

新しい糖脂質蛍光プローブを開発して

細胞膜の“筏ナノドメイン”を解明

—ウイルスや毒素の細胞内侵入機構の解明に新しい光—

木曾真 京都大学 (総長：山極壽一) 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) ・岐阜大学 (学長：森脇久隆) 応用生物科学部教授、安藤弘宗同准教授、河村奈緒子同研究支援員、楠見明弘 京都大学 iCeMS ・沖縄科学技術大学院大学 (学長：ジョナサン・ドーファン) 教授、鈴木健一 京都大学 iCeMS 准教授らの研究グループは、細胞膜の構成成分で、細胞膜の重要な働きをになう特殊な糖脂質、ガングリオシド*1の細胞膜上での動きや分布の可視化に世界で初めて成功しました。

さらに、ガングリオシドが、GPI アンカー型受容体*2とよばれる種類の受容体と細胞膜上で結合したり離れたりする様子を可視化することにも成功し、さらに、この結合には、コレステロールが必要なことを見いだしました。すなわち、これら3種の分子が、会合体を作ることを世界で初めて証明しました。この発見の画期的なところは、以下の3点です。

(1) これら3種の分子は細胞膜内で集合して「筏 (いかだ) ドメイン」*3と名付けられるナノドメインを作る可能性がこの25年間疑われてきました。筏ナノドメインは受容体の機能発現やウイルス・毒素などの細胞内侵入に重要という強い意見もあり、生細胞内で本当に存在するかどうかは大きな課題でした。本研究で初めて、これら3種分子を含むナノドメインの存在が証明されました。

ガングリオシドが筏ナノドメインに出入りする様子を1分子ずつ見たり、筏ナノドメインが動く様子を解析することにも成功しました。これらによって、

(2) ガングリオシドは筏ナノドメインを作るという重要な働きがあることが分かりました。

(3) ガングリオシドは10~50ミリ秒 (1秒の1/100~1/20) の時間スケールで筏に入っては出ていくという、きわめて動的な制御がなされていることが分かりました。これによって、何故いままでも、筏ナノドメインが生きている細胞内で見つからなかったかも分かりました。ナノサイズという小ささに加えて、分子がきわめて動的に出入りするので、普通の方法では見えなかったのです。

では、本研究では、どのような方法で可視化に成功したのでしょうか？ガングリオシドは天然のままでは見えません。そこで蛍光を発する小分子をガングリオシドに結合させて、その蛍光をマーカー (プローブ=探針、と呼びます) として追跡しました。今までの方法では、ガングリオシドの特定の部分に1個だけプローブをつけるのは困難なうえに、プローブ結合によってガングリオシドの機能を損なっていました。今回、研究グループは、蛍光分子とガングリオシドの複合

体の全化学的合成に成功し、さらに17種の中から機能を損なわないものを選ぶことで、これらの問題をクリアしたのです。さらに、生細胞の細胞膜中で、蛍光ガングリオシドを1分子イメージングにより可視化し、1分子追跡することで、ガングリオシドの動的な動きを手にとるように見ることができました。

インフルエンザウイルスやコレラ毒素のような病因物質が細胞内に侵入するときには、細胞膜の筏ナドメインを上手に乗っ取って侵入することが示唆されています。本研究で開発された方法と得られた結果は、侵入機構の解明のための大きな一歩であるばかりでなく、侵入を阻止する薬剤開発にも寄与するものです。

本研究は文部科学省 科学研究費助成事業（研究代表 木曾真, 課題番号 22380067; 安藤弘宗, 23688014, 15H04495; 楠見明弘, 24247029; 鈴木健一, 24370055, 15H04351）、文部科学省 WPI プログラム（京都大学 物質－細胞統合システム拠点 = iCeMS）および科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業 CREST（研究分担者 楠見明弘）によって推進され、京都大学 物質－細胞統合システム拠点・岐阜大学応用生物科学部で行われたものです。

本成果はロンドン時間 2016 年 4 月 4 日 16 時（日本時間 5 日午前 0 時）の週に米科学誌「Nature Chemical Biology (ネイチャー・ケミカル・バイオロジー)」オンライン速報版で公開されました。

1. 本研究の背景と目的

地球上の全ての細胞の細胞膜は2次元の液体です。細胞膜は、脂質とタンパク質からできていて、それらの分子は細胞膜の2次元液体中で熱運動（ブラウン運動）して動き回っています（図1）。

本研究の中心分子であるgangliosideは、細胞膜を作る脂質の中でも糖脂質と呼ばれる種類の分子に属します。gangliosideの代表的な18種の模式構造（糖鎖の種類によって区別したもの）を図2に示します。

本研究でgangliosideを取り上げたのは、それが細胞膜の脂質の数%しかいない少数構成成分であり、それだからこそ、単なる細胞膜の構造形成分子である以上に、細胞膜の様々な特異的機能に関与することが推定されてきたからです。例えば、発癌に関与する受容体である上皮成長因子(EGF)受容体⁴や神経回路の働きを中心とするAMPA型受容体⁵、GPIアンカー型受容体と呼ばれる一群の特殊な構造を持つ受容体（次ページ図3）の機能を調節するなどの生理的機能が推定されていました。

さらに、gangliosideは、細胞膜中にある「筏ドメイン（ラフト）」³と名付けられる仮想的ナノドメインの形成に関与する可能性が議論されてきました。gangliosideという分子自体、生物学の非常に大きなミステリーなのですが、さらに筏ドメインも、この25年くらい、大きな論議を呼んできた作業仮説です。細胞膜は2次元の液体なのですが、その中で、筏のようなドメインができるという概念が面白い上に、筏ナノドメインは受容体の機能発現やウイルス・毒素などの細胞内侵入に重要という示唆も得られていたので、大きな関心を呼んでいました。gangliosideは、筏ドメインで働くという強い意見もありました。その一方で、筏ナノラフトドメインは、多くの研究者の努力にもかかわらず、生細胞の細胞膜内では検出できなかったのです。そのため、筏ナノドメインは本当に存在するか、gangliosideが筏ドメイン形成に本当に関与し、本当にそこで働くのかどうか、と

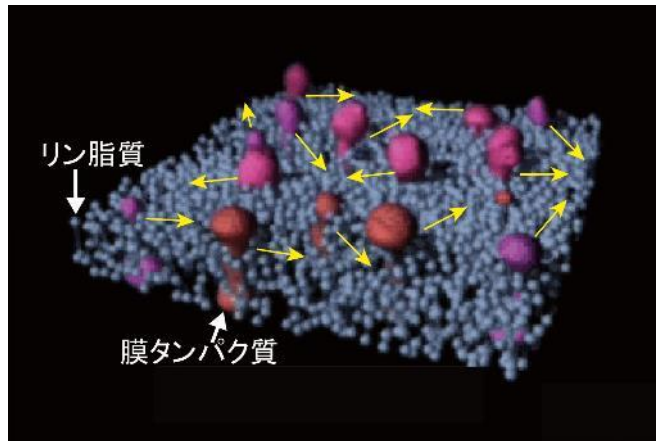


図1. 細胞膜は脂質と膜タンパク質が混じり合っ、2次元の液体を作っている。分子は細胞膜中で熱運動（ブラウン運動）している。

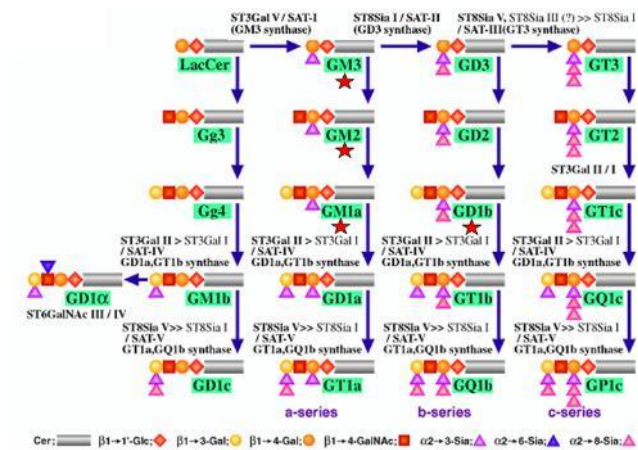


図2. 代表的なgangliosideの構造と生合成経路（矢印）。Glycoforumのホームページより転載。色は、様々な糖を示す。LacCerに様々な糖が結合している。紫色の三角がシアル酸で、これが結合している分子をgangliosideと呼ぶ。灰色部分が脂質（糖と脂質がある分子を糖脂質と呼ぶ）。

いうことを解明することは、ここ 20 年くらい、シグナル伝達や病因物質の侵入機構などの研究における大きな課題となっていました。

そこで、本研究では、以下の 3 つを目的として、検討を行いました。

(1) ガングリオシドを、生細胞の細胞膜中で分子 1 個ずつの単位で、画像として見る方法を開発すること。

(2) ガングリオシドと、筏ドメイン親和性と考えられている受容体 (GPI アンカー型受容体の 1 種である CD59^{*6}) の相互作用 (どのように接近し、結合し、解離するか) を明らかに

し、さらに筏ドメイン形成に必須であると仮定されているコレステロールの関与を解明すること。

(3) (2)の研究によって、生細胞の細胞膜中で筏ドメインを検出し、物性と機能を解明すること。

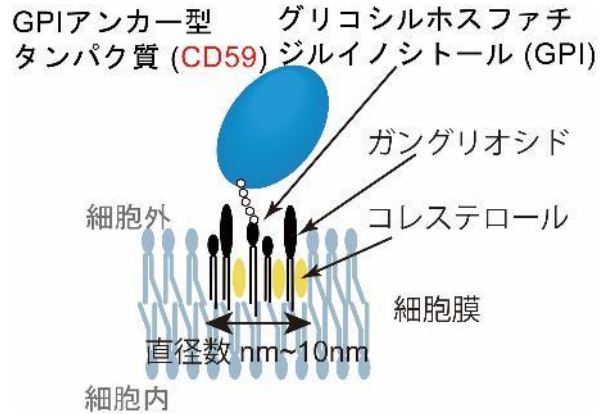


図 3. ガングリオシド、GPI アンカー型受容体 (CD59)、および、コレステロールの作る筏ナノドメインのモデル (我々の作業仮説)。

2. 研究内容と成果

2-1a. 蛍光標識されたガングリオシドの全合成

上記のような目的を達成するため、分子細胞生物学で普通に考えられる方法は、ガングリオシドに蛍光を発するマーカー分子 (プローブ=探針、と呼びます) で目印をつけ、その蛍光を細胞膜上で画像として観察する、というものです。今までもこの方法は試みられてきましたが、成功しませんでした。実際、いままで、生細胞の細胞膜中でのガングリオシドの分布・動き・他の分子との相互作用、相互作用による分子複合体形成などがわからなかった最も大きな原因は、ガングリオシドと同様に振る舞う適切な蛍光標識ガングリオシドがなかったことにありました。この方法がガングリオシドで成功しなかった理由は、ガングリオシドに蛍光プローブをつけようとすると、特定の 1 箇所ではなく様々な部位に結合してしまうこと、プローブの結合部位によってはガングリオシドの機能がなくなること (プローブは事件をレポートするためのレポーターでなくてはならないのに、現場に行かなかったり、現場で正しくはたらかなかったり、それどころか事件を引き起こしたりする) が起こっていたためです。そのため、本研究では、ガングリオシドの機能を妨げない部位で、解釈が単純になるように、特定の 1 箇所だけに蛍光プローブを結合させることを、最初の目的としました。

以前、木曾、安藤、河村らのグループは、世界で初めてガングリオシドの全化学合成^{*7}に成功していました。今までは、動物や植物から精製してきたガングリオシドをうまく改変して、蛍光プローブを結合させようとして、失敗していたのです。しかし、全化学合成法に基づくと、これは最初から完全に分子がデザインできます。それで、蛍光プローブが特定の部位に 1 個だけ結合したガングリオシドが化学合成できました。本研究では、ガングリオシドのうち 4 種のガングリオシド (GM1, GM2, GM3, GD1b) で蛍光プローブが結合した分子の合成に成功しています。実際には、蛍光プローブを結

合させる場所を変えたり、蛍光プローブの種類を変えたりして、17種の分子を合成し、その内、7種が、人工のラフト類似モデル系で、ガングリオシドの正しい蛍光類似体として振る舞うことが分かりました(図4)。また、これらの検討の結果、どのように分子をデザインすると、ガングリオシドのうまい蛍光類似体ができるかも分かりました。

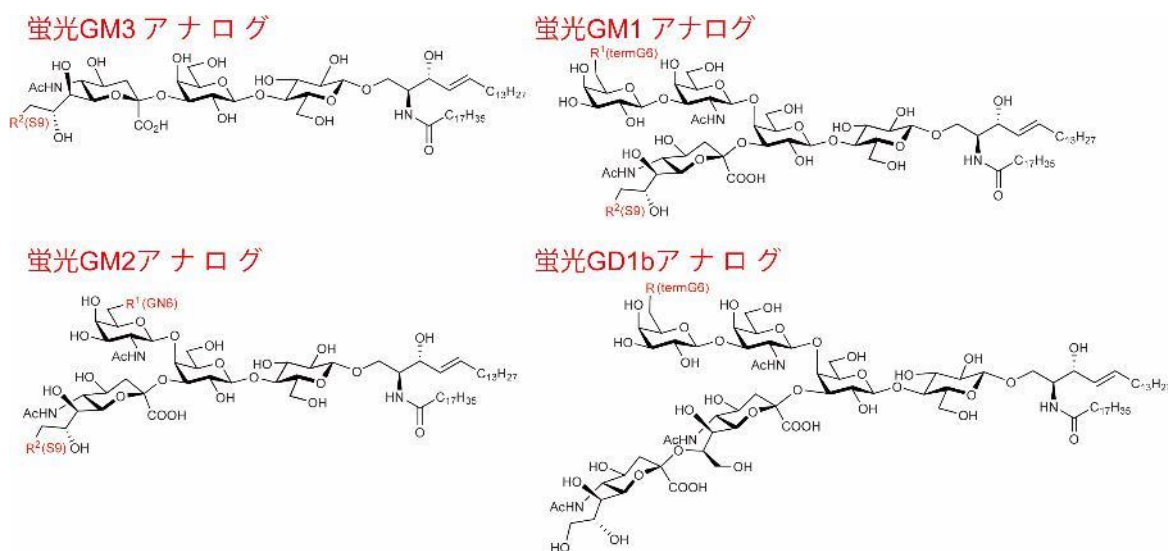


図4. 人工膜系で、天然のガングリオシドと同様に挙動した蛍光標識ガングリオシドの構造

2-1b. 生細胞の細胞膜中での蛍光標識ガングリオシドの1分子観察

生細胞中での1蛍光分子観察と追跡*8は、私たちが世界をリードしてきた方法です。そこで、GM1とGM3という2種の代表的なガングリオシドの蛍光類似体プローブを、生細胞の細胞膜中に導入し、それらを1分子レベルで画像化することにしました。これによって、GM1とGM3の生細胞の細胞膜中での動きが、1分子毎に手に取るように分かるようになりました。これをビデオでご覧に入れます。

2-2. ガングリオシドと、筏ドメイン親和性の GPI アンカー型受容体である CD59 が、コレステロールがあると、過渡的に結合・解離を繰り返すことを見いだした

以前私たちは、1分子観察によって、GPI アンカー型受容体*2と呼ばれる一群の特殊な構造を持つ受容体(図3)は、コレステロールとも結合することによって、寿命が約0.2秒の二量体*9を形成することを示しました(2012, Nature Chemical Biology)。さらに、GPI アンカー型受容体の一つであるCD59を調べることによって、受容体に細胞外からの刺激分子(補体複合体やC8という分子)がCD59に結合すると、今度は安定な四量体(コレステロールを含む)を形成することも示しました。

それまでに、筏ドメインとは、もしそれが生細胞中の細胞膜に存在するとしたら、コレステロールが必須の構造分子で、そこに、GPI アンカー型受容体や特殊な脂質が集まる会合体、であろうと考え

られていました。それで、細胞膜中での筏ドメイン探しが、20年以上行われてきました。しかし、確たる存在証明はありませんでした。

しかし、我々の2012年の論文で、CD59の作るタンパク質二量体がコレステロールで安定化された構造が、筏ドメインの1種であり、他の筏ドメインも類似の構造をもつ可能性が出てきました。それまでは、筏ドメインは直径が20nm (0.02ミクロン) 以上ある (直径が0.1ミクロンとか1ミクロンもあるような、細胞としては、非常に大きな構造と思っている人も多かったのです。細胞の大きさは、直径が数10ミクロン) と推定されていたのですが、CD59の二量体+コレステロールの大きさは数nmしかないこと、また、筏ドメインの寿命は数分以上と以前は仮定されていたのですが、1秒未満である可能性が出てきました。

今回の実験で、筏ドメインを作る特殊な脂質の一種とされていたガングリオシドとCD59が結合すること、それにはコレステロールが必要であることが分かりました。すなわち、筏ドメインを作る3役者がそろい踏みで集合体を作ることが分かりました。すなわち、これが探していた筏ドメインであると考えられます。

GPI アンカー型受容体 (本研究の場合はCD59) は、上記のように、単量体、二量体、四量体と、様々な形態をとります。それらとガングリオシドとの結合を調べた結果、結合時間は、それぞれ、0.012, 0.040, 0.048 ミリ秒であることが分かりました。つまり、ガングリオシドは、複数の分子が次々と交替でCD59に結合してきて、各分子は、非常に短時間しかCD59には結合していないことが分かりました (図5)。

すなわち、今までは、生細胞の細胞膜中で、安定で大きな筏ドメイン構造を探していたので見つからなかったのです。

本研究によって、筏ドメインの大きさはせいぜい数ナノメートル、さらに、長くとも0.2秒程度で分解し、ガングリオシドは、0.01~0.04秒程度で入れ替わるような、極めて過渡的な分子集合体であることが分かりました。

上記で、ガングリオシドは、GM1でもGM3でも変化はありませんでした。すなわち、ガングリオシドに共通の脂質部分の構造が、CD59との集合体形成に重要であることが推定できます。

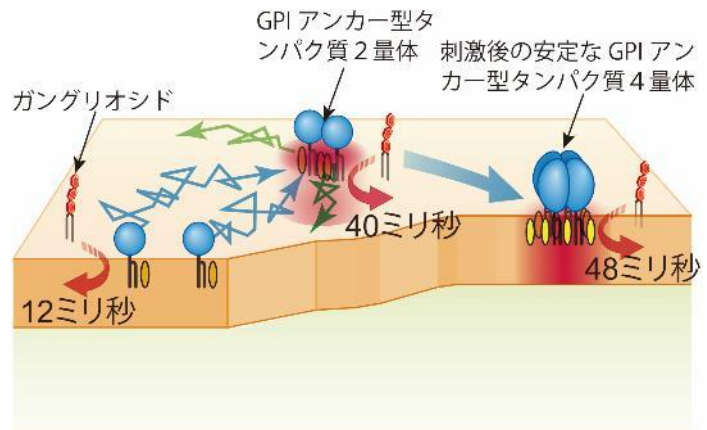


図5. ガングリオシドは、コレステロールがあるときにだけ、CD59単量体、二量体、そして安定化された四量体へ12~48ミリ秒間という短い間、リク

2-3. 生細胞の細胞膜中にある超過渡的筏ナノドメインの物性と機能（まとめ）

(1) 細胞外から CD59 へのシグナルが来る前；CD59 は単量体（単量体に関わる筏ナノドメイン）と二量体を中心とする筏ナノドメインという 2 つの状態間で、常に転換している。二量体筏ナノドメインの寿命は 0.2 秒程度。このような筏ナノドメインができるにはコレステロールが必要で、コレステロールが CD59 筏ナノドメイン形成の必須アイテム（これは、以前、我々が 2012 年にやはり Nature Chemical Biology に出版したことをまとめました）。

(2) (1) の刺激前の細胞膜；CD59 の単量体と二量体に関わる筏ナノドメインに、ガングリオシドは過渡的にやってくる。滞在時間はそれぞれ 0.012 秒と 0.040 ミリ秒。CD59 とガングリオシドの集合にはコレステロールが必要。したがって、CD59+ガングリオシド+コレステロールで筏ナノラフトドメインができる。ガングリオシドの滞在時間は短く、複数のガングリオシドが次々に CD59 筏ドメインにやってきては、すぐに、ラフト外にいる分子と交換することが分かった。

(3) 細胞外から CD59 に刺激が入ったあと；CD59 は主に四量体を中心とする筏ナノドメインを形成する（我々の前回の Nature Chemical Biology 2012）。そこにガングリオシドがリクルートされて来る。滞在時間は 0.048 秒と、やはりとても短い。

(4) すなわち、本研究で、初めて筏ドメインが生細胞中の細胞膜で観察できたといってよい。大きさは数 nm であり、ガングリオシドはきわめて動的に出入りする。滞在時間は 0.010~0.048 秒。すなわち、筏ドメインはきわめて動的な構造であることがわかった。

3. 今後の期待

ガングリオシドは様々な膜受容体の活性制御を行うことが知られていますが、その機構はいまだよく分かっていません。今回、本研究グループが開発したガングリオシド蛍光プローブによって、様々な膜受容体の活性制御機構が明らかになると期待されます。

さらに、コレラ毒素などの毒素、インフルエンザウィルスや HIV などのウィルスが細胞内に侵入するときには、細胞膜のガングリオシドが形成に寄与している筏ナノドメインを上手に乗っ取って侵入することが示唆されています。本研究で開発された蛍光標識ガングリオシドは、侵入機構の解明のための大きな一歩であるばかりでなく、侵入を阻止する薬剤開発にも寄与するもので、今後解明が進むことが期待されます。

用語解説・注釈

※1 ガングリオシド：脂質（正しくはスフィンゴ脂質）に 2 個から 9 個の糖が鎖状に結合している分子をスフィンゴ糖脂質と呼ぶ。糖脂質のうち、糖の少なくとも 1 つがシアル酸（ノイラミン酸）であるものを、ガングリオシドと呼ぶ。代表的なガングリオシドの 18 種を図 2 に示す。シアル酸には細胞表面を負電荷（マイナス電荷）に維持して、不要な細胞間接着を抑制する機能があるほか、インフルエンザウィルスやロタウィルス、コレラ毒素に細胞表面の結合場所を

提供するため、感染の初期反応に重要である。アルツハイマー病発症に関わるアミロイドβは、神経細胞膜上のガングリオシド(GM1)と結合し、重合が進むといわれている。

- ※2 GPI アンカー型受容体：細胞膜上の受容体の1種で、特殊な構造を持っている(図3)。すなわち、タンパク質部分が細胞膜内に全く埋め込まれておらず、細胞の外側表面だけにあり、そのタンパク質部分が glycosylphosphatidylinositol=グリコシル・ホスファチジルイノシトール(GPI)と呼ばれる細胞膜にあるリン脂質に共有結合して細胞膜に繫留(アンカー)されている受容体。このため、GPI アンカー型受容体と呼ばれる。ヒト遺伝子は、約130種のGPI アンカー型受容体をコードしている。実際の細胞膜では、コピー数にして、受容体分子の約10%を占めると推定されている。受容体の役割は、細胞外からのシグナル分子を結合し、さらに結合したことを、細胞内に伝えることである。それにもかかわらず、GPI アンカー型受容体は、細胞内に露出していないという逆説的な構造をもつ。すなわち、この受容体分子だけでは、外側のタンパク質部分に細胞外からのシグナル分子が結合したことを、細胞内にシグナルできない。そのため、GPI アンカー型受容体の細胞内へのシグナル機構に強い関心が集まっている。
- ※3 筏ドメイン(ラフト)：細胞膜は2次元状の液体である(図1)。しかし、膜を作るすべての分子が、液体中でよく混じり合うわけではないことが分かってきた。ちょっとくっつきやすい分子とか、お互いにちょっと避ける分子など、色々な分子から細胞膜はできているということだ。その中で、コレステロールと親和性が高い分子群の存在に、この25年くらい注目が集まっている(膜脂質の30%程度がコレステロール)。それで、細胞膜を海面に例えると、そこにコレステロールを介して集まった分子がぷかぷか浮いているイカダ、というイメージから、筏ドメイン(ラフト)という名前が使われるようになった。細胞膜を模したような単純な人工膜では、このような膜領域を作り出すことができている。細胞膜を弱い中性石鹼状分子で摂氏0度付近で溶かすと、コレステロールとともに色々な分子が溶けずに残るため、これらの分子が筏を作るのではないかと推定されてきた。しかし、生きている細胞中の細胞膜で、筏ドメインが存在するのか、どのような機構でできるのか、どのような大きさで受容はどれくらいか、筏ドメインを作る分子はコレステロール以外には何があるのかは、ほとんどわかっていなかった。人工膜では、大抵、2~3種類の脂質分子で膜を構成するので、そこで、筏もどきの膜領域を作るために必要な代表的な脂質分子は、コレステロールと糖脂質であることがわかっていく。しかし、細胞膜中には、1万種程度の分子が存在し、それらがどのように混ざり合って、液体中に筏ドメインを作るのかは、わかっていなかった。本研究で、実際の細胞にあるラフトの理解が一気に進んだと考えている。
- ※4 上皮成長因子(EGF)受容体：上皮成長因子(EGF)という細胞外からやってくるシグナル分子が結合すると、細胞内にEGFが結合したということ連絡するシグナルを伝達し、細胞の増殖を促す受容体。ガングリオシドGM3が結合すると、シグナル伝達が抑制されることが示唆されている。
- ※5 AMPA 受容体：中枢神経系のシナプスに存在するグルタミン酸受容体の一種で、神経伝達の上流にある神経細胞がグルタミン酸を放出したとき、それが受け側の細胞のAMPA受容体に結合すると陽イオンを透過するようになり、これが受け側の神経細胞の興奮(膜電位変化)につな

がる。記憶や学習に大きく関与している。ガングリオシド GM1 が AMPA 受容体に結合すると、受容体活性が抑制されるという報告がある。

- ※6 CD59：GPI アンカー型受容体的一种。それに細胞外から結合するリガンドは、免疫反応に関わる補体複合体や C8 という分子。抗体の自己攻撃を抑制するための重要な受容体。リガンドが結合するとコレステロールとともに四量体を形成する。
- ※7 ガングリオシドの全化学合成：ガングリオシドは、最近まで、生体から抽出した酵素を利用して合成するか、生体にあるものを精製することで得られていた。ガングリオシドを人工的に合成することは極めて困難で、合成化学の主要課題の一つであった。本研究チームの木曾らのグループが 2009 年に効率的な合成法を開発し、最も難しいとされるガングリオシド GQ1b の全合成に成功した。
- ※8 生細胞中での 1 蛍光分子観察と追跡：生細胞中で観察したい目的分子に、蛍光を発する分子を結合させ、蛍光を目印に 1 分子分解能でその分子を観察する方法である。このためには、特殊な蛍光顕微鏡（本研究では、研究室で開発し組み立てた顕微鏡）を用いる。多数の分子の挙動を 1 個ずつ見て、それらの動きや分布変化が追跡できる。本研究グループでは 1986 年以来、特殊な顕微鏡の開発だけでなく、細胞がよい状態のまま 1 分子観察をするための自動化技術、画像取得後にノイズの中からシグナルを拾って 1 分子を追跡するためのソフトウェアの開発などの技術開発を実施してきており、この分野での世界のリーダーとなっている。
- ※9 二量体 (dimer)：分子 2 個が結合して生成する 2 分子結合体のこと。結合寿命は様々で、結合体の定義が難しい場合も多い。3 つ・4 つの分子がまとまった場合は三量体・四量体と呼ぶ。それに対照して結合しない状態にある分子を呼ぶときは、単量体という言葉を用いる。

論文タイトルと著者

“Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor”

Naoko Komura*, Kenichi G.N. Suzuki*, Hiromune Ando*, Miku Konishi, Machi Koikeda, Akihiro Imamura, Rahul Chadda, Takahiro K Fujiwara, Hisae Tsuboi, Ren Sheng, Wonhwa Cho, Koichi Furukawa, Keiko Furukawa, Yoshio Yamauchi, Hideharu Ishida, Akihiro Kusumi#, and Makoto Kiso#

Nature Chemical Biology DOI: **10.1038/nchembio.2059**

*本研究に同等に貢献したことを示す

#本研究全体に関する共同責任著者