様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １６ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2024
課題番号：２１Ｋ０６５３０

研究課題名（和文）ガングリオシドのアシル鎖構造を介した自然免疫制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Regulation of innate immune responses through acyl-chain structures of gangliosides

研究代表者

狩野　裕考（KANOH, Hirotaka）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科（藤沢）・特任助教

研究者番号：４０７７４２７９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：自然免疫受容体Toll-like receptor（TLR）やCaspase（Casp）ファミリーを介した慢性炎症は、がんやメタボリックシンドロームをはじめとする多様な疾患の強力な増悪因子となる。しかし、その活性化制御に関与する内因性リガンドは多岐に及び、近年でも発見が相次ぐなど、その全容解明には至っていない。本研究では、スフィンゴ糖脂質：ガングリオシドGM3が、TLR4などのリポ多糖受容体の内因性リガンドとして機能し、炎症応答および細胞死応答を誘発すること、その生理活性が脂質部分（セラミド）のアシル鎖構造（鎖長や不飽和度）の違いによって制御されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん、敗血症、重度のメタボリックシンドロームなどの炎症性疾患は、現代の医学・医療における重要な疾患であるとともに、未だ完治に向けた治療法の確立には至っておりません。本研究の成果は、炎症性疾患の背景にある、未知のメカニズムに焦点をあて、その一端を新たに明らかにしたものです。本研究の成果や、今後の研究の発展により、新たな治療法や診断法の開発につながることが期待されます。

研究成果の概要（英文）：The Toll-like receptor (TLR) and caspase (Casp) families are involved in chronic inflammation, which strongly promotes cancer, metabolic syndrome, and other inflammatory disorders. We found that GM3 ganglioside, a glycosphingolipid, acts as an endogenous ligand for lipopolysaccharide receptors, such as TLR4. The regulatory mode of action depends on the acyl chain structure of the ceramide, i.e., the length and degree of fatty acid desaturation.

研究分野：生物系薬学

キーワード：スフィンゴ糖脂質　炎症　細胞死

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景
自然免疫受容体 Toll-like receptor（TLR）や Caspase（Casp）ファミリーを介した慢性炎症は、がんやメタボリックシンドロームをはじめとする多様な疾患の強力な増悪因子となる。しかし、TLR や Caspase の活性化に関与する内因性リガンドは多岐に及び、近年でも発見が相次ぐなど、その全容解明には至っていない。近年、糖鎖とセラミドから構成される脂質＝スフィンゴ糖脂質による免疫制御メカニズムが急速に明らかとなっている。申請者は、肥満時に血清中で増加するスフィンゴ糖脂質：ガングリオシド GM3 が、リポ多糖受容体：TLR4 の内因性リガンドとして炎症応答を誘発すること、その生理活性が脂質部分（セラミド）のアシル鎖構造（鎖長や不飽和度）の違いによって制御されることを見出した（Kanoh H et al, EMBO J. 39: e101732, 2020）。

２．研究の目的
本研究の目的は、種々の脂肪酸構造をもつガングリオシド GM3 分子種を介したリポ多糖受容体 TLR4 の制御機構、ならびに、近年発見された細胞内リポ多糖受容体 Casp4/11 の制御機構を解明し、自然免疫応答および細胞死制御におけるスフィンゴ糖脂質の機能的役割を新たに示すことである。

３．研究の方法
自然免疫系細胞として、マウス単球・マクロファージ系培養細胞 RAW264.7 細胞を用いた。GM3 分子種や、関連する生合成前駆体および代謝産物であるスフィンゴ糖脂質、セラミド骨格をもつ異なるクラスのスフィンゴ脂質と、大腸菌由来 LPS を用いて、細胞を刺激し、炎症性サイトカインの産生量を ELISA 法で評価した。また、LPS 合成経路欠損型の BL21(DE3)大腸菌を用いて、GM3 と相互作用する因子について組み換えタンパク質の発現・精製を行った。

４．研究成果
　初年度は、以下の研究成果を得ることができた。
(1) GM3 分子種および各種スフィンゴ糖脂質による炎症性細胞死の誘導制御機構の解析：骨髄由来マクロファージ・樹状細胞を用い、LPS 誘導性のパイロトーシス（LDH 放出、IL-1a 放出）に対する GM3 分子種および各種スフィンゴ糖脂質の作用を検討することで、糖鎖構造およびセラミドのアシル鎖構造に応じた構造活性相関を解析した。短いアシル鎖構造をもつ長鎖 GM3 分子種は、LPS 誘導性の IL-1a 放出を抑制し、反対に、より長いアシル鎖構造をもつ極長鎖 GM3 分子種は、LPS 誘導性の IL-1a 放出を増大させた。一方、GM3 の生合成前駆体として異なる糖鎖構造をもつスフィンゴ糖脂質では、アシル鎖構造に依存した IL-1a 放出制御作用を明確には確認できなかった。また、GM3 分子種で見られた IL-1a 放出の増大作用は、GM3 の代謝産物として N-アセチルガラクトサミンが付加した GM2 では減弱し、ほとんど見られなかった。以上のことから、スフィンゴ糖脂質による炎症性細胞死の誘導制御機構は、その糖鎖構造およびセラミドのアシル鎖構造の双方によって制御されていることがわかった。
(2) 阻害剤、KO 細胞を用いた炎症性細胞死の誘導経路の解析：各種阻害剤、KO 細胞を用いて、GM3 分子種による炎症性細胞死の誘導経路を解析した結果、GM3 によるパイロトーシス経路の制御が示唆された。パイロトーシスの起点となる Caspase-1/4/11 に対する阻害剤（VX-765）、マウス Gasdermin D に対する阻害剤（Necrosulfonamide）によって、極長鎖 GM3 による IL-1a 放出の増大が抑制され、一方で、極長鎖 GM3 による TNF-a 産生の増大は抑制されないことが確認された。加えて、Caspase-11-KO 細胞、Gasdermin D-KO 細胞においても、極長鎖 GM3 による IL-1a 放出の増大が抑制された。以上のことから、非古典的経路を経由するパイロトーシスに対する GM3 分子種の関与が示唆された。
　二年目では、以下の研究成果を得ることができた。
(1) 組み換え全長 Casp4/11 発現系の構築：IL-1a は非古典的インフラマソームを介したパイロトーシスによって放出されることから、その構成因子である Casp4/11（細胞内 LPS 受容体）が、各種脂肪酸構造の GM3 分子種によって直接的に活性化制御を受ける可能性が考えられた。そこで、大腸菌発現系を用い、Casp4/11 の His-tag 融合タンパク質発現系を構築した。リガンド認識後の自己切断活性を低減した Casp4(C258A)および Casp11(C254A)変異体として発現させることで、リガンド結合によって誘導される多量体形成を、全長型タンパク質の複合体として観察可能なコンストラクトとした。宿主は、LPS 合成経路欠損型の大腸菌発現系を用いることで、発現宿主内における意図しない多量体形成および活性化を低減できるよう考慮した。
(2) 組み換え全長 Casp4/11 精製系および多量体アッセイ系の確立：LPS 合成経路欠損型の大腸菌発現系であっても、LPS 生合成中間体である Lipid-IVa は産生されることから、既報に基づいた界面活性剤による内因性代謝物洗浄ステップと、さらに界面活性剤自体の除去ステップを、Affinity 精製中に組み込むことで、より高純度の精製を可能にした。Affinity 精製およびゲル濾過担体によるバッファー交換後の Caspase-4/11 は SDS-PAGE においてほぼ単一バンドであり、

ケミカルクロスリンクによる多量体検出アッセイにおいても単量体として得られていることが確認できた。これを用いることで、各種のスフィンゴ糖脂質分子種による多量体形成アッセイの確立を行なった。

三年目では、以下の研究成果を得ることができた。

（1）組み換え全長 CASP4 タンパク質を用いた多量体形成アッセイに基づくリガンド解析：昨年度までに確立した、LPS 合成経路欠損大腸菌を用いた組み換え全長 CASP4/11 タンパク質の発現系、および、内因性脂質代謝物の洗浄ステップを加えた精製系を用いることで、組み換えヒト CASP4(C258A)タンパク質を精製し、各種脂肪酸構造のガングリオシド GM3 を加えた際に、その活性化状態の指標となる多量体が形成されるか検討した。その結果、加えたガングリオシド GM3 の脂肪酸構造の違い（鎖長、不飽和度など）によって、異なる分子量帯のオリゴマーが形成されることが分かった。GM3 によって誘導された CASP4 オリゴマーの分子量と、これまでにマクロファージ細胞に対する刺激実験で得られていた生理活性に、明瞭な相関が認められた。このことから、GM3 の脂肪酸構造の違いによって、そのリガンド性および CASP4 を介したサイトカイン放出が制御されている可能性を、生化学レベルで確認することができた。

（2）排除限界クロマトグラフィーを用いたより高純度な組み換え全長 CASP4 タンパク質精製系の確立：これまでに確立した精製系により、組み換え CASP4 タンパク質は、ほぼ単量体として得られていた。その一方で、より高度な分析実験に進むためには、微量に含まれる単量体以外のタンパク質成分や界面活性剤成分を、より完全に除去することが必要であった。そこで、アフィニティー精製・バッファー交換に加えて、排除限界クロマトグラフィーによる単量体分子量成分の分取・精製を行った。得られた高純度単量体タンパク質を用いることで、リガンドに対する応答性や、形成される多量体の分子量帯が、これまでよりも明瞭に検出・判別できることが分かった。

最終年度は、以下の研究成果を得ることができた。

(1)組み換え全長 Casp4/11 を用いた多量体アッセイ：昨年度に確立した組み換え全長 Casp4/11 精製系を用いて、組み換えタンパク質を発現・精製し、各種のスフィンゴ脂質およびリン脂質との相互作用解析を行った。これまでに得られていた GM3 との相互作用解析に加えて、より広範なスフィンゴ脂質・スフィンゴ糖脂質との相互作用を網羅的に調べることが可能になった。その結果、組み換え全長 Casp4/11 と相互作用して、オリゴマー形成を誘導しうるスフィンゴ脂質・スフィンゴ糖脂質分子種を新たに見出すことができた。(2)組み換え全長 Galectin-3 の精製系の確立：Casp4/11 に加えて、ガングリオシドの糖鎖構造を認識しうる糖鎖認識タンパク質として、組み換え全長 Galectin-3 の発現・精製系を確立した。LPS 合成経路欠損大腸菌による発現系、アフィニティー精製系、ゲルろ過クロマトグラフィー精製系を用いて、細胞レベルからタンパク質レベルに至るまで広く適用可能な精製レベルの Galectin-3 を得た。

研究期間全体を通して実施した研究により、(1) GM3 分子種および各種スフィンゴ糖脂質によるパイロトーシス誘導制御機構の解析，(2) 阻害剤、KO 細胞によるパイロトーシス誘導経路の解析，(3) 組み換え全長 Casp4/11 精製系および多量体アッセイ系の確立，(4) 組み換え全長 Galectin-3 の精製系の確立，(5) 多量体アッセイによるスフィンゴ脂質・スフィンゴ糖脂質との相互作用解析など、十分な成果を得ることができた。今後は、ウェスタンブロッティング法による細胞内 Casp4/11 および GsdmD の活性化の検出や、マウス個体における GM3 分子種の炎症制御作用等の解析により、分子、細胞、個体レベルの制御メカニズムの解明が期待される。また、本研究によって確立した実験系を用いて、より広範なスフィンゴ脂質・糖脂質分子種から、新たに自然免疫応答・細胞死応答を制御する分子種を網羅的に同定し、全体像の解明につなげたい。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Inokuchi Jin-ichi、Kanoh Hirotaka	４．巻 9
２．論文標題 Pathophysiological Significance of GM3 Ganglioside Molecular Species With a Particular Attention to the Metabolic Syndrome Focusing on Toll-Like Receptor 4 Binding	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	６．最初と最後の頁 918346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2022.918346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Inokuchi Jin‐ichi、Kanoh Hirotaka、Inamori Kei‐ichiro、Nagafuku Masakazu、Nitta Takahiro、Fukase Koichi	４．巻 -
２．論文標題 Homeostatic and pathogenic roles of the GM3 ganglioside	５．発行年 2021年
３．雑誌名 The FEBS Journal	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Kanoh Hirotaka	４．巻 142
２．論文標題 Homeostatic and Pathophysiological Regulation of Toll-like Receptor 4 Signaling by GM3 Ganglioside Molecular Species	５．発行年 2022年
３．雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	６．最初と最後の頁 195～203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.21-00193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Miura A, Manabe Y, Suzuki KGN, Shomura H, Okamura S, Shirakawa A, Yano K, Miyake S, Mayusumi K, Lin CC, Morimoto K, Ishitobi J, Nakase I, Arai K, Kobayashi S, Ishikawa U, Kanoh H, Miyoshi E, Yamaji T, Kabayama K, Fukase K	４．巻 146
２．論文標題 De Novo Glycan Display on Cell Surfaces Using HaloTag: Visualizing the Effect of the Galectin Lattice on the Lateral Diffusion and Extracellular Vesicle Loading of Glycosylated Membrane Proteins	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Journal of the American Chemical Society	６．最初と最後の頁 22193～22207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.4c02040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計8件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名
石川 潮、狩野 裕考、新田 昂大、鈴木 明身、井ノ口 仁一

２．発表標題
ガングリオシドGM3分子種の脂肪酸構造による炎症性細胞死の制御メカニズム

３．学会等名
第9回がんと代謝研究会，松山，2023年5月

４．発表年
2023年

１．発表者名
石川 潮、狩野 裕考、新田 昂大、稲森 啓一郎、鈴木明身、井ノ口 仁一

２．発表標題
ガングリオシドGM3の脂質構造による新規パイロトーシス制御機序

３．学会等名
第62回日本薬学会東北支部大会，仙台，2023年10月

４．発表年
2023年

１．発表者名
石川 潮、狩野 裕考、新田 昂大、鈴木 明身、井ノ口 仁一

２．発表標題
ガングリオシド GM3 のアシル鎖による炎症性細胞死制御メカニズム

３．学会等名
第17回東北糖鎖研究会，桐生，2023年11月

４．発表年
2023年

１．発表者名
狩野 裕考，新田 昂大，石川 潮，鈴木 明身，井ノ口 仁一

２．発表標題
ガングリオシドGM3のアシル鎖構造によるTLR4活性化制御

３．学会等名
日本生化学会東北支部第88回例会・シンポジウム

４．発表年
2022年

１．発表者名
石川 潮, 狩野 裕考, 新田 昂大, 鈴木 明身, 井ノ口 仁一

２．発表標題
ガングリオシドGM3によるパイロトーシス制御の解析

３．学会等名
日本生化学会東北支部第88回例会・シンポジウム

４．発表年
2022年

１．発表者名
石川 潮, 狩野 裕考, 新田 昂大, 鈴木 明身, 井ノ口 仁一

２．発表標題
ガングリオシドGM3の分子種によるパイロトーシス制御の解明

３．学会等名
第45回日本分子生物学会年会

４．発表年
2022年

１．発表者名
石川 潮、狩野 裕考、新田 昂大、鈴木 明身、井ノ口　仁一

２．発表標題
ガングリオシドGM3の分子種差によるパイロトーシス制御の解析

３．学会等名
日本薬学会第143年会

４．発表年
2023年

１．発表者名
尾股　明、石川　潮、狩野　裕考、新田　昂大、田中　杜和、稲森　啓一郎、鈴木　明身、井ノ口　仁一

２．発表標題
ガングリオシド発現ヒト型マウス系統の新規同定とゲノム構造解析

３．学会等名
日本薬学会第143年会

４．発表年
2023年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関