Development and applications of stable-isotope-labeling methods oriented to structural glycobiology

糖鎖構造生物学のための安定同位体標識技術の開発と応用

Yamaguchi, Yoshiki

RIKEN, Advanced Science Institute, Chemical Biology Department,
Systems Glycobiology Research Group, Structural Glycobiology Team
2-1 Hirosawa Wako, Saitama 351-0918, Japan
FAX: +81-48-467-9620, E-mail: yyoshiki@riken.jp

Key Words: *stable isotope labeling, NMR, glycoprotein, glycoform, structure*

Abstract

Growing evidence reveals that glycans attached to proteins contribute not only to their solubility or stability but also to the tertiary structure of functional sites in proteins. It is becoming more and more important to elucidate the role of glycans from the structural aspects in the basic life science and applied science field, such as drug development. In this situation, we have been developing a methodology for analyzing the structure of glycoconjugates by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. In particular, we have established a systematic method for stable isotope labeling of glycoproteins with a variety of techniques based on synthetic chemistry, enzyme chemistry and cell cultivating. Hence, it is possible to analyze the structure, dynamics and interaction of glycoproteins at atomic resolution.

要約

タンパク質に結合している糖鎖はそのタンパク質の溶解性や安定性を決定するばかりでなく、タンパク質機能部位の三次元構造の構築に関与していることが明らかとなりつつある。糖鎖の役割を高次構造の観点から解明することは基礎生命科学と創薬等の応用科学のいずれにおいてもますます重要な課題となりつつある。こうした状況において、著者らは核磁気共鳴 (NMR) 法を利用した複合糖質の構造生物学研究の方法論の開発に取り組んできた。特に、合成化学、酵素化学、細胞培養技術を用いて糖タンパク質の安定同位体標識技術を確立したことにより、糖タンパク質の立体構造、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方法を切り拓いた。

A. Introduction

The glycans attached to proteins are known to mediate cell-cell communication, quality control of proteins, and structural integrity of proteins (1–4). In an effort to reveal the functions of glycans, not only biochemical and molecular biology approaches but also a structural biology approach are expected to play important roles. Accordingly, in order to unravel the functions of sugar moieties, it is necessary to determine the structure of glycoproteins containing glycans and to elucidate the mechanisms by which glycan-binding proteins (lectins) recognize glycans. Table 1 shows a list of glycans covalently or non-covalently attached to proteins in which more than eight successive sugar residues are resolved and deposited in the Protein Data Bank (5–38). The structure and interaction mode of typical high-mannose and complex type glycans are now beginning to be unraveled. Since glycans are often mobile and the covalent structures are heterogeneous, it is usually difficult to obtain the electron

A. はじめに

タンパク質に結合している糖鎖は、細胞間のコミュニケーションやタンパク質の品質管理、タンパク質の安定性の向上など様々な機能を担っていることが知られている (1–4)。このような糖鎖の機能を真に理解するためには、生化学的・分子生物学的なアプローチに加えて構造生物学的なアプローチが重要な役割を果たすと期待されている。すなわち、糖鎖を含めた糖タンパク質の立体構造やレクチンによる糖鎖の認識様式を原子レベルで明らかにすることが糖鎖機能の解説に貢献すると考えられている。

現在 Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) に登録されている糖タンパク質あるいは糖鎖–レクチン複合体のうちで 8 糖体以上の糖残基の立体構造が解明されているものを、糖鎖の化学構造別に表 1 に示す (5–38)。このように高マンノース型や複合型の糖鎖についてその立体構造が決定されつつあり、また糖鎖–タンパク質の複合体の構造解析から糖鎖

Table 1. List of *N*-linked oligosaccharides covalently or non-covalently attached to proteins deposited in Protein Data Bank. These oligosaccharides contain more than eight linked sugar residues. The data were obtained using Glycoconjugate Data Bank (79)

Structures of <i>N</i> -glycans	Glycoprotein Glycan/protein complex	Structure determination	Resolution (Å)	PDB code	Reference
<i>complex type</i>
Furin	X-ray	2.6	1p8j	1
IgG	X-ray	1.7	1l6x	2
<i>Lathyrus ochrus</i> isolectin I/ glycopeptide complex	X-ray	2.8	1lgc	3
<i>Lathyrus ochrus</i> isolectin I/ glycopeptide complex	X-ray	2.8	1lgc	3
Vascular apoptosis-inducing protein 2B	X-ray	2.7	2dw2	4
IgG	X-ray	2.9	1fc1	5
			4.5	1frt	6
			3.2	1e4k	7
			3.0	2j6e	ubpublished
			4.1	1h3y	8
<i>Lathyrus ochrus</i> isolectin I/ glycopeptide complex	X-ray	2.8	1lgc	3
Human zinc- α 2- glycoprotein	X-ray	2.8	1zag	9
IgG	X-ray	2.4	1h3x	8
			2.8	1i1a	10
			2.6	1i1c	10
			2.3	1ocp	unpublished
			2.0	2dtq	11
	α -subunit of human chorionic gonadotropin	NMR	—	1hd4	12
Endo- β - <i>N</i> - acetylglucosaminidase F3	X-ray	2.1	1eom	13
IgG	X-ray	2.7	1dn2	14
			3.1	1h3v	8
			5.0	2gj7	15
			3.0	1t83	16
			3.5	1t89	16
			3.2	1igy	17
IgG	X-ray	3.0	1t83	16
			3.5	1t89	16
			2.4	1h3x	8
			2.3	1oop	unpublished
Antithrombin	X-ray	2.6	1e05	18

Table 1 (continue)

Structures of <i>N</i> -glycans	Glycoprotein Glycan/protein complex	Structure determination	Resolution (Å)	PDB code	Reference
TCR-peptide-MHC class I complex	X-ray	2.7	1kj2	19
IgG	X-ray	3.2	1mco	20
<i>high mannose type</i>
Cyanovirin-N/ oligomannose complex	X-ray	2.5	1m5m	21
Influenza virus neuraminidase	X-ray	2.2	2b8h	22
Yeast exo-(1,3)- β - glucanase	X-ray	1.8	1h4p	23
<i>Aspergillus awamori</i> glucoamylase	X-ray	2.0 1.7	1gah 1gai	24 24
	Influenza virus neuraminidase	X-ray	1.7 2.2	1mwe 2b8h	25 22
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> proteinase a	X-ray	2.2	1dp5	26
Human β -glucuronidase	X-ray	2.6	1bhg	27
	Human CD2	NMR	—	1gya	28
	Bovine lysosomal α -mannosidase	X-ray	2.7	1o7d	29
	EGF receptor	X-ray	2.8	1yy9	30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> proteinase a	X-ray	1.8	1dpj	26
<i>Aspergillus awamori</i> glucoamylase	X-ray	2.4 2.4 2.4	1agm 1dog 1glm	31 32 33
	Glycosylated eel calcitonin	NMR	—	1bzb	34
	<i>Aspergillus awamori</i> glucoamylase	X-ray	2.2	3gly	33
Yeast exo-(1,3)- β - glucanase	X-ray	1.8	1h4p	23

densities of glycans even though we succeed in growing glycoprotein crystals (39,40). Successful observations of almost complete glycans (listed in Table 1) are mainly attributed to the extensive intramolecular and/or intermolecular interactions between the glycans and the proteins in the crystal lattice (39,40). Some 3D structures of

とペプチド鎖との相互作用様式の一端も明らかとされつつある。糖鎖は一般に運動性が高く化学構造が不均一であるために、結晶が得られたとしても通常十分な電子密度像を得ることが困難である(39,40)。表1に挙げるように限られた解析例において糖鎖の大部分の像が得られているのは、糖鎖が自身

Fig. 1. 3D structures of typical oligosaccharides deposited in Protein Data Bank. (a) Complex type glycans of vascular apoptosis-inducing protein (2DW2, left) and *Lathyrus ochrus* isolectin I/glycopeptides complexes (1LGC, middle and right). (b) High-mannose type glycans of influenza virus neuraminidase (2B8H and 1MWE, left and right, respectively), human β -glucuronidase (1BHG, middle). These graphics are generated with the software PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net/>).

glycans in Table 1 are shown in Fig. 1 as examples. From the comparison of these structures, it is obvious that the conformations of glycans are considerably different from each other. The conformation of glycans seems strongly dependent on their covalent structures and/or the surrounding microenvironment.

Although the structures of glycoproteins and glycan-lectin complexes have been determined as shown in

の結合しているタンパク質分子あるいは結晶中で隣接する分子とコンタクトしているためである(39,40)。表1に挙げた糖鎖の立体構造例を図1に示す。それらの糖鎖構造を比較してみると、高マンノース型糖鎖および複合型糖鎖のいずれの場合においても、その立体構造は糖鎖間で異なっており、糖鎖はそのおかれている環境や化学構造によって立体構造が大きく変わり得ることを示している。

Table 1, the structural data of glycoconjugates in PDB is quite few compared to the simple proteins. More than 50 % of total proteins are glycosylated (41), only 3% (1,589/46,719 entries, Jan. 2008) of total deposited proteins are glycoproteins (containing more than one sugar residue in the Protein Data Bank). The lack of structural analysis of glycoproteins is mainly due to the difficulties in obtaining a large amount (1–10 mg) of glycosylated proteins for structural analyses. Even though a large amount of glycoprotein was prepared, the glycans attached to proteins are often enzymatically removed for crystallization (42,43). Inherent flexibility and microheterogeneity of glycans attached to protein hampers the crystallization of glycoproteins. Lack of stable isotope labeling method also prevents the NMR analysis of glycoproteins. In order to reveal a variety of functions embedded in glycans, it is obviously needed to accumulate structural information on glycans.

B. Establishment of stable isotope labeling of glycoproteins

Stable isotope labeling is now an essential technique for structural analysis of proteins. Stable isotope labeling is useful not only for attaining high signal to noise ratio of NMR spectra but also obtaining the structural information of interest or suppressing the unwanted signals (44–46). We started to establish the stable isotope labeling technique for NMR analysis of large glycoproteins. We focused on immunoglobulin G (IgG) as a model glycoprotein. Radioisotope labeling (^3H or ^{14}C) of glycoprotein glycans has been reported to facilitate detection of small amounts of glycoprotein samples (47). Furthermore, stable isotope labeling of glycoproteins by metabolic and chemo-enzymatic methods has been reported for NMR analyses (48–52). However, for NMR analysis, it is necessary to establish a systematic method for labeling high molecular weight glycoproteins, such as IgG, with stable isotopes. We attempted to label the glycans attached to IgG by adding labeled metabolic precursors into the medium for culturing antibody-producing cells. To attain maximum enrichment of isotopes, we optimized the culture conditions of antibody-producing cells using serum-free media. We also developed synthetic methods to obtain the labeled monosaccharides, $[1-^{13}\text{C}]$ glucosamine, $[^{15}\text{N}]$ glucosamine and $[6-^{17}\text{O}]$ glucosamine for metabolic precursors. Furthermore, we investigated enzymatic

このように糖タンパク質や糖鎖–レクチン複合体の立体構造が明らかとされてきているものの、これらの立体構造解析数は糖鎖の修飾を受けていない単純タンパク質の解析数と比較して圧倒的に少ないのが現状である。生命を構成する全タンパク質のうち半数以上は糖鎖が付加していると言われていたが(41)、Protein Data Bankに登録されているタンパク質のうち糖タンパク質として座標が登録されているもの(一残基以上の糖残基の座標を含んでいるもの)は、全体のわずか3パーセント程度である(2008年1月現在、46,719 エントリー中1,589 個)。このように糖タンパク質の構造解析が圧倒的に少ない理由は、糖鎖が付加されたタンパク質を構造解析に必要な量(通常1–10 mg程度)を得ることが困難であることが第一に挙げられる。十分な量の糖タンパク質を調製できたとしても、結晶を得るために糖鎖を酵素的に除去していたり(42,43)、糖鎖固有の運動性・不均一性が糖タンパク質の結晶化を妨げていたり、NMR解析のための糖タンパク質の安定同位体標識法が欠如している、などの理由により糖タンパク質糖鎖の構造解析が著しく立ち遅れている。糖鎖の様々な機能を解明するためには糖鎖の立体構造に関する多くの知見が是非とも必要である。

B. 糖タンパク質の安定同位体標識技術の確立

安定同位体標識は現在NMRによるタンパク質の立体構造解析において必須の技術となっている。安定同位体標識は、NMR検出の感度を向上させるだけでなく、標識方法を工夫することにより、知りたい領域の立体構造情報のみを抽出する、あるいは不要なシグナルを検出しないようにする、といった情報の取捨選択も可能である(44–46)。著者らは高分子量の糖タンパク質のNMRによる高次構造解析を実施するために、免疫グロブリンG(IgG)を題材として、その安定同位体標識に着手した。これまで微量糖鎖の構造解析などの目的で ^3H や ^{14}C などの放射性同位元素を用いた糖タンパク質糖鎖の標識は従来行われていた(47)。またNMR解析のために代謝経路あるいは酵素反応と有機合成を利用して糖タンパク質の安定同位体標識を行った例が報告されている(48–52)。しかしながらIgGのような高分子量糖タンパク質を解析するためには、系統的な糖タンパク質の安定同位体標識法を検討・確立する必要があった。抗体産生細胞を培養する培地中に標識した糖鎖前駆体を添加することにより、IgGに結合している糖鎖を標識することを試みた。糖鎖の高い安定同位体標識率を達成するために、無血清の条件下での抗体産生細胞の培養条件の検討を行った。また、 $[1-^{13}\text{C}]$ glucosamineや $[^{15}\text{N}]$ glucosamine、 $[6-^{17}\text{O}]$ glucosamineなどの安定同位体標識糖を高収率で合成するため、その合成方法の検討も同時に行った

Fig. 2. Synthesis of stable isotope labeled glucosamines. $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ glucosamine and $[^{15}\text{N}]$ glucosamine were synthesized using $[^{13}\text{C}]$ potassium cyanide and $[^{15}\text{N}]$ ammonium chloride for ^{13}C and ^{15}N enrichment, respectively. $[6\text{-}^{17}\text{O}]$ glucosamine was prepared using $[^{17}\text{O}_2]$ sodium acetate, which was prepared from $[^{17}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$.

Fig. 3. Schemes of stable isotope labeling of glycoprotein glycan. Metabolic labeling (left) and in vitro enzymatic labeling (right) are schematically shown.

methods to introduce labeled sugars onto purified IgG in vitro. By use of metabolic and in vitro labeling techniques, we have succeeded in labeling mg order of glycoprotein with high selectivity and high isotope enrichment (Fig. 3) (53).

Using the established isotope-labeling methods, we started to analyze the structure of IgG-Fc by NMR. We performed a series of NMR measurements of IgG-Fc whose glycans are uniformly or selectively labeled. Owing to the observed NMR parameters (chemical shift, NOE, relaxation time, etc), we could reveal the dynamics of Fc glycans and the mode of glycan-peptide interactions.

(図2)。さらに、精製した IgG に糖転移酵素を用いて標識糖を導入するための条件検討を行った。それらの検討の結果、細胞の代謝を利用した「メタボリックラベリング法」および糖転移酵素を利用した「*in vitro* ラベリング法」により、ミリグラムオーダーの糖タンパク質の糖鎖部分に対して選択的かつ100%に近い標識率で安定同位体標識を施すことに成功した(図3)(53)。

このようにして確立した安定同位体標識法を用いて、NMR 法による IgG-Fc の構造解析を行った。糖鎖を均一にあるいは選択的に安定同位体標識を施した IgG-Fc を対象として

Fig. 4. Examples of NMR parameters on IgG-Fc. (a) Summary of inter-sugar residue (broken line) and sugar-polypeptide (solid line) NOE connectivities observed in ¹³C-labeled IgG-Fc. (b) ¹⁵N relaxation parameters (¹⁵N T_1 , T_2 and {¹H}-¹⁵N NOE) and amide proton exchange rates (k_{ex}) of GlcNAc residues on IgG-Fc. k_{ex} values are obtained by a comparison of the signal intensities in ¹H-¹⁵N HSQC spectra with and without presaturation of the water resonance (80). Relaxation parameters amide proton exchange rates could be used for the analysis of dynamical features and solvent accessibility of each GlcNAc residue. These parameters are obtained using IgG-Fc whose GlcNAc residues were selectively labeled with ¹⁵N (81). The NMR signal from GlcNAc-1 was not observed due to line-broadening.

Figure 4 shows some experimental results on IgG-Fc glycans as examples. We also developed a new method to assign ¹H and ¹³C NMR signals for the glycans on glycoproteins by using [¹³C₆, ²H₇]glucose as a metabolic precursor. The D to H exchange ratios at the C1-C6 positions of each sugar residue have been proven to provide useful information for the residue-specific assignment (54). These methods established a basis for the NMR analyses of large glycoproteins (55).

各種 NMR 測定を行った。NMR 測定で観測される種々のパラメータ（化学シフト、NOE、緩和時間など）を利用することによって、IgG の Fc 領域に結合している 2 本鎖複合型糖鎖の分子内存在様式や運動性を原子レベルで明らかとすることができた。図 4 に解析結果の一例を示す。また、²H および ¹³C によって二重標識されたグルコースを培養動物細胞の代謝前駆体として糖タンパク質糖鎖に安定同位体標識を施すことにより、各糖残基の 1 位から 6 位の重水素から水素への交換率を利用して糖鎖由来の NMR シグナルを帰属する方法もあわせて確立した(54)。これらの方法により、高分子量糖タンパク質の NMR 解析を行うための基盤を整えることができた(55)。

C. Analysis of glycoform-dependent structural changes

Biantennary complex type glycans attached to IgG-Fc are of vital importance for the promotion of effector functions, such as binding to Fc receptors and activating complement system (56–58). However, the structural and functional roles of each sugar residue have not been examined in detail. Therefore, we intended to investigate the glycoform-dependent conformational alteration of IgG-Fc and the relationship between the structures and effector functions by use of the established labeling methods. Uniform ^{13}C - and ^{15}N -labeling of both glycan and peptide portions of glycoproteins can be attained by replacing all the medium components (carbon and nitrogen sources) with the corresponding labeled ones. We could examine the structural change of IgG-Fc upon trimming of glycans attached to uniformly ^{13}C - and ^{15}N -labeled Fc by NMR. We treated the glycans attached to IgG-Fc with galactosyltransferase, galactosidase, *N*-acetylhexosaminidase,

C. グライコフォームの違いによる糖タンパク質の構造変化の解析

IgG の Fc 領域に結合している 2 本鎖の複合型糖鎖は、Fc レセプターとの結合や補体活性化などのエフェクター機能の発現において必須であることが古くから知られている (56–58)。しかしながら、その糖鎖を構成する個々の糖残基の構造と機能に果たす役割についてはあまり明らかとされていなかった。そこで、本研究で確立した安定同位体標識法を利用して糖タンパク質のグライコフォームの変化に伴う構造変化と活性との関係を明らかにすることを試みた。糖タンパク質中の糖鎖・ペプチド鎖を ^{13}C および ^{15}N で均一に標識するには、糖タンパク質発現細胞の培地中の炭素源・窒素源を標識体に置換することにより可能となる。このような標識 Fc を用いることにより、糖鎖の化学構造の変化（グライコフォームの変化）に伴う、Fc の構造変化を NMR により追跡することが可能となる。Fc に結合している糖鎖を糖転移酵素 (galac-

Fig. 5. Conformational changes of IgG-Fc on trimming of sugar residues attached to Asn297. The perturbed residues upon removal sugar residues were shown in black on the crystal structures of human IgG-Fc (PDB code 1E4K). (a) Galactosidase treatment, (b) *N*-acetylhexosaminidase treatment, (c) endoglycosidase D treatment, (d) PNGase F treatment and (e) removal of fucose. The glycans attached to Asn297 of IgG-Fc are shown in stick representation and removed sugar residues are colored in black. The molecular graphics were generated with PyMOL.

endoglycosidase D and peptide:*N*-glycosidase F. Removal of non-reducing galactose or GlcNAc residues induced local conformational changes surrounding the galactose and GlcNAc residues. However, cleavage of GlcNAc β 1-4GlcNAc bond with endoglycosidase D resulted in structural alteration of lower hinge region, which is the major Fc receptor binding site (Fig. 5a-d) (55,58).

Recent report shows that removal of fucose residues on IgG-Fc dramatically enhances the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity up to 50 times (59). The cost of therapeutic antibodies is quite high, so the mechanism of ADCC enhancement of fucose-depleted IgG is a topic of great interests (60). Although the molecular mechanism of ADCC enhancement has been proposed to date (61), the detailed mechanism is still unknown. We thus compared the fucosylated and non-fucosylated Fc fragment of IgG by stable isotope-assisted NMR methods. From the spectral comparison, it was revealed that structural and dynamical changes were occurred in the limited region around the fucose residues (Fig. 5e) (15). These results suggest that the enhancement of ADCC activity is attributed to the subtle conformational and dynamical changes.

D. Application of labeling method to analysis of glycan-protein interaction

Stable isotope labeling of glycans is also useful for analysis of glycan-lectin interactions as well as structural analysis of glycoproteins. It is possible to obtain the structural information on lectin-bound ligand using labeled glycan ligands. We started the structural analysis of intracellular lectins, particularly focused on SCF^{Fbs1}. SCF^{Fbs1} is a sugar-recognizing ubiquitin ligase, and ubiquitinate proteins with *N*-linked glycans. SCF^{Fbs1} is considered to play important roles in proteasomal degradation of glycoproteins in cytosol (62,63).

We performed the NMR analysis of the interactions between sugar-binding domain (SBD) of Fbs1 and a variety of oligosaccharides and isotopically labeled glycopeptides (Fig. 6). Labeled glycopeptides were prepared by protease and glycosidase treatments of labeled glycoprotein (in this case, we used IgG). From the NMR spectra, it was revealed that Fbs1 recognizes the innermost

tosyltransferase) や各種グリコシダーゼ (galactosidase, *N*-acetylhexosaminidase, endoglycosidase D, peptide:*N*-glycosidase F) を用いて処理を施した結果、非還元末端側の Gal や GlcNAc を切断した場合は、限局された場所 (Gal や GlcNAc 残基の空間的近傍) にしか構造変化が誘起されなかったが、endoglycosidase D によって GlcNAc β 1-4GlcNAc 結合を切断したときに初めて Fc レセプターの結合部位であるヒンジ領域下流に高次構造変化が観測された。各糖残基とポリペプチド鎖との相互作用が Fc レセプター結合部位の高次構造を構築していることを NMR 法により原子レベルで実証することができた (図 5a-d) (55,58)。

近年 Fc に結合している糖鎖のフコース残基を取り除くと、Fc レセプターとの親和性が上昇してその抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性が劇的に増大 (>50 倍) することが報告されている (59)。抗体医薬の分野では高いコストが問題となっており、そのためにフコース欠損型の ADCC 活性の増大のメカニズムには多大な関心が寄せられている (60)。その分子構造論的なメカニズムについてはモデルが提唱されているものの (61)、依然として不明な点が多い。そこで、安定同位体利用 NMR 法を用いてフコース残基の有無による Fc の構造の相違を明らかにすることを試みた。その結果、フコース結合型およびフコース欠損型の Fc の高次構造の違いはフコース残基の周辺の局所にとどまることが判明した (図 5e) (15)。この結果は、フコース残基の除去に伴う抗体依存性細胞障害活性の顕著な増大は、この残基周辺の微細な環境変化に対応することが考えられる。今後フコース欠損型 Fc と Fc レセプターとの相互作用のさらなる解析が必要である。

D. 糖鎖—レクチンの相互作用解析への応用

安定同位体標識法は糖タンパク質の構造解析のみならず、糖鎖とレクチンの相互作用解析にも適用することが可能である。リガンドとなる糖鎖を標識することにより、レクチンに結合しているリガンド糖鎖の構造情報を入手することができる。そこで、糖鎖を認識するユビキチンリガーゼ複合体 SCF^{Fbs1} をはじめとする細胞内レクチンについての構造生物学的研究を開始した。SCF^{Fbs1} は細胞質において、*N* 結合型糖鎖を有するタンパク質を認識してポリユビキチン鎖を連結する酵素であり、プロテアソームによる糖タンパク質の分解において重要な役割を担っていることが見出されている (62,63)。

糖鎖結合ドメイン (Fbs1-SBD) と様々な糖鎖および安定同位体標識を施した糖ペプチドとの相互作用の一連の NMR 解析を行った (図 6)。標識糖ペプチドは標識した糖タンパク質 (この場合 IgG) をプロテアーゼ消化、グリコシダーゼ消化を行うことにより調製した。NMR 解析の結果から、Fbs1

Fig. 6. Interaction of Fbs1 with a variety of ^{13}C -labeled glycopeptides. ^1H - ^{13}C HSQC spectra of glycopeptides in the presence (gray) and absence (black) of sugar-binding domain of Fbs1. Each glycan structure is shown onto the corresponding NMR spectrum.

Fig. 7. Tandem mass spectra of unlabeled and ^{13}C -labeled PA-oligosaccharides with MALDI-QIT-TOFMS. Isotopomers of biantennary oligosaccharides were subject to mass analyses, in which one of two non-reducing terminal galactose residues is selectively enriched with ^{13}C .

GlcNAc and glycosylated asparagine residues. In many native glycoproteins, however the innermost GlcNAc residues are shielded by intramolecular interactions with amino acid residues spatially proximate to the glycosylation sites. The steric hindrance seems to hamper the approach of Fbs1 to correctly folded glycoproteins. Therefore the sugar-binding mode embodied by Fbs1 is suitable for the recognition of misfolded glycoproteins, which is targeted for proteasomal degradation. These findings have important implications for the elucidation of degradation system of glycoproteins in cells (55,64,65).

E. Mass spectrometric analysis of isotope-labeled glycans

Isotope labeling techniques are now extensively used for the mass spectrometric analysis of peptides and proteins (66–68). Isotope labeling oligosaccharides in the mass spectrometric analyses is also quite useful for the identification of glycosylation sites (69–71) and quantitative analysis of oligosaccharide mixtures (72,73). It is, however, not feasible to determine the oligosaccharide structure unambiguously solely on the MS data because there exist a variety of isomeric structures with different composition, glycosidic linkage and branching. In particular, identification of individual fragment ions originating from multiantennary oligosaccharides is extremely difficult. However, we might discriminate each antenna if branch-selective ^{13}C labeling of sugar residue is applied to oligosaccharides. We have succeeded in mass spectrometric analyses of biantennary oligosaccharides, in which one of two non-reducing terminal galactose residue is selectively enriched with ^{13}C by enzymatic reactions (74). Interestingly, a preferential cleavage of the GlcNAc β 1-2Man glycosidic linkage in the Man α 1-6 antenna was observed compared with the cleavage in Man α 1-3 antenna. Collection of mass spectrometric data obtained by these labeling techniques would be useful for analysis of tri- and tetra-antennary oligosaccharide (75) and branch specificity of glycosyltransferases (76).

F. Summary and future perspective

Thus we established the stable isotope labeling methods for the structural analyses of glycoproteins and glycan-lectin complexes. However, the structure and functions of sugar chains are not fully understood. Covalent structure of glycans attached to membrane proteins are related to the signal transduction (77), for example, but it would be necessary to explain these phenomena from the structural point of view. Structural analysis of glycolipids and glycoproteins on the cell membrane might reveal the new functions of sugar chains. For the purpose, it is undoubtedly necessary to develop the methods for structural

は標的糖タンパク質の糖鎖とポリペプチド鎖の連結部を認識することが判明した。しかしながら、通常多くの糖タンパク質では、Asnに結合しているGlcNAcは近傍のアミノ酸残基と分子内相互作用をしているために、その立体障害からFbs1と結合できないと考えられる。したがってFbs1の基質結合様式はプロテアソームで分解されるべきミスフォールド状態にある糖タンパク質の認識に適していることを明らかにした。得られた結果は、細胞内における糖タンパク質の分解システムを解明するうえでの重要な知見となった(55,64,65)。

E. 安定同位体標識技術の糖鎖の質量分析への応用

近年、タンパク質やペプチドの質量分析における安定同位体の利用は目覚ましい(66–68)。糖鎖の質量分析の分野においても安定同位体標識は、糖鎖結合部位の同定(69–71)や糖鎖の比較定量解析(72,73)などに対して有用であることが示されている。しかし依然として質量分析による糖鎖の化学構造を一義的に決定することは容易ではない。それは、通常糖鎖には組成やグリコシド結合、分岐に由来する数多くの異性体が存在していることに由来する。特に、糖鎖が多分岐型の構造をしており、それぞれの枝が同じ質量である場合、その開裂がどの枝に由来するのかを同定することは困難である。しかし、分枝鎖選択的に特定の糖残基の ^{13}C による標識を行えばそのイオンを目印とすることができる。著者らは、枝選択的に ^{13}C 標識した2本鎖複合型糖鎖を調整して質量分析を行うことにより、その枝選択的な開裂を示すことに成功した(74)。興味深いことにMan α 1-6結合の分岐にあるGlcNAc β 1-2Manのグリコシド結合はMan α 1-3結合の分岐にあるグリコシド結合よりも切断されやすいことが判明した。このような安定同位体標識を取り入れて質量分析のデータを蓄積することにより、3本鎖、4本鎖といった多分岐糖鎖の開裂パターンの解析(75)、糖転移酵素の分枝鎖特異性の解析(76)など今後質量分析の範囲が広がるものと思われる。

F. まとめと今後の展望

以上のように安定同位体標識をキーワードとして糖タンパク質や糖鎖—レクチン複合体の構造解析手法を確立した。しかしながら、現状では糖鎖の構造と機能に関しては未知な事柄が山積している。たとえば膜タンパク質に結合している糖鎖の構造はシグナル伝達に関与していることが示されてきているが(77)、これらの現象の立体構造の観点から説明することが今後重要になると考えている。生体膜上の糖脂質や膜糖タンパク質を対象とした立体構造解析により、これまで未知であった糖鎖の機能が明らかにされるものと期待される。そのためには、膜タンパク質や糖脂質を含んだ超分子複合体

analyses of super molecular complexes including glycoproteins and glycolipids. In order to analyze such samples, we just started to use an ultra high field NMR spectroscopy promising high resolution and sensitivity (78). The obtained spectra enabled us to estimate the exchange ratio of hydroxyl protons by use of isotope shifts. We are also developing a method for structural analysis of high molecular weight glycoproteins by ^{13}C direct detecting. We aim to elucidate the mechanism of functional expression of glycoconjugates on the basis of stable isotope assisted NMR spectroscopy.

を対象とした構造解析の方法論の開発も今後重要となる。現在は、そのような対象を視野にいて超高磁場 NMR 装置のもたらず高分解能・高感度を積極的に活用することにより、微小な同位体シフトによるヒドロキシルプロトンの溶媒との交換速度の算出、低温プローブを用いた高感度 ^{13}C 検出による高分子量糖タンパク質の糖鎖シグナルの帰属法の開発を行っている(78)。以上に述べた安定同位体標識技術を基盤として複合糖質の構造解析を行うことにより、その機能発現メカニズムの解明を目指していきたいと考えている。

謝辞

本稿を終えるにあたり、未熟な私に研究の機会を与えてくださり御指導を賜りました東京大学・荒田洋治先生、嶋田一夫先生に心より御礼申し上げます。名古屋市立大学・加藤晃一先生は私が学生のことから現在に至るまで終始御指導・御鞭撻をいただき深く感謝いたします。現在の理研での研究の機会を与えてくださり、糖鎖研究の御指導をいただいております谷口直之先生・伊藤幸成先生に深く感謝いたします。標識単糖の合成で御指導いただきました東京大学・故古賀憲司先生、青木伸先生、新藤充先生、青木一真先生、抗体につきて共同研究を行っていただきました協和発酵工業株式会社の設楽研也先生、佐藤光男先生、松宮茂樹先生、ユビキチンリガーゼの共同研究を行っていただきました臨床研・田中啓二先生、吉田雪子先生、安定同位体標識糖鎖の質量分析に関する共同研究を行っていただきました島津製作所・田中耕一先生、関谷禎規先生に深謝いたします。糖鎖の HPLC 分析では名古屋市立大学・高橋禮子先生に大変お世話になり厚く御礼申し上げます。また紙面では書ききれないほどの多くの学生方の並々なぬ努力によって本研究は成り立っております。この場を借りて皆様方に深く御礼申し上げます。

References

1. Kato, K., and Kamiya, Y. (2007) *Glycobiology* **17**, 1031–1044
2. Kobata, A. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 443–464
3. Dwek, R. A. (1995) *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 1–25
4. Kobata, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 483–501
5. Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G. P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W., and Than, M. E. (2003) *Nature Struct. Biol.* **10**, 520–526
6. Idusogie, E. E., Presta, L. G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P. Y., Ultsch, M., Meng, Y. G., and Mulkerrin, M. G. (2000) *J. Immunol.* **164**, 4178–4184
7. Bourne, Y., Mazurier, J., Legrand, D., Rouge, P., Montreuil, J., Spik, G., and Cambillau, C. (1994) *Structure* **2**, 209–219
8. Igarashi, T., Araki, S., Mori, H., and Takeda, S. (2007) *FEBS Lett.* **581**, 2416–2422
9. Deisenhofer, J. (1981) *Biochemistry* **20**, 2361–2370
10. Burmeister, W. P., Huber, A. H., and Bjorkman, P. J. (1994) *Nature* **372**, 379–383
11. Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., and Jacob, U. (2000) *Nature* **406**, 267–273
12. Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., and Sondermann, P. (2003) *J. Mol. Biol.* **325**, 979–989
13. Sánchez, L. M., Chirino, A. J., and Bjorkman, P. (1999) *Science* **283**, 1914–1919
14. Martin, W. L., West, A. P., Jr., Gan, L., and Bjorkman, P. J. (2001) *Mol. Cell.* **7**, 867–877
15. Matsumiya, S., Yamaguchi, Y., Saito, J., Nagano, M., Sasakawa, H., Otaki, S., Satoh, M., Shitara, K., and Kato, K. (2007) *J. Mol. Biol.* **368**, 767–779

16. Erbel, P. J., Karimi-Nejad, Y., van Kuik, J. A., Boelens, R., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. (2000) *Biochemistry* **39**, 6012–6021
17. Waddling, C. A., Plummer, T. H., Jr., Tarentino, A. L., and Van Roey, P. (2000) *Biochemistry* **39**, 7878–7885
18. DeLano, W. L., Ultsch, M. H., de Vos, A. M., and Wells, J. A. (2000) *Science* **287**, 1279–1283
19. Sprague, E. R., Wang, C., Baker, D., and Bjorkman, P. J. (2006) *PLoS Biol.* **4**, e148
20. Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., and Sun, P. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 16469–16477
21. Harris, L. J., Skaletsky, E., and McPherson, A. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 861–872
22. Skinner, R., Abrahams, J. P., Whisstock, J. C., Lesk, A. M., Carrell, R. W., and Wardell, M. R. (1997) *J. Mol. Biol.* **266**, 601–609
23. Reiser, J. B., Gregoire, C., Darnault, C., Mosser, T., Guimezanes, A., Schmitt-Verhulst, A. M., Fontecilla-Camps, J. C., Mazza, G., Malissen, B., and Housset, D. (2002) *Immunity* **16**, 345–354
24. Guddat, L. W., Herron, J. N., and Edmundson, A. B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4271–4275
25. Botos, I., O’Keefe, B. R., Shenoy, S. R., Cartner, L. K., Ratner, D. M., Seeberger, P. H., Boyd, M. R., and Wlodawer, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 34336–34342
26. Smith, B. J., Huyton, T., Joosten, R. P., McKimm-Breschkin, J. L., Zhang, J. G., Luo, C. S., Lou, M. Z., Labrou, N. E., and Garrett, T. P. (2006) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 947–952
27. Taylor, S. C., Ferguson, A. D., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 128–134
28. Aleshin, A. E., Stoffler, B., Firsov, L. M., Svensson, B., and Honzatko, R. B. (1996) *Biochemistry* **35**, 8319–8328
29. Varghese, J. N., Colman, P. M., van Donkelaar, A., Blick, T. J., Sahasrabudhe, A., and McKimm-Breschkin, J. L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11808–11812
30. Li, M., Phylip, L. H., Lees, W. E., Winther, J. R., Dunn, B. M., Wlodawer, A., Kay, J., and Gustchina, A. (2000) *Nature Struct. Biol.* **7**, 113–117
31. Jain, S., Drendel, W. B., Chen, Z. W., Mathews, F. S., Sly, W. S., and Grubb, J. H. (1996) *Nature Struct. Biol.* **3**, 375–381
32. Wyss, D. F., Choi, J. S., Li, J., Knoppers, M. H., Willis, K. J., Arulanandam, A. R., Smolyar, A., Reinherz, E. L., and Wagner, G. (1995) *Science* **269**, 1273–1278
33. Heikinheimo, P., Helland, R., Leiros, H. K., Leiros, I., Karlsen, S., Evjen, G., Ravelli, R., Schoehn, G., Ruigrok, R., Tollersrud, O. K., McSweeney, S., and Hough, E. (2003) *J. Mol. Biol.* **327**, 631–644
34. Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P., and Ferguson, K. M. (2005) *Cancer Cell* **7**, 301–311
35. Aleshin, A. E., Firsov, L. M., and Honzatko, R. B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15631–15639
36. Harris, E. M., Aleshin, A. E., Firsov, L. M., and Honzatko, R. B. (1993) *Biochemistry* **32**, 1618–1626
37. Aleshin, A. E., Hoffman, C., Firsov, L. M., and Honzatko, R. B. (1994) *J. Mol. Biol.* **238**, 575–591
38. Hashimoto, Y., Toma, K., Nishikido, J., Yamamoto, K., Haneda, K., Inazu, T., Valentine, K. G., and Opella, S. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 8377–8384
39. Petrescu, A. J., Wormald, M. R., and Dwek, R. A. (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 600–607
40. Wormald, M. R., Petrescu, A. J., Pao, Y. L., Glithero, A., Elliott, T., and Dwek, R. A. (2002) *Chem. Rev.* **102**, 371–386
41. Lütke, T., Frank, M., and von der Lieth, C. W. (2004) *Carbohydr. Res.* **339**, 1015–1020
42. Grueninger-Leitch, F., D’Arcy, A., D’Arcy, B., and Chene, C. (1996) *Protein Sci.* **5**, 2617–2622
43. Chang, V. T., Crispin, M., Aricescu, A. R., Harvey, D. J., Nettleship, J. E., Fennelly, J. A., Yu, C., Boles, K. S., Evans, E. J., Stuart, D. I., Dwek, R. A., Jones, E. Y., Owens, R. J., and Davis, S. J. (2007) *Structure* **15**, 267–273
44. Arata, Y., Kato, K., Takahashi, H., and Shimada, I. (1994) *Methods Enzymol.* **239**, 440–464
45. Kainosho, M., Torizawa, T., Iwashita, Y., Terauchi, T., Mei Ono, A., and Güntert, P. (2006) *Nature* **440**, 52–57
46. Kainosho, M. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4 Suppl**, 858–861
47. Varki, A. (1991) *FASEB J.* **5**, 226–235
48. Miyazaki, T., Sato, H., Sakakibara, T., and Kajihara, Y. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5678–5694
49. Miyazaki, T., Sakakibara, T., Sato, H., and Kajihara, Y. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1411–1412
50. 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
51. Gilhespy-Muskett, A. M., Partridge, J., Jefferis, R., and Homans, S. W. (1994) *Glycobiology* **4**, 485–489
52. Goux, W. J., Perry, C., and James, T. L. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1829–1835
53. Yamaguchi, Y., Kato, K., Shindo, M., Aoki, S., Furusho, K., Koga, K., Takahashi, N., Arata, Y., and Shimada, I. (1998) *J. Biomol. NMR* **12**, 385–394
54. Yamaguchi, Y., Takizawa, T., Kato, K., Arata, Y., and Shimada, I. (2000) *J. Biomol. NMR* **18**, 357–360
55. Yamaguchi, Y., and Kato, K. (2007) Structural glycobiology by stable-isotope-assisted NMR spectroscopy. in *Modern Magnetic Resonance* (Webb, G. A. ed.), Springer-Verlag, The Netherlands. pp 219–225
56. Kobata, A. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 472–478
57. Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., and Dwek, R. A. (2007) *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 21–50
58. Yamaguchi, Y., Takahashi, N., and Kato, K. (2007) Molecular interactions: Antibody structures and functions. in *Comprehensive Glycoscience*. pp 745–763
59. Okazaki, A., Shoji-Hosaka, E., Nakamura, K., Wakitani, M., Uchida, K., Kakita, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., and Shitara, K. (2004) *J. Mol. Biol.* **336**, 1239–1249
60. Satoh, M., Iida, S., and Shitara, K. (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* **6**, 1161–1173
61. Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Brunker, P., and Umaña, P. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 5032–5036
62. Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. (2002) *Nature* **418**, 438–442
63. Yoshida, Y. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2623–2631

64. Mizushima, T., Hirao, T., Yoshida, Y., Lee, S. J., Chiba, T., Iwai, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Tsukihara, T., and Tanaka, K. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 365–370
65. Yamaguchi, Y., Hirao, T., Sakata, E., Kamiya, Y., Kurimoto, E., Yoshida, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., and Kato, K. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 712–716
66. Shiio, Y., and Aebersold, R. (2006) *Nat. Protoc.* **1**, 139–145
67. Pan, S., and Aebersold, R. (2007) *Methods. Mol. Biol.* **367**, 209–218
68. Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., and Kuster, B. (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1017–1031
69. Kaji, H., Yamauchi, Y., Takahashi, N., and Isobe, T. (2006) *Nat. Protoc.* **1**, 3019–3027
70. Atwood, J. A., 3rd, Minning, T., Ludolf, F., Nuccio, A., Weatherly, D. B., Alvarez-Manilla, G., Tarleton, R., and Orlando, R. (2006) *J. Proteome. Res.* **5**, 3376–3384
71. Kaji, H., Saito, H., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Hirabayashi, J., Kasai, K., Takahashi, N., and Isobe, T. (2003) *Nat. Biotechnol.* **21**, 667–672
72. Yuan, J., Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Kawanishi, T., and Hayakawa, T. (2005) *J. Chromatogr. A* **1067**, 145–152
73. Kang, P., Mechref, Y., Kyselova, Z., Goetz, J. A., and Novotny, M. V. (2007) *Anal. Chem.* **79**, 6064–6073
74. Kato, K., Yamaguchi, Y., Takahashi, N., Nishimura, M., Iwamoto, S., Sekiya, S., and Tanaka, K. (2004) *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn* **52**, 284–288
75. Kameyama, A., Nakaya, S., Ito, H., Kikuchi, N., Angata, T., Nakamura, M., Ishida, H. K., and Narimatsu, H. (2006) *J. Proteome Res.* **5**, 808–814
76. Ito, H., Kameyama, A., Sato, T., Sukegawa, M., Ishida, H. K., and Narimatsu, H. (2007) *Nat. Methods* **4**, 577–582
77. Taniguchi, N. (2007) *Nat. Chem. Biol.* **3**, 307–309
78. Kato, K., Sasakawa, H., Kamiya, Y., Utsumi, M., Nakano, M., Takahashi, N., and Yamaguchi, Y. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 619–625

Profile of the Authors

Yoshiaki Yamaguchi received his Ph.D. in 1998 at Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo (Profs. Ichio Shimada and Yoji Arata). He continued his research as a Postdoctoral Research Fellow and then as a Research Associate in the same group. From 2001 to 2007 he was a Lecturer at Nagoya City University (Prof. Koichi Kato) and then move to his current position at RIKEN, Systems Glycobiology Research Group as a team leader of Structural Glycobiology Laboratory. His current study focuses on development of NMR techniques for structural analyses of glycoproteins and glycan-related proteins. He has been holding posts concurrently in Nagoya City University (2007–) and in Tokyo Medical and Dental University (2008–) as a visiting Professor. He received Young Scientist Awards from GlycoTOKYO in 2006 and from the Japanese Society of Carbohydrate Research in 2007.