

糖転移酵素の関与するメラニン産生制御の解析

大阪大学大学院 医学系研究科

谷口直之

The biological roles of asparagine-linked oligosaccharides (*N*-glycans) on glycoproteins are thought to be played through the interaction of terminal glycan structures and their receptors. The diversity and avidity of the terminal structures are, however, regulated by the core structure of *N*-glycans. In vertebrates, six different *N*-acetylglucosaminyltransferases (GnT-I through GnT-VI) are involved in initiating the synthesis of highly branched *N*-glycan core structure. Among them, we have purified and cloned four GnTs (GnT-III, IV, V, VI) for the first time. GnT-VI catalyzes the transfer of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) to position 4 of the Man α 1,6 arm of the core structure of *N*-glycan, forming the most highly branched pentaantennary glycans with a bisecting GlcNAc. The human GnT-VI-homolog (hGnT-VIh) gene was originally identified in the region commonly deleted in pancreatic cancer, but its function is unknown. hGnT-VIh shows no GnT-VI activity, although its primary structure is very similar to that of chicken GnT-VI (galGnT-VI) (50% identity). In order to elucidate the biological role of chicken GnT-VI and human GnT-VIh, the *galGnT-VI* and *hGnT-VIh* genes were introduced into a mouse melanoma cell line B16F1. Melanin production was enhanced in *hGnT-VIh* gene-introduced cells, accompanied by increased tyrosinase activity. In contrast, it was reduced in *galGnT-VI* transfectants, accompanied by a decrease of tyrosinase activity level. To investigate the molecular mechanism of these phenomena, tyrosinase mRNA levels in the cells were examined. The mRNA level in *hGnT-VIh* transfectants was elevated, while that in *galGnT-VI* transfectants was reduced compared to control cells. To study alterations in carbohydrate chains induced by the expression of *hGnT-VIh* and *galGnT-VI* genes, oligosaccharides on cell-surface were examined by flowcytometry using DSA and L-PHA lectins, which recognize poly *N*-acetylglucosamine and β 1,6GlcNAc branch, respectively. The reactivity against DSA and L-PHA was increased in hGnT-VIh-transfectants but decreased in *galGnT-VI*-transfectants. Taken together, it is suggested that the expression of the *hGnT-VIh* and *galGnT-VI* genes regulates melanin production via the regulation of tyrosinase expression accompanied by alterations in carbohydrate chain structures.

1. 緒言

タンパク質に付加された糖鎖は、様々なタンパク質の機能を調節することにより、細胞の分化と増殖を制御することが知られている。糖タンパク質糖鎖には、アスパラギン結合型 (*N*型) 糖鎖とムチン型 (*O*型) 糖鎖があり、*N*型糖鎖をもつものが多い。*N*型糖鎖は、タンパク質のアスパラギン (Asn) 残基に結合しており、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とマンノース (Man) より成る特徴的な分岐コア構造を有する (Fig. 1)。この糖鎖付加によりタンパク質が機能分子として成熟するようになる。糖鎖は、単糖が非還元末端側に一つずつ付加して伸長するが、この反応は糖転移酵素で触媒される。*N*型糖鎖のコア分岐構造は6つの *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT-I ~ VI) によって合成される (Fig. 1)。

われわれはこれまで、GnT-III、-IV、-V、-VIについて精製を行い¹⁻⁴⁾、精製酵素のアミノ酸配列に基づいて

cDNA クローニングを行ってきた^{1, 5-7)}。GnT-I ~ Vはヒトに存在し、ヒト遺伝子が同定されているが^{6, 8-12)}、GnT-VIは魚類や鳥類では見つからないが、哺乳動物ではまだ見つからない^{4, 7)}。トリ GnT-VIの cDNA クローニングにより、従来 GnT-IVの相同遺伝子として知られていたヒト GnT-IVホモログ (hGnT-IVh)¹³⁾が、実はGnT-IVよりもGnT-VIにより相同性が高いことがわかり⁷⁾、以降hGnT-VIhと改名した。hGnT-VIhは、GnT-VIおよびGnT-IVとアミノ酸配列でそれぞれ50%および27%一致しているが、hGnT-VIhにはGnT-VI活性もGnT-IV活性もみられなかった⁷⁾。

GnT-IVあるいはGnT-Vで合成される高分岐糖鎖構造

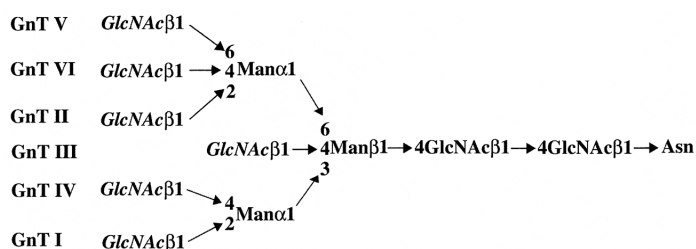
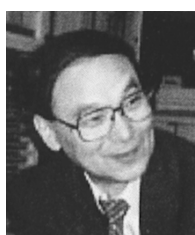


Fig. 1. Structure of the pentaantennary *N*-linked core oligosaccharide containing the bisecting GlcNAc residue. Location at which the GlcNAc transferases (GnT-I through VI) are involved in the branch formation.



Regulation of Melanin Production by Glycosyltransferases.

Naoyuki Taniguchi

Department of Biochemistry, Osaka University Medical School

は、癌細胞の転移¹⁴⁾や受精¹⁵⁾、受容体機能¹⁶⁾、免疫反応¹⁷⁾などに関係している。GnT-VIは、GnT-Vの産物である β 1,6GlcNAc分岐構造を認識して⁴⁾、さらに β 1,4結合でGlcNAcを転移してより複雑な分岐構造を形成する(Fig. 1)。糖鎖が高分岐化すると、多価性が付与されて糖鎖受容体との親和性が非常に高まることから¹⁸⁾、GnT-VIの導入によりさまざまな生物作用が生じることが予想された。また、hGnT-VIhに関しては、試験管内で糖転移酵素活性はみられていないが、未知の糖鎖修飾反応を触媒する可能性が考えられた。

メラニン細胞のメラニン産生のキー酵素であるチロシナーゼは、チロシン加水分解活性とドーパ酸化活性を同時にもち、その活性にはN型糖鎖が必須であることが知られている^{19~21)}。また、 α -MSH等によるcAMP産生刺激によってメラノーマ細胞のメラニン産生が増加する際、さまざまなタンパク質のN型糖鎖の合成が促進される²²⁾。このように、メラニン細胞におけるメラニン産生にはN型糖鎖が深く関わっていることがわかっているが、実際どのような糖鎖構造が関与しているのか、また、どのような糖転移酵素が関与しているのかは不明である。われわれは、最近、GnT-III遺伝子をマウスメラノーマ細胞B16細胞に発現させると、チロシナーゼの糖鎖構造が変化するとともに、その活性が上昇して、メラニン産生が増大することを見出した²³⁾。そこで他の糖転移酵素の影響を調べるために、トリGnT-VIとhGnT-VIhのcDNAをマウスメラノーマ細胞B16F1に導入してその効果を調べた。

2. 実験

2.1 材料

哺乳動物用発現ベクターpcDNA3.1/Zeo(+)は、Invitrogen社より購入した。ビオチンで標識されたDatura stramonium agglutinin(DSA)、leucoagglutinating Phaseolus vulgaris agglutinin(L-PHA)は、EY laboratories社より購入した。RNA抽出試薬Trizol、Superscript II、LipofectAmineはGIBCOBRL社より購入した。抗生物質ZeocellはInvivoGen社より購入した。BCAプロテインアッセイキットはPierce社より購入した。マウスメラノーマ細胞B16F1は、10%牛胎児血清を加えたダルベッコ改変イーグル基礎培地を用いて、5%CO₂下、37°Cで培養を行った。

2.2 ヒトGnT-VIホモログ(hGnT-VIh)遺伝子導入メラノーマ細胞の作成

pSV-hGnT-VIh¹³⁾からhGnT-VIhのopen reading frame(ORF)をpcDNA3.1ベクターに挿入し、pcDNA-hGnT-VIhを作製した。B16F1細胞に、LipofectAminを用いてメーカーのマニュアルに従い、pcDNA-hGnT-VIhをトランスフェクトし、100 μ g/mLのzeocellを添加してスクリーニングし、限界希釈法により細胞をクローン化した。

2.3 ニワトリGnT-VI(galGnT-VI)遺伝子導入メラノーマ細胞の作成

pSV-GnT-VI⁷⁾からgalGnT-VIのORFを、pcDNA3.1に挿入し、pcDNA-galGnT-VIを作製した。トランスフェクション、スクリーニング、クローン化の方法はhGnT-VIhと同様である。

2.4 ノーザンブロットティング

各細胞からtotal RNAをTrisolを用いて抽出した。得られたtotal RNA 10 μ gをホルムアルデヒド変性ゲルで電気泳動し、陽性荷電ナイロンメンブレン(Roche)にブロットティングした。galGnT-VI遺伝子のmRNAレベルの発現を見る場合には、GnT-VI遺伝子の後半部分の配列を元にして作ったジゴキシン標識RNAプローブを、チロシナーゼ遺伝子のmRNAレベルでの発現をみる場合には、チロシナーゼ遺伝子の配列全長を元に作成したジゴキシン標識DNAプローブをハイブリダイズさせ、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシン抗体(Roche)にて検出した。

2.5 RT-PCR

total RNA 1 μ gを用いて、random primerと逆転写酵素Superscript IIによって逆転写反応(RT)を行った。PCRは、変性を94°Cで30秒、アニーリングを55°Cで30秒、伸長反応を72°Cで1分間の条件で、hGnT-VIh遺伝子の場合、Gn4H5S:5'-AACGTTCTACAGTGTCATTC-3'とGnT4H5A:5'-GGATGCAATGACTTCTTGA-3'を用いて28サイクル、チロシナーゼ遺伝子の場合、TYRinB F:5'-GAGTATA-ATAGCCATCAGGT-3'、とTYRinB R:5'-CTTGGGACATT-GTTCCATTC-3'を用いて29サイクル、コントロールの β -アクトチン遺伝子の場合、 β actinF:5'-TTACCAACTGGGAC-GACATG-3'とreverse primer β actinR:5'-AGGAGCCAGAG-CAGTAATCT-3'を用いて21サイクル増幅させた。

2.6 チロシナーゼ活性測定、タンパク定

チロシナーゼの活性測定は、細胞溶解液50 μ Lに1 mMの β -L-dehydroxyphenylalanin(L-DOPA)を950 μ Lずつ加えて、37°Cで30分間反応させた後、475nmでDOPA-chromeの吸光度を測定した²⁰⁾。タンパク質定は牛血清アルブミンを標準として用いて、BCAプロテインアッセイキットによって行った。

2.7 フローサイトメトリー

各細胞を0.25% EDTAを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で剥がし、20 μ g/mLのビオチン化レクチンと氷上で30分間反応させた後、PBSで洗い、さらにFITC標識アビジンを氷上で30分間反応させ、PBSで洗った後、FACScan(Beckton Dickinson社製)にて解析した。

3. 結果

ニワトリ GnT- VI 遺伝子 *galGnT- VI* をマウスメラノーマ細胞 B16F1 にトランスフェクトして、zeocell 耐性株を得た。これらの Zeocell 耐性株における導入 GnT- VI 遺伝子の発現を、ノーザンブロットングで解析したところ、転写物が確かに発現していた (data not shown)。

同様に、ヒト GnT- VI ホモログ遺伝子 *hGnT- VI h* についても B16F1 細胞にトランスフェクトして Zeocell 耐性株を得た。*hGnT- VI h* 遺伝子の発現は、転写物量が非常に少くノーザンブロットングでは検出できなかったが、RT-PCR で転写物を確認した (data not shown)。

galGnT- VI および *hGnT- VI h* 遺伝子導入メラノーマ細胞は、親株や Mock トランスフェクトと比べて、特に目立った増殖速度の変化はみられなかった (data not shown) が、*galGnT- VI* 遺伝子導入細胞は、対照細胞より白くなり、反対に *hGnT- VI h* 遺伝子導入細胞は黒くなった (Fig. 2)。光学顕微鏡で観察すると、*hGnT- VI h* 遺伝子導入細胞は、細胞間あるいは細胞-基質間の接着が増強したためと思われるが突起を出して伸展した細胞形態をとるとともに、メラニン色素を多量に含有している細胞が多数みられた (Fig. 3)。一方、*galGnT- VI* 遺伝子導入細胞は明らかな形態学的な差異はみられなかった。

次にメラニン産生のキー酵素であるチロシナーゼの発現を調べた。*hGnT- VI h* 遺伝子導入細胞のチロシナーゼ活性は、対照細胞と比べて約 2 倍高く、一方 *galGnT- VI* 遺伝子導入細胞は約 4 分の 1 に低下していた (Fig. 4)。この結果から、*hGnT- VI h* 遺伝子導入メラノーマ細胞および *galGnT- VI* 遺伝子導入メラノーマ細胞におけるメラニン産生の変化は、チロシナーゼ活性で制御されていると思われた。

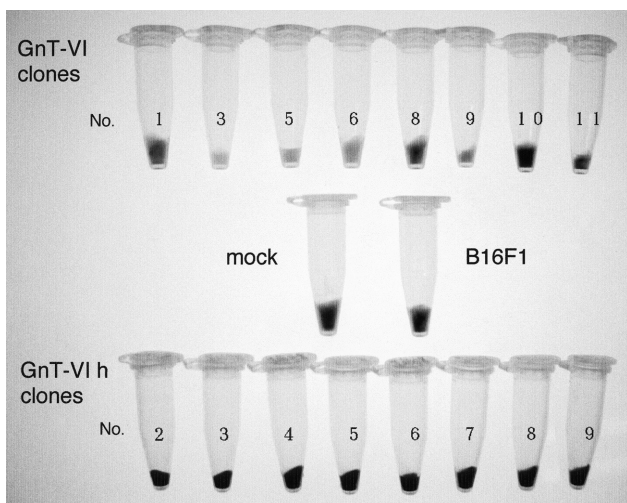


Fig. 2. Comparison of cell-pellet color between parent B16F1 cells, mock transfectants, *galGnT- VI* transfectants, and *hGnT- VI h* transfectants.

チロシナーゼ活性変化のメカニズムを明らかにするために、まず、mRNA レベルの発現をノーザンブロットングで解析した。*hGnT- VI h* 遺伝子導入細胞ではチロシナーゼの転写物が検出されたが、親株、Mock トランスフェクタント、*galGnT- VI* 遺伝子導入細胞では検出されなかった (Fig. 5)。次に、親株、Mock トランスフェクタント、*galGnT- VI* 遺伝子導入細胞におけるチロシナーゼ mRNA の発現をより高感度の RT-PCR で解析したところ、*galGnT- VI* 遺伝子導入細胞では、親株、Mock トランスフェクタントと比べて発現が低下していた。

チロシナーゼは糖タンパク質であり、糖鎖の付加が酵素活性の発現に必要であることが報告されている^{19~21)} ので、*hGnT- VI h* 遺伝子あるいは *galGnT- VI* 遺伝子の強制発現によりチロシナーゼの糖鎖が改変されて酵素活性を変化させる可能性が考えられた。そこで、まず、*hGnT- VI h* 遺伝子導入細胞および *galGnT- VI* 遺伝子導入細胞における GnT- VI 活

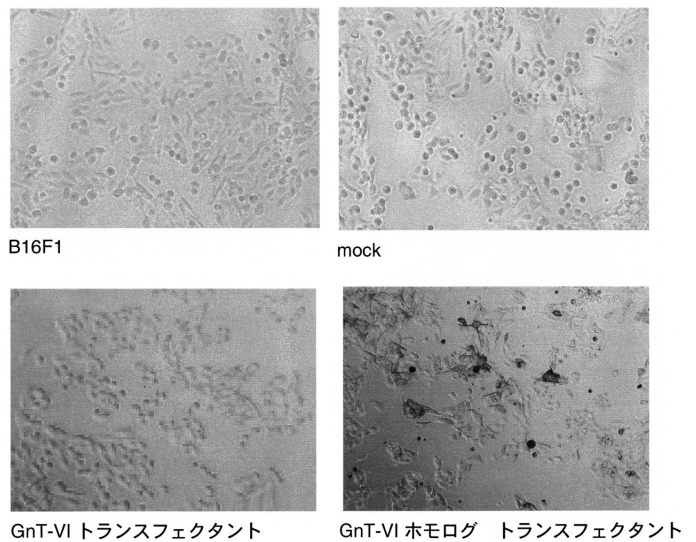


Fig. 3. Microscopic observation of parent B16F1 cells, mock transfectants, *galGnT- VI* transfectants, and *hGnT- VI h* transfectants.

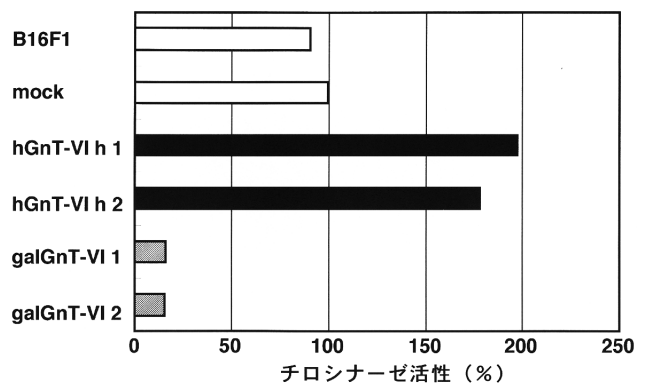


Fig. 4. Tyrosinase activity levels in parent B16F1 cells, mock transfectants, *galGnT- VI* transfectants, and *hGnT- VI h* transfectants.

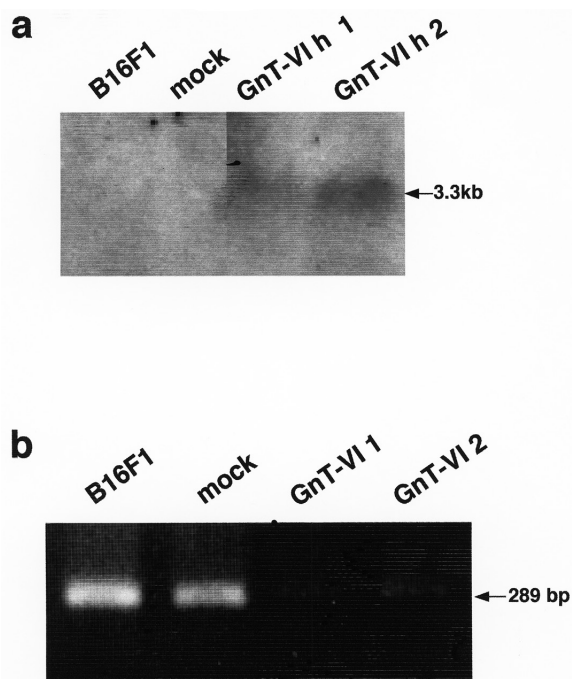


Fig. 5. Tyrosinase mRNA levels in parent B16F1 cells, mock transfectants, *galGnT-VI* transfectants, and hGnT-VIh transfectants.

Tyrosinase mRNA expression levels were examined by Northern blotting (panel a) and RT-PCR (panel b).

性を測定したが、親株同様にいずれも活性が検出されなかった (data not shown)。何らかの阻害物質の混入による活性抑制も考えられたので、次に、細胞内における糖鎖変化をレクチンを用いて調べた。直接にGnT-VI産物であるGlcNAc β 1-4 (GlcNAc β 1-6) Man α 構造を認識するレクチンは知られていないので、GnT-V産物である β 1,6GlcNAcブランチ構造を認識するとされるDSAレクチン²⁴⁾とL-PHAレクチン²⁵⁾を用いて、フローサイトメトリーで細胞表面の糖鎖構造との反応性について調べた。DSAに対する反応性は、対照として用いたmockトランスフェクタントと比べて、hGnT-VI遺伝子導入細胞では増加し、*galGnT-VI*遺伝子導入細胞では不変あるいは若干低下した (Fig. 6a)。L-PHAの反応性もDSAレクチンの反応性と一部異なるものの、mockトランスフェクタントと比べて、hGnT-VIh遺伝子導入細胞では増加し、*galGnT-VI*遺伝子導入細胞では不変あるいは若干低下した (Fig. 6b)。したがって、hGnT-VIh遺伝子と*galGnT-VI*遺伝子の導入は細胞表面のN型糖鎖の構造を変化させ得ることがわかった。

4. 考察

チロシナーゼの活性を規定する因子は複数あり、糖鎖もその一因と考えられる^{19, 20)}。実際、チロシナーゼについているN型糖鎖は分子シャペロンとの結合に関わり、酵素活性の発現に必要であることが証明されている²¹⁾。以前、

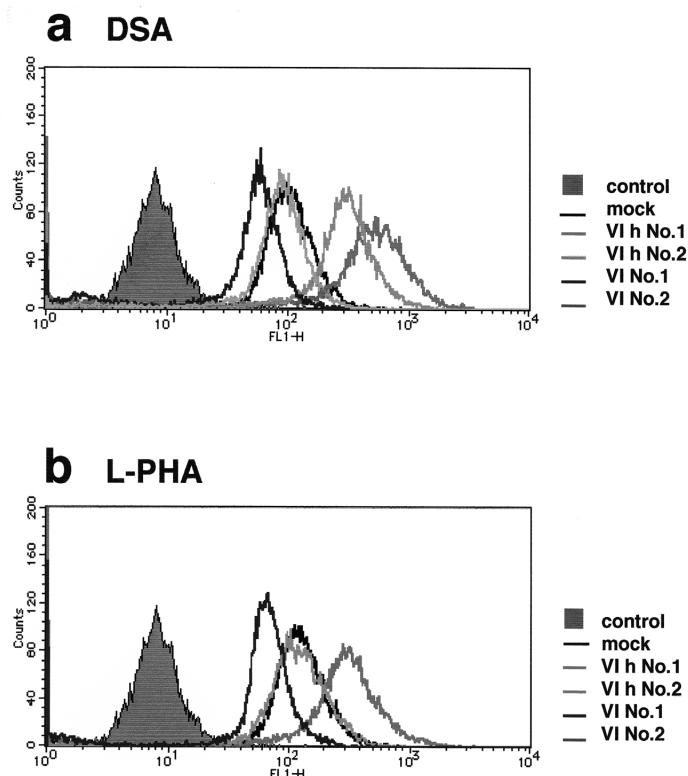


Fig. 6. Reactivities of cell surface glycoproteins to DSA and L-PHA lectins.

Mock transfectants, *galGnT-VI* transfectants, and hGnT-VI transfectants were examined by flow cytometry analysis using DSA (panel a) and L-PHA (panel b) lectins.

我々はN-アセチルグルコサミン転移酵素GnT-III (図1参照) 遺伝子をマウスメラノーマB16細胞に導入するとチロシナーゼ活性の上昇に伴いメラニン産生が増加することを見出した²³⁾。本研究では、*galGnT-VI*遺伝子導入細胞ではチロシナーゼ活性の低下に伴ってメラニン産生が抑制され、一方、hGnT-VIh遺伝子導入細胞では逆にチロシナーゼ活性の上昇に伴いメラニン産生が亢進することを見出した。Gn-VIはN型糖鎖の分岐形成に与り、また、hGnT-VIhも未知ではあるが糖転移酵素である可能性が高いので、これらの遺伝子導入は、チロシナーゼを含む糖タンパク質糖鎖の構造を改変し、活性に影響を及ぼすことが予想された。しかし両者のトランスフェクタントにおいて、導入した遺伝子が発現していることをmRNAレベルでは確認できるものの、GnT-VIの活性は検出できなかった。何か試験管内におけるGnT-VI活性を阻害する細胞内物質が混入したのかもしれない。糖転移酵素は、発現量が非常に少なく試験管内で活性が検出されなくても、実際に細胞内では糖転移酵素として働いているかもしれない。

一方、ポリN-アセチルラクトサミンと β 1,6GlcNAc分岐部を認識する植物レクチンDSAとL-PHAを用いたフローサイトメトリーにより細胞表面の糖鎖構造の変化を調べた

ところ、*galGnT*-VI 遺伝子導入細胞と *hGnT*-VI *h* 遺伝子導入細胞における細胞表面の糖鎖変化は逆に動いた。このレクチンとの反応性が、導入遺伝子産物の直接的な糖転移酵素活性に基づくものであるか、それとも他の糖転移酵素群の攪乱に基づくものであるかは不明である。いずれにしてもチロシナーゼの糖鎖自体も変化している可能性も高い。

チロシナーゼの活性変化とチロシナーゼの mRNA の発現が相関していたことから、本研究で観察された *galGnT*-VI あるいは *hGnT*-VI *h* 遺伝子導入によるメラニン産生量の変化は、一つにはチロシナーゼ遺伝子の発現が変化したためと思われる。この原因としては、*galGnT*-VI と *hGnT*-VI *h* の mRNA が直接チロシナーゼ遺伝子の転写あるいはチロシナーゼ mRNA の安定性に干渉した可能性が考えられる。別の可能性としては、細胞表面の糖鎖変化が、チロシナーゼ遺伝子の発現に影響を及ぼしたか、あるいは別の分子を介してチロシナーゼ mRNA の安定性を調節していることが考えられる。

以上をまとめると、トリ *GnT*-VI 遺伝子およびヒト *GnT*-VI *h* 遺伝子のマウスメラノーマ細胞における発現は、チロシナーゼの発現変化を介して、メラニン産生を制御することが明らかとなった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご支援いただきましたコスメトロロジー研究振興財団に深謝いたします。

(参考文献)

- 1) Nishikawa A, Ihara Y, Hatakeyama M, Kangawa K, Taniguchi N: Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-N-acetylglucosamine : β -D-mannoside β -1,4N-acetylglucosaminyltransferase III from rat kidney. *J. Biol. Chem.* **267** : 18199-18204, 1992
- 2) Oguri S, Minowa MT, Ihara Y, Taniguchi N, Ikenaga H, Takeuchi M: Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine : α 1,3-D-mannoside β 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase (*N*-acetylglucosaminyltransferase - IV) from bovine small intestine. *J. Biol. Chem.* **272**:272 : 22721-22727, 1997
- 3) Gu J, Nishikawa A, Tsuruoka N, Ohno M, Yamaguchi N, Kangawa K, Taniguchi N: Purification and characterization of UDP-N -acetylglucosamine: α -6-D-mannoside β 1-6N-acetylglucosaminyltransferase (*N*-acetylglucosaminyltransferase V) from a human lung cancer cell line. *J. Biochem.* **113** : 614-619, 1993
- 4) Taguchi T, Ogawa T, Inoue S, Inoue Y, Sakamoto Y, Korekane H, Taniguchi N: Purification and characterization of UDP-GlcNAc:GlcNAc β 1-6 (GlcNAc β 1-2) Man α 1-R [GlcNAc to Man] β 1,4-*N*-acetylglucosaminyltransferase VI from hen oviduct. *J. Biol. Chem.* **275** : 32598-32602, 2000
- 5) Minowa MT, Oguri S, Yoshida A, Hara T, Iwamatsu A, Ikenaga H, Takeuchi M: cDNA cloning and expression of bovine UDP-N-acetylglucosamine : β 1,3-D-mannoside α 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase IV. *J. Biol. Chem.* **273** : 11556-11562, 1998
- 6) Saito H, Nishikawa A, Gu J, Ihara Y, Soejima H, Wada Y, Sekiya C, Niikawa N, Taniguchi N: cDNA cloning and chromosomal mapping of human N-acetylglucosaminyltransferase V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198** : 318-327, 1994
- 7) Sakamoto Y, Taguchi T, Honke K, Korekane H, Watanabe H, Tano Y, Dohmae N, Takio K, Horii A, Taniguchi N: Molecular cloning and expression of cDNA encoding chicken UDP- *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) : GlcNAc β 1-6 (GlcNAc β 1-2) -Man₁-R [GlcNAc to Man] β 1,4N -acetylglucosaminyltransferase VI. *J. Biol. Chem.* **275** : 36029-36034, 2000
- 8) Kumar R, Yang J, Eddy RL, Byers MG, Show TB, Stanley P: Cloning and expression of the murine gene and chromosomal location of the human gene encoding N-acetylglucosaminyltransferase I. *Glycobiology* **2**:383-393, 1992
- 9) Tan J, D'Agostaro AF, Bendiak B, Reck F, Sarkar M, Squire JA, Leong P, Schachter, H.: The human UDP-*N*-acetylglucosamine : α -6-D-mannoside β -1, 2-*N*-acetyltransferase II gene (MGAT2) -cloning of genomic DNA, localization to chromosome 14q21, expression in insect cells and purification of the recombinant protein. *Eur. J. Biochem.* **231** : 317-328, 1995
- 10) Yip B, Chen SH, Mulder H, Hoppener J, Schachter H : Organization of the human β -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I gene (*MGAT1*) , which controls complex and hybrid N-glycan synthesis. *Biochem. J.* **321** : 465-474, 1997
- 11) Ihara Y, Nishikawa A, Tohma T, Soejima H, Niikawa N, Taniguchi N: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of human *N*-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) . *J. Biochem.* **113** : 692-698, 1993
- 12) Yoshida A, Minowa MT, Takamatsu S, Hara T, Oguri S, Ikenaga H, Takeuchi M: Tissue-specific expression and chromosomal mapping of a human UDP-N-acetylglucosamine : α 1,3-D-mannoside β 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase. *Glycobiology* **9** : 303-310, 1999
- 13) Furukawa T, Youssef EM, Yatsuoka T, Yokoyama

- T, Makino N, Inoue H, Fukushige S, Hoshi M, Hayashi Y, Sunamura M, Horii A: Cloning and characterization of the human UDP-N-acetylglucosamine: α -1,3-D-mannoside β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase IV-homologue (hGnT-IV-H) gene. *J. Hum. Genet.* **44** : 397-401, 1999
- 14) Murata K, Miyoshi E, Kameyama M, Ishikawa O, Kabuto T, Sasaki Y, Hiratsuka M, Ohigashi H, Ishiguro S, Ito S, Honda H., Takemua F, Taniguchi N, Imaoka S: Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* **6** : 1772-1777, 2000
- 15) Kitajima K, Inoue S, Inoue Y : 61 : Isolation and characterization of a novel type of sialoglycoproteins (hyosporin) from the eggs of medaka, *Oryzias latipes*: nonapeptide with a large N-linked glycan chain as a tandem repeat unit. *Dev. Biol.* **132** : 544-553, 1989
- 16) Ihara Y, Sakamoto Y, Mihara M, Shimizu K, Taniguchi N.: Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferase III disrupts the tyrosine phosphorylation of Trk with resultant signaling dysfunction in PC12 cells treated with nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **272** : 9629-9634, 1997
- 17) Buckhaults P, Chen L, Fregien N, Pierce M: Transcriptional regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by the src oncogene. *J. Biol. Chem.* **272** : 19575-19581, 1997
- 18) Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA: Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.* **57** : 785-838, 1988
- 19) Imokawa, G, Mishima Y: Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* **42** : 1994-2002, 1982
- 20) Petrescu SM, Petrescu AJ, Titu HN, Dwek RA, Platt FM: Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. *J. Biol. Chem.* **272** : 15796-15803, 1997
- 21) Branza-Nichita N, Negroiu G, Petrescu AJ, Garman EF, Platt FM, Wormald MR, Dwek RA, Petrescu SM: Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J. Biol. Chem.* **275** : 8169-8175, 2000
- 22) Sodi SA, Chakraborty AK, Platt JT, Kolesnikova N, Rosembat S, Keh-Yen A, Bolognia JL, Rachkovsky ML, Orlow SJ, Pawelek JM: Melanoma x macrophage fusion hybrids acquire increased melanogenesis and metastatic potential: altered N-glycosylation as an underlying mechanism. *Pigment Cell Res.* **11** : 299-309, 1998
- 23) Taniguchi N, Jain SK, Takahashi M, Ko JH, Sasai K, Miyoshi E, Ikeda Y: Glycosyltransferases: cell surface remodeling and regulation of receptor tyrosinase kinases-induced signaling. *Pure. Appl. Chem.* **71** : 719-728, 1999
- 24) Yamashita K, Totani K, Ohkura T, Takasaki S, Goldstein IJ, Kobata A: Carbohydrate binding properties of complex-type oligosaccharides on immobilized Datura stramonium lectin. *J. Biol. Chem.* **262** : 1602-1607, 1987
- 25) Cummings RD, Kornfeld S: Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *J. Biol. Chem.* **257** : 11230-11234, 1982