

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370047

研究課題名(和文) N型糖鎖修飾のコンセンサス配列占有則を立体構造の視点から解明する

研究課題名(英文) Structural basis for N-linked glycosylation site occupancy

研究代表者

神田 大輔 (Kohda, Daisuke)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80186618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のアスパラギン残基への糖鎖付加はオリゴ糖転移酵素(OST)と呼ばれる膜タンパク質酵素が触媒している。超好熱性古細菌のOSTタンパク質のC末端可溶性ドメインおよび全長の結晶構造決定を行った。核磁気共鳴法・緩和時間解析と生化学実験により、OSTタンパク質の動的構造が糖鎖転移活性に必須であることを示した。糖鎖受容体であるペプチド基質(Asn-Val-Thr配列)との複合体の結晶解析を、ジスルフィド結合を使ってテザリングすることで成功させた。糖供与体(脂質結合型糖鎖)との複合体構造解析を行うための準備として、古細菌の脂質結合型糖鎖の化学構造の決定を質量分析と核磁気共鳴分析を用いて行った。

研究成果の概要(英文)：The addition of oligosaccharide chains on the asparagine residues in proteins is catalyzed by the membrane enzyme, oligosaccharyltransferase (OST). We determined the crystal structures of the C-terminal globular domains and the full-length OST protein from hyperthermophilic archaea. We also showed that the dynamic feature of the C-terminal globular domains was essential for the oligosaccharyl transfer activity. The crystal structure in the complex with the oligosaccharide acceptor substrate was determined using the tethering of a peptide containing the Asn-Val-Thr sequon to the protein through a disulfide bond. Toward the determination of the complex structure with the oligosaccharide donor substrate, we analyzed the chemical structures of archaeal lipid-linked oligosaccharides to synthesize the water-soluble analogues.

研究分野：構造生物学

キーワード：N型糖鎖修飾 翻訳後修飾 X線結晶解析 膜タンパク質 糖転移酵素

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のアスパラギン残基への糖鎖付加 (N型糖鎖付加) は翻訳後修飾の代表である。コンセンサス配列 Asn-X-Thr/Ser 中の Asn 残基への糖鎖の転移反応はオリゴ糖転移酵素 (OST) と呼ばれる膜タンパク質酵素が触媒している。N型糖鎖修飾は真核生物だけではなく、古細菌にも広く存在する。また、真正細菌の一部にも存在する。OST 酵素の触媒サブユニットは STT3/AglB/PglB (真核/古細菌/真正細菌) と呼ばれるタンパク質である。

2. 研究の目的

N 型糖鎖修飾のコンセンサス配列は Asn-X-Ser/Thr であるが、統計的に 3 割のコンセンサス配列には糖鎖は結合していない。OST 酵素がどのような機構で糖鎖修飾をするコンセンサス配列と糖鎖修飾をしないコンセンサス配列を区別しているのか? という問いは未解決であり、これを N 型糖鎖修飾のコンセンサス占有則と呼ぶ。糖鎖転移反応はタンパク質翻訳と協調して起こり、OST 酵素との相互作用によってコンセンサス配列の糖転移反応中のコンホメーションが決まる。したがって、反応機構の理解には立体化学的な視点が重要であり、コンセンサス占有則を解明する最良の方法は適切な構造生物学的アプローチをとることである。古細菌型 OST 酵素の全長の結晶構造決定を中心とした構造生物学研究と、活性発現メカニズムの解明や機能改変を目指した生化学研究を行い、コンセンサス占有則をコンホメーションの観点で明快に説明することを目指す。

3. 研究の方法

立体構造決定を X 線結晶構造解析により行う。動的な性質に関しては核磁気共鳴法による緩和時間解析を用いる。超好熱古細菌のタンパク質を大腸菌で組み換えタンパク質として発現して大量調製する。好熱性生物由来のタンパク質は温度を上げて変性しにくいので構造決定や生化学実験に適している。古細菌を培養して膜画分を調製し、酵素反応による糖ペプチドの調製などの生化学的な実験に用いる。古細菌として *Pyrococcus furiosus* と *Archaeoglobus fulgidus* を選択した。それぞれのゲノムには 2 種および 3 種の AglB タンパク質がコードされている。これらを PfAglB-L と PfAglB-S および AfAglB-L, AfAglB-S1, AfAglB-S2 として区別する。

4. 研究成果

AfAglB-S1 タンパク質の C 末端球状ドメインの結晶構造を決定した (論文)。さらに、C 末端球状ドメインには大きな可塑性を示すセグメントがあることを結晶の多形から、実際に溶液中ではこのセグメントは大きな内部運動を持つことを AfAglB-S2 を使って NMR 緩和時間解析により示した (論文)。

さらに、古細菌のオリゴ糖転移酵素全長を大腸菌の膜画分に発現してアッセイする系を用いて、柔軟性を抑制するような人工的なジスルフィド結合を導入すると、酵素活性が完全に消失するが、還元してジスルフィド結合を切断すると完全に活性が回復することを PfAglB-L を使って示した (論文)。可動セグメントは糖鎖修飾コンセンサス配列である Asn-X-Ser/Thr 配列の +2 の位置のセリンとスレオニン残基を認識するセリン・スレオニンポケットの形成に関与している。オリゴ糖転移酵素は新生ポリペプチド鎖を効率よくスキャンするために、C 末端球状ドメイン内に存在する構造可塑性を巧みに利用している可能性が考えられた。すなわち、コンセンサス配列中のセリンとスレオニン残基を確実に捉え、糖転移が終了したら、すばやくポリペプチド鎖を離して次ぎのコンセンサス配列が来るのに備えるために、セリン・スレオニンポケットの形成と破壊をすばやく行うようなメカニズムの存在が想定される。

次に AfAglB-L の全長の結晶構造決定を行った (論文)。C 末端にヒスタグをつけた形で、大腸菌を用いて発現した。膜フラクションを界面活性剤である DDM (n-dodecyl-β-D-maltopyranoside) を用いて可溶化後、Ni セファロース、スロンピンによるタグ除去、ゲルろ過を用いて精製した。ゲルろ過において DDM を OG (noctyl-β-D-glucopyranoside) および LDAO (lauryldimethylamine-oxide) に置換した。OG および LDAO サンプルから、空間群 C2 (分解能 2.5Å) と空間群 P4₃2₁2 (分解能 3.4Å) の 2 つの結晶が得られた。AfAglB-L C 末端可溶性ドメインの立体構造をマルトース結合タンパク質との融合タンパク質を用いて決定し (文献)、分子置換のサーチモデルとして用いて構造決定を行った (図 1 左)。N 末端膜貫通領域に 2 価金属イオンが結合しているが、C2 結晶の構造にはこの 2 価金属イオンの近くに、結晶化溶液に含まれていた硫酸イオンが結合していた。これは反応プロダクトであるドリコールリン酸のリン酸基をミミ

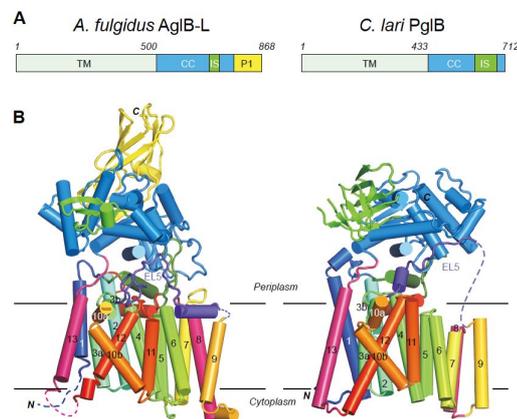


図 1 今回、構造決定した AfAglB-L の構造 (P43212 型、左) と、スイスグループによって構造決定された C/PglB の構造 (右)。

ックしていると考えている。また、2つの膜貫通ヘリックスをつなぐ長いループ(EL5と呼ぶ)はディスオーダーして電子密度が観測できなかった。一方、 $P_43_21_2$ 結晶の構造は、基質が結合していないアポフォームであり、EL5ループの電子密度が観測できた。スイスのグループから報告されている真正細菌 *Campylobacter lari* の PglB の全長結晶構造(図1右, 参考文献, ペプチドとの複合体, EL5は半分ディスオーダーしている)と合わせて考察することで、EL5のダイナミックな構造変化を中心とした、糖転移反応サイクルの存在が推定できた。

基質であるペプチドとの複合体構造を得ることを目指したが、単純な混合では共結晶を得ることができなかった。そこで、AfAglB-Lタンパク質にシステイン残基を導入し、ペプチド側にも導入したシステイン残基との間に分子間ジスルフィド結合を作らせた複合体を作製した。なお、システイン残基の導入位置は、ペプチドとの共結晶が既に得られている CIPglB 酵素の立体構造を参照して行った。結晶構造解析の分解能は低下したが、ペプチド基質が伸びたコンホメーションで結合していることがわかった(図2)。糖鎖付加コンセンサ配列 Asn-Val-Thrのうち、Asn 残基の側鎖は2つの酸性アミノ酸残基および2価金属イオンと共に、carboxylate dyad と命名した特殊な構造を形成していた。

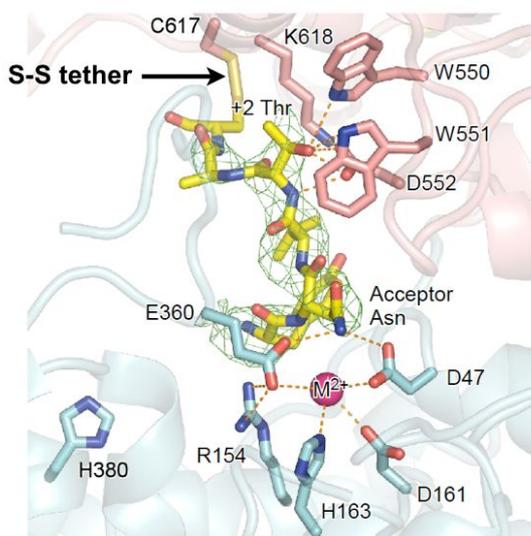


図2 AfAglB-L・ペプチド複合体の結晶構造。ペプチド(Asn-Val-Thr配列)はSS結合によりタンパク質にテザリングされている。

脂質結合型糖鎖(LLO)はOST反応のオリゴ糖鎖供与体である。真核生物や真正細菌のLLOに比べ、古細菌のLLOの化学構造は多様であり、古細菌の種ごとに構造決定を行う必要がある。LLOのオリゴ糖鎖の構造決定は、OST反応を利用して糖ペプチドを大量調製し、単糖組成分析、単糖絶対配置分析、質量分析、NMR解析により決定した。古細菌 *P. furiosus* のオリゴ糖鎖構造を報告し(文献),

また *A. fulgidus* の糖鎖構造の解析を終了した。一方、LLOの脂質リン酸部分の構造決定は培養菌体から有機溶媒抽出したのち、陰イオン交換と順相HPLCにより分離し、ESI-MS分析を行うことで決定した。*P. furiosus* と *A. fulgidus* のLLOは、ドリコール-モノリン酸であることを見いだした(図3)。真核生物と真正細菌ではリン酸基の数は2個であるので、古細菌のLLOの独自性を示している。今回明らかにしたLLOの化学構造をもとに、共結晶作成のための水溶性LLOアナログの化学合成を行い、AglB・LLO複合体の結晶構造解析に使用することができる。

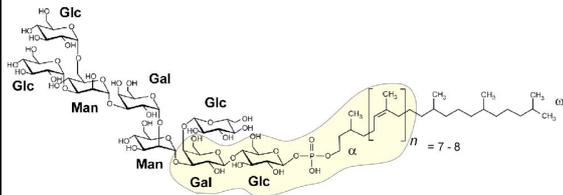


図3 *A. fulgidus* のLLOの化学構造。ドリコールの末端から3個の二重結合は飽和している。黄色網掛部分は水溶性アナログに相当する。

参考文献 Lizak C, Gerber S, Numao S, Aebi M, Locher KP. X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature* **474**, 350-355 (2011)

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6件)

Matsumoto S, Igura M, Nyirenda J, Matsumoto M, Yuzawa S, Noda N, Inagaki F, Kohda D. Crystal structure of the C-terminal globular domain of oligosaccharyltransferase from *Archaeoglobus fulgidus* at 1.75 Å resolution. *Biochemistry* **51**, 4157-4166 (2012) DOI: 10.1021/bi300076u

Nyirenda J, Matsumoto S, Saitoh T, Maita N, Noda NN, Inagaki F, Kohda D. Crystallographic and NMR evidence for flexibility in oligosaccharyltransferases and its catalytic significance. *Structure* **21**, 32-41 (2013) DOI: 10.1016/j.str.2012.10.011

Matsumoto S, Shimada A, Kohda D. Crystal structure of the C-terminal globular domain of the third paralog of the *Archaeoglobus fulgidus* oligosaccharyltransferases. *BMC Struct Biol* **13**, 11 (9 pages) (2013) DOI: 10.1186/1472-6807-13-11

Matsumoto S, Shimada A, Nyirenda J,

Igura M, Kawano Y, Kohda D. Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation. Proc Natl Acad Sci USA **110**, 17868-17873 (2013) DOI: 10.1073/pnas.1309777110

Fujinami D, Matsumoto M, Noguchi T, Sonomoto K, Kohda D. Structural elucidation of an asparagine-linked oligosaccharide from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. Carbohydr Res **387**, 30-36 (2014) DOI: 10.1016/j.carres.2014.01.021

Ishiwata A, Taguchi Y, Lee YJ, Watanabe T, Kohda D, Ito Y. N-Glycosylation with synthetic undecaprenyl pyrophosphate-Linked oligosaccharide to oligopeptides by PglB oligosaccharyltransferase from *Campylobacter jejuni*. Chembiochem **16**, 731-737 (2015) DOI: 10.1002/cbic.201402658

〔学会発表〕(計 10 件)

国内英語口頭発表および海外発表をリスト

Shunsuke Matsumoto, Crystal structure of the C-terminal globular domain of oligosaccharyltransferase from *Archaeoglobus fulgidus* at 1.75 Å resolution. Interact2012, Munich, Germany (May, 2012)

Daisuke Kohda, Structural biology of the N-glycosylation reaction. The 20th Anniversary of the Mizutani Foundation for Glycosciences, Tokyo, Japan (Nov, 2012)

Shunsuke Matsumoto, Atsushi Shimada, James Nyirenda, Mayumi Igura, Daisuke Kohda, Crystal structure of an archaeal oligosaccharyltransferase, a membrane enzyme that catalyzes the transfer of sugar chains to asparagine residues of glycoproteins. Post-GCOE Symposium & Retreat in Singapore with NUS and TLL, Singapore (Mar, 2013)

Shunsuke Matsumoto, Crystal structure of an archaeal oligosaccharyltransferase. Glycobiology Gordon Research Conference, CA, USA (Mar, 2013)

James Nyirenda, Flexibility in the C-terminal globular domain of

oligosaccharyltransferase is essential for N-linked glycosylation, Glycobiology Gordon Research Conference, CA, USA (Mar, 2013)

Shunsuke Matsumoto, Atsushi Shimada, Takahiro Yamasaki, Daisuke Kohda, Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation, The 27th International Carbohydrate Symposium, Bangalore, India (Jan, 2014)

Daisuke Fujinami, Masaki Matsumoto, Daisuke Kohda, Structural elucidation of N-linked oligosaccharides of hyperthermophilic archaea. International Symposium between Kyushu U. Post Global COE and School of Biomedical Sciences, Monash U., Melbourne, Australia (Feb, 2014)

Daisuke Kohda, Crystal structures of oligosaccharyltransferase provide insights into the sequon recognition and activation of N-linked protein glycosylation. 第 87 回 日本生化学会大会シンポジウム, Kyoto, Japan (Oct, 2014)

Daisuke Kohda, Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation. 2014 SFG & JSCR joint annual meeting, “Integrating Glycosciences from biology and chemistry to medicine”, Honolulu, Hawaii, USA (Nov, 2014)

Daisuke Kohda, Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation. Progress 100: Kyushu-U and Stanford-U Joint Research and Education Program, First Symposium: From Genes to Human Diseases, Fukuoka (Mar, 2015)

〔図書〕(計 4 件)

神田大輔, N型糖鎖生合成の主役: オリゴ糖転移酵素の構造生物学 実験医学 2013 年 6 月増刊号「第三の生命鎖 研究の最前線 糖鎖の機能・作動原理と疾患」第 31 巻 第 10 号, 146-152 (2013)

松本俊介, 神田大輔, N 型糖鎖修飾におけるアスパラギン側鎖アミド基の活性化機構の構造基盤. 生物物理 54(3), 158-159 (2014)

Shunsuke Matsumoto, James Nyirenda, Daisuke Kohda. Structural Biology of Oligosaccharyltransferases. Glycoscience: Biology and Medicine, Editors: Naoyuki Taniguchi, Tamao Endo, Gerald Hart, Peter Seeberger, Chi-Huey Wong, Springer (2014)

James Nyirenda, Shunsuke Matsumoto, and Daisuke Kohda. Crystallographic and NMR evidence for flexibility in oligosaccharyltransferases and its catalytic significance. SPring-8 Research Frontiers 2013, 26-27 (ISSN 1349-0087 SPring8 Document D2014-010) (2014)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/vsb/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神田 大輔 (Kohda, Daisuke)

研究者番号 : 8 0 1 8 6 6 1 8

(1)連携研究者

嶋田 睦 (Shimada, Atsushi)

研究者番号 : 7 0 3 9 1 9 7 7

眞柳 浩太 (Mayanagi, Kouta)

研究者番号 : 5 0 4 1 8 5 7 1