

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24247029

研究課題名(和文)細胞膜上マクロ構造体の形成と機能の機構：1分子イメージングによる解明

研究課題名(英文)Unraveling the formation mechanism of membrane macroscopic structures by single-molecule imaging

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜上には、直径が500nmを超えるマクロ構造体が多数存在し、重要な機能を果たしている。本研究では、接着斑とシナプスを取りあげ、微細構造と、形成・分解の制御機構を比較検討した。世界をリードする生細胞1分子観察法を用いて、構成分子の動態を直接に可視化した。その結果、これらの構造体は、今まで信じられていたようなタンパク質の巨大集積体ではなく、100nm未満の直径を持つ小さな島のようなタンパク質集合体が、同程度の隙間をあけて集まってできる『群島』構造をとっているということがわかった。また島の間の海峡は、細胞膜のバルク領域と同様、アクチン骨格によってコンパートメントされていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：There exist many macroscopic structures with sizes greater than 500 nm in the plasma membrane, which perform various important functions. In this study, we were interested in two macroscopic structures, the focal adhesion and the synapse. We examined and compared their fine structures and the regulation mechanisms for the formation-disintegration of their constituent molecules, using world-leading single-molecule imaging-tracking for live cells developed by us previously. Our results indicate that these structures are not single entities of massive protein assemblies as previously assumed, but largely consist of the fluid membrane dotted by protein islands of sizes less than 100 nm in diameter, which we call archipelago architectures. The channels (fluid membrane part) between the islands were found to be compartmentalized by the actin membrane skeleton, like the bulk region of the plasma membrane.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：細胞生物物理 1分子計測・操作 メゾスコピック系 生体分子 細胞膜の動的構造

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上には、直径が500nmを超えるマクロ構造体が多数存在し、重要な機能を果たしている。本研究では、主に接着斑 (FA) をとりあげ、微細構造と、形成・分解の制御機構を解明することを目的とする。さらに、この研究を、シナプスの構造形成にも敷衍する。これらは全く分かっていなかったが、我々は世界をリードする生細胞1分子観察法を用いて研究を開始し、その結果、解明が急激に進み始めた。

接着斑 (focal adhesion) は、数ミクロンの楕円形のものが多く、細胞が膜上に作り出す最大級の構造物である。動物の体の中では、細胞の移動が重要な働きを演ずる多数の過程がある。例えば、傷口の治癒、免疫応答、発生過程、癌細胞の浸潤転移など、例を上げると切りがない。これらの細胞移動を行うために、細胞が、細胞膜上に創り出す構造体が接着斑 (focal adhesion) である。

接着斑は、ロックライミングの際のハーケンのような働きをしていて、細胞は接着斑を足場として移動していく。具体的には、接着斑は、細胞外基質と細胞内のアクチンストレスファイバーを結合して、移動時の力発生に寄与し、細胞が移動していく前方では接着斑形成が起こり、後方では分解が起こる。この分解・形成は10分間のオーダーで生起し、これによって、長距離の細胞移動が可能になっている。

接着斑では、細胞外基質に膜貫通型タンパク質のインテグリンが結合し、インテグリンの細胞質側には、paxillin や talin などのタンパク質が集合して、その凝集塊がアクチン線維につながっている。接着斑は、色々なタンパク質分子が集まり、しかも、それが膜面上で数ミクロンにわたって広がる巨大な構造体だと考えられてきた (タンパク質巨大集積体モデル)。

しかし、ここで、一つの大きな疑問が生じる。上記の通り、接着斑は、細胞の移動のために、前方で形成され、後方で分解されるが、それらに要する時間は10分から20分程度である。数ミクロンサイズのタンパク質集積体が、一体どのようにして10~20分で、形成したり分解したり出来るのか、見当がつかないのである。

さらに最近、超解像蛍光顕微鏡の進歩により、接着斑は一つのタンパク質の塊ではなく、いくつかの塊に分割されている可能性が示唆されている。すなわち、大きなタンパク質塊の間に、細い水路 (流動性膜) があったとしても、接着斑領域での膜分子の拡散係数は小さいままで、接着斑の形成や分解が、拡散運動によって急速に起こることは期待できないことが、既に30年前に示されている (ベネチア水路モデル。この種の非線形性は percolation 効果と呼ばれている)。一方、超解像画像で見えている各々のタンパク質塊

も、分解能や統計的問題のため、大きさが過大評価されている可能性が高く、実際にははるかに小さなタンパク質会合体である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、接着斑の微細構造と、形成・分解の制御機構を解明すること、さらにその結果を、神経細胞が創るシナプスに敷衍し、微細構造と形成・分解の制御機構を比較して、細胞膜上の、直径が500nmを超えるマクロ構造体の構造と形成・分解の機構に共通の基本戦略・原理を探索して解明することである。

我々は、これらは、基本的に「群島構造モデル」で理解できるという作業仮説を立て、これを検証することで、解明を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

世界をリードする生細胞1分子観察法を用いて、構成分子の動態を直接に可視化する方法をとった。具体的には、生細胞中での2色 (2種分子) 同時1分子観察・追跡、世界最速の1分子イメージング・追跡 (0.1ミリ秒分解能、ビデオ速度より330倍速い)、世界最速のPALM (photoactivation localization microscopy) (1枚のPALM画像を得るのに、通常は5-10分を要するのに対し、我々の装置だと1秒で画像が得られる) などの方法を用いた。

接着斑領域のマーカー分子としては、接着斑の裏打ちタンパク質である paxillin に mGFP を融合させた分子を用いた。

4. 研究成果

(1) 接着斑 (FA) の群島構造モデルを強く支持する結果を得た。

接着斑とは関係のないトランスフェリンレセプター (TfR; 膜貫通型タンパク質) と脂質 (GPI) アンカー型タンパク質の Thy1 を時間分解能4ミリ秒で (通常のビデオ速度よりも約8倍速い) 1分子観察・追跡した。TfRもThy1も接着斑の中に簡単に入っていく、その中で拡散運動した。接着斑内での拡散速度 (0.3~1ミクロンスケールでの拡散係数) は、外部に比べて約1/2であった。すなわち、接着斑内でもまだまだ速い拡散が可能で、接着斑内の面積の最低でも70%以上が「流動性膜からなっている」ことがわかった (したがって、接着斑に入った分子は、ほとんどが1秒以内に外に出てくる)。接着斑が、1個のタンパク質大規模集積構造であるというモデル、および、ベネチア水路モデルは明確に否定された。

接着斑の主要タンパク質で、細胞外基質の受容体であり膜貫通型タンパク質であるインテグリンベータ3は、拡散運動によって、自由に接着斑内に侵入し、また、出てくることが分かった。しかし、その拡散挙動は、TfRやThy1に比べて複雑であった。

接着斑内で、観察時間中ずっと静止していたインテグリンは約40%に過ぎなかった(接着斑外だと15%)。残りのインテグリン分子は、接着斑の中で、単純拡散と一時停留を繰り返していた(一時停留は、その分子の平均拡散係数を基準とし、動く範囲が著しく狭い時間帯を検出するソフトを開発し、それを用いて行った)。一時停留の1回あたりの寿命(指数関数の時定数)は0.22秒であった。このように動いたり止まったりしている分子について調べると、動いている時間は70%、止まっている時間は30%であった(すなわち、動いている時間は、指数関数の時定数で、0.51秒)。

インテグリンは、接着斑を作るタンパク質集合体である島に結合したり、取り込まれたりして、静止したり、一時停留する、と考え、これらのデータも群島構造モデルとよく話が合う。すなわち、接着斑の中でも細胞膜の2次元流体構造が維持されており、そこに、まばらに、接着斑タンパク質の作る島が散在していると考えられるのである。ちょうど、日本三景の松島群島に似たような構造といつてよい。島の大きさはまだ分かっていない。

「1. 研究開始当初の背景」の項で、接着斑のような巨大な構造物を10~20分で生成・分解している仕組みが大きな疑問であったと述べた。この群島モデルは、この疑問に対して回答を与えるものであると考えている。群島モデルでは、松島群島の海峡部分に漂う松葉のように、膜タンパク質は、細胞膜の海(接着斑の海峡部分)を拡散運動することができ、それによって素早く各島に到達できる。そのため、全ての島において、同時に生成・分解が可能となる。これらにより、短時間での接着斑の生成と分解が可能になっていると考えられるのである。

(2) 接着斑形成に関わるシグナル分子(低分子量Gタンパク質)であるRac1の接着斑へのリクルートの機構

Rac1はおもに細胞質中に存在し、そこから接着斑にリクルートされてくる。その過程を1分子イメージング・追跡によって解明した。野生型(WT)、常時活性化型変異体(CA)、常時不活性化型変異体(DA)、Rac1のC末11アミノ酸配列のアンカー脂質結合ドメイン(Tail)の4種の分子を用いて検討した。その結果、これらの分子はすべて、細胞質から細胞膜上へと到着するが、着陸地点は細胞膜上に一様に分布し、接着斑に多く着陸するというようなことは、見られなかった。Rac1が

細胞膜に着陸したあと、Rac1は細胞膜の内側表面で拡散運動を行い、接着斑の内部へも拡散運動によって入り、接着斑の内部でも拡散運動を続けた。

CAはWTと同様に拡散運動をしているが、接着斑の内部では、WTよりはるかに頻繁に、一時停留を繰り返すことが分かった。実際、CAの一時停留の時間割合は36%で、これは野生型の10%に比べて、はるかに高い割合であり、1回の一時停留の寿命は0.48秒であった。インテグリンと同じように、go-Stopを繰り返すのがCAの挙動の特徴である。接着斑の内部で静止している分子まで加えると、停留している時間の割合は71%にもなる。これは、野生型の35%に比べてはるかに高い割合である。これは、Rac1が活性化されると、インテグリンベータ3と同じように、接着斑の中の構造体に結合するためであろうと考えられる。

一方、接着斑内でのRac1の拡散係数(動いている分子だけについての平均)は、接着斑外に比べて、約1/3程度であった。これは、TfR、Thy1、インテグリンと同様、接着斑の群島構造モデルを支持する結果である。

(3) 接着斑の群島構造モデルにおいて、流動膜部分は、アクチン膜骨格によって仕切られていることが分かった

接着斑とは関係のないトランスフェリンレセプター(TfR; 膜貫通型タンパク質)を世界最速の時間分解能0.1ミリ秒で1分子観察・追跡した。その結果、トランスフェリン受容体は、FA外の細胞膜と同様、ホップ拡散することが示された。すなわち、FA内部でも、アクチン膜骨格の網目で液性の細胞膜は仕切られており、その中に、FAタンパク質の島が散在することが示唆された。

(4) 後シナプス膜における、分子動態の解明
後シナプス膜において、神経伝達物質受容体GluR1、後シナプス膜に限らず細胞膜上に広く分布している膜タンパク質(GPIアンカー型受容体のThy1とプリオンタンパク質)、膜裏打ちタンパク質Homer1bの1分子動態の解明を進めた。その結果、検討したすべての分子が、動的に常にターンオーバーしていることが明らかになった。

(5) 様々な細胞膜上マクロ構造体の形成原理と機能には、共通の基本戦略・原理があり、基本的に群島構造で理解できるという仮説の提案

細胞膜には、接着斑やシナプス以外にも、さまざまな、ミクロンサイズの構造体が存在する。例えば、上皮細胞の、アドヒレンス・ジャンクション、デスモソーム、タイトジャンクション、ヘミデスモソームなどである。これらの構造体の多くも、10分のオーダーで

の形成・分解がある程度可能である。また、構造体全体としては安定して存在するように見えても、構成分子は、次々と入れ替わっている可能性も示唆されている。したがって我々は、これらの構造体も、群島構造を取っているのではないかと推定している。群島構造は、分子に比べてはるかに大きなマイクロスケールの構造体を生成するために、細胞が進化の過程で獲得してきた一般戦略である可能性が高く、さらなる研究の進展が期待される。

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8件)

Z. Kalay, T. K. Fujiwara, A. Otaka, and A. Kusumi, Lateral diffusion in a discrete fluid membrane with immobile particles, 査読有, Phys. Rev. E, 89, 2014, 022724

doi: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.89.022724>

N. Hiramoto-Yamaki, K. A. Tanaka, K. G. Suzuki, K. M. Hirose, M. S. Miyahara, Z. Kalay, K. Tanaka, R. S. Kasai, A. Kusumi, and T. K. Fujiwara, Ultrafast diffusion of a fluorescent cholesterol analog in compartmentalized plasma membranes, 査読有, Traffic, 15, 2014, 583-612

doi: 10.1111/tra.12163

A. Kusumi, T. A. Tsunoyama, K. M. Hirose, R. S. Kasai, and T. K. Fujiwara, Tracking single molecules at work in living cells, 査読有, Nature Chemical Biology, 10, 2014, 524-532

doi: 10.1038/nchembio.1558

Akihiro C. E. Shibata, Limin H. Chen, Rie Nagai, Fumiyoshi Ishidate, Rahul Chadda, Yoshihiro Miwa, Keiji Naruse, Yuki M. Shirai, Takahiro K. Fujiwara, Akihiro Kusumi, Rac1 recruitment to the archipelago structure of the focal adhesion through the fluid membrane as revealed by single-molecule analysis, 査読有, Cytoskeleton, 70, 2013, 161-177

doi: 10.1002/cm.21097

A. C. E. Shibata, T. K. Fujiwara, L.-M. 柴田明裕、楠見明弘、接着斑の群島構造モデルと形成機構 - 1 分子イメージングによる解明、査読有、生体の科学、64、2013、232-238

Chen, K. G. N. Suzuki, Y. Ishikawa, Y. L. Nemoto, Y. Miwa, Z. Kalay, R. Chadda, K. Naruse, and A. Kusumi, Archipelago architecture of the focal adhesion: Membrane molecules freely enter and

exit from the focal adhesion zone, 査読有, Cytoskeleton, 69, 2012, 380-392
doi: 10.1002/cm.21032

A. Kusumi, T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyama, Z. Kalay, R. S. Kasai, and K. G. N. Suzuki, Dynamic organizing principles of the plasma membrane for signal transduction: Commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic Model, 査読有, Ann. Rev. Cell Dev. Biol., 28, 2012, 215-250
doi:10.1146/annurev-cellbio-100809-151736

Akihiro Kusumi, Takahiro K. Fujiwara, Nobuhiro Morone, Kenta J. Yoshida, Rahul Chadda, Min Xie, Rinshi S. Kasai, Kenichi G. N. Suzuki, Membrane mechanisms for signal transduction: The coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes, 査読有, Semin. Cell. Dev. Biol., 23, 2012, 126-144

doi: 10.1016/j.semcdb.2012.01.018

[学会発表](計24件)

Akihiro Kusumi, Plasma membrane domain mechanisms for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, 2014 Symposium in Chemical Biology, 2014年11月27日, ローザンヌ(スイス)

Akihiro Kusumi, Basic unit rafts for raft formation and function as revealed by single-molecule tracking, Annual meeting of the Korean Society for Molecular and Cell Biology (KSMCB) 2014, 2014年10月22日, ソウル(韓国)

Akihiro Kusumi, Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, ComBio 2014, 2014年10月1日, キャンベラ(オーストラリア)

Akihiro Kusumi, Unit raft mechanism for signal transduction revealed by single-molecule tracking, Biomembrane Days 2014, 2014年9月2日, ベルリン(ドイツ)

Akihiro Kusumi, Membrane mechanisms as revealed by single-molecule tracking in living cells, The Biennial British Biophysical Society Conference, 2014年7月10日, コヴェントリー(イギリス)

Akihiro Kusumi, Membrane mechanisms: Concerted action of membrane domains for signal transduction in the plasma membrane, 8th IUPAP International Conference on Biological Physics, 2014

年6月20日、北京(中国)
Akihiro Kusumi, Hierarchical and dynamic organization of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, The 14th Hunter Meeting, 2014年3月26日、ハンターバレー(オーストラリア)
Akihiro Kusumi, Hierarchical and dynamic organization of the plasma membrane for signal transduction revealed by single-molecule tracking, Departmental Seminar, Dept. of Chemistry and Dept. of Biology, King's College London, 2013年12月10日、ロンドン(イギリス)
Akihiro Kusumi, Short-lived homodimer rafts of GPI-anchored proteins and glycolipids as basic units for organization and operation of raft microcompartments, International Symposium on Cellular Microcompartments, 2013年9月21日、オスナブリュック(ドイツ)
Akihiro Kusumi, Unit raft hypothesis: a proposition based on advanced single-molecule imaging results, Engineering Life 2013 Symposium "Bio-molecular principles for novel methods and materials", 2013年9月17日、ドレスデン(ドイツ)
Akihiro Kusumi, U Hypothesis of unit rafts as organizers of the meso-scale domain structure and function in the plasma membrane, Diffusion Fundamentals V "Basic Principles of Diffusion Theory, Experiment and Application", 2013年8月26日、ライプツィヒ(ドイツ)
楠見明弘, ラフト形成と機能のための細胞の第一歩、第86回日本薬理学会年会、2013年3月22日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
Akihiro Kusumi, First steps to raft formation as revealed by single-molecule tracking: transient GPI-anchored protein homodimer rafts are basic units for raft organization and function, RSC Publishing-iCeMS Joint International Symposium "Cell-Material Integration and Biomaterials Science", 2013年3月18日、京都大学(京都府京都市)
楠見明弘, 細胞膜シグナル伝達を担うメゾスケールドメイン構造:1分子イメージング解析による研究、大阪大学蛋白質研究所セミナー「シグナル伝達と解析技術のあらたな潮流」、2013年3月5日、大阪大学蛋白質研究所(大阪府吹田市)
楠見明弘, ラフト機能と構造の基本単位として働く GPI アンカー型受容体ホモダ

イマーラフト:1分子イメージングによる研究、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Akihiro Kusumi, Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: single-molecule tracking studies, Departmental Seminar, Dept. of Physiology, University of Otago, 2012年11月26日、ダニーデン(ニュージーランド)

楠見明弘, 細胞膜の階層メゾドメイン構造とシグナル変換制御機構:1分子イメージングによる研究、第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012年11月15日、京都大学(京都府京都市)

Akihiro Kusumi, Transient GPI-anchored protein homodimer rafts are basic units for raft organization and function, The Biophysical Society (U.S.) Thematic Meeting "Lipid-protein Interactions in Membranes: Implications for Health and Disease", 2012年11月3日、ハイデラバード(インド)

Akihiro Kusumi, Transient GPI-anchored protein homodimer rafts are basic units for raft organization and function: single-molecule imaging study, Departmental Seminar, National Centre for Biological Science, 2012年11月1日、バンガロール(インド)

楠見明弘, 受容体ホモダイマーによるラフト機能創出:1分子イメージングによる研究、第21回日本バイオイメージング学会学術集会、2012年8月28日、国立京都国際会館(京都府京都市)

⑲ 楠見明弘, Organizing principles of the plasma membrane: Three-tiered hierarchical meso-scale domain architecture revealed by single-molecule tracking, Joint Summer Research School in Nanomedicine, 2012年8月2日、慶應義塾大学(東京都新宿区)

⑳ 楠見明弘, 1分子毎に見て細胞膜がはたらく仕組みを解く、京都大学再生医科学研究所第7回公開講演会「分子から細胞さらに再生医療へ」、2012年7月14日、京都大学(京都府京都市)

㉑ 楠見明弘, 細胞膜上の特別なドメインの形成機構と機能、第27回動物細胞工学シンポジウム「細胞表面の理解と応用」、2012年6月1日、東京工業大学キャンパス・イノベーションセンター(東京都港区)

㉒ Akihiro Kusumi, Organizing principles of the plasma membrane: Three-tiered hierarchical meso-scale domain

architecture revealed by
single-molecule tracking, CLS (Peking
University)-iCeMS (Kyoto University)
Joint Symposium, 2012年4月21日,北
京(中国)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.nanobio.frontier.kyoto-u.ac.
jp/](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

笠井 倫志 (KASAI, Rinshi)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：20447949

(3) 連携研究者 なし