

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650003

研究課題名(和文) O-GlcNAc化を定量的・定性的に解析する新たな基盤的技術の開発

研究課題名(英文) Development of methods for quantitative and qualitative analyses of protein O-GlcNAcylation.

研究代表者

久保田 裕二(Kubota, Yuji)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70614973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質翻訳後修飾の一種であるO-GlcNAc化は、細胞増殖や代謝など様々な細胞機能を制御する一方で、その異常は糖尿病や癌などの原因となる。現在、1000種を超えるO-GlcNAc化蛋白質が同定されているものの、O-GlcNAc化がこれらの標的分子にどのような機能変化をもたらすか、その多くは未だ明らかにされていない。その理由の一つとして、蛋白質O-GlcNAc化の解析技術・手法が他の翻訳後修飾研究と比較して未だ不十分である点が挙げられる。そこで、O-GlcNAc研究における基盤的技術の推進を目的として、O-GlcNAc化蛋白質解析法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：O-GlcNAcylation, a kind of protein post-translational modifications, has an important roles in various cellular functions such as cell proliferation and metabolism. Recently, it has been reported that its dysregulation causes such as diabetes and cancers. However, fundamental techniques and methods for the analysis of protein O-GlcNAcylation are insufficient. Therefore, I conducted this study for the purpose of development of new techniques in O-GlcNAc analysis.

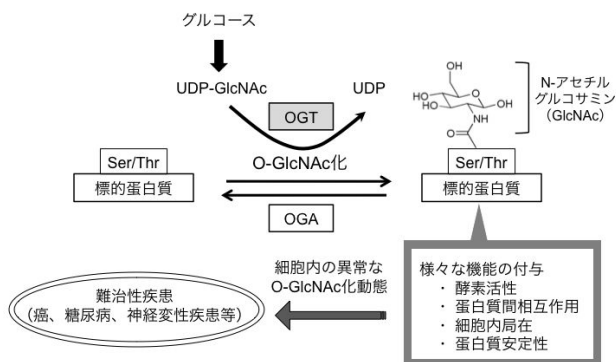
研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳後修飾

科学研究費助成事業 (科学研究費補助金) 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

蛋白質 O-GlcNAc 化は、核や細胞質内で起こる特殊な O-結合型糖鎖修飾である。細胞外で起こる一般的な糖鎖修飾と異なり、細胞内蛋白質のセリンあるいはトレオニン残基に N-アセチルグルコサミンが1分子のみ結合する。その反応は可逆的であり、ヒト細胞内では、O-GlcNAc 化を担う OGT (O-GlcNAc Transferase) と、その脱修飾を担う OGA (O-GlcNAcase) とによってダイナミックに制御されている (図1)。



【図1. OGT (O-GlcNAc転移酵素) による細胞内蛋白質のO-GlcNAc化とその機能】

O-GlcNAc 化された標的蛋白質は、その性質(酵素活性や細胞内局在、蛋白質安定性など)が様々に変化することが示されてきた。また興味深い事に、蛋白質 O-GlcNAc 化はセリン・トレオニン残基に生じることから、リン酸化など他の翻訳後修飾と拮抗して標的分子の機能制御を行うことが報告されている。O-GlcNAc 化の標的となる蛋白質分子は現在1000 種を超えており、中には代謝や細胞分裂などの基本的な生命機能に関与する分子のみならず、p53 や tau といった様々な難治性疾患 (癌・神経変性疾患・糖尿病など) に関与する分子が含まれており、O-GlcNAc 化と疾病発症・悪性化との関連性も強く示唆されている。

2. 研究の目的

近年、質量分析を用いた O-GlcNAc 化蛋白質の網羅的探索により、様々な基質分子の同定が行われてきた。上述の通り、細胞内には数多くの基質分子が存在することが判明しているが、O-GlcNAc 化は標的分子によって異なる効果を与えることから、本修飾による蛋白質分子への影響を予想することは難しく、未だ多くの基質分子の O-GlcNAc 化による効果は不明である。また、他の蛋白質翻訳後修飾 (リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化など) の研究分野に比べ、O-GlcNAc 化蛋白質の研究は、その発見が比較的新しい事もあり未だ生化学的解析法の種類が少なく、本研究分野の発展を妨げる一因となっている。そこで本研究では、O-GlcNAc 研究分野の更なる発展・推進のため、O-GlcNAc 化蛋白質の機能の解析に有用な技術開発を行った。

3. 研究の方法

O-GlcNAc 基質分子(代表的基質として Tab1 蛋白質を主に使用した)とヒト由来の野生型 OGT、または変異型 OGT の発現ベクターを作成し、ヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK293) またはアフリカミドリザル腎臓由来細胞 (COS7) に導入した。遺伝子導入から 48 時間後、OGA 阻害剤 (Pugnac) を含む細胞破砕液を用いて目的蛋白質の抽出を行い、Laemmli 法による SDS-PAGE により目的基質分子を分離後、その O-GlcNAc 化を各種 O-GlcNAc プローブ [O-GlcNAc 化特異的抗体 (RL2 および CTD110.6) あるいは O-GlcNAc 選択的レクチンである WGA 結合 HRP] を用いて検出・比較した。また、基質

蛋白質の N 末端にはアフィニティータグ (GST または HA タグ) が付加されているため、細胞破碎後にグルタチオンビーズあるいは抗 HA 抗体を添加することで目的分子のアフィニティー精製を行い、以降の解析に用いた。

4 . 研究成果

解析対象の基質分子に対し、その O-GlcNAc 化がどのような影響を与えるか生化学的に検証するためには、その O-GlcNAc 化型ならびに非 O-GlcNAc 化型分子それぞれを高純度かつ大量に精製する必要がある。しかしながら、O-GlcNAc 基を基質分子から切断・排除する OGA が恒常的な活性を保持したまま細胞内に存在しているため、細胞から目的分子を精製しても、多くの場合その中に含まれる O-GlcNAc 化型分子の割合は極めて低く、その後の生化学的解析は極めて困難である。現在、リコンビナント蛋白質として精製した基質分子および OGT を試験管内で混合し、in vitro で O-GlcNAc 化させる方法が開発されているものの、活性のある全長 OGT (1046 アミノ酸) をリコンビナント分子として多量に精製することは容易ではない。そこで、高度に O-GlcNAc 化された目的分子を得るために、まず O-GlcNAc 化基質分子と全長 OGT を HEK293 あるいは COS7 細胞内に共発現させた。その結果、どちらの細胞を用いた場合でも目的分子が非常に強く O-GlcNAc 化されており、かつ目的分子に付加されたタグを用いることで同分子の精製が可能である事が分かった。さらに、本法を用いて得られた O-GlcNAc 化蛋白質は、その後の in vitro での生化学的解析 (酵素活性および分子結合能などの検討) にも十分に適用可能である事を確認した。

上述のように OGT を哺乳類細胞内に強発現した場合、目的分子が細胞内で O-GlcNAc 化を高率に受けることから、その分子が担う

細胞機能にも影響すると考えられる。しかしながら、本手法では同一細胞内に存在する目的分子以外の基質蛋白質に対しても O-GlcNAc 化を促進してしまうため、目的分子の O-GlcNAc 化に限定した効果を細胞レベルで検証する事は難しい。そこで、目的分子以外のグローバルな基質分子に対する O-GlcNAc 化を可能な限り排除できる実験条件を探索すべく、以下の検討を行った。OGT は C 末端側に O-GlcNAc 化活性を有する酵素領域を持つ一方で、N 末端側には基質と結合する領域 [Tetratricopeptide repeat (TPR) domain] を有している。実際に、TRP domain 内の基質結合部位に様々な置換・欠損変異を導入することによって、OGT の基質特異性が大きく変化する事が知られている。そこで、上述の基質特異性に関する知見を基にして、複数種の OGT 変異体を作成し、既知の O-GlcNAc 化分子である Tab1 と共にヒト細胞内に発現させた。その結果、Tab1 分子に対して強く O-GlcNAc 化する一方で、その他の内在性基質分子に対しては減弱した O-GlcNAc 化活性を示す OGT 変異体を見出した。今後、同 OGT 遺伝子変異体によって導入された O-GlcNAc 化のアミノ酸部位が、in vivo における生理的な O-GlcNAc 化部位と同じである事を確認する。また、本法が Tab1 以外の O-GlcNAc 化分子にも適用可能であるか、複数の既知基質分子を用いて検証する予定である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Kenji Ichikawa, Yuji Kubota, Takanori Nakamura, Jane S. Weng, Taichiro Tomida, Haruo Saito, and Mutsuhiro Takekawa
“**MCRIP1, an ERK substrate, mediates ERK-induced epigenetic gene silencing**

**during epithelial-mesenchymal transition
by regulating the co-repressor CtBP”**

Molecular Cell, 2;58(1):35-46 (2015)

2. Yusuke Sato, Eiji Goto, Yuri Shibata, Yuji Kubota, Atsushi Yamagata, Sakurako Goto-Ito, Keiko Kubota, Jun-ichiro Inoue, Mutsuhiro Takekawa, Fuminori Tokunaga and Shuya Fukai

“Mechanisms of dual specificity for M1- and K63-linked polyubiquitin chains revealed by CYLD deubiquitinase structures in catalytic states”

Nature Struct. Mol. Biol., 22(3):222-9 (2015)

3. Mutsuhiro Takekawa and Yuji Kubota
“Mitogen-activated protein kinase signaling and cancer.”

Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling (Springer)

in press. (2015, Editor; Takekawa M & Inoue J)

[学会発表](計7件)

1. 久保田裕二、武川睦寛
「癌およびRas/MAPK症候群におけるMEK変異体の異常活性化機構と抗癌剤抵抗性」
第37回日本分子生物学会年会
平成26年11月25日(横浜)
2. 久保田裕二、武川睦寛
「ERKシグナルの時空間制御異常による遺伝子発現プロファイルの変化」
第3回修飾シグナル病若手ワークショップ
2014年10月1日(神奈川)
3. Yuji Kubota, Mutsuhiro Takekawa
“Germ-line and somatic mutations of the MEK gene modulate its kinase activity in congenital Ras-MAPK syndromes and sporadic cancers”
第9回研究所ネットワーク国際シンポジウム
2014年6月20日(大阪)
4. Yuji Kubota, Mutsuhiro Takekawa
“MEK mutations in congenital Ras-MAPK syndromes or sporadic cancers alter the MEK

kinase activity and gene expression profiles”

東京大学医科学研究所 創立記念研究発表会

2014年5月30日(東京)

5. 久保田裕二、木下英司、武川睦寛
「『Ras/MAPK症候群』および『孤発性癌』で認められるMEK遺伝子変異体の異常活性化機構と疾患発症メカニズムの解明」

第64回日本電気泳動学会総会

2013年11月15日(仙台)

6. 久保田裕二、武川睦寛
「癌および先天性Ras/MAPK症候群におけるMEK遺伝子変異体の異常活性化メカニズムと疾患発症機構の解明」

第2回修飾シグナル病若手ワークショップ

2013年10月22日(群馬)

7. 市川研史、久保田裕二、Jane Weng、中村貴紀、武川睦寛

「新規ERK基質分子MCRIP1によるERK依存的ジーンサイレンシングと上皮間葉転換の制御」

第65回日本細胞生物学会大会

2013年6月19日(名古屋)

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保田裕二(Kubota Yuji)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号:70614973