

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11534

研究課題名(和文) 生体内糖タンパク質の構造情報を利用した糖鎖認識機構解析のための手法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of simulation methods for analyzing the mechanism of glycan recognition by proteins using structural information of glycoproteins

研究代表者

能登 香 (Kaori, Ueno-Noto)

北里大学・一般教育部・講師

研究者番号：20361818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：体内の認識分子としてはたらく糖鎖は、糖タンパク質や糖脂質として存在し、生物種、個体、臓器ごとに異なる構造をもつ。生体内でこれらの糖鎖はどのように特異的に認識されているのか、個別に、あるいは複数糖鎖の模様として認識されているのか、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、糖鎖の認識機構を明らかにするため、糖タンパク質上に並ぶ様々な糖鎖を認識する一連の抗体の構造情報を利用し、古典分子力学計算及び量子化学計算を行い、実験的に得られる抗体の親和性実験結果と比較しながら、その認識機構に関する基礎的な情報を提供すると共に、新たな糖鎖認識シミュレーション法を開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、体内で薬物輸送物質としての応用を目的に、特異な認識能をもつ糖鎖を使ったクラスター分子が作製されている。その分子設計には、各種糖鎖に対するタンパク質の認識能に関する系統的且つ詳細な相互作用情報が必須であるが、その認識メカニズムは明らかになっていない。ヒト免疫不全ウイルスの活性を減退させる働きをもつ中和抗体を対象にした本研究は、ウイルスの感染防御の詳細な理解を深めるだけでなく、広範な生命現象にみられるタンパク質の糖鎖認識における基礎情報を提供し、そのためのシミュレーション開発を開発する、という点で学術的のみならず、社会的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：Glycans, polysaccharides, exist as glycoproteins or glycolipids and have different structures for each species, individual, and organ and act as recognition molecules in the body. The mechanism of how proteins specifically recognize these glycans individually or as patterns of multiple glycans has not been clarified. To elucidate the recognition mechanism of glycans by proteins, the structural information of a series of antibodies that recognize various glycans arranged on glycoproteins of human immunodeficiency virus 1 were analyzed by classical molecular mechanics and quantum chemical calculations. By comparing the calculated antibody-glycan interaction energies with the experimental results of affinities of the antibodies to the glycans, this study provides basic information on the mechanism of glycan recognition by proteins and a new simulation method for it.

研究分野：計算化学

キーワード：糖鎖認識シミュレーション 生命分子計算 中和抗体 ヒト免疫不全ウイルス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質は細胞膜の構成成分として広く分布している。その糖鎖を構成する糖が一つ異なるだけで細胞の外観は全く異なり、例えばヒトの ABO 血液型は赤血球表面の糖鎖の違いによって決まる。糖鎖は生体内の細胞や特定の器官を高度に識別する役割を担っており、腫瘍マーカー等の認識分子として重要な働きをしている。一方、複数の糖鎖を「模様(パターン)」として認識される可能性が示唆されている[1]。ヒト血清アルブミン上に糖鎖をクラスター化した分子をマウスに投与することにより肝臓細胞を高度に認識することができ、その分子の動態や集積の制御はアルブミン上の糖鎖構造を変化させることで可能となる。薬物輸送等への応用が期待されるが、アルブミンに対して糖鎖の数が少ない場合や、糖鎖末端の単糖のみのクラスターでは同様の効果を得ることができなかった。「生体内で糖鎖は個別に特異的に認識されているのか、あるいは複数糖鎖の模様として認識されているのか」等の糖鎖認識機構は明らかになっていない。一方、糖鎖-タンパク質間の親和性の比較分析には、糖鎖を基板上に高密度に配置し、検体に含まれるタンパク質との親和性を測定するグリカンアレイ解析実験が行われている。しかし、基板-糖鎖間の界面の物性を正しくシミュレーションする方法が確立していないこと、グリコシド結合で繋がる糖鎖は大きく揺らぐためにその構造決定が難しいことから、グリカンアレイ解析結果に対応するシミュレーション研究はこれまで行われていなかった。新規糖鎖クラスター等の分子設計には、各種糖鎖に対するタンパク質の認識能に関する系統的な相互作用情報を得る必要があり、それを可能にするシミュレーション法のニーズがある。

2. 研究の目的

本研究は、これまでに開発してきた生体分子シミュレーション方法を発展させ、糖タンパク質に複数結合する糖鎖と抗体の結晶構造情報を利用し、系統的且つ定量性のあるタンパク質の糖鎖認識の基礎となる情報を提供できる理論モデルと方法論の構築を目指したシミュレーション手法の開発を目的とする。薬物輸送等への応用が期待される新規糖鎖機能性分子の設計指針となる糖鎖認識に関する情報を提供し、治療・創薬分野に貢献すると共に理論の分野から糖鎖化学分野に寄与することを目標とする。

3. 研究の方法

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) の表面には、gp120 と gp41 と呼ばれる外被糖タンパク質から成るサブユニットが 3 個集まって突出部を形成している (図 1)。各三量体には糖鎖が結合する部位が 81 個存在し、それらがどのような糖鎖構造をもつか、統計的に解析されている[2]。また、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 活性を減退させる働きをもつ中和抗体は多種類作製されており、外被糖タンパク質の gp120 部分の糖鎖を特異的に認識するものがある。このような抗体の X 線結晶構造は 100 個以上報告されている。本研究では、構造情報が豊富且つ系統的に解析されている中和抗体の糖鎖認識を対象にして、生体内環境における抗体の糖鎖認識機構を解明するシミュレーション手法の開発を下記の通り段階的に行った。

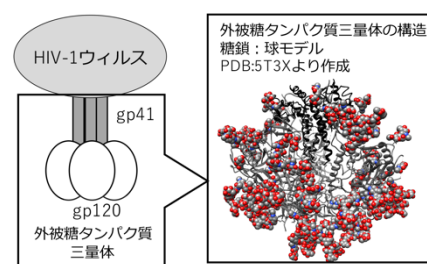


図1 HIV-1外被糖タンパク質三量体の構造

① 抗体の糖鎖結合特性データの系統的解析—糖鎖を個別に認識する場合—

抗体に一つの糖鎖が結合する場合の親和性を確認するため、高マンノース型糖鎖との親和性が異なる中和抗体四種の糖鎖認識について、系統的に解析し、結合特性データを収集した。PGT128 ファミリーに属する PGT128 抗体は、同じファミリーでアミノ酸配列相同性 95%以上の PGT127 抗体や、相同性が 80%程度の PGT121 ファミリーに属する PGT124 や PGT122 抗体よりも高マンノース型糖鎖 (図 2) に強く結合した[3-5]。これらの抗体と高マンノース型糖鎖との複合体結晶構造 (PDB ID: 4TVP (PGT122), 5T3S (PGT124), 3TWC (PGT127), 3TV3 (PGT128), 図 3) では、いずれの複合体においても、糖鎖の二つの末端が抗体のループ部分にはまっている配座をもつ構造であった。

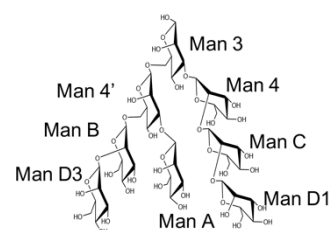


図2 高マンノース型糖鎖

pH=7.0, 300K で水素付加した後、これらの構造を出発構造にして、それぞれ古典分子動力学 (MD) シミュレーションを、PARM99, GLYCAM06j の力場を用いてプログラム AMBER16 で行い、分子立体構造の変化を解析すると共に、結合自由エネルギーを求めた。また、シミュレーションの単位時間刻みのスナップショット構造を、アミノ酸残基、単糖ごとにフラグメント分割し、MP2 法によって電子相関を考慮した量子化学計算 (フラグメント分子軌道法、プログラムは GAMESS を使用) を行い、水分子や熱揺らぎを考慮した詳細なタンパク質-糖鎖間の相互作用を定量的に見積もると共に、相互作用の時間変化を追跡した。求めた糖鎖-抗体間の相互作用エネルギーを、糖鎖-抗体間親和性実験結果と比較し、これら抗体の結合特性を明らかにした。

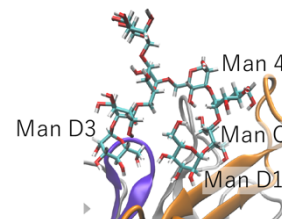


図3 PGT128抗体-高マンノース型糖鎖複合体の結合部位

② 糖タンパク質上に並ぶ複数種類の糖鎖を認識する抗体をモデル化したシミュレーション法の開発

PGT 抗体は、抗体間で結合する糖鎖型に違いがあり [6]、前述の高マンノース型糖鎖だけでなく、負電荷をもつシアル酸を含む 2 本鎖複合型糖鎖 (図 4) にも結合する。この違いに注目した。アミノ酸配列の相同性が高い PGT121, 128, 151 抗体のうち、高マンノース型糖鎖には、PGT128, PGT121 抗体の順に強く結合し、PGT151 抗体とは結合しない。一方、2 本鎖複合型糖鎖には、PGT121, PGT151 抗体の順に親和性が強く、PGT128 抗体とはほとんど結合しないことが実験的に示されている [7]。

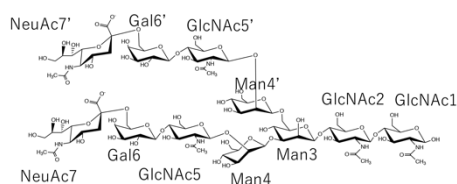


図 4 シアル酸を含む 2 本鎖複合型糖鎖

PGT128, 151 抗体が 2 本鎖複合型糖鎖に結合する結晶構造が報告されていないため、PGT121 抗体が 2 本鎖複合型糖鎖に結合する複合体の結晶構造 (PDB ID:4JY4) を鋳型として、別の糖鎖と結合する PGT128 及び PGT151 抗体の複合体結晶構造 (PDB ID:3TV3, 4NUG) を使い、ドッキングシミュレーションにより各複合体構造を得た。これらの構造を出発構造にして、それぞれ 50 ns の MD シミュレーションを行い、認識部位における糖鎖構造や複合体全体の動的変化を解析し、結合自由エネルギーを求め、上記実験結果と比較した。

ヒト免疫不全ウイルスの外被糖タンパク質の表面は数種類の糖鎖で覆われており、このうちの複数の糖鎖を介して結合する PGT 抗体の結晶構造が報告されている。一方で、糖タンパク質の特定の領域にどのような糖鎖が存在するのか、統計的に解析されている研究報告がある [2]。この情報を参照し、糖タンパク質上の結晶構造の糖鎖部分を改変することで、糖タンパク質表面を「基板に固定した複数の糖鎖」としてモデル化し、抗体が糖鎖の違いをどのように認識するのかを解析した。PGT122 抗体が結合する糖タンパク質の結晶構造 (PDB:5FYL) の 20 個の糖鎖のうち、複合型糖鎖が結合していることが報告されている部位 (アスパラギン 137 番残基) の糖鎖を 2 本鎖複合型に修正した。その抗体部分を PGT121, PGT128, PGT151 に換えて複合体構造 (約 16,000 原子) を三種作成した。各構造を出発構造に、それぞれ 100 ns 以上の MD シミュレーションを行い、安定構造を得た (図 5)。糖鎖と抗体間の詳細な相互作用解析を行うため、各安定構造から、糖鎖と抗体部分を取り出した構造 (約 6,900 原子) について、溶媒効果を考慮した量子化学計算 (FMO-PCM 法) を行った。さらに脱溶媒効果を考慮するため、複合体、糖鎖、抗体を個別に量子化学計算して算出する Subsystem 法 [8] による解析も行った。

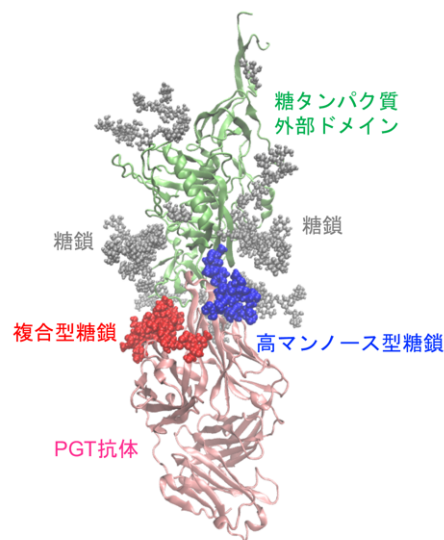


図 5 糖タンパク質外部ドメインに複数の糖鎖を介して結合する PGT 抗体

4. 研究成果

① 抗体の糖鎖結合特性データの系統的解析—糖鎖を個別に認識する場合—

PGT128, 127, 124, 122 抗体が高マンノース型糖鎖に結合する複合体結晶構造を出発構造として、MD シミュレーションを行ったところ、PGT124 や PGT122 抗体に比べ、PGT128 及び 127 抗体との複合体における糖鎖構造の安定性が非常に高く、抗体ファミリー間で安定性が異なることが明らかになった。MM-GBSA 法及び基準振動モード解析で算出した PGT128 抗体と高マンノース型糖鎖間の結合自由エネルギーは -16.5 kcal/mol で最も強く、PGT127 と PGT124 が -8 kcal/mol 程度、PGT122 は -4.2 kcal/mol となり、前述の親和性実験結果と良い相関が見られた。抗体—糖鎖複合体の各結晶構造、及びシミュレーションの単位時間刻みの複合体構造に対して、電子相関を考慮した量子化学計算 (FMO-MP2 法) を行い、抗体—糖鎖間の相互作用を解析した。PGT128 ファミリーでは、Man D1, D3 の糖鎖末端が認識に重要であった。一方、PGT121 ファミリーでは、糖鎖の根本部位 (Man 4 や Man C) も抗体結合への寄与が大きく、抗体ファミリーによって、認識で重要な役割を持つ糖鎖内の部位が異なることが明らかになった (表 1, 図 2)。また、得られた抗体—糖鎖間相互作用エネルギーは、PGT128, PGT127, PGT124, PGT122 の順に強く (表 1)、実験結果と定性的に一致した。MD シミュレーションによって各複合体構造を安定化させた場合、相互作用エネルギーにおける抗体間の違いが顕著になり、実験結果との相関が向上することが明らかになった (図 6)。さらに、抗体ファミリー内における抗体間のわずかな糖鎖認識の違いは、水素結合の数だけでなく、適度な疎水相互作用を再現する分散相互作用が寄与することが明らかになった。例えば、PGT127 と PGT128 抗体では、糖鎖の Man 4 部分と抗体間の領域に入り込む水分子の分布が異なる。その部分での抗体—糖鎖間の分散相互作用の有無が、認識のわずかな違いに寄与することが明らかになった (図 7)。これらの研究成果は、日本化学会年会、日本糖質学会年会及び第 25 回国際複合糖質シンポジウムで発表すると共に、学術論文として発表した。

	Total	Man D1	Man D3	Man C	Man 4
E(PGT122)	-130.1	-13.5	-35.9	-40.9	-43.9
E(PGT124)	-134.9	-9.5	-7.8	-70.8	-43.4
E(PGT127)	-206.5	-86.1	-83.3	-21.7	2.6
E(PGT128)	-218.7	-86.2	-86.6	-22.9	-4.9

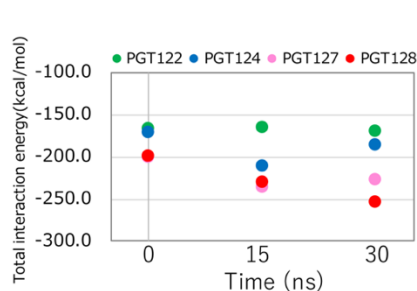


図6 抗体と高マンノース型糖鎖間全相互作用エネルギー(kcal/mol)の時間変化

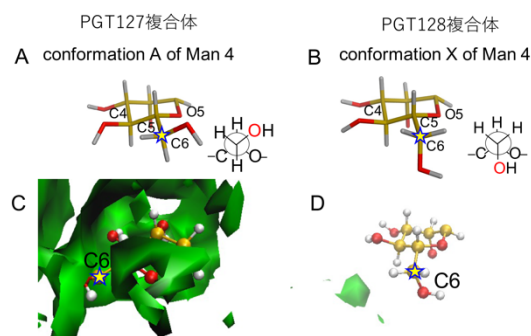


図7 Man 4の立体配座及びその周辺の水分分布
PGT127複合体 (A,C), PGT128複合体 (B,D)

② 糖タンパク質上に並ぶ複数種類の糖鎖を認識する抗体をモデル化したシミュレーション法の開発

ドッキングシミュレーションによって作成した PGT121, PGT128, PGT151 抗体と 2 本鎖複合型糖鎖が結合する複合体構造を使い, MD シミュレーションを行ったところ, いずれの複合体においても糖鎖と抗体間の結合は保持されていた. 2 本鎖複合型糖鎖と抗体間の結合自由エネルギーを MM-GBSA 法及び基準振動モード解析で算出した結果, PGT121 (-11.3 kcal/mol) < PGT151 (-9.2 kcal/mol) < PGT128 (7.4 kcal/mol) の順になり, 先行研究における結合の安定性の順序と一致し, 実験結果を定性的に再現することが明らかになった. しかし, 複合体内部での糖鎖構造の安定性は異なり, PGT121 と PGT128 抗体との複合体では糖鎖構造が安定して結合しているのに対し, PGT151 抗体では, 糖鎖構造の揺らぎが徐々に大きくなり, 結合様式が変化していく様子が観察され, ドッキングシミュレーションによって作成した初期構造を使った系統解析は難しいことが明らかになった. これらの結果を分子科学討論会及び日本化学会年会にて報告した.

上記の研究結果をふまえ, 抗体が複数の糖鎖を認識する系に研究対象を拡張し, 抗原糖鎖二種に対する三種の抗体について, 抗体が糖鎖の違いをどのように認識するかを解析した. 糖タンパク質に結合する PGT 抗体の複合体構造の動的変化を, MD シミュレーションによって追跡したところ, PGT128 抗体では, 抗体部分の構造揺らぎが大きく, 高マンノース型糖鎖との結合部位側に引きつけられる様子が観察された. これは, PGT128 抗体と高マンノース型糖鎖の親和性が, 2 本鎖複合型糖鎖との親和性よりも強いという実験事実と合うものであった.

シミュレーションによって得られた安定構造から, 糖鎖と抗体部分を取り出した構造について, 分極連続体モデルによって溶媒を考慮した量子化学計算 (FMO-PCM 法) を行い, 抗体-糖鎖間相互作用エネルギーを求めたが, 親和性実験結果を再現しなかった. 一方, 複合体, 抗体, 糖鎖を個別に FMO-PCM 計算し, 脱溶媒和効果を考慮する Subsystem 法を用いて相互作用を解析したところ, 各抗体と高マンノース型糖鎖, 2 本鎖複合型糖鎖間の相互作用エネルギー (表 2) は, 実験的に得られる値と比較可能なオーダーとなり, 上記先行研究の実験結果とよく一致した. これらの結果をまとめ, 日本糖質学会年会, 日本化学会年会で発表した. 現在, 学術論文を投稿準備中である. また, これまで行ってきた抗体の糖鎖認識に関する研究の概要について, 化学反応経路探索のニューフロンティア 2019 にて招待講演を行った.

糖鎖の型	PGT121 抗体	PGT128 抗体	PGT151 抗体
高マンノース型糖鎖	-43.5	-49.6	-32.8
2 本鎖複合型糖鎖	-42.6	-12.9	-24.8

<引用文献>

- [1] Ogura, A. *et al.* *Sci Rep*, 6, 21797, 2016.
- [2] Cao, L. *et al.* *Nat Commun*, 8, 14954, 2017.
- [3] Walker, L. M. *et al.* *Nature* 477, 466, 2011.
- [4] Pancera, M. *et al.* *Nature*, 514, 7523, 455, 2014.
- [5] Steichen, J. M. *et al.* *Immunity*, 45 (3), 483, 2016.
- [6] Falkowska, E. *et al.*, *Immunity*, 40, 657, 2014.
- [7] Garces, F. *et al.*, *Cell*, 159, 69, 2014.
- [8] D.G. Fedorov *et al.*, *J. Phys. Chem. A*, 120, 2218, 2016.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 M. Kusumoto, K. Ueno-Noto, K. Takano	4. 巻 41
2. 論文標題 Systematic interaction analysis of anti-HIV-1 neutralizing antibodies with high mannose glycans by FMO and MD methods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Comput. Chem.	6. 最初と最後の頁 31-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcc.26073	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 能登香
2. 発表標題 脱溶媒和効果を考慮した量子化学計算による抗体の糖鎖認識の違いの理論的解明
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 能登香
2. 発表標題 HIV-1認識PGT抗体とシアル酸含有複合型糖鎖間の相互作用解析
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Ueno-Noto, M. Kusumoto, K. Takano
2. 発表標題 A comparative analysis of affinities of antibodies to a high-mannose glycan by theoretical methods
3. 学会等名 25th International Symposium on Glycoconjugate (Glyco25) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能登香
2. 発表標題 HIV-1 外被糖タンパク質上の糖鎖を認識する抗体の親和性に関する理論的研究
3. 学会等名 化学反応経路探索のニューフロンティア2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能登香
2. 発表標題 二種類の糖鎖を介して糖タンパク質に結合する抗体の糖鎖認識に関する理論的研究
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能登香
2. 発表標題 量子化学計算によるヒト免疫不全ウイルス中和抗体と糖タンパク質上糖鎖間の親和性比較
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 能登 香
2. 発表標題 糖タンパク質上のシアル酸含有糖鎖を認識する中和抗体の親和性に関する理論的研究
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能登 香
2. 発表標題 ヒト免疫不全ウイルス上のシアル酸を有する抗原糖鎖に対する中和抗体の親和性比較
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 能登 香, 楠本美侑, 鷹野景子
2. 発表標題 計算化学に基づくヒト免疫不全ウイルス上の高マンノース型糖鎖を認識する中和抗体の親和性比較研究
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------