

総 説

免疫グロブリン結合糖鎖の構造—機能相関

山口 芳樹

Structure-Function Relationship of Immunoglobulin Glycan

Yoshiki YAMAGUCHI

Laboratory of Pharmaceutical Physical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku Medical and Pharmaceutical University.

(Received November 20, 2019)

Antibodies are glycosylated proteins which play a central role in immune system. Much attention has been paid for *N*-glycosylation at Asn297 of IgG Fc. It has been well established that the Fc *N*-glycan is essential for expressing proper effector functions such as Fc receptor binding and complement activation. The underlying mechanism how the *N*-glycan affect Fc receptor binding has been analyzed and discussed from the structural data. This review will focus on the current understanding how Fc *N*-glycosylation impacts on the structure and function of the Fc. Finally, techniques are introduced to remodel the *N*-glycan attached to Fc.

Key words — antibody, Fc receptor, *N*-glycan, immunoglobulin, dynamics

1. はじめに

糖鎖は主にタンパク質や脂質に共有結合した状態で存在しており、糖鎖の構造に依存して機能が調節されていると考えられている。糖鎖生物学の進展により、生体防御システムや新生糖タンパク質の品質管理、分化・再生、神経機能の調節などの様々な局面において、糖鎖の様々な生理的機能が明らかにされてきた。その中で、免疫グロブリンは、糖鎖の機能が最も研究された糖タンパク質の一つといっても過言ではない。近年、バイオ医薬品・抗体-薬物複合体としての抗体の利用が増加しており、糖鎖の構造とその機能制御にますます注目が集まっている。本総説では、抗体に結合している糖鎖がその機能に及ぼす影響について、最近の報告をまとめながら、特に立体構造の観点から議論したい。また、抗体の糖鎖改変技術や分析技術が進展したことも抗体の糖鎖の構造機能相関の研究を後押ししており、最後に、筆者らの抗体糖鎖改変の応用例を紹介したい。

2. 抗体の *N*-結合型糖鎖

抗体分子は、抗原結合を担う Fab 部分とエフェクター機能を担う Fc 部分がヒンジ領域で連結され

た基本構造を有している (Fig. 1)。ヒト IgG1 を例にすると、2本の H 鎖と 2本の L 鎖がジスルフィド結合で連結しており、Fc 領域の Asn297 には 1 対の 2 本鎖糖鎖が結合している。Fc 領域の X 線結晶構造解析によると、その糖鎖は分子内部に埋もれた状態で存在しており、ペプチド鎖との相互作用が広範にわたっている。このことから、糖鎖は Fc 領域特に C_{H2} ドメインの立体構造の維持に役割を果たしていることは予想されてきた。この糖鎖の機能面における重要性は以前より指摘されており、この糖鎖を取り除くと抗原結合能や protein A 結合能はほとんど影響を受けないものの、Fc 受容体との結合や補体活性化が著しく低下あるいは喪失することが報告されてきた。そのため研究者は糖鎖を欠落させると、Fc の立体構造に変化が及び、そのためにエフェクター活性が低下するという作業仮説を立てて、研究が進んだ。

Krapp らは様々な糖鎖の長さを結合した Fc を準備し、各グライコフォームの X 線結晶構造解析を行い、同時に Fc 受容体との親和性を求めた。¹⁾ 予想通り、糖鎖を短く刈り取っていくと Fc 受容体との親和性が低下した。構造解析の結果、糖鎖を刈り取ると、2つの C_{H2} ドメイン間の距離が短くなることが示された。そのことから、糖鎖はドメイン間の相対配置 (4 次構造) の維持に重要であると提案された。一方で、筆者らは安定同位体 NMR

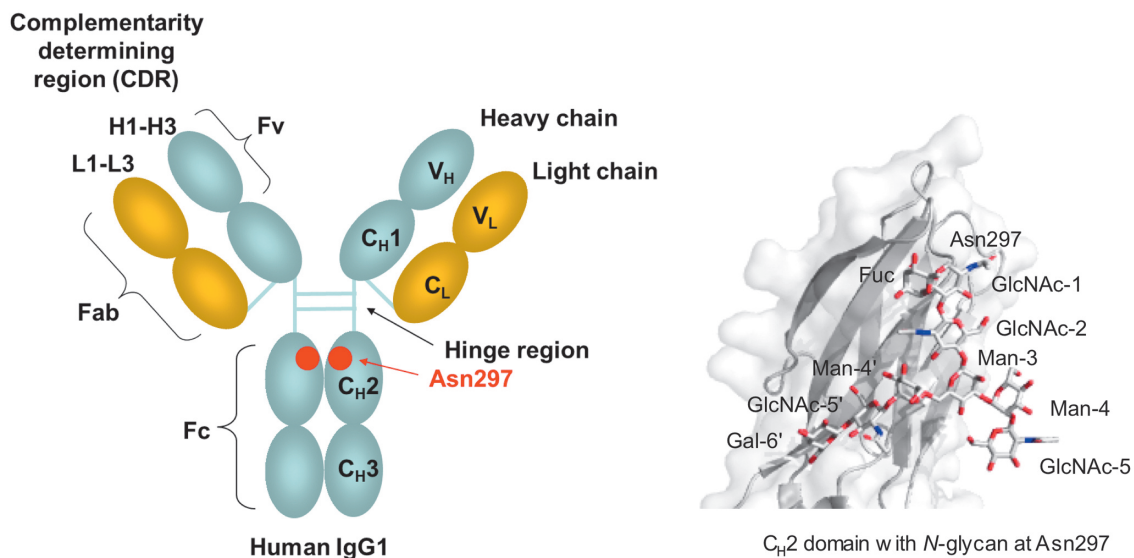


Fig. 1. Basic structure of immunoglobulin (human IgG1) and its C_H2 domain with N-glycosylation at Asn297. C_H2 domain was chosen from the crystal structure of human IgG1 Fc fragment (PDB ID: 1FC1).³⁶⁾ Peptide is shown with ribbon and N-glycan with stick representation.

法を用いて同様の問題に取り組んだ。²⁾ 糖鎖を取り除くと C_H2 ドメインのヒンジ領域下流に由来する NMR 信号に化学シフト変化が認められた。ヒンジ領域下流は Fc 受容体の結合部位であることから、糖鎖はエフェクター部位の高次構造の維持に重要であると議論した。

その後も、1対の C_H2 ドメイン間の距離によって糖鎖切断による構造変化が議論されてきた。実際、大腸菌で生産された糖鎖のない human IgG1 Fc³⁾ や PNGase F で糖鎖を切断した murine IgG1 Fc⁴⁾ の結晶構造は、closed conformation となっていた (Pro239-Pro239 $C\alpha$ 同士の距離 18.9~19.6 Å)。そのため、closed conformation は Fc 受容体との結合に不向きであるという考えが提唱された。

一方でこれらの報告に反する結果も報告された。糖鎖のない human IgG1 Fc の結晶構造が同じく明らかにされたが、Pro239-Pro239 $C\alpha$ 同士の距離は 27.6 Å と open conformation となっていた (PDB ID: 3DNK)。また PNGase F で処理した human IgG4 Fc においても Pro239-Pro239 $C\alpha$ 同士の距離は 29.1 Å となっており、open conformation であった。⁵⁾ 以上のことから、 C_H2 ドメイン間の距離で議論することは問題を含んでおり、むしろ糖鎖を取り除いた Fc は open, close を含めた複数の conformation から成り立っていると考えるのが自然である。結晶構造で観察された構造はクリスタルパッキングの影響を受けることが予想され、溶

液中で優先的に存在する conformation を反映していない可能性を十分考慮する必要がある。

以上より、結晶中ではなく溶液中での Fc のコンフォメーションを調べる手法が重要になる。一つのアプローチは X 線小角散乱 (SAXS) であり、本方法は溶液中における高分子の低分解能モデルを提供する。Borrok らは SAXS により糖鎖の付加した糖鎖結合型 Fc と糖鎖非結合型 Fc の慣性半径を求めた。³⁾ その結果、慣性半径は、糖鎖結合型 Fc で 27.4 Å、糖鎖非結合型 Fc で 28.3 Å となった。Yageta らも独立に SAXS の解析を行い、糖鎖結合型 Fc で 26.4 Å、糖鎖非結合型 Fc で 28.9 Å の慣性半径を算出した。⁶⁾ 以上より、糖鎖欠損型では Fc はより open な conformation になっているといえる。

Fc のドメインの相対配置は安定同位体を利用した溶液 NMR によっても解析されている。¹⁵N-Tyr と ¹⁵N-Lys で標識した Fc 試料 (糖鎖付加型、欠損型) に対して残余双極子カップリングを指標とした解析を行ったところ、両者において顕著な 4 次構造の変化は見いだされなかった。⁷⁾

SAXS も NMR も一つの平均化された構造を仮定しており、複数の構造の分布を考慮することは通常困難である。それに対して一分子 FRET は溶液中において取り得る複数の conformation のヒストグラムを明らかにすることができるため、各 conformation の分布を明らかにすることができる。^{8,9)} Fc の Ser258 を Cys に置換し、2 種類の蛍光色素 (ド

ナーとアクセプター)を導入することにより、ホモとヘテロの蛍光色素の組み合わせのFcを得た。その後、FRET効率を糖鎖付加体と糖鎖欠損体と比較したところ、糖鎖欠損体では、より柔軟性を獲得し、Fcの構造に多様性の生じることが明らかになった。以上より、糖鎖欠損型のFcの結晶構造は多くの取り得るconformationのうちの一つ(snap shot)として捉えることができる。

それではなぜ、糖鎖を欠落させるとFc受容体への親和性が低下するのであろうか? 糖鎖を除いたFcは一連の多くのconformationを取り得るが、糖鎖結合型は相対的に限られた運動性を有しているようである。糖鎖欠損型Fcのその柔軟な性質はFc受容体と相互作用するときに不利に働くことが考えられる。

もう少し局所的な視点に立った場合、FcのCEループの相対配置がFc受容体との相互作用に重要であるとの考えがある。糖鎖付加型のFcと糖鎖欠損型のFcを用いて溶液NMR法により、該当部分の運動性を緩和時間を指標に調べたところ、糖鎖欠損型ではCEループは糖鎖付加型よりもより柔軟であることが明らかになった。⁷⁾ このことはX線結晶構造解析のデータと一致しており、CEループのB factorは糖鎖欠損体の方が糖鎖結合型よりも高くなっている。³⁾ 以上より、CEループは糖鎖の存在により安定化されており、その安定化され

たconformationはFc受容体との相互作用界面を形成するのに必須であると考察できる。

3. 抗体のグリコフォームとエフェクター活性の相関

(i) フコース残基の影響

抗体に結合している糖鎖が大きく注目を集めるきっかけになったのは、フコース残基とFc受容体との相互作用の関係が報告されたことにある。Fcに結合している糖鎖のコアフコース(Fuc α 1-6)を欠損させると、Fc受容体との親和性が上昇し、結果として抗体依存性細胞障害活性(ADCC)が50~100倍程度上昇する。^{10,11)} この発見は、抗体医薬品の開発を刺激する結果となった。フコースの含量を調節することにより、目的のエフェクター活性を達成することにつながるからである。それでは、なぜフコース一残基を除いただけでFc受容体との親和性が上昇するのか、そのメカニズムの解明が待たれた。最近になり、フコース欠損型FcとFc受容体の複合体の結晶構造解析が3つのグループによって報告された(Fig. 2)。2011年にFerraraらはフコースの欠損したhuman IgG1 Fcと高マンノース型糖鎖の付加したFc受容体(CD16a)との結晶構造を解いたところ、興味深いことに分子間の広範な糖鎖-糖鎖相互作用が観測された。¹²⁾ 比較のためにフコース結合型のFcと

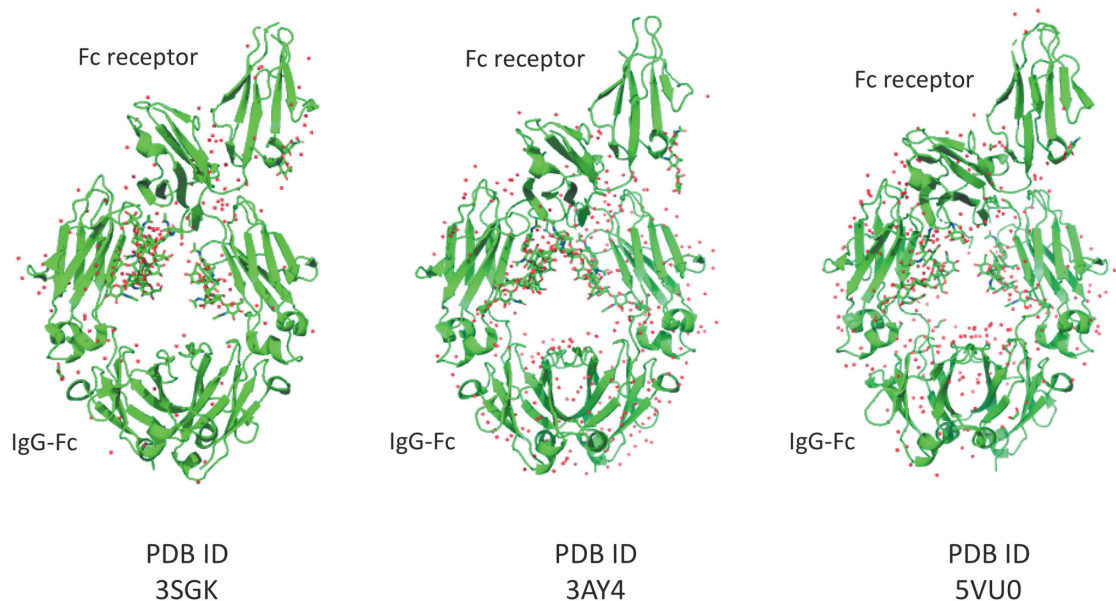


Fig. 2. Three independent reports showing the crystal structure of human afucosylated IgG1-Fc in complex with Fc receptor. Intermolecular glycan-glycan interaction was observed for the first two cases (left¹²⁾ and middle¹³⁾) but recent report shows no electron density of N-glycan from Fc receptor (right¹⁴⁾). Peptide is shown with ribbon and N-glycan with stick representation. Bound water molecules are shown as small red spheres.

Fc 受容体の結晶構造を解析したところ、その糖鎖-糖鎖相互作用の接触面積は有意に減弱しており、フコースの存在は適切な糖鎖-糖鎖相互作用を妨げていると考察された。時を同じくして Mizushima らもフコース欠損型 Fc と複合型糖鎖修飾を受けた Fc 受容体との結晶構造解析を行った。¹³⁾ この2つの報告で Fc 受容体側の糖鎖の種類は異なるものの(高マンノース型 vs 複合型)、Mizushima らの明らかにした構造においても糖鎖-糖鎖相互作用が観測された。これらの報告から、糖鎖-糖鎖相互作用が親和性に貢献しており、フコースはその相互作用を妨げるように寄与しているとの認識になった。

しかし最近になり、Falconer らはフコース欠損型とオリゴマンノース型糖鎖の付加した Fc 受容体 (CD16a) との複合体の結晶構造を明らかにした。¹⁴⁾ 複合体において、既報と異なり Fc 受容体上の Asn162 に結合している糖鎖は直接結合している GlcNAc1 残基しか観測されなかった。分子間の糖鎖-糖鎖相互作用が観測されなかった理由については不明であるが、一つの可能性として、既報で報告された糖鎖-糖鎖相互作用はクリスタルコンタクトに由来する可能性がある。この点を検証するために、複合体において分子動力学計算が実施された。Fc のフコースが欠損している場合、Fc 受容体の Asn162 に結合している糖鎖の可動域は 10800 \AA^3 であるのに対し、フコースが結合している Fc の場合は、Fc 受容体の糖鎖の可動域が 9100 \AA^3 にまで減弱した。このことより、Fc のフコース残基は Fc 受容体の糖鎖の可動域を減らすことにより、エネルギー的 (エントロピー的) に不利になっていると考察した。この考え方は、分子間の糖鎖-糖鎖相互作用が親和性に寄与しているとの結果^{12,13)} と反するものであり、依然としてコンセンサスは出ていないのが現状である。注意しなければならないのは、先にも述べたように結晶構造は複数の構造群のうちのスナップショットを反映している可能性があり、クリスタルコンタクトの影響も無視できない。そのため、今後は溶液中におけるダイナミクスを考慮した解析が必要になると思われる。

(ii) シアル酸残基の影響

もう一つの論点として Fc に結合している糖鎖のシアル酸残基の影響である。これは Fc の糖鎖に $\alpha 2\text{-}6\text{Neu}5\text{Ac}$ を含んだ IVIG (intravenous immunoglobulin G) はコントロールの IVIG と比較

して抗炎症活性が 10 倍程度有意に高いとの報告がきっかけとなっている。^{15,16)} IVIG をシアリダーゼで処理したところ、IVIG の抗炎症活性は失われた。¹⁷⁾ どのようにしてシアリル化が Fc の活性を制御しているかは依然として不明であるが、いくつかのメカニズムが提唱され、議論されてきた。一つの仮説は、シアル酸の付加した IgG-Fc が特定の受容体によって認識されるというものである。In vivo の実験において Fc の抗炎症作用を発揮するにはマウス C 型レクチン受容体である SIGN-R1 が必要であるとの報告がある。¹⁸⁾ SIGN-R1 のヒトオルソログは DC-SIGN であり、シアリル化 Fc と結合することが提案された。¹⁸⁾ 後に Sondermann らは $\alpha 2\text{-}6\text{Neu}5\text{Ac}$ を導入した Fc は IgE 受容体である CD23 に結合することを細胞を用いた ELISA によって示した。¹⁹⁾ これはシアリル化が Fc の構造変化を誘起し、それによって受容体と結合するようになるというモデルである。しかしながら、これらの結果に対立する結果も提示されており、^{20,21)} さらなる解析が必要であると思われる。また、これまでいくつかのシアル酸を含む Fc の結晶構造解析がなされているが、²²⁻²⁴⁾ 概してシアリル化 Fc はシアル酸を含まない Fc の結晶構造のばらつきの程度であり、有意な変化があるとは結論しにくい。Bjorkmann らはシアリル化が Fc の C_{H2} ドメインの柔軟性を増加させ、抗炎症活性を増大させているという仮説を提示しているが、²³⁾ 現在のところ、なぜ構造の柔軟性が受容体結合に影響するのかを説明するデータはない。したがって、現時点ではシアリル化 IgG の抗炎症活性の活性上昇のメカニズムは依然として未解決の問題である。

4. 抗体の糖鎖改変による抗体-薬物複合体の作製

抗体の Fc に結合している 2 本鎖糖鎖は、ガラクトース、フコース、bisecting GlcNAc の有無などにより不均一性を示している。これだけでも $4 \times 2 \times 2 = 16$ 通りの糖鎖が存在することになる。抗体分子中、糖鎖は 1 組のペアとして存在しているので $16 \times 16 = 256$ 通りの抗体分子種が存在する計算になる。そのため、抗体は少しずつエフェクター活性の異なる分子種の総和であるといえる。

とりわけ、抗体を医薬品として取り扱う場合も、糖鎖の構造に関する情報をあらかじめ入手しておくことが望ましい。品質管理の面からもロット間で糖鎖の組成を一定に保つことが重要になる。抗

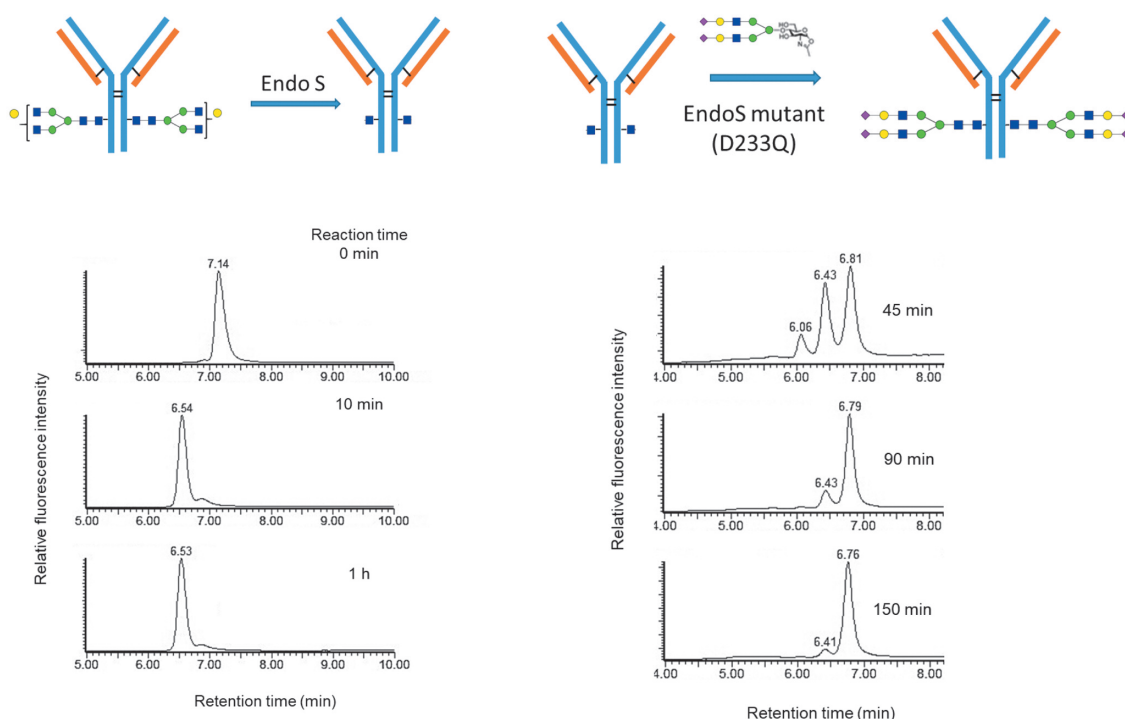


Fig. 3. Real time monitoring of *N*-glycan cleavage and addition by UPLC.³¹⁾ Antibody peaks were detected using fluorescence from tryptophan residues.

体を発現する宿主によっては α 1-3Gal や Neu5Gc (*N*-グリコシルノイラミン酸) などヒトによって抗原性を有する糖残基を含む場合も存在し、抗体医薬品の副作用につながる。そのため、抗原性を有する糖鎖を極力減らすような技術開発も必要になる。

抗体の各糖鎖構造がその機能に及ぼす影響を調べるためには、糖鎖が不均一の抗体を使うのではなく、目的の糖鎖構造を有した均一の抗体を準備する必要がある。筆者らは、ガラクトース転移酵素、ガラクトシダーゼ、ヘキソサミダーゼ、エンドグリコシダーゼ D、PNGase F などによって抗体の糖鎖改変と NMR 解析を行ってきた。^{2,25-28)} 最近になり、抗体の糖鎖を特異的に切断するバクテリア由来のエンド型酵素 EndoS が発見され、²⁹⁾ 抗体の糖鎖リモデリングにおいて重要な役割を果たすようになった。特に EndoS の活性部位に存在するアミノ酸残基を変異された EndoS 変異体（例えば EndoS D233Q）は目的の糖鎖を抗体に付加することが可能である。³⁰⁾ 以下に抗体の糖鎖切断と糖鎖付加の条件検討を示す。³¹⁾

ヒト IgG1 を EndoS もしくは PNGase F と混和し、インキュベーションした。反応液から一部をサンプリングし、ワイドボアの親水性カラムの接続された UPLC システムにて糖鎖の切断をリアル

タイムでモニターした (Fig. 3)。その結果、糖鎖の切断に伴い、保持時間の変化が認められ、10 分間で EndoS による切断が完了していることを確認した。質量分析によっても糖鎖が切断されていることを確認した。

次に EndoS 変異体 (D233Q) を用いることにより、抗体への糖鎖導入を試みた。この場合、糖鎖供与体として、酵素反応の活性中間体とされているオキサゾリン糖鎖を用いた。オキサゾリン糖鎖の Lys アミノ基との副反応^{32,33)} を抑制するために、pH などの条件検討を行った結果、3 時間程度で副反応を抑えつつ、目的の糖鎖を Asn297 に導入することに成功した。得られた糖鎖付加体の均一性は、質量分析によっても確認された。このようなステップを経ることにより、目的の糖鎖構造を有する抗体を準備することが可能になった。現在このような手法を用いて抗体の糖鎖構造と機能の相関を調べた報告は増えている。

さて、本手法は抗体-薬物複合体の合成に応用することが可能である。あらかじめ糖鎖の非還元末端に薬物を導入しておき、それを EndoS 変異体で導入することができれば、均一な抗体-薬物複合体の合成が可能になる。2 本鎖糖鎖に薬物を 2 つ導入した場合、抗体 1 分子あたり 4 分子の薬物を

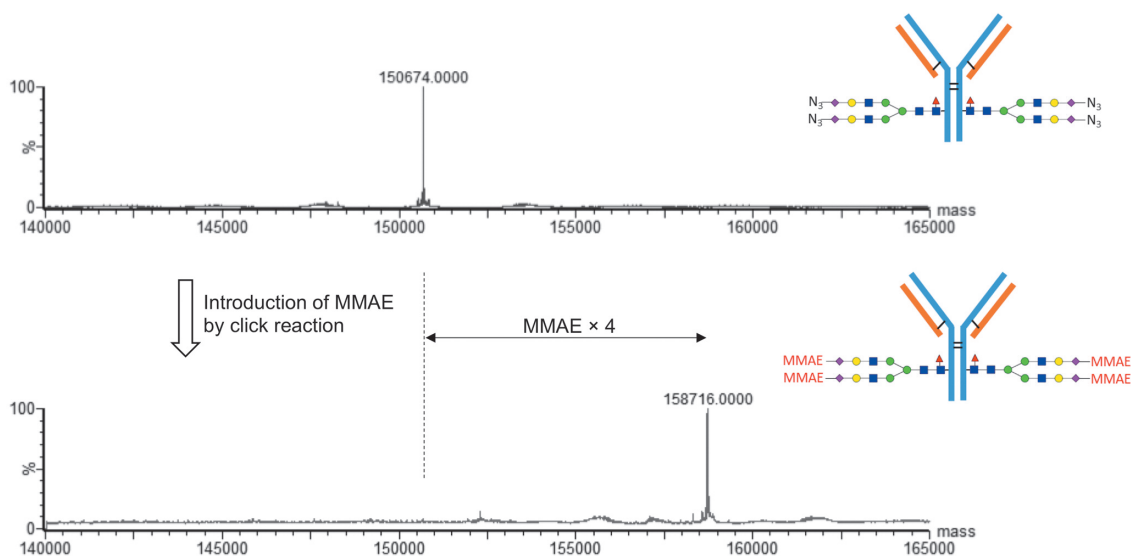


Fig. 4. Deconvoluted ESI-MS spectra of Trastuzumab (Herceptin) modified with azide-containing glycans (upper) and of ADC comprising MMAE with linker via *N*-glycan (lower).³¹⁾ MMAE (monomethyl auristatin E) is an anti-cancer drug which inhibits polymerization of tubulin.

導入することになり、薬物-抗体比をばらつきなく固定することが可能になる。実際、このようにして得られた抗体-薬物複合体は質量分析の結果、4分子の薬物が抗体に結合していた (Fig. 4)。³¹⁾ 均一な構造であることは、安定した薬効の発揮につながると期待される。

5. 今後の展望

X線結晶構造解析は、その都度我々に明確な像を提供し、作用原理について一定の答えを出してきた。まさに構造生物学の成果である。そのため、生命原理の解明をX線結晶構造解析に依存してきたのは揺るぎない事実である。しかしながら、糖鎖の役割を解明しようとする、糖鎖は電子密度像を与えない場合が多く、その役割を明確に説明できない場合が多く存在する。最も研究が進んでいる抗体分子ですら、本総説で述べたように糖鎖の作用メカニズムは不明な点が残されている。この問題を解決するためには、X線結晶構造解析に加えて、ダイナミクスを加味した手法を取り入れることが間違いなく必要である。溶液NMRに加えて、最近原子分解能を提供するようになったクライオ電子顕微鏡も役割を果たすようになるであろう。糖鎖がマルチドメインタンパク質のダイナミクスを制御し、ひいては活性を制御しているという報告例もある。³⁴⁾ また、糖鎖構造に依存した受容体の構造活性相関を丁寧に解析した報告も存

在する。³⁵⁾ このように糖鎖の作動メカニズムまで踏み込んだ報告例は現状限られている。

その一つの要因としては、目的の糖鎖構造をもったタンパク質の調製の難しさにある。特定の糖転移酵素が欠損した細胞を宿主として用いることにより、均一な糖鎖構造を有する糖タンパク質の発現は可能ではあるが、その糖鎖構造はMan₅GlcNAc₂などに限られ (GnT-I欠損の場合)、特に複合型糖鎖の均一な糖鎖を含む糖タンパク質を得ることは現時点では困難である。その状況でエンドグリコシダーゼとオキサゾリン糖鎖を用いた糖鎖改変技術はまさにブレイクスルーであり、糖タンパク質の構造機能相関の研究に適合するものである。今後、この技術を発展させつつ、糖タンパク質糖鎖の構造活性相関をNMRや分子動力学計算によって解明していくことが重要になるであろう。

謝辞

抗体の安定同位体標識とNMR解析は、学生時より荒田洋治先生、嶋田一夫先生、加藤晃一先生のご指導により行われたものです。また理研でのプロジェクト研究の推進にあたり、谷口直之先生、伊藤幸成先生には多大なるお力添えをいただきました。抗体の糖鎖改変と抗体薬物複合体については眞鍋史乃先生と進めた共同成果であり、国立がん研究センター・株式会社伏見製薬所・日本ウォーターズ株式会社との共同研究になります。

この場を借りて改めてお礼申し上げます。長きにわたり励ましの言葉をいただきました荒田洋治先生のご冥福を心からお祈り申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反はありません。

REFERENCES

- 1) Krapp S., Mimura Y., Jefferis R., Huber R., Sondermann P., *J. Mol. Biol.*, **325**, 979–989 (2003).
- 2) Yamaguchi Y., Nishimura M., Nagano M., Yagi H., Sasakawa H., Uchida K., Shitara K., Kato K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 693–700 (2006).
- 3) Borrok M. J., Jung S. T., Kang T. H., Monzingo A. F., Georgiou G., *ACS Chem. Biol.*, **7**, 1596–1602 (2012).
- 4) Feige M. J., Nath S., Catharino S. R., Weinfurter D., Steinbacher S., Buchner J., *J. Mol. Biol.*, **391**, 599–608 (2009).
- 5) Davies A. M., Jefferis R., Sutton B. J., *Mol. Immunol.*, **62**, 46–53 (2014).
- 6) Yageta S., Imamura H., Shibuya R., Honda S., *MAbs*, **11**, 453–462 (2019).
- 7) Subedi G. P., Barb A. W., *Structure*, **23**, 1573–1583 (2015).
- 8) Kelliher M. T., Jacks R. D., Piraino M. S., Southern C. A., *Mol. Immunol.*, **60**, 103–108 (2014).
- 9) Piraino M. S., Kelliher M. T., Aburas J., Southern C. A., *Immunol. Lett.*, **167**, 29–33 (2015).
- 10) Shields R. L., Lai J., Keck R., O'Connell L. Y., Hong K., Meng Y. G., Weikert S. H., Presta L. G., *J. Biol. Chem.*, **277**, 26733–26740 (2002).
- 11) Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., Hanai N., Shitara K., *J. Biol. Chem.*, **278**, 3466–3473 (2003).
- 12) Ferrara C., Grau S., Jager C., Sondermann P., Brunker P., Waldhauer I., Hennig M., Ruf A., Rufer A. C., Stihle M., Umana P., Benz J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 12669–12674 (2011).
- 13) Mizushima T., Yagi H., Takemoto E., Shibata-Koyama M., Isoda Y., Iida S., Masuda K., Satoh M., Kato K., *Genes Cells*, **16**, 1071–1080 (2011).
- 14) Falconer D. J., Subedi G. P., Marcella A. M., Barb A. W., *ACS Chem. Biol.*, **13**, 2179–2189 (2018).
- 15) Anthony R. M., Nimmerjahn F., Ashline D. J., Reinhold V. N., Paulson J. C., Ravetch J. V., *Science*, **320**, 373–376 (2008).
- 16) Anthony R. M., Kobayashi T., Wermeling F., Ravetch J. V., *Nature*, **475**, 110–113 (2011).
- 17) Kaneko Y., Nimmerjahn F., Ravetch J. V., *Science*, **313**, 670–673 (2006).
- 18) Anthony R. M., Wermeling F., Karlsson M. C., Ravetch J. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19571–19578 (2008).
- 19) Sondermann P., Pincetic A., Maamary J., Lammens K., Ravetch J. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 9868–9872 (2013).
- 20) Yu X., Vasiljevic S., Mitchell D. A., Crispin M., Scanlan C. N., *J. Mol. Biol.*, **425**, 1253–1258 (2013).
- 21) Temming A. R., Dekkers G., van de Bovenkamp F. S., Plomp H. R., Bentlage A. E. H., Szittner Z., Derksen N. I. L., Wuhler M., Rispens T., Vidarsson G., *Sci. Rep.*, **9**, 9995 (2019).
- 22) Crispin M., Yu X., Bowden T. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E3544–3546 (2013).
- 23) Ahmed A. A., Giddens J., Pincetic A., Lomino J. V., Ravetch J. V., Wang L. X., Bjorkman P. J., *J. Mol. Biol.*, **426**, 3166–3179 (2014).
- 24) Chen C. L., Hsu J. C., Lin C. W., Wang C. H., Tsai M. H., Wu C. Y., Wong C. H., Ma C., *ACS Chem. Biol.*, **12**, 1335–1345 (2017).
- 25) Yamaguchi Y., Kato K., Shindo M., Aoki S., Furusho K., Koga K., Takahashi N., Arata Y., Shimada I., *J. Biomol. NMR*, **12**, 385–394 (1998).
- 26) Yamaguchi Y., Takizawa T., Kato K., Arata Y., Shimada I., *J. Biomol. NMR*, **18**, 357–360 (2000).
- 27) Yamaguchi Y., Kato K., *Methods Enzymol.*, **478**, 305–322 (2010).
- 28) Kato K., Yamaguchi Y., Arata Y., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **56**, 346–359 (2010).
- 29) Collin M., Olsen A., *EMBO J.*, **20**, 3046–3055 (2001).
- 30) Huang W., Giddens J., Fan S. Q., Toonstra C., Wang L. X., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 12308–12318 (2012).
- 31) Manabe S., Yamaguchi Y., Matsumoto K., Fuchigami H., Kawase T., Hirose K., Mitani A., Sumiyoshi W., Kinoshita T., Abe J., Yasunaga M., Matsumura Y., Ito Y., *Bioconjug. Chem.*, **30**, 1343–1355 (2019).
- 32) Suda M., Sumiyoshi W., Kinoshita T., Ohno S., *Tetrahedron Lett.*, **57**, 5446–5448 (2016).

- 33) Wang N., Seko A., Daikoku S., Kanie O., Takeda Y., Ito Y., *Carbohydr. Res.*, **436**, 31–35 (2016).
- 34) Matoba K., Mihara E., Tamura-Kawakami K., Miyazaki N., Maeda S., Hirai H., Thompson S., Iwasaki K., Takagi J., *Cell Rep.*, **18**, 32–40 (2017).
- 35) Li J., Su Y., Xia W., Qin Y., Humphries M. J., Vestweber D., Cabanas C., Lu C., Springer T. A., *EMBO J.*, **36**, 629–645 (2017).
- 36) Deisenhofer J., *Biochemistry*, **20**, 2361–2370 (1981).