

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06962

研究課題名(和文) Thermodynamic basis of life: protein-carbohydrate interaction

研究課題名(英文) Thermodynamic basis of life: protein-carbohydrate interaction

研究代表者

CAAVEIRO Jose (CAAVEIRO, Jose)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：00536732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、種々の生化学的な現象に関わる基本的観点から、熱力学および構造学的な炭水化物の相互作用の基盤を明確にすることである。糖を含む界面活性剤を用いて、可逆的かつ定量的な巻き戻しにより、膜貫通蛋白質を可溶化できることを世界で初めて原子レベルで実証した。脂質結合モジュールを用いて、膜孔形成毒素FraCへの炭水化物の結合を世界で初めて原子レベルで実証した。比較的特異性が低いHIV-1中和抗体による糖タンパク質エンベロープの認識機構を原子レベルで解明した。IgGのFc領域に結合した糖鎖末端のガラクトースは、IgGのエフェクター機能を調節することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We clarified the thermodynamic and structural basis of the interaction between proteins and carbohydrates from a fundamental point of view in several biologically relevant systems. Atomic-level demonstration, for the first time, of the full and reversible refolding of a transmembrane protein into a water-soluble form by employing sugar-containing detergents. Atomic-level demonstration, for the first time, of the binding of a carbohydrate to a pore-forming toxin (FraC) using its lipid binding module. Elucidation of the recognition mechanism of the glycoprotein Env of HIV-1 by a broadly-neutralizing anti-HIV-1 antibody at the atomic level. Demonstration that the terminal galactose of the glycan attached to the Fc region of IgG modulate the effector function of IgG. And explanation of the thermodynamic role of the glycan attached to residue Asn297 of the Fc region of IgG was revealed.

研究分野：Structural Biology

キーワード：Glycan Sugar Antibody Enzyme Pore-forming protein X-ray crystallography Thermodynamics Kinetics

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛋白質と炭水化物との相互作用は、生化学的に重要なプロセスの調節に関与する。糖鎖と蛋白質の親和性が非常に低いこと、多糖類の組成に多様性があることから、これまでは、この類いの相互作用の研究を遂行するのは困難であった。近年、鍵となる生物物理学的技術の分解能や感度が向上したことから、蛋白質と炭水化物との相互作用の新規な特徴を明らかにすることができつつある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、種々の生化学的な現象に関わる基本的観点から、熱力学的および構造学的な炭水化物の相互作用の基盤を明確にすることである。

3. 研究の方法

本研究では、糖が主要な役割を果たす3つの異なるモデルを用いた。すなわち、膜孔形成毒素(FraC)、いくつかの抗体、糖分解酵素である。これらの組み替え蛋白質は大腸菌、昆虫細胞、哺乳類細胞によって産生し、均質になるまで精製した。これらのモデル蛋白質と糖との相互作用の基本的性質は、X線結晶解析学、表面プラズモン共鳴、等温滴定型熱量測定などの高分解能技術によって解析した。さらに、これら相互作用の動力学、生化学的、機能的な評価には、MDシミュレーションを用いた。

4. 研究成果

-糖を含む界面活性剤を用いて、可逆的かつ定量的な巻き戻しにより、膜貫通蛋白質を可溶化できることを世界で初めて原子レベルで実証した(図1)。

-脂質結合モジュールを用いて、膜孔形成毒素FraCへの炭水化物の結合を世界で初めて原子レベルで実証した(図2)。

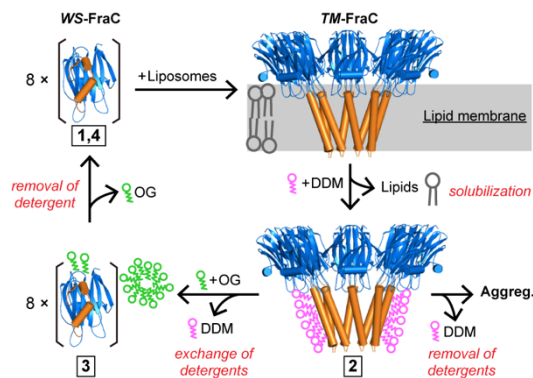


図1. FraCのトランスフォーメーション。

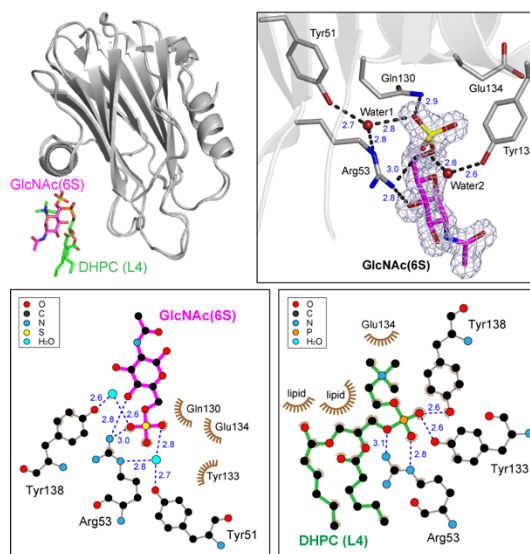


図2. 脂質ポケットに結合した糖。

-比較的特異性が低い HIV-1 中和抗体による糖タンパク質エンベロープの認識機構を原子レベルで解明した(図3)。

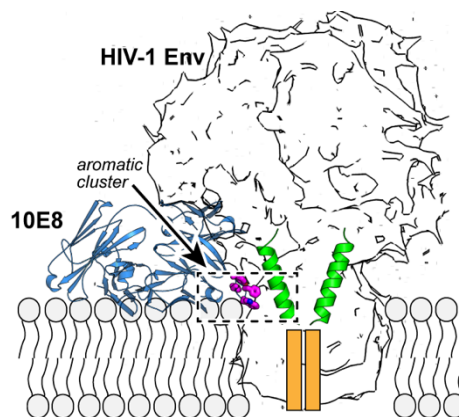


図3. 抗 HIV-1Fab のエンベロープへの結合。

-IgG の Fc 領域に結合した糖鎖末端のガラクトースは、IgG のエフェクター機能を調節することを見出した (図 4)。

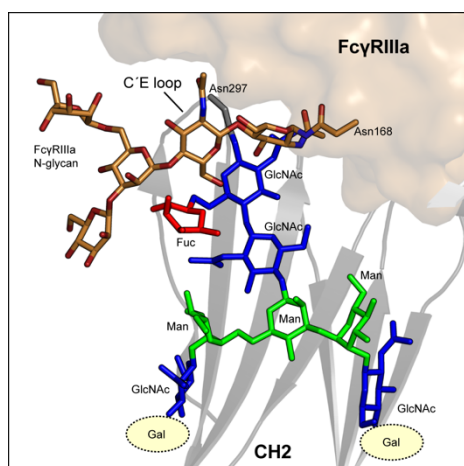


図 4。糖鎖は IgG の Asp297 に結合している。

-IgG の Fc 領域の Asp297 残基に結合した糖鎖の熱力学的な役割を明らかにした (図 5)。

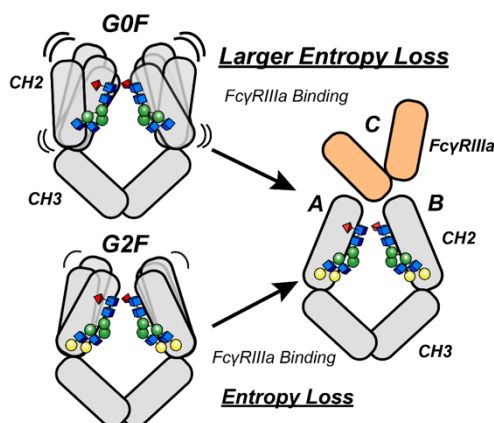


図 5。IgG の熱力学安定性は、糖鎖の組成によって調整されている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

(1) Tashima, T., Nagatoishi, S., Caaveiro, J.M.M., Nakakido, M., Sagara, H., Mimuro, H., Ohnuma, S-I., and Tsumoto, K. (2018) Weak electrostatic interactions between collagen and monomeric SLRP osteomodulin govern the shape of type I collagen fibrils.

*Commun. Biol.* **1**:33.

DOI:10.1038/s42003-018-0038-2.

(2) Miyanabe, K., Akiba, H., Kuroda, D., Nakakido, M., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Hamakubo, T., Caaveiro, J.M.M.,\* and Tsumoto, K. (2018) Intramolecular H-bonds govern the recognition of a flexible peptide by an antibody. *J. Biochem.* **164**:1-12.

DOI:10.1093/jb/mvy032.

(3) Kiyoshi, M., Caaveiro, J.M.M., Tada, M., Tamura, H., Tanaka, T., Terao, Y., Morante, K., Harazono, A., Hashii, N., Shibata, H., Kuroda, D., Nagatoishi, S., Oe, S., Ide, T., Tsumoto, K., and Ishii-Watabe, A. (2018) Assessing the heterogeneity of the Fc-glycan of a therapeutic antibody using an engineered Fcγ Receptor IIIa-immobilized column. *Sci. Rep.* **8**:3955.

DOI:10.1038/s41598-018-22199-8.

(4) Tanaka, K., Caaveiro, J.M.M.,\* Morante, K., and Tsumoto, K. (2017) Hemolytic actinoporins interact with carbohydrates using their lipid-binding module. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **372**:20160216.

DOI:10.1098/rstb.2016.0216.

(5) Kiyoshi, M., Tsumoto, K., Ishii-Watabe, A., and Caaveiro, J.M.M.\* (2017) Glycosylation of IgG-Fc: A molecular perspective. *Int. Immunol.* **29**:311-317.

DOI:10.1093/intimm/dxx038.

(6) Rujas, E., Insausti, S., García-Porras, M., Sanchez-Eugenia, R., Tsumoto, K., Nieva, J.L., and Caaveiro, J.M.M.\* (2017) Functional contacts between MPER and the anti-HIV-1 broadly neutralizing antibody 4E10 extend into the core of the membrane.

*J. Mol. Biol.* **429**: 1213-1226.  
DOI:10.1016/j.jmb.2017.03.008.

(7) Rujas, E., Caaveiro, J.M.M., Insausti, S., García-Porras, M., Tsumoto, K., and Nieva, J.L. (2017) Peripheral membrane interactions boost the engagement by an anti HIV-1 broadly neutralizing antibody. *J. Biol. Chem.* **292**:5571-5583.  
DOI:10.1074/jbc.M117.775429.

(8) Kudo, S., Caaveiro, J.M.M., Nagatoishi, S., Miyafusa, T., Matsuura, T., Sudou, Y., and Tsumoto, K. (2017) Disruption of cell adhesion by an antibody targeting the cell-adhesive intermediate (X-dimer) of human P-cadherin. *Sci. Rep.* **7**:39518.  
DOI:10.1038/srep39518.

(9) Garcia-Linares, S., Rivera-de-Torre, E., Morante, K., Tsumoto, K., Caaveiro, J.M.M., Gavilanes, J.G., Slotte, J.P., and Martinez-del-Pozo, A. (2016) Differential effect of membrane composition on the pore-forming ability of four different sea anemone actinoporins. *Biochemistry* **55**:6630-6641.  
DOI:10.1021/acs.biochem.6b01007.

(10) Rujas, E., Caaveiro, J.M.M.\*, Partida-Hanon, A., Gulzar, N., Morante, K., Apellániz, B., García-Porras, M., Bruix, M., Tsumoto, K., Scott, J.K., Jiménez, M.A., and Nieva, J.L. (2016) Structural basis for broad neutralization of HIV-1 through the molecular recognition of 10E8 helical epitope at the membrane interface. *Sci. Rep.* **6**:38177.  
DOI:10.1038/srep38177

(11) Morante, K., Bellomio, A., Gil-Carton, D., Redondo-Morata, L., Sot, J., Scheuring, S., Valle, M., González-Mañas, J.M., Tsumoto, K., and Caaveiro, J.M.M.\* (2016)

Identification of a membrane-bound prepore species clarifies the lytic mechanism of actinoporins. *J. Biol. Chem.* **291**: 19210-19219.

DOI:10.1074/jbc.M116.734053

(12) Kudo, S., Caaveiro, J.M.M.\* and Tsumoto, K. (2016) Adhesive dimerization of human P-cadherin catalyzed by a chaperone-like mechanism. *Structure*, **24**: 1523-1536.

DOI:10.1016/j.str.2016.07.002.

(13) Rujas, E., Gulzar, N., Morante, K., Tsumoto, K., Scott, J.K., Nieva, J.L., and Caaveiro, J.M.M.\* (2015) Structural and thermodynamics basis of epitope binding to neutralizing and non-neutralizing forms of the anti-HIV-1 4E10 antibody. *J. Virol.* **89**:11975-11991.

DOI:10.1128/JVI.01793-15.

(14) Tanaka, K., Caaveiro, J.M.M.\* and Tsumoto, K. (2015) Bidirectional transformation of a protein between its native water-soluble and transmembrane conformations. *Biochemistry* **54**:6863-6866  
DOI:10.1021/acs.biochem.5b01112.

(15) Caaveiro, J.M.M., Kiyoshi, M., and Tsumoto, K. (2015) Structural Analysis of Fc/Fc $\gamma$ R Complexes: A Blueprint for Antibody Design. *Immunol. Rev.* **268**: 201-221. DOI:10.1111/imr.12365.

[学会発表] (計13件)

(1) Caaveiro, J.M.M. Antibodies & Complement: Effector Functions, Therapies & Technologies, Sant Feliu de Guíxols, Girona, Spain, June 28 - July 1, 2018.

国際学会

(2) Caaveiro, J.M.M. The Fascinating journey of a metamorphic protein to the cell membrane, Bioforo 5th Alumni Research Meeting, Leioa, Spain, December 20, 2017,

国際学会

(3) Caaveiro, J.M.M., Kiyoshi, M., Ueda, T., and Tsumoto, K. Structural Biology of Fc receptors. Antibody Engineering & Therapeutics (Annual meeting of the Antibody Society), San Diego, CA, USA, December 11-15, 2017, 国際学会

(4) Tsumoto, K. and Caaveiro, J.M.M. Protein-lipid interactions in a pore-forming toxin. 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Kumamoto, September 19-21, 2017, 国内学会

(5) Caaveiro J.M.M. Molecular recognition phenomena involving proteins of therapeutic interest. 3rd HU-TMU-KU Joint Symposium for Pharmaceutical Sciences, Fukuoka, September 1, 2017, 国際学会

(6) Caaveiro, J.M.M. Thermodynamic properties of the transition state in biomolecular recognition phenomena. 23rd Pharma-Science Forum, The Biophysical Society of Japan (Hokkaido branch), Sapporo, March 16, 2017, 国内学会

(7) Caaveiro, J.M.M. Biomolecular recognition: a structural and physicochemical perspective. Chile-Japan Academic Forum 2016 at Patagonia, Puerto Natales, Chile, November 7-11, 2016, 国際学会

(8) Caaveiro, J.M.M. Thermodynamic tools in fragment-based drug discovery. 2016 UT-PUCC Joint Workshop for Frontiers in Bioengineering and Biomedical Engineering, Santiago de Chile, Chile, November 4, 2016, 国際学会

(9) Caaveiro, J.M.M. Pore formation assisted by lipids. Membrane pores: from structure and assembly, to medicine and technology, The Royal Society, London, UK,

June 27-28, 2016, 国際学会

(10) Caaveiro, J.M.M., Kiyoshi, M., and Tsumoto, K. Principles of Biomolecular Recognition of IgG-Fc by its receptors. Antibody Biology & Engineering, a Gordon Research Conference, Galveston, TX, USA, March 20-25, 2016, 国際学会

(11) Caaveiro, J.M.M., Vu, N., Morante, K., Moriwaki, Y., and Tsumoto, K. Molecular basis of heme transfer between NEAT transporters in Staphylococcus aureus. 7th International Chemical Congress of Pacific Basin Societies PacificChem, Honolulu, HI, USA, December 15-20, 2015, 国際学会

(12) Caaveiro J.M.M., Kobe, A., Mitani, T., and Tsumoto, K. Use of thermodynamic tools in the early stages of fragment-based drug discovery. 7th International Chemical Congress of Pacific Basin Societies PacificChem, Honolulu, HI, USA, December 15-20, 2015, 国際学会

(13) Caaveiro J.M.M., Miyafusa, T., Chigira, T., Nakano, K., Nagatoishi, S., and Tsumoto, K. Structural and mechanistic basis of capsular polysaccharide-synthesizing enzymes CapE/F, and the route to discovery novel inhibitors with antibacterial properties. 7th International Chemical Congress of Pacific Basin Societies PacificChem, Honolulu, HI, USA, December 15-20, 2015, 国際学会

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

CAAVEIRO, Jose (カアベイロ ホセ)  
九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：00536732

### (4) 研究協力者

津本 浩平 (TSUMOTO, Kouhei)  
東京大学・大学院工学系研究科・教授