

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12229

研究課題名(和文)糖鎖クラスタの立体構造計算法の開発とワクチン設計への応用

研究課題名(英文)3D Structure prediction of glycan clusters and its application for vaccine design

研究代表者

李 秀栄 (Re, Suyong)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 AI健康・医薬研究センター・主任研究員

研究者番号：50390670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面のタンパク質を覆う糖鎖は抗体や受容体の認識に関係するが、それらの立体構造について知られていることは極少ない。本研究では、典型的なモデル系としてラッサウイルスのエンベロープタンパク質を取り上げ、分子動力学計算による糖鎖集合系の立体構造計算法を確立し、糖鎖がタンパク質表面で複数のクラスタを形成し抗体結合を阻害する様子を明らかにした。得られた立体構造情報を情報学的なエピトープ予測法と組み合わせることで、既知のエピトープを再現するだけでなく、新たなエピトープ予測にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞表面を覆う糖鎖はがんや感染症など多くの病気と関係する。しかし、複雑で柔らかい糖鎖構造を実験で見るのは未だ難しい。特に複数の糖鎖が集まった時にどのような構造をとるかはほとんど知られていなかった。本研究成果は糖鎖集合のクラスタ形成を原子解像度で示すもので、従来仕組みのわからなかった高度な糖鎖機能を説明する新たな視点を与える。さらに、糖鎖を標的とするワクチン開発にも役立つと期待され、学術的にも社会的にも意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The protein glycosylation affects a protein-antibody interaction, but a little is known about the effect because of the diverse structures and interactions of glycans. Here, we built an atomistic model of a fully glycosylated envelope protein complex of the Lassa virus. Using molecular dynamics simulations, we show that the glycans form distinct clusters to non-uniformly shield the protein surface. We integrated the simulation results with existing sequence- and structure-based epitope prediction methods and successfully recovered known protein epitopes and even predicted new ones. This work provides a molecular basis for integrating otherwise elusive structural properties of glycans into vaccine and neutralizing antibody developments.

研究分野：計算化学

キーワード：糖鎖クラスタ 立体構造予測 分子動力学計算 エピトープ ラッサ熱

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は単糖が枝分れ状につながった生体分子で、生体内には単糖の種類や長さ、分岐数の異なる無数の糖鎖が存在する。それらの多くは、タンパク質や脂質に結合している。真核生物のタンパク質の約 50%、膜タンパク質ではそのほとんどに糖鎖が結合している。特に、アスパラギン酸に結合する「N 型糖鎖」は細胞間の認識と関係して重要である。細胞表面を覆う N 型糖鎖は、クラスタを形成して個々の糖鎖分子では成し得ない高度な細胞認識を実現していると考えられている。実際に、ウイルス表面糖鎖を認識するワクチンの開発も進められており、がんやウイルス感染といった病気の解明、治療薬の標的ともなっている (Behrens, A. J. et al. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017, 44:125-133、Crispin, M. et al. *Curr. Opin. Virol.* 2016, 18:70-75)。しかし、糖鎖クラスタの立体構造に関する研究はほとんど行われておらず、糖鎖クラスタがどのように細胞や受容体を識別するのか、分子レベルでわかっていることは極少ない。

糖鎖の構造は複雑で柔軟なため、X 線結晶構造解析をはじめ、従来の構造生物学的な解析で立体構造を決定することができない。NMR 分析やイオンモビリティ質量分析の技術的な進歩に伴い複雑な糖鎖構造の識別や定量解析が可能になってきたが、立体構造情報は未だ限定的な状況にあり新たな技術基盤が必要である。分子動力学—MD (Molecular Dynamics)—計算は、DNA やタンパク質など生体分子の立体構造ダイナミクスの研究に広く用いられており、糖鎖の立体構造情報を得る有力な手段となりえる。研究開始当初、申請者は、タンパク質の立体構造予測で広く用いられているレプリカ交換 MD 法 (REMD 法, Replica-Exchange Molecular Dynamics 法) (Sugita, Y.; Okamoto, Y. *Chem. Phys. Lett.* 1999, 314:141-151) を一早く糖鎖の問題に適用し、糖鎖の立体構造アンサンブル (柔軟な生体分子構造を表現する、複数の立体構造からなる構造モデル) を原子解像度で求める計算基盤を構築していた。この手法は、温度の異なる複数のレプリカ (系のコピー) の MD 計算を並列・独立に実行し、ある頻度で隣接する温度を交換することで、定温の MD 計算では実現できない広い構造空間の探索を可能にする。一方で、計算の標的は水中の単一糖鎖に限られており、ウイルス表面糖鎖のように、多数の糖鎖が集積した「糖鎖集合系」の計算に適用できる段階ではなかった。

### 2. 研究の目的

本課題では、糖鎖クラスタの分子動力学計算モデルを確立し、それを応用しウイルス表面を覆う糖鎖クラスタの立体構造を明らかにした上で、表面糖鎖の遮蔽効果を取り込んだエピソード予測を実現することを目的とした。そのために、(1)実験データに基づくリアリスティックな糖鎖を結合したモデルの作成、(2)糖鎖集合系の計算と解析手法の確立、(3)糖鎖を考慮したエピソード予測法の構築を具体的な目標として、これらを通じてウイルス表面での糖鎖クラスタ形成の有無と糖鎖種による違いを明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

本課題では、具体的な対象としてラッサ熱ウイルスの糖タンパク質 3 量体モデル (LASV GPC: Lassa virus glycoprotein complex) に着目した。この系については、X 線結晶構造が存在し表面に結合する糖鎖種も同定されている (Watanabe, Y. et al. *PNAS* 2018, 115:7320-7325、Hastie, K. M. et al. *Science* 2017, 356:923-928)。そこで、結晶構造 (PDBID: 5VK2) に基づき、33 本の結合糖鎖をウェブツール CHARMM-GUI Glycan Modeler を用いて付加したモデルを作成した。分子動力学計算は、CHARMM36m 力場と TIP3P パラメタを用いて、300 K、1 atm の定圧条件下 (NPT) で行った。各系に対して、100 ns の平衡化計算を実施した後、1 $\mu$ s の計算を実施した。次いで、糖鎖の構造探索を加速するために、レプリカ交換法の一つである generalized Replica-Exchange Solute

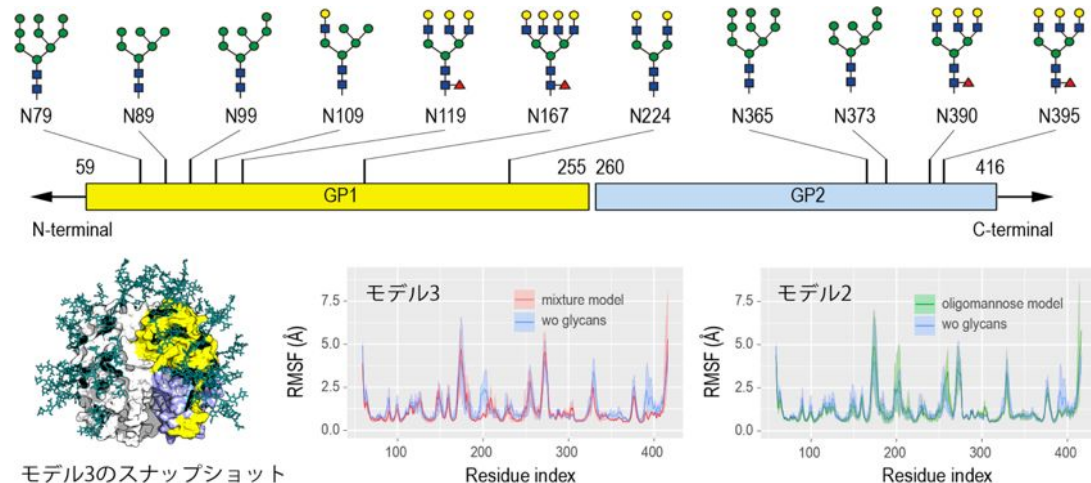


図1 計算に用いた複合糖鎖モデル (モデル3) の構造とタンパク質アミノ酸残基の揺らぎ (モデル2 はオリゴマンノース糖鎖モデル)

Tempering (gREST) 法 (Kamiya, M.; Sugita, Y. J. Chem. Phys. 2018, 149:072304) を用いた計算も実施した。この手法では、部分系のみでレプリカ交換を行うことで、精度を保ちつつ計算コストを大幅に軽減できる。本課題では、糖鎖の二面角エネルギー項のみを「Solute」として、4 レプリカ (Solute temperature: 300.0 K, 316.7 K, 336.3 K, 356.5 K) を用いた。すべての計算は、GENESIS プログラム (J. Jung et al. Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 2015, C. Kobayashi et al. J. Comput. Chem. 2017) を用いて行った。エピトープ予測には、既存の配列・構造ベースの手法 (BepiPred と Ellipro) を用いた。具体的には、分子動力学計算から得られた糖鎖の立体構造ダイナミクス情報をスコア化し、上記手法で得られたスコアと組み合わせることで総合的に評価する手法を構築した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Lasv GPC 表面糖鎖の立体構造ダイナミクス (計算モデルと解析)

結合糖鎖の種類による違いも見るとともに、結合糖鎖なし (モデル1)、オリゴマンノース型 (Man9GlcNAc2) のみ (モデル2)、オリゴマンノース、複合型、ハイブリッド型 N 型糖鎖が結合 (モデル3) した3つのモデルを構築し分子動力学計算を実施した。図1には、モデル3に対して実験的に最も分布が多いとされる結合糖鎖 (Watanabe, Y. et al. PNAS 2018, 115:7320-7325, Hastie, K. M. et al. Science 2017, 356:923-928) と CHARMM-GUI を用いて構築した全原子モデルを示す。また、モデル2とモデル3のGPCのC $\alpha$ 原子に対して求めた平均二乗揺らぎ (RMSF) を示す。両モデルともに糖鎖なし (モデル1) のRMSFと比べ大きな違いは見られない。従って、表面糖鎖がタンパク質運動に与える影響は小さいと言える。モデル1と比べてGly391付近のピークが顕著に抑制されているのは、近接する結合糖鎖とのタンパク質-糖鎖相互作用によるものと考えられる。また、モデル3特異的にAla202付近のピークが抑制されているが、モデル2とモデル3の揺らぎは全体的に酷似しており、結合糖鎖の種類によりタンパク質機能が大きく異なるとは考えにくい。

タンパク質表面を覆う結合糖鎖の影響を調べるために、GP1とGP2ドメインの溶媒露出表面積 (Solvent Accessible Surface Area: SASA) を糖鎖がある場合と無い場合とで計算し、それらの値から糖鎖による遮蔽度合いを求めた。図2は、モデル2とモデル3に対して、大きさの異なるプローブ球 (水分子に相当する1.4Åから抗体の部分構造を模した大きな値まで) を用いて求めた各ドメインの遮蔽度合いを示す。全領域でGP1の遮蔽度合いがGP2よりも高く、その差はプローブ球の値が大きくなるにつれて顕著になる。つまり、受容体や抗体はGP1よりもGP2ドメインに優位に結合することを示唆する。この傾向は糖鎖修飾の進んだモデル3でより顕著になっており、糖鎖修飾の進行が特異的な分子認識機能の獲得と関係することを示唆する。

次いで、モデル3に対して、ウィルス表面での糖鎖クラスタ形成の有無を調べるために糖鎖間コンタクトを解析した。ここでは、各糖鎖ペアに対して重原子間距離が5Å未満ならコンタクトしていると見なした。その結果、図3に示すような2種類のクラスタが形成されていることがわかった。一つは、LASV GPCを構成するプロトマー (単量体) のGP1結合糖鎖 (N79, N99, N109, N167) とGP2結合糖鎖 (N365, N390, およびN395) を含むプロトマー内クラスターで、他方は3つのプロトマー (3量体) のGP1結合糖鎖N119からなるプロトマー間クラスターである。前者はGPC側面 (特にGP2部分) を、後者はGPC上部 (GP1部分) を遮蔽している。プロトマー間クラスターは宿主細胞への侵入に関連する $\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ -DG) との結合部位を覆う一方、プロトマー内クラスターはGP1解離に関連するリソソーム関連膜タンパク質1 (LAMP1) の結合部位を覆っている。表面糖鎖は、クラスタを形成することで、機能部位を効率的に保護していることを示唆する。

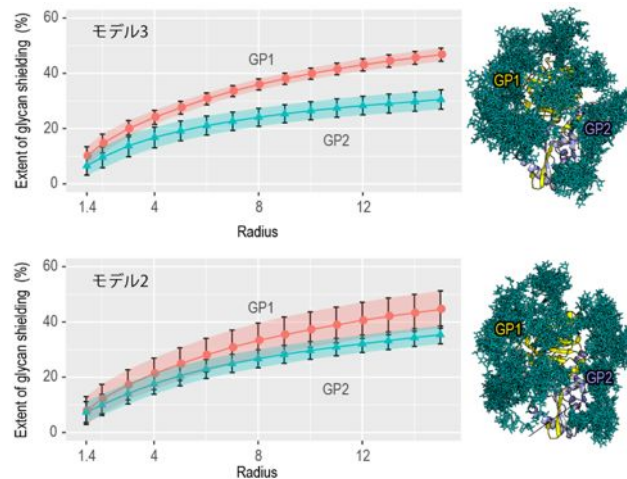


図2 タンパク質表面の糖鎖遮蔽度合い

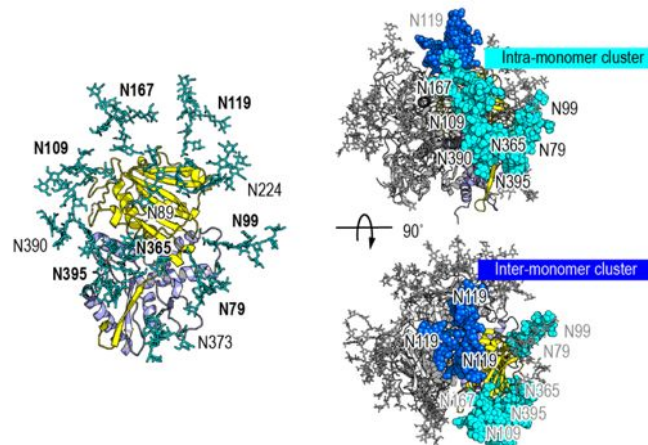


図3 プロトマー内・プロトマー間クラスター



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Dokainish Hisham M, Re Suyong, Mori Takaharu, Kobayashi Chigusa, Jung Jaewoon, Sugita Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 The inherent flexibility of receptor binding domains in SARS-CoV-2 spike protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e75720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.75720	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 Re Suyong, Mizuguchi Kenji	4. 巻 125
2. 論文標題 Glycan Cluster Shielding and Antibody Epitopes on Lassa Virus Envelop Protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2089 ~ 2097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.0c11516	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 Fujiyama Keisuke, Kato Naoki, Re Suyong, Kinugasa Kiyomi, Watanabe Kohei, Takita Ryo, Nogawa Toshihiko, Hino Tomoya, Osada Hiroyuki, Sugita Yuji, Takahashi Shunji, Nagano Shingo	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular Basis for Two Stereoselective Diels-Alderases that Produce Decalin Skeletons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 22401 ~ 22410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202106186	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 Shinobu Ai, Re Suyong, Sugita Yuji	4. 巻 9
2. 論文標題 Practical Protocols for Efficient Sampling of Kinase-Inhibitor Binding Pathways Using Two-Dimensional Replica-Exchange Molecular Dynamics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 878830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2022.878830	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 Yagi Kiyoshi, Re Suyong, Mori Takaharu, Sugita Yuji	4. 巻 72
2. 論文標題 Weight average approaches for predicting dynamical properties of biomolecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 88 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbi.2021.08.008	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 Mori Takaharu, Jung Jaewoon, Kobayashi Chigusa, Dokainish Hisham M., Re Suyong, Sugita Yuji	4. 巻 120
2. 論文標題 Elucidation of interactions regulating conformational stability and dynamics of SARS-CoV-2 S-protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1060 ~ 1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2021.01.012	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 Re Suyong, Yamaguchi Yoshiki, Sugita Yuji	4. 巻 32
2. 論文標題 Molecular Dynamics Simulation of Glycans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E113 ~ E118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1616.1E	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 Oshima Hiraku, Re Suyong, Sugita Yuji	4. 巻 60
2. 論文標題 Prediction of Protein-Ligand Binding Pose and Affinity Using the gREST+FEP Method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Information and Modeling	6. 最初と最後の頁 5382 ~ 5394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.0c00338	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 Kim Seonghoon, Oshima Hiraku, Zhang Han, Kern Nathan R., Re Suyong, Lee Jumin, Roux Benoit, Sugita Yuji, Jiang Wei, Im Wonpil	4. 巻 16
2. 論文標題 CHARMM-GUI Free Energy Calculator for Absolute and Relative Ligand Solvation and Binding Free Energy Simulations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Theory and Computation	6. 最初と最後の頁 7207 ~ 7218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jctc.0c00884	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 該当する

1. 著者名 Oshima, H.; Re, S.; Sugita, Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Replica-Exchange Umbrella Sampling Combined with Gaussian Accelerated Molecular Dynamics for Free-Energy Calculation of Biomolecules.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Chem. Theory Comput.	6. 最初と最後の頁 5199-5208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jctc.9b00761	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 Niitsu, A.; Re, S.; Oshima, H.; Kamiya, M.; Sugita, Y.	4. 巻 59
2. 論文標題 De Novo Prediction of Binders and Nonbinders for T4 Lysozyme by GREY Simulations.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Chem. Inf. Model.	6. 最初と最後の頁 3879-3888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.9b00416	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 Re, S.; Oshima, H.; Kasahara, K.; Kamiya, M.; Sugita, Y.	4. 巻 116
2. 論文標題 Encounter Complexes and Hidden Poses of Kinase-Inhibitor Binding on the Free-Energy Landscape.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci.	6. 最初と最後の頁 18404-18409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1904707116	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 -

[学会発表] 計11件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Suyong Re, Kenji Mizuguchi
2. 発表標題 Structure and Dynamics of Glycans on Viral Protein
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李秀栄
2. 発表標題 分子動力学シミュレーションソフトウェア「GENESIS」の紹介
3. 学会等名 LINC勉強会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suyong Re, Kenji Mizuguchi
2. 発表標題 Structure and dynamics of glycans on Lassa virus envelop protein
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李秀栄, 水口賢司
2. 発表標題 糖鎖を考慮したエピトープ予測
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Suyong Re, Naoki Kato, Keisuke Fujiyama, Shingo Nagano, Yuji Sugita
2. 発表標題 gREST prediction of substrate bindings to stereoselective enzymes
3. 学会等名 CBI学会2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suyong Re
2. 発表標題 Docking simulation using GENESIS and its possible application for glycan systems
3. 学会等名 6th Glyco-lipidologue seminar (RIKEN)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 秀米
2. 発表標題 分子動力学計算ソフトウェアGENESISの創薬に役立つ機能の紹介（イントロダクション）
3. 学会等名 CBI学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 秀米
2. 発表標題 GENESISを用いた蛋白質-化合物結合自由エネルギー計算
3. 学会等名 第420回CBI学会講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 秀栄
2. 発表標題 分子動力学ベースのモデリングとインシリコ創薬支援
3. 学会等名 第4回徳島大学統合的がん創薬研究クラスター 合同オンラインミーティング
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 秀栄, 尾嶋 拓, 杉田 有治
2. 発表標題 Binding free-energy analysis of Src protein inhibitors using 2D-Replica-Exchange Molecular Dynamics (gREST/REUS) simulation
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李 秀栄, 尾嶋 拓, 杉田 有治
2. 発表標題 Free energy analysis of ATP competitive inhibitor-protein kinase bindings.
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
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
---------	---------