

## 糖タンパク質セレクチンの糖鎖認識機構

(産業技術総合研究所 計算科学研究部門、CREST-JST) ○石田豊和

はじめに

糖鎖を特異的に認識して結合する糖タンパク質はレクチンと総称されて、生体中の細胞表面での分子認識プロセス（例えば、生物内の細胞間の分子認識、細胞接着、細胞内の物質の取り込みなど）においては、多様な糖鎖と種々のレクチン間の相互作用が本質的に重要である事が近年の実験結果により明らかとなってきた。しかし分子レベルで見た場合、糖鎖のとりうる複雑な配座の多様性を同定する事が困難であったり、高分解能の結晶構造に基づいたタンパク質-糖鎖複合体の情報不足している等の理由により、レクチンの糖鎖認識機構の詳細な理解はあまり進んでいない現状にある。このような現状を踏まえ本研究では、典型的な糖タンパク質として動物レクチンの一種セレクチンを対象として取り上げて、糖タンパク質-糖鎖複合体の階層的なモデリング手法を提案し、糖鎖認識機構の原子レベルの情報を引出す事を目標とした一連の研究を行った。

体内の炎症部位における生体防御機構において、白血球の血管外浸潤は生理的に重要なプロセスであり、この際セレクチンは白血球と血管内皮細胞との細胞接着に重要な役割を果たす事が知られている。ここでセレクチンは白血球や血管内皮細胞等に発現する糖タンパク質であり、その発現部位により、E、P および L セレクチンの三種類に分類されている。何れのセレクチンも分子構造にかなりの相同性を持ち、特に細胞外アミノ末端に位置する C-タイプレクチンドメインにシアリルルイス X ( $Sle^X$ : NeuAc, Gal, GlcNAc, Fuc から成る糖鎖構造) という特定の糖鎖モチーフを結合することが知られているが、その結合親和性はセレクチンの種類により特異性のある事も明らかになっており、この生理学的現象の分子論的メカニズムの解明は、セレクチンタンパク質の糖鎖認識機構を明確にする重要性のみならず、リポソームと糖鎖からなる能動的標的指向性 DDS の開発には不可欠の課題となっている。

目的、計算手法

今回対象として選択した系は、(1) 糖タンパク質に関してはヒトの E、P セレクチンの二種類、(2) 糖鎖としては  $Sle^X$  に限った。近年になって E、P セレクチンと  $Sle^X$  を結合した断片的な結晶構造が得られているので、この情報を用いて現実的なタンパク質モデルを構築し、E、P セレクチンと  $Sle^X$  の結合親和性を階層的な分子シミュレーションから明らかにする事を最大の目標とした。この場合主たる計算手法は分子動力学計算と ab initio QM/MM 電子状態計算である。糖タンパク質系のモデリング時における特徴的な問題として、初期構造として実験データを利用した場合結晶構造データの解像度の問題から、単純な構造精密化に基づく相互作用解析では限界のある事も容易に予測される。そこで本研究では、以下に述べる 2つの解析を平行して実行し、原子レベルでの糖鎖認識機構を議論する事を試みた：(1) 結晶構造をもとにした糖鎖複合体に対する溶媒和構造のモデル化、全系の QM/MM レベルで構造精密化する事による複合体構造解析、相

相互作用エネルギー成分解析（フラグメント法ベースの全電子状態解析との比較も含む）（2）分子動力学計算と ab initio QM/MM 計算を組合わせた糖鎖結合状態に対する自由エネルギー面計算の実行、最小自由エネルギー状態における糖鎖結合配座の同定と構造パラメータ、物性値（NMR 化学シフト）の実験データとの比較

### 計算、解析結果

QM/MM 計算による構造の精密化とフラグメント法ベースの全電子計算レベルの相互作用解析を組合わせ、E、P セレクチン間の糖鎖認識の差異を調べた。E セレクチン複合体に関しては実験構造の分解能もそこそこよい事から (1.5Å)、水和クラスターの構造精密化で得られた計算構造と結晶構造間で大きな構造変化は見られない。SLe<sup>X</sup> は C-タイプレクチンドメイン領域の表面に弱く結合しているだけで、糖鎖の認識に関与しているアミノ酸残基も、結合領域に存在する Glu、Arg 等のごく限られた残基である事が認められた。しかし P セレクチン複合体の場合用いた実験構造の分解能が悪く (3.4Å)、構造ベースの相互作用エネルギー解析では複雑な糖鎖認識機構に関して有意義な比較が困難であった。ただこれら構造ベースの比較では、QM/MM レベルでも全系量子計算レベルでも本質的に殆ど変化が見られないので、これは糖鎖の認識としては基本的に静電相互作用が本質である事を示唆している。

結果として上記の構造比較ベースの解析では糖鎖の様な弱い高次複合体の解析は困難な事が明らかとなったので、溶液中でタンパク質が基質である糖鎖を結合した状態を自由エネルギー空間上での安定構造間の状態遷移だととらえ、自由エネルギー空間上での糖鎖の構造をマップする事を試みた。この場合の自由エネルギー面は、(a) 糖鎖の溶媒和自由エネルギーと (b) 糖鎖の配座の内部エネルギーの2つの情報を反応座標に選択した二次元自由エネルギー面で、この縮訳された情報をもとに糖鎖認識機構において重要な2つのパラメータ、すなわち (1) 糖鎖の Bioactive conformation と (2) 糖鎖のタンパク質に対する Binding epitopes を議論した。理論計算から明らかになった事はまず (1) の観点に関して、SLe<sup>X</sup> 中のグリコシド結合の二面角の分布を見る限り、E、P セレクチンともに同じ様な分布を示し、両者とも似通った配向でタンパク質と結合している事が確かめられた。また (2) の観点に関しては、Fuc が Ca 結合ドメインのアミノ酸残基とタイトに水素結合を形成して、ペアとなるアミノ酸残基の組に対しては明瞭な差異が見られなかったが、Gal の水素結合ペアに対して2者間で微妙な差が確認された。さらに自由エネルギー面上において同定された最小自由エネルギー構造に対して QM/MM-GIAO レベルの計算から化学シフトの計算を行ない、NMR の実験結果から示唆される結合ドメイン内での構造パラメータの詳細を議論した。これら解析結果の詳細は当日発表する予定である。

### 謝辞

本研究は戦略的創造研究推進事業 (CREST) 採択課題、「DDS シミュレータの研究開発」の支援のもとに行なわれた。