

核磁気共鳴法による免疫系糖タンパク質の動的立体構造解析 NMR study of dynamical 3D-structure of glycoproteins in the immune system

嶋田一夫*[#]

Ichio Shimada*[#]

*東京大学・大学院薬学系研究科・教授, [#]産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター・主任研究員
*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, [#] Biological Information Research Center
(BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

It is well established that the glycans in glycoproteins are often involved in important biological phenomena. To understand the role of the glycans attached to glycoproteins in solution, structural information obtained by NMR spectroscopy is obviously required. Recently we have developed a systematic stable isotope labeling method for NMR study of glycoprotein glycan. We have applied this labeling method to Fc fragment of immunoglobulin G, with a molecular weight of 50 K. Here we describe the labeling strategy and briefly discuss the structures and functions of glycans attached to Fc fragment.

1. 研究目的

近年の遺伝子工学、蛋白質工学の進展に伴い、分子レベルでの生命現象の理解が着々と進み、細胞が生きるための詳細な仕組みは明確になりつつある。一方、細胞から組織、組織から器官へと統合された構造体が適切に働くためには、生体分子間の相互作用によって媒介される複雑な情報伝達システムを使って、機能の発現制御を行う必要がある。このような複雑なシステムを理解するためには、第三の生体物質として糖鎖にも目を向ける必要がある。実際、細胞表面に存在するタンパク質や、アルブミンを除く血清タンパク質のうち、大部分は糖タンパク質であり、生命現象の様々な局面でしばしば重要な役割を演じている。¹⁻⁵⁾

このような糖タンパク質糖鎖の機能に関する知見はこれまで、遺伝子工学的あるいは生化学的な実験によって主に得られており、機能メカニズムが高次構造の観点から原子レベルで十分に説明された例は残念ながらほとんどない。糖タンパク質の機能発現メカニズムを真に解明するためには、ペプチド鎖のみならず糖鎖の高次構造を明らかにする必要がある。しかしながら、糖蛋白質中の糖鎖の高次構造を NMR によって系統的に解析する方法は最近まで確立していなかった。そこで、本研究では糖蛋白質糖鎖を対象とした安定同位体利用 NMR 法を確立し、糖鎖が機能に果たしている役割を明らかにすることを目指す。

2. 研究経過および成果

(1) 糖鎖の安定同位体標識

糖タンパク質中の糖鎖を NMR の解析対象とする場合、糖鎖部分に安定同位体標識を施し、糖鎖部分の NMR 情報を抽出するといった方法論が必要不可欠となる。安定同位体標識した糖鎖前駆体を用いて糖タンパク質の糖鎖部分を標識する方法は、メタボリックラベリングと *in vitro* ラベリングの2種類の方法が考えられる。

メタボリックラベリングは、糖タンパク質発現細胞の糖の代謝経路を利用して糖鎖を標識する方法である。糖鎖の生合成においては、グルコースが糖鎖前駆体として最も重要であり、グルコースから全ての糖残基 (GlcNAc, Man, Fuc 残基など) が生合成され得る。一方、グルコサミンは GlcNAc 残基のよい生合成前駆体であり、Man や Fuc 残基にはほとんど利用されないことから GlcNAc 残基を選択的に標識したい場合は極めて有用であることが期待される。実際、メタボリックラベリングでは、培地中のグルコースを標識したグルコースに置き換える、あるいは標識したグルコサミンを培地に添加することによって、細胞を培養し糖鎖の標識を行う。

一方、*in vitro* ラベリングでは、まず糖蛋白質を精製し、その糖蛋白質に対して糖転移酵素を用いて標識糖を試験管内で付加する方法である。すなわち、標識単糖 (この場合ガラクトース) を糖ヌクレオチド (UDP-Gal) に変換し、糖転移酵素を用いて糖蛋白質に付加する。Gal 転移酵素の場合、酵素の特異性をうまく利用すれば、複数存在する Gal 残基のうち、目的の Gal 残基のみを選択的に標識することも可能である。

これらの方法を併せて用いることにより、全ての糖残基を均一に、あるいは特定の糖残基を選択的に標識することが可能である。実際、このような標識法を用いて調製した糖タンパク質の各標識体の NMR スペクトルを図 1、2 に示す。図 1、2 の NMR スペクトルは、アノメリック位を選択的に ^{13}C 標識した糖鎖前駆体を用いて標識した試料

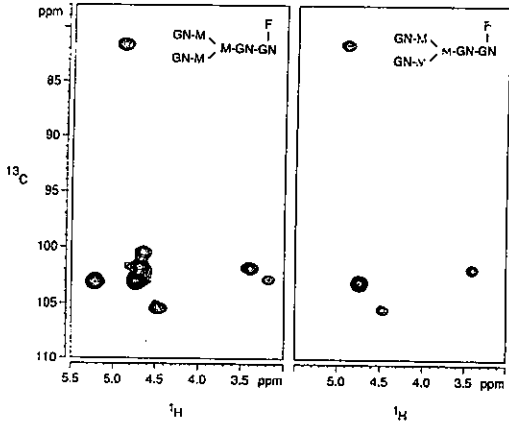


図 1. アノメリック領域の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル
(左) $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ グルコースによって代謝ラベルした免疫グロブリン G (IgG) の Fc フラグメント、
(右) $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ グルコースによって代謝ラベルした Fc。左のスペクトルにおいては、全ての糖残基由来のアノメリックシグナル (8 つ) が、右のスペクトルでは GlcNAc 残基由来のアノメリックシグナルのみ (4 つ) が観測されている。

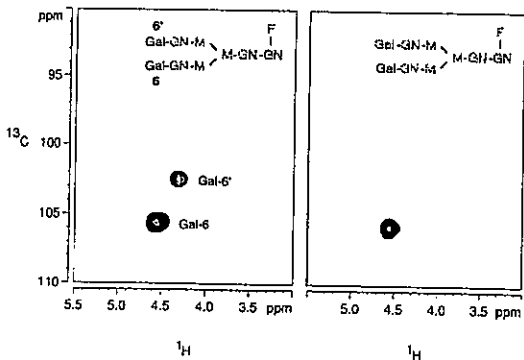


図 2. アノメリック領域の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル
(左) *In vitro* ラベリング法により、Gal-6 と Gal-6' の両残基を $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ ガラクトースにて標識した Fc、
(右) ガラクトース転移酵素の特異性を利用して、Gal-6 残基のみを選択的に $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ ガラクトースにて標識した Fc。これらのスペクトルの比較により、Gal-6 と Gal-6' の帰属が可能となった。

を測定して得られたものである。アノメリック位 (1 位) のシグナルは、他の位置のシグナル (2-6 位) と比較してシグナルの分離がよく、糖鎖由来のシグナルを解析する上での起点となる。これらの NMR スペクトルを比較することにより、GlcNAc 残基の帰属 (糖残基タイプ別の帰属)、および 2 つの Gal 残基の位置特異的な帰属 (Gal-6 と Gal-6' の区別) を容易に行うことが可能となった⁶⁾。

(2) NMR シグナルの帰属法の開発

アノメリック炭素のみならず、その他全ての炭素が均一に ^{13}C 標識されたグルコース ($[U\text{-}^{13}\text{C}]$ グルコース) を糖鎖前駆体として代謝ラベルを行うことによって、糖鎖を構成する炭素 C1-C6 を均一に ^{13}C 標識した糖タンパク質を調製することが可能である。そのような試料に対して $^1\text{J}_{\text{CH}}$ 、 $^1\text{J}_{\text{CC}}$ のスピン-スピン結合を利用した測定法 (HCCH-COSY など) を適用すれば、アノメリックシグナルを起点として糖残基内の 2 位から 6 位に帰属を拡張することが原理的に可能である。しかし、糖鎖アノメリックシグナル以外は一般に縮重が激しく、HCCH タイプの測定のみでは実際帰属が困難であった。そこで、 ^{13}C と D にて二重標識されたグルコース ($[U\text{-}^{13}\text{C}_6, \text{D}]$ グルコース) を糖鎖前駆体とした代謝ラベリングによる糖鎖のシグナル帰属法を考案した⁷⁾。細胞培養中のグルコースは、様々な糖ヌクレオチド (UDP-GlcNAc, GDP-Man, GDP-Fuc など) へと変換されるが、その際に糖部分の D が培地中の

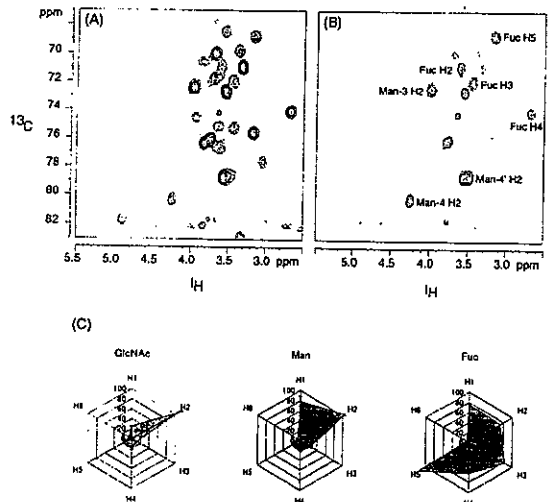


図 3. $[U\text{-}^{13}\text{C}_6]$ グルコースを用いて標識した Fc の
(A) ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル (非アノメリック領域)。
(B) $[U\text{-}^{13}\text{C}_6, \text{D}]$ グルコースを用いた Fc の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル。
(C) $[U\text{-}^{13}\text{C}_6, \text{D}]$ グルコースを用いて Fc の糖鎖を標識した際の各糖残基の D から H への交換率。

H と交換することがわかっている。その D から H への置換率が各糖残基 (GlcNAc, Man, Fuc) によって異なることを利用して、新たにいくつかのシグナルを帰属することに成功した。(図 3) さらに、糖鎖シグナルの位置特異的な帰属 (例えば 4 つの GlcNAc 残基由来のシグナルの区別) は、位置特異的に帰属をした 2 つの Gal 残基 (Gal-6 と Gal-6') 由来のシグナルを起点として、糖残基間の NOE を観測することによって連鎖的に行った (例えば、Gal-6 H1 と GlcNAc-5 H4 間の NOE を観測する)。このように、スピン-スピン結合定数、D/H 交換率、NOE を利用することによって、糖鎖由来のシグナルの帰属を行うことに成功した。このようにして帰属したシグナルを用いることによって、糖タンパク質中の糖鎖の高次構造や運動性に関する情報を原子レベルで得ることが可能となった。

3. 応用例: IgG 糖鎖の高次構造と機能・疾患

(1) IgG の糖鎖

本研究で NMR の解析対象とした IgG は代表的な糖タンパク質であり、その Fc 部分の Asn297 に

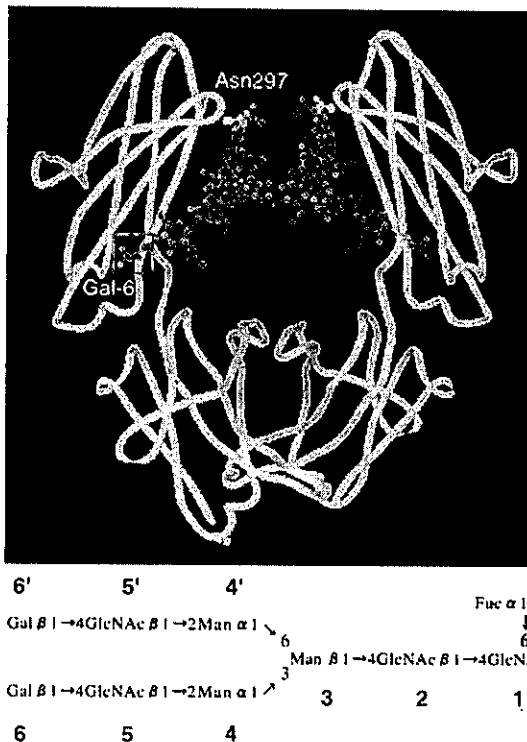


図 4. ヒト IgG の Fc フラグメントの X 線結晶構造⁹⁾と IgG の主な糖鎖構造。Asn297 に結合している糖鎖はドメインの内部に位置している。Gal 残基 (Gal-6') は四角で囲って示した。

一對の 2 本鎖複合型糖鎖が普遍的に結合している。図 4 に Deisenhofer が報告したヒト IgG1 の Fc の結晶構造⁹⁾と Fc に結合している糖鎖の配列を示す。結晶構造中において Asn297 に結合している一對の糖鎖は、ドメインの間に挟まれた状態で存在している。この糖鎖は、糖鎖非還元末端の Gal 残基などの有無により不均一性を示している。その不均一性に由来する各糖鎖成分の存在比は、健常なヒト個体間では常に一定であるが、慢性関節リウマチ患者由来の IgG は、Gal 含量が有意に減少しており、糖鎖の Gal 残基の欠落がリウマチを引き起こす原因であると予想された⁹⁾。Dwek らはそのような立場から、Gal を欠く糖鎖はペプチド鎖との相互作用が無くなり、その結果ドメインの内部から溶媒に露出し、糖鎖がマンノース結合蛋白質と相互作用できるようになるというモデルを提唱している^{10, 11)}。私たちは Gal 残基の欠落に伴い、糖鎖の高次構造・運動性が実際どのように変化するかを帰属した糖鎖シグナルを用いて解析した。

(2) Glycoform の変化に伴う糖鎖の高次構造・運動性の変化

まず、糖鎖を標識した Fc から Gal 残基をガラクトシダーゼによって欠落させた Fc (以下 Fc(G0) と呼ぶ) と、その Fc(G0) に *in vitro* で非標識の Gal を結合させた Fc (以下 Fc(G2) と呼ぶ) を大量に調製した。Gal 残基の欠落に伴う高次構造変化を追跡するため、Fc(G0)、Fc(G2) の両 NMR スペクトルを重ねて比較したのが図 5 である。その結果、Man-3、Man-4、GlcNAc-5 に由来するピーク以外は、Gal の有無に関わらず同一の化学シフトを示すことが明らかとなった。このことは、Gal 残基の欠落にともない、Man-3、Man-4、GlcNAc-5 は構造変化をするものの、その他の部分は構造変化を起こしていないことを意味する。

次に Gal 残基の欠落に伴い、運動性がどのように変化するかを調べるため、Fc(G0)、Fc(G2) の糖鎖アノメリック炭素の横緩和時間 T_2 をシグナルの線幅から求めた。 T_2 の大きさは一般にその原子の運動性を表すと考えてよい。非還元末端の Gal-6 は高い運動性 ($T_2 = 25$ ms) を示しているが、それ以外の糖残基の T_2 は、6-11 ms を示し Gal 残基の有無に関わらず変化しないことが明らかとなった。Fc のペプチド主鎖 α 炭素の T_2 は 8 ms 程度であることから、糖鎖はペプチド鎖と同程度の運動性を有していることがわかる。

以上の結果をまとめると、Gal 残基の欠落は、Fc の糖鎖の限られた部分に高次構造変化を誘起するものの、糖鎖全体の運動性は依然として抑制されたままであり、糖鎖はペプチド鎖と相互作用していることが明らかとなった⁹⁾。従って先に述べた、糖鎖がドメインの内部から溶媒に露出するという

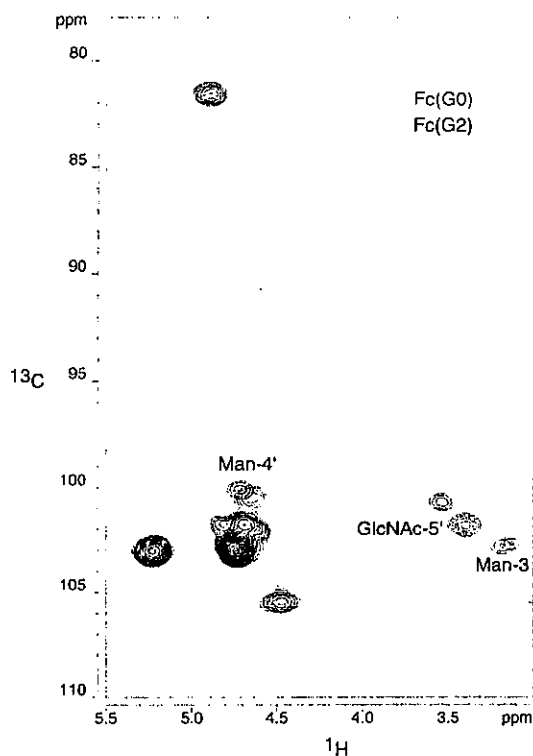


図5. $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースによってメタボリックラベルした Fc (G0) (点線) とその試料に非標識の Gal 残基を付加した Fc(G2) (実線) の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを重ねたもの。Man-3、Man-4'、GlcNAc-5'残基において化学シフト変化が観測されたが、その他の残基に関しては同一の化学シフトを示した。

モデル^{10, 11)}とは異なった結果が得られ、提唱されたモデルとは異なるメカニズムが関与していると考えられる。そのメカニズムを明らかにするためには、Fc と相互作用する分子も視野に入れたさらなる高次構造解析が必要である。

4. 今後の課題と発展

糖鎖は、一般に種特異性・不均一性を有しており、実験上の取り扱いが難しく、それほど機能面で重要視されていなかったため、タンパク質や核酸を対象とした研究と比較すると著しく立ち遅れていた。それでも現在では、糖鎖生物学という学問分野が確立し、世界的に様々な角度から糖鎖が研究されるようになった。糖タンパク質においても糖鎖部分に注意を払った高次構造解析が報告されるようになり (例えば T cell レセプター、MHC、糖蛋白質ホルモンなど)、糖蛋白質糖鎖もようやく構造的な視点から捉えられるに至った感がある。

る¹²⁻¹⁵⁾。今後、安定同位体標識を利用した糖タンパク質の NMR 解析法は重要である。

参考文献

- 1) Dwek, R.A. (1995) *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 1-25.
- 2) Varki, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 97-130.
- 3) Lis, H. and Sharon, N. (1993) *Eur. J. Biochem.* **218**, 1-27.
- 4) Kobata, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 483-501.
- 5) Rademacher, T.W., Parekh, R.B. and Dwek, R.A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 785-838.
- 6) Yamaguchi, Y., Kato, K., Shindo, M., Aoki, S., Furusho, K., Koga, K., Takahashi, N., Arata, Y. and Shimada, I. (1998) *J. Biomol. NMR* **12**, 385-94.
- 7) Yamaguchi, Y., Takizawa, T., Kato, K., Arata, Y. and Shimada, I. (2000) *J. Biomol. NMR* **18**, 359-362.
- 8) Deisenhofer, J. (1981) *Biochemistry* **20**, 2361-2370.
- 9) Parekh, R.B., Dwek, R.A., Sutton, B.J., Fernandes, D.L., Leung, A., Stanworth, D. and Rademacher, T.W. (1985) *Nature (London)* **316**, 452-457.
- 10) Wormald, M.R., Rudd, P.M., Harvey, D.J., Chang, S.-C., Scragg, I.G. and Dwek, R.A. (1997) *Biochemistry* **36**, 1370-1380.
- 11) Malhotra, R., Wormald, M.R., Rudd, P.M., Fischer, P.B., Dwek, R.A. and Sim, R.B. (1995) *Nat. Med.* **1**, 237-243.
- 12) Rudd, P.M., Wormald, M.R., Stanfield, R.L., Huang, M., Mattsson, N., Speir, J.A., DiGennaro, J.A., Fetrow, J.S., Dwek, R.A. and Wilson, I.A. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 351-366.
- 13) Wilson, I.A. and Garcia, K.C. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 839-848.
- 14) Wyss, D.F. and Wagner, G. (1996) *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 409-416.
- 15) Weller, C.T., Lustbader, J., Seshadri, K., Brown, J.M., Chadwick, C.A., Kolthoff, C.E., Ramnarain, S., Pollak, S., Canfield, R. and Homans, S.W. (1996) *Biochemistry* **35**, 8815-8823.

発表論文リスト

- Yamaguchi, Y., Kato, K., Shindo, M., Aoki, S., Furusho, K., Koga, K., Takahashi, N., Arata, Y. and Shimada, I. (1998) *J. Biomol. NMR* **12**, 385-94.
- Yamaguchi, Y., Takizawa, T., Kato, K., Arata, Y. and Shimada, I. (2000) *J. Biomol. NMR* **18**, 359-362.