

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03361

研究課題名(和文) タンパク質の糖鎖修飾の特異性を決定する分子機構の解明と人工糖タンパク質技術の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms underlying protein-specific glycosylation and development of artificial glycoproteins

研究代表者

佐藤 匡史 (Sato, Tadashi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授

研究者番号：80532100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラミニン結合性糖鎖修飾の初期段階に関わるGlcNAc転移酵素AG061の立体構造解析に成功した。これにより、本酵素はフィブロネクチンIII型ドメインを介して2量体化し、サブユニット間相互作用を通じて基質認識部位を形成することが示唆された。さらに、積荷受容体ERGIC-53/MCFD2が担う血液凝固因子の細胞内輸送に着目した研究を通じて、糖転移酵素と糖タンパク質の細胞内の会合機会の有無が規定されることにより、タンパク質の糖鎖修飾の特異性が決定されるという新たな分子機構が存在する可能性が見えてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、すでに医薬品として臨床で利用されているエリスロポエチンに対してわずか10残基のパスポート配列を付加することで分泌量が増加することを見出した。このことは、バイオ医薬品の効率的な生産につながることを期待できる。また、本研究の成果では血液凝固因子の細胞内における輸送メカニズムも明らかにしていることから、血液凝固因子欠損症の発症の仕組みの理解を深めるとともに、血栓症のように血液凝固によって引き起こされる疾患の治療法の開発に貢献できる可能性がある。さらに、ラミニン結合性糖鎖合成に関わる糖転移酵素AG061の立体構造を明らかにしており、筋ジストロフィーの発症の仕組みの理解を深めることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determined three-dimensional structure of GlcNAc transferase AG061 involved in the initial step of glycosylation of laminin-binding glycan. We elucidated this enzyme dimerizes through the fibronectin type III domains, suggesting a formation of substrate-binding site via the inter-subunit interactions. Furthermore, through structural and functional studies of intracellular transport of blood coagulation factors mediated by cargo receptor ERGIC-53/MCFD2, we provided a new insight into molecular mechanism underlying protein-specific glycosylation governed by intracellular association between glycosyltransferases and glycoproteins.

研究分野：構造生物学、糖鎖生物学

キーワード：3次元構造 糖鎖修飾 糖転移酵素 細胞内輸送 積荷受容体

1. 研究開始当初の背景

自然界に存在するタンパク質のおよそ半数は糖鎖修飾を受けており、それらタンパク質上に提示された糖鎖は生体内で様々な機能を担っている。言うまでもなくタンパク質はゲノム情報という鋳型に基づいた逐次的なプロセスを通じて作られるが、糖鎖の形成は糖転移酵素によって行われ、設計図となる鋳型は存在しない。そのため、糖鎖修飾は緻密な制御が難しく、一般に不均一性を示すものと考えられている。その一方で、あたかも設計図が存在するかの如く、ある特定のタンパク質に対してのみ起こる糖鎖修飾が多く知られている。

例えば、 α -ジストログリカン (α DG) 上に発現しているラミニン結合性を有する糖鎖は、他のタンパク質上での発現は殆ど起こっていないことが知られている。 α DG は神経系において、神経細胞の移動に関与しており、脳形成において重要な役割を担っている。ラミニン結合性糖鎖は、2 糖からなるコア M1 と呼ばれる短い糖鎖と、2 つのリン酸-リビトール残基を有する 5 糖の糖鎖に連結した長鎖の Xyl-GlcA リピート糖鎖からなるコア M3 と呼ばれる巨大な糖鎖の少なくとも 2 本の極めて独特な構造からなっている。ラミニン結合性糖鎖合成において、タンパク質特異的な糖鎖修飾を制御する分子メカニズムが存在している可能性が考えられるが、その詳細は全くと言って明らかにされていない。

2. 研究の目的

「タンパク質の糖鎖修飾はどのようにして制御されているか？」という問いに対して、既存の生物学における統一的なコンセンサスはない。本研究では、ラミニン結合性糖鎖合成の初期段階に関与する GlcNAc 転移酵素 AGO61 に焦点をおき、立体構造解析を通じて本酵素の作動メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、糖タンパク質の細胞内輸送と糖鎖修飾の関連性の探査を行うことを目的として、糖タンパク質の細胞内輸送に関わる積荷受容体 ERGIC-53/MCFD2 の構造機能解析を行った。こうして得られた立体構造情報を活用することによって、特定の糖鎖を目的のタンパク質に自在に発現させる糖鎖編集技術を確立することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、X 線結晶構造解析を軸とする構造生物学的手法を用いて「タンパク質の糖鎖修飾の特異性を決定する分子機構」を解き明かすことを目指した。具体的には、(1) ラミニン結合性糖鎖合成の初期段階に関与する GlcNAc 転移酵素 AGO61 の 3 次元構造を X 線結晶構造解析により決定した。さらに、(2) NMR を用いた相互作用解析と細胞生物学的アプローチを通じて、糖タンパク質の細胞内輸送と糖鎖修飾の関連性の探査を行った。

4. 研究成果

(1) ラミニン結合性糖鎖合成機構の構造基盤の解明

これまでに研究代表者が所属するグループでは、GlcNAc 転移酵素 AGO61 (別名 POMGnT2) が α -ジストログリカン (α DG) 上に発現しているラミニン結合性糖鎖合成の初期段階に関与し、また本糖鎖合成に関わる幾つかの酵素と分子複合体を形成することを明らかにしつつある。すなわち、AGO61 は複合体形成を介してこれらの酵素と協働することによって、タンパク質特異的な糖鎖修飾を実現している可能性が示唆される。

本研究を通じて、ヒト由来 AGO61 の結晶構造を 2.80 オングストロームの分解能で決定した。その結果、AGO61 は大きな触媒ドメインと小さなフィブロネクチン III 型 (FN3) ドメインが約 15 残基のリンカーを介して繋がれた構造をとっていることが明らかになった。興味深いことに、結晶中において AGO61 は FN3 ドメインが介して 2 量体構造を形成していることを明らかになった (図 1)。さらに、超遠心分析を行った結果、溶液中において AGO61 はもっぱら 2 量体を形成していることが明らかになった。また、高速原子間力顕微鏡解析の結果においても、AGO61 は単量体構造ではなく、結晶構造で見られたような 2 量体構造をとることがわかった。AGO61 の 2 量体構造中において、一方のサブユニットの触媒ドメインと他方のサブユニットの FN3 ドメインと一体となって基質認識部位を形成している可能性が示唆された。このことは、AGO61 が

α DG の特定のアミノ酸配列におけるマンノース残基に GlcNAc を転移するタンパク質特異的な糖鎖修飾の実現に寄与しているものと考えられる。

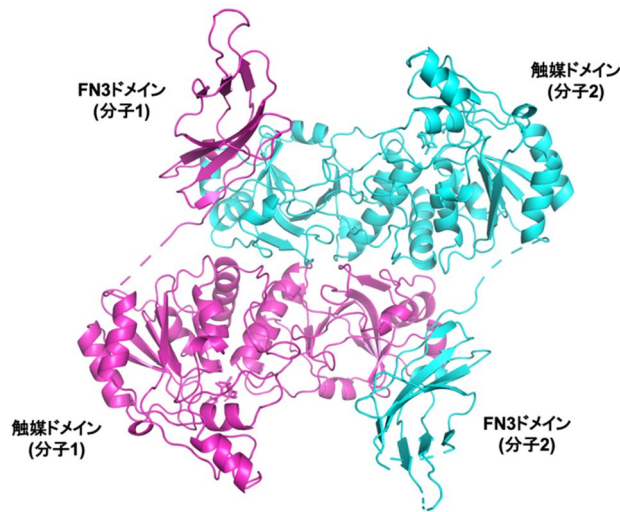


図 1: X 線結晶構造解析により明らかにした AGO61 の 3 次元構造

AGO61 はフィブロネクチン III 型 (FN3) ドメインを介して 2 量体を形成して機能することが明らかになった。

(2) 糖タンパク質の細胞内輸送と糖鎖修飾の関連性の探査

タンパク質の糖鎖修飾の特異性を決定する分子機構の解明に向けて、糖タンパク質の細胞内輸送と糖鎖修飾の関連性について研究を進めた。具体的には、血液凝固因子欠損症の原因遺伝子産物である積荷受容体 ERGIC-53/MCFD2 の複合体が担う、血液凝固第 V・第 VIII 因子の細胞内輸送機構に着目した。NMR 解析の結果、MCFD2 は第 1 因子中のアミノ酸 10 残基からなるアミノ酸配列を特異的に認識していることが判った。この配列を取り除くと第 1 因子の分泌量が著しく低下することから、この配列は MCFD2 が第 1 因子を効率的に運ぶための目印として機能していることを突き止めた。また、この配列をエリスロポエチンなどのモデル糖タンパク質に組み込み、その蛍光イメージングを行うことで、配列導入が細胞内輸送に及ぼす効果を定量評価した。その結果、それらの糖タンパク質の細胞内の輸送効率が向上し、分泌量が 2-3 倍も上昇することが明らかになった。さらに興味深いことに、本配列を組み込んだ糖タンパク質のシアル酸修飾様式が野生型のものと比較して劇的に変化することが見出された[Yagi *et al.* (2020) *Nature Commun.* 11, 1368]。この結果は、本研究で見出されたアミノ酸配列が、細胞内の積荷糖タンパク質の輸送経路における“パスポート”として働いていることを示している。また、特定の糖鎖修飾を担う糖転移酵素と糖タンパク質の細胞内の会合機会の有無が規定されることにより、タンパク質の糖鎖修飾の特異性を決定されるという新たな分子機構が存在する可能性が見えてきた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Satoh Tadashi, Nishio Miho, Suzuki Kousuke, Yagi-Utsumi Maho, Kamiya Yukiko, Mizushima Tsunehiro, Kato Koichi	4. 巻 76
2. 論文標題 Crystallographic snapshots of the EF-hand protein MCFD2 complexed with the intracellular lectin ERGIC-53 involved in glycoprotein transport	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 216 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X20005452	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 Yagi, H., Yagi-Utsumi, M., Honda, R., Ohta, Y., Saito, T., Nishio, M., Ninagawa, S., Suzuki, K., Anzai, T., Kamiya, Y., Aoki, K., Nakanishi, M., Satoh, T., and Kato, K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Improved secretion of glycoproteins using an N-glycan-restricted passport sequence tag recognized by cargo receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15192-1	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hirokazu Yagi, Taiki Saito, Rino Yamada, Saeko Yanaka, Maho Yagi-Utsumi, Tadahi Satoh, Tatsuya Suzuki, Satoshi Goto, Tomomi Nemoto, Yusaku Ohta, Kazuhiro Aoki, Shinji Takada, and Koichi Kato
2. 発表標題 Protein-specific glycosylation controlled by sub-Golgi resident glycosyltransferases
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koichi Kato, Saeko Yanaka, Tokio Watanabe, Tatsuya Suzuki, Rina Yogo, Tadashi Satoh, Takumi Yamaguchi, and Hirokazu Yagi
2. 発表標題 Dynamic Views of Oligosaccharides and Glycoproteins Provided by Experimental and Computational Observations
3. 学会等名 3rd Australasian Glycoscience Symposium (3rd AGS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koichi Kato, Tatsuya Suzuki, Methanee Hiranyakorn, Saeko Yanaka, Tadashi Satoh, Takumi Yamaguchi, Hirokazu Yagi, Maho Yagi-Utsumi
2. 発表標題 NMR characterization of conformational dynamics of carbohydrate and ubiquitin chains as post-translational protein modifiers
3. 学会等名 ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢木宏和, 渡辺大輝, Ganser Christian, 金 明美, 吉田早希, 佐藤匡史, 梅澤芙美子, 柚木康弘, 守島 健, 杉山正明, 内橋貴之, 加藤 晃一
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡を用いた糖転移酵素の分子構造動態解析
3. 学会等名 第30回 日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤匡史、加藤 晃一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 名古屋大学出版会	5. 総ページ数 83-95
3. 書名 「タンパク質の品質管理とN型糖鎖」、糖鎖生物学 (北島 健、佐藤 ちひろ、門松 健治、加藤 晃一編)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等 http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/sbk/index.html
--

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