

B3GALNT2 糖転移酵素によって合成される 新規 LacdiNAc 糖鎖構造のキャリアタンパク質の研究

SATテクノロジー・ショーケース2017

■ はじめに

「糖鎖」は、生体の鎖状高分子の一つであり、核酸やタンパク質と同様に生体内で重要な役割を担っている。現在、糖鎖改変バイオ医薬品などの創薬利用や癌・再生医療の有用マーカーとして糖鎖の注目度は年々高まっている。しかし、糖鎖の分子相互メカニズムや機能の理解は限定的である。

糖鎖合成を行う糖転移酵素は、現在までヒトで約 200 種類クローニングされ、基質特異性や転移する糖の種類がそれぞれ異なる。そして、糖鎖の生物機能は、糖の組成や結合部位によって変化することが明らかとなっている。

我々が着目する type I LacdiNAc 糖鎖は、糖転移酵素の一つである B3GALNT2 によって合成される。本酵素はヒト生体内で広汎に発現しているが、**合成される糖鎖は生体試料より検出することが困難であった**。しかし、近年になり、B3GALNT2 は脊椎動物の発生やヒトの疾患に関与するという報告がなされるようになり、本糖鎖の機能解明は生物学的に重要である。

本研究は、**type I LacdiNAc 糖鎖のキャリアタンパク質を同定する解析方法を確立**し、本糖鎖の生物学的意義解明に迫ることを目的としている。

■ 活動内容

1. Type I LacdiNAc 糖鎖認識レクチンの探索

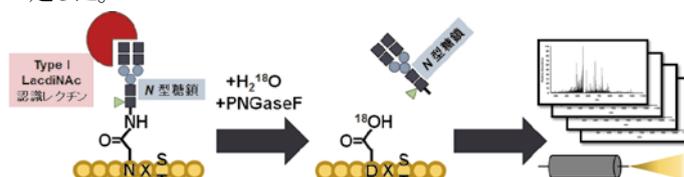
Type I LacdiNAc 糖鎖を単離・検出するために、**レクチンの糖結合性を利用した**。レクチンは、糖の種類や糖鎖構造に対して特異的な結合活性を持つ。さらにレクチンは幅広い生物種に存在し、様々な生物機能を発揮していることが報告されている。

B3GALNT2 過剰発現細胞と正常細胞のタンパク質をそれぞれ回収し、B3GALNT2 過剰発現細胞由来のタンパク質をより強く認識するレクチンを Lectin Array および

Lectin Blot によって探索した。これにより、数個のレクチンが type I LacdiNAc 糖鎖の単離・検出に有用であることを見出した。

2. IGOT-LC/MS 解析を用いた type I LacdiNAc キャリアタンパク質の同定

Type I LacdiNAc 糖鎖キャリアタンパク質を網羅的に同定するために、本糖鎖認識レクチンを用いて捕集した *N*結合型糖ペプチドを**糖鎖付加位置特異的な安定同位体標識法 (IGOT : isotope-coded glycosylation site-specific tagging)**により標識した。これらの標識ペプチドを LC/MS によって同定し、B3GALNT2 過剰発現細胞と正常細胞の比較グライコプロテオーム解析を行った。今回の解析手法によって、type I LacdiNAc 糖鎖が存在する *N*結合型糖鎖を持つ候補タンパク質を数十種類同定した。



①レクチンカラムによる捕集 ②糖鎖付加部位特異的な安定同位体標識(IGOT) ③LC/MS解析
図 1 type I LacdiNAc キャリアタンパク質を同定するための IGOT-LC/MS 解析の模式図

3. 同定された候補タンパク質上の糖鎖解析

Type I LacdiNAc 糖鎖認識レクチンによって捕集された糖ペプチド上の *N*結合型糖鎖を MALDI-TOF-MS によって解析した。この結果、*N*結合型糖鎖中の type I LacdiNAc 糖鎖の存在量が B3GALNT2 により増大することを確認した。

また、同定された候補タンパク質を免疫沈降法により回収し、同定された候補タンパク質上の *N*結合型糖鎖中の type I LacdiNAc 糖鎖の存在量が B3GALNT2 によって増大することを確認した。

代表発表者 **中根 隆浩 (なかね たかひろ)**
所 属 **1. 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻**
2. 特定国立開発法人 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 糖鎖技術研究グループ
問合せ先 〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 2-12
TEL:029-861-3200 FAX:029-861-3201

■キーワード: (1)糖鎖科学
(2)type I LacdiNAc
(3)B3GALNT2
(4)IGOT
■共同研究者: 成松 久
(産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門)