

研究報告書

「小胞体糖タンパク質フォールディング装置作動メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 佐藤 匡史

1. 研究のねらい

糖鎖はタンパク質が適正な完成品となって出荷されるための品質管理の標識として機能することが明らかになりつつある。小胞体糖タンパク質フォールディング装置は、2つの糖鎖プロセシング酵素、すなわちグルコシル化を触媒する UGGT (UDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素) と脱グルコシル化を触媒するグルコシダーゼ II、糖鎖結合能を有するレクチンであるカルネキシン・カルレティキュリンが協同的に働くことによって機能している。本研究は、本さきがけ研究者がこれまで確立してきた技術基盤と学術的成果を背景として、様々な構造生物学的手法 (X線結晶構造解析、超高磁場 NMR 分光法、X線小角散乱、高速原子間力顕微鏡解析) を縦横に活用した相関構造解析を遂行することにより、小胞体品質管理機構の構造基盤を統合的に理解することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

小胞体で誕生した糖タンパク質は、アスパラギン結合型糖鎖上の非還元末端のグルコース残基を目印とした品質管理システムを通じて正しい立体構造を獲得している。本研究では、このシステムを作動させる2つの糖鎖プロセシング酵素、すなわちグルコシル化を触媒する UGGT と脱グルコシル化を触媒するグルコシダーゼ II を対象として、構造生物学のアプローチを縦横に活用した相関構造解析を行い、本品質管理システムの作動機構を探索した。

グルコシダーゼ II においては、触媒-制御サブユニット間の相互作用様式に加えて、2つの異なるグルコシル化糖鎖との複合体の立体構造を明らかにした [研究成果 1, 2]。これにより、本酵素の活性部位が瓢箪型の深いポケットからなることが判り、2段階の脱グルコシル化反応は連続しては起こらないことが示された。このことは、糖タンパク質がモノグルコシル化した糖鎖を認識するシャペロンと相互作用するための猶予時間を与えているものと考察される。

一方 UGGT では、本酵素が大きなフォールディングセンサー領域と小さな触媒ドメインが柔軟なリンカーを介して繋がれた構造をとっていることが明らかになった。また、UGGT のセンサー領域はチオレドキシリン様ドメインがタンデムに3つ繋がったマルチドメイン構造を形成していることを見出した [研究成果 3]。UGGT は幅広い疎水性パッチを有する可動性のセンサー領域を介して、疎水性残基を露出した変性糖タンパク質基質を認識しているものと考えられる。

さらに、これらの酵素の基質と生成物にあたるモノグルコシル化した糖鎖の動的な立体構造を NMR 分光法と分子動力学シミュレーションにより明らかにした [研究成果 4, 5]。これにより、小胞体レクチンであるカルレティキュリンは糖鎖の構造変化を伴う誘導適合によって分子認識を行っていることが示された。

(2) 詳細

研究テーマ「小胞体グルコシダーゼ II の作動メカニズムの解明」

小胞体品質管理システムは、タンパク質に結合した N 型糖鎖の末端に付加されるわずか 1 残基のグルコース残基の有無を目印として、タンパク質の品質を見分けている。すなわち、フォールディングが完成したタンパク質にはグルコース残基が付加されず、輸送系へと導かれる。一方、フォールディングが未完成なものにはグルコース残基が付加され、レクチン・シャペロン複合体の標的となる。このカルネキシンサイクルと呼ばれる品質管理システムにおいて、グルコース残基の切除と付加はそれぞれグルコシダーゼ II と糖転移酵素 UGGT によって担われている。グルコシダーゼ II は、ジグルコシル化状態からグルコース残基を切除する”切断 1”とモノグルコシル化状態からグルコースを取り除く”切断 2”をともに触媒する活性を有している(図 1)。カルネキシンサイクルの離脱を促すのは切断 2 であるが、この反応過程は切断 1 と比較して遅いことが知られている。しかしながら、この点を含めてグルコシダーゼ II による糖鎖プロセッシング機構の構造的理解はほとんど得られていなかった。

立体構造解析の結果、触媒 α サブユニットの活性部位は 2 つのサブサイトを含む瓢箪型のポケットから構成されていることを見出した(図 1)。活性部位ポケットが深いために、切断 1 の次に切断 2 に移行するためには糖鎖がいったん離れる必要があり反応が連続で起こらないことが示された。このように切断 2 が遅れを伴う過程であることは、モノグルコシル化されたグライコフォームを持つシャペロンとの相互作用

を通じて糖タンパク質が折りたたまれる猶予時間を与えているものと考察される[研究成果 1]。また、本酵素は触媒 α サブユニットと制御 β サブユニットから構成されるヘテロダイマーとして機能している。本研究では、 α サブユニットと β サブユニット G2B ドメインからなる複合体の立体構造解析に成功し、 α β サブユニット間の相互作用様式を明らかにした[研究成果 2]。その結果、G2B ドメインのカルシウム分子の結合は、その立体構造形成や α β サブユニット間の相互作用に寄与していることを見出した。

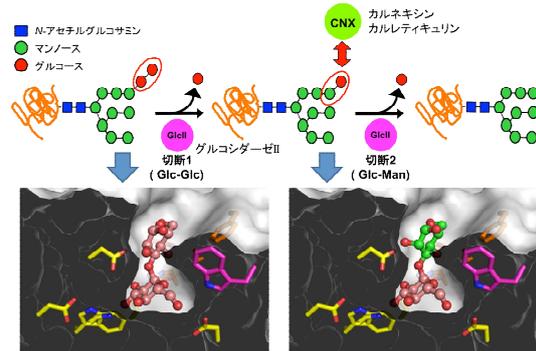


図1 グルコシダーゼ II による糖鎖プロセッシング(上)とその構造基盤を与える基質複合体の結晶構造(下)。

研究テーマ「フォールディングセンサー酵素 UGGT の作動メカニズムの解明」

小胞体品質管理システムにおいて UGGT は、フォールディングが未完成なタンパク質に対してのみグルコース残基を転移することで、フォールディングセンサーとしての機能を果たしている。しかしながら、この品質管理機構の中核を担う鍵酵素の分子認識および作動機構には未だ不明な点が多く存在しており、その理解はほとんど進んでいなかった。そこで本研究では、構造生物学的手法を縦横に活用した相關構造解析を行い、本酵素の作動メカニズムを理解することを目指した。

UGGT の全体構造を明らかにすることを目的として、X 線小角散乱および高速原子間力顕

微鏡解析を行った。その結果、本酵素は大きな N-lobe(フォールディングセンサー領域)と小さな C-lobe(触媒ドメイン)が柔軟なリンカーによって繋がれた構造をとっていることを見出した。また高速原子間力顕微鏡解析の結果、フォールディングセンサー領域は4つのドメインから構成されるリング状の構造をとっていることが示唆された。次に、原子分解能で立体構造を明らかにするために、本酵素の X 線結晶構造解析を試みた。バイオインフォマティクス解析を行い、フォールディングセンサー領域のドメイン構造の同定を試みた。その結果、フォールディングセンサー領域は小胞体品質管理機構に関わるタンパク質・酵素群においてよく見出されるドメインであるチオレドキシシン様ドメインが3つタンデムに繋がった構造を有していることを見出した[研究成果 3]。そこで、このドメイン構造の情報をもとに、様々な組み合わせのドメイン欠損体の結晶化を行い、3番目のチオレドキシシン様ドメインと触媒ドメインの3次元構造を解明することに成功した。触媒ドメインの立体構造は1.5 Åの高分解能で決定し、活性に必要な Ca^{2+} およびドナー基質である UDP グルコースとの結合様式を詳細に明らかにした。さらに興味深いことに、このチオレドキシシン様ドメインはC末端にフレキシブルなヘリックスを有し、疎水性パッチを露出した open 型と遮蔽した close 型のコンフォメーションをとり得ることが明らかとなった[研究成果 3] (図2)。以上の結果より、UGGT がこのヘリックスを介して基質糖タンパク質をセンシングするメカニズムが推測された。

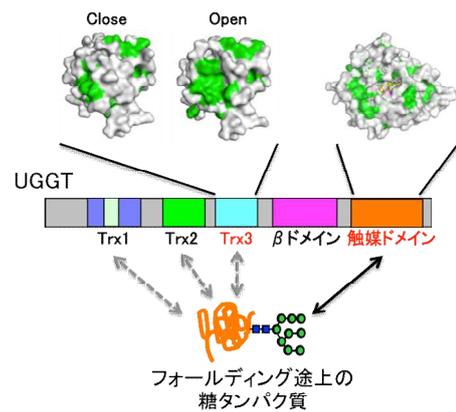


図2 UGGT による基質糖タンパク質認識の概略図。

研究テーマ「モノグルコシル化高マンノース型糖鎖の動的構造解析」

グルコシダーゼIIとUGGTの基質と生成物にあたるモノグルコシル化した糖鎖の動的な立体構造をNMR分光法と分子動力学シミュレーションにより明らかにすることを試みた。本研究者が所属するグループでは、新たな立体構造情報として常磁性効果に着目し、ランタノイドイオンの導入によって観測される擬コンタクトシフト(PCS)を利用した糖鎖のNMR立体構造解析法を開発してきた。これまでに、 $Man_9GlcNAc_2(M9)$ などの糖鎖の動的構造解析を行ってきた。そこで、本研究では更に1残基大きいモノグルコシル化糖鎖(GM9)に拡張した。GM9の部位選択的な安定同位体標識体は、UGGTを用いた酵素法と化学合成法を組み合わせることで調製した[研究成果 4]。NMR解析の結果、レクチンであるカルレティキュリンは糖鎖の構造変化を伴う誘導適合によって分子認識を行っていることが示された(図3)[研究成果 5]。

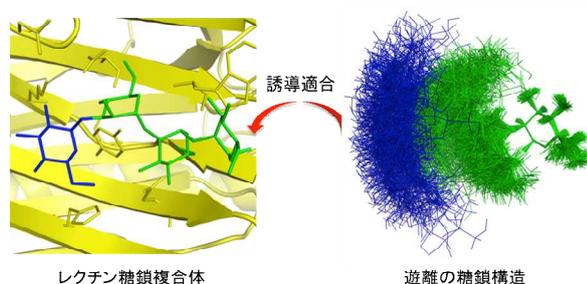


図3 レクチンであるカルレティキュリンの誘導適合を介した糖鎖認識機構

3. 今後の展開

グルコースによるタグは、小胞体で誕生する新生ポリペプチド鎖の中でも特にフォールディングが困難なタンパク質上に選択的に提示されていることが予想される。しかしながら、この品質管理システムのターゲットとなる基質タンパク質の実体についてはほとんど明らかにされていない。従って、本研究で明らかにした構造的知見を踏まえて、この問題に取り組むことが重要な課題だと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、小胞体品質管理システムの中核を担う、2つの糖鎖プロセッシング酵素(UGGTおよびグルコシダーゼII)に焦点をおき、構造生物学的手法を縦横に活用した相関構造解析を遂行することにより、これら酵素の作動メカニズムの解明を目指した。脱グルコシル化に関わるグルコシダーゼIIでは、その糖鎖複合体の立体構造解析に成功し、2報の論文発表を行うことが出来た。一方UGGTでは、その全体構造をX線小角散乱および高速原子間力顕微鏡解析により明らかにした。また、部分構造ではあるが、チオレドキシン様ドメインと触媒ドメインの立体構造を決定することに成功し、これまでに1報の論文発表を行った。現在、UGGTのフォールディングセンサードメインのクライオ電子顕微鏡解析と結晶化が順調に進んでおり、本さきがけ研究期間内に、論文投稿を予定している。さらに、グルコシダーゼIIとUGGTの基質と生成物にあたるモノグルコシル化した糖鎖の動的な立体構造をNMR分光法と分子動力学シミュレーションにより明らかにし、2報の論文発表を行った。

以上の通り、当初の研究計画を概ね進めることができたことから、研究目的を十分に達成出来たものと自己評価している。各年度において、本研究を進める上で肝となるデータが得られたことから、研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)は、問題無かったものと考えている。また本研究成果は、一部のデータを除き、これまでに論文発表を行うことが出来ているので、本研究成果の科学技術への波及効果は期待できるものと考えている。社会・経済への波及効果については、本研究成果のみではまだ不十分であり、3の「今後の展開」で記載した内容の更なる研究の遂行が必要だと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

グルコシル化を触媒する全長UGGT(UDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素)のX線小角散乱、高速AFMによる動的構造情報を取得した。また、UGGTのTrx3ドメインと触媒ドメインの結晶構造解析に成功した。さらに、脱グルコシル化を触媒するグルコシダーゼIIの触媒サブユニットの結晶構造解析に成功し、グルコシル化糖鎖のプロセッシングに関する重要な知見を得た。制御サブユニットの構造解析にも成功した。以上のように目標とした事項の多くはほぼ達成できた。

グルコシダーゼIIの構造を解き、反応機序を明らかにしたこと、そしてUGGTの構造に

についても概ね解明し、反応機序に新規の理解を与えたことは、ともに糖鎖科学への構造生物学からの重要な貢献であると評価できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Satoh T., Toshimori T., Yan G., Yamaguchi T., and Kato K., Structural basis for two-step glucose trimming by glucosidase II involved in ER glycoprotein quality control, *Sci. Rep.* **6**, 20575 (2016).
2. Satoh T., Toshimori T., Noda M., Uchiyama S., and Kato K., Interaction mode between catalytic and regulatory subunits in glucosidase II involved in ER glycoprotein quality control, *Protein Sci.* **25**, 2095–2101 (2016).
3. Zhu T., Satoh T., and Kato K., Structural insight into substrate recognition by the endoplasmic reticulum folding-sensor enzyme: crystal structure of third thioredoxin-like domain of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase, *Sci. Rep.* **4**, 7322 (2014).
4. Zhu T., Yamaguchi T., Satoh T., Kato K., A hybrid strategy for the preparation of ¹³C-labeled high-mannose-type oligosaccharides with terminal glucosylation for NMR study, *Chem. Lett.* **44**, 1744–1746 (2015).
5. Suzuki, T., Kajino, M., Yanaka, S., Zhu, T., Yagi, H., Satoh, T., Yamaguchi, T., and Kato, K., Conformational analysis of a high-mannose-type oligosaccharide displaying glucosyl determinant recognised by molecular chaperones using NMR-validated molecular dynamics simulation, *Chembiochem in press* (2017).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 佐藤匡史, 加藤晃一, 糖鎖認識を介したタンパク質品質管理機構の構造基盤
平成 28 年度日本応用糖質科学会東日本シンポジウム, 東京, 2016 年 7 月 22 日.
2. 佐藤匡史, Zhu, T., 年森隆泰, 山口拓実, 加藤晃一, 糖鎖を目印としたタンパク質品質管理機構の構造基盤.
第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 2016 年 6 月 9 日.
3. Satoh, T., Inagaki, K., Yagi-Utsumi, M., Kozai, T., Zhu, T., Itoh, S.G., Okumura, H., Kamikubo, H., Uchiyama, T., and Kato, K., Structural insights into the working mechanisms of multi-domain enzymes involved in ER protein quality control.
8th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Sciences, Okazaki, February 15–17 (2016).
4. Satoh, T., and Kato, K., Structural insights into glycoprotein processing mechanisms in ER quality control system.

The 87th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Kyoto, October 15 (2014).

5. Satoh, T., and Kato, K., Structural basis for the glycan-processing mechanisms in glycoprotein quality control system.

The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sapporo, September 26 (2014).

受賞

1. 「平成 28 年度名古屋市立大学学長表彰」(2016)