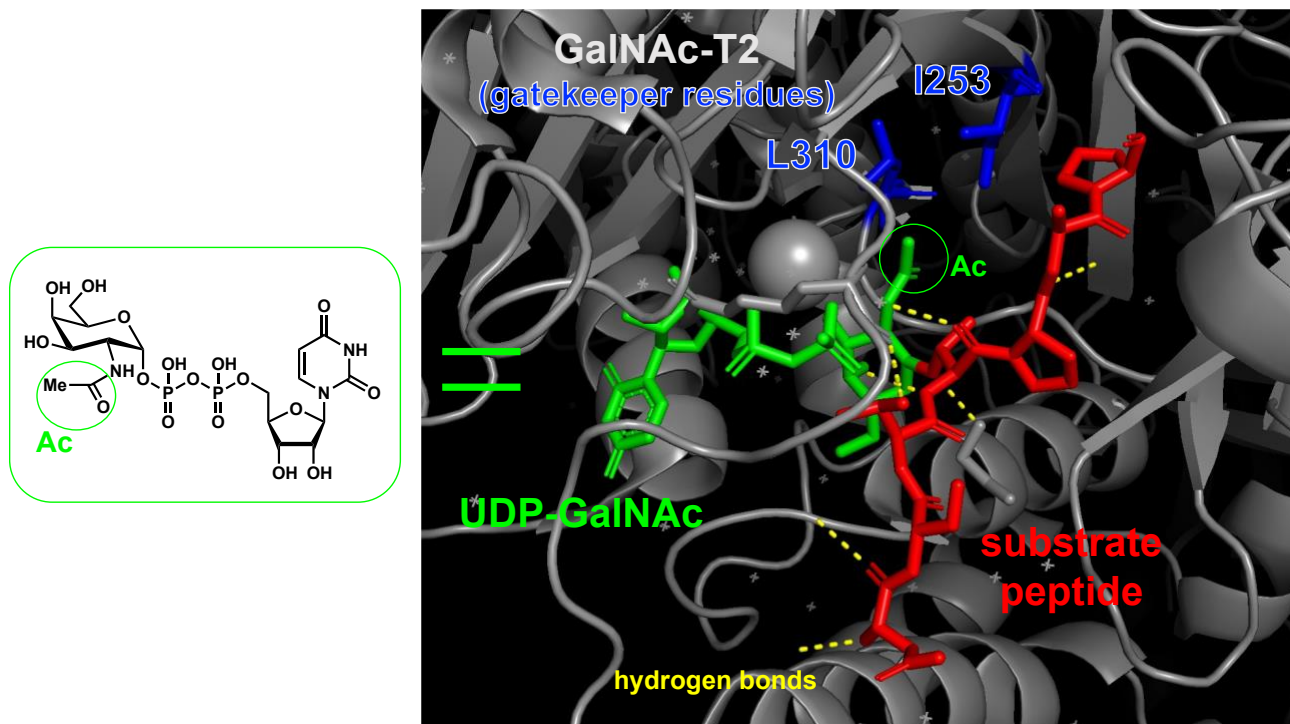


## ● Bump-and-hole engineering の論文について

Q. GalNAc-T のタンパク質選択性に変異を入れても変化しないのは、構造から説明できるか？

A. 変異を入れた箇所とタンパク質認識部位が異なっているためだと思います。

以下の図に示すように、変異を入れた gatekeeper residues(青色)と、基質となるペプチド(赤色)を認識する部位が異なっているため(黄色の点線は基質ペプチドと GalNAc-T2 の間の水素結合)、変異を入れてもグリコシル化の反応速度やタンパク質選択性が変化しないのだと思います。

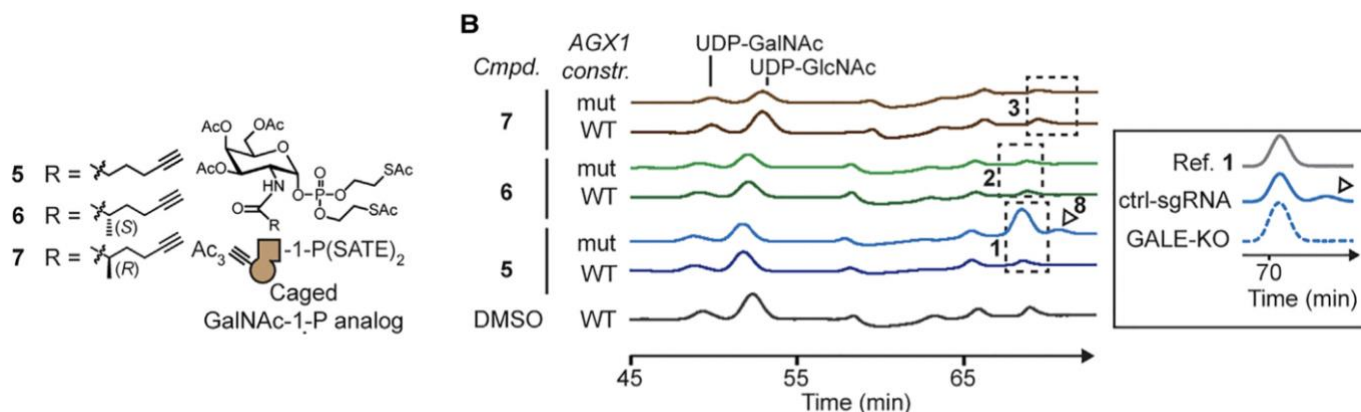


(PDB 4D0T, Lira-Navarrete, E., Iglesias-Fernández, J. *et al. Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 8206–8210.)

Q. Sugar analog はどの程度の濃度で使用しているか？

A. 生細胞反応では、50  $\mu\text{M}$  で使用していました。

生細胞でのラベリングでは、50  $\mu\text{M}$  の sugar analog **5** を使っていました。また、以下に示した、細胞内の GalNAc analog **1** の量を定量した実験では 100  $\mu\text{M}$  の sugar analog **5** を使っています。これを見ると、100  $\mu\text{M}$  程度の sugar analog **5** を入れれば、生細胞内にある内在性の UDP-GalNAc や UDP-GlcNAc と同程度か、それ以上の濃度の GalNAc analog **1** ができていることが分かります。



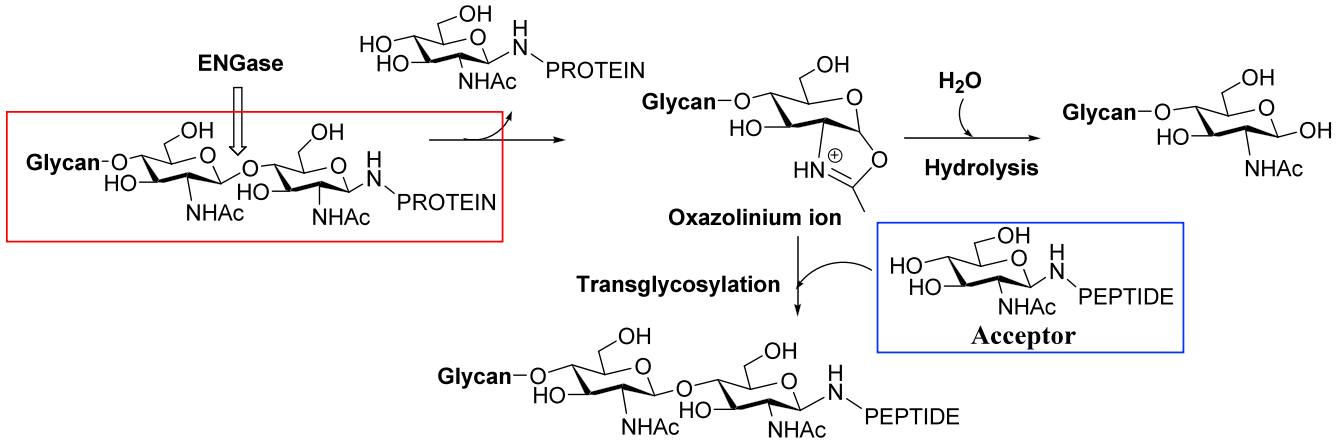
(Schumann, B., Malaker, S. A. *et al. Mol. Cell* **2020**, *78*, 824-834.e15.)

● Exoenzymatic engineering の論文について

Q. ENGase に少し変異を入ただけで加水分解からグリコシル化に変わるのが意外だが、なぜか？

A. 実は、変異がない状態でもグリコシル化は可能で、それが変異により最大限引き出されたと考えられます。

セミナー中では説明しませんでしたでしたが、一部の ENGase には、変異がない状態でも、加水分解能に加えて、加水分解した糖鎖を別の糖受容体(acceptor)に移す transglycosylation 活性があることが知られていました(下図)。



そのため、ENGase が発見された当初は、この transglycosylation 活性を活かして均一な糖鎖を合成する試みがなされていましたが、加水分解との競合が起こるため、acceptor(青色)に対して基質となる糖タンパク質(赤色)を大過剰使用しなければならない上、収率は 5-20%程度にとどまっていたようです。

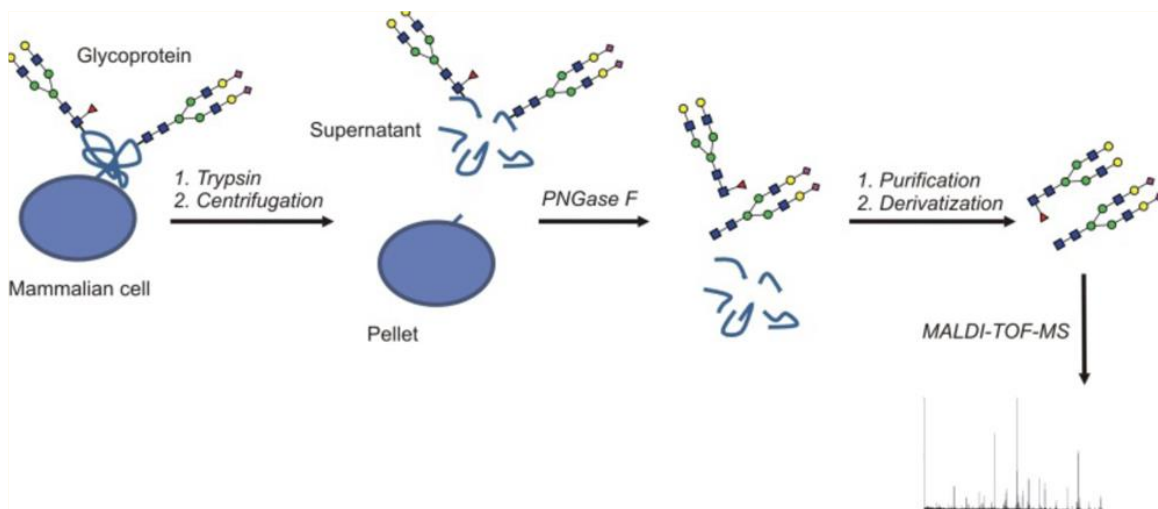
そこで、加水分解に関与するアミノ酸残基を変異させた ENGase のスクリーニングにより、糖鎖の加水分解活性をほとんど持たない上、糖鎖オキサゾリンを基質としてグリコシル化が可能な、今回の論文で使用されたような酵素が開発されてきています。

(Wang, L.-X. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 2011, 23, 33–52.)

Q. MALDI-TOF MS 解析のためのサンプルはどのように調製しているか？

A. ペプチドや糖鎖をそれぞれ酵素で消化したのち、糖鎖のみを精製していました。

以下に示す論文の手法を用いてサンプルを調製しています。まず、トリプシンによってタンパク質を消化し、膜タンパク質の断片を取ってきます。その後、PNGase F によってペプチドと糖鎖が切り離されます。これを C18 カラムによって精製することで、糖鎖のみを精製してきているようです。



(Hamouda, H., Kaup, M. *et al. Proteome Res.* 2014, 13, 6144–6151.)

## Q. OPRD1 について調べる発想はどのように得たと考えられるか？

### A. 論文内に言及はありませんでした。また、OPRD1 と糖鎖との関係に関する先行研究はありませんでした。

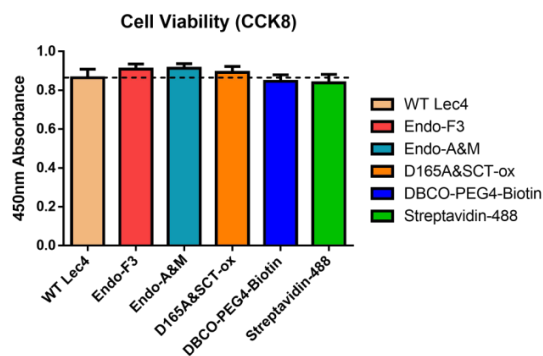
この論文を報告した中国科学院のグループは、糖鎖に関するケミカルバイオロジーを研究しており、今回のような生細胞の糖鎖編集や、糖鎖編集の ADC への応用、天然物への糖鎖付加による活性改善などを中心に行ってきたいました。特に、これまでに OPRD1 や GPCR に関して研究をしていたわけではなく、共同研究者にもその分野の専門家はいないようでした。さらに、この論文以前に OPRD1 と糖鎖の関連について言及した論文は、調べた限りではなさそうでした。

論文内に OPRD1 を見つけた経緯についての言及は全くありませんでしたが、おそらく、今回の手法を用いて様々なレセプターをスクリーニングした結果、OPRD1 を見つけてきたのだと思います。そのため、以降は個人的な意見ですが、このようなアプリケーションを着想するにあたっては、①開発した手法をスループット性の高いアッセイ系にまで落とし込み、②それが活かせる領域を幅広く開拓するということがポイントになるのではないかと思います。

## Q. 糖鎖を全部刈り取っても細胞は生きていますか？

### A. 調べた限りでは cell viability に影響はありませんでした。

論文内では、下図のように、糖鎖を刈り取る反応(1時間)のあと 30 分間インキュベートし、その後 cell viability を調べたところ、ほとんど変化しなかったということが示されていました。より長時間置いたら影響が出てくる気もしますが、特に言及はありませんでした。



Supplementary Figure 20. Cell viability analysis during the glycan editing procedures. Data are presented as mean ± SD of n = 5 cell wells (one individual experiment). Lec4 cells were transferred to a 96-well plate with 6000 cells/well in 100  $\mu$ L MEM $\alpha$  medium and were cultured overnight at 37  $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ . Cells were divided into 6 groups (5 duplicates per group) and were washed with PBS containing 5% FBS. Cells from different groups were separately treated with Endo-F3 (0.1 mg/mL), or Endo-A plus Endo-M (0.1mg/mL respectively), or Endo-F3 D165A (0.1 mg/mL) with SCT-ox (1 mM), or DBCO-Biotin (100  $\mu$ M), or Streptavidin-488, in 100  $\mu$ L MEM $\alpha$  medium. After 1 hour, cells were washed with PBS containing 5% FBS and were cultured in 100  $\mu$ L MEM $\alpha$  medium containing CCK8 (90  $\mu$ L medium with 10  $\mu$ L CCK8 stock) at 37  $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  for 30 min before data acquisition by BioTek Epoch.

(Tang, F., Zhou, M. *et al. Nat. Chem. Biol.* 2020, 16, 766–775.)

## ● セミナー全体に対して

## Q. 酵素を使うことへの抵抗はないか？

### A. 個人的には抵抗はあり、今回紹介したようなことが純粋に化学的にできるとかなり面白いと思います。

生細胞が持っている糖鎖を制御するには、周囲にある大量の水や、糖鎖が持つ大量のヒドロキシ基の中から標的のヒドロキシ基を見分けることが必要になる上、糖鎖がつながっているタンパク質に対する選択性や、糖鎖の配列に対する選択性など、様々な選択性が必要となります。そのため、現在は、ほとんどが今回紹介したような酵素を用いた手法となっており、それを用いることで様々な生物学的研究に繋がっています。

そのような中で、水中で選択的に糖鎖を制御する純粋に化学的な手法の実現には、これまでの糖鎖合成化学の知見に加え、分子認識や水中の有機化学を最大限に活かす必要があります。さらに、実現できれば、治療への応用可能性も見えてくるため、理学的にも医学的にも面白い研究の方向性になるのではないかと思います。調べた限りでは、水中の保護基フリーの糖鎖合成法を開発しているグループ\*1 や、治療を志向して糖鎖を化学的に修正する手法を開発しているグループ\*2(まだ成果は出ていないかも?) などが存在しているようです。

\*1 [京都工芸繊維大学 バイオベースマテリアル学専攻 田中研](#)

\*2 [Huang Lab at Scripps Research](#)