

細胞表層に存在する糖鎖の機能解明—糖鎖機能解明を指向した分子ツールの  
開発及び糖脂質界面現象の解明—

大塚 功

Elucidation of Carbohydrate Functions in Cell Membranes—Development  
of Molecular Tool Containing Carbohydrate Ligand and Elucidation  
of Interface Phenomena of Glycolipid

Isao OHTSUKA

*Kyushu University of Health and Welfare, 1714-1 Yoshino-cho,  
Nobeoka, Miyazaki 882-8508, Japan*

(Received March 25, 2011)

Glycosphingolids and glycoproteins in cell membrane are thought to play important roles in variety biological phenomena. Our interests focused on elucidation of their functions at the molecular level. We are especially interested in organic chemistry and physical chemistry of carbohydrates. Physical part—Surface of Langmuir-Blodgett (LB) films which comprised of various gangliosides, sphingolipids and cholesterol are observed by atomic force microscopy (AFM). We studied distribution of model compounds related to an antigenic epitope from *Bupleurum falcatum* L. in  $G_{M3}$  (GM3)-DPPC monolayers. We also investigated relation between disease and glycolipids in cell membrane. Chemical part—New molecular tools for the elucidation of carbohydrate roles using photoaffinity labeling were developed. We showed that the structural difference between closed ring- and open ring-type carbohydrates affected binding affinity to proteins. This study confirmed that carbohydrate structure, in both non-reducing end and reducing end sugars, is deeply related to the recognition event between carbohydrates and proteins. As a result, they will be used in future studies to elucidate carbohydrate functions on cell surfaces.

**Key words**—carbohydrate; atomic force microscopy (AFM); photoaffinity labeling; Langmuir-Blodgett (LB) film; molecular tool

細胞表層には様々な形で糖鎖が存在し、糖脂質や糖タンパクといった形態をとっている。これら糖鎖は細胞間情報伝達機構に深く関与していることが知られており、糖鎖の機能を解明することは、生命現象の解明に大きく寄与するものと考えられる。<sup>1)</sup>

しかし、糖鎖の認識現象を解明するためにはまだまだ不明な点が数多くあり、解明していく必要がある。このうち物理的な問題として、細胞膜上における糖鎖の挙動が挙げられる。一般に細胞膜はある一定の膜圧で保持されているが、シグナル伝達などの刺激により膜圧が変化した場合や、膜の組成による膜表面の変化については、知見が欠如している。ま

た、薬物を体内に投与した際の膜上の糖鎖との係わりや、疾病が糖鎖に及ぼす影響についても未解明である。化学的な問題として、糖鎖に対応するレクチンとの親和性の低さである。糖鎖-レクチンの親和性は  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  程度であり、タンパク認識と比較して認識能が低く、糖鎖の側から結合レクチンを見出すことは不可能だと言われている。

そこで、本研究では細胞膜上に存在する糖鎖を、物理的及び化学的見地からの解明を目的とし、物理的解明として、疑似細胞膜を作製し、種々の条件による膜表面の変化を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察することで、膜上の糖鎖の物性を明らかにする。また、化学的解明では、糖鎖機能解明を目指した分子ツールを合成し、糖鎖-レクチンの関係解明のための方法論の構築を目指した (Fig. 1)。

## 1. 物理的解明

### 1-1. 原子間力顕微法による糖脂質膜界面現象の

九州保健福祉大学薬学部 (〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町 1714-1)

e-mail: ohtsuka@phoenix.ac.jp

本総説は、平成 22 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

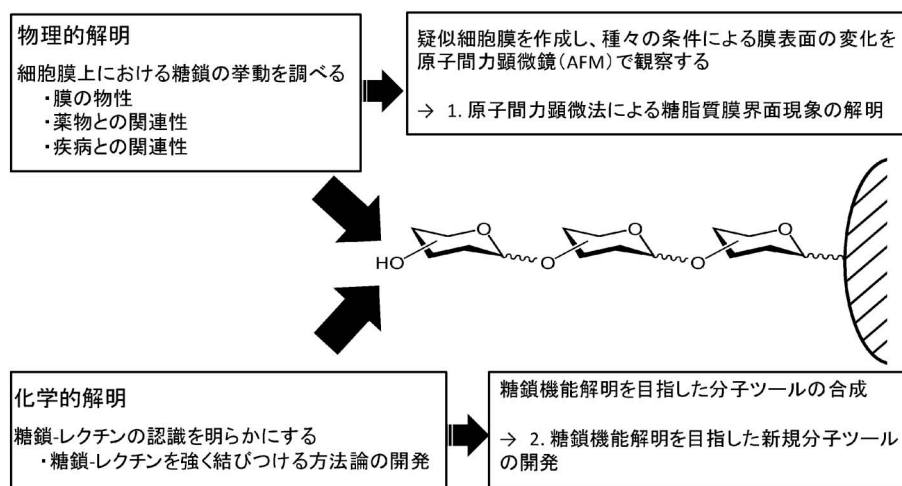


Fig. 1. Elucidation of Carbohydrate Functions by Chemistry and Physiology

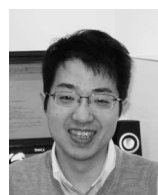
解明<sup>2-8)</sup> 本研究では、疑似細胞膜の表面を観察することから、二次元的に分子が層を形成する Langmuir-Blodgett (LB) 膜を作製し、その表面を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した。AFM は探針先端と試料表面との間に働く原子間力をカンチレバーの変位から測定し、探針を表面に沿って走査することで表面の像を形成する。近接する2つの物体間には必ず力が作用するため、試料に対する物理的な制約は存在しない特徴を有している。

まず、ガングリオシドを含む単分子膜の界面現象を観察した。細胞膜を構成するリン脂質の主要成分である DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) とガングリオシド  $G_{D1a}$  ( $GD1a$ ) による膜圧とモル分率の違いによる影響を調べた。膜圧を 10 mN/m と 28 mN/m とし、 $GD1a$  の組成を変化させた場合、10 mN/m では  $GD1a$  の量を増やしていくことで、ドメインが少なくなってきたのが確認されたことから、このドメインは DPPC 由来のものだと考えられる。一方 28 mN/m の系では、10 mN/m でみられたドメイン状の模様は観察されず 0.8 のときには細かいドット状の模様へと変化した (Fig. 2)。

次に細胞膜中のラフトに多く含まれる DOPC (ジオレオイルフォスファチジルコリン) やコレステロールを含んだ系について調べた。ガングリオシドには  $GD1a$  と  $G_{T1b}$  ( $GT1b$ ) を用い、その違いを比較した結果、いずれも DPPC が存在することでドメイン状の模様が観察されるものの、その形態には大きく違いがみられた。 $GD1a/DPPC/DOPC$  で

は大きなドメインのほか、紐状の模様が観察されたのに対し、 $GT1b/DPPC/DOPC$  ではドメインと細かなドットが観察された。さらにコレステロールを加えることで膜表面は複雑なものへと変化している様子が確認された。 $GT1b/DPPC/DOPC/Chol$  2/6/6/3 では蓮状の模様が観察され、ガングリオシドの量を少なくすることで、神経細胞の形態に似た模様を呈した。この模様は  $GD1a$  でもみることができた。これら膜表面の変化はまだ現象論にすぎず、今後より詳しく調べる必要があるものと考察する (Fig. 3)。

1-2. 柴胡由来ペクチン様多糖のモデル化合物を用いた膜中への分布と創薬への志向<sup>9,10)</sup> 薬物と糖鎖の係わりを調べるべく、柴胡由来ペクチン様多糖のモデル化合物を用いた膜中への分布と創薬への志向について検証した。サイコは漢方処方において小柴胡湯、大柴胡湯、などの柴胡剤の構成生薬として慢性肝炎や自己免疫疾患に用いられる。近年、このサイコの根部から得られた多糖体 *bupleuran 2IIc* に抗潰瘍活性が見い出されている。*bupleuran 2IIc* は 90% 以上のポリガラクトン酸と、ガラクトン酸とラムノースよりなる  $PG1$ ,  $KDO$  を含む  $PG2$  よりなることが推定されている。このうち最も活性



大塚 功

九州保健福祉大学薬学部講師。博士 (薬学)、東京都出身、共立薬科大学大学院 (現 慶応義塾大学大学院) 博士課程修了、(株)三菱化学生命科学研究所特別研究員、九州保健福祉大学薬学部助手、助教を経て 2009 年 4 月より現職。専門は糖鎖工学。

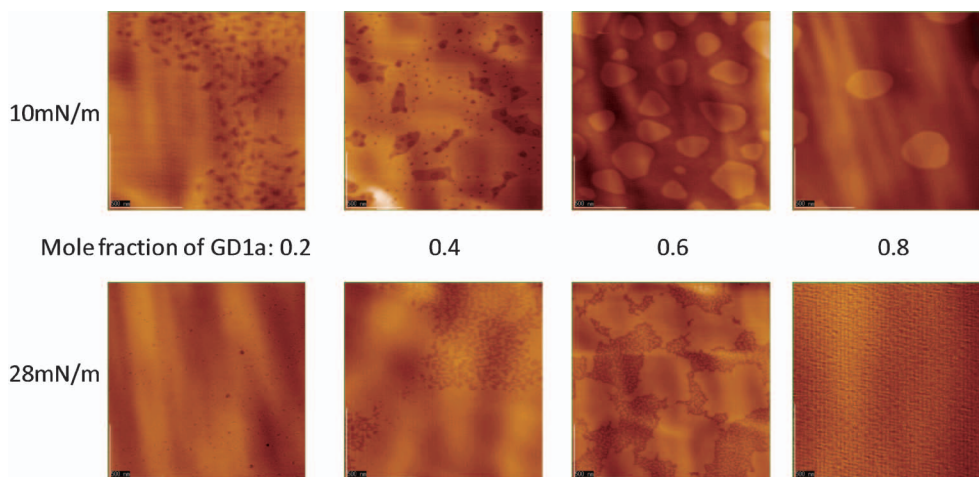


Fig. 2. AFM Images of GD1a/DPPC Monolayers at 10 and 28 mN/m

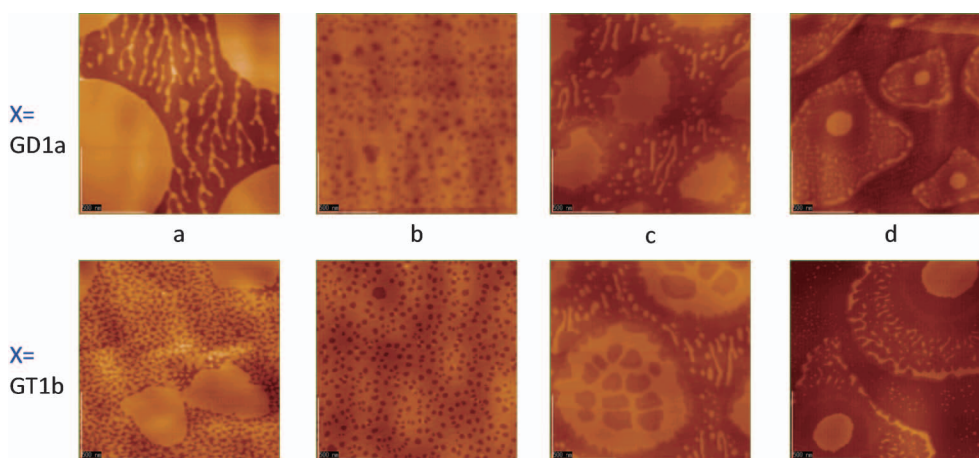


Fig. 3. AFM Images of a: (X (GD1a or GT1b)/DPPC/DOPC=2/6/6), b: (X/DOPC=2/6), c: (X/DPPC/DOPC/Chol=2/6/6/3), d: (X/DPPC/DOPC/Chol=0.5/6/6/3) Monolayers at 28 mN/m

が高い部分である PG1 については、その側鎖部分においてリンパ球幼若活性や腸管免疫調節活性も報告されている。これらを含んだモデル化合物を合成することは柴胡の薬理活性を明らかにする上でも有用であることから、このモデル化合物 A とクラスター効果を期待した四量体である B を用い、細胞膜上における薬物の分布を調べた (Fig. 4)。

まず、DPPC のみの膜に A を添加したところ、平坦な像が得られたのに対し、 $G_{M3}$  (GM3) 存在下では白い斑点状の模様が確認された。このことから化合物は GM3 を認識していることが示唆される。さらに四量体 B の系では、膜表面が不均一な模様となっていることから、単量体に対し四量体はクラスター効果により薬物が集積していると考えられる (Fig. 5)。

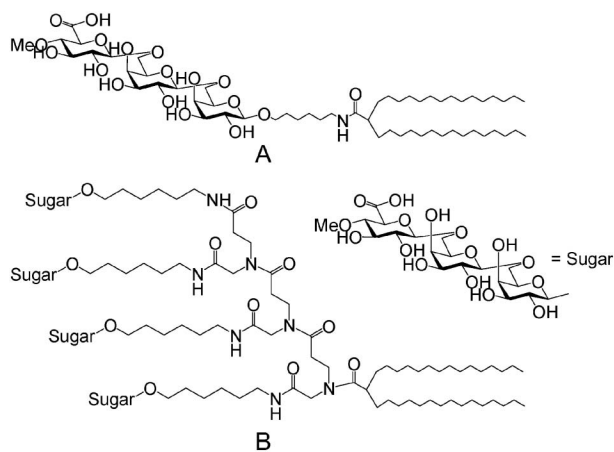


Fig. 4. Structure of Model Compound Monomer A and Tetramer B from *Bupleurum falcatum* L.

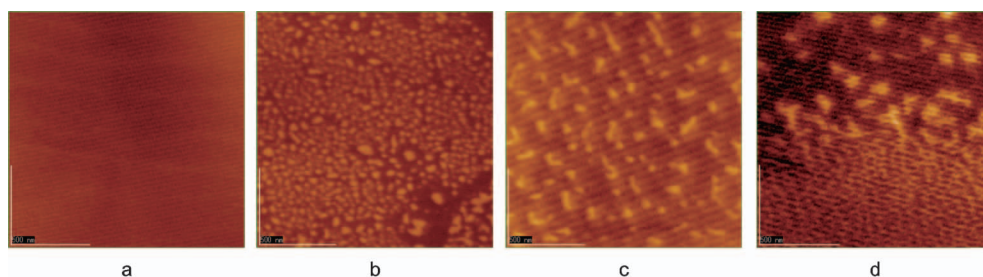


Fig. 5. AFM Images of a: (DPPC/A=9/1), b: (DPPC/GM3=8/2), c: (DPPC/GM3/A=8/2/1), d: (DPPC/GM3/B=8/2/1) Monolayers at 35 mN/m

**1-3. プリオンタンパク断片ペプチド PrP106-126 のコンフォーメーションの違いによる GM<sub>1</sub> 認識能の変化<sup>11)</sup>** プリオン病は脳、脊髄、目、腸などの感染部位を経口摂取することで脳神経細胞がスポンジ化し、発症する。現在のところ、プリオン病発症の原因は異常プリオンタンパクの脳内への異常蓄積によるものであり、異常プリオンはなんらかの原因で正常プリオンタンパクを異常プリオンタンパクに変化させることで増殖し、発症に係わっているとされている (Fig. 6)。正常プリオンタンパク PrP<sup>C</sup> と異常プリオンタンパク PrP<sup>Sc</sup> ではアミノ酸配列、糖修飾に大きな違いはないものの、PrP<sup>Sc</sup> はプロテアーゼ耐性であり、 $\beta$ -sheet 構造の含有量が多いことから、conformation 変化が発症に重要であることがわかっている。この PrP<sup>C</sup> 及び PrP<sup>Sc</sup> は細胞膜中に存在する GM<sub>1</sub> (GM1) を認識することが知られていることから、本研究では、プリオンタンパクが変異することで GM1 を含んだ細胞膜にどう影響するかを調べた。

DPPC 及び DPPC/GM1 の単分子膜に PrP<sup>C</sup> を添加した様子を比較すると後者の方がプリオンタンパクを強く認識しているのが観察された。さらに PrP<sup>Sc</sup> を加えた場合、膜の表面が不均一に観察された。これは PrP<sup>Sc</sup> により膜の組成に変化が生じ、膜が破壊されていることを意味する。つまり実際の細胞に置き換えると細胞死につながるものと考えられる。また、細胞膜を破壊することで知られるアミロイドベータタンパク (A $\beta$ P) と不活性タンパクであるスクランブル PrP を用いて実施した場合においても同様の結果が得られたことから、PrP<sup>C</sup> 及び PrP<sup>Sc</sup> の細胞膜に及ぼす影響を確認することができた (Fig. 7)。

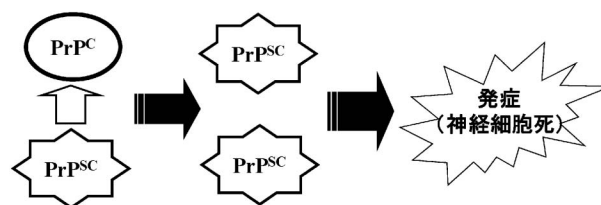


Fig. 6. Mechanistic Pathway for Infection of Prion Disease

## 2. 化学的解明

**2-1. 糖鎖機能解明を目指した新規分子ツールの開発<sup>12)</sup>** 糖鎖は、対応するレクチンを認識することで情報伝達機構に参与しているが、糖鎖-レクチン認識においてはいくつかの問題が存在する。まず、両者の認識能が低いことである。糖鎖-レクチンの結合定数は  $K_d = 10^{-4} - 10^{-5}$  程度であり、これは抗原抗体反応が  $10^{-9}$  レベルであるのに対して大変弱いことを物語っている。また糖鎖は認識が甘く、選択性が低いことから、結合状態の維持が難しいことが挙げられる。

上記問題を克服し、研究を加速させるには糖鎖機能解明を指向したツールの開発が重要だと考える。光アフィニティーラベル法はジアジリン基の特性を生かしたもので、光照射によりラジカルを生み出し、最寄の分子と共有結合を形成する。つまり、糖鎖の傍にジアジリン基を配置することで、レクチンを認識した後、光照射することで強固な共有結合からなる複合体が作られ、これを吊り上げることで、確実に糖鎖を認識したレクチンを同定することが可能となり、汎用性が高い手法であると言える (Fig. 8).<sup>13,14,15)</sup>

本法を利用した分子ツールは、市販されているアフィリエイト CHO と糖を混ぜ合わせるだけで合成される。得られた分子ツールは認識部位、結合部位、

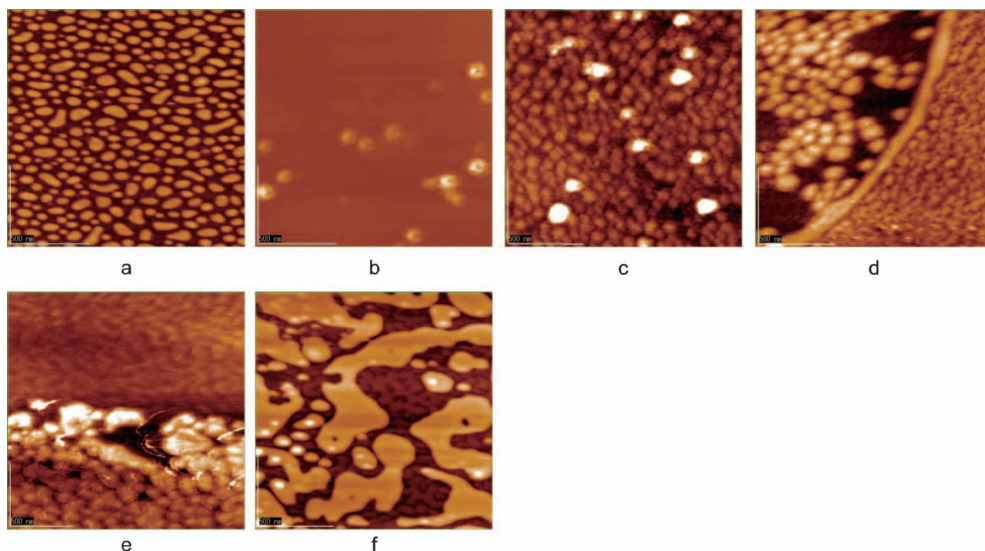


Fig. 7. AFM Images of a: (DPPC/GM1=8/2), b: (DPPC/PrP<sup>C</sup>=8/1), c: (DPPC/GM1/PrP<sup>C</sup>=8/2/1), d: (DPPC/GM1/PrP<sup>SC</sup>=8/2/1), e: (DPPC/GM1/AβP1-40=8/2/1), f: (DPPC/GM1/Scramble PrP 106-126=8/2/1) Monolayers at 35 mN/m

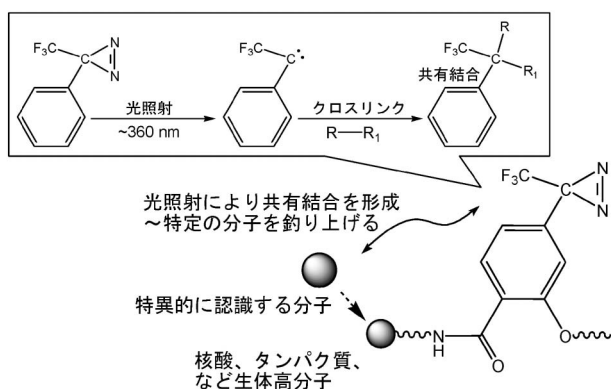


Fig. 8. Identification of Specific Binding Molecules for Ligands by Photoaffinity Labeling

検出部位を有したものであり、有用な化合物であると言える。

しかし従来法では、一度還元末端の糖が開環することから、生じるアルデヒド基とオキシアミノ基が反応してしまい、糖の還元末端が開環してしまうことが明らかとなっている。<sup>16)</sup> 糖鎖の還元末端が開環してしまうことは、糖としての形態をなさず、レクチンとの認識能に大きな影響を及ぼす。そこで本研究では、還元末端が開環した正確な糖鎖構造を持つ分子ツールの合成を目指し、開環型との比較を行った (Fig. 9)。

D-ラクトースを出発物質として還元末端にアリル基を導入後、オゾン分解によりアルデヒド基に変換した化合物 **5** を合成し、これにアフィライト CHO

(生化学工業) **7** を縮合させることで、目的とする分子ツール **8** が高収率で得られた (Scheme 1)。

また、D-ラクトースと **7** を直接作用させることで、還元末端が開環した **9** も合成された。この **8** 及び **9** は -C=N- 部位において *E-Z* 体が生成されるが、これらは分離せずに光アフィニティーラベル法によるレクチンとの認識能を測定した (Scheme 2)。

合成した分子ツールは 37°C でインキュベートしたのち、光照射することで、対応するレクチンと共有結合を形成する。ここにアビジン-ペルオキシダーゼ (HRP) を添加することで、ビオチン部分が認識され、この複合体が得られる。Figure 10 は、ウエスタンブロットングにより映し出した結果であり、ダイズレクチン (*Glycine max* (soybean): SBA)、デイゴマメレクチン (*Erythrina cristagalli*: ECA)、ピーナッツレクチン (*Arachis hypogaea* (peanut): PNA) はそれぞれラクトース及びガラクトースを認識するレクチンである。ラクトースをリガンドとした閉環型糖鎖を持つ **8** は還元末端が開環した **9** に比べて強くバンドが検出され、認識が強いことを表している。またラクトースを先にレクチンと混ぜ合わせた系では、レクチンの鍵穴はラクトースで塞がれており、分子ツールがレクチンの鍵穴を正確に認識していれば、ラクトースの有無によりその差がみられるはずである。ここでの結果では **8** はラクトースの有無による差がみられたのに対し、**9** にはみられなかったことから、還元末端が開環する

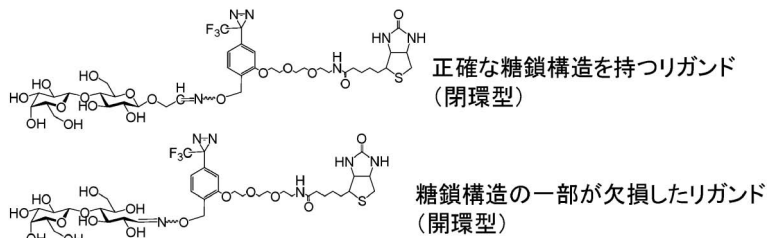
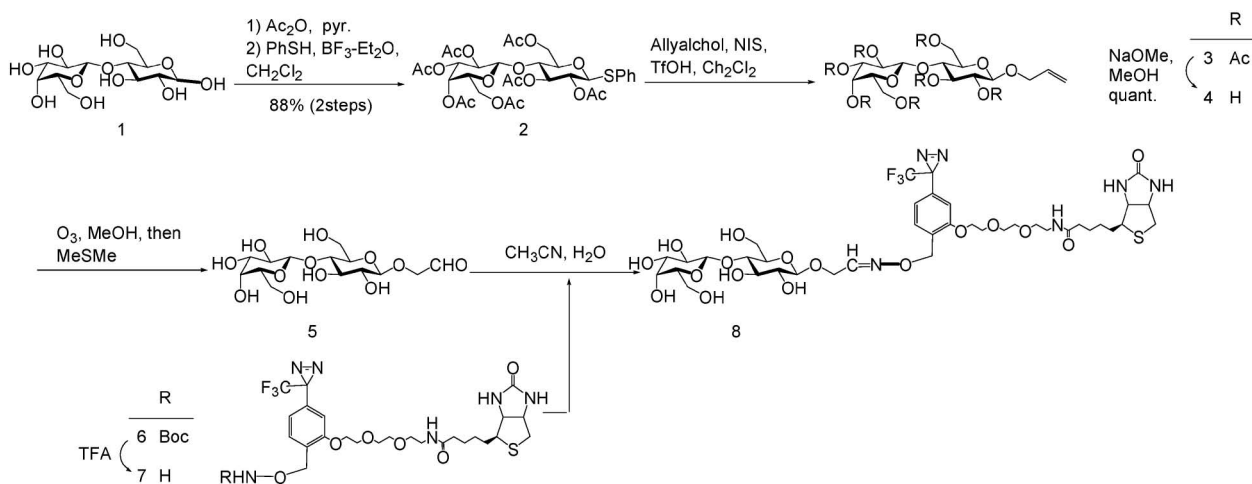
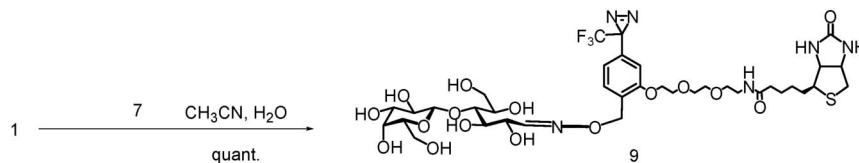


Fig. 9. Target Molecular Tools Containing Photoreactive Group



Scheme 1.



Scheme 2.

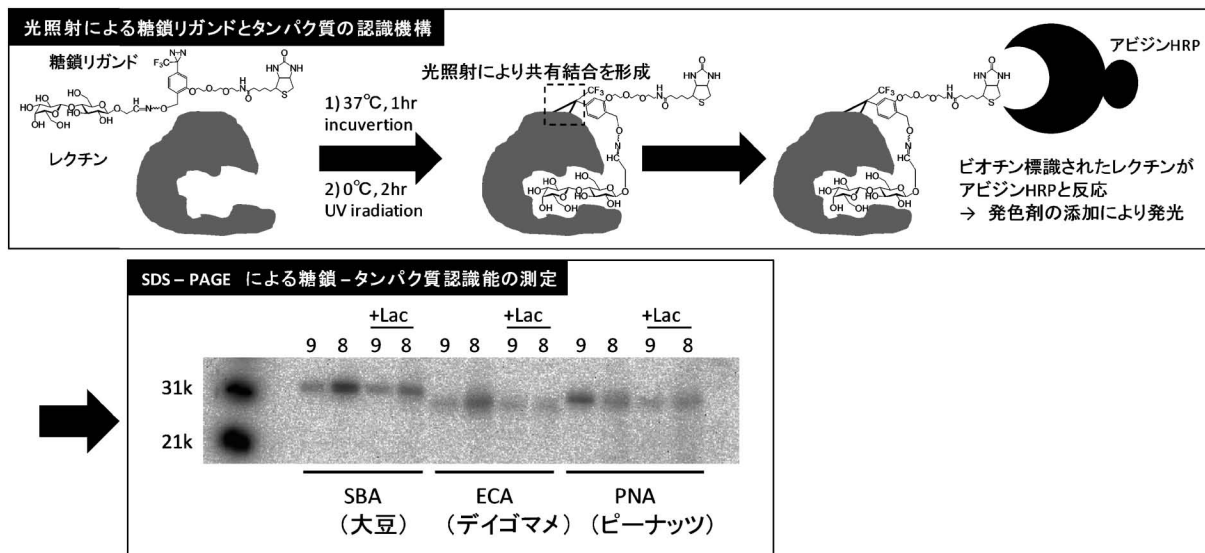


Fig. 10. Elucidation of Molecular Tools (8, 9) and Specific Binding Lectin for D-Lactose (SBA, ECA, PNA) Interactions by Photoaffinity Labeling

ことで糖鎖認識能が低下し、レクチンの鍵穴以外の部分と結合しているものと考えられる。

### 3. まとめ

細胞表層の糖鎖の機能を物理的、化学的視点からの解明を目指し研究を開始した。膜中において、糖鎖はそれぞれが異なる役割を担っており、糖鎖認識薬物を多量体にする事で、より標的部位に薬物が集積されることが明らかとなった。また、疾病の発現に糖鎖が関与していることから、認識される糖鎖をモチーフした医薬品の開発が期待される。化学的解明においては、新たな糖鎖-レクチンの関係解明の方法論の構築することで、今後糖鎖機能の解明が加速されることを期待する。

**謝辞** 本研究は、九州保健福祉大学薬学部横山祥子教授、佐久嶋明世教授、垣内信子教授、川原正博教授、定金 豊准教授を始め多くの方々のご協力の下、実施されたものである。ここに深く感謝いたします。

### REFERENCES

- 1) Taylor M. E., Drickamer K., "Introduction to Glycobiology," Oxford University Press, New York, 2003.
- 2) Ohtsuka I., Yokoyama S., *Mater. Technol.*, **25**, 215-219 (2007).
- 3) Ohtsuka I., Yokoyama S., *Mater. Technol.*, **25**, 271-273 (2007).
- 4) Ohtsuka I., Yokoyama S., *Mater. Technol.*, **26**, 191-196 (2008).
- 5) Ohtsuka I., Yokoyama S., *Mater. Technol.*, **26**, 229-235 (2008).
- 6) Yokoyama S., Ohtsuka I., *Mater. Technol.*, **27**, 3-5 (2009).
- 7) Ohtsuka I., Yokoyama S., *Mater. Technol.*, **27**, 35-40 (2009).
- 8) Ohtsuka I., Toizumi F., Yokoyama S., *Mater. Technol.*, **28**, 1-7 (2010).
- 9) Ohtsuka I., Hada N., Jin Y., Takeda T., Yokoyama S., *Mater. Technol.*, **24**, 104-109 (2006).
- 10) Hada N., Ohtsuka I., Jin Y., Yokoyama S., Takeda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 1281-1284 (2006).
- 11) Kawahara M., Ohtsuka I., Yokoyama S., Sadakane Y., *Int. J. Alzheimers Dis.*, Article ID 304583, (2011).
- 12) Ohtsuka I., Sadakane Y., Higuchi M., Hada N., Hada J., Kakiuchi N., Sakushima A., *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 894-899 (2011).
- 13) Koshi Y., Nakata E., Hamachi I., *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 1349-1352 (2005).
- 14) Fleming S. A., *Tetrahedron*, **51**, 12479-12520 (1995).
- 15) Fang K., Hashimoto M., Jockusch S., Turro N. J., Nakanishi K., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8543-8544 (1998).
- 16) Hatanaka Y., Kempin U., Jong-Jip P., *J. Org. Chem.*, **65**, 5639-5643 (2000).