

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19111

研究課題名（和文）糖鎖の特異的な分子間相互作用と細胞のガン転移機構の分子論的解明

研究課題名（英文）Molecular Study of Specific Intermolecular Interactions of Sugar Chains and Metastasis Mechanism of Cancer Cell

研究代表者

野口 秀典（NOGUCHI, Hidenori）

国立研究開発法人物質・材料研究機構・エネルギー・環境材料研究拠点・グループリーダー

研究者番号：60374188

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、糖鎖とタンパク間相互作用を調べるため、モデル糖鎖表面を構築し、糖鎖とタンパク間の相互作用を分子レベルで追跡し構造を明らかにしようとするものである。まず始めにモデル糖鎖表面の構造と水との相互作用について調べ、糖鎖部位には2種類の水素結合性の異なる部位が存在することを示唆する結果が得られた。当初の目的である糖鎖とタンパク質の相互作用を調べ、構造の情報を得ようとしたが、糖鎖由来のシグナルを明確に捉えることができずはっきりしなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞表面の糖鎖の特異的認識能を理解することは、未だ不明な点が多く残されている細胞表面の糖鎖役割を理解するうえで重要である。細胞がガン転移すると細胞表面の糖鎖が変化し、悪性化が進むと、転移性の高いガン細胞では、正常時にはわずかしか発現していない巨大糖鎖の量が増えることが明らかとなってきた。生きた状態の細胞を観測し、細胞表面の糖鎖の分子認識過程を界面選択的な振動分光法の確立させることは、将来分子レベルで構造解析を可能とする。細胞のガン転移に対するメカニズムを細胞表面・界面の構造変化から明らかにしていくことは、生物分野のみならず医学の分野においても多いに有用で意義ある研究となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to investigate the interaction between sugar chains and proteins, we constructed a model sugar chain surface and trace the interaction between sugar chains and proteins at the molecular level to clarify the structure. First, we investigated the structure of the model sugar chain surface and its interaction with water, and obtained results suggesting that there are two types of hydrogen-bonding sites with different hydrogen bonding properties. We investigated the interaction between sugar chains and proteins, which was the original purpose, and tried to obtain structural information, but it was not clear because the signal derived from sugar chains could not be clearly detected.

研究分野：物理化学

キーワード：生体界面 糖鎖 赤外分光法

1. 研究開始当初の背景

生体反応の多くは、細胞膜表面などの界面での反応が重要な役割を果たしている。例えば、細胞表面に存在する糖鎖は、細胞間や細胞外基質との相互作用や細胞外との情報交換に深く関わっていることが近年明らかになってきている。この糖鎖は、細胞の接着や分化、ガン細胞の転移、感染症の感染など、細胞表面の糖鎖とタンパクとの結合が関係していると言われている。したがって、細胞の表面構造を調べ、糖鎖-タンパク間相互作用を調べることは、生命現象を理解する上で重要な課題である。

本研究は、表面・界面の分子構造に関する情報を取り出すことが可能な和周波発生(Sum Frequency Generation: SFG)分光法および全反射赤外(Attenuated Total Reflection Infrared : ATR-IR)分光法を用い、実細胞表面の糖鎖とタンパクとの間の特異的な分子間相互作用、および糖鎖-タンパク間相互作用におよぼす細胞表面の水の役割を調べ、依然として不明な点が多く残されている細胞表面の糖鎖の特異的認識能を分子レベルで明かにするものである。

特に、細胞表面の糖鎖と特異的に結合するレクチンは、細胞と細胞間の橋渡しや情報伝達を行うタンパクであり、この分子間総合作用を理解することは、細胞のガン転移のメカニズムを知る上でも重要である。

本研究の遂行によって、未だ不明な点が多く残されている、細胞表面の糖鎖の役割解明に対し新たな知見を提供できると考えている。

2. 研究の目的

細胞膜は細胞内外を単に隔てている静的な構造体ではなく、特異的なチャンネルによってイオンなどの低分子を透過させたり、受容体を介して細胞外からのシグナルを受け取る機能、細胞膜の一部を取り込んで細胞内に輸送する機能など、細胞にとって重要な機能を担っている。

この細胞膜には、脂質の中に埋め込まれたり、脂質自体に結合した状態のタンパク(膜タンパク)が存在し、さらにこの脂質や膜タンパクには多くの場合糖鎖が結合している。糖鎖とは糖が鎖状に連なったものでありタンパクや細胞の膜を構成している脂質の表面に結合しており、ヒゲが生えたような状態で存在しており、細胞同士の情報を受け渡しや、外部から侵入してきた細菌の感知など、アンテナのような役割を担っている。糖鎖は、細胞の接着や分化、ガン細胞の転移、感染症の感染など細胞表面の糖鎖とタンパクとの相互作用に関係していると言われており、生命現象の認識シグナルとして働いていることが明らかになってきた(図1)。したがって、タンパクや細胞がどのように糖鎖を認識しているかを明らかにすることが、生命現象の巧みな分子認識能力を知る上で重要である。このような細胞膜、膜タンパク等で起こる生命現象の本質を分子レベルで明らかにしていくには、単一細胞あるいは単一分子などを計測可能とする高い空間分解能を兼ね備えた顕微システムの導入が必須となる。

そこで、本研究では生体内の過程を分子レベルで追跡可能なその場計測システムを構築し、実細胞表面の糖鎖とタンパクとの間の特異的な分子間相互作用、および糖鎖-タンパク間相互作用におよぼす細胞表面の水の役割を調べ、依然として不明な点が多く残されている細胞表面の糖鎖の特異的認識能を分子レベルで明かにしようとするものである。本研究の遂行によって、未だ不明な点が多く残されている、細胞表面の糖鎖の役割解明に対し新たな知見を提供できると考えている。

3. 研究の方法

細胞膜モデル表面の構築

ポリフェノール配糖体であるルチンは糖鎖および親・疎水両用の接着機能の有するカテコール基を含んでいるため、特異的

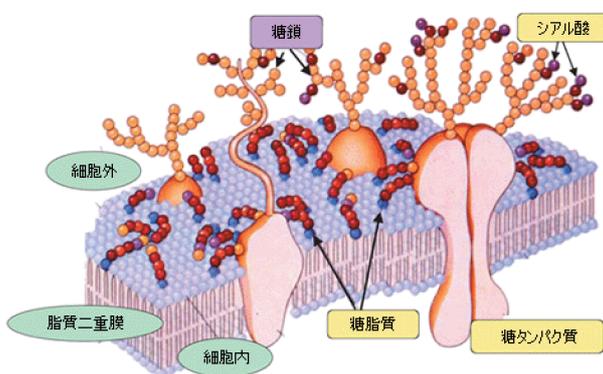


図1 細胞膜モデル図

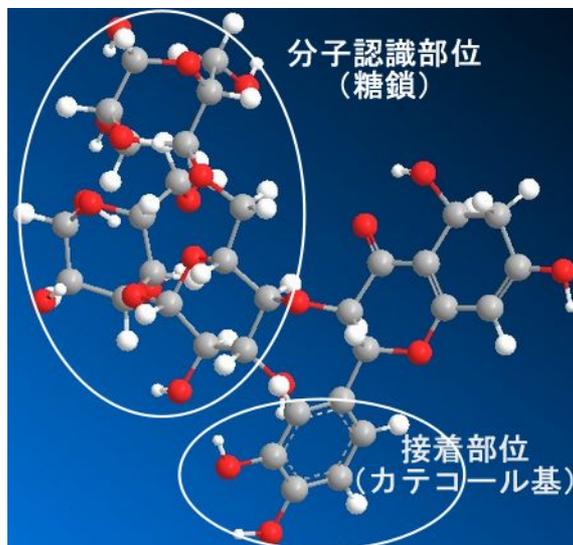


図2 グルコシル化ルチン

分子認識部位と接着部位を有する分子の一つである。従ってルチンを用いてモデル糖鎖表面の構築を行うことにした。しかし、ルチンは水に対する可溶性が低いいため、類似の α グルコシル化ルチンを用いることにした(図2)。 α グルコシル化ルチンをシリコン酸化膜表面(親水性表面)上に敵下することでルチン修飾シリコン表面の構築を行った。

その場計測システムを構築

表面・界面の分子構造に関する情報を取り出すことが可能な SFG 分光法および ATR-IR 分光法を用い、実細胞表面の糖鎖とタンパクとの間の特異的な分子間相互作用、および糖鎖-タンパク間相互作用におよぼす細胞表面の水の役割を調べようとするものである。

SFG 分光法は非線形光学効果に基づく分光法の1つであり、周波数 ω_1 と ω_2 の2つの光子から $\omega_3=\omega_1+\omega_2$ の1つの光子が発生する過程である。非線形光学過程であることから中心対称性の媒体中では起こらず、界面のみで起こり、例を固定波長の可視光とし、 ω_2 を波長可変の赤外光とすると、界面の準位と ω_2 が等しくなったときに SFG 強度は共鳴的に増加し、ピークを与える。つまり、SFG 分光法は界面敏感な振動分光法であり、バルクに圧倒的に多く存在する分子種の妨害無しに界面の有機分子や界面水の構造を測定可能であり、水環境下にある細胞膜表面・界面の構造・反応を分子レベルで理解する上で有効な手法となる。モデル糖鎖表面となる α グルコシル化ルチンを石英プリズム表面に構築し、重水と接触させ界面分子構造の追跡を行った。

ATR-IR 分光は、ATR プリズムに Si を用い、表面に Si 酸化膜を作成した後、 α グルコシル化ルチン水溶液と接触させることでモデル糖鎖表面の構築を行い界面分子構造の追跡を行った。

4. 研究成果

タンパクや細胞がどのように糖鎖を認識しているかを明らかにすることを目的に、モデル糖鎖表面の構築を試みた。図3(a)にグルコシル化ルチンで修飾した Si 表面を空気中で得られた ATR-IR スペクトルである。1654 cm^{-1} 、1605 cm^{-1} にグルコシル化ルチン由来の C=O 結合および C-O-C 結合に帰属されるピークが観測された。その他 1600 から 1200 cm^{-1} 領域にいくつかのピークが観測された。これらはグルコシル化ルチンのベンゼン環由来の振動に由来する。

実際の細胞は水環境下での観測が重要になることから、モデル糖鎖表面の測定を水中で行い、グルコシル化ルチンの構造変化を追跡した。重水中で測定した結果を図3(b)-(d)に示す。水中のスペクトルは 1600 cm^{-1} 付近にブロードなピークが観測されているが、これは多量のバルク重水の変角振動に由来する吸収によるものである。このブロードなバルク水の吸収のなかに 1640 cm^{-1} と 1590 cm^{-1} にピークが観測されている。これは、空気中のスペクトルで 1654 cm^{-1} と 1605 cm^{-1} に観測されていたピークが低波数シフトしたものであり、このことからルチン分子の周囲に水分子が水素結合を形成して配位していることが示唆された。

次に糖鎖と水分子の相互作用を調べるため、高波数領域の OH の伸縮振動領域の測定を行った。図4にモデル糖鎖表面を水分子と接触した後のスペクトルの時間変化を示す。3400 cm^{-1} と 3200 cm^{-1} に OH の伸縮振動に由来する吸収が確認される。 D_2O 中で測定を行っていることから、ここで観測されたピークは糖鎖部位 OH 伸縮振動に由来するものであると言える。

図4のスペクトルから 3400 cm^{-1} にピークを与える成分と 3200 cm^{-1} にピークを与える成分をフィッティングによって求めた積分強度を D_2O との接触時間に対してプロットした結果を図5に示す。

OH 伸縮振動のピーク位置は一般に水素結合の強さを反映したものを考えることが出来る。つまり糖鎖中の OH 基は周囲の D_2O と水素結合を形成し、2種類の異なった水素結合の強い OH (3200 cm^{-1}) と水

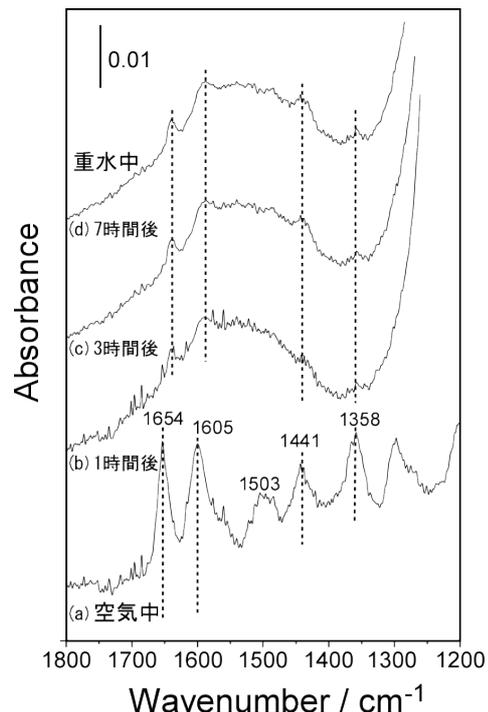


図3 グルコシル化ルチンで修飾した Si 表面の ATR-IR スペクトル (低波数領域)

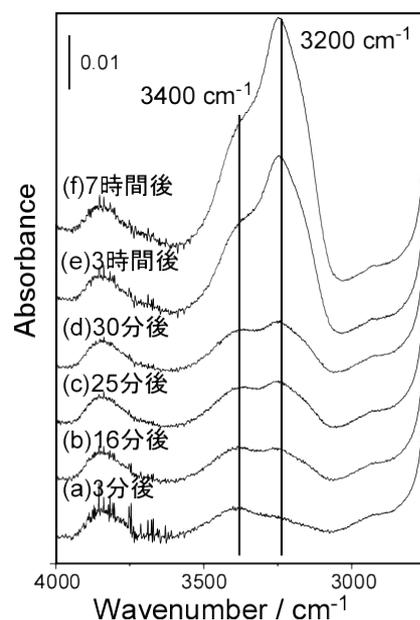


図4 グルコシル化ルチンで修飾した Si 表面の ATR-IR スペクトル (OH 伸縮振動)

素結語の弱いOH (3400 cm^{-1}) の2種類のOH基が存在することを意味している。これらの結果をふまえて、タンパク吸着におよぼす構造の変化を追跡する試みを行ってきたが、信号が弱いのと、観測されるピークが複雑すぎて構造の同定にはいたらなかった。

以上、本研究では、モデル糖鎖表面の構造と水との相互作用について調べた。糖鎖部位には2種類の水素結合性の異なる部位が存在することを示唆する結果が得られた。当初の目的であった糖鎖とタンパクとの相互作用を調べ、構造に関する情報を得ようと試みたが、糖鎖由来の信号を明確にとらえることが出来なかったため、どのような構造

で変化しているのかを明らかにすることが出来なかった。今後は、適切なモデル表面の構築を行うことが重要であり、引き続き糖鎖とタンパクとの相互作用を探る予定である。

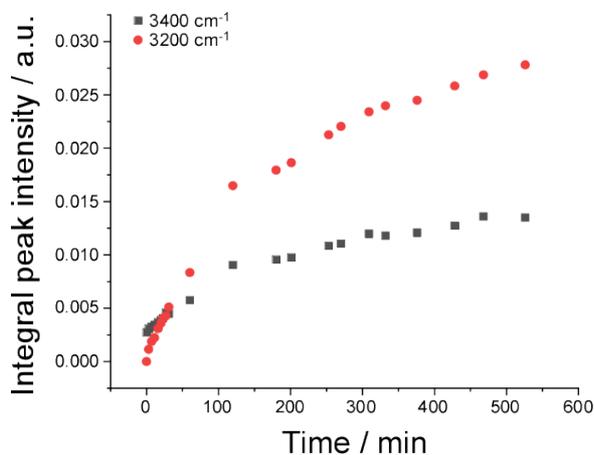


図5 モデル表面の糖鎖部位のOH伸縮振動ピーク強度の時間変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 野口秀典	4. 巻 37
2. 論文標題 固液界面の生体分子の構造・動的解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Society for Biomaterials	6. 最初と最後の頁 226-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 野口秀典	4. 巻 68
2. 論文標題 二重共鳴和周波発生分光法の電気化学測定系への適用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 分光研究	6. 最初と最後の頁 153-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Kentaro Tomita, Hidenori Noguchi, Kohei Uosaki	4. 巻 1
2. 論文標題 Effect of Water and HF on the Distribution of Discharge Products at Li-O2 Battery Cathode	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Applied Energy Materials	6. 最初と最後の頁 3434-3442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsaem.8b00584	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 該当する
1. 著者名 Ganesan Elumalai, Hidenori Noguchi, Hung Cuong Dinh, Kohei Uosaki	4. 巻 819
2. 論文標題 An efficient electrocatalyst for oxygen reduction to water - boron nitride nanosheets decorated with small gold nanoparticles (~ 5 nm) of narrow size distribution on gold substrate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Electroanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 107-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jelechem.2017.09.033	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 -

1. 著者名 Shuo Yang, Hidenori Noguchi, Kohei Uosaki	4. 巻 122
2. 論文標題 Electronic Structure of CO Adsorbed on Electrodeposited Pt Thin Layers on Polycrystalline Au Electrodes Probed by Potential-Dependent IR/Visible Double-Resonance Sum Frequency Generation Spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 8191-8201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.7b10703	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 -

1. 著者名 Huiwen Lin, Hidenori Noguchi, Kohei Uosaki	4. 巻 112
2. 論文標題 Application of windowless energy dispersive spectroscopy to determine Li distribution in Li-Si alloys	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Physics Letters	6. 最初と最後の頁 73903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5016211	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 -

1. 著者名 野口秀典	4. 巻 43
2. 論文標題 表面振動分光法による生体分子の構造解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Colloid & Interface Communication	6. 最初と最後の頁 28-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Feng Liu, Chao Ding, Yaohong Zhang, Teresa S. Ripolles, Taichi Kamisaka, Taro Toyoda, Shuzi Hayase, Takashi Minemoto, Kenji Yoshino, Songyuan Dai, Masatoshi Yanagida, Hidenori Noguchi, Qing Shen	4. 巻 139
2. 論文標題 Colloidal synthesis of air-stable alloyed CsSn _{1-x} Pb _x perovskite nanocrystals for use in solar Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 16708-16719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b08628	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 -

1. 著者名 Shuo Yang, Hidenori Noguchi, Kohei Uosaki	4. 巻 235
2. 論文標題 Broader energy distribution of CO adsorbed at polycrystalline Pt electrode in comparison with that at Pt(111) electrode in H2SO4 solution confirmed by potential dependent IR/visible double resonance sum frequency generation spectroscopy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Electrochim. Acta	6. 最初と最後の頁 280-286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.electacta.2017.03.113	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 -

1. 著者名 Hiroshi Hibino, Madoka Takai, Hidenori Noguchi, Seishiro Sawamura, Yasufumi Takahashi, Hideki Sakai, Hitoshi Shiku	4. 巻 67
2. 論文標題 An approach to the research on ion and water properties in the interphase between the plasma membrane and bulk extracellular solution	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Physiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 439-445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-017-0530-3	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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			