

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07916

研究課題名(和文) 水素/重水素交換質量分析法による糖タンパク質 糖鎖複合体の相互作用解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of analytical method for glycoprotein-glycan interaction by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry

研究代表者

橋井 則貴 (Hashii, Noritaka)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長

研究者番号：20425672

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)：糖タンパク質糖鎖は、タンパク質や糖タンパク質と複合体を形成することにより、様々な生理機能に關与することが知られている。糖鎖-糖タンパク質複合体の機能を理解するためには、相互作用部位を特定するとともに、複合体形成に關連した構造変化を捉えることが重要である。そこで本研究では、簡便かつ迅速な糖鎖-タンパク質間相互作用解析手法の開発を目的として、水素重水素交換/質量分析(HDX/MS)により、モデルの糖鎖及び糖タンパク質を用いて、糖鎖-糖タンパク質複合体の相互作用解析手法としての有用性評価を行った。本研究により、HDX/MSは、糖鎖-糖タンパク質間相互作用解析に利用可能であることが実証された。

研究成果の概要(英文)：Protein glycosylation is involved in several biological functions via complex formation with target proteins and glycoproteins. To comprehensively understand biological roles of the glycan-glycoprotein complex, it is important to identify interaction sites in complexes as well as to reveal structural changes related to complex formation. However, many issues still remain in general higher-order structural analytical methods, including X-ray crystal structural analysis and NMR. These methods require complicated operations, such as crystallization and preparation of high-concentration sample solutions. We have analyzed protein-protein interactions under physiological conditions via hydrogen deuterium exchange reaction/liquid chromatography/mass spectrometry (HDX/MS). In this study, we evaluated the effectiveness of the HDX/MS using model glycan and glycoproteins. We demonstrated that HDX/MS is useful as an easy and rapid analytical method for glycan-glycoprotein interaction.

研究分野：分析化学

キーワード：水素重水素交換/質量分析 相互作用解析

1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質糖鎖は、タンパク質と複合体を形成することにより、炎症、免疫、及び血液凝固等に関係することが示唆されている。糖鎖の機能を理解するためには、糖鎖構造を明らかにするとともに、他の分子との相互作用機序を分子レベルで解明することが重要である。糖鎖-糖タンパク質複合体の高次構造解析や相互作用解析は、一般に X 線結晶構造解析法や核磁気共鳴 (NMR) 法などにより行われている。しかしながら、それらの解析手法は、不均一性が高い糖タンパク質が分析対象の場合にスペクトルが複雑となり解析できないケースがあること、解析可能なタンパク質の分子量に限界があること、高濃度の試料溶液を準備する必要があることなど課題が多い。分子生物学や糖鎖生物学等の分野で、糖タンパク質糖鎖の機能ドメインとしての重要性が急速に認識されつつあるが、その一方で、糖鎖-糖タンパク質相互作用解析技術は発展途上にあると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに我々は、簡便かつ迅速な糖タンパク質高次構造特性評価技術を開発する一環として、タンパク質の揺らぎ (動的構造) 解析技術の一つとして知られている水素/重水素交換反応と質量分析を組み合わせた手法 (HDX/MS) に着目し、タンパク質の分子間相互作用解析に応用してきた。タンパク質水溶液を重水溶液で希釈するとタンパク質のアミド水素は重水素に置換される (HDX 反応)。反応溶液の pH を酸性にして HDX 反応停止 (クエンチ) 後、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を用いて、オンラインペプシン消化、及びペプチドマッピングを行うことにより、ペプチド単位の重水素交換数を確認することができる。一般に、分子表面の溶媒と接触しやすいアミド水素ほど早く重水に交換され、水素結合に関与する水素原子や分子内部に存在するアミド水素などの交換速度は遅いことから、分子間の相互作用界面を重水素交換率の低いペプチドとして特定することができる HDX/MS は、微量分析が可能なこと、操作が簡便なこと、さらに生体内に近い環境下での測定が可能な点で他の分析法よりも優れている。

そこで、より簡便かつ迅速な糖鎖-タンパク質間相互作用解析手法の開発を目的として、モデルとしてヒトアンチトロンビン (AT)、及びヘパリン類を用いて、HDX/MS の糖鎖-糖タンパク質複合体の相互作用解析手法としての有用性評価を行った。

3. 研究の方法

3-1. 試料等

合成ヘパリン 5 糖として市販製剤を使用した。未分画ヘパリンナトリウム (UFH) 及び低分子量ヘパリンナトリウム (LMWH) は、それぞれ Calbiochem 社製試薬、及び市販製剤

を使用した。アンチトロンビン (AT) は乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤を用いた。トロンビンは市販製剤を使用した。重水及び Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP-HCl) は SigmaArdrich 社、グアニジン塩酸 (guanidine-HCl) 塩溶液は ThermoFisherScientific 社より購入した。

3-2. ヘパリン類-アンチトロンビン複合体溶液の調製

ヘパリン類と AT の複合体溶液は、それぞれを以下の比率で混合することにより調製した。

①合成ヘパリン 5 糖-AT 複合体

AT	6.8mg/mL	100µL
合成ヘパリン 5 糖	12.5mg/mL	8µL
PBS		192µL
最終濃度		
AT	2.3mg/mL	
合成ヘパリン 5 糖	0.33mg/mL	

②未分画ヘパリン (UFH) -AT 複合体

AT	6.8mg/ml	100µL
UFH	12.5mg/ml	40µL
PBS		160µL
最終濃度		
AT	2.3mg/mL	
UFH	1.65mg/mL	

③低分子量ヘパリン (LMWH) -AT 複合体

AT	6.8mg/mL	100µL
LMWH	6.25mg/mL	80µL
PBS		120µL
最終濃度		
AT	2.3mg/mL	
LMWH	1.67mg/mL	

④UFH-AT-トロンビン (T) 複合体

AT	6.8mg/mL	100µL
UFH	12.5mg/mL	40µL
トロンビン	13.6mg/mL	25µL
PBS		135µL
最終濃度		
AT	2.3mg/mL	
UFH	1.65mg/mL	
トロンビン	1.13mg/mL	

⑤LMWH-AT-T 複合体

AT	6.8mg/mL	100µL
LMWH	6.25mg/mL	80µL
トロンビン	13.6mg/mL	25µL
PBS		95µL
最終濃度		
AT	2.3mg/mL	
LMWH	1.67mg/mL	
トロンビン	1.13mg/mL	

3-3. 水素重水素交換 / 質量分析 (HDX/MS)

① サンプル溶液

3-2に示した条件で各サンプル溶液を調製した。

② コントロール溶液

PBSを用いて、ATの最終濃度が2.3mg/mLとなるようにコントロール溶液を調製した。

③ クエンチバッファー

予冷(4°C)した300 mM TCEP-HCl及び4 M guanidine-HClを含む溶液をクエンチバッファーとして使用した。なお、クエンチバッファーのpHについては、HDX反応溶液と等量混合後に2.25となるように調整した。

④ PBS 重水溶液

ダルベッコ PBS (-) 粉末 (日本製薬株式会社) の960 mgを100 mLの重水(99.9 atom % D)で溶解して、PBS重水溶液を調製した。

⑤ HDX反応及びクエンチ操作

本操作はCTC PAL sample manager (LEAP Technologies)を用いて実施した。サンプル溶液及びコントロール溶液の各3 µLに57 µLのPBS重水溶液を加えて混和した後、0, 0.17, 1, 10, 60, 240, 960分間、10°Cでインキュベートした。所定時間インキュベートした後、反応溶液(50 µL)と50 µLのクエンチバッファー(50 µL)を混合することで反応を停止させた。

⑥ LC/MSによるオンラインペプシン消化

クエンチ後、50 µLの溶液をLC/MSに注入した。LC/MSは以下の装置及び条件で行った。MS: SynaptG2-S Q-ToF mass spectrometer (Waters)

LC: nanoACQUITY UPLC system (Waters)

ペプシンカラム: Poroszyme Immobilized Pepsin Cartridge (2.1×30 mm, Applied Biosystems)

オンラインペプシン消化: サンプル注入後、0.1%ギ酸溶液(pH 2.5)を移動相とし、流速300 µL/minで、10°C、1分間、ペプシンカラムを通過させることによりペプシン消化を行い、生じたペプチドはトラップカラムにより捕獲した。

トラップカラム: VanGuard Pre-Column, BEH C18, 2.1×5mm (Waters)

分離カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.0×100 mm, 1.7 µm, Waters)

ペプチドの分離: 0.1%ギ酸溶液(pH 2.5)(移動相A)及び90%アセトニトリルを含む0.1%ギ酸溶液(移動相B)を用いて、流速30 µL/min, 移動相Bのリニアグラジュエント(13~85%, 8分間)で、重水素交換したペプチドを分離・溶出させた。

MS条件: 以下のとおりであった。

Electrospray voltage: 2.8 kV (positive ion mode)

Mass range: m/z 100–2,000

⑦ AT由来ペプチドの同定及び重水素化率の算出

ATのアミノ酸配列を含む in-house のデータベースを作成し、ProteinLynx Global Server 2.5.2 (Waters)により、ペプチド同定を行った。重水素化率の計算は、DynamX 2.0 software (Waters)で行った。

⑧ X線結晶構造との重ね合わせ

HDX/MS解析によりサンプルとコントロールで差のみられた領域について、PyMOL (Schrödinger)を用いて、ATのX線結晶構造との重ね合わせを行った。ATのX線結晶構造として、RCSB Protein Data Bankに登録されている2B4X, ATとヘパリン類複合体の構造として1AZX及び1TB6を使用した。

4. 研究成果

4-1. 合成ヘパリン5糖-ATの解析

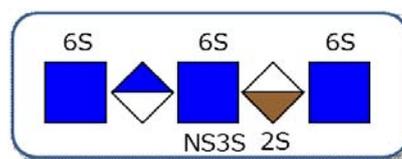


図1. 合成ヘパリン5糖
GlcNAc(6S)-GlcA-GlcNS(3S,6S)-IdA-GlcNS(6S)

本研究で使用した合成ヘパリン5糖(図1)はATと相互作用を示すことが知られている。そこでまず、HDX/MSにより合成ヘパリン5糖-AT複合体の相互作用解析を行った。コントロール(ATのみ)及びサンプル(合成ヘパリン5糖+AT)のHDX/MS解析を行った後に、AT由来のペプチドの重水素交換数を比較した。その結果、合成ヘパリン5糖を添加すると、40番目のアミノ酸残基付近(領域1)、110番目のアミノ酸残基付近(領域2)、80番目のアミノ酸残基付近(領域3)、220番目のアミノ酸残基付近(領域4)、及び380番目のアミノ酸残基付近(領域5)で差異が見られた(図2, 3)。領域1及び2は、X線結晶構造との重ね合わせから、ヘリックスA

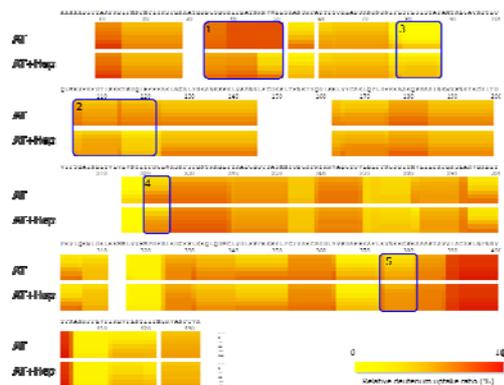


図2. 合成ヘパリン5糖(Hep)及びアンチトロンビン(AT)のHDX/MS解析により得られた重水素交換数のヒートマップ

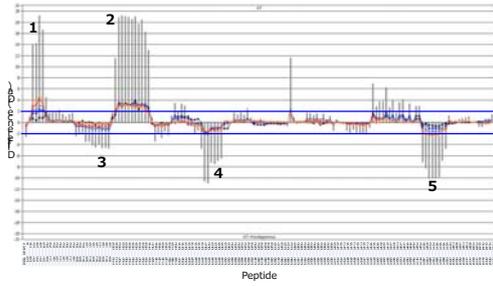


図 3. アンチトロンビン (AT) (コントロール), 及び合成ヘパリン 5 糖 (Hep)-AT 複合体の重水素交換数の差異解析
40 番目のアミノ酸残基付近 (領域 1), 110 番目のアミノ酸残基付近 (領域 2), 80 番目のアミノ酸残基付近 (領域 3), 220 番目のアミノ酸残基付近 (領域 4), 及び 380 番目のアミノ酸残基付近 (領域 5)

(hA) 及び hD であることが明らかとなった (図 4). これらの領域はヘパリン結合部位であることが示唆されているが, 本分析によっても重水素交換数の減少が認められ, すなわち, ヘパリンとの相互作用により, 同領域の揺らぎが減少したものと推察された. 一方, 領域 3, 4, 及び 5 は, それぞれ hB, ストランド 3A (s3A), s5A 及びトロンビン反応ループの一部 (近位ヒンジ領域) と一致するが, 同領域の重水素交換数は増加した. s3A 及び s5A 領域は, トロンビン結合時の構造安定化に関係することが知られている. また, 近位ヒンジ領域付近は, AT の構造安定化に参与する s4A が形成される領域であり, さらに, ヘパリン結合によるアロステリック構造変化に関係することが知られている Gly379 及び Ser380 が含まれる. hB はシャッター領域と呼ばれ, ヘパリン結合時の構造変化に関係することが示唆されている領域である. 以前の報告からは, hB, s3A, s5A 及び近位ヒンジ領域は, トロンビン結合時に, いずれも溶媒側に露出するような構造変化が生じることが示唆されることから, 本研究の結果は, それを支持するものであった. 尚, 本研究結果から, hB, s3A 及び s5A 領域の構造変化 (開口) は合成ヘパリン 5 糖結合時に速やかに起こる現象であり, トロンビン非存在下でも生じる可能性が新たに示唆された.

4-3. ヘパリン類-AT の解析

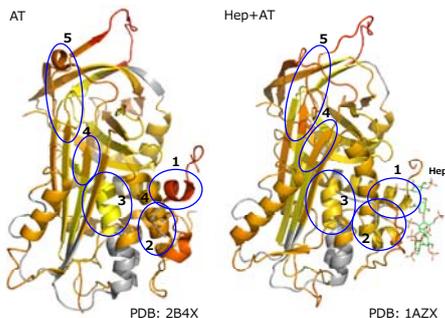


図 4. HDX/MS 解析で差異の認められた領域と X 線結晶構造との重ね合わせ
灰色: 未同定領域

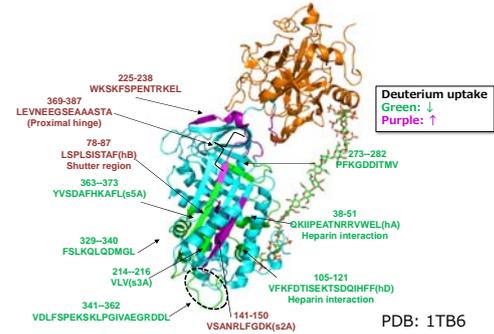


図 5 未分画ヘパリン-アンチトロンビン複合体, 及び低分子量ヘパリン-アンチトロンビン複合体で差異の認められた領域.

複雑な不均一性を有する糖鎖と糖タンパク質との相互作用解析への HDX/MS 解析手法の応用可能性を検証することを目的として, 未分画ヘパリン (UFH) 及び低分子量ヘパリン (LMWH) をモデル糖鎖として用いて, AT との相互作用解析を行った. HDX/MS 解析を行った結果, UFH 及び LMWH を添加すると, いずれも hA 及び hD 領域の重水素交換数が減少したことから, 両ヘパリン類と合成ヘパリン 5 糖では AT との結合領域が類似していることが示唆された. また, hB, s3A, 及び近位ヒンジ領域の重水素交換数には増加傾向がみられ, 合成ヘパリン 5 糖と同様の

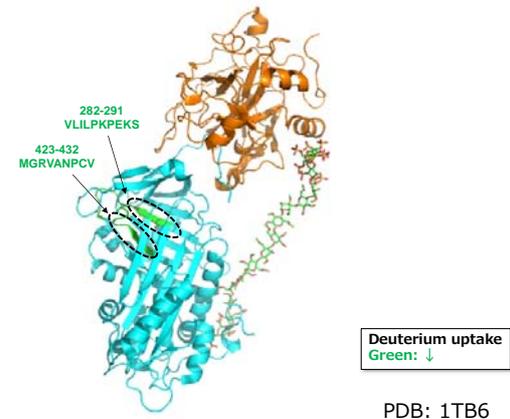


図 6 未分画ヘパリン-アンチトロンビン-トロンビン複合体, 及び未分画ヘパリン-アンチトロンビン複合体にのみ差異の認められた領域.

動的構造変化が生じている可能性も示唆された. 一方, 合成ヘパリン構成 5 糖と比較したとき, UFH 及び LMWH では, 新たに 290 番目のアミノ酸残基付近において, 重水素交換数に減少傾向がみられ, さらに LMWH より UFH の方が, 強い減少傾向が観察された. 一般に, LMWH は UFH よりもトロンビン阻害活性が低いことが知られており, 同領域の高次構造変化とトロンビン阻害活性との関連性に興味を持たれる.

4-4. ヘパリン類-AT-トロンビンの解析 LMWH が UFH よりもトロンビン阻害活性

が低い要因として、両ヘパリン類と AT との相互作用が異なることが考えられる。そこで、トロンビン存在下及び非存在におけるヘパリン類-AT 複合体の HDX/MS 解析を行い、UFH-AT-トロンビン複合体に特徴的な重水素交換数の変化が生じるペプチド領域の抽出を行った。尚、HDX/MS 分析に用いた溶媒組成において、UFH のトロンビン阻害活性が保持されていることを確認している。

AT のみの分析をコントロールとして、UFH-AT-トロンビン複合体、UFH-AT 複合体、LMWH-AT-トロンビン複合体、及び LMWH-AT 複合体の HDX/MS 解析を行った。その結果、全ての複合体に共通して、AT の hA 及び hD の重水素交換数の減少傾向、並びに hB 及び近位ヒンジ領域の重水素交換数の増加傾向が観察された (図 5)。また、取得したデータを詳細に検討した結果、これまでに報告されていない複数の領域 (140~150, 230~240, 270~280, 340~360 番目のアミノ酸残基付近) にも差異が認められることが示唆された。

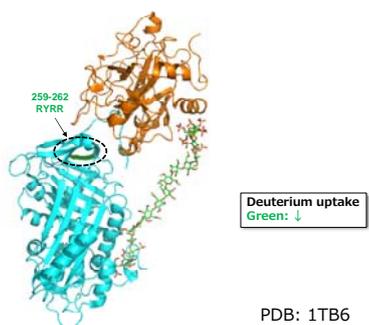


図 7 未分画ヘパリン-アンチトロンビン-トロンビン複合体にのみ差異の認められた領域。

UFH-AT-トロンビン複合体と UFH-AT 複合体に特徴的な重水素交換数の変化として、B 領域のストランド構造を形成する 280~290 及び 420~430 番目付近のアミノ酸配列の減少傾向が確認された (図 6)。両領域はトロンビンが存在しなくとも揺らぎが減少する領域であると考えられる。すなわち、AT の B 領域ストランド構造の安定化は、トロンビンとの結合に重要であることが示唆された。また、UFH-AT-トロンビン複合体にのみ特徴的な重水素交換数の変化としては、C 領域のストランド構造を形成する 259~262 番目付近のアミノ酸配列の減少傾向が観察された (図 7)。図 7 に示したように、C 領域は比較的トロンビンの近傍に位置することから、AT-トロンビンの相互作用に関連した部位である可能性がある。

以上の結果から、UFH-AT-トロンビン複合体の形成には、B 及び C 領域のストランド構造の安定化が重要である可能性が示唆された。また、HDX/MS は複数のタンパク質と糖鎖の相互作用解析にも応用可能であるこ

とが示唆された。

本研究では、糖鎖-糖タンパク質間相互作用解析手法の開発を目的として、モデルとしてヘパリン類、AT、トロンビンを用いて、HDX/MS の有用性評価を行った。本研究の結果、ヘパリン類及びトロンビンとの結合に係る相互作用界面、及び結合に伴う AT の動的構造変化を捉えることができた。本研究により HDX/MS が簡便かつ迅速な糖鎖-糖タンパク質間相互作用解析手法であることが実証された。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 橋井則貴, 鈴木琢雄, 蛭田葉子, 石井明子, 水素重水素交換/質量分析法を利用した糖鎖-タンパク質間相互作用解析. 第 89 回日本生化学会大会 (2016. 9)
- 2) 橋井則貴, 石井明子, 質量分析によるバイオ医薬品の品質特性解析, 第 67 回日本電気泳動学会シンポジウム (2017. 6)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
橋井 則貴 (HASHII Noritaka)
国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長

研究者番号：20425672

(2) 研究分担者

鈴木 琢雄 (SUZUKI Takuo)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・主任研究官

研究者番号：10415466