

細胞内タンパク質の新規糖修飾の発見

Discovery of a novel *O*-glycosylation of intracellular proteins

蛋白解析グループ 亀村和生

Kazuo KAMEMURA

Recent studies have established that many nuclear and cytoplasmic proteins are glycosylated with *N*-acetylglucosamine at the hydroxyl group of the Ser or Thr residue on the protein. These discoveries imply that glycosylation plays a role in a regulation of an intracellular protein network, for example, via a saccharide chain-lectin interaction. Furthermore other types of glycosylation in intracellular proteins were expected to exist. We first developed an advanced method for measuring the carbohydrate-binding activity of lectins, which is useful to find a novel saccharide chain-lectin interaction and to identify cDNAs encoding novel lectins. Next, we have tried to find a novel sugar modification of intracellular proteins using massively available rabbit muscle cytosolic enzymes and found that creatine kinase is partially glycosylated at the Ser or Thr residue with an *O*-linked glucose. This discovery will provide a novel clue for understanding intracellular protein networks.

1. はじめに

糖鎖生物学を築き上げてきた先駆者達によって、分泌タンパク質や細胞膜に分布する膜タンパク質のほとんどが、小胞体やゴルジ体内腔で多様な糖鎖修飾を受けて成熟分子になり、それらの糖タンパク質糖鎖がレクチンなどを介して細胞間コミュニケーションや細胞外からのシグナルとして機能していることが明らかにされてきた¹⁾。さらに、これらの糖鎖と種々の疾患との関わりも示唆されている。対照的に、細胞質や核のタンパク質はそれらの生合成や分布が細胞内膜系とは無縁であることから、糖鎖修飾を受けないというのが従来の定説であった。しかしながら、近年の Hart らによる核ならびに細胞質タンパク質の *O*-GlcNAc 化の発見により、その定説が覆された²⁾。*O*-GlcNAc 化とは、タンパク質のセリンあるいはスレオニン残基に *O*-グリコシド結合で *N*-アセチルグルコサミン一分子が転移されることである。*O*-GlcNAc 化は、細胞質や核に存在する *O*-GlcNAc 転移酵素と *O*-GlcNAcase によって媒介される可逆的な反応である³⁾。細胞内膜系とは独立に存在する *O*-GlcNAc 修飾系の発見は、(a) 細胞質や核におけるタンパク質-タンパク質相互作用・情報伝達系に糖タンパク質糖鎖-レクチン相互作用が関与している可能性、そして (b) 細胞質や核に *O*-GlcNAc 化以外にも多様な糖鎖修飾系が存在する可能性を示唆した。そこで、本研究においては、まずヒト完全長 cDNA バンクの中から未知レクチン cDNA を同定し (a) の可能性を追究するための新しい手法として、高感度レクチン検出法を開発した。また (b) の可能性を検討するため、大量に入手可能な細胞質酵素類を用いて糖鎖解析を行ったところ、ウ

サギ筋細胞質クレアチンキナーゼがグルコース(Glc)によって修飾されていることを見出した。

2. リガンドプロットティングによる高感度レクチン検出法の開発³⁾

レクチンとは糖関連酵素ならびに免疫グロブリンを除く糖親和性タンパク質の総称である。生体内には生理的に重要な未知レクチンが多数存在すると考えられている。従来、レクチンを検出する手法として赤血球凝集試験が用いられていたが、凝集を引き起こさないレクチンや微量のレクチンの検出には適さないことから、それに代わるレクチン検出法として糖固定化アフィニティークロマトグラフィーをはじめ、いくつかの手法が開発されている。それらの手法のなかで最も高感度な検出法としてペルオキシダーゼ標識糖タンパク質をプローブとしたリガンドプロットティングが挙げられるが、プローブに起因する高いバックグラウンドやレクチン以外のタンパク質との非特異的相互作用等の問題点がある。そこで、高感度かつ非特異相互作用を起こしにくいリガンドプロットティングによるレクチン検出法の開発を試みた。

2-1. 原理

レクチンを含む試料をPVDF膜あるいはニトロセルロース膜上にドットプロットまたはSDS-PAGE後エレクトロプロットする。プロットした膜をブロッキング処理後、糖鎖プローブとして種々の糖を共有結合させたビオチン化ポリアクリルアミドポリマープローブ(糖-bp-probe)を用いたリガンドプロットティングを行い、二次プローブに用いたペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンの酵素活性を指標にして糖結合活性を高感度化学発光法により検出する(本報告書研究成果集参照)。

2-2. 植物レクチンによる実験例

コンカナバリンA、ヒマメレクチン、ダイズレクチン、小麦胚芽レクチン(生化学工業)をドットプロットあるいはSDS-PAGE後エレクトロプロットしたものをを用いてアッセイしたところ、それぞれのレクチンの糖結合活性は糖特異的に検出された。検出限界はダイズレクチンでは1 μ g、コンカナバリンAでは100ngまでであったが、ヒマメレクチンと小麦胚芽レクチンは5ng程度の微量で検出可能であった(Fig. 1)。本法において、いずれのレクチンも従来のリガンドプロットティングによる検出法より少なくとも10分の1以下の微量で検出することができた。高感度検出を可能にした要因としては、用いた糖鎖プローブの支持体がポリアクリルアミドであることから、プローブとレクチン以外のタンパク質との非特異相互作用がなく、バックグラウンドの低下につながったことと、高感度化学発光検出法を用いたことがあげられる。

2-3. タンパク質粗抽出物中に含まれるレクチンの検出例

β -ガラクトシドに親和性を有する動物レクチンの一種であるガレクチン-3のGST

融合タンパク質を大腸菌内で発現させた。大腸菌ライセートをエレクトロブロット後、*N*-アセチルラクトサミン-ブローブによるリガンドブロッティングを行ったところ、ガレクチン-3 のバンドが検出された。この時同ブローブに親和性を示す大腸菌由来のタンパク質（おそらくレクチン）も検出されたことから、タンパク質粗抽出物中の、類似の糖親和性を有するが分子量の異なるレクチン群の同時検出に有効であることが示された (Fig. 2)。また、マンノース-ブローブによる血清中のマンナン結合タンパク質 (MBP) の検出を試みたところ、わずか 50nl の血清で検出可能であった。成人血清中の MBP 含量は文献値より 0-880 μ g/liter なので、ピコグラムレベルの高感度で MBP が検出できたことになる。以上の結果から、本法はレクチンの高感度検出法として有用であると同時に、組織・細胞などのライセート中のレクチン群の探索法として有効であることを示した。なお、大谷らは本法を用いてヒト肝臓細胞質で発現しているコレクチンファミリーの CL-L1 の糖親和性を証明している⁴⁾。

3. 細胞質タンパク質の新規糖鎖修飾の発見

細胞質や核のタンパク質で、*O*-GlcNAc 化以外の糖鎖修飾を受けている糖タンパク質が、いくつか報告されている。例えば、粘菌の細胞質タンパク質である SKP1 はそのヒドロキシプロリンを介して *O*-グリコシド結合による Gal (α 1-6) Gal (α 1-) Fuc (α 1-2) Gal (β 1-3) GlcNAc 鎖を有していること⁵⁾、また、細胞質酵素であるホスホグルコムターゼがグリコプロテイン: Glc-ホスホトランスフェラーゼのアクセプターであることから、オリゴマンノース鎖を有していることが報告されている⁶⁾。これらの知見は *O*-GlcNAc 修飾系とは異なる糖修飾系が細胞質に存在することを示唆しているが、どちらの糖鎖とも他の細胞質タンパク質には見い出されておらず、特殊なケースと言わざるを得ない。このように、*O*-GlcNAc 修飾系とは異なる糖タンパク質の存否については基礎的知見が非常に乏しい現状にある。そこで、市販の大量入手可能な細胞質酵素について、糖鎖修飾の有無を蛍光ラベル糖鎖電気泳動 (FACE) により同定することを試みた。

3-1. 蛍光ラベル糖鎖電気泳動による単糖分析⁷⁾

6 種の市販ウサギ筋細胞質タンパク質、クレアチンキナーゼ (CK)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、アルドラーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、ホスホグルコムターゼを FACE 単糖分析に供したところ、各試料に特徴的なパターンで Glc、GlcNAc、マンノース、フコースなどの糖が検出されたことから、試供したタンパク質が多様な糖鎖を有している可能性が示唆された。しかしながら、検出された糖が試料に混入している他の複合糖質由来である可能性は否定できない。そこで、最も単純な糖組成を示した CK をイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、再度 FACE に供したところ Glc のみが検出された (Fig. 3)。

3-2. ウサギ筋細胞質クレアチンキナーゼの糖修飾の同定²¹⁾

FACE 解析によって Glc が検出されたウサギ筋細胞質 CK について、糖修飾部位ならびに糖鎖構造を同定するために詳細な解析を行った。CK をトリプシン消化して得たペプチド混合物を逆相クロマトグラフィーで粗分画した後、各画分を FACE に供したところ、3 画分から Glc が検出されたことから、少なくとも 3 種の糖ペプチドが存在することが示唆された (Fig. 4A)。それらのうち最も Glc 含量の高い画分を更に精製し、Glc を有する単一ペプチドを得ることができた (Fig. 4B)。そのアミノ酸配列はウサギ筋細胞質 CK の L¹⁵⁷-K¹⁷⁰ と一致した。ESI-MS/MS 解析より、(1) 糖修飾部位は 158, 164 番目のセリン、166 番目のスレオニンであること、(2) 結合様式はヒドロキシル基を介した O-グリコシド結合であること、(3) 得られた単一ペプチド画分には、未修飾ペプチドと (1) の修飾部位のいずれか一つが修飾されている糖ペプチド 3 分子種が含まれていることがわかった。FACE により検出された Glc の含量と、トリプシン消化 CK ペプチドの解析結果から、試供したウサギ筋細胞質 CK にはおよそ 40% のモノグルコシル (O-Glc) 化分子種が存在していることが示唆された。

細胞質タンパク質において、生理的な O-Glc 化が同定されたのは本報告が初めてである。FACE において他の細胞質酵素からも Glc が検出されていることから、O-Glc 化は CK に限られた特殊な修飾ではなく、O-GlcNAc 化のように細胞質タンパク質の多くにみられる糖修飾様式である可能性が考えられる。なお、*Clostridium* 属の細菌には感染細胞中で毒素タンパク質である糖転移酵素を産生し、細胞質の低分子量 G タンパク質を O-Glc 化することにより不活化することが知られている²²⁾。G タンパク質が生理的に O-Glc 化されるという知見は得られていないが、この細菌は細胞内で生理的に行われているタンパク質の O-Glc 化による機能調節機構を巧みに利用している可能性も考えられる。

O-GlcNAc 化はリン酸化と相反的な関係にあること、タンパク質の半減期に影響していること、他の分子との相互作用に寄与していることなどが示唆されている²³⁾。O-Glc 化もセリン、スレオニン残基を修飾していることから、O-GlcNAc 化と同様に、リン酸化との関連や分子間相互作用へ寄与していることが推測される。今後、細胞質タンパク質 O-Glc 化の生理機能を明らかにするためには、O-Glc 化に関与している糖転移酵素やグルコシダーゼの同定ならびに効率の良い O-Glc 化の同定法の開発などが必要であろう。

4. おわりに

細胞質や核のタンパク質はリン酸化やユビキチン化に代表される翻訳後修飾を受けることにより、半減期、局在、タンパク質-タンパク質相互作用、ならびに活性が制御されていることは周知の事実である。本研究において我々は新たな翻訳後修飾としての糖鎖に着目し、(1) 糖鎖情報受容タンパク質であるレクチンの高感度検出法を確立し、(2) 細胞質タンパク質の新規糖修飾として O-Glc 化を発見した。細胞内タ

ンパク質の糖修飾研究の先駆者である Hart らにより、O-GlcNAc 化部位はリン酸化部位の近傍か、時としてリン酸化部位と同じであることが明らかにされている³⁾。このことは、同一のタンパク質が時空間的に種々の翻訳後修飾を受けることによって機能調節されていること、その修飾因子の一つとして糖鎖が関与していることを意味している。細胞内タンパク質における糖鎖修飾は、膜・分泌系タンパク質の糖鎖とは異なり、鎖長が短く、糖鎖の代謝回転は修飾されたタンパク質のそれより速いと考えられる。今後、さらに細胞質や核のタンパク質の糖修飾に関する知見が充実し糖情報受容メカニズムが明らかにされれば、細胞内タンパク質ネットワークにおける糖鎖の新しい役割が解明されるものと期待される。

5. 参考文献

1. "糖鎖生物学" (斉藤政樹、谷口直之、川崎敏祐、入村達郎、鈴木明身 編、1998) 蛋白質 核酸 酵素 増刊 vol. 43, no. 16, 共立出版.
2. Hart, G. W. (1997) Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 315-335.
3. Kamemura, K. and Kato, S. (1998) Detection of lectins using ligand blotting and polyacrylamide-type glycoconjugate probes. *Anal. Biochem.* **258**, 305-310.
4. Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Yamazaki, H., Shimada, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., and Wakamiya, N. (1999) Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1). *J. Biol. Chem.* **274**, 13681-13689.
5. Teng-umnuay, P., Morris, H. R., Dell, A., Panico, M., Paxton, T., and West, C. M. (1998) The cytoplasmic F-box binding protein SKP1 contains a novel pentasaccharide linked to hydroxyproline in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* **273**, 18242-18249.
6. Marchase, R. B., Boulines, P., Brumley, L. M., Dey, N., Browne, B., Auger, D., Fritz, T. A., Kulesza, P., and Bedwell, D. M. (1993) Phosphoglucomutase in *Saccharomyces cerevisiae* is a cytoplasmic glycoprotein and the acceptor for a Glc-phosphotransferase. *J. Biol. Chem.* **268**, 8341-8349.
7. Kamemura, K. and Kato, S. (1998) Cytoplasmic proteins possessing sugar chains different from O-GlcNAc. *Abstract Book of International Symposium on Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosylation*, Taipei, Nov. 9-13, BP-14.
8. Kamemura, K. and Kato, S. Rabbit muscle cytosolic creatine kinase is partially O-glycosylated. In submitted.
9. Genth, H., Aktories, K., and Just, I. (1999) Monoglucosylation of RhoA at threonine 37 blocks cytosol-membrane cycling. *J. Biol. Chem.* **274**, 29050-29056.

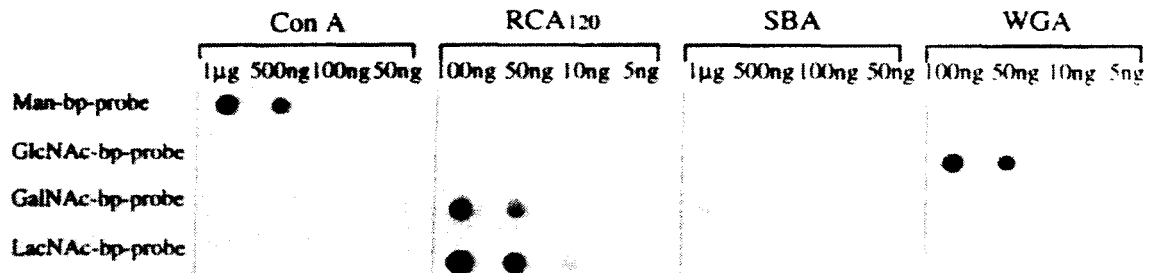


Fig. 1. Binding of carbohydrate-bp-probes to plant lectins.

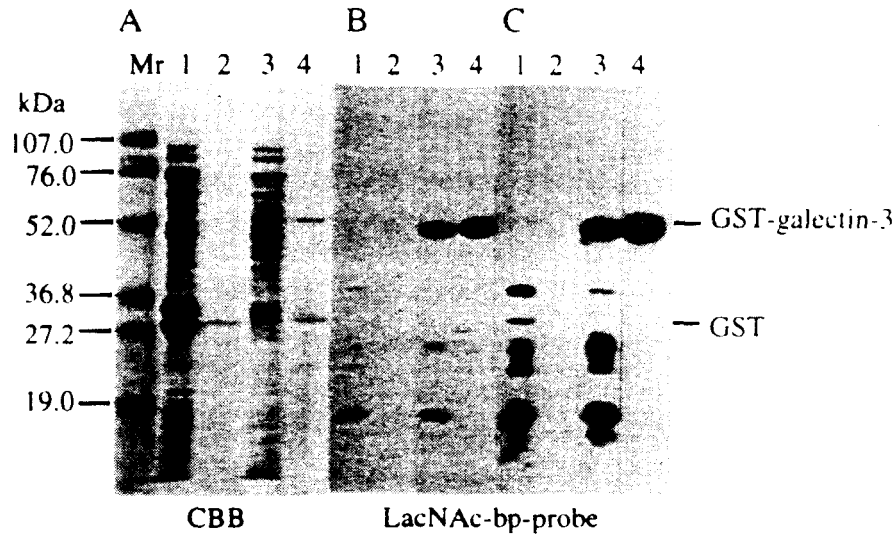


Fig. 2. Binding of LacNAc-bp-probe to GST-galectin-3. The film was exposed for 15 s (B) or 2 min (C). Lane 1, the lysate of *E. coli* carrying a plasmid containing the GST DNA; 2, affinity-purified GST; 3, the lysate of *E. coli* carrying a plasmid containing the GST-galectin-3 fusion DNA; 4, affinity-purified GST-galectin-3.

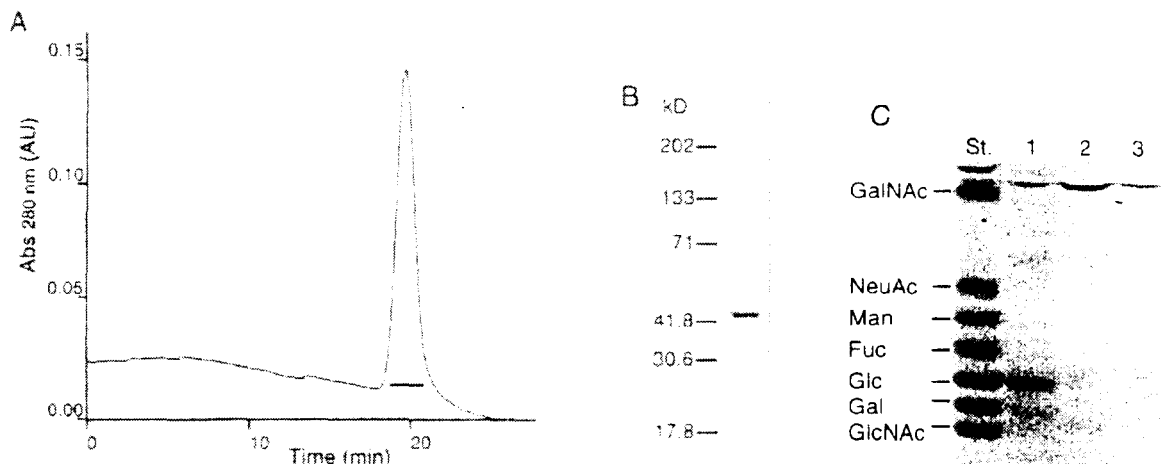


Fig. 3. Purification and FACE analysis of CK. (A) Purification of CK by Mono Q ion-exchange chromatography. (B) SDS-PAGE of the pooled fraction. (C) FACE sugar composition analysis of the pooled fraction. Lane 1, hydrolysate of the pooled fraction; 2, non-hydrolysate of the fraction; 3, water (as a negative control); St, sugar standards.

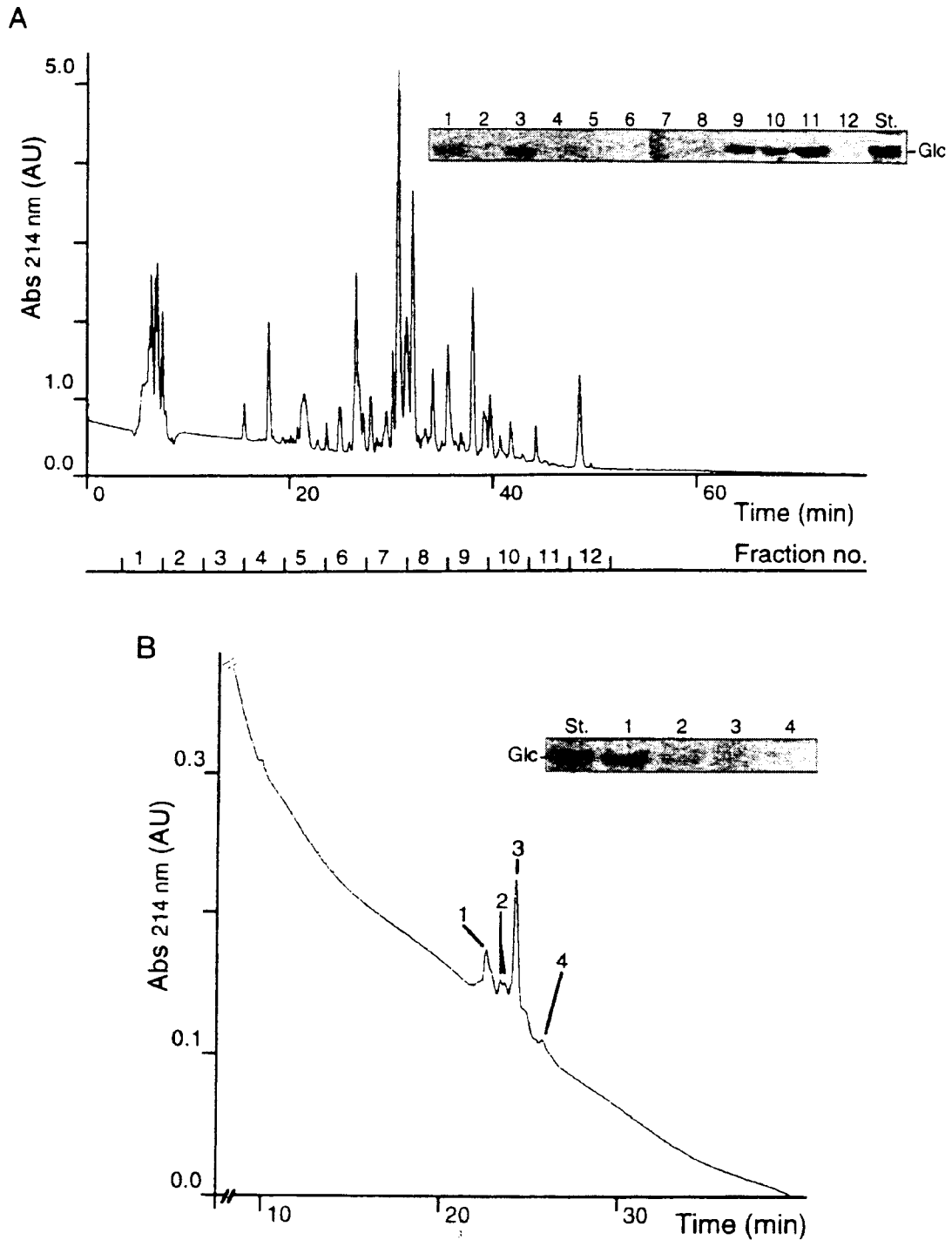


Fig. 4. Separation of the glycopeptides from trypsin digest of CK. (A) Reverse-phase liquid chromatography of the digest on a Sephasil C8 SC 2.1/10 column. (B) Re-chromatography of the fraction 11 in the panel A on a Sephasil C18 SC 2.1/10 column. The number of the inlet corresponds to the peak number.