

実施課題名 NMRによる複合糖質の構造解析技術の開拓

【背景】(実施課題の背景・目的を簡潔に具体的に記載してください。)

自然界に存在する蛋白質の約半数は糖鎖修飾をうけているが、糖鎖構造の複雑さゆえに、糖蛋白質の構造生物学研究は立ち遅れている。糖鎖は蛋白質に比べて官能基の多様性が乏しいためNMRピークの重なり合いが激しい。抗体は高分子量(150kDa)の多ドメイン糖蛋白質であるため、TROSYや磁場配向を利用した計測が構造情報の取得に甚だ有効である。したがって超高磁場でのNMR計測が重要な意味を持つ。本研究では抗体をモデル系として糖蛋白質のNMRを用いた構造手法解析を発展させることを目的とする。

【実施内容】(別紙の利用報告書に記載してある実施内容を簡潔に具体的に記載してください。)

申請者はこれまで、動物細胞をはじめとする真核生物発現系を用いることにより糖鎖を受けた抗体に安定同位体標識を施す技術を開発してきた。この技術基盤に基づいて、これまでヒトおよびマウス抗体のFc領域(50kDa)について、NMR信号の帰属を進めてきた。本研究を通じて900MHz超高磁場NMR計測およびTROSY法等を適用することにより、Fc領域の主鎖NMRシグナルの帰属を達成し、Fcと血中分子の相互作用解析を効率的に進めることができた。また、蛋白質部分のみならず、糖鎖部分についても帰属を行うとともに、Fc領域の蛋白質部分との相互作用に関する情報を得ることができた。さらには観測対象をIgG(150kDa)に拡張してNMR計測と解析を行った。部位特異的な重水素常識を施し、TROSY法を用いた計測を行うことで、IgGのシグナルを観測するのに成功した。観測することができた信号のうちFc領域に由来するものについて帰属に取り組み、それらすべての信号を帰属することができた。また、得られた結果に基づき、動的立体構造解析に取り組んだ。本研究を通じて得られる研究成果は、糖鎖修飾の生物学的意義を探究する学理の深化をもたらすとともに、抗体医薬をはじめ糖鎖修飾を伴う多くのバイオ医薬品の研究開発にも資するものと期待される。

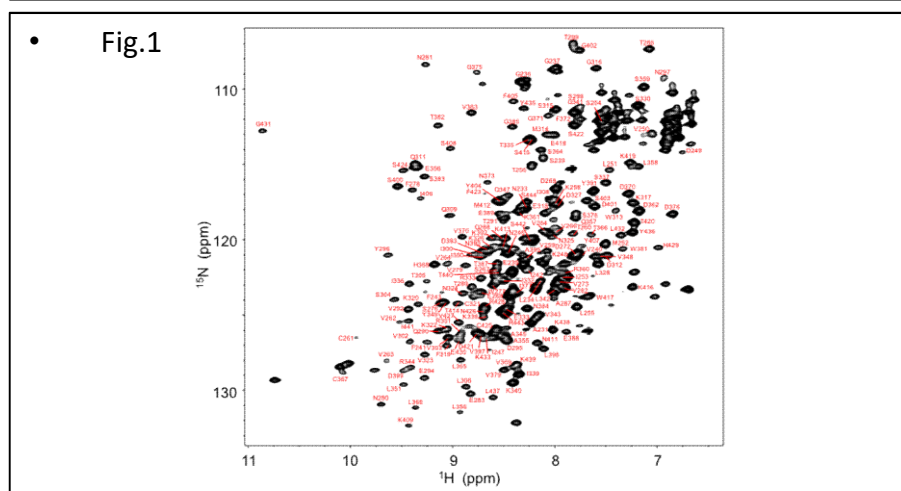


Fig.1 本研究課題を通じて達成された抗体のFc領域の主鎖NMR信号の主鎖の完全帰属

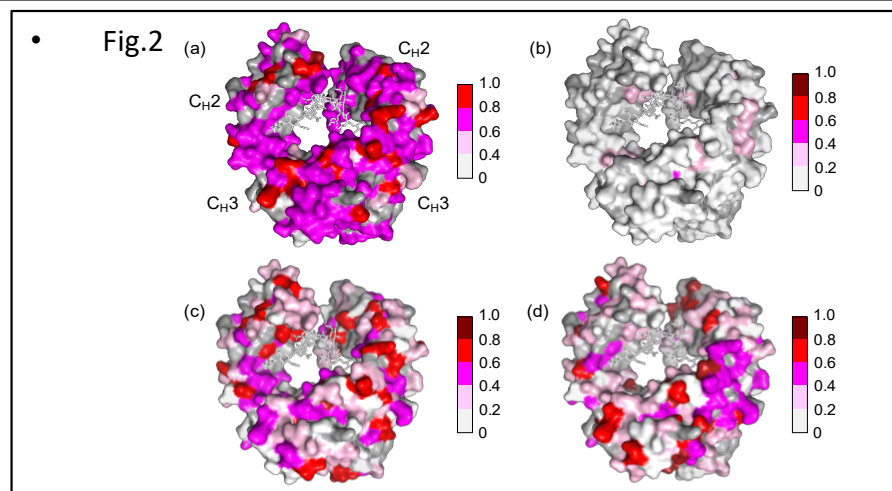


Fig.2 Fc領域の(a)血清中、(b)アルブミン存在下、(c)ポリクローナル抗体存在下、(d)ポリクローナル抗体Fab存在下におけるシグナル減弱強度のマッピング

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題
利用報告書

(課題実施者の方へ)

課題選定委員会にて、実施内容のフィードバックを行うため、ご記入下さい。本報告書については、必要な編集・加工を行った上で NMR 共用プラットフォームのホームページにて公開を致します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての発表や資料作成等のご協力をお願いする場合があります。

課題受付番号	プラットフォーム事務局記載欄		
利用課題名	NMRによる複合糖質の構造解析技術の開拓		
実施機関名	自然科学研究機構		
実施部署名	生命創成探究センター		
実施責任者管理職名・氏名	職名	教授	氏名 加藤 晃一
実施部署所在地	愛知県岡崎市明大寺町東山 5-1		
本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。)	自然界に存在する蛋白質の約半数は糖鎖修飾をうけているが、糖鎖構造の複雑さゆえに糖蛋白質の構造生物学研究は立ち遅れている。申請者は動物細胞をはじめとする真核生物発現系を用いることにより糖鎖修飾を受けた抗体の安定同位体標識技術確立しており、これをモデル系として糖蛋白質のNMR解析の可能性を追求してきた。糖鎖は蛋白質に比べて官能基の多様性が乏しいためNMRピークの重なり合いが激しい。抗体はまた高分子量(150kDa)の多ドメイン糖蛋白質であるため、TROSY や磁場配向を利用した計測が構造情報の取得に甚だ有効である。したがって超高磁場でのNMR計測が重要な意味を持つ。本研究では、こうした技術基盤を背景にNMRを用いた糖蛋白質の構造解析手法を発展させることを目的とする。本研究を通じて得られる研究成果は、糖鎖修飾の生物学的意義を探究する学理の深化をもたらすとともに、抗体医薬をはじめ糖鎖修飾を伴う多くのバイオ医薬品の研究開発にも資するものと期待される。		
利用実施時期、及び期間 (チェックボックスにチェックをおいれください)	平成 29 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日 総利用日数： 12 週と 3 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)		

利用施設 理化学研究所	NMR装置 (該当部分に ○)	利用装置① ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 (○) 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz 利用期間 1：平成 29 年 4 月 1 日～平成 29 年 4 月 9 日(1 週間 2 日間) 利用期間 2：平成 29 年 9 月 5 日～平成 29 年 9 月 10 日(6 日間) 利用期間 3：平成 29 年 10 月 2 日～平成 29 年 10 月 9 日(1 週間 1 日) 利用期間 4：平成 30 年 2 月 8 日～平成 30 年 2 月 18 日(1 週間 4 日) 利用期間 5：平成 30 年 3 月 5 日～平成 30 年 3 月 18 日(2 週間) 利用期間 6：平成 30 年 5 月 1 日～平成 30 年 5 月 21 日(3 週間) 利用装置② ・ () 溶液 600MHz、(○) 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz 利用期間 1：平成 29 年 10 月 20 日～平成 29 年 11 月 6 日(2 週間 4 日間)
その他の 利用施設	※4 NMR 施設以外の装置、支援などを利用した場合は記載してください	
成果の 概要	実施内容 (字数制限はありませんが 400 字～800 字以内(程度)でお書きください。)	※申請書との整合性にご配慮ください。 申請者はこれまで、動物細胞をはじめとする真核生物発現系を用いることにより糖鎖修飾を受けた抗体に安定同位体標識を施す技術を成功裡に開発してきた。この技術基盤に基づいて、これまでヒトおよびマウス抗体の Fc 領域(50kDa)について、NMR 信号の帰属を進めてきた。本研究を通じて 900MHz 超高磁場 NMR 計測および TROSY 法等を適用することにより、Fc 領域の主鎖 NMR シグナルの帰属を達成し、Fc と血中分子の相互作用解析を効率的に進めることができた。また、蛋白質部分のみならず、糖鎖部分についても帰属を行うとともに、Fc 領域の蛋白質部分との相互作用に関する情報を得ることができた。さらには観測対象を IgG (150kDa) に拡張して NMR 計測と解析を行った。部位特異的な重水素常識を施し、TROSY 法を用いた計測を行うことで、IgG のシグナルを観測することに成功した。観測できた信号のうち Fc 領域に由来するものについて帰属に取り組み、それらすべての信号を帰属することができた。また、得られた結果に基づき、動的立体構造解析に取り組んだ。本研究を通じて得られる研究成果は、糖鎖修飾の生物学的意義を探究する学理の深化をもたらすとともに、抗体医薬をはじめ糖鎖修飾を伴う多くのバイオ医薬品の研究開発にも資するものと期待される。

	本課題により得られた成果と当初目標との比較 (字数制限はありませんが 400 字～800 字以内(程度)でお書きください。)	本研究を通じて 900MHz 超高磁場 NMR 計測および TROSY 法等を適用することにより、Fc 領域の主鎖 NMR シグナルの帰属が十分に達成され、Fc と血中分子の相互作用解析を効率的に進めることができた。また、蛋白質部分のみならず、糖鎖部分についても帰属を行い、Fc 領域の蛋白質部分との相互作用に関する情報を得ることができた。さらには観測対象を IgG (150kDa) に拡張して NMR 計測と解析を行った。部位特異的な重水素常識を施し、TROSY 法を用いた計測を行うことで、IgG のシグナルを観測することに成功した。観測できた信号のうち Fc 領域由来のものについて帰属に取り組み、すべての信号を帰属することができた。このように当初の目標通り、高分子量糖タンパク質である IgG の NMR 計測と解析に取り組み、その動的立体構造解析の基盤を確立することができた。また、本研究を通じて得られた結果に基づき、Fc 領域の立体構造ダイナミクス解析に取り組むことができた。
	成果発表	※本課題利用による論文・学会発表・特許（出願中含む）等で本事業に関連する謝辞を記載頂いた成果について、可能な範囲で記載して下さい。 Saeko Yanaka, Toshio Yamazaki, Rina Yogo, Hirokazu Yagi, and Koichi Kato An NMR approach for characterizing antibody interactions in serum environment <i>Molecules</i> 22, 1619 (2017) 谷中冴子, 山崎俊夫, 與語理那, 矢木宏和, 加藤晃一 血清中での抗体間の相互作用解析 第 57 回 NMR 討論会 2018 年 9 月 20 日 (札幌); L3-11.
	今後の展開 (字数制限はありませんが 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)	※特に、本課題により得られた NMR 技術を用いた応用について 本研究を通じて得られた糖タンパク質の安定同位体標識と NMR 計測・解析に関する知見に基づいて、Fc 領域の動的立体構造解析に取り組むことができた。しかしながら、そうした情報は Fc 領域の特定の部位についてしか明らかにできておらず、未だ十分に達成されているとは言い難い。また、これまでは Fc 領域について重点的に NMR 解析に取り組んできたが、IgG 全長については側鎖信号帰属に困難を伴っている。今後は高分子量糖タンパク質の動的立体構造解析に取り組むとともに、より高分子量の糖タンパク質についての NMR 計測・解析手法を確立することが必要である。

社会・経済への波及効果の見 通し (字数制限はありません 300 字～600 字以内(程度)でお書 きください。)	本研究を通じて得られた研究成果は糖鎖修飾の生物学的意義を探究する学理の 深化をもたらすとともに、抗体医薬をはじめ糖鎖修飾を伴う多くのバイオ医薬品の 研究開発にも資するものと期待される。
利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望	※本施設を利用して良かった点、改善してほしい点、提案事項など、施設利用 の感想を記載してください。なお複数機関の利用の場合は、どの施設に対する 感想かも明記して下さい。 理化学研究所の計測、解析における密な情報提供・支援体制により、研究の展開 が加速され、効率的に成果発表まで至ることができた。施設の素晴らしさを実感す るとともに、大変感謝している。
今後の NMR 共用プラットフォ ームに対する期待	
成果公開延期の希望の有無	※特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は必ず事前に利用機関 先の課題担当者にご相談ください。 () あり : (○) なし 「あり」の場合理由 :
その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。)