

氏 名 張 英

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1652 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 物理科学研究科 機能分子科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Paramagnetism-assisted NMR analyses of conformational  
dynamics of ganglioside glycans

論文審査委員 主 査 教授 青野 重利  
教授 加藤 晃一  
准教授 奥村 久士  
准教授 西村 勝之  
教授 深瀬 浩一 大阪大学

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Glycans are the carbohydrate parts of glycoconjugates such as glycoproteins, glycolipids, and proteoglycans, and mediate cell–cell communication and consequent signal transduction, thereby controlling a variety of physiological and pathological processes. For better understanding the molecular basis of the mechanisms underlying the glycan functions, it is quite desirable to gain detailed information on their conformational dynamics in solution. Hence, my thesis focuses on the development of the methodology for characterization of conformational dynamics of glycans. It consists four chapters, **Chapter 1** “General introduction,” **Chapter 2** “Development of the methodology for characterization of the conformational dynamics of linear GM3 trisaccharide,” **Chapter 3** “Application of paramagnetic NMR–validated molecular dynamics simulation for characterization of the conformational dynamics of branched GM2 and GM1 oligosaccharides” and **Chapter 4** “Summary and perspective.”

In **Chapter 1**, I describe the general biological roles of glycans and explain the limitation of present methods for the structural analysis of glycans. Although, the glycans have important physiological and pathological roles, the conformational analysis of glycans is still a remaining challenge. This is primarily because of their dynamic conformational multiplicities and branched covalent structures, which hinder conventional analytical methods such as X–ray crystallography. Although recent advancement on computational calculation has enabled large–scale molecular dynamics (MD) simulations of oligosaccharides in solution, experimental data are indispensable for validating the simulation results because they heavily depend on the calculation conditions such as simulation time, initial state and force field. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has immense potential to deal with this kind of flexible biomolecules. However, the nuclear Overhauser effect–based approach, widely used for protein structure determination, is often limited by insufficient distance–restraint information due to the low density of observable protons in glycans. For conformational characterization of dynamic glycans, their structures should not be dealt with as a single well–defined global free energy minimum but as an ensemble of low energy conformers. Hence, I have developed an NMR methodology for evaluating a dynamic ensemble of glycan conformations by employing paramagnetic effects induced by an unpaired electron, which provide long–distance information on dynamic conformations of glycans.

In **Chapter 2**, I described the structural characterization of the linear GM3 trisaccharide ( $\alpha$ Neu5Ac–(2–3)– $\beta$ Gal–(1–4)– $\beta$ Glc) by using the paramagnetism–assisted NMR in conjunction with MD simulation. This approach was presented to characterize the conformational dynamics of GM3 trisaccharide, which shared the common core structure among gangliosides forming an integral part of cellular membranes. To elucidate the conformations of ganglioside glycans in solution, I prepared novel phenylenediamine–based lanthanide chelating–tag. Subsequently, this phenylenediamine derivative was covalently attached to the reducing end of the chemically

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

synthesized GM3 trisaccharide. Upon chelating with paramagnetic lanthanide ions, the tagged GM3 trisaccharide exhibited NMR spectral changes due to pseudocontact shift (PCS), thereby offering an opportunity to determine the spatial positions of the individual  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclei with respect to the paramagnetic metal center. The PCS values of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  were measured as the differences between the chemical shifts of the compound chelated to the paramagnetic ion such as  $\text{Tm}^{3+}$  and those observed with the diamagnetic  $\text{La}^{3+}$  ion in their  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronuclear single-quantum coherence spectra. For construction of the 3D structural model, all-atom MD simulations of the GM3 trisaccharide were employed. The observed PCS values of the trisaccharide were in excellent agreement with those back-calculated from the conformational ensemble derived from a 120-ns MD simulation including quite minor conformers, thereby demonstrating that this methodology is useful in evaluating the multiple conformations of the linear GM3 trisaccharide in solution at atomic level.

In **Chapter 3**, I describe the application of this methodology to the analysis of conformational dynamics of the branched GM2 tetrasaccharide ( $\beta\text{GalNAc-(1-4)-}[\alpha\text{Neu5Ac-(2-3)}]-\beta\text{Gal-(1-4)-}\beta\text{Glc}$ ), which possesses an additional GalNAc moiety in comparison with GM3 trisaccharide. The experimental PCS data were in an excellent agreement with back-calculated PCS data from the 3D ensemble model. Furthermore, the simulation results of GM1 pentasaccharide ( $\beta\text{Gal-(1-3)-}\beta\text{GalNAc-(1-4)-}[\alpha\text{Neu5Ac-(2-3)}]-\beta\text{Gal-(1-4)-}\beta\text{Glc}$ ) were successfully evaluated, providing the accurate conformational space of this branched oligosaccharide. These results indicated wide applicability of this methodology for analyzing the conformational dynamics of glycans. By inspecting the results of the GM1 pentasaccharide and the GM2 tetrasaccharide, I found that the outer Gal residue raised little conformational change in the GM1 pentasaccharide. By contrast, the PCS data of the Neu5Ac residues in GM3 trisaccharide and GM2 tetrasaccharide exhibited significant difference in glycosidic linkage conformation, consistent with the MD simulation results showing that different conformational space of Neu5Ac-Gal between the GM3 trisaccharide and GM2 tetrasaccharide. This result suggests that the additional GalNAc branch restricts the conformational flexibility of the Neu5Ac-Gal glycosidic linkage in the GM2 tetrasaccharide through inter-residue interactions.

In **Chapter 4**, I summarize my work and discuss the future perspective. The conformational characterization of the linear GM3 trisaccharide and the branched GM2 and GM1 oligosaccharides demonstrates that paramagnetism-assisted NMR method combined with MD simulation is useful for the conformational characterization of flexible, branched glycans. This methodology opens a new prospect for conformational analyses of dynamic structures of ganglioside glycans toward decoding *glycocode*s from the 3D structural aspects, giving mechanistic insights into their various physiological and pathological roles in living system. However, compared to protein structural biology, the structural analyses of glycans are still immature. New NMR techniques for analyzing glycan-glycan and glycan-protein interactions and the advancement in the preparation of isotope labeled glycan samples are needed for providing elaborate information of glycans to understand their functional roles in living

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

systems.

生命現象の諸相で重要な役割を演じている糖鎖は、複雑な分岐構造に加え内部運動の自由度に著しく富んでおり、水溶液中では一定の立体構造をとっていない。このことが、核酸やタンパク質に比べた糖鎖の際立った特徴になっている。また、それゆえに精密な構造・機能解析は困難を伴う。本論文はこうした状況に鑑みて、糖鎖の立体構造のダイナミクスを通じて発揮される生物機能の理解を深めるために、核磁気共鳴 (NMR) 法を用いた糖鎖の動的立体構造解析法の開発を行ったものである。

第1章では、研究の背景と目的について以下の趣旨が述べられている。糖鎖の生物機能の分子科学的基盤に関する理解を深めるためには、その3次元構造について精密な情報を収集することが不可欠である。タンパク質のNMR解析においては、核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用した立体構造解析法が確立されている。ところが、糖鎖においては、プロトン密度が低いためにNOEによる構造情報が十分に得られない。この問題に対し、出願者は、長距離にわたる原子配置の情報を与える常磁性効果に着目し、ランタニドプローブを応用した常磁性NMR法と分子動力学 (MD) 計算とを組み合わせることで、糖鎖の動的3次元構造を定量的に描象する方法論を構築することを構想した。

第2章では、神経細胞膜上に存在する糖脂質ガングリオシドGM3の糖鎖構造を対象に、常磁性効果を応用した糖鎖のNMR解析法の確立を行った。ランタニドイオンを用いた常磁性プローブを合成し、これをGM3糖鎖へと連結した。その結果、糖鎖の各水素および炭素原子について常磁性効果の1つである擬コンタクトシフト (PCS) を観測することに成功した。さらにMD計算によって得られた複数のコンフォマーを考慮した糖鎖立体構造のアンサンブルモデルを作成し、PCSの理論値を算出した。このようにして得られたPCSの実験値と理論値の比較を行った結果、主要なコンフォメーションのみならず、存在割合の低い安定構造を考慮することで両者がよりよく一致することが判明し、こうした知見をもとに、溶液中における糖鎖の3次元構造ダイナミクスを正しく記述することを達成した。

続く第3章では、より複雑な糖鎖の構造解析についての応用を目指した。これを実現するため、分岐構造を有しているガングリオシドGM2およびGM1の糖鎖構造について、常磁性NMR法とMD計算による解析を行った。その結果、複雑な分岐構造を有する糖鎖の立体構造のダイナミクスを正確に捉えることに成功した。また、得られた結果に基づき、直鎖型3糖であるGM3糖鎖と分岐糖鎖の配座空間の比較を行い、シアル酸残基のグリコシド結合がとり得るコンフォメーションが両者の間で有意に異なることを明らかにした。GM2糖鎖の安定構造の詳細な解析をもとに、糖残基間の相互作用によってコンフォメーションが制限されることが考察されている。

第4章では研究成果を総括するとともに、今後の展望が述べられている。本論文の研究成果により、水中で様々なコンフォメーションをとっている糖鎖について、その分子構造情報を定量的に得ることが可能となった。また、糖鎖とタンパク質との複合体や、糖鎖のクラスターの構造ダイナミクスなどに迫ることが展望としてまとめられている。

以上のように、出願者は主体的に研究に取り組み、神経細胞膜上で機能している糖脂質の糖鎖構造の動的立体構造や、糖鎖の分岐構造の差異がもたらすダイナミックなコンフォ

(Separate Form 3)

メーション変化を、原子レベルの分解能で明らかにすることに成功している。柔軟な生命分子である糖鎖に対して、従来の研究では困難であった物理化学的なアプローチを可能にし、その分子科学研究を進展させる意義も深い。また、本論文の成果は国際学術雑誌 2 報に報告されている。従って、本審査委員会は本論文が博士（理学）の授与に値すると全員一致で判断した。