

実施課題名: 糖鎖の構造決定および糖鎖-タンパク質の相互作用解析

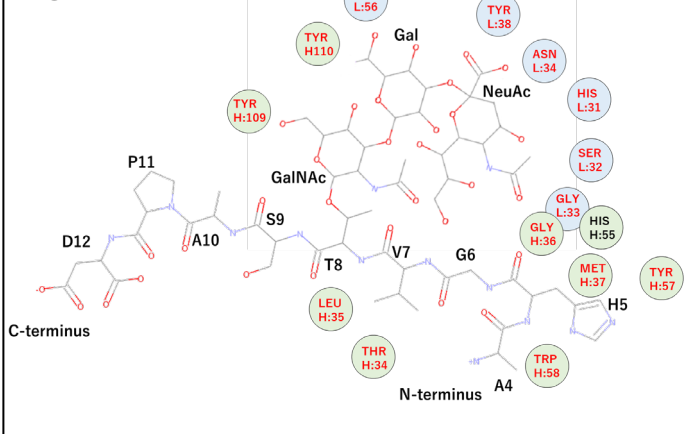
【背景】

糖鎖-タンパク質複合体のX結晶構造解析を行う場合に、その分子間相互作用の弱さから、糖鎖リガンドの電子密度像を得られない場合も多い。一方、NMR法は弱い相互作用の検出を得意としており、糖鎖-タンパク質の原子レベルでの相互作用解析の手法として適している。本課題の目的は、NMR法による未知糖鎖の化学構造の決定、および糖鎖とタンパク質の弱い相互作用の検出・解析を行い、得られたNMR情報を組み込んで糖鎖-タンパク質の複合体モデルを構築するためのフローを構築することである。

【実施内容】

- (i) MY.1E12はMUC1上の短鎖化糖鎖部分をエпитープとして認識する抗体であり、その特異性からがんの診断や治療への応用が期待されている。本研究ではNMR解析と計算化学的手法を組み合わせることにより、MUC1糖ペプチドとMY.1E12抗体の相互作用を解析した。その結果、MY.1E12は、*O*-結合型糖鎖のみならずその糖鎖修飾部位周辺のペプチド領域を認識していることが判明した。
- (ii) *N*-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ-IVa(GnT-IVa)は、糖鎖中の α 1-3マンノース上に β 1-4 GlcNAc分岐を形成するが、興味深いことにC末端領域にレクチンドメインが見いだされた。安定同位体利用NMR法により、GnT-IVaレクチンドメインは糖鎖生成物と選択的に相互作用することを明らかにし、その解離定数を 3.2×10^{-4} Mと算出した。
- (iii) マトリグリカン6糖は、繰り返し2糖である-3Xyl α 1-3GlcA β 1-からなるコアM3糖鎖を構成する重要な多糖であり、ラミニンと相互作用することにより筋組織を安定化させている。本研究では、マトリグリカン6糖とラミニン- α 2との相互作用についてSTD-NMRおよびバイオレイヤー干渉法により解析を行った。バイオレイヤー干渉法により、その相互作用はCa²⁺依存的であり、解離定数は 7.5×10^{-8} Mと算出した。またSTD-NMR法から、マトリグリカン6糖の中央部分がラミニンによって認識されることを明らかにした。

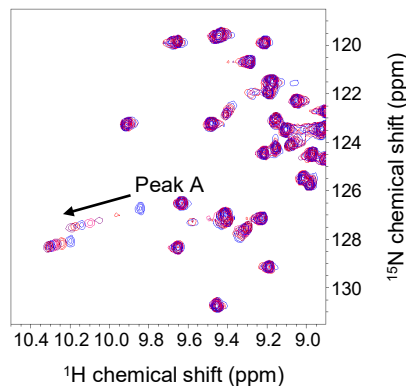
Fig. 1



NMRデータを組み入れたMUC1糖ペプチドとMY.1E12抗体の相互作用モデル構築

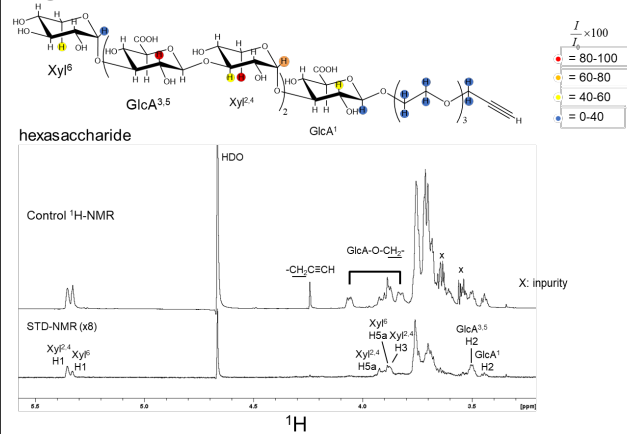
Fig. 2

糖鎖リガンド: GlcNAc β 1-2Man



¹⁵N標識GnT-IVaレクチンドメインと糖鎖リガンドを用いたNMR滴定実験

Fig. 3



化学合成マトリグリカン6糖とラミニンとの相互作用のSTD-NMRによるエピトープ解析

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF21-01-041			
利用課題名	糖鎖の構造決定および糖鎖-タンパク質の相互作用解析			
所属機関	東北医科薬科大学			
所属部署	分子生体膜研究所			
役職・氏名	役職	教授	氏名	山口芳樹
利用実施時期、及び期間	2022年 2月 4日 ~ 2024年 2月 29日 総利用日数: 35日 <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

本課題は、(i) 構造未知の糖鎖試料に対して、NMR法を用いて構造を決定すること、(ii) NMR法による糖鎖とタンパク質の弱い相互作用の検出・解析を行い、得られたNMR情報を組み込んで糖鎖-タンパク質の複合体モデルを構築するためのフローを構築すること、(iii) 安定同位体標識を施した糖タンパク質を用いて、糖鎖-ペプチド鎖の分子内相互作用を検出する方法の最適化を行うことを目的とした。

未知糖鎖試料のサンプル量は限られている場合が多く、NMR信号の縮重も激しく、高感度・高磁場でのNMR測定が必須になる。また構造既知の合成糖鎖とタンパク質の弱い相互作用をNMR法で検出・解析する際には、測定法の選択・試料条件の検討が必要であるが、系統的にそれらを行うには至っておらず、毎回試行錯誤的である。申請者が所属する大学の600 MHz NMR装置は共用であることによる制約があり、また感度の面でも不十分である。東北大の600 MHz・800 MHzの装置は高感度極低温プローブを装着しており、かつ高い分解能を達成できる。申請者は先端研究基盤共用促進事業(SHARE)のプログラムに参画して、東北大学のNMR装置を用いて遠隔で測定し、データの共有を行ってきた。その経験を活かしてNMR共用プラットフォームのスムーズな利用を試みた。

2. 成果の概要

実施内容

糖鎖のもつ生理機能を明らかにするためには、生化学・分子生物学のアプローチからでは不十分な場合が多く、糖鎖の立体構造・運動性や相互作用の実体を明らかにする必要があると私たちは考えている。原子レベルでの相互作用様式を明らかにするためには、X線結晶構造解析が一般的であるが、一般に糖鎖とタンパク質の結合親和性は低く、糖鎖の電子密度像が得られない場合も多い。一方で、NMR法は弱い相互作用の検出を得意としており、糖鎖-タンパク質の原子レベルでの相互作用解析に適している。また、NMR法は糖鎖の化学構造決定にもユニークな役割を果たしており、質量分析では解決できない異性体の同定に威力を発揮する。本課題では、NMR法による未知糖鎖の化学構造の決定、および糖鎖とタンパク質の弱い相互作用の検出・解析を行い、計算化学などの他の手法を組み合わせ、糖鎖-タンパク質の複合体モデルを構築するためのフローを確立す

ることを行ってきた。さらに、糖タンパク質を対象として、糖鎖のダイナミクスおよび糖鎖-タンパク質の分子内相互作用の検出に取り組んだ。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

本課題では、糖鎖構造生物学の観点から重要と判断される糖鎖-タンパク質相互作用のシステムを対象にして主に取り組んできた。当初掲げた目標の多くは達成できたが、糖鎖の構造解析は予想以上に困難であり、期間内に構造を決定するには至らなかった。以下に本課題により得られた成果の代表的な例を示す。

(i) MUC1 は粘液を構成する主要な糖タンパク質であり、正常時は *O*-結合型糖鎖で密に覆われているが、細胞が腫瘍化すると *O*-結合型糖鎖が短鎖化する。MUC1 上の短鎖化糖鎖部分をエピトープとして認識する抗体 MY.1E12 が見いだされており、そのユニークな特異性からがんの診断や治療への応用が期待されている。MY.1E12 抗体のキャリアタンパク質依存的な相互作用の構造基盤は不明であったことから、本研究では NMR 解析と計算化学的手法を組み合わせることにより、MUC1 糖ペプチドと MY.1E12 抗体の相互作用様式を明らかにした。その結果、MY.1E12 は、*O*-結合型糖鎖のみならずその糖鎖修飾部位周辺のペプチド領域を認識していた (文献 1, 7, 8)。

(ii) *N*-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ-IVa (GnT-IVa) は、*N*-結合型糖鎖中の α 1-3 マンノース上に β 1-4 GlcNAc 分岐構造を形成する。GnT-IVa の発現低下または欠損は糖尿病の表現型を引き起こすが、その構造および触媒機構は十分に理解されていなかった。今回私たちは共同で、マウス GnT-IVa の C 末端領域に存在するレクチンドメインを同定した。また、糖鎖結合アッセイと安定同位体利用 NMR 法により、GnT-IVa レクチンドメインは糖鎖生成物と選択的に相互作用することを明らかとし、その解離定数を 3.2×10^{-4} M と算出した。さらに、レクチンドメインは効率的な触媒反応のための調節サブユニットであることを示した (文献 2)。

(iii) マトリグリカン は、繰り返し 2 糖である $-3\text{Xyl} \alpha 1-3\text{GlcA} \beta 1-$ からなるコア M3 糖鎖を構成する重要な多糖であり、ラミニンと相互作用することにより筋組織を安定化している。私たちは、マトリグリカンの繰り返し 6 糖にアルキンリンカーを結合させてビオチン結合型のマトリグリカンの合成に成功した。また、マトリグリカン 6 糖とラミニン- $\alpha 2$ との相互作用について STD-NMR 法およびバイオレイヤー干渉法により解析を行った。その相互作用は Ca^{2+} 依存的であり、解離定数は 7.5×10^{-8} M であった。また、マトリグリカン 6 糖の中央部分がラミニンによって認識されることが判明した。本研究により、筋肉組織の再構築に対して化学的アプローチにより貢献するための基礎データを収集できた (文献 3)。

成果発表

論文発表

(1) *O*-Glycan-dependent interaction between MUC1 glycopeptide and MY.1E12 antibody by NMR, molecular dynamics and docking simulations.

Kokubu R, Ohno S, Kuratani H, Takahashi Y, Manabe N, Shimizu H, Chiba Y, Denda-Nagai K, Tsujii M, Irimura T, Yamaguchi Y*.

Int. J. Mol. Sci. 23(14):7855 (2022) doi: 10.3390/ijms23147855.

(2) Discovery of a lectin domain that regulates enzyme activity in mouse *N*-acetylglucosaminyltransferase-IVa (MGAT4A).

Nagae M*, Hirata T, Tateno H, Mishra SK, Manabe N, Osada N, Tokoro Y, Yamaguchi Y, Doerksen RJ, Shimizu T, Kizuka Y*.

Commun. Biol. 5(1):695 (2022) doi: 10.1038/s42003-022-03661-w.

(3) Synthesis of the matriglycan hexasaccharide, $-3\text{Xyl} \alpha 1-3\text{GlcA} \beta 1-$ trimer and its interaction with laminin.

Tamura T, Omura Y, Kotera K, Ito R, Ohno S, Manabe N, Yamaguchi Y*, Tamura JI*.
Org. Biomol. Chem. 20(43):8489–8500 (2022) doi: 10.1039/d2ob01388f.

(4) Structural analysis of oligosaccharides and glycoconjugates using NMR.

Yamaguchi Y*, Yamaguchi T, Kato K*.

Adv. Neurobiol. 29:163–184 (2023) doi: 10.1007/978-3-031-12390-0_6.

(5) NMR analysis of mammalian glycolipids.

Yamaguchi Y*.

Methods Mol. Biol. 2613:181–188 (2023) doi: 10.1007/978-1-0716-2910-9_14.

(6) Each *N*-glycan on human IgA and J-chain uniquely affects oligomericity and stability.

Pan S, Manabe N, Ohno S, Komatsu S, Fujimura T, Yamaguchi Y*.

Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 1868(2):130536 (2024) doi: 10.1016/j.bbagen.2023.130536.

(7) Solution NMR Analysis of *O*-Glycopeptide–Antibody Interaction.

Kokubu R, Ohno S, Manabe N, Yamaguchi Y*.

Methods Mol. Biol. 2763:321–327 (2024) doi: 10.1007/978-1-0716-3670-1_26.

(8) Molecular Dynamics Simulation and Docking of MUC1 *O*-Glycopeptide

Kokubu R, Ohno S, Manabe N, Yamaguchi Y*.

Methods Mol. Biol. 2763:373–379 (2024) doi: 10.1007/978-1-0716-3670-1_32.

学会発表

Lacto-*N*-fucopentaose I の立体構造および抗 iPS 細胞抗体 R-17F との相互作用の解析

大野 詩歩, 大内 陽翔, 齋藤 祐希, 真鍋 法義, 湯浅 德行^a, 松崎 祐二^a, 築地 信^b, 川崎 敏祐^c,
山口 芳樹

(東京化成工業^a, 星薬大薬^b, 立命館大学^c)

日本薬学会年会 142 年会, 名古屋, 2022 年 3 月

MUC1 糖ペプチドと抗 MUC1 抗体 MY.1E12 の相互作用解析

國府 涼香, 倉谷 太豪, 高橋 優花, 大野 詩歩, 真鍋 法義, 清水 弘樹^a, 千葉 靖典^a, 伝田 香里^b,
築地 信^c, 入村 達郎^b, 山口 芳樹

(産総研・細胞分子工学^a, 順天堂大院・医^b, 星薬大薬^c)

日本薬学会年会 142 年会, 名古屋, 2022 年 3 月

NMR 法による α Xyl- β GlcA の繰返し構造とラミニンの相互作用解析

真鍋 法義, 大野 詩歩, 伊藤 良汰, 田村 敬裕^a, 田村 純一^a, 萬谷 博^b, 遠藤 玉夫^b, 山口 芳樹

(鳥取大院連大農^a, 都健康長寿研分子機構^b)

日本薬学会年会 141 年会, 名古屋, 2022 年 3 月

Isotope labeling of glycoproteins aiming to understand the role of glycosylation by NMR

Yoshiki Yamaguchi

GlycoNMR Summit, online, May 2022

Analysis of conformation and interaction of α Xyl- β GlcA repeating unit

Yoshiki Yamaguchi, Noriyoshi Manabe, Shiho Ohno, Ryota Ito, Takahiro Tamura^a, Hiroshi Many^b,
Tamao Endo^b, and Jun-ichi Tamura^a

(Tottori University^a, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology^b)

30th International Carbohydrate Symposium, Brazil on line, July 2022

Chemical and chemo-enzymatic syntheses of glycans containing ribitol phosphate scaffolding of matriglycan

Jun-ichi Tamura^a, Takahiro Tamura^a, Shunsuke Hoshino^b, Rieko Imae^b, Mao Nagase, Shiho Ohno,
Noriyoshi Manabe, Yoshiki Yamaguchi, Hiroshi Many^b, and Tamao Endo^b

(Tottori University, The United Graduate School of Agricultural Sciences^a, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital
and Institute of Gerontology, Molecular Glycobiology, Research Team for Mechanism of Aging^b)

30th International Carbohydrate Symposium, Brazil on line, July 2022

抗未分化 iPS 細胞抗体 R-13E と lacto-*N*-fucopentaose I の相互作用解析

大野 詩歩, 大内 陽翔, 齋藤 祐希, 真鍋 法義, 湯浅 徳行^a, 松崎 祐二^a, 築地 信^b, 川崎 敏祐^c,
山口 芳樹

(東京化成工業^a, 星薬大薬^b, 立命館大学^c)

第 41 回日本糖質学会年会, 大阪, 2022 年 9 月

α Xyl- β GlcA の繰り返し構造とラミニンの相互作用解析

真鍋 法義, 伊藤 良汰, 大野 詩歩, 田村 敬裕^a, 田村 純一^a, 萬谷 博^b, 遠藤 玉夫^c, 山口 芳樹
(鳥取大院・連大農^a, 都健康長寿研・分子機構^b)

第 16 回東北糖鎖研究会, 福島, 2022 年 10 月

NMR データを組み込んだドッキングシミュレーションによる R-13E 抗体-糖鎖リガンド複合体のモデル構築

大内 陽翔, 大野 詩歩, 齋藤 祐希, 真鍋 法義, 湯浅 徳行^a, 松崎 祐二^a, 築地 信^b, 川崎 敏祐^c,
山口 芳樹

(東京化成工業^a, 星薬大薬^b, 立命館大学^c)

第 16 回東北糖鎖研究会, 福島, 2022 年 10 月

NMR データを組み入れた抗糖鎖抗体のドッキングシミュレーション

大野 詩歩, 大内 陽翔, 齋藤 祐希, 真鍋 法義, 湯浅 徳行^a, 松崎 祐二^a, 築地 信^b, 川崎 敏祐^c,
山口 芳樹

(東京化成工業^a, 星薬大薬^b, 立命館大学^c)

第 50 回構造活性相関シンポジウム, オンライン, 2022 年 11 月

糖鎖の不均一性(多様性)とその生物学的意義を求めて

山口 芳樹

創価大学糖鎖生命システム融合研究所コロキウム, 東京, 2022 年 11 月

糖鎖の機能解明のための構造生物学-現状と展望

山口 芳樹

第 19 回日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 岐阜, 2022 年 11 月

遠隔操作による生体分子の NMR 計測の実際

山口 芳樹

NMR プラットフォームシンポジウム 2022, 東京, 2022 年 11 月

相互作用とダイナミクスから理解する糖鎖の生理機能

山口 芳樹

第 44 回東北薬学セミナー, 仙台, 2022 年 12 月

Glycan dynamics and glycan-protein interactions analyzed by experimental NMR methods, AlphaFold-assisted molecular dynamics and docking simulations

Yoshiki Yamaguchi

Glyco26, Taipei, Aug. 2023

ヒト免疫グロブリン A1 の Fc 結合糖鎖の構造と機能

潘 順麗, 真鍋 法義, 小松 祥子, 藤村 務, 山口 芳樹

第 62 回日本薬学会東北支部大会, 仙台, 2023 年 10 月

ヒト IgA および J 鎖を修飾する N-結合型糖鎖の構造と機能

潘 順麗, 真鍋 法義, 小松 祥子, 藤村 務, 山口 芳樹

第 17 回東北糖鎖研究会, 群馬, 2023 年 11 月

今後の展開

糖鎖 NMR 信号の帰属・化学構造決定には、1D の選択励起の実験 (1D-HOHAHA/NOESY/ROESY など) および ^1H - ^{13}C HSQC CLIP-COSY が非常に有効であり、これらの測定を活かして複雑な未知糖鎖の構造決定に今後活かす予定である。また、800 MHz 装置での STD-NMR 測定や NOESY 測定は非常に感度が高く、NMR データを糖鎖-タンパク質複合体のモデル構築に活かしていく予定である。一方で、高分子量糖タンパク質において糖鎖とペプチド鎖の分子内 NOE を検出することが困難であった。今後はその原因を探り、改善を検討していきたい。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本課題は基礎研究が中心であり、得られた成果がすぐに社会・経済に還元できる訳ではありませんが、糖鎖 (糖ペプチド)-抗体の相互作用様式を解明することは、高い親和性を有する抗体、あるいは異なる結合特異性を有する抗体の合理的デザインにつながり、疾病の診断や治療に貢献することが期待されます。また、遺伝性疾患により失われた糖鎖の機能を補完するような糖鎖誘導体の開発においても、NMR 法により得られた知見が活かされています。また、対象とした糖タンパク質がバイオ医薬品として適用できる可能性もあり、糖鎖修飾に関して得られた構造的知見を応用することも検討しております。

4. 利用における感想 (改善要望等を含む)

(東北大学) 先端研究基盤共用促進事業 (SHARE) (R1~R2) に参画して遠隔測定を行ってきた経験もあり、サンプルの送付・受け取り、遠隔操作、データの受け取りなどをスムーズに、かつセキュアに実施することができました。測定時のマシンや PC のトラブルなどはほとんどなく、安定した状態で測定ができました。

(生命創成探究センター)¹³C 直接観測の感度がとてもよく、良好な ¹³C-NMR スペクトルを得ることができました。

5. 今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待

現在の NMR 共用プラットフォームのシステムに大変満足しております。課題の継続・延長も含めこの NMR 共用プラットフォームのシステムが継続されることを期待しております。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

特にありません。

8. 利用施設

東北大学

溶液 600MHz

利用期間 1: 2022 年 6 月 17 日～2022 年 6 月 20 日

溶液 800MHz

利用期間 1: 2022 年 3 月 17 日～2022 年 3 月 22 日

利用期間 2: 2022 年 7 月 5 日～2022 年 7 月 11 日

利用期間 3: 2022 年 7 月 26 日～2022 年 7 月 27 日

利用期間 4: 2023 年 7 月 14 日～2023 年 7 月 18 日

利用期間 5: 2023 年 10 月 26 日～2023 年 10 月 30 日

利用期間 6: 2023 年 11 月 17 日～2023 年 11 月 21 日

利用期間 7: 2024 年 2 月 1 日～2024 年 2 月 5 日

生命創成探究センター

溶液 800MHz

利用期間 1: 2022 年 11 月 9 日～2022 年 11 月 9 日

利用期間 2: 2022 年 11 月 18 日～2022 年 11 月 19 日

利用期間 3: 2022 年 12 月 1 日～2022 年 12 月 3 日

9. その他の利用施設

生命創成探究センターでは、AFM や native MS の測定とも連携しており、その支援を受けました。また東北大学では NMR 測定・解析に関する講習会があり、参加させていただきました。