

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570154

研究課題名 (和文) 1分子観察・操作による細胞膜ラフト上の情報伝達機構の解明

研究課題名 (英文) Single-molecule tracking study of the mechanisms of signal transduction in lipid rafts of cell plasma membranes

研究代表者 鈴木 健一 (KENICHI SUZUKI)

京都大学・物質—細胞統合システム拠点・民間等共同研究員

研究者番号：50423059

研究成果の概要 (和文)：

定常状態の細胞膜上で GPI アンカー型タンパク質は、その細胞外タンパク質部分の相互作用により短寿命のホモダイマーを形成していることが明らかとなった。タンパク質間相互作用のある場合には、脂質相互作用がさらにそのホモダイマーを安定化するが、タンパク質相互作用のない場合は、脂質相互作用はホモダイマー形成に有効ではないことが判明した。さらには、GPI アンカー型受容体をリガンド刺激後、非常に安定なホモオリゴマーが形成されるが、そのホモオリゴマーは、他のラフト脂質であるガングリオシドをリクルートし、下流のシグナル伝達に必要なラフト様ドメインを形成することが始めて明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

It has turned out that in steady-state cell plasma membranes, GPI-anchored proteins formed transient homo-dimers based on the extracellular protein-protein interactions. In the presence of protein-protein interactions, lipid interactions were found to facilitate the formation of the homo-dimers, while this was not observed in the absence of the protein interactions. Furthermore, it was found that upon ligation of GPI-anchored receptors, very stable homo-oligomers were formed, the oligomers recruited other raft lipid, ganglioside, and induced raft-like structure in the oligomers. The formation of the raft-like structure in the oligomers was essential for the downstream signaling such as intracellular calcium response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子観察、細胞膜、ラフト、シグナル伝達、受容体

1. 研究開始当初の背景

以前の「ラフト仮説」は、細胞膜上には「ラフト」という脂質相互作用だけでできる特殊な膜領域が存在し、シグナル伝達のためのプラットフォームとしてはたらいっている」というものであった。しかし、実際にそのような膜領域があるということは証明されていなかった。

一方、我々は、生きている細胞の形質膜上で膜タンパク質、脂質、細胞膜内層の信号分子を1分子ずつ2色で観察することにすでに成功していた。

2. 研究の目的

本研究では、以上に述べたようなそれまでの研究をさらに発展させ、「シグナル分子が集積し働く場」「情報変換のプラットフォーム」として注目されている細胞膜中のラフトについて、その形成機構とシグナル伝達への関与を解明することを目的とした。特にCD59(補体第8成分の受容体でGPIアンカー型タンパク質)を主な系として解明を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

我々が、開発してきた1分子追跡法によって、本研究は初めて可能になったものであり、その方法を用いた。また、ラフト研究に合うように方法自体の開発も進展させた。例えば、受容体の2量体、多量体形成を観察するためには、その受容体を非常に低レベルで発現させ、高い効率で蛍光ラベルしなければならないが、その手法を開発した。その結果、ナノメゾサイズの分子集合体の形成と分解や、作動機構の研究に威力を発揮する1分子イメージング法が開発でき、これを駆使した。

4. 研究成果

ラフト領域形成における「脂質と脂質アンカー型の受容体の協同的な相互作用」と「脂質膜内での液晶相—秩序液晶相の相分離に似た協同的過程」についての仮説を検証するために、細胞外からシグナル入力のないときにおいて様々なGPI-アンカー型受容体の会合数を1分子観察により定量的に見積もった。そのために、非常に低レベルで発現しているGPI-アンカー型受容体を非常に高効率で蛍光色素などでラベルする実験系を確立し、様々な会合能を持つタンパク質を持ったGPIアンカー型タンパク質を細胞に発現させ、2量体形成の長さや頻度を調べた。また、もともと天然に存在している受容体だけではなく、GPI-アンカー部分(糖脂質部分)を貫通型タンパク質に変えることで液晶相に分配される構造に変えたキメラタンパク質についても調べた。

その結果、

- 1) GPI-アンカー型受容体はectodomain間相互作用が強いと2量体を形成しやすく、寿命が150-300ミリ秒と短寿命のホモダイマーを形成していた。
- 2) 脂質相互作用の効果もタンパク質相互作用によりエンハンスされることが判明した。しかし、タンパク質相互作用がないと脂質相互作用は十分に生かされないことも判明した。従って、長寿命のヘテロダイマーは形成されなかった。これは新しいラフトモデルとして注目を浴びると考えられる。
- 3) アクチン線維がダイマー形成を促すという報告が以前にあったが、アクチンは破壊前後でダイマー形成に変化は見られなかった。
- 4) リガンド刺激後、GPI-アンカー型受容体CD59は非常に安定なホモオリゴマーを形成し、一時停留しては、運動するといった奇妙な運動を繰り返していた。脂質相互作用がないとこの安定なホモオリゴマーの形成も一時停留も見られなかった。一時停留の有無と細胞内カルシウム応答の出現とはよく一致していた。
- 5) ラフトマーカーであるスフィンゴ糖脂質のCD59の安定なホモオリゴマーへのリクルートを調べた結果、スフィンゴ糖脂質は100-200ミリ秒と短い時間ではあるが、一時的にホモオリゴマーへリクルートされていた。一方で、非ラフトマーカーの場合にはずっと短く低い頻度でしかリクルートは見られなかった。これらの結果から、GPI-アンカー型受容体CD59は、刺激後に他のラフトマーカーを一時的にリクルートすることによりラフト様ドメイン(クラスターラフトと命名した)を形成し、シグナル伝達に必要なラフトを形成することが、初めて明らかになった。
- 6) 以上の結果から、定常状態でのホモダイマーは、リガンド刺激時に形成される非常に安定なホモオリゴマーを形成するための準安定状態にあると考えられる。ほんの少しのタンパク質の改変が分子の相互作用の微妙なバランスをシフトさせ、シグナル伝達に必要な安定なクラスターラフト形成を導くと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. R. S. Kasai, K. G. N. Suzuki, E. R.

- Prossnitz, I. Koyama-Honda, C.
Nakada, T. K. Fujiwara, & A. Kusumi.
Full characterization of GPCR
monomer-dimer dynamic equilibrium
by single molecule imaging. *J. Cell Biol.*
192, 2011, 463-480, 査読有
2. K. A. K. Tanaka*, K. G. N. Suzuki*
(*equal contribution), Y. M. Shirai, S. T.
Shibutani, M. S. Miyahara, H. Tsuboi,
M. Yahara, A. Yoshimura, S. Mayor, T.
K. Fujiwara, & A. Kusumi. Membrane
molecules mobile even after chemical
fixation. *Nature methods*, 7, 2010,
865-866, 査読有
 3. A. Kusumi, Y. Shirai, I. Koyama-Honda,
K. G. N. Suzuki, & T. K. Fujiwara.
Hierarchical organization of the
plasma membrane investigations by
single-molecule tracking vs.
fluorescence correlation spectroscopy.
FEBS Letters. 584, 2010, 1814-1823,
査読有
 4. K. G. N. Suzuki, & A. Kusumi.
Mechanism for signal transduction in the
induced-raft domains as revealed by
single molecule tracking. *Trends in
Glycoscience and Glycotechnology* 20,
2008, 341-351, 査読有
 5. Y. M. Umemura, M. Vrljic, S. Y.
Nishimura, T. K. Fujiwara, K. G. N.
Suzuki, & A. Kusumi. Both MHC class
II and its GPI-anchored form undergo
hop diffusion as observed by
single-molecule tracking. *Biophys. J.*
95, 2008, 435-450, 査読有
 6. 鈴木健一、生物物理、デジタルシグナ
ル変換場としてはたらく誘導ラフトドメ
イン、2008、48(6)、320—324、査読有
- [学会発表] (計 15 件)
1. 鈴木健一、生物物理若手の会
研究セミナー、1分子観察で初めて見え
てくる細胞膜ラフト構造とシグナル伝達
機構、京都、2011年3月12日
 2. 鈴木健一、第2回 iCeMS-NCBS Joint
Symposium、How does the meso-scale
raft domain exist and transform to
work? : a single-molecule imaging
study、京都、2010年12月17日
 3. 鈴木健一、Association of Pacific Rim
Universities Research Symposium、
Single-molecule imaging studies of
meso-scale raft domains in
steady-state cells、京都、2010年11月
24日
 4. 鈴木健一、第8回 iCeMS 国際シンポジ
ウム、Meso-scale raft domains: whether
and how they exist and work in
steady-state cells?、京都、2010年11月
10日
 5. 鈴木健一、他、第48回日本生物物理学会
年会、Lipid-stabilized dynamic
homo-dimers of GPI-anchored proteins
based on ectodomain protein
interactions in the steady-state cell
membrane、仙台、2010年9月20日
 6. 鈴木健一、第13回 Membrane Research
Forum、Lipid-stabilized homo-dimers
of GPI-anchored proteins based on
ectodomain protein interactions、京都、
2010年1月29日
 7. 鈴木健一、生理学研究所所長招聘セミナ
ー、1分子追跡でみえてきた細胞膜ラフ
トが働くしくみ、岡崎、2010年1月19
日
 8. 鈴木健一、他、第47回日本生物物理学会
年会、Molecular trapped time in
metastable raft domains in
steady-state cells is much shorter than
1 ms、徳島、2009年10月30日
 9. 鈴木健一、第59回 FCCA セミナー、
Mechanism for raft-based signal
transduction via GPI-anchored
receptors as revealed by
single-molecule tracking、東京、2009
年10月20日
 10. 鈴木健一、第5回 Leukocyte Signal
Transduction Workshop、Mechanism
for RAFT-based signal transduction as
studied by single-molecule tracking、
Crete (Greece)、2009年6月17日
 11. 鈴木健一、他、第52回アメリカ生物物理

学会、Glycosphingolipids and Non-Raft Phospholipids Exhibit Very Similar Dynamics in Single-Molecule Observations、Boston、2009年3月2日

12. 鈴木健一、京大 iCeMS 第 13 回 Crossdisciplinary seminar、Cell membrane structures and signal transduction mechanisms as revealed by single-molecule tracking、京都、2008年12月24日
13. 鈴木健一、他、BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同年会シンポジウム、Dynamics of raft-associated molecules for signal transduction as revealed by single-molecule tracking、神戸、2008年12月10日
14. 鈴木健一、日本顕微鏡学会第 52 回シンポジウム、細胞膜上のラフトを介したシグナル伝達機構:1 分子追跡による研究、千葉、2008年10月18日
15. 鈴木健一、第 30 回北海道大学獣医学術基金群講演会、1 分子観察で初めて見えてくる細胞膜ラフトとシグナル伝達機構、札幌、2008年10月15日

[図書] (計 2 件)

1. 鈴木健一、他、羊土社、実験医学、細胞膜が働くしくみ「膜機構」の解明—高分解能 1 分子追跡で見る細胞膜メゾスケールドメインの階層構造、2010、28(8)、1241-1250
2. 鈴木健一、他、羊土社、実験医学増刊号「生命現象の動的理解を目指すライブイメージング」、1 分子追跡でみえてきた細胞膜ラフトが働くしくみ、2008、96-103

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 健一 (KENICHI SUZUKI)

京都大学・物質—細胞統合システム拠点・民間等共同研究員

研究者番号：50423059

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：