

48 糖鎖相互作用による受容体活性制御機構の解明	鈴木 健一
---------------------------------	--------------

【目的】 シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは、ラフト中で最も重要な分子種の一つであり、特異的機能や多くの疾患に関与するとされてきた。しかし、天然のガングリオシドと同様に挙動する蛍光プローブが存在していなかったために、生細胞の形質膜上のラフト内での挙動など、その動態は全く明らかになっていなかった。この問題を解決するために、我々は、岐阜大学の安藤教授との共同研究で、天然のガングリオシドと同様に振舞う 8 種のガングリオシド蛍光プローブの合成に成功した。本研究では、高精度 1 分子観察法を用いて、生細胞膜上でのガングリオシド動態を解明することを目的とした。

【方法】 生細胞膜や人工リン脂質膜にガングリオシド蛍光プローブを再構成し、それらの 1 分子観察を 37°C で行い、ホモダイマー、オリゴマー寿命、EGF 受容体との共局在期間の測定を行った。また、1 分子 FRET 観察によって、ホモダイマー、ヘテロダイマー寿命の測定を行った。

【結果】 8 種のガングリオシドプローブ (GM1、GM2、GM3、GalNAcGD1a、GD1b、GD3、GT1b、GQ1b、蛍光色素は ATTO594) を、それらのガングリオシドが発現していない細胞膜上で 1 分子観察した結果、いずれのプローブも短寿命 (~200 ミリ秒) のホモダイマーを形成していることが分かった。また、このホモダイマー形成はラフト脂質相互作用によって安定化されていることが明らかとなった。さらにガングリオシドプローブは、人工リン脂質平面膜上でも、細胞膜上と同程度の寿命のホモダイマーを形成していた。従って、ガングリオシド自体の相互作用でホモダイマーが形成されていることが示唆された。ガングリオシドの様々な糖鎖のアナログ体を合成し、1 分子観察した結果、ホモダイマーの安定化に重要な官能基を特定することができた。また、1 分子 FRET 観察の結果、一般にはホモダイマーの方がヘテロダイマーよりも安定だが、ガングリオシドの組み合わせによっては、ヘテロダイマーもホモダイマーと同程度安定に存在しうることも明らかとなった。

ガングリオシドは、様々な受容体の活性制御に関わっていることがよく知られている。しかし、生細胞膜上でのその詳細な機構は明らかではない。そこで我々は、1 分子観察法により、ガングリオシドによる EGF 受容体の活性制御機構を解明しようと試みた。結果、EGF 受容体の N 型糖鎖の一部とガングリオシド GM3 との相互作用が、EGF 受容体のダイマー形成と活性化を抑制することが明らかとなった。

開発したガングリオシド蛍光プローブ

