

機関番号：12608

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～ 2010

課題番号：20550150

研究課題名 (和文)

ナノ糖鎖の精密集積化を目指した糖鎖アレイの調製と分子間相互作用の解析

研究課題名 (英文)

Preparation of the glycol-arrays for aiming at the ordered and well-defined accumulation and the analyses of the interaction to proteins

研究代表者：森 俊明 (MORI TOSHIAKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：50262308

研究成果の概要 (和文)：

多様な分子構造・集合構造を持つ糖鎖を固体基板上に配向固定化し、糖鎖チップの創製と糖結合性タンパク質をはじめとする生体分子との相互作用について、網羅的にかつ迅速に評価することを目的とした。二次元表面内にタンパク質セグメントをマトリックスとして埋め込み、糖鎖の疎密を制御して構築することによって数種のレクチン、糖鎖結合性タンパク質の糖鎖集合構造への相互作用メカニズムを明らかにした。さらに基板上での酵素反応を用いることで糖鎖伸長過程を詳細に明らかにし、特に1分子計測による新たな知見が得られた。

研究成果の概要 (英文)：

In order to elucidate the multivalent interactions between carbohydrates and proteins, and to prepare the glycol arrays which immobilized onto the solid surface

We could succeed in arraying carbohydrate ligands on the surface with dispersion by utilizing the biotin-avidin interaction, and the kinetic analyses for protein binding could be performed with the QCM system.

Moreover, we have analyzed interaction forces between a verotoxin that is a substance responsible for o-157 and Gb3 sugar molecules on a cell surface. The rupture forces were obtained by changing loading rates and we can get an effective bond length which is an important parameter for an analysis of interaction mechanisms. We can have detected single-molecular interaction forces, and we will discuss about the interaction mechanism in more detail by an analysis of the forces.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：atomic force microscopy (AFM) / verotoxin / Gb3 sugar molecules / single molecular measurement / Quartz-crystal microbalance (QCM)

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの情報が明らかにされ生命科学の研究・開発のフェーズは、ポストゲノム研究としてプロテオミクスというタンパク質全体を大規模に対象とした機能と構造の解明および相互作用の解析へと移行してきている。また、タンパク質の約半数が翻訳後に糖鎖修飾を受けて本来の機能を発揮することが明らかにされつつある。糖鎖はタンパク質の安定性や局在性に関わっているのはもちろんのこと、細胞表面においては認識分子として機能することなど細胞の高次生命機能の発現に重要な役割を果たしている。しかしながら、糖の構造多様性のために分子レベルでの解明にはまだほど遠い。また、糖鎖を含む生体分子間の相互作用の際には、糖鎖には多数の水酸基が存在しているため、媒介分子である水分子が大きな役割を果たしているが、研究対象例がごく限られており、相互作用や分子認識の普遍的な理解が非常に困難である。糖鎖機能の解明のためには、網羅的な糖鎖ライブラリーの調製並びに相互作用の評価法が不可欠であり、第一段階としては、例えば酵素法による One-Pot 合成や糖鎖自動合成装置の開発のように、糖鎖を如何に自在に調製できるかが鍵になる。また、次の段階として解析の方法の簡便さと精密さを構築することである。

2. 研究の目的

生体分子の機能を解明するにあたって、例えば DNA チップ、タンパク質チップのような基板上に生体分子を固定することにより種々の分子間相互作用について検討する方法が多くとられている。核酸・タンパク質のように固相合成法が確立されている場合には比較的容易に調製可能であるが、糖鎖チップに関しては重要視されつつも技術的には困難であった。本申請では細胞膜表層に発現している多様な分子構造・集合構造を持つ糖鎖を固体基板上に糖鎖伸長酵素により効率的、厳密に配向固定化し、糖鎖チップの創製と糖結合性タンパク質をはじめとする生体分子との相互作用について、網羅的にかつ迅速に評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 二次元表面から水平方向へのナノスケール糖鎖集積化

1nm 間隔の 3 量体をとるヘマグルチニン、2-3 nm 間隔の 5 量体をとる志賀毒素から、15 量体をとるベロ毒素、15nm 程度の結合性部位を持つ血清レクチンなどのマトリックスタンパク質分子を利用するとさらに多価による結合が評価できる。これらの分子はいずれも 2-30 ナノメートルの

分子から成り立っているため、ナノスケール構造体のセグメントと成りうる。固定化する糖鎖は、酵素を用いた糖タンパク質転移反応により一段階で広範囲にわたる種類のものに適用した。糖鎖の固定化の評価は表面元素組成などのスペクトル解析や、水晶発振子マイクロバランスなどの重量測定により計測した。

(2) 二次元表面から垂直方向へのナノスケール糖鎖集積化

① 分子鎖長のそろった糖鎖固定化基板の調製

長さのそろった糖鎖ポリマーは糖転移酵素による糖鎖交互結合法にて種々のグリコサミノグリカンが調製できる。細胞表層上で細胞外マトリックスとして機能する多糖はほとんどホモポリマーではなく、その大部分が 2 種類のモノマーから成る交互共重合体である。具体的にはコンドロイチン (K4 抗原) ポリメラーゼ、ヒアルロン酸合成酵素など二基質認識性酵素を利用し、1 種類ずつのモノマーのみを交互に作用させて、逐次に重合する方法を確立した。

② 固定化糖鎖の生体分子間相互作用と伸長反応の解析

平成 20 年度までに確立した糖鎖アレイの調製法をもとにして、生理活性な糖鎖を二次元固体表面上に提示させ、酵素や糖結合性タンパク質との相互作用を解析する。具体的には原子間力顕微鏡 (AFM) によるフォースカーブの解析により、動力学的解析を行った。今回、特定の配列や密度に制御された糖鎖アレイとタンパク質との相互作用を調べることで新たな知見が得られた。

4. 研究成果

(1) 主にベロ毒素と分岐型 Gb3 糖鎖との相互作用解析において、糖鎖分岐度の効果、糖鎖密度の効果、糖鎖クラスター化度の効果を正確に詳細に調べることににより、ベロ毒素の相互作用メカニズムを動力学的に明らかにすることができた。特にクラスター化度の効果においてはベロ毒素の結合のしやすさよりも離れやすさが効いていることを初めて明らかにした。

また、1 分子レベルの解析を SPM フォースカーブ測定によって力学計測することで、相互作用メカニズムのさらなる新しい知見を得ることもできた。

(2) 表層上の酵素反応においては、力学計測法による糖鎖伸長反応を 1 分子レベルで観察解析できる手法を新たに開発した。また、AFM 観察により、反応の 1 分子計測も可能であることを示した。

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9件)

1. Takanori Nihira, Toshiaki Mori, Megumi Asakura, Yoshio Okahata
“Kinetic Studies of Dextranase Enzyme Reactions on a Substrate- or Enzyme-Immobilized 27 MHz Quartz Crystal Microbalance” *Langmuir*, **27**, 2107-2111 (2011). (査読有り)
 2. 森 俊明
アミンの合成と反応性-バイオ複合体への展開「生命理工系のための大学院基礎講座-有機化学」湯浅英哉編 東京工業大学出版社. 111-117, 171-172 (2011). (査読無し)
 3. Toshiaki Mori, Tatsuro Ohtsuka, Yoshio Okahata
“Kinetic Analyses of Bindings of Shiga-like Toxin to Clustered and Dispersed Gb3 Glyco-Arrays on a Quartz-Crystal Microbalance” *Langmuir*, **26**, 14118-14125 (2010). (査読有り)
 4. 岡畑 恵雄、森 俊明
“脂質修飾酵素の作成と非水溶媒中での利用” 「酵素利用技術大系」エヌティーエス、308-315(2010). (査読無し)
 5. Toshiaki Mori, Momoko Toyoda, Tatsuro Ohtsuka, Yoshio Okahata
“Kinetic analyses for bindings of concanavalin A to dispersed and condensed mannose surfaces on a quartz crystal microbalance” *Anal. Biochem.*, **395**, 211-216 (2009). (査読有り)
 6. 森 俊明
“糖鎖伸長酵素反応の高感度測定-細胞表層上のコンドロイチン多糖伸長酵素の反応解析” *化学と工業*, **62**, 990-991, (2009). (査読有り)
 7. 森 俊明
“非水溶媒中で酵素を利用する” バイオ研究のフロンティア「酵素・タンパク質をはかる・とらえる・利用する」工学図書、137-147(2009). (査読無し)
 8. Toshiaki Mori, Kanehira Imai, Mirei Hasegawa, Yoshio Okahata
“Nanometer-scale Surface Modification by Polymerization of Tetrafluoroethylene on Polymer Substrates in Supercritical Fluoroform” *J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.*, **46**, 1577-1585 (2008). (査読有り)
 9. 森 俊明
酸・塩基、反応性「バイオ系のための基礎化学問題集」三原久和他編 講談社 89-93, 157-158 (2008). (査読無し)
- [学会発表] (計41件)
1. 廣瀬敦、角田佳充、木全弘治、森 俊明、岡畑恵雄、高速AFMを用いた脂質膜上のヒアルロン酸合成酵素の反応解析、日本化学会第91春季年会 2011. 3. 26-29、神奈川大学、講演中止
 2. 森 俊明、露木由実、岡畑恵雄、AFM動的分子間力分光法によるペロ毒素とGb3糖鎖の相互作用解析、日本化学会第91春季年会 2011. 3. 26-29、神奈川大学、講演中止
 3. 露木由実、森 俊明、岡畑恵雄、ペロ毒素によるGb3 糖鎖混合脂質二分子膜の二次元平面上フォースカーブ測定、日本化学会第91春季年会、2011. 3. 26-29、神奈川大学、講演中止
 4. Toshiaki Mori, Megumi Asakura, Yoshio Okahata, “Direct monitoring of

- enzymatic carbohydrate elongations by atomic force microscopy as a single molecular level”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies : PACIFICHEM 2010, 2010.12.19, (Honolulu, HI, USA).
5. Toshiaki Mori, Takayuki Kodera, Nobuo Sugiura, Koji Kimata, Yoshio Okahata, “QCM measurements of carbohydrate elongations catalyzed by chondroitin polymerase”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies : PACIFICHEM 2010, 2010.12.18, (Honolulu, HI, USA).
 6. Takato Kusakabe, Akiko Murakawa, Nobuo Sugiura, Koji Kimata, Toshiaki Mori, Yoshio Okahata, “Effect of mutations on carbohydrate elongations catalyzed by Chondroitin Polymerase”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies: PACIFICHEM 2010, 2010.12.18, (Honolulu, HI, USA).
 7. Yumi Tsuyuki, Toshiaki Mori, Yoshio Okahata, “A single molecular force-curve measurement between verotoxin and Gb3 sugar molecules”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies : PACIFICHEM 2010, 2010.12.17, (Honolulu, HI, USA).
 8. 大塚雅徳、森 俊明、岡畑恵雄、”高速原子間力顕微鏡を用いたコンドロイチンポリメラーゼの1分子酵素反応の観察”、第4回バイオ関連化学シンポジウム 2010.9.25 (大阪大学)。
 9. 日下部峻斗、村川明子、杉浦信夫、木全弘治、森 俊明、岡畑恵雄、”点変異型 K4CPによる糖鎖重合反応”、第4回バイオ関連化学シンポジウム 2010.9.25 (大阪大学)。
 10. 森 俊明、飯田匡章、岡畑恵雄、”コンドロイチンポリメラーゼによる糖鎖伸長反応の解析”、第59回高分子討論会 2010.9.16 (北海道大学)。
 11. 露木由実、森 俊明、岡畑恵雄、”1分子フォースカーブ測定によるペロ毒素-Gb3糖鎖相互作用力の解析”、第59回高分子討論会 2010.9.16 (北海道大学)。
 12. 森 俊明、浅倉 恵、岡畑恵雄、”1分子フォースカーブ測定によるデキストランスクラーゼ糖鎖伸長反応の解析”、第59回高分子討論会 2010.9.16 (北海道大学)。
 13. Toshiaki Mori, “Direct monitoring of Carbohydrate Elongation by Chondroitin Polymerases using a Quartz-crystal Microbalance and High speed Atomic Force Microbalances”, Bio-engineering and Nano-engineering Symposium 2010. 2010.9.10-13 (Fudan University, Shanghai, China).
 14. 日下部峻斗、村川明子、杉浦信夫、木全弘治、森 俊明、岡畑恵雄、”点変異型コンドロイチンポリメラーゼによる糖鎖伸長反応”、第59回高分子学会年次大会 2010.5.26 (横浜国際会議場)
 15. 露木由実、森 俊明、岡畑恵雄、”フォースカーブ測定によるペロ毒素とGb3糖鎖の相互作用力の解析”、日本化学会第90春季年会, 2010.3.27 (近畿大学)。
 16. 浅倉 恵、森 俊明、岡畑恵雄、”フォースカーブ測定を用いたデキストランスクラーゼによる糖鎖伸長反応の動力学解析”、日本化学会第90春季年会,

2010. 3. 27 (近畿大学) .
17. 飯田匡章、森 俊明、岡畑恵雄、” 高速原子間力顕微鏡を用いたコンドロイチンポリメラーゼK4CPの一分子酵素反応の観察” , 日本化学会第90春季年会, 2010. 3. 27 (近畿大学) .
 18. Toshiaki Mori, “Direct Monitoring of Carbohydrate Elongations by a Quartz-Crystal Microbalance and Atomic Force Microscopy” , Advanced Polymeric Material and Technology Symposium 2010. 2010. 1. 26 (Jeju, Korea)
 19. 森 俊明、” 細胞表層上のナノ糖鎖の精密集積化と生体分子間相互作用” , 日本接着学会講演会 2009, 2009. 11. 13 (東北大多元研)
 20. 浅倉 恵、森 俊明、岡畑恵雄、” SPMフォースカーブ測定によるデキストラランスクラーゼ糖鎖伸長反応の一分子計測” , 第58回高分子討論会, 2009. 9. 17, (熊本大) .
 21. 秋山裕也、森 俊明、岡畑恵雄、” SPMフォースカーブ測定によるベロ毒素のGb3 糖鎖集合構造への一分子相互作用解析” 第 58 回 高 分 子 討 論 会 , 2009. 9. 17, (熊本大) .
 22. 森 俊明、小寺貴之、岡畑恵雄、” コンドロイチンポリメラーゼによる一糖交互伸長反応の解析” , 生体機能関連化学シンポジウム2009. 9. 13-15 (九州大医学部) .
 23. Toshiaki Mori, “Direct Monitoring of Carbohydrate Elongation by a Scanning Probe Microscopy” Symposium for Eco-environmental and Biological Technology, 2009. 8. 5 (Beijing, China).
 24. 森 俊明、浅倉 恵、岡畑恵雄、” SPMフォースカーブ測定による糖鎖伸長酵素反応の解析” , バイオ高分子シンポジウム, 2009. 7. 29 (東大駒場).
 25. 浅倉 恵、森 俊明、岡畑恵雄、” AFMフォースカーブ測定を用いたデキストラランスクラーゼによる糖鎖伸長反応の解析” , 日本化学会春季年会 2009. 3. 28 (日大理工) .
 26. 小寺貴之、森 俊明、岡畑恵雄、コンドロイチンポリメラーゼの交互糖転移反応の解析, 日本化学会春季年会 2009. 3. 28 (日大理工) .
 27. Megumi Asakura, Toshiaki Mori, Yoshio Okahata, “Analysis of glycosylations catalyzed by dextran sucrase using an AFM” , 1st International Symposium on Biotechnology, Bioengineering and Biomedical Science 2009. 3. 21 (Tsinghua University, Beijing, China).
 28. Toshiaki Mori, “Direct Monitoring of Carbohydrate Elongation by a Quartz-crystal Microbalance and an Atomic Force Microscopy” , Chine-Japan Bio-forum Regenerative Medicine and Related Technology 2009, 2009. 3. 18, (Shanghai, China).
 29. 森 俊明、秋山裕也、岡畑恵雄、” AFMフォースカーブ測定を用いたデキストラランスクラーゼによる糖鎖伸長反応の観察” , 日本生化学会, 2008. 12. 11 (神戸国際会議場).
 30. 森 俊明、黒田 大介、岡畑 恵雄、” AFMフォースカーブ測定による糖鎖伸長反応の観察” , 第 57 回高分子討論会、2008. 9. 26, (大阪市立大).

31. 小寺貴之、杉浦信夫、木全弘治、森 俊明、岡畑恵雄、” 水晶発振子上でのコンドロイチン伸長酵素反応の動力学的解析” , 第 57 回高分子討論会、2008. 9. 26, (大阪市立大).
32. 森 俊明、大塚達郎、岡畑恵雄、” ペロ毒素の認識性に及ぼす糖鎖固定化密度及びクラスター化度の効果” , 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2008. 9. 18, (東工大).
33. 森 俊明、大塚達郎、岡畑恵雄、” ペロ毒素の認識性に及ぼす基板表面上での糖鎖密度の効果” , 第 18 回バイオ高分子シンポジウム, 2008. 7. 25, (上智大).
34. 黒田大介、森 俊明、岡畑恵雄、” AFM を用いたデキストランスクラーゼによる糖鎖伸長反応の検出” , 第 57 回高分子学会年次大会 2008. 5. 28 (横浜国際会議場) .

[その他]

ホームページ等

http://www.okahata-lab.bio.titech.ac.jp/Okahata_Mori_Lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 俊明 (MORI TOSHIAKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号 : 50262308