

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04495

研究課題名(和文)細胞膜糖鎖ドメインの形成と機能の動的機構の解明

研究課題名(英文) Study for elucidation of the structures and functions of nano-sized membrane domains using glycolipid probes

研究代表者

安藤 弘宗 (ANDO, Hiromune)

岐阜大学・研究推進・社会連携機構・教授

研究者番号：20372518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：【研究内容】細胞膜ドメインと呼ばれる細胞膜に一過的に形成される分子の集合体に関する研究を行った。特に細胞膜ドメインの主要分子である糖脂質(糖鎖と脂質が結合した分子)に注目し、細胞膜ドメインが形成される際の糖脂質の振舞いを1分子観察という高精細な可視化技術によって解析することを目的とした。

【成果】合成化学の手法により、天然分子と同様な性質を維持した蛍光標識した糖脂質分子を世界で初めて開発した(11種類)。この蛍光糖脂質分子を細胞膜に挿入し、1分子ごとの細胞膜での振舞いを解析することにより、「脂質ラフト」「糖脂質ドメイン」と呼ばれるドメイン形成の基礎となる分子間相互作用を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Research aim: To figure out the mechanisms of the formation of the tentatively formed cell membrane domains by the single molecule imaging technique. This research mainly focuses on the behavior of glycolipids, which are key components of the cell membrane domains.

Research outcomes: A series of the fluorescent labeled glycolipids which are useful as equivalents to native molecules has been developed for the first time. We have found the molecular interactions fundamental and essential for the formations of lipid raft and glycolipid domain by the single molecule imaging technique.

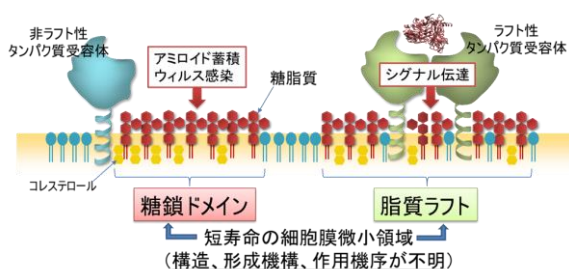
研究分野：糖鎖合成化学、生物有機化学

キーワード：細胞膜ドメイン 脂質ラフト ガングリオシド 1分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に形成されるナノスケールの微小領域は細胞膜ドメインとよばれ、細胞と外界を隔てる細胞膜の働きにおいて、重要な局所構造である。しかしながら、細胞膜ドメインは安定な構造体として存在するのではなく、非常に短時間で構成分子が離合集散を繰り返す中で形成される一過性の分子集合体である。そのため、細胞膜ドメインの形成機構、構造について未知の部分が多くを占めていた。しかし、この状況は、高速かつ高分解能の蛍光顕微鏡を用いる1分子イメージング技術の発展によって打開されつつある。当時、我が国の研究者によって、生きている細胞膜で細胞膜ドメインが運動する様子を初めて捉えられるなどの目覚ましい成果が上がっていた。

本研究課題では、細胞膜ドメインの内、脂質ラフトと呼ばれる微小領域に注目した。脂質ラフトは、GPIアンカー型蛋白質、スフィンゴ糖脂質（主にガングリオシド）、コレステロール、飽和リン脂質を主たる構成分子とするドメインであり、細胞膜を介するシグナル伝達の重要なプラットフォームとして働いたり、病原体の細胞内侵入の足場として利用されることが知られている。1分子イメージングを用いた研究では、脂質ラフトの主たる構成分子のGPIアンカー型蛋白質の集合体の振る舞いに関する解析が進んでいるが、同様に重要な構成分子であるガングリオシドの動態に関しては、不明であった。加えて、糖脂質を主体として構成される糖脂質ドメインに関しても、形成機構などは不明であった。この理由は明快であり、細胞膜で天然分子と同様に振舞う蛍光標識したガングリオシドが存在せず、1分子イメージングが適用できないためである。



2. 研究の目的

上述の背景を踏まえて、本研究では、申請者が開発した蛍光ガングリオシドと連携研究者の鈴木博士の1分子イメージングの手法を駆使して、脂質ラフトおよび糖脂質ドメインの形成機構、動態、機能を詳解することを目的とし、以下の以下の課題を設定した。

(1) 脂質ラフトおよび蛋白質受容体とガングリオシドの相互作用の解析

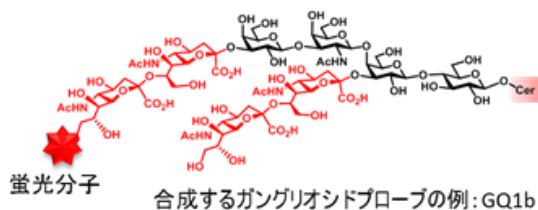
(2) ガングリオシドーガングリオシド間の相互作用解析

(3) 細胞膜ドメインを介した生物学的現象のイメージングによる解析

3. 研究の方法

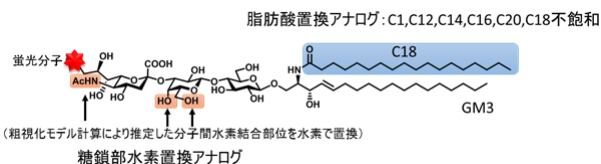
(1) 脂質ラフトおよび蛋白質受容体とガングリオシドの相互作用の解析

先行して開発した、天然分子と同等の細胞膜動態を示す蛍光ガングリオシドプローブを合成し、ラフト性タンパク質および非ラフト性タンパク質との相互作用を1分子イメージングによって観察および解析する。

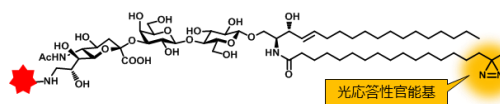


(2) ガングリオシドーガングリオシド間の相互作用解析

先行実験で見出したガングリオシド同士の同種間特異的相互作用（ホモダイマー、ホモオリゴマー形成）において必須の構造要因を明らかにするために、分子間の相互作用に重要と思われる糖残基間の水素結合、脂質-脂質相互作用に着目し、構造が比較的単純な三糖より構成されるGM3の糖鎖部水素置換アナログおよび脂肪酸置換アナログの蛍光プローブを合成する（下図）。その後、プローブを用いたホモダイマー化を1分子イメージングにて解析し、ダイマー形成寿命の比較から官能基のレベルでの寄与を明らかにする。



さらに、ホモダイマー形成の確証を得るためにガングリオシド間で架橋可能な光応答性ガングリオシドプローブを合成し（下図）、モデル膜中でのホモダイマーの光刺激による架橋化を試み、架橋によって安定化したホモダイマーの形成を調査する。



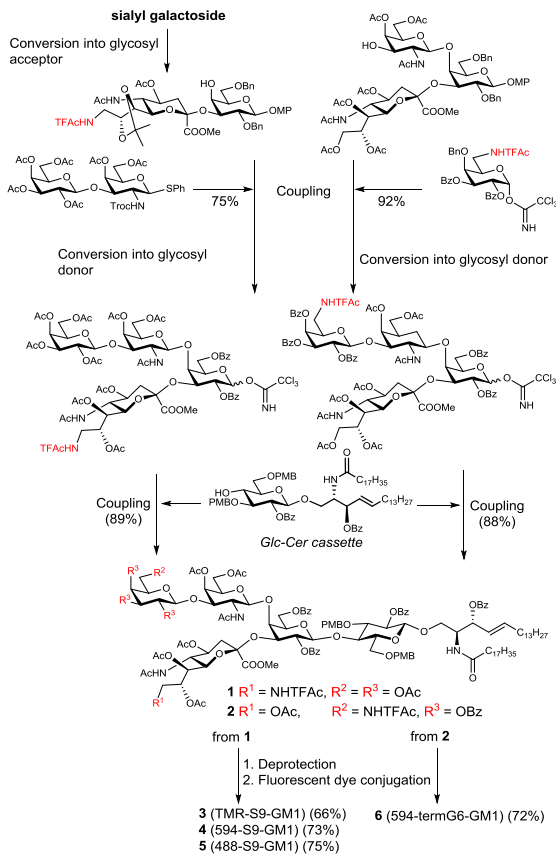
(3) 細胞膜ドメインを介した生物学的現象のイメージングによる解析

がん細胞の増殖などに関わる上皮成長因子(EGF)受容体とガングリオシドGM3の相互作用をイメージングによって可視化しGM3がEGF受容体の自己リン酸化を抑制している現象を解析する。

4. 研究成果

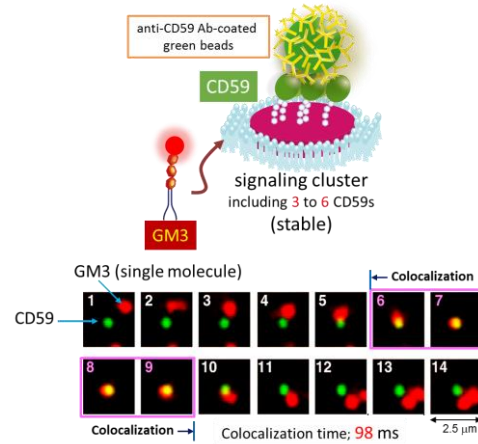
(1) 脂質ラフトおよび蛋白質受容体とガングリオシドの相互作用の解析

下図に示したような合成経路に沿って、糖鎖末端に蛍光分子を結合させた、ガングリオシドおよびスフィンゴ糖脂質の誘導体(11種類 GM2, GM1, GT1b, GD3, GQ1b, GalNAc-GD1a, asialo-GM2, asialo-GM1, LaseCer, GlcCer, Cer)を合成した。合成した誘導体は、非イオン異性界面活性剤不溶性画分 (DRM) 分配試験、液体秩序相-非秩序相 (Lo/Ld) 分配試験を経て、天然の親分子と同等の物性を示すことを確認し、1分子イメージングによるタンパク質受容体との相互作用解析に供した。



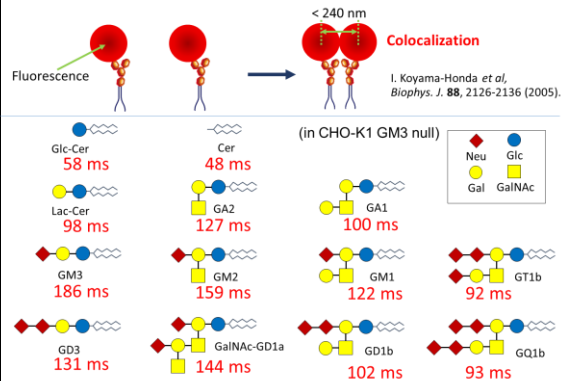
脂質ラフトを構成する GPI アンカー型タンパク質の一種である CD59 と合成した蛍光ガングリオシドとの相互作用を解析したところ、脂質ラフトの主要なガングリオシドである GM3, GM1 は CD59 のクラスターに対して特異的に相互作用する事が明らかとなった。例えば、CD59 のモノマー、ホモダイマー、シグナリングクラスター (CD59 のリガンドである補体 C8 の結合によって誘起される 3 から 6 分子の CD59 よりなるクラスターのモデル。シグナル伝達を媒介することができる) に対して、GM3 は、それぞれ 53ms, 80ms, 98ms の時間で共局在することが示された。共局在時間と局在の頻度より求められる総共局在時間は、非ラフト分子の DOPE の約 6 倍であった (下図)。この実験によって、ガングリオシドは脂質ラフトの領域に対して非常にダイナミックに

相互作用する様子が初めて捉えられた。



(2) ガングリオシド-ガングリオシド間の相互作用解析

上述した蛍光ガングリオシドを用いて、定常状態の細胞膜でのガングリオシドの挙動を解析した。GM3 において観察されたガングリオシドの同種二量体 (ホモダイマー) の形成を焦点にして、解析したところ、試験した全てのガングリオシドはホモダイマー形成を頻繁に繰り返している事が明らかとなった (下図)。



さらに、ホモダイマー化の構造要因を解明するために、蛍光 GM3 の糖鎖改変体、脂質改変体を各種合成し、ホモダイマーの形成時間を解析した。糖鎖改変体間の形成時間の増減によって、シアル酸 5 位のアセトアミド基がダイマー形成に重要であり、シアル酸 1 位のカルボキシル基は形成を弱める一因である事が示唆された。また、脂質改変体では、セラミドを構成する脂肪酸の炭素鎖長が形成時間に強く影響した。炭素数が 16 を下回ると、形成時間が炭素数の減少に比して短くなる事が示された。

次に、有意なホモダイマー形成を示す最小の分子であるラクトシルセラミド (LacCer) について、その脂質部分に光刺激によって近傍の分子との架橋形成が可能であるジアジリン基を有する類縁体を合成し、モデル膜でのホモダイマー形成を検証した。初めに、LacCer 単分子膜を用いた架橋実験で、脂質間で二量体が優位に形成されることを確認し

た。続いて、DPPC、DOPC、コレステロールからなるリポソーム中で LacCer の光架橋を試みたところ、LacCer は他の脂質成分と反応することなく、ホモダイマーのみを優位に形成している事が確認できた。また、このホモダイマー形成はコレステロールの含有率に依存的であり、脂質ラフト様の相分離が生じる条件下でのみホモダイマーが形成されることが示された。

(3) 細胞膜ドメインを介した生物学的現象のイメージングによる解析

EGF 受容体と GM3 の相互作用によって、EGF 受容体の細胞質側ドメインの自己リン酸化が抑制され、EGF 受容体のシグナル伝達が負に制御される現象が報告されている。我々は、蛍光ガングリオシドを用いて、EGF 受容体と各種ガングリオシドの相互作用を 1 分子イメージングにより比較した。その結果、GM3 は他のガングリオシド (GM1) の 7.4 倍の総共局在時間を示した。さらに、GM3 ホモダイマーは、GM3 モノマーよりも EGF 受容体モノマーに対して親和性が高いことが明らかとなった。このことから、GM3 はホモダイマーを基本として EGF 受容体と相互作用し、EGF 受容体のダイマー化を阻害することで、自己リン酸化を抑制しているという分子機構が導き出された。さらに、GM3 ホモダイマーの抑制条件では、細胞質側のシグナル分子が EGF 受容体にリクルートし、ホモダイマー形成条件では、リクルートが抑止される様子を可視化することに成功した。

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 22 件)

1. K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, M. Konishi, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, Revealing the raft domain organization in the plasma membrane by single-molecule imaging of fluorescent ganglioside analogs. *Methods Enzymol.* 598, 267-282, **2018**. DOI: 10.1016/bs.mie.2017.06.038.
2. N. Komura, K. G. N. Suzuki, H. Ando, M. Konishi, A. Imamura, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso, Syntheses of fluorescent gangliosides for the studies of raft domains. *Methods Enzymol.* 597, 239-263, **2017**. DOI: 10.1016/bs.mie.2017.06.004
3. K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, T. Fujiwara, M. Kiso, A. Kusumi, Development of new ganglioside probes and unraveling of raft domain structure by single-molecule imaging. *Biochim. Biophys. Acta-General Subjects*, 1861,

2494-2506, **2017**.

doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.012

4. N. Komura, K. G. N. Suzuki, H. Ando, M. Konishi, M. Koikeda, A. Imamura, R. Chadda, T. K. Fujiwara, H. Tsuboi, R. Sheng, W. Cho, K. Furukawa, K. Furukawa, Y. Yamauchi, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso, Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat. Chem. Biol.* 12, 402-410, **2016**. DOI: 10.1038/nchembio.2059

[学会発表] (計 25 件)

(1) 招待講演 (国際学会)

1. H. Ando, Synthetic chemistry of sialic acid-containing glycolipids for molecular understanding of their biological roles, International Symposium on Pure & Applied Chemistry 2017 (ISPAC2017), Ho Chi Minh City, Vietnam, June 8-10, **2017**.
2. H. Ando, Development of novel ganglioside probes to explore glycan-protein architecture formed in the cell membrane. Glycoscience Japan - The Netherlands Joint Seminar 2016, Glycobiology in Health and Disease, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands, April 19-22, **2016**.
3. H. Ando, Ganglioside synthesis for understanding interplays with membrane molecules. 2015 Glycoscience Symposium, Institute of Biological Chemistry, Taipei, Taiwan, December 7-9, **2015**.
4. H. Ando, Ganglioside probes for exploring functional molecular complexes in the cell membrane. The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA, December 15-20, **2015**.

[図書] (計 3 件)

1. 安藤弘宗, 鈴木健一, 楠見明弘, 木曾眞: 第3編 糖鎖の構造解析・プロファイリング 第8章 1 分子観察用ガングリオシドプローブの開発と脂質ラフト研究への応用「糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック 創薬・医療から食品開発まで」、津本浩平, 加藤晃一, 鷹羽武史, 深瀬浩一, 古川鋼一編, (株)エヌ・ティー・エス、東京、pp277-279 (pp678), **2015**.
2. 今村彰宏, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾眞: 第4編 糖鎖の工学—合成・機能 第2章 糖鎖合成 (化学合成) と機能第1節 生理活性ガングリオシドの合成「糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック 創薬・医療から食品開発まで」津本浩平, 加藤

晃一，鷹羽武史，深瀬浩一，古川鋼一編、
(株)エヌ・ティー・エス、東京、pp343-346
(pp678), 2015.

[その他]

ホームページ：

<https://www1.gifu-u.ac.jp/~kasei1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 弘宗 (ANDO, Hiromune)

岐阜大学・研究推進・社会連携機構・教授

研究者番号：20372518

(2) 連携研究者

鈴木 健一 (SUZUKI, Kenichi)

岐阜大学・研究推進・社会連携機構・教授

研究者番号：50423059