

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：51601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780111

研究課題名(和文) 特定タンパク質と架橋形成能を有する多価性糖鎖配位体の設計と展開

研究課題名(英文) Functional design of glycoclusters possessing cross-linking activities with lectin

研究代表者

尾形 慎(Ogata, Makoto)

福島工業高等専門学校・その他部局等・助教

研究者番号：10532666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：3種類の植物レクチン(ニホンニワトコレクチン、デイゴマメレクチン、ヒイロチャワンタケレクチン)に対して架橋複合体形成能と高結合親和性をあわせもつ低分子型多価性糖鎖材料の開発に成功した。さらに、骨格部やスパーサー部、糖鎖部をそれぞれ改変することで、架橋複合体の大きさや形成様式が変化することや、結合親和性が飛躍的に上昇することを明らかにした。また今回の研究において、我々が機能設計した多価性糖鎖材料は今回研究に用いた直径が数～数十ナノメートルほどの糖結合性タンパク質(レクチン)に対してだけでなく、直径が百ナノメートル程のウイルス粒子に対しても架橋複合体を形成可能な多価性糖鎖材料であることを実証した。

研究成果の概要(英文)：We are interested in developing an efficient synthetic route to multivalent glycosides, for glycomimetics, as they tend to have enhanced avidity due to their multivalency for specific lectins. In this study, various types of glycoclusters carrying alpha-2,6-sialyllactosamine, N-acetyllactosamine and Lewis X were designed and synthesized as glycomimetics. The interaction between each glycoclusters and three types lectins [Sambucus sieboldiana agglutinin (SSA), coral tree (Erythrina cristagalli) agglutinin (ECA) and Aleuria aurantia lectin (AAL)] is characterized using by hemagglutination inhibition assay, precipitation assay, isothermal titration calorimetry and dynamic light scattering.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 生物生産化学・生物有機化学

キーワード：分子認識 糖鎖工学

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖生物学の分野において、糖鎖-タンパク質間の1対1の結合親和性は非常に小さいにもかかわらず、細胞表面で集合体構造となることで結合親和性が飛躍的に増大する『糖鎖クラスター効果』が一般によく知られている。本概念は、糖鎖医薬・抗ウイルス剤などの開発において、最も基本となる設計指針となっている。我々はこれまでに、天然素材である納豆菌由来 $\gamma$ -ポリグルタミン酸に対して糖鎖を多価に配位した高分子型糖鎖ポリペプチドを合成し、それが糖鎖-レクチン間の結合解析ツールとなるばかりではなく、この結合原理が糖鎖-インフルエンザウイルス間にも適用できることを明らかにした。しかしながら、今後の応用を見据えた場合、生分解性や抗原性などの観点から構造明確な低分子型糖鎖体の合成技術が必須となる。そこで我々は、低分子型糖鎖体の分子設計にあたり、一般的な金属キレート剤として知られるグリコールエーテルジアミン四酢酸(EGTA)の4価カルボキシ基が配位子としてカニバさみのように金属イオンを補足するキレート原理に着目し、EGTAを前駆体としてカルボキシ基を介して導入した糖鎖を配位子に見立てた四価糖鎖配位体の合成を着想した。興味深いことに、本多価性糖鎖配位体は、クラスター効果による結合親和性の増加のみならず、糖結合部位を2つ以上有する標的タンパク質と三次元的な架橋複合体を形成するという現象を見出している。

## 2. 研究の目的

本課題では、キレート原理に学びそれを模倣した多価性糖鎖配位体などの多価性糖鎖材料を創り出すことで、標的タンパク質に対して架橋結合能や高結合親和性を有する新規な糖鎖材料の革新的な技術論と方法論を展開する。具体的には、分子構造を骨格部(EGTA等)・糖鎖部・スパーサー部の3つにモジュール化することで、各種相互作用解析を指標とした統合的な機能設計を実施し、『架橋形成能や高結合親和性を有する新規多価性糖鎖材料』の開発を実現する。本課題は、従来の高分子型糖鎖ポリペプチドとタンパク質間又はウイルス間における普遍的な結合原理にヒントを得て、独自に着想した先駆的・独創的研究である。即ち、全く新しい概念で多価性糖鎖配位体を創製し、糖鎖-標的タンパク質間の結合原理を糖鎖-ウイルス間の結合・接着にも適用した新しい概念に基づくウイルス捕捉剤および検出システムの開発を目指している。

また、上記に示したように多価性糖鎖材料はその構造を糖鎖部・スパーサー部・骨格部の3つに分けることができる。そのうち糖鎖部は、レクチンとの結合に直接関与する最も重要な部分であり、糖鎖部とレクチンとの結合親和性は多価性糖鎖材料の機能発現に重要な役割を担っている。よって、本研究では

いくつかのレクチンや酵素に対して高結合親和性を有する糖鎖部の探索および開発も行った。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、Neu5Ac $\alpha$ 2,6Gal構造に対して結合親和性を有するニホンニワトコレクチン(SSA)やN-アセチルラクタミン(LacNAc; Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)構造に対して結合親和性を有するデイゴマメレクチン(ECA) フコース構造に対して結合親和性を有するヒロチャワンタケレクチン(AAL)などの植物レクチンをモデルタンパク質に見立て、それらレクチンに対して架橋形成能や高結合親和性を示す多価性糖鎖材料の開発および機能設計を行った。また、ウイルスに関してはインフルエンザウイルスやポリオマウイルス(MCV)に対して多価性糖鎖材料を分子設計した。

## 4. 研究成果

### SSAに対する多価性糖鎖材料の合成

本研究ではSSAに対して、架橋複合体形成能を有するシアロ型多価糖鎖配位体の設計及び合成を行った。さらに、糖鎖リガンドレクチン間における架橋複合体形成メカニズムを各種相互作用解析の統合的評価により検証した。はじめに、前駆体となるEGTAの四価カルボキシル基に対してアグリコン部に2-アミノエトキシ基を有するスパーサー結合型Neu5Ac $\alpha$ 2,6LacNAc (Neu5Ac $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) およびNeu5Ac $\alpha$ 2,6LacNAc $\beta$ 1,3LacNAc配糖体をそれぞれ導入した3糖および5糖シアロ型四価糖鎖配位体(1・2)を合成した。また、これとは別に化合物2のLacNAc1回繰り返し分に相当する長さをアルキルスパーサーで置換したスパーサー延長型Neu5Ac $\alpha$ 2,6LacNAc四価配位体(3)も合成した。続いて、これら一連の糖鎖配位体とSSAとの結合特性解析を等温滴定カロリメトリー(ITC)により評価した。その結果、2が最も強い結合解離定数( $K_d = 34$  nM)を示し、その値は一価のNeu5Ac $\alpha$ 2,6LacNAcと比較して28倍強い結果となった。また興味深いことに、化合物1と2および3では糖鎖リガンド一分子に対するSSAの結合数に違いがみられ、化合物1はリガンド:SSAが1対2で、化合物2および3は1対3で結合することが示された。さらに、本リガンドの架橋形成に伴う形態変化を定量沈降試験及び動的光散乱法で評価したところ、ITCの結果を支持する濃度範囲において化学量論的な架橋複合体の形成が示された。結果として、化合物1はリガンド:SSAが1対1で、化合物2および3は1対2で最大沈降量を示し、その粒径は600-800 nmと巨大なリガンドSSA架橋複合体であることが明らかとなった。今回の結果から、糖鎖配位体のスパーサーおよび糖鎖構造が架橋複合体形成に深く関与することを実証すると共に、そのリガンドと

レクチン間における架橋複合体形成メカニズム (図1) を各種相互作用解析の統合的評価により提案した。

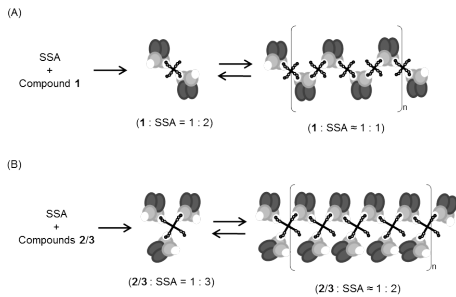


図1 多価性糖鎖配位体とSSA間における架橋複合体形成メカニズム

### ECA に対する多価性糖鎖材料の合成

近年、ウイルス感染などに関与する糖結合性タンパク質 (レクチン) に対して架橋複合体を形成可能な低分子型の糖鎖クラスター材料の開発が盛んに行われている。従来の糖鎖クラスター材料は糖鎖がレクチンとの結合に全て利用されるように設計されており、これにより架橋能の獲得と親和性の向上が図られている。しかしながら、このような設計は  $\Delta H$  の増大が見込まれる一方で、大きな  $\Delta S$  の損失も伴う。本研究では、 $\Delta S$  損失を抑えた新規糖鎖クラスター材料 (図2) の開発を目的とした。始めに、LacNAc 含有四価配糖体 ((LacNAc)<sub>4</sub>-DBGs) を合成した。具体的には、アルキル鎖長の異なるジカルボン酸 (HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH; n=4, 10, 16) を骨格部に用いることで 3 種類の (LacNAc)<sub>4</sub>-DBGs を合成した。続いて、(LacNAc)<sub>4</sub>-DBGs とレクチンとの各種相互作用解析を行った。また、本研究では LacNAc に結合親和性を有する ECA をモデルタンパク質として使用した。定量沈降試験では、全ての (LacNAc)<sub>4</sub>-DBGs において架橋複合体の形成が確認された。また、結合親和性は赤血球凝集阻害試験法及び等温滴定カロリーメトリー (ITC) により評価した。赤血球凝集阻害試験では、アルキル鎖長が一番長い (LacNAc)<sub>4</sub>-DBG-C<sub>18</sub> が最大の阻害活性 (IC<sub>50</sub> = 188 nM) を示した。また、ITC 分析においても (LacNAc)<sub>4</sub>-DBG-C<sub>18</sub> が最も強い結合親和性 ( $K_d$  = 2.4  $\mu$ M) を示した。具体的には、 $\Delta H$  の値が他の化合物より低いものの、 $\Delta S$  損失が最も低いという特徴を有していた。また、化学量論比より (LacNAc)<sub>4</sub>-DBGs と ECA との結合比は全て 1 対 2 であることも明らかとなった。結果として、(LacNAc)<sub>4</sub>-DBGs の骨格部改変により、ECA との結合様式を変化させることなく  $\Delta S$  損失を軽減し結合親和性を向上させることに成功した。

### AAL に対する多価性糖鎖材料の合成

本研究では、細胞間の相互作用に関与する Lewis X (LeX) 糖鎖構造を有した新規四価糖鎖配位体の合成を行った。LeX 糖鎖合成の鍵

酵素である 1,3 フコース転移酵素 (FUT6) の発現系は BmNPV バクミド法を用いて構築した。これにより、カイコ幼虫から組換え FUT6 を体液 1 mL あたり約 0.3 ユニットで得ることに成功した。次に、組換え FUT6 を含む各種糖転移酵素を用いて、3 種類の LeX 糖鎖構造を有する四価糖鎖配位体 (1~3) を合成した (図3)。さらに、合成した四価糖鎖配位体を用い、AAL との相互作用解析を行った。化合物 1~3 と AAL との相互作用を赤血球凝集阻害試験によって解析した。AAL は  $\alpha$ 2, 3, 4, 6-フコースに特異的であり、L-フコースに対する最小阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) は 5 mM であった。一方、化合物 1~3 の IC<sub>50</sub> はそれぞれ 12.5  $\mu$ M, 0.25  $\mu$ M, 0.063  $\mu$ M であった。これらの結果は、モルから糖換算しても化合物 1~3 の IC<sub>50</sub> は L-フコースモノマーよりも低く、多価による阻害効果が観察された。特に、化合物 3 は低分子にもかかわらず、非常に強い阻害活性を示した。さらに、同じ四価同士で比較すると化合物 2 と 3 よりも化合物 1 の阻害効果が高かったため、多価効果だけではなくSpacer や内部糖鎖を延長することで AAL との結合親和性が上昇することが確認された。

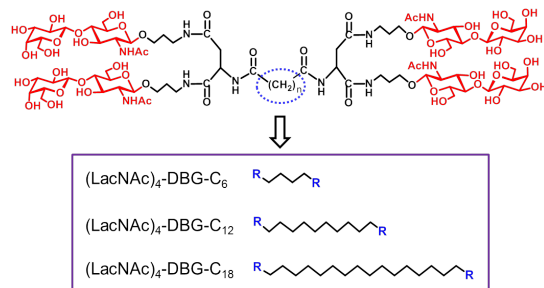


図2 ECA に対して  $\Delta S$  損失を抑えた新規糖鎖クラスター材料

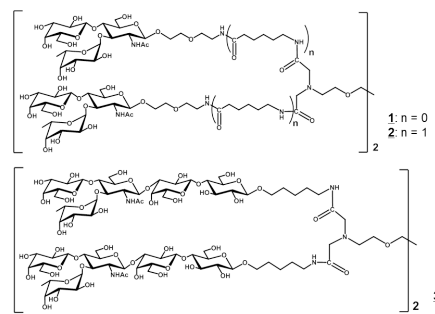


図3 LeX糖鎖構造を有する新規四価糖鎖配位体

### MCV に対する多価性糖鎖材料の合成

MCV に対して結合親和性が期待される糖鎖構造を有した、数種類のシアロ糖鎖含有四価糖鎖材料を用いて、MCV との相互作用解析を行った。その結果植物レクチン同様、ある糖鎖構造およびある一定濃度領域において、MCV とシアロ糖鎖含有四価糖鎖材料は巨大なウイルス糖鎖架橋複合体を形成することが明らかとなった。

## 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7件)

- 1) Ogata, M., Uzawa, H., Hidari, K. I., Suzuki, T., Park, E. Y., Usui, T. Facile synthesis of sulfated sialoglycopolypeptides with a  $\gamma$ -polyglutamic acid backbone as hemagglutinin inhibitors against influenza virus. *J. Appl. Glycosci.*, 2014, 61, 1-7. (査読有)
- 2) Takahashi, T., Kawakami, T., Mizuno, T., Minami, A., Uchida, Y., Saito, T., Matsui, S., Ogata, M., Usui, T., Sriwilaijaroen, N., Hiramatsu, H., Suzuki, Y., Suzuki, T. Sensitive and direct detection of receptor binding specificity of highly pathogenic avian influenza A virus in clinical samples. *PLoS ONE*, 2013, 8, e78125. (査読有)
- 3) Dong, J., Harada, M., Yoshida, S., Kato, Y., Murakawa, A., Ogata, M., Kato, T., Usui, T., Park, E. Y. Expression and purification of bioactive hemagglutinin protein of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in silkworm larvae. *J. Virol. Methods*, 2013, 194, 271-276. (査読有)
- 4) Ogata, M., Umemoto, N., Ohnuma, T., Numata, T., Suzuki, A., Usui, T., Fukamizo, T. A novel transition-state analogue for lysozyme, 4-O- $\beta$ -tri-N-acetylchitotriosyl moranoline, provided evidence supporting the covalent glycosyl-enzyme intermediate. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288, 6072-6082. (査読有)
- 5) Hattori, T., Ogata, M., Yumiko, K., Totani, K., Nikaido, M., Nakamura, T., Koshino, H., Usui, T. Enzymatic synthesis of cellulose II-like substance via cellulolytic enzyme-mediated transglycosylation in an aqueous medium. *Carbohydr. Res.*, 2012, 353, 22-26. (査読有)
- 6) Kato, T., Manohar, S. L., Kanamasa, S., Ogata, M., Park, E. Y. Improvement of the transcriptional strength of baculovirus very late polyhedrin promoter by repeating its untranslated leader sequences and coexpression with the primary transactivator. *J. Biosci. Bioeng.*, 2012, 113, 694-696. (査読有)
- 7) Ogata, M., Takeuchi, R., Suzuki, A., Hirai, H., Usui, T. Facile synthesis of 4-O- $\beta$ -N-acetylchitooligosyl 2-acetamido-2,3-dideoxydideoxy-gluconolactone based on transformation of chitooligosaccharide and its suppressive effects against the furylfuramide-induced SOS response. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2012, 76, 1362-1366. (査読有)

[学会発表](計13件)

- 1) 安本佳成, 尾形慎, 田見祐一, 中馬康志, 碓氷泰市, 朴龍洙. ITC 滴定実験による LacNAc 含有糖鎖クラスターとデイゴマメレクチンの相互作用解析. 日本農芸化学会 (2014/3/27-30, 明治大学生田キャンパス (東京都)).
- 2) 平沢巽, 鈴木尊久, 岡田宏文, 尾形慎, 村田健臣, 碓氷泰市, 戸谷一英. *Trichoderma reesei* 由来の  $\beta$ -グルコシダーゼの基質特異性. 日本農芸化学会 (2014/3/27-30, 明治大学生田キャンパス (東京都)).
- 3) 尾形慎. 糖鎖および糖質の化学と応用. 福島化学工業懇話会 (2014/1/16, 福島工業高等専門学校 (福島県)).
- 4) Yoshinari Yasumoto, Makoto Ogata, Taichi Usui, Enoch Y. Park. Molecular design of the glycocluster inhibitor against N-acetyllactosamine-specific lectin ECA. 静岡健康・長寿学術フォーラム (2013/11/1, 静岡県コンベンションアーツセンター (静岡県)).
- 5) 吉田佐和子, 加藤竜也, 尾形慎, 碓氷泰市, 朴龍洙. カイコ発現系を用いたインフルエンザウイルスヘマグルチニンの発現. 日本生物工学会 (2013/9/18-20, 広島国際会議場 (広島県)).
- 6) 尾形慎, 杉山尚弘, 朴龍洙, 渡邊浩史, 柳瀬美千代, 鷹羽武史, 門川淳一, 鈴木哲朗, 碓氷泰市. 多糖ナノ粒子を構造基盤としたインフルエンザウイルス結合性糖鎖クラスター材料の機能設計. 日本農芸化学会 (2013/3/24-28, 東北大学川内キャンパス (宮城県)).
- 7) 杉山尚弘, 尾形慎, 渡邊浩史, 柳瀬美千代, 鷹羽武史, 碓氷泰市. シアリル LacNAc 含有球形多糖超分子の合成とインフルエンザウイルスとの結合能評価. 日本応用糖質科学会 (2012/9/19-21, 東京農工大学府中キャンパス (東京都)).
- 8) 柳瀬美千代, 尾形慎, 杉山尚弘, 渡邊浩史, 鷹羽武史, 門川淳一, 碓氷泰市. 非還元末端選択的修飾技術を基盤とするインフルエンザウイルス結合性多糖素材の開発. 第31回日本糖質学会年会 (2012/9/17-20, 鹿児島市民文化ホール (鹿児島県)).
- 9) Daichi Mori, Makoto Ogata, Enoch Y. Park, Taichi Usui. Synthesis of novel tetravalent ligands containing fucosyl-triose or pentaose for the analysis of carbohydrate-carbohydrate interactions. 15th International Biotechnology Symposium. (2012/9/16-21, Gaegu (Korea)).
- 10) 尾形慎, 矢野恵美, 梅村征一郎, 村田健臣, 朴龍洙, 小林夕香, 浅井知浩, 奥直人, 中村直樹, 松尾一郎, 碓氷泰市. レクチンとの架橋複合体形成能を有する四価シアロ型糖鎖配位体の機能設計. 第10

回若手のカフォーラム(2012/9/6,静岡県立大学(静岡県)).

- 11) 森大地, 尾形慎, 朴龍洙, 碓氷泰市. フコシル三糖及び五糖含有新規四価配位体の合成と機能解析に向けて. 第10回若手のカフォーラム(2012/9/6,静岡県立大学(静岡県)).
- 12) 田見祐一, 中馬康志, 尾形慎, 村田健臣, 碓氷泰市. LacNAc含有多価配糖体の合成とレクチンとの親和性評価. 第10回若手のカフォーラム(2012/9/6,静岡県立大学(静岡県)).
- 13) 尾形慎. 糖鎖を活用した機能性材料の開発. Bio tech 2012 ~ アカデミックフォーラム ~ (2012/4/25-27, 東京ビックサイト(東京都)).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/ogata-m/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾形 慎 (OGATA MAKOTO)  
福島工業高等専門学校・物質工学科・助教  
研究者番号: 10532666

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: