

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01801

研究課題名(和文)細胞膜内の脂質相互作用が誘起する糖脂質分子の構造機能の制御

研究課題名(英文)Lipid interaction and headgroup conformation of glycosphingolipids in membrane bilayer

研究代表者

花島 慎弥 (Hanashima, Shinya)

大阪大学・理学研究科・講師

研究者番号：50373353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ糖脂質は、セラミドの共通構造を有し様々な大きさと電荷の糖鎖頭部基を有する一群の脂質分子である。コレステロールとの相互作用を介して様々な局在変化をおこし生命現象に関与することが示唆されていたが、その親和性の強さは不明であった。そこで、生体モデル膜中でのスフィンゴ糖脂質のコレステロールとの相互作用と頭部基の構造変化を固体NMRと蛍光分光法を組み合わせ解析した。ラクトシルセラミドでは、強固な頭部基水素結合を基盤としたクラスター形成を起こし、コレステロールとの親和性は弱いことがわかった。グルコシルセラミドでの頭部基解析では、コレステロールは顕著な構造変化を誘起しないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Glycosphingolipids (GSLs) are the membrane lipid molecules having common ceramide backbone and oligosaccharide headgroups with various size and charge. GSLs have been thought to interact with cholesterol (Cho) and altered the sugar chain conformation to regulate the protein interactions, but detail was elusive. Here, we used biomimetic membranes to analyze GSL-Cho interaction and the headgroup conformation by solid state NMR and fluorescence spectroscopies. Lactosylceramide was found to form rigid cluster through headgroup hydrogen bonding, and the affinity to Cho was weak. Glucosylceramide received some order effect from Cho, but the headgroup conformation was not significantly altered in the presence of Cho.

研究分野：生体分子化学

キーワード：糖脂質 生体膜 構造 NMR 合成

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

スフィンゴ糖脂質は細胞膜構成脂質の数%を占める。スフィンゴミエリンと同一の脂質鎖構造を有し、細胞膜上でスフィンゴ糖脂質を主成分とするミクロドメインを形成してシグナル伝達に關与する。このようなミクロドメインは細胞膜上で離散、集合を繰り返しながら一過的に形成され、その結果、生命シグナルはパルスとして細胞内に導入される。

申請者の所属する研究室では、細胞表面の機能ドメインである脂質ラフトに着目して、その脂質間相互作用を有機合成と²H-NMRを用いて研究してきた。脂質鎖の水素を位置特異的に重水素に置換したスフィンゴミエリン標識体を系統的に合成して、その解析から、コレステロールがリン脂質よりもスフィンゴミエリンと強くそして深い部位で相互作用することを明らかにしていた。

脂質ラフトにおける機能性の糖脂質複合体の相互作用と構造を精密に研究することは、その生体機能を正確に解明するうえで必須である。しかしながら、原子レベルでの精密な解析はその流動的な性質などが原因で大きく遅れており、ラフト中での脂質間相互作用により形成される糖脂質複合体の構造基盤は不明である。代表的なラフト脂質であるコレステロールとスフィンゴ糖脂質の膜内で起こる相互作用が、細胞膜の表面の糖脂質糖鎖の構造に影響を与え、認識タンパク質との結合性をも制御していることが計算化学により示唆されていた。しかしその実験的根拠は糖鎖結合毒素との親和性など間接的なもののみで、直接的な根拠は乏しい状況であった。

2. 研究の目的

糖脂質は、細胞膜に存在する機能ドメインである脂質ラフト分子複合体を形成して、タンパク質による認識を調節し、シグナル伝達を制御する重要な分子である。糖脂質がそのような生理機能を発揮するときには、細胞膜内でラフト特異的な脂質と相互作用して、細胞表面にある糖脂質糖鎖の構造変化が誘起される事が示唆されている。しかしその実験的な根拠はきわめて乏しい。そこで、生体膜を模倣した環境に下において、NMRを用いることで、糖脂質の脂質ラフトにおける脂質間相互作用と続く構造変化を明らかにし、ラフト糖脂質分子集合体の全体構造の解明を目指す。具体的には以下の点に関し研究を推進する。生体膜を模倣した環境における糖脂質の膜内でのコレステロールとの相互作用を、固体NMRを用いて精密に明らかにする。膜内でおこる脂質間相互作用が誘起する膜表面の糖脂質糖鎖の構造の変化を追跡する。これらの研究結果を併せて糖脂質分子複合体のスナップショット像を構築して、脂質ラフトにおける糖脂質分子集合体の本質

にせまる。

3. 研究の方法

(1)スフィンゴ脂質標識体の合成

アシル鎖 10 位に重水素標識を施したスフィンゴ糖脂質を化学合成した。ラクツシルセラミド標識体は、市販のセリンを原料に Boc 化、ワインレブアミド化、ビニル基の挿入を経て鍵中間体を得る。このケトン立体選択的に還元してオレフィンメタセシス反応により trans-オレフィン部とスフィンゴシン鎖を構築した。その後、1 位にラクツース供与体とグリコシル化して頭部基を挿入した。さらに脂肪酸部分をアミド結合にて導入して最後に脱保護することで目的のラクツシルセラミド標識体を得た。

グルコシルセラミド二重標識体は、市販の 2-¹³C-グルコースを原料として、これをグルコノラクツンに導いた後、NaBD₄ で還元することで 1 位に重水素を導入した二重標識部分を構築した。

重水素標識化ガングリオシド GM1 は、文献に従いアシル鎖を塩基によりいったん加水分解したのち、重水素化脂肪酸と縮合することで容易に得た。

(2)生体モデル膜の固体 NMR

合成した重水素化脂質と非標識脂質を混合した 50%水和 Multi lamellar vesicle (MLV) を作成して、固体 NMR を測定した。重水素固体 NMR は solid-echo 法により測定して、核四極子相互作用の大きさを解析した。¹³C{²H}REDOR 法を用いて 2 結合間の異種核双極子相互作用の大きさを求めた。これらの固体 NMR で得られる核四極子と異種核双極子の相互作用は局所の角度とオーダーの情報を含有しており、これを解析することで分子のオーダー度合いと角度が得られる。

4. 研究成果

(1)ラクツシルセラミドとコレステロールの脂質膜内での相互作用

多様な頭部基糖鎖構造を有するスフィンゴ糖脂質のなかで、二糖構造を有するラクツシルセラミドに着目した。ラクツシルセラミドは多くの糖脂質に共通する基本構造であり、細胞表面に存在しており、シグナル伝達や感染に關与する。この糖脂質を解析することで、スフィンゴ糖脂質と他の脂質分子の相互作用の基本情報の取得を目指した。

生体モデル膜中でおこるラクツシルセラミドとコレステロールとの相互作用解析を固体²H NMRを用いておこなった。この測定を達成するためにまずアシル鎖の 10 位に重水素を組み込んだラクツシルセラミド標識体を化学合成し、コレステロール有無での²H NMR スペクトルを測定した。その結果、コレ

ステロール非存在下ではリポソーム中でラクトシルセラミド同士が強く凝集したゲル相を形成し、NMR シグナルの広幅化をまねいた。これは、合成したラクトシルセラミドの DSC を測定したところ、78 度の高温域にゲル - 液晶の相転移温度を有していたことと一致する。その一方で、コレステロール存在下ではラクトシルセラミドはコレステロールと相互作用して高いオーダー効果を受けることが明らかになった。

さらに不飽和リン脂質と混合し擬似的な脂質ラフト様環境を再現した三成分からなるリポソームを作成して、コレステロールとの相互作用を調べた。本条件下においても、コレステロールが存在しないときは NMR シグナルが観測されず、ラクトシルセラミドは強い凝集状態にあることを示した。一方で、コレステロールが存在していると示される四極子分裂幅を観測した。このことは、コレステロールがラクトシルセラミド間の凝集をほぐし、コレステロールとラクトシルセラミドからなる微小なドメインを形成したことを示唆する結果と考えている。

脂質分子の相特異的な蛍光プローブである BODIPY-PC を用い、ラクトシルセラミド含有リポソーム (GUV) の蛍光顕微鏡による相分離を観測した。その結果、²H NMR で用いた各組成において、²H NMR で得られたラクトシルセラミド分子の運動性を裏打ちする相分離とドメイン形状が観測された。

(2) グルコシルセラミドとコレステロールの脂質膜内での相互作用と頭部基の傾き

コレステロールの誘起する頭部基の傾きの変化を観測するため、他のスフィンゴ糖脂質と共通脂質構造を有しつつ最小の頭部基をもつグルコシルセラミドを用いた。脂質膜中での頭部配向の変化を固体 NMR を用いて解析することを目指した。グルコース 1 位に重水素、2 位に炭素 13 標識を施したグルコシルセラミド二重標識体を化学合成した。合成したグルコシルセラミドの相転移温度を測定したところ 88 度を示し、常温ではゲル相状態であった。そこで、ジミリストイルホスホコリン (DMPC) をあらかじめ混合することでゲル相を解消させた生体モデル膜を作成した。この膜をコレステロールのあるときとないときで、重水素固体 NMR と REDOR 測定を行い、四極子分裂幅ならびに異種核双極子カップリングを解析した。その結果、コレステロールのオーダー効果に起因するシグナル変化を観測した。その一方で、グルコース頭部基の角度変化に依存するようなシグナル変化は観測されなかった。このことは、グルコシルセラミドの頭部配向は、コレステロールの有無に左右されないことを示唆する結果といえる。さらに大きな頭部基を有するようなスフィンゴ糖脂質での挙動に興味を持たれる。

(3) ガングリオシド GM1 とコレステロールの作るドメイン構造の精密解析

ガングリオシド GM1 は酸性のシアル酸を含む五糖を極性頭部基にもち、セラミド鎖を脂質鎖とした構造を有する。GM1 は種々の生理機能を有するスフィンゴ糖脂質の代表的な分子種の一つであり、脂質ラフトに局在して、コレラトキシンやアミロイド などの疾患関連タンパク質と結合することが知られている。しかしながら、GM1 がどのように他の脂質分子と相互作用して脂質ラフトへの分配されるのかはいまだよくわかっていない。そこで本研究では、脂質ラフトの主要な脂質成分であるスフィンゴミエリンとコレステロールに GM1 と併せて着目することで、四成分生体モデル膜中での GM1 の濃度依存的な局在変化を優れた蛍光脂質プローブと、固体 NMR を用いて明らかにした。

不飽和リン脂質 DOPC とスフィンゴミエリン、GM1、コレステロールから成る生体モデル膜を作成して、蛍光 GM1 プローブと蛍光スフィンゴミエリンプローブを併せて用いその膜上での分配を明らかにした。その結果、GM1 が低濃度域では、スフィンゴミエリン/コレステロールと共局在する一方で、高濃度になると GM1 のスフィンゴミエリンドメインへの局在が大きく低下して、さらにスフィンゴミエリンのドメインの大きさを顕著に縮小させることを明らかにした。

重水素固体 NMR を用いてこの脂質膜系におけるガングリオシド GM1 の脂質ラフトへの分配を精密に解析した。脂肪酸の 10 位に重水素標識を導入した GM1 とスフィンゴミエリンをそれぞれ合成し、種々の割合でスフィンゴミエリンと GM1 を加えた生体モデル膜を調製して固体 NMR を測定した。その結果、GM1 低濃度領域ではスフィンゴミエリン/コレステロールと相互作用して Lo ドメインに局在し、ドメインの安定化に寄与することを示すシグナルを得た。その一方で、GM1 が過剰に存在すると、頭部同士の静電反発によりスフィンゴミエリンドメインが分散して、スフィンゴミエリン、コレステロールと微小ドメインを形成することが示唆される結果を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Hanashima Shinya, Suga Akitsugu, Yamaguchi Yoshiki Bisecting GlcNAc restricts conformations of branches in model N-glycans with GlcNAc termini Carbohydrate Research (査読あり) 456 (2018) 53-60. DOI; 10.1016/j.carres.2017.12.002.

Malabed Raymond, Hanashima Shinya, Murata Michi, Sakurai Kaori

Sterol-recognition ability and membrane-disrupting activity of Ornithogalum saponin OSW-1 and usual 3-O-glycosyl saponins BBA Biomembrane 査読あり 1859 (2017) 2516-5525. DOI: 10.1016/j.bbmem.2017.09.019
Hossain Md. I, Hanashima Shinya, Nomura T, Lethu S, Tsuchikawa H, Murata M, Kusaka H, Kita S, Maenaka K. Synthesis and Th1-immunostimulatory activity of α -galactosylceramide analogues bearing a halogen-containing or selenium-containing acyl chain Bioorganic and Medicinal Chemistry 査読あり 24, (2016) 3687-3695.
DOI:10.1016/j.bmc.2016.06.007

〔学会発表〕(計 15 件)

Shinya Hanashima, Malabed Raymond, Michio Murata Cholesterol Interaction with Steroidal Saponins in Bilayer Membrane ICPAC2018 2018 年 シェムリアップ (招待講演)
石井亮・花島慎弥・梅川雄一・村田道雄 生体モデル膜中におけるグルコシルセラミド頭部の固体 NMR 配向解析 日本化学会 98 春年会 2018 年 千葉
大野詩織・花島慎弥・安田智一・土川博史・村田道雄・木下祥尚・松森信明・安藤弘宗・鈴木健一・J. Peter Slotte ガングリオシド GM1 とスフィンゴミエリンが形成するドメイン構造の動的解析 日本化学会 98 春年会 2018 年 千葉
佐々木克聡・花島慎弥・村田道雄 生体モデル膜中におけるコレステロール依存的な糖鎖の配向変化の解明を目指したガングリオシド GM3 標識体の合成研究 日本化学会 98 春年会 2018 年 千葉
花島慎弥、池田竜二、村田道雄、J Peter Slotte 生体膜モデル中におけるラクトシルセラミドの脂質間相互作用とドメイン形成の解析 第 36 回日本糖質学会年会 2017 年 旭川
池田竜二、土川博史、花島慎弥、J. Peter Slotte、村田道雄 重水素固体 NMR と蛍光分光法を用いたラクトシルセラミドとコレステロールの生体モデル膜中での相互作用解析 日本化学会第 97 春季年会 2017 年 神奈川
中野幹人、花島慎弥、原利明、村田道雄、樺山一哉、深瀬浩、安藤弘宗、木曾真、鈴木健一 蛍光分光法を用いた生体モデル膜中におけるガングリオシド GM3 とタンパク質 EGFR 膜貫通ドメインの相互作用解析 日本化学会第 97 春季年会 2017 年 神奈川
石井亮、花島慎弥、村田道雄 脂質膜中でのグルコシルセラミド頭部基の配向解析を目指したフッ素化アナログ化合物の合成研究 日本化学会第 97 春季年

会 2017 年 神奈川
Shinya Hanashima, Ryuji Ikeda, Shiori Ohno, Michio Murata Acyl chain mobility of Glycosphingolipids in Hydrated Membrane as Examined by Solid State ^2H NMR ICMRBS-21 2016 年 京都
Shinya Hanashima Solid state NMR study for the glycosphingolipid interactions in raft model membrane 1st BMS conference 2016 年 ベルリン (招待講演)
南角拓実、花島慎弥、村田道雄 重水素標識スフィンゴ糖脂質の合成と生体モデル膜における固体 NMR 解析 日本化学会第 96 春季年会 2016 年 京都
高田美沙、花島慎弥、土川博史、安田智一、村田道雄、木下祥尚、松森信明、安藤弘宗、木曾真、鈴木健一、楠見明弘、J. Peter Slotte ガングリオシド GM1 およびスフィンゴミエリンが共存するリン脂質膜におけるドメイン形成の蛍光イメージング解明 日本化学会第 96 春季年会 2016 年 京都
花島慎弥、南角拓実、池田竜二、村田道雄 生体膜における脂質間の相互作用解明に向けた糖脂質標識体の合成と NMR 測定 第 34 回日本糖質学会年会 2015 年 東京
池田竜二、花島慎弥、土川博史、村田道雄 固体 ^2H -NMR を用いたラクトシルセラミドとコレステロールの生体膜モデル中での相互作用解析 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2015 年 東京
高田美沙、花島慎弥、村田道雄、阿野光、木下祥尚、松森信明、安藤弘宗、木曾真 新規蛍光標識脂質を用いた GM1 含有モデル膜における脂質ラフトの動的挙動解明 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2015 年 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

花島 慎弥 (Shinya Hanashima)
大阪大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：50373353