

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17889

研究課題名(和文) NMRデータに基づく配座空間探査による動的糖鎖コードの解読

研究課題名(英文) Exploration of the conformational spaces of oligosaccharides based on NMR analyses and deciphering the dynamic glycode

研究代表者

山口 拓実 (Yamaguchi, Takumi)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：60522430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の秩序維持に関わる糖タンパク質品質管理機構において、糖鎖は、タンパク質の品質を表示するタグとして機能し、その細胞内運命の決定に寄与している。こうした分子メカニズムを解明することができれば、糖鎖が担う生命情報を解読するための重要な礎となることは間違いない。本研究では、小胞体内において立体構造形成が未完成的な糖タンパク質の目印として働く糖鎖を研究対象とし、酵母遺伝子破壊、化学合成、試験管内酵素反応を駆使して本糖鎖の安定同位体標識法を確立した。さらに、常磁性NMR解析法による精密実験と分子シミュレーションを組み合わせた動的構造解析を通して、分子シャペロンによる糖鎖認識の仕組みを解き明かした。

研究成果の概要(英文)： Oligosaccharides play pivotal roles in a variety of biological events in intracellular environments primarily through their interactions with a series of carbohydrate recognition proteins. In this study, the dynamic conformational ensemble of the high-mannose-type dodecasaccharide that displays the terminal glucose residue as a determinant recognized by molecular chaperones was determined. For this purpose, we attempted to apply the method based on paramagnetism-assisted NMR spectroscopy in conjunction with molecular dynamics simulation. A key to exploiting this method is the preparation of sufficient quantities of the lanthanide-tagged oligosaccharide with uniform and selective stable isotope-labelling. This was enabled by using a chemoenzymatic technique that we also developed. Consequently, our exploration of the conformational space of this dodecasaccharide revealed an induced-fit mechanism by which the chaperone accommodates the glucosyl antenna of their targets.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：糖鎖 NMR 分子シミュレーション ダイナミクス 立体構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の中で新たに生合成された糖タンパク質が小胞体において立体構造を形成する際や、固有の立体構造獲得後にゴルジ体へと移る際には様々な種類の糖認識タンパク質(レクチン)が関与することが知られている。また、細胞の中で不要となったタンパク質が分解処理されるプロセスにも、糖鎖とレクチンとの相互作用が重要な役割を果たしている。これらの機構において、糖鎖は、種々の酵素の働きによって少しずつ化学構造を変えるプロセッシング過程と共役しながら、糖タンパク質の品質を表示するタグとして機能し、その細胞内運命の決定に寄与している。

ところが、こうした生物学的重要性にもかかわらず、糖鎖の物理化学的な研究は、タンパク質や核酸に比べて著しく立ち遅れてきた。とりわけ難しい問題は、糖鎖が、タンパク質にはみられない複雑な枝分かれ構造であるに加え、高い柔軟性をもち、水中では絶えず揺らいでいることである。柔軟な生命鎖である糖鎖が、タンパク質の細胞内運命決定という高度な秩序維持をいかにして実現しているのか、その詳細な分子メカニズムを解明することができれば、糖鎖が担う生命情報を解読するための重要な礎となることは間違いない。しかし、糖鎖分子の正しい立体構造に関する研究は、伝統的な構造生物学手法の適用の難しさから、基盤となる計測手法さえ確立されていない未開拓の研究領域と言える。

### 2. 研究の目的

本研究では、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の動的な3次元立体構造を明らかにすることを目指す。これを通じて、タンパク質品質管理システムに関わる酵素やレクチンと糖鎖との相互作用機構を解明し、糖タンパク質の細胞内運命を決定する暗号がいかにコードされ、また読み解かれるのか、その構造基盤に迫る。

### 3. 研究の方法

本研究では、非還元末端グルコース残基を含む12糖からなる高マンノース型糖鎖G1M9について、酵母変異株を用いた高マンノース型糖鎖の大量調製法と化学-酵素合成法を組み合わせ、均一または選択的に安定同位体標識を施した糖鎖の調製法を確立した。調製した糖鎖の立体構造について、常磁性タグを応用した核磁気共鳴分光(NMR)法と分子動力学(MD)シミュレーションを基軸とする精密解析に基づいて原子レベルの分解能で明らかにした。さらに、こうして得られた構造基盤に基づき、糖鎖と、タンパク質品質管理機構に関わるレクチンとの相互作用機構を調査した。

### 4. 研究成果

小胞体内で糖タンパク質のフォールディング状態が不全なタンパク質の存在を感じてグルコース残基を付加する酵素であるUDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素(UGGT)を活用して、安定同位体標識を施したG1M9糖鎖を作出する方法論を開発した。

高マンノース型糖鎖を均一に発現する変異酵母を同位体標識グルコースを炭素源として含む培地で培養することによって、糖タンパク質を均一に標識した。得られた糖タンパク質を基質とし、別途化学合成したUDP-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]グルコースを用いてUGGTによる糖転移反応を行い、G1M9糖鎖を調製することに成功した(図1)。

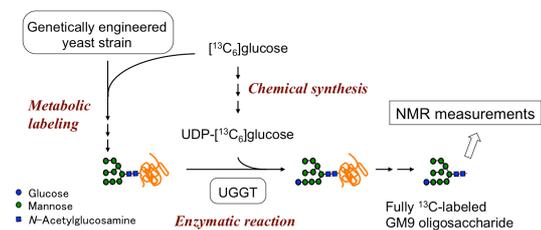


図1. 酵母遺伝子破壊、化学合成、試験管内酵素反応を組み合わせた安定同位体標識G1M9糖鎖の作出。T. Zhu et al. Chem. Lett. 2015より。

調製した安定同位体標識糖鎖を利用し、MDシミュレーションと常磁性タグを応用したNMR計測とを組み合わせた動的構造解析によって、そのコンフォメーション空間を明らかにすることに成功した(図2)。さらに、実験データによって裏付けられた分子シミュレーションにより、多様な構造を形成する糖鎖が分子シャペロンとの相互作用を通じて新たな立体構造を形成する、誘導適合に基づく分子認識の仕組みを理解することができた。これにより、糖タンパク質の立体構造形成、輸送、分解に関与する一連の高マンノース型糖鎖について、水中で揺動する立体構造情報を定量的に得るに至った。

また、糖タンパク質を分解へと促す酵素グルコシダーゼIIに関して分子運命決定に関わる構造基盤を求めることができた。さらに、神経幹細胞ではたらく糖鎖を人工分子骨格に結合したハイブリッド分子をデザインし、機能性糖鎖クラスターを創出した。得られた糖鎖クラスターを用いて精密NMR計測を実施することにより、細胞間コミュニケーションに関わる糖鎖-糖鎖相互作用の構造基盤を明らかにすることができた。

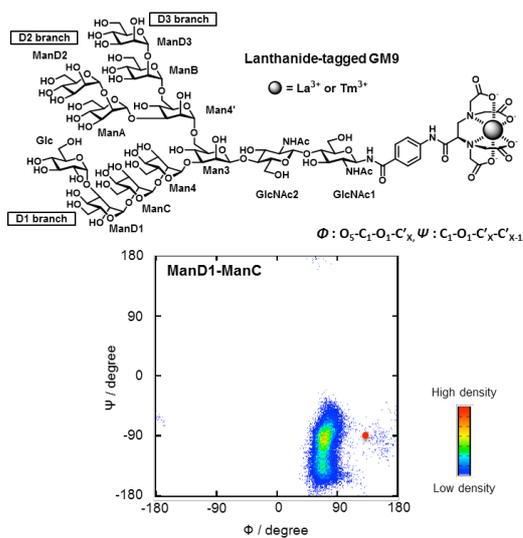


図 2. 上)常磁性プローブを導入した G1M9 糖鎖。下) 実験データを用いて裏付けられた分子シミュレーションにより得られた二面角分布。赤丸はレクチンとの複合体の結晶構造中のコンフォメーションを示す。T. Suzuki et al. ChemBioChem 2017 より。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① G. Yan, T. Yamaguchi, T. Suzuki, S. Yanaka, S. Sato, M. Fujita, K. Kato, "Hyper-assembly of self-assembled glycoclusters mediated by specific carbohydrate-carbohydrate interactions," *Chem. Asian J.* 2017, 12, 968-972, DOI: 10.1002/asia.201700202. (査読有)
- ② T. Suzuki, M. Kajino, S. Yanaka, T. Zhu, H. Yagi, T. Satoh, T. Yamaguchi, K. Kato, "Conformational analysis of a high-mannose-type oligosaccharide displaying glucosyl determinant recognised by molecular chaperones using NMR-validated molecular dynamics simulation," *ChemBioChem*, 2017, 18, 396-410, DOI: 10.1002/cbic.201600595. (査読有)
- ③ T. Satoh, T. Toshimori, G. Yan, T. Yamaguchi, K. Kato, "Structural basis for two-step glucose trimming by glucosidase II involved in ER glycoprotein quality control," *Sci. Rep.*, 2016, 6, 20575, DOI: 10.1038/srep20575. (査読有)
- ④ K. Kato, T. Yamaguchi, "Paramagnetic NMR probes for characterization of the dynamic conformations and interactions of oligosaccharides," *Glycoconj. J.* 2015, 32, 505-513, DOI: 10.1007/s10719-015-9599-1. (査読有)

- ⑤ 山口拓実, 矢木真穂, 加藤晃一, "糖鎖の生命分子科学の新展開," *機器センターたより*, 2015, 7, 74-78. (査読有)
- ⑥ T. Zhu, T. Yamaguchi, T. Satoh, K. Kato, "A hybrid strategy for the preparation of  $^{13}\text{C}$ -labeled high-mannose-type oligosaccharides with terminal glucosylation for NMR study," *Chem. Lett.* 2015, 44, 1744-1746, DOI: 10.1246/cl.150898. (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

- ① 堀 由樹, Yan Gengwei, 山口拓実, "糖鎖の NMR 相互作用解析のための常磁性プローブの合成," 日本化学会第 97 春季年会, 慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県横浜市), 2017 年 3 月 16 日.
- ② 村上真吾, Yan Gengwei, 山口拓実, "分子シミュレーションを用いたルイス X 糖鎖の構造揺らぎ探査," 日本化学会第 97 春季年会, 慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県横浜市), 2017 年 3 月 16 日.
- ③ G. Yan, T. Suzuki, S. Yanaka, T. Yamaguchi, M. Fujita, K. Kato. "NMR analyses of the dynamic structure and interactions of Lewis X oligosaccharide and its cluster," 日本化学会第 97 春季年会, 慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県横浜市), 2017 年 3 月 16 日.
- ④ T. Yamaguchi, "Synthesis and modifications of oligosaccharides toward understanding their functioning mechanisms," JAIST Japan-India Symposium on Materials Science 2017, 北陸先端科学技術大学院大学 (石川県能美市), 2017 年 3 月 7 日.
- ⑤ 山口拓実, "常磁性金属プローブを活用した生体分子の構造解析," 平成 28 年度 錯体化学若手の会・北陸支部勉強会, 金沢大学 角間キャンパス (石川県金沢市), 2016 年 12 月 3 日.
- ⑥ G. Yan, T. Yamaguchi, S. Yanaka, T. Suzuki, M. Fujita, K. Kato, "Creation of self-assembled glycoclusters for characterizing sugar-sugar interactions," 2nd International Symposium on Center of Excellence for Innovative Material Sciences Based on Supramolecule, 石川県文教会館 (石川県金沢市), 2016 年 10 月 26 日.
- ⑦ T. Yamaguchi, "Biophysical and chemical approaches to dynamic conformations of oligosaccharides," CARBO- XXXI International Conference

- on “New Frontiers in Carbohydrate Chemistry and Biology”, New Delhi (India), 2016年11月15日.
- ⑧ 山口拓実, “糖鎖の分子科学: 化学・生物学・物理学を横断して,” 第3回「動的秩序と機能」若手研究会, 加賀観光ホテル (石川県加賀市), 2016年10月11日.
- ⑨ 山口拓実, Zhu Tong, 佐藤匡史, 加藤晃一, “安定同位体標識モノグルコシル化糖鎖の調製と NMR 立体構造解析,” 日本化学会第96春季年会, 同志社大学 京田辺キャンパス (京都府京都市), 2016年3月24日.
- ⑩ 山口拓実, “NMRと分子シミュレーションによる糖鎖の三次元構造ダイナミクスの描像,” 蛋白研セミナー「構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題」, 東京大学先端科学技術研究センター (東京都目黒区), 2016年3月2日.
- ⑪ T. Yamaguchi, “Chemical synthesis and modification of oligosaccharides toward controlling their biofunctions,” DU-JAIST Indo-Japan Symposium on Chemistry of Functional Molecules/ Materials, New Delhi (India), 2016年2月26日.
- ⑫ T. Yamaguchi, T. Satoh, T. Zhu, K. Kato, “Conformational dynamics of high-mannose-type oligosaccharides as studied by NMR spectroscopy combined with molecular dynamics simulation,” The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), Honolulu (USA), 2015年12月17日.
- ⑬ Zhu Tong, 山口拓実, 佐藤匡史, 加藤晃一, “Structural basis of the molecular mechanisms underlying intracellular quality control of glycoproteins mediated by the ER folding sensor enzyme UGGT,” 糖鎖科学中部拠点第12回「若手の力」フォーラム, 名城大学薬学部ライフサイエンスホール (愛知県名古屋市), 2015年11月28日.
- ⑭ T. Zhu, T. Satoh, T. Yamaguchi, K. Kato, “Structural insights into intracellular quality control of glycoproteins mediated by their glucosylation,” The 4th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions, 九州大学西新プラザ (福岡県福岡市), 2015年11月22日.
- ⑮ 山口拓実, Tong Zhu, 佐藤匡史, 加藤晃一, “分岐鎖糖鎖の配座空間探査における常磁性効果の活用,” 第54回 NMR 討論会, 千葉工業大学津田沼キャンパ

ス (千葉県習志野市), 2015年11月8日.

- ⑯ T. Yamaguchi, K. Kato, “Paramagnetic Lanthanide-tagging for NMR Characterization of The Conformational Dynamics of Oligosaccharides,” IMS Asian International Symposium “Supramolecular Dynamics at the Interface of Chemistry and Biology”, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市), 2015年6月12日.

〔図書〕 (計4件)

- ① K. Kato, H. Yagi, T. Yamaguchi, *Modern Magnetic Resonance*, Springer, 2017, in press.
- ② M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, Y. Uekusa, K. Kato, *NMR in Glycoscience and Glycotechnology*, RSC Publishing (Cambridge), 2017, in press.
- ③ M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, R. Kitahara, K. Kato, *Molecular Science of Fluctuations Toward Biological Functions*, Springer (Japan), 2016, pp. 87-103.
- ④ 山口拓実, 加藤晃一, 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック～創薬・医療から食品開発まで～, エヌ・ティー・エス, 2015, pp. 265-271.

〔その他〕

研究紹介

細胞内秩序維持に関わるタンパク質品質管理機構における分子シャペロンによる糖鎖分子認識の仕組みを解明

<http://seimei.ims.ac.jp/newsletter/044.pdf>

サイボーグ超分子を用いて細胞膜上糖鎖クラスタの動的相互作用機構に迫る

<http://seimei.ims.ac.jp/newsletter/045.pdf>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 拓実 (YAMAGUCHI TAKUMI)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号: 60522430