

学 位 論 文 題 名

Template Effect on Carbohydrate-Protein Interaction

(糖質－タンパク質相互作用における鋳型効果)

学位論文内容の要旨

生体を構成する細胞が正常に機能するためには、細胞間の情報伝達に基づいて個々の細胞が自身の役割を全うする必要がある。糖鎖は構造の多様性を有しているため様々な細胞間情報を媒介する物質として適しており、受精、発生、分化、成長、老化、がん化、ウイルス感染などの生命現象に関わる情報伝達に関与している。これらの情報のやりとりは、糖鎖－タンパク質、または糖鎖－糖鎖間の特異的相互作用によって制御されている。このように様々な生体情報を担う糖鎖の詳細な構造と機能の関わりは大変興味深く、糖鎖が関与する結合の特異性や強さを糖鎖構造の化学的改変によって制御する目的で、糖質分子やその類似体の分析、合成研究が行われてきた。ところが糖鎖－タンパク質間相互作用において糖鎖一分子とタンパク質一分子間の結合は大変弱い。糖鎖シグナル増幅の仕組みとして糖鎖リガンドの多価性や配向性（糖鎖クラスター効果）が指摘されて以来、多価型糖鎖分子や高分子型糖鎖リガンドの合成研究が積極的に行われてきた。当研究室においても様々な糖鎖密度を持つ糖鎖高分子を用いて、糖鎖－タンパク質相互作用の強さが高分子担体上での糖鎖密度に依存することを見いだしてきた。これらの事実から、糖質－タンパク質間相互作用においては、個々の糖鎖構造に加えて糖鎖間距離、空間的配置や配向性も含めて認識されるということが示唆されている。

近年、生体膜表面の糖質分子は膜中に無秩序に分散しているのではなく、情報伝達や細胞接着に関与するタンパク質、コレステロールなどと共に集合して膜上でドメインを形成していることが証明された。また、細胞接着やウイルス感染など外部との情報のやりとりがこれら膜ドメインを介して行われていることも徐々に明らかになってきている。このことは細胞表層の糖鎖が様々な分子と集合して集合体として機能することを示しており、糖鎖クラスター効果は2次元平面（膜）においても重要な因子であるといえる。したがって糖鎖の関与する細胞機能を理解するためには、個々の糖鎖構造に由来する機能に加えて、糖質分子集合体（クラスター）とタンパク質との相互作用に関する研究を行う必要がある。

本研究では、糖鎖－タンパク質間相互作用における糖鎖の密度、空間的配置や配向性に着目し、研究をおこなった。第1章では序論として、生体内で糖鎖が果たす様々な役割および、糖－タンパク質相互作用における糖鎖クラスター効果について説明した。過去に報告された様々な研究結果をもとに、糖質分子の関与する生体分子間相互作用における認識分子の三次元的な関係について述べている。

第2章では、糖鎖リガンドの空間的配置や配向性を制御した糖鎖高分子の設計、合成および目的タンパク質との相互作用について述べている。柔軟な水溶性糖鎖高分子中にターゲット分子特異的な認識部位を形成させる方法として、分子鋳型法として知られる概念を用いた。すなわち重合性糖鎖モノマーと認識相手タンパク質分子とを結合させた状態で、アクリルアミドおよび架橋剤とともに共重合する。鋳型として用いたタンパク質分子をポリマーから除去し「鋳型 (+) ポリマー」を得た。この方法によって得られた糖鎖高分子は、鋳型非存在下でランダ

ムに架橋して重合した糖鎖高分子「鑄型（－）ポリマー」に比べて、鑄型タンパク質に対して 100 倍～300 倍強い親和性を示した。また鑄型（＋）ポリマーの結合選択性を調べるために、同じ構造の糖鎖を認識する異なるタンパク質に対する結合常数を求めた。鑄型（＋）ポリマーは鑄型タンパク質に対して、非鑄型タンパク質よりも数十倍高い親和性を示した。これはミクロな認識単位である糖モノマーが鑄型タンパク質と相互作用することで、鑄型（＋）ポリマー中に、鑄型に対して糖鎖リガンドを適切に配置したマクロなタンパク質認識部位が形成されたためと考えられる。

第 3 章では生体膜を模倣した膜モデルを用いて、膜表面での糖鎖分子密度や分布状態などの空間的配置とタンパク質分子認識について検討している。脂質部分に光重合性官能基であるジアセチレンを導入した種々の糖脂質を酵素法もしくは化学的方法によって合成し、糖脂質とマトリックス脂質からなる単分子膜および LB 膜を作製した。糖鎖特異的なタンパク質を糖脂質膜に結合させて膜表面でのタンパク質分布の様子を原子間力顕微鏡によって観察したところ、タンパク質は糖脂質の構造や密度、タンパク質の種類など種々の要因によって、ネット、ドット、樹状など特有のパターンをもって膜に結合していた。糖脂質膜基板に結合したタンパク質が活性を保持していることを、表面プラズモン共鳴法によって確認し、糖質－タンパク質相互作用を利用して活性なタンパク質を平面基板に固定化できることが示された。

続いて第 4 章では第 3 章で得られた知見をもとに、マルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として発現したガラクトース転移酵素 (MBP-GalT) を表面プラズモンセンサー表面に固定化し、高分子型糖鎖アクセプターを用いて、固定化 MBP-GalT によるガラクトシル化反応のモニタリングを行った。光重合性マルトリオース脂質を含む LB 単分子膜を作製し、MBP-マルトリオース相互作用によって MBP-GalT を膜表面に固定化した。この方法ではタンパク質の特定部位 (MBP) を固定化に用いるため、タンパク質の向きをそろえて平面に固定化することが可能である。また、高分子アクセプターを用いることで、クラスター効果による効率的な糖鎖伸長反応および高分子量基質との反応による大きなシグナル変化をねらった。MBP-GalT を固定化したセンサー上にアクセプターとなる糖鎖高分子基質のみを単独でインジェクトした時には、有意なシグナルが観察されなかった。一方アクセプター基質を UDP-Gal と共にインジェクトすると、初期の緩やかなレスポンスに続いてシグモイド的な大きなシグナルが観察され、センサー表面に固定化した糖転移酵素による糖転移反応の過程をモニタリングできることがわかった。

第五章では、タンパク質に糖鎖リガンドを複数結合させた多価型人工糖タンパク質の合成を行なった。糖鎖導入度、糖鎖－タンパク質間距離、糖鎖間距離など糖鎖の空間的配置と、大腸菌による赤血球凝集阻害活性との関係について調べた。この実験ではタンパク質上の糖鎖間距離が 20nm を超える場合に高い活性を示し、大腸菌表面に多価に存在するレクチンと多価糖タンパク質との三次元的な認識が示された。

第 6 章は第 1～5 章のまとめである。本研究では、糖鎖－タンパク質相互作用における高次な特異的認識に興味をもって研究を進めてきた。第 2 章で述べられているような水溶液の状態で、また第 3 章で用いた単分子膜を用いた系において、認識相手分子の存在によってそれを鑄型として他方の分子が特異的な高次構造を形成することが示された。生体の営みは複雑に制御された特異的相互作用の蓄積によって成り立っているが、糖鎖－タンパク質間相互作用において、リガンド（レセプター）が鑄型分子と相互作用をしながら高次集合体を形成していくことが示されたことは、生体分子の特異性の機構を解くヒントとなるものであると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 坂 入 信 夫 (大学院地球環境科学研究科)

副 査 教 授 川 端 和 重

副 査 助教授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

Template Effect on Carbohydrate-Protein Interaction

(糖質－タンパク質相互作用における鋳型効果)

糖鎖は受精、発生、分化、成長、老化、がん化、ウイルス感染などの生命現象に関わる情報を担っており、これらの情報伝達は糖鎖－タンパク質、および糖鎖－糖鎖間の特異的相互作用によって制御されている。糖鎖が関与する結合の特異性や強さを糖鎖構造そのものによって制御する従来のアプローチに加え、糖鎖－タンパク質間相互作用における糖鎖リガンドの多価性や配向の重要性（糖鎖クラスター効果）が指摘されて以来、多価型高分子糖鎖リガンドの合成研究やタンパク質認識能の解析が積極的に行われ、糖質－タンパク質間相互作用においては糖鎖間の距離、空間的配置や配向性も含めて認識されるということが示唆されてきた。また近年、生体膜表面の糖質分子が糖脂質ドメインと呼ばれる集合体を形成し、細胞接着やウイルス感染など外部との情報伝達窓口として機能していることが明らかになりつつある。このことは細胞表層の糖鎖が様々な分子と集合して集合体として機能することを意味し、したがって糖鎖の関与する細胞機能を理解するためには、糖質分子集合体とタンパク質との“多価な”相互作用機構に関する研究を行う必要がある。

このような背景にあって申請者は、糖鎖－タンパク質間相互作用における糖鎖の密度、空間的配置や配向性などを含めたトポロジカルな認識に着目し、鋳型効果を利用することで1) 糖質－タンパク質間の特異的相互作用制御、2) 糖脂質膜へのタンパク質のパターン化集積とその応用、に関する研究を行った。

第2章では分子鋳型法として知られる概念を用いて、糖鎖リガンドの空間的配置や配向性を制御した糖鎖高分子の設計、合成および目的タンパク質との相互作用解析を行った。鋳型タンパク質存在下で重合性糖鎖モノマーをアクリルアミド、架橋剤とともに重合し、鋳型分子を除去して得た「鋳型（+）ポリマー」は、鋳型非存在下でランダムに架橋して重合した「鋳型（-）ポリマー」に比べて、鋳型タンパクに対して 100 倍～300 倍強い親和性を示した。また同一糖鎖構造を認識する異なるタンパク質である非鋳型タンパク質よりも、鋳型タンパクに対して数十倍高い親和性を示した。このように「親和性」と「選択性」の二つが確認されたことで、鋳型効果を利用して特異的相互作用を

制御した糖鎖高分子合成の有効な方法論を示したといえる。

第3章では生体膜を模倣した膜モデルを用いて、糖脂質膜を鋳型としたタンパク質集合体形成について検討している。ジアセチレン含有光重合性糖脂質を合成し、様々な組成の糖脂質 LB 膜表面に糖鎖特異的なタンパク質を集積したところ、タンパク質は糖脂質の構造や密度など種々の要因によって、ネット、ドット、樹状など特有のパターンをもって膜に結合していた。AFM、SPR などによる解析の結果、タンパク質が一分子の厚さで活性を保持した状態で糖脂質膜表面に固定化されていることが確認され、機能性細胞培養基板や生体分子センサーなどの有用な生体材料への応用の可能性が示された。

続いて第4章では第3章で考案したタンパク質集積法によって、レクチンとの融合糖転移酵素(MBP-GalT)を表面プラズモンセンサー表面に固定化し、高分子型糖鎖アクセプターを用いることで、固定化酵素による糖転移反応のモニタリングを行った。糖転移酵素の発現や活性変化は、細胞のガン化やリウマチなどある種の疾患に伴う糖鎖構造異常を引き起こす要因であり、効率的な糖転移酵素活性評価方法の開発が求められている。本論文では、生体内の糖転移酵素の存在様式を模倣した二次元膜表面への酵素固定化、高分子糖鎖基質利用というユニークな方法によって糖転移酵素反応のダイレクトなモニタリングに成功した。

第五章ではタンパク質に糖鎖を複数結合させた多価型人工糖タンパク質を合成し、糖鎖導入度、糖鎖-タンパク質間距離、糖鎖間距離など糖鎖の空間的配置と大腸菌表面のレクチンとの相互作用との関係について調べた。大腸菌レクチンとの結合は、人工糖タンパク質糖鎖の糖鎖間距離に依存し、菌体表面に多価に存在するレクチンと多価糖タンパク質とのトポロジカルな認識が明らかになった。

第6章では本論文を総括している。

以上のように申請者は、鋳型効果を利用することで糖鎖-タンパク質間相互作用における特異的認識の制御に成功した。また分子の配向を制御した効果的なタンパク質パターン化集積方法を新規に考案し、その有用性を明確に示した。この研究は生体分子の鋳型利用にヒントを得た独自の発想に基づいており、生体分子のトポロジカルな認識機構の解明および生体材料創成に貢献するところ大なるものがある。よって審査員一同は、申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。