

機関番号：37604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20611021

研究課題名（和文） 低親和性対応型フォトパニング法の開発による神経糖鎖の機能解明

研究課題名（英文） Development of the photochemical panning adapted to low affinity ligands and analysis of neural carbohydrates' functions

研究代表者

定金 豊 (SADAKANE, Yutaka)

九州保健福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：60293304

研究成果の概要（和文）：天然と同じ構造を保ったままで糖鎖を光反応性リガンドにするための合成法を確立し，ラクトースをモデル糖鎖として従来物より親和性および特異性の高い実験系を構築した．神経糖鎖の機能を解明する一助として，脂質膜上での糖脂質とβアミロイドペプチドの挙動を原子間力顕微鏡で観察した結果，特徴的な凝集像が見られることが明らかになった．

研究成果の概要（英文）：We established the synthetic methods for photo-reactive carbohydrates, in which carbohydrate reducing end was cyclic form, i.e. natural form. Experiments using the new photo-reactive lactose ligand revealed that cyclic form of lactose showed high affinity and high specificity comparing acyclic form of lactose. We also analyzed the interaction between carbohydrates and Alzheimer's beta-amyloid peptides on the lipid membrane by atomic force microscope, and revealed that the interaction of ganglioside and amyloid peptide generated the specific aggregation on lipid layer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：光反応，アミロイド，プロテオーム，神経科学，糖鎖，薬学，分析化学，バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖鎖は生体のあらゆる部位で特別な機能を発揮している。しかしながら，糖鎖の結合タンパク質への親和性が低い( $10^{-6}$ ～ $10^{-4}$ M程度)のために，糖鎖の機能を解明する速度はプロテオミクス時代を迎えた現在でも，それ

以前とあまり変わっていない。親和性が低いと非特異的な結合との見分けがつきにくく，相互作用の解析が困難となる。また，大量のリガンドを扱う必要があるために，リガンドを固定化する担体が非現実なほど大量に必要となり，効率的なクローニング法の開発が

難しいのが状況である。

(2) 神経において糖鎖がどのような役割を果たしているか解明作業が進んでおり、アルツハイマー病に関連するβアミロイドペプチドの凝集に神経糖鎖が関わっているという研究報告もなされているが、詳細は未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

(1) 糖鎖などの低親和性リガンドに対応した効率的なクローニング法を確立するために次の2つの技術を開発する。

①リガンドを固定する担体を削減できる方法論の開発

②光反応性糖鎖リガンドの親和性を向上させる技術の開発

(2) ガングリオシド(糖脂質)を標的として、神経糖鎖機能の役割を探る。

## 3. 研究の方法

(1) 光反応基をもつラクトース糖鎖リガンドとT7ファージについて、分子量10万が排出限界の限外濾過膜を利用して両者の分配割合を比較した。光反応性リガンドは逆相HPLCで定量し、ファージは希釈液のプラーク数で定量した。

(2) ラクトース糖鎖の末端を活性化したのち、アリルアルコールを付加した。末端のアルケンのオゾンを利用して選択的にアルデヒドに変換した。

(3) ガングリオシド GM1-dipalmitoyl phosphatidyl choline(DPPC)とDPPCを8:2で混合した単層脂質上に、アルツハイマーβアミロイドペプチド(1-40)を添加し、原子間力顕微鏡で凝集の様子を観察した。

## 4. 研究成果

(1) リガンドに結合するタンパク質との親和性により、リガンドとタンパク質とが複合体を形成する。光反応基はこの両者は共有結合で結びつけることができる(図1A)。その結果、タンパク質が変性しても両者は離れない。リガンドのみではタンパク質が変性すると離れてしまう(図1B)。これらの性質を利用して、リガンドを固定化する担体の量の削減技術を開発した。

リガンドは通過するがタンパク質は通過させない限外濾過膜を利用する。タンパク質を変性した状態では、濾過膜の上部に残るリガンドはリガンド-タンパク質の複合体を作っているもののみである(図1AとB)。すなわち、タンパク質と結合しているリガンドと結合していないリガンドとを濾過膜で分

離できることになる。濾過膜の上部を回収して実験に利用すれば、リガンド量が大幅に削減され、固定担体の量を大幅に減らすことができる。基礎的な検討として、濾過膜が提示ファージと光反応性リガンドとを分離できるかどうか実験を行った(図1CとD)。その結果、99.999%以上のファージを上部で回収が可能なこと、さらに99.9%のリガンドを下部で回収が可能になったことが明らかになった。

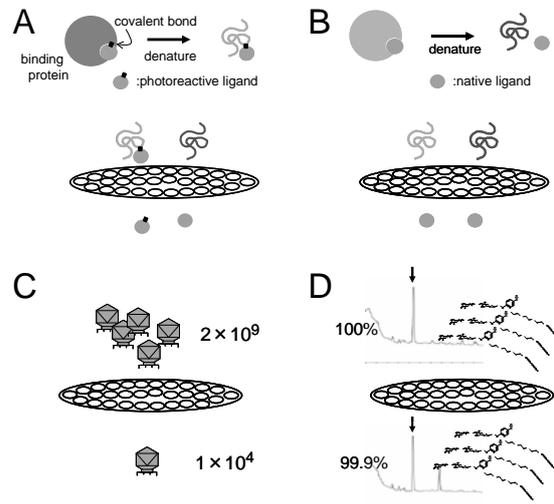


図1 固定担体を削減するための基礎的検討

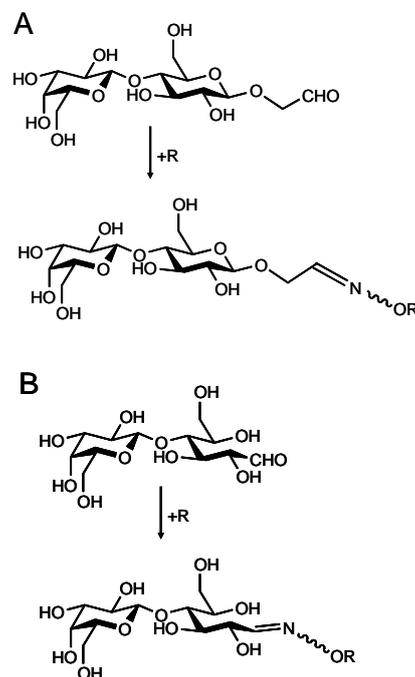


図2 閉環した糖鎖と開環した糖鎖

(2) 従来法では光反応性の糖鎖リガンドを作るために糖鎖の還元末端のアルデヒドを利用して光反応基と結合させる。このとき、糖鎖の還元末端が開環してしまい、糖鎖とし

ての適切な構造をとることができない欠点をもつ (図 2B). 元来の糖鎖の形である閉環形を保ったまま光反応基と結合させるためには, 人工的にアルデヒドを導入する必要がある (図 2A). アリルアルコールを結合した糖鎖にオゾン処理することで, 効率的に糖鎖末端に人工的にアルデヒドを導入する技術確立した (図 3). この人工糖鎖を利用し光反応性糖鎖リガンドを合成した. その糖鎖末端が閉じていることを核磁気共鳴法および質量分析法で確認した. 糖鎖結合タンパク質である数種類のレクチンを利用して, 開環型と閉環型での認識能力の違いを調べた結果, 閉環型でのみ良好な親和性を有することが明らかになった.

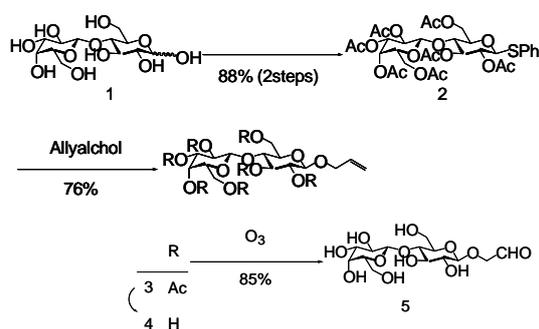


図 3 合成スキーム

(3) 糖脂質であるガングリオシド GM1 とアルツハイマーβアミロイドペプチドとの相互作用を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した (図 4). 図 4A は糖脂質のみを加えたときの単層脂質膜の状態の AFM 像である. これに, βアミロイドペプチドを加えると, 白く見える部分 (盛り上がっていることを示している) が大きくなり, ペプチドと糖脂質とが相互作用している像を捉えることができた (図 4B).

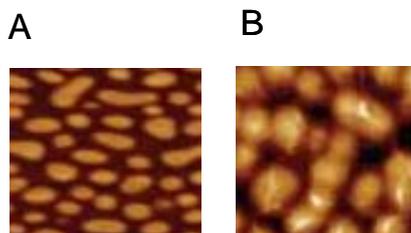


図 4 単層脂質上でのガングリオシドとアルツハイマーβアミロイドペプチドの挙動

低親和性に適応したクローニング法は完成できなかったが, 基礎的な検討を終えることができた. 光反応基が新たな Chemical Biology の方法論を創り出すポテンシャルを持つことを明示できた.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Yutaka Sadakane, Noriko Fujii, Kazuya Nakagomi (2011) Determination of rate constants for beta-linkage isomerization of three specific aspartyl residues in recombinant human alpha A-crystallin protein by reversed-phase HPLC, J Chromatogr. B (in press).
2. Kawahara M., Koyama H., Nagata T., Sadakane Y.: Zinc, copper, and carnosine attenuate neurotoxicity of prion fragment PrP106-126, Metallomics, (2011, in press).
3. Y. sadakane, I. Otsuka, K. (2011) A basic study of photochemical panning for ligands with lower binding affinity, Photomedicine and Photobiology 32, in press
4. Masahiro Kawahara, Isao Ohtsuka, Shoko Yokoyama, Midori Kato-Negishi and Yutaka Sadakane. (2011) Membrane incorporation, channel formation, and disruption of calcium homeostasis by Alzheimer's beta-amyloid protein. International Journal of Alzheimer's Disease. 2011, Article ID 304583, 17 pages on line
5. Isao Ohtsuka, Yutaka Sadakane, Mari Higuchi, Noriyasu Hada, Junko Hada, Nobuko Kakiuchi, Akiyo Sakushima (2011) Effect of the binding affinity of carbohydrates and proteins by the structural difference of the reducing terminal of sugar using photoaffinity labeling. Bioorg Med. Chem. 19, 894-899
6. 定金 豊 (2011) アスパラギンおよびアスパラギン酸残基の構造的変化解析: 神経疾患機構との繋がりを求めて, KURRI-KR-164 p15-19
7. Yamazaki Y, Fujii N, Sadakane Y, Fujii N. (2010) Differentiation and semiquantitative analysis of an isoaspartic acid in human alpha-Crystallin by postsourc decay in a curved field reflectron. Anal. Chem. 82, 6384-6394
8. Y. Sadakane, K. Konoha, M. Kawahara, K. Nakagomi (2010) Quantification of structural alterations of L-Asp and L-Asn residues in peptides related to

- neuronal disease by reversed-phase HPLC. *Chem. & Biodivers.* 7, 1371-1379
9. Y. Sadakane, I. Otsuka, K. Konoha, H. Koyama, M. Kawahara, Y. Hatanaka (2009) Ligand structure for photoaffinity labeling of carbohydrate-binding protein. *Photomedicine and Photobiology* 31, 9-10.
  10. Kawahara M, Negishi-Kato M, Sadakane Y. (2009) Calcium dyshomeostasis and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid protein. *Expert Rev Neurother.* 9, 681-693.
  11. Y. Sadakane, K. Konoha, T. Nagata, M. Kawahara (2008) Improvement of screening for protective substances against zinc-induced neuronal cell death. *Trace Nutrients Res.* 25, 41-45.
  12. Y. Sadakane, M. Tsunoda (2008) On the frontier of analytical science by young scientist - Detection and utilization of biomolecules - *YAKUGAKU ZASSHI* 128, 1587-1588.
  13. Y. Sadakane, Y. Hatanaka (2008) Development of new method for molecular biology using the photophore, diazirine. *YAKUGAKU ZASSHI* 128, 1615-1622.
- [学会発表] (計 35 件)
1. 定金 豊 2011年3月6日 (カンファレンス講演) 光を利用して化学と生物をつなぐ新技術を開発する 順正学園学術カンファレンス (延岡)
  2. I. Ohtsuka; Y. Sadakane; M. Higuchi; N. Kakiuchi; A. Sakushima; Synthesis of new molecular tools for elucidation of carbohydrates roles by photoaffinity labeling: Carbohydrate - protein interactions are affected by different of glycosidic formations. *PACIFICHEM 2010* (2010, 12, 16, Hawaii)
  3. 大塚 功, 定金 豊, 樋口真里, 垣内信子 光アフィニティーラベル法による糖鎖機能解明を目指した新規分子ツールの開発 第 27 回日本薬学会九州支部大会, 2010年12月11日, 長崎
  4. Kawahara M., Koyama H., Sadakane Y.; Alterations of gene expressions during neuronal death after zinc exposure: implications of calcium dyshomeostasis, Society for Neuroscience (2010.11.16-21, San Diego).
  5. 定金 豊 2010年11月11日 (招待講演) アスパラギンおよびアスパラギン酸残基の構造的変化解析: 神経疾患機構との繋がりを求めて 京都大学原子炉実験所・専門研究会 「第3回 タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会」 (大阪)
  6. 川原正博、小山裕也、定金豊: プリオン蛋白断片ペプチドのコンフォメーション変化と神経毒性に及ぼす微量金属の影響、第2回メタロミクス研究フォーラム (2010.11.2-3、京都)
  7. 定金 豊, 大塚 功, 川原正博, 畑中保丸: 糖鎖機能の効率的化未明を目指した光反応性糖鎖リガンドの製作 第 32 回日本光医学・光生物学会 (2010年7月30日, 東京)
  8. 小山裕也、定金豊、大塚功、川原正博: Effects of zinc and copper on conformational changes and neurotoxicity of prion fragment peptide (PrP106-126), 第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2010) (2010.06.25-26, 徳島)
  9. 大塚 功, 定金豊, 樋口真理, 佐久島明世: 光アフィニティーラベル法による糖鎖機能解明を目指した新規分子ツールの創製 日本薬学会第 130 回年会 (2010年3月30日、岡山)
  10. 川原正博, 定金 豊, 小山裕也: 微量金属の神経毒性と神経変性疾患 (2010年3月28日、岡山)
  11. 定金 豊, 木葉敬子, 川原正博, 畑中保丸: 糖鎖結合タンパク質に適した光化学的スクリーニング法の開発 第 26 回日本薬学会九州支部大会 (2009年12月12日, 福岡)
  12. Kawahara M, Nagata T, Konoha K, Sadakane Y: Carnosine inhibits  $\beta$ -sheet formation of PrP106-126 and protects against its neurotoxicity. *Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2009* (2009.07.11-16, Wien, Austria)
  13. 定金 豊, 大塚 功, 木葉敬子, 畑中保丸: 光反応性生体高分子リガンドの開発と光化学的スクリーニング法への応用 第 31 回 日本光医学・光生物学会 (2009年7月23日, 大阪)
  14. Y. Sadakane, K. Konoha, M. Kawahara, K. Nakagomi (July, 2009) Analysis of Alternation of A-Asp and L-Asn residues in peptides related to conformational disease. *International D-amino acid Research (IDAR2009)* (Awazi Inland, Japan)
  15. 定金豊, 木葉敬子: アルツハイマー  $\beta$  アミロイドペプチドの自己構造変化を認

- 識する抗体作製と応用 日本薬学会第129回年会 (2009年3月27日、京都)
16. 大塚 功, 永田哲也, 木葉敬子, 定金豊, 川原正博, 横山祥子: プリオン蛋白断片ペプチド PrP106-126 のコンフォメーションの違いによる細胞膜中における糖脂質認識能について - 原子間力顕微法による直接観察 日本薬学会第129回年会 (2009年3月27日、京都)
  17. 川原正博, 永田哲也, 大塚功, 木葉敬子, 定金豊, 横山祥子: 微量元素の神経毒性と老年性認知症の発症メカニズム、日本薬学会シンポジウム「金属の関与する生命科学(II) トキシコメタロミクス研究の新展開～最新分析法開発から創薬、診断、治療へのアプローチ」(2009年3月27日)
  18. 大塚 功, 永田 哲也, 木葉 敬子, 定金 豊, 川原 正博, 横山 祥子 2008年12月5-6日、プリオン断片蛋白 PrP106-126 のコンフォメーションの違いによるGM1 への認識能の変化-原子間力顕微法による直接観察 第25回日本薬学会九州支部大会(延岡)
  19. M. KAWAHARA, T. NAGATAI, OHTSUKA, K. KONOHA, Y. SADAKANE, S. YOKOYAMA Effects of trace elements on prion-induced neurotoxicity of primary cultured hippocampal neurons, Neuroscience 2008 (Washington D.C., U.S.A. 2008.11.19)
  20. 定金 豊, 木葉敬子, 畑中保丸 2008年8月6-8日、ジアジリンを利用した光化学的スクリーニング法の開発 第21回バイオメディカル分析科学シンポジウム (札幌)
  21. 定金 豊, 木葉敬子, 畑中保丸 2008年7月11-12日、光化学的スクリーニング法の開発 第30回 日本光医学・光生物学会 (島根)

[その他]

ホームページ等

<http://www.d4.dion.ne.jp/~sadafami/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

定金 豊 (SADAKANE, Yutaka)

九州保健福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号: 60293304

### (2) 研究分担者

川原 正博 (KAWAHARA, Masahiro)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号: 40224828

木葉 敬子 (KONOHA, Keiko)

九州保健福祉大学・薬学部・助手

研究者番号: 00369175

(2009年まで)

大塚 功 (OHTSUKA, Isao)

九州保健福祉大学・薬学部・講師

研究者番号: 20389589

(2009-2010年 連携研究者→研究分担者)

### (3) 連携研究者

大塚 功 (OHTSUKA, Isao)

九州保健福祉大学・薬学部・講師

研究者番号: 20389589

(2008年)