

機関番号：63903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21850029

研究課題名（和文）オリゴ糖鎖ナノクラスターの精密構築と生体分子認識機構の解明

研究課題名（英文）Study of well-defined oligosaccharide clusters for understanding their biomolecular recognition mechanisms

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

研究成果の概要（和文）：細胞表面に集積化した糖鎖（糖鎖クラスター）を分子認識場として生じるタンパク質やペプチドなどとの相互作用は、一つ一つの糖鎖の機能の足し合わせとは異なる、クラスターならではの性質である。本研究では糖鎖クラスターの機能メカニズムを明らかにすることを旨とし、核磁気共鳴(NMR)法を活用した糖鎖クラスターの新規解析法を開発した。これにより、糖鎖クラスターの動的構造や機能を詳細に解明するための基盤を整えることができた。

研究成果の概要（英文）：Oligosaccharides form clusters on cell membranes and thereby play unique and vital roles in various cellular events through interactions with biomolecules. For the elucidation of the underlying mechanisms of the glycocluster functions, systematic methods by using NMR spectroscopy were developed. This line of study can be extended to detailed analyses of structures, dynamics, and interactions of the sugar clusters on membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	980,000	294,000	1,274,000
2010年度	860,000	258,000	1,118,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,840,000	552,000	2,392,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：高分子化学

キーワード：糖鎖、糖鎖集積、NMR、分子認識、ランタノイド

## 1. 研究開始当初の背景

細胞表面では複雑なオリゴ糖鎖が集積してマイクロドメインを形成し、タンパク質をはじめとする生体分子との特異な相互作用に参与している。例えば神経細胞表面に存在する糖脂質 GM1 のクラスターは、アルツハイマー病の発症に関わるアミロイドβペプチドと相互作用することで、不溶性アミロイド形成を促すことが見出されてきた。またガングリオシド集積ドメインにおける糖鎖間相

互作用は、細胞間の接着や神経信号伝達に重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。近年このような糖鎖クラスター特有の機能は強く認知されるようになったが、その機能がどのようなメカニズムに起因するのかを解明することは困難であり、分子レベルでの研究はほとんど行われていない。

この要因として、生体内で重要な役割を果たすオリゴ糖鎖の多くが複雑で多様な構造をしており、人工系においてそれらを精密な

クラスター構造へと集積化することが困難であることが挙げられる。例えばデンドリマーのように有機化学的手法による多段階の合成を要する系では、オリゴ糖鎖の化学合成・修飾が非常に煩雑なものであることが大きな問題点となってしまう。そのためモデル化合物としては、リポソームやミセルなどの無秩序な集合体を用いられてきた。このような既往の研究例では糖鎖集積体の性質を巨視的に調査するにとどまっておき、クラスター独自の機能メカニズムの詳細は明らかにされていない。特に、分子レベルでの機構解明に重要な NMR 法の適用が困難であることが、研究の進展を大きく阻んでいた。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖鎖の集積形体を自在に設計し、生体内で重要な役割を果たすオリゴ糖鎖クラスターをナノメートルサイズで精密構築することを考えた。これにより NMR 計測を中心とした精密な解析を可能とし、糖鎖クラスターが発現する、糖鎖間や各種生体分子との相互作用など特異な分子認識機能に関して詳細に解析し、そのメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

オリゴ糖鎖クラスターの生物機能の分子科学的基盤に関する理解を深めるためには、立体構造に関する精密な情報を収集することが不可欠である。しかしながら、糖鎖は、化学構造が不均一であることに加えて内部運動の自由度が大きいため、これまで分子科学的なアプローチを行うことが困難であった。本研究ではこの問題の解決に向け、常磁性タグによる化学修飾と、小型バイセルを用いた糖鎖集積を活用し、糖鎖およびそのクラスターの NMR 解析を行った。

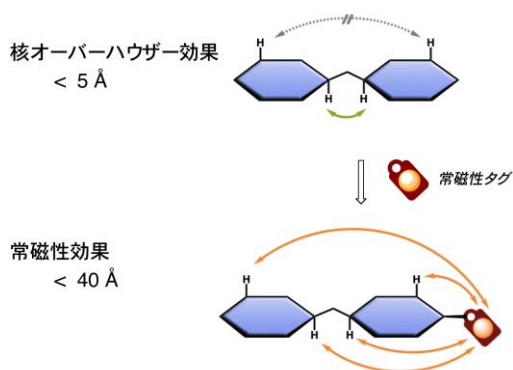


図 1. 常磁性タグの応用

タンパク質の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 NMR による立体構造解析法が確立されている。一方プロトン密度の低い糖鎖では、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、これに基づいて立体構造解析を行うことは容易ではない。そこで新たにランタノイドイオンを利用した常磁性プローブを糖鎖の還元末端へ導入し、常磁性 NMR による解析を試みた (図 1)。

また、糖脂質ガングリオシドを集積した小型バイセルを構築した。糖鎖クラスターの NMR 解析を行うためには、効果的に機能を発現する集積形態と、NMR 解析に適したナノサイズを両立する必要がある。そこで、ディスク状の二重膜構造を有し、かつサイズ制御が可能なバイセルに着目した。神経細胞膜上に多く存在する糖脂質ガングリオシドをバイセルの構成分子として組み込み、詳細な NMR 解析を実施した (図 2)。

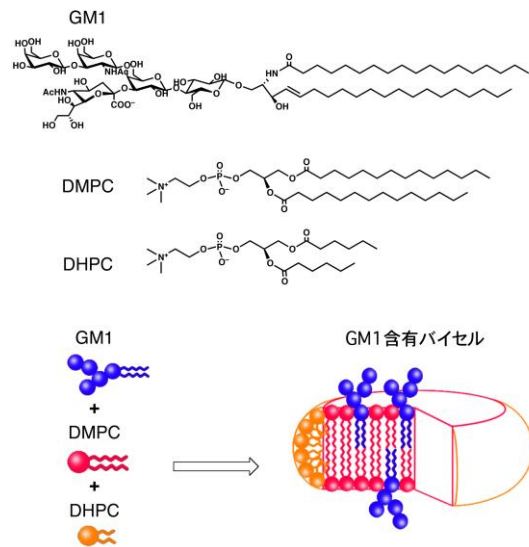


図 2. GM1 含有バイセルの調製

## 4. 研究成果

常磁性 NMR を利用した糖鎖の新規立体構造解析法を開発した。また、バイセルを応用することで糖鎖クラスターの NMR 解析を可能にした。これにより、糖鎖および糖鎖クラスターの動的構造や機能を詳細に解明するための基盤を整えることができた。

### (1) 糖鎖の立体構造解析への常磁性 NMR の応用

タンパク質を修飾する N 型糖鎖のコア構造であるジアセチルキトビオース (GlcNAc  $\beta$  1-4GlcNAc) の還元末端を選択的にアミノ化し、そこへ新規に合成した EDTA 誘導体を連結した。こうして得た試料へ常磁性金属を添加することで、常磁性ランタノイドを効率的に所

定の位置へ導入することができた (図3)。錯形成の前後で  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC 測定を行った結果、擬コンタクトシフト (PCS) による NMR スペクトルの変化を定量的に観測することに成功した。そこで、分子動力学計算により求めたジアセチルキトビオースの安定構造を基に PCS の実験値と計算値を比較したところ、両者は非常に良い一致を示した。この結果、ランタノイドイオンによる常磁性効果を応用することで、水溶液中中の糖鎖の立体構造情報を新たに取得できることを明らかにした。

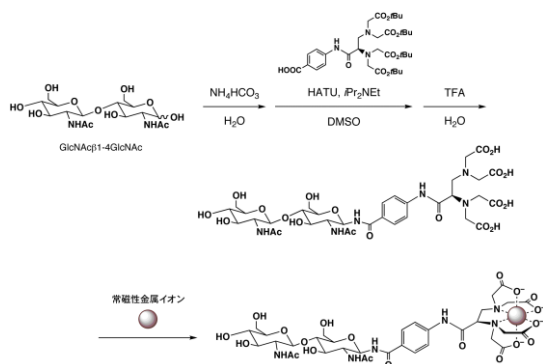


図3. ジアセチルキトビオースへの常磁性プローブの導入

## (2) バイセルを用いた糖鎖クラスターの NMR 解析

神経細胞膜上に存在する糖脂質であるガングリオシド GM1、GM2、および GM3 を組込んだ小型バイセルを調製した。最適化した条件のもと、ガングリオシドとリン脂質 DMPC 及び DHPC を混合することで試料を調製し、各種 NMR 測定によってガングリオシドがバイセルに組み込まれていることを確認した。また構成成分の混合比率を変化させることで、糖脂質含有バイセルのサイズを制御することに成功した。これらのガングリオシドはいずれも単独では水中で巨大なミセルを形成するため、シグナルが広幅化により消失してしまい、通常は NMR による観測は困難である。そこでバイセルへ含有させることでサイズの制御を可能とし、糖鎖クラスター由来の NMR シグナルを明瞭に観測することに成功した。さらに各種高分解能二次元 NMR 計測を駆使し、各ガングリオシドのスペクトル帰属を達成した (図4)。また GM1 クラスターと特異的に結合し凝集することが知られているアミロイド  $\beta$  との相互作用を調べた結果、GM1 を含有したバイセルが顕著にアミロイド  $\beta$  の凝集を誘起することが判明した。これらのことから、糖脂質含有バイセルが糖鎖クラスターの NMR 解析に有用であることを示すことができた。

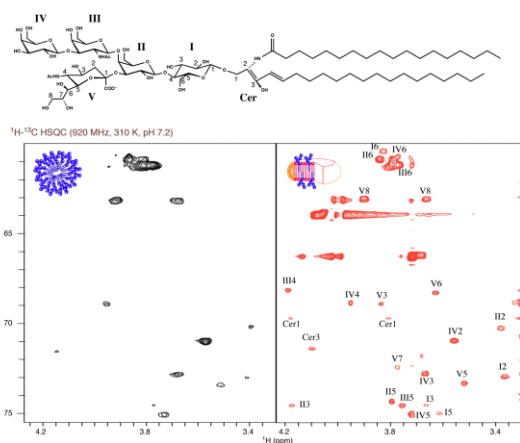


図4. GM1 ミセル (左) および GM1 含有バイセルの NMR スペクトル

## 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1件)

① 山本さよこ、山口拓実、Máté Erdélyi、Christian Griesinger、加藤 晃一、Paramagnetic lanthanide tagging for NMR conformational analyses of *N*-linked oligosaccharides、Chemistry -A European Journal、査読有、2011、in press

[学会発表] (計7件)

① 山口拓実、NMR による糖鎖の立体構造解析のための新規手法の開発、岡崎統合バイオサイエンスセンター10周年記念シンポジウム、2011年2月10日、岡崎コンファレンスセンター (愛知県)

② 山口拓実、NMR conformational analysis of *N*-linked oligosaccharides by paramagnetic tagging、98<sup>th</sup> Indian Science Congress、2011年1月5日、SRM University (インド)

③ 山口拓実、NMR spectroscopic approaches to the conformational characterization of *N*-linked oligosaccharides by introducing paramagnetic tags、The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010)、2010年12月16日、ハワイコンベンションセンター (アメリカ)

④ 山口拓実、Paramagnetic-tagging approach for NMR characterization of *N*-linked oligosaccharides、2<sup>nd</sup> Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG) conference、2010年10月27日、Academia Sinica (台湾)

⑤ 山口拓実、糖鎖の NMR 構造解析のための新

規手法の開発、2009年度 生物物理学会中部  
支部講演会、2010年3月29日、岡崎コ  
ンファレンスセンター（愛知県）

⑥ 山口拓実、Development of NMR methods for  
structural analyses of oligosaccharides  
by using paramagnetic tags、The 4th Winter  
School of JSPS Asian CORE Program for  
Frontiers of Materials, Photo-, and  
Theoretical Molecular Sciences、2009  
年12月14日、ソウル国立大学（韓国）

⑦ 山口拓実、Development of NMR  
conformational analysis methods for  
oligosaccharides by using paramagnetic  
metal ions、SOKENDAI Asian Winter School  
2009、2009年12月2日、岡崎コンファ  
レンスセンター（愛知県）

## 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