

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03362

研究課題名（和文）分岐型糖鎖の高次構造と相互作用原理の解明

研究課題名（英文）Study on structure and interaction of branched glycans

研究代表者

山口 芳樹 (Yamaguchi, Yoshiki)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90323451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,600,000円

研究成果の概要（和文）：糖鎖は枝分かれ構造を有し、その化学構造を明らかにするのは容易ではない。本研究では、原子レベルの構造情報をもたらす核磁気共鳴（NMR）法を糖鎖に適用する際の測定方法について検討を行った。NMRシグナルの分裂を回避する手法を用いることにより、5糖からなるモデル糖鎖に由来するNMR信号を曖昧なく同定することができた。

その糖鎖・糖ペプチドの役割を明らかにするためには、タンパク質との相互作用様式を解明する必要がある。本研究では、モデルケースとして抗体を対象とし、NMR解析結果を組み入れたドッキングの手法を検討した。NMRデータ量に依存するものの、ドッキングの再現性・精度を高めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分子である糖鎖の複雑な構造を明らかにすることは容易ではなく、その迅速かつ確実な構造解析が望まれている。本研究では、核磁気共鳴（NMR）法において測定方法を検討することにより、糖鎖に由来するNMR信号を曖昧なく同定することが可能になった。本成果は、糖鎖の生理的機能の解明に貢献する。

また糖鎖の役割を明らかにするためには、タンパク質との相互作用の様式を明らかにする必要がある。本研究では、NMR解析結果を組み入れたドッキングの手法を検討することにより、最小限の実験結果からドッキングモデルを構築することに成功した。本成果は、糖鎖を認識する抗体の合理的デザインなどに応用することが可能である。

研究成果の概要（英文）：Glycans usually have a branched structure, and the resulting complexity hampers the structural analysis. In this study, we applied nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, which provides structural information at the atomic level, to model glycans. By using a 1H-homodecoupling method, NMR signals was sharpened at the expense of signal sensitivity. We unambiguously assigned the NMR signals derived from a model glycan.

In order to clarify the role of the glycans, it is necessary to elucidate their interaction mode with proteins. In this study, we investigated a docking method for antibodies as a model case, incorporating the results of NMR analysis. We were able to improve the reproducibility and accuracy of docking, although it depends on the amount of NMR data.

研究分野：構造生物学

キーワード：糖鎖 糖タンパク質 グライコフォーム NMR 糖転移酵素 電子顕微鏡

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質に結合している糖鎖は、タンパク質の品質管理、細胞接着、タンパク質の安定化など様々な機能を持つことが知られている。特に糖鎖は細胞の顔と呼ばれており、その構造は細胞・組織の種類等によって大きく異なっている。さらに特定の糖鎖構造は疾患の状態によっても大きく変動することから、近年疾患マーカーとしての役割も重視されている。

N-結合型糖鎖(N型糖鎖)はオリゴ糖転移酵素の働きにより、翻訳された新生タンパク質の Asn-X-Ser/Thr 配列の Asn 残基に付加する(XはPro以外)。Asnに付加した糖鎖の多くはその後、小胞体-ゴルジ体を通る際に、一群の糖鎖プロセッシング酵素の働きを受け、高マンノース型糖鎖から複合型糖鎖へと成熟を成し遂げる。複合型糖鎖は通常2~5本の分枝からなり、その分枝間ではほぼ共通の糖鎖構造を有する。

典型的な2本鎖の複合型糖鎖は、Man 1-3分枝とMan 1-6分枝の2つの枝から構成されているが、各分枝は糖転移酵素や糖分解酵素、レクチンなどの反応性・結合性がしばしば異なることが明らかにされている。ガラクトース転移酵素は、Man 1-3分枝に優先的にガラクトースを付加すること、一方でシアル酸転移酵素は、Man 1-6分枝に優先的にシアル酸を付加することが知られている。このような分枝構造に依存した事象は、2つの糖鎖分枝のコア領域に対する相対的な配置や運動性の違いによると考えられるが、そのメカニズムはほとんど実証されておらず、根本的な「問題」として解決されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、糖鎖を特徴づける分枝構造に着目し、核磁気共鳴(NMR)法やX線結晶構造解析法などの実験化学的手法およびレプリカ交換分子動力学法などの計算化学的手法を用いて分岐糖鎖とレクチンの相互作用の構造基盤を明らかにすることを目的とした。糖鎖の各分枝それぞれに個性がもたらされる構造的な要因を解明するとともに、分岐型糖鎖に作用するレクチン・糖転移酵素の特異的な性質を立体構造の観点から解釈することを目指した。

### 3. 研究の方法

分岐構造をもつ糖鎖およびその対照糖鎖を化学合成法および天然糖タンパク質からの切り出しにより調製し、糖鎖に由来するNMRシグナルの完全帰属を行う。得られた帰属を基に一連のNMR解析を行い、立体構造とダイナミクスに関する情報を原子レベルで得る。同時に該当糖鎖のレプリカ交換分子動力学計算を行うことにより、糖鎖の立体構造アンサンブルを求め、先にNMR解析から得られた構造パラメータとの比較解析を行う。さらに各分岐糖鎖と特異的に結合するタンパク質および糖転移酵素を対象として、分岐型糖鎖の相互作用様式をNMR解析などの実験的手法および計算科学的手法により解明する。

### 4. 研究成果

#### (1) 分岐糖鎖のNMR解析法の検討

3本~4本の多分岐型糖鎖の場合、NMRシグナルの縮重が起こり、各分枝の議論が困難になる。シグナルの縮重を回避するため、広域ホモデカップリング(Pureshift)やスペクトル処理を工夫することにより、NMRスペクトルの簡素化の方法を検討した。広域ホモデカップリング法では通常の測定に比べて感度が低下するものの、 $^1\text{H}$ 同士のカップリングによる分裂を回避することができたため、従来であればシグナルの重なりや、分裂の複雑さから読み取ることができなかった異核( $^{13}\text{C}$ や $^{31}\text{P}$ )とのカップリング定数を容易に読み取ることができた。実際 $^{13}\text{C}$ 標識を部位特異的に行った糖鎖試料に対して、Pureshift NMRスペクトルを測定することにより、糖残基間のグリコシド結合周りの $3J(\text{C},\text{H})$ カップリング定数を比較的容易に読み取ることができた。また $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC CLIP-COSYのrelayを繰り返すことにより、アノマー位の水素H1からH2, H3, H4と順にあいまいさなく帰属することができた。本測定方法は感度も良好であり、シグナルの重なりの激しい糖鎖信号の帰属に非常に有効な方法であった。

#### (2) 高マンノース型糖鎖含有タンパク質の大量調製法の検討

分岐型糖鎖を結合しているモデル糖タンパク質としてRNase Bを主な対象とした。RNase Bは高マンノース型糖鎖を有しているが、マンノース残基が5個から9個の混合物であり、各RNase B グライコフォームをHPLCにより単離精製する方法を検討した。カラムの種類、移動相の溶媒の種類、グラジエントを検討することにより、各RNaseB グライコフォームを単離することに成功した。各グライコフォームはNMR解析や糖転移酵素との相互作用解析に用いた。

#### (3) $^{13}\text{C}$ -NMR法による糖タンパク質の水素結合の解析

素結合を直接観察する一つ的手段としてNMR法が用いられている。 $^1\text{H}$ -NMR法は糖鎖ヒドロキシ水素を直接観測する利点を有する一方で、シグナルの化学シフト範囲が狭く、他の信号と重複することが問題であった。本研究ではその問題を解決するため、広い化学シフト域を有する $^{13}\text{C}$ -

NMR を用いて解析を行った。<sup>13</sup>C-NMR 測定には分岐型高マンノース糖鎖を含む RNase B をモデル糖タンパク質として、H<sub>2</sub>O : D<sub>2</sub>O = 1 : 1 の溶媒を使用して行った。そして、糖鎖に由来する <sup>13</sup>C-NMR シグナルの線形の温度依存性を観察することにより、ヒドロキシプロトンの H/D 交換速度に関する情報の抽出を試みた。その結果、高温では sharp な <sup>13</sup>C シグナルが観測された一方、低温においては broad な <sup>13</sup>C シグナルが観測された。<sup>13</sup>C-NMR の感度の低さの問題は残されているものの、糖タンパク質糖鎖の水酸基に由来する水素結合の解析法として <sup>13</sup>C-NMR 法の有効性を示した。

#### (4) 分岐糖鎖を有するタンパク質と糖転移酵素との相互作用解析

分岐型糖鎖に作用する糖転移酵素 UGGT の分子メカニズムを解明するため、糖転移酵素およびその補助因子の発現系構築を最初に検討した。細胞内に発現している糖転移酵素の抽出条件の最適化（超音波破碎の時間、可溶化剤の添加）を行い、糖転移酵素の一段階精製法を確立した。また補助因子の分泌発現・精製法を確立し、補助因子内のジスルフィド結合ペアを 2 組同定した。さらに、精製した糖転移酵素と補助因子を混合後、ゲルろ過カラムを用いて安定な複合体を単離することに成功した。その複合体をネガティブ染色後に 2D 解析を行ったところ、クライオ電顕で観察が見込める単分散の像を得ることができた (BINDS による支援)。さらに、糖転移酵素と補助因子の複合体に合成基質候補を混合させた試料についても電顕像での観察を行った。準備が整い次第、基質上の分岐糖鎖と糖転移酵素の相互作用様式および補助因子の役割をクライオ電顕像の解析から明らかにする予定である。

#### (5) NMR 法および計算化学を融合した抗体のリガンド複合体の結合様式の解明

タンパク質の立体構造モデリングの分野が機械学習により著しく進展した状況において、タンパク質とリガンドの結合様式を精度高くかつ迅速に明らかにすることは喫緊の課題として残っている。本年度は、NMR 法と計算化学的手法を融合することにより、タンパク質とリガンドの複合体モデルを迅速かつ高精度で構築することを目標とした。立体構造情報の蓄積している抗体分子を対象とし、分岐構造を有するリガンドとの相互作用様式の解明に取り組んだ。<sup>1</sup>H-NMR による滴定実験および STD-NMR から、エピトープ領域を推定した。ホモロジーモデリングおよびアルファフォールドにより抗体モデルを構築し、実験情報を含めたドッキングシミュレーションを実施してドッキングポーズを得た。立体構造既知の抗体-リガンド複合体の系に対して同様の手法でドッキングを行い、本方法の精度を定量的に評価した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshida Fumi, Yoshinaka Hiroki, Tanaka Hidenori, Hanashima Shinya, Yamaguchi Yoshiki, Ishihara Mikio, Saburomaru Miyuki, Kato Yuki, Saito Risa, Ando Hiromune, Kiso Makoto, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu	4. 巻 25
2. 論文標題 Synthesis of the Core Oligosaccharides of Lipooligosaccharides from <i>Campylobacter jejuni</i> : A Putative Cause of Guillain-Barre Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 796 ~ 805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201804862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanie Yoshimi, Yamaguchi Yoshiki, Hayashi Akiyoshi, Uzawa Jun, Hatakeyama Makoto, Hidaka Yasuhiro, Toda Nobuhiro, Nakamura Shinichiro, Kanie Osamu	4. 巻 473
2. 論文標題 Structural analysis of a novel lipooligosaccharide (LOS) from <i>Rhodobacter azotoformans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 104 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2018.12.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Manabe Shino, Yamaguchi Yoshiki, Matsumoto Kana, Fuchigami Hirobumi, Kawase Taiji, Hirose Kenji, Mitani Ai, Sumiyoshi Wataru, Kinoshita Takashi, Abe Junpei, Yasunaga Masahiro, Matsumura Yasuhiro, Ito Yukishige	4. 巻 30
2. 論文標題 Characterization of Antibody Products Obtained through Enzymatic and Nonenzymatic Glycosylation Reactions with a Glycan Oxazoline and Preparation of a Homogeneous Antibody?Drug Conjugate via Fc N-Glycan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 1343 ~ 1355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.9b00132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Tatsuya, Hayashi Chieka, Komura Naoko, Tamai Rie, Uzawa Jun, Ogawa Junya, Tanaka Hidenori, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Kiso Makoto, Yamaguchi Yoshiki, Ando Hiromune	4. 巻 21
2. 論文標題 Synthesis and Glycan-Protein Interaction Studies of Se-Sialosides by $^{77}\text{Se}$ NMR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 6393 ~ 6396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b02303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Miyako, Mishra Sushil K., Tokoro Yuko, Sato Keiko, Nakajima Kazuki, Yamaguchi Yoshiki, Taniguchi Naoyuki, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Bisecting GlcNAc Is a General Suppressor of Terminal Modification of N-glycan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Proteomics	6. 最初と最後の頁 2044 ~ 2057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/mcp.RA119.001534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohno Rei-ichi, Ichimaru Kenta, Tanaka Seitaro, Sugawa Hikari, Katsuta Nana, Sakake Shiori, Tominaga Yu-ki, Ban Ikuho, Shirakawa Jun-ichi, Yamaguchi Yoshiki, Ito Emi, Taniguchi Naoyuki, Nagai Ryoji	4. 巻 294
2. 論文標題 Glucoselysine is derived from fructose and accumulates in the eye lens of diabetic rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17326 ~ 17338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010744	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Manabe Yoshiyuki, Marchetti Roberta, Takakura Yohei, Nagasaki Masahiro, Nihei Wataru, Takebe Tomoyuki, Tanaka Katsunori, Kabayama Kazuya, Chiodo Fabrizio, Hanashima Shinya, Kamada Yoshihiro, Miyoshi Eiji, Dulal Hari Prasad, Yamaguchi Yoshiki et al.	4. 巻 131
2. 論文標題 The Core Fucose on an IgG Antibody is an Endogenous Ligand of Dectin 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 18870 ~ 18875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ange.201911875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Yoshiki	4. 巻 31
2. 論文標題 A Struggle of the Last Eleven Years after Getting JSCR Award	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 SE50 ~ SE52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1924.2SE	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiki Yamaguchi	4. 巻 1
2. 論文標題 Ion mobility-mass spectrometry (IM-MS)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycoscience: Basic Science to Applications	6. 最初と最後の頁 6~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiki Yamaguchi	4. 巻 2
2. 論文標題 Conformational analysis of glycans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycoscience: Basic Science to Applications	6. 最初と最後の頁 40~41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiki Yamaguchi	4. 巻 2
2. 論文標題 Computational science (supercomputer) and AI (artificial intelligence)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycoscience: Basic Science to Applications	6. 最初と最後の頁 42~43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiki Yamaguchi	4. 巻 15
2. 論文標題 Core technologies for elucidating the role of glycans in disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycoscience: Basic Science to Applications	6. 最初と最後の頁 265~266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山口 芳樹	4. 巻 269
2. 論文標題 レクチンの糖鎖認識とは	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 750 ~ 755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 眞鍋 史乃, 山口 芳樹	4. 巻 48
2. 論文標題 糖鎖改変による抗体 薬物複合体合成	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊ファインケミカル	6. 最初と最後の頁 51 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 眞鍋 史乃, 山口 芳樹	4. 巻 17
2. 論文標題 ADC開発におけるリンカー設計の意義	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 がん分子標的治療	6. 最初と最後の頁 11 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yoshiki Yamaguchi
2. 発表標題 Solution NMR and docking simulation analysis of interaction between tau aggregates and low-molecular-weight compounds
3. 学会等名 International Academic Forum on Neuroinflammation and Psychopharmacology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 芳樹
2. 発表標題 水溶液中における糖脂質の脱ミセル化とNMR法による性状解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 芳樹
2. 発表標題 糖鎖構造の多様性とその生物学的意義の探求
3. 学会等名 第13回東北糖鎖研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山 央子, 井手 三津子, 中西 悦郎, 上村 紀仁, 山口 芳樹, Peter Greimel, 上口 裕之, 高橋 良輔, 平林 義雄
2. 発表標題 グルコシルセラミド分解酵素による新規脳内ステロール代謝物・ステロール配糖体の代謝制御
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiki Yamaguchi
2. 発表標題 Solution NMR and docking simulation analysis of interaction between tau aggregates and small chemicals
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium2019 (APPS2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 大野 詩歩, 真鍋 法義, 山口 芳樹
2. 発表標題 計算化学によるリピトールのコンフォメーション空間の解析
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 芳樹
2. 発表標題 糖鎖の高次構造と相互作用原理の解明に向けて
3. 学会等名 第17回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 芳樹, 真鍋 史乃, Peter Greimel, 伊藤 幸成
2. 発表標題 完全重水素化シクロデキストリンの化学酵素合成と糖脂質のNMR解析
3. 学会等名 第58回NMR討論会・SEST2019合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 紀之, 山口 芳樹, 海老名 保男, 佐々木 高義, 石田 康博
2. 発表標題 残余双極子カップリング測定における配向力、温度安定性、有機溶媒耐性を兼ね備えた新規配向剤
3. 学会等名 第58回NMR討論会・SEST2019合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiki Yamaguchi, Shino Manabe, Peter Greimel, Yukishige Ito
2. 発表標題 NMR structural analysis of glycolipid in aqueous solution
3. 学会等名 11th ACGG Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 芳樹
2. 発表標題 糖鎖構造解析の基礎とその実際
3. 学会等名 第410回CBI学会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiki Yamaguchi
2. 発表標題 An NMR approach to investigate glycolipid structure
3. 学会等名 TMPU-AS Joint Glycoscience Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------