

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年3月29日現在

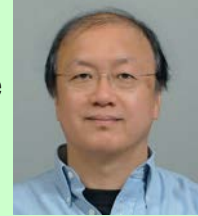
受容体の超過渡的複合体によるシグナル変換と
アクチンによる制御：1分子法による解明

Signal transduction by transient molecular complexes and
its regulation by actin membrane skeleton: single-molecule
tracking study

課題番号：16H06386

楠見 明弘 (KUSUMI, AKIHIRO)

沖縄科学技術大学院大学・教授



研究の概要（4行以内）

我々は、我々の最近の研究に基づき、細胞膜上でのシグナル変換を担う多くの分子複合体は、(1)0.1秒オーダーで様々なシグナル分子がやってきては去っていくような著しく動的な機構で働く、(2)多くの細胞膜上シグナル変換分子複合体は、アクチン膜骨格も構造的基盤として働く、という作業仮説をたてた。本研究では、本仮説の成否を検討し、シグナル機構を解明する。

研究分野：1分子細胞医化学

キーワード：1蛍光分子イメージング、1分子追跡、シグナル分子複合体、CD59、Fce受容体、GPCR

1. 研究開始当初の背景

本研究の申請前に、我々は、細胞膜のシグナル伝達についての2つの驚くべき発見をした。すなわち、3つの受容体系（補体制御のCD59、アレルギーに関わるFce受容体、GPCR）において、(1)シグナル分子複合体は、生細胞内で1分子法で直接見ると、大きくも安定でもなく、0.1秒オーダーで様々なシグナル分子がやってきては去っていくような著しく動的な機構で働く、(2)アクチン膜骨格がシグナル変換の基盤として働く可能性がある、というものである。これらは、我々が開発してきた超高速1分子観察法・FRET法がある程度使えるようになってきて、初めて可能になったものである。これらは、3つのシグナル系で共通に見られたので、多くのシグナル系に共通の基本戦略・原理であると思われた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の観察に基づき、主に上記3つの受容体系を用い、これら2つのシグナル機構の検討をさらにすすめて、解明することを目的とした。以て、細胞のシグナル機構研究にパラダイム変換を誘起することを目指し、また、シグナル異常による多くの病気の理解に寄与するだけでなく、将来は、薬剤

の新しい設計概念にもつなげたい。

3. 研究の方法

まずは、現在の我々の超高速1分子観察・追跡法をさらに改善し、超高速の超解像PALMイメージング+1分子追跡の同時実行法（2色～3色）を開発する。すなわち、本研究で、1分子追跡の超高速化（45kHz；時間分解能22μs）、PALM観察の超高速化（1画面1秒程度）、これらを同時に実行する装置を開発する。刺激で形成されるCD59会合体ラフトやTalinタンパク質複合体など、ゆっくりと変化・移動する会合体をPALM観察しながら（時間分解能1秒）、そこへ別の分子（例えば、integrin, PIP5K, 糖脂質）が出入りしたり、会合体内部で動くのを22μsの時間分解能で観察できるようにする。

同時に、1分子追跡時間を、蛍光分子の退色と点滅を制御し、100秒程度（指数減衰時間）にまで延ばす方法を開発する。試料中の酸素分子濃度を制御し（酸素の減らしすぎはダメ。三重項状態の制御と細胞の生存に必要）、酸化剤と還元剤を混在させることで、蛍光分子が主に4つの励起状態と基底状態の間で複雑に遷移する速度と経路を制御することで、この開発を完成させた。

これらの2つの手法を用い、研究目的を達成する。

4. これまでの成果

(1) 前項の3で述べた方法開発は、既に達成した。最初の開発については、現在、論文投稿を準備中である。

第二の開発についても成功し、以下の結果を得た。試料中の酸素分子濃度を2%程度に減らし(体内の酸素分圧と同程度)、還元剤と酸化剤(細胞毒性の低い trolox と troloxquinone をそれぞれ使用)を混在させることで、蛍光分子の退色と点滅を制御し、1分子追跡時間を、指数減衰時間にして約100秒まで延ばすことに成功した(SeTauを用いた場合)。実際、1分子追跡において、数パーセントの分子は400秒程度(約7分間!!)観察できるようになった。

もっと広く用いられている蛍光プローブであるテトラメチルローダミンでも、蛍光退色寿命は40秒程度まで伸びた。この2%酸素+trolox+troloxquinoneの方法は、試した13種の蛍光分子のうち、9種の蛍光分子に有効であった。この研究成果は、出版済みである(Tsunoyama et al., Nat. Chem. Biol. 2018)。

(2) 多くのシグナル分子がシグナル分子複合体に滞在する時間が1秒未満であることの検討を進め、多くのシグナル分子について、このような現象が見られることが分かった。またGPCRのdopamine D2 receptorは、寿命0.1秒のホモダイマーを形成することが分かった(Kasai et al., Cell Biochem. Biophys. 2018)。

(3) Fcε受容体のシグナル機構をマスト細胞(具体的にはRat Basophilic Leukemia細胞=RBL-2H3細胞)を用いて調べ、極めて面白い結果を得た。これに関して、現在、論文投稿を準備中である。

(4) アクチン膜骨格がシグナル変換の共通基盤としてはたらく仕組みの解明をすすめた。特に膜骨格を直接観察することに成功し、出版した(Shirai et al., PLoS One 2017)。さらに、膜骨格が細胞膜のシグナル系に対して「閉じ込め効果」をもつ、という可能性を検討中である。また一部の結果は出版済みである(Fujiwara et al., Mol. Biol. Cell 2016)。

(5) ラフト親和性受容体のシグナル機構の解明をおこなうための新規蛍光標識脂質の開発に成功した(Kinoshita et al., J. Cell Biol. 2016; Komura et al., Nat. Chem. Biol.)。これらは、ラフトのダイナミクス、構造、機能の解明に大きく役立ち、学術的価値だけではなく、医学薬学分野への波及効果も大きいと考えられる。

5. 今後の計画

これまでの成果をもとに、所期の研究目的を達成する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. T. A. Tsunoyama, Y. Watanabe, J. Goto, K. Naito, K. G. N. Suzuki, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function. Nat. Chem. Biol. 14, 497-506 (2018). DOI: 10.1038/s41589-018-0032-5.

2. Y. M. Shirai, T. A. Tsunoyama, N. Hiramoto-Yamaki, K. M. Hirose, A. C. E. Shibata, K. Kondo, A. Tsurumune, F. Ishidate, A. Kusumi (Co-Corresponding Author), and T. K. Fujiwara. Cortical actin nodes: Their dynamics and recruitment of podosomal proteins as revealed by super-resolution and single-molecule microscopy. PLoS ONE 12, e0188778 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0188778.

3. M. Kinoshita, K. G. N. Suzuki, N. Matsumori, M. Takada, H. Ano, K. Morigaki, M. Abe, A. Makino, T. Kobayashi, K. M. Hirose, T. K. Fujiwara, A. Kusumi (Co-Corresponding Author), and M. Murata. Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs. J. Cell Biol. 216, 1183-1204 (2017). DOI: 10.1083/jcb.201607086.

4. K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, M. Konishi, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. Revealing the raft domain organization in the plasma membrane by single-molecule imaging of fluorescent ganglioside analogs. Methods Enzymol. 598, 267-282 (2018). DOI: 10.1016/bs.mie.2017.06.038.

5. K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, T. K. Fujiwara, M. Kiso, and A. Kusumi. Development of new ganglioside probes and unraveling of raft domain structure by single-molecule imaging. Biochim. Biophys. Acta - General Subjects (Review in a special issue on Neuro-glycoscience) 1861, 2494-2506 (2017). DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.07.012.

7. ホームページ等

<https://www.oist.jp/news-center/press-releases/biological-ballet-development-new-imaging-technique-reveals-complex>