するGalNAc-T遺伝子の発現が特異的に抑制されていた。また、T16KDでもGalNAc-T9の発現量が減少していたが、後述するようにT16KD細胞はRAを添加しても神経細胞へと分化できない。したがって、T16KDで見られたGalNAc-T9の発現の減少は、導入したアンチセンスRNAが非特異的にGalNAc-T9の発現を抑制したのではなく、T16KDが神経細胞へ分化出来ないためにGalNAc-T9の発現が誘導されなかったことによると考えられる。

次に、各GalNAc-Tノックダウン細胞をRA処理し、神経細胞へと誘導した。mock, T9KD, T13KDにRAを添加すると、いずれもコントロールと同様に長い突起を持つ神経細胞へと分化した(図3a-c)。一方、興味深いことにT16KDにRAを添加したところ、2日目にほとんどの細胞(~90%)が培養皿から遊離し、死滅した。さらに、培養皿に接着していた一部の細胞をトリ

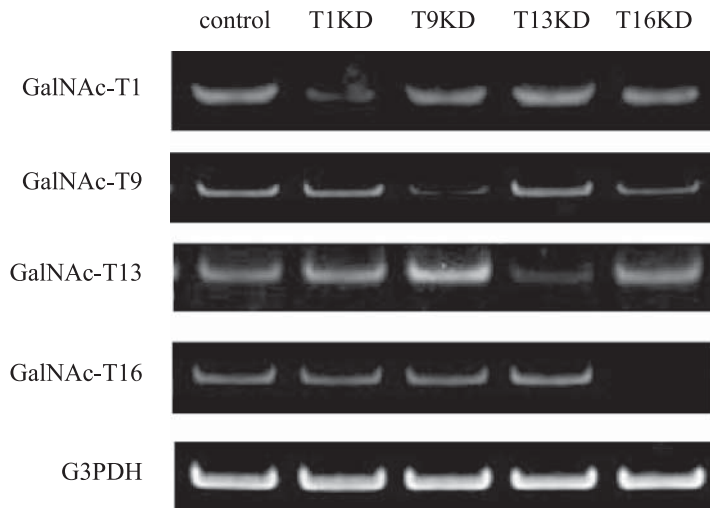


図2 GalNAc-T の特異的発現抑制

mock 細胞 (control), GalNAc-T1 (T1KD), GalNAc-T13 (T13KD), GalNAc-T16 (T16KD) の RA 処理 2 日目の細胞から RNA を調製し, RT-PCR した. 94°C 20 sec, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec のサイクルを 21 (control), 28 (T1KD), 30 (T13KD), 25 (T16KD) 回行い, 電気泳動した. GalNAc-T9 (T9KD) については, 細胞塊形成後 2 日目の細胞から RNA を調製し, RT-PCR した. 94°C 20 sec, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec のサイクルを 35 回行い, 電気泳動した.

ブシン処理し, ペトリ皿に播種したが, それらの細胞は細胞塊を形成せず, ほとんどの細胞が死滅した. また, ペトリ皿中の全ての細胞を回収し, 培養皿に播種したが, 培養皿に接着した細胞はごくわずかであり, 接着した細胞においても神経突起の伸長は観察されなかった (図 3d).

3.3 GalNAc-T ノックダウン細胞のアポトーシス分析

GalNAc-T16 の発現抑制による細胞死のメカニズムを解析するため, アポトーシス解析を行った. 一般的な細胞死とは異なり, アポトーシスを起こした細胞ではクロマチンの凝集, DNA の断片化, カスパーゼカスケードの活性化, 細胞膜リン脂質の逆位などの形態的, 分子的な変化が見られる. 我々は最初に, カスパーゼカスケードの活性化を解析した (図 4). カスパーゼ 8, 9 活性は, 全ての細胞において低い活性しか検出されなかったが, RA 処理 2 日目にわずかであるが活性が亢進していた. これは, 神経誘導に用いた RA の持つ弱いアポトーシス誘導活性によるものだと考えられる [16]. 一方, T16KD 細胞では RA 処理 2 日目に, カスパーゼ 3 の活性が劇的に亢進していた. このことは, GalNAc-T16 の発現抑制による細胞死にアポトーシスが関わっていることを強く示している.

細胞がアポトーシスを起こすと, 細胞膜脂質二重層の非対称性が失われ, 通常は細胞膜内側に存在するホスファチジルセリンが細胞膜外側へとトランスロケーションすることが知られている [17]. そこで, ホスファチジルセリンと特異的に結合するアネキシン V, 死細胞特異的に核

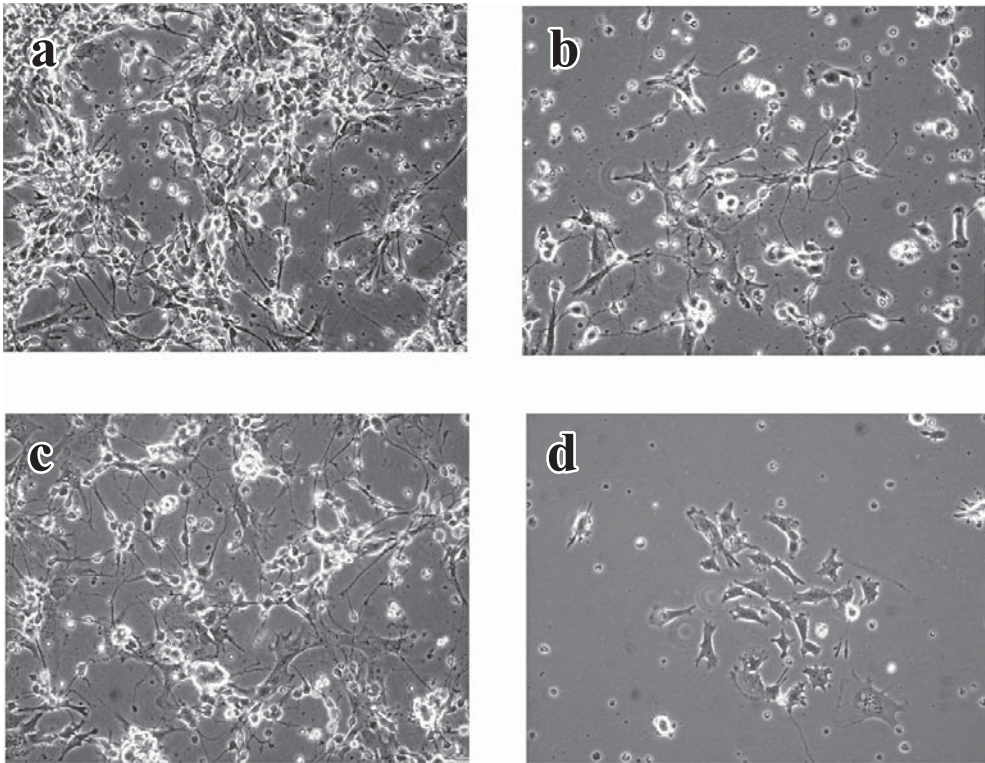


図3 GalNAc-Tの発現抑制による神経分化への影響

GalNAc-T ノックダウン細胞をRA処理し、細胞塊形成後2日目にトリプシン処理した。トリプシン処理した細胞を培養ディッシュに播種し、4日後に形態を観察した。a) mock (control), b) T9KD, c) T13KD, d) T16KD.

を染色するヨウ化プロピジウム同時に用いて細胞を染色すると、生細胞 (AnV^- , PI^-)、初期アポトーシス細胞 (AnV^+ , PI^-)、後期アポトーシス細胞または死細胞 (AnV^+ , PI^+) を区別することができる。この手法を用いてRA処理したP19細胞をフローサイトメーターにより解析した。T1KD, T9KD, T13KDでは数%のアポトーシス細胞 (AnV^+ , PI^-) が検出されたにすぎないが、T16KDでは、 $12 \pm 2.1\%$ ものアポトーシス細胞が検出されており (図5c)、T16KDに見られた細胞死にアポトーシスが関与していることが考えられた。

4. 考察

GalNAc-Tは、大きな遺伝子ファミリーを形成しており、いくつかのアイソザイム遺伝子は組織特異的な発現パターンを示す [10]。その中でも、GalNAc-T9, -T13, -T16は脳特異的な発現を示し、脳でのムチン型糖鎖合成機構を解析する上で、非常に重要である。脳特異的なタンパク質へのムチン型糖鎖の付加が報告されており、クロモグラニンAや β -アミロイド前駆タンパ

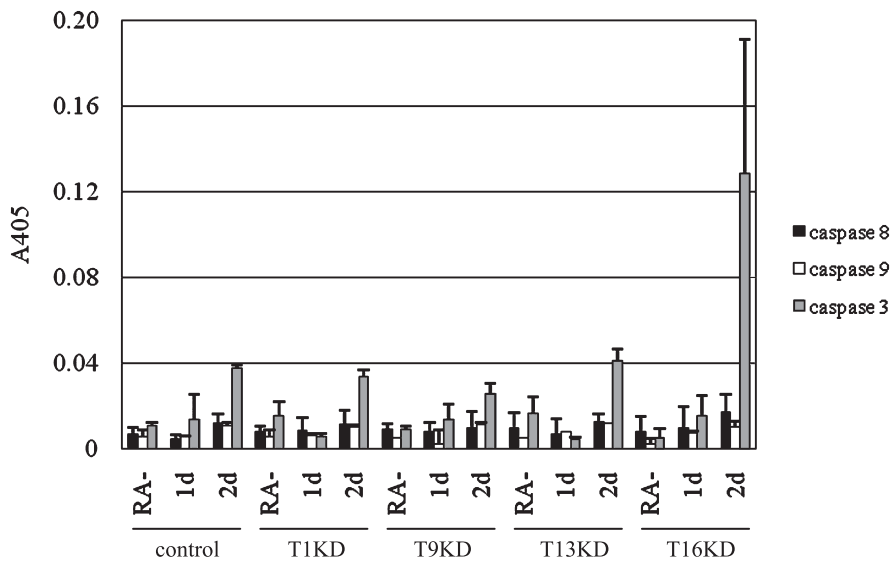
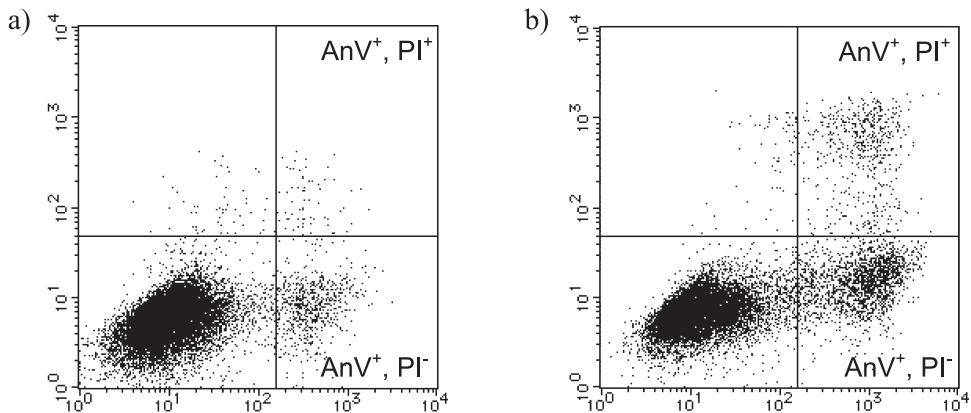


図4 GalNAc-T 発現抑制細胞のカスパーゼ活性

P19 およびノックダウン細胞から細胞抽出液を回収した．回収した細胞抽出液から $20\mu\text{g}$ のタンパク質を用いてカスパーゼ活性を測定した． 37°C ，3時間反応した後，405 nm の吸光度を測定した．RA-；未処理，1d；RA 処理後 1 日目，2d；RA 処理後 2 日目．

ク質， α -シヌクレインなどはその良い例である．しかしながら，どのアイソザイムがこれらのタンパク質へ糖を付加するかはまだ明らかではない [18-20]．筆者らは *in situ* hybridization 法により，GalNAc-T9, -T16 が脳内の限定された領域（海馬歯状回と小脳の顆粒細胞層，視床下部，大脳皮質の中間層など）に発現することを示した [11]．これらのアイソザイムが限局された発現様式を持つことは，生体内でのムチン型糖鎖の生合成が高度に制御された反応であることを反映しているのかもしれない．したがって，これらのアイソザイムの内在性基質の解明は，脳でのムチン型糖鎖の機能を解析する上に重要だと考えられる．

マウス胚性腫瘍細胞 P19 は多分化能を持つ細胞であり，RA 存在下で細胞塊を形成させることで神経への分化が誘導される [15]．神経誘導時の GalNAc-T ファミリーの発現を解析したところ，脳特異的 GalNAc-T である GalNAc-T9, -T13, -T16 は神経誘導に伴って発現が亢進した．このうち，GalNAc-T13, -T16 は，RA 処理二日目から発現するが，GalNAc-T9 の発現はこれらのアイソザイムよりも遅く，細胞塊を形成してはじめて発現した．このことは，GalNAc-T13, -T16 が P19 細胞の神経分化において，GalNAc-T9 よりも早いステージで機能していることを示唆している．さらに，T16KD を RA 誘導したところ，P19 細胞は神経には分化せず，アポトーシスを起こしてほとんどの細胞が死滅した．また，アポトーシスを起こさなかった細胞も神経には分化しなかった．これらのことは，GalNAc-T16 が他のアイソザイムと比べて P19 細胞の神経分化に，より重要な機能を持つことを示唆している．また予備的実験では，T16KD において，神



c)

	apoptotic cells (%)
Control	5.5 ± 2.3
T1KD	2.5 ± 1.9
T9KD	2.1 ± 0.6
T13KD	3.1 ± 2.2
T16KD	12.0 ± 2.1

図5 GalNAc-T ノックダウン細胞のフローサイトメトリック解析
RA 処理 2 日目の細胞を回収し、アネキシン V, PI で染色した。染色した細胞を FACS 解析し、蛍光強度をプロットした。a) mock 細胞 (control), b) T16KD 細胞, c) 初期アポトーシス細胞 (AnV^+ , PI^-) 数 (%)。

経細胞マーカーである MAP2 や他の神経分化に関わる遺伝子群の発現も変化していた。これらの知見は GalNAc-T16 が P19 細胞の神経分化において重要な働きをしていることを示している。

GalNAc-T16 は未分化な細胞では発現しておらず、RA 処理の刺激による P19 細胞の分化に伴い、その発現は速やかに誘導された。このことは、GalNAc-T16 は未分化細胞では必要ではなく、初期の神経分化に非常に重要な働きをしていると考えられる。これは、RA 未処理の T16KD 細胞に影響がない結果と一致している。しかしながら、RA 処理した T16KD 細胞は神経細胞への分化に不可欠なステップである細胞塊を形成せず、神経細胞へも分化しなかった。このことは、GalNAc-T16 が細胞塊の形成に必要な細胞表面タンパク質への糖鎖の付加などに関与する可能性が考えられる。例えば、細胞接着因子である N-CAM や N-cadherin などは神経分化に重要な分子であるが [15, 21]、これらの分子を含む接着分子への糖鎖の付加を GalNAc-T16 が担っている可能性が考えられる。また、GalNAc-T16 の酵素活性は他の GalNAc-T と比べて極めて低いことから、GalNAc-T16 が糖転移酵素以外の活性を持つ可能性もある。例えば、精子表面で接着因

子として働くガラクトース転移酵素のように, GalNAc-T16 が接着因子として働いているのかもしれない [22] .

糖鎖とアポトーシスの関係を示すいくつかの報告がある, 例えば, Lesnikov らはトランスフェリンの抗アポトーシス活性がトランスフェリンの糖鎖を除去することにより消失することを報告している [23] . また, ヘパトーマと CD8⁺ T 細胞で見られるアポトーシスでは, α 1, 3 フコース転移酵素 VII が前者に, ST3Gal-I シアル酸転移酵素が後者に関与している [24, 25] . 近年, Tian らは NIH3T3 細胞や発生時期の顎下腺細胞とムチン型糖鎖の合成阻害剤で処理すると, アポトーシスが起ることを報告した [26] . これらのことは, あるタンパク質上のムチン型糖鎖が細胞の通常の活動・生存に必須であることを示している .

GalNAc-T16 の発現抑制によって引き起こされるアポトーシスの分子機構は明らかではないが, 神経細胞内での基質タンパク質への糖鎖付加が欠損したことにより, タンパク質の変性・凝集が細胞へのストレスとなりアポトーシスが引き起こされた可能性がある . そこで我々は予備的な実験ではあるが, T16KD 細胞での糖鎖修飾の変化をビーナッツレクチンによる染色法で解析したところ, コントロールとの変化は検出されなかった . この実験結果については, 検出限度の問題も考えられるが, GalNAc-T16 が低い酵素活性しか持たないため, レクチン染色で検出できるほどの変化を生じなかった可能性もある . 現在, T16KD 細胞と P19 細胞のムチン型糖鎖の構造, およびタンパク質のプロフィールの比較を試みている .

参 考 文 献

- [1] Fukuda, M. (2002) *Biochim Biophys Acta* 1573, pp. 394–405.
- [2] Gerloni, M., Castiglioni, P., and Zanetti, M. (2005) *J Immunol* 175, pp. 6551–6559.
- [3] Ogata, S., Maimonis, P. J., and Itzkowitz, S. H. (1992) *Cancer Res* 52, pp. 4741–4746.
- [4] Varki, A., and Angata, T. (2006) *Glycobiology* 16, pp. 1R–27R.
- [5] Elhammer, Å. P., Kézdy, F. J., and Kurosaka, A. (1999) *Glycoconj J* 16, pp. 171–180.
- [6] Cheng, L., Tachibana, K., Iwasaki, H., Kameyama, A., Zhang, Y., Kubota, T., Hiruma, T., Tachibana, K., Kudo, T., Guo, J. M., and Narimatsu, H. (2004) *FEBS Lett* 566, pp. 17–24.
- [7] Homa, F. L., Hollander, T., Lehman, D. J., Thomsen, D. R., and Elhammer, Å. P. (1993) *J Biol Chem* 268, pp. 12609–12616.
- [8] Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A., and Tabak, L. A. (2003) *Glycobiology* 13, pp. 1R–16R.
- [9] Wang, H., Tachibana, K., Zhang, Y., Iwasaki, H., Kameyama, A., Cheng, L., Guo, J., Hiruma, T., Togayachi, A., Kudo, T., Kikuchi, N., and Narimatsu, H. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 300, pp. 738–744.
- [10] Young, W. W., Jr., Holcomb, D. R., Ten Hagen, K. G., and Tabak, L. A. (2003) *Glycobiology* 13, pp. 549–557.
- [11] Nakamura, N., Toba, S., Hirai, M., Morishita, S., Mikami, T., Konishi, M., Itoh, N., and Kurosaka, A. (2005) *Biol Pharm Bull* 28, pp. 429–433.

- [12] 黒坂 光 京都産業大学総合学術研究所所報, 平成 18 年, 第 4 号, pp. 17–22.
- [13] Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A., and Kalnins, V. I. (1982) *J Cell Biol* 94, pp. 253–262.
- [14] Jones-Villeneuve, E. M., Rudnicki, M. A., Harris, J. F., and McBurney, M. W. (1983) *Mol Cell Biol* 3, pp. 2271–2279.
- [15] Gao, X., Bian, W., Yang, J., Tang, K., Kitani, H., Atsumi, T., and Jing, N. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 284, pp. 1098–1103.
- [16] Ninomiya, Y., Adams, R., Morriss-Kay, G. M., and Eto, K. (1997) *J Cell Physiol* 172, pp. 25–35.
- [17] Stuart, M. C., Damoiseaux, J. G., Frederik, P. M., Arends, J. W., and Reutelingsperger, C. P. (1998) *Eur J Cell Biol* 76, pp. 77–83.
- [18] Salton, S. R., Margolis, R. U., and Margolis, R. K. (1983) *J Neurochem* 41, pp. 1165–1170.
- [19] Schubert, D., LaCorbiere, M., Saitoh, T., and Cole, G. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86, pp. 2066–2069.
- [20] Tompkins, M. M., Gai, W. P., Douglas, S., and Bunn, S. J. (2003) *Brain Res* 984, pp. 233–236.
- [21] Franceschini, I., Angata, K., Ong, E., Hong, A., Doherty, P., and Fukuda, M. (2001) *Glycobiology* 11, pp. 231–239.
- [22] Rodeheffer, C., and Shur, B. D. (2004) *Development* 131, pp. 503–512.
- [23] Lesnikov, V., Lesnikova, M., and Deeg, H. J. (2001) *Exp Hematol* 29, pp. 477–489.
- [24] Van Dyken, S. J., Green, R. S., and Marth, J. D. (2007) *Mol Cell Biol* 27, pp. 1096–1111.
- [25] Wang, H., Wang, Q. Y., Zhang, Y., Shen, Z. H., and Chen, H. L. (2007) *Glycoconj J* 24, pp. 207–220.
- [26] Tian, E., Hagen, K. G., Shum, L., Hang, H. C., Imbert, Y., Young, W. W., Jr., Bertozzi, C. R., and Tabak, L. A. (2004) *J Biol Chem* 279, pp. 50382–50390.

Studies on Apoptosis Caused by the Suppression of UDP-GalNAc: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 16

Shinya TOBA

Shinichi TAKADA

Akira KUROSAKA

Abstract

Mucin-type O-glycosylation is one of the most important post-translational modifications of proteins, and a UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-transferase) catalyzes the initial step in the biosynthesis of mucin-type glycans by transferring GalNAc from UDP-GalNAc to a polypeptide. We previously cloned a brain-specific putative GalNAc-transferase (pt-GalNAc-T) gene from rat and human that is highly homologous to another brain-specific isozyme, GalNAc-T9. Since pt-GalNAc-T has an enzymatic activity to O-glycosylate some typical mucin peptides, pt-GalNAc-T is a novel member of the GalNAc-transferase family, and is therefore designated GalNAc-T16. To assess a role of GalNAc-T9, and -T16 in neural development, we used P19 mouse embryonic carcinoma cells, which can be induced to differentiate into neural cells upon the treatment with retinoic acid (RA). When expression of all the GalNAc-transferases cloned so far was analyzed by RT-PCR during P19 neural differentiation, brain-specific isozymes, GalNAc-T9, -T13, and -T16, were found to be expressed in association with neural differentiation of the cells. We then suppressed the expression of these brain-specific isozymes as well as GalNAc-T1 in P19 cells by RNAi. Interestingly, only P19 cells suppressed with the GalNAc-T16 expression failed to differentiate into neurons after the RA treatment. Caspase assay and FACS analysis revealed that the suppression of the GalNAc-T16 expression led P19 cells to an apoptotic cell death during the neural development. Thus, GalNAc-T16 has an essential role in the neural differentiation of P19 cells.

Keywords: glycosylation, mucin-type O-glycan, neural development, apoptosis, RNAi