

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770124

研究課題名(和文) 糖脂質マイクロドメインにおける細胞膜分子の可視化動態解析

研究課題名(英文) Dynamic behavior analysis of membrane molecules in glycolipid enriched membrane microdomain

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)：

IR-sEGFPおよびEGFR-mCherryの安定発現株をCHO-K1細胞にて作成し、これに成功した。この細胞株において膜脂質の組成を外因的に調節するために、コレステロールを包括し除去する試薬であるM β CDを用いてFRAP測定を行った。その結果、動的比率が11～13%程度減少した。また、IR-sEGFPにおいて糖脂質合成阻害剤D-PBPPによる処理を行ったところ、M β CDとは逆に動的比率が0.76から0.82に増加した。

この結果は、膜受容体が複数の領域(マイクロドメインを含む)に存在し、領域ごとに受容体の活性調節が行われている可能性を示しており、生細胞において1分子観察以外の方法でマイクロドメインの存在を示す重要な証拠となり得る。

研究成果の概要(英文)：

Membrane lateral heterogeneity is accepted as a requirement for the function of biological membranes, and the notion of “raft/microdomain” gives specificity to this concept. In this study, measurement of the lateral diffusion of IR was performed by fitting analysis to fluorescence recovery curves and trace analysis to individual fluorescent spots, which provided diffusion coefficient (D). It shows us how fast membrane molecules are diffusing at the change of membrane environment such as before and after stimulation by cholesterol depression. We will utilize these techniques for the lateral diffusion analysis of membrane receptor in another assay conditions, such as treatment of glycosphingolipid (GSL) inhibitor, use of GSL deficient cells or of pathologic samples.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：糖脂質、糖鎖、マイクロドメイン、膜受容体、イメージング

1. 研究開始当初の背景

膜の不均質性が生体膜において重要な役割を果たしていることがこれまでの研究で実証されており、Lipid Raft(マイクロドメイン)の概念がその基盤となっている。しかしながら、Raft 研究の分野では解析手法が手詰まりの状態、生体膜を時空間に支配された液層として研究する物理的手法はまだ開発途中である。これが実際の細胞と生物学的手法、物理化学的手法との間に大きな溝を作っている。Lipid Raftの構成成分として知られているガングリオシドは、シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質(GSL)ファミリーの総称であり、GM3はその生合成経路における最初の分子である。GM3はヒトを含む哺乳動物の種々の細胞に広く発現していることから、その生理機能および病態生理学的意義が注目されてきた。ガングリオシドは細胞膜表面に発現し癌細胞の接着や浸潤、受容体活性、増殖因子様活性、細胞間認識などに関与しており、癌の悪性度との関連においても多数の報告がある。これらの作用機序の一つとして膜受容体分子のLipid Raftへの集積あるいは解離が想定されている(我々の総説: *Comprehensive glycoscience* 3, 733-744 (2007))。しかしながらその解析手法は、ショ糖密度勾配遠心法を主軸とした「界面活性剤に不溶性か可溶性か?」によって細胞膜上の不均質な局在を評価する方法にとどまり、この域を脱していない。また汎用されるTRITON™のような非イオン性界面活性剤は脂質-タンパク質相互作用を切る性質を持つため、静電的相互作用も考慮にいたした「膜受容体分子のLipid Raftへの集積あるいは解離」の評価は困難であると考えられる。さらに膜近傍には電荷の勾配が存在しており、細胞内膜では膜脂質(酸性リン脂質ホスファチジルセリン)とタンパク質の静電的相互作用が細胞内のシグナル制御に関与していることが物理化

学的に実証されていることから(MARCKSのミリストイル静電気スイッチ: McLaughlin and Murray, *Nature* 438, 605-611 Review (2005))、膜受容体のRaftモデル解析においても同様に「界面活性剤」を使わない全く別の解析手法を導入することが不可欠である。

そこで本研究では顕微鏡を用いた分子動態観察を糖脂質マイクロドメインと膜受容体の相互作用解析に導入することを考えた。近年、蛍光標識分子を用いた可視化技術の発展は目覚しく、基礎研究のみならず臨床応用も視野に入れた分子動態解析が注目されている。我々はこれまでにインスリン受容体とカベオリンの相互作用を生細胞で可視化して解析する手法を用いることで、インスリン抵抗性の作用機序の解明にアプローチしている(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007)。本研究ではさらにこの技術を展開し、糖脂質発現制御下における種々の膜受容体の動態解析を、顕微鏡を用いて行う。

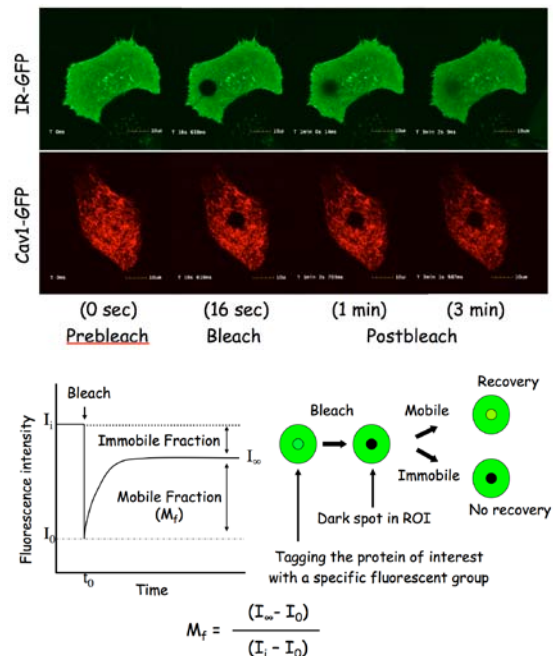


Fig. 1 (上図) FRAP 法の実例: HeLa 細胞にインスリン受容体(IR)およびカベオリン1 (Cav1) の GFP 融合タンパク質 IR-GFP および Cav1-GFP を発現させ、それぞれ膜表面を共焦点顕微鏡により時系列的に観察した。測定開始 16 秒後に ROI (測定領域) をブリーチし、1 分後、3 分後の画像を取得した。IR は細胞膜上を拡散するので ROI の蛍光輝度が時間と共に回復している。一方 Cav1 はカベオラ構造を形成し不動化しているため、蛍光輝度が回復しない。(下図) 蛍光回復率の時間経過を示すグラフと FRAP の概念図: 回復曲線の終末点 (カーブフィッティングにより予測可能) から目的分子の動的成分比率を求めることができる。また曲線の立ち上がりの度合いから拡散速度を (拡散係数として) 算出することもできる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖脂質マイクロドメインが細胞膜に存在する分子、特に膜受容体分子の膜局在 およびシグナリングに与える影響を、蛍光顕微鏡を用いた分子動態観察により解析し、糖脂質の受容体シグナルへの積極的な関与を実証するものである。具体的には、細胞膜上で糖脂質ガングリオシド GM3 が構築する微小ドメインの量的・質的な変化に的を絞り、この変化がインスリン受容体(IR)、上皮成長因子受容体(EGFR)の側方拡散やシグナル伝達に寄与していることを、光退色後蛍光回復(FRAP) 法(Fig.1)を用いて解析していく。

3. 研究の方法

FRAP 法ではターゲットとなる分子に蛍光標識を施すことが必要である。その標識分子を発現させた細胞において解析したい領域 (ROI) に強いレーザーを短時間照射し、分子の機能を壊すことなく蛍光のみを退色(ブリーチ)させる。もし目的分子が不動ならば、ブリーチ領域の蛍光は回復しない。動的な分子ならば、拡散することで、周囲の未退色分子が混ざり合い、ブリーチ領域の蛍光は回復していく。この時間経過にともなう蛍光回復率をグラフにプロットすることで、目的分子の動的成分比率や拡散速度を算出することができる(Fig.1)。この手法を用いて、IR の膜上で

の動態が脂質組成の変化によりどのような影響を受けるのかを測定した。まず、IR-sEGFP の安定発現株を CHO-K1 細胞を用いて作成し、蛍光標識した受容体がインスリンにより活性化することを確認した(Data not shown)。次に細胞株に対して FRAP 計測を行った。

測定には共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Olympus FV1000-D) を用いた。対物レンズは UPLSAPO の 60 倍水浸で開口数は 1.20、蛍光の励起にはマルチアルゴンレーザー(波長 488 nm) を用いた。イメージサイズは 512x512 pixel とし、スキャンスピードは 4.0 usec/pixel、ズームは 5.0 倍(0.082 $\mu\text{m}/\text{pixel}$) に設定した。スキャン設定は、ブリーチ前にレーザーパワー 1.0% で 5 フレーム、ブリーチ ROI の形状を円形(radius 30 pixel = 2.46 μm) にし、レーザーパワー 100% で ROI を 3 回ブリーチした後、レーザーパワー 1.0%、94 フレームを取得する条件で行った。細胞は 35 mm ガラス底ディッシュに培養し、測定前にフェノール非含有培地である Opti-MEM に交換した後、顕微鏡に設置した培養ステージにて 5 分以上安定させた。

4. 研究成果

まず、コントロールとなる IR-sEGFP 安定発現株に対して FRAP を行い、得られた蛍光回復曲線に対して非線形カーブフィッティング解析を行った。カーブフィッティングとは、実験的に得られたデータに対して、決められた条件に最も良く当てはまるような曲線を求めることで、今回我々は、IR が細胞膜上で複数の異なる側方拡散を行う成分に分離できる (即ち、細胞膜が 2 つ以上の不均質な成分で構成され、そこを IR が拡散している) と仮定し、Fig. 2 のようなモデル式を当てはめた。計算には Origin8 (Light Stone 社) を用いて最小自乗法を使用した。その結果、IR の拡散成分が 1 成分であると仮定したよりも、2 成分と仮定した方が、オリジナルデータと計算結果の間の 2 乗誤差の和を示す

カイ 2 乗値 (χ^2) が減少することがわかり、Fig. 2 に示されるようにフィッティングカーブも 1 成分(青色)より 2 成分(赤色)の方が実測値に重なった。このようにして成分数を増やした結果、3 成分以降では至適な成分比が得られなかったため、本研究では IR を 2 成分に分けて以降の検討を行った。

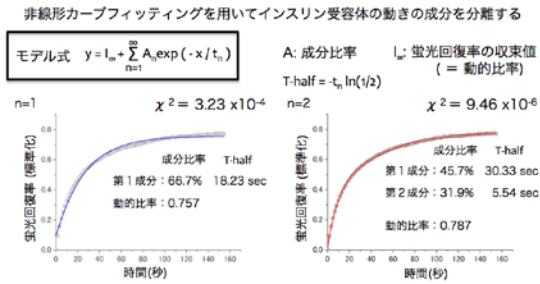


Fig. 2 非線形カーブフィッティング解析による IR の拡散成分分離。1 成分フィッティングでも充分収束しているが (補正 $R^2=0.98808$)、2 成分フィッティングではより収束していることがわかる (補正 $R^2=0.99965$)。

今回のモデル式によるフィッティング解析から、動的成分を 100%としたときの成分比率、蛍光回復率の収束値 (=動的比率) および各成分が完全に蛍光回復するまでの時間の半値 (T-half) を求めた。その結果、遅い拡散(T-half = 30.33(sec))をする成分は 45.7%、速い拡散(T-half = 5.54(sec))をする成分は 31.9%、動的比率は 0.79 となった。

続いて膜脂質の組成を外因的に調節するために、本研究では、コレステロールを包括し除去する試薬である M β CD と糖脂質合成阻害剤の D-PBPP を用いて検討を行った (Fig. 3)。M β CD が細胞の形状および生死に影響がない条件を種々検討した結果、濃度および処理時間は 5mM 10min に確定した。この条件において FRAP 計測を行いコントロールと比較した結果、動的比率が 0.79 から 0.68 に減少した。興味あることに、この時 IR の遅い成分には影響はなく、速い成分の成分比率のみが同程度減少していた。また、それぞれの IR の拡散定数を算出したところ、M β CD

処理による顕著な変化はみられなかった。一方、糖脂質合成阻害剤である D-PBPP の処理条件は常法により 20 μ M 48 時間で行った。この条件において同様に FRAP 計測を行いコントロールと比較した結果、動的比率は M β CD とは逆に 0.76 から 0.82 に増加した。この時 IR の速い成分には影響はなく、遅い成分の成分比率のみが同程度増加していた。IR の拡散定数は各成分とも若干減少したが顕著なものではなかった。

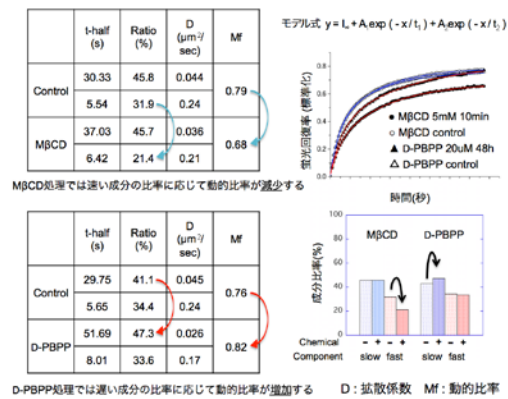


Fig. 3 コレステロールの除去と糖脂質合成阻害では生細胞におけるインスリン受容体の挙動が全く異なる。M β CD 処理では速い成分の比率に応じて動的比率が減少し、D-PBPP 処理では遅い成分の比率に応じて動的比率が増加する。

また、それぞれの処理条件において、IR のインスリン刺激による自己リン酸化を調べたところ、M β CD では活性の増減は観察されなかったが D-PBPP では顕著な低下が見られた(Data not shown)。さらに、EGFR-mCherry を用いて、M β CD にて処理した際の FRAP 計測も行った結果、IR と同様の傾向を示すことが分かった (Fig.4)。

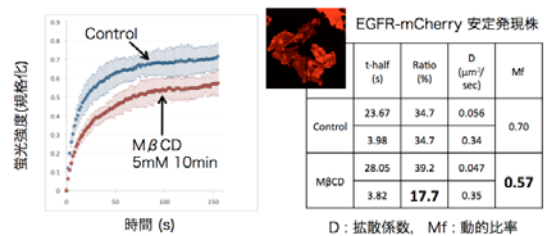


Fig. 4 EGFR-mCherry における FRAP 解析。IR-sEGFP と同様に M β CD 処理により動的比率および遅い成分の比率が減少した。

これらの結果は、膜受容体が脂質組成変化の影響が異なる複数の領域(マイクロドメインを含む)に存在し、領域ごとに受容体の活性調節が行われている可能性を示しており、生細胞において1分子観察以外の方法でマイクロドメインの存在を示す重要な証拠となり得る。今後はさらに成長因子刺激時の受容体の動態を解析していく予定である。

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 2 件)

- 1) 樺山一哉, 鈴木佑典: 糖脂質マイクロドメインの機能および構造解析、東海大学糖鎖科学研究所紀要、Vol.5、p26-32 (2011)、東海大学糖鎖科学研究所、査読無
- 2) 樺山一哉: 糖脂質マイクロドメインと膜受容体の相互作用解析、*PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN*. No.78 (2010) 日本ペプチド学会、査読無

[学会発表] (計 13 件)

(ポスター発表)

- 1) Kazuya Kabayama: Analysis of glycolipid-membrane protein interaction by optical microscope、第二回 光塾、2010 年 12 月 11-12 日、大阪
- 2) 横井麻加, 出口友紀子, 郷慎司, 樺山一哉, 吉村祐一, 高畑廣紀, 井ノ口仁一: 2 型糖尿病治療薬としての新規グルコシルセラミド生合成酵素阻害剤の開発、BMB2010、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
- 3) Kazutaka Oda, Kazuya Kabayama: Measurement of the lateral diffusion of insulin receptor in membrane microdomain by fluorescence recovery after photobleaching、BMB2010、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
- 4) Yusuke Suzuki, Kazuya Kabayama: Convenient and rapid removal of detergent from gangliosides in detergent-resistant membrane

microdomains、BMB2010、2010 年 12 月 7-10 日、神戸

- 5) Kazuya Kabayama: Alteration of lipid component in microdomain affects lateral diffusion of membrane receptor、BMB2010、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
- 6) Kazuya Kabayama: Measurement of the lateral diffusion of growth factor receptors in membrane microdomain by live cell imaging system、The 2nd ACGG Conference、2010 年 10 月 26-30 日、台北
- 7) Kazuya Kabayama, Jin-ichi Inokuchi: New approaches to detect behavior of growth factor receptors in plasma membrane microdomains、第 25 回 国際糖質シンポジウム (ICS2010)、2010 年 8 月 1 日-6 日、幕張
- 8) Kazuya Kabayama, Jin-ichi Inokuchi: Dynamic behavior analysis of insulin signaling molecules in glycolipid enriched membrane microdomain、the 27th Naito Conference on “Membrane Dynamics and Lipid Biology [I]”、2010 年 6 月 29 日-7 月 2 日、札幌
(口頭発表)
- 9) 樺山一哉: 糖脂質マイクロドメインの機能および構造解析、第 8 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、2010 年 11 月 29 日、品川
- 10) 尾田和隆, 鈴木優里, 樺山一哉: 細胞膜上における膜受容体の挙動解析、東海大・成蹊大・群馬大 合同セミナー、2010 年 10 月 24 日、東海大学山中湖セミナーハウス
- 11) 樺山一哉: ラスター画像相関分光法による膜分子の動態解析、第 2 回総合医学研究所・糖鎖科学研究所合同シンポジウム、2010 年 5 月 28 日、東海大学
(招待講演)
- 12) Kazuya Kabayama: Modulation of Growth Factor Receptors in Membrane Microdomains、第 131 回日本薬学会年会特別シンポジウム、

2011年3月28日-31日、静岡（震災のため中止*要旨あり）

13) Kazuya Kabayama : Glycolipid-enriched microdomain control lateral diffusion of membrane receptors、第48回日本生物物理学会年会シンポジウム、2010年9月20日-22日、仙台

[その他]
ホームページ等
<http://www.tsc.u-tokai.ac.jp/pubhome/glyco/>

6. 研究組織

(1) 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