



Title	固体NMR測定による脂質膜環境におけるガングリオシドGM3糖鎖の配座・配向解析
Author(s)	佐々木, 克聡
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/92165">https://hdl.handle.net/11094/92165</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏名 ( 佐々木 克聡 )

## 論文題名

Conformation and Orientation of Ganglioside GM3 Glycan in Lipid Bilayers as Elucidated by Solid-State NMR  
(固体NMR測定による脂質膜環境におけるガングリオシドGM3糖鎖の配座・配向解析)

## 論文内容の要旨

【研究背景】ガングリオシドはシアロ糖鎖を有する酸性スフィンゴ糖脂質であり、主要なラフト構成分子のひとつである。生体膜において、ガングリオシドはウイルスや細菌毒素の感染やそれに対する防衛機構などに関与している。近年、生体膜環境に依存して、ガングリオシド糖鎖の立体構造およびその性質が調節され得ることが示唆されている。しかし、非結晶性かつ異方的な膜環境にある分子の動的挙動を解析することは困難であり、脂質糖鎖の立体配座・配向を対象とした実験的証拠は乏しい。

【研究計画・プローブ合成】本研究では、多様なガングリオシドの基本骨格を有するGM3に着目し、膜環境にある脂質糖鎖の立体構造を解析することを目指した。測定手法には、低水和状態の脂質二重膜サンプルを用いた測定が可能である固体NMRを適用した。固体NMR実験に向けて、標識による影響が限りなく小さい重水素( $^2\text{H}$ )や炭素13( $^{13}\text{C}$ )などの同位体核種を各糖残基および脂肪酸鎖に位置選択的に導入した一連のGM3プローブをデザインした(図1)。このとき、膜法線を基準として糖鎖の姿勢を考える場合、互いに相補的な立体構造情報を与えるように標識位置を選択した。

プローブ分子の合成経路を確立するため、鍵反応である糖連結反応(グリコシル化反応)において保護基の種類に着目して検討したところ、グルコース部位にナフチルメチル基を有する基質が良好な反応性を示すことが確かめられた。位置選択的に同位体を導入した標識基質をそれぞれ調製し、確立した合成経路に従って個別に連結していくことで7種類のGM3プローブを開発した。

【固体NMR測定・解析】開発したプローブ分子をラフト環境および非ラフト環境を模倣した生体モデル膜に組み込み、固体NMR測定を実施した。モデル膜の主要な脂質組成として、ラフト環境にはスフィンゴミエリンおよびコレステロールを、非ラフト環境には流動性に富むPOPCをそれぞれ選択した。

アシル鎖標識体を用いた測定では、それぞれの膜環境について顕著に異なるNMR観測値が得られた。これより、脂質膜内部の挙動について、ラフト環境下ではコレステロールによるオーダー効果を受けて脂質間のパッキングが強くなり、GM3アシル鎖の揺らぎが抑制されていることが確認できた。また、糖鎖標識体を用いた測定結果を複合的に解析することで、GM3糖鎖の立体配座・配向を解析した。シアロ酸骨格は他の糖残基とは異なり、膜表面と平行な平均配向を示すことがわかった。ただし、糖鎖部標識体を用いた測定結果では、それぞれの膜環境についてNMR観測値に顕著な差は確認されなかった。その一方で、GM3アシル鎖における解析結果とは対照的に、糖鎖末端の揺らぎの程度がラフト環境においてより大きくなっていることを示唆する結果を得た。

【タンパク質との相互作用】最後に、GM3糖鎖を認識する植物レクチンを用いた結合親和性評価を実施した。Sia $\alpha$ 2-3Gal結合を認識することが知られている「*Maackia Amurensis* Leukoagglutinin (MAL)」のリシン残基に対して、5-カルボキシフルオレセインを導入した蛍光標識レクチンを調製した。標識レクチンを脂質膜サンプルに対して添加し、蛍光強度から結合量を評価した。その結果、非ラフト膜における結合量は、ラフト膜のそれよりも大きくなることが確認された。以上より、固体NMR実験を主体とする解析結果を考慮すると、膜環境に応じて糖脂質の動的挙動が変化し、生物学的機能に影響を及ぼしていることが示唆された。

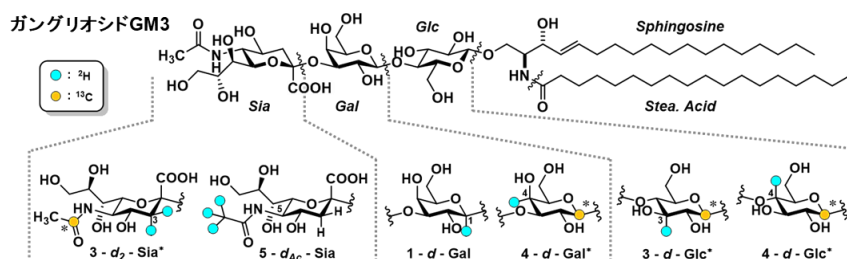


図1. 同位体標識GM3プローブのデザイン

## Abstract of Thesis

Name ( Katsuaki Sasaki )

## Title

Conformation and Orientation of Ganglioside GM3 Glycan in Lipid Bilayers as Elucidated by Solid-State NMR

(固体NMR測定による脂質膜環境におけるガングリオシドGM3糖鎖の配座・配向解析)

## Abstract

**【Background】** Ganglioside is a kind of acidic glycosphingolipids with sialoglycans, and thought as one of the key component for bio-functional membrane domains, so called lipid rafts. On the cell surface, gangliosides are involved in many biological events, such as viral infections. Cholesterol-ganglioside interaction has been considered to regulate the protein-ganglioside interplay by altering the orientation of the glycan headgroup. However, it is difficult to analyze the dynamic behavior of molecules incorporated into an anisotropic membrane environment, and there is only little experimental evidence for the conformation and orientation of lipid glycan.

**【Research Plan, Probe Synthesis】** In this study, I focused on ganglioside GM3, which has a common core-structure of ganglioside family, and examined its glycan conformation and orientation by solid-state NMR experiments. Aiming at solid-state NMR experiments, I designed a series of GM3 probes, in which isotopic nuclides were regioselectively introduced into each carbohydrate residue or fatty acid chain (Fig. 1).

To establish a synthetic pathway for probe molecules, protecting groups of substrates used for glycosylation were investigated. It was confirmed that substrates having naphthylmethyl groups at the glucose moiety showed good reactivity. Each isotopically-labeling unit was

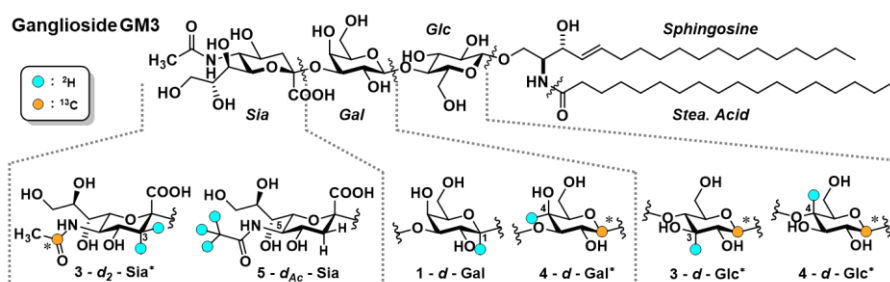


Fig.1 Design of isotopically-labeled GM3 probes

prepared, and they were individually combined according to an established synthetic pathway.

**【Solid-State NMR Analysis】** Solid-state NMR measurements were performed with the model membranes, mimicking the rafts (sphingomyelin and cholesterol) and the non-rafts (POPC) environments.

By using acyl chain labeling probes, significantly different values were observed for each membrane environments. Thus, in the raft environment, it was confirmed that the fluctuation of the GM3 acyl chain was suppressed by the order effect of cholesterol. Then, the conformation and orientation of GM3 glycan were examined by combining the observed values obtained from glycan-labeled probes. Unlike other carbohydrate residues, the sialic acid moiety was found to show an average orientation, parallel to the membrane surface. However, in the results using glycan-labeled probes, no significant differences were observed for each membrane environment. On the other hand, in contrast to the results of GM3 acyl chains, it was suggested that the degree of fluctuation of the glycan-terminal was greater in the raft environment.

**【Binding Affinity Assay】** I also evaluated the binding affinity using a plant lectin that recognizes the GM3 glycan moiety. A fluorescence-labeled lectin was prepared by introducing 5-carboxyfluorescein into the lysine residue of "Maackia Amurensis Leukoagglutinin (MAL)", which is known to recognize the Sia  $\alpha$ -3 Gal glycoside bond. As a result, it was confirmed that the binding affinity in the non-raft membrane was larger than that in the raft membrane. Considering the results of solid-state NMR experiments, it was suggested that the dynamic behavior of glycolipids might differ depending on the membrane environment, and it affects the biological functions of lipid-glycan.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (佐々木克聡)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	村田 道雄
	副 査	教 授	深瀬 浩一
	副 査	特任教授	伊藤 幸成
	副 査	鳥取大学教授	花島 慎弥
<p>生体膜において、糖脂質ガングリオシド GM3 は様々なシグナル伝達に関与している。例えば、上皮成長因子受容体 (EGFR) の働きは GM3 によって抑制される。これら GM3 とタンパク質受容体との相互作用は、膜中のコレステロールの存在によっても影響を受けることが知られているが、その分子機構については計算科学的手法による推定が行われているに過ぎない。佐々木氏は、これら GM3 の関与するシグナル伝達の分子機構における脂質分子間相互作用の役割を構造面から解明することを目的に博士論文研究を行った。</p> <p>佐々木氏は、特に GM3 の糖鎖部分の立体配座と配向を化学的手法によって解明することに主眼を置いた。まず、GM3 を NMR 核で同位体標識し、脂質二重膜内での糖鎖部分を選択的に測定する。NMR 実験によって、膜中での分子回転軸 (膜の法線) に対する GM3 標識原子の配向を解明し、それを分子動力学(MD)シミュレーションと組み合わせることで、糖鎖の立体配座と膜に対する配向を求めることを目指した。まず、同氏は GM3 糖鎖を構成する 3 つの単糖にそれぞれ重水素と炭素-13 を導入するために、効率的な合成戦略を確立し、これを用いて合計 6 種の同位体標識体を調製した。これらに加えて、脂質アシル鎖を重水素化した標識体も調製し、GM3 の疎水性セラミド部分が通常のリン脂質と類似した挙動を取ることを確認した。次に、重水素シグナルと四極子分裂および重水素と炭素-13 の磁気双極子相互作用を、コレステロールの存在下と非存在下で測定することによって、回転軸に対する糖鎖の配向を推定した。固体 NMR 測定によって得られた配向の候補は数種類に及んだが、MD 法を組み合わせることによって配向を絞り込むことができた。その結果、GM3 糖鎖の末端にあるシアル酸部分がコレステロール存在下でやや傾いていることを示す結果を得た。すなわち、この糖鎖の傾きは、GM3 糖鎖とタンパク質の相互作用に対してコレステロールが阻害的に働くことの原因の 1 つであると考えられる。佐々木氏が開発した手法と今回得られた結果は、糖脂質が有する生物機能の分子機構解明に今後資するものと期待される。</p> <p>以上の研究業績によって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>			