

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350078

研究課題名(和文)原子間力顕微鏡を用いた1分子計測による糖鎖構造および機能解析

研究課題名(英文)Analyses of enzymatic reaction about glycoconjugates using Atomic Force Microscopy in single molecule level

研究代表者

森 俊明(Mori, Toshiaki)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：50262308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖の関わる相互作用・酵素反応などの糖鎖機能解析をピコグラムオーダーで検出する技術を創出することを目的とし、AFMフォースカーブ測定および高速AFM観察により、マイカ基板に固定化された糖鎖をタンパクで修飾されたチップを用いて両者を接触解離させることで相互作用を力学的に測定し、糖鎖の結合のみならず糖鎖関連酵素について解析を達成できた。また、一分子の膜タンパク質酵素反応のリアルタイムモニタリングを適用し酵素反応の動力学的解析を行い、細胞膜上で起こる反応モニタリングを精密に計測できる技術を開発した。さらに直接糖鎖を観察することにより、相互作用解析および反応解析を行い、そのメカニズムを明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Atomic force microscopy (AFM) can detect forces as intermolecular interaction forces by force-curve measurements. For example, when a ligand is immobilized on a chip, and a receptor is immobilized on a plate, we can measure single-molecular interaction forces between two molecules. The distribution of glycolipid microdomain in biomembrane is difficult to observe in nanometer scale. We measured a distribution of glycolipid Gb3Ceramide (Gb3Cer) in lipid bilayer by AFM force mapping measurement using Verotoxin modified tip.

In this study, 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 detected single-molecular interaction forces, and we discussed about the interaction mechanism in more detail by an analysis of the forces.

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：原子間力顕微鏡 糖鎖 細胞膜 1分子計測 糖鎖関連酵素

1. 研究開始当初の背景

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、糖鎖は生体高分子の中でも DNA、タンパク質と異なり、分岐や結合に関わる異性体を含む複雑多岐にわたる分子であるから、解析の方法が難しく、分子レベルでの機能解明にはまだほど遠い。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。このような状況下でナショナルプロジェクトとして 2000 年以降をだけみても NEDO「糖鎖合成関連遺伝子ライブラリー構築プロジェクト」・「糖鎖構造解析技術開発プロジェクト」・「糖鎖機能活用技術開発プロジェクト」、JST-CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」、科研費特定領域「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」においていずれも機能解析、糖鎖合成法に関する研究が進展している。

例えば、糖鎖-糖鎖結合タンパク質間の相互作用解析をする上で ELISA やレクチンマイクロアレイで網羅的に解析する展開を図っているグループもある。研究代表者らも水晶発振子マイクロバランスにより、蛍光ラベルなどを施すことなく糖鎖関連酵素反応の高感度検出が可能であることを明らかにしており、上記の NEDO プロジェクトの中で 2004 年から 3 年間参加しながら、開発を行った。海外のグループにおいても例えば、糖鎖-タンパク質相互作用を介する糖鎖機能の解明が米国糖鎖機能研究コンソーシアムにおいて開発が進んできている。また、同じく米国において癌研究所(NCI)n においても糖鎖関連腫瘍マーカーの探索が先導的に遂行されている。これらのプロジェクトにおいて、相互作用を解析する上で最低でもナノグラムオーダーの試料が必要であり、大量に多様な種類の糖鎖を調製することが糖鎖機能を探る上ではもちろん不可欠であるが、少量の試料しか手に入らず、機能はもちろんのこと、構造を解析するのさえ困難な場合が多いという

問題点は多々残されているのが現状である。最近では 質量分析による構造の解析方法が進展しごく少量のピコグラムの試料で決定できる技術が確立されつつあるが、**相互作用・酵素反応などの糖鎖機能解析をピコグラムオーダーで検出する技術は皆無**であり、ごく少量での機能を調べる上では解析技術の向上すなわち解析アプローチを新たに創出することが非常に重要である。

以上のような背景から研究代表者は一分子計測による糖鎖機能の解明を目指すこととした。研究代表者は昨年度から JST-さきがけで「細胞膜表層上のナノ糖鎖の精密集積化の構築」というテーマで、細胞膜に発現している糖タンパク質糖鎖・糖脂質糖鎖・複合糖鎖の機能解明を目指している。その中で昨年度、原子間力顕微鏡(AFM)による解析で「**糖鎖を標識することなく一分子で観察**でき、糖鎖結合タンパク質との**相互作用を一分子レベルでリアルタイムに検出**すること」が実現できた。すなわち糖鎖をピコグラム用いるだけで糖鎖の機能を検出できることを明らかにした。

2. 研究の目的

研究代表者が独自に開発した、1 分子力学計測法による糖鎖伸長反応を利用して、膜タンパク質酵素の反応を 1 分子レベルで追跡することを目的とする。また、マイカ基板上にソフトに糖鎖高分子を固定化することにより、糖鎖末端からの酵素反応を 1 分子計測する。

3. 研究の方法

AFM フォースカーブ測定および高速 AFM 観察により、糖鎖-糖鎖結合タンパク質間の相互作用を調べることをまず主眼に置いた。これまで、これらの相互作用については網羅的な相互作用解析が提案され、数十種類のタンパク質について検討されている。しかしながら、糖鎖・タンパク質を大量に調製することが出来ないためその詳細を調べることはほとんどなされていない。また、糖鎖へのタンパク質の相互作用においてタンパク質は糖鎖の集合構造を認識していることが多く、メカニズムが明白なものは限られている。本研究では、1mm 四方のマイカ基板上に固定化された糖鎖をタンパクで修飾されたチップを用いて両者を接触解離させることでその相互作用を力学的に測定した。すなわち、ピコグラムオーダーで解析をするを行った。特に基板に固定す

る糖鎖をその粗密を制御して固定する技術を研究代表者は上述プロジェクトにより確立しているため、詳細な相互作用を解析することが可能であった。

次いで、糖鎖に結合するだけでなく、反応を触媒するタンパク質すなわち糖鎖関連酵素について解析を行う。昨年糖鎖伸長酵素をチップに固定した状態で、フォースカーブにより、その反応をリアルタイムに追跡できることを明らかにした。本研究では、一分子の膜タンパク質酵素反応のリアルタイムモニタリングを適用し、酵素反応の動力学的解析を行い、細胞膜上で起こる反応モニタリングを精密に計測できる技術の開発を目指した。

さらに高速 AFM 観察により、直接糖鎖を観察することにより、相互作用解析および反応解析を行い、そのメカニズムを明らかにした。これまで、AFM により水中で糖鎖を一分子の状態直接観察することは実現されておらず、相互作用をリアルタイムに観察した例はない。通常 AFM では百ナノメートル四方の領域で画像を取得するには少なくとも数十秒かかり、相互作用を直接観察することは不可能であった。さきがけ研究のなかで 1 秒間に 10 枚画像を取得出来る高速 AFM を用いて、基板に弱く吸着させただけの糖鎖を鮮明に観察することが出来、タンパク質の相互作用をサブ秒スケールでリアルタイムに観察できることを明らかに出来た。すなわち、ほんのピコグラム糖鎖を用いるだけで相互作用のみならず、反応も観察・解析出来ると期待された。

4. 研究成果

1 分子力学計測法による糖鎖伸長反応を利用して膜タンパク質酵素の反応を 1 分子レベルで追跡することを目的として、相互作用や酵素反応などの糖鎖機能解析をごく微量のピコグラムレベルで検出する技術を創出し、解析技術開発を目指した。

23年度はレクチンと糖鎖のとの相互作用解析を力学計測して1分子レベルでの結合

親和性を測定する系を確立した。

24年度は23年度までに確立した力学計

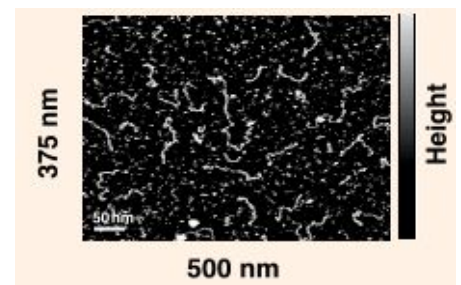
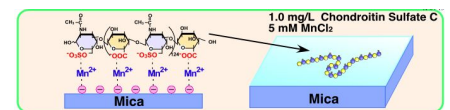
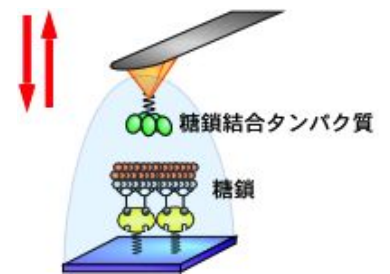
測法の妥当性を検討するために、1分子レベルで画像解析をするよう高速AFMによる計測法の開発を目指した。

具体的には細胞表層で働く酵素としてその可溶性成分が調製可能なコンドロイチン合成酵素について検討を行った。また、当該酵素は一つの酵素に2つの反応活性部位を持ち合わせ、互いに異なる反応を連続的に触媒して、交互共重合体を生成することが、

共同研究者らの結晶構造解析により明らかになっているが、本手法による反応機構のさらなる解明が可能になる。すなわち、糖鎖固定系と酵素

固定化系での反応を追跡比較することにより、詳細が明らかになる。コンドロイチンオリゴマーを加えることで、酵素とオリゴマーの結合を観察した後に、モノマー分子を添加することで反応開始を観察したところ、結合挙動は観察できたが伸長反応を観察することはできなかった。しかしながら、微生物由来ヒアルロン酸合成酵素を分子分散状態で固定化したマイカ基板に基質を添加するとヒアルロン酸が1分子レベルで伸長する様子が10秒の時間分解能にて追跡できることを見いだした。しかもその反応速度には多分散性のあることが初めて明らかとなった。

25年度は、24年度に実施達成した1分子イメージング法の定量評価をするために、23年度に確立した1分子力学計測法をグリコサミノグリカン糖鎖伸長反応および、キチ



ン分解酵素に対して適用したところ、詳細な反応メカニズムを明らかにすることができた。

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. *Toshiaki Mori, Atsushi Hirose, Tatsuya Hagiwara, Masanori Ohtsuka, Yoshimitsu Kakuta, Koji Kimata, and Yoshio Okahata, "Single-Molecular Enzymatic Elongation of Hyaluronan Polymers Visualized by High-Speed Atomic Force Microscopy" *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 20254-20257 (2013). (査読有)
2. Yoshio Okahata and *Toshiaki Mori, "Binding Kinetics of Lectins to Sugar Surfaces on a Quartz-Crystal Microbalance", *Methods in Molecular Biology, in press.* (査読有)
3. *Toshiaki Mori, Masayoshi Shibata, Takanori Nihira, Bunzo Mikami, and Yoshio Okahata, "Kinetic monitoring of site-directed mutational β -amylase catalysis on a 27-MHz QCM", *J. Mol. Cat. B: Enzyme*, **82**, 121-126 (2012). (査読有)
4. *Toshiaki Mori, Takayuki Koderu, Hiroshi Yoshimine, Yoshimitsu Kakuta, Nobuo Sugiura, Koji Kimata, and Yoshio Okahata, "Kinetics of Iterative Carbohydrate Transfer to Polysaccharide Catalyzed by Chondroitin Polymerase on a Highly Sensitive Flow-Type 27 MHz Quartz-Crystal Microbalance",

Chem. Eur. J., **18**, 7388-7393 (2012).
Highlight (Cover) (査読有)

5. *Toshiaki Mori, Megumi Asakura, and *Yoshio Okahata, "Single-Molecule Force Spectroscopy for Studying Kinetics of Enzymatic Dextran Elongations", *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 5701-5703 (2011). (査読有)
6. Takanori Nihira, *Toshiaki Mori, Megumi Asakura, and *Yoshio Okahata, "Kinetic Studies of Dextranucrase Enzyme Reactions on a Substrate or Enzyme-Immobilized 27 MHz Quartz Crystal Microbalance", *Langmuir*, **27**, 2107-2111 (2011). (査読有)
7. *Toshiaki Mori, Megumi Asakura, and *Yoshio Okahata, "Single-Molecule Force Spectroscopy for Kinetics of Enzymatic Elongation of glycoconjugate", *Glycoconjugate J.*, **28**, 292 (2011). (査読有)

[学会発表](計14件)

1. 第63回高分子討論会(2014/9/24-26, 長崎大学)
加藤早紀、中川裕子、森 俊明
種々のキチン分解酵素によるキチンへの結合・分解挙動のAFM1分子解析
2. 日本結合組織学会(2014/6/5-7, ウィンクあいち)
森 俊明
高速原子間力顕微鏡を用いたグリコサミノグリカン糖鎖伸長反応の1分子観察(招待講演)
3. 第63回高分子学会年次大会(2014/5/27-29, 名古屋国際会議場)

キチナーゼ修飾探針を用いたキチンフィルム
の酵素的ナノパターンニング法の開発
宍戸啓介、中川裕子、森 俊明

4. 第 63 回高分子学会年次大会
(2014/5/27-29, 名古屋国際会議場)

キチン分解酵素 ChiA, ChiB および ChiC の
キチンへの結合解離メカニズムの 1 分子解
析

加藤早紀、中川裕子、森 俊明

5. 日本化学会第 9 4 春季年会
(2014/3/27-30, 名古屋大学)

宍戸啓介、中川裕子、森 俊明

AFM フォースマッピングを用いた酵素的
キチン分解反応の加速効果の直接観察

6. 日本化学会第 9 4 春季年会
(2014/3/27-30, 名古屋大学)

田中利奈、森 俊明

AFM を用いた脂質二分子膜中の膜タンパ
ク質の動的挙動解析

7. 日本化学会第 9 4 春季年会
(2014/3/27-30, 名古屋大学)

加藤早紀、中川裕子、森 俊明

キチン分解酵素 ChiA, ChiB および ChiC の
キチンへの結合・分解挙動の 1 分子観察

8. 日本化学会第 9 4 春季年会
(2014/3/27-30, 名古屋大学)

小林真也、森 俊明

高速 AFM を用いた糖脂質膜上での糖転移
酵素反応の直接イメージング

9. 第 62 回高分子討論会(2013/9/11-13)

宍戸啓介、中川裕子、森 俊明

キチナーゼ修飾探針を用いた AFM フォース
マッピングによるキチンフィルムの
結合・分解挙動の観察

10. 第 62 回高分子討論会(2013/9/11-13,
金沢大学)

森 俊明、小泉翔平、露木由実

ベロ毒素修飾チップによる糖脂質ラフト界
面の分子マッピング

11. 高分子学会九州若手の会(2013/7/5, ア
ルモニーサンク小倉)

森 俊明

生体膜上のナノ糖鎖の生成に関する精密計
測

12. バイオ高分子シンポジウム 2013
(2013/7/31-8/1, 東工大)

森 俊明、小泉翔平、岡畑恵雄

ベロ毒素修飾チップによる Gb3Cer 含有脂
質膜のフォースマッピング観察

13. 第 62 回高分子学会年次大会
(2013/5/29-31、京都国際会議場)

森 俊明、小泉翔平、岡畑恵雄

ベロ毒素修飾探針を用いた AFM フォース
マッピングによる脂質膜中における Gb3
セラミドの分布観察

14. 第 62 回高分子学会年次大会
(2013/5/29-31、京都国際会議場)

宍戸啓介、森 俊明、岡畑恵雄

キチナーゼ修飾探針を用いた AFM フォー
スマッピングによるキチンフィルムへの結
合・解離挙動の直接観察

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 俊明 (Toshiaki MORI)

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