

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 3 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02397

研究課題名(和文)新規糖鎖標的プローブの創生による医療応用技術の開発

研究課題名(英文)Development of novel probes for a glycan for medicinal technology

研究代表者

山崎 和彦 (Yamasaki, Kazuhiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：00358243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：40アミノ酸の最小レクチンPhoSLに非天然型アミノ酸を含む様々な改変を導入し、医療応用に適する高機能型レクチンを創出することを目的とする。まず基盤となる糖鎖認識機構をX線結晶構造解析と分子動力学計算によって原子レベルで解明した。これに基づき、糖鎖結合の強化・変換を目指して改変体をデザインし、分子動力学計算による検討後に10種を合成した。意図した相互作用形成が確認されつつも結合力の強化には至らなかった。一方、コアフコース糖鎖が付加されている新型コロナウイルスのスパイクタンパク質との結合を調べたところ、糖鎖のみの場合よりも1000倍も強い結合が観察され、特異的阻害剤としての可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は、がんなど細胞の状態によって変化するため、バイオマーカーとなる。したがって、それを認識するレクチンは診断や治療へ応用できる可能性を有する。本研究は化学合成が可能な小型レクチンPhoSLを題材に、非天然のアミノ酸を含む改変を立体構造情報に基づいて行うことを通して、医療応用への道筋を模索する意義を有する。コアフコース糖鎖が付加されることが知られている新型コロナウイルスのスパイクタンパク質との強固な結合を観察したことは、治療薬あるいは診断薬としての開発の可能性を示せたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims at developing engineered lectins suitable for pharmaceutical applications via mutations of the 40-amino-acid minimal lectin PhoSL, which is specific to core fucosylation, by unnatural amino acids. At first, we revealed the glycan-binding mechanism of PhoSL by X-ray crystallography and molecular dynamics simulation at the atomic level. Based on the result, we designed and synthesized 10 mutants in order to enhance/alter the glycan-binding affinity. We could not obtain affinity-enhanced mutants even though some showed the intended intermolecular contact. On the other hand, we observed binding of PhoSL with Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike protein, which was known to contain core-fucosylated glycans, at approximately 1000-times stronger affinity than with isolated glycans. This suggests a possibility of PhoSL as a specific inhibitor or a diagnostic agent for such diseases.

研究分野：構造生物学

キーワード：レクチン 糖鎖認識 タンパク質認識 立体構造 変異導入 非天然アミノ酸 化学合成

1. 研究開始当初の背景

スギタケレクチン (*Pholiota squarrosa* lectin: PhoSL) は、糖タンパク質におけるN結合型糖鎖の中で、最も根元にあるNアセチルグルコサミン(GlcNAc)にフコース(Fuc)が付加された「コアフコース」構造を特異的に認識する(文献1; 図1A)。体内の細胞は、がん化を始め、その状態に応じて、細胞表面や分泌タンパク質の糖鎖構造を変化させるため、糖鎖は病態のバイオマーカーとなる。例えば、肝臓がんのマーカーとして用いられる α -fetoprotein (AFP)の糖鎖には多様性があるが、コアフコース構造を含むものは、がん化した場合のみに見られることが知られている(文献2)。PhoSLのコアフコースに対する特異性は既存のレクチンに比較して極めて高く、前立腺癌や膵臓癌および関連病態の病理診断に用いられて始めていた(文献3-6)が、一方で、治療薬としての開発については、進んではいなかった。

開始当初、私たちは、スギタケレクチン (*Pholiota squarrosa* lectin: PhoSL) の三量体の新規立体構造をNMR分光法によって初めて決定し(文献7)、コアフコース糖鎖の認識機構の詳細を解明するためにX線結晶解析を進めつつあった。このFucとGlcNAcとの結合様式(α 1-6結合; α フコースの1位の炭素がGlcNAcの6位の酸素に結合する)が特殊であることから、それを認識するものと考え、PhoSLとFuc(α 1-6)GlcNAcの2糖の複合体の立体構造決定をX線結晶解析法によって行い、成功していた(図1B)。しかし、それだけで十分に他の結合様式(α 1-2結合、 α 1-3結合、 α 1-4結合)を排除できるか、検討の余地を残していた。

2. 研究の目的

PhoSLの最大の特徴は40アミノ酸と極めて小さく、化学合成が可能である。したがって、非天然アミノ酸を含む改変が容易であり、これを題材に高機能化を行う場合の化学的自由度が極めて大きい。本研究は、PhoSLに非天然型アミノ酸を含む様々な改変を導入し、医療応

用に適する高機能型レクチンを創出することを最終的な目的とする。医療応用を行うためには、体内に種々存在する糖鎖と峻別することが必須である。コアフコース(あるいは α 1-6結合型フコースを有する)糖鎖以外には結合しないこと、さらには特定の糖タンパク質以外には結合しないこと、などの性質が重要かつ望ましい。変異導入によって、コアフコース特異的な結合を強化することや、特定の糖タンパク質のアミノ酸部分も認識できるようにできると理想的である。逆に、他の糖鎖種の認識能を付与することも応用範囲を広げる上では意味がある。

このように、本研究では、1) コアフコース認識の強化、2) 糖鎖認識の変換、3) タンパク質部分の認識(エピトープ広範囲化)を目論み、改変を行う。そのためには付加的な相互作用(水素結合や疎水性相互作用)が目的にあった形で生じるように改変体をデザインす

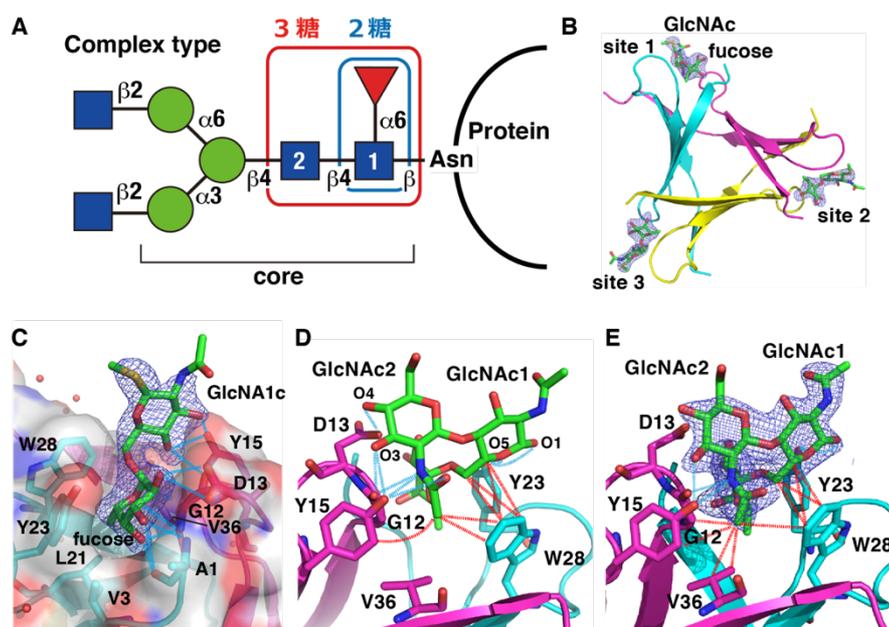


図1: PhoSLによるコアフコース糖鎖の認識機構 A: N型糖鎖におけるコアフコース化。赤三角、青四角、緑丸はそれぞれフコース、GlcNAc、マンノース。B: X線結晶解析による PhoSL 三量体とフコース-GlcNAc2 糖の複合体立体構造。C: 2糖認識機構の詳細 (Bにおける site 1)。D: 分子動力学計算による3糖の認識機構 (図1Cとは逆のGlcNAc2が手前に来る方向から見て)。E: X線結晶解析による3糖の認識機構

る必要があり、まずは、その基盤としてコアフコースの特異的認識機構を原子レベルで解明しなければならない。

3. 研究の方法

(1) コアフコース特異的認識機構の解明

分子動力学計算およびX線結晶解析により、コアフコース特異的な認識機構について解析を進めた。AMBERによる分子動力学計算においては、PhoSL/Fuc(α 1-6)GlcNAc (2糖)複合体の立体構造のGlcNAcにさらにGlcNAcを追加してFuc(α 1-6)[GlcNAc(β 1-4)]GlcNAcの3糖の形にしてシミュレーションを行い、安定なコンフォメーションを探索した。さらに、他の結合様式(α 1-2結合、 α 1-3結合、 α 1-4結合)を排除する仕組みについて、これらも標準的な3糖(それぞれ、H-type 1型: fucose(α 1-2)galactose(β 1-3)GlcNAc、Le^x型: fucose(α 1-3)[galactose(β 1-4)]GlcNAc、Le^a型: fucose(α 1-4)[galactose(β 1-3)]GlcNAc)について、上記2糖複合体構造をベースに検討を行った。

X線結晶解析においては、Fuc(α 1-6)[GlcNAc(β 1-4)]GlcNAcをPhoSL単体の結晶に対して浸透させる方法と、複合体を形成させてから結晶条件を検討する2つの方法で結晶作成を試みた。

(2) 改変体のデザインと合成、結晶解析

原子レベルで解明した認識機構に基づき、PhoSLと糖鎖の間の相互作用(水素結合および疎水性相互作用)が増強されることを目論んで非天然アミノ酸を含む変異体のデザインを行った。AMBERによる分子動力学計算を行い、意図した相互作用が安定的に形成されることを確認した後、Fmoc固相法によって化学合成を行った。非天然アミノ酸はFmoc体が市販のものを優先的に用いた。必要に応じてアミノ酸付加の各段階での収率を確認し、条件検討をしながら進めた。Frontal Affinity Chromatography (FAC)、糖鎖アレイ、および表面プラズモン共鳴(SPR)によって、糖鎖認識特異性と結合強度について解析した。さらに、単体および糖鎖との複合体について、結晶化を試みた。

表1: 合成に成功した改変体のリスト

改変名	配列	非天然アミノ酸種と期待する効果
Y15-3HyY	APV PVT KLV CDGDT [3HyY] KCTAY-LDY GDG KWVA QWDTAVFH TT	3HyY: 3-hydroxytyrosine、水素結合の強化
Y15-PCF	APV PVT KLV CDGDT [PCF] KCTAY-LDY GDG KWVA QWDTAVFH TT	PCF: <i>p</i> -carboxyphenylalanine、水素結合の強化
Y23-3HyY	APV PVT KLV CDGDTY KCTAY-LD [3HyY] GDG KWVA QWDTAVFH TT	3HyY: 3-hydroxytyrosine、水素結合の強化
Y23-PCF	APV PVT KLV CDGDTY KCTAY-LD [PCF] GDG KWVA QWDTAVFH TT	PCF: <i>p</i> -carboxyphenylalanine、水素結合の強化
Y23-PyA	APV PVT KLV CDGDTY KCTAY-LD [PyA] GDG KWVA QWDTAVFH TT	PyA: pyrenealanine、疎水性相互作用の強化
W28-5MeW	APV PVT KLV CDGDTY KCTAY-LDY GDG K [5MeW] VA QWDTAVFH TT	5MeW: 5-methyltryptophan、疎水性相互作用の強化
W28-6MeW	APV PVT KLV CDGDTY KCTAY-LDY GDG K [6MeW] VA QWDTAVFH TT	6MeW: 6-methyltryptophan、疎水性相互作用の強化
W28-PyA	APV PVT KLV CDGDTY KCTAY-LDY GDG K [PyA] VA QWDTAVFH TT	PyA: pyrenealanine、疎水性相互作用の強化
W28T/V36Tle	APV PVT KLV CDGDTY KCTAY-LDY GDG KTVA QWDTA [Tle] FH TT	Tle: tertleucine、糖結合ポケットのうちGlcNAc2接触部分の底あげ、コアフコース特異性の低減化
F37DLy	APV PVT KLV CDGDTY KCTAY-LDY GDG KWVA QWDTAV [Dly] H TT	Dly: D-lysine、糖結合ポケットの壁形成と水素結合強化
参考: 野生型	APV PVT KLV CDGDTY KCTAY-LDY GDG KWVA QWDTAVFH TT	

(3) タンパク質部分の認識の可能性の検討

コアフコースが付加されることが知られている新型コロナウイルスのスパイクタンパク質について表面プラズモン共鳴法によって結合強度の解析を行った。さらに、分子動力学計

算によって、複合体モデルを構築し、タンパク質部分との相互作用を解析した。

4. 研究成果

(1) コアフコース特異的認識機構の解明

PhoSL/Fuc(α 1-6)GlcNAc (2糖; 図1A) 複合体の結晶解析による立体構造 (図1B, C) を用い、さらにGlcNAcを追加してFuc(α 1-6)[GlcNAc(β 1-4)]GlcNAc(3糖; 図1A) の形にして分子動力学シミュレーションの計算を行った。単糖間の二面角の推移を解析したところ、2つのGlcNAcの間で大きな転移を起こすことが観察された。その結果、付与した (より外側の) GlcNAc (GlcNAc2; 図1A) のNアセチル基が糖結合ポケットの内側に入って、水素結合および疎水性相互作用を形成することがわかった (図1D)。なお、糖のみでのシミュレーションも並行して行って安定的に存在するコンフォメーションを同定したところ、PhoSLに結合している場合でも糖そのものが有する安定コンフォメーションを保持していることが判明した。

このことから、他の結合様式 (α 1-2結合、 α 1-3結合、 α 1-4結合) の糖鎖においても、それらが有する安定コンフォメーションで結合が可能であるかモデルを置いて解析したところ、その場合はいずれも糖鎖もPhoSLの糖結合ポケットを形成するアミノ酸残基と立体障害を生じてしまうことがわかった。特にTrp28が極めて高頻度にクラッシュすることがわかり、他の結合様式を排除する上で決定的な役割を有することがわかった。

X線結晶解析においては、PhoSL単体の結晶にFuc(α 1-6)[GlcNAc(β 1-4)]GlcNAcの3糖を浸透させる方法を進めたが、決定した立体構造において糖に相当する電子密度を観察することができなかった。

一方、この糖鎖とPhoSLをあらかじめ複合体にしてから結晶作成を行ったところ、結晶化に成功し、糖が存在する立体構造を決定できた。観察された糖のコンフォメーションは、上述の分子動力学計算によって得られたものと全く同じであり、PhoSLがその糖結合ポケットにおいてコアフコース糖鎖の3糖部分を結合して認識することがわかった (図1E)。特に、フコースと外側のGlcNAcがポケット内に入り、水素結合や疎水性相互作用によって認識されている。

(2) 変体のデザインと合成、結晶解析

上記の相互作用機構に基づき、まずは相互作用の強化を目指した変体をデザインし、分子動力学計算によって安定性が確認されたものについて化学合成を行った。特に非天然アミノ酸を導入したものは、その性質によって合成効率が悪くなることも多く、さらに、合成できてもカラムから溶

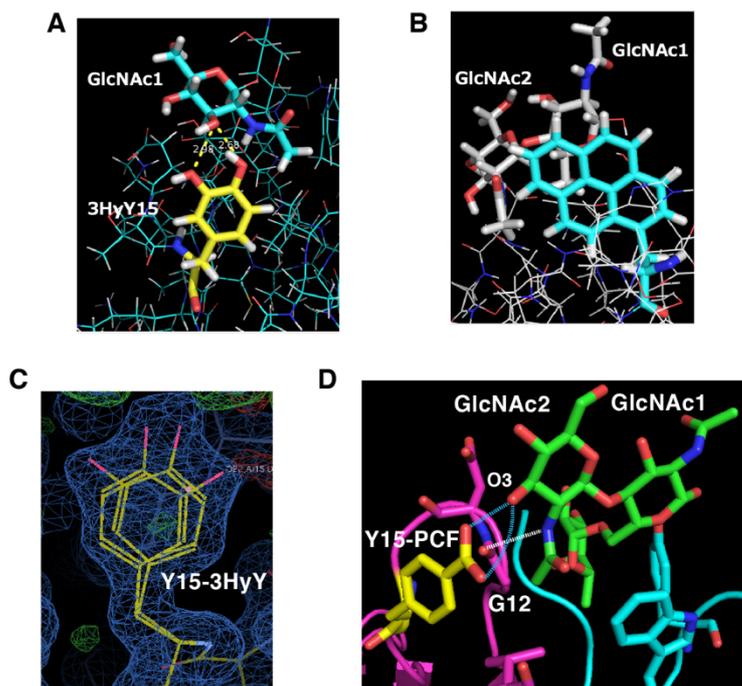


図2: PhoSL に対する非天然アミノ酸の導入 A:3-hydroxyTyr の導入による水素結合強化のデザイン。B:pyreneAla の導入による疎水性相互作用強化のデザイン。C:Tyr15 に 3-hydroxyTyr 導入した変体の X 線結晶解析。芳香環の向きは不定。D:Y15 に *p*-carboxyPhe (PCF) を導入した PhoSL とコアフコース 3 糖の複合体の X 線結晶解析による立体構造。青線は水素結合、白線は野生型ではある (図 1E) が変体で消失した水素結合を示す。PCF の carboxyl 基およびベンゼン環がなす平面に GlcNAc2 の O3 が入る結果、GlcNAc の acetyl 基がポケットから浮いて G12 との水素結合が切れている。

出しないなどの問題を多く生じた。合成・単離が成功した改変体のリストを表1に示す。これらは、水素結合を増強するもの(図2A)、疎水性相互作用を増強するもの(図2B)などである。水素結合の増強においては、アクセプターの原子が負に帯電することで強度が増強される現象(Charge-assisted hydrogen bond, 文献8)を考慮した。一部について、結晶解析を行い、非天然アミノ酸の導入を確認した(図2C)。FAC、糖鎖アレイ、およびSPRによって、糖鎖種に対する特異性および親和性の解析を行った。これらのほとんどは野生型と同じくコアフコースに対する特異性を維持していることが確認できたが、親和性として野生型を上回るものは、残念ながら現れなかった。ある改変体についてコアフコース3糖との複合体の結晶構造解析を行ったところ、想定した相互作用は観察されている一方で、それによって野生型で見られた水素結合が逆に切れてしまう状況が観察された(図2D)。一方、糖鎖ポケットを形成するアミノ酸残基の置換によるコアフコース認識力の低下を意図した改変体(W28T/V36Tle, 表1)については、目論見通りとなった。これについてコアフコース以外の糖鎖(3糖)との複合体の結晶ができれば、さらなる改変によってそれらに対する結合力の強化を目論む改変を重ねて行う予定であったが、結晶の生成には至らなかった。

しかし、本研究はPhoSLに様々な非天然のアミノ酸を取り入れることには成功しており、今後、様々な応用の可能性があることを示している。特に、下記に述べるタンパク質部分の認識については、野生型が最も強いという可能性は逆に低いと考えており、非天然アミノ酸を含む強化の余地は十分にある。

(3) タンパク質部分の認識の可能性の検討

表面プラズモン共鳴法によってPhoSLと新型コロナウイルスのスパイクタンパク質の結合を観察したところ、nMレベルの非常に強い結合が見られた(図3A; 文献9)。これは、PhoSLと糖鎖の相互作用が μM レベルの強度(文献1)であることに比べ、実に1000倍程度の増強となっている。理由としては、PhoSLが糖鎖の一番根元に結合することで、土台となるタンパク質部分にも接触していることが考えられる。実際、分子動力学計算を行ったところ、PhoSLとタンパク質の間に水素結合や多くの疎水性相互作用が観察された(図3B)。したがって、相互作用をさらに強化することで、強力かつ特異的な結合をもたらすことが期待できる。これらの結果は、PhoSLが新型コロナウイルス感染症に特異的な阻害剤あるいは診断薬として開発できる可能性を示している。

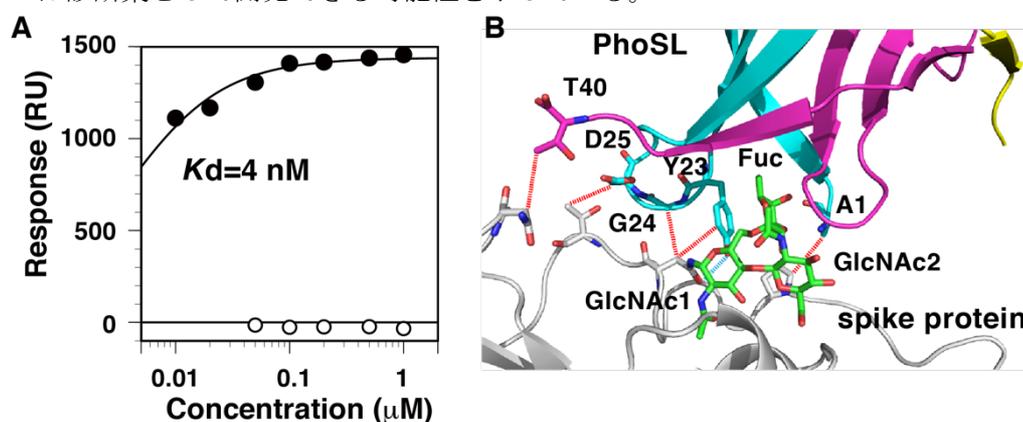


図3: PhoSLと新型コロナウイルスのスパイクのタンパク質の相互作用 A: 表面プラズモン共鳴による相互作用解析。黒は野生型、白は糖鎖ポケットにおける改変体(W28T/V36Tle)を示す。B: 分子動力学計算による複合体モデル。PhoSLはスパイクタンパク質のアミノ酸と強固に相互作用していることがわかる。青線は水素結合、赤線は疎水性相互作用を示す。

<引用文献> 1) Kobayashi *et al.*, 2012, *J. Biol. Chem.* 287, 33973. 2) Aoyagi *et al.*, 1991, *Cancer* 67, 2390. 3) Shimomura *et al.*, 2015, *Clin. Chim. Acta.* 446, 30. 4) Fujita *et al.*, 2016, *Oncotarget* 7, 56643. 5) Llop *et al.*, 2016, *Theranostics* 6, 1190. 6) Ueda *et al.*, 2016, *Pancreatolgy* 16, 238. 7) Yamasaki *et al.*, 2018, *Sci. Rep.* 8, 7740. 8) Gilli & Gilli, 2000, *J Mol Struct.* 552, 1. 9) Yamasaki *et al.*, 2023, *FEBS J.* 290, 412.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kazuhiko Yamasaki, Tomomi Kubota, Tomoko Yamasaki, Izuru Nagashima, Hiroki Shimizu, Ryu-Ichiro Terada, Hiroshi Nishigami, Jiyoung Kang, Masaru Tateno, Hiroaki Tateno	4. 巻 29
2. 論文標題 Structural Basis for Specific Recognition of Core Fucosylation in N-glycans by Pholiota Squarrosa Lectin (PhoSL)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 576-587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwz025	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 Yamasaki Kazuhiko, Adachi Naruhiko, Ngwe Tun Mya Myat, Ikeda Akihito, Moriya Toshio, Kawasaki Masato, Yamasaki Tomoko, Kubota Tomomi, Nagashima Izuru, Shimizu Hiroki, Tateno Hiroaki, Morita Kouichi	4. 巻 290
2. 論文標題 Core fucose-specific Pholiota squarrosa lectin (PhoSL) as a potent broad-spectrum inhibitor of SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 412-427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16599	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 山崎和彦
2. 発表標題 コアフコース結合レクチンPhoSLによる特異的認識機構の構造基盤
3. 学会等名 日本生化学会年会（シンポジウム）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎和彦、山崎智子、館野浩章
2. 発表標題 NMR分光法によるコアフコース認識レクチンPhoSLの三量体溶液構造とフコース認識機構
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎和彦、久保田智巳、清水弘樹、館野浩章
2. 発表標題 NMR分光法、X線結晶解析、分子動力学計算によるレクチンPhoSLのコアフコース認識機構の解明
3. 学会等名 第20回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 スギタケレクチン及び/又はその変異ペプチドを含むウイルス感染症の治療用又は診断用 医薬組成物	発明者 山崎和彦、館野浩章、清水弘樹、森田公一、Ngwe Tun, MM	権利者 産業技術総合研究所、長崎大学
産業財産権の種類、番号 特許、2022-052125	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	清水 弘樹 (Shimizu Hiroki) (30344716)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	館野 浩章 (Tateno Hiroaki) (30450670)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 グループ長 (82626)	
研究分担者	久保田 智巳 (Kubota Tomomi) (90356923)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

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
---------	---------