

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07320

研究課題名(和文) O-GlcNAc修飾とその認識機構を介した生体恒常性維持機構の解析

研究課題名(英文) Biochemical analysis of recognition proteins for O-GlcNAcylated protein

研究代表者

関根 弘樹 (Sekine, Hiroki)

東北大学・加齢医学研究所・講師

研究者番号：50506285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の翻訳後修飾は多種多様な生物現象を調節する。中でもO-GlcNAc化修飾は、グルコースやグルタミンといった細胞外の栄養状態によって調節され、細胞周期、細胞分化といった多くの生物現象に関連する。翻訳後修飾はその修飾を認識するタンパク質が機能発現に必要であると考えられているが、O-GlcNAc化修飾は認識タンパク質が不明である。本研究では私たちが以前発見したNRF1がO-GlcNAc化されることから発展させて、O-GlcNAc化NRF1をリコンビナントで精製する方法を確立し、これを利用してO-GlcNAc化認識タンパク質の同定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質間結合の制御において、翻訳後修飾は重要な働きをする。そのためタンパク質翻訳後修飾による、他のタンパク質との結合様式を調べることは極めて重要である。中でもO-GlcNAc化は様々な生物現象に関わり、細胞の栄養状態などでダイナミックに制御されることが明らかとなっていた。しかしO-GlcNAc化を認識する分子機構はほとんど知られていなかった。本研究では、O-GlcNAc化を認識するタンパク質の同定を初めて行った。この認識タンパク質との結合様式を詳細に調べることで、O-GlcNAc化による生物現象の調節が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Post translational modifications of proteins are related to the control of their protein functions. O-GlcNAc modification is involved in the control of biological processes including cell cycle and differentiation, which are regulated by extracellular nutrients such as glucose and glutamine. Modification-recognition proteins are required for function of modified proteins, however O-GlcNAcylation recognition mechanisms were still remained unclear. We found O-GlcNAc-bound proteins by using recombinant O-GlcNAcylated NRF1.

研究分野：生化学

キーワード：翻訳後修飾 O-GlcNAc修飾

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リン酸化、アセチル化、メチル化といったタンパク質の翻訳後修飾は、多彩な化学修飾を介してタンパク質の機能発現を調節し、種々の生命現象を支える重要な化学反応である。これら翻訳後修飾の中でも *O*-GlcNAc 修飾されるタンパク質は数百以上あると考えられており、栄養状態の感知、日周性の調節などに関与する。*O*-GlcNAc 修飾は OGT という酵素により UDP-GlcNAc を基質として用い、グルコサミン 1 分子が糖付加される化学反応であるが、セリン・スレオニン残基に施されることから、これまでリン酸化との拮抗関係で、その機能を説明されることが多かった。ところが、*O*-GlcNAc 修飾による機能発現について様々な報告がある中で、その全てがリン酸化との拮抗関係で説明できるわけではないことから、何らかの *O*-GlcNAc 修飾依存的な機能発現の調節がなされると予想されている。*O*-GlcNAc 修飾以外の翻訳後修飾一般の機能発現調節については、それぞれの修飾に固有の認識タンパク質が同定されているのに対して (アセチル化ではプロモドメインタンパク質、メチル化ではクロモドメインタンパク質など)、*O*-GlcNAc 修飾の認識タンパク質は未だ不明である。

### 2. 研究の目的

糖修飾は大きく分けて N 結合型糖鎖修飾や O 結合型糖鎖修飾などの糖が複数枝分かれして連なる糖鎖修飾と、単糖修飾である *O*-GlcNAc 修飾に大別される。糖鎖修飾はゴルジ体で主におこるのに対して、*O*-GlcNAc 修飾は細胞質や核内で付加・除去反応がダイナミックにおこる。糖鎖修飾と結合するタンパク質群としてレクチンが古くから知られている一方で、*O*-GlcNAc 修飾についてはほとんど報告されていない。*O*-GlcNAc 修飾は生理的な重要性が報告されている一方で、がんなどでは高発現し悪性化に関与することが報告されており、本研究で認識タンパク質を同定することができれば、*O*-GlcNAc 修飾を制御することにつながり、応用性が高い。そこで私たちが発見した転写因子 Nrf1 の *O*-GlcNAc 修飾を *in vitro* で高効率に施す方法を開発し、*O*-GlcNAc 修飾認識タンパク質を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

Nrf1 と OGT のリコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* で NRF1 に *O*-GlcNAc 修飾が効率的に導入される系を作製する。得られた *O*-GlcNAc-NRF1 と NRF1 に結合するタンパク質群を比較し、*O*-GlcNAc-NRF1 により強く結合するタンパク質を同定する。この際、リコンビナントタンパク質の中で *O*-GlcNAc 修飾されているタンパク質の割合は極めて重要である。そのためより効率の良い NRF1 に *O*-GlcNAc 修飾を得るための実験を行う。得られたタンパク質をベイトに細胞抽出液と反応させ、結合タンパク質を LC-MS/MS で網羅的に決定、*O*-GlcNAc 修飾認識タンパク質を同定する。

### 4. 研究成果

*in vitro* で *O*-GlcNAc 修飾を非常に高い効率で施す方法を確立することができた(図 1)。この *O*-GlcNAc-NRF1 と修飾されていない NRF1 を用いて、細胞抽出液と反応させ結合タンパク質を網羅的に同定し両者の比較を行なった。結果、OGT や HCF1 といったすでに私たちが結合することを明らかとしていたタンパク質群については、両者での結合性の違いが見られない一方で、あるタンパク質 X は *O*-GlcNAc-NRF1 においてより濃縮されていることがわかった。今後はさらにこのタンパク質の解析、*O*-GlcNAc 認識機構、*O*-GlcNAc タンパク質の機能面でどのような影響があるかなどを調べていく必要がある。

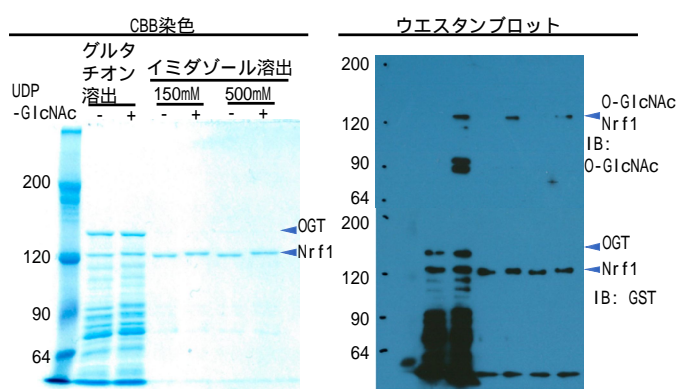


図 1. リコンビナント NRF1 に対する *O*-GlcNAc 修飾  
NRF1 は GST と (His)6 タグを施しており、両方のタグを用いて精製したところほぼ単一バンドの NRF1 が得られた。基質である UDP-GlcNAc 依存的に *O*-GlcNAc 修飾が NRF1 に施され、修飾によりバンドが高分子量側にシフトするが、これも単一バンドであり高効率に *O*-GlcNAc 修飾がおこっていることが観察される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okazaki Keito, Anzawa Hayato, Katsuoka Fumiki, Kinoshita Kengo, Sekine Hiroki, Motohashi Hozumi	4. 巻 -
2. 論文標題 CEBPB is required for NRF2-mediated drug resistance in NRF2-activated non-small cell lung cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac013	査読の有無 有
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 Sekine Hiroki, Motohashi Hozumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Roles of CNC Transcription Factors NRF1 and NRF2 in Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 541 ~ 541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13030541	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 Okazaki K, Anzawa H, Liu Z, Ota N, Kitamura H, Onodera Y, Alam Md. Morshedul, Matsumaru D, Suzuki T, Katsuoka F, Tadaka S, Motoike I, Watanabe M, Hayasaka K, Sakurada A, Okada Y, Yamamoto M, Suzuki T, Kinoshita K, Sekine H, Motohashi H	4. 巻 11
2. 論文標題 Enhancer remodeling promotes tumor-initiating activity in NRF2-activated non-small cell lung cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 s41467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19593-0	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 関根弘樹
2. 発表標題 慢性低酸素時の炎症反応促進におけるリソソーム活性低下の分子機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 WEB開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Sekine.
2. 発表標題 Chronic hypoxia enhances proinflammatory response of macrophages by inhibiting lysosomal activity.
3. 学会等名 第16回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム & Key Forum 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Sekine, Akihiro Kishino, Hayato Anzawa, Yoshihiro Izumi, Masatomo Takahashi, Takeshi Bamba, Kengo Kinoshita, Hozumi Motogohashi.
2. 発表標題 Vitamin B6 is an oxygen-sensitive nutrient shaping macrophage inflammatory phenotype under chronic hypoxia by suppressing lysosomal activity.
3. 学会等名 Cod Spring Harbor Meeting “Mechanisms of Metabolic Signaling” Virtual (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸野明洋、村上昌平、関根弘樹、本橋ほづみ
2. 発表標題 硫黄を利用した生体防御機構とエネルギー代謝
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会 第20回日本N0学会 合同学術集会 WEB開催
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------