

## 論文内容の要旨

### 論文題目

# 可溶性糖転移酵素による糖鎖修飾伸長反応とマメ科レクチン WJA を用いた 新規 O-GlcNAc 修飾検出方法の確立

氏名 安保博仁

### 【序論】

小胞体やゴルジ体内でおこるタンパク質の糖鎖修飾とは異なり、細胞質内では、セリン/スレオニン残基の  $\beta$ -N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 修飾が起こる。この糖修飾は、菌類・植物・動物に至るまで広く存在することから、生物機能において大変重要な役割を担っていると考えられており、その詳細な研究が盛んに行われている。しかし、研究を行う上で以下の二点が問題であった。

**問題点 1** 細胞内には O-GlcNAc 加水分解酵素 (OGA) が存在するために O-GlcNAc 修飾は可逆的である。よって、これまでに報告されている O-GlcNAc 修飾タンパク質は、たまたま修飾されていたわずかなものを検出したに過ぎない。

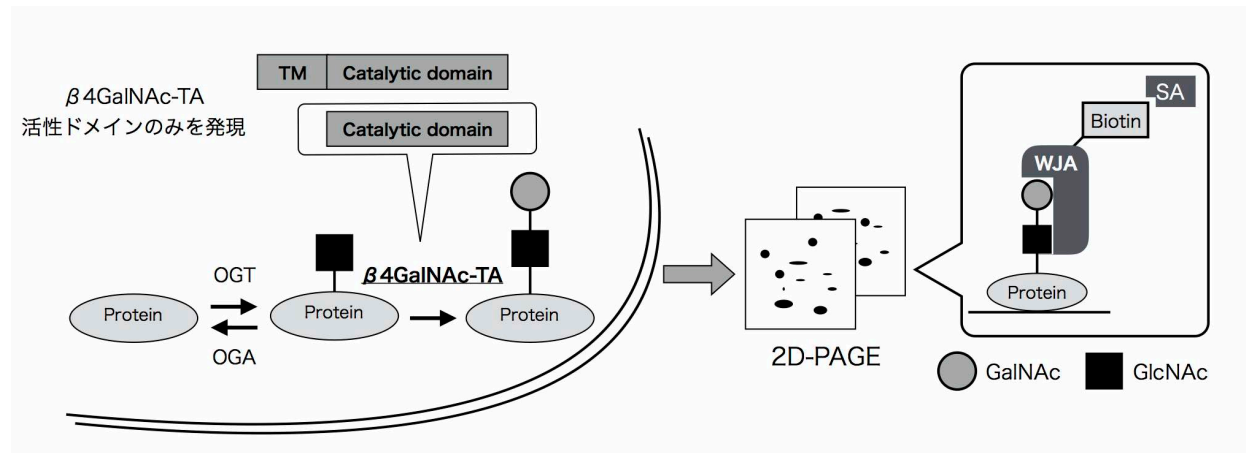
**問題点 2** 抗 O-GlcNAc 抗体として用いられている RL2 あるいは CTD110.6 は O-GlcNAc 修飾ペプチドを抗原として作製しているため、少なからずアミノ酸配列依存的であり、O-GlcNAc 修飾を網羅的に検出することができない。糖鎖のみを認識するレクチンが網羅的なプローブとして考えられるが、GlcNAc 特異的レクチン WGA (Wheat germ agglutinin) はシアル酸にも結合することから GlcNAc 特異的とは言えない。

本研究では、上記の点を解決するために糖転移酵素とレクチンを用いた新規 O-GlcNAc 修飾検出方法の確立を目指した。本来ゴルジ体に局在している N-アセチルガラクトサミン転移酵素 ( $\beta$ 4GalNAc-TA) の膜貫通領域を除いた活性ドメインを細胞質内に発現させ、ヒストンや転写因子等の O-GlcNAc を伸長させることで GalNAc  $\beta$ 1-4GlcNAc とし、OGA が作用できない安定な糖鎖に改変する。GalNAc  $\beta$ 1-4GlcNAc に誘導された O-GlcNAc 修飾は OGA による加水分解を免れ細胞内に安定的に蓄積されるので、O-GlcNAc 修飾の履歴を確実に残すことができる。さらに、この GalNAc-GlcNAc 糖鎖構造を GalNAc-GlcNAc 特異的マメ科レクチン WJA で検出する (Fig. 1)。最後に、検出された修飾タンパク質を質量分析によって同定する。

我々の研究室では最近、GalNAc-GlcNAc 構造に特異的に結合するレクチンとしてナツフジ種子より WJA (*Wisteria japonica* agglutinin) を発見した。WJA は GalNAc-GlcNAc 構造に対する特異性が非常に高い。さらに、WJA の GalNAc-GlcNAc に対するアフィニティーは WGA の GlcNAc に対するアフィニティーよりも高いことから、O-GlcNAc 修飾が伸長した GalNAc-GlcNAc 糖鎖構造を検出するプローブとして適しており、また大量精製が可能である。

本研究は、本来可逆的な O-GlcNAc 修飾を不可逆的な修飾へと変えてしまうという新しい視点に基づ

いているため、これまで微量にしか存在しないがために見つかってこなかった新たな *O*-GlcNAc 修飾たんぱく質が発見されることが期待される。

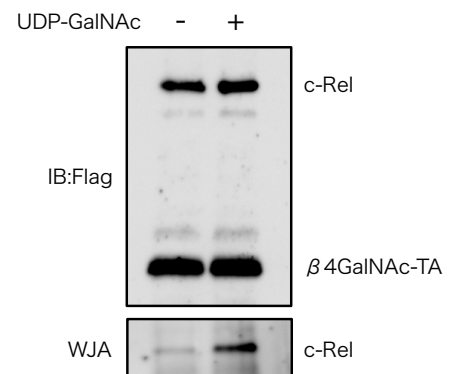


**Figure 1.** マメ科レクチン WJA を用いた *O*-GlcNAc 修飾検出方法の概略  
糖転移酵素  $\beta$  4GalNAc-TA の酵素活性ドメインを細胞質・核に発現させ、*O*-GlcNAc 修飾タンパク質の糖鎖を GalNAc  $\beta$  1-4 GlcNAc に改変する。改変糖鎖構造をマメ科レクチン WJA で検出する。

## 【結果】

### 1. *In vitro* において糖転移酵素 $\beta$ 4GalNAc-TA は *O*-GlcNAc 修飾を伸長する

まず、糖転移酵素  $\beta$  4GalNAc-TA を用いて *O*-GlcNAc 修飾を伸長することが可能かを検討するため、*In vitro* 糖鎖伸長アッセイを行った。モデルタンパク質として c-Rel を用いた。c-Rel は 350 残基目のセリン一箇所のみが *O*-GlcNAc 修飾されていることが報告されている転写因子である (Parameswaran et al., 2013)。HEK293T 細胞により発現、精製した Flag タグ付加  $\beta$  4GalNAc-TA と c-Rel にドナーである UDP-GalNAc を加たところ、WJA のシグナルが検出された (Fig. 2)。以上の結果より、*O*-GlcNAc 修飾を糖転移酵素  $\beta$  4GalNAc-TA により伸長し GalNAc  $\beta$  1-4GlcNAc 構造に改変できること、また改変糖鎖構造をマメ科レクチン WJA で検出できることが分かった。



**Figure 2.** *In vitro* における糖鎖伸長反応  
UDP-GalNA 添加時においてのみ WJA のシグナルが検出された。

### 2. 糖転移酵素 $\beta$ 4GalNAc-TA は細胞内においても *O*-GlcNAc 修飾を伸長する

可溶性の糖転移酵素  $\beta$  4GalNAc-TA が細胞内でも *O*-GlcNAc 修飾を伸長することができるかを検討した。モデルとしてヒストンを用いることとした。先行研究よりヒストン H2A、H2B、H3、H4 が *O*-GlcNAc 修飾を受けることが報告されている (Sakabe et al. 2010; Fujiki et al. 2011; Fong et al. 2012)。糖転移酵素  $\beta$  4GalNAc-TA を発現させた HEK293T 細胞より、酸抽出によりヒストンを精製した。精製したヒストンを電気泳動および WJA を用いたレクチンブロッティングに供したところ、糖転移酵素を発現する

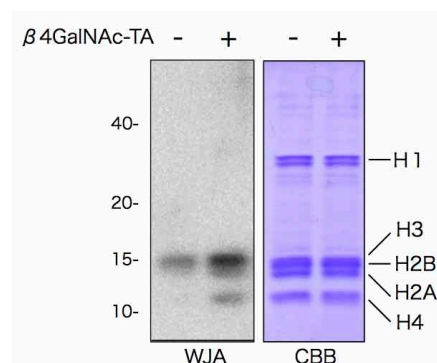
細胞のヒストンのみにシグナルが検出された (Fig. 3)。よって、ヒストンの *O*-GlcNAc も糖転移酵素により伸長しており、細胞内でも糖転移酵素  $\beta$  4GalNAc-TA は *O*-GlcNAc 修飾を伸長することが分かった。

### 3. Thiamet G 処理における *O*-GlcNAc 修飾亢進の検出

細胞内においても糖転移酵素は *O*-GlcNAc 修飾を伸長することが分かったため、続いて OGA 特異的阻害剤である Thiamet G 処理による *O*-GlcNAc 修飾の亢進を WJA で検出できるか検証した。糖転移酵素を発現させた HEK293T 細胞に Thiamet G を添加後 48 時間培養し、回収後二次元電気泳動および WJA レクチンブロットを行った。結果、Thiamet G 処理においてスポットの増強が見られた (Fig. 4(A) 上)。また、 $\beta$  4GalNAc-TA を発現させない細胞では、この変化は検出されなかった (Fig. 4(A) 下)。

### 4. 既存の *O*-GlcNAc 修飾検出プローブとの比較

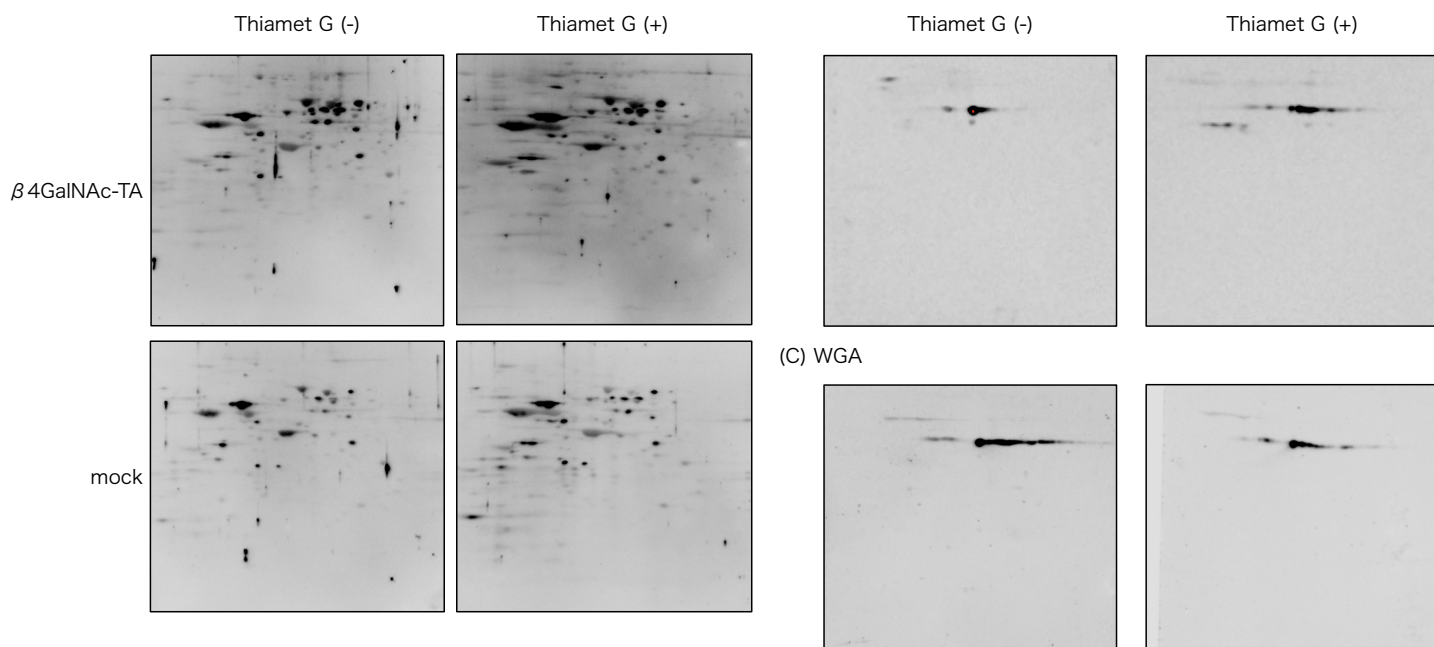
*O*-GlcNAc 修飾検出プローブとして現在用いられている *O*-GlcNAc 抗体 RL2、GlcNAc 特異的レクチン WGA と本手法の比較を行った。細胞ライセートを二次元電気泳動に供した結果、RL2 および WGA で検出されたスポット増強に比べ、WJA において検出されたスポット増強の方が顕著であった (Fig. 4(A) (B) (C))。よって、今回の新規手法はこれまで用いられてきたプローブに比べ高感度であることが分かった。



**Figure 3.** ヒストンの *O*-GlcNAc 修飾伸長反応とレクチンブロット  
糖転移酵素を発現させた HEK293 細胞より精製したヒストンでのみ WJA のシグナルが検出された。

(A) WJA

(B) RL2



**Figure 4.** RL2、WGA、WJA を用いた *O*-GlcNAc 修飾検出の比較

(A) 糖転移酵素を発現させた HEK293 細胞を Thiamet G で処理することにより、WJA のシグナルの増加が検出された。この増加は、糖転移酵素を発現しない細胞では検出されなかった。(B) 抗 *O*-GlcNAc 抗体 RL2 を用いたウエスタンブロット。(C) GlcNAc 特異的レクチン WGA を用いたレクチンブロット。(A)(B)(C)ともにタンパク量を揃えて泳動している。

## 5. MALDI-TOF MS を用いたプロテオーム解析

質量分析の手法を用いて、Thiamet G処理によって増加するO-GlcNAc修飾タンパク質の同定を試みた。糖転移酵素  $\beta$  4GalNAc-TAを発現させたHEK293T細胞をThiamet G処理して調製したライセートを二次元電気泳動に供し、レクチンブロットにおいて強度が増強したスポットをゲル内トリプシン消化、MALDI-TOF MSによるタンパク同定を行った。結果、先行研究により報告のあったO-GlcNAc修飾タンパク質に加え、新規O-GlcNAc修飾タンパク質を多数同定することができた (Table 1)。

Table 1. 検出されたO-GlcNAc修飾タンパク質

先行研究により報告のあるO-GlcNAc修飾タンパク質
Heat shock cognate 71 kDa protein
Eukaryotic initiation factor 4A-I
40S ribosomal protein SA
Proliferating cell nuclear antigen
新規O-GlcNAc修飾タンパク質
Chloride intracellular channel protein 1
Prohibitin
Rho GDP-dissociation inhibitor 1
Proteasome subunit beta type-4
Actin/ANKRD26-like family C member 1B
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I

### 【結論と展望】

これまでO-GlcNAc修飾を高感度かつ網羅的に検出できるプローブは存在しなかった。しかし、糖転移酵素  $\beta$  4GalNAc-TA と GalNAc-GlcNAc 特異的レクチン WJA を組み合わせた本手法を用いることで、既存の手法よりも高感度かつ網羅的にO-GlcNAc修飾を検出することができた。また、MALD-TOF/MSによってタンパク同定を試みたところ、これまで報告されてきたO-GlcNAc修飾タンパク質に加え、新規O-GlcNAc修飾タンパク質を同定することができた。これは、細胞内でOGAによる分解を避けることに加え、GalNAc-GlcNA糖鎖構造を持ったO-GlcNAc修飾タンパク質が細胞内に蓄積されたことで感度が上昇したからであると考えられる。現在レクチンアフィニティーカラムによる濃縮条件を検討しており、さらなる網羅的なプロテオミクスを行っていく予定である。また、O-GlcNAc修飾がダイナミックに変化する刺激として細胞外グルコース濃度、酸化ストレス、塩ストレスなどが知られている。今回我々が提案する糖転移酵素とレクチンWJAを用いた方法でこれら刺激に対するO-GlcNAc修飾タンパク質の変化を追跡すれば、これまでに報告されていないO-GlcNAc修飾タンパク質の関わりが明らかになり、研究のさらなる発展が見込まれる。

### 【論文発表】

1. **Abo, H.**; Soga, K.; Tanaka, A.; Tateno, H.; Hirabayashi, J.; Yamamoto, K., Mutated Leguminous Lectin Containing a Heparin-binding Like Motif in a Carbohydrat-Binding Loop Specifically Binds to Heparin. *PLoS One* **2015** 29;10(12) :e0145834.
2. Soga, K.; **Abo, H.**; Qin, S.-Y.; Kyoutou, T.; Hiemori, K.; Tateno, H.; Matsumoto, N.; Hirabayashi, J.; Yamamoto, K., Mammalian Cell Surface Display as a Novel Method for Developing Engineered Lectins with Novel Characteristics. *Biomolecules* **2015**, 5 (3), 1540-1562.