

実施課題名: 糖鎖-タンパク質相互作用および糖タンパク質高次構造のNMR解析

【背景】

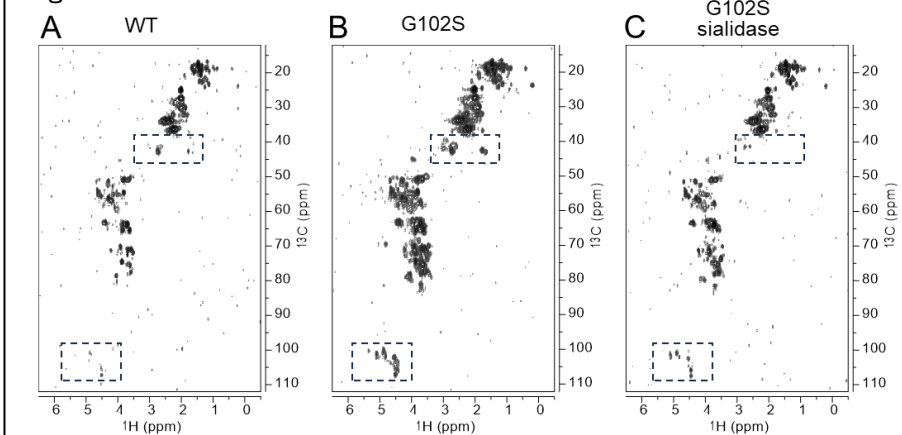
糖鎖が生命現象の様々な局面で機能を果たしていることは、これまで主に糖転移酵素遺伝子の改変実験を通じて解明されてきた。しかし、個々の糖タンパク質に付加された糖鎖の機能については依然として不明な点が多く、その予測も容易ではない。申請者らは、糖タンパク質糖鎖の機能を立体構造の観点から解明することを目指して研究を進めている。本課題では、 ^{13}C 標識糖タンパク質をNMR測定の対象として、糖鎖の高次構造情報を抽出して糖タンパク質糖鎖の構造-機能相関を明らかにするとともに、NMR法と分子動力学(MD)計算を融合させ、糖鎖-タンパク質相互作用の特異性がもたらす要因を解明することを目的としている。

【実施内容】

(1) Chitotriosidase-1 (CHIT1) はゴーシェ病のバイオマーカーであり、そのG102S変異は一部集団に高頻度に認められるものの、機能的影響は不明であった。本研究では、組換えCHIT1(野生型、G102S、N100Q+G102S)を作製し、SDS-PAGE、MALDI-MS、PNGase F処理、レクチンブロットに加え、糖鎖部分の均一 ^{13}C 標識を用いたNMR解析により新規N型糖鎖の構造を詳細に解析した。G102S変異体では酵素活性の低下が認められ、分子動力学(MD)シミュレーションにより構造安定性の低下や基質結合の障害が示唆された。G102S変異は新規N型糖鎖付加を介してCHIT1の構造と機能を変化させ、ゴーシェ病病態の解明に新たな手がかりを提供した(文献1)。

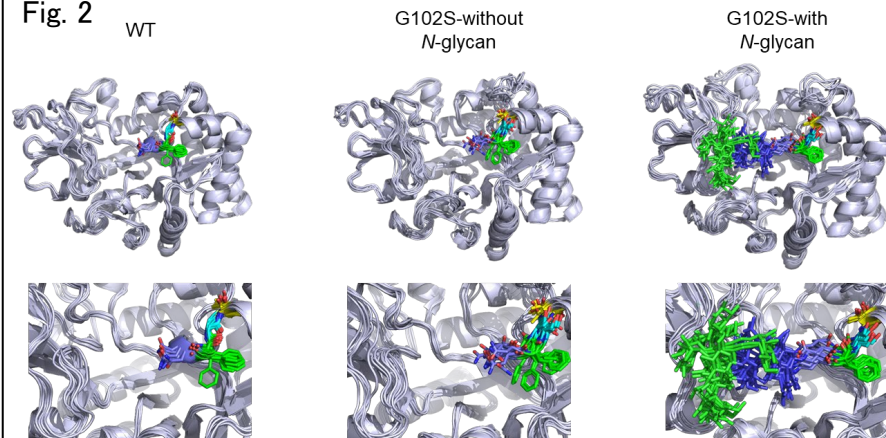
(2) 糖タンパク質NMR解析では、糖鎖構造の不均一性がシグナル帰属を困難にする大きな課題である。本研究では、GlcNAc転移酵素I欠損細胞を用いて糖鎖の均一化を試み、最適化した条件により約1 mgの ^{13}C 標識糖タンパク質を調製することに成功した。モデル糖タンパク質としてIgA-Fcを用いたNMR測定では、糖鎖の均一化によりスペクトルが大幅に簡素化され、解析の精度が向上した(文献2)。

Fig. 1



^{13}C 標識した各種CHIT1タンパク質の2D ^1H - ^{13}C HMQCスペクトル

Fig. 2



N型糖鎖付加がCHIT1タンパク質のダイナミクスに及ぼす影響

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF24-01-073			
利用課題名	糖鎖-タンパク質相互作用および糖タンパク質高次構造の NMR 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	2024 年 8 月 1 日～2026 年 3 月 31 日 総利用日数: 15 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

糖鎖が生命現象の様々な局面で機能を果たしていることは、糖転移酵素の遺伝子改変実験から主に解明されてきた。しかし個々の糖タンパク質における糖鎖の機能については不明な点が多く、機能の予測も困難である。申請者らは、糖タンパク質糖鎖の機能を立体構造の観点から解明することを目指してきた。本課題では、(i) NMR 法および分子動力学(MD)計算を融合させることにより、糖鎖-タンパク質相互作用の特異性をもたらす要因を解明すること、および (ii) ^{13}C 標識糖タンパク質を NMR 測定対象として、糖鎖の高次構造情報を抽出し、糖タンパク質糖鎖の構造-機能相関を解明することを目的とした。

具体的には、糖鎖シグナルの縮重を回避するために、 ^1H - ^{13}C HSQC を含んだ STD-NMR 測定を行うとともに、シグナル照射に関するパラメータの最適化を実施した。また NMR データを組み入れた MD 計算から糖鎖-タンパク質複合体のモデルを構築するとともに、哺乳細胞発現系を用いた ^{13}C 標識糖タンパク質の大量調製と測定を行い、 ^{13}C -edited/filtered NOESY 実験から糖残基間・糖鎖-ペプチド鎖間の NOE を同定することを目指した。

2. 成果の概要

実施内容

本課題では、糖鎖構造生物学の観点から重要と考えられる糖鎖付加タンパク質酵素および糖鎖-タンパク質相互作用の系を中心に研究を進めた。

(1) Chitotriosidase-1 (CHIT1) は、ゴーシェ病のバイオマーカーとして用いられており、その G102S 変異は一部集団で高頻度に見られるものの、機能的影響は不明であった。本研究では、組換え CHIT1 (野生型、G102S、N100Q+G102S) を作製し、SDS-PAGE、MALDI-MS、PNGase F 処理、レクチンブロットに加え、糖鎖部分の均一 ^{13}C 標識を利用した NMR 解析により、新たに付加された N-型糖鎖の構造を詳細に解析した。酵素活性は変異体で低下し、分子動力学シミュレーションにより構造安定性の低下と基質結合の障害が示唆された。G102S 変異が新規 N-型糖鎖付加を介して CHIT1 の構造と機能を変化させることを明らかにした。

(2)糖タンパク質のNMR解析では、糖鎖化学構造の微視的不均一性がシグナルの帰属を困難にしていた。この課題を解決する手法として、GlcNAc 転移酵素 I 欠損細胞を用いた一過性発現系を構築し、トランスフェクション法・培地成分・培養方法を最適化することで、 ^{13}C 標識糖タンパク質 (IgA-Fc) を約 1mg 調製することに成功した。NMR 測定では、糖鎖構造の均一化によりスペクトルが大幅に簡素化され、解析が容易になることを示した。

NMR 測定は東北大学 (溶液 800MHz、600MHz) および生命創成探究センター (溶液 800MHz) において実施し、試料の送付・リモート操作・データ転送はいずれもスムーズに行われた。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

当初目標として掲げた、(i) STD-NMR と ^1H - ^{13}C HSQC を組み合わせた糖鎖-タンパク質相互作用解析、(ii) ^{13}C 標識糖タンパク質の調製と NMR 解析、(iii) NMR データを組み入れた MD 計算による複合体モデル構築、の 3 点について以下の進捗が得られた。

目標(i)については、ラクト-N-フコペンタオース I と抗体の複合体モデル構築に向けた MD 計算と NMR 法の融合的アプローチを進め、学会発表・論文発表を行った。目標(ii)については、GlcNAc 転移酵素 I 欠損細胞を用いた一過性発現系を確立し、代謝 ^{13}C 標識 IgA-Fc の調製に成功した。スペクトルの簡素化により高次構造解析の足がかりを得た。目標(iii)については、CHIT1 変異体の解析において MD 計算と連動した構造・機能相関の解明を達成した。

一方、均一 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識タンパク質の主鎖・側鎖シグナル帰属を目的とした 3 次元 NMR 測定については、測定中に試料の沈殿が生じ、3 次元測定の実施が困難な状況にある。また、部分糖鎖欠損変異体の NMR 解析については、発現量が低く、必要量の試料確保には至っていない。これらは継続課題として、測定条件・バッファー条件・培養条件の最適化を進める。

成果発表

論文

(1) 3D structural insights into the effect of N-glycosylation in human chitotriosidase variant G102S.

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

Biochim Biophys Acta Gen Subj. 1869(1):130730 (2025) doi: 10.1016/j.bbagen.2024.130730.

(2) Metabolic ^{13}C -labeling of IgA Fc fragment by transient mammalian expression for NMR analysis

Shunli Pan, Manabe Noriyoshi, Yoshiki Yamaguchi Y*.

Methods in Molecular Biology. 2961:69-75 (2025) doi: 10.1007/978-1-0716-4722-6_5.

(3) Bacterial expression, purification and characterization of the human Dectin-1 lectin domain for structural and functional studies.

Chiba H, Manabe N, Naito J, Nishida N, Ohno N, Yamaguchi Y*.

Protein Expr Purif. 229:106668 (2025) doi: 10.1016/j.pep.2025.106668.

(4) Integrative structural analysis of lacto-N-fucopentaose I recognition by antibodies R-17F and R-13E using NMR, docking, and molecular dynamics simulations.

Ohno S, Ohuchi A, Saitoh Y, Manabe N, Fujimura T, Yuasa N, Matsuzaki Y, Tsuiji M, Kawasaki T, Yamaguchi Y.

Glycobiology 36(4):cwag016 (2026) doi: 10.1093/glycob/cwag016.

学会発表

・分子動力学計算と NMR 法による lacto-N-fucopenaose I と抗体の複合体モデル構築

大野 詩歩, 田岡 千拓, 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, 川寄 敏祐^c, 山口 芳樹

(東京化成工業^a, 星薬大^b, 立命館大^c)

第 18 回東北糖鎖研究会, 仙台, 2024 年 10 月, 演題番号 O-5

・ヒトキトリオシダーゼバリエント G102S における *N*-グリコシル化の立体構造的影響

徐 瀟, 真鍋 法義, 大野 詩歩, 小松 祥子, 藤村 務, 山口 芳樹

第 18 回東北糖鎖研究会, 仙台, 2024 年 10 月, 演題番号 P-6

・IgE-Fc の糖鎖修飾とその構造的役割

野村 桜子, 澤田石 遥香, 加茂 希萌, 岩渕 立郎, 真鍋 法義, 上松 亮平^a, 坂本 泉^a, 廣瀬 賢治^{b,c}, 権 根相^b, 山口 芳樹

(糖鎖工学研究所^a, 東北大^b, 日本ウォーターズ^c)

第 18 回東北糖鎖研究会, 仙台, 2024 年 10 月, 演題番号 P-13

・BLI 法によるマトリグリカンとラミニンの相互作用の親和性評価

宮本 廉, 湊谷 敬太, 伊藤 良汰, 真鍋 法義, 小寺 康太^a, 田村 敬裕^b, 望月 楽斗^c, 田村 純一^{a,b,c}, 山口 芳樹

(鳥取大院・持社創生農^a, 鳥取大院・連大農^b, 鳥取大農・生命環境農^c)

第 18 回東北糖鎖研究会, 仙台, 2024 年 10 月, 演題番号 P-15

・糖鎖の可視化技術の現状と展望

山口 芳樹

第 6 回糖鎖技術開発セミナー, オンライン, 2024 年 10 月, 演題番号 1

・細胞質 Peptide:*N*-glycanase が持つ非触媒ドメインの機能についての再検証

平山 弘人^a, 立田 由里子^a, 藤田 盛久^b, 真鍋 法義, 山口 芳樹, 鈴木 匡^a

(理化学研究所・研究開拓本部・鈴木糖鎖^a, 岐阜大学・糖鎖生命コア研究所^b)

第 97 回日本生化学会大会, 横浜, 2024 年 11 月, 2S09e-01

・「糖鎖構造構造生物学」による糖鎖構造多様性の生物学的意義の探求

山口 芳樹

第 1 回 GlyCosmos シンポジウム, つくば, 2024 年 12 月, 演題番号 3

・抗体の糖鎖修飾とその構造・機能的役割

山口 芳樹

第 3 回日本抗体学会学術大会, 仙台, 2024 年 12 月

Mechanisms of site-specific *N*-glycosylation: experimental and computational approaches

Yoshiki Yamaguchi

Academia Sinica - TMPU Bilateral Meeting, Taipei, 2025 年 2 月, 5

合成マトリグリカンの構造とラミニン親和性の相関: BLI 法による解析

宮本 廉¹, 小寺康太², 田口遥斗³, 田村敬裕², 望月楽斗⁴, 湊谷敬太¹, 伊藤良汰¹, 真鍋法義¹, 田村純一^{2,3,4},
山口芳樹¹

¹東北医薬大・薬, ²鳥取大院・連大農, ³鳥取大院・持社創生農, ⁴鳥取大農・生命環境農

第 91 回日本生化学会東北支部例会・シンポジウム, 仙台, 2025 年 6 月, P-16

ヒト IgE-Fc における高マンノース型糖鎖の構造と機能的役割の解明

野村桜子¹, 澤田石遥香¹, 加茂希萌¹, 岩渕立郎¹, 真鍋法義¹, 上松亮平², 坂本泉², 廣瀬賢治, 權垣相, 山口芳樹

¹東北医薬大・分生研・糖鎖構造, ²糖鎖工学研究所, ³東北大, ⁴日本ウォーターズ

第 91 回日本生化学会東北支部例会・シンポジウム, 仙台, 2025 年 6 月, P-22

今後の展開

均一 ¹³C/¹⁵N 標識タンパク質の NMR 帰属については、BEST 法や NUS 法を活用した短時間データ取得の最適化を進めるとともに、アミノ酸選択的標識の導入により帰属拠点の複数化を図る。また、バッファー条件の最適化により試料の安定性向上を目指す。

部分糖鎖欠損変異体については、細胞培養条件の最適化を継続し、NMR 解析に必要な試料量の確保に努める。本課題の測定は主に糖鎖構造の均一化のために GlcNAc 転移酵素 I 欠損細胞を宿主として用いているが、将来的には糖鎖が不均一な状態でも高次構造情報が得られるよう測定方法を開発する予定である。また、糖鎖が複数結合したタンパク質については、部位特異的な変異により糖鎖の本数を制御しながら解析を進め、将来的には糖鎖間干渉も考慮した高度な NMR 測定・解析手法の確立を目指す。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本研究で対象としている CHIT1 は、ゴーシェ病のバイオマーカーとして臨床的に重要であり、その G102S 変異の機能的影響を構造レベルで解明した成果は、ゴーシェ病の病態理解や診断精度の向上に貢献し得る。また、糖タンパク質の糖鎖構造と機能の相関を明らかにすることは、次世代の糖タンパク質医薬品（抗体医薬・融合タンパク質等）の設計・最適化に直結する知見を提供する。さらに、均一 ¹³C 標識糖タンパク質を用いた NMR 解析プロトコルの確立は、製薬・バイオ産業において応用可能な分析技術として波及効果が期待される。糖鎖-タンパク質相互作用の特異性解明は、レクチン・糖鎖を標的とした新規創薬シーズの探索にも貢献する可能性があり、中長期的に医療・産業分野への幅広い社会的貢献が見込まれる。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

(東北大) サンプルの送付・受け取り、遠隔操作、データの受け取りはスムーズかつセキュアに実施され、大変満足しております。

(生命創成探究センター) mass photometry や高速 AFM、native MS などの利用においてサポートを頂き、感謝しております。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

今後も引き続き NMR プラットフォームと同様の支援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

今後も NMR プラットフォームの継続と発展を希望しています。取得した NMR データについて、専門的なアドバイスをいただきながらディスカッションを続けられる環境に感謝しております。

8. 利用施設

東北大学

溶液 800MHz

利用期間 1: 2024 年 8 月 22 日～2024 年 8 月 26 日 (8/22 9:00- 8/26 9:00)

利用期間 2: 2025 年 8 月 22 日～2025 年 8 月 25 日 (8/22 16:00 - 8/25 9:00)

利用期間 3: 2025 年 12 月 19 日～2025 年 12 月 22 日 (12/19 16:00 - 12/22 9:00)

利用期間 4: 2026 年 3 月 24 日～2026 年 3 月 26 日 (3/24 16:00 - 3/26 10:00)

溶液 600MHz

利用期間 5: 2025 年 1 月 10 日～2025 年 1 月 14 日 (1/10 16:00 - 1/14 9:00)

9. その他の利用施設

東北大学では、NMR 測定および解析に関する講習会に参加させていただき、NMR を学ぶ機会を得ることができました。また、生命創成探究センターでは、mass photometry や高速 AFM、native MS において支援を頂きました。