

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06575

研究課題名(和文)GlcNAc転移酵素の多様性と普遍性の構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural studies on the variety and universality of GlcNAc transferases

研究代表者

長江 雅倫 (Nagae, Masamichi)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：60619873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Nアセチルグルコサミン(以下、GlcNAc)はグルコースから合成されるアミノ糖で、生体内に豊富に存在する。GlcNAcは進化的に異なる複数のGlcNAc転移酵素によって様々な修飾様式で蛋白質に付加される。これまで立体構造からその共通性と独自性に着目した研究はほとんど報告がない。そこで本研究は三つのGlcNAc転移酵素、GnT-IVa, GnT-V, EOGTに焦点を当てて、基質認識および反応機構の解明に取り組んだ。その結果、GnT-IVaに新しい機能ドメインがあることを発見した。またGnT-Vの基質糖蛋白質に関わる残基を特定した。さらにEOGTの結晶化に世界に先駆けて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GlcNAc転移酵素は多様なファミリーから構成される糖転移酵素群であり、その生理機能は多岐に渡っており、関連する疾患も複数存在する。本研究が対象としたGnT-IVaは膵臓の細胞上のグルコースの取り込みを調節することが知られており、II型糖尿病への関与が報告されている。またGnT-Vの過剰発現は細胞のがん化に関与することが知られている。さらにEOGTは難病であるAdams-Oliver症候群の原因遺伝子である。本研究はこれらの酵素の共通性と独自性を明らかにすることを目指しており、その成果はこれらの酵素の制御、ひいては疾患の制御につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：N-acetylglucosamine (GlcNAc) is synthesized by glucose and one of the most abundant monosaccharide in our body. GlcNAc is attached to glycoproteins via various linkages by multiple GlcNAc transferases. However, few studies focused on the commonality and uniqueness of these GlcNAc addition from the structural points of view. In this study, we performed structural studies on three GlcNAc transferases, GnT-IVa, GnT-V, and EOGT, to elucidate their substrate recognition and reaction mechanisms. As a result, we found a new functional domain in GnT-IVa. We also identified residues involved in the substrate glycoprotein of GnT-V. Furthermore, we succeeded in crystallizing EOGT.

研究分野：構造生物化学

キーワード：構造生物学 糖鎖生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

*N*アセチルグルコサミン (*N*-acetylglucosamine, 以下 GlcNAc と略す) は、グルコースから合成されるアミノ糖で、生体内に豊富に存在する。GlcNAc は様々な糖転移酵素 (GlcNAc 転移酵素) により蛋白質上に付加される。GlcNAc 転移酵素は進化的に独立した複数のファミリーからなり、それぞれ多様な生理機能を有している。しかし、その基質認識機構の詳細や反応メカニズムについては未だ不明である。

本研究は、*N*-acetylglucosaminyltransferase-IVa (以下 GnT-IVa)、*N*-acetylglucosaminyltransferase-V (以下 GnT-V)、EGF-specific GlcNAc transferase (以下 EOGT) の三種類の GlcNAc 転移酵素に着目した。これらの酵素はそれぞれ特徴的な生理機能が知られている。GnT-IVa は *N*型糖鎖に 1-4 分岐した GlcNAc を転移する酵素で、膵臓の細胞上の Glucose transporter 2 (Glut-2) の糖鎖修飾を介してインスリンの分泌を制御し、II 型糖尿病に関与している (Ohtsubo et al., *Cell* 2005)。また GnT-V は *N*型糖鎖に 1-6 分岐した GlcNAc を転移する酵素で、過剰発現が細胞のガン化に関与することが以前から知られている (Taniguchi et al., *Mol Aspects Med* 2021)。一方、EOGT は細胞外蛋白質である Notch の EGF リピートに *O*型糖鎖として GlcNAc を転移する酵素であり、難病として知られる Adams-Oliver 症候群の原因遺伝子であることが明らかになっている (Ogawa et al., *J Biol Chem* 2015)。

これら三種類の GlcNAc 転移酵素の基質認識や反応機構に関する原子レベルの知見は長い間得られていなかったが、2018 年に申請者らのグループによって GnT-V の全体構造とアクセプター基質糖鎖との複合体の立体構造が初めて明らかになった (Nagae et al., *Nat Commun* 2018)。しかし GnT-IVa、EOGT の構造機能相関は依然として不明であり、GnT-V に関しても実際に糖蛋白質とどのように相互作用するかは未知であった。

2. 研究の目的

そこで本研究は、令和 2 ~ 4 年度の三年間の研究期間で、GnT-IVa、GnT-V、EOGT の三種類の糖転移酵素に焦点を当て、構造生物学的手法と酵素学的手法を組み合わせることで、それぞれの基質認識と反応機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、それぞれの酵素について下記の目標を設定した。

項目 I. GnT-IVa の新規レクチンドメインによるリガンド認識と酵素反応との関連を明らかにする。

項目 II. GnT-V の基質糖蛋白質の認識を明らかにする。

項目 III. EOGT の立体構造を明らかにする。

3. 研究の方法

項目 I.

申請者は予備実験として、アミノ酸配列解析から GnT-IVa にこれまで知られていなかったレクチンドメインが存在することを明らかにしつつあった。そこでレクチンドメイン遺伝子を pGEX-6P-1 ベクターに組み込み、GST 融合蛋白質として大腸菌 BL21(DE3) RIPL 株に発現させた。大量培養した菌体を超音波破碎し、グルタチオンセファロースによって粗精製したのち、プレジジョンプロテアーゼによって GST とレクチンドメインを切り離し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによってレクチンドメインを高純度に精製した。

得られた精製レクチンドメインをシッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った。得られた結晶は液体窒素で凍結し、茨城県つくば市にある大型放射光施設 Photon Factory で回折強度データ収集を行った。GnT-IVa レクチンドメインは新規蛋白質ドメインであり、類似分子の立体構造は得られていなかった。このため位相決定はヨウ素を用いた単波長異常分散法 (SAD 法) にて行った。

項目 II.

これまでに申請者は GnT-V について細胞外ドメイン全長のアポ体と、触媒ドメインコア領域とアクセプター基質複合体の二種類の立体構造を報告した (Nagae et al., *Nat Commun* 2018)。その後、米国のグループによってアクセプター糖鎖構造の異なる複数の立体構造が報告された (Darby et al., *ACS Catalysis* 2020)。興味深いことに、我々と米国のグループとではアクセプター基質の糖鎖の方向に微妙な差異があり、そのことから糖蛋白質との相互作用の解釈に違い

があった。そこで申請者は岐阜大学の木塚康彦教授らのグループと共同で、GnT-V と基質糖蛋白質との相互作用を生化学的に検討した。まず申請者が我々のグループによって決定された立体構造を基に基質糖蛋白質とのドッキングモデルを作成し、そこから蛋白質との相互作用に寄与する候補残基として Glu280, Val354, Ala357 と Lys361 を選定し、点変異体(E280A, V354N, A357N, K361A)を作成した。続いてモデル基質となる糖鎖二種類(GnGnBi-Asn-PNS, GnGnbi-PA) およびモデル糖蛋白質として A1AGP, Transferrin, IgG の三種類の合計 5 種類の基質に対する反応性を比較した。

項目 III.

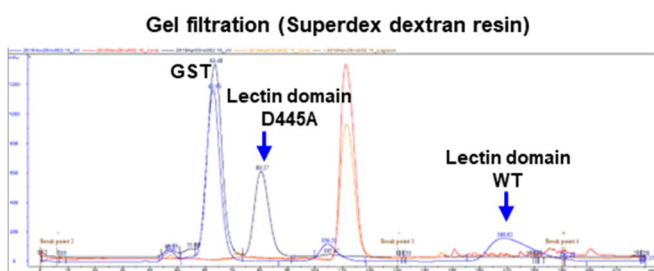
EOGT の立体構造は研究開始当初は報告が一切なかった。この原因としてリコンビナント蛋白質を生産するのが困難である点が挙げられていた。申請者は名古屋大学の岡島徹也教授、小川光貴助教と共同で発現系の構築に取り組んだ。まず動物細胞の発現系を用いて EOGT を培地中に分泌させる系を構築した。しかし残念ながらほとんど蛋白質が得られなかった。そこで細胞内から精製する系の構築を目指し、Flag タグを付加した EOGT について HEK293 細胞による安定発現株を樹立した。株化後、細胞を 20 センチディッシュで大量培養し、スクレーパーにより細胞を回収し、界面活性剤で細胞膜を破壊することで小胞体内の EOGT 蛋白質を溶液中に放出させ抗 Flag 抗体が固定化されたビーズ (Flag M2 ビーズ) を用いて Flag-EOGT を回収した。その後、プレジジョンプロテアーゼによって Flag タグを除去し、ゲルろ過カラムによって EOGT を高純度に精製した。

EOGT 蛋白質はドナー基質アナログである UDP、アクセプター基質である EGF リピートと混合し、結晶化した。結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法で行った。得られた結晶は液体窒素で凍結し、スイスの大型放射光施設である Swiss Light Source にて回折強度データ収集を行った。位相決定は AlphaFold2 を用いて作成したモデル構造を鋳型として分子置換法によって行った。

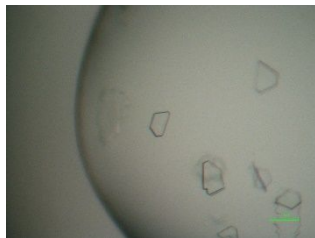
4. 研究成果

項目 I.

GnT-IVa レクチンドメインのリコンビナント蛋白質をゲルろ過カラムにて精製したところ、下記の図のように溶出位置が通常の蛋白質よりも大幅に遅れることが明らかになった。このことからレクチンドメインがカラムの担体であるデキストラン(グルコースのポリマー)と相互作用することが示唆された。またアミノ酸配列から糖鎖結合部位と予想された Asp445 をアラニンに置換した変異体 (D445A 変異体) では溶出位置が大幅に早くなった。これらのことから GnT-IVa レクチンドメインはグルコース担体と Asp445 を介して相互作用していることが示唆された。

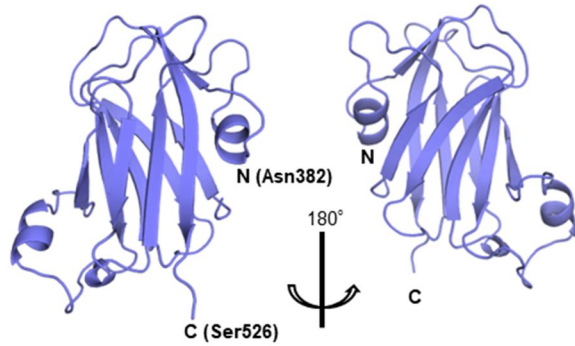


次に GnT-IVa レクチンドメインの結晶化を行った。その結果、野生型では結晶は得られなかったが、D445A 変異体で下図のような結晶が得られた。この結晶に対して回折強度データ収集を行ったところ、1.95Å 分解能のデータセットを得ることに成功した。



GnT-IVa レクチンドメインは新規ドメインであり、分子置換法を行えるようなモデル構造が存在しなかった。そこで KI/I₂ 混合液から気体ヨウ素を発生させ、結晶と短時間触れることで、蛋白質のチロシン残基にヨウ素を結合させることを試みた。その後、液体窒素で凍結し、大型放射光施設 Photon Factory で波長 1.5Å で回折強度データ収集を行った。得られた 7 個のデータセットをマージして、単波長以上分散法で位相を決定した。

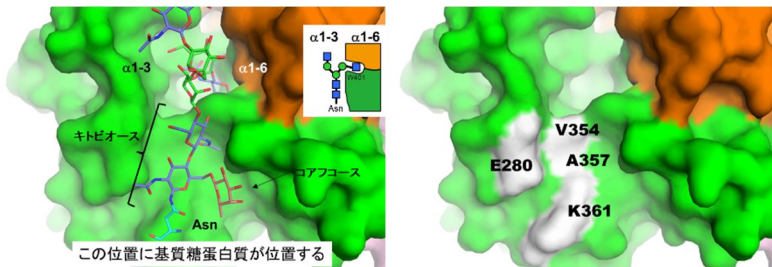
得られた立体構造を見ると、下図のように サンドイッチ構造の両端に ヘリックスが存在した。既知構造を比較するとバクテリアの NagH と呼ばれるレクチンと相溶性が高いことが明らかになった。



このバクテリアの NagH の糖鎖認識様式を基にして分子動力学シミュレーションにより詳細な基質認識モデルを構築した。これら一連の成果は下記原著論文 6 として報告した。

項目 II.

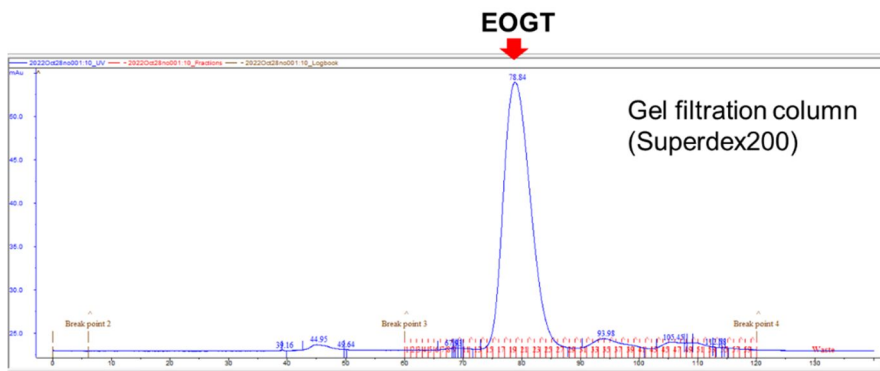
以前、申請者らが構造解析した GnT-V とアクセプター基質との複合体の立体構造 (PDB code: 5ZIC) を基にしてアスパラギンを含む N 型糖鎖全体のモデル構造を構築した所、下記のようになった。この予想構造からキトビオースが相互作用すると推測される、E280, V354, A357, K361 を選び、変異体を作成して酵素活性を測定した。



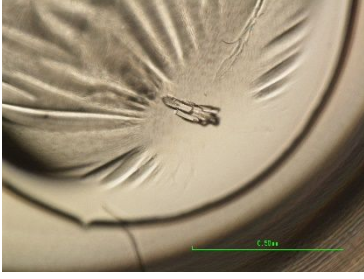
その結果、V354N 変異体で基質糖鎖および基質糖蛋白質に対する酵素活性が減少した。また K361A 変異体では基質糖鎖に対する活性はほとんど変化しなかったが、基質糖蛋白質に対する活性が低下した。これらのことから V354 が基質糖鎖の認識に重要であること、K361 が基質糖蛋白質の認識に重要であることが示唆された。これらの結果は下記原著論文 12 として発表した。

項目 III.

HEK293 細胞の安定発現株から得られた EOGT 蛋白質はゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果から、溶液中ではモノマーで存在することが示唆された (下図)。



精製蛋白質をドナー基質アナログである UDP と混合して結晶化した所、下記の写真のような結晶が得られた。



現在、構造の精密化を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Osuka Reina F., Hirata Tetsuya, Nagae Masamichi, Nakano Miyako, Shibata Hiroyuki, Okamoto Ryo, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 298
2. 論文標題 N-acetylglucosaminyltransferase-V requires a specific noncatalytic luminal domain for its activity toward glycoprotein substrates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101666 ~ 101666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101666	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 Vibhute Amol M., Tanaka Hide-nori, Mishra Sushil K., Osuka Reina F., Nagae Masamichi, Yonekawa Chizuko, Korekane Hiroaki, Doerksen Robert J., Ando Hiromune, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 1866
2. 論文標題 Structure-based design of UDP-GlcNAc analogs as candidate GnT-V inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130118 ~ 130118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2022.130118	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 Lu X., Hosono Y., Nagae M., Ishizuka S., Ishikawa E., Motooka D., Ozaki Y., Sax N., Maeda Y., Kato Y., Morita T., Shinnakasu R., Inoue T., Onodera T., Matsumura T., Shinkai M., Sato T., Nakamura S., Mori S., Kanda T., Nakayama Emi E., Shioda T., Kurosaki T., Takeda K., Kumanogoh A., Arase H., Nakagami H., Yamashita K., Takahashi Y., Yamasaki S.	4. 巻 218
2. 論文標題 Identification of conserved SARS-CoV-2 spike epitopes that expand public cTfh clonotypes in mild COVID-19 patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20211327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211327	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 Nagae Masamichi, Yamaguchi Yoshiki, Taniguchi Naoyuki, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 21
2. 論文標題 3D Structure and Function of Glycosyltransferases Involved in N-glycan Maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 437 ~ 437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21020437	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 Omahdi Zakaria, Horikawa Yuto, Nagae Masamichi, Toyonaga Kenji, Imamura Akihiro, Takato Koichi, Teramoto Takamasa, Ishida Hideharu, Kakuta Yoshimitsu, Yamasaki Sho	4. 巻 295
2. 論文標題 Structural insight into the recognition of pathogen-derived phosphoglycolipids by C-type lectin receptor DCAR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5807 ~ 5817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012491	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 Tomida Seita, Takata Misaki, Hirata Tetsuya, Nagae Masamichi, Nakano Miyako, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 295
2. 論文標題 The SH3 domain in the fucosyltransferase FUT8 controls FUT8 activity and localization and is essential for core fucosylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 7992 ~ 8004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013079	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 Ma Chenyu, Takeuchi Hideyuki, Hao Huilin, Yonekawa Chizuko, Nakajima Kazuki, Nagae Masamichi, Okajima Tetsuya, Haltiwanger Robert S., Kizuka Yasuhiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Differential Labeling of Glycoproteins with Alkynyl Fucose Analogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6007 ~ 6007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176007	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 該当する

1. 著者名 Hirata Tetsuya, Nagae Masamichi, Osuka Reina F., Mishra Sushil K., Yamada Mayumi, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 1864
2. 論文標題 Recognition of glycan and protein substrates by N-acetylglucosaminyltransferase-V	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129726 ~ 129726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2020.129726	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 Taniguchi Naoyuki, Ohkawa Yuki, Maeda Kento, Harada Yoichiro, Nagae Masamichi, Kizuka Yasuhiko, Ihara Hideyuki, Ikeda Yoshitaka	4. 巻 in press
2. 論文標題 True significance of N-acetylglucosaminyltransferases GnT-III, V and 1,6 fucosyltransferase in epithelial-mesenchymal transition and cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Aspects of Medicine	6. 最初と最後の頁 100905 ~ 100905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mam.2020.100905	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 Nagae Masamichi, Suzuki Kei, Yasui Norihisa, Nogi Terukazu, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu, Takagi Junichi	4. 巻 mvaa144
2. 論文標題 Structural studies of reelin N-terminal region provides insights into a unique structural arrangement and functional multimerization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa144	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 Nagae Masamichi, Hirata Tetsuya, Tateno Hiroaki, Mishra Sushil K., Manabe Noriyoshi, Osada Naoko, Tokoro Yuko, Yamaguchi Yoshiki, Doerksen Robert J., Shimizu Toshiyuki, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Discovery of a lectin domain that regulates enzyme activity in mouse N-acetylglucosaminyltransferase-IVa (MGAT4A)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03661-w	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 該当する

1. 著者名 Osada Naoko, Nagae Masamichi, Nakano Miyako, Hirata Tetsuya, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 298
2. 論文標題 Examination of differential glycoprotein preferences of N-acetylglucosaminyltransferase-IV isozymes a and b	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102400 ~ 102400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102400	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 Tomida Seita, Nagae Masamichi, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 298
2. 論文標題 The stem region of 1,6-fucosyltransferase FUT8 is required for multimer formation but not catalytic activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102676 ~ 102676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102676	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 Shibata Kensuke, Motozono Chihiro, Nagae Masamichi, Shimizu Takashi, Ishikawa Eri, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Izumi Yoshihiro, Takahashi Masatomo, Fujimori Nao, Wing James B., Hayano Takahide, Asai Yoshiyuki, Bamba Takeshi, Ogawa Yoshihiro, Furutani-Seiki Makoto, Shirai Mutsunori, Yamasaki Sho	4. 巻 13
2. 論文標題 Symbiotic bacteria-dependent expansion of MR1-reactive T cells causes autoimmunity in the absence of Bcl11b	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34802-8	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 Haji Shojiro, Ito Taiki, Guenther Carla, Nakano Miyako, Shimizu Takashi, Mori Daiki, Chiba Yasunori, Tanaka Masato, Mishra Sushil K, Willment Janet A, Brown Gordon D, Nagae Masamichi, Yamasaki Sho	4. 巻 11
2. 論文標題 Human Dectin-1 is O-glycosylated and serves as a ligand for C-type lectin receptor CLEC-2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.83037	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 該当する

1. 著者名 Guenther Carla, Nagae Masamichi, Yamasaki Sho	4. 巻 156
2. 論文標題 Self-referential immune recognition through C-type lectin receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advances in Immunology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.ai.2022.09.001	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0件

〔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
---------	---------