

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06082

研究課題名(和文) 膵細胞におけるガレクチンラティスの機能メカニズムの解明と病態生理学的意義の理解

研究課題名(英文) Elucidation of the functional mechanisms of galectin lattices in pancreatic beta cells and understanding their pathophysiological significance

研究代表者

大坪 和明(Ohtsubo, Kazuaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・教授

研究者番号：30525457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜に発現するトランスポーターやチャネル分子の局在や機能は、それら分子が有する糖鎖と細胞外に存在するガレクチンとが結合し、ガレクチンラティスを形成することで制御されていることが知られているが、その詳細は未だ明らかになっていない。本研究において我々は、このガレクチンラティス形成やその崩壊が引き起こすエンドサイトーシスのメカニズムを明らかにするため、細胞表面に形成されるガレクチンラティス複合体の構成分子を質量分析により解析し、それら機能の解析を行った。その結果、細胞膜におけるガレクチンラティス形成に必要なアンカー分子やエンドサイトーシスに関与するキナーゼの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはこれまでの研究から膵臓細胞におけるガレクチンラティスの崩壊が、グルコースセンサー分子であるGLUT2のエンドサイトーシスを惹起し、結果、血統レベルに応じたインスリン分泌機能が障害され、糖尿病を発症することを見出してきた。本提案研究により、その詳細な分子メカニズムの解明のための大きな手がかりを得ることに成功した。この成果は、細胞膜タンパク質のホメオスタシス機構の理解という学術的な意義があるのみならず、糖尿病などの代謝疾患の治療や、入院患者等の栄養管理で問題となるRefeeding syndromeの予防や患者のQOLの改善に繋がり、その社会的波意義や、臨床的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：It is well known that the localization and function of transporters and channel molecules expressed on the plasma membrane are regulated by the formation of galectin lattices on the cell surface, which are formed by the binding of glycan chains of these molecules to galectins that exist extracellular space. However, the detailed mechanism has not been well elucidated. In this study, we analyzed the galectin-lattice complexes formed on the cell surface by mass spectrometry to elucidate the mechanism of the formation of the galectin-lattice and the endocytosis induced by the destruction of the galectin-lattice, and then analyzed their functions on the cellular physiological regulations. As a result, we succeeded in identifying anchor molecules required for galectin lattice formation at the plasma membrane and kinases involved in the endocytosis induced by the disassembly of the galectin-lattice.

研究分野：疾患糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 ガレクチンラティス 膵臓 細胞 GLUT2 エンドサイトーシス Protein kinase C Teneurin-3

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を隔てた分子の選択的輸送は、細胞生理機能の恒常性維持や細胞微小環境への適切な応答に不可欠な初期過程である。その機能は細胞に発現する特異的トランスポーターやチャネル分子が担っているため、これら分子の発現パターンや形質膜への局在が輸送活性を決定する。これら分子の機能は、自身の糖鎖によって制御されるがそのメカニズムは十分理解されていない。細胞の糖鎖合成経路は細胞微小環境に応じて精密に制御されており、結果、細胞微小環境の変化に応じて細胞表面上に発現するトランスポーターやチャネル分子の糖鎖構造が変化することになる。一方、細胞間質には糖鎖中のガラクトシド構造を特異的に認識し結合するガレクチンが存在し、細胞膜表面の糖タンパク質と結合し分子間を架橋することで『ガレクチンラティス』という機能ドメインを形成すると考えられている。

我々は、糖転移酵素 GnT-IVa の欠損マウスの解析により、糖鎖が生体の恒常性維持に不可欠な生体高分子であることが明らかにしてきた。膵臓細胞において、グルコーストランスポーター 2 (GLUT2) が GnT-IVa により糖鎖修飾を受け、その糖鎖を介してガレクチン 9 とガレクチンラティスを形成することを発見した。これにより膵臓細胞のグルコースセンサー機能が保持され、血糖に応じたインスリン分泌が可能になることを証明するとともに、この糖鎖修飾不全が血糖に応じたインスリン分泌不全を引き起こし 2 型糖尿病の原因となることを発見した。GLUT2 のみならず、これまでの研究から、細胞表面で機能する様々な糖タンパク質の機能がガレクチンラティスにより制御されていることが明らかになってきている。

ガレクチンラティスによる細胞膜タンパク質の機能制御は、多くの知見に裏付けられた一大作業仮説・概念であり、今なお、その概念証明や機能解析が精力的に進められている。古くから、X 線結晶解析によるレクチン複合体の構造解析や化学量論に基づいたガレクチンラティスの格子構造モデルの構築が進められ、今では、ガレクチンラティスが関与する細胞機能の事例が数多く報告されている。しかし、未だガレクチンラティスによる膜タンパク質の機能制御メカニズムは不明である。糖鎖形成不全や、糖鎖リガンドによる競合的ガレクチンラティス破壊が膜タンパク質のエンドサイトーシスを惹起することが一般的に知られているが、その詳細なメカニズムは全く明らかになっていない。病態形成過程におけるプロテオスタスタシスの理解は、ポストゲノム時代の重要課題の一つとなっており、ガレクチンラティスの形成メカニズムやその崩壊による障害の発生機構の解明を進めていく必要がある。

2. 研究の目的

本提案研究では、申請者のこれまでの研究をさらに発展させ、膵臓β細胞におけるガレクチンラティスの機能メカニズムの解明と、個体レベルでのエネルギー代謝における病態生理学的意義の理解を目的とする。本研究の骨頂は、これら取組により細胞生物学の一大課題である細胞膜を隔てた選択的輸送機構に「糖鎖修飾を介したガレクチンラティス形成による制御」という新たな概念を書き加えることである。このような研究アプローチは国内外において例がなく、本研究課題は非常に独創性の高いものである。本研究により膵臓β細胞の新規制御法が見出されれば、生活習慣を背景とする糖尿病などの代謝疾患の治療や、入院患者等の栄養管理で問題となる Refeeding syndrome の予防や患者の QOL の改善に繋がることを期待される。

3. 研究の方法

(1) ラクトース処理によるガレクチンラティス破壊と GLUT2 及び CAT3 のエンドサイトーシス
マウス膵臓細胞由来インスリノーマである Min6 細胞の培養上清中にガレクチンのリガンド構造を持つラクトースを添加し、細胞膜表面でのガレクチンと膜タンパク質の糖鎖との結合を競合的に阻害した。ラクトース添加の前に細胞膜表面膜タンパク質を Sulfo-NHS-LC-Biotin により Biotin 化し、ラクトース処理後経時的に細胞ライセートを回収し、抗 GLUT2 抗体または抗 CAT3 抗体で免疫沈降後、Biotin 化された分子の減衰を捉えることで解析を行った。

(2) ガレクチンラティス複合体の構成分子の探索

Min6 細胞の膜表面タンパク質を DTSSP で架橋を行い、ライセート回収後、抗ガレクチン 2 抗体で免疫沈降を行うことで、細胞膜表面に形成されるガレクチンラティスの複合体の構成分子を取得した。これら分子を SDS-PAGE、銀染色後、質量分析によりタンパク質の同定を行った。

(3) CRISPR-Cas9 を用いた Teneurin-3 遺伝子ノックアウト細胞の作成

HEK293T 細胞に pLenti-CRISPR v2-Tenm3、psPAX2、pMD2.G をトランスフェクションしてから培養上清中にウイルス液を取得した。Min6 細胞にウイルス液及び Polybrene を添加し、72 時間後に Puromycin でセレクションを行った。その後、希釈法によるシングルセルクローニングを行った。取得した各クローンからゲノム DNA を抽出し、PCR によりターゲティング領域を増幅後、配列のシーケンシングを行い、変異導入の確認を行った。樹立した Teneurin-3 ノックアウト細胞の表

面における GLUT2 の発現レベルを解析することで、ガレクチンラティス形成における Teneurin-3 の関与の解析を行った。

(4) ガレクチンラティス破壊によるエンドサイトーシスの惹起における PKC の関与
一般的な膜タンパク質のエンドサイトーシスの制御に Protein Kinase C (PKC) が関与することが報告されていることからガレクチンラティス崩壊が引き起こすエンドサイトーシスにおいて PKC の活性化が関与するのかわ、PKC 阻害剤処理細胞を用いて解析した。また、関連する PKC ファミリー分子を同定するため、PKC ファミリーの発現プロファイルをリアルタイム PCR で解析するとともに、PKC 阻害剤の阻害の基質特異性との相関性を解析した。また、同定されたガレクチンラティス複合体構成分子から PKC の活性化に繋がる経路を見出すため、miRNA によるこれら分子のノックダウンを行い、PKC 活性化及びエンドサイトーシスへの影響を解析した。

(5) PKC 活性化経路の上流解析

ガレクチンラティス複合体の構成分子の探索から見出された S1P2 は PKC の上流分子の有力な候補であることから、S1P2 阻害剤を用いてガレクチンラティス破壊により惹起されるエンドサイトーシスにおける S1P2 の関与の解析を行った。また、ラクトースによるガレクチンラティスの破壊時における S1P2 の分子量を解析することで、その修飾を解析するとともに、産生される DAG を解析した。

4. 研究成果

(1) ラクトース処理によるガレクチンラティスの崩壊の結果、細胞表面の GLUT2 の発現量が低下することが確認された。一方、PKC 阻害剤である BIM-1 の添加により細胞表面の GLUT2 発現レベルの低下が抑制された。この結果は、GLUT2 のエンドサイトーシスが PKC の制御を受けていることを示唆している。興味深いことに、ラクトース処理細胞のみならず、非処理細胞やスクロース処理細胞においても同処理により GLUT2 タンパク量の若干の上昇が観察されたことから、定常的な GLUT2 のエンドサイトーシスによるクリアランスも PKC を介していると考えられた。さらに、PKC activator である PMA 処理を行い、細胞膜表面の GLUT2 の発現量を解析した。その結果、PKC の活性化によりエンドサイトーシスが誘導され、細胞表面の GLUT2 の発現量が低下することが確認された。さらに、PMA 処理と同時に BIM-1 を処理することで細胞表面の GLUT2 の発現低下を抑制することができたことから、膵臓細胞での PKC の活性化が GLUT2 のエンドサイトーシスを引き起こすことが判明した。さらに、ガレクチンラティス崩壊による GLUT2 のエンドサイトーシスにおいて、PKC が関与することを確認するため、GLUT2 と Clathrin の細胞内局在を間接蛍光抗体染色で解析した。非処理細胞では GLUT2 が細胞表面に局在するが、ラクトース処理によりガレクチンラティスを崩壊させると、細胞膜表面の GLUT2 が減少し、細胞内に Clathrin と GLUT2 の共局在が観察された。PMA により PKC を活性化するとラクトース処理の有無に関わらず細胞表面の GLUT2 が減少し細胞内に Clathrin と GLUT2 の共局在が観察された。一方、PKC 阻害剤処理により、ラクトース処理、PMA 処理細胞でもエンドサイトーシスが抑制された。PKC には構造的に相同性を有する 10 種類のアイソフォームが存在する。我々が用いた PKC inhibitor である BIM-1 は PKC α 、PKC β 、PKC γ を阻害する化合物であることから、MIN6 細胞における GLUT2 のエンドサイトーシスにはこれらアイソフォームが関与すると考えられた。そこで、MIN6 細胞において発現する PKC アイソフォームを RT-PCR で解析した結果、MIN6 細胞には PKC α および PKC β が発現していることが確認された。これらの結果から、GLUT2 のエンドサイトーシスには PKC α または PKC β のいずれか、またはその両方が関与することが示された。

(2) GLUT2 の細胞膜表面での発現における Teneurin-3 の関与を解析するため、樹立した Teneurin-3 w/ Δ MIN6 細胞を解析した。Teneurin-3 w/ Δ MIN6 細胞の Teneurin-3 タンパク質の発現レベルが片方のアリルの変異導入と一致して、約 50% に減少していることが確認された。一方、Teneurin-3 w/ Δ MIN6 細胞における GLUT2 タンパク質の総量はほとんど変化が見られなかったが、細胞表面における GLUT2 の発現レベルは低下していた。これら結果は Teneurin-3 が細胞表面での GLUT2 の安定的な発現に関与していることを示唆している。さらに、Teneurin-3 w/ Δ MIN6 細胞において PKC を阻害すると、細胞表面における GLUT2 の発現レベルが増加した。これらの結果は、細胞表面の GLUT2 の安定化に Teneurin-3 が関与しており、Teneurin-3 の減少が PKC を介した GLUT2 のエンドサイトーシスを惹起することを示している。

(3) 質量分析によるガレクチンラティス構成タンパク質の探索により、CAT3 や Teneurin-3、Sphingosine 1-phosphate receptor 2 (S1P2) 等が構成分子として同定された。興味深いことに、ガレクチンラティス構成分子として同定された S1P2 は G タンパク質共役型受容体であり、PLC の活性化や PKC を活性化することが報告されていることから、ガレクチンラティスの崩壊が S1P2 を活性化し、PKC の活性化を介して、局所的なエンドサイトーシスを誘導していると推測された。そこで S1P2 の阻害剤である JTE013 で細胞を処理すると、Sucrose 処理及び Lactose 処理細胞表面での GLUT2 タンパク質が増加することが観察された。この結果は、Min6 細胞におけるエンドサイトーシスによる GLUT2 の定常的なクリアランスや、ガレクチンラティス崩壊により誘導されるエンドサイトーシスが S1P2 の活性化を介している可能性を示している。一方、ラクトース

処理細胞における S1P2 の分子サイズをウエスタンブロットにより解析した結果、ラクトース処理により、S1P2 の分子サイズが僅かに低分子化していることが判明した。これは、S1P2 分子の N 末または C 末が切断されている可能性を示唆しており、これが S1P2 の活性化につながっているのではないかと推察している。加えて、S1P2 によって活性化されることが予測される PLC の産物である DAG 量を解析した結果、ラクトース処理細胞において、処理後速やかに DAG レベルが上昇することが観察された。これら結果は、ラクトース処理によって誘導されるエンドサイトーシスが S1P2 の活性化、PLC の活性化、PKC の活性化という一連のシグナル伝達経路を通じて実行されていることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Ito Ruka, Nagao Keisuke, Ohtsubo Kazuaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of Sialyl-Tn Antigen in Cancer Metastasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glycosignals in Cancer	6. 最初と最後の頁 53~78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-19-7732-9_4	査読の有無 無
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 Nagao Keisuke, Maeda Kento, Hosomi Kasumi, Morioka Kaito, Inuzuka Tatsutoshi, Ohtsubo Kazuaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Sialyl-Tn antigen facilitates extracellular vesicle-mediated transfer of FAK and enhances motility of recipient cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac008	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大坪和明
2. 発表標題 予後不良と相関する糖鎖腫瘍マーカー-Sialyl-Tn抗原の生物学的機能
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長尾恵介、細見夏純、前田賢人、大坪和明
2. 発表標題 sTn抗原による細胞外小胞分泌促進を介した細胞外小胞受容細胞の運動能制御
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Nagao, Kasumi Hosomi, Kento Maeda, Tatsutoshi Inuzuka, Kazuaki Ohtsubo
2. 発表標題 Sialyl-Tn antigen regulates the cellular iron homeostasis and the production of extracellular vesicles.
3. 学会等名 2023 Annual Meeting of Society for Glycobiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大坪和明研究室(大学院生命科学研究部先端生命医療科学部門) https://www.kumamoto-u.ac.jp/kenkyuu_sangakurenkei/kenkyuu/kenkyu/laboratory-exploration/57-2015summer</p>

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
研究協力者	長尾 恵介 (Nagao Keisuke)	熊本大学 大学院・保健学教育部・大学院生 (17401)	
研究協力者	四位 一平 (Shii Ipei)	熊本大学 大学院・保健学教育部・大学院生 (17401)	

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
---------	---------