〔シンポジウム：糖ライコームの新展開〕

ムチン O-グリコシレーションの制御とその生物学的意義

竹内英之・加藤健太郎・入村達郎

SUMMARY

Mucin 2 (MUC2) is the major intestinal mucin. O-glycans are attached to MUC2 in a potentially diverse arrangement, which is crucial for their interaction with endogenous and exogenous lectins. In the present report, a PTTTPITTTTK peptide corresponding to a portion of the MUC2 tandem repeat domain was synthesized, and incubated with UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine (UDP-GalNAc) and detergent-soluble microsomes, prepared from the human colon carcinoma cell line LS174T. The products were fractionated by reverse-phase HPLC and characterized by matrix-assisted laser-desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. Oligopeptides with GalNAc residues derived from PTTTPITTTTK, containing consecutive threonine residues, were found to be glycosylated with 1-7 GalNAc residues per single peptide. The sequences of all glycopeptides were determined. The results indicated that the predominant sites of the first through to the sixth GalNAc incorporation were Thr-3, Thr-6, Thr-5, Thr-2, Thr-4 and Thr-1, respectively. An exception was the presence of a glycopeptide with three GalNAc residues at Thr-1, Thr-4 and Thr-5. When the putative biosynthetic intermediates, PTTT*PITTTTK and PT*TTPITTTTK, were used as acceptors, all the products detected and analyzed were the same as those obtained when the unsubstituted peptide and microsome fractions of LS174T cells were incubated. Thus, the preferential order and maximum number of GalNAc incorporation into threonine residues of MUC2 core peptides are strictly regulated, when the microsome fraction of LS174T cells is used as a source of *N*-acetyl-D-galactosaminyltransferases.

Key words: mucin, O-glycosylation, tumor antigen, UDP-GalNAc: polypeptide *N*-acetyl-D-galactosaminyltransferase.

はじめに

ムチンは、主に上皮細胞によって産生され、管腔側に分泌されるか、あるいは、細胞膜表面に表出される高分子量で、非常に糖含量の高い糖蛋白質である。O-結合型糖鎖の付加しうるセリン、スレオニンの含量が高い配列の繰り返し、いわゆる、タンデムリピートをもつといった構造的特徴をもっている^{1,2)}。腸管粘膜上皮の主要なムチンである MUC2 ムチンのタンデムリピートは 23 アミノ酸からな

り、このうち 14 個が Thr 残基であり、配列上 Thr 残基が連続する部分と交互に並ぶ部分とが存在している³⁾。ヒト大腸癌 LS174T 細胞の産生する MUC2 ムチンのタンデムリピートの Thr 残基はおよそ 78% が糖鎖の付加を受けているという報告がある⁴⁾。正常な消化管粘膜上皮細胞の産生する MUC2 ムチンも高度に糖鎖の付加を受けていると考えられているが、異なる細胞や組織における、その糖鎖付加のパターンについてはよくわかっていない^{3,5)}。一般に多価の糖鎖は糖鎖認識分子との結合性が強いことが知

The regulation of mucin-type O-glycosylation and its biological significance.

Hideyuki Takeuchi, Kentaro Kato, Tatsuro Imamura; 東京大学大学院薬学系研究科生体異物学

Correspondence address: Hideyuki Takeuchi, Laboratory of Cancer Biology and Molecular Immunology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.

略号一覧: α -CHCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; FITC, fluorescein isothiocyanate; GalNAc, *N*-acetyl-D-galactosamine; HPLC, high-performance liquid chromatography; MALDI-TOF, matrix-assisted laser-desorption ionization-time-of-flight; MUC2, mucin 2; pp-GalNAc-T, UDP-GalNAc: polypeptide *N*-acetyl-D-galactosaminyltransferase (EC 2.4.1.41); PTH, phenylthiohydantoin; RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction.

第 52 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

られており、このような相互作用は、細胞と細胞との相互作用において重要である。ムチンの構造的特徴の生物学的意義を考えると、ムチンは糖鎖を細胞外に提示することを機能として進化の過程で生物によってデザインされた分子であると考えられる。私たちは複数の *N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) 残基がムチン上にあるときに、腫瘍関連糖鎖抗原のひとつである Tn 抗原を認識するマクロファージ C 型レクチンのよいリガンドになりうることを既に報告している⁶⁾。

ムチン型糖鎖の生合成は、ポリペプチド上の Ser 残基または Thr 残基に GalNAc 残基が転移されるところから始まり、この最初のステップは、UDP-GalNAc:ポリペプチド *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素 (pp-GalNAc-T) によって触媒される。本酵素は、II 型の膜貫通蛋白質で、ゴルジ体に局在して発現している。C 末端に、既知の植物レクチンと相同性をもつ部位が存在することも指摘されており⁷⁾、最近そのドメインが糖鎖を予めもった基質に対する酵素活性に関係していることが報告された⁸⁾。また、複数のアイソザイムの存在が報告されている⁹⁻¹⁷⁾。

消化管粘膜上皮細胞の産生するムチン、特に MUC2 ムチンのタンデムリピートのような糖鎖付加部位が連続するコアペプチド上における糖鎖付加の制御機構と生合成された糖鎖の生物学的意義については未解明な点が多かった。これらを明らかにするため、我々は MUC2 ムチンタンデムリピートの一部の配列に相当する配列への GalNAc 残基の付加の制御機構を解析した¹⁸⁻²¹⁾。初めに、MUC2 ムチンタンデムリピート部分に相当する配列をもつペプチドを Fmoc-固相法により合成した。合成ペプチドを中性付近の pH において FITC と反応させ、N 末端を蛍光標識し、これをアクセプター基質、UDP-GalNAc をドナー基質、酵素源としては、ヒト大腸癌 LS174T 細胞のミクロソーム画分を用い GalNAc 転移反応を行った。その結果、この反応系においては、最初に GalNAc 残基が付加される Thr 残基は 2 通りのみであり、おのおのについて、その後の GalNAc 残基の付加は厳密に制御され、ある一定の順序でのみ付加されていくことが明らかとなった。

MUC2 ムチンタンデムリピートにおける GalNAc 残基の付加の制御機構

Thr 残基が連続して並んでいる FM 2-1 ペプチド (FITC-PTTTPITTTTK) をアクセプター基質としてヒト大腸癌 LS174T 細胞のミクロソーム画分と 37°C で 3, 6, 18 時間反応後、反応産物を逆相 HPLC にて分取した (Fig. 1)。糖の付加していない未反応の基質はサンプル注入後 26.8 分で溶出された (peak g)。これよりも遅れて溶出されるピークは UDP-GalNAc 非存在下においても検

Fig. 1. Separation of glycosylated FM2-1 peptide corresponding to MUC2 by reversed-phase HPLC.

FM2-1 peptides were incubated with detergent-soluble microsome fractions from human colon carcinoma cell line LS174T and separated by reversed-phase HPLC on a C18 column. Elution profiles after 3-, 6-, and 18-h incubation periods are shown. Peaks a-g represent major peaks.

Fig. 2. Profiles of MALDI-TOF MS of glycosylated FM2-1 peptide separated by reversed-phase HPLC.

Mass indicates $[M+H]^+$ form.

出されることから、基質の分解物であると考えられる。糖の付加したペプチドは 23 分から 26 分の間に溶出された (peak a~f)。Peak a は 3 時間反応の時点では検出されず、6 時間反応産物中には検出されている。また、peak a, b, c の相対量は反応時間に依存して増加した。

各ピークについて溶媒を濃縮後、分子量を MALDI TOF-MS にて測定した (Fig. 2)。サンプルのイオン化を促進するためのマトリックスとして、 α -CHCA を用いた。Fig. 1 の peak g に含まれていた糖の付加していない未反応の基質の分子量は 1551.8 で、保持時間 25.8 分に溶出された peak f に含まれていた糖ペプチドの分子量は 1754.6 であり、その差は 203 マスで、GalNAc 残基が 1 個付加したものであることが示唆された。同様に、peak a~e に

含まれる糖ペプチドの分子量から、反応によって付加した GalNAc 残基の数が明らかとなった。例えば、peak e については測定結果は分子量 1958.3 であるので、2 個の GalNAc 残基が付加したものであることがわかる。Peak d, c, b については分子量がそれぞれ 2161.0, 2364.8, 2567.6 であったので、GalNAc 残基の付加数は、それぞれ 3, 4, 5 個であることが判明した。Peak a については、2771.3 および 2974.6 が検出されているが、これは GalNAc 残基が 6 個および 7 個付加した 2 種類の糖ペプチドが含まれていたと考えられる。ヒト大腸癌 LS174T 細胞のミクロソーム画分を酵素源として用いると、このペプチド (PTTTPITTTTK) の 7 個の Thr 残基すべてに GalNAc 残基が付加されることが示唆された。

Fig. 1 の peak a~g に含まれる糖ペプチドについて、GalNAc 残基の付加している Thr 残基を決定するため、各反応産物をプロテインシーケンサーにて解析した (Fig. 3)。この解析において、Thr 残基に GalNAc 残基が付加している場合、通常のエドマン分解反応後の産物である PTH-Thr-GalNAc はジアステレオマーを生成するため逆相 HPLC チャート上で、保持時間の異なる 2 つのピ

ークとして検出された。Fig. 3 に示したように、peak f および peak e は、それぞれ PTTT*PITTTTK (T* は Thr-GalNAc を示す。) および PTTT*PITTT*TK として同定された。Peak d については、逆相 HPLC の溶出条件を変化させ詳細に解析すると、3 個の GalNAc 残基が付加した糖ペプチドが 2 種類含まれていることが判明した。ひとつは、PTTT*PITT*T*TK (G3) で、もう一方は、PT*TTPIT*T*TTK (G3') であった。これらの相対量は蛍光強度から同程度であると推定された。Peak c は PTT*T*PITT*T*TK (G4) であった。しかしながら、ミクロソーム画分による酵素反応を 60 時間行くと、同じ溶出位置に新たなピークが検出され、GalNAc 残基の付加位置を解析すると、そのピークには、PT*TTPIT*T*T*TK (G4') が含まれていた。Peak b には主に PTT*T*PIT*T*T*TK (G5) が含まれていた。Peak a については、再度逆相 HPLC にて分画を行い、2 番目のピークについて解析を行うと、PT*T*T*PIT*T*T*TK (G6) であることが判明した。これらの結果は、糖鎖付加部位を複数もつムチンコアペプチドへの GalNAc 残基の付加は、ランダムな反応ではなく、付加する順序が厳密に

Fig. 3. Profiles of amino acid sequencing chromatograms of the MUC2 peptide FM2-1 and its derivatives with incorporated GalNAc residues.

Materials corresponding to peaks from reversed phase HPLC (6 h incubation) were analyzed on the Applied Biosystems 490 Procise protein sequencing system. Untreated FM2-1 and FM2-1 with 1-6 GalNAc residues were analyzed. These correspond to peaks g, f (G1), e (G2), d (G3 and G3'), c (G4), and b (G5). Materials in peak a were separated into two components by re-chromatography with an analytical C18 column and the second peak was sequenced (G6). Materials in peak d were further separated by the additional HPLC fractionation and analyzed separately (G3 and G3'). The G4' was obtained as a peak having a similar retention time as peak c when the incubation of peptide with the enzyme was extended to 60 h. All other components remained as single peaks on C18 columns after separation under a variety of conditions. Asterisks indicate putative peaks of PTH derivatives of α -GalNAc-Thr. Other amino acids were indicated by the one letter abbreviations.

制御されている反応であることを強く示唆している。

ここまでの結果を受けて、我々は、ヒト大腸癌 LS174T 細胞のミクロソーム画分を酵素源として用いたときの、MUC2 ムチンのタンデムリピートの一部の配列に相当する PTTTPITTTTK ペプチドにおける最初の GalNAc 残基の付加部位は Thr-2 および Thr-4 であり、おののについて、その後の GalNAc の付加順序がただ一通りに決まっているという仮説を立てた。

この仮説を検証するために、異なる Thr 残基に GalNAc 残基のひとつ付加した 2 種類の糖ペプチド、すなわち、PT*TTPITTTTK および PTTT*PITTTTK とを単離した。ヒト大腸癌 LS174T 細胞のミクロソーム画分と反応させることにより、これらの受容基質としての特異

性を解析した。反応産物の逆相 HPLC による分画結果を Fig. 4 に示した。MALDI-TOF MS によって明らかになった、各ピークに含まれている糖ペプチドの GalNAc 残基の付加数を図中に示した。PTTT*PITTTTK を基質としたとき、反応 12 時間後には 3 個の GalNAc 残基が付加したものが主であり、24 時間後には 5 個の GalNAc 残基が付加したものが主になった。GalNAc 残基の最大付加数は 7 個であった。GalNAc 残基が 2 個または 4 個付加した糖ペプチドは、3 個または 5 個付加した糖ペプチドに比べて相対的に少なく、中間産物として、これらは GalNAc 残基の付加を受けやすいものと考えられた。PT*TTPITTTTK を基質としたとき、反応主産物は、3 個の GalNAc 残基が付加した糖ペプチドで、最大付加数は 4 個であった。図中、24.0 分に溶出される # 印を付したピークは基質の分解産物と思われる。同様のピークは PTTT*PITTTTK を基質としたときには検出されなかった。

PT*TTPITTTTK あるいは PTTT*PITTTTK を基質として反応させたときに得られたすべてのピークについて、そこに含まれている糖ペプチドをプロテインシーケンサーにて解析し、GalNAc 残基の付加位置を決定した。その結果、PTTTPITTTTK を基質として反応させたときに得られたものと、GalNAc 残基の付加位置について同様なものが得られていることが判明した。ヒト大腸癌 LS174T 細胞のミクロソーム画分を酵素源、PT*TTPITTTTK あるいは PTTT*PITTTTK を基質として反応させると、おののについて、その後の GalNAc 残基の付加順序がただ一通りに決まっていることが強く示唆された。さらに、PTT*T*PITT*T*TK および PT*TTPIT*T*T*TK を単離し、これらを基質として用い解析を行うと、PTT*T*PITT*T*TK からは、PTT*T*PIT*T*T*TK, PT*T*T*PIT*T*T*TK, PT*T*T*PIT*T*T*T*TK が合成されるが、PT*TTPIT*T*T*TK はほとんど GalNAc 残基の付加を受けないことがわかった。

考 察

以上の結果に基づく、ヒト大腸癌 LS174T 細胞のミクロソーム画分による MUC2 ムチンタンデムリピートの一部に相当する PTTTPITTTTK への GalNAc 残基の付加経路を Fig. 5 に模式的に示した。ここに示した 2 通りの生合成経路のみが存在するならば、PTTTPITTTTK への GalNAc 残基の付加は pp-GalNAc-T の基質特異性に基づいて各段階において厳密に制御されていると考えられる。理論上、GalNAc 残基の付加経路は $7! (1+1/1!+1/2!+1/3!+1/4!+1/5!+1/6!+1/7!)$ 通り存在するが、ヒト大腸癌 LS174T 細胞のミクロソーム画分を酵素源とし

Fig. 4. Reverse-phase HPLC analysis of PTTT*PITTTTK and PT*TTPITTTTK glycopeptides after incubation with UDP-GalNAc and microsome fractions of LS174T cells.

(A) Elution profiles from a C18 column of PTTT*PITTTTK after incubation with LS174T microsome fractions for 0, 3, 6, 12, or 24 h. (B) Elution profiles from a C18 column of PT*TTPITTTTK after incubation with LS174T microsome fractions for 0, 3, 6, 12, or 24 h. The numbers associated with the peaks indicate the number of attached GalNAc on the core peptide. Hash marks (#) indicated peaks which represent potential degradation products of molecular masses 909 and 1107 (as estimated by MALDI-TOF MS).

Fig. 5. Schematic representation of the pathways of GalNAc incorporation into a MUC2 peptide, PTTTPITTTTK, incubated with UDP-GalNAc and microsome fractions of LS174T human colon carcinoma cells.

Open circles: GalNAc residues likely to be transferred in the reaction immediately prior to the formation of the structure; closed circles: GalNAc attached to the peptide in the previous reactions.

た場合には、このうちの2通りのみが選択されていることになる。また、本研究により、ペプチドへの最初のGalNAc残基の付加位置によって、その後のGalNAc残基の付加順序が一義的に決定されることが示唆された。

これまでに、少なくとも9種類のヒトpp-GalNAc-T遺伝子がクローニングされている。我々は抗体染色によりヒト大腸癌LS174T細胞が少なくともpp-GalNAc-T1, -T2, -T3, -T4を蛋白質レベルで発現しており、これらに加えて、mRNAレベルではpp-GalNAc-T6, -T7, -T8もこの細胞は発現していることをRT-PCR法によって確認している。バキュロウイルス発現系にて作製した組み換え型pp-GalNAc-T1, -T2, -T3, -T4は、おのおの、PTTTPITTTTKに対して異なる特異性を示した。これらの組み換え型酵素単独では、ヒト大腸癌LS174T細胞のミクロソーム画分を酵素源としたときにみられたGalNAc残基の付加経路は再現されなかった。各ステップにおいて、どのpp-GalNAc-Tが作用しているかは検討すべき今後の課題である。

pp-GalNAc-Tの活性が、基質のアミノ酸配列に影響を受けるという多くの報告がある^{22,23)}。しかしながら、ムチンタンデムリピートのようなSer残基またはThr残基が連続する配列においてGalNAc残基がどのような順序で付加されるかという視点に立った研究は、これまでにほとんどなかった²⁴⁾。本研究で用いた反応は、*in vitro*の無細胞系であり、ここで得られた知見が*in vivo*のムチン型糖鎖の生合成をどれだけ反映し得るのか今後検証していきたいと考えている。

文 献

- 1) Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 607-34.
- 2) Kim YS, Gum J, Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J* 1996; 13: 693-707.
- 3) Gum JR, Hicks JW, Toribara NW, Siddiki B, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. *J Biol Chem* 1994; 269: 2440-6.
- 4) Byrd JC, Nardelli J, Siddiqui B, Kim YS. Isolation and characterization of colon cancer mucin from xenografts of LS174T cells. *Cancer Res* 1988; 48: 6678-85.
- 5) Inoue M, Yamashina I, Nakada H. Glycosylation of the tandem repeat unit of the MUC2 polypeptide leading to the synthesis of the Tn antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 23-7.
- 6) Iida S, Yamamoto K, Irimura T. Interaction of human macrophage C-type lectin with O-linked N-acetylgalactosamine residues on mucin glycopeptides. *J Biol Chem* 1999; 274: 10697-705.
- 7) Imberty A, Piller V, Piller F, Breton C. Fold recognition and molecular modeling of a lectin-like domain in UDP-GalNAc: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Protein Eng* 1997; 10: 1353-6.
- 8) Hassan H, Reis C, Bennett EP, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Hollingsworth MA, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Clausen H. The lectin domain of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T4 directs its glycopeptide specificities. *J Biol Chem* 2000; 275: 38197-205.
- 9) Homa FL, Hollander T, Lehman DJ, Thomsen DR, Elhammer AP. Isolation and expression of a cDNA clone encoding a bovine UDP-GalNAc: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *J Biol Chem* 1993; 268: 12609-16.
- 10) White T, Bennett EP, Takio K, Sorensen T, Bonding N, Clausen H. Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *J Biol Chem* 1995; 270: 24156-65.
- 11) Bennett EP, Hassan H, Clausen H. cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T3. *J Biol Chem* 1996; 271: 17006-12.
- 12) Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Hollingsworth MA, Merckx G, Kessel AGV, Eiberg H, Steffensen R, Clausen H. Cloning of a human UDP-N-acetyl-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat. *J Biol Chem* 1998; 273: 30472-81.
- 13) Bennett EP, Hassan H, Hollingsworth MA, Clausen H. A novel human UDP-N-acetyl-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase,

- GalNAc-T7, with specificity for partial GalNAc-glycosylated acceptor substrates. *FEBS Lett* 1999; 460: 226-30.
- 14) Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Hollingsworth MA, Akisawa N, Ikematsu Y, Merckx G, van Kessel AG, Olofsson S, Clausen H. Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6. *J Biol Chem* 1999; 274: 25362-70.
- 15) Simmons AD, Musy MM, Lopes CS, Hwang L-Y, Yang Y-P, Lovett M. A direct interaction between EXT proteins and glycosyltransferase is defective in hereditary multiple exostoses. *Human Mol Genetics* 1999; 8: 2155-64.
- 16) White KE, Lorenz B, Evans WE, Meitinger T, Strom TM, Econs MJ. Molecular cloning of a novel human UDP-N-acetyl-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T8, and analysis as candidate autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene. *Gene* 2000; 246: 347-56.
- 17) Toba S, Tenno M, Konishi M, Mikami T, Itoh N, Kurosaka A. Brain-specific expression of a novel human UDP-GalNAc: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T9). *Biochim Biophys Acta* 2000; 1493: 264-8.
- 18) Iida S, Takeuchi H, Hassan H, Clausen H, Irimura T. Incorporation of N-acetylgalactosamine into consecutive threonine residues in MUC2 tandem repeat by recombinant human N-acetyl-D-galactosamine transferase-T1, T2 and T3. *FEBS Lett* 1999; 449: 230-4.
- 19) Iida S, Takeuchi H, Kato K, Yamamoto K, Irimura T. Order and maximum incorporation of N-acetyl-D-galactosamine into threonine residues of MUC2 core peptide with microsome fraction of human-colon-carcinoma LS174T cells. *Biochem J* 2000; 347: 535-42.
- 20) Kato K, Takeuchi H, Kanoh A, Mandel U, Hassan H, Clausen H, Irimura T. N-acetylgalactosamine incorporation into a peptide containing consecutive threonine residues by UDP-N-acetyl-D-galactosaminide: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 2001; 11: 821-9.
- 21) Kato K, Takeuchi H, Miyahara N, Kanoh A, Hassan H, Clausen H, Irimura T. Distinct orders of GalNAc incorporation into a peptide with consecutive threonines. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 110-5.
- 22) Yoshida A, Suzuki M, Ikenaga H, Takeuchi M. Discovery of the shortest sequence motif for high level mucin-type O-glycosylation. *J Biol Chem* 1997; 272: 16884-8.
- 23) Wandall H, Hassan H, Mirgorodskaya E, Kristensen AK, Roepstorff P, Bennett EP, Nielsen PA, Hollingsworth MA, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Clausen H. Substrate specificities of three members of the human UDP-N-acetyl-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3. *J Biol Chem* 1997; 272: 23503-14.
- 24) Hanisch F-G, Muller S, Hassan H, Clausen H, Zachara N, Gooley AA, Paulsen H, Alving K, Peter-Katalinic J. Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-N-acetylgalactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *J Biol Chem* 1999; 274: 9946-54.