

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15981

研究課題名(和文)糖鎖とタンパク質が織りなす抗体のアロステリックネットワークの探査

研究課題名(英文)Exploration of antibody allosteric networks of glycans and proteins

研究代表者

谷中 冴子 (Yanaka, Saeko)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教

研究者番号：80722777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗体は抗原認識を契機としてエフェクター機能を発動し、免疫システムにおいて異物の排除を司る糖タンパク質である。抗体に結合した糖鎖はエフェクター機能と密接に結びついており、その構造多様性は優に100通りを越える。抗体の糖鎖はタンパク質部分と渾然一体となった分子内ネットワークを形成しており、糖鎖構造の僅かな変化が分子内ネットワークに影響を与えることで予期せぬ遠位の部位に構造変化を引き起こし、エフェクター機能を変調するものと考えられる。本研究では、実験と理論の統合により、体分子内に張り巡らされた糖鎖とタンパク質が織りなす“アロステリックネットワーク”を探査し、その動態と機能の関連を浮き彫りにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖を含めた抗体の構造解析はいくつかの取り組みが報告されているが、それらは断片的な現象論的記述にとどまっており、分子の動的3次元構造の観点に立って、糖鎖構造のバリエーションと機能を結びつける系統的な研究は国内外を通じて行われていない。

本研究により、これまで各論的な経験に基づいて行われているバイオ医薬の糖鎖バリエーションの品質管理に科学的根拠がもたらされるとともに、次世代抗体医薬の創成に向けての体系的な設計指針を与えることが可能となるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Antibodies are glycoproteins that trigger effector functions upon antigen recognition and are responsible for the elimination of foreign substances in the immune system. Glycans attached to antibodies are closely linked to their effector functions, and there can be more than 100 different glycoforms. The glycans of antibodies form intramolecular networks that are integrated with the protein portion, and it is supposed that subtle changes in the glycan structure can affect the intramolecular network, causing structural changes at unexpected distal sites and modulating the effector functions. This study explored the "allosteric network" of glycans and proteins in the antibody molecule through the integration of experimental and theoretical approaches, highlighting the relationship between the dynamics and functions of the network.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：免疫グロブリンG Fc領域 糖鎖 MDシミュレーション 核磁気共鳴法 アロステリックネットワーク

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体は外来抗原の認識を契機として種々のエフェクター機能を発動し、異物の排除を司る糖タンパク質である。抗体の Fc 領域を構成する相同な 2 つの重鎖にはそれぞれに N 型糖鎖が結合しており、糖鎖はエフェクター機能と密接に結びついている (Fig.1)。免疫グロブリン G (IgG) の N 型糖鎖には中性糖鎖だけでも 16 種類のバリエーションがある。そのため、IgG 分子中での一対の糖鎖の組み合わせは実に 136 通りにも及ぶ。糖鎖がシリアル化される場合も考慮すれば、可能な組み合わせの総数はさらに莫大なものとなる。

一方、慢性関節リウマチなどの疾患においては、こうした糖鎖の多様性が消失し、特定のグリコフォームが異常に増大する。そのため、免疫システムの恒常性は抗体糖鎖の多様性と深く関わっているものと考えられてきた。

抗体が医薬品として実用化される今日においては、糖鎖が抗体の機能・安定性・体内寿命・免疫原性の決定因子であることから、抗体の糖鎖のバリエーションを正しく評価し、糖鎖を含めた構造の同一性を担保することが求められるようになってきている。しかしながら、そもそも抗体の糖鎖構造のバリエーションが存在することの生物学的意義はこれまで明らかとなっていない。本研究は分子の 3 次元構造ダイナミクスの観点からこの古くて新しい問題に挑むものである。

2. 研究の目的

抗体の分子構造については数多くの X 線結晶構造データが積み上げられており、これによって一対の糖鎖が Fc の分子内部に埋め込まれていることが明らかとなっている。しかしながら、本質的に柔軟な構造体である抗体分子を結晶中に置かれた静的構造に基づいて評価するには限界があり、グリコフォームに依存した立体構造を解明するのにこうしたアプローチは馴染まない。一方、核磁気共鳴 (NMR) を用いた研究により、グリコフォームの差異が糖鎖から遠位のアミノ酸残基にも影響が及ぶことが報告されている。しかしながら、糖鎖と遠位のアミノ酸残基がどのように遠位的に影響を及ぼし合うのか、という情報が欠落している。しかも、これまでの NMR 研究の対象は、一対の糖鎖が均一かつ対称な構造をもった抗体分子に限られている。アロステリックな効果を考える上で、抗体が本質的に柔軟な構造体であるという視点が極めて重要となる。抗体分子中では糖鎖とタンパク質が緊密に連携した分子内ネットワークが形成されており、こうしたネットワークを介して、糖鎖構造の僅かな変化が分子構造ダイナミクスに影響を与えることで予期せぬ部位に構造変化を引き起こし、エフェクター機能を変調するものと考えられる。

本研究は実験と理論の協奏を通じて抗体分子内に張り巡らされた糖鎖とタンパク質が織りなす“アロステリックネットワーク”を探索し、その動態と機能の関連を明らかにすることを目指すものである。

3. 研究の方法

本研究は、IgG の Fc 領域に結合している一対の N 型糖鎖に着目して、その構造バリエーションと分子構造ダイナミクス、ひいては機能との連関を予測する新規なアプローチ法を開発するものである。Fc の糖鎖構造の組み合わせは 100 種類を越えるが、本研究では、そのうちのメジャーな 4 種類の糖鎖からなる対称な構造の Fc を対象に、分子動力学 (MD) 計算により動的構造アンサンブルの情報を得た。これに対して、NMR 法と量子ビーム溶液散乱による実験検証を行い、計算プロトコルの妥当性を検証した。確立したプロトコルを用いて非対称な糖鎖構造を含む Fc に解析対象を拡張し、それらの動的 3 次元構造の情報を得ることに取り組んだ。得られた構造アンサンブルを用い、情報科学的手法を応用することで、アロステリックネットワークをあぶり出すことを試みた。そのための理論的アプローチ法の開発も進めた。以下にその成果を述べる。

4. 研究成果

本課題では、IgG の Fc 領域に結合している一対の N 型糖鎖に着目して、その構造バリエーションと分子構造ダイナミクス、ひいては機能との連関を予測するための新規なアプローチ法の開発に取り組んだ。

申請者のグループで決定した結晶構造を基に、グリコフォームを改変した一連の Fc を *in silico* でモデリングして MD 計算の初期構造として、水分子を露わに含んだ全原子計算をマイクロ秒スケール実施し、各グリコフォームについての動的構造アンサンブルを取得した。MD シ

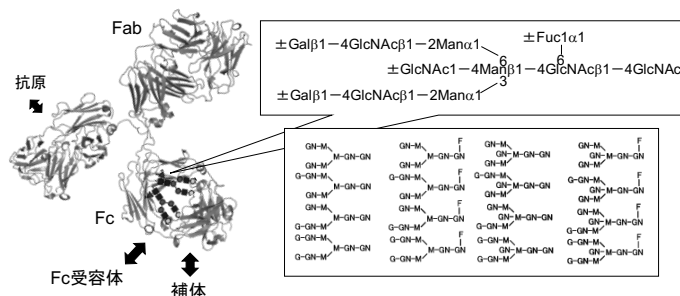


Fig.1 抗体のグリコフォームのバリエーション

IgG の Fc に存在する一対の糖鎖の構造は多様性に富んでおり、エフェクター分子との相互作用を変調するものと想定される。

ミュレーションの結果の妥当性を量子ビーム溶液散乱や NMR 法などの実験的手法により検証した。NMR 分光法を用いて実験的に検証するため、NMR 計測を行うのに十分な量の安定同位体標識試料を調製するための条件を確立した。すなわち、糖鎖構造が均一かつ対称な Fc を細胞工学手法と *in vitro* 酵素反応法によって調製するプロトコルを整えた。これにより、安定的に均一糖鎖構造を持つ Fc を大量調製することが可能となった。この方法を用いて均一な糖鎖構造を有するマウス Fc を作成し、良質な NMR スペクトルを得ることができた。得られた NMR スペクトルの解析を行い、タンパク質主鎖と糖鎖に由来するすべての NMR ピークを帰属することに成功した。NMR スペクトルの解析の結果、Fc の非還元末端のガラクトース残基を除去することで、Fc 分子内の糖鎖-タンパク質間の相互作用ネットワークが変動し、それに伴って Fc の四次構造も変化することが明らかとなった (Fig.2)。このような Fc の四次構造変化は、IgG とエフェクター分子との相互作用に影響を与えるものと考えられる。また、ヒト IgG の Fc のメジャーな 4 種類の対称なグリコフォームを対象に、タンパク質主鎖と糖鎖に由来するすべての NMR ピークを帰属することに成功し、得られた一連の Fc グリコフォームの NMR スペクトルデータに基づき、糖鎖構造の変動に伴う Fc の構造変化を定量化することができた。

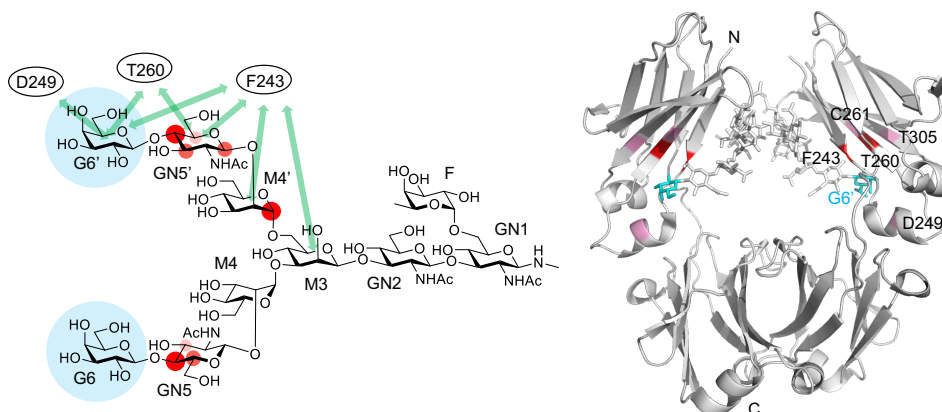


Fig.2 Fc 領域の糖鎖-タンパク質間ネットワーク

右 : Fc 糖鎖の還元末端ガラクトース除去に伴う糖鎖の NMR 信号変化をマッピングした。また、Fc の糖鎖とタンパク質相互作用ネットワークを図示した。左 : Fc 糖鎖の還元末端ガラクトース除去に伴うタンパク質の NMR 信号変化をマッピングした。

一方、MD 計算で得られた構造アンサンブルの中に隠された情報を読み解くための理論的アプローチ法の開発を進めた。糖鎖をモデル分子として、構造アンサンブルを包括的に取り扱うアプローチ法を確立した (Fig.3)。この方法を応用して、NMR データと MD シミュレーションの結果を統合し、Fc の分子構造中の糖鎖-タンパク質の相互作用ネットワークを明らかにする基盤を構築した。これにより、Fc のグリコフォームの改変の影響を分子内でアミノ酸残基に伝播するハブとなる糖残基の存在を突き止めることに成功した。その結果、Fc の糖鎖とアミノ酸残基の間に存在するアロステリックネットワークを浮き彫りとすることができた。

さらに、抗体とエフェクター分子との親和性を定量解析し、糖鎖の構造バリエーションが機能に及ぼす影響を明らかにした。水素-重水素交換質量分析法により、Fab 中に存在する Fcγ 受容体の相互作用部位が抗原認識に伴ってアロステリックに変化し、IgG の受容体親和性が向上することも明らかとなった。

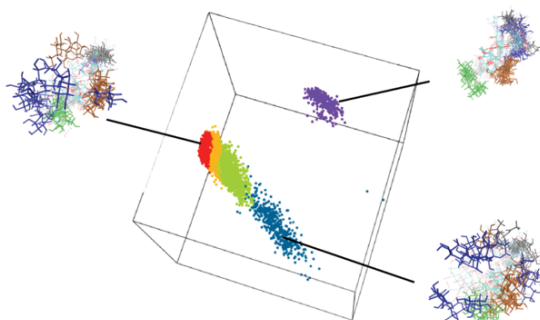


Fig.3 糖鎖の動的構造を解析する手法の開発

糖鎖の構造アンサンブルについて、包括的な特性評価を行うために、カーネル法とコンフォメーション自由エネルギーランドスケープを関連付けた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Yuki, Wakaizumi Natsumi, Irisa Mine, Maruno Takahiro, Shimada Mari, Shintani Koya, Nishiumi Haruka, Yogo Rina, Yanaka Saeko, Higo Daisuke, Torisu Tetsuo, Kato Koichi, Uchiyama Susumu | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 The Fab portion of immunoglobulin G has sites in the CL domain that interact with Fc gamma receptor IIIa | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 mAbs | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19420862.2022.2038531 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yanaka Saeko, Nishiguchi Shigetaka, Yogo Rina, Watanabe Hiroki, Shen Jiana, Yagi Hirokazu, Uchihashi Takayuki, Kato Koichi | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Quantitative Visualization of the Interaction between Complement Component C1 and Immunoglobulin G: The Effect of CH1 Domain Deletion | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 2090 ~ 2090 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042090 | 査読の有無 無 |
| 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 Yanaka Saeko, Yagi Hirokazu, Yogo Rina, Onitsuka Masayoshi, Kato Koichi | 4. 巻 76 |
| 2. 論文標題 Glutamine-free mammalian expression of recombinant glycoproteins with uniform isotope labeling: an application for NMR analysis of pharmaceutically relevant Fc glycoforms of human immunoglobulin G1 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biomolecular NMR | 6. 最初と最後の頁 17 ~ 22 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10858-021-00387-5 | 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 Watanabe Tokio, Yagi Hirokazu, Yanaka Saeko, Yamaguchi Takumi, Kato Koichi | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Comprehensive characterization of oligosaccharide conformational ensembles with conformer classification by free-energy landscape via reproductive kernel Hilbert space | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics | 6. 最初と最後の頁 9753 ~ 9760 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CP06448C | 査読の有無 無 |
| 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 Yanaka Saeko, Yamaguchi Yoshiki, Takizawa Takeshi, Miyanoiri Yohei, Yogo Rina, Shimada Ichio, Kato Koichi | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 NMR assignments of the N-glycans of the Fc fragment of mouse immunoglobulin G2b glycoprotein | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biomolecular NMR Assignments | 6. 最初と最後の頁 187 ~ 192 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12104-020-10004-5 | 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 Sato Nobuhiro, Yogo Rina, Yanaka Saeko, Martel Anne, Porcar Lionel, Morishima Ken, Inoue Rintaro, Tominaga Taiki, Arimori Takao, Takagi Junichi, Sugiyama Masaaki, Kato Koichi | 4. 巻 0 |
| 2. 論文標題 A feasibility study of inverse contrast-matching small-angle neutron scattering method combined with size exclusion chromatography using antibody interactions as model systems | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 1-8 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab012 | 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 Yagi Hirokazu, Yanaka Saeko, Yogo Rina, Ikeda Akari, Onitsuka Masayoshi, Yamazaki Toshio, Kato Tatsuya, Park Enoch Y., Yokoyama Jun, Kato Koichi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Silkworm Pupae Function as Efficient Producers of Recombinant Glycoproteins with Stable-Isotope Labeling | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biomolecules | 6. 最初と最後の頁 1482 ~ 1482 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10111482 | 査読の有無 無 |
| 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 Yanaka Saeko, Yogo Rina, Kato Koichi | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Biophysical characterization of dynamic structures of immunoglobulin G | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biophysical Reviews | 6. 最初と最後の頁 637 ~ 645 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00698-1 | 査読の有無 無 |
| 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 谷中冴子、加藤晃一 | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 複雑な糖鎖のコンフォメーション空間の探査と改変 計算と実験の統合によるアプローチ | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 化学 | 6. 最初と最後の頁 30-71 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Saeko Yanaka |
| 2. 発表標題 Stable isotope-assisted NMR analysis of dynamics and interactions of the Fc region of immunoglobulin G as glycoprotein |
| 3. 学会等名 ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST2021 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 谷中冴子 |
| 2. 発表標題 抗体の3次元構造と相互作用のダイナミクスをみる |
| 3. 学会等名 PFF2020/2021 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 谷中冴子 |
| 2. 発表標題 抗体の安定同位体標識によるNMRを用いた3次元構造と相互作用の解析 |
| 3. 学会等名 第21回若手NMR研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 沈佳娜, 谷中冴子, 西口茂孝, 内橋貴之, 加藤晃一 |
| 2. 発表標題 抗体分子に隠された補体第一成分の相互作用部位の探査 |
| 3. 学会等名 令和3年度 生物物理学会中部支部講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 谷中冴子 |
| 2. 発表標題 抗体の3次元構造と相互作用のダイナミクスを解明する方法の 開発と抗体の高機能化への展開 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 谷中冴子, 與語理那, 矢木宏和, 加藤晃一 |
| 2. 発表標題 Impacts of the N-glycan variation of antibodies on their dynamic structures of functional relevance |
| 3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 與語理那, 谷中冴子, 矢木宏和, 加藤晃一 |
| 2. 発表標題 血清環境における抗体の分子間相互作用と機能の解明 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第141年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Hirokazu Yagi, Saeko Yanaka, Koichi Kato | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 Elsevier (Oxford) | 5. 総ページ数 - |
| 3. 書名 Comprehensive Glycoscience, 2nd edition (J. Barchi ed.) | |

〔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 | | |
|---------|------------------------|--|--|
| フランス | Institut Laue-Langevin | | |