

令和元年6月20日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08219

研究課題名(和文) 2段階クリック反応を利用した新規O-GlcNAc化プロテオーム解析法の開発と応用

研究課題名(英文) Development of a method for the analysis of protein O-GlcNAcylation using two-step click chemistry

研究代表者

津元 裕樹 (Tsumoto, Hiroki)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：00409385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、2段階クリック反応を利用したO-GlcNAc化プロテオーム解析法の開発と糖尿病モデル動物への応用を目的とした。モデルペプチドを用いた検討により、2段階クリック反応を利用してO-GlcNAc化ペプチドを濃縮できることを実証した。糖尿病モデル動物の腎臓を用いてO-GlcNAc化プロテオーム解析を行い、28のタンパク質に由来する34のO-GlcNAc化ペプチドを同定した。また、相対的定量解析を行い、2倍以上に増加あるいは減少するO-GlcNAc化タンパク質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質のO-GlcNAc化は血糖値によって変化することから、糖尿病において重要な修飾である。本研究課題により、糖尿病モデル動物の腎臓で増加あるいは減少するO-GlcNAc化タンパク質の同定に成功した。今後、これらの生物学的な意義を明らかにすることで、糖尿病性腎症の病因・病態の解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, a method for the enrichment of O-GlcNAcylated peptides using two-step click chemistry was developed. Analysis of O-GlcNAcylated proteins was performed using extracts from rat kidney tissue. A total of 34 O-GlcNAcylated peptides from 28 proteins were identified. Of these, 2 proteins were increased and 7 proteins were decreased in diabetic rat.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：O-GlcNAc プロテオミクス 質量分析

1. 研究開始当初の背景

O-結合型 N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 化とは、核、細胞質およびミトコンドリアに局在するタンパク質の Ser/Thr 残基の水酸基に対して GlcNAc が一つだけ付加される翻訳後修飾の一つである。ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) を糖供与体として O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) により付加され、β-D-N-アセチルグルコサミニダーゼ (OGA) により脱離される。UDP-GlcNAc はヘキサミン合成経路を介したグルコースの最終代謝物である。よって、細胞外グルコース濃度増加により UDP-GlcNAc が増加し、その結果タンパク質の O-GlcNAc 化が亢進する (図1)。

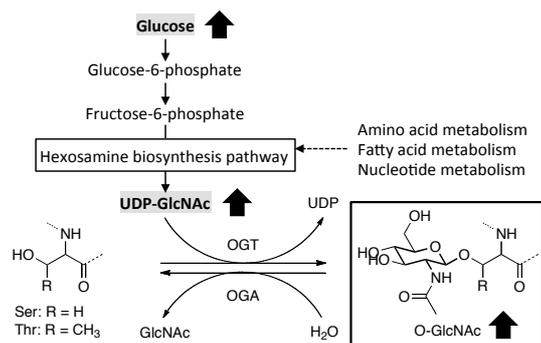


図1. O-GlcNAc 化とヘキサミン合成経路

O-GlcNAc 化はシグナル伝達 (リン酸化と拮抗)、エピジェネティック制御、転写、分解、ストレス応答など様々な生物学的プロセスに関与し、糖尿病、がん、神経変性疾患などの病態においても重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。O-GlcNAc 化の役割を分子レベルで理解するためには、修飾されるタンパク質とその修飾部位だけでなく、変動も明らかにする必要があります。しかしながら、微量な O-GlcNAc 化を網羅的に解析するには技術的問題のため非常に困難である。

網羅的 O-GlcNAc 化プロテオーム解析では特異的かつ効率的な濃縮法が必要不可欠である。抗 O-GlcNAc 抗体やレクチンなど、親和性を利用した濃縮法では特異性や網羅性が問題とされ、近年では酵素反応とクリック反応が利用されている。アジド化 UDP-Gal (UDP-GalNAz) と糖転移酵素変異体 Gal-T1 (Y289L) を用いて O-GlcNAc 化部位にアジドを導入後、特異的かつ高収率なアジドとアルキンのクリック反応により“濃縮用のタグ”としてビオチンやリン酸基を導入する方法である。しかしながら、ビオチン-アビジンでは強すぎる相互作用のため溶出効率が低下する、リン酸基ではリン酸化ペプチドを区別できないなどの問題がある。そのため、より特異的かつ効率的な濃縮法の開発と、それを利用した網羅的 O-GlcNAc 化プロテオーム解析法の開発が強く望まれている。

これまでビオチン-アビジンの溶出効率の問題を解決するため、可逆的共有結合であるジスルフィド結合を利用した O-GlcNAc 化ペプチド濃縮法を開発した (Tsumoto, H. et al Bioorg. Med. Chem. Lett., 2015, 25, 2645-9)。本濃縮法は、酵素反応による O-GlcNAc 化部位へのアジド導入後、新たに設計・合成したチオール-アルキン 1 を用いたチオールの導入 (クリック反応と還元)、ジスルフィド結合を介した樹脂への固定化 (チオール-ジスルフィド交換) によるものである (図2)。共有結合であるため変性剤、界面活性剤、有機溶媒、酸などによる十分な洗浄が可能であり、還元剤により温和な条件下で容易に溶出できる利点がある。一方、クリック反応中にチオール-アルキン 1 がジスルフィド体を形成するため、チオールに還元するステップが必要である、フリーのシステイン残基含有ペプチドも濃縮される、MS/MS において十分なペプチド配列情報が得られずタンパク質や修飾部位の同定が容易ではないなどの問題があった。

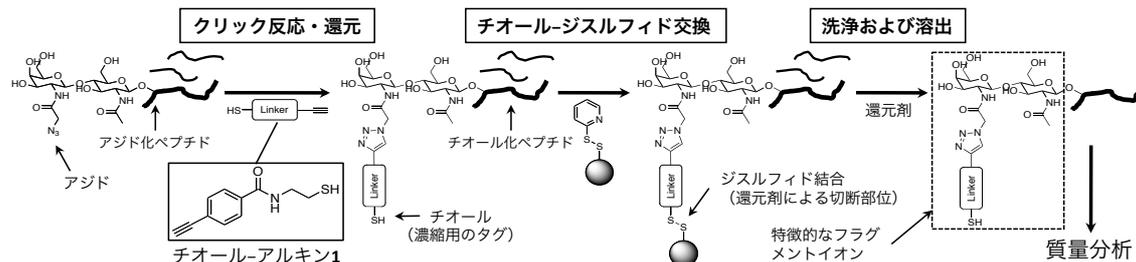


図2. チオール-ジスルフィド交換を利用した O-GlcNAc 化ペプチド濃縮法 (従来法)。

2. 研究の目的

本研究では、酵素反応と2段階のクリック反応を利用する特異的かつ効率的な新規 O-GlcNAc 化ペプチド濃縮法を開発し、それを基盤とする高感度 O-GlcNAc 化プロテオーム解析法の開発を目的とする。また、開発した解析法を糖尿病モデル動物に応用し、糖尿病における O-GlcNAc 化の役割を明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 2段階クリック反応を利用した新規 O-GlcNAc 化ペプチド濃縮法の開発

従来法（図2）のクリック反応中に形成されたジスルフィド体の末端アルキンに着目し、このアルキンとアジド担体との2回目のクリック反応を行うことができれば、チオールに依存しない、より特異的かつ高収率な濃縮法を開発することができると考えた（図3）。

UDP-GalNAz と GalT1 変異体を用いる酵素反応により O-GlcNAc 化ペプチドの O-GlcNAc 化部位にアジドを導入した。一方、アジドビーズとチオール-アルキンとのクリック反応を行い、アルキンビーズとした（クリック反応1）。チオール-アルキンがジスルフィド結合を形成して末端にアルキンをもつことを利用し、アジド化ペプチドを含むサンプルとアルキンビーズのクリック反応を行なった（クリック反応2）。ビーズの洗浄、還元剤による溶出（ジスルフィド結合の切断）を行い、溶出画分の質量分析を行った。O-GlcNAc 化ペプチド標準品を用い、反応条件、洗浄条件、ビーズの種類などを検討した。

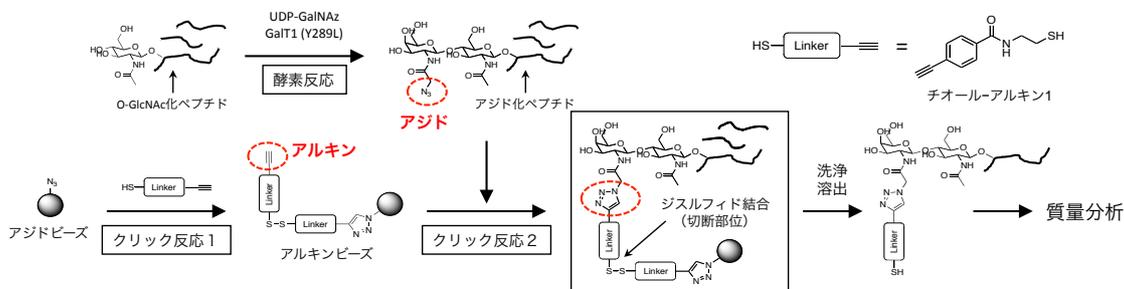


図 3. 2段階クリック反応を利用した O-GlcNAc 化ペプチド濃縮法（本研究課題）。

(2) 糖尿病モデル動物の O-GlcNAc 化プロテオーム解析

Goto-Kakizaki (GK) ラットは腎糸球体基質膜肥厚や尿中微量アルブミンなど糖尿病性腎症初期の特徴を持つ 2 型糖尿病モデルとして用いられている。GK ラットと遺伝的背景が同じである Wistar ラットを対照とし、GK ラットの O-GlcNAc 化プロテオーム解析を行った。

GK ラット（15 週齢，雄，n=3）および Wistar ラット（15 週齢，雄，n=3）の腎臓（杏林大学医学部 秋元義弘教授より提供）からタンパク質を抽出してタンパク質量量を行なった。タンパク質（200 μ g）に O-GlcNAc 化タンパク質標準品である α -crystallin（1 μ g）を内部標準として添加し、ジチオトレイトールによる還元（37°C，60 分）、ヨードアセトアミドによるアルキル化（室温，60 分，遮光）、トリプシン（4 μ g）による酵素消化（37°C，15 時間）を行い、トリプシン消化物を得た（サンプル 1）。また、タンパク質 100 μ g 相当のトリプシン消化物（サンプル 1）を用い、安定同位体標識法として TMTsixplex 試薬（Thermo Fisher Scientific）を用いてラベル化後、6 サンプル全てを混合した（サンプル 2）。

本研究ではサンプル 1（安定同位体標識なし，タンパク質 100 μ g 相当）を用いて O-GlcNAc 化ペプチド濃縮後，nanoLC-ESI-MS/MS を行い，O-GlcNAc 化ペプチドの同定およびピーク面積による相対的定量解析を行った（解析 1）。また，サンプル 2（安定同位体標識あり，タンパク質 300 μ g 相当）を用いて濃縮後，nanoLC-ESI-MS/MS を行い，O-GlcNAc 化ペプチドの同定および MS/MS スペクトルのレポーターイオンによる相対的定量解析も行った（解析 2）。本研究ではチオール-ジスルフィド交換を利用した O-GlcNAc 化ペプチド濃縮法（従来法）を行なった。

4. 研究成果

(1) 2段階クリック反応を利用した新規 O-GlcNAc 化ペプチド濃縮法の開発

2段階クリック反応を利用した O-GlcNAc 化ペプチド濃縮法（図3）をモデルペプチドにより検討した結果，目的のチオール-アルキン誘導体化 O-GlcNAc 化ペプチドに相当するピーク（m/z 1565.67）が MALDI-TOF MS で検出された（図4）。よって，2段階クリック反応により O-GlcNAc 化ペプチドを濃縮できることがわかった。しかしながら用いたアジドビーズが高価であり，濃縮法とし広く普及させるためには，コストの問題を解決する必要があった。そこで，より安価なビーズを用いて検討を行なった。しかしながら，本研究期間内では濃縮効率を向上させることはできなかった。

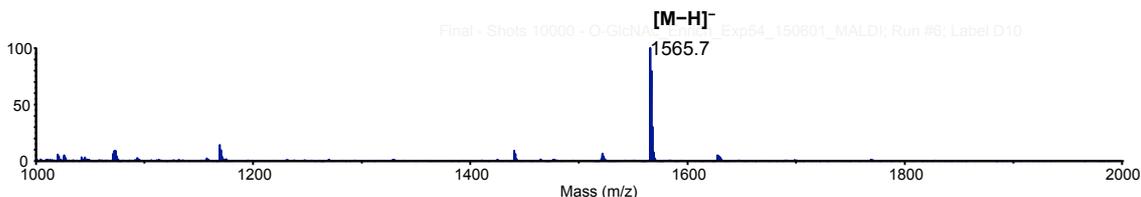
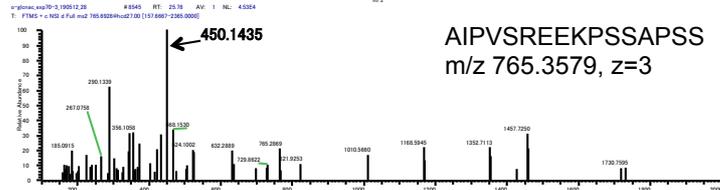
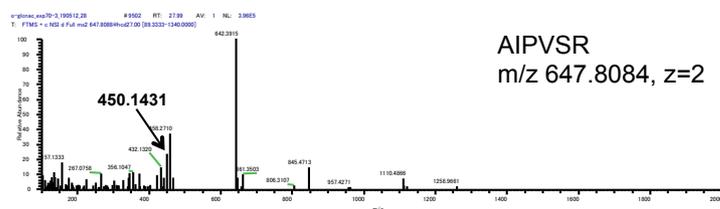


図 4. 濃縮後の MALDI-TOF マススペクトル。

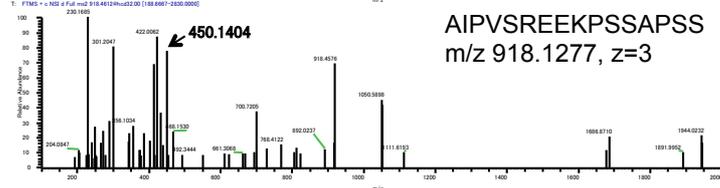
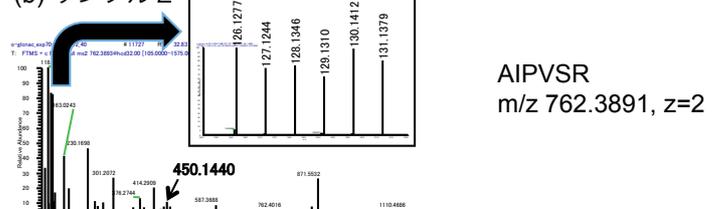
(2) 糖尿病モデル動物の O-GlcNAc 化プロテオーム解析

解析 1 (安定同位体標識なし) および解析 2 (安定同位体標識あり) のいずれにおいても内部標準として添加した O-GlcNAc 化タンパク質を同定することができた (図 5). よって, 組織サンプルでも O-GlcNAc 化ペプチドを濃縮でき, データベース検索によりタンパク質を同定できることを実証できた. しかしながら, 安定同位体標識を用いた場合 (解析 2), 同定はできるが定量に用いるレポーターイオンが検出できないため定量できないペプチドがあった (図 5b 下段). よって, 本研究で用いた質量分析システムにおいて安定同位体標識法は適さないことがわかった. 一方, チオール-アルキン誘導体化部位に由来する特徴的なフラグメントイオンとして m/z 450 が検出され, チオール-アルキン誘導体化された O-GlcNAc 化ペプチドであることの信頼性を高める診断イオンとして有用であることがわかった.

(a) サンプル 1



(b) サンプル 2



(c) フラグメントイオン

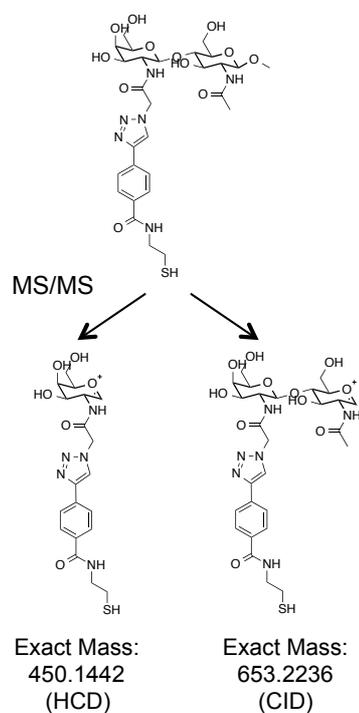
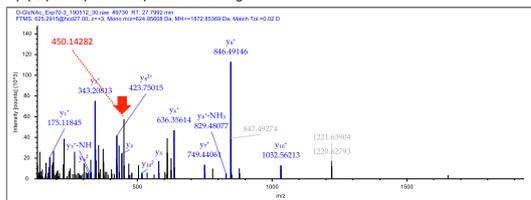


図 5. 誘導体化 O-GlcNAc 化ペプチドの nanoLC-ESI-MS/MS スペクトルとフラグメントイオン.

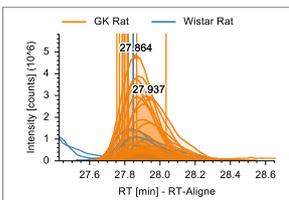
解析 1 の結果, O-GlcNAc ペプチドとして 40 ペプチドの同定に成功した. 図 5 で示した内部標準の場合と同様, 同定されたラット腎臓タンパク質に由来する O-GlcNAc 化ペプチドの MS/MS でも特徴的なフラグメントイオンである m/z 450 が検出されており, 解析結果の信頼性が高いことがわかった (図 6).

MS/MS

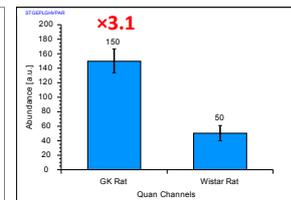
(a) Lipoma-preferred partner homolog



Chromatogram



Quan



(b) Adipocyte plasma membrane-associated protein

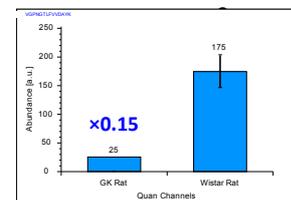
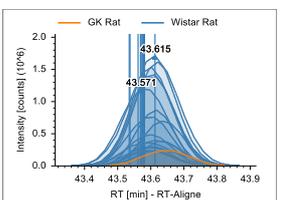
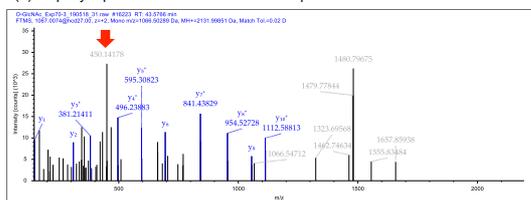


図 6. ラット腎臓タンパク質に由来する O-GlcNAc 化ペプチドの解析結果の例

内部標準に由来する6ペプチドを用いて濃縮効率を算出し、ラット腎臓タンパク質に由来する34ペプチド(28タンパク質)について相対的定量を行なった。その結果、GKラットで2倍以上増加は2ペプチド(2タンパク質)、2倍以上減少は7ペプチド(7タンパク質)であった(表1)。

表1. GKラットで2倍以上変動したタンパク質

Accessions	Master Protein Descriptions	Sequence	Abundance Ratio (GK/Wistar rat)	
			Normalized	
Q5XI07	Lipoma-preferred partner homolog	STGEPLGHVPAR	3.1	4.1
D3ZEN0	MICAL-like protein 2	ASTVVTAPTSK	1.5	2.0
P24623	Alpha-crystallin A chain (内部標準)	AIPVSR	0.77	1.0
P24623	Alpha-crystallin A chain (内部標準)	AIPVSREEKPSSAPSS	0.74	0.99
P10960	Prosaposin	TNSSFVQGLVDHVKEDCDR	0.33	0.44
Q66HG9	Mitochondrial antiviral-signaling protein	STAATPSTVPTNIAPSK	0.28	0.37
P68370	tubulin alpha-1A chain	PTYTNLNR	0.18	0.23
Q7TP48	Adipocyte plasma membrane-associated protein	VGPNGTLFVVDAYK	0.15	0.19
P23785	Granulins	NDVPCDDFSSCPSNNTCCR	0.14	0.19
Q5FVF9	Biotinidase	FNDTEVLQR	0.01	0.01
P00787	Cathepsin B	QNTTWQAGR	0.01	0.01

本研究により、酵素反応と2段階のクリック反応を利用することでO-GlcNAc化ペプチドを濃縮できることを明らかにした。また、糖尿病モデル動物のO-GlcNAc化プロテオーム解析を行った結果、変動するO-GlcNAc化タンパク質およびその修飾部位を含むペプチド配列の同定に成功した。今後、これらのタンパク質におけるO-GlcNAc化の役割を明らかにすることにより、糖尿病性腎症の病因・病態の解明に発展することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Hiroki Tsumoto, Yoshihiro Akimoto, Tamao Endo, Yuri Miura. Quantitative analysis of O-GlcNAcylation in combination with isobaric tag labeling and chemoenzymatic enrichment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2017, 27, 5022-5026. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.10.005. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 秋元 義弘, 楊 國昌, 三浦 ゆり, 津元裕樹, 岩本 真知子, 戸田 年総, 福富 俊之, 菅原 大介, 宮東 昭彦, Gerald W Hart, 遠藤 玉夫, 川上 速人. ラット腎臓におけるリン酸化アクチンと糖修飾アクチンの局在. 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会(宮崎). 2018年9月29-30日.
2. 尾崎 友祥, 津元 裕樹, 岩本 真知子, 梅澤 啓太郎, 福井 浩二, 秋元 義弘, 遠藤 玉夫, 三浦 ゆり. Sirtuin 1 (SIRT1) のO-GlcNAc修飾に関する研究. 第62回日本薬学会 関東支部大会(東京). 2018年9月15日.
3. 三浦 ゆり, 早川 敦子, 津元 裕樹, 岩本 真知子, 福井 浩二, 秋元 義弘, 遠藤 玉夫. 糖尿病モデル Goto-Kakizaki ラット腎組織における線維化. 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018年合同大会(大阪). 2018年5月15-18日.
4. 秋元 義弘, 早川 敦子, 三浦 ゆり, 津元 裕樹, 岩本 真知子, 福井 浩二, 川上 速人, 遠藤 玉夫. 糖尿病モデルラット腎組織のプロテオームと免疫組織化学的解析. 第122回日本解剖学会総会・学術集会(長崎). 2017年3月28-30日.
5. 津元 裕樹, 秋元 義弘, 遠藤 玉夫, 三浦 ゆり. 効率的なO-GlcNAc化ペプチド濃縮のための担体の比較. 日本薬学会第137年会(仙台). 2017年3月24-27日.

[その他]

ホームページ <https://www.tmghig.jp/research/team/roukakikou/proteome/>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。