

# 論文審査の結果の要旨

氏名 安保 博仁

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問題が障壁となっている。即ち、細胞内には *O*-GlcNAc 加水分解酵素 (OGA) が存在し *O*-GlcNAc 修飾は可逆的であるため、僅かな *O*-GlcNAc 修飾タンパク質を検出するに過ぎなかった。また、汎用されている抗 *O*-GlcNAc 抗体は *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かった。さらに、GlcNAc 特異的レクチン WGA (Wheat germ agglutinin) も多用されているが、シアル酸にも結合することから GlcNAc 特異的ではない。そこで本研究では、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という利点がある。さらに、この GalNAc-GlcNAc 糖鎖構造は哺乳動物細胞には発現していない糖鎖であり、また GalNAc-GlcNAc 特異的マメ科レクチン WJA (*Wisteria japonica* agglutinin) を新規に見出したが、これが伸長した糖鎖構造に最適のプロープであると共に、大量に入手できるという利点がある。そこで本研究は、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き、これまで微量にしか存在しないがために見つかったこなかった新たな *O*-GlcNAc 修飾タンパク質を探索することとした。

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。HEK293T 細胞により発現・精製した Flag タグ付加  $\beta$ 4GalNAc-TA と c-Rel、

さらにドナーである UDP-GalNAc を加えたところ、WJA のシグナルが検出され、 $\beta$ 4GalNAc-TA により伸長し GalNAc  $\beta$ 1-4GlcNAc 構造がマメ科レクチン WJA で検出できることが分かった。次に、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。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キングに供したところ、糖転移酵素を発現する細胞由来のヒストンのみにシグナルが検出された。これらの結果から、ヒストンの *O*-GlcNAc も糖転移酵素により伸長しており、細胞内においても糖転移酵素  $\beta$ 4GalNAc-TA は *O*-GlcNAc 修飾を伸長することが分かった。*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、GlcNAc 特異的レクチン WGA と本手法の比較を行った結果、抗 *O*-GlcNAc 抗体で検出されたスポットに比べ、WJA において検出されたスポットがはるかに顕著であり、従来のプローブに比べ高感度かつ広範囲に渡って検出が可能であることが分かった。

次に糖転移酵素  $\beta$ 4GalNAc-TA を発現させた HEK293T 細胞から Thiamet G 処理して調製したライセートを作成し、二次元電気泳動、レクチンブロットにおいて強度が増強したスポットを回収した。さらに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、既に報告のある *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、従来法に比べて本手法の優位性を明らかにした。

本論文の内容は論文提出者が全てに渡って主体となって解析及び考察を行ったものであり、論文提出者の寄与は十分に満たされていると判断できる。従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上、1,942字