

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24619014

研究課題名(和文) IgG Fc領域糖ペプチドにおけるペプチド 糖鎖間相互作用と構造機能関係

研究課題名(英文) Ion mobility mass spectrometry of IgG Fc glycopeptides from different subclasses

研究代表者

田尻 道子(Tajiri, Michiko)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・流動研究員

研究者番号：70581312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖は物理化学的性質およびタンパク質の生物活性を変化させる。糖鎖とその付加部位近傍のアミノ酸配列との関係を見るため、糖ペプチドを材料として解析を行った。気相における糖ペプチドの立体構造および衝突断面積について、イオンモビリティ質量分析と理論計算を行い、糖鎖がペプチド骨格に与える構造的影響を解析した。

気相において糖ペプチドはペプチドに比べてコンパクトな立体構造をとっており、付加部位近傍の糖とペプチド骨格との相互作用が糖ペプチドの立体構造に寄与していることが示唆された。糖鎖構造に因らず、糖の付加がペプチド骨格の立体構造に大きく影響を与えることを示した。

研究成果の概要(英文)：Glycosylation alters the physicochemical properties and biological activities of proteins. We analyzed glycopeptides using ion mobility mass spectrometry (IMS MS) and compared the data with the conformations calculated by molecular mechanics (MM) to investigate the interaction between protein and glycan in the vicinity of the attachment site.

In general, the collision cross sections (CCSs) of glycopeptides were smaller than those of peptides. Our findings from IMS MS and MM calculation suggested that the interaction between the innermost glycan and peptide backbone contributes to the compactness of glycopeptide ions in gas phase and the attachment of glycans gives a large influence on the conformation of peptide backbones independent of the glycan structures.

研究分野：質量分析学

キーワード：糖ペプチド 糖タンパク質 イオンモビリティ 質量分析 衝突断面積 糖鎖 - ペプチド間相互作用 免疫グロブリンG

1. 研究開始当初の背景

第3の生命鎖と呼ばれる糖鎖の機能は、糖タンパク質に関して言えば、大きく2つに分けられる。ひとつは、その物性（物理化学特性）に基づく構造的効果であり、タンパク質の安定化や水溶性、さらには glycoalyx と呼ばれるような集合体としてのバリア等の機能、すなわち静的な機能である。もうひとつはリガンドとしての機能であり、細胞間の認識からインフルエンザのような感染まで広く生物（生命）機能と関わっている。本研究はこれらの静的および動的な糖鎖機能のいずれとも関係する。この動的機能に関して言えば、特定の末端構造、特殊な糖鎖構造、さらにはリン酸化や硫酸化による追加的な修飾構造がその役割を担っていることが糖鎖の特徴であり、そのような特異的な構造は通常、タンパク質の特定付加部位に存在し、しかも多様な糖鎖構造ヘテロジェネイターのなかの一構造として存在している。

免疫グロブリン G (IgG) の Fc 領域内の 297 番目のアスパラギン (Asn) に結合する N 型糖鎖（複合型二本鎖）は、IgG の補体活性化や Fc γ 受容体介在性の活性などの Fc エフェクター機能に必要不可欠であり、高い修飾率で還元末端 N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に α 1,6 結合フコース（コアフコース）が付加している。このフコースを欠失させることで抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) は飛躍的に増強する。また、バイセクティング GlcNAc 付加によっても ADCC 活性が増強される。このような「糖鎖リモデリング」は抗体医薬において利用されているが、特定糖鎖がタンパク質機能を変化させるメカニズムは必ずしも十分に理解されていない。

我々は、これまで糖鎖構造解析に関する研究を行ってきたが、その基本的な考えは、「従来の糖鎖解析（糖タンパク質から遊離した糖鎖の解析）ではグライコ・プロテオミクスには対応できないため、部位特異的な糖鎖構造（より正確には「部位特異的な糖鎖プロファイル」）を解析するための“糖ペプチド”の質量分析の開発と実践に集中する」ということであった。そして、構造・機能関連 (structure-function relationship) の理解に必要な特定部位の糖鎖構造プロファイル解析 (site-specific glycan profiling) について成果を発表してきた。

質量分析による構造解析において利用されるタンデム質量分析では、衝突誘起解離によって生成するプロダクトイオンが異性体間で異なることはよく知られ、そのことは糖鎖構造解析にも利用されている。しかし、我々は、開裂に必要な衝突エネルギーレベルが異性体間で異なっているという基本的な部分に注目した。そのような研究として、コアフコースと Lewis フコースをもつ糖ペプチド異性体の衝突誘起解離について詳細な検討を行った。そこで観察された違いは、気相

中での糖ペプチドイオンの立体構造の違いを概ね反映し、ひいては（気相における現象ではあるものの）生体内での特定糖鎖付加による付加部位近傍ペプチド（骨格）構造への影響をより一般的な概念として証明できると考えた。

この考えは、O 型（ムチン型）糖鎖において、セリン (Ser) /スレオニン (Thr) に結合する N アセチルガラクトサミン (GalNAc) のアミドプロトンが付加部位 Ser/Thr に隣接するアミノ酸残基のカルボニル酸素との間で水素結合を形成し、付加部位近傍のペプチド骨格のフレキシビリティを制限するという報告 (Coltart et al. J Am Chem Soc 124:9833-9844, 2002) や、高マンノース N 型糖鎖を構成する 14 糖のうち付加部位近傍のわずかに 3 糖 (GlcNAc2Man) がタンパク質の折り畳みおよび安定性を規定しているという報告にも触発された。この知見は N 型糖鎖の基本 3 糖コア構造の重要性を表しており、これらの修飾糖が糖鎖付加近傍のペプチド骨格に影響を与えているのではないかと考えた。

ヒト IgG には 4 つのサブクラスがあるが、エフェクター機能はサブクラスごとに異なっており、また、サブクラス間でアミノ酸配列は少しずつ異なっている。糖鎖が付加する Asn297 周辺では、それぞれのサブクラスで 296 番目と 300 番目がフェニルアラニン (Phe) であるかチロシン (Tyr) であるかが異なっている。エフェクター機能には糖鎖付加が必要不可欠であることから、糖鎖付加部位近傍の配列の違いが機能に影響を及ぼしているのではないかという仮説をたて、糖ペプチドにおける糖鎖 - ペプチド間の相互作用を明らかにすることにより、サブクラス間の機能の違いを証明できると考えた。

2. 研究の目的

ヒト IgG には 4 つのサブクラスがあり、エフェクター機能はサブクラスごとに異なっている。エフェクター機能に必要な N 型糖鎖の付加部位近傍のアミノ酸配列がサブクラスで異なっており、その配列の違いが機能に影響を及ぼしているという仮説をたて、本研究では、糖鎖リモデリングを行った糖ペプチドを試料として、イオンモビリティ質量分析法によって糖鎖 - ペプチド間の相互作用の変化を衝突断面面積変化として計測し、糖ペプチドにおける糖鎖 - ペプチド間の相互作用と構造機能関係を明らかにすることで、その仮説を証明すること目的とする。

3. 研究の方法

(1) (糖) ペプチド試料

標品あるいは血清より得た IgG からトリプシン消化によってサブクラスごとにペプチド配列の異なる糖ペプチドを得た。エキソグリコシダーゼ及びエンドグリコシダーゼによって糖鎖が原型の構造から GlcNAc 2 糖の構

造までの異なる糖ペプチドを得た。コア GlcNAc 1 糖の糖ペプチドおよびペプチドに関しては化学合成によって得た。

また、6 種類のヒト血清由来の糖タンパク質からトリプシンおよびエンドグリコシダーゼ M 消化によってコア GlcNAc 1 糖の糖ペプチドを得た。衝突断面積が既知のペプチドは 3 種類のタンパク質のトリプシン消化から得た。

(2) イオンモビリティ質量分析

(糖) ペプチド試料は 20%メタノール/0.1%ギ酸に溶解し、ナノスプレーイオン化法によってプロトン化分子を生成し、イオンモビリティ質量分析計 SYNAPT G2 HDMS (Waters)によって計測を行った。ドリフトガスは窒素を用いた。2 価のプロトン化分子のドリフトタイムを測定し、衝突断面積を得た。

(3) 分子化学計算

ペプチドおよびコア GlcNAc 糖ペプチドの 2 価のプロトン化分子に関して、CONFLEX7 を用いて分子力学法 (MM) を用いたコンフォメーション探索を行った。力場は MMFF94s を用いた。得られたコンフォメーションの衝突断面積は MOBCAL プログラムを用いて計算した。実験で得られた CCS 値と比較し、糖鎖がペプチド骨格に与える構造的影響を解析した。

4. 研究成果

IgG1 と IgG2 のアミノ酸配列はそれぞれ EEQYNSTYR (exact mass 1188.5)、EEQFNSTFR (1156.5)である。2 価のプロトン化分子のイオンモビリティ質量分析 (IMS MS) より、ペプチドの衝突断面積は IgG1 の方が IgG2 よりも大きく分子量とリニアな関係であったのに対し、最も付加部位近傍のコア GlcNAc 1 糖が付加することで IgG1 が IgG2 に比べて小さくなった。この傾向は糖鎖が大きくなっても保持されており、我々はこのことに注目した。IgG3 (EEQYNSTFR) と IgG4 (EEQFNSTYR) は同じ分子量であるにも関わらず、ペプチドとコア GlcNAc 糖ペプチド共に CCS は IgG3 の方が IgG4 よりも大きかった。

分子力学法 (MM) コンフォメーション探索によって得られた構造から、IgG ペプチドおよびコア GlcNAc 糖ペプチドにおいて、糖鎖とチロシンの水酸基がペプチド骨格と水素結合を形成し、コンフォメーションに影響を与えていた。水素結合形成部位はペプチド配列に大きく依存し、サブクラス間で全く異なっていた。この結果から糖とペプチド骨格間の水素結合形成がコンフォメーションに影響を与えると考えられ、また、糖鎖付加部位近傍のペプチド配列の違いが機能に影響を与えることを示唆している。

MM コンフォメーション探索で得られた構造の CCS と実験で得られた CCS を比較したところ、相対的に同じ傾向を示し、定性的に一致していた。

また、多数のコア GlcNAc 糖ペプチドとペプチドの IMS MS から、コア GlcNAc 糖ペプチドはペプチドに比べてコンパクトな構造をとっていた。従って、最も付加部位に近いコア GlcNAc とペプチド骨格との相互作用がコンパクトな構造をとることに寄与していることが示唆された。このことは、糖鎖構造に因らず、糖の付加がペプチド骨格の立体構造に大きく影響を与えることを示している。

本研究では N 結合型糖ペプチドを扱ったが、得られた知見から、ムチン型や O-GlcNAc などのより小さい糖が付加する O 結合型糖鎖に関しても、付加部位近傍のペプチド骨格に大きく影響を与えているであろうことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[論文発表] (計 1 件)

1. Takahashi M, Hasegawa Y, Ikeda Y, Wada Y, Tajiri M, Ariki S, Takamiya R, Nishitani C, Araki M, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kuroki Y. "Suppression of heregulin β signaling by the single N-glycan deletion mutant of soluble ErbB3 protein" *J Biol Chem.* **288**, 32910-32921 (2013) 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

1. Michiko Tajiri "Ion mobility mass spectrometry and MM conformational search of glycopeptides" The 30th ASMS Asilomar Conference (American Society for Mass Spectrometry) (招待講演), 2014 年 10 月 11 日, パシフィックグローブ (米国・カリフォルニア)
2. Michiko Tajiri, Takae Takeuchi, Yayoi Hongo, Takemichi Nakamura, Kenji Hirose, Yoshinao Wada "Ion mobility mass spectrometry and MM conformational search of glycopeptides" The 20th International Mass Spectrometry Conference (IMSC2014), 2014 年 8 月 26 日, ジュネーブ (スイス)
3. 田尻道子, 竹内孝江, 本郷やよい, 中村健道, 和田芳直 「糖ペプチドのイオンモビリティ質量分析と分子力学法を用いたコンフォメーション探索」 第 62 回質量分析総合討論会, 2014 年 5 月 14 日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪・吹田)
4. Michiko Tajiri, Takae Takeuchi, Yoshinao Wada "Ion mobility mass spectrometry and MM conformational search of glycopeptides" The 5th JCS International Symposium on Theoretical Chemistry, 2013 年 12 月 3 日, 東大寺総合文化センター (奈良・奈良) (招待ポスター発表)
5. 田尻道子, 竹内孝江, Feifei Zhu, Maissa M Gaya, 本郷やよい, 中村健道, David E Clemme, 和田芳直 「糖ペプチドのイオンモビリティ質量分析と分子力学法を用いたコンフォメーション探索」 第 61 回質量分析総合討論会, 2013 年 9 月 11 日,

つくば国際会議場エポカルつくば（茨城・つくば）

6. Michiko Tajiri “Ion mobility mass spectrometry of IgG Fc glycopeptides from different subclasses” The 4th Asia Oseania Mass Spectrometry Conference (招待講演) 2013年7月11日 台北（台湾）
7. Michiko Tajiri, Feifei Zhu, Maissa M Gaya, Yoshinao Wada, David E Clemmer “Ion mobility mass spectrometry of IgG Fc glycopeptides from different subclasses” The 61th ASMS Conference (American Society for Mass Spectrometry), 2013年6月11日, ミネアポリス（米国）
8. Michiko Tajiri, Yayoi Hongo, Takemichi Nakamura, Kenji Hirose, Yoshinao Wada “Ion mobility mass spectrometry of IgG Fc glycopeptides from different subclasses” The 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC2012), 2012年9月19日, 国立京都国際会館（京都・京都）
9. Michiko Tajiri, Yayoi Hongo, Takemichi Nakamura, Kenji Hirose, Yoshinao Wada “Ion mobility mass spectrometry of IgG Fc glycopeptides from different subclasses” The 60th ASMS Conference (American Society for Mass Spectrometry), 2012年5月21日, バンクーバー（カナダ）

6. 研究組織

(1)研究代表者

田尻 道子 (TAJIRI, Michiko)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター（研究所）・代謝部門・流動研究員

研究者番号：70581312

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

本郷 やよい (HONGO Yayoi)

独立行政法人理化学研究所・連携支援ユニット・専任技師

研究者番号：40435681

中村 健道 (NAKAMURA Takemichi)

独立行政法人理化学研究所・連携支援ユニット・専任研究員

研究者番号：10360611