

Title	糖鎖構造がタンパク質動態へ与える影響の探索：合成糖鎖表示システムの開発とその応用
Author(s)	三浦, 彩音
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96396
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (三浦 彩音)

論文題名

Exploring effect of glycan structures to protein dynamics: Development of a synthetic glycan displaying system and its applications

(糖鎖構造がタンパク質動態へ与える影響の探索：合成糖鎖表示システムの開発とその応用)

論文内容の要旨

糖鎖は細胞表面を覆い、膜分子の動態やシグナル伝達、細胞間相互作用など様々な生命現象に関わる。糖鎖機能の多くは、多様な生体分子との相互作用形成により発現する。しかし、糖鎖—生体分子相互作用とその機能について詳細に解析することは、糖鎖の構造多様性とその制御の難しさから、非常に困難である。

【合成糖鎖提示手法】

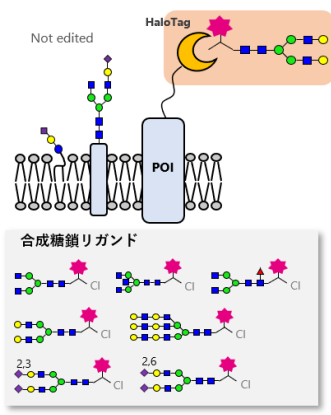
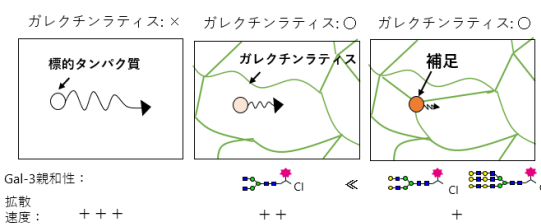
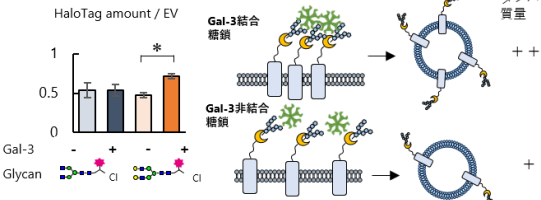


図 本研究の概要

【側方拡散解析】



【EVへのタンパク質ローディング解析】



そこで本研究では、HaloTagテクノロジーを用いて均一構造の糖鎖を標的タンパク質特異的に導入する「合成糖鎖提示手法」を開発した。そして本手法を用いて、主要な糖鎖—生体分子相互作用の一つである糖鎖—Galectin-3 (Gal-3) 相互作用による、タンパク質動態制御機能を解析した (図)。

始めに、合成糖鎖提示手法を開発した。本手法はHaloTagとハロアルカンとの速やかな共有結合を利用して、実際にHaloTag融合タンパク質を膜上に発現させ、ハロアルカンを有する7種類の糖鎖リガンドを導入することに成功した。さらに、複数の構造の糖鎖について、糖鎖認識タンパク質レクチンとの構造特異的な相互作用を、細胞膜上で可視化することに成功した。

続いて、合成糖鎖提示手法を糖鎖—Gal-3相互作用の解析に応用し、次の二つの解析を行った。

i) タンパク質側方拡散抑制の解析

β -ガラクトース含有糖鎖を認識するGal-3は、糖鎖を介して膜タンパク質同士を架橋し、ガレクチンラティスというネットワーク構造を形成する。ガレクチンラティスは側方拡散などの膜タンパク質の動態を制御することが知られているが、その機能を糖鎖構造に基づいて定量的に評価した例はない。そこでガレクチンラティス機能に糖鎖構造が与える影響を、種々の糖鎖リガンドを導入したHaloTag融合タンパク質の動態計測により解析した。結果、ガレクチンラティスの形成に応じて、標的タンパク質に修飾された糖鎖が、Gal-3との相互作用を通して膜タンパク質の側方拡散を構造依存的に調節していることが明らかになった。また、ガレクチンラティスの形成にはN-グリカンの十分な発現が重要であることが示唆された。

ii) 細胞外小胞 (EV) へのタンパク質ローディングにおける糖鎖—Gal-3相互作用の寄与の解析

EVはあらゆる種類の細胞から放出され、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たす。EV膜上の糖鎖組成は、特定の構造の糖鎖の比率が高くなっており、糖鎖駆動的なEVへのタンパク質ローディング制御機構が示唆される。本研究では、糖鎖—Gal-3相互作用によりEVへのタンパク質ローディングが制御されると仮説を立て、合成糖鎖提示手法を用いてGal-3依存性について検証した。そして、Gal-3の添加は、Gal-3結合糖鎖を導入した標的タンパク質のEVへのローディングを促進することを見出した。先行研究から、Gal-3による標的タンパク質のクラスター化がそれ自身のEVへのローディングを促進した可能性が考えられた。予想外に、高濃度のGal-3の添加は、回収した溶液中のEV濃度を減少させた。この現象のメカニズム解明にはさらなる検討が必要である。

以上より、合成糖鎖提示手法は、生体機能における糖鎖とレクチンの相互作用の影響を理解するために、個々のタンパク質に焦点を当て、それぞれの糖鎖の構造に基づいて調査できることを示した。

論文内容の要旨

氏名 (三浦 彩音)

論文題名

Exploring effect of glycan structures to protein dynamics: Development of a synthetic glycan displaying system and its applications
(糖鎖構造がタンパク質動態へ与える影響の探索：合成糖鎖表示システムの開発とその応用)

論文内容の要旨

Glycans constitute a stratified arrangement known as the glycocalyx, enveloping the cellular surface and participating in diverse biological phenomena, including membrane dynamics, signal transduction, and cell-cell interactions. The manifold functions attributed to glycans are manifested through intricate interactions with various biomolecules. However, comprehensive scrutiny of glycan-biomolecule interactions and their associated functions is exceptionally challenging owing to the heterogeneity of glycan structures and difficulty in their regulation. In this study, I developed a "synthetic glycan-displaying system" utilizing HaloTag technology to homogeneously introduce structurally defined glycans onto specific target proteins. Using this method, I analyzed the function of the glycan-Galectin-3 (Gal-3) interaction, one of the major glycan-biomolecule interactions, in the regulation of protein dynamics (Figure).

First, a synthetic glycan presentation method was developed. This method smoothly utilizes the formation of covalent bonds between the HaloTag and haloalkanes. I successfully expressed HaloTag fusion proteins on cell membranes and introduced seven types of haloalkane-containing glycan ligands. Furthermore, I succeeded in visualizing the structure-specific interactions of multiple glycan structures with glycan recognition proteins, lectins, on the cell membrane.

Next, I applied this method to the analysis of glycan-Gal-3 interactions and performed two analyses.

i) The analysis of protein lateral diffusion regulation

Gal-3, which recognizes β -galactose-containing glycans, crosslinks membrane proteins via glycans to form a network structure called galectin lattices. Galectin lattices are known to regulate the dynamics of membrane proteins such as lateral diffusion, but their functions have not been quantitatively evaluated based on the glycan structures. The effect of glycan structures on galectin lattice function was analyzed by measuring the dynamics of HaloTag fusion proteins modified with various glycan ligands. These results revealed that glycans modified on the target proteins modulate the lateral diffusion of membrane proteins in a glycan structure-dependent manner through interaction with Gal-3 in response to the formation of galectin lattices. The results also suggest that sufficient expression of N-glycans is important for the formation of galectin lattices.

ii) Analysis of the contribution of glycan-Gal-3 interactions to protein loading into extracellular vesicles

Extracellular vesicles (EVs) are released from all cell types and play an important role in intercellular communication. The glycan composition on EV membranes is characterized by a high proportion of glycans with specific structures such as poly-lactosamine glycan and sialic acid terminal glycans, and it suggest a glycan-driven protein-loading mechanism for EVs. In this study, we hypothesized that protein loading into EVs is regulated by the glycan-Gal-3 interaction and examined the Gal-3 dependence using a synthetic glycan displaying system. We found that the addition of Gal-3 promotes the loading of target proteins with Gal-3-affinity glycans into EVs. Based on previous studies, it is possible that the clustering of target proteins by Gal-3 promotes their own loading into EVs. Interestingly, the addition of high concentrations of Gal-3 reduced the EV concentration in the recovered solution. Further studies are required to elucidate the detailed mechanisms.

In conclusion, it was shown that the synthetic glycan-displaying system can reveal the effects of glycan-lectin interactions on biological functions, focusing on individual proteins and based on glycan structures.

[Synthetic glycan displaying system]

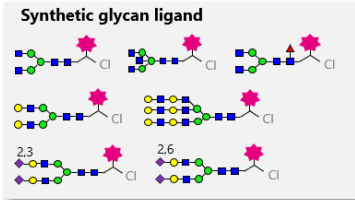
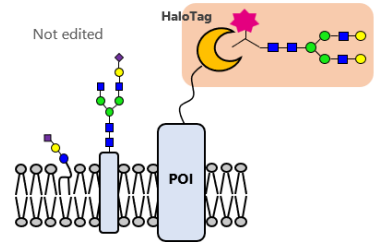
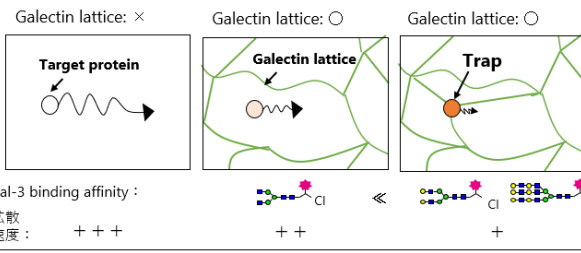
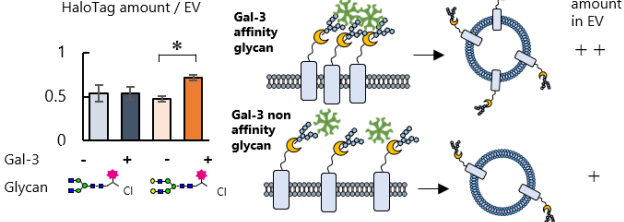


Figure. Overview of this research

[Lateral diffusion analysis]



[Analysis of the protein loading into EVs]



論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (三 浦 彩 音)		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 教授	深瀬 浩一
	副 査 教授	村田 道雄
副 査 特任教授 (常勤)	島本 啓子	

論文審査の結果の要旨

三浦彩音氏は Exploring effect of glycan structures to protein dynamics: Development of a synthetic glycan displaying system and its applications について研究を行った。

糖鎖は細胞表面を覆い、膜分子の動態やシグナル伝達、細胞間相互作用など様々な生命現象に関わっている。糖鎖機能の多くは、多様な生体分子との相互作用形成により発現する。しかし、糖鎖-生体分子相互作用とその機能について詳細に解析することは、糖鎖の構造多様性とその制御の難しさから現状でも困難であり、多くの糖鎖機能は未知であると考えられる。

そのような状況下で、本研究は新規な細胞表層での糖鎖機能解析法を提示するものである。まず三浦氏は、HaloTag テクノロジーを用いて均一構造の糖鎖を標的タンパク質特異的に導入する「合成糖鎖提示手法」を開発した。続いて、主要な糖鎖-生体分子相互作用の一つである糖鎖-Galectin-3 (Gal-3) 相互作用によるタンパク質動態制御機能を解析した。合成糖鎖提示手法は、HaloTag とハロアルカンとの速やかな共有結合を利用して、細胞表層に糖鎖を提示する手法である。まず HaloTag 融合タンパク質を膜上に発現させ、ハロアルカンを有する 7 種類の糖鎖リガンドを導入することに成功し、糖鎖認識タンパク質レクチンとの構造特異的な相互作用を細胞膜上で可視化することに成功した。続いて、合成糖鎖提示手法を糖鎖-Gal-3 相互作用の解析に応用し、次の二つの解析を行った。

i) タンパク質側方拡散抑制の解析

β -ガラクトース含有糖鎖を認識する Gal-3 は糖鎖を介して膜タンパク質同士を架橋し、ガレクチンラティスというネットワーク構造を形成する。ガレクチンラティスを介したタンパク質側方拡散に糖鎖構造が与える影響を種々の糖鎖リガンドを導入した HaloTag 融合タンパク質の動態計測により解析した。Gal-3 との相互作用を通して糖タンパクモデルの側方拡散が、糖鎖構造依存的に調節されていることを明らかにした。

ii) 細胞外小胞 (EV) へのタンパク質ローディングにおける糖鎖-Gal-3 相互作用の寄与の解析

EV 膜上には特定の構造の糖鎖が多く発現しており、糖鎖駆動的な EV へのタンパク質ローディング制御機構が想定される。本研究では糖鎖-Gal-3 相互作用に着目し、合成糖鎖提示手法を用いて Gal-3 によるタンパク質ローディング制御について検証した。Gal-3 結合糖鎖が修飾された標的タンパク質は、Gal-3 の添加により EV へのローディングが促進されることを見出した。一方で、高濃度の Gal-3 の添加は EV リリースを減少させることも見出した。

以上のように、三浦氏は、細胞表層の糖鎖機能を解析する新手法を開発した。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。