

TSUBAME 共同利用 令和6年度 学術利用 成果報告書

利用課題名 糖鎖-蛋白質間の相互作用解析  
 英文: Analysis of carbohydrate-protein interactions  
 利用課題責任者 尾形 慎  
 First name Surname Makoto Ogata

所属 福島大学農学群食農学類  
 Affiliation Faculty of Food and Agricultural Sciences, Fukushima University  
 URL <https://www.agri.fukushima-u.ac.jp/>

邦文抄録(300 字程度)

糖鎖は、エネルギー代謝や細胞間の情報伝達、ウイルス感染など様々な生命現象に関与している。糖鎖を基質とする酵素群などの蛋白質-糖鎖間相互作用はこれらの現象の多くで重要な役割を持つため、蛋白質の糖鎖認識メカニズムを理解することは、生理機能の理解や創薬などへの応用へ向け重要である。しかし、多様で複雑な糖鎖構造は、糖鎖-蛋白質相互作用の解析の障壁となっている。本課題では、糖鎖関連酵素の詳細な機能理解や機能性糖鎖材料開発を目指し、TSUBAME4.0 上でのドッキングシミュレーション、分子動力学法等を取り入れた糖鎖-蛋白質間相互作用解析を行った。今回は、リゾチーム新規活性測定基質の設計およびシアル酸転移酵素の基質認識機構解析について報告する。

英文抄録(100 words 程度)

Carbohydrates and carbohydrate-active enzymes interaction have many physiological roles such as energy metabolism, cell communication, and infection. For revealing glycan-mediated biological phenomenon and for drug discovery, it is important to clarify substrate recognition mechanisms of proteins involved in biosynthesis and degradation of glycan. However, analysis of them have technical limitation due to structural complexity of glycan. In this study, we performed docking simulation and molecular dynamics simulation using TSUBAME 4.0 to analyze carbohydrate-active enzyme and develop functional glycan materials. We report a novel substrate for assaying lysozyme activity and analysis of substrate recognition mechanism for sialyltransferase.

*Keywords:* Carbohydrate, Lysozyme, Sialyltransferase, Docking simulation, Molecular dynamics

## 1. リゾチームの新規活性測定基質の開発

### 背景と目的

リゾチームは、GH ファミリー22 に属し、ペプチドグリカンやキチンなどを加水分解する酵素である。-4~+2 の6つの糖結合サブサイトを持ち、-1・+1 サブサイト間のβ-グリコシド結合を加水分解する(図1)。ニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)活性は潰瘍性大腸炎などのマーカーとして利用されているが、活性測定の簡便さと精度の両立など課題点も多い。そこで我々はより優れた活性測定手法確立のため、新規活性測定基質の設計および評価を行った。この際、ドッキングシミュレーションや MD シミュレーションを活用することで複雑な糖鎖分子における解析の効率化を図った。

### 概要

前述したサブサイト情報から、非還元末端側がキトトラオース(GN4)、還元末端側が非GNの2糖からなる6糖を基質候補とする方針を取った。還元末端側は

2糖といえ膨大なパターンが考えられるが、本年度はまずシミュレーション手法の評価を目的とし、グリコシド結合が異なる3種類のグルコビオース(G2、図2)に絞った。6糖GN4G2の各糖残基がHEWLの各サブサイトと結合できれば、図2のような活性測定スキームにより簡便な活性測定が期待できる。今回は、ドッキングシミュレーション、MDシミュレーションにより3種のGN4G2とHEWLサブサイト間の相互作用安定性を評価した。

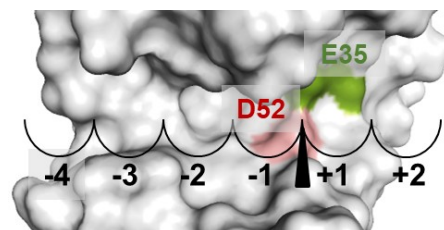


図1 HEWL (PDB: 4HP0) の糖結合サブサイト E35、D52 はそれぞれ触媒残基。

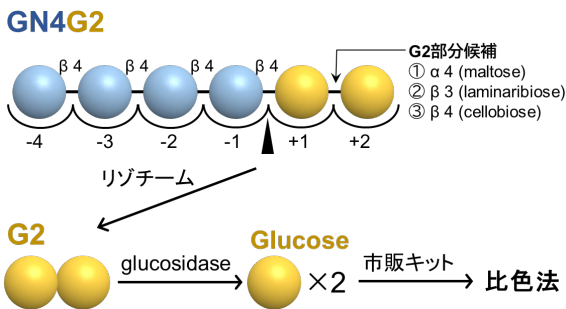


図 2 HEWL 新規基質の設計と活性測定スキーム  
青丸が N-アセチルグルコサミン (GN)、黄色がグルコース (G)。GN4G2 模式図下部にリゾチームのサブサイトおよび加水分解位置、右側に 3 種類の G2 候補を示した。

## 結果および考察

まず、基質候補である 3 種類の GN4G2 をリガンドとし、HEWL をレセプターとしたドッキングシミュレーションを行ったところ、3 種類のリガンド全てにおいて 6 糖が各サブサイト近傍に位置するドッキングポーズが得られた。それらを初期構造とした MD シミュレーションを行ったところ、G2 部分が cellobiose の場合のみ HEWL の +1, 2 サブサイトと安定した相互作用を示した (図 3)。また、MM-PB/SA 法による結合自由エネルギー計算において+側サブサイト近傍の残基に絞って結合自由エネルギーへの寄与を解析したが、この結果も cellobiose が最も良好であった。

実際に HEWL の糖転移活性を利用した基質合成において、受容体に cellobiose を用いた場合顕著な生成物が観察された。また、合成した GN4-cellobiose は活性測定に十分な感度を有していることも確認された。このことから、基質設計において今回用いた分子シミュレーションによる相互作用評価法の有用性が示された。

## まとめ、今後の課題

今回我々は、3 種類の GN4G2 のうち最も優れた基質をドッキングシミュレーションおよび MD シミュレーションを用いた酵素 - 基質相互作用解析により判定した。リガンドが自由度の高い 6 糖であったが、実験結果と矛盾無い結果を得ることができた。今後は還元末端をグルコピオース以外にも広げ、TSUBAME4.0 の演算能力をより活用した大規模なスクリーニングへの発展も期待できる。そのためには、大量の計算結果をより効率よく判定するための系構築などが課題となる。

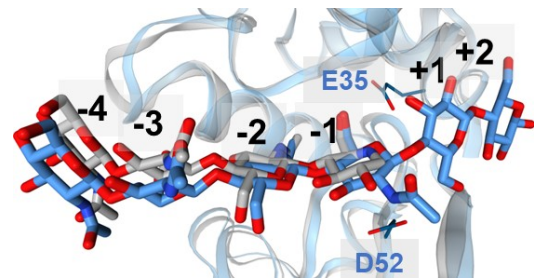


図 3 HEWL-GN4-cellobiose 複合体 MD シミュレーション 100 ns のプロダクションラン中 95 ns 時点のスナップショット (青) と HEWL-GN3-moranoline (GN3M) 複合体結晶構造 (灰色、PDB: 4HP0) との構造アラインメント。GN4 の結合様式も結晶構造との重なりが概ね良好である。+側は参照となるリガンドが無いものの、cellobiose がサブサイトに張り付くように相互作用していることが分かる。他の 2 リガンドではサブサイトから G2 部分が離れる傾向にあった。

## 2. シアル酸転移酵素とリガンドの相互作用解析

### 背景と目的

シアル酸転移酵素の一つである ST3Gal3 は、GT ファミリー 29 に属し、N-アセチルラクタミン (LacNAc) 誘導体のガラクトース (Gal) にシアル酸 (Sia) を  $\alpha$ -2,3 結合で転移させる。本酵素は特に脳において重要な役割を持ち、その変異は認知機能障害の発達に障害を引き起こす。しかし、現時点で立体構造が未知であるため、変異による影響のメカニズム解析などが難しい。一方、近年は蛋白質立体構造予測技術の発展が著しい。我々のグループでも AlphaFold にてモデリングした rat ST3Gal3 (rST3Gal3) 立体構造情報を基に重要残基を予測後、変異体アッセイを行うことで、図 3 の残基における活性への影響を評価できている。これら残基がどのような機構で酵素機能に関与しているかを理解するためには、リガンドとの相互作用解析が欠かせない。そこで分子シミュレーションにて rST3Gal3 各残基とリガンドの相互作用を解析した。

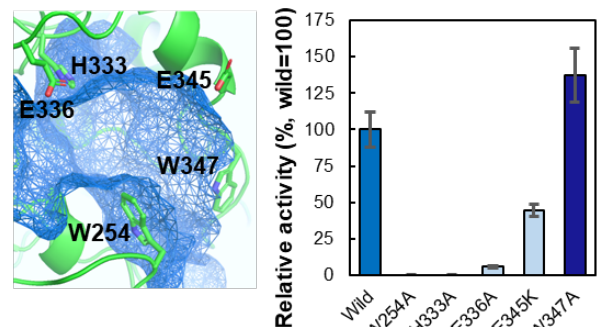


図 4 rST3Gal3 予測構造と主要残基の変異体アッセイ  
興味深いことに W347A では比活性が向上した。クレフト反対側に位置する W254A とは対照的である。ドナーは CMP-Sia、アクセプターは LacNAc-dansyl である。

## 概要

シアル酸転移酵素の構造解析は複雑である。まず転移酵素なのでリガンドはドナー、アクセプターの 2 種類が存在する。そのため相互作用を理解するにはアミノ酸残基とリガンド間のみならずドナー – アクセプター間相互作用も重要となる。さらに、構造既知のシアル酸転移酵素サブファミリーの測定データを見るに、その構造はリガンドを含め不安定な傾向にある。そのため、複合体の相互作用理解には MD シミュレーションによるダイナミクス解析が重要と考え、中心的アプローチとして採用した。MD シミュレーション用の初期構造は、レセプターに rST3Gal3 予測構造、ドナーに CMP-Sia、アクセプターに LacNAc-OMe を用いて取得したドッキングポーズを用いた。この際、前述のようにドナー – アクセプター間相互作用を考慮するため、2 つのリガンドを同時にドッキングさせる手法を取った。その後 MD シミュレーションを行い rST3Gal3 のリガンド結合様式の解析を行った。

## 結果および考察

200 ns 間の MD シミュレーションで得られたスナップショットを、複合体構造が既知の他サブファミリーと比較したところ結合様式は概ね類似していた。提唱されている反応機構も合わせて考えた際、概ね妥当な様式が得られたと考えられる。変異体アッセイ結果との比較に関しては、アッセイ結果が対照的であった W254、W347 に注目して述べる。双方の残基とも MD シミュレーション中、アクセプターの LacNAc-OMe と相互作用していた点は共通だが、前者はアクセプターとスタッキングのような相互作用を維持していたのに対し、後者のインドール環と LacNAc の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基は面同士垂直に近い状態であった(図 5)。Ala 置換による活性の向上も合わせると W347 はアクセプター結合領域における若干の立体障害を引き起こしていると考えられる。

## まとめ、今後の課題

今回我々は、リガンド結合様式が不明である ST3Gal3 に対して MD シミュレーションを中心とした手法を用い、ドナー、アクセプターとの複合体構造推定と

相互作用解析を行った。シアル酸転移酵素はドナー結合領域に関してはファミリー内で保存性の高いモチーフが存在するため、アミノ酸残基との相互作用に関しては他のサブファミリー情報が一定程度参考になるが、アクセプターはサブファミリー毎に異なるため残基の保存性が非常に低い。そのため、変異体アッセイ結果とシミュレーション結果を組み合わせると ST3Gal3 のアクセプター結合領域に関する知見が得られた点は大きい。課題としては、より詳細な相互作用解析のための複合体初期構造取得があげられる。ドナーの構造上、ドッキングシミュレーションにて妥当性のある複合体構造を取得するまでかなりの試行錯誤を要した。現在は AlphaFold3 が TSUBAME4.0 上でも利用可能なので、今後こちらを用いた複合体構造取得も検討したい。

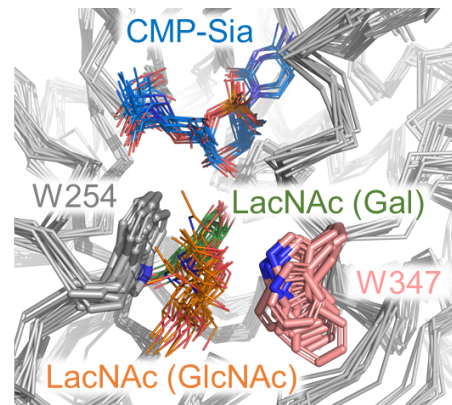


図 5 rST3Gal3 – CMP-Sia – LacNAc-OMe 複合体の MD シミュレーション

200 ns の MD シミュレーションにおける初期フレームの主鎖 Ca 原子を参照構造とした構造アラインメントのうち、最終 60 ns 分 10 フレームを表示している。