

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03639

研究課題名(和文)可溶性GalNAc転移酵素を用いたO-GlcNAc修飾タンパク質の網羅的機能解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of O-GlcNAcylated proteins using soluble GalNAc-transferase

研究代表者

山本 一夫 (Yamamoto, Kazuo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20174782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子等のO-GlcNAc修飾が細胞の分化や増殖を誘導するとともに、これらタンパク質のプロテオスタシスを制御していることが知られている。このような重要性が指摘されているにも拘わらず、O-GlcNAc修飾の解析には多くの困難がある。本課題では、高感度なO-GlcNAc修飾タンパク質の検出法、修飾部位の同定方法、修飾部位特異的な抗体の作成技術、抗体を用いたO-GlcNAc修飾タンパク質の動的観察、BioID法を用いた相互作用タンパク質の特定を通して、O-GlcNAc修飾タンパク質の機能解明に通じる流れを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の機能を制御する薬剤が多数作られることにより、さまざまな病気を治療し改善することが可能となっているが、核内・細胞質内のO-GlcNAc修飾を標的とした創薬は未だに何一つ行われていない。多くの創薬標的分子に関して、さまざまな薬剤の開発が試みられているように、今回の研究の対象とした核内・細胞質内タンパク質のO-GlcNAc修飾が新たな創薬標的分子の一つの大きな対象となりうることを示し、そのアプローチの道筋を開いた成果と考える。

研究成果の概要(英文)：It is well known that O-GlcNAcylation of nuclear and cytoplasmic proteins, such as transcription factors, induces differentiation and proliferation of the cell and furthermore, such modification regulates their proteostasis. We noticed that O-GlcNAcylation of proteins plays an important role in their functions, however there are many difficulties in their biochemical and biological analyses. In this project, we established many kinds of analytical methods to clarify the meaning of O-GlcNAc modification of proteins through high sensitive identification of O-GlcNAcylated proteins, identification of GlcNAc-modified residues, establishment of antibodies specific for GlcNAc-modified residues, observation of dynamic protein modification by O-GlcNAc, and identification interacting partner protein with O-GlcNAcylated proteins.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 翻訳後修飾 糖転移酵素

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞質や核内タンパク質の  $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) 修飾は、リン酸化と競合してさまざまなシグナル伝達を制御している。転写因子やアダプター分子の *O*-GlcNAc 修飾が細胞の分化や増殖を誘導するとともに、ヒストンの *O*-GlcNAc 修飾は、メチル化やアセチル化と同様のヒストンコードの一つと捉えられている。このような重要性が指摘されているにも拘わらず、*O*-GlcNAc 修飾の解析には多くの困難があり、未だに報告は僅かである。その理由は、第一に *O*-GlcNAc を特異的に検出する抗体等のプローブが存在しないこと、第二に、*O*-GlcNAc 修飾は可逆的であり、ごく一部のタンパク質のみ (1%前後) しか修飾を受けていないことから、修飾部位の特定が困難であることなどが挙げられる。これを解決するために、我々は可溶性 GalNAc 転移酵素を細胞質あるいは核内に発現させて、*O*-GlcNAc を GalNAc-GlcNAc へ伸長させる方法を確認した (disaccharide-tag 法)。この手法は、(1)2 糖に伸長させることにより *O*-GlcNAc が分解されずに蓄積すること、(2)GlcNAc 単糖に比べ 2 糖ははるかに強い親和力をもち追跡しやすいこと、(3)GalNAc-GlcNAc は哺乳動物細胞に発現していないこと、(4)この 2 糖を特異的に認識する植物レクチン *Wisteria japonica* lectin (WJA) を大量に調製できるという利点がある。そして何よりも、ペプチド部分を認識する抗体とは異なり *O*-GlcNAc 修飾を平等かつ高感度に検出できるようになった。事実、従来の *O*-GlcNAc の検出として現在世界中で用いられているモノクローナル抗体 RL2 や CTD110.6、そして小麦胚芽レクチン WGA と比較すると、その感度の違いは歴然と異なり高感度であることがわかる。すなわち、この手法が確立できたことによって、*O*-GlcNAc 修飾の生物学的意義が初めて追跡できる状況になった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞質、核内、ミトコンドリア内に存在するタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾の生物学的意義を解明するオールマイティーな手法を確認することである。今まで *O*-GlcNAc 修飾の検出そのものが不十分であったため、細胞質や核内タンパク質の  $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) 修飾の意義についてはほとんど議論がされてこなかった。この *O*-GlcNAc 修飾は従来の糖鎖修飾とはさまざまな点で異なっており、リン酸化と拮抗してさまざまなシグナル伝達を制御している。しかし、ミリ秒の反応であるリン酸化とは異なり糖は安定であるため、長期のタイムスパンで進行する生存シグナル (恒常性の維持) に関わる制御機構と考えられる。それ故、神経変性疾患などの恒常性維持の低下や、逆に恒常性維持の亢進したがんなどの疾患においても、*O*-GlcNAc 修飾は深く関与していると考えられる。これら *O*-GlcNAc 修飾の生物学的意義を明らかにするために、個々のタンパク質の修飾部位を明らかにする手法から、修飾部位特異的な抗体の作出、抗体を用いた *O*-GlcNAc 修飾タンパク質の細胞内動態の解析、またその修飾部位特異的に相互作用するパートナー分子の探索などの一連の解析プラットフォームを確認し、最終的に細胞の機能にどのような影響を及ぼすかを一つ一つ明らかにする手法を確認することを目標とする。

### 3. 研究の方法

#### 1. 細胞質、核を標的とする可溶性 GalNAc 転移酵素ベクターの作製

*O*-GlcNAc 修飾タンパク質は従来の糖タンパク質とはオリエンテーションが異なり、核や細胞質に存在する。我々の樹立した disaccharide-tag 法では可溶性 GalNAc 転移酵素を細胞内に発現させ GlcNAc を GalNAc-GlcNAc へ伸長させて感度良く検出する手法であるが、この可溶性 GalNAc 転移酵素を核内に発現させることにより核内に存在する *O*-GlcNAc 修飾タンパク質にのみ GalNAc-GlcNAc タグを作らせて核内の *O*-GlcNAc 修飾タンパク質のみを追跡する手法を検討する。具体的には、SV40T 抗原の核移行シグナルを付加した可溶性糖転移酵素 (Flag タグを同時に付加) の発現ベクターを構築し、HEK293 細胞等に発現させる。48 時間後、細胞を回収しライセートを調製して以下の分析に供する。なお、可溶性糖転移酵素が目的のオルガネラに限局して発現しているか否かは抗 Flag タグ抗体を用いて細胞染色を行い確認する。

#### 2. 2次元電気泳動 (2D-PAGE) による *O*-GlcNAc タンパク質の検出と質量分析による同定

上記で調製した細胞のライセートを 2次元電気泳動に供し、ウェスタンブロッティングの後、GalNAc-GlcNAc を特異的に認識する WJA レクチンを用いて検出を行う。WJA レクチンが GalNAc-GlcNAc 特異的で最適なレクチンであることは既に報告済みである。WJA で染色さ

れたスポット（あるいはそれに相当するもの）をゲルから切り出した後、トリプシンによるゲル内消化をし、ペプチドを回収し MALDI-TOF MS あるいは LC-MS/MS 質量分析を用いてタンパク質の同定を行う。

### 3. O-GlcNAc 修飾ペプチドの濃縮と質量分析による修飾部位の特定

O-GlcNAc 修飾は 1%前後と極めて僅かであり、修飾されたアミノ酸残基を同定するためには、上記のトリプシン消化物の中から O-GlcNAc ペプチドを選択的に回収する必要がある。また、糖の修飾により親水性が高くなり、従来の C18 の疎水性レジンによる回収が悪い可能性も考えられる。そこで、WJA レクチンを固相化したアフィニティカラムを作製し、これに吸着するペプチドを回収することにより、O-GlcNAc 修飾ペプチドを濃縮することを試みる。濃縮した糖ペプチドの LC-MS/MS 解析は、最新の Orbitrap 型質量分析計を用いて行う。

### 4. O-GlcNAc 修飾ペプチドに対する抗体の作製

上記で特定したアミノ酸残基に GlcNAc 修飾を施した糖ペプチドを化学合成する。この糖ペプチドをウサギに免疫をし、ポリクローナル抗体を作成する。得られた抗血清より、硫酸沈殿、DEAE-Sepharose による陰イオン交換クロマトグラフィーにより IgG 画分を精製する。次に O-GlcNAc 修飾ペプチドおよび未修飾の単純ペプチドを固相化したゲルを作成し、O-GlcNAc 修飾ペプチドに結合し、修飾のない単純ペプチドには結合しない画分を取得する。

### 5. O-GlcNAc 修飾タンパク質と相互作用するパートナー分子のプルダウンによる探索

O-GlcNAc 修飾タンパク質と相互作用する分子を特定するために、HEK293 細胞内に Myc-tag 付加したタンパク質を発現させた。この細胞の cell lysate を調製し、上記で調製した O-GlcNAc 修飾ペプチドに対する抗体を用いてプルダウンを行った。具体的には、protein A ビーズに抗体を吸着させ、洗浄後に可溶化バッファーで溶出し二次元電気泳動で解析をする。O-GlcNAc 修飾タンパク質は抗 Flag-tag 抗体で追跡ができるので、それ以外のスポットが相互作用するパートナー分子と考えられる。

### 6. WJA-ビオチンリガーゼ (R118G) 融合タンパク質の作成

O-GlcNAc 修飾タンパク質と相互作用する分子を特定する別法として、プルダウンの効率が悪い理由として洗浄等の操作により相互作用しているタンパク質が解離してしまう可能性が考えられたので、洗浄をせずに相互作用タンパク質をビオチン化し、その後、ストレプトアビジンを用いて検出・精製をする手法を試みる。その前段階として、WJA-ビオチンリガーゼ (R118G) 融合タンパク質を作成することとした。第一の手法として、WJA, BirA (R118G)、IgG-Fc のそれぞれの cDNA をさまざまな組み合わせで繋いで pCAGGS に組み込み、融合タンパク質をコードする発現ベクターを作成する。このベクターを CHO 細胞に形質転換し puromycin で選別を行った後、培養上清中から protein A-Sepharose カラムを用いて融合タンパク質を精製する。いろいろな組み合わせが考えられるので、レクチン活性およびビオチンリガーゼ活性を持ち備え、且つ発現効率のよいものを調べることにする。

### 7. WJA-ビオチンリガーゼ (R118G) 融合タンパク質を用いた相互作用タンパク質の同定

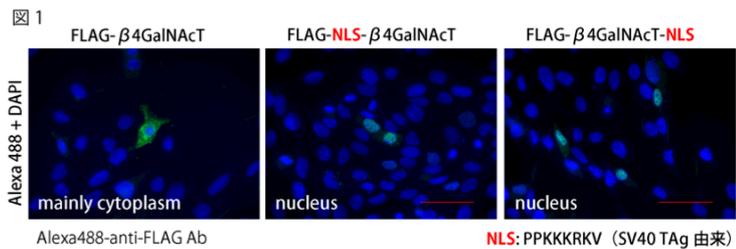
O-GlcNAc 修飾タンパク質と相互作用する分子を特定する別法として、WJA-ビオチンリガーゼ (R118G) (BirA (R118G)) を用いてビオチン化する手法を検討する。BirA (R118G) は本来の認識ペプチド配列の有無にかかわらず活性化された変異体であり、産生されるビオチン-5'-AMP は高い反応性を有する。しかし、ビオチン-5'-AMP は不安定な化合物であり直ぐに壊れてしまうため、10Å 程度のごく近傍のタンパク質のみをビオチン化する。これを利用して、GalNAc 転移酵素と一緒に WJA-BirA (R118G) を細胞内に発現させ、GalNAc-GlcNAc タグをもつタンパク質と相互作用する候補分子を探索する。これら相互作用候補タンパク質の同定は、上記 2 の項目と同様の質量分析を用いて行う。

## 4. 研究成果

### 1. 細胞質、核を標的とする可溶型 GalNAc 転移酵素ベクターの作製

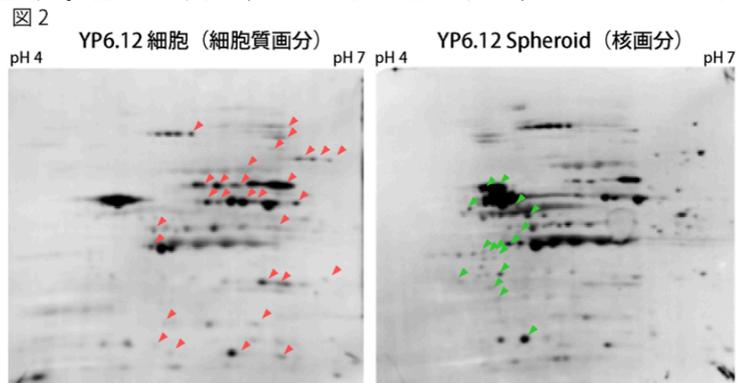
本手法では GlcNAc に GalNAc を転移させて disaccharide-tag を導くことにより、tag 修飾されたタンパク質を蓄積させること、2糖に伸長させることによりレクチンとの親和を上昇させることとし、特異性を上げて高感度に検出することにした。可溶型 GalNAc 転移酵素の N 末

端、あるいはC末端にSV40T抗原の核移行シグナルの配列 (PPKKKRKV) を付加した発現ベクターを作成した。細胞内に発現させる可溶性GalNAc転移酵素にこの核移行シグナルを付加した2種類の発現ベクターをHEK293細胞に形質転換し、N末端に付加したFlagタグに対する抗体で細胞での局在を調べた。その結果、N末端およびC末端に核移行シグナルを付加したものでは、いずれも核内に局限して発現している一方、付加しないものでは主に細胞質に分布していることが明らかになった(図1)。



## 2. 二次元電気泳動 (2D-PAGE) による O-GlcNAc タンパク質の検出と質量分析による同定

次に、このN末端に核移行シグナルを付加したものと付加しない可溶性GalNAc転移酵素を発現させたマウス膵臓がん細胞からライセートを調製し、二次元電気泳動およびWJAレクチンブロットングにより多くのスポットが感度良く観察された。細胞内に可溶性GalNAc転移酵素を発現させる際に核移行シグナルを付加したところ、核内にのみ糖転移酵素が局在することが明らかになったが、スポットのパターンが核移行シグナルを付加しない糖転移酵素を発現させた細胞由来のものとは顕著に異なり、核内タンパク質を選択的に検出できていることが明らかになった(図2)。図に示す矢印のスポットを回収し、トリプシンによるin gel digestionを行いペプチドを回収し、Orbitrap型高感度質量分析計によるLC-MS/MS解析を行ってタンパク質の同定をした。同定されたタンパク質で、且つ浸潤性・EMT・抗がん剤耐性との関連が知られているタンパク質だけでも16種類の転写因子などを特定した。

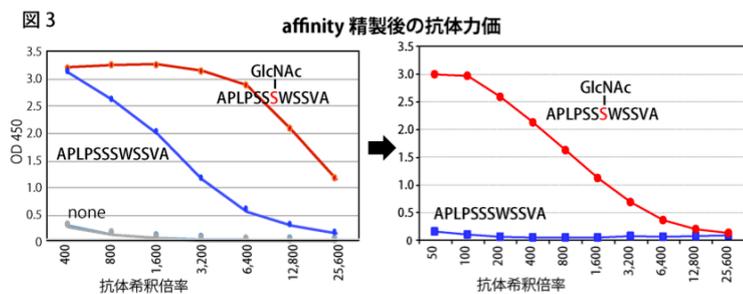


## 3. O-GlcNAc 修飾ペプチドの濃縮と質量分析による修飾部位の特定

これらのトリプシン消化物の中から転写因子Xに着目し、O-GlcNAc修飾ペプチドを濃縮するためにWJAレクチンカラムによる濃縮を試みた。トリプシンによるin gel digestionにより回収したペプチドからWJA-Sepharoseカラムにより結合画分を回収し、これをzip tipにより再びペプチドを精製・濃縮した。さらに回収ペプチドをOrbitrap型高感度質量分析計によるLC-MS/MS解析を行った。CIDモードでペプチドの配列の決定とHexNAcの有無の確認を、ETDモードでHexNAcの結合したアミノ酸の同定を行い、新規のO-GlcNAc修飾アミノ酸残基を多数同定することができた。

## 4. O-GlcNAc 修飾ペプチドに対する抗体の作製

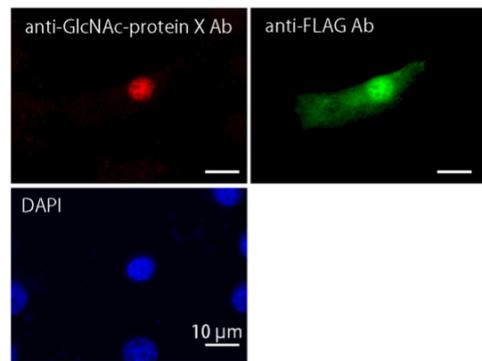
上記で同定した転写因子 X の O-GlcNAc 修飾ペプチドに対する特異的抗体の作製を行うために、糖ペプチドの化学合成を行った(配列は図3の通り)。これをKLHにカップリングした後、ウサギに免疫して O-GlcNAc 修飾を含む前後のペプチド配列を認識する



抗体を取得した。この抗血清の中には O-GlcNAc 修飾を受けていないペプチドを認識する抗体も一部含まれていたことから、糖ペプチドおよび単純ペプチドを固相化したカラムを作成し、糖ペプチドに結合し且つ単純ペプチドには結合しない画分を得た(図3)。この抗体は、Western blottingできれいに転写因子 X のみを染色することができ、またプルダウンを行うことも確認できた。またこの抗体は免疫染色にも供することが可能であり、O-GlcNAc

修飾された転写因子 X が核内のみで局在していることが細胞染色によって示された (図 4)。

図 4



#### 5. O-GlcNAc 修飾タンパク質と相互作用するパートナー分子のプルダウンによる探索

転写因子 X の O-GlcNAc 修飾ペプチドに対する特異的な抗体を上述のように取得することができたので、この抗体を用いて O-GlcNAc 修飾された転写因子 X と相互作用しているタンパク質をプルダウンによって探索・同定することを試みた。抗体染色により転写因子 X が上手くプルダウンできていることは確認できたが、他のタンパク質のスポットが銀染色でほとんど確認できなかった。そこで、プルダウンしたサンプルを直接質量分析によって同定することを試みた。質量分析の結果から複数のタンパク質が同定された。ただし、対照として用いた抗転写因子 X 抗体による共沈降サンプルの解析結果と比較して、多くのタンパク質に違いが見られ、O-GlcNAc 修飾による違いなのか抗体の違いによる結果なのか、判断ができなかった。そこで、個々のタンパク質をコードする cDNA を PCR クローニングにより取得し、別の Myc タグを付加して Flag タグ付加転写因子 X と共発現を試みた。細胞のライセートを調製しプルダウンを上記と同じ条件で行い、一緒にプルダウンしてくるかを検証した。ただし、O-GlcNAc 修飾をしている転写因子 X の量がもともと少ないため、明確な判断はできなかった。また、途中の洗浄等の操作で一部解離してしまう可能性が考えられたため、以降に述べるビオチンリガーゼの融合タンパク質を用いて検討を行うこととした。

#### 6. WJA-ビオチンリガーゼ (R118G) 融合タンパク質の作成

同定した O-GlcNAc 修飾タンパク質と相互作用する分子を特定するために、WJA-ビオチンリガーゼ (R118G) (BirA (R118G)) をコードする cDNA を作製し、発現ベクターを作成することにした。WJA レクチンの cDNA は類似のものが複数取得されたために、どれが正しいか判断ができなかった。そこで、すべてのクローン 7 種類に関して組換え体タンパク質を発現させてレクチン活性を調べてみたが、いずれも組換え体 WJA レクチンの強い活性が認められなかったために、同じ特異性をもつ *Wisteria floribunda* レクチン (WFA) の cDNA を用いて WFA-BirA (R118G) を作出する方針に変更した。WFA レクチンの cDNA を 2 種類とビオチンリガーゼ変異体 (BirA (R118G)) をコードする cDNA、および精製のタグに使用するヒト IgG-Fc の cDNA をさまざまに組み合わせた 5 種類の発現プラスミドを作成した。CHO 細胞にプラスミドを形質転換し、その培養上清からプロテイン A カラムを用いて融合タンパク質を精製した。精製の過程で酸性条件でカラムから溶出させる操作があるので、この操作により WFA レクチンの活性、またビオチンリガーゼの活性が消失しないことを確認しながら実験条件を最適化し、WFA5-BirA (R118G)-Fc をが最も活性が強く収率も良いことが示された。

#### 7. WFA-ビオチンリガーゼ (R118G) 融合タンパク質を用いた相互作用タンパク質の同定

精製した WFA5-BirA (R118G)-Fc 融合タンパク質を細胞に振りかけ、ATP とビオチン存在下で 37°C、4 時間反応させることにより WFA5 に結合するタンパク質およびその近傍のタンパク質をビオチン化した。この細胞を洗浄後、lysis buffer に可溶化し二次元電気泳動し、Western blotting 後に SA-HRP で染色を行ったところ、一つのスポットが染色された。このスポットが転写因子 X が核内で相互作用しているタンパク質と想定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi, T., Ikehara, S., Akimoto, Y., Nakanishi H., Kume, M., Yamamoto, K., Ohara, O., Ikehara, S., Ikehara, Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 TGF- $\beta$ signaling promotes tube-structure-forming growth in pancreatic duct adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-019-47101-y">https://doi.org/10.1038/s41598-019-47101-y</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山本一夫	4. 巻 269
2. 論文標題 レクチン医学最前線-はじめに-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本一夫	4. 巻 269
2. 論文標題 改変レクチンの創出	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 720-726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 糸優彦、山口高志、池原謙、山本一夫
2. 発表標題 膵管腺癌の3次元培養下における表現型に関わるO-GlcNAc修飾の機能
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本一夫
2. 発表標題 糖鎖機能を標的とした創薬デザイン
3. 学会等名 第36回プラズマ核融合学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 糸優彦、山口高志、池原謙、山本一夫
2. 発表標題 膵管腺癌の3次元培養下における表現型に関わるO-GlcNAc修飾の機能解析
3. 学会等名 第49回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 糸優彦、山口高志、池原謙、山本一夫
2. 発表標題 膵管腺癌の3次元培養下における表現型に関わるO-GlcNAc修飾の機能解析
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本一夫
2. 発表標題 糖鎖機能を標的とする創薬デザイン-鳥インフルエンザ感染とがん
3. 学会等名 第10回プラズマ医療・健康産業シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本一夫
2. 発表標題 GAGを認識する改変レクチンの創出
3. 学会等名 第90回日本生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本一夫
2. 発表標題 GAG 鎖を識別する遺伝子改変レクチンの創製と新たな創薬標的探索への展望
3. 学会等名 第9回プラズマ医療・健康産業シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本一夫	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 168
3. 書名 図説免疫学入門	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----