

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790039

研究課題名(和文) レクチン糖脂質結合と細胞接着現象の分子機構

研究課題名(英文) Mechanism of cell adhesion due to lectin-glycolipid interaction

研究代表者

平松 弘嗣 (HIRAMATSU, HIROTSUGU)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90419995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトガレクチン1(hGal-1)は生体内でダイマーとして存在し、膜糖タンパク質や膜糖脂質への結合を介して細胞接着に関与する。本研究では糖脂質ガングリオシドGM1と中性脂質POPCを用いたリポソームを作成し、hGal-1に含まれるTrp68の蛍光波長を解析することで結合の解析を行った。水溶性糖鎖ラクトースに対する結合定数が 3 mM^{-1} 程度であったことに対し、脂質膜上のGM1への結合定数、ならびにダイマーに2ヶ所含まれる糖結合サイトの協同性がラクトースの場合と大きく異なることを見いだした。脂質膜上の糖鎖と水溶性糖鎖では結合特性が異なることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Human galectin-1 (hGal-1) dimer is involved in cell adhesion by binding multiple saccharide moieties on surfaces of membranes. We analyzed the binding of hGal-1 to ganglioside GM1 in POPC liposome by monitoring the fluorescence of Trp68 of hGal-1, and found a marked difference of the binding constant and Hill coefficient between the binding to GM1 and a soluble saccharide lactose. The results imply that hGal-1 has different properties in binding to soluble and membrane-bound sugars.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：細胞接着 糖鎖 ラマン分光法 蛍光分光法 レクチン

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死因第一位の疾病である。正常細胞ががん化することに伴い、細胞分裂の異常、転移能の獲得、血管新生、など様々な現象が生じる。

がん細胞の転移に関して、原発組織からの脱離と移動先での定着という段階は、それぞれ「細胞接着機能」の off および on が起こっている、と考えることができる。すなわち、がん細胞転移に関わる様々なステップのうち、原発巣からの脱離、および定着先の組織への結合、という各段階で細胞接着の強度が適切に制御されている。細胞接着機能には上皮間葉転移という遺伝子発現プログラムの改変に基づく変化が関わっているが、これとは別に、糖鎖結合タンパク質(レクチン)の細胞膜糖鎖(糖脂質、膜糖タンパク質)への結合も関与すると考えられている。

細胞接着強度の制御機構のうち、レクチンが関与する過程に関して、どのような特性があるか、および、分子機構は必ずしも明確ではない。細胞接着強度を制御することはがんの転移の制御につながることから、分子機構の解明が待たれていた。このような背景のもと、「レクチン糖脂質結合と細胞接着現象の分子機構」というタイトルで本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究を含む一連の取り組みの最終目標は、水溶性レクチンが介する細胞接着の機構、強度、特性、などを明らかにすることである。この最終目的のために、本研究では、代表的な水溶性レクチンであるヒトガレクチン1(hGal-1)を取り扱い、研究を行っている。hGal-1が関与する細胞接着のモデル系として、我々は「糖脂質含有リポソーム」を用い、「水溶性糖鎖」への結合との共通点および相違点を解明することを本研究の目的とした。これらの結果を元に、細胞接着への関与の可能性および分子機構を考察した。

3. 研究の方法 ヒトガレクチン1が関与する細胞接着力を解析するために、(1)ラクトース(Galβ1-4Glc, Lac)結合定数のpH依存性解析と構造解析、(2)膜糖脂質含有リポソームへの結合定数の解析と構造解析、を行うことにした。分光学的手法として、Trp 蛍光分光法を用いて糖結合定数の算出を行った。またラマン分光法を用いてタンパク質構造解析を行った。

初年度には、(1)水溶性糖鎖-レクチン結合の結合定数 pH 依存性の測定、(2)水溶性糖鎖-レクチン結合の構造解析と結合定数の大小を決める構造的要因の解明、を行うことを計画した。

次年度(研究計画最終年度)には、(3)糖脂質-レクチン結合の結合定数 pH 依存性の測定、(4)糖脂質-レクチン結合の構造解析と、結合定数に対する「構造的要因」「クラスター効

果」の解明、(5)糖脂質リポソームを用いた細胞接着現象モデル系の開発、(6)糖脂質リポソームの hGal-1 添加によるクラスターサイズ変化の解析、およびその pH 依存性の解析、を計画した。

4. 研究成果

研究計画の各項目に関して述べる。

- (1) 水溶性糖鎖-レクチン結合の結合定数 pH 依存性の測定
- (2) 水溶性糖鎖-レクチン結合の構造解析と結合定数の大小を決める構造的要因の解明

水溶性糖鎖である Lac を添加し、hGal-1 のアミノ酸配列に唯一含まれる Trp68 の蛍光スペクトルの解析から結合定数(K_b)を決定した。
pH 7.5 4 hGal-1 の Lac 結合定数 K_b (図 1)

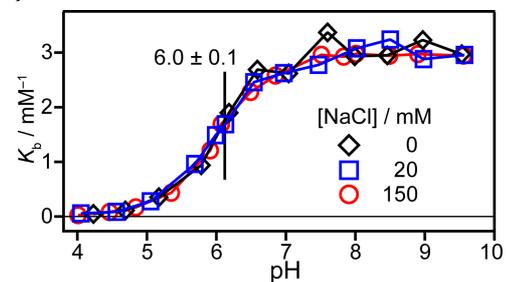


図 1. hGal-1 の Lac 結合定数 K_b の pH 依存性

は、NaCl 濃度によらず pH 7-9.5 では 3.0 mM^{-1} 程度で一定であり、pH 6.0 を境に低下した。hGal-1 および変異体の 229 nm 励起共鳴ラマンスペクトル (D_2O 溶液) 円偏光二色性、Trp68 蛍光の解析結果から、pH 6.3 近辺で His52 のプロトン化と主鎖構造の変化が起こること、pH 5.7 近辺で His44 プロトン化と Trp68 環境変化が起こること、を見いだした。円偏光二色性の pH 依存性は 100 mM Lac 添加により消失した。紫外吸収差スペクトルの解析から、酸性条件下でのカチオン π 相互作用を検出した。

以上の実験結果から、酸性条件では hGal-1 の 2 つの His 側鎖のプロトン化が起こることが分かった。結合定数の低下は His52 プロトン化(pH 6.3)によって hGal-1 糖結合ポケット周辺の構造が変化して Lac と相互作用しにくくなること、His44 プロトン化(pH 5.7)に伴い Trp68 との間にカチオン π 相互作用が生じ、Lac との相互作用に適さない構造に変化すること、によると考えられる。以上の結果を、参考文献 2 として論文発表した。

pH 7.5 9.5 0 mM では pH > 8.2 で Lac ゲル結合割合 Y が低下した(図 2)。 Y の pH 依存性は NaCl 濃度増大に伴い消失した。pH 7-9.5 の範囲で NaCl 濃度(0, 20, 150 mM)に関わらず K_b は $\sim 3.0 \text{ mM}^{-1}$ であった(図 1)。可視ラマンスペクトルの SH 伸縮振動バンド強度解析から Cys 側鎖脱プロトン化の $\text{p}K_a$ を 8.5 ± 0.1 と決定した。

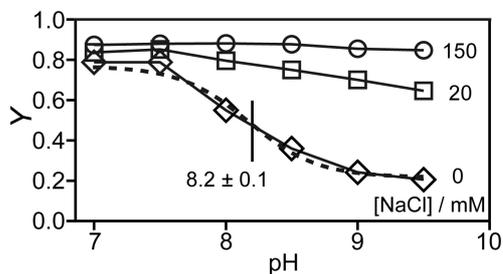


図2. ラクトースゲル結合割合 Y の pH 依存性

pH 7-9.5 の範囲で Lac ゲル結合割合 Y は NaCl 0 mM では低下し、高 NaCl 濃度条件下では低下しなかったが、 K_b は NaCl 濃度によらずほぼ一定であった。すなわち塩基性条件下では、 K_b は低下しないが Y が低下しうることがわかった。hGal-1 結合によって Lac ゲル表面の hGal-1 密度が増大することを考えると、低塩濃度・高 pH 条件での Y の低下は Cys 側鎖脱プロトン化により生じる負電荷間の静電的反発によるものと考えられる。以上の結果を、参考文献 3 として論文発表した。

(3) 糖脂質-レクチン結合の結合定数 pH 依存性の測定

(4) 糖脂質-レクチン結合の構造解析と、結合定数に対する「構造的要因」「クラスター効果」の解明

糖脂質ガングリオシド GM1 と中性脂質 POPC を用いたリポソームを作成し、hGal-1 に含まれる Trp68 の蛍光波長を解析することで結合の解析を行った。pH 5-10 の範囲で実験を行った。水溶性糖鎖ラクトースに対する結合定数が 3 mM^{-1} 程度であったことに対し、脂質膜上の GM1 への結合定数およびその pH 依存性、ならびにダイマーに 2 ヶ所含まれる糖結合サイトの協同性がラクトースの場合と大きく異なることを見いだした。例えば pH 7.5 において、GM1/POPC リポソームに対する結合定数は 7.3 mM^{-1} であり、ラクトースに対する K_b (3.0 mM^{-1}) の約 2.5 倍であった。また複数の糖結合サイト間の協同性を示すパラメータであるヒル係数は pH 7.5 で 4.8 である結果を得た。他の pH 条件においても、同様の結果を得た。

ガングリオシド GM1 に含まれる五糖をセラミド骨格から切り離した水溶性五糖に関しては、hGal-1 は結合定数が非常に小さいことが示されている。これに対し、本実験で確認された結合定数は、水溶性ラクトースに対する結合定数より大きいものであった。このことは、hGal-1 のリガンドとなりうる糖鎖の構造以外の要因によって見かけの結合定数が増大したことを示唆する。多価糖鎖に対するレクチンの結合において、結合速度は不変であるが、解離速度が低下するために、見かけの結合定数が増大する、という現象が知られている(クラスター効果)。我々が見いだした GM1/POPC リポソームに対する結合定

数の増大は、このようなリガンドのクラスター化に由来するものと考えて矛盾しない。このように、我々は脂質膜上に存在する糖脂質クラスターに対し、hGal-1 の見かけの結合定数が増大することを見いだした。

hGal-1 は生理条件下ではダイマーとして存在することから、ヒル係数が 2 を越えるという結果は、複数のダイマーが同時に糖結合を起こしていることを意味する結果である。この点に関し、「リポソーム間の架橋となるような hGal-1 ダイマーの糖結合」が起こる場合、これによって架橋されるリポソームの間隙は、適切な距離にリガンドが存在するため、hGal-1 のあつらえ向きの結合サイトとして働きうる、と考えることで説明される。

以上のように、脂質膜上の糖鎖と水溶性糖鎖では結合特性が異なることを示唆する結果を得た。これらの結果に関し、現在論文発表を準備中である。

(5) 糖脂質リポソームを用いた細胞接着現象モデル系の開発

項目(3)(4)において、細胞接着現象モデル系として、ガングリオシド GM1 および中性脂質 POPC からなる糖脂質リポソームを用いた。クラスターサイズ変化の解析のためにリポソーム内部に色素を封入する必要があるが、低分子である色素がリポソームから侵しうること、リポソーム外部(溶媒部分)の色素の寄与の見積り、など検討すべき課題が多い。そこで筆者らは、代替品として赤血球を利用することにした。兔保存血液に含まれる赤血球は脂質二重膜に糖脂質を含む天然のリポソームである。大きさはおよそ $2 \mu\text{m}$ 程度で、内部に赤色を呈するヘモグロビンを含むため視認性が高いこと、溶血を除けば侵出の心配がないこと、入手が容易であること、などの長所を持つ。また、兔血液の赤血球凝集試験は hGal-1 のレクチン活性の試験法として確立されており、hGal-1 によって複数の赤血球同士が接着されることが既に知られている。

(6) 糖脂質リポソームの hGal-1 添加によるクラスターサイズ変化の解析、およびその pH 依存性の解析

兔保存血液(日本バイオテスト)に緩衝液を加え NaCl 濃度を 150 mM、pH を 7.4 とした。この希釈血液に対し hGal-1 を添加し、赤血球凝集体のサイズの分布を解析したところ、hGal-1 濃度に依存した凝集体会合数の増加が見いだされた(図 3)。hGal-1 濃度を増加させると赤血球会合数が鋭敏に増大する様子が観測された。この結果は、hGal-1 の結合のヒル係数が大きいことを示唆する。前項で述べた GM1/POPC リポソームへの hGal-1 結合の結果と同様である。このような鋭敏な hGal-1 濃度依存性は、リポソーム上の糖鎖に

対する hGal-1 の結合の特徴である可能性がある。pH 依存性に関し現在解析中である。

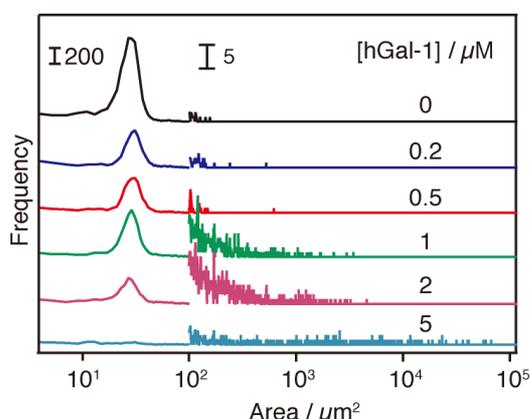


図3. 赤血球凝集体の顕微鏡像サイズ(面積)のヒストグラムの hGal-1 添加量依存性

(7) ラマンスペクトル測定のための垂直フロー装置の開発 一連の hGal-1 構造解析においてラマン分光法を利用する際に問題になったのは、ラマン散乱が微弱であることであった。これはラマン分光法一般に共通する問題であり、効率的な測定をする手段が必要である。そこで我々は、試料液柱を作成するための垂直フロー装置を開発した(図4)。これは試料液柱と空気の界面の全反射を利用することでラマン励起光および信号光の散逸を防ぎ、測定効率を向上させるための装置であり、顕微ラマン分光装置に取り付けて用いる。垂直フロー装置を用いることにより、非共鳴ラマン信号強度が 12.0 倍(信号雑音比が 4.1 倍)増大することを示した。488nm 励起光を吸収する色素コンゴレドの共鳴ラマン信号の増大率は 4.9 倍であり、試料による励起光とラマン散乱光の吸収の影響が現れていると考えられる。垂直フロー装置によって、非共鳴ラマン信号の方が大きい信号増大効果が得られることが分かった。以上の結果を参考文献 1 として論文発表した。

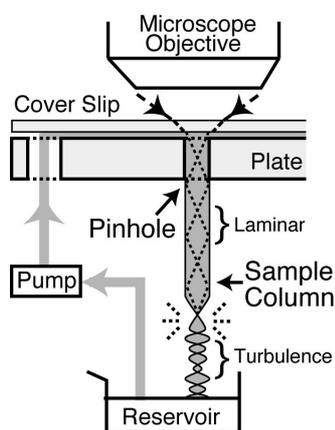


図4 垂直フロー装置模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. “Vertical flow apparatus for enhancement and efficient collection of Raman signal,” Hirotsugu Hiramatsu and Takahiro Saito, *J. Raman Spectrosc.*, **2014**, *45*, 208-210. [DOI: 10.1002/jrs.4437] (査読あり)

2. “Involvement of Histidine Residues in the pH-Dependent β -Galactoside-binding Activity of Human Galectin-1,” Hirotsugu Hiramatsu, Katsuyuki Takeuchi, Hideo Takeuchi, *Biochemistry*, **2013**, *52*, 2371-2380. [DOI: 10.1021/bi4001112] (査読あり)

3. “ β -Galactoside-binding Activity of Human Galectin-1 at Basic pH,” Hirotsugu Hiramatsu, Katsuyuki Takeuchi, Koki Fukuda, Tomohide Nishino, *Chemical Physics*, **2013**, *419*, 113-117. [DOI: 10.1016/j.chemphys.2013.01.018] (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 堀良太、平松弘嗣[F-10]「リポソーム表面のガングリオシド GM1 糖鎖に対するヒトガレクチン 1 の結合」、第 5 2 回日本薬学会東北支部大会、仙台、2013 年 10 月 20 日

2. Hirotsugu Hiramatsu, Katsuyuki Takeuchi, Koki Fukuda, Tomohide Nishino, Hideo Takeuchi,

“Involvement of a Few Amino Acid Residues in the pH-Dependent β -Galactoside-binding Activity of Human Galectin-1,” Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-7), Kobe, 2013 年 8 月 25-30 日

3. 平松弘嗣、竹内勝之、福田洸希、西野伴英、竹内英夫

「酸性および塩基性条件でのヒトガレクチン 1 糖結合能低下の原因」、生体分子科学討論会 2013、大阪、2013 年 6 月 8 日

4. Hirotsugu Hiramatsu, Tomohide Nishino, Hideo Takeuchi,

“ β -Galactoside-binding activity of human galectin-1 at basic pH”, 第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋、2012 年 9 月 23 日

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

平松 弘嗣 (HIRAMATSU, HIROTSUGU)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90419995

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：