

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23770155

研究課題名（和文） 新規光学技術を用いた糖脂質と膜受容体の相互作用解析

研究課題名（英文） Analyses of the interaction between glycolipids and membrane receptor by novel optics technology

研究代表者

樺山 一哉 (KABAYAMA KAZUYA)

東海大学・糖鎖科学研究所・准教授

研究者番号：00399974

研究成果の概要（和文）：脂質二重層は、細胞膜の基本的構成要素である。近年の研究によれば、多様な脂質分子集団は無秩序に分布しているのではなく、例えば、細胞膜表面に局在するスフィンゴ糖脂質とコレステロールとの安定した会合により、他の脂質領域とは異なったマイクロドメイン（脂質ラフト）が存在していると考えられている（脂質ラフト仮説）。本研究では脂質ラフトの組成変化が膜受容体分子の局在およびシグナリングに影響を及ぼすメカニズムに関する研究を行った。具体的には、光退色後蛍光回復法(FRAP)および共焦点顕微鏡の光電子増倍管をもちいた蛍光相関スペクトル法(point-scan FCS)などにより膜脂質変化が膜受容体の動態に関与することを数値化して解析を行った。脂質ラフトの組成変化の方法としては、糖転移酵素を遺伝的に再構成した細胞を数種類用いて、上皮成長因子受容体の活性測定および糖脂質生合成阻害剤のD-PDMPを用いた検証を行った。その結果、脂質ラフトを形成していると考えられる糖脂質の組成変化は受容体の活性および膜流動性に影響することが実証できた。また、糖脂質とタンパク質の相互作用を検出する新しい手法として蛍光相互相関スペクトル法(point-scan FCCS)の初期検討を行い、市販の共焦点顕微鏡でガングリオンシドGM1とその結合分子であるコレラトキシンの相互作用を検出することができた。

研究成果の概要（英文）：Lipid bilayer is an elemental structural component of the cell membrane. Latest researches show that various lipid molecules are not distributed disorderly and we have recognized it as “lipid microdomain”. Lipid microdomains are dynamic structures constantly in the process of either association or dissociation. It has been suggested that these microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids could play an important rule in many cellular processes including signal transduction, membrane trafficking, cytoskeletal organization, and pathogen entry.

In my laboratory, we study about the mechanism which composition change of lipid microdomain influence localization and signaling of membrane receptors. By novel optics technology such as fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), we are trying to quantify this interaction and elucidate the rule of lipid microdomain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：機能生物化学

科研費の分科・細目：

キーワード：イメージング、糖脂質、マイクロドメイン、膜受容体、ガングリオシド、蛍光顕微鏡、成長因子受容体、糖鎖、生細胞イメージング

1. 研究開始当初の背景

糖脂質マイクロドメインの機能や構造を解析するにあたり、現時点において幾つかの問題点があげられている。その中の一つに、密度勾配遠心法による膜マイクロドメインの分画法だけでは糖脂質マイクロドメインを論じる上で、総括的な解釈が難しいことがある。この問題に関しては、これまでも多くの場で議論されてきているが、結論はでていない。我々の研究室では、問題の解決策の一つとして、生化学的なデータに加えて、蛍光顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより実態に迫ろうと考えている。まず始めに、糖脂質再構成細胞の膜流動性と成長因子受容体のシグナル伝達の相関を検討するため、FRAP法により解析を行った。

二番目に我々は、蛍光顕微鏡を用いて簡便に動態を解析する手法を検討した。蛍光相関スペクトル法 (FCS; Fluorescence correlation spectroscopy) は顕微鏡の焦点領域を通過する蛍光分子の発する光子のゆらぎを相関関数に置き換えることで、目的分子の拡散係数や分子量、さらには分子の大きさまで計測できる手法である。GrattonらはFCSでもちいる高感度の電子増倍管 APD (Abaranche photo diode) の代わりに一般の共焦点顕微鏡に用いられる PMT (Photo multiplier tube) を用いて光の揺らぎを計測し、APDの正確性をPMTで補償するために取得データを分割し平均値から評価するという解析法を確立した。ここでは上記解析法を point-scan FCS法と表記するが、今後多くのケーススタディが提示されれば、共焦点顕微鏡を用いたスタンダードな動態解析法への発展するのではないかと期待している。さらには、FCSの応用で2色の蛍光分子の同時性を解析できる蛍光相互相関スペクトル法 (FCCS; Fluorescence cross correlation spectroscopy) にも移行することが可能であり、生化学の分野では「分子の動く速さがどの位なのか？」よりも「分子同士に相互作用があるのか？」を知りたい事のほうが多い (と感じる)。FCSを応用したFCCS (蛍光相互相関スペクトル法) が概念的にも受け入れられやすいと考える筆者としては、糖脂質とタンパク質の相互作用解析に利用できるのではないかと模索している。

2. 研究の目的

細胞膜にはスフィンゴ糖脂質やコレステロールに富むマイクロドメインとよばれる微小領域が存在し、膜受容体を介したシグナル伝達の場合として機能していると言われている。また現在、糖脂質と成長因子受容体の相互作用に関する報告がなされているが、それらの詳細なメカニズムは解明されていない。そこで、我々は糖脂質を再構成し

た細胞を用いてシグナル伝達と細胞膜上の糖脂質組成の変化にどのような関係があるのかを調べた。また、糖脂質とタンパク質の相互作用を簡便に計測できるシステムとして上記の point-scan FCS を2蛍光の相互相関に拡張した point-scan FCCS が有用であると考え、検討を開始した。

3. 研究の方法

3-1 糖脂質再構成細胞の膜流動性と成長因子受容体のシグナル伝達の相関

比較には国立感染症研究所細胞化学部門 (部長：花田賢太郎博士) の山地俊之研究員より GlcCer (グルコシルセラミド) synthase と GM3 synthase の cDNA および Gb3 synthase の shRNA を、レトロウイルスを用いて導入し糖脂質組成を変化させた3種類の細胞と Control 株の計4種類の HeLa 細胞を供与して頂き、解析に用いた。

3-2 point-scan FCCS を用いた糖脂質とタンパク質の相互作用解析

ある別々の蛍光分子 (あるいは蛍光標識した分子) が相互作用を有しない場合、顕微鏡の焦点領域を異なる時間に通過する。この場合、分子から発せられる蛍光は時間軸において同時性をもたないので、相互相関関数が上昇しない (Fig.1 上図)。一方2つの蛍光分子が相互作用している場合、同時に焦点領域を通過するため、相互相関関数が上昇する (Fig.1 下図)。この値の比較から相互作用の有無を測定する。この方法を用いてガングリオシド GM1 とコレラトキシンの相互作用を解析した。

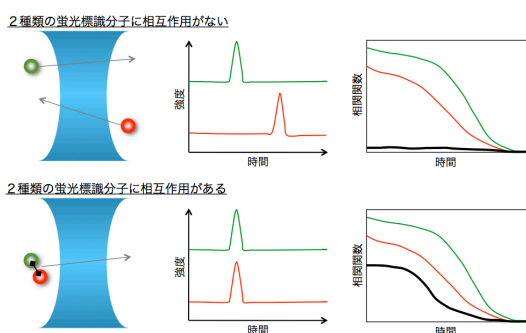


Figure 1 FCCS (蛍光相互相関スペクトル)法の概要

4. 研究の結果

4-1 糖脂質再構成細胞の膜流動性と成長因子受容体のシグナル伝達の相関

まず、TLCにて糖脂質の組成を解析した (Fig.2A)。その結果、Control株ではLacCer (ラクツシルセラミド) と Gb3 の発現が見られた。

一方 GlcCer synthase の cDNA を導入した細胞では GlcCer が多く蓄積し、Gb3 の発現も若干増加していた。GM3 synthase 遺伝子を導入した株では GM3 が多く蓄積し、LacCer と Gb3 の発現が減少していた。Gb3 発現抑制株では、Gb3 の発現が減少し、LacCer が蓄積していた。これらの細胞において EGF 刺激後の膜受容体およびシグナル分子のリン酸化をウェスタンブロット法で確認した。その結果、コントロール細胞と比べて GlcCer synthase 導入株と Gb3 synthase 抑制株において EGFR と ERK1/2 のリン酸化抑制が見られた(Fig.2B)。EGFR のリン酸化が減少すると期待された GM3 synthase 導入株においては顕著な変化は観察されなかった。

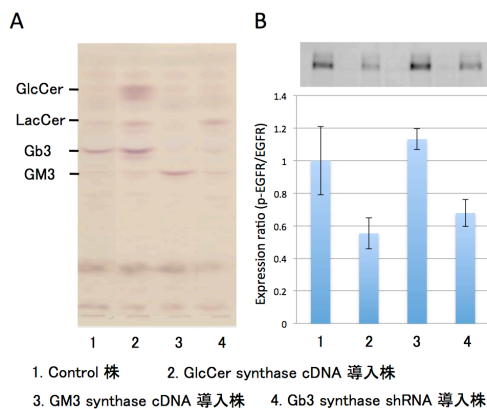


Figure 2 (A)糖脂質再構成細胞の TLC 解析と (B) EGFR の自己リン酸化解析

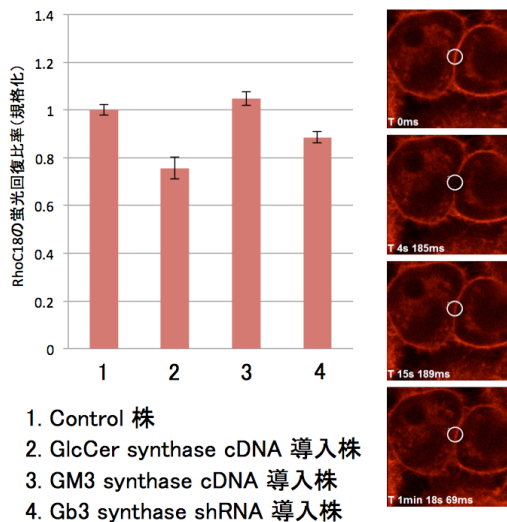


Figure 3 FRAP 法による膜流動性解析: 解析最終時間(1分18秒)における膜結合性蛍光分子 Rhodamine-C18 の蛍光回復比率(左図)と FRAP 解析のスキュン画像(右図; 上から退色前、退色直後、解析開始から15秒後、1分18秒後)

このような糖脂質の組成変化が膜受容体に与える影響の一つとして、膜流動性が想定された。そこで次に、細胞膜の流動性を解析するために、蛍光顕微鏡を用いて FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 測定を行った。FRAP 解析についての詳細は昨年の紀要を参照されたい。細胞膜に Rhodamine-C18 を導入して検討したところ、EGFR のリン酸化抑制が見られた2種類の細胞株において、動的成分が減少するという結果を得た(Fig.3)。以上を含め、本研究における EGFR のリン酸化抑制は、細胞膜の組成変化による膜の流動性の低下が引き起こしたという可能性が示唆された。

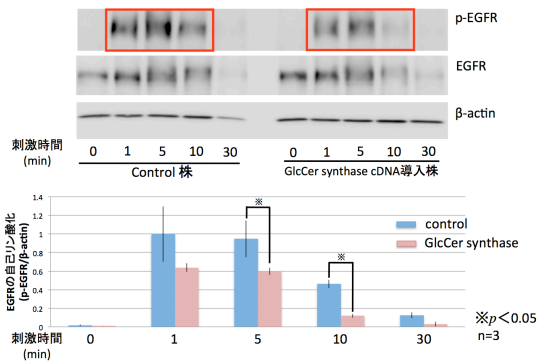


Figure 4 EGF 刺激における EGFR の自己リン酸化の経時的変化

そこで、最も顕著に変化の現れた GlcCer synthase 導入株においてより詳細に検討を行った。EGF 刺激による自己リン酸化の時間経過を解析したところ、いずれの時間においても GlcCer synthase 導入株の自己リン酸化は減少していた(Fig.4)。この活性化の抑制が糖脂質由来であるのかを検証するために、糖脂質合成阻害剤 D-PDMP を用いて同様の解析を行った。

20 μM, 48 時間の D-PDMP 処理により、GlcCer synthase 導入株は GlcCer を顕著に減少させた(Fig.5A)ことを TLC 解析により確認した。この処理条件の下、EGFR のリン酸化を確認したところ、コントロール細胞と同レベルまで回復していた(Fig.5B)。この条件において FRAP 解析を行ったところ、やはり膜流動性も回復傾向をみせた(Fig.6)。以上の結果から、糖脂質の組成変化による EGFR の自己リン酸化の調節に、膜の流動性が関与することが示唆された。

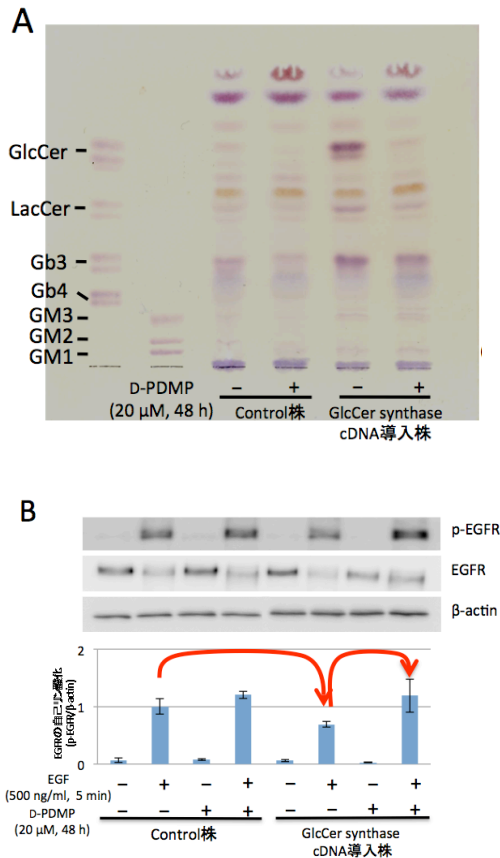


Figure 5 (A)阻害剤による糖脂質の発現制御と(B) EGFR の自己リン酸化との相関

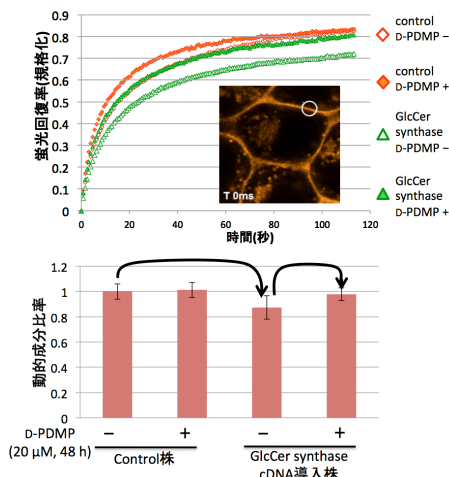


Figure 6 阻害剤による膜流動性の制御

4-2 point-scan FCCS を用いた糖脂質とタンパク質の相互作用解析

ガングリオシド GM1 とコレラトキシンの point scan FCCS による相互作用の検証をおこなった。その結果、BODIPY-FL により標識されたガングリオシド GM1 と Alexa647 により標識されたコレラトキシンのサブユニット (CTX) に顕著な相互相関が現れた (Fig.7)。ネガティブコントロールとして用いられたグルコシルセラミド (GlcCer)、ラクトシルセラミド (LacCer)、スフィンゴミエリン (SM) には相互相関は見られなかった。最近 FCS 測定装置 (MF20TM)、FCCS 測定装置 (FlucDEUX™) など販売されているが、既存の共焦点顕微鏡を用いて相互作用を測定できる点で汎用性が高い。我々はこの解析法が、糖鎖-レクチン相互作用および糖鎖合成過程の反応場のゆらぎ解析に応用可能であると考えている。また現在、膜脂質と成長因子受容体の蛍光相互相関も検討中である。

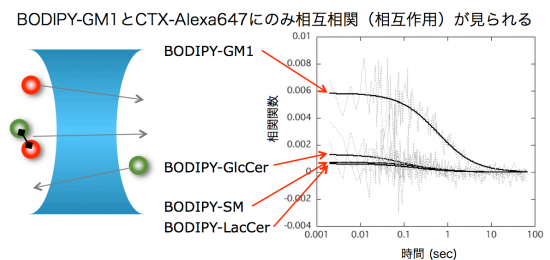


Figure 7 point scan FCCS による GM1-CTX の相互作用解析

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)
1. Kojima H, Tohsato Y, Kabayama K, Itonori S, Ito M. Biochemical studies on sphingolipids of *Artemia franciscana*: complex neutral glycosphingolipids. *Glycoconj. J.* 30, 257-268 (2013)
 2. Suzuki Y and Kabayama K. Convenient and rapid removal of detergent from glycolipids in detergent-resistant membrane microdomains. *J. Lipid Res.* 53, 599-608 (2012)

3. Sekimoto J, Kabayama K, Gohara K, Inokuchi JI.
Dissociation of the insulin receptor from caveolae during TNF α -induced insulin resistance and its recovery by d-PDMP. *FEBS Lett.* 586, 191-195 (2012)
*Cover Art in the January 20th issue
4. Kabayama K.
Modulation of Growth Factor Receptors in Membrane Microdomains. *YAKUGAKUZASSI* 132, 417-423 (2012)

〔学会発表〕 (計 37 件)

(ポスター発表)

- 1) Kazutaka Oda, Kazuya Kabayama :
Measurement of the lateral diffusion of insulin receptor in membrane microdomain by fluorescence recovery after photobleaching、第 61 回 FCCA セミナー/FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2011、2011 年 8 月 6 日、板橋
- 2) 小田慶喜、樺山一哉、稲津敏行、有馬英俊、山ノ井孝：シクロデキストリン類およびそのドキソルビシン複合体がヒト肝がん細胞株 HepG2 細胞に及ぼす効果、第 28 回シクロデキストリンシンポジウム、2011 年 9 月 8-9 日、秋田
- 3) 櫻井祐介、山地俊之、花田賢太郎、樺山一哉 : Analysis of relationship between activity of epidermal growth factor receptor and membrane fluidity in glycolipid reconstituted cells、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都
- 4) 樺山一哉 : ラフトは存在しないのか?、第 3 回 光塾、2011 年 10 月 22 日、本郷
- 5) 樺山一哉 : 新規光学技術を用いた糖脂質と膜受容体の相互作用解析、東海大学産学連携フェア 2011、2011 年 12 月 8 日、平塚
- 6) Yusuke Suzuki, Kazuya Kabayama, Yujin Iwata, Saori Katsuta, Hisashi Kamimiya, Yasuo Kojima, Akira Okamoto, and Yasunori Kushi : Improvement in recovery rate of glycolipids in membrane microdomain after detergent removal by 1,2-dichloroethane extraction、1st Biotechnology Congress、2012 年 2 月 14-15 日、Dubai, UAE
(口頭発表)
- 7) 樺山一哉、鈴木佑典：膜マイクロドメイン画分からの簡便な界面活性剤除去法を活用した糖脂質の構造決定、第 53 回日本脂質生化学会年会、2011 年 5 月 13 日、東京ガーデンパレス、お茶の水
- 8) 樺山一哉、鈴木佑典：膜マイクロドメイン画分からの簡便且つ迅速な界面活性剤除去法の確立、第 30 回日本糖質学会年会、2011 年 7 月 10 日、長岡
- 8) 樺山一哉 : 脂質マイクロドメインの構造および機能解析、東海大学総合医学研究所・糖鎖科学研究所 第 3 回公開合同シンポジウム、2011 年 7 月 22 日、東海大学伊勢原校舎、伊勢原
- 9) 小田慶喜、服部憲治郎、樺山一哉、稲津敏

行、有馬英俊、鬘谷要、黒崎千智、小柴生造、山ノ井孝：ガラクトース結合型シクロデキストリンを用いた標的指向型 DDS としての機能評価、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 12-14 日、つくば

10) Kazutaka Oda, Kazuya Kabayama : Cholesterol Depletion Influence Lateral Diffusion of Insulin Receptor、2011 年 9 月 23 日、第 84 回日本生化学会大会、京都 (英語による発表)

11) 小島寿夫：甲殻類ブラインシュリンブの糖脂質、第 7 回総医研研修会、2011 年 10 月 14 日、湯河原

12) 櫻井祐介、樺山一哉 : 糖脂質再構成細胞における膜受容体活性と膜流動性の関連の解析、成蹊大学・群馬大学・東海大学合同セミナー、2011 年 10 月 30 日、草津

13) 鈴木佑典、勝田沙織、樺山一哉、岩田祐仁、上宮悠、榎泰典：膜マイクロドメイン画分の複合糖質の構造解析法確立、2011 年 12 月 17 日、第 7 回日本大学先端バイオフォーラム、日本大学桜門会館、市ヶ谷
(招待講演)

13) 樺山一哉 : 蛍光顕微鏡と質量分析により脂質ラフトを明らかにする、第 53 回日本脂質生化学会シンポジウム (理研シンポジウム共催)、2011 年 5 月 12 日、東京ガーデンパレス、お茶の水

14) 樺山一哉 : 糖脂質代謝阻害剤の合成から糖脂質マイクロドメインの機能解析へ、公益財団法人野口研究所講演会、2011 年 7 月 1 日、野口研究所、板橋

15) 樺山一哉 : 脂質ラフトの構造と機能、第三回脂質メディエーターワークショップ、2011 年 12 月 17 日、立命館大学、滋賀

(ポスター発表)

16) Kazuya Kabayama, Yusuke Suzuki, Hisao Kojima : Convenient and rapid removal of detergent from ganglioside in detergent-resistant membrane microdomains、The Gordon Research Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology、2012 年 4 月 22-27 日、Lucca, Italy

17) 樺山一哉、三宅亜依、新井健太、Alessandro Prinetti : ヒト卵巣癌細胞におけるカベオリンの挙動解析、第 4 回光塾、2012 年 8 月 25-26 日、北海道大学理学部講堂、札幌

18) 樺山一哉、小島寿夫 : 顕微鏡装置と質量分析装置を用いて糖脂質の機能および構造を解析する、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 18-20 日、鹿児島市民文化ホール、鹿児島

19) Kazutaka Oda, Kazuya Kabayama : Cholesterol depletion influences lateral diffusion of insulin receptor、ACGG (Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology) 4th Conference、2012 年 10 月 29-31 日、済州国際会議場、韓国

20) 新井健太、尾田和隆、櫻井祐介、Alessandro Prinetti、樺山一哉 : ヒト卵巣がん細胞におけるカベオラ形成分子の機能解析、

糖鎖科学合同セミナー、2012年11月11-12日、成蹊学園箱根寮、箱根

21) 大竹愛理、小島寿夫、榎山一哉：脂肪細胞のインスリン抵抗性状態におけるグリオシドGM3の構造解析、糖鎖科学合同セミナー、2012年11月11-12日、成蹊学園箱根寮、箱根

22) Haruka Shinohara, Rio Kita, Naoki Shinyashiki, Shin Yagihara, Kazuya Kabayama, Toshiyuki Inazu、Temperature Dependent Study of Thermal Diffusion for Aqueous Solutions of α -, β -, and γ - Cyclodextrin、The 4th International Symposium on Slow Dynamics in Complex Systems、2012年12月2-7日、東北大学、仙台

23) 榎山一哉、小島寿夫：界面活性剤およびトリグリセリドの簡便除去法による糖脂質の構造解析、東海大学産学連携フェア、2012年12月6日、東海大学湘南キャンパス、平塚

24) 櫻井祐介、山地俊之、花田賢太郎、榎山一哉：糖脂質再構成細胞における膜流動性と成長因子受容体の関連、第85回日本生化学会年会、2012年12月15日、マリンメッセ福岡、博多

25) 尾田和隆、榎山一哉：細胞膜におけるコレステロールの除去はインスリン受容体の膜流動性やシグナル伝達に影響を与える、第85回日本生化学会年会、2012年12月15日、マリンメッセ福岡、博多

26) 三宅亜依、櫻井祐介、新井健太、Alessandro Prinetti、井ノ口仁一、榎山一哉：ヒト卵巣癌細胞におけるカベオリンの挙動解析、第85回日本生化学会年会、2012年12月15日、マリンメッセ福岡、博多

27) Saori Katsuda, Yusuke Suzuki, Eriko Yoshida, Shunichi Kojima, Kazuya Kabayama, Hisashi Kamimiya, Anila Mathew, Yasunori Kushi、Removal of coupling reagents from fluorescence-labeled oligosaccharides、第85回日本生化学会年会、2012年12月15日、マリンメッセ福岡、博多

(口頭発表)

28) 小島寿夫、榎山一哉：3T3-L1 脂肪細胞の総脂質中トリグリセリドのDCE洗浄による除去および中性糖脂質の検出と構造解析、第54回日本脂質生化学会年会、2012年6月7日、九州大学医学部百年講堂、博多

29) 榎山一哉：顕微鏡装置と質量分析装置を駆使した脂質ラフトの解析、第7回スフィンゴセラピー研究会、2012年7月14日、能登ロイヤルホテル、能登

30) 榎山一哉：糖脂質マイクロドメインの存在意義、長泉セミナー、2012年8月21日、長泉町文化センターベルフォーレ、三島

31) Sandro Sonnino, Ting Cao, Xuquin Xie, Simona Prioni, Giuditta Illuzzi, Kazuya Kabayama, Jin-ichi Inokuchi, Alessandro Prinetti、Role of Sialyltransferase-1 (GM3 Synthase) in the Regulation of a Caveolin-1-dependent Signaling Complex Controlling the Adhesion and Motility of Human Ovarian Cancer Cells、

SialoGlyco 2012、2012年9月10日、ACADEMIA SINICA、台湾

32) 三宅亜依、櫻井祐介、尾田和隆、門脇萌、榎山一哉：ヒト卵巣がん細胞におけるカベオリンの挙動解析、糖鎖科学合同セミナー、2012年11月11日、成蹊学園箱根寮、箱根

(招待講演)

33) 榎山一哉：顕微鏡と質量分析による糖脂質マイクロドメインの解析、招待セミナー、2012年7月3日、法政大学、小金井

34) Kazuya Kabayama : Modulation of Growth Factor Receptors in Membrane Microdomains、ACGG (Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology) 4th Conference、2012年10月29日、済州国際会議場、韓国

35) Kazuya Kabayama : The Problem and Solution in a Function and Structural Analysis of Glycolipid Microdomain、Special Seminar、2012年11月1日、延世大学、韓国

36) 榎山一哉：脂質ラフトの構造機能解析、理研セミナー、2012年11月6日、理化学研究所、和光

37) 榎山一哉：糖脂質の機能解析～阻害剤合成から動態解析へ～、GlycoTokyo2012、2012年11月17日、慶應義塾大学薬学部、芝 (奨励賞受賞講演)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.glyco.u-tokai.ac.jp/Inst_of_Glycoscience/Home.html

6. 研究組織

研究代表者

榎山 一哉 (KABAYAMA KAZUYA)

東海大学・糖鎖科学研究所・准教授

研究者番号：00399974