

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249002

研究課題名(和文)糖鎖認識系を標的とする創薬を目指した複合糖質機能の構造基盤の解明と分子設計

研究課題名(英文)Elucidation of structural basis of glycoconjugate functions and its application for molecular design toward developing drugs targeting the carbohydrate recognition systems

研究代表者

加藤 晃一 (KATO, Koichi)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20211849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖鎖が担う生体機能の発現メカニズムを分子複合体の立体構造解析を通じて解明し、得られた構造情報をもとに糖鎖認識系を標的とする創薬の基盤構築を行った。特に、糖タンパク質の細胞内運命決定システムにおける選別的な輸送と分解の分子メカニズムを明らかにすることに成功している。さらには、免疫系糖タンパク質としての抗体について迅速な構造解析を実現するための技術基盤を確立した。これを応用することにより、様々な生産基材で作成した抗体の溶液中における高次構造情報を取得し、抗体医薬の開発に資する知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we have elucidated the glycan-mediated mechanisms of biological functions through structural analyses of molecular complexes and thereby provided the groundwork for developing drugs targeting the carbohydrate recognition systems. In particular, we have revealed molecular mechanisms underlying the selective trafficking and degradation in glycoprotein-fate determination in cells. Furthermore, we have established technical basis for structural analyses of antibodies and thereby obtained solution structure information of these glycoproteins produced in various production vehicles, providing valuable insights into development of antibody drugs.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 糖鎖認識 細胞内レクチン 免疫グロブリンG

## 1. 研究開始当初の背景

自然界に存在するタンパク質全種類の実に半数以上は糖鎖による修飾を受けているといわれている。糖鎖は、タンパク質の溶解性・安定性などの物理化学的性状を規定しているばかりでなく、タンパク質機能部位の立体構造構築に与り、またレクチンとの相互作用を通じて細胞内外におけるタンパク質の運命を決定している。さらに、細胞表面において糖鎖は、細胞間のコミュニケーションやウイルス感染を媒介しており、最近では糖鎖のクラスターが病原性タンパク質と特異的な相互作用を通じて、アルツハイマー病などの神経変性疾患を誘起し得ることが示されている。

したがって、生体内における糖鎖認識システムは様々な疾患を予防・治療するための創薬標的となり得る。実際、抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品の開発にあたって糖鎖修飾の影響を考慮することは最重要課題の一つとなっている。しかしながら、糖鎖の構造情報はゲノムに直接コードされておらず、その構造の複雑さ(分岐性、構造異性、柔軟性、微視的不均一性など)ゆえに生産制御および構造解析が難しく、とりわけ構造生物学的アプローチによる3次元構造解析が極めて困難であった。こうした状況に鑑みて、研究代表者らは過去十余年に余りにわたり、糖鎖のコンフォメーション・ダイナミクス・相互作用を原子レベルの分解能で解き明かすための体系的な方法論の構築に力を注いできた。

## 2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが築いてきた技術基盤と学術的成果を背景として、糖鎖が担う生体機能の発現メカニズムを分子複合体の立体構造解析を通して原子レベルで解明し、得られた立体構造情報をもとに、糖鎖認識系を標的とする創薬の基盤を構築することを目的とする。本研究では特に、(1) レクチ

ンによる糖タンパク質の細胞内選別輸送システム、および(2) 免疫系における糖タンパク質分子間相互作用システムにおける糖鎖認識系を対象として、それらの作動メカニズムの構造基盤を解明するための戦略的研究を展開した。

## 3. 研究の方法

これまでに研究代表者らが開発してきた、糖タンパク質を対象とした体系的な構造生物学的研究手法(高磁場 NMR 分光法および X 線結晶構造解析法)を縦横に活用し、(1) 血液凝固因子などの糖タンパク質の細胞内選別輸送にかかわるカーゴ受容体(細胞内レクチン ERGIC-53 とカルシウム結合タンパク質 MCFD2 の複合体)による分子認識、(2) 免疫グロブリン G (IgG) の Fc 領域と Fcγレセプターの複合体形成の構造基盤を原子分解能で解明した。さらに、糖鎖とタンパク質分子の3次元構造の変動を考慮した分子設計を目指し、糖鎖の動的3次元構造の情報取得に必要な手法の開発もあわせて行った。得られた3次元構造情報に基づき、分子間相互作用を最適化することを目指した分子設計を行い、立体構造解析支援のもと、アミノ酸配列および糖鎖構造を改変した分子の機能評価を分子・細胞レベルにおいて実施した。

## 4. 研究成果

### (1) レクチンによる糖タンパク質の細胞内選別輸送システム

小胞体-ゴルジ体間における糖タンパク質の輸送は、細胞内レクチン ERGIC-53 による糖鎖認識と、カルシウム結合タンパク質 MCFD2 によるポリペプチド鎖認識が協働することにより担われている。本研究では、血液凝固因子に対する積荷受容体の作動メカニズムを明らかにするために、主に ERGIC-53 による糖鎖認識の構造基盤を明らかにすることを目指した。これまでに我々は

フロントアルフィニティークロマトグラフィー解析を通じて、本レクチンの糖鎖結合特異性、すなわち高マンノース型糖鎖の  $\alpha$ 1-2 結合のマンノース 2 糖構造を認識することを明らかにしている。そこで、ERGIC-53、その補因子 MCFD2、 $\alpha$ 1-2 マンノトリオース 3 糖からなる 3 者複合体の結晶構造解析を行った。その結果、ERGIC-53 はわずか 1 残基のアミノ酸の違いを通じて、同一な糖鎖リガンドに対して 2 通りの異なった様式で相互作用し、幅広い糖鎖結合特異性を獲得していることが見出された (図 1) [Sato et al. (2014) PLoS ONE, 9, e87963, DOI: 10.1371/journal.pone.0087963]。

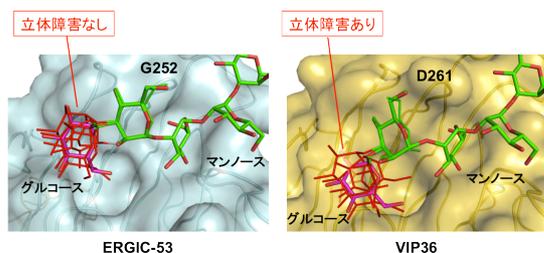


図 1: 積荷受容体 (輸送レクチン) ERGIC-53 (左) および VIP36 (右) のモノグルコシル化糖鎖との複合体モデル

一方で、血液凝固第 V・第 VIII 因子の細胞内輸送は、ERGIC-53 による糖鎖認識に加えて、MCFD2 によるポリペプチド鎖との相互作用を通じて行われると考えられている。そこで、MCFD2 との結合に関わる血液凝固第 V・第 VIII 因子のアミノ酸配列をバイオインフォマティクス解析によって探索したところ、両者に共通したペプチドモチーフが存在することがわかった。そこで、該当ペプチドと ERGIC53-MCFD2 複合体に関して、NMR やカロリメトリーによる物理化学的解析を実施し、基質認識の構造基盤に関する情報を収集することができた。

さらに、精密実験データに基づく分子シミュレーションを通じて、分泌経路においてタンパク質の品質を提示する役割を担う高マンノース型糖鎖が、特定の糖残基の除去に伴ってコンフォメーション空間を顕著に広げることを見出し、レクチンによる分子認識に際して多様な構造アンサンブルの中から特定のコンフォーマーが選ばれる様子を明らかにした (図 2) [Yamaguchi et al. (2014) J. Angew. Chem. Int. Ed. 53, 10941-10944, DOI: 10.1002/ange.201406145]。

ユレーションを通じて、分泌経路においてタンパク質の品質を提示する役割を担う高マンノース型糖鎖が、特定の糖残基の除去に伴ってコンフォメーション空間を顕著に広げることを見出し、レクチンによる分子認識に際して多様な構造アンサンブルの中から特定のコンフォーマーが選ばれる様子を明らかにした (図 2) [Yamaguchi et al. (2014) J. Angew. Chem. Int. Ed. 53, 10941-10944, DOI: 10.1002/ange.201406145]。

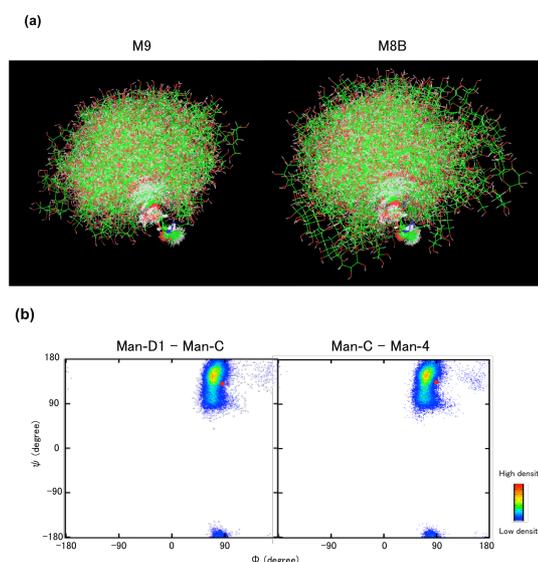


図 2: (a) NMR 解析と分子シミュレーションによって求めた高マンノース型糖鎖 M9 (左) および M8B (右) の立体構造の重ね合わせ。(b) M9 糖鎖の配座空間と、輸送レクチン VIP36 と結合した際のコンフォメーション。分子認識に関わるマンノース残基間の二面角で現した。

## (2) 免疫系における糖タンパク質分子間相互作用システム

IgG の Fc 領域と Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ RIII) の相互作用は両者の糖鎖構造に強く依存する。これまで我々は、本複合体の立体構造解析を行い、その糖タンパク質分子間相互作用の構造基盤を明らかにしてきた。そこで本研究では、この構造情報を基に高親和および低親和型

の糖タンパク質複合体の分子設計を行い、それら複合体の立体構造解析に成功した。

一方、ヒト IgG1 の Fc 領域について NMR シグナルの帰属を行った。通常 IgG-Fc のような巨大なタンパク質のスペクトル解析は困難であるが、多次元 NMR 解析とアミノ酸選択的標識法を駆使し、その帰属に成功した。これにより、溶液中における高次構造情報を容易に取得することを可能とした (図 3)[Yagi et al. (2015) Biomol. NMR Assign, in press, DOI: 10.1007/s12104-014-9586-7]。

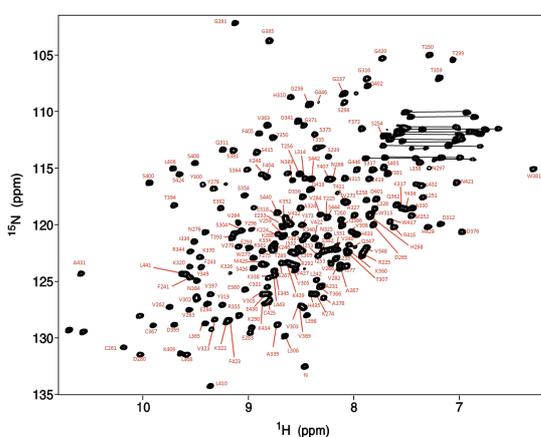


図 3: ヒト IgG1 の Fc 領域の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR シグナルの帰属

さらには、トランスジェニックタバコやカイコを用いて安定同位体標識を施した IgG を発現させる手法の開発に成功した。こうした異なる生産基材を用いて発現したタンパク質は、生産基材に依存した糖鎖が付加されることから、これらのリコンビナントタンパク質の構造が正しく保たれているかを評価する方法の樹立が強く望まれている。そこで、ヒト IgG-Fc の NMR 信号をプローブとして利用することで、得られた糖タンパク質の構造の違いを調べた。その結果、異なる生産基材を用いて調製した IgG は、糖鎖付近の立体構造に影響を受けるものの、それ以外のほとんどの部位について、構造のインテグリテ

ィが保たれていることを明らかにすることができた[Yagi et al. (2015) Plant Cell Rep, 34, 959-968, DOI:10.1007/s00299-015-1757-1 and Yagi et al. (2015) J. Biomol. NMR, in press, DOI: 10.1007/s10858-015-9930-y]。

これらの成果により、抗体医薬品開発における重要な知見を与えることができた。

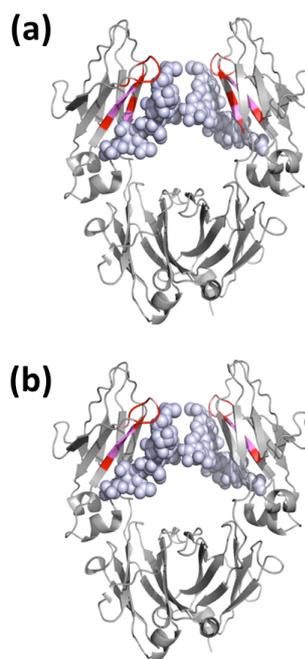


図 4: 動物細胞由来の抗体の NMR スペクトルとトランスジェニックタバコ (a) およびカイコ (b) を利用して産生した抗体の NMR スペクトルとを比較することで、生産基材の違いによって、抗体の高次構造に及ぼす影響を残基レベルで明らかにした (IgG-Fc 上に赤、ピンクでマッピングした)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

- ① [T.Yamaguchi](#) and [K.Kato](#), Paramagnetic NMR probes for characterization of the dynamic conformations and interactions of oligosaccharides, *Glycoconj. J.*, 査読有、2015、in press  
DOI: 10.1007/s10719-015-9599-1
- ② [H.Yagi](#), [Y.Zhang](#), [M.Yagi-Utsumi](#), [T.Yamaguchi](#), [S.Iida](#), [Y.Yamaguchi](#) and [K.Kato](#), Backbone  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  resonance assignments of the Fc fragment of

- human immunoglobulin G glycoprotein, *Biomol. NMR Assign.*, 査読有、2015、in press  
DOI:10.1007/s12104-014-9586-7
- ③ H.Yagi, (3人省略), T.Yamaguchi, (7人省略), K.Kato, Stable isotope labeling of glycoprotein expressed in silkworms using immunoglobulin G as a test molecule, *J. Biomol. NMR*, 62, 157-167, 2015  
DOI:10.1007/s10858-015-9930-y
- ④ H.Yagi, (4人省略), T.Yamaguchi, (5人省略), K.Kato, NMR-based structural validation of therapeutic antibody produced in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Cell Rep.* 34, 959-968, 査読有、2015  
DOI:10.1007/s00299-015-1757-1
- ⑤ T.Satoh, T.Yamaguchi, and K.Kato, Emerging structural insights into glycoprotein quality control coupled with *N*-glycan processing in the endoplasmic reticulum, *Molecules* 20, 2475-2491, 査読有、2014  
DOI:10.3390/molecules20022475
- ⑥ Y.Kamiya, T.Satoh, and K.Kato, Recent advances in glycoprotein production for structural biology: toward tailored design of glycoforms, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 26, 44-53, 査読有、2014  
DOI:10.1016/j.sbi.2014.03.008
- ⑦ T.Zhu, T.Satoh, and K.Kato, Structural insight into substrate recognition by the endoplasmic reticulum folding-sensor enzyme: crystal structure of third thioredoxin-like domain of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase, *Sci. Rep.* 4, Article number: 7322, 査読有、2014  
DOI:10.1038/srep07322
- ⑧ T.Yamaguchi, (4人省略), K.Kato, Exploration of conformational spaces of high-mannose-type oligosaccharides by an NMR-validated simulation, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 10941-10944, 査読有、2014  
DOI:10.1002/ange.201406145
- ⑨ N.Kawasaki, (5人省略), H.Yagi and K.Kato, Site-specific classification of N-linked oligosaccharides of the extracellular regions of Fc $\gamma$  receptor IIIb expressed in baby hamster kidney cells, *J. Glycomics Lipidomics* 4:116, 査読有、2014  
DOI:10.4172/2153-0637.1000116
- ⑩ S.Ninagawa, (3人省略), K.Kato, (5人省略), K.Mori, EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step, *J. Cell Biol.* 206, 347-356, 査読有、2014  
DOI:10.1083/jcb.201404075
- ⑪ T.Satoh, K.Suzuki, T.Yamaguchi, and K.Kato, Structural basis for disparate sugar-binding specificities in the homologous cargo receptors ERGIC-53 and VIP36, *PLoS ONE* 9, e87963, 査読有、2014  
DOI:10.1371/journal.pone.0087963
- ⑫ 矢木宏和、加藤晃一、IgG-Fc と Fc 受容体の複合体形成における糖鎖の役割、実験医学、査読有、31 巻、1602-1606、2013
- ⑬ Y.Kamiya, K.Yanagi, T.Kitajima, T.Yamaguchi, Y.Chiba, and K.Kato, Application of metabolic  $^{13}\text{C}$  labeling in conjunction with high-field nuclear magnetic resonance spectroscopy for comparative conformational analysis of high mannose-type oligosaccharides, *Biomolecules* 3, 108-123, 査読有、2013  
DOI:10.3390/biom3010108
- [学会発表] (計 102 件) うち招待講演 (51 件)
- ① Koichi Kato, Conformational dynamics and interactions of oligosaccharides and glycoconjugate, 第 4 回 よこはま NMR 研究会 (招待講演)、2015 年 2 月 4 日、理化学研究所・横浜研究所交流棟ホール (神奈川県横浜市)
- ② 加藤晃一、タンパク質機能の制御に関する N 型糖鎖構造の多様性と多型性、第 87 回 日本生化学会大会 (招待講演)、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)
- ③ 佐藤匡史、糖タンパク質品質管理システムにおける糖鎖修飾メカニズムの構造基盤、第 52 回 日本生物物理学会年会 (招待講演)、2014 年 9 月 26 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ④ Koichi Kato, NMR exploration of dynamic conformations and interactions of oligosaccharides and glycoconjugates, The "6th Iberoamerican NMR meeting // IV Iberian NMR meeting // VII Reunion Bienal del GERMN" (基調講演)、2014 年 9 月 24 日、Alcala de Henares (Spain)
- ⑤ 加藤晃一、バイオ医薬品の構造をみる、第 22 回 日本バイオイメージング学会学術集会 (招待講演)、2013 年 9 月 16 日、

- 東京大学薬学部講堂（東京都文京区）
- ⑥ 加藤晃一、立体構造からみた糖鎖の不均一性、第32回日本糖質学会年会（招待講演）、2013年8月7日、大阪国際交流センター（大阪府大阪市）
- ⑦ Koichi Kato、Structural glycobiology for biophysical decoding sweet messages、8<sup>th</sup> Asian Biophysics Association Symposium (ABA Jeju 2013)（招待講演）、2013年5月27日、Jeju (Korea)
- ⑧ Koichi Kato、Structural views of carbohydrate-protein interaction systems as potential therapeutic targets、Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013)（招待講演）、2013年01月24日、Chon Buri (Thailand)
- ⑨ 加藤晃一、複合糖質の立体構造・ダイナミクス・相互作用、第85回日本生化学会大会（招待講演）、2012年12月14日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

〔図書〕（計2件）

- ① Y.Zhang, T.Yamaguchi, T.Satoh, M.Yagi-Utsumi, Y.Kamiya, Y.Sakae, Y.Okamoto, and K.Kato, “Conformational dynamics of oligosaccharides characterized by paramagnetism-assisted NMR spectroscopy in conjunction with molecular dynamics simulation,” *Advances in Experimental Medicine and Biology* (A. Chakrabarti and A. Surolia ed.), Springer (Switzerland), **842**, pp217-230 (2015). DOI:10.1007/978-3-319-11280-0\_14
- ② Y.Yamaguchi, T.Yamaguchi, and K.Kato, “Structural analysis of oligosaccharides and glycoconjugates using NMR,” *Advances in Neurobiology* (R. K. Yu and C.-L. Schengrund ed.), Springer (New York), **9**, pp.165-183 (2014). DOI:10.1007/978-1-4939-1154-7\_8

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：未分化細胞のアポトーシス誘導剤  
 発明者：加藤晃一、矢木宏和、山口拓実、ヤンゲンエイ  
 権利者：公立大学法人名古屋市立大学、大学共同利用機関法人自然科学研究機構  
 種類：特許  
 番号：特許願第2015-102175  
 出願年月日：平成27年5月19日  
 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

[http://groups.ims.ac.jp/organization/kkato\\_g/](http://groups.ims.ac.jp/organization/kkato_g/)

プレスリリース

先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子の機能を解明

[https://www.ims.ac.jp/news/2013/11/21\\_1218.html](https://www.ims.ac.jp/news/2013/11/21_1218.html)

構造異常糖タンパク質の分解に必要な糖鎖刈り込み機構を解明

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2014/140902\\_1.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2014/140902_1.html)

水中で絶え間なく揺らいでいる糖鎖の立体構造を描き出す

[https://www.ims.ac.jp/news/2014/09/05\\_2994.html](https://www.ims.ac.jp/news/2014/09/05_2994.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

加藤 晃一 (KATO, Koichi)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20211849

### (2)研究分担者

山口 拓実 (YAMAGUCHI, Takumi)

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：60522430

矢木 宏和 (YAGI, Hirokazu)

名古屋市立大学・薬学研究科（研究院）・講師

研究者番号：70565423

佐藤 匡史 (SATO, Tadashi)

名古屋市立大学・薬学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80532100

### (3)連携研究者

矢木 真穂 (YAGI-UTSUMI, Maho)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任助教

研究者番号：40608999