

糖蛋白質の立体構造形成および分子認識機構の構造生物学的解析

Structural Biology of Glycoproteins for the Elucidation of Mechanisms of Folding and Molecular Recognition

(日本薬学会推薦)

研究代表者 名古屋市立大学 加藤 晃一 Nagoya City University

Koichi Kato

協同研究者 名古屋市立大学 高橋 禮子 Nagoya City University

Noriko Takahashi

名古屋市立大学 栗本 英治 Nagoya City University

Eiji Kurimoto

研究目的

ゲノムプロジェクトの成果は生命科学の全ての分野に大きな変革をもたらしつつある。しかしながら、ゲノムに直接コードされた情報の総体のみでは生命現象を理解することは困難である。例えば、細胞間のコミュニケーションに携わる蛋白質はほとんど全てが糖鎖を結合しており、それらの機能を理解するためには糖鎖が担う生命情報を高次構造の観点から解読することが必要である。糖蛋白質を対象とした高次構造の解析手法は著しく未開拓な状況にあるが、われわれは代表的な糖蛋白質である免疫グロブリンを対象として、糖蛋白質の動的な高次構造を解明するための核磁気共鳴 (NMR) 法の解析戦略を確立してきた。本研究は、免疫グロブリンをはじめとする免疫系糖蛋白質と細胞内において糖鎖を認識するレクチンを対象として、これらが発現している糖鎖の動的三次元構造を NMR を利用して原子レベルで明らかにすることにより、(1)糖蛋白質の立体構造形成における糖鎖の役割、(2)糖蛋白質の機能部位の構造構築における糖鎖の役割、(3)分子間の特異的認識における糖鎖の役割、(4)病態に伴う糖鎖構造の変動を解明することを目的とした。

研究経過

糖蛋白質糖鎖の研究を推進するにあたり、まず多次元 HPLC マップ法による糖鎖の

発現プロファイルの解析および NMR 測定のための糖鎖の安定同位体標識の検討を行った。Fc レセプター、ロドプシン、CD1 などの糖蛋白質に対して多次元マップ法を適用し糖鎖構造を迅速に決定することに成功した。また、安定同位体標識を施した免疫グロブリン G や CD1 などの試料を調製し、NMR 測定を行うことが可能であることを実証した。このような技術的基盤を整えた後、以下の各項目について検討を行った。

(1) 糖蛋白質の立体構造形成における糖鎖の役割

小胞体は蛋白質の立体構造形成、糖鎖の修飾、サブユニット会合が行われる環境を備えた細胞内における蛋白質の品質管理の場であることが明らかとなりつつある。本研究で対象としたカルレティキュリンは、小胞体内腔に局在するカルシウム結合蛋白質として同定された分子シャペロンであり、新生糖蛋白質が一過的に発現しているアスパラギン結合型糖鎖 $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ を特異的に認識してポリペプチド鎖の立体構造形成の補助に寄与している。カルレティキュリンが認識する糖鎖の構造モチーフに関する知見を得るために、各種オリゴ糖鎖 ($\text{Glc}\alpha(1-3)\text{Man}$, $\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}$, $\text{Glc}\alpha(1-3)\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}$, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) を用いてカルレティキュリンとの相互作用の NMR 解析を行った。その結果、カルレティキュリンは糖鎖の非還元末端の $\text{Glc}\alpha(1-3)\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}$ 部分を認識しており、還元末端の GlcNAc 残基は結合に関与しないことが明らかとなった。さらに非還元末端の Glc 残基は α 結合で連結していることが重要であり、これが β 結合にて連結した糖鎖ではカルレティキュリンに対する親和性が有意に低下していることが明らかとなった。

また、カルレティキュリン分子の動的性質に着目し、 ^{15}N で均一に標識したカルレティキュリンの ^1H - ^{15}N シフト相関 NMR スペクトルの測定を行った。スペクトル中に観測されたピークの大部分は P ドメインに由来していることから、P ドメインは分子の中で著しく高い運動性を有していることが明らかとなった。さらにカルレティキュリンの基質認識様式を明らかにするため、モノグルコシル糖鎖を発現している免疫グロブリン Y (IgY) をモデル糖蛋白質としてカルレティキュリンとの相互作用解析を行った。その結果、IgY の結合に伴って P ドメインに由来するシグナルの線幅は広幅化するものの化学シフト変化は認められず先端部由来のシグナルはスペクトル中に依然として観測されることが示された。従って、標的糖蛋白質と結合した

状態でも P ドメインの先端部は高い運動性を保持していることが明らかとなった。P ドメインのアーム先端部はフォールディング補助蛋白質である ERp57 をリクルートする場であることが知られている。本研究で明らかにした P ドメインの運動性はカルレティキュリン・ERp57・基質の 3 者複合体に運動の自由度を与えており、ERp57 が標的糖蛋白質に作用する際に有利に働いていることが示された。

(2) 糖蛋白質の機能部位の構造構築における糖鎖の役割

代表的な糖蛋白質である免疫グロブリン G(IgG)は、Fc 領域のアスパラギン 297 に糖鎖結合部位を保存している。この部位に発現している糖鎖は IgG のエフェクター機能 (Fc レセプターとの結合を介した細胞の活性化など) と密接に関係していることが明らかとなっている。しかしながら糖鎖を構成している個々の残基が IgG の機能部位 (Fc レセプター結合部位など) の高次構造の構築において果たしている役割については未解明である。そこで IgG の各糖残基の構造構築に対する寄与を明らかにするため、均一に ^{15}N で標識した IgG の Fc 部分を各種グリコシダーゼ (エンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼ) で処理することにより、様々なグライコフォームを有する Fc を大量に調製して NMR 解析を行った。その結果、非還元末端側の Gal 残基、GlcNAc 残基は C_{H2} ドメインの限定された部位の構造を構築に寄与しているが、糖鎖中央部の Man 残基、GlcNAc 残基は、 C_{H2} ドメインのみならず、ヒンジ領域下流に至るまでの部位の構造構築にも影響を及ぼしていることが判明した。IgG のヒンジ領域下流は、Fc レセプター結合部位であることから、糖鎖を構成する糖残基のうち、中央部の Man 残基、GlcNAc 残基は遠位の機能部位の構造に重要な役割を果たしていることになる。特に、Fc レセプター結合部位に位置する IgG の Leu234 由来のシグナルは複数のコンフォメーションを示しているが、Man 残基、GlcNAc 残基を取り除くとした多形は消失することが明らかとなった。この事実は、糖鎖がペプチド鎖部分の高次構造のみならずそのダイナミクスまでも規定しているということを示しており極めて興味深い。さらに T 細胞に糖脂質を提示する機能を有する糖蛋白質である CD1 についても糖鎖構造解析および NMR 解析を行い、糖鎖部分が蛋白質の立体構造の構築に寄与していることを示した。

(3) 分子間の特異的認識における糖鎖の役割

様々なグリコフォームを有する IgG を用いて、IgG 結合分子 (Fc レセプター、リウマチ因子 Z34 など) との相互作用解析を表面プラズモン共鳴法により解析し、速度論的パラメータを算出した。その結果、IgG の非還元末端側の Gal 残基や GlcNAc 残基の除去は Fc レセプターや Z34 との結合にほとんど影響を及ぼさないことが判明した。さらに糖鎖中央部の Man 残基と GlcNAc 残基を取り除くと、Z34 との結合能は維持しているものの、Fc レセプターとの結合は低下することが明らかとなった。糖鎖を完全に除去した場合では Z34 と Fc レセプターいずれとも結合能を有していなかった。このように IgG の個々の糖残基は、相互作用する分子によって果たす役割が異なっていることを明らかとした。

一方、ヒト Fc レセプター III 上にも糖鎖が発現しており、この糖鎖は補体レセプターとの結合に寄与しているという報告がある。ヒトとマウスに由来する様々なタイプの Fc レセプターの糖鎖構造を解析した結果、興味深いことにマウス Fc レセプター II には高マンノース型糖鎖は全く検出されなかったが、ヒト Fc レセプター III では全体の 15% もの割合で高マンノース型糖鎖が検出された。この高マンノース型糖鎖はヒト Fc レセプター III と補体レセプターとの相互作用に寄与していることが示唆された。

(4) 病態に伴う糖鎖構造の変動の意義

IgG に結合している糖鎖は、シアル酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、フコースの有無などによる微視的不均一性を示す。これらの糖鎖の構成比率は健常なヒト個体間ではほぼ一定であるが、慢性関節リウマチ患者に由来する IgG ではガラクトース含量が減少することが報告されている。本研究では、ウェゲナー肉芽種症、クリオグロブリン血症患者由来の IgG、および空気接触により白濁沈殿ゲル化を起こす IgG 等を対象として糖鎖の構造解析を行った。その結果、いずれのケースにおいても健常人と比較してガラクトース含有量の減少が認められた。興味深いことに、ウェゲナー肉芽種症患者が妊娠すると IgG のガラクトース含量の増加が見られることが明らかとなり、各疾患の病態と糖鎖構造は密接な関係を持つことが示唆された。IgG の糖鎖のみならず他の糖蛋白質の糖鎖プロファイルを明らかにすることが、様々な疾患の病態把握や病因解明に貢献するものと期待される。

考察

本研究を推進した結果、糖蛋白質を高次構造、ダイナミクス、相互作用を原子レベルの分解能で解析するための系統的な戦略を構築することができた。この戦略に基づいて糖鎖の生物学的機能を構造生物学の観点から理解することが可能となった。例えば、新生糖蛋白質の立体構造形成に関わるカルレティキュリンは糖鎖の Glc 残基の結合様式を厳密に認識しており、柔軟なドメインを備え持つことにより、フォールディング補助反応を円滑に進行させていることが示された。また、IgG や CD1 などの糖蛋白質においては、それらが発現している糖鎖中の特定の糖残基が機能部位の構造構築においては分子認識機能に関わっていることを明らかにした。さらに糖蛋白質が発現している糖鎖のプロファイルが、様々な疾患の病態を鋭敏に反映して変化することを示した。このような知見は、糖蛋白質糖鎖の機能の理解に貢献するのみならず、様々な疾患の診断・治療の一助になると期待される。

研究発表

口頭発表

1. 加藤晃一、山口芳樹、高田一幸、益田勝吉、Royston Jefferis、高橋禮子；糖タンパク質の構造生物学的解析を展開するための系統的戦略. 第 22 回日本糖質学会年会、2001 年 7 月、静岡
2. Koichi Kato, Katsuyoshi Masuda, Yoshiki Yamaguchi, Noriko Takahashi, HaHyung Kim, Ichio Shimada, and Yoji Arata ; Electrospray ionization mass spectrometric analyses of the glycosylation of immunoglobulin G, XVIth International Symposium on Glycoconjugates. 2001 年 8 月、The Hague
3. 加藤晃一；ポストゲノム科学における NMR の可能性、学術振興会科学研究費基盤研究(C)企画調査公開シンポジウム「糖鎖コドンの高次認識機構の解明」、2001 年 9 月、名古屋
4. 加藤晃一；NMR を利用する糖タンパク質の構造生物学、第 13 回名古屋コンファレンス. 2001 年 11 月、名古屋
5. 加藤晃一；糖タンパク質の構造生物学の進展に向けて、第 2 回蛋白質科学会. 2002 年 6 月、名古屋

6. Koichi Kato ; Strategies for NMR Analyses of Structure, Dynamics, and Interaction of Glycoprotein, The International Conferences on Magnetic Resonance in Biological Systems. 2002 年 8 月、Toronto
7. Koichi Kato ; NMR Studies of Structure and Dynamics of Glycoproteins. FAOBMB Meeting、2002 年 9 月、Taipei
8. 加藤晃一 ; 糖鎖の機能発現メカニズムの解明を目指した NMR 解析戦略. 第 75 回日本生化学会大会、2002 年 10 月、京都
9. Koichi Kato ; Stable isotope labeling approaches in NMR spectroscopy of glycoproteins. 第 4 回 ORCS 国際シンポジウム、2002 年 11 月、つくば
10. Koichi Kato ; NMR Structural Biology of IgG Glycoproteins. 日米科学協力事業、2003,1, Maui

紙上発表

1. 山口芳樹、加藤晃一 ; 安定同位体利用 NMR による糖鎖構造解析. 蛋白質 核酸 酵素 増刊号「糖鎖機能」、印刷中
2. Noriko Takahashi, Katsuyoshi Masuda, Kenji Hiraki, Kazuo Yoshihara, Hung-Hsiang Huang, Kay-Hooi Khoo, and Koichi Kato ; N-Glycan structures of squid rhodopsin: Existence of the α 1-3 and α 1-6 di-fucosylated innermost GlcNAc residue in a molluscan glycoprotein. 投稿中