

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2021～2023
課題番号：21K12112
研究課題名(和文) リガンドの多価結合による分子認識機構を有する生体分子間相互作用の解析手法の確立

研究課題名(英文) Developing a method for analyzing biomolecular interactions via multivalent ligand binding

研究代表者
能登 香 (Noto, Kaori)
北里大学・一般教育部・准教授

研究者番号：20361818
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体内でリガンドが多価結合する際の認識特異性を評価するための新たなシミュレーション方法の開発を目的としている。病原性細菌の付着因子における糖鎖認識、およびペロ毒素の標的細胞での糖鎖結合において、糖鎖が多価で結合することが実験的に示されているため、これらの複合体の構造情報及び糖鎖との親和性に関する熱力学的実験結果を利用し、分子動力学シミュレーションおよび量子化学計算から糖鎖が関与する多価相互作用の詳細を明らかにした。この結果をもとに生体内における多価結合による分子認識機構を解明するためのシミュレーション手法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内で細胞や特定の器官が高度に識別される際、細胞膜の構成成分として広く分布する様々な糖鎖の認識特異性が使われているが、糖鎖とタンパク質間の親和性自体は強くないため、糖鎖が多価で結合することで親和性を高めていることが示唆されている。このような生体内での多価結合の詳細に関する理論は未だ確立されていない。生体内の糖鎖構造決定は難しく、実験的な解明は限られているため、生体内多価相互作用を扱えるシミュレーション手法は社会的にニーズがある。このシミュレーションによって明らかになる基礎情報は学術的に意義があると共に、新規薬物、薬物輸送糖鎖修飾分子の設計指針となる。

研究成果の概要(英文)：Protein-glycan interactions are widespread in biology and play a central role in many important biological events, such as bacterial infection. However, the interactions between proteins and glycans are intrinsically weak. To compensate for this limitation, multimeric protein-glycan interactions have been reported in several systems, such as adhesion factors of pathogenic bacteria and early stages of infection by verotoxins to target cells. To elucidate the multivalent interaction between glycans and proteins in the adhesin FimH, and the mechanism of multivalent glycan recognition by verotoxin, detailed analyses of the interaction between glycans and the proteins using MD simulation as well as quantum chemical calculations were conducted. Through this study, a new simulation method was developed to evaluate the recognition specificity of multivalent binding of ligands in vivo.

研究分野：計算化学

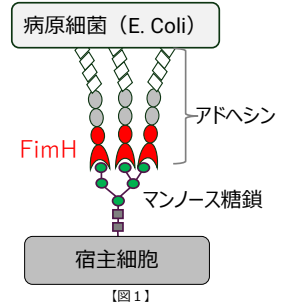
キーワード：糖鎖 分子認識機構 多価結合 分子動力学 量子化学計算 付着因子 毒素

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

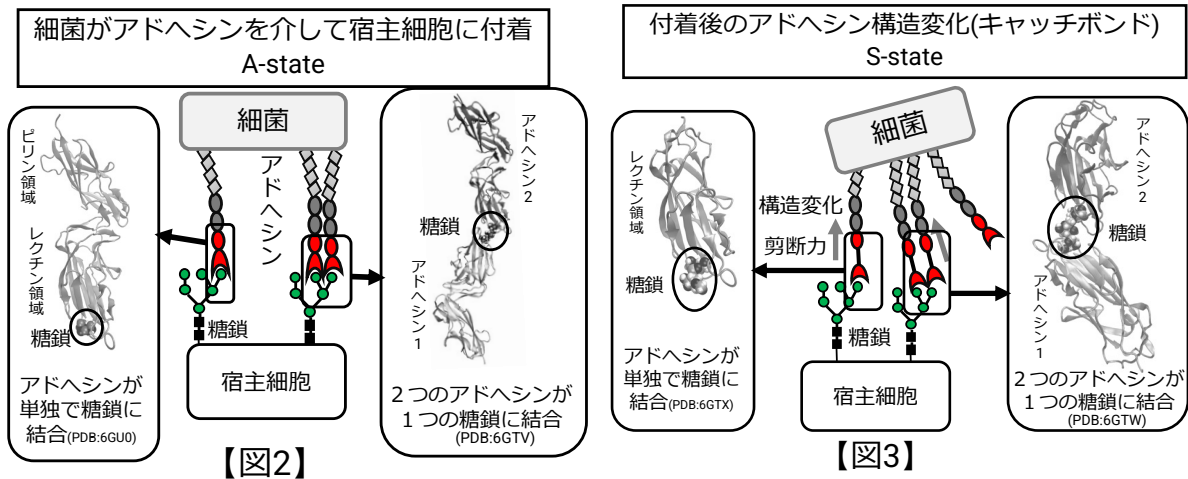
生体内で細胞や特定の器官が高度に識別される際、細胞膜の構成成分として広く分布する様々な糖鎖の認識特異性が使われている。しかし、糖鎖とタンパク質間の親和性自体は強くないため、糖鎖が多価で結合することで親和性を高めていることが示唆されている。グリコシド結合で繋がる糖鎖は、大きく揺らぐためにその構造決定が難しく、糖鎖の多価結合を対象にする研究はこれまであまり行われていない。しかし、生体内で薬物輸送を目的とする新規糖鎖クラスター分子や薬剤等の開発に向け、特異的な認識能をもつ糖鎖の多価相互作用の解明研究から得られる基礎的な知見、および開発のためのシミュレーション手法にはニーズがある。

病原性細菌は宿主細胞表面に付着することで感染を開始する。付着は細菌による感染症や疾病に不可欠な初段階であり、感染症予防や治療の創薬ターゲットとなっている。大腸菌の線毛の細胞表面に存在するアドヘシンは、宿主の細胞表面に存在するマンノース糖鎖をレセプターとして付着することで、細胞接着を促進する付着因子である(図1)。アドヘシンの先端にはFimHがあり、レクチン領域とピリン領域から構成され、通常、この二つの領域は結合している(A-state, 図2)。このレクチン領域では特異的にマンノース糖鎖に結合し、その親和性はマンノース糖鎖構造のグリコシド結合の違いによって異なることが明らかになっている。[1]

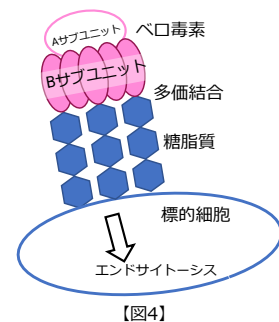


細菌感染における付着は、口、肺、腸などで、粘液が上皮細胞の表面に沿って流れる場所で起こる動的なものである。アドヘシンは糖鎖との会合によって、FimHの部分構造が変化(レクチン領域とピリン領域が分離, S-state)するとともに剪断応力が働き、糖鎖との親和力が強くなることで細胞の解離を防ぐ「キャッチボンド」と呼ばれるメカニズムがある(図3, [1])。このリガンドが結合することによって構造や親和性が変化する大腸菌付着因子FimHの糖鎖認識を対象に、タンパク質の構造変化を伴う際の糖鎖-タンパク質間相互作用の詳細を明らかにすることを本研究の第一段階とした。

さらにこの系では、アドヘシン FimH と糖鎖間に多価結合が関与することが明らかになっている。FimHの通常状態(A-state)および分離状態(S-state)において、2つのアドヘシンFimHが1つの糖鎖に結合する構造が報告されている(図2, 図3, [2])。「タンパク質と糖鎖が2対1で結合する場合の相互作用」を解析し、前述の「アドヘシンFimHが単独で糖鎖を認識する場合」と比較することで、多価結合の特徴を明らかにすることを本研究の第二段階とした。



0157株に代表される腸管出血性大腸菌によって産生される毒素であるペロ毒素(志賀毒素)は、そのBサブユニットを介して標的細胞に結合する(図4)。このサブユニットは五量体を形成し、標的細胞表面の複数の糖脂質と特異的に、かつ多価相互作用をすることが明らかになっている。[3]複数の糖鎖に結合するペロ毒素Bサブユニット五量体の結晶構造は報告されており、単量体あたり3つの糖鎖と結合している。この系を対象に、毒素と糖鎖間の多価結合の相互作用の特徴を解析すると共に、1つのタンパク質が複数のリガンドを認識する「1対多の生体内多価相互作用」の特徴を明らかにし、別の系にも応用可能なシミュレーション手法を開発していくことを着想した。



2. 研究の目的

本研究は、生体内でリガンドが多価結合する際の認識特異性を評価するための新たなシミュレーション手法の開発を目的としている。病原性細菌の付着因子における糖鎖認識、およびペロ毒素の標的細胞での糖鎖認識において、糖鎖が多価で結合することが実験的に示されている。糖鎖

【1 研究目的、研究方法など (つづき)】

がタンパク質に結合する複合体の構造情報や、糖鎖のタンパク質への親和性に関する熱力学的実験結果を利用し、計算化学の手法を用いて相互作用の詳細を明らかにすると共に、生体内における多価結合による分子認識機構の解明に向けた解析手法を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、大腸菌が関与する二つの系を対象にした。第一に付着因子アドヘシンが関与する糖鎖結合を対象にした。この系では、糖鎖の多価結合や、その結合による構造変化、それに伴う糖鎖親和性の変化が実験的に明らかになっており、「タンパク質が単独で1つの糖鎖に結合する1対1相互作用」、「2つのタンパク質が1つの糖鎖に結合する2対1相互作用」について段階的に解析した。第二にペロ毒素の感染初段階における糖脂質への結合における「1つのタンパク質が複数の糖鎖に結合する1対多相互作用」での糖鎖認識を対象にした。これらの研究を通して生体内環境における多価の糖鎖認識機構を解明するシミュレーション手法の開発を下記の通り行った。

① アドヘシン FimH が単独で糖鎖を認識する場合 (1 対 1) の相互作用解析

大腸菌付着因子アドヘシン FimH のレクチン領域でのマンノース糖鎖認識は特異的であり、マンノース糖鎖のグリコシド結合の違いによって、 $\alpha 3\text{Man}2 > \alpha 2\text{Man}2 > \alpha 6\text{Man}2$ の順に親和性が高いことが実験的に示されている。レクチン領域とピリン領域が結合している通常状態 (A-state) の FimH にマンノース二糖 ($\alpha 3\text{Man}2$ 及び $\alpha 6\text{Man}2$) が結合する複合体の結晶構造 (pdbID: 6gu0, 6gtv, 原子数約 4300) と、この構造を利用して $\alpha 2\text{Man}2$ が結合する複合体をモデリングにより作成した。これらを出発構造にして、150 ns の分子動力学シミュレーションを、プログラム AMBER20 を使用して行い、複合体構造のダイナミクスや、溶媒分布の変化を解析した。また、大腸菌の活性は温度依存性があるため、シミュレーションの温度条件を変え (300 K, 310 K, 320K), その影響も確認した。MD シミュレーションの単位時間刻みのスナップショット構造に対して、摂動法により電子相関を考慮した大規模量子化学計算 (FMO-MP2/6-31G(d), プログラム GAMESS) を行い、詳細なタンパク質-糖鎖間の相互作用を PIEDA により定量的に見積もり [4], 実験から得られている熱力学的データと比較し、その結合様式の違いが相互作用に与える影響を解析した。

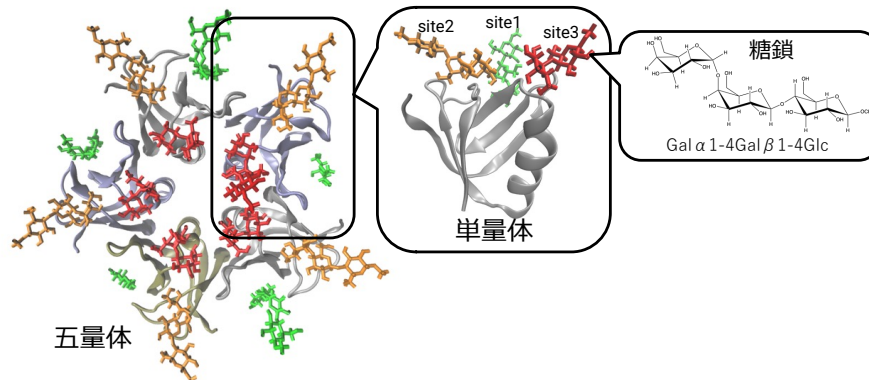
次に、FimH のレクチン領域に糖鎖が会合することにより、そのレクチン領域とピリン領域が分離し、せん断応力が働く状態 (S-state) でマンノース二糖 ($\alpha 6\text{Man}2$, $\alpha 3\text{Man}2$, $\alpha 2\text{Man}2$) が結合する各複合体結晶構造 (pdbID: 6gtw, 6gtx, 6gty) を出発構造にして、上記と同様の解析を行い、タンパク質側の構造変化を伴う際のアドヘシン FimH と糖鎖間相互作用を詳細に解析した。

② 2つのアドヘシン FimH が1つの糖鎖を認識する (2 対 1) 相互作用解析

2つのアドヘシン FimH が1つのマンノース三糖 ($\text{Man} \alpha (1-3) [\text{Man} \alpha (1-6)] \text{Man} \alpha$) に結合する複合体構造には、通常状態 (A-state) と分離状態 (S-state) の結合状態が異なる二つの結晶構造が報告されている (pdb ID: 6gtv, 6gtw 原子数約 4800~8600)。これらの結晶構造を出発構造にして、前述と同様の手法を用いて MD シミュレーションおよびそのスナップショット構造に対する量子化学計算を行い、2つのアドヘシンが1つの糖鎖を認識する場合の多価相互作用解析を行い、上記①アドヘシン FimH が単独で認識する場合と比較検討した。

③ ペロ毒素感染初段階で1つのタンパク質が複数の糖鎖を認識する (1 対多) 相互作用解析

ペロ毒素の B サブユニット五量体に、グロボトリオシルセラミド (Gb3) の糖鎖部分 ($\text{Gal} \alpha 1-4\text{Gal} \beta 1-4\text{Glc}$) が多重結合する結晶構造 (pdbID: 1bos) が報告されている。この構造では、単量体あたり3個の糖鎖と結合している (図5)。この各単量体部分 (約 1230 原子) を出発構造として、100 ns の分子動力学シミュレーションを AMBER20 で行い、糖鎖結合の変化および複合体のダイナミクスを解析した。また、MD シミュレーションのスナップショット構造における毒素と糖鎖間の相互作用エネルギーを量子化学計算 (FMO-MP2/6-31G(d)) により算出した。続いて、B サブユニット五量体全体 (6181 原子) に対して、MD シミュレーションおよび量子化学計算を同様にを行い、糖鎖多重結合における相互作用を詳しく解析した。



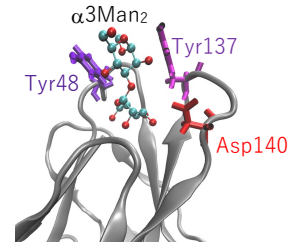
【図5】 ペロ毒素Bサブユニット五量体糖鎖複合体結晶構造 (pdb ID: 1bos)

【1 研究目的、研究方法など (つづき)】

4. 研究成果

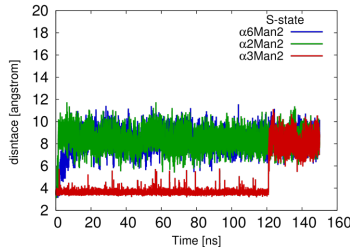
① アドヘシン FimH が単独で糖鎖を認識する場合 (1 対 1) の相互作用解析

アドヘシンの糖鎖認識の特徴を明らかにするため、3 種類のマンノース糖鎖-アドヘシン複合体構造を出発構造にして、150 ns の分子動力学シミュレーションを行った。どの複合体においても活性部位の構造は安定し、各糖鎖との結合は保持されていたが、活性部位に存在する Asp140 残基の配座に顕著な違いが見られた (図 6)。Asp140 残基と糖鎖間距離の時間変化を 3 種類の複合体で比較し、S-state での結果を図 7 に示す。α3Man2 糖鎖が結合する複合体では、Asp140 の側鎖が活性部位の内側にある配座をとる (約 4.0 Å) が、α2Man2 や α6Man2 糖鎖が結合する複合体では、シミュレーション開始後すぐに Asp140 の側鎖部分が反転し、側鎖が活性部位の外側に反転する配座となり、距離が長くなった (約 9.0 Å)。一方、通常状態 A-state (図 8) では、すべての複合体においてシミュレーション開始後すぐに Asp140 の側鎖は反転したが、その後、α3Man2 糖鎖結合複合体のみが内側に戻った。また、α3Man2 糖鎖結合複合体では、A-state, S-state どちらの状態においても、活性部位の入口付近に扉のように存在する二つのチロシン残基 (Tyr48, Tyr137) がシミュレーション中ずっと α3Man2 糖鎖末端を挟み、α3Man2 糖鎖を活性部位にしっかりと配置させ、強く相互作用できるような配座をとることが明らかになった (図 6)。これらの結果は、α3Man2 糖鎖が他の糖鎖よりも強い親和性をもつという親和性実験結果を支持するものであった。

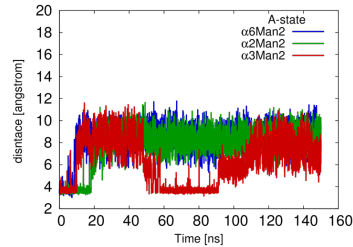


【図6】

スナップショット構造におけるアドヘシンと糖鎖間相互作用を量子化学計算により計算したところ、シミュレーション開始初期において、各糖鎖とアドヘシン間の相互作用エネルギーの絶対値は、A-state, S-state どちらの状態においても α3Man2 > α2Man2 > α6Man2 複合体の順に大きくなり、実験的に得られた解離定数と定性的に一致することが明らかになった。特に S-state における α3Man2 複合体では、一定時間が経過後も、活性部位における糖鎖相互作用は強く、立体構造が多少変化しても、糖鎖親和性が保持されることが明らかになり、解離を防ぐための剪断応力が働く環境下において、強い相互作用を保持する、という実験結果を支持するものであった。また、この相互作用の内訳は主に活性部位に存在する Phe-1, Asp54, Asp140 残基とのものであった。相互作用の時間変化を解析したところ、このうち Asp140 残基との相互作用が 3 種類のマンノース糖鎖 α3Man2, α2Man2, α6Man2 間の FimH への親和性の違いに寄与することが明らかになった。



【図7】 S-state での Asp140 と糖鎖間距離の時間変化

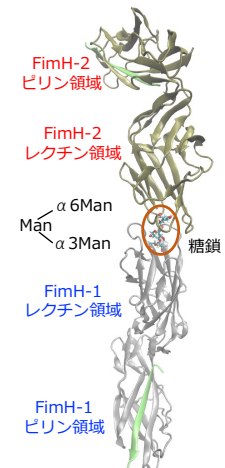


【図8】 A-state での Asp140 と糖鎖間距離の時間変化

さらに、シミュレーションの温度条件を変え、アドヘシンの親和性における温度依存性を MD シミュレーション及び量子化学計算により確認した。アドヘシンと親和性が強い α3Man2 糖鎖は、300 K から 310 K への温度上昇によってアドヘシンと糖鎖親和性がさらに強くなり、大腸菌の活性化条件と合う結果が得られた。一方、アドヘシンとの親和性が弱い α6Man2 糖鎖はこの温度上昇によって、複合体内での糖鎖構造安定性がさらに悪化し、親和性が弱くなることが明らかになった。以上の結果は、第 40 回日本糖質学会年会、日本化学会第 102 春季年会、および国際学会 (TACC-2023) で発表すると共に、第 59 回生物物理学会にて招待講演を行った。

② 2 つのアドヘシン FimH が 1 つの糖鎖を認識する (2 対 1) 相互作用解析

2 つのアドヘシンがマンノース三糖と結合する結晶構造 (pdbID: 6gtv, 6gtw) を出発構造として、MD シミュレーションを行い、複合体構造のダイナミクスや溶媒分布の変化を解析した。この複合体は、FimH1-α3Man-Man-α6Man-FimH2 という、2 つのアドヘシンが 1 つの糖鎖を引き合う構造になっており (図 9)、α3Man 側の相互作用と α6Man 側の相互作用の時間変化を追跡したところ、S-state において α3Man 側の相互作用エネルギーの絶対値は α6Man 側よりも常に大きく、α3Man2 糖鎖は α6Man2 糖鎖よりもアドヘシンと親和性が強いという実験結果と合うものであった。活性部位にある Asp140 残基の配座と相互作用エネルギーは相関があり、上記①と同様に、アドヘシンと糖鎖間多価相互作用においても重要な役割をしていることが明らかになった。一方、通常の結合状態 (A-state) において、α3Man 側、α6Man 側の各相互作用エネルギーは同程度であり、両者の差は見られな



【図9】 2 つの FimH が Man3 糖鎖に結合する複合体結晶構造 (PDB: 6GTV)

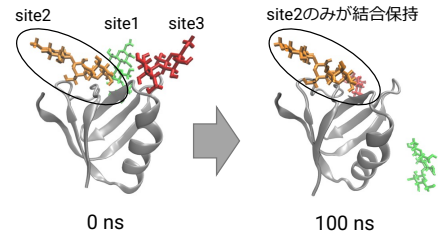
【1 研究目的、研究方法など (つづき)】

った。

2つのタンパク質で1つのリガンドを認識する多価結合についてさらに研究を遂行するためには、同様の結晶構造が必要となるが、その数は限られている。モデリングによって複合体構造を作成する等の検討が必要であり、今後の課題である。これらの結果は、第41回日本糖質学会年会、日本化学会第103春季年会で発表した。

③ ペロ毒素感染初段階で1つのタンパク質が複数の糖鎖を認識する (1対多) 相互作用解析

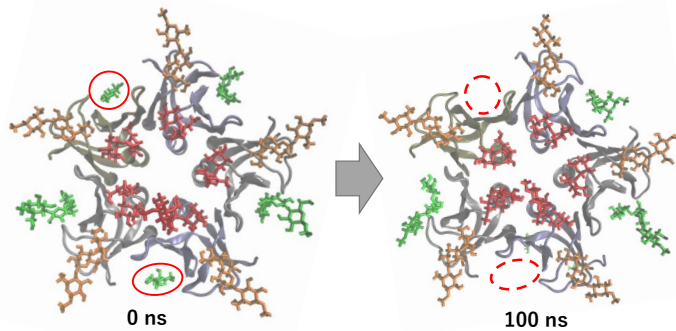
腸管出血性大腸菌によって産生されるペロ毒素のBサブユニット五量体が標的細胞表面の複数のスフィンゴ糖脂質と特異的に多価結合する複合体結晶構造を出発構造として、100 nsのMDシミュレーションを行った。単量体で複数の糖鎖を認識する場合と、五量体全体で複数の糖鎖を認識する場合は、構造安定性に大きな違いが見られた。単量体と糖鎖複合体のMDシミュレーションでは、3つの糖鎖のうち、2つが外れ、ループ近傍のSite2糖鎖のみが結合を保持することができた(図10)。5つの単量体すべてにおいて同様の結果が得られた。一方、五量体全体で複数の糖鎖を認識する場合では、15個の糖鎖のうち13個の結合が保持された(図11)。



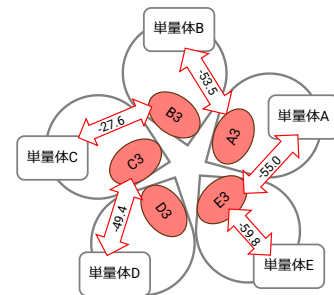
【図10】単量体のMDシミュレーションでのスナップショット構造の時間変化

この違いを明らかにするため、MDシミュレーションのスナップショット構造におけるペロ毒素と糖鎖間の相互作用エネルギーを量子化学計算(FMO-MP2/6-31G(d))を用いて算出したところ、各単量体と糖鎖間で相互作用するだけでなく、隣接する単量体とも相互作用していることが明らかになった(図12)。単量体のシミュレーションでは外れてしまう糖鎖であっても、五量体でその結合を保持できるのは、糖鎖が隣接する単量体とも協働的に相互作用することに起因することが明らかになった。この協働的な相互作用は、単量体によってその強さは異なり、シミュレーション時間経過とともにその差が顕著になることが明らかになった。以上の結果を(第42回日本糖質学会年会、日本化学会第104春季年会)発表した。

本研究で適用したシミュレーション手法によって明らかになった協働的な多価相互作用を、他の系にも応用し、多価相互作用を定量的に議論するための理論と手法の開発を今後も発展させていく。



【図11】五量体のMDシミュレーションでのスナップショット構造の時間変化



【図12】ペロ毒素Bサブユニット五量体糖鎖における協働的な相互作用エネルギー(kcal/mol)

<引用文献>

- [1] M. M. Sauer, R. P. Jakob, J. Eras, S. Baday, D. Eriş, G. Navarra, S. Bernèche, B. Ernst, T. Maier, R. Glockshuber, *Nat. Commun.* 2016, 7, 10738.
- [2] M. M. Sauer, R. P. Jakob, T. Lubner, F. Canonica, G. Navarra, B. Ernst, C. Unverzagt, T. Maier, R. Glockshuber, *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141, 936.
- [3] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* 2000, 403, 669.
- [4] D. G. Fedorov, K. Kitaura, *J. Phys. Chem. A* 2012, 116, 704.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 能登 香
2. 発表標題 タンパク質 糖鎖間における多価相互作用の理論研究
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 能登 香
2. 発表標題 糖鎖多価結合における認識機構に関する理論研究
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaori Ueno-Noto
2. 発表標題 Analyses of recognition mechanism and structure of bacteria FimH adhesin
3. 学会等名 第60回生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 能登 香
2. 発表標題 細菌感染の付着因子の糖鎖認識に関する理論研究
3. 学会等名 日本化学会第1012春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 能登 香
2. 発表標題 FimH 細菌感染の付着因子の糖鎖認識機構の解明
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------