

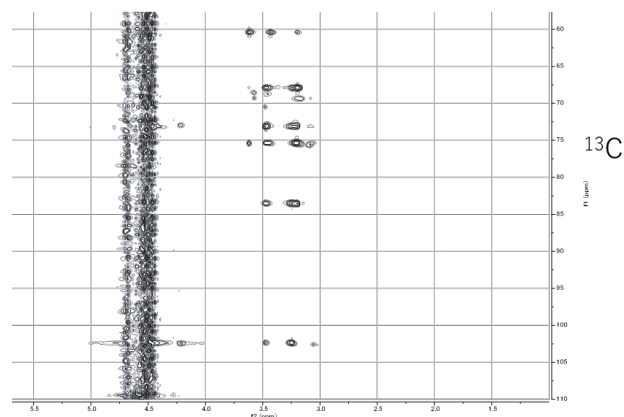
実施課題名：繰返し構造を有するリガンド糖鎖のレクチン受容体による認識機構の解明

【背景】本研究では、繰返し構造を有する糖鎖と、それを認識するレクチン型パターン認識受容体との相互作用機構の解明を目的とした。多糖は自然免疫系において重要な役割を担い、生体恒常性の維持にも寄与している。これらはレクチン型受容体によって認識されるが、その認識には糖鎖の鎖長依存性が関与しており、分子機構には未解明の点が多い。さらに、鎖長に対する感受性は受容体ごとに異なることから、その構造基盤の解明が課題となっている。そこで本研究では、多糖の鎖長に対する受容体の選択的認識機構を詳細に解析し、多糖認識を介した免疫調節機構および生体恒常性維持機構の理解深化を目指した。

【実施内容】

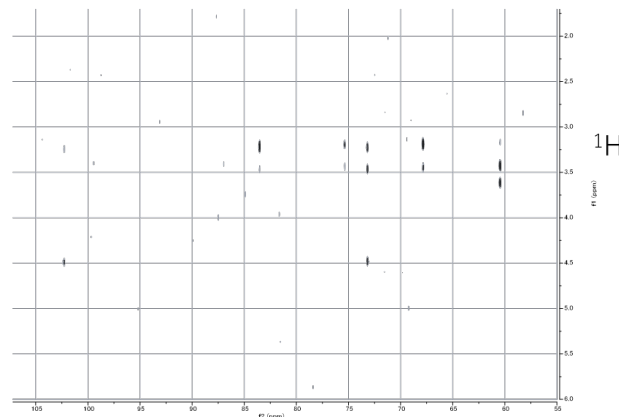
本課題では、 β -グルカン(ラミナリン)やマトリグリカンなどの繰返し構造を有する糖鎖を対象として、レクチン型パターン認識受容体による鎖長依存的な認識機構の解明を目指した。これらの糖鎖では、繰返し構造に起因するNMRシグナルの縮重により部位特異的な解析が困難となるため、各種1次元・2次元NMR測定を組み合わせることでシグナル帰属を試みた。ラミナリンは天然由来であるため鎖長が不均一であり、さらに分岐構造も有することから位置特異的な帰属は容易ではなかったが、通常の ^1H 検出型測定に加えて ^{13}C 直接検出法を併用することで、 ^{13}C 軸の高分解能を活用したシグナル分離に成功した。さらに、 ^{13}C 直接検出法では H_2O 由来の信号の影響を受けないため、 ^1H - ^{13}C HSQCなどの ^1H 検出型実験で問題となるアノマー位シグナルと水シグナルの重なりを回避することができた(Fig. 1)。 ^{13}C 検出法は ^1H 検出法に比べて感度が低いものの、本研究では試料をmgオーダーで調製できたことに加え、 ^{13}C 検出に適したクライオプローブおよび高磁場NMR装置を利用することで、感度上の問題は実質的に大きな障害とはならなかった。また、将来的に不均一性を示す多糖の解析を見据え、各種NMR測定条件の検討も行った。

^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY (^1H 検出, 混合時間 30 ms)



^1H (15 min)

^1H - ^{13}C TOCSY-DEPT (^{13}C 検出, 混合時間 30 ms)



^{13}C (3 h)

Fig. 1 β -グルカン糖鎖の ^{13}C 直接検出NMR解析

β -グルカン糖鎖 (^{13}C 非標識)

3 mg/0.6 mL in H_2O

高感度TCIクライオプローブを搭載した800 MHz NMR装置を用いて、 β -グルカン糖鎖に ^{13}C 直接検出法を適用した。その結果、 ^{13}C 標識を施していない試料に対しても、 ^{13}C 軸の高い分解能を活用した ^{13}C - ^1H 相関スペクトルの取得に成功した。

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF25-01-085			
利用課題名	繰返し構造を有するリガンド糖鎖のレクチン受容体による認識機構の解明			
所属機関	東北医科薬科大学			
所属部署	分子生体膜研究所			
役職・氏名	役職	講師	氏名	真鍋 法義
利用実施時期、及び期間	2025 年 8 月 1 日 ~ 2026 年 3 月 31 日 総利用日数: 5 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

本研究では、繰返し構造を有する糖鎖と、それを認識するレクチン型パターン認識受容体との相互作用機構を構造生物学的手法により解明することを目的とした。 β -グルカン、キチン、グリコサミノグリカン(GAG)などの多糖は、自然免疫系において重要な役割を担うとともに、生体恒常性の維持にも寄与している。これらはレクチン型受容体によって認識されるが、その認識には糖鎖の鎖長依存性が関与しており、分子機構には未解明の点が多い。さらに、鎖長に対する感受性は受容体ごとに異なることから、その構造基盤の解明が喫緊の課題となっている。

申請者はこれまでに、ヒト Dectin-1 レクチンドメインの大量発現系を確立し、 ^{15}N 標識体を用いた NMR 解析により、糖鎖リガンドおよび Ca^{2+} との相互作用を可視化してきた(Chiba, Manabe et al., Protein Expression Purif., 229, 2025)。また、Laminin と GAG との結合における鎖長依存性に着目し、その相互作用特性を明らかにしてきた(Kotera et al., Carbohydr. Res., 547, 2025)。これらの知見と技術的蓄積を基盤として、本研究では多糖の鎖長に対する受容体の選択的認識機構を詳細に解析し、多糖認識を介した免疫調節機構および生体恒常性維持機構の理解深化を目指した。

2. 成果の概要

実施内容

本課題では、 β -グルカン(ラミナリン)やマトリグリカンなどの繰返し構造を有する糖鎖を対象として、レクチン型パターン認識受容体による鎖長依存的な認識機構の解明を目指した。各種 1 次元・2 次元 NMR 測定を組み合わせ糖鎖のシグナル帰属を進めるとともに、STD-NMR を用いて糖鎖-受容体間の相互作用解析を行った。また、天然由来 β -グルカン糖鎖に対して ^{13}C 直接検出法を適用し、非標識試料の解析条件を検討した。

さらに、パイセクト型糖鎖とそれを認識するタンパク質について、STD-NMR による相互作用解析および NOESY によるコンフォメーション解析を実施した。

NMR 測定は東北大学 800 MHz 溶液 NMR 装置を用いて実施した。試料輸送、リモート測定およびデータ転送はいずれも円滑に行われた。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

本課題では、繰り返し構造を有する糖鎖とレクチン受容体との相互作用解析を進め、当初目標の多くを達成することができた。特に、STD-NMR 解析により受容体との相互作用に関与する糖鎖部位を同定することができた。

一方、繰り返し構造に起因するシグナル縮重のため、研究期間内に完全なシグナル帰属には至らなかった。しかしながら、¹³C 直接検出法の導入によりシグナル分離能を向上させることができ、今後の多糖解析に有用な知見を得た。

また、バイセクト型糖鎖認識タンパク質についても、相互作用解析およびコンフォメーション解析に十分な感度で測定可能であることを確認し、今後の詳細解析に向けた基盤を構築することができた。

成果発表

論文

(1) Integrative structural analysis of lacto-N-fucopentaose I recognition by antibodies R-17F and R-13E using NMR, docking, and molecular dynamics simulations.

Ohno S, Ohuchi A, Saitoh Y, Manabe N, Fujimura T, Yuasa N, Matsuzaki Y, Tsuiji M, Kawasaki T, Yamaguchi Y. Glycobiology 36(4):cwag016 (2026) doi: 10.1093/glycob/cwag016.

学会発表

ヒトおよびマウス Dectin-1 による β -グルカン認識機構の比較解析

千葉 花子, 真鍋 法義, 内藤 淳子, 西田 典永, 大野 尚仁, 山口 芳樹

第 44 回日本糖質学会年会, 弘前, 2025 年 10 月, PA-56

ヒト IgA1-Fc の二量体形成および安定性に対する N-型糖鎖の部位特異的役割

山口 芳樹, Shunli Pan, 真鍋 法義, 大野 詩歩, 小松 祥子, 藤村 務

第 4 回日本抗体学会学術大会, 大宮, 2025 年 12 月, B009

今後の展開

化学構造的に不均一な多糖に対して、NMR 測定を試みる予定です。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

レクチン受容体による糖鎖認識機構の理解は、感染症、炎症性疾患、および免疫関連疾患の病態理解に貢献するとともに、糖鎖を標的とした診断・創薬研究の基盤となることが期待されます。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

サンプルの送付・受け取り、遠隔操作、データの受け取りはスムーズかつ安全に実施されました。大変満足しております。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

今後も NMR プラットフォームと同様の支援が継続されることを期待しております。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

核磁気共鳴(NMR)装置利用講習会の開催や、利用に際しての専門的なアドバイスなど、大変感謝しております。

8. 利用施設

東北大学

溶液 800MHz

利用期間 1: 2026 年 3 月 24 日～2026 年 3 月 26 日 (3/24 16:00 – 3/26 10:00)

9. その他の利用施設

生命創成探究センターとも連携して進めることができ、大変感謝しております。