

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07303

研究課題名(和文)パイアンテナ型糖鎖の準安定構造に関する構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural studies on meta-stable conformations of bisected glycan

研究代表者

長江 雅倫 (Nagae, Masamichi)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：60619873

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)：糖鎖は様々な単糖がグリコシド結合で重合したものである。糖鎖は運動性が高く溶液中で複数の構造の動的な平衡にあると考えられているが、糖鎖の配列と構造の相関は不明である。本研究で私は哺乳類の代表的な糖鎖であるN型糖鎖に焦点を当て、X線結晶構造解析によって配列と構造の相関を調べた。我々は3年間の研究期間にN型糖鎖と関連する糖蛋白質の構造を幾つか明らかにした。特にがん悪性化に関わる糖転移酵素であるGnT-VとN型糖鎖の複合体の結晶構造を明らかにし、がん悪性化に関わる糖鎖の生成と挙動に関する知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖の配列と構造の相関は生体高分子に関する基礎研究であり、一見すると社会的な成果の還元が難しいように思われるかもしれない。しかし我々の体の中には数百種類の糖転移酵素が常時働いており、複雑な化学構造を持つ糖鎖が数多く存在する。驚くべきことにこれらの糖鎖の生理学的な意義は未だ不明な点だけである。私の研究は生体内に豊富に存在するN型糖鎖に焦点を当て、その糖鎖の構造および改変メカニズムを形の情報から明らかにすることを目的にしていた。今回の研究を通してがん悪性化に関与する糖転移酵素の立体構造を明らかにすることができた。この成果は将来的な糖鎖の機能の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Polysaccharides are composed of various monosaccharide residues linked with glycosidic bonds. The 3D structures of polysaccharide are supposed to exist as dynamic equilibrium of multiple conformations. Compared with nucleic acids and proteins, the investigation of the relationship between sequence and 3D structure of polysaccharide has been not fully understood yet. This is because of high flexibility of 3D structure of polysaccharide and technical difficulties of structural analyses. In this proposal, I proposed the structural analysis of N-glycan which is representative glycan in mammals by X-ray crystallography. I and co-workers clarified several atomic structures of N-glycan and its related glycoproteins in this three years. Especially, we reported the crystal structure of cancer-associated glycosyltransferase GnT-V in complex with ligand N-glycan. This report has the potential to clarify the relationship between cancer specific glycan and its behavior.

研究分野：構造生物化学

キーワード：構造生物学 糖鎖生物学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は様々な種類の単糖がグリコシド結合を介して直鎖状あるいは分岐上に重合した生体高分子です。糖鎖は溶液中で極めて運動性が高いが無秩序に運動しているのではなく、複数の準安定構造の動的な平衡状態として存在すると考えられています。さらに糖鎖は配列に固有の準安定構造を持つと考えられており、配列の変化が構造に変化をもたらすと考えられています。しかし糖鎖の配列と構造の相関に関する研究はほとんど行われておらず、分子としての実態が不明です。この原因として、糖鎖の高い運動性によって従来の X 線結晶構造解析や溶液 NMR 実験では解析が困難であることが考えられます。

N型糖鎖は最も代表的な糖鎖修飾であり、Sequon と呼ばれる特徴的な 3 アミノ酸のモチーフ上のアスパラギン残基に糖鎖が付加される修飾様式です。N型糖鎖は哺乳類で広く見られ、例えばがん悪性化などの生体の状態の変化によってその構造が変わることが知られていますが、糖鎖構造の変化がどのような溶液挙動の変化につながっているのか、またどのようなメカニズムで糖鎖が変化するのかなど多くのことがわかっておりません。

### 2. 研究の目的

そこで私は N型糖鎖の配列と構造の相関に焦点を当てて、N型糖鎖と糖鎖結合蛋白質であるレクチンや糖鎖を付加する酵素である糖転移酵素などの複合体構造を X 線結晶構造解析などの構造生物学的な研究手法によって明らかにすることを目指しました。

### 3. 研究の方法

本研究は蛋白質と糖鎖との複合体の X 線結晶構造解析をメインに据えています。蛋白質は大腸菌または動物細胞の大量発現系を用いて調製し、アフィニティークロマトグラフィーやイオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの手法を用いて高純度に精製しました。また糖鎖は市販されているものを入手する他、共同研究者らによる化学合成した試料を使用しました。

これらの高純度蛋白質と糖鎖を混合し、複合体の状態で結晶化しました。得られた結晶は大型放射光施設によって回折強度データを収集し、X 線結晶構造解析によって原子レベルの分解能の立体構造を取得しました。

### 4. 研究成果

2017年4月から2020年3月までの三年間の研究期間に複数の N型糖鎖と糖鎖結合蛋白質の立体構造解析に成功しました。そのうち代表的な 2 例を以下に示します。

#### 4-1: 植物レクチンを用いた N型糖鎖の配列依存的相互作用解析

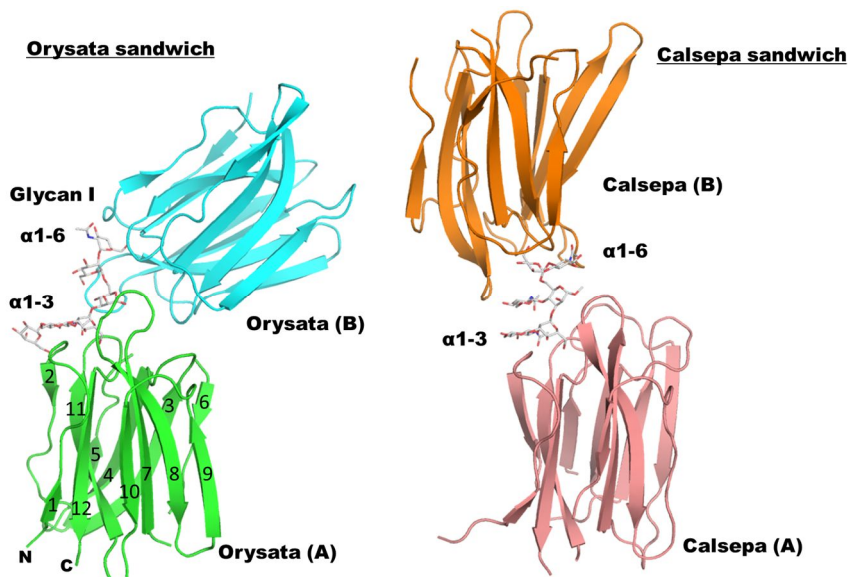
植物に含まれる糖鎖結合蛋白質(レクチン)の中には、哺乳類などの動物で N型糖鎖に非常に強く結合するものがあります。その中で Oryzata と名付けられたイネ由来のレクチンはバイアンテナ型糖鎖に特異的に結合するのに対して Calsepa と名付けられた朝顔由来のレクチンはバイセクト型糖鎖に強く結合します。バイアンテナとバイセクト糖鎖は兄弟のようなもので互いに配列が似ており、バイアンテナ型糖鎖に GlcNAc が付加されるとバイセクト型糖鎖になります。私はこの GlcNAc 付加によるバイアンテナからバイセクト型糖鎖への変化が立体構造にどのような影響をもたらすのか興味を持ち、それぞれのレクチンと糖鎖との複合体の結晶構造を明らかにしました(下図)。その結果、Oryzata も Calsepa も二分子のレクチンが糖鎖を挟み込むようなサンドイッチ構造をしていましたが、その挟み方が大きく異なっていました。Oryzata とバイアンテナ型糖鎖の複合体中で糖鎖は二本の分岐鎖が互いにバンザイをするような位置関係であるのに対して、Calsepa とバイセクト型糖鎖との複合体中の糖鎖は片腕を上にあげて、もう片方の腕を下に下げたような格好をしておりました。そしてレクチンと糖鎖との界面を詳細に調べますと、それぞれのレクチンが二つのサンドイッチ構造を取りやすいようなアミノ酸の配列になっていることがわかりました。

この結果は下記のような投稿論文として発表致しました。

Masamichi Nagae\*, Sushil K. Mishra\*, Shinya Hanashima, Hiroaki Tateno and Yoshiki Yamaguchi (\* equal contributor)

Distinct roles for each N-glycan branch interacting with mannose-type Jacalin-related lectins Oryzata and Calsepa

*Glycobiology* **27**(12):1120-1133 (2017)



#### 4-2 : がん悪性化に関わる 1-6 分岐 N 型糖鎖を生成する糖転移酵素 GnT-V の立体構造解析

私たちの体の N 型糖鎖は体内の状態によって時々刻々と糖鎖構造が変化することが知られています。そのため多くの疾患マーカーとして利用されています。N-acetylglucosaminyltransferase-V (別名 GnT-V) という糖転移酵素は私たちの体の中で働く酵素で N 型糖鎖に GlcNAc を付加して 1-6 分岐という糖鎖構造を作り上げます。この酵素が過剰に働くとがん悪性化を引き起こすことが知られており、どのようなメカニズムで糖鎖を付加するのか注目されていましたが長い間不明でした。その原因として GnT-V を均一かつ大量に調製することの難しさがありました。私たちは Expi293 細胞という動物細胞を用いて大量に調製し、PA タグという特殊なタグを付加することで効率よくかつ高純度に回収する手法を確立することに成功しました。また GnT-V と基質である N 型糖鎖は結合が弱く、複合体にすることが困難と言われていました。そこで GnT-V と安定に結合できる糖鎖化合物として、理化学研究所の伊藤幸成先生が開発した N 型糖鎖と核酸供与体を結びつけた人工阻害剤を用いました。

こうして得られた GnT-V と N 型糖鎖との複合体によってこれまで未解明であった基質の認識機構を知ることができました。また GnT-V の詳細な原子構造を明らかにしたことで、今後の阻害剤開発に繋がる貴重な情報を得ることができました。

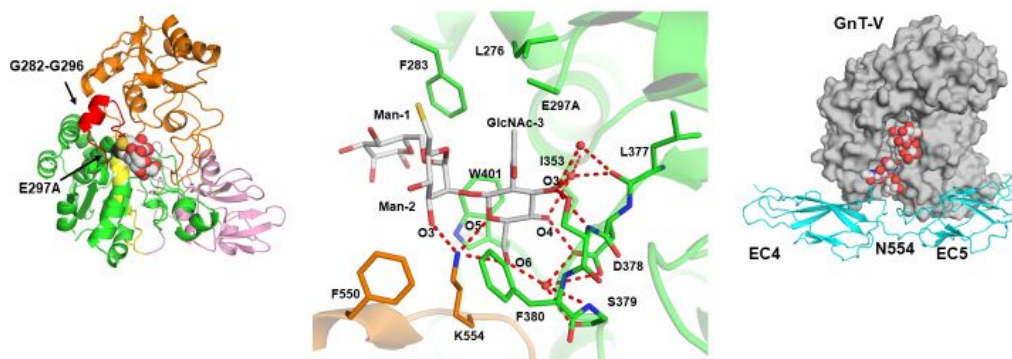
この成果は下記の投稿論文として発表いたしました。

[Masamichi Nagae<sup>\\*,\\*\\*</sup>, Yasuhiko Kizuka<sup>\\*\\*</sup>, Emiko Mihara, Yu Kitago, Shinya Hanashima, Yukishige Ito, Junichi Takagi, Naoyuki Taniguchi and Yoshiki Yamaguchi](#)

(\* correspondence author, \*\* equal contribution)

Structure and mechanism of cancer-associated N-acetylglucosaminyltransferase-V

*Nature Communications* 9(1):3380 (2018)



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Nagae Masamichi、Yamaguchi Yoshiki、Taniguchi Naoyuki、Kizuka Yasuhiko	4. 巻 21
2. 論文標題 3D Structure and Function of Glycosyltransferases Involved in N-glycan Maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 437 ~ 437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21020437	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 Omahdi Zakaria、Horikawa Yuto、Nagae Masamichi、Toyonaga Kenji、Imamura Akihiro、Takato Koichi、Teramoto Takamasa、Ishida Hideharu、Kakuta Yoshimitsu、Yamasaki Sho	4. 巻 295 (17)
2. 論文標題 Structural insight into the recognition of pathogen-derived phosphoglycolipids by C-type lectin receptor DCAR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5807-5817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012491	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 Nagae Masamichi、Yamaguchi Yoshiki	4. 巻 1
2. 論文標題 Structural Aspects of Carbohydrate Recognition Mechanisms of C-Type Lectins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Topics in Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 1-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1007/82_2019_181">https://doi.org/10.1007/82_2019_181</a>	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 Suga Akitsugu、Nagae Masamichi、Yamaguchi Yoshiki	4. 巻 28
2. 論文標題 Analysis of protein landscapes around N-glycosylation sites from the PDB repository for understanding the structural basis of N-glycoprotein processing and maturation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 774 ~ 785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwy059	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 Nagae Masamichi, Kizuka Yasuhiko, Mihara Emiko, Kitago Yu, Hanashima Shinya, Ito Yukishige, Takagi Junichi, Taniguchi Naoyuki, Yamaguchi Yoshiki	4. 巻 9
2. 論文標題 Structure and mechanism of cancer-associated N-acetylglucosaminyltransferase-V	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05931-w	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 Nagae Masamichi, Yamaguchi Yoshiki	4. 巻 1104
2. 論文標題 Biophysical Analyses for Probing Glycan-Protein Interactions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 119 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-2158-0_7	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 Nagae M, Mishra SK, Hanashima S, Tateno H, Yamaguchi Y	4. 巻 27(12)
2. 論文標題 Distinct roles for each N-glycan branch interacting with mannose-binding type Jacalin-related lectins Oryzata and Calsepa.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 1120-1133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwx081	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 Nagae M, Mishra SK, Neyazaki M, Oi R, Ikeda A, Matsugaki N, Akashi S, Many H, Mizuno M, Yagi H, Kato K, Senda T, Endo T, Nogi T, Yamaguchi Y	4. 巻 22(4)
2. 論文標題 3D structural analysis of protein O-mannosyl kinase, POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 348-359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12480	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 Nagae M, Liebschner D, Yamada Y, Morita-Matsumoto K, Matsugaki N, Senda T, Fujita M, Kinoshita T, Yamaguchi Y	4. 巻 85(4)
2. 論文標題 Crystallographic analysis of murine p24 2 Golgi dynamics domain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proteins, structure, function and bioinformatics	6. 最初と最後の頁 764-770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prot.25242	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4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nagae Masamichi、Kizuka Yasuhiko、Mihara Emiko、Kitago Yu、Hanashima Shinya、Ito Yukishige、Takagi Junichi、Taniguchi Naoyuki、Yamaguchi Yoshiki
2. 発表標題 Structural studies of cancer-associated glycosyltransferase, GnT-V
3. 学会等名 10th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長江雅倫、木塚康彦、三原恵美子、北郷悠、花島慎弥、伊藤幸成、高木淳一、谷口直之、山口芳樹
2. 発表標題 癌化に関連する糖転移酵素GnT-Vの結晶構造解析
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長江雅倫、木塚康彦、三原恵美子、北郷悠、花島慎弥、伊藤幸成、高木淳一、谷口直之、山口芳樹
2. 発表標題 がん悪性化を促進する糖転移酵素GnT-VのX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会平成30年度年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長江雅倫、Sushil K. Mishra、根谷崎牧子、大井里香、池田明美、松垣直宏、明石知子、萬谷博、弘瀬友理子、水野真盛、矢木宏和、加藤晃一、千田俊哉、遠藤玉夫、禾晃和、山口芳樹
2. 発表標題 ジストログリカノパチー原因遺伝子産物Protein O-Mannosyl Kinase (POMK)の構造解析
3. 学会等名 日本糖質学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----