

細胞内糖鎖機能探索ツールとしての機能性磁性ナノ粒子の開発

長堀 紀子 [北海道大学大学院先端生命科学研究所 / 特任助教]

背景・目的

糖鎖は生体内において細胞分化、シグナル伝達などを精密かつ複雑な相互作用で制御している。糖鎖の多様な機能を解析し、医薬品等への応用を進めるためには、複合糖質機能を分子レベルで解明する「構造解析」および「相互作用解析」が不可欠である。近年糖鎖構造解析技術が飛躍的に進歩し、機能糖鎖の同定が進んでいる。一方、糖鎖が機能するときの相互作用相手分子の同定にいたったものは数少ない。

そこで本研究では、糖鎖の相互作用相手分子を同定するための簡便で汎用性の高い方法を開発することを目的とした。

内容・方法

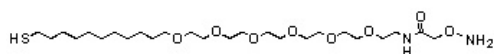
これまでに「糖鎖が機能する時の相互作用相手分子の同定」を目的とし、糖鎖磁性ビーズの開発を行ってきた。すなわち磁性体表面にオキシアミノ基を導入し、任意の糖鎖結合させた糖鎖-磁性ビーズを作製する方法を構築した。この糖鎖磁性体を用いて、特異的結合タンパク質の釣り上げについて検討したところ、「微粒子への非特異吸着」が最大の問題であることが明らかとなった。

そこで本提案では、1) 生体膜を模倣した表面を提供することによる非特異吸着の回避、および2) 切断部位の導入による非特異吸着の分離 について検討を行った。

結果・成果

生体膜を模倣した表面をもつ糖鎖提示磁性微粒子

アミノオキシ基をもつチオール化合物1(合成ルートは研究開始前に確立) を用い、遊離糖鎖還元末端アルデヒド基とのオキシム形成反応を利用して、糖任意の糖鎖を自在に磁性微粒子表面に提示できるようにした。



化合物1

細胞内外には多種多様な生体分子で込み合っているにもかかわらず、細胞膜表面の糖鎖はタンパク質によって特異的認識を受けて機能することから、生体膜表面の物理的性質は非特異吸着を抑制する作用を有すると考えられる。本研究では、細胞膜表面に最も多く存在するリン脂質様分子(化合物2) を用いることによるタンパク質の非特異吸着の低減効果について検討した。



化合物2

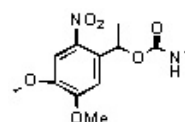
銀で被覆した磁性微粒子表面に、化合物1、化合物2から成る自己組織化膜を形成させ、糖鎖を表面に提示した磁性微粒子を作製した。作製した糖鎖提示磁性微粒子を用いて、糖鎖特異的タンパク質との結合評価および非特異吸着抑制効果について検討した。その結果、生体膜を模倣した表面を提供することによって、分子認識における糖鎖情報を保持し、かつタンパク質の非特異吸着を低減した糖鎖提示磁性微粒子が作製できることが示された。

次に我々は、非特異吸着と特異的に結合したタンパク質を分離するために、糖鎖と磁性体をつなぐリンカー部分への光切断部位の導入を検討した。

光切断性糖鎖磁性微粒子

目的分子として、A) 糖鎖関連化合物を特異的に結合しうる官能基、B) 親水性環境になじむ構造、C) 光切断部位、D) 磁性体への結合性、という4つの機能と性質を併せ持つ化合物を設計し、合成した。

光切断部位には



の構造を含む分子設計を行った。

合成した化合物について、表面を銀コートした磁性微粒子表面への結合条件を検討した。銀表面に結合した化合物は、MALDI-TOF MS測定におけるレーザー照射によって光切断部位が切断されてイオン化されるため、MS測定によってビーズへの化合物の結合を確認した。次に、合成した化合物のヒドラジド基と遊離オリゴ糖の還元末端のアルデヒド基とのヒドラゾン結合形成反応条件を検討した。反応のモニタリングはMALDI-TOF MSによって行った。最適化した反応条件を用いて、マンノペンタオースをモデル化合物として反応を行い、光切断活性を持つリンカーを介して糖鎖を提示した糖鎖-磁性微粒子の作製を行った。現在、特異的タンパク質の選択的結合能、および非特異吸着との分離効果について評価を行っている。

今後の展望

糖鎖の「相互作用相手分子の特定」を進める上で、非特異的吸着を制御し、特異的な結合と非特異的吸着とを明確に見分けることが重要な課題である。本研究では化学の立場から糖鎖の生物学的機能解明を目指し、非特異吸着を分離できるリンカー化合物の開発を目的として実験を行った。雑多な生体分子の中から微量のターゲット分子を見分けることができれば、効率的に新規糖鎖認識システムを同定することができ、疾患マーカーの探索や創薬ターゲットの創出等の応用研究への展開が期待される。