

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710257

研究課題名(和文) GPIアンカーの膜環境下における立体構造と相互作用の解明

研究課題名(英文) Structure and interaction analysis of GPI-related glycans

研究代表者

花島 慎弥 (Hanashima, Shinya)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50373353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体での役割が未解明なGPIアンカー関連糖鎖やタンパク質の構造と機能に関する研究を分野複合的な手法を用いておこなった。GPIアンカー糖鎖の部分構造を化学合成にて調製し、その生合成、輸送に關与するタンパク質PGAP5との結合性を酵素活性を用いて評価し、その機能と機構に迫った。結核菌のGPI糖鎖類縁体PIMとヒト消化管タンパク質ZG16pとの複合体構造をNMRを用いて詳細に明らかにし、新しい粘膜免疫機構の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We studied structures and a glycan-protein complex of functionally unknown GPI-related glycans and proteins through a combination of chemical and structural biological techniques. We chemically synthesized a series of truncated GPI-glycan structures. Enzymatic assay using the synthetic glycan units, human PGAP5, relates to GPI biological synthesis and ER-Golgi transport, requires full 5 sugar sequences for the substrate recognition. Our NMR study revealed that Mycobacterium phosphatidyl inositol glycan PIM is recognized by human lectin ZG16p which abundantly present around mucosa at intestine. Our finding suggests a new defense mechanism through mucosal immune responses.

研究分野：生物有機化学

キーワード：糖鎖 NMR タンパク質

1. 研究開始当初の背景

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーはある種のタンパク質を細胞表面に繋ぎ止めておく構造体として 20 年以上前に Ferguson らによりその糖鎖構造が報告された (*Nature* **1988**, 333, 269; *Science* **1988**, 239, 753.). 現在までに哺乳動物や植物、酵母などとともにマラリアやトリパノソーマ症の原因となる病原性の原虫類など、真核生物に広く存在する。それら GPI-アンカー型タンパク質は加水分解酵素や受容体、抗原など様々な機能を持つ。

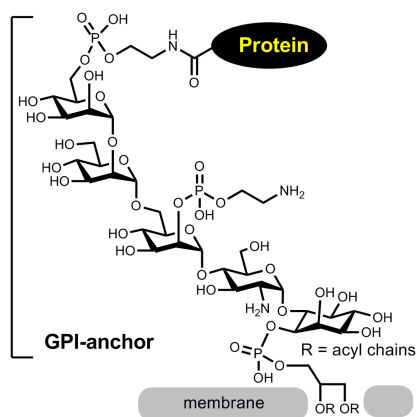


Fig. 1 GPI-アンカーの構造

GPI-アンカー型タンパク質は複雑な生合成経路を経て合成される (木下ら *FEBS Lett* **2010**, 584, 1670.) が、GPI アンカーそれ自体の機能は不明なままである (C. R. Bertozzi et al. *Biochemistry* **2008**, 47, 6991.). GPI-アンカー型タンパク質の多くは細胞膜上の機能ドメインに存在していることから、カベオリンのような機能ドメインに存在するタンパク質と相互作用する可能性が考えられてきたが、直接的証拠は得られていない。GPI アンカーの機能解明が遅れている背景には、均一構造の入手の困難さが挙げられる。化学合成は小川ら、Schmidt らにより 90 年代初頭より報告がなされているが (Ogawa et al. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 671; Schmidt et al. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 679.) 20 年を経た現在でも未だ容易とは言い難い。そのため GPI 合成を基盤とする化学的

ならびに化学生物学的アプローチによる機能解明研究への展開例は非常に限られる (例 C.R. Bertozzi et al. *PNAS* **2007**, 104, 20332.). 一方 GPI アンカー糖鎖骨格の立体構造と運動性に関しては NMR によるミセル中での解析例があるが (Nieto et al. *Glycobiology* **2006**, 16, 969.) 相互作用に重要と考えられる二つのホスホエタノールアミンを含まない構造を用いたものであった。

2. 研究の目的

化学生物学的アプローチと構造生物学的アプローチを併せて GPI 関連糖鎖やタンパク質の立体構造や相互作用を解明すること、またそのための化学合成や NMR を用いた構造、相互作用解析の技術基盤の確立を目的にした。本構造機能研究を通して、トリパノソーマ症などに対する抗体医薬を用いた治療の可能性を探る基盤となる研究とする。

3. 研究の方法

本研究に用いた一連の糖鎖構造は化学合成により得た。適切な単糖保護体を合成して、順次グリコシル化反応を繰り返すことにより糖鎖を伸長し、最後に脱保護反応を行い、目的の糖鎖構造を得た。糖鎖やタンパク質の構造は各種二次元測定を用いてシグナルの帰属をおこなった後、2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY や 1D DPFGE-NOESY を用いて解析した。二つの核間 NOE シグナルの強度 (I_1, I_2) は核間距離 (r_1, r_2) と $I_1/I_2 = r_2^6/r_1^6$ の関係を利用して、プロトン核間距離を見積もり立体構造を解析した。やタンパク質との相互作用は飽和移動差 (STD) - NMR や Transferred-NOE、化学シフト摂動を利用することで解析した。

4. 研究成果

GPI アンカーは特徴的な糖鎖構造をもち、哺乳動物、酵母、菌類や病原性原虫類に広く存在するが、その機能はアンカーとしてタンバ

ク質を繋ぎ止めておく役割以外いまだ不明である。申請者は、化学生物学的アプローチと構造生物学的アプローチを併せて GPI アンカーの立体構造を解明し未だ不明な機能にせまることを目的に研究を遂行した。

GPI アンカー糖鎖の化学合成をおこなった。マンノース三糖とグルコサミンからなる四糖骨格の2箇所あるいは3箇所のマンノースのヒドロキシ基へエタノールアミンユニットを導入した。続いて脱保護をおこない、目的の四糖ユニットの合成を達成した。この合成を基盤として先の四糖にイノシトールを有する五糖ユニットを合成した。まずグルコースから Ferrier 反応を経て合成したイノシトール保護体に、グルコサミンを導入した。反応は立体選択性の完全な制御が困難であったが、2:1 の選択性で α -体を優先的に得ることができた。ここで得られた二糖ユニットを受容体へと導いたのち、先に合成したトリマンノース供与体と縮合して、目的の五糖骨格を得た。得られた五糖骨格へエタノールアミンユニットの導入をおこない、続く脱保護を経て、目的の五糖ユニットの合成を達成した。

合成した GPI 糖鎖の立体構造を NOE を用いて解析した。選択励起パルスを用いた一次元の NOESY 測定により、高感度かつ短時間で NOE 相関シグナルのセットを取得した。その結果、特に非還元末端側のマンノースの回転が制限されて回転異性体が存在している可能性を示唆した。GPI 合成と小胞体からゴルジ体への輸送に関与する膜タンパク質 PGAP5 は、*in vitro*での発現が難しいこともありそのリガンド認識機構は不明であった。そこで、その活性を指標に、GPI 糖鎖の3糖または4糖ユニットを用いて、天然型 GPI 構造に対する活性阻害を指標に認識構造を調べた。その結果、PGAP5 に対する阻害はかなり弱く、PGAP5 はその活性発現のためには GPI 構造全体を認識している可能性が高いことがわかった。こ

のことは PGAP5 が小胞体での成熟型 GPI を認識して小胞体からゴルジ体輸送の門番をしている可能性を示す結果と考えられる。さらに、NMR を用いて PGAP5 と GPI 糖鎖との相互作用を調べた。そのために共同研究者により作成いただいた PGAP5 が細胞膜表面に発現する細胞株を用いることにした。On-Cell NMR 条件下で Saturation transfer double difference (STDD)-NMR を測定することで、その相互作用の NMR による検出を試みた。その結果、タンパク質とリガンドの結合に由来すると考えられるシグナルの取得に成功した。しかしながら細胞に由来するバックグラウンドのシグナルを効率的に除くことが困難であったため、詳細な解析のためには更なる測定条件の検討が必要であった。また、結核菌の PIM は、GPI アンカーと共通のコア構造であるホスファチジルイノシトールを有する。この PIM コア構造の糖鎖部分を精密に化学合成して、ヒトの腸管タンパク質 ZG16p との相互作用を NMR により詳細に調べて、その複合体構造を決定した。

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 3 件)

Shinya Hanashima, Sebastian Götze, Yan Liu, Akemi Ikeda, Kyoko Kojima-Aikawa, Naoyuki Taniguchi, Daniel Varón Silva, Ten Feizi, Peter H. Seeberger, Yoshiki Yamaguchi ChemBioChem 査読あり 2015, in press DOI; 10.1002/cbic.201500103

Shinya Hanashima, Hiroaki Korekane, Naoyuki Taniguchi, Yoshiki Yamaguchi Synthesis of N-glycan units for assessment of substrate structural requirements of N-acetylglucosaminyltransferase III

Bioorganic and Medicinal Chemistry
Letter 査読あり、2014, 24, 4533-4537.
DOI; 10.1016/j.bmcl.2014.07.074.

Shinya Hanashima, Akemi Ikeda, Hiroshi
Tanaka, Yoshiyuki Adachi, Naohito Ohno,
Takashi Takahashi, Yoshiki Yamaguchi
Glycoconjugate Journal 査読あり 2014,
24, 368-378. DOI;
10.1007/s10719-013-9510-x.

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
花島 慎弥 (HANASHIMA Shinya)
大阪大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：50373353

〔学会発表〕(計 5 件)

花島慎弥 バイセクト型糖鎖部分構造
の合成と糖転移酵素阻害剤の分子設計
戦略 第 12 回糖鎖科学コンソーシアム
シンポジウム 2014 年 12 月 4 日 - 2014
年 12 月 5 日 東京医科歯科大学 (東
京・千代田区)

Shinya Hanashima, NMR interaction
analysis of intestinal soluble lectin ZG16p
with mycobacterium phosphatidylinositol
mannosides, SFG2014 annual meeting,
2014 年 11 月 16 日 - 2014 年 11 月 19 日
Hawaii, (USA).

花島慎弥, 可溶性レクチン ZG16p と結核
菌の PIM 糖鎖における複合体構造の
NMR 解析, 第 33 回日本糖質学会年会
2014 年 8 月 10 日 - 2014 年 8 月 12 日 名
古屋大学 (愛知・名古屋市)

Shinya Hanashima, NMR study of short
 β 1,3-glucan structure insight into the
interaction with Dectin-1, The 5th ACGG
conference, 2013 年 10 月 16 日 - 2013 年
10 月 18 日 Khon Kaen, (Thailand)

花島慎弥, NMR を用いた短鎖 β 1,3-glucan
の構造と Dectin-1 との相互作用解析 第
32 回日本糖質学会年会 2013 年 8 月 5
日 - 2013 年 8 月 7 日 大阪国際センター
(大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 1 件)

Shinya Hanashima, Yoshiki Yamaguchi,
“Applications of NMR to Biomolecular
Systems of Interactions: An Overview”
Bio-Nanotechnology, A Revolution in
Food, Biomedical and Health Sciences
2013, 573-592 (eds D. Bagchi, M. Bagchi,
H. Moriyama and F. Shahidi), Blackwell
Publishing Ltd., Oxford

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)