

研究報告書

「細胞膜表層上のナノ糖鎖の精密集積構造の構築」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：森 俊明

1. 研究のねらい

生体内での分子認識や情報伝達には糖鎖の関わる分子間相互作用が大きく関連していることが最近の糖鎖生物学の進歩から明らかにされている。特に細胞表層に提示されている糖脂質糖鎖や糖タンパク質糖鎖は細胞膜という界面を介して、わずか数ナノメートルの毒素などのタンパク質分子からウイルス・細菌、そして数十マイクロメートルの細胞まで広範囲の大きさにわたる相互作用に関わっている。役割としては、細胞表層のレセプターとリガンドとの相互作用を通してウイルスなどの感染やレセプターからのシグナル伝達などが分かってきた。本研究では、糖鎖ナノ集積構造を精密に構築し、その界面での分子間相互作用メカニズムを解明することを目指し、細胞膜における糖鎖の受容体との相互作用および細胞膜において発現している糖鎖の生成反応について検討した。

2. 研究成果

1) ペロ毒素とGb₃糖鎖間相互作用の1分子解析

糖鎖と糖結合性タンパク質の相互作用は生体内の情報伝達において重要な役割を担っており、その結合親和性は糖鎖密度により多価的に相互作用することで劇的に変化すると考えられる。しかし基板に糖鎖を並べて相互作用の解析を行う場合、糖鎖密度を精度良くコントロールすることはこれまで困難であった。

腸管出血性大腸菌が産出するペロ

毒素とGb₃糖鎖との結合について糖鎖密度を精密にコントロールし、ペロ毒素との相互作用を水晶発振子マイクロバランスにて解析し、ペロ毒素の認識性に及ぼす糖鎖密度の効果、糖鎖クラスター化度の効果を明らかにした。図1に示したように原子間力顕微鏡を用いて探針に固定した試料と基板に固定した試料を接触させた後に引き離したときに生じる破断力を測定し、分子間相互作用についてさらに詳細に解析したところ、ペロ毒素を固定したマイカ基板に対し、4分岐Gb₃糖鎖を固定した探針を用いてフォースカーブ測定を行うと、1分子レベルの相互作用に基づく破断力のみが観察された。次いでLoading rateを変え同様に測定を行うと破断力の変化が観察された。これらをDFS解析することで、それぞれの結合におけるエネルギー障壁を求めた。1Gb₃糖鎖の場合には2つの直線上にあったが、4Gb₃糖鎖の場合には曲線的に変化していることより、ペロ毒素と糖鎖との相互作用はジッパーモデルもしくは並列モデルにあることが示唆される。また、有効結合長を見積もったところ、ペロ毒素と1Gb₃糖鎖または4Gb₃糖鎖との相互作用では両者と

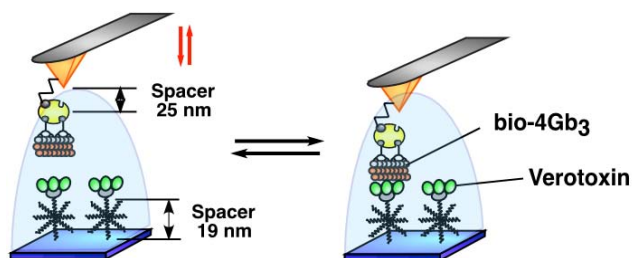


図1 分岐型Gb₃糖鎖修飾チップを用いたペロ毒素固定化基板のフォースカーブ測定

もほぼ一致し、結合メカニズムは同じだが結合力のみ大きくなっているということが明らかになった。また、結合寿命は 4Gb_3 糖鎖の方が 1Gb_3 糖鎖よりもはるかに長いことも分かった。以上より多点で Gb_3 糖鎖に結合する特徴を持つペロ毒素のより詳細な相互作用メカニズムについての知見を得ることができた。

2) 糖鎖関連酵素の 1 分子計測による反応解析

細胞表層に発現する糖鎖伸長酵素の反応ではアクセプター糖鎖の酵素への結合とそれに続く糖ヌクレオチドなどの活性化モノマーによる連続した糖転移により伸長することが多い。そこで、プライマー糖鎖依存型糖鎖伸長酵素のモデル化としてデキストランスクラーゼによる伸長反応(図2a)を 1 分子レベルで追跡することを検討した。図2bで示したように基板上にデキストラン伸長酵素(DSase)を共有結合的にまばらに固定化し、カンチレバーの先にデキストランプライマーを共有結合で修飾した系で、所定速度でフォースカーブ測定を行うことにより反応を追跡した。まずモノマーであるショ糖非存在下でのフォースカーブは、図 3a のようにデキスランプライマーの非還元末端糖とDSaseとの結合に基づく破断力が観察され、その大きさは 1 分子レベルの結合に匹敵することが確認された。(図2b左端)その後、所定速度でカンチレバーの上げ下げをしながらショ糖を添加して糖鎖と酵素が接触した時点を反応開始として連続してフォースカーブ測定を続けたところ図 3b のように反応時間とともに破断力は長距離方向へシフトする挙動が観察された。結合の破断される距離を反応時間に対してプロットして伸長速度を求めると(図3c)、1 秒あたり 2.7 糖の伸長しており、この値はこの酵素の k_{cat} (3.1 s^{-1}) にきわめて近いことから、フォースカーブの破断力のシフトは 1 分子レベルの糖鎖伸長反応の進行を追跡できたことになる。この手法を細胞膜上の酵素に用いるとおおのの酵素特性を評価できることになる。

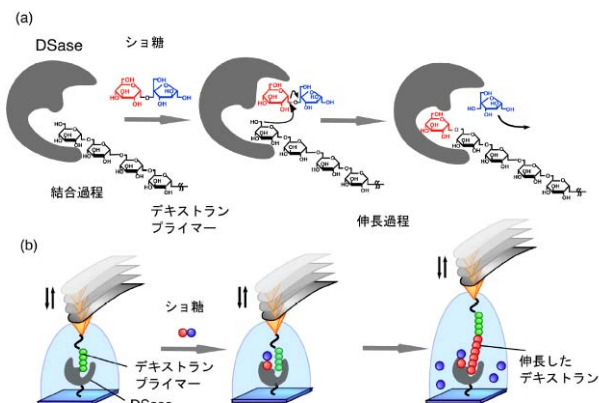


図2デキストラン伸長酵素反応の 1 分子力学計測

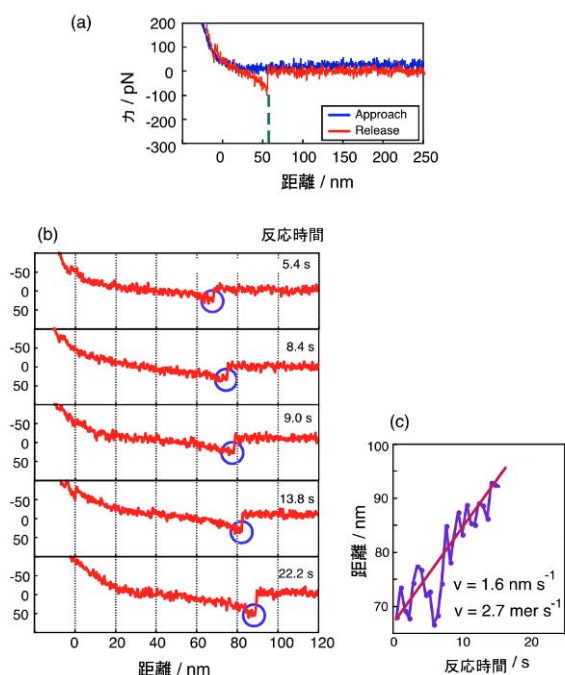


図3デキスランプライマー修飾カンチレバーによる DSase 固定化基板のフォースカーブ

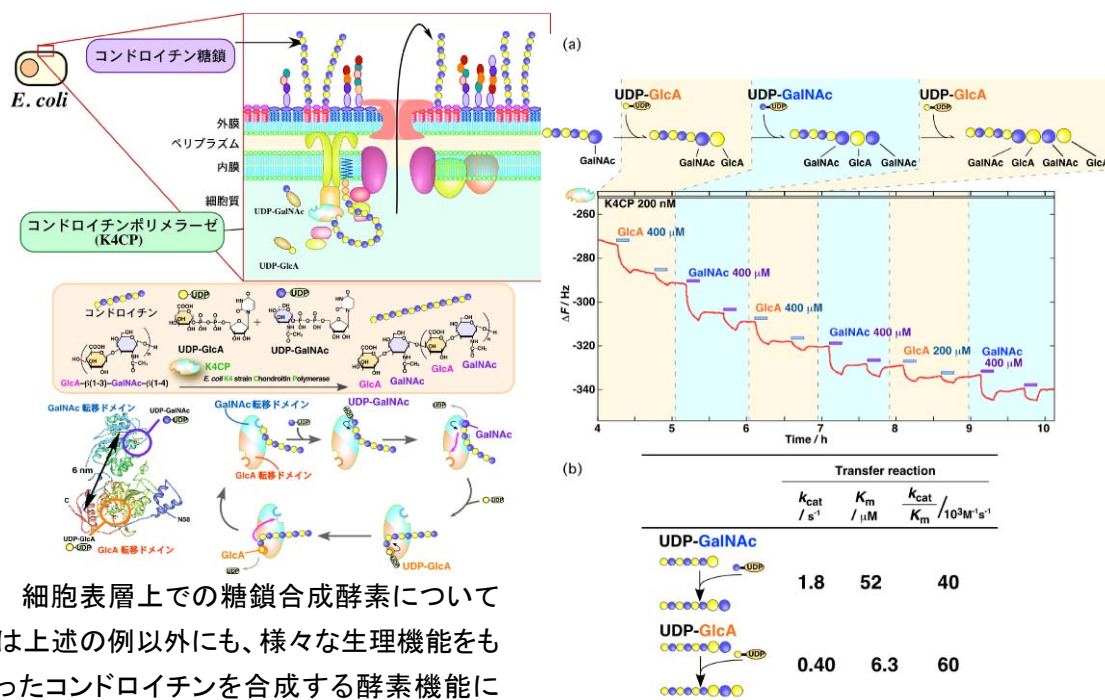


図4 コンドロイチンポリメラーゼによる一糖交互糖転移反応のモニタリング

細胞表層上での糖鎖合成酵素については上述の例以外にも、様々な生理機能をもったコンドロイチンを合成する酵素機能に関する研究が行われており、最近、*Escherichia coli* K4株由来のコンドロイチンポリメラーゼ(K4CP)がクローニングされ、

可溶性タンパク質として大量に発現、精製された。この酵素は、コンドロイチン糖鎖の非還元末端に対してUDP-GalNAc糖モノマーおよびUDP-GlcA糖モノマーが交互に糖転移反応することによりコンドロイチン糖鎖を伸長し、細菌から哺乳動物に至るまで広く保存されている糖転移酵素のUDP化糖結合ドメインが存在することなどが明らかにされた。(図4)また、結晶構造解析からK4CPは一つの酵素で二つの反応を触媒するバイファンクショナルな酵素であることが分かった。さらに各々の一方の糖転移活性部位を不活性化させた酵素変異体を用いると、単糖のみしか転移しないことも分かった。これらの反応解析にあたっては主にRI-ラベル化されたUDP化糖モノマーを用いることにより反応生成物を定量されてきた。そのため反応の経時変化を追跡することは煩雑であり、反応の詳細なメカニズムを解明することは困難であった。そこで高感度フロー型QCMによる反応解析について検討し、図4に一糖交互糖転移反応のモニタリング結果を示す。非還元末端にGalNAcをもつコンドロイチンオリゴマーを固定した基板にモノマー基質であるUDP-GlcAを添加すると振動数が減少(重量が増加)し、その値は単糖が転移した値に相当することより、反応を追跡できていると考えられる。飽和値に達したところで、次いでUDP-GalNAcを添加すると再び振動数が減少しその値は単糖分に相当した。一糖ずつ交互に転移する挙動を観察することは少なくとも3回ずつは認められた。反応初速度を求めMichaelis-Mentenプロットよりもとめた反応パラメーターを求めるとおのおの k_{cat} 値と K_m 値は異なったが、触媒効率を示す k_{cat} / K_m の値はほぼ一致し、この酵素はおおのこの糖転移についてほぼ同等に進行させることが分

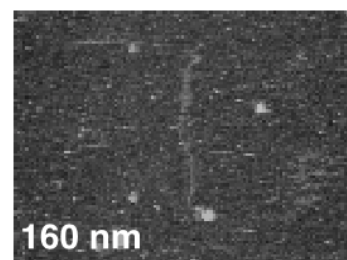


図5糖転移酵素から伸長する糖鎖の高速AFM観察

かり、そのことが交互共重合体であるコンドロイチン多糖をスムーズに生成させる要因になっているものと考えられる。また、固定化膜上で酵素から糖鎖が伸長する様子を高速AFMにより1分子レベルで観察することにも成功した。(図5) 細胞表層上での糖鎖が様々な生理活性を示すことは上述したとおりであるが、その分子メカニズムや糖鎖の生成メカニズムにはまだまだ不明な点が多い。細胞膜という界面で起こる現象を理解する際に、どの位置でどのようなときに起こっているかを時空間レベルで探るためには一分子計測は有効な手段であると考えられる。

3, 今後の展開

細胞表層上での糖鎖が様々な生理活性を示すことは上述したとおりであるが、その分子メカニズムや糖鎖の生成メカニズムにはまだまだ不明な点が多い。細胞膜という界面で起こる現象を理解する際に、どの位置でどのようなときに起こっているかを時空間レベルで探るためには一分子計測は有効な手段であると考えられる。特に細胞膜に埋め込まれた糖転移酵素の反応メカニズムを明らかにするために有効である。

4, 自己評価

細胞膜中での糖鎖の関わる分子認識及び酵素反応に焦点を当てて、モデル系にて解析してメカニズムを明らかにすることができた。特に AFM による 1 分子計測を実施することにより、細胞膜中での挙動を空間分解能は nm オーダー、時間分解能もサブ秒オーダーで詳細に明らかにすることができたことは成果である。最終目標である細胞膜そのものの相互作用・反応については定量評価するに至っていないが、そのための目処は十分実現可能なところまで来ていると考えている。

なお、上記以外の成果・展開に関しては、特許も含めて早くまとめていきたい。

5, 研究総括の見解

糖鎖関連酵素の 1 分子反応解析をフォースカーブ測定から明らかとする方法論の確立は、酵素反応の素過程を 1 分子レベルで解明する新しい方法論を提供している点で評価出来る。一方、当初の目標である細胞膜表層での相互作用解析実現には、今後、さらなる工夫が必要であろう。細胞膜における相互作用においては、糖鎖結合というシグナルが脂質分子の相分離や集合状態変化と密接に関連しており、このプロセスの分子レベルでの解明が今後、重要な課題となっていくものと考えられる。このような局面にまで解析の方法論を上げて行って欲しい。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表 (*: Corresponding Author)

1. 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).
2. Takanori Nihira, Toshiaki Mori,* Megumi Asakura, and Yoshio Okahata*, "Kinetic Studies of Dextranase Enzyme Reactions on a Substrate or Enzyme-Immobilized 27 MHz Quartz

Crystal Microbalance”, <i>Langmuir</i> , 27 , 2107-2111(2011).
3. <u>Toshiaki Mori</u> ,* TatsuroOhtsuka, and Yoshio Okahata*, “Kinetic Analyses of Bindings of Shiga-like Toxin to Clustered and Dispersed Gb3 Glyco-Arrays on a Quartz-Crystal Microbalance”, <i>Langmuir</i> , 26 , 14118-14125 (2010)
4. <u>Toshiaki Mori</u> , Momoko Toyoda, TatsuroOhtsuka, Yoshio Okahata “Kinetic analyses for bindings of concanavalin A to dispersed and condensed mannose surfaces on a quartz crystal microbalance” <i>Anal. Biochem.</i> , 395 , 211-216 (2009)
5. <u>Toshiaki Mori</u> ,* Masayoshi Shibata, TakanoriNihira, BunzoMikami, and Yoshio Okahata*, “Kinetic Monitoring of Site-Directed Mutational β -Amylase Catalysis on a 27-MHz QCM” <i>Biotechnol. Bioeng.</i> , <i>in press</i> .

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

その他の論文・総説

1. <u>Toshiaki Mori</u> ,* “Single-molecule Force Spectroscopy for Studying Kinetics of Enzymatic Elongations of Glycoconjugate”, <i>Glycoconj. J.</i> , 28 , 292 (2011).
2. <u>Toshiaki Mori</u> , Kanehira Imai, Mirei Hasegawa, Yoshio Okahata “Nanometer-scale Surface Modification by Polymerization of Tetrafluoroethylene on Polymer Substrates in Supercritical Fluoroform” <i>J. Polym. Sci. A, Polym. Chem.</i> , 46 , 1577-1585 (2008).
3. 森 俊明, “細胞表層上のナノ糖鎖の構造・機能および精密集積化”, <i>高分子</i> , 60 , 739-741 (2011).
4. 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” <i>化学と工業</i> , 62 , 990-991, (2009)
5. 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)
6. 森 俊明, “細胞表層上の糖鎖集合構造への相互作用解析”表面, <i>in press</i> .

招待講演

1. 超高速(動画)AFMシンポジウム、 <u>森 俊明</u> 、“糖鎖関連酵素の1分子計測による反応解析”ビジョンセンター日本橋、2011年6月10日
2. Bio-nanotechnology Seminar 2011 in Shanghai Science and Technology Park, <u>Toshiaki MORI</u> , “Surface modification of biomolecules on the polymer substrates by supercritical fluids”, 立邦塗料(中国)有限公司 Shanghai, 2011年9月2日,
3. 2011 ナノ材料よこはま研究会、 <u>森 俊明</u> 、“細胞表層上のナノ糖鎖の構造および機能解析”、2011年10月10日
4. ソフト界面のダイナミクス(科研費新学術領域「ソフト界面」ワークショップ)、 <u>森 俊明</u> 、“界面で起こる糖鎖認識・糖鎖合成反応の1分子解析”、富山大学、2011年11月

- 4 日.
5. 化学工学会（第 41 回秋季大会）「超臨界流体と生体関連化学」 広島大学 2009. 9. 16
6. 日本接着学会東北支部講演会 2009 「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」東北大学 2009. 11. 13
- 7.China-Japan Bio-forum Regenerative Medicine and Related Technology 2009 “Direct Monitoring of Carbohydrate Elongation by an Atomic Force Microscopy”Shanghai, China 200 名 2009.3.18
- 8.1st International Symposium on Biotechnology, Bioengineering and Biomedical Science“Analysis of glycosylations catalyzed by dextran sucrase using an AFM” Tsinghua University, Beijing, China) 200 名 2009.3.21
- 9.Symposium for Eco-environmental and Biological Technology (EcoBioTech)“Direct Monitoring of Carbohydrate Elongations by a Quartz-crystal Microbalance”Beijing, China 2009.8.5
10. 東京工業大学プロダクティブリーダー養成機構第一回フュージョンプロジェクト 「超臨界流体のナノバイオテクノロジーへの利用」 東京工業大学 2008. 12. 25