

先導分子科学研究部門（客員・流動研究部門）

加 藤 晃 一（教授）（2004年10月16日着任）*）

A-1) 専門領域：NMR 構造生物学、糖鎖構造生物学

A-2) 研究課題：

- a) 生体を構成する主要な高分子である複合糖質およびタンパク質の精密立体構造解析
- b) NMRを利用した生体高分子の相互作用と内部運動の解析
- c) 超高磁場固体NMR法の生体高分子の高次構造解析への応用

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 高等生物を構成するタンパク質の多くは糖鎖修飾を受けた糖タンパク質として存在している。しかしながら糖鎖由来のNMRシグナルは一般にスペクトル上での重なり合いが激しくこれまで解析が困難であった。そのために本グループではこれまで糖タンパク質の安定同位体標識法の確立を行ってきた。またNMR測定では高い磁場を用いれば、高い分解能と感度上昇を期待できる。安定同位体標識 (^{13}C , ^{15}N , ^2H) を施したIgGのFc領域を対象として超高磁場NMR装置により各種多次元NMRを測定した。その結果Fcのポリペプチド主鎖・糖鎖に由来するシグナルを高い分解能と感度で観測することに成功した。また、超高磁場NMR装置は“natively unfolded protein”とよばれる特定の高次構造を形成していない試料に対しても有効である。natively unfolded proteinである α -synucleinはNMRシグナルの重なりが激しく解析が困難であったが、超高磁場NMR装置の世界最高分解能を積極的に活用することによりシグナルが分離して観測され、帰属が著しく容易となった。
- b) 920 MHz超高磁場NMR装置を用いて高マンノース型糖鎖 ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) と細胞内レクチン (VIP36) の相互作用解析を行った。 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ の Man-D1, Man-D2, Man-D3 に由来するアメリカシグナルは500 MHzのNMR装置ではシグナルは重なっていたが、920 MHzの超高磁場NMRスペクトルでは完全に分離して観測された。 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ にVIP36を添加していったところ、Man-4, Man-C, Man-D1に由来するシグナルに選択的なシグナルの広幅化が観測された。これらのシグナルは $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ のD1アームに由来することから、VIP36は高マンノース型糖鎖の主にD1アームを認識して結合することが明らかとなった。また多ドメインタンパク質のドメイン間相互作用を明らかにするために、残余双極子相互作用によるドメインの相対配置の決定を試みた。残余双極子カップリング (RDC) 値は通常数Hzと小さな値であるが、このパラメータは磁場に依存し、超高磁場での観測は有効である。マルチドメインタンパク質であるプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の $b'a'$ ドメインを対象に、パイセルやファージなどの配向媒体を用いて残余双極子カップリング値を求めることに成功した。活性部位の酸化還元状態によって、RDC値が変化することより、そのドメイン配置が大きく変化することが明らかとなった。
- c) 水に不溶性の生体高分子は、溶液NMR法が適用できない。固体NMRはこのような試料の構造解析に対して威力を発揮する。今年度は固体測定のためのハード・ソフト両面のセットアップが完了し、 β -グルカンのような多糖をモデル化合物として、CP-MAS, MAS-J-HMQC, HETCORなどの測定を感度よく行うことに成功した。

B-1) 学術論文

S. SEKIYA, Y. YAMAGUCHI, K. KATO and K. TANAKA, “Mechanistic Elucidation of the Formation of Reduced 2-Aminopyridine Derivatized Oligosaccharides and Their Application in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 3607–3611 (2005).

T. INADA, T. TERABAYASHI, Y. YAMAGUCHI, K. KATO and K. KIKUCHI, “Modulation of the Catalytic Mechanism of Hen Egg White Lysozyme (HEWL) by Photochromism of Azobenzene,” *J. Photochem. Photobiol. A* **175**, 100–107 (2005).

Y. KAMIYA, Y. YAMAGUCHI, N. TAKAHASHI, Y. ARATA, K. KASAI, Y. IHARA, I. MATSUO, Y. ITO, K. YAMAMOTO and K. KATO, “Sugar-Binding Properties of VIP36, an Intracellular Animal Lectin Operating as a Cargo Receptor,” *J. Biol. Chem.* **280**, 37178–37182 (2005).

M. AKUTSU, M. KAWASAKI, Y. KATOH, T. SHIBA, Y. YAMAGUCHI, R. KATO, K. KATO, K. NAKAYAMA and S. WAKATSUKI, “Structural Basis for Recognition of Ubiquitinated Cargo by Tom1-GAT Domain,” *FEBS Lett.* **579**, 5385–5391 (2005).

H. YAGI, N. TAKAHASHI, Y. YAMAGUCHI, N. KIMURA, K. UCHIMURA, R. KANNAGI and K. KATO, “Development of Structural Analysis of Sulfated N-Glycans by Multi-Dimensional HPLC Mapping Methods,” *Glycobiology* **15**, 1051–1060 (2005).

M. NAKASAKO, T. OKA, M. MASHUMO, H. TAKAHASHI, I. SHIMADA, Y. YAMAGUCHI, K. KATO and Y. ARATA, “Conformational Dynamics of Complementarity-Determining Region H3 of an Anti-Dansyl Fv Fragment in the Presence of Its Hapten,” *J. Mol. Biol.* **351**, 627–640 (2005).

M. KAWASAKI, T. SHIBA, Y. SHIBA, Y. YAMAGUCHI, N. MATSUGAKI, N. IGARASHI, M. SUZUKI, R. KATO, K. KATO, K. NAKAYAMA and S. WAKATSUKI, “Molecular Mechanism of Ubiquitin Recognition by GGA3 GAT Domain,” *Genes Cells* **10**, 639–654 (2005).

T. KIMURA, K. IMAISHI, Y. HAGIWARA, T. HORIBE, T. HAYANO, N. TAKAHASHI, R. URADE, K. KATO and M. KIKUCHI, “ERp57 Binds Competitively to Protein Disulfide Isomerase and Calreticulin,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 224–230 (2005).

B-2) 国際会議のプロシーディングス

K. KATO, Y. YAMAGUCHI, T. HIRAO, T. SUZUKI, Y. YOSHIDA and K. TANAKA, “NMR structural biology of sugar-recognizing ubiquitin ligase involved in glycoprotein degradation,” *Glycoconjugate J.* **22**, 218–219 (2005).

Y. KAMIYA, H. TSUKAKOSHI, Y. YAMAGUCHI, N. TAKAHASHI, Y. ARATA, K. KASAI, Y. IHARA, I. MATSUO, Y. ITO, K. YAMAMOTO and K. KATO, “Sugar-binding, properties of VIP36, an intracellular animal lectin operating as a cargo receptor,” *Glycoconjugate J.* **22**, 217 (2005).

H. IWASE, N. TAKAHASHI, K. KATO, A. ITOH, T. TAKATANI, N. IWANAMI and Y. HIKI, “Glycoform of N-linked oligosaccharide of tonsillar IgA1, and aberrant IgA1 prepared from the serum by asialo-, agalacto-IgA1-sepharose column and their involvement in IgA nephropathy,” *Glycoconjugate J.* **22**, 360–361 (2005).

B-3) 総説、著書

- 加藤晃一, 「NMRによる糖鎖構造解析」, 未来を拓く糖鎖科学, 金芳堂, 24-25 (2005).
- 加藤晃一, 「NMRによる糖タンパク質の立体構造解析」, 未来を拓く糖鎖科学, 金芳堂, 62-63 (2005).
- 加藤晃一, 高橋禮子, 「GALAXY:糖鎖構造解析支援ウェブアプリケーション」, 未来を拓く糖鎖科学, 金芳堂, 423-424 (2005).
- 加藤晃一, 坂田絵理, 大隅良典, 「細胞内タンパク質分解」, タンパク質科学 構造・物性・機能, 化学同人, 第12章, 531-544 (2005).
- 山口芳樹, 矢木宏和, 加藤晃一, 「MSを用いた糖鎖構造解析」, ファルマシア **41**, 1065-1069 (2005).
- 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, NTS, 76-83 (2005).
- 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, 学進出版, 117-129 (2005).
- 栗本英治, 鈴木麻衣子, 加藤晃一, 「バイオテクノロジーによる味覚修飾タンパク質クルクリンの産生と甘味料としての応用」, 化学と工業 **58**, 838-840 (2005).

B-4) 招待講演

- K. KATO**, “NMR and Sugar Library in Glycomics,” 特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第3回公開シンポジウム, Tokyo (Japan), January 2005.
- K. KATO**, “NMR Structural Biology of Glycoproteins,” Strategies for the acquirement of functional diversity of proteins, Tokyo (Japan), January 2005.
- 加藤晃一, 「NMR構造生物学とグライコムクス」, 第1回21世紀COE若手研究者研究討論会, 京都, 2005年3月.
- 加藤晃一, 「NMRを利用した構造グライコムクス」, 文部科学省ナノテクノロジー総合支援プロジェクト成果発表会「分子・物質に視点をのいたナノテクノロジー・ナノサイエンスIII」, 岡崎, 2005年3月.
- 加藤晃一, 「NMRと糖鎖ライブラリーを利用した構造糖鎖生物学」, よこはまNMR構造生物学研究会 甲斐荘先生退官記念講演会, 横浜, 2005年3月.
- 加藤晃一, 山口芳樹, 高橋禮子, 「NMRと糖鎖ライブラリーを利用した構造グライコムクスへのアプローチ」, 日本薬学会第125年会, 東京, 2005年3月.
- K. KATO, Y. YAMAGUCHI, Y. KAMIYA, T. HIRAO, H. YAGI and N. TAKAHASHI**, “NMR structural biology of glycoproteins: Structures, dynamics, and interactions,” 2nd Workshop the Netherlands-Japan, Utrecht (The Netherlands), April 2005.
- 加藤晃一, 坂田絵理, 住吉 晃, 内海真穂, 山口芳樹, 「神経変性疾患のNMR構造生物学」, 特定領域研究「病態脳」夏のワークショップ, 長野, 2005年8月.
- 加藤晃一, 「Carbohydrate-protein interactions probed by NMR and sugar library」, 第78回日本生化学会大会, 神戸, 2005年10月.
- 加藤晃一, 坂田絵理, 住吉 晃, 内海真穂, 山口芳樹, 「神経変性疾患にかかわるタンパク質のかたち」, 第14回日本バイオイメージング学会学術集会, 東京, 2005年10月.
- K. KATO**, “NMR and Sugar Library approaches to protein sociology,” International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), October-November 2005.
- 加藤晃一, 「NMRを利用した構造グライコムクス」, 第3回糖鎖科学コンソーシアム, 東京, 2005年12月.

加藤晃一、鈴木麻衣子、栗本英治、「味覚修飾タンパク質クルクリンの構造・機能解析」, 第42回植物化学シンポジウム, 名古屋, 2005年12月.

B-5) 特許出願

特願2004-28323, 「糖鎖の選択的末端糖残基同位体標識法」, 加藤晃一、高橋禮子、山口芳樹(株)鳥津製作所、(株)グライエンス, 2004年.

特願2004-28324, 「糖鎖構造解析手法」, 岩本慎一、関谷禎規、田中耕一、加藤晃一、高橋禮子、山口芳樹(株)鳥津製作所, 2004年.

特願2004-28688, 「新規甘味タンパク質及びその製法」, 加藤晃一、栗本英治、栗原良枝、葦沢悟、鈴木榮一郎、榛葉信久(味の素(株)), 2004年.

特願2005-167015, 「アミノピリジン標識糖鎖の質量分析法」, 関谷禎規、田中耕一、加藤晃一、山口芳樹(株)鳥津製作所, 2005年.

B-6) 受賞、表彰

加藤晃一, 日本薬学会奨励賞 (2000).

B-7) 学会および社会的活動

学協会役員、委員

日本バイオイメージング学会 評議員 (1995-).

日本生化学学会 評議員 (2002-).

日本糖質学会 評議員 (2003-).

その他

株式会社グライエンス 科学技術顧問 (2004-2005).

株式会社グライエンス 取締役 (2005-).

B-8) 他大学での講義、客員

名古屋大学大学院生命農学研究科, 生命技術科学特別講義, 「NMR構造生物学:基礎と応用」, 2005年1月13-14日.

名古屋大学大学院工学研究科, バイオマテリアル基礎論, 「NMR構造生物学の基礎と応用」, 2005年6月10日.

東京理科大学大学院, 生物有機化学特論, 「グライコミクスとNMR構造生物学」, 2005年10月28日.

B-10) 外部獲得資金

基盤研究(C)(2), 「NMR情報に基づく免疫グロブリンFcレセプターの分子認識とシグナル伝達機構の解明」, 加藤晃一 (1997年-1998年).

持田記念医学薬学振興財団研究助成金, 「NMR情報に基いた免疫グロブリンFc領域におけるタンパク質間相互作用メカニズムの解明と制御」, 加藤晃一 (2000年).

医科学応用研究財団研究助成金, 「尿路結石マトリクスを構成する糖タンパク質オステオポンチンの分子構造と生活習慣病の病態との相関の解析」, 加藤晃一 (2000年).

武田科学振興財団 薬学系研究奨励金,「構造生物学的アプローチによる免疫系複合糖質の立体構造形成と分子認識機構の解析」,加藤晃一 (2001年).

山田科学振興財団 研究援助金,「糖タンパク質の立体構造形成および分子認識機構の構造生物学的解析」,加藤晃一 (2001年).

島津科学技術振興財団研究開発助成金,「生体分子間相互作用および生体超分子の計測を指向したエレクトロスプレーイオン化質量分析装置の開発」,加藤晃一 (2001年).

内藤記念科学振興財団研究助成金,「多機能型シャペロン・カルレティキュリンの分子認識機構の解明」,加藤晃一 (2001年).

財団法人病態代謝研究会研究助成金,「神経変性疾患に關与する細胞内タンパク質品質管理システムの構造生物学的研究」,加藤晃一 (2001年).

名古屋市立大学特別研究奨励費,「NMRを利用したオステオポンチンの分子構造解析」,加藤晃一 (2001年).

基盤研究(B),「免疫系で機能する複合糖質の立体構造形成と分子認識機構に関する構造生物学的研究」,加藤晃一 (2001年-2002年).

(財)氷谷糖質科学振興財団研究助成金,「NMRを利用した糖タンパク質の機能発現メカニズムの解析」,加藤晃一 (2002年).

特定領域研究「タンパク質の一生」,「タンパク質社会における糖鎖の機能解明を目指したNMR構造生物学」,加藤晃一 (2003年-2004年).

特定領域研究「ゲノム情報科学」,「糖タンパク質の構造グライコミクスを展開するためのデータベース構築」,加藤晃一 (2003年-2004年).

財団法人科学技術交流財団,「糖鎖科学名古屋拠点研究会」,加藤晃一 (2003年-2004年).

(独)科学技術振興機構(プラザ育成研究調査),「糖鎖ライブラリーを活用したグライコミクス解析システムの開発」,加藤晃一 (2004年).

経済産業省中部経済産業局(地域新生コンソーシアム研究開発事業),「糖鎖ライブラリーを活用した新規マイクロアレーの開発」,加藤晃一 (2004年-2005年)

特定非営利活動法人パイオものづくり中部,「糖鎖分科会」,加藤晃一 (2005年).

特定領域研究「グライコミクス」,「NMRを利用した構造グライコミクス」,加藤晃一 (2005年-2006年).

萌芽研究,「味覚修飾タンパク質クルクリンの機能発現メカニズムの解明と応用」,加藤晃一 (2005年-2006年).

C) 研究活動の課題と展望

超高磁場NMR装置にて威力を発揮するTROSY法と重水素デカップルを組み合わせた3重共鳴測定が可能となるように整備を進める。また、超高磁場NMR測定の際の効率的な水由来のシグナル消去法を開発する。さらに、固体NMR法により不均一系・凝集系に対して解析を行うことを計画している。

* 本務は名古屋市立大学大学院薬学研究科教授