

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19328

研究課題名(和文)糖鎖を利用したクライオ電子顕微鏡解析の問題克服と自然免疫受容体TLRへの応用

研究課題名(英文)Overcoming the problems in CryoEM analysis using sugar chain and its application to the innate immune receptor, TLR

研究代表者

清水 敏之(Shimizu, Toshiyuki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：30273858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：まずタンパク質のPEG化に代表されるタンパク質化学修飾によってCryoEM解析における問題(凝集やOrientation bias)を解決することを試みた。その結果いくつかのタンパク質で有効であることがわかった。グリコシダーゼであるEndoHで処理するとタンパク質に単糖を残して糖鎖(GlcNAc)を切断することができる。EndoH処理あり、なしのTLR7サンプルはOrientation biasを解決するまでにはいたらなかった。糖鎖処理の有無に加え、Tagの切断の有無などの条件検討も必要だと思われる。人為的に糖鎖サイトを導入すると、タンパク質の発現などにも影響することもあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PEG化などの化学修飾は容易に試みることができる方法であり、クライオ電子顕微鏡解析で問題点がある場合は試す価値のある方法である。一方糖鎖導入は手間のかかる方法でありOrientation biasを解決するまでにはいたらないが、タンパク質の物性を変えることも期待できるので試行する価値はあると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tried to solve the problems in CryoEM analysis (aggregation, orientation bias etc) by the chemical modification (PEGylation). PEGylation effectively work in some proteins, allowing the structural analysis. TLR7 is a glycoprotein and we prepared the TLR7 trimmed by EndH, and no trimmed TLR7. However, orientation bias in CryoEM analysis was not improved in both cases. In addition, introduction of glyco-sites sometimes affect the expression level of the protein.

研究分野：構造生物学

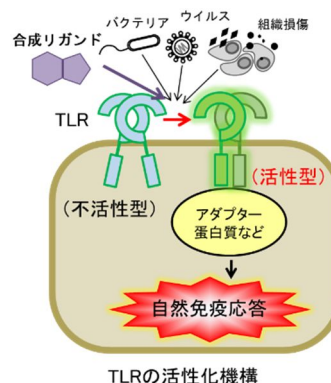
キーワード：クライオ電子顕微鏡 Orientation bias 糖鎖

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年クライオ電子顕微鏡による単粒子解析が飛躍的に進み、数々のタンパク質構造が解析されている。しかしながら解析途中でいくつもの問題点に直面する。代表的なものはタンパク質の凝集やグリッド作成時の Orientation bias である。後者は単粒子解析では分子がランダムに配向しなければならないが、一方向になってしまい三次元構成が困難になるという問題である。

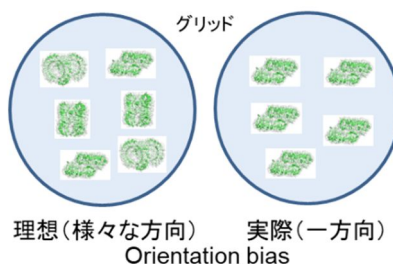
我々はこれまで自然免疫応答における代表的病原体センサーの一つ Toll 様受容体(TLR)の構造科学的研究を進めてきた。TLR の中でも TLR7 は一本鎖 RNA をリガンドとする TLR であり、このような核酸認識 TLR は合成リガンドによっても強力に免疫応答を誘導することから抗ウイルス薬やがん免疫賦活剤としての利用が期待される。実際に TLR7 のアゴニストであるイミキモドは尖圭コンジローマの治療薬として用いられている。その一方で、過剰な核酸認識 TLR の応答は自己免疫疾患を発症させる。近年、全身性エリテマトーデス (SLE) 治療の標的分子の一つとして TLR7 が脚光を浴びており、アンタゴニストは SLE の新規の治療薬として有望である。



我々は X 線結晶解析により TLR と種々のリガンドとの複合体構造を解明したが、クライオ電子顕微鏡を用いた TLR の構造解析にも着手した。このとき前述した Orientation bias の問題点に直面した。この問題点を解決するために様々な手法が提唱されているが、その一つはタンパク質の PEG 化に代表されるタンパク質化学修飾である。しかしながら化学修飾であるため修飾サイト、修飾効率のコントロールが困難な場合がある。

### 2. 研究の目的

TLR が糖タンパク質であることを利用し、人為的なコントロールが可能である糖鎖修飾によってこの問題点を解決する発想を得た。もう一つ強調したい点は X 線結晶解析の短所の一つである結晶場による影響をクライオ電子顕微鏡で克服することである。本申請では糖鎖修飾な人為

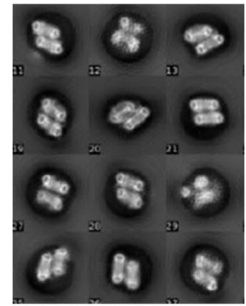


コントロールによる配向性の解決と TLR の活性化機構を明らかにすることを研究目的とする。さらに糖鎖導入が他のタンパク質にも適用可能であるか可能性を探る。

### 3. 研究の方法

クライオ電子顕微鏡による TLR 分子の単粒子解析を行うとき現在直面している困難な点はグリッド作成の時に分子の向きがある一方向にそろってしまっていることである (右図)。単粒子解析を行うためには向きがランダムに並んでいなければならないが、

Orientation bias のために分解能が向上していない。TLR7 には 14ヶ所の N 型糖鎖結合部位があり、これを利用することによりこの問題点を解決する。すべてに糖鎖を導入、N 末側だけあるいは C 末側だけに糖鎖修飾を導入、など様々な組み合わせによって配向が変化するかどうかを調べる。さらにループ部位に人為的に糖鎖付加部位を導入することも検討する。糖鎖付加の有無によってリガンド結合能が変化しないことはチェックする。



TLR7の2D解析  
(一方向に偏る)

#### 4. 研究成果

糖鎖導入位置の検討を行う一方で、タンパク質の PEG 化に代表されるタンパク質化学修飾によってタンパク質の凝集や Orientation bias を解決することを試みた。その結果いくつかのタンパク質で有効であることがわかった。その結果は論文として報告した。EndoH は高マンノースのキトビオースコア内部や N 結合型糖タンパク質のハイブリッドオリゴ糖内部で糖鎖を切断するグリコシダーゼである。この酵素で処理するとタンパク質に単糖を残して糖鎖 (GlcNAc) を切断することができる。EndoH 処理あり、なしの TLR7 サンプルは Orientation bias を解決するまでにはいたらなかった。糖鎖処理の有無に加え、Tag の切断の有無などの条件検討も必要だと思われる。人為的に糖鎖サイトを導入すると、タンパク質の発現などにも影響することもあった。タンパク質側の改変とグラフェンなどのグリッド利用など多面的な検討が必要だと思われる。

Improving particle quality in cryo-EM analysis using a PEGylation method (2021)

Zhang Z, Shigematsu H, Shimizu T, Ohto U

*Structure* 29, 1192-1199

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Zhang Zhikuan, Shigematsu Hideki, Shimizu Toshiyuki, Ohto Umeharu	4. 巻 29
2. 論文標題 Improving particle quality in cryo-EM analysis using a PEGylation method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 1192 ~ 1199.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.str.2021.05.004	査読の有無 無
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://kouzou.f.u-tokyo.ac.jp/>

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