

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05855

研究課題名(和文)糖鎖を介したタンパク質架橋反応のリアルタイム観察とリガンド創出への新アプローチ

研究課題名(英文) Real-time observation of lectin cross-linking reactions by multivalent carbohydrates and new approach to ligand design

研究代表者

尾形 慎(Ogata, Makoto)

福島大学・食農学類・准教授

研究者番号：10532666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：前方静的光散乱(F-SLS)瞬時測定装置を使用して糖鎖クラスターと多価レクチン間の架橋凝集反応のリアルタイム観察を行った。具体的には、4価のシアロ糖鎖クラスターとニホンニワトコレクチン(SSA)を用いて架橋凝集反応を行った。時間分解F-SLSの散乱強度は、シアロ糖鎖クラスターとSSAとで形成された架橋複合体とともに増加した。結果、糖鎖クラスターと多価レクチン間の微細な連続架橋凝集をリアルタイムで観察することに成功した。得られた時間分解F-SLSパターンを用いたフラクタル次元に基づく構造解析により、架橋反応の進行とともに凝集体の密度が平衡に達するまで変化することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノからサブミクロンスケールで変化する糖鎖と多価レクチン間での凝集体形成反応を、これら凝集体の分析に高感度な独自のF-SLS瞬時測定技術によって明らかにした。これら一連の成果は、これまで不可能であった多価糖鎖と多価レクチン間架橋反応のリアルタイム観察を可能にした点で、学術的意義は非常に高い。また、これら相互作用はウイルスの宿主感染の際にもみられる普遍的な結合原理であるため、本技術を病原性ウイルスの検出や捕捉に応用展開が可能であり、社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We present a real-time observation and a structurally variable process of the cross-linking agglutination between multivalent lectins and glycoclusters using a small-angle forward static light scattering (F-SLS) technique. In this study, a cross-linking agglutination reaction was carried out using Sambucus Sieboldiana agglutinin (SSA) and a tetravalent Neu5Ac₂, 6LacNAc-glycocluster as a cross-linker. The scattering intensity of time-resolved F-SLS increased with the formation of the Neu5Ac₂, 6LacNAc-glycocluster - SSA cross-linked complex. As a result, we succeeded in observing the fine sequential cross-linking agglutination phenomenon between the multivalent carbohydrates and the multivalent lectins in real time with F-SLS. Furthermore, the structural analysis based on the fractal dimension using the time-resolved F-SLS pattern revealed that the structure of the aggregates changes densely as the cross-linking reaction progresses, and that the process is an equilibrium reaction.

研究分野：生物有機化学

キーワード：糖鎖 レクチン 凝集 糖鎖クラスター 架橋反応 前方静的光散乱 分子認識

1. 研究開始当初の背景

レクチンは動植物や微生物、ウイルスなどに多種多様に存在する糖結合活性を持ったタンパク質である。多くのレクチンは、共通して多価の糖結合活性を有しており、細胞上の複合糖質と構造特異的に結合後、多重架橋を引き起こし、凝集体を形成する。本現象は、ウイルス感染や細胞間の情報伝達、ガン転移など様々な生物学的プロセスに関与している。よって、レクチンに対する高親和性リガンドの作製は、架橋複合体形成機構の解明や糖鎖医薬・抗ウイルス剤の開発に対してとても重要な意味をもたらす。このような背景に対して、1990年代以降、レクチンとの間に分子間ネットワークを形成することで、結合親和性を飛躍的に増加させる糖鎖クラスタリング技術が開発され、高親和力と架橋形成能の双方を合わせ持った合成糖鎖リガンドの開発が盛んに行われている。近年申請者も、標的レクチンに対する架橋反応を高度に制御可能な多価糖鎖配糖体の設計および合成に成功している。しかし、これまで本研究の核となる架橋複合体形成反応の追跡および評価には重大な欠点が存在していた。つまり従来の評価系は、反応初期の両モノマー異分子間相互作用と反応終期の糖鎖-レクチン凝集体の観察によって得られる断片的な評価が主であり、最も重要な糖鎖-レクチン架橋反応を経時的に分析評価することは、市販のどの計測装置にも対応していないため不可能であった(図1)。そこで申請者は、研究分担者の若松教授(茨城高専)が独自開発したナノからサブミクロンスケールのタンパク質凝集体に対して高感度である低角度($<8^\circ$)の前方光散乱(F-SLS)を瞬時に計測できる凝集体分析装置(時間分解F-SLS測定装置、図2)を改良利用することで、糖鎖とレクチン間で起こる微細な逐次架橋現象をリアルタイムで観察する世界初の試みを着想した(図3)。これにより、これまで未知であった架橋複合体形成のプロセスやその速度論、さらには凝集体の構造に関する情報取得が可能となり、全く新しいアプローチに基づいた合成糖鎖リガンドの分子設計論を展開する(図3)。

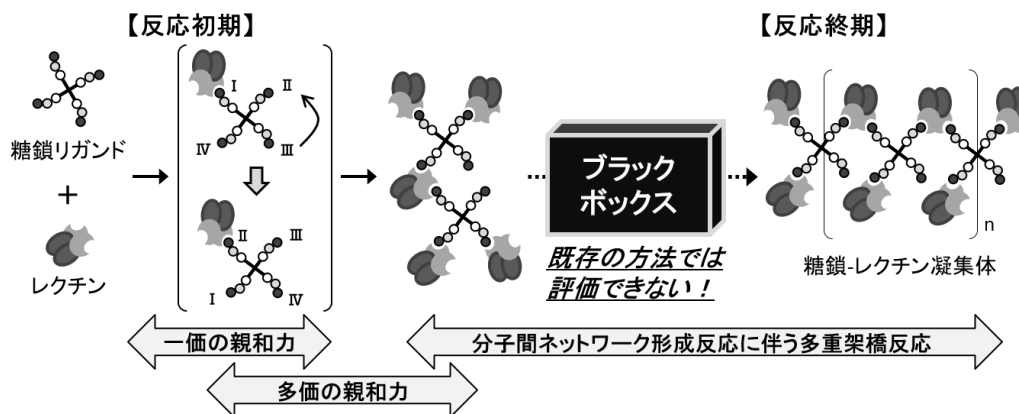


図1. 多価糖鎖-レクチン間架橋複合体形成反応と課題解決を阻む壁

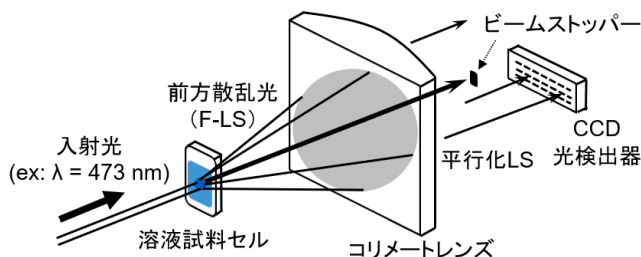


図2. 時間分解F-LS測定システム

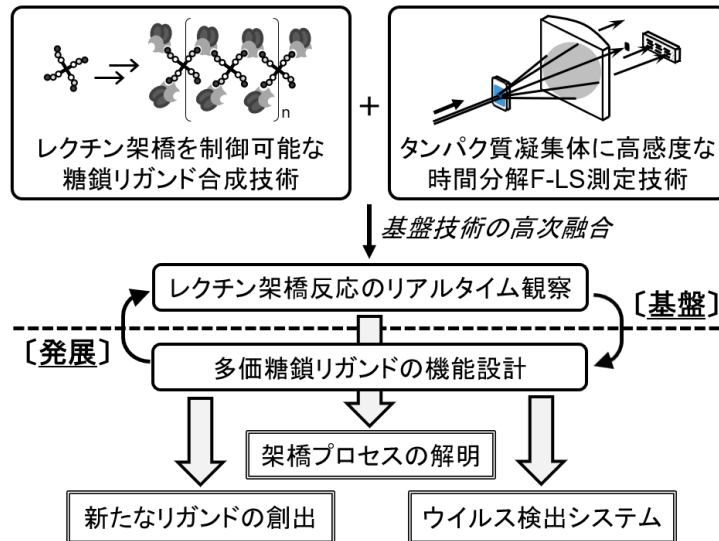


図3. 研究概要と計画

2. 研究の目的

本研究は、時間分解 F-SLS 測定による糖鎖-レクチン多重架橋反応のリアルタイム観察と架橋複合体形成プロセスの機構解明を目的とする。さらに、時間分解 F-SLS 測定によって得られる新知見をリガンドの分子設計にフィードバックし構造最適化を行うことで、レクチンに対して飛躍的に架橋能を増強した糖鎖リガンドを創出する。最終目標としては、本設計原理を様々な病原性ウイルスに適用することで、架橋反応に伴う形態変化現象を指標としたウイルス検出システムの開発を推進する。

3. 研究の方法

本研究でモデルレクチンとして使用したニホンニワトコレクチン (SSA) は、コスモバイオ株式会社から購入した。また、本研究で多価糖鎖として使用した、四価の Neu5Ac α 2,6LacNAc-糖クラスターおよび四価の LacNAc-糖クラスター (図 4) は、我々が以前報告した方法 [Ogata M. *et al.*, *Bioconjugate Chemistry* 23, 97-105 (2012)] を用いて合成した。

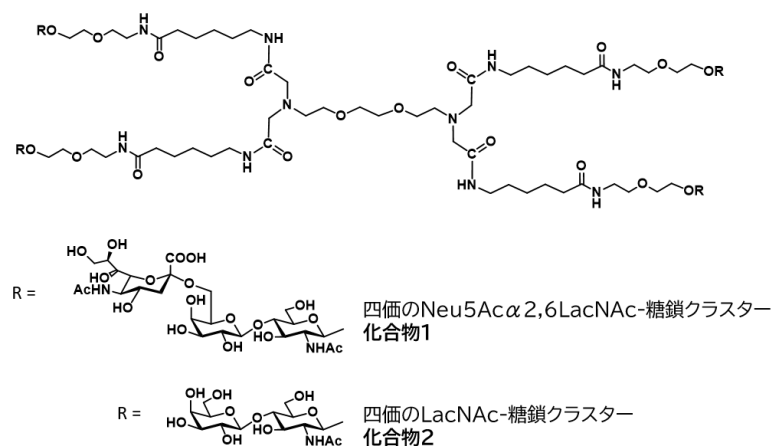


図4. 本研究で使用した中分子多価糖鎖

F-SLS 測定の方法を次に示す。SSA を 10 mM PBS (pH 7.4) で溶解し、SSA 溶液 (4、6、および 8 μ M) を調製した。その SSA 溶液をフィルターろ過 (0.20 μ m) 後、F-SLS 測定装置のサンプルセルに 50 μ L 添加した。続いて、同緩衝液で溶解およびフィルターろ過 (0.20 μ m) した化合物 1 と 2 (2、3、および 4 μ M) を、SSA を含むサンプルセルに 50 μ L 添加・混合後、直ちに F-SLS を測定した。時間分解 F-SLS 測定装置は、コリメートレンズと CCD 光検出器 (図 2) の組み合わせることで、凝集体の F-SLS プロファイルの正確なその場測定を可能にした。F-SLS

測定には、安定化ダイオード励起固体レーザー（出力 25 mW、 $\lambda = 473 \text{ nm}$ ）からの細いレーザービーム光（直径約 0.7 mm、広がり角 $< 1.2 \text{ mrad}$ ）を使用した。この装置により、 $1.5^\circ \sim 15^\circ$ の範囲の小さな角度での F-SLS の正確なリアルタイム測定が可能になった。1 回の F-SLS プロファイル測定は、CCD の 1 回の露光時間（通常は 20 ms）を使用して実行された。F-SLS シグナルは 30 秒または 60 秒間隔で測定された。すべての F-SLS 測定は、 $20 \pm 0.5^\circ \text{ C}$ で空調管理された部屋で行った。

4. 研究成果

- ✓ 多価糖鎖（四価の Neu5Ac $\alpha 2, 6\text{LacNAc}$ -糖クラスター）と多価レクチン（SSA）間の構造特異的な凝集反応を F-SLS 瞬時計測装置を使用してリアルタイムで観察することに成功した。
- ✓ F-SLS パターンは、架橋プロセスに関する情報を提供した。
- ✓ 多価糖鎖と多価レクチン間で形成される凝集体の密度変化をフラクタル次元で評価した。
- ✓ 時間分解 F-SLS は、凝集反応を評価するための強力なツールであることを実証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ogata M	4. 巻 33
2. 論文標題 Middle-molecular-weight glycoclusters for the crosslinking of multivalent lectins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E91-E97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.2016.7E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 尾形慎	4. 巻 33
2. 論文標題 多価レクチン架橋能を有する中分子糖鎖クラスター	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 J91-J97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.2016.7J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ogata M, Onoda T, Koizumi A, Tokunaga Y, Ohta I, Nukuzuma S, Park EY, Usui T, Suzuki T	4. 巻 5
2. 論文標題 Agglutination of human polyomaviruses by using a tetravalent glycocluster as a cross-linker	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 21940-21947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.0c03269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ogata M.	4. 巻 85
2. 論文標題 Functional design of glycan-conjugated molecules using a chemoenzymatic approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience Biotechnology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1046-1055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾形慎, 小野田崇司, 植英規, 若松孝
2. 発表標題 時間分解前方光散乱測定による糖鎖-レクチン架橋凝集のダイナミクス
3. 学会等名 蛋白質科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makoto Ogata
2. 発表標題 Functional design of glycan-conjugated molecules using a chemoenzymatic approach
3. 学会等名 化学系学協会東北大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾形慎
2. 発表標題 酵素法を基盤とした糖質複合分子の機能設計に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部 第156回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾形慎
2. 発表標題 化学酵素融合法によるキチン糖類の合成・変換に関する研究
3. 学会等名 日本応用糖質科学会東北支部会オンライン講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若松孝, 尾形慎, 植英規
2. 発表標題 タンパク質凝集に高感度な前方静的・動的光散乱の同時計測技術の開発
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾形慎, 小野田崇司, 小泉亜未, 徳永雄平, 太田勲, 奴久妻聡一, 朴龍洙, 碓氷泰市, 鈴木哲朗
2. 発表標題 四価糖鎖クラスターを架橋剤として用いたヒトポリオーマウイルスの凝集反応
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾形慎
2. 発表標題 化学酵素プロセスによる糖質複合分子の機能設計に関する研究
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾形慎
2. 発表標題 糖質複合分子の創製研究を通じて科学的な疑問に挑む
3. 学会等名 日本化学会北海道支部室蘭・苫小牧地区講演会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若松孝, 小野田崇司, 植英規, 尾形慎
2. 発表標題 前方光散乱瞬時計測による糖鎖 レクチン架橋反応凝集のダイナミクス評価
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾形慎
2. 発表標題 酵素法を基盤とした糖質複合分子の機能設計に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 分析装置および分析方法	発明者 若松孝、植英規、尾形慎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-27118	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/ogata-m homepage https://glycochemistry-lab.jp/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	若松 孝 (Wakamatsu Takashi) (80220838)	茨城工業高等専門学校・国際創造工学科・教授 (52101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関