

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19112

研究課題名（和文）糖鎖-ガレクチン相互作用による膜タンパク質動態制御機構の解明

研究課題名（英文）Modulation of Membrane Protein Dynamics by Glycan-Galectin Interaction

研究代表者

樺山 一哉（Kabayama, Kazuya）

大阪大学・放射線科学基盤機構・教授

研究者番号：00399974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、合成糖鎖とガレクチンとの相互作用によるタンパク質の動態制御を生き細胞で実現することを目的とした。内在化制御に関しては膜タンパク質だけでなく抗体を用いても実施した。抗HER2抗体に対して蛍光プローブを導入したガラクトース末端を有する2分岐9糖を結合し、HER2高発現細胞に添加したところ、ガラクトースに高親和性を持つガレクチン3存在下で内在化が抑制され、補体依存性細胞傷害も向上した。同様にガラクトース末端を有する糖鎖を導入した蛍光標識膜タンパク質が、ガレクチン3により側方拡散が制御されることを、顕微鏡による分子動態形跡により実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は合成糖鎖を生細胞上で機能させ、生命現象に関与するタンパク質との相互作用を実証する萌芽的検証実験であり、研究成果を論文として発出できたことは、これまで糖鎖構造の複雑性から詳細な分子構造まで議論できなかった本分野において、学術的に意義深い。また、膜タンパク質の側方拡散制御についても、これまでの遺伝子制御や代謝制御による糖鎖組成変化の複雑さから脱却し、合成糖鎖を用いて明確に糖鎖構造の違いによる相互作用を確認できたことは、当該分野において化学と生物を融合した新たな研究領域の創出に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to control protein dynamics in living cells through interactions between synthetic glycans and galectins. Internalization control was conducted using not only membrane proteins but also antibodies. Galactose-terminated synthetic glycans were conjugated to an anti-HER2 antibody tagged with a fluorescent probe. When this conjugate was added to HER2-overexpressing cells, internalization was suppressed in the presence of galectin-3, which has a high affinity for galactose, and complement-dependent cytotoxicity was enhanced. Similarly, it was demonstrated through microscopic observation of molecular dynamics that the lateral diffusion of fluorescent labeled membrane proteins modified with galactose-terminated glycans were regulated by galectin-3.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：合成糖鎖 ガレクチン ガラクトース イメージング galectin-3 抗体

1. 研究開始当初の背景

ガレクチンは脊椎動物で発見された可溶性の β -ガラクトシド結合性レクチンであり、発生、分化、炎症、免疫、がん、感染など幅広く生命現象に関与している。1994年 Cell 誌における国際提案で正式名称が決まり、それ以来幾多の研究がなされ今日まで多くの成果が蓄積している。一方、その生物機能、内在性リガンド、分泌機構など、全く明らかにされていない部分も多く残されている。本研究は大変挑戦的ではあるが、申請者らが構築した合成糖鎖提示細胞を用いることで、糖タンパク質糖鎖とガレクチンの相互作用を分子構造レベルで解き明かせると考えた。この実証が成功すれば、ガレクチンの発現変化により発症する病態、特にがんの治療法の開発に繋げることも期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、合成糖鎖とガレクチンとの相互作用によるタンパク質の動態制御を生きた細胞で実現することを目的とした。内在化制御に関しては膜タンパク質だけでなく抗体を用いても実施する。同様にガラクトース末端を有する糖鎖を導入した蛍光標識膜タンパク質が、ガレクチン3により側方拡散が制御されることを、顕微鏡による分子動態形跡により実証する。

3. 研究の方法

1) 合成糖鎖標識抗体の作成

0.5 $\mu\text{g/mL}$ または 1 $\mu\text{g/mL}$ の抗体を添加した 10 kDa の Filtration tube に、HV フィルターでろ過した PBS を加え、10000 G で 10 分間遠心ろ過することによって Buffer の置換を行った。これを 5 回行った後に、蛍光(TMR)標識を行い、PBS による Buffer の置換を 5 回行った。適宜 PBS を加えることで濃度を 1×10^{-6} M に調整し、DMSO で溶解した MAL-dPEG@12-NHS ester を 5×10^{-5} M になるように添加し、室温で 30 分間反応させた。PBS による Buffer の置換を 5 回行った後に、H₂O で溶解した糖鎖を 1×10^{-4} M になるように添加し、室温で 2 時間反応させた。PBS による Buffer の置換を 5 回行い、SDS-PAGE と銀染色によって糖鎖の結合を確認した。

2) TMR 標識抗 HER2 抗体のイメージング

BT474 細胞を 35 mm glass bottom dish に 2 日間培養し、培地を除去して終濃度 2.0 $\mu\text{g/mL}$ になるように TMA 標識抗 HER2 抗体を 200 μL 滴下し、30 分間上記設定のインキュベーターで反応させた。その後培地を除去して Saline で洗浄し、細胞に適した培地を加えて一定時間上記設定のインキュベーターに静置した。その後培地を除去して Live Cell Imaging Solution を添加し、イメージング解析を行った。細胞内取り込み量の粒子カウントは ImageJ を用いた。

3) CDC(補体依存性細胞傷害)活性の測定

96 well plate に播種した細胞 1×10^5 cells に対して、培地を用いて調製した 0.5 $\mu\text{g/mL}$ の抗体を、インキュベーターで 30 分間反応させた。(対照実験には Saline を加えた。) 抗体を含む培地を除去した後に、新しい培地を添加した後、補体を添加し、インキュベーター内で 1 時間反応させた。(対照実験には Triton-X 100 を加えた。) 補体を含む培地を除去した後に、Saline で 1 回洗浄を行い、培地を 90 μL 加えた。これに Cell Counting Kit-8 を 10 μL 加え、インキュベーターで 3 時間反応させた。反応後、吸光マイクロプレートリーダーを用いて細胞生存率を測定した。

4) TMR 標識 HER2 の FRAP 法による動態解析

標的タンパク質として HER2-HT (HaloTag を融合した HER2 タンパク質) を用いて、合成糖鎖リガンド-ガレクチン 3(Gal-3)相互作用によるタンパク質動態制御を評価した。HeLa WT 細胞に発現させた HER2-HT に、Alexa Fluor 488 標識 HaloTag リガンド (AF488) もしくは合成糖鎖リガンドを導入後、Gal-3 の存在下/非存在下で FRAP 測定を行った。

4. 研究成果

1) ガラクトース末端を持つ糖鎖を導入した抗体は Gal-3 の添加により細胞膜上に一定時間保持できる

下図(図1左)のガラクトース末端の9糖骨格をもつ糖鎖(蛍光プローブとしてTMRを標識)を導入した抗HER2抗体を、HER2が高発現しているBT474細胞に添加し、Gal-3の存在下で18時間培養した。その結果Gal-3非存在下と比べて顕著に細胞膜への抗体の保持が見られ、細胞膜に強い蛍光が見られた。(図1右)

*図は、
Manabe Y., Kabayama K., Fukase K. *et al.*
Angew. Chem. Int. Ed. **2023**, e202304779 より抜粋

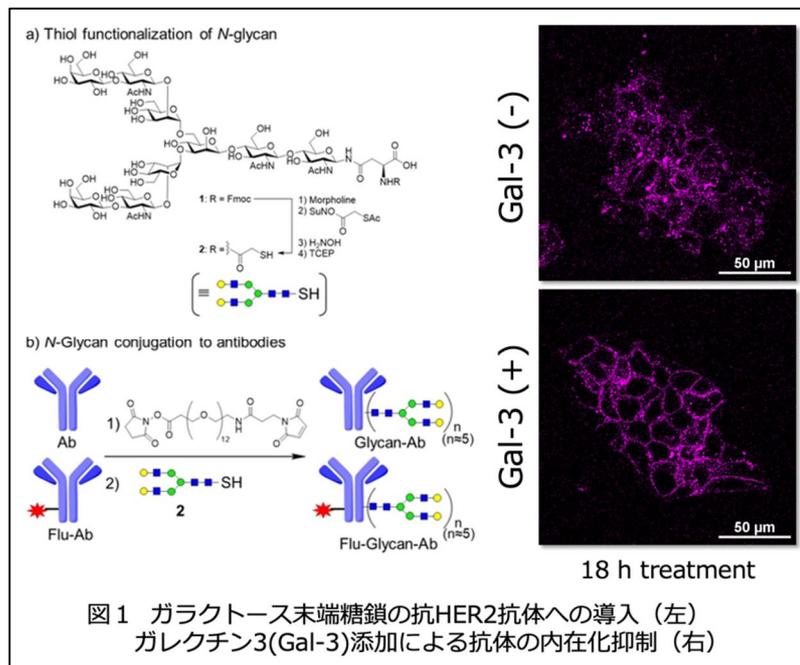


図1 ガラクトース末端糖鎖の抗HER2抗体への導入(左)
ガレクチン3(Gal-3)添加による抗体の内化抑制(右)

2) ガラクトース末端を持つ糖鎖を導入した膜タンパク質 HER2 は Gal-3 の添加により側方拡散速度が低下する

FRAP法による動態解析結果を図2に示す。Gal-3親和性9糖リガンド(図2に構造を記載)を導入したHER2の一過性に発現したHeLa細胞において、Gal-3の添加により動的成分の低下(=蛍光回復率の低下)ならびに $t_{1/2}$ の値の顕著な増加が観察された。すなわち、ガラクトース末端糖鎖を有する膜タンパク質HER2は、Gal-3が細胞膜直上で形成するネットワーク(ガレクチン格子)との相互作用により側方拡散が抑制されることを実証した。

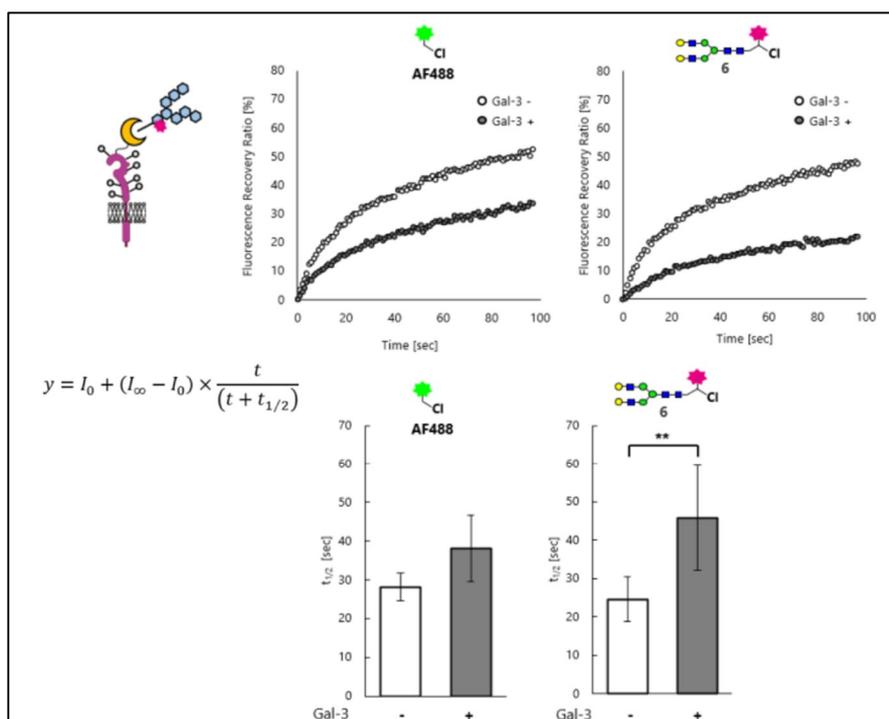


図2 HaloTag融合HER2タンパク質のGal-3結合糖鎖導入による膜流動性変化(FRAP解析)
上図) Gal-3(グラフ中の灰色丸/白色丸)存在/非存在下でのHER2-HTの蛍光回復曲線。
HER2-HTを発現するHeLa細胞を250 nMのAF488リガンドまたは糖鎖リガンド6で37℃、
15分間処理した後、細胞を2回洗浄し、FRAP(光褪色後蛍光回復法)による解析を行った。
Gal-3の処理濃度は100 μg/mL。100秒間の蛍光回復率を測定。下図) $t_{1/2}$ は、非線形カーブ
フィッティングのモデル式(図中の式)により算出しグラフ化した。データは生物学的に独立した
6-7 (n = 6-7) 反復の結果を表す。エラーバーは平均値の標準偏差を表す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Yusuke, Kabayama Kazuya	4. 巻 2613
2. 論文標題 Structural Analyses of the Glycolipids in Lipid Rafts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glycolipids: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 2613)	6. 最初と最後の頁 145 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2910-9_12	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 Hayashi Yasuhiro, Huang Xuhao, Tanikawa Takashi, Tanigawa Kazunari, Yamamoto Mizuki, Gohda Jin, Inoue Jun-ichiro, Fukase Koichi, Kabayama Kazuya	4. 巻 173
2. 論文標題 Reactive oxygen species are associated with the inhibitory effect of N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide on the entry of the severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 337-342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad020	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 Huang Xuhao, Kaneda-Nakashima Kazuko, Kadonaga Yuichiro, Kabayama Kazuya, Shimoyama Atsushi, Ooe Kazuhiro, Kato Hiroki, Toyoshima Atsushi, Shinohara Atsushi, Haba Hiromitsu, Wang Yang, Fukase Koichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Astatine-211-Labeled Gold Nanoparticles for Targeted Alpha-Particle Therapy via Intravenous Injection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 2705 ~ 2705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics14122705	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 Hilmayanti Erina, Nurlelasari, Supratman Unang, Kabayama Kazuya, Shimoyama Atsushi, Fukase Koichi	4. 巻 204
2. 論文標題 Limonoids with anti-inflammatory activity: A review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 113469 ~ 113469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2022.113469	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 Chang Tsung-Che, Manabe Yoshiyuki, Ito Keita, Yamamoto Ryuku, Kabayama Kazuya, Ohshima Shino, Kametani Yoshie, Fujimoto Yukari, Lin Chun-Cheng, Fukase Koichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Precise immunological evaluation rationalizes the design of a self-adjuvanting vaccine composed of glycan antigen, TLR1/2 ligand, and T-helper cell epitope	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 18985 ~ 18993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2RA03286D	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 Manabe Yoshiyuki, Iizuka Yuki, Yamamoto Ryuku, Ito Keita, Hatano Kanae, Kabayama Kazuya, Fukase Koichi	4. 巻 62
2. 論文標題 Improvement of Antibody Activity by Controlling Its Dynamics Using the Glycan-Lectin Interaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202304779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202304779	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三浦彩音、真鍋良幸、樺山一哉、深瀬浩一
2. 発表標題 糖鎖構造による B 細胞活性の調節
3. 学会等名 第14回光塾
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黄 栩昊、樺山 一哉、林 康広、深瀬 浩一
2. 発表標題 FRAP 法を用いたフェンレチニドによる膜流動性解析
3. 学会等名 第14回光塾
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦彩音、樺山一哉、真鍋良幸、三宅秀斗、白川明日香、初村洋紀、山地俊之、鈴木健一、深瀬浩一
2. 発表標題 合成糖鎖を生やした細胞で観る膜分子の動態
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黄栩昊、樺山一哉、林康宏、深瀬浩一
2. 発表標題 FRAP法を用いたフェンレチニドによる膜流動性変化の解析
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 黄栩昊、樺山一哉、林康宏、深瀬浩一
2. 発表標題 FRAP法を用いたフェンレチニドによる膜流動性変化の解析
3. 学会等名 第15回セラミド研究会学術集会・第16回スフィンゴセラピィ研究会 合同年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真鍋良幸、三浦彩音、三宅秀斗、鈴木健一、樺山一哉、深瀬浩一
2. 発表標題 合成生物学的アプローチによる細胞表層糖鎖ネットワークの解析
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦彩音、樺山一哉、真鍋良幸、三宅秀斗、白川明日香、初村洋紀、山地俊之、鈴木健一、深瀬浩一
2. 発表標題 糖鎖 - ガレクチン相互作用の分子化学的解析
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第33回サマースクール
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuya Kabayama, Jinichi Inokuchi	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Humana	5. 総ページ数 314
3. 書名 Glycolipids: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 2613)	

〔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