

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 2日現在

機関番号：12501  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590001  
 研究課題名（和文） 核磁気共鳴法および質量分析法による糖鎖の構造解析とダイナミクス  
 研究課題名（英文） Structural analysis and dynamics of oligosaccharides by NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry  
 研究代表者  
 関 宏子（SEKI HIROKO）  
 千葉大学・分析センター・特任准教授  
 研究者番号：60114245

研究成果の概要（和文）：オリゴ糖の構造解析手段としてNMRは感度が悪い欠点があるが、溶液中での立体構造が解析できる大きなメリットがある。NMRスペクトルで、シグナルが重なり解析が困難な、ハイマンノース型の合成したモデル化合物（マンノース5残基）を用いて、新規に開発した測定法や種々の手法を駆使して初めて $^1\text{H}$ と $^{13}\text{C}$ の完全解析に成功した。本測定法が、複雑な糖鎖構造を持つ微量化合物を比較的短時間で解析できる有用性とさらなる利用範囲の拡大が期待できることを示した。

研究成果の概要（英文）：NMR spectroscopy is a very important and method for the structural analysis of oligosaccharides, despite its low sensitivity. The NMR spectra of the model compound (mannose pentasaccharide) are very complex and difficult to analyze owing the overlapping signals. We successfully assigned all its  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  signals of model compound. Our proposed methods are potentially useful for obtaining such information when both time and the amount of sample are limited.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：核磁気共鳴・質量分析・糖鎖構造・ $^{31}\text{P}$ -NMR・ダイナミクス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 機能と構造は密接に関係しているので、機能を発現する構造を研究することは重要である。糖蛋白質、糖脂質、配糖体の糖部分の構造は生理活性の発現において重要であるが近年増々重要性が高まってきている。糖鎖化合物は結晶化し難くX線解析ができないことが多い。糖鎖を新しいマーカー分子と

する研究が感度の良いMSや蛍光を中心に行われている。しかしながら、構造ダイナミクスの研究はMSよりも、むしろNMRの得意分野であり、我々はすでにイオン液体における構造ダイナミクスの研究で多くの成果を得ている。

(2) 多糖類の構造は、構造変化やNMRに

おけるシグナルの重なりなどから、解析が非常に複雑なため、新しい NMR による解析法の確立が望まれている。すでに我々は、新規酵素より生成した配糖体での NMR 解析法を確立した [Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 2285-2293 (2008)]。くらげから単離したムチンについて NMR による立体構造解析 [J. Nat. Prod., **72**, 818-823 (2009)] や糖鎖の分解物を MS と  $^{31}\text{P}$ -NMR を用いた解析を行った [Carbohydr. Res., **344**, 2182(2009)]。

## 2. 研究の目的

(1) 近年ポストゲノム時代の要請に応じて、糖鎖の機能を解明し、それらをマーカー分子として診断技術や治療法に展開する新たな研究がはじまっている。また蛋白質全体の約半分は糖蛋白質と言われており、糖脂質を含めた糖鎖の機能と構造研究の必要性も高まっている。そこで、液体と固体の双方に利用可能な NMR 法と超高精度多段階 MS/MS 法の結果を相補的に用いた、安定同位体ラベルが困難な糖鎖化合物を天然存在比で糖鎖構造と立体配座の解析手法の確立を目指すことにした。

(2) 迅速かつ高感度で複雑な糖鎖構造解析するために、感度の良い超高精度質量分析装置 (リニアードイオントラップ電場型 FT-MS ハイブリッド LC/MS<sup>n</sup>) を用いて、まず NMR ですでに分かっている糖鎖化合物で、基本的な測定条件の検討を行い、解析手法の確立を目指すことにした。

## 3. 研究の方法

(1) 分析センター所有の JNM ECA600 NMR 装置を用いて、合成したマンノース 5 残基から成るモデル糖鎖について、 $^1\text{H}$ -NMR の重なっているために判別が困難なシグナルを開発した手法と従来の測定法を駆使して立体構造の解析、および温度可変測定により、構造ダイナミクスの研究を行う。

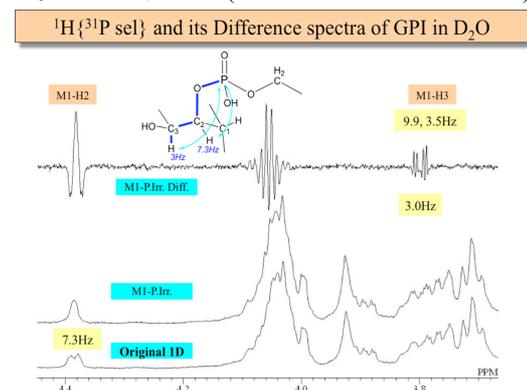
(2) Phosphate または Phosphonate が結合したモデル糖とくらげムチンの  $^{31}\text{P}$  とのスピンの結合定数を決定する手法について検討。立体構造を調べるために、 $^{31}\text{P}$  を選択的にデカップリングして、 $^{31}\text{P}$  と結合している部位のみを  $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  で観測する手法を検討。

(3) 多段階 MS<sup>n</sup> が可能な超高精度質量分析装置で、クニウムチンをはじめ複雑に結合している糖蛋白質の構造解析に有効な測定条件や測定手段を検討。

## 4. 研究成果

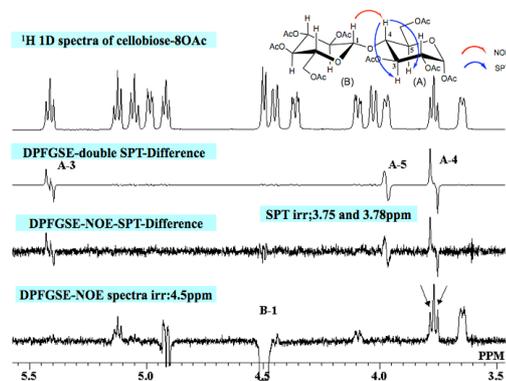
(1) 糖鎖を含む生体化合物にはリン酸化されているものが多いが、 $^{31}\text{P}$ -NMR に関する詳

細な解析は少なく、立体構造を含めた解析例はほとんど無い。Phosphate または Phosphonate が結合したモデル糖とくらげムチンのリンとのスピン結合定数を決定する手法について検討した。糖鎖のシグナルは、化学結合に差が無くかつ複雑に重なりあっている。そこで、 $^{31}\text{P}$  を選択的にデカップリングし、オリジナルとの差をとり、重なり合ったスペクトルの中から  $^{31}\text{P}$  と結合した部位のみを  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  で観測する手法を確立した。さらに、NOE (Nuclear Overhauser Effect) /



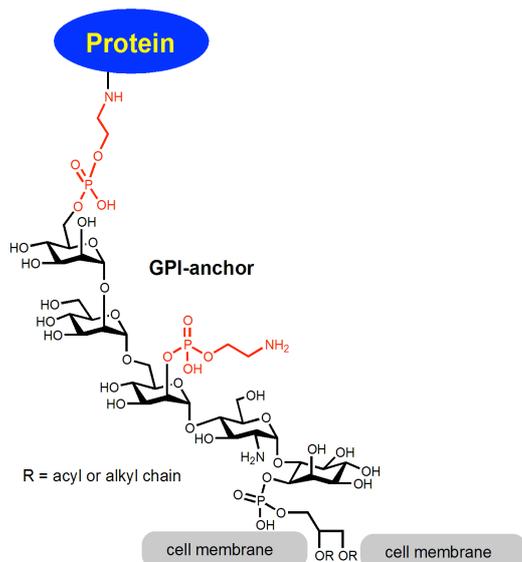
ROE (Rotating frame Overhauser Effect) 法で得られた情報を SPT (Selective Population Transfer) で展開し、込み合ったスペクトルの中から糖の結合情報や配座情報を得ることを検討した結果、 $\beta$  結合型 Gal および GalNAc について好結果を得た。

$\alpha$  結合型に関してはさらに検討中である。これらの手法からより正確な帰属情報が得ら



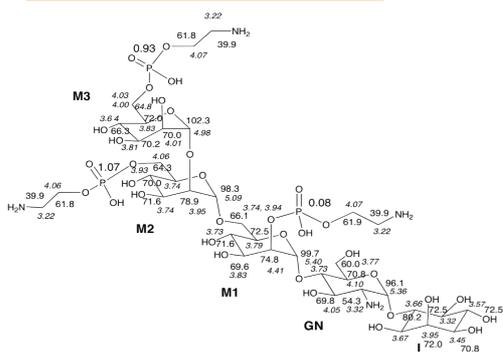
れ、くらげムチンとモデル糖鎖だけでなくその他の糖鎖化合物にも広く応用できると期待している。

(2) 哺乳動物における約 150 種類の蛋白質が GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) アンカーを介して細胞と結合し、生体制御、細胞間の情報伝達、ウイルスの受容体としての機能をもっている。これらの機能と構造関係を解明する一つの手段として、イノシトール、グルコサミン、マンノースの 3 個にホスファティディルエタノールアミンが結合したモデル化合物を共同研究者が合成した。



この化合物で NMR の解析を始めたが、通常の DQF-COSY、HSQC、TOCSY 法などでは約半分のシグナルしか帰属できなかった。SPT 法は照射強度が弱く、最も選択制が優れた測定法であるが、これを新たに開発した DPGSE-Double-SPT 法など次元 NMR の測定法を使って、短時間で全て帰属した。さらに、 $^1\text{H}\{^3\text{P selective}\}$  差スペクトルによって、M1 に結合した  $^3\text{P}$  と M1-H-2 の間に 7.3Hz、同じく H-3 との間に 3Hz のスピン結合定数が観測された。これは 4 ボンドのスピン結合定数としては大きい値であり、 $^3\text{P}$  と H-3 が W 字則の関係にあることが示唆され、この部分の立体構造がかなり絞り込めた。この結果と ROE の結果と併せて立体構造についても貴重な知見を得た。

#### $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^3\text{P}$ chemical shifts



(3) 生体内の糖タンパク質は NMR で必要な量を手入れするのが困難である場合が多く、より高感度な測定法である MS による解析が試みられているが、糖鎖構造の迅速で高感度な解析手法はまだ確立されていない。そこで、糖鎖や糖タンパク質の構造解析手法を確立するための前段階として、NMR で構造決定されたオリゴ糖について MS による解析を行い、マススペクトルパターンと糖構造との関連について検討を行った。その結果、結合位

置の異なるオリゴ糖の MS<sup>n</sup> スペクトルパターンに有意差が認められた。

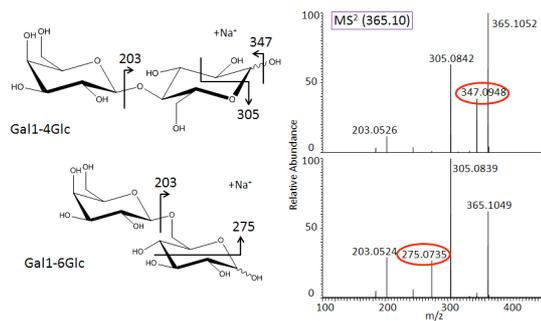


図 Gal1-4Glc(上)と Gal1-6Glc(下)の MS<sup>2</sup> スペクトル

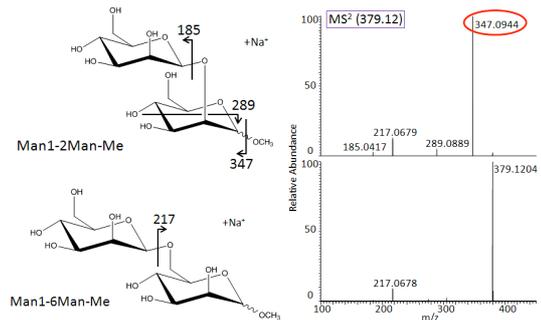
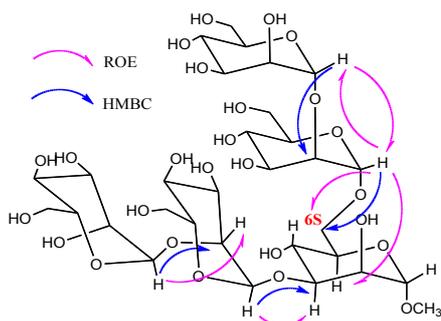


図 Man1-2Man-Me(上)と Man1-6Man-Me(下)の MS<sup>2</sup> スペクトル

(4) N-glycan 型 (アスパラギン型) 糖鎖は、機能面で注目されており、多くの報告がある。これらの糖鎖の特徴として、コア部分に 5 個のマンノースを持っていることが挙げられる。これらのハイマンノース型の解析は他の糖 (例えばグルコース型) に比べて難しい。他の糖でもアノメリックプロトン以外は、糖鎖プロトン ( $^1\text{H}$ ) のオーバーラップに苦しめられるのに、マンノースではさらに、1 位と 2 位のスピン結合定数が小さく、1 位からの TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) 測定で、2 位、最大でも 3 位までの関連しか得られない場合が多い。また、分子量が大きく、類似の構造を持つものの混合物においてはその解析はさらに困難を極める。アスパラギン型糖鎖の研究の際に合成したマンノース 5 残基から成るモデル糖鎖について測定及び解析を行った結果を報告した。各マンノース残基は結合の仕方によりケミカルシフト値に差が生じるが、同様の結合の場合はシフトの違いは僅かであり対応するシグナルが極めて接近している。今回、このように判別困難なオリゴ糖において、DPGSE (Double Pulsed Field Gradient Spin Echo) 法による次元 NMR を駆使した。中でも SPT (Selective Population Transfer) 法およびこれを組み合わせた測定法が有益であった。この実験で非常に近接している 3 個のマンノースの 2 位の H のケミカルシフト値とスピン結合定数を読み取ることができた。また、次元 ROE (Rotational Overhauser Effect) にスピンドカッ

プリングを組み合わせる測定法、同じく SPT を組み合わせて立体構造の解析を行った。従来までに研究されてきたマンノースでは、3糖まででそれ以上については、研究報告が無い。1-6 結合部分の配座割合は、20°C 付近では *gaush-gaush* が 70%、*gaush-trans* が 30% であったが、40°C 付近では *gaush-trans* の割合が増加することを確認した。この結果はとりもなおさず、糖鎖のダイナミクスを見ていることになり、今後の糖鎖の機能解析に役立つものと考えられる。NMR により詳細な構造解析を行なう場合、二次元法ばかりでなく、一次元法も適切に組み合わせて研究することが有益であることを確認した。



#### 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 6 件)

- ① Structural analyses of mannose pentasaccharide of high mannose type oligosaccharides by 1D and 2D NMR spectroscopy, Y. Kubota, H. Hori, R. Sawa, H. Seki and J. Uzawa, *Magn. Reson. Chem.*, 査読有, 50, 2012, 659-664  
DOI: 0.1002/mrc.3859
- ② NMR Study of Cation Dynamics in Three Crystalline States of 1-Butyl-3-methyl-imidazolium Hexafluorophosphate Exhibiting Crystal Polymorphism, T. Endo, H. Murata, M. Imanari, N. Mizushima, H. Seki and K. Nishikawa, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, 116, 2012, 3780-3788  
DOI: 10.1021/jp300636s
- ③ Ultraslow Dynamics at Crystallization of a Room-Temperature Ionic Liquid, 1-Butyl-3-methylimidazolium Bromide, M. Imanari, K. Fujii, T. Endo, H. Seki, K. Tozaki and K. Nishikawa, *J. Phys. Chem. B*, 116(13), 2012, 3991-3997  
DOI: 10.1021/jp300722j
- ④ S. Mizuno, H. Sakai, M. Saito, S. Kado, F. Sakane, Diacylglycerol kinase-dependent formation of phosphatidic acid molecular

species during interleukin-2 activation in CTLL-2 T-lymphocytes, *FEBS Open Bio*, 査読有, 2, 2012, 267-272

DOI: 10.1016/j.fob.2012.08.006

- ⑤ Degradation Index for Quality Evaluation of Commercial Dietary Supplements of Bilberry Extract, M. Yamamoto, K. Yamaura, M. Ishiwatari, M. Shimada, S. Kado, H. Seki, N. Shimada, K. Ueno, *Journal of Food Science*, 査読有, 78, 2013, 477-483

DOI: 10.1111/1750-3841.12043

- ⑥ NMR study on relationships between reorientational dynamics and phase behaviour of room-temperature ionic liquids: 1-alkyl-3-methylimidazolium cations; M. Imanari, K. Uchida, K. Miyano, H. Seki and K. Nishikawa, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 査読有, 12, 2010, 2959-2967

DOI: 10.1039/b922931k

[学会発表] (計 18 件)

- ① NMR による糖鎖の立体構造とダイナミクスの解析、鶴沢 洵、花島慎弥、関 宏子、山口芳樹、日本農芸化学会大会 2013 年度大会 (仙台)、2013 年 3 月 24 日~28 日
- ② マンノースオリゴ糖鎖の配座解析に有益な NMR 測定法、鶴沢 洵、関 宏子、山口芳樹、第 51 回 NMR 討論会 (名古屋) 2012 年 11 月 8 日~10 日
- ③ プロトン観測ヘテロ核相関一次元 NMR 法、鶴沢 洵、久保田由美子、関 宏子、山口芳樹、第 79 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会 第 89 回計測自動制御学会力学量計測部会 第 29 回合同シンポジウム (鳥取) 2012 年 6 月 7 日~9 日
- ④ NMR を用いた 1-Alkyl-3-methylimidazolium Bromide のアルキル鎖長差による運動性の研究、日高佑樹、今成 司、水島規子、西川恵子、関 宏子、第 79 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会 第 89 回計測自動制御学会力学量計測部会 第 29 回合同シンポジウム (鳥取) 2012 年 6 月 7 日~9 日
- ⑤ Di (2-ethylhexyl) dithiophosphate の酸化生成物の解析、吉田清香、阿部大典、関 宏子、藤永 薫、第 79 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会 第 89 回計測自動制御学会力学量計測部会 第 29 回合同シンポジウム (鳥取) 2012 年 6 月 7 日~2012 年 6 月 9 日
- ⑥ NMR Difference spectroscopy and its application to GPI glycan, J. Uzawa, S. Hanashima, Y. Kubota, H. Seki, Y. Yamaguchi, The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance

- 2011(Yokohama), November 18, 2011
- ⑦ 糖鎖解析に有益な NMR 測定法(Useful NMR measuring methods for analysis of oligosaccharides) NMR Difference Spectroscopy and its application to GPI glycan、鶴澤 洵、関 宏子、Glyco Tokyo 2011 シンポジウム (和光)、2011 年 12 月 9 日
- ⑧ 核磁気共鳴法および質量分析法による糖鎖の構造解析手法の検討、吉田清香、鶴澤 洵、榎飛雄真、関 宏子、日本分析化学会第 60 年会 (名古屋)、2011 年 9 月 16 日
- ⑨ 糖鎖解析に有益な NMR 測定法、鶴澤 洵、関 宏子、丑田公規、日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都)、2011 年 3 月 28 日
- ⑩ NMR を用いたイオン液体 1-butyl-3-methylimidazolium-hexafluorophosphate のダイナミクス、村田裕樹、遠藤太佳嗣、水島規子、今成 司、関 宏子、西川恵子、日本化学会第 91 春季年会 (横浜)、2011 年 3 月 28 日
- ⑪ NMR を用いたイオン液体 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate のダイナミクス、村田裕樹、遠藤太佳嗣、今成 司、関 宏子、西川恵子、日本大学生産工学部第 43 回 (平成 22 年度) 学術講演会 (千葉)、2010 年 12 月 4 日
- ⑫ 新しい NMR 差スペクトル法、鶴澤 洵、久保田由美子、堀 浩、関 宏子、丑田公規、第 49 回 NMR 討論会 (東京)、2010 年 11 月 15 日
- ⑬ 質量分析を用いた  $\alpha$ -Synuclein アミロイド形成機構の解析、吉田清香、下高原櫻子、城山祐樹、坂本 茂、上田健二、洪澤康一、田代 充、関 宏子、分析化学会第 59 年会 (仙台)、2010 年 9 月 17 日
- ⑭ NMR を用いた常温イオン液体 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate の結晶状態におけるダイナミクス、村田裕樹、遠藤太佳嗣、今成 司、関 宏子、西川恵子、第 4 回分子科学討論会 (大阪)、2010 年 9 月 17 日
- ⑮ イミダゾリウム系イオン液体の二位メチル基置換効果：回転ダイナミクスの観点から、遠藤太佳嗣、今成 司、関 宏子、西川恵子、第 4 回分子科学討論会 (大阪)、2010 年 9 月 17 日
- ⑯ Structural Analysis of Q-mucin and Related Phosphonate Saccharides Based on NMR Difference Spectroscopy with a  $^{31}\text{P}$  Decoupling Technique, J. Uzawa, H. Seki, K. Ushida, The 25<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium(Tokyo), August 5, 2010
- ⑰  $^1\text{H}$  NMR 分光法によるイミダゾール系イオン液体の相転移に伴うカチオンのダイ

ナミクス、関 宏子、今成 司、西川恵子、第 77 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会 第 83 回計測自動制御学会力学量計測部会第 27 回合同シンポジウム(京都)、2010 年 5 月 13 日

- ⑱ Spin-Lattice Relaxation Study of Reorientational Dynamics of Imidazolium-Based Ionic Liquids: Effect of Methylation at the 2-position of Imidazolium Ring, T. Endo, M. Imanari, H. Seki, K. Nishikawa, 51st EXPERIMENTAL NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE CONFERENCE, (California, USA) April 19-22, 2010

[その他]

ホームページ等

<http://www.cac.chiba-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関 宏子 (SEKI HIROKO)

千葉大学・分析センター・特任准教授

研究者番号：60114245

### (2) 研究分担者

吉田 清香 (YOSHIDA SAYAKA)

千葉大学・分析センター・技術職員

研究者番号：10568439