

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21247022

研究課題名（和文） 1分子追跡による細胞膜分子ナノ集合体の動的情報交換システムの解明

研究課題名（英文） single-molecule tracking elucidation of signal transduction by the molecular nano-complexes in the plasma membrane

研究代表者

楠見 明弘（KUSUMI AKIHIRO）

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：50169992

研究成果の概要（和文）：生細胞の細胞膜上での1分子イメージングの時間分解能を0.1ミリ秒まで、位置決め精度30nmを保ったまま改善した。この方法を用い、ラフト型受容体であるCD59のデジタル的シグナル変換が、以下の機構で起こることを見出した。すなわち、定常状態では、CD59はモノマーと寿命が100～200ミリ秒程度のダイマーラフトやテトラマーラフトの間で激しく変換しているが、リガンド結合により、テトラマーより大きなラフトが安定化され、デジタルシグナルを発信する。

研究成果の概要（英文）：The time resolution of single-molecule fluorescent imaging in the live cell plasma membrane has been improved to 0.3 ms, without losing the single-molecule localization accuracy of 30 nm. This method was applied to study the signal transduction mechanism of the raft-associated molecule CD59, and the revealed the following mechanism. In resting cells, CD59 trans-convert among monomers, homo-dimer rafts, and homo-tetramer rafts with lifetimes of 100-200 ms. Upon ligation, CD59 formed stable oligomer rafts, which triggered intracellular pulse-type signal responses.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費       | 合計         |
|--------|------------|------------|------------|
| 2009年度 | 20,300,000 | 6,090,000  | 26,390,000 |
| 2010年度 | 7,900,000  | 2,370,000  | 10,270,000 |
| 2011年度 | 7,900,000  | 2,370,000  | 10,270,000 |
| 総計     | 36,100,000 | 10,830,000 | 46,930,000 |

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分子追跡、細胞膜、ナノ集合体、情報変換、システム、GPIアンカー型受容体

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、生細胞の細胞膜上で2種の分子が結合したり解離したりする様子を1分子蛍光追跡することに、世界で初めて成功した。また、1分子の運動や局在を追跡するのみならず、分子の活性化までも1分子FRETによって1分子毎に見ることに成功した。

例えば、がん遺伝子産物で代表的な低分子量Gタンパク質の一つであるRas分子の活性化の瞬間を1分子毎に可視化することに成功した。すなわち、生細胞中で、分子の動き・相互作用・活性化が、1分子毎に手に取るようにわかるようになってきたのである。

その結果、Ras/Rafシグナル系や、混沌を

極めていたラフト関与の Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) アンカー型受容体のシグナル変換機構が明らかできる状況が出来始めた。

## 2. 研究の目的

上記の我々の研究結果に基づき、本研究では、以下の研究開発を行うことを目的とした。

(1) 生細胞の細胞膜上での1分子イメージングの時間分解能を0.1ミリ秒まで、位置決め精度を保ったまま改善すること。

(2) 細胞膜上の短寿命ナノ集合体（タンパク質集合体+ナノラフト）の形成と分解の、分子過程と機構を解明すること

(3) これらの短寿命ナノ集合体がどのようにシグナル変換を促進したり、可能にしたりするかを解明すること。それらが担う細胞内シグナルの基本はパルス状量子化信号(FM式信号)であるという可能性を調べること。

(4) 我々が見出した、細胞膜の仕切りによるコンパートメント構造と、細胞膜上の短寿命ナノ集合体の関係、それらがシグナル変換に果たす役割を明らかにする。

さらに、それらを数理モデルを用いて検討し、シグナル制御のシステム原理を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず、すでに世界をリードしている1分子追跡技術を、さらに大きく改善することにした。具体的には、

(1) 3種分子を同時1分子追跡する装置の開発

(2) カメラ開発により、時間分解能を0.1ミリ秒まであげること、  
をおこなう。

これによって、短寿命ナノ集合体の検出能を大幅に改善する。

次に、細胞膜上の短寿命ナノ集合体（タンパク質集合体+ナノラフト）を1分子追跡し、タンパク質相互作用とラフト脂質相互作用の協働関係を解明する。特に、我々が、主に扱ってきた GPI アンカー型受容体の CD59 が作るシグナル伝達ナノ複合体/ナノドメインを中心的なパラダイムとして研究を進める。

さらに、我々が見出した、細胞膜の仕切りによるコンパートメント構造と、細胞膜上の短寿命ナノ集合体の関係、それらがシグナル変換に果たす役割を調べる。

最後に、それらを数理モデルを用いて検討し、シグナル制御のシステム原理を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 生細胞の細胞膜上での1分子イメージングの時間分解能を0.1ミリ秒まで、位置決め精度30nmを保ったまま改善した。また、3種の分子を1分子同時追跡する方法の開発に成功した。

これらの方法を用い、1分子を高精度で見て触るような研究ができるようになった。例えば、シグナル伝達分子が細胞膜上をどのように動き回り、どのようにしてシグナルを次々に伝えていくのか、というようなことが、見え始めた。

(2) ラフト型受容体である CD59 の細胞膜上での挙動を、上記の1分子イメージング法を用いて調べた。定常状態では、CD59 はモノマーと寿命が100~200ミリ秒程度のダイマーラフトやテトラマーラフトの間で激しく変換していることがわかった。これは、極めて著しい結果であったので、他の GPI アンカー型受容体でも起こっているのかどうかを調べた。その結果、調べたすべての GPI アンカー型受容体、すなわち、Thy-1、DAF、uPAR のすべてが、モノマーと寿命が100~200ミリ秒程度のダイマーラフトやテトラマーラフトの間で激しく変換していることがわかった。

しかも極めて面白いことに、ダイマーラフトは違う種類の GPI アンカー型受容体の組合せで起こることはなかった。すなわち、ダイマーラフトの形成には、GPI アンカー型受容体のタンパク質部分の相互作用が必要なことが分かった。このとき、ラフト脂質相互作用は、このようなタンパク質間相互作用でできるダイマーを安定化させていることが分かった。

一方、テトラマーラフトは、ダイマーラフトが、主に、ラフト脂質相互作用で集まって形成される。したがって、面白いことに、違う種類の GPI アンカー型受容体のダイマーラフトの組合せでも、テトラマーラフトは出来るのである。同じような仕組みで、5~20nm程度の、文献で報告されてきたような、やや大きなラフトも形成されていくことが示唆された。

(3) リガンド結合により、テトラマーより大きなラフトが安定化され、デジタルシグナルを発信する。このとき、やはり基本になるのはホモダイマーラフトであることが示された。特にダイマーラフトにリガンドが結合すると、リガンド結合していない CD59 に比べてはるかに安定になり、さらにリガンド結

合 CD59 のテトラマーは非常に安定である。これが、色々な細胞内シグナル分子をリクルートし、そこで短時間の相互作用が起こるため、パルス状のデジタルシグナルを発信する。

(4) 細胞膜上の短寿命ナノ集合体は GPI アンカー型受容体 4 個程度が多く、細胞膜の仕切りによるコンパートメントよりはるかに小さいものが多い。さらに、コンパートメントの境界は、非ラフト的であり、そこを越えてラフト構造が成長することは困難らしい。すなわち、短寿命ナノラフトは、各コンパートメント内で成長し機能するものと結論された。

さらに、細胞膜の仕切りの存在が、細胞膜上での衝突頻度にどのような影響を与えるかを数理モデルを用いて検討した。仕切りの存在は、分子間相互作用の平衡は変えないので、細胞膜全体での衝突頻度はほとんど変わらない。しかし、2 分子が同一コンパートメントに入るとそこでは衝突反応が急激に進む。すなわち、衝突や反応頻度の空間分布が、急激に変化するようになり、細胞膜上でのシグナル変換の空間パターン形成に寄与していると考えられた。

以前の「ラフト仮説」は、細胞膜上には「ラフトという特殊で 1 ミクロンレベルの大きいサイズの安定な膜領域が存在し、外部から刺激が来ると、そのようなラフト領域にシグナル分子が集まってシグナル変換をおこなう（あるいは、その領域に、必要な受容体やシグナル分子は既に集合しており、リガンドが来るとすぐに反応出来る）」というものであった。しかし、上の結果は、普段、細胞膜上にあるラフトというのは小さく不安定なもので、それが刺激依存的に on-demand で安定化されて (CD59 会合体ラフト) シグナル変換のプラットフォームとして働くことを示唆している。

細胞膜は、タンパク質間相互作用だけでなく、脂質間相互作用をうまく使うことによって、ラフト領域というナノメゾ領域を形成させ、さらにそこで、多段の分子のリクルート制御を働かせている。ラフト領域を作らせるといところで、ノイズの影響は大きく抑制できている。さらに on-demand ラフト領域ができると、そこに次々と色々な分子をリクルートすることで、増幅を可能にしている。短寿命の分子リクルートは、熱揺らぎのために短寿命になるわけであるが (解離速度が大きいというデザインになっている)、これによって、この回路には、暴走することがないよう、すぐに自然に切れるという機能が付加

されていると考えることが出来る。一方、このようなスイッチを可能にするために、定常状態の細胞膜は、小さなシグナルが来たときに大きな変化が起こせるように、脂質間相互作用を準備し、前駆ラフトとでもいうべき、小さく、寿命の短いラフト様構造を準備しているのだと思われる。

本研究の波及効果について。

on-demand 形成されたラフトは、牛海綿状脳症 (BSE)、エイズウィルスの感染、アルツハイマー病発症にも関わっていると考えられ、これらの感染や発病過程の解明につながることを期待される。

一方、これらの発見は、1 分子追跡によって初めて可能になったもので、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、1 分子イメージングが威力を発揮することを示す好例といえる。この方法自体も、多くの研究者によって使われ、本研究分野の進展に寄与することが期待出来る。

## 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 15 件)

- ① A. C. E. Shibata, T. K. Fujiwara, L.-M. Chen, K. G. N. Suzuki, Y. Ishikawa, Y. L. Nemoto, Y. Miwa, R. Chadda, K. Naruse, and A. Kusumi, Archipelago architecture of the focal adhesion: Membrane molecules freely enter and exit from the focal adhesion zone, Cytoskeleton, 査読有, 印刷中, 2012, 印刷中, DOI: 該当なし
- ② K.-J. Cho, R. S. Kasai, J.-H. Park, S. Chigurupati, S. J. Heidorn, D. van der Hoeven, S. J. Plowman, A. Kusumi, R. Marais, and J. F. Hancock, Raf inhibitors target Ras spatiotemporal dynamics, Curr. Biol., 査読有, 印刷中, 2011, 印刷中, DOI: 該当なし
- ③ Z. Kalay, T. Fujiwara, and A. Kusumi, Confining domains lead to reaction bursts: reaction kinetics in the plasma membrane, PLoS One, 査読有, Vol.7, 2012, e32948, DOI:10.1371/journal.pone.0032948
- ④ Z. Kalay, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi, Cytoskeleton-induced meso-scale domains, Cellular Domains, 査読有,

Chapter 1, 2011, 3-22,  
DOI: 10.1002/9781118015759.ch1

- ⑤ A. Kusumi, K. G. N. Suzuki, R. S. Kasai, K. Ritchie, and T. K. Fujiwara, Hierarchical meso-scale domain organization of the plasma membrane, Trends Biochem. Sci., 査読有, Vol.36, 2011, 604-615,  
DOI: 10.1016/j.tibs.2011.08.001
- ⑥ R. S. Kasai, K. G. N. Suzuki, E. R. Prossnitz, I. Koyama-Honda, C. Nakada, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi, Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging, Journal of Cell Biology, 査読有, Vol.192, 2011, 463-480,  
DOI: 10.1083/jcb.201009128
- ⑦ K. A. K. Tanaka, K. G. N. Suzuki, Y. M. Shirai, S. T. Shibutani, M. S. H. Miyahara, H. Tsuboi, M. Yahara, A. Yoshimura, S. Mayor, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, Equal contribution, Membrane molecules mobile even after chemical fixation, Nature Methods, 査読有, Vol.7, 2010, 865-866,  
DOI: 10.1038/nmeth.f.314
- ⑧ A. Kusumi, Y. M. Shirai, I. Koyama-Honda, K. G. Suzuki, and T. K. Fujiwara, Hierarchical organization of the plasma membrane: Investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy, FEBS Letters, 査読有, Vol.584, 2010, 1814-1823,  
DOI: 10.1016/j.febslet.2010.02.047

[学会発表] (計44件)

- ① A. Kusumi, Signal transduction of GPI-anchored receptors based on dimerization and raft-lipid interaction, The International Titisee Conferences, 2012年3月29日, ティティーズ (ドイツ)
- ② A. Kusumi, Lipid-Stabilized Dynamic Homo-Dimers of GPI-Anchored Receptors Convert into Oligomeric Signaling Clusters, The American Society for Cell Biology 2011 Annual Meeting, 2011年12月3日, デンバー (アメリカ)
- ③ A. Kusumi, Signal transduction facilitated by raft-based interactions

as revealed by single-molecule imaging, 1st POSTECH International Symposium on Bioimaging, 2011年9月29日, 浦項 (韓国)

- ④ A. Kusumi, Organizing principle of the plasma membrane: three-tiered meso-scale domain architecture revealed by single-molecule tracking, The 8th European Biophysics Congress, 2011年8月27日, ブタペスト (ハンガリー)
- ⑤ A. Kusumi, Raft-facilitated protein interactions for signal transduction as revealed by single-molecule imaging, The 30th Naito Conference "Membrane Dynamics and Lipid Biology [II]: Domains, Droplets and Diseases", 2011年6月29日, 北海道
- ⑥ A. Kusumi, Three-tiered meso-scale membrane domains for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, Biochemistry Seminar Series, Department of Biochemistry, New York University School of Medicine, 2010年12月14日, ニューヨーク (アメリカ)
- ⑦ A. Kusumi, Hierarchical meso-domain organization of the plasma membrane for signal transduction: single-molecule tracking studies, Signal Transduction & Therapeutics Research Seminar, Jonsson Comprehensive Cancer Center, University of California Los Angeles, 2010年10月26日, ロサンゼルス (アメリカ)
- ⑧ A. Kusumi, Three-Tiered Meso-Structures of the Plasma Membrane as Revealed by Single-Molecule Tracking, 2010 FASEB Summer Research Conferences: Molecular Biophysics of Cellular Membranes, 2010年8月4日, サクストンズリバー (アメリカ)
- ⑨ A. Kusumi, Signal transduction by lipid-anchored molecules as revealed by single-molecule tracking, MRC Laboratory for Molecular Cell Biology (LMCB) Scientific Advisory Board, 2010年6月16日, ロンドン (イギリス)
- ⑩ A. Kusumi, Signal transduction by lipid-anchored molecules as revealed

by single-molecule tracking, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology 2010 Annual Meeting, 2010年4月26日, アナハイム(アメリカ)

⑪ A. Kusumi, Signal-molecule tracking approaches to membrane domains, HFSP Frontiers Meeting, 2010年3月4日, ストラスブール (フランス)

⑫ A. Kusumi, Signal transduction of GPI-anchored proteins as studied by single-molecule tracking analysis, The EMBO meeting: advancing the life sciences, 2009年9月1日, アムステルダム (オランダ)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nanobio.frontier.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

楠見 明弘 (KUSUMI AKIHIRO)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：50169992

### (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：