

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790039

研究課題名（和文） 安定同位体標識技術を利用した糖鎖の精密構造解析法の開発

研究課題名（英文） Development of structural analysis of oligosaccharides by stable isotope labeling techniques

研究代表者

山口 芳樹 (YAMAGUCHI YOSHIKI)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90323451

研究成果の概要：高感度 ^{13}C 検出法による高分子量糖タンパク質糖鎖のNMRシグナルの帰属法の開発を行った。この計測技術は、糖タンパク質の構造・機能解析のブレイクスルーとなった。また、低温条件下で ^{13}C -NMRを計測することにより、糖鎖水酸基の水素結合に関する情報を得ることに成功した。本方法をオリゴ糖鎖や多糖に適用することにより、オリゴ糖間の弱い相互作用や多糖のヘリックス形成の立体構造に関する情報を抽出することが可能となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	390,000	3,390,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生物分子構造学、安定同位体標識、糖鎖、NMR、糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

生体を構成するほとんどのタンパク質には“糖鎖”が結合している。糖鎖はタンパク質の溶解性や安定性を決定するばかりでなく、タンパク質機能部位の三次元構造の構築に関与していることが明らかとなりつつある。現在、糖鎖の構造機能の体系的・網羅的解明を目指したグライコミクスが、急速な勢いで進展している。また、抗体医薬をはじめ医薬品として実用段階にあるバイオロジクスの中で糖タンパク質は重要な位置を占めており、糖鎖の構造が生物活性に大きな影響を与えている例も知られている。したがって、糖鎖の構造を迅速・簡便・正確に解析するこ

とは医薬品の開発・生産においてもますます重要な課題となりつつある。

現在、糖鎖構造解析において質量分析(MS)と核磁気共鳴(NMR)法は、なくてはならない分析であり、その最近の進展については目覚ましい。しかしながら、両方法ともに問題点を抱えており、糖鎖構造解析は依然として容易ではなかった。

2. 研究の目的

我々はこれらの問題点を解決するため、糖タンパク質や糖鎖に安定同位体標識を施し、NMRや質量分析などの分析方法を系統的に適用することにより、その構造と機能を探求し

ようとする発想に至っている。本研究の目的は、これまで開発してきた糖鎖の安定同位体標識技術を基盤とし、糖タンパク質糖鎖の新しいNMR計測法・質量分析法を確立することにより、これまで得られなかったタンパク質糖鎖の構造情報を抽出し、構造的観点から糖鎖の機能を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 安定同位体標識糖鎖の MSn 分析による開裂様式の解析

通常糖鎖は分岐型の構造をしており、それぞれの枝が同じ質量である場合、その開裂がどの枝に由来するのかを同定することは困難である。しかし、分枝鎖選択的に特定の糖残基を ^{13}C により標識を行えばそのイオンを目印とすることができ、容易に帰属することができる。申請者らは、枝選択的に ^{13}C 標識した2本鎖複合型糖鎖を用いて、その枝選択的な開裂を明らかとしている(図2)。その知見をもとに様々な3本鎖、4本鎖糖鎖について行いその開裂様式のデータベースを蓄積する。また、得られた知見をもとにその開裂様式の理論的背景をコンピュータシミュレーションにより明らかとして、構造未知の糖鎖構造を質量分析のみを用いて決定する方法を開発する。

(2) 安定同位体標識タグを用いた糖鎖の定量的質量分析とその応用

通常糖鎖を分析する場合、糖鎖還元末端に2-aminopyridine等の蛍光物質にて誘導体化を施す。この糖鎖タグを ^2H や ^{15}N などの安定同位体にて標識を施しておくことにより、PA化糖鎖の定量が質量分析において可能となる。非標識の2-aminopyridineと標識2-aminopyridineを用いて糖鎖を誘導体化し、それぞれを混合して質量分析を行うことにより、各糖鎖の定量を行う(図3)。またこの方法を応用し、ある種の疾患における特異的発現糖鎖(糖鎖バイオマーカー)の同定を試みる。

(3) 高感度 ^{13}C 検出法による高分子量糖タンパク質糖鎖の帰属法の開発と応用

動物細胞、昆虫細胞等を利用した糖鎖修飾付きの糖タンパク質の大量発現系を利用し、これらの安定同位体(^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O)標識糖タンパク質を調製する。得られた糖タンパク質の糖鎖の配列は予め多次元HPLC法により同定する。得られた標識糖タンパク質を対象として ^{13}C 検出に適したNMR低温プローブを用いて ^{13}C 検出型のNOESY/TOCSYを測定する。また、高分子量糖タンパク質においても効率的なC-C間の磁化移動を達成するため、最適な重水素化率の検討、NMR測定の混合時間などのNMR計測パラメータの最適化を行う。同位体標識率はフーリエ変換型質量分析装置を用いて明らかとする。

(4) 酸素のNMRシグナルを利用した糖鎖の構造解析

酸素原子は糖鎖を構成する主要な原子で水素結合において重要な役割を果たしているが、そのNMR解析はほとんど行われていない。それは、主に ^{17}O の天然同位体比が圧倒的に少ないことによる。しかし、 ^{17}O の化学シフトの範囲は ^1H や ^{13}C に比べて極めて広く(~1600 ppm)、糖鎖の構造解析・コンフォメーション解析に非常に有用であることが予想される。申請者らの安定同位体標識技術を用いて糖鎖の ^{17}O 標識体を調製し、その ^{17}O -NMRスペクトルを測定する。いくつかの代表的な構成糖残基の ^{17}O の化学シフトデータを蓄積し、その結合様式やグリコシド結合のコンフォメーションと化学シフトとの関係を明らかとする。

(5) ヒドロキシルプロトンを利用した糖鎖—タンパク質、糖鎖—糖鎖相互作用解析

一般に糖鎖—タンパク質、糖鎖—糖鎖相互作用には水素結合が重要な役割を担っているが、その検出は通常困難である。前年度に蓄積した同位体シフト値およびヒドロキシルプロトンの交換速度を基礎データとして、糖鎖—タンパク質相互作用や糖鎖—糖鎖相互作用解析に応用する。具体的には糖鎖のヒドロキシルプロトンの水素結合形成にともなう交換速度の低下を観測する。また、NMRの試料管の直径が1 mm-3 mmのようなマイクロ試料管では、 $-15\text{ }^\circ\text{C}$ 程度まで水溶液が凍結しないことを利用して $-15\text{ }^\circ\text{C}$ としてヒドロキシルプロトンの直接観測を試み、そのヒドロキシルプロトンの化学シフト、スピン結合定数から糖鎖—糖鎖相互作用の原子レベルでの詳細を明らかとする。

4. 研究成果

(1) 高感度 ^{13}C 検出法による高分子量糖タンパク質糖鎖の帰属法の開発

動物細胞を利用した糖鎖修飾付きの糖タンパク質の大量発現系を利用して、安定同位体

(^{13}C)標識糖タンパク質を調製した。得られた標識糖タンパク質を対象として ^{13}C 検出に適したNMR低温プローブを用いて ^{13}C 検出型のNOESY/TOCSYを測定した。その結果、良好な感度の ^{13}C - ^{13}C の2次元相関スペクトルを得ることに成功した。 ^{13}C 直接検出を利用した本帰属法はHCCH-COSY/TOCSYなどの ^1H 検出型の帰属法と相補的であり、両方法を併用することにより高分子量糖タンパク質糖鎖のシグナルを効率的に帰属することが可能になると考えられる。また分子量5万程度の糖タンパク質に関しては、 ^{13}C -TOCSYに比べて ^{13}C -NOESY計測の方が高感度にシグナルを検出できることが判明した。この計測技術を利用すれば、糖タンパク質の構造解析・機能解析のブレイクスルーとなることが期待される。

(2) ヒドロキシルプロトンに着目した糖鎖

の構造解析

一般に糖鎖—タンパク質、糖鎖—糖鎖相互作用には水素結合が重要な役割を担っているが、その検出は通常困難である。今年度は、糖鎖の水素結合の情報を抽出するために、NMRを用いて糖鎖ヒドロキシルプロトンの溶媒との交換速度の交換速度のpHや温度の依存性を明らかとした。さらにその基礎データに基づき、Lewis x 糖鎖のヒドロキシルプロトンの水素結合形成にともなう交換速度の低下を観測することに成功した。さらにLewis xとCa²⁺の微弱な相互作用にともなうヒドロキシルプロトンの交換速度の低下を観測することにも成功した。オリゴ糖鎖のみならずアミロースやベータグルカンなどの多糖に本方法を適用した結果、アミロースでは鎖長に依存せずにO3で水素結合形成が観測されたのに対して、ベータグルカンの場合では鎖長に依存してO2で水素結合の形成が観測されるようになった。これらの知見は多糖のヘリックス形成の構造基盤を明らかにする上で基礎的な知見となる。

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7件)

① M. Utsumi, Y. Yamaguchi, H. Sasakawa, N. Yamamoto, K. Yanagisawa, K. Kato
Up-and-down topological mode of amyloid beta-peptide lying on hydrophilic/hydrophobic interface of ganglioside clusters. Glycoconj. J. (2009) in press (査読有)

② Y. Yamaguchi, M. Wälchli, M. Nagano, K. Kato
A ¹³C-detection NMR approach for large glycoproteins. Carbohydr. Res. 344, 535-538 (2009) (査読有)

③ Y. Yamaguchi
Development and application of stable-isotope-labeling methods oriented to structural glycobiology Trends Glycosci. Glycotechnol. 20, 117-130 (2008) (査読有)

④ S. Miyakawa, Y. Nomura, T. Sakamoto, Y. Yamaguchi, K. Kato, S. Yamazaki and Y. Nakamura
Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G RNA 14, 1154-1163 (2008) (査読有)

⑤ K. Kato, H. Sasakawa, Y. Kamiya, M. Utsumi, M. Nakano, N. Takahashi and Y. Yamaguchi
920 MHz ultra-high field NMR approaches to structural glycobiology Biochim Biophys Acta. 1780, 619-625 (2008) (査読有)

⑥ Y. Yamaguchi, T. Hirao, E. Sakata, Y. Kamiya, E. Kurimoto, Y. Yoshida, T. Suzuki, K. Tanaka, and K. Kato
Fbs1 protects the malformed glycoproteins from the attack of peptide:N-glycanase Biochem. Biophys. Res. Commun. 362, 712-716 (2007) (査読有)

⑦ S. Matsumiya, Y. Yamaguchi, J. Saito, M. Nagano, H. Sasakawa, S. Otaki, M. Satoh, K. Shitara, K. Kato
Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G J. Mol. Biol. 368, 767-779 (2007) (査読有)

[学会発表] (計11件)

① 花島慎弥、¹³C-NMRの同位体シフト効果を用いた糖鎖の水素結合観測への試み、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月27-29日、福岡

② Yoshiki Yamaguchi, Structural glycobiology for elucidating the function of glycoproteins: a multifaceted approach、International Symposium on Systems Glycobiology -A Bridge between Functional Glycomics and Chemical Biology-、2008年12月5日、品川

③ 山口芳樹、糖鎖の機能解明を目指した糖鎖構造生物学、第6回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム -糖鎖研究と他領域との統合-、2008年12月4日、品川

④ Yoshiki Yamaguchi, Development of an NMR Method for Structural Analysis of Oligosaccharides、2008 Annual Meeting of the Society for Glycobiology、2008年11月13日、Texas

⑤ 山口芳樹、糖鎖ヒドロキシルプロトンの交換速度を算出するためのNMR法の開発、第28回日本糖質学会年会、2008年8月19日、つくば

⑥ 山口芳樹、920MHz超高磁場NMR装置を利用した生体高分子・超分子の構造解析、中部

地区ナノテクノロジー・ネットワーク総合支援成果報告会、2008年3月18日、岡崎

⑦ 山口芳樹、糖タンパク質糖鎖の立体構造解析の現状と今後の課題、理研シンポジウム「第11回生体分子の化学」、2008年1月25日、和光

⑧ 神谷由紀子、糖タンパク質の輸送を司るカーゴレセプターによる糖鎖認識の特異性の解析、第27回日本糖質学会年会、2007年8月2日、福岡

⑨ 山口芳樹、糖鎖構造生物学のための安定同位体標識技術の開発と応用、第27回日本糖質学会年会、2007年8月1日、福岡

⑩ Hirokazu Yagi、Detailed Substrate specificities of sulfotransferases and glycosyltransferases as revealed by multi-dimensional HPLC mapping method、第3回国際糖類分子免疫学学術会議、2007年7月8-11日、台湾

⑪ 松宮茂樹、フコース結合型および欠失型ヒト免疫グロブリンG1のFcフラグメントの構造比較、第7回日本蛋白質科学会年会、2007年5月25日、仙台

[図書] (計5件)

① Y. Yamaguchi and K. Kato
Experimental Glycoscience Glycochemistry
pp. 121-123 (2008) Springer Japan
Analysis of sugar-protein interactions by NMR

② K. Kato and Y. Yamaguchi
Experimental Glycoscience Glycochemistry
pp. 45-50 (2008) Springer Japan
Structural analysis of glycoconjugates by NMR

③ 山口芳樹、加藤晃一
抗体医薬の最前線 pp116-126 CMC 出版
(2007)
NMRによる抗体の高次構造解析

④ 山口芳樹、加藤晃一
実験医学 25, pp. 1137-1144 (2007) 羊土社
NMRによる糖鎖-タンパク質相互作用の解

⑤ Y. Yamaguchi, N. Takahashi, and K. Kato
Comprehensive Glycoscience vol.3, pp. 745-763 (2007) Elsevier Science Ltd
Molecular interactions: Antibody structures and functions

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 芳樹 (YAMAGUCHI YOSHIKI)
独立行政法人理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム・チームリーダー
研究者番号：90323451