

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06929

研究課題名(和文) コアフコースによる高度機能化バイオ医薬品の開発プラットフォームの構築

研究課題名(英文) Protein engineering of human FUT8 for efficient production of core fucosylated glycoproteins

研究代表者

井原 秀之 (Ihara, Hideyuki)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：50452834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ医薬品のアスパラギン結合型糖鎖(N型糖鎖)改変による機能化に利用できる高活性型糖転移酵素の作製を行った。N型糖鎖のコアフコース構造を合成するFUT8について、N型糖鎖修飾を導入した変異体では野生型より高い酵素活性を持つことが明らかになった。また、FUT8の活性化機構を理解するために高次構造形成について調べたところFUT8が二量体で存在し、触媒ドメインに付随した α -helicalドメインとSH3ドメインが二量体形成に重要であることが明らかになった。今後、得られた研究成果を基に、より高活性型のFUT8変異体の作製やそれをを用いたバイオ医薬品の糖鎖改変による機能化を行っていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エリスロポエチンや抗体医薬に代表されるバイオ医薬品の糖鎖改変による機能化が注目されている中、本研究成果は糖鎖改変の主要なツールである糖転移酵素の高活性化に翻訳後修飾改変(本研究ではN型糖鎖改変)が有効であることを示した。また、抗体医薬の機能化に関わるコアフコース構造を合成するFUT8の活性化機構の一つとして、二量体形成が重要であることも明らかにすることができた。これらの成果は、今後のバイオ医薬品の糖鎖改変による機能化技術の発展に有益な情報を提供できるものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We examined to prepare a highly active glycosyltransferase for the functionalization of biopharmaceuticals by modification of N-glycan. As the results, it was found that N-glycosylated human FUT8 mutants have higher activities than the wild type enzyme. In addition, the molecular assembly of FUT8 was investigated, to reveal the mechanism of activation of FUT8 enzyme. It was suggested that human FUT8 potentially forms homodimer via intermolecular hydrophobic interactions involving the α -helical and SH3 domains associated with the catalytic domain.

On the basis of these results, we would like to design more active FUT8 mutants for the development of N-glycan-modified biopharmaceuticals.

研究分野：生化学、糖鎖生物学

キーワード：フコース転移酵素 FUT8 糖転移酵素 N型糖鎖 翻訳後修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サイトカインや抗体分子といったバイオ医薬品の医療分野における重要性が増す中、近年アスパラギン結合型糖鎖(N型糖鎖)の改変によるバイオ医薬品の“高度機能化”が注目されている。タンパク質に糖鎖が付加されると、溶解性・電荷・タンパク質分解酵素の作用への耐性・レクチンによる認識・タンパク質-タンパク質相互作用などの物理化学的や生物学的な性質に影響をおよぼすことが知られており、目的タンパク質のN型糖鎖を人為的に改変することで物理化学的もしくは生物学的性質を変化させる“高度機能化”が様々なバイオ医薬品で検討されている。“高度機能化”が成功した有名なものとして人為的なN型糖鎖付加により血中滞留時間を改善した腎性貧血の患者に投与されるエリスロポエチン製剤が知られている。抗体医薬品分野では、抗体分子のN型糖鎖中のコアフコースを欠損させることで抗体依存性細胞障害活性を劇的に上昇させるポテリジェント技術が高い注目を浴びている。こうした中、様々な臨床的に重要なバイオ医薬品をターゲットとしたN型糖鎖改変による“高度機能化”を効率的に行える開発プラットフォームの構築が期待されている。

2. 研究の目的

糖タンパク質の糖鎖改変技術としては、糖転移酵素のノックアウトやゲノム編集が有名であり特定の糖鎖構造を消失させるのに著しい効果を発揮している。一方で、特定の糖鎖構造を増加させる技術としては、宿主細胞への糖転移酵素遺伝子導入による過剰発現が知られているが、その改変効率はノックアウトやゲノム編集と比較すると低いことが問題となっている。これは、糖転移酵素の目的糖鎖構造の合成に最適な“場所・タイミング”が糖鎖合成経路における他の様々な糖転移酵素との競合関係から非常に限定されているのに対して、過剰発現させた糖転移酵素の小胞体-ゴルジ体でのタンパク質発現分布が幅広くなってしまい目的糖鎖構造の合成の最適な“場所・タイミング”と十分に一致していないためであると予想される。

本申請で焦点をあてるコアフコースは、N型糖鎖の還元末端側のN-アセチルグルコサミンに1,6-フコースが付加したものでありFUT8により合成される糖鎖構造である。これまでにコアフコースは、「正常な発生・成長に必須である」「増殖因子受容体や接着分子などの機能を活性化する」「N型糖鎖の立体構造に変化をおよぼし構造の自由度を制限する」「糖分解酵素に対して抵抗性を示す」といった生命現象に関わることが報告されており、コアフコースによるバイオ医薬品の“高度機能化”を期待できる糖鎖構造であるといえる。本申請では、コアフコース合成を触媒するFUT8の過剰発現時に上述の細胞内でのFUT8の発現分布とコアフコース合成の最適な“場所・タイミング”がより一致し高効率で触媒能を発揮できる変異体酵素を作製し、それをを用いたコアフコース含有糖タンパク質高発現系を構築することで、コアフコースによる“高度機能化”バイオ医薬品の開発プラットフォームとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 翻訳後修飾改変FUT8変異体の作製と機能解析

翻訳後修飾改変FUT8変異体の作製

N型糖鎖修飾がなされることが知られているカイコFUT8の一次配列とヒトFUT8の一次配列を比較し、ヒトFUT8の人為的なN型糖鎖修飾のための変異導入残基の候補を決定した。決定した候補となるアミノ酸残基に変異導入を行ったヒトFUT8変異体を培養細胞で発現させ、N型糖鎖修飾の有無やFUT8酵素活性に及ぼす影響について調べた。

分泌型N型糖鎖付加ヒトFUT8変異体の作製

N型糖鎖修飾によるヒトFUT8の活性へ及ぼす影響を調べることを目的とし、分泌型N型糖鎖付加ヒトFUT8変異体の作製をバキュロウイルス 昆虫細胞発現系を用いて行った。FUT8のN末端側にバキュロウイルスのエンベロープタンパク質であるgp67のシグナル配列を導入し、また精製を簡便にすることを目的としてC末端にポリヒスチジンタグを導入した組換えウイルスを作製し、作製した組換えウイルスを昆虫細胞であるSf21細胞に感染させ組換え酵素を発現させた。

(2) FUT8の高次構造に関わるドメインの機能解析

ヒトFUT8の多量体形成能の検証

初めに、ステム領域のシステイン残基を介して共有結合による二量体を形成することが知られているカイコFUT8を参照にし、ヒトFUT8のステム領域にも等価のシステインを導入することで共有結合を介した二量体形成能を獲得するかどうかを検討した。続けて、我々が以前に明らかにしたヒトFUT8の立体構造データを用いてPISA server (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver) による高次構造のモデリング

を行った。

多量体形成に関わるドメインの機能解析

モデリングの結果をもとに、多量体形成に関わるドメイン(α -helical ドメイン、SH3 ドメイン)の欠損変異体・点変異導入変異体を作製し FUT8 酵素活性に及ぼす影響を調べた。また、 α -helical ドメイン、SH3 ドメインにシステインを導入し細胞内でジスルフィド結合による架橋実験でこれらのドメインの空間配置が上述のモデリングの結果と一致するかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) 翻訳後修飾改変 FUT8 変異体の作製と機能解析

翻訳後修飾改変 FUT8 変異体の作製

N型糖鎖が付加されていることが知られているカイコFUT8とヒトFUT8の一次構造比較を行い、ヒトFUT8のAsp-186, Glu-347, Glu-348がカイコFUT8の糖鎖付加部位と等価であることが推定された。これらの残基をアスパラギンに置換したヒトFUT8変異体(D186N, E347N/A349T, E348N, D186N/E347N/A349T, D186N/E348N)をCOS-1, HEK293, CHO, HepG2, Sf21細胞で発現させたところ、変異体のN型糖鎖付加が確認できた。また、野生型と比較して変異体ではFUT8酵素活性が上昇することがわかり、ヒトFUT8へのN型糖鎖付加が高活性FUT8変異体の作製に有効である可能性が示された(図1)。

分泌型 N 型糖鎖付加ヒト FUT8 変異体の作製

(1)- の結果をもとに、N型糖鎖付加 FUT8 変異体の活性調節の詳細を調べるために可溶性酵素標品の調製とその機能解析を行った。作製したバキュロウイルスを Sf21 細胞に感染させたところ、培地中への糖鎖付加 FUT8 変異体(D186N, E347N/A349T, E348N, D186N/E347N/A349T, D186N/E348N)の分泌を確認できた。また、分泌させた変異体の FUT8 活性も確認することができた。これらの分泌型の糖鎖付加 FUT8 変異体は、グリコシダーゼ消化により実際に糖鎖修飾を受けていることが明らかになった。金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製した野生型と D186N 糖鎖付加変異体を用いて反応速度論的解析を行ったところ、D186N 糖鎖付加変異体では受容体基質に対する K_m 値が野生型に比べ小さくなっており受容体基質に対する親和性が上昇している可能性が示唆された。

(2) FUT8 の高次構造に関わるドメインの機能解析 [1]

ヒト FUT8 の多量体形成能の検証

カイコ FUT8 の S-S 結合を介したホモ二量体形成に関わるステム領域のシステイン残基を導入したヒト FUT8 変異体では、カイコ酵素と同様に共有結合によるホモ二量体を形成することが明らかになり、ヒト FUT8 のステム領域が分子間で隣接していることが示された。

ヒト FUT8 の構造データ(PDB ID: 2DE0)を用いた分子モデリングでは、N末端側の α -helical ドメインが four-helix bundle 様の結合を介して2量体を形成すること、C末端側の SH3 ドメインがパートナー分子の α -helical ドメインに隣接して位置している予測結果が得られた(図2-1)。

図2-1. ヒト FUT8 の二量体形成.
(A) システイン導入変異体の S-S 結合を介した二量体形成. (B)(C) 分子モデリングによるヒト FUT8 の二量体構造.

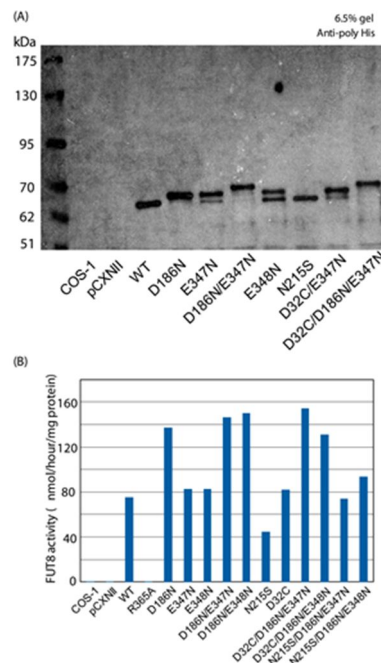
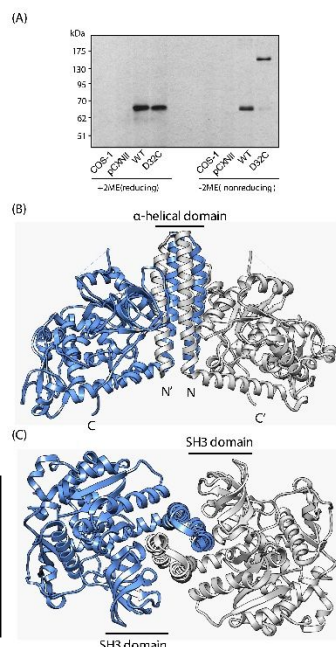


図1. 糖鎖付加 FUT8 変異体の COS-1 細胞での一過性発現.
(A) SDS-PAGE および Western blotting による変異体の発現量の検出.
(B) HPLC による変異体の FUT8 活性の測定結果.



多量体形成に関わるドメインの機能解析

の結果をもとに、 α -helical ドメインの欠損変異体をバキュロウイルス 昆虫細胞発現系を用いて作製した。粗精製を行い調製した α -helical ドメインの欠損変異体の酵素活性を測定したところ、FUT8 活性が消失することが明らかになった。

次にヒト FUT8 の SH3 ドメインの点変異体を作るにあたって、変異導入残基を決定するためにニワトリの c-Src (PDB ID: 1QWE) と構造比較を行った。c-Src のリガンドとの結合に関わる残基と等価のヒト FUT8 のアミノ酸残基を変異導入残基とし変異体を作製し COS-1 細胞で一過性に発現させたところ、ヒト FUT8 の His-513, Asp-537, Tyr-539, Pro-554, Tyr-556, Lys-557 の変異体では発現には影響が見られなかったが FUT8 酵素活性が著しく減少することが明らかになった (図 2-2)。

更に α -helical ドメインと SH3 ドメインに人為的にシステイン残基を導入した変異体 (α -helical ドメイン; E125C, S132C, SH3 ドメイン; Y556C, D537C) を用いて細胞内での S-S 結合導入変異体による架橋実験を行ったところ、 α -helical ドメインと SH3 ドメインの分子間での S-S 結合形成が確認できヒト FUT8 の二量体における α -helical ドメインと SH3 ドメインの空間配置が細胞内においても分子モデリングの結果と一致することが明らかになった (図 2-3)。

この結果より、ヒト FUT8 の α -helical ドメインと SH3 ドメインが酵素活性に必須であり、細胞内で分子間で隣接して配置されていることが明らかになった。これらの結果は、FUT8 がアクティブな酵素として働くにはホモ二量体形成が必要であり、その形成には α -helical ドメインや SH3 ドメインといった触媒ドメインに付随したドメイン構造が重要な役割を担っていることを示唆していると考えられる。これらの研究成果は、 α -helical ドメインや SH3 ドメインを標的にした高活性な FUT8 変異体を作製できる可能性が考えられ、今後 (1) の N 型糖鎖付加変異体と合わせることでより高効率でコアフコース付加が可能となる FUT8 変異体の作製が期待できる。

[Reference]

[1] Hideyuki Ihara, Takahiro Okada, Naoyuki Taniguchi, Yoshitaka Ikeda, Involvement of the α -helical and Src homology 3 domains in the molecular assembly and enzymatic activity of human 1,6-fucosyltransferase, FUT8, Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1864 (2020) 129596.

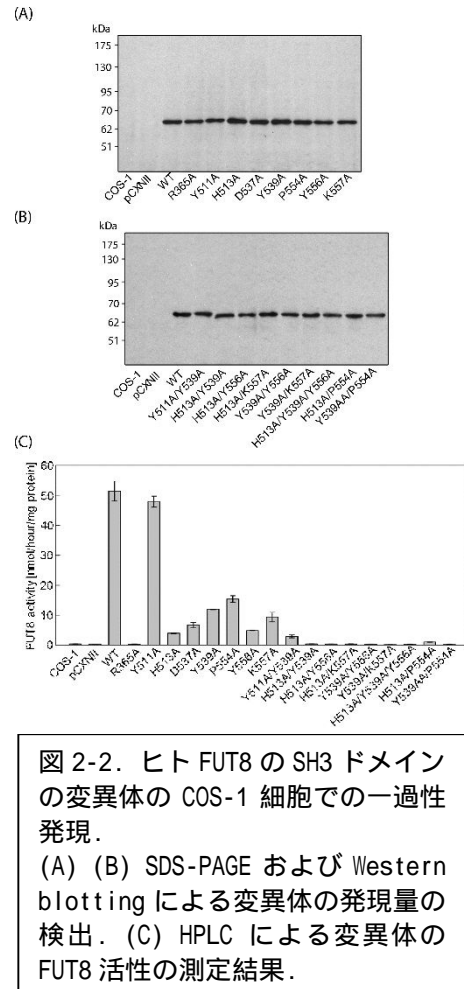


図 2-2. ヒト FUT8 の SH3 ドメインの変異体の COS-1 細胞で一過性発現. (A) (B) SDS-PAGE および Western blotting による変異体の発現量の検出. (C) HPLC による変異体の FUT8 活性の測定結果.

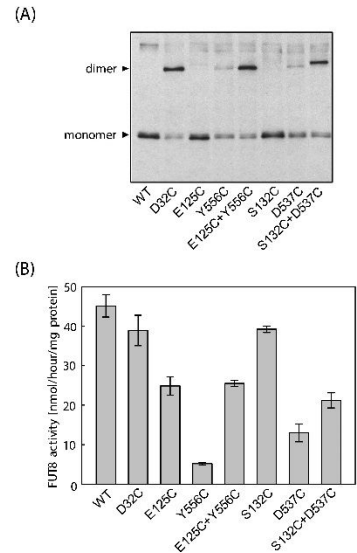


図 2-3. ヒト FUT8 のシステイン導入変異体の COS-1 細胞で一過性発現. (A) SDS-PAGE および Western blotting による S-S 結合を介した二量体の検出. (B) HPLC による変異体の FUT8 活性の測定結果.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ihara Hideyuki, Okada Takahiro, Taniguchi Naoyuki, Ikeda Yoshitaka	4. 巻 1864
2. 論文標題 Involvement of the α -helical and Src homology 3 domains in the molecular assembly and enzymatic activity of human 1,6-fucosyltransferase, FUT8	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 129596 ~ 129596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2020.129596	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井原秀之、岡田貴裕、谷口直之、池田義孝
2. 発表標題 ヒト 1,6-フコース転移酵素の高次構造形成に関わるドメインの機能解析
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井原秀之、岡田貴裕、池田義孝
2. 発表標題 糖鎖付加型 1,6-フコース転移酵素（FUT8）変異体の分泌型酵素の調整およびその機能解析
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井原秀之、岡田貴裕、池田義孝
2. 発表標題 ヒト 1,6-フコース転移酵素（FUT8）の部位特異的変異導入による翻訳後修飾の改変
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）（第40回 日本分子生物学会年会、第90回 日本生化学会大会）
4. 発表年 2017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
連携研究者	池田 義孝 (Ikeda Yoshitaka) (60252657)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	