

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24750170

研究課題名(和文)常磁性金属修飾糖鎖を用いた過渡的相互作用の動的観察

研究課題名(英文)Elucidation of the dynamic conformations and interactions of oligosaccharides by using paramagnetic NMR probes

研究代表者

山口 拓実 (Yamaguchi, Takumi)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教

研究者番号：60522430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では、分子間の弱い相互作用による過渡的な複合体形成が重要な役割を果たしている。本研究では、弱い相互作用の担い手として糖鎖に着目し、常磁性NMR法を応用することで、糖鎖の立体構造、ダイナミクス、相互作用様式を明らかにすることを目的とした系統的な解析を実施した。

常磁性タグ修飾を活用したNMR計測による精密実験データに裏付けられた分子シミュレーションを通じて、複雑な分岐構造と柔構造を有する糖鎖の動態を定量的観点から描象することに成功した。さらに、タンパク質による糖鎖の分子認識に際して、多様な構造アンサンブルの中の特定のコンフォーマーが選ばれる様子を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of physicochemical basis of the biological functions of oligosaccharides remains as tasks with more challenges. Paramagnetism-assisted NMR techniques using lanthanide ion-chelating probes was combined with molecular dynamics simulations to explore the conformational spaces of oligosaccharides in solution. The experimentally validated simulation results successfully provided atomic descriptions of dynamic behaviors of oligosaccharides such as high-mannose-type oligosaccharides harboring intracellular glycoprotein-fate determinants in their branched structures. The data showed conformational selection mechanisms by the carbohydrate recognition proteins during the glycan recognition process. These results suggest that dynamic conformational rearrangements of oligosaccharides can be important factors in inspecting carbohydrate-binding affinities and specificities of the lectins and enzymes in cells.

研究分野：生体関連化学

キーワード：糖鎖 NMR 常磁性 立体構造解析 ダイナミクス

### 1. 研究開始当初の背景

生命現象の多くの局面では、適切な相手を認識するため、弱く過渡的な相互作用を通して対象を識別することが必要である。例えば、タンパク質間相互作用の初期過程において、遭遇複合体と呼ばれる過渡的な会合体の存在が明らかにされるようになってきた。また、弱い相互作用の担い手として、糖鎖への注目が集まっている。

糖鎖は、タンパク質を修飾することで、その高次機能の制御に寄与するだけでなく、分子シャペロンや酵素が結合する際の認識標識として働いている。また、細胞表面の糖鎖が、細胞間接着やシグナル伝達など、細胞間のコミュニケーションを媒介する役割を担っていることが見出されつつある。しかし一般に、糖鎖の結合力は極めて弱い。したがって、こうした糖鎖の生物機能の本質は、まさに弱い相互作用にあると言える。すなわち糖鎖は、タンパク質間や細胞間コミュニケーションにおいて、水溶液中で揺らぐ三次元構造を通じた過渡的な分子認識により、適切な相互作用相手の識別に寄与していると考えられる。

こうした過渡的な分子認識機構の詳細を明らかにすることができれば、生命現象の更なる理解に通じるのみならず、分子認識化学をはじめとする種々の研究領域に新たな発展をもたらすことは間違いない。しかし、一般的な構造生物学研究の手法では、糖鎖の過渡的な複合体の精密な構造や相互作用機構など、その分子科学的基盤に関する情報を集めることは容易ではなかった。柔軟な生命鎖である糖鎖は、水溶液中で一定のコンフォメーションをとらない。したがって、糖鎖の分子認識は、コンフォメーションの絶え間ない揺らぎの中で生じる。そのため、糖鎖の弱い相互作用を考える上では、安定な結合状態を静的に観測するのではなく、遊離状態のコンフォメーションの定量的な理解を含めた動的な観察を行うことが重要となるためである。

### 2. 研究の目的

生体内では、分子間の弱い相互作用による過渡的な複合体形成が重要な役割を果たしている。本研究では、こうした過渡的相互作用の分子科学的基盤を明らかにするための、新規方法論の確立を目的とする。これを達成するため、弱い相互作用の担い手として、糖鎖に着目した。糖鎖の生物機能は、その動的なコンフォメーションを通じて体现される。そのため、糖鎖の過渡的相互作用に関する精緻な情報を得るためには、水溶液中で揺らいでいる糖鎖の動的な観察が必要である。そこで、常磁性金属修飾を施した糖鎖を応用し、糖鎖の立体構造、ダイナミクス、相互作用様式を系統的に明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

溶液中の生体分子の3次元構造とそのダイナミクスに関する情報を得るために有効な手法の一つは、核磁気共鳴 (NMR) 分光法である。しかし、溶液 NMR 法においても、既存の測定法を用いて糖鎖を解析することは容易ではない。タンパク質の NMR 構造学的研究においては、核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用した立体構造解析法が確立されている。一方糖鎖は、プロトン密度が低いため、近距離にあるプロトン間の距離情報を反映する NOE を観測し、これに基づいて構造解析を行うことは極めて困難である。

そこで本研究では、常磁性プローブによる糖鎖の修飾を行うことで、常磁性 NMR 法を用いた糖鎖の動的構造解析を行った。常磁性効果は、NOE とは異なるロングレンジの構造情報を与えることが知られている。タンパク質を修飾するハイマンノース型糖鎖および主要な糖脂質であるガングリオシドについて本手法を適用し、常磁性効果の一つである擬コンタクトシフト (PCS) や常磁性緩和増強効果を利用した NMR 解析を実施した。これらの測定データと分子動力学計算とを組み合わせ、その動的なコンフォメーションを描象し、糖鎖の弱い相互作用の実体に迫った。

### 4. 研究成果

常磁性効果を応用した糖鎖の NMR 解析を行うため、複雑な分岐構造を有する糖鎖へ常磁性タグを導入する手法を確立した。遺伝子改変酵母を用いて糖タンパク質上に均一に発現させた高マンノース型糖鎖 M9 に関して、その分離・精製条件、および化学修飾のための反応条件を最適化し、その還元末端にニトロキシラジカルやランタニドプローブを選択的に導入することに成功した (図 1)。

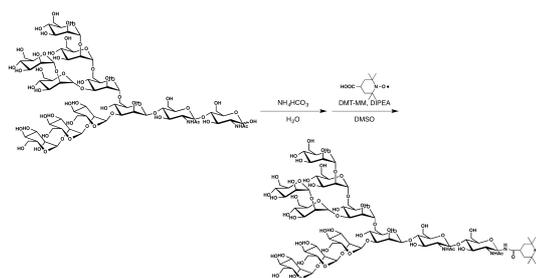


図 1. 高マンノース型糖鎖 M9 への常磁性プローブの導入。T. Yamaguchi *et al.* *Chem. Lett.* 2013 より。

変異酵母を [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]グルコースを炭素源として含む培地で培養することによって糖鎖を <sup>13</sup>C で均一に標識し、得られた高マンノース型糖鎖 M9 に金属結合能をもつ有機多座配位子を結合した後、金属イオンとの錯形成反応により常磁性金属を導入した。こうして調製した試料の NMR 計測から糖鎖の各 <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C の

化学シフト変化を観測することで、立体構造に関する PCS 値を求めた (図 2)。

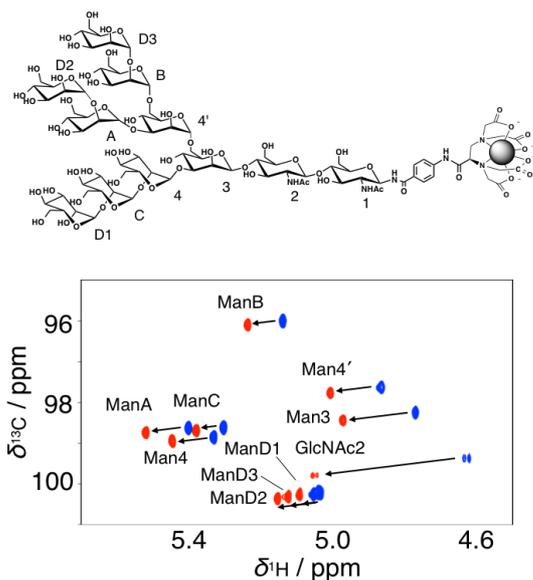


図 2. 常磁性ランタニドプローブの導入による M9 糖鎖の NMR スペクトルの変化。La<sup>3+</sup> (青; 反磁性) および Tm<sup>3+</sup> (赤; 常磁性) を用いて観測した PCS に基づく化学シフトの変化を矢印で示した。T. Yamaguchi *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* 2014 より。

M9 はマンノース (Man) 9 残基を含む 11 糖であり、その非還元末端にいずれも共通する糖鎖構造 (Man  $\alpha$  1-2Man) を含む 3 本の分岐鎖を有している。通常、その NMR スペクトルは多くの信号が縮重してしまい詳細な解析には困難を伴うが、化学シフトを空間配置に応じて変化させる PCS を応用することで、すべての糖残基の信号を良好に観測することができるようになった。さらに、常磁性 NMR 実験から求めた構造情報と照らし合わせてシミュレーション結果を評価することによって、糖鎖の配座空間の探索を行った。具体的には、MD 計算によって得られた複数のコンフォマーを考慮したアンサンブルモデルを構築し、その構造に基づいて PCS の理論値を算出した。これを NMR による PCS の実験値と比較することで、MD 計算によって得られた構造サンプリングの適切さを評価した。この際、レプリカ交換 MD シミュレーションを用いることで、複雑に枝分かれした糖鎖の実際の構造を正しく反映することが可能となった。その結果、M9 糖鎖の 3 本の分岐鎖のコンフォメーションは有意に異なっており、一部の枝を還元末端側に向けたフォールドバック構造を取ることが示された。また、同様の解析から、M9 から末端のマンノース 1 残基をとり除いただけで、糖鎖のコンフォメーション空間が顕著に広がることが明らかとなった (図 3)。これらの高マンノース型糖鎖は糖認識タンパク質 (レクチン) との相互作用を通じ

て、糖タンパク質のフォールディング・輸送・分解といった運命の決定に関わる目印の役割を果たしている。こうした機構において、糖鎖のダイナミックな立体構造変化は、糖鎖とレクチンとの間のコミュニケーションに重要な役割を演じていることが予想された。さらに、結晶構造データの結果と合わせた解析から、細胞内レクチンによるこれらの糖鎖の分子認識に際して、多様な構造アンサンブルの中の特定のコンフォマーが選ばれることを示すことができた。

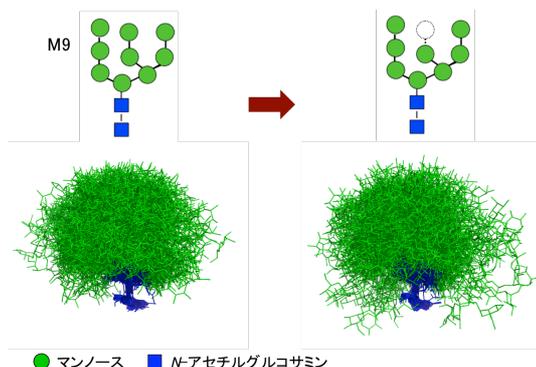


図 3. 常磁性 NMR 解析とレプリカ交換 MD シミュレーションを通じて明らかにした糖鎖の立体構造の重ね合わせ。M9 糖鎖 (左) の中央の枝からマンノース 1 残基が外れると、糖鎖全体の動きが大きく変化する。T. Yamaguchi *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* 2014 より。

同様に、神経細胞膜上に豊富に存在する糖脂質ガングリオシドの糖鎖構造についても、常磁性 NMR 法と MD 計算による解析を行った。ガングリオシド GM1 を含む一連の糖鎖構造の配座空間を比較したところ、分岐構造の有無によって取り得る立体構造が著しく制御されている様子を明らかにすることができた (図 4)。

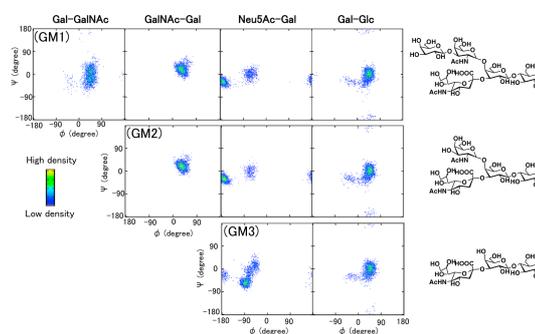


図 4. ガングリオシド糖鎖のコンフォメーション空間。糖残基間の二面角を用いて配座を表した。Y. Zhang *et al. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2015 より。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 8 件)

- ① T. Yamaguchi and K. Kato, "Paramagnetic NMR probes for characterization of the dynamic conformations and interactions of oligosaccharides," *Glycoconj. J.* in press (2015) 査読有.  
DOI: 10.1007/s10719-015-9599-1
- ② 山口拓実, 加藤晃一, "糖鎖の立体構造を描き出す," *生物物理*, **55**, 81-83 (2015) 査読有.  
DOI: 10.2142/biophys.55.081
- ③ T. Satoh, T. Yamaguchi, and K. Kato, "Emerging structural insights into glycoprotein quality control coupled with N-glycan processing in the endoplasmic reticulum," *Molecules* **20**, 2475-2491, (2015) 査読有.  
DOI: 10.3390/molecules20022475
- ④ T. Yamaguchi, Y. Sakae, Y. Zhang, S. Yamamoto, Y. Okamoto, and K. Kato, "Exploration of conformational spaces of high-mannose-type oligosaccharides by an NMR-validated simulation," *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 10941-10944, (2014) 査読有.  
DOI:10.1002/ange.201406145
- ⑤ Y. Zhang, T. Yamaguchi, and K. Kato, "New NMR tools for characterizing the dynamic conformations and interactions of oligosaccharides," *Chem. Lett.* **42**, 1455-1462, (2013) 査読有.  
DOI:10.1246/cl.130789
- ⑥ Y. Kamiya, K. Yanagi, T. Kitajima, T. Yamaguchi, Y. Chiba, and K. Kato, "Application of metabolic <sup>13</sup>C labeling in conjunction with high-field nuclear magnetic resonance spectroscopy for comparative conformational analysis of high mannose-type oligosaccharides," *Biomolecules* **3**, 108-123, (2013) 査読有.  
DOI:10.3390/biom3010108
- ⑦ T. Yamaguchi, Y. Kamiya, Y.-M. Choo, S. Yamamoto, K. Kato, "Terminal spin labeling of a high-mannose-type oligosaccharide for quantitative NMR analysis of its dynamic conformation," *Chem. Lett.* **42**, 544-546, (2013) 査読有.  
DOI: 10.1246/cl.130040.
- ⑧ T. Yamaguchi, T. Uno, Y. Uekusa, M. Yagi-Utsumi, and K. Kato, "Ganglioside-embedding small bicelles for probing membrane-landing processes of

intrinsically disordered proteins," *Chem. Commun.* **49**, 1235-1237 (2013) 査読有.  
DOI: 10.1039/c2cc38016a

〔学会発表〕 (計 29 件)

- ① 山口拓実, 榮 慶丈, 岡本祐幸, 加藤晃一, "NMR 解析に基づく分子シミュレーションによる高マンノース型糖鎖の動的立体構造の解明," 日本化学会 第 95 春季年会 2015 年 3 月 28 日 (日本大学理工学部・千葉県・船橋市) .
- ② T. Yamaguchi, Y. Sakae, M. Yagi-Utsumi, Y. Zhang, S. Yamamoto, Y. Okamoto, and K. Kato, "Elucidation of the molecular basis of oligosaccharide functions by NMR spectroscopy and molecular dynamics simulation," The 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions, 2015 年 1 月 11 日 (合歓の郷・三重県・志摩市) .
- ③ T. Yamaguchi, Y. Zhang, Y. Kamiya, S. Yamamoto, and K. Kato, "Exploration of conformational dynamics of oligosaccharides by stable isotope- and lanthanide- assisted NMR approaches," XXVIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), 2014 年 8 月 28 日 (Dallas, USA) .
- ④ 山口拓実, "揺らめく糖鎖のかたちとはたらき," 「宇宙・生命・脳・物質・エネルギー」若手研究者による *Rising Sun* Ⅲ, 2014 年 6 月 15 日 (日本科学未来館・東京都・江東区) .
- ⑤ T. Yamaguchi, Y. Zhang, Y. Kamiya, Y. Sakae, Y. Okamoto, and K. Kato, "Paramagnetism-assisted NMR evaluation of molecular dynamics simulations for conformational characterization of oligosaccharides," 6<sup>th</sup> Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science : Experiments and Simulation, 2013 年 11 月 25 日 (岡崎コンファレンスセンター・愛知県・岡崎市) .
- ⑥ 山口拓実, "常磁性効果を活用した糖鎖の立体構造解析—NMR と分子動力学計算によるコンフォメーション空間の探索—," 日本分光学会 NMR 分光部会 平成 25 年度講習会, 2013 年 10 月 16 日 (名古屋大学・愛知県・名古屋市) .
- ⑦ 山口拓実, Zhang Ying, 王 進政, 戸谷 希一郎, 榮 慶丈, 岡本祐幸, 神谷由紀子, 加藤 晃一, "ランタニドイオンを活

- 用した常磁性NMR法による糖鎖の動的構造解析,”第7回バイオ関連化学シンポジウム,2013年9月27日(名古屋大学・愛知県・名古屋市)。
- ⑧ 山口拓実,加藤晃一,“NMRを用いた糖鎖のコンフォメーション揺らぎとクラスター特性の解析,”国際高等研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能ネットワークとダイナミクスの解明」第2回研究会,2013年8月8日(国際高等研究所・京都府・木津川市)。
- ⑨ 山口拓実,Zhang Ying,王 進政,喜多島敏彦,千葉靖典,戸谷希一郎,神谷由紀子,加藤晃一,“安定同位体標識と常磁性プローブ導入による高マンノース型糖鎖のNMR動的構造解析,”第32回日本糖質学会年会,2013年8月6日(大阪国際交流センター・大阪府・大阪市)。
- ⑩ T. Yamaguchi, Y. Zhang, and K. Kato, “Paramagnetic NMR approaches for revealing conformational dynamics of oligosaccharides,” 8th Asian Biophysics Association Symposium (ABA Jeju 2013), 2013年5月28日 (Jeju, Korea)。
- ⑪ T. Yamaguchi and K. Kato, “NMR approaches to the molecular basis of oligosaccharide functions,” 2013 Asian Core Winter School, 2013年1月28日 (Busan, Korea)。
- ⑫ T. Yamaguchi, Y. Zhang, and K. Kato, “Paramagnetic Lanthanide-tagging for NMR Conformational Characterization of Glycolipids,” Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013), 2013年1月24日 (Chon Buri, Thailand)。
- ⑬ T. Yamaguchi, Y. Zhang, and K. Kato, “NMR spectroscopic approaches to the conformational dynamics of oligosaccharides by paramagnetic tagging,” The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), 2012年11月28日 (東工大蔵前会館・東京都・目黒区)。
- ⑭ 山口拓実,Zhang Ying,山本さよこ,亀田倫史,加藤晃一,“常磁性効果を用いた糖鎖の動的立体構造解析,” Paramagnetic-tagging approaches for exploring conformational dynamics of oligosaccharides,” 第51回NMR討論会,2012年11月10日(ウインクあいち・愛知県・名古屋市)。
- ⑮ 山口拓実,Zhang Ying,山本さよこ,亀田倫史,Erdélyi Máté,Griesinger Christian,加藤晃一,“常磁性NMR法による糖鎖の動的立体構造解析,”第31回日本糖質学会年会,2012年9月18日(鹿児島市民文化ホール・鹿児島県・鹿児島市)。
- ⑯ 山口拓実,Zhang Ying,山本さよこ,加藤晃一,“常磁性NMR分光法と分子動力学計算を組み合わせた糖鎖の動的立体構造解析,”第39回生体分子科学討論会,2012年6月9日(東北大学・宮城県・仙台市)。
- [図書] (計 3件)
- ① Y. Zhang, T. Yamaguchi, T. Satoh, M. Yagi-Utsumi, Y. Kamiya, Y. Sakae, Y. Okamoto, and K. Kato, “Conformational dynamics of oligosaccharides characterized by paramagnetism-assisted NMR spectroscopy in conjunction with molecular dynamics simulation,” *Advances in Experimental Medicine and Biology* (A. Chakrabarti and A. Suroliá ed.), Springer (Switzerland), **842**, pp217-230 (2015). DOI:10.1007/978-3-319-11280-0\_14
- ② T. Yamaguchi and K. Kato, “Paramagnetism-assisted nuclear magnetic resonance analysis of dynamic conformations and interactions of oligosaccharides,” *Glycoscience: Biology and Medicine* (N. Taniguchi, T. Endo, G. W. Hart, P. Seeberger, and C.-H. Wong ed.), Springer (Japan), 1, pp137-145 (2014). DOI:10.1007/978-4-431-54841-6\_101
- ③ Y. Yamaguchi, T. Yamaguchi, and K. Kato, “Structural analysis of oligosaccharides and glycoconjugates using NMR,” *Advances in Neurobiology* (R. K. Yu and C.-L. Schengrund ed.), Springer (New York), **9**, pp.165-183 (2014). DOI:10.1007/978-1-4939-1154-7\_8
- [その他]  
プレスリリース  
水中で絶え間なく揺らいでいる糖鎖の立体構造を描き出す  
[https://www.ims.ac.jp/news/2014/09/05\\_2994.html](https://www.ims.ac.jp/news/2014/09/05_2994.html)
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
山口 拓実 (Yamaguchi, Takumi)  
分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教  
研究者番号：60522430