

糖タンパク質の構造グリコミクスを展開するためのデータベースの拡張と応用

●加藤 晃一 ◆山口 芳樹 ◆栗本 英治

名古屋市立大学大学院薬学研究所

〈研究の目的と進め方〉

生体を構成するタンパク質の多くは糖鎖を結合している。糖鎖の生物学的重要性は明白であるにもかかわらず、糖タンパク質は現行の構造ゲノム科学の中で積極的に顧みられていない。その大きな理由は、糖鎖を構成する残基の組成・配列・結合様式を簡便に決定するシーケンシング技術が存在しないことである。更に、タンパク質に結合している糖鎖は構造上の不均一性を示すために解析は著しく複雑になる。こうした状況下で、我々は三次元HPLCマップ法による糖タンパク質の糖鎖のプロファイリングを展開している。また、糖タンパク質に安定同位体標識を施してNMR解析を行う技術を開発する技術も有している。本研究は、これらの方法によって構築された糖鎖構造のデータベースをインターネット上で公開することを通じて糖鎖構造解析を支援し、糖タンパク質の構造ゲノミクスの進展に資することを目的とする。本研究の進展により糖鎖が担う生命情報が解読されれば、創薬をはじめとする産業応用にも資するところが大きいと考える。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 天然には微量しか得られない硫酸化糖鎖を得るために、硫酸転移酵素を導入した培養細胞を用いた検討を行う。
- 2) 三次元マップの適用範囲を硫酸化糖鎖に拡張する。
- 3) 三次元HPLCマップ法によって蓄積されたデータを統計処理することによってputativeな糖鎖のマップ上での出現位置を予測する方法を確立する。さらに、質量分析 (MS) 法との組み合わせによるタンパク質が発現している糖鎖の迅速プロファイリングシステムの開発も目指す。

〈研究期間の成果〉

①糖鎖データの拡張

硫酸基転移酵素とフコース転移酵素を導入したLS12細胞 (愛知がんセンター神奈木玲児博士より恵与) を用いて、その膜タンパク質画分より構造解析に十分量のN型硫酸化糖鎖を得ることに成功した。HPLCを利用して得られた硫酸化糖鎖群について、多次元HPLC法と質量分析法を併用して構造解析を行った。これにより、約40種類の硫酸化糖鎖の構造を決定し、それら糖鎖のHPLCマップを作成することができた(図1) (1,5,11)。

②GALAXYの開発と糖鎖プロファイリング

これまでに蓄積した約500種類におよぶN型糖鎖の多次元HPLCデータベースにMS情報を組み合わせて、WEBアプリケーションGALAXY (<http://www.glycoanalysis.info>) を開発し、インターネット上での公開を行った(図2) (2,7,11,16)。このアプリケーションにおいては糖鎖を61個の残基ユニットからなるツリー構造として表記しており、重回帰分析によって個々のユニットのHPLCの溶出時間への寄与を推計し、未知糖鎖のマップ上での出現位置を予想する機能を搭載している。

また、GALAXYに搭載している糖鎖構造データベースを利用して、様々な自己免疫疾患における免疫グロブリンの糖鎖プロファイルデータの収集、種々の宿主において発現したインフルエンザウィルスや寄生虫表面の糖鎖プロファイリングを行った(11)。

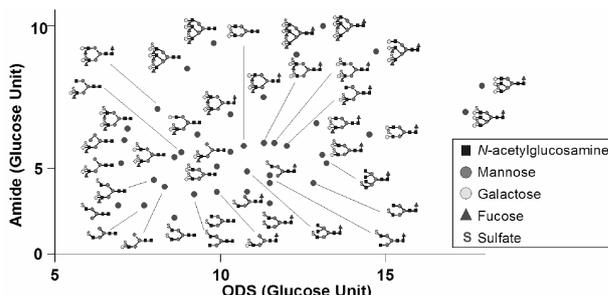


図1 硫酸化糖鎖のHPLCマップ

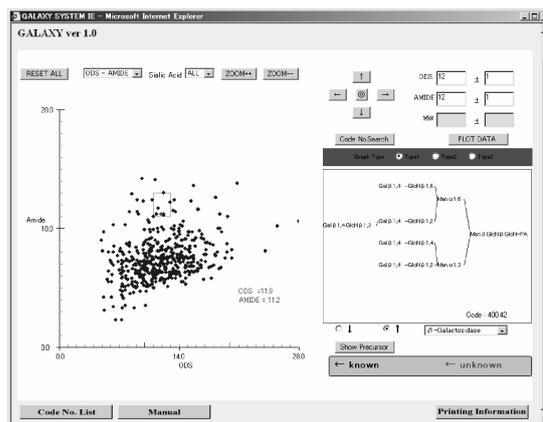


図2 WEBアプリケーション GALAXY

③NMRによる糖鎖とレクチンの相互作用解析

糖タンパク質の細胞内運命 (フォールディング、輸送、分解) を決定する様々なレクチンによる糖鎖認識メカニズムをNMRを用いて研究した。特に、安定同位体標識を施した糖ペプチドをリガンドとして用いることにより、ユビキチンリガーゼSCFFbs1の標的糖タンパク質の認識メカニズムを原子レベルで明らかにすることに成功した(3,10,13,14)。すなわち、Fbs1は糖ペプチドの糖鎖部分だけでなく糖鎖結合部位であるAsn残基ともコンタクトしていることが明らかとなった。一般に、立体構造を形成している糖タンパク質において、糖鎖の還元末端に位置するGlcNAc残基は糖鎖結合部位の空間的近傍にあるアミノ酸残基と分子内で相互作用している。そのため、Fbs1は立体構造を形成している糖タンパク質の糖鎖還元末端部と相互作用することは困難である。しかしながら、小胞体から細胞質に逆行輸送された糖タンパク質のポリペプチド鎖はアンフォールド状態にあるものと予想される。こうしたアンフォールド状態の糖タンパク質では糖鎖の還元末端は露出しており、Fbs1と相互作用することが可能であると考えられる。

④安定同位体標識糖鎖を利用した質量分析

糖鎖は独特な分岐構造を有するなどの理由により数多くの異性体が存在するため、質量分析を利用した構造解析が困難である。最近、MS/MSにおけるフラグメンテーションの様式の違いを利用して糖鎖の異性体を識別しようという試みが行われてきている。そのためには、フラグメンテーションパターンに差異が生じる所以を探求することが重要である。我々は、特定の分岐の非還元末端を安定同位体で標識した種々の糖鎖アイソトポマーを用いて、分岐構造の開裂様式を解析した(図3)。この方法を用いることによって分岐構造を有する糖鎖のグルコシド結合における開裂のしやすさの違いなどを系統的に解析することが可能となった(6,8,9,15)。

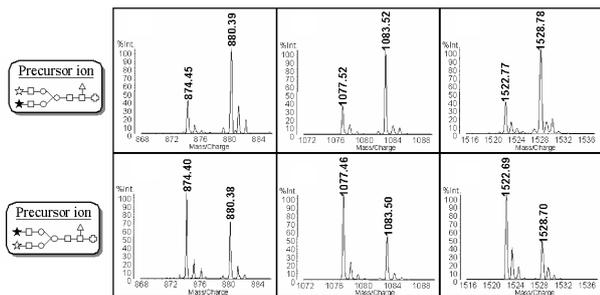


図3 安定同位体標識を施した糖鎖のタンデムMSスペクトル

〈国内外での成果の位置づけ〉

以上のような構造グライコミクスの体系的アプローチは国内外を問わず類例がなく、高い国際競争力を有していると考えている。実際に、GALAXYには国外ユーザーからのアクセスも多く、また糖鎖構造解析に関して海外からの数多くの共同研究の依頼を受けている状況にある。

一方、糖鎖構造データベースの構築の過程で生成した糖鎖標品のライブラリーには産業界からも注目を集めている(17)。こうした状況のもと、本研究で開発している技術シーズを基盤とした糖鎖科学ベンチャー「グライエンス」を設立するに至り、産学共同研究を展開しつつある。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

特に予想外の困難はなく、当初の計画は十分に達成された。

〈今後の課題〉

GALAXYの構造検索機能および推計機能の高機能化をはかるとともに、糖鎖科学に関する他のデータベースとの連携も視野に入れた開発を行う。また、糖鎖ライブラリーを整備して、その応用研究を行う。また、様々な動物細胞・組織、昆虫細胞などを利用して糖鎖ライブラリーを充実し、構造解析や糖鎖マイクロアレーの開発等に供する。特に、安定同位体標識糖鎖を利用したNMR解析および質量分析に重点をおいて、構造グライコミクスを展開する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング

1. 308290840

Takahashi, N., Masuda, K., Hiraki, K., Yoshihara, K., Huang, H.-H., Khoo, K.-H., and Kato, K., N-Glycan structures of squid rhodopsin: Existence of the α 1-3 and α 1-6 difucosylated innermost GlcNAc residue in a molluscan glycoprotein, *Eur. J. Biochem.* 270(12), 2627-2632 (2003)

2. 404081732

Takahashi, N., and Kato, K., GALAXY (Glycoanalysis by the three axes of MS and chromatography): a Web application that assists structural analyses of N-glycans, *Trends Glycosci. Glycotech.*, 15(84), 235-251 (2003)

3. 404081744

Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S.J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukihara, T., and Tanaka, K., Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase, *Nature Struct. Mol. Biol.*, 11(4), 365-370 (2004)

4. 408221223

Suzuki, M., Kurimoto, E., Nirasawa, S., Masuda, Y., Hori, K., Kurihara, Y., Shimba, N., Kawai, M., Suzuki, E., Kato, K., Recombinant curculin heterodimer exhibits taste-modifying and sweet-tasting activities, *FEBS Lett.* 573(1-3), 135-138 (2004)

5. 0602091919

Yagi, H., Takahashi, N., Yamaguchi, Y., Kmura, N., Uchimura, K., Kannagi, R. and Kato, K., Development of structural analysis of sulfated N-glycans by multi-dimensional HPLC mapping methods, *Glycobiology.* 15(10), 1051-1060 (2005)

6. 0602092043

Kato, K., Yamaguchi, Y., Takahashi, N., Nishimura, M., Iwamoto, S., Sekiya, S., and Tanaka, K., Discrimination of isomeric fragment ions observed in tandem mass spectra of biantennary oligosaccharides by use of selective isotope labeling, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 52(5), 284-288 (2004)

2) データベース/ソフトウェア

7. 308290855

GALAXY (Glycoanalysis by the three axes of MS and chromatography): a Web application that assists structural analyses of N-glycans
<http://www.glycoanalysis.info/>

3) 特許など

8. 糖鎖の選択的末端糖残基同位体標識法

出願番号 特願2004-28323

出願日 平成16年2月4日

発明者 加藤晃一, 高橋禮子, 山口芳樹

9. 糖鎖構造解析手法

出願番号 特願2004-28324

出願日 平成16年2月4日

発明者 岩本慎一, 関谷禎規, 田中耕一, 加藤晃一, 高橋禮子, 山口芳樹

4) その他顕著なもの、

10. 308290901

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*, 48(8 Suppl), 1184-1189 (2003)

11. 308290905

高橋禮子, 栗本英治, 山口芳樹, 加藤晃一, 多次元HPLC法のグライコミクス解析への展開, *蛋白質 核酸 酵素*, 48(10), 1412-1418 (2003)

12. 408221228

加藤晃一, 山口芳樹, 免疫系レセプターの分子認識の構造的基盤, *臨床免疫*, 40(4), 472-476 (2003)

13. 408221232

山口芳樹, 加藤晃一, レクチンによる糖鎖認識の構造生物学, *生化学*, 76(3), 269-277 (2004)

14. 408221236
坂田絵理, 田中啓二, 加藤晃一, ユビキチンリガーゼの機能発現の構造的基盤, 細胞工学 23(7), 825-831 (2004)
15. 0602092029
山口芳樹, 矢木宏和, 加藤晃一, MSを用いた糖鎖構造解析, フェルマシア 41(11), 1065-1069 (2005)
16. 0602092101
加藤晃一, 高橋禮子, 糖鎖構造解析を支援するためのウェブアプリケーション“GALAXY”, バイオデータベース利用法 検索からバイオインフォマティクスへ 117-129 (2005)
17. 0602092221
神谷由紀子, 山口芳樹, 加藤晃一, NMRを利用した糖鎖構造生物学, 糖鎖科学の新展開-機能解明・次世代型材料・医薬品開発に向けて- 76-83 (2005)