

# 糖脂質による増殖シグナル向上のメカニズムの解明

独立行政法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

川島 永子

Sandhoff Disease is a progressive neurodegenerative disorder caused by mutations in the *HEXB* gene which encodes the  $\beta$ -subunit of *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase A and B, resulting in the accumulation of the ganglioside GM2. Previously, we reported that astrocytes from Sandhoff Disease model mice (ASD) grew markedly more rapidly than those from wild-type mice (AWT). This was caused by c-Src and ERK activation due to accumulated GM2 in the lysosomes. These results suggested that c-Src might be directly activated by accumulated GM2. To investigate this issue, here we analyzed i) interactions between GM2 and intracellular c-Src by Western blotting of immunoprecipitation with anti-GM2 antibody; ii) localization of accumulated GM2 and c-Src, by immunofluorescence; iii) length of the fatty acids of GM2 accumulated in lysosomes, by MALDI-TOF MS. We observed that the accumulated GM2 interacted directly with c-Src and co-localized in the lysosome membrane. Analysis of the GM2 ceramide moiety revealed no difference in the fatty acid lengths in AWT and ASD, indicating that densely-packed GM2 interactions with the cytosolic kinase c-Src, and glycosphingolipid (GSL) aggregation was sufficient to result in transmission of signals for proliferation. These results indicate that excessive accumulated GSLs have direct signal transduction activity, not only at the cell surface but also at the membrane of intracellular organelles such as lysosomes.

## 1. 緒言

酸性糖脂質であるガングリオシドは神経系に豊富に含まれており、シナプス形成や神経突起伸張に重要な役割を果たしているが<sup>1-4)</sup>、細胞表層におけるコレステロールやGPIアンカータンパク質などと同様に、受容体などの糖タンパク質と共に細胞内外のシグナル伝達、接着、増殖、分化などを調節しているマイクロドメイン<sup>3,5)</sup>を形成している。スフィンゴ糖脂質に関わる研究は、糖鎖の多様性と機能性の解明に注力されてきたが、特に、シグナル伝達は糖脂質により調節されている事が明らかとされている。また、スフィンゴ糖脂質の脂質分子、特に脂肪酸の生体膜におけるマイクロドメインの構成、および機能の重要性も明らかにされてきた。

Srcファミリーキナーゼ (SFK) は、中枢神経系やヒト癌細胞で活性が高く、悪性化・浸潤、また細胞接着・代謝・血管新生の破壊などに関係している。特にc-Srcを介したガングリオシドのシグナル伝達に関しては、GM3やGM1によりNeuro2aの神経突起伸張が誘導される事などがすでに報告されているが、この現象は、細胞外ガングリオシドがシグナルドメインへ導入され、c-Srcがリン酸化される事で引き起こされるとされている。また、c-Srcは抗GM3モノクローナル抗体によって共役沈降する事から、

ガングリオシドはc-Srcを活性化する事も考えられる。我々はこれまでに、ガングリオシドの細胞増殖調節に対する関連性、すなわち蓄積ガングリオシドによって増殖シグナルが亢進する事、特にリソソームに過剰蓄積したGM2が細胞内シグナルタンパク質であるc-SrcやERKの活性化を引き起こす事を示してきた。しかし、GM2による細胞内、しかもリソソームのルーメン側に位置するc-Srcの活性化機構の詳細は、未だ明らかではない。そこで今回は、GM2とc-Srcの相互作用を検討した結果、蓄積GM2によるc-Srcの活性化機構が明らかとなった事から、以下に報告する。

## 2. 実験

### 2.1 細胞および培養

ザンドホッフ病モデルマウスおよび野生型 (C57BL/6) マウスより樹立したアストロサイト (ASDおよびAWT) は、10%血清、100 $\mu$ g/mLペニシリン、50 $\mu$ g/mLストレプトマイシン、110 $\mu$ g/mLピルビン酸ナトリウムを含むDMEMを用い、5% CO<sub>2</sub>濃度で37°Cで培養した。

### 2.2 細胞抽出液の調整

リン酸化タンパク質を解析するために、培養した細胞は100 $\mu$ M pervanadate処理した後、1% Triton X-100を含む細胞溶解液を用いて細胞を溶解させた後、4°Cで13,000rpmで5分間遠心し、上清を細胞抽出液とした。

### 2.3 免疫沈降

$\sim 10^6$ 個の細胞を、1% Triton X-100を含む細胞溶解液で懸濁した後、可溶化させた。15,000 rpmで5分間遠心して、核を除去した上清を集めた。相当量のタンパク質上清を抗



Enhanced Aggregation of Ganglioside GM2 Transmit Proliferation Signals

Nagako Kawashima

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Bioproduction Research Institute

GM2抗体と共にインキュベートした後、Immobilized Protein Lを加え、4℃で一晩インキュベートした。

## 2.4 SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析

細胞抽出液にSDSサンプルバッファーを加え、98℃で5分インキュベートした。SDS-PAGEで分離した後、PVDF膜に転写し、3% BSAでブロッキングを行った。その後、特異1次抗体およびHRP標識の抗IgG抗体を用いて検出を行った。バンドは、化学発光で検出した。

## 2.5 免疫蛍光染色

GM2とc-Srcがリソソーム膜近傍に共局在しているかどうかを検討するために、抗GM2抗体、抗c-Src抗体、抗リン酸化c-Src抗体、抗CD107a (Lamp-1)抗体を用いた蛍光抗体染色を行った。アストロサイトにおける糖脂質と糖タンパク質を解析するために、細胞は4%パラホルムアルデヒドで固定した後、0.1% Triton X-100もしくは90%メタノールで膜透過処理した。10% normalヤギ血清でブロッキングした後、一次抗体を添加した。Alexa488/Alexa555が標識された二次抗体を反応させた後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出した。

## 2.6 糖脂質の抽出、分離および免疫薄層クロマトグラフィー

糖脂質は、イソプロピルアルコール/ヘキサン/水を添加して抽出した。超音波処理後、3,500 rpmで5分間遠心し、得られた上層をガングリオシドを含む総脂質画分とした。この画分を乾固し、メタノール/クロロホルム/水(4:2:1)を加えて3,000 rpmで5分間遠心する事でFolch画分を得た。このFolch画分をHPTLCプレートにスポットした後、クロロホルム/メタノール/0.2% CaCl<sub>2</sub>溶媒(55:45:10)で展開し、オルシノールで染色した。また免疫TLC解析には、TLCアルミシートやSilica gel 60 F254を用い、TLC解析と同条件でスポット・展開した後、抗GM2抗体(GMB28)および抗GM3抗体(GMR6)を用いて検出した。

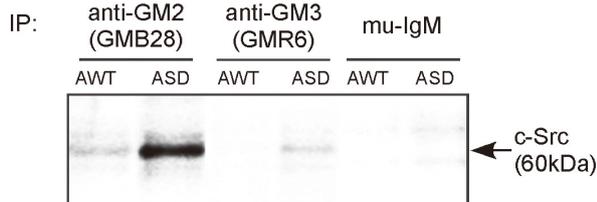


Fig. 1 抗ガングリオシド抗体を用いた免疫沈降

左側：抗GM2抗体を用いた免疫沈降、中央：抗GM3抗体を用いた免疫沈降、右側：mu-IgMを用いた免疫沈降。

AWT:AWT由来の細胞抽出液、ASD:ASD由来の細胞抽出液、mu-IgM:非特異的マウスIgM抗体(ネガティブコントロール)。

## 2.7 糖脂質の分解、精製・メチル化

糖脂質のFolch画分に、0.1N NaOH/メタノールを加え40℃で2時間反応させた後、1Nの酢酸で中和した。遊離脂肪酸はn-ヘキサンで除去した後に、残った画分は乾固させた。アルカリ分解した糖脂質は、0.1M KClで再溶解した後、逆相カラム(C18 Sep-Pak)に供した。サンプルはメタノールおよびクロロホルム/メタノール(2:1)で溶出させ、減圧乾燥させた後、NaOH/DMSO懸濁液およびヨードメタンで再溶解させた。反応は冷50%氷酢酸および冷蒸留水を加えて反応を停止させた後、クロロホルムで抽出した画分をメチル化糖脂質とし、MALDI-TOF MSで解析した。

## 2.8 MALDI-TOF MS解析

メチル化糖脂質は、Ultraflex II TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics)を用いて、MALDI-TOF MSで解析した。マトリックスは2,5-dihydroxybenzoic acidを含む溶液を用い、質量を決定した。

## 3. 結果

### 3.1 GM2との共沈物におけるc-Srcの検出

c-Src/GM2の相互作用を調べるために、野生型マウス由来のアストロサイト(AWT)およびザンドホッフ病モデルマウス由来のアストロサイト(ASD)について免疫沈降実験を行った。実験は、抗GM2モノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った後、抗c-Src抗体を用いたウェスタンブロット法により沈降物を解析した。AWTおよびASDの両方でc-Srcと一致する約60kDaのタンパク質を検出したが、AWTの細胞抽出液では、60kDa種は比較的少なく、非特異性のマウスIgMの存在下ではシグナルは検出されなかった(Fig. 1)。この結果から、ASDではGM2がc-Srcと強く結合している事が予想された。さらに抗GM2抗体の特異性を確認するために、免疫TLCと抑制実験を行った。その結果、AWTおよびASDのFolch画分について、抗GM2抗体を用いて検出したところ、GM2のみ検出された(Fig. 2)。さらに、抗GM2抗体で沈殿させた免疫沈降

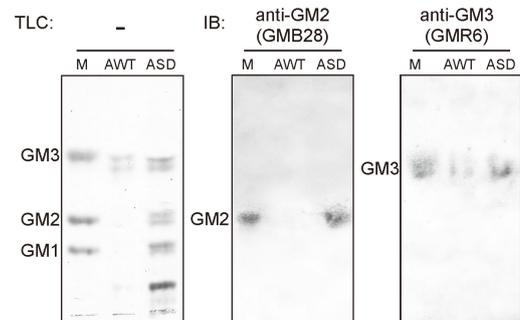


Fig. 2 抗ガングリオシド抗体の特異性の検討

左側：TLCのオルシノール染色、中央および右側：免疫TLC、M:GM3、GM2およびGM1の標準ガングリオシドを含有するマーカー

物中にミセル化GM2添加すると、c-Srcのバンドは、消失するという事が分かった (Fig. 3)。これらの結果は、使用した抗GM2抗体が免疫沈降物におけるGM2を特異的に認識しているという事を示している。ASDの細胞表層において多く発現しているGM3についても抗GM3抗体を用いて、GM2と同様の免疫沈降実験を行ったが、c-SrcはGM2に比べると非常に少ない量しか検出されなかった (Fig. 1)。また、使用した抗GM3抗体に関してもGM3のみを認識している事も確認できた (Fig. 2)。これらの結果は、GM2に比べGM3は殆どc-Srcと相互作用していない事を意味するものである。

### 3.2 GM2 との共沈物における SFK の検出

SFK (Fyn, Lyn, Yes) と GM2 の結合性を調べるために、Triton X-100 を含む緩衝液で溶解した各々の細胞抽出液を用いて、抗GM2および抗GM3モノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降とウエスタンブロッティングはこれまで記載した様に行い、抗Lyn、抗Yes、抗Fyn抗体で検出を行った (Fig. 4A)。AWTおよびASDにおいてFynとYesに相当するバンドは検出されたものの、バンドの濃さはc-Srcと比較すると非常に低かった。Lynは検出されなかった。細胞内のc-Src、Fyn、Lyn、Yesの量をウエスタンブロット法で解析したところ、これらは同程度

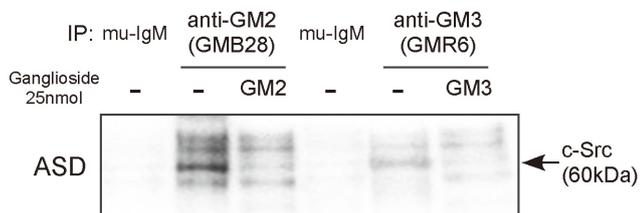


Fig. 3 抗ガングリオシド抗体の阻害実験  
ミセル化GM2またはGM3を抗GM2抗体または抗GM3抗体を用いて沈澱させた免疫沈降物中に添加した。

の量が含まれている事が分かった (Fig. 4B)。この結果より、ASDにおけるc-Srcは主にGM2と相互作用している事が示唆された。

### 3.3 GM2 と c-Src の局在検討

免疫蛍光抗体染色によって、c-SrcとGM2の共局在を観察した。細胞は8ウェルマイクロスライドに播種し、固定した後に界面活性剤で膜透過処理を行った。各々の細胞は、特異一次抗体、およびFITC/Rhodamine修飾2次抗体で染色した。ASDにおいてはGM2とc-Srcの染色像を重ね合わせた像はかなりオーバーラップしている事が示された事から (Fig. 5A)、GM2は殆どがc-Srcと共局在している事が示唆された。これまでに我々は、ASDにおいてはGM2はLamp-1 (CD107a/Lysosome marker) と共局在している事を示してきたが<sup>6)</sup>、今回はASDにおけるc-SrcもまたLamp-1と共局在している事を確認した (Fig. 5B)。これらの結果は、ASDにおいてはGM2と同様にc-Srcもまたリソソーム膜近傍に位置する事を示すものである。一方、AWTでもc-Srcシグナルが検出されるものの、染色シグナルの分布はASDにおけるそれとは全く異なる (Fig. 5B)。よって、通常状態では、c-Srcはリソソームに局在するものではない事を示している。

### 3.4 GM2 とリン酸化 c-Src の局在検討

c-Srcおよびリン酸化c-SrcのGM2との共局在性を調べるために、ASDとAWTの免疫蛍光抗体染色を行ったが、タンパク質の脱リン酸化を防ぐために、過バナジウム処理を行った。さらに固定化と膜透過処理を行った後、細胞は、c-Src、リン酸化c-SrcおよびGM2に対する一次抗体、続いてFITC/Rhodamine結合2次抗体で染色した。リン酸化c-SrcのシグナルはAWTでは微弱であり (Fig. 5のc-Srcを比較)、全c-Srcのタンパク質量に対するリン酸化c-Src

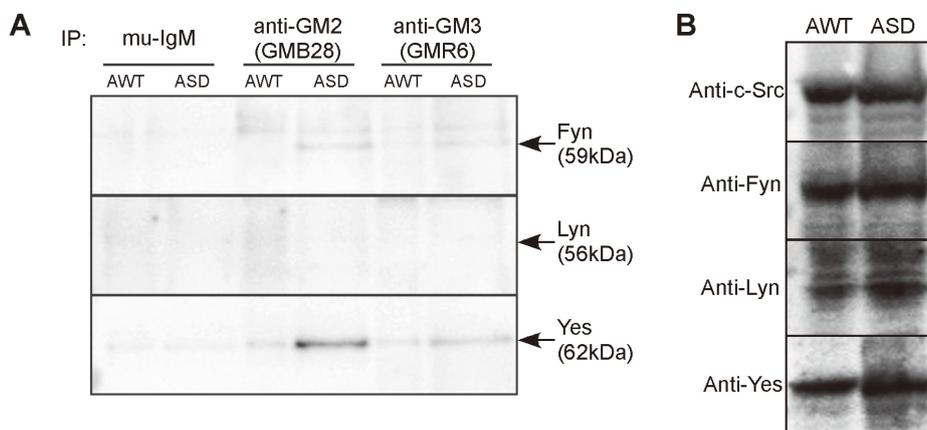


Fig. 4 SFK に関する検討  
A: GM2 共役沈殿物における SFK の検討  
B: AWT と ASD における SFK 発現タンパク質の検討

の量は、AWTでは低かった (Fig. 6)。さらに、AWTではリン酸化c-SrcとGM2の染色像は重ならなかった一方で、ASDではリン酸化c-SrcとGM2の染色像が重なったことから共局在している事が示唆された (Fig. 6)。

### 3.5 糖脂質の TOF MS 解析

これまで我々は、c-Srcはリソソームに蓄積したGM2と相互作用する事を示してきた。さらに、これらの相互作用ではGM2の脂質部位が関係しているのかを調べるために、TOF MSを用いてAWTおよびASDにおけるGM2の分子量を調べた。AWTおよびASDよりスフィンゴ糖脂質をFolch画分として抽出した後に過メチル化し、TOF MS解析を行った。過メチル化GM2に相当する分子量のピークは、AWTとASD間で殆ど同じであり、同一の脂肪酸鎖長で構成されている事を示唆している (Fig. 7)。すなわち

脂肪酸構造は、大凡C16:0~C20:0である事がわかった。この結果は、c-Srcの挙動や活性化に影響を与えるのはGM2の脂肪酸の鎖長ではなく、GM2の過剰な蓄積である事を示唆するものである。

## 4. 考察

本研究で我々は、c-SrcがGM2と共役沈降する事から、c-SrcがGM2と相互作用する事を示したが。これはリソソームに蓄積したGM2が細胞内c-Srcと相互作用する事を示唆するものである (Fig. 1-4)。また、c-Srcと細胞質内GM2の解析を行った結果、c-Srcは、GM2と同様、リソソームマーカー CD107a/Lamp-1とも共局在している事がわかった。これは、ASDではc-Srcがリソソームに蓄積したGM2と共局在している事を示すものである (Fig. 5)。さらに、リン酸化c-SrcもまたCD107a/Lamp-1とGM2と共局在している事もわかったが (Fig. 6)、これらはc-SrcがGM2と相互作用する事で活性化される事を示唆している。また、過剰に蓄積したGM2のセラミド部位の解析から、ASDにおける脂肪酸鎖長は極めて一般的である事も分かった。これは、糖脂質の脂肪酸鎖長とは関係なく、凝集したGM2が細胞内c-Srcの挙動と活性化に極めて重要である事を提案するものである (Fig. 7)。

Prinettiらは、ガングリオシドが細胞内c-Srcを活性化すると報告し<sup>7)</sup>、また岩渕らは、長鎖脂肪酸を持つスフィンゴ糖脂質のみが細胞内SFKを活性化させる事ができると報告している<sup>8)</sup>。最近浜村らは、SFKのYesの活性化には増加したGD3が関係している事を報告した。我々は、GM2が細胞内c-Srcと相互作用する様に、過剰に蓄積したガングリオシドは細胞表層だけではなく、リソソームの様

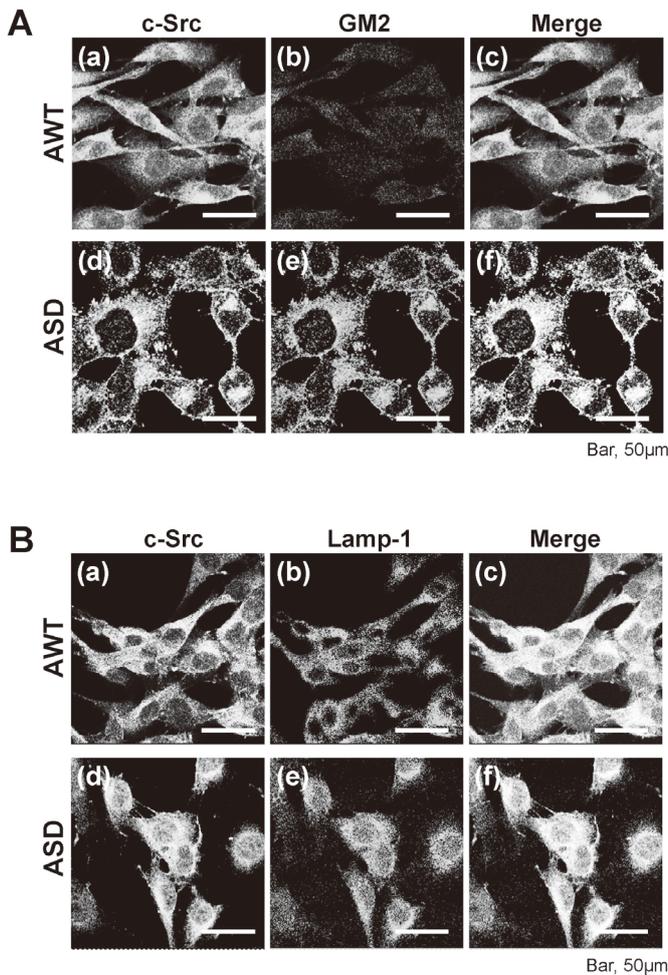


Fig. 5 蛍光標識抗体を用いた各分子の局在検討

A: c-SrcとGM2の局在検討;(a-c):AWT細胞(上段)、(d-f):ASD細胞(下段)、(a, d)抗c-Src抗体による染色、(e):抗GM2抗体による染色、(c, f):重ね合わせ画像。  
B:c-SrcとLamp-1の局在検討;(a-c):AWT細胞(上段)、(d-f):ASD細胞(下段)、(a, d)抗c-Src抗体による染色、(b, e):抗Lamp-1抗体による染色、(c, f):重ね合わせ画像。

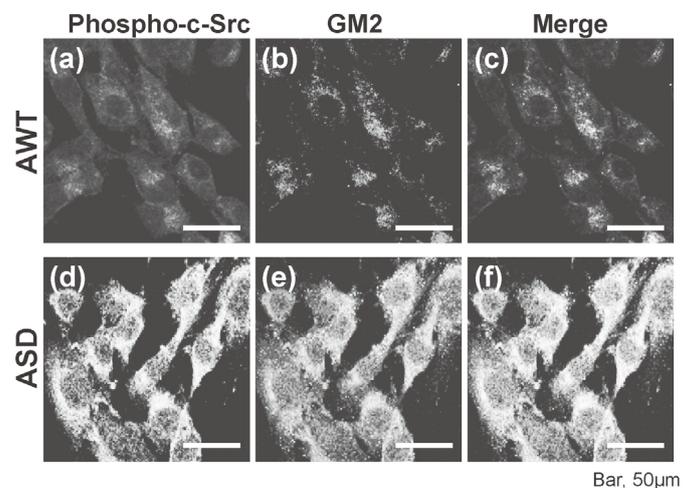


Fig. 6 リン酸化c-SrcとGM2の局在検討

(a-c):AWT細胞(上段)、(d-f):ASD細胞(下段)、(a, d):抗リン酸化c-Src抗体による染色、(b, e):抗GM2抗体による染色、(c, f):重ね合わせ画像

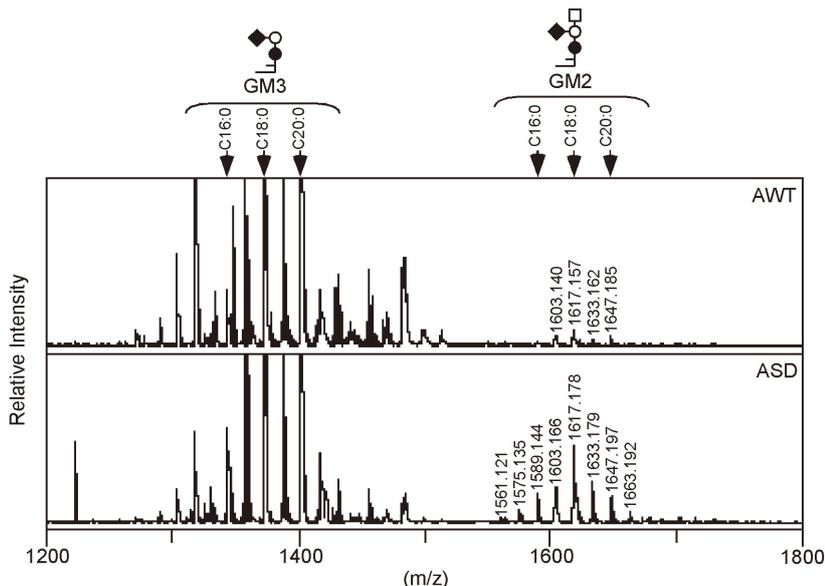


Fig. 7 アストロサイト糖脂質のMSスペクトル

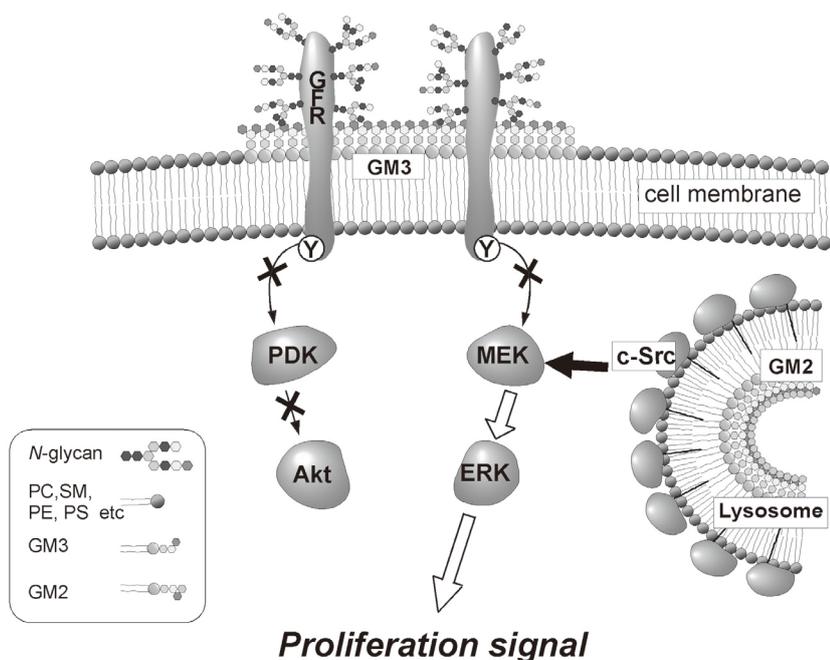


Fig. 8 リソソームの蓄積糖脂質からのシグナル伝達経路 (ASDモデル)  
 このモデルは、本研究および Kawashima *et al. J Neurochem* (2009) の結果を基に作成した。細胞表層の GM3 は EGFR の様な成長因子受容体を不活性化し、さらに Akt を不活性化させる。これらの挙動は、細胞表層の GM3 により受容体 (EGFR や FGFR) は不活性化を促され、一方でリソソームに蓄積した GM2 により活性化された c-Src は、増殖シグナル伝達系を刺激し、結果として細胞増殖能が亢進される。これらの現象は糖脂質、特にガングリオシドの細胞表層における増殖因子受容体のサブレッサーとして、さらに増殖と関わる細胞内シグナル伝達のアクティベーターとしても機能する事を示している。

なオルガネラにおける c-Src をも活性化させる事を示した。これは、スフィンゴ糖脂質が細胞表層からだけでなく、ある程度の糖脂質が蓄積しているオルガネラの細胞膜からもシグナルを伝達できる事を意味する。通常は、スフィン

ゴ糖脂質はリソソーム酵素により分解を受けることから、リソソームに過剰に蓄積する事はない。しかし、我々が用いた GM2 ガングリオシド-シスモデルマウスから単離したアストロサイトは、分解酵素が欠損しているために

GM2がリソソームに異常な密度で蓄積してしまう。以上の事から、ガングリオシドは蓄積の度合いにより細胞内のc-Srcのようなシグナル分子と相互作用し、これを活性化させる事が出来る事を示している。

また、AWTとASD間でGM2の脂肪酸鎖長に差がない事が明らかとなったため、蓄積したGM2からc-Srcへのシグナルの伝達には脂肪酸鎖長は重要ではない事が示された。この結果は、岩渕らの見出したラクトシルセラミドとLynの相互作用に脂肪酸の長さが重要であるという報告と対照的な結果となった。この違いはおそらく、糖脂質が受容体として働くかどうかの違いと考えられる。ラクトシルセラミドは好中球においてグルカンの受容体として働き、グルカンと結合する事でLynを活性化する<sup>8)</sup>。これに対し、ASDでは、リソソームに蓄積したGM2により、c-Srcはリガンドと結合する事なく恒常的に活性化されている。すなわち、受容体として機能する糖脂質により、細胞内リン酸化酵素の活性化は脂肪酸鎖長に依存する一方で、蓄積した糖脂質からのシグナル活性化では脂肪酸鎖長は無関係である事を示している。今回我々が観察したASDにおいて、蓄積したGM2による増殖シグナルの活性化は、Prinettiらの報告<sup>2)</sup>と似た機構であると考えられる。今回示した糖脂質GM2とc-Srcの相互作用はおそらく直接的なものと思われるが、テトラスパニンのようなアダプター分子が介在している可能性も十分に考えられる。

本研究により、ガングリオシドの蓄積により細胞増殖シグナルが活性化する仕組みが明らかとなった。この細胞増殖は、受容体を限定するものではなく、また糖脂質の蓄積があれば細胞表層以外からも増殖シグナルが活性化する事を示すものである。これは細胞種にも依存しない事を意味するため、ガングリオシドのみによる細胞増殖能の活性化が可能である事も示唆している。よって、ガングリオシドにより皮膚細胞の増殖活性化を亢進させる事が可能であると考えられる。健康な皮膚を保持するためには、皮膚細胞の増殖能亢進も重要な因子と考えられるため、今後この様な知見を基に、応用研究に発展される事を期待する。

#### (引用文献)

- 1) Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., *et al.* : Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10662-10667. (1996)
- 2) Prinetti, A., Iwabuchi, K., and Hakomori, S. : Glycosphingolipid-enriched signaling domain in mouse neuroblastoma Neuro2acells. Mechanism of ganglioside-dependent neuritogenesis, *J Biol Chem* **274**, 20916-20924. (1999)
- 3) Hakomori, S. : Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends, *Biochim Biophys Acta* **1780**, 325-346. (2008)
- 4) Regina Todeschini, A., and Hakomori, S. : Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains, *Biochim Biophys Acta* **1780**, 421-433. (2008)
- 5) Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Hamamura, K., *et al.* : Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glyco lipid-enriched microdomains, *J Biol Chem* **285**, 27213-27223. (2010)
- 6) Kawashima, N., Tsuji, D., Okuda, T., *et al.* : Mechanism of abnormal growth in astrocytes derived from a mouse model of GM2 gangliosidosis, *J Neurochem* **111**, 1031-1041. (2009)
- 7) Prinetti, A., Marano, N., Prioni, S., *et al.* : Association of Src-family protein tyrosine kinases with sphingolipids in rat cerebellar granule cells differentiated in culture, *Glycoconj J* **17**, 223- 232. (2000)
- 8) Iwabuchi, K., Prinetti, A., Sonnino, *et al.* : Involvement of very long fatty acid-containing lactosylceramide in lactosylceramide-mediated superoxide generation and migration in neutro phils, *Glycoconj J* **25**, 357-374. (2008)