

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21121004

研究課題名(和文) 超高解像度1分子蛍光顕微鏡の開発と細胞膜受容体の情報伝達機構の1分子解析

研究課題名(英文) Development of super-resolution fluorescence microscopy and single-molecule analysis of signal transduction mechanism of a receptor protein in cell membrane

研究代表者

船津 高志(Funatsu, Takashi)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00190124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 122,000,000円、(間接経費) 36,600,000円

研究成果の概要(和文)：Mplを骨髓球細胞株に強制発現させ蛍光標識した。その結果、Mplはリガンドの有無にかかわらず単量体・二量体の平衡状態で存在することを明らかにした。Mpl二量体の寿命はリガンド存在下で延長し、Mplのリン酸化はアダプタータンパク質Shcのノックダウンにより阻害された。一方、安定化されたMpl二量体はMplのリン酸化を促進した。本研究により、サイトカイン受容体の単量体・二量体平衡による正のフィードバック制御という、新規のリン酸化制御機構を明らかにした。これは、低いサイトカイン濃度で標的細胞を効率よく刺激するのに重要だと思われる。また、Mplの局在を観察するために超解像蛍光顕微鏡を開発した。

研究成果の概要(英文)：The thrombopoietin (TPO) receptor, Mpl, is a cytokine receptor regulating platelet production and early hematopoiesis. Although TPO signaling is initiated by phosphorylation of optimally oriented Mpl dimers, dimerization of Mpl is poorly understood. Here, we describe the regulatory mechanism of dimerization of Mpl by single-molecule fluorescence imaging in live cells. Mpl molecules were associated and dissociated repeatedly on the plasma membrane. As a result, Mpl existed as a mixture of monomers, dimers, and oligomers. TPO increased Mpl dimers or oligomers by stabilizing Mpl dimers. The stabilization of Mpl dimers was dependent on their phosphorylation and an adaptor protein, Shc, suggesting that phosphorylated Mpl dimers were crosslinked by Shc. In contrast, knockdown of Shc, an Mpl transmembrane mutant, influenced their phosphorylation. Thus, phosphorylation of Mpl was regulated by the stability of Mpl dimers in a positive feedback manner.

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分子生理・生化学 1分子イメージング ナノ計測 受容体 生体膜

## 1. 研究開始当初の背景

トロンボポエチン (thrombopoietin, TPO) は血小板の前駆細胞である巨核球の増殖と分化を促進するサイトカインであり、血小板の産生を制御する主要な因子だと考えられている。このような TPO の機能は I 型サイトカイン受容体ファミリーに属する受容体 Mpl によって担われている。Mpl は細胞外に TPO が存在すると細胞表面から細胞内へと内在化し、逆に細胞外に TPO が存在しないと細胞内から細胞表面へと輸送されることが報告されている (Dahlen et al., *Blood*, 102: 102, 2003)。このように Mpl が局在を変化させることは、下流のシグナル伝達を制御する上で重要だと考えられている。しかし、TPO の結合と Mpl の多量体のメカニズム、さらにはシグナル伝達との関係については細胞生物学的、生化学的な検討がなされているのみである。また、TPO と Mpl の過渡的複合体がどのようにして安定な多量体を形成し、細胞内をどのように輸送され、分解されるかも明らかにされていない。このように TPO と Mpl の結合、内在化、分解過程のダイナミクスを時空間的に捉える研究はまだ行われていない。

## 2. 研究の目的

光学顕微鏡による生体分子の 1 分子イメージングは、申請者らのグループによって世界に先駆けて開発された技術である。その後、シャペロニンなどのタンパク質が一時的に複合体を形成し機能を発揮する様子を 1 分子イメージングすることに成功している。また、生細胞の内部でも生体分子を 1 分子イメージングできるようになり、mRNA の運動を 1 分子解析することにも成功している。この手法を進展させ、従来の光学顕微鏡の解像度の限界を超えた数十ナノメートルの解像度を有する超解像度 1 分子蛍光顕微鏡システムを開発する。これを用いて、血球系の分化に関係する情報伝達機構を明らかにする。具体的には、血小板の前駆細胞である巨核球の増殖

と分化を促進するサイトカインである TPO と、その受容体である Mpl をそれぞれ蛍光標識し、両方の分子の運動を同時に 1 分子イメージングする。まず、TPO と Mpl を蛍光標識し、TPO と Mpl の結合の様子と、Mpl の多量体化の進行を定量し、TPO の結合に伴う Mpl の多量体化のメカニズムを明らかにする。また、クラスリンや脂質ラフトの阻害剤を加えたり、クラスリンや脂質ラフトを構成する主要なタンパク質の発現を RNAi で抑制することにより、Mpl の内在化がどのように変化するか蛍光顕微鏡観察する。これにより、Mpl がクラスリンによって内在化するのか脂質ラフトによって内在化するのかを明らかにする。次に、Mpl の多量体化が Jak2、Src ファミリーキナーゼのリン酸化に及ぼす影響と、逆に、Jak2、Src ファミリーキナーゼのリン酸化の抑制が、Mpl の多量体化に及ぼす影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

蛍光色素 1 分子をナノメートル計測できる超安定ステージを備えた 1 分子蛍光顕微鏡システムを改良し、高速波長切り替えと、それに同期した画像取得を可能にする。また多数の画像情報から超高解像度の画像を再構築するためのプログラムを作成する。これにより、超高解像度 1 分子蛍光顕微鏡システムを完成させる。これを用いて TPO と Mpl の相互作用のダイナミクスを観察するため、TPO の C 末端に蛍光色素 IC5 を、Mpl の N 末端側に緑色蛍光タンパク質を結合させる。TPO と Mpl を 1 分子レベルで同時観察し、多量体の形成過程を観察する。Mpl が何量体を形成しているか蛍光強度分布解析法で調べる。また、多量体化した TPO/Mpl がクラスリン被覆ピットや脂質ラフトのマーカータンパク質と共同在するか超高解像度 1 分子蛍光顕微鏡システムを用いて調べる。さらに、細胞表面における TPO および Mpl の運動を 1 分子レベル

で同時観察することにより TPO/Mpl の内在化機構を明らかにする。TPO/Mpl の内在化が JAK2 により制御されている可能性がある。これを明らかにするため、JAK2 やその恒常活性型変異体 V617F を過剰に発現させ、TPO/Mpl の内在化に変化があるか調べる。また、Mpl の恒常活性型変異体 W515L/K の内在化を調べることで、Mpl の活性化が TPO/Mpl の内在化を制御しているか明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) Mpl シグナルの正のフィードバック制御

サイトカインは血液中を循環する低分子タンパク質であり、標的細胞内のシグナル伝達を細胞外から刺激する。Mpl は血小板産生と初期造血を制御するサイトカイン受容体である。Mpl リガンドのトロンボポエチンは、元々血小板前駆細胞の巨核球の増殖と分化を促進するサイトカインとして同定されたが、多能性の造血幹細胞の制御に必須なサイトカインの一つとして注目されている。近年、Mpl のリン酸化は Mpl 二量体の構造変化により制御されることが分かりつつある。Mpl の細胞質領域には非受容体型チロシンキナーゼの JAK2 が結合している。Mpl は二量体化しているが、細胞質領域同士が離れた構造を取るため、細胞質領域に結合した JAK2 は二量体化していない。しかし、リガンド依存的に Mpl 二量体が構造変化すると JAK2 は二量体化する。JAK2 は二量体内で自己リン酸化すると、活性型へ構造を変化させて Mpl をリン酸化できるようになる。このように、Mpl のリン酸化は Mpl 二量体の構造変化により制御されることが分かりつつある。

一方、Mpl 二量体の安定性はよく分かっていない。一分子イメージングにより Mpl 二量体の安定性を明らかにすることにした。Mpl は細胞膜上で結合・解離を繰り返しており、その結果、単量体と二量体が混在するかたちで存在していた。また、Mpl 二量体の寿命はリガンド存在下で延長し、Mpl のリン酸化の

阻害やアダプタータンパク質 Shc のノックダウンにより阻害された。Shc はリン酸化チロシン結合ドメインを二つ持つため、リン酸化された Mpl 二量体が Shc により架橋されたと考えている。一方、安定化された Mpl 二量体は Mpl のリン酸化を促進した。前述のとおり、JAK2 は Mpl 二量体の構造変化により二量体化することで自己リン酸化し、Mpl をリン酸化する。そのため、Mpl 二量体が安定化されると JAK2 の自己リン酸化が促進され、Mpl のリン酸化が促進されるという仮説を立てた。この仮説は、Mpl 二量体の寿命が Mpl のリン酸化に影響を与えることにより確かめられた。

このように、Mpl 二量体は Mpl のリン酸化により安定化され、安定化された Mpl 二量体は逆に Mpl のリン酸化を促進することが明らかになった (図 1)。

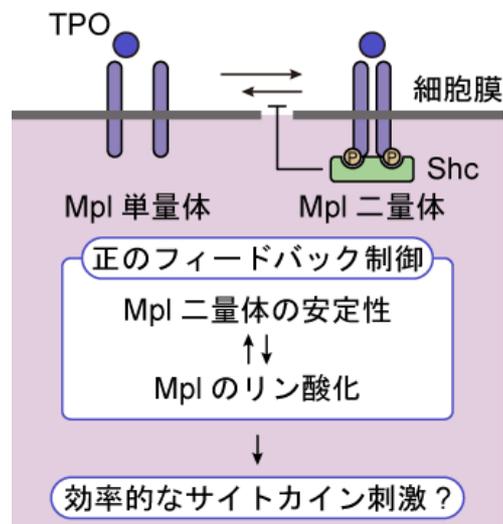


図 1 Mpl 二量体安定化による Mpl リン酸化のフィードバック制御

##### (2) Mpl シグナルの空間制御

Mpl シグナルの空間制御を理解することは Mpl シグナル機構を理解する上で重要である。これまでに共焦点顕微鏡により、リガンド結合型の Mpl が細胞膜上でコレステロール依存的にクラスター化することを明らかにした。コレステロールを除去すると、リガンド結合型の Mpl はクラスター化しなくなり、Mpl のリン酸化も阻害された。この結果は、リガンド結合型の Mpl がコレステロール依存的にク

ラスタライズすることにより Mpl のシグナルが促進されることを示唆する。

近年、造血幹細胞・造血前駆細胞では、脂質ラフトのクラスター化によりシグナルが制御されることが分かりつつある。脂質ラフトはコレステロールに富む膜ドメインとして知られるので、脂質ラフト上で Mpl の単量体・二量体平衡がどのように制御されるかを超解像イメージングにより調べた。従来の一分子イメージングでは、光学顕微鏡の回折限界内に複数の分子が存在すると、一分子解析が困難だった。造血前駆細胞上の脂質ラフトのクラスターは最大数  $\mu\text{m}$  なので、その中で Mpl の一分子解析は困難だった。従来の一分子イメージングでは回折限界 (200-300 nm) により、多分子の結合解離の一分子解析することが困難だからだ。そこで、圧縮センシングと  $\text{\`a trous}$  変換による輝点抽出を組み合わせることで、空間分解能約 100 nm、時間分解能約 60 ms の一分子超解像観察法を開発した (図 2)。

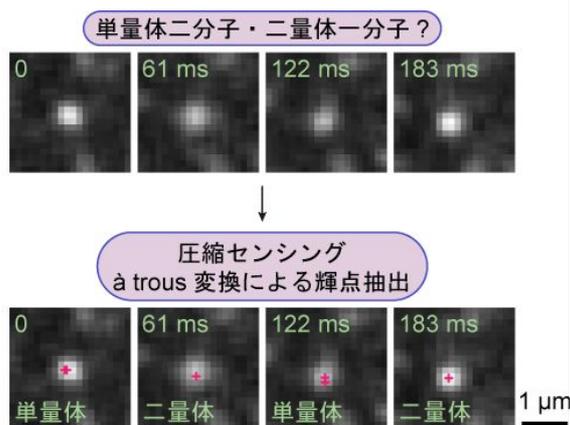


図 2 Mpl 単量体・二量体平衡の一分子超解像観察 (空間分解能 100 nm)

### (3) 超高解像度 1 分子蛍光顕微鏡の開発

Mpl の分布を光の回折限界を超えて観察するために、超解像光学顕微鏡 (STORM) を開発した。その結果、水平方向に約 20 nm、奥行き方向に約 60 nm の解像度を得た。この顕微鏡システムを評価するため、まず、ストレス顆粒 (SG) の観察を行った。細胞は外界からのストレス刺激に対して、損傷を防御し生

存を図るストレス適応機構を有している。その機構の一つとして SG の形成があげられる。SG は、低酸素、熱ショック、ウイルス感染、砒素などのストレス刺激に応答して形成される直径約  $1 \mu\text{m}$  の細胞質内構造体であり、mRNA、RNA 結合タンパク質、40S リボソームなどから構成されている。SG が形成されると一部の mRNA が SG 内に取り込まれ、翻訳が一時的に停止する。そして、細胞がストレスから回復すると SG は消失し、翻訳が再開される。SG の作用機構を明らかにするため、SG の生成と消失のダイナミクスを計測した。その結果、構成成分である RNA が外部とシャトルしていることを示した。細胞に砒素による参加ストレスを加えて SG を生成させ、STORM 観察したところ、SG 内で mRNA が直径約 100 nm 程度の小さな区画に局在していた。また、ストレス顆粒構成因子の局在の様子の違いを明らかにした。

### 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 14 件)

Shin-nosuke Uno, Mako Kamiya, Toshitada Yoshihara, Ko Sugawara, Kohki Okabe, Mehmet C. Tarhan, Hiroyuki Fujita, Takashi Funatsu, Yashushi Okada, Seiji Tobita, Yasuteru Urano. A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. Nat. Chem. In press. 査読有

加藤尚志、坂本明彦、船津高志、宮崎洋 「巨核球・血小板産生における TPO-c-Mpl 系の分子動態」日本血栓止血学会誌、23 巻 6 号、pp.544-551 (2012) 査読無

Yodai Takei, Ryo Iizuka, Taro Ueno, Takashi Funatsu. Single-molecule observation of protein folding in

symmetric GroEL-(GroES)<sub>2</sub> complexes. J. Biol. Chem. 287, 41118-41125 (2012). doi:10.1074/jbc.M112.398628 査読有

Kohki Okabe, Noriko Inada, Chie Gota, Yoshie Harada, Takashi Funatsu, Seiichi Uchiyama. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. Nat. Commun. 3, 705 (2012). doi:10.1038/ncomms1714 査読有

Junwei Zhang, Kohki Okabe, Tokio Tani, Takashi Funatsu. Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules. J. Cell Sci. 124, 4087-4095 (2011). doi:10.1242/jcs.090951 査読有

坂本明彦、加藤尚志、船津高志「細胞膜上におけるトロンボポエチン受容体の一分子ダイナミクス」生化学、83 巻 10 号、pp.912-919 (2011) 査読無

Kohki Okabe, Yoshie Harada, Junwei Zhang, Hisashi Tadakuma, Tokio Tani, Takashi Funatsu. Real time monitoring of endogenous cytoplasmic mRNA using linear antisense 2' O-methyl RNA probes in living cells. Nucleic Acids Res. 34, e20 (2011). doi:10.1093/nar/gkq1196 査読有

Tomoya Sameshima, Ryo Iizuka, Taro Ueno, Takashi Funatsu. Denatured proteins facilitate the formation of the football-shaped GroEL-GroES complex. Biochem. J. 427, 247-254 (2010). doi:10.1042/BJ20091845 査読有

Mai Yamagishi, Yoshitaka Shirasaki, Takashi Funatsu. Size-dependent accumulation of mRNA at the leading edge of chicken embryo fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 390,

750-754 (2009). doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.043 査読有

〔学会発表〕(計 24 件)

坂本明彦、加藤尚志、船津高志「一回膜貫通型サイトカイン受容体Mpl二量体化の一分子蛍光解析」日本生物物理学会第51回年会、2013年10月28日～30日、国立京都国際会館、京都市、京都府

船津高志「細胞膜上におけるトロンボポエチン受容体の一分子ダイナミクス」第13回Pharmaco-Hematology Symposium～血液からの創薬を考える～、2012年6月15日～16日、日本薬学会長井記念ホール、渋谷区、東京都

坂本明彦、加藤尚志、船津高志「トロンボポエチンシグナルの上流部は脂質ラフトによって制御されている」第62回日本細胞生物学会大会 2010年5月19日～21日、大阪国際会議場、大阪市、大阪府

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~funatsu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

船津 高志 (FUNATSU, Takashi)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：00190124

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

加藤 尚志 (KATO, Takashi)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：80350388