

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655098

研究課題名(和文)糖転移酵素1分子マニピュレーション法による細胞外マトリックス多糖の二次元精密構築

研究課題名(英文)two-dimensional construction of ECM-glycoconjugate chips using single molecule manipulation by glycosyltransferase attached with AFM tip

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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：グライコミクス研究としての糖鎖チップ調製法として、二次元面内方向にナノメートルスケールで自在に複合糖鎖を導入する革新的な手法を酵素反応の1分子力学モニタリングにより達成することを目的とし、二次元面内の各所で行い、細胞表層をモデル化する系の構築を検討した。24年度にはオリゴ糖伸長反応を力学計測で実際にモニタリングできるかどうかを検討して、反応が進むことを酵素基質間の相互作用力により検出できることが分かった。25年度には、グリコサミノグリカン糖鎖伸長反応、糖脂質糖鎖転移反応について検討を行った。その結果、反応が進むことを開発した力学計測法によっても検出できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to construct ECM-glycoconjugate chips, we employed the single molecule manipulation methods. First, we examine the preparation of AFM tips modified with glycosyltransferase. As a result, we could prepare the enzyme tips. And then, we performed the force-distance measurements with the enzyme tip to the substrates on the mica surface. We examined the interaction between enzymes and the corresponding substrates under several conditions. We confirm the detection of the procedures for the enzymatic reaction. And we could control the movement of the tip in the area with 50 nm width.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：1分子計測 糖転移反応 AFM フォースカーブ測定 糖鎖チップ

1. 研究開始当初の背景

細胞表層上の脂質分子、膜タンパク質分子の中には糖鎖が付加されている場合が多く、その糖鎖が相互作用、情報伝達に欠かせないものであることがリガンドレセプター間の各々の研究からも遺伝子レベルでの網羅的な研究からも重要視されている。また、細胞間を有機的につなげているいわゆる細胞外マトリックスという足場分子がネットワークを形成することで機能が達成されているが、これらを構成するのもグリコサミノグリカンという多糖分子が役割を担っている。これら細胞表層上にある糖鎖はそれぞれの分子が個々に作用しているのではなく、膜に対して水平方向にはナノスケールの集合構造(クラスター集積化)をとり、垂直方向には特定のナノスケールの分子鎖長や厚みをもって提示されはじめて機能を発現する場合が多い。しかしながら、分子レベルで糖鎖を並べたり、その粗密が議論できるほど理解は全く進んでいない。すなわちナノスケールでの糖鎖集積化が生命現象を理解するためのキーとなる。そこで本研究では糖鎖のナノ構造を構築することを研究のねらいとする。

ポストゲノム研究として糖鎖の網羅的解析として糖鎖チップ、糖鎖アレイなどが調製されているが、糖鎖研究の場合、その集合構造を考慮に入れた例は皆無である。二次元固体表面に糖鎖を導入するのは研究例として、阪大明石満教授ら数グループによって重合性糖鎖モノマーをグラフト重合により調製する方法、多糖ポリマーの片末端を固定する方法などが報告されている。この場合には糖鎖認識性のタンパク質などとの相互作用が調べられているが、基板に対して水平方向に糖鎖密度を制御したり、垂直方向にも長さの規定された糖鎖を調製することが困難である。また、気-水界面単分子膜を利用して糖鎖のクラスター集積化をした例も報告されているが、脂質分子の相分離挙動が生じるため、糖鎖密度

を精密に制御することは全くできていない。また、化学合成法により、糖鎖チップを調製する例も2002年以降カナダアルバータ大学 Hindsgaul ら、米国 Mrksich らによって精力的に行われているが、せいぜい3糖の長さの糖の例しか報告されておらず、精密に長さのそろったオリゴマー、ポリマーを合成するには反応性基の保護、糖鎖結合、官能基の脱保護を繰り返す必要があり複雑すぎて非常に困難である。これに対して、本研究では、研究代表者が開発した酵素反応を基板上的特定の位置において進行させることに成功した技術をもとにして、二次元面内で糖鎖を自在に配置させて固定できるチップすなわち、細胞モデルを構築する点で斬新である。

2. 研究の目的

グライコミクス研究としての糖鎖チップ調製法として、二次元面内方向にナノメートルスケールで自在に複合糖鎖を導入する革新的な手法を酵素反応の1分子力学モニタリングにより達成することを目的とする。酵素修飾カンチレバーと糖鎖固定化基板とのAFMフォースカーブ測定法により特異的結合力をモニターした上で(反応地点の決定)、両者を接触させた状態で反応基質を所定時間添加し、再度フォースカーブ測定を行い結合力の変化をモニターする(反応完結の確認)。以上の操作を二次元面内の各所で行い、細胞表層をモデル化する系の構築に挑戦する。

3. 研究の方法

平成24年度

糖鎖伸長反応を逐次的に行い、一カ所に所定の長さの糖鎖を導入して、面内移動させながら、長さの異なる糖鎖傾斜チップを10 μ mオーダーに渡って調製するための系を検討した。糖転移反応の完了確認は、1分子力学測定により、酵素修飾カンチレバーとオリゴ糖鎖の特異的結合に基づく切断力の確認と、糖転移

後に特異的結合力の解消をモニターすることで行った。糖鎖チップの調製法の確認としてはAFM解析、元素分析タンパク質結合挙動の解析を行った。

平成25年度

endo-M 酵素は本来、糖タンパク質糖鎖を糖鎖の還元末端のGlcNAcを残して加水分解する酵素として糸状菌から単離された酵素である。この酵素の特徴としては、系内に過剰のGlcNAc糖鎖を持つ化合物を共存させると、加水分解反応だけではなく、糖転移反応も起こることである。また、N-結合型糖タンパク質糖鎖であれば、どのような種類の糖鎖でも加水分解できる広範囲に適用される酵素であり、グライコミクス研究としての糖鎖調製法に向いている。また、当該酵素の糖転移能は水溶液中では余り高くないのであるが、本方法の場合にはendo-M 酵素とGlcNAc糖鎖結合基板が接触したときのみ糖転移反応を起こすように糖タンパク質糖鎖を添加すればいいので、加水分解反応は抑制されることが期待される。所望の糖鎖チップが調製できたことの確認は糖タンパク質糖鎖認識性タンパク質の結合挙動を追跡した。

調製した糖鎖チップは細胞表層上でのモデル化として、ウイルスなどの感染やその阻害剤の探索に用いることができる。また、細胞表層上の糖タンパク質糖鎖を任意にチップ上に導入することができれば、糖鎖結合の診断用チップとしても用いることが可能を持ち合わせている。具体的には、

(1)インフルエンザウイルスワクチンのシアル酸含有糖鎖への相互作用

(2)ペロ毒素に対するGb3糖鎖の結合挙動について検討をした。

4. 研究成果

24年度にはオリゴ糖伸長反応を力学計測で実際にモニタリングできるかどうかを検討

して、反応が進むことを酵素基質間の相互作用力により検出できることが分かった。また、阻害剤添加による相互作用の解消を確認する、作用しない基質での測定などコントロール実験により上記の検出が特異的相互作用すなわち、反応完了を示すことの確認を行った。

25年度には、24年度の結果をグリコサミノグリカン糖鎖伸長反応に適用すると同時に糖脂質糖鎖転移反応について検討を行った。その結果、反応が進むことを開発した力学計測法によっても検出できることが明らかとなった。さらにペロ毒素に対するGb3糖鎖の結合挙動を定量的に評価する系も確立することができた。

残る問題点としては空間配置の精度を上げるための方策がさらに必要であることが挙げられるが、糖鎖チップとして実際に酵素修飾探針を用いて達成できることを明らかにできた。

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. 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)
2. *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)
3. *Toshiaki Mori, Masayoshi Shibata, Takanori Nihira, Bunzo Mikami, and Yoshio Okahata,
“Kinetic monitoring of site-directed mutational α -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8件)
1. 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)
 2. 日本化学会第94春季年会(2014/3/27-30, 名古屋大学)
穴戸啓介、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
 3. 日本化学会第94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
 4. 日本化学会第94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
 5. 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
ペ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
 6. 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
 7. 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

8. 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

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