

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04351

研究課題名(和文)高精度1分子観察による基本ユニットラフト仮説の検証

研究課題名(英文)Verification of unit raft hypothesis by high-resolution single-molecule imaging

研究代表者

鈴木 健一 (Suzuki, Kenichi)

岐阜大学・研究推進・社会連携機構・教授

研究者番号：50423059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生細胞膜上でラフト親和性の糖脂質やGPIアンカー型受容体(GPI-anchored receptor = GAR)が特異的ホモダイマーを形成し、ラフトの基本ユニットとなり、シグナル変換のプラットフォームとなるという仮説を検証した。

様々な糖脂質やGARが短寿命のホモダイマーを形成することを発見し、一般性があることを発見した。また、形成されたホモダイマーはすべて、脂質相互作用で安定化されていることを見出した。さらにこれらのホモダイマーは、下流のシグナル伝達を誘起する、あるいは膜受容体活性を制御するための基本ユニットとしてはたらくことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the hypothesis that raft-associated glycolipids and GPI-anchored receptors (GARs) form homodimers via specific interactions, and work as a unit for downstream signal transduction.

We found that a variety of glycolipids and GARs formed homodimers via specific interactions, which can be generalized. We also found that the homodimers of glycolipids and GARs were stabilized by lipid interactions. Furthermore, our results suggest that these homodimers work as a unit for inducing downstream signaling events or for regulating activity of membrane receptors.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：ラフト 1分子観察 GPIアンカー型受容体 糖脂質 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ラフト領域は、細胞膜上のシグナル変換のプラットフォームとして注目されてきたが、その構造やシグナル変換における役割などの実体は、いまだ解明されず、論争が続いていた。我々は、高精度1蛍光分子追跡法を開発し、非常に興味深い結果を得つつあった。すなわち、ラフト領域には、(1) 動的に形成・分解をおこなう基本ユニットがあり、その形成には、脂質間の協同的相互作用が必須であること、(2) ラフト親和性の GPI アンカー型受容体 (GAR) に刺激が入ると、GAR のホモダイマーがラフト脂質との協同的相互作用で安定化されて、安定な会合体ラフトを作り、細胞内シグナルを誘起すること、が分かってきた。さらに最近、糖脂質の性質を変えない蛍光アナログの合成に3種の糖脂質について成功し、(3) 糖脂質も単位 (ユニット) ラフトを形成し、(4) これらが受容体型チロシンキナーゼ (RTK) のシグナル制御をおこなう可能性、が分かってきていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の作業仮説をもとに、ラフト脂質の協同的相互作用を利用したシグナル変換機構を解明することである。

すなわち、細胞膜は、数ナノメートルから数10ナノメートルのスケールで脂質結合分子の協同的集合体が生成消滅する性質をもち、この脂質の協同的相互作用を利用しつつ、特定のシグナル分子のリクルートや集合が起こり、シグナルが惹起される、というものである。脂質結合のシグナル分子は、細胞膜に非常に多くみられ、協同的分子集合によって可能になるシグナルは、極めて多くの経路で使われていると思われる。細胞膜でのシグナル分子の協同的集合とシグナル伝達機構を理解することは、生物学的に極めて重要である。これまでに得られた結果から導かれた仮説を下に記述する。

(仮説1) 今までの研究で、準安定な2種類の単位ラフトが形成・分解を繰り返していることが分かった。さらに単位ラフトには個性があり、GAR はタンパク質相互作用により、糖脂質は糖鎖相互作用によりそれぞれホモダイマーを形成し、それがコレステロールにより安定化されることが分かった。しかし、ヘテロダイマーはできないことがわかっている。そこで、作業仮説(1) は、これら2種類の単位ラフトから、より大きなテトラマーラフトなどの細胞膜上のほとんどすべてのラフトができる。

仮説2) (図1) GAR への外部刺激によって(図1(1))、GAR 単位ラフトは安定化され(図1(2))、GAR 会合体ラフトが形成され(図1(3))、シグナル変換を担うシグナルラフトとなる。GAR 会合体ラフトに、細胞質の下流シグナル分子がリクルートされる。これにも、ラフト脂質の協同的相互作用が利用されることが多い。即ち、GAR 会合体ラフトが細胞内シグ

ナル誘起のプラットフォームになる(図1の「シグナル」)。

(仮説3) ラフト外にある膜貫通型の受容体、特に受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は、それぞれに特異的な糖脂質の単位ラフトによって機能制御を受ける。

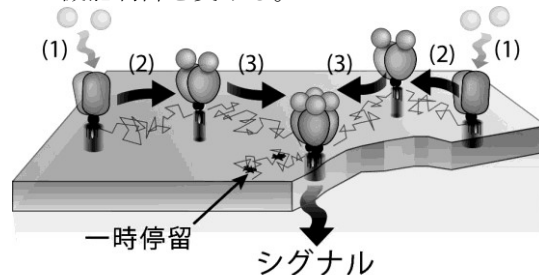


図1. GAR 単位ラフトを基礎とする、GAR のシグナル変換機構。リガンド刺激後 GAR 単位ラフト(1)が、脂質の協同的相互作用を利用し、GAR 会合体ラフト(3)を作る。

3. 研究の方法

(1) CHO-K1 細胞膜上に 0.5 分子/ μm^2 となるように GAR を発現させて、tag を用いて、ほぼ 100% のラベル効率となるように蛍光標識した。

(2) 連携研究者の、安藤らが合成した様々な糖脂質ガングリオシド蛍光プローブを CHO-K1 細胞膜に 0.5 分子/ μm^2 程度の濃度になるように導入した。

(3) RTK の EGF 受容体 (EGFR) も CHO-K1 細胞に 0.3 分子/ μm^2 となるように発現させ、tag を用いて、ほぼ 100% のラベル効率となるように蛍光標識した。

(4) GAR の一つである CD59 をリガンド刺激後の会合体形成を調べるために、1 分子イメージングによって蛍光強度を測定した。

(5) 様々なガングリオシドプローブと蛍光ラベル EGFR を 2 色同時 1 分子観察することにより共局在を調べた。

4. 研究成果

(1) 連携研究者の安藤らと共同で、天然のガングリオシドと同様にラフト親和性の 8 種のガングリオシド蛍光プローブの合成に成功した。

(2) ガングリオシド蛍光プローブは、特異的な糖鎖相互作用で、寿命が 100-200 ミリ秒のホモダイマーを形成していた。これは人工平面脂質膜上でも観察されたので、伸介分子は要らないことも明らかとなった。

(3) ガングリオシドの糖鎖のうち、特にシアル酸がホモダイマーを安定化するのに重要なことが明らかとなった。

(4) ガングリオシドのうち、GM3 のホモダ

イマーのみが、EGFR と相互作用し、EGFR のダイマー形成と活性化を制御していることが明らかとなった。このことは、本研究の目的である、ガングリオシドダイマーが、膜受容体活性制御のユニットとしてはたらくという仮説の一部を検証できたといえる。

(5) GAR の Thy-1 や DAF も、CD59 同様に、短寿命のホモダイマーを形成していた。DAF もシグナル刺激すると、CD59 同様に、ホモダイマーから安定な会合体を形成し、それが貫通型タンパク質をリクルートし、一時停留を示していた。GAR の方も、目的で述べた仮説の一部を検証できたといえる。

今後は、ガングリオシドホモダイマー、GAR ホモダイマーのさらなる仮説の検証を進めて行きたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① T. A. Tsunoyama, Y. Watanabe, J. Goto, K. Naito, R. S. Kasai, K. G. N. Suzuki, T. K. Fujiwara, A. Kusumi. (2018) Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function. *Nat. Chem. Biol.*, 14, 497-506. (査読有)
DOI: 10.1038/s41589-018-0032-5
- ② K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, T. K. Fujiwara, A. Kusumi. (2018) Revealing the raft domain organization in the plasma membrane by single-molecule imaging of fluorescent ganglioside analogs. *Methods in Enzymol.*, 598, 267-282. (査読有)
DOI:10.1016/bs.mie.2017.06.038
- ③ S. S. Tiwari, Y. M. Shirai, Y. L. Nemoto, K. Kojima, K. G. N. Suzuki. (2018) Native prion protein homodimers are destabilized by oligomeric amyloid β 1-42 species as shown by single-molecule imaging. *Neuroreport* 29, 106-111. (査読有)
DOI:10.1097/WNR.0000000000000916
- ④ N. Komura, K. G. N. Suzuki, H. Ando, M. Konishi, A. Imamura, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso. (2017) Synthesis of fluorescent gangliosides for the studies of raft domains. *Methods in Enzymol.* 597, 239-263. (査読有)
DOI: 10.1016/bs.mie.2017.06.004.
- ⑤ K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, T. K. Fujiwara, M. Kiso, A. Kusumi. (2017) Development of new ganglioside probes and unraveling of raft domain structure by single-molecule imaging. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 2494-2506. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.07.012.
- ⑥ M. Kinoshita*, K. G. N. Suzuki(*equal contribution), N. Matsumori, M. Takada, H. Ano, K. Morigaki, M. Abe, A. Makino, T. Kobayashi, K. M. Hirose, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, M. Murata. (2017) Raft-based sphingomyelin interactions revealed fluorescent sphingomyelin analogs. *J. Cell Biol.* 216, 1183-1204. (査読有)
DOI: 10.1083/jcb.201607086.
- ⑦ K. G. N. Suzuki. (2017) Investigation of raft dynamics by single-molecule observation of ganglioside probes. *Seikagaku* 89, 121-125. (査読有)
<https://seikagaku.jbsoc.or.jp/10.14952/SEIKAGAKU.2017.890121/data/index.pdf>
- ⑧ N. Komura*, K. G. N. Suzuki*, H. Ando*(equal contribution), M. Konishi, M. Koikeda, A. Imamura, R. Chadda, T. K. Fujiwara, H. Tsuboi, R. Sheng, W. Cho, K. Furukawa, K. Furukawa, Y. Yamauchi, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso. (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat. Chem. Biol.* 12, 402-410. (査読有)
DOI: 10.1038/nchembio.2059
- ⑨ T. K. Fujiwara, K. Iwasawa, Z. Kalay, A. Tsunoyama, Y. Watanabe, Y. M. Umemura, H. Murakoshi, K. G. Suzuki, Y. L. Nemoto, N. Morone, A. Kusumi. (2016) Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 27, 1101-1119. (査読有)
DOI: 10.1091/mbc.E15-04-0186
- ⑩ K. G. N. Suzuki. (2016) Single-molecule imaging of signal transduction via GPI-anchored receptors. *Methods Mol. Biol.* 1376, 229-238. (査読有)
DOI: 10.1007/978-1-4939-3170-5_19
- ⑪ K. G. N. Suzuki. (2015) New insights into the organization of plasma membrane and its role in signal transduction. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 317, 67-96. (査読有)
DOI: 10.1016/bs.ircmb.2015.02.004

[学会発表] (計 14 件)

- ① 鈴木健一 (2018年3月) 1分子観察によるラフト組織化と機能の解明 大阪大学蛋白質研究所セミナー生体膜の生物化学、大阪 (招待講演)
- ② 鈴木健一 (2017年12月) 1分子観察で明らかになったガングリオシドクラス

ター形成とその EGF 受容体活性制御機構
ConBio2017、神戸（招待講演）

- ③ 鈴木健一（2017年11月）細胞膜の組織化と機能：高精度1分子法による解明
名古屋大学 IGER セミナー、名古屋（招待講演）
- ④ 鈴木健一（2017年10月）高精度1分子イメージングで明らかになったラフト組織化と機能 第10回セラミド研究会、札幌（招待講演）
- ⑤ Kenichi G. N. Suzuki（2017年10月）Unraveling of raft organization and function by single-molecule imaging. International seminar on biophysics and chemical biology of biomembranes and lipid bilayers.大阪（招待講演）
- ⑥ 鈴木健一（2017年9月）細胞膜上での超高速1分子蛍光観察法 第55回日本生物物理学会、熊本（招待講演）
- ⑦ 鈴木健一（2017年6月）1分子観察で明らかになったガングリオシドのクラスター形成機構と EGF 受容体活性制御機構 第59回日本脂質生化学会、京都（招待講演）
- ⑧ 鈴木健一（2017年1月）高精度1分子観察で初めて明らかになった細胞膜構造とシグナル伝達機構 第3回医薬獣連携研究会プログラム、岐阜（招待講演）
- ⑨ Kenichi G. N. Suzuki（2016年10月）Regulation mechanisms of EGF receptor activity by gangliosides as revealed by single-molecule imaging. The 8th Asian Community for Glycoscience and Glycotechnology Annual Conference. Wuxi, China（招待講演）
- ⑩ 鈴木健一（2016年7月）1分子イメージングにより明らかになったガングリオシドの糖鎖相互作用による EGF 受容体活性制御機構 日本プロテオーム学会2016年大会、東京（招待講演）
- ⑪ Kenichi G. N. Suzuki（2016年6月）Unraveling of raft Organization and function by single-molecule imaging of new ganglioside probes. The 21st iCeMS International Symposium. 京都（招待講演）
- ⑫ Kenichi G. N. Suzuki（2015年11月）Unraveling raft organization and function by GPI-anchored receptors and gangliosides. Super-Resolution symposium. Bangalore, India（招待講演）
- ⑬ K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, A. Yamazaki, H. Ishida, K. Furukawa, K. Morigaki, A. Kusumi, M. Kiso. (2015年9月)Unraveling of mechanisms of ganglioside dimer formation as revealed by single-molecule imaging. 第53回日本生物物理学会年会 金沢（ポスター）
- ⑭ 鈴木健一（2015年5月）1分子イメージン

グにより明らかになったラフト組織化と機能のための最初のステップ 日本顕微鏡学会第71回学術講演会 京都（招待講演）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：新規蛍光標識スフィンゴミエリン及びその利用

発明者：村田道雄、松森信明、木下祥尚、楠見明弘、鈴木健一

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2017-506557

出願年月日：平成30年6月7日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www1.gifu-u.ac.jp/~single/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 健一 (SUZUKI, Kenichi)

岐阜大学・研究推進・社会連携機構・教授

研究者番号：50423059

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

安藤 弘宗 (ANDO Hiromune)

岐阜大学・研究推進・社会連携機構・教授

研究者番号：20372518

(4) 研究協力者

()