

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14477

研究課題名(和文)細胞膜上のデジタル式シグナル変換システムの解明

研究課題名(英文)Unraveling of digital-like signal transduction systems in cell plasma membranes

研究代表者

鈴木 健一 (SUZUKI, KENICHI)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点准教授

研究者番号：50423059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：「細胞膜上の受容体を刺激後、長く続くアナログシグナルは、1分子レベルで見ると短期間シグナルから積算されて作られる。」とする仮説を検証した。EGF受容体への下流シグナル分子のリクルートを1分子観察したところ、0.5秒以下の時間しか続かなかったが、細胞全体のシグナル強度が高くなるにつれて、リクルート頻度は大きくなっていった。この結果は、上記仮説をさらに裏付けた。

研究成果の概要(英文)：We inspected a hypothesis that long analog-like signals by receptors in cell plasma membranes can be generated by summation of short digital-like signals. We performed single-molecule imaging of recruitment of signaling molecules to EGF receptors upon ligation, and found that the recruitment occurred for very short periods (less than 0.5 sec), but the frequency of the recruitment was increased as the bulk signal intensity was increased. These results strongly support the hypothesis.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：シグナル伝達 1分子観察 ラフト Src family kinase Phospholipase C gamma

1. 研究開始当初の背景

我々は、高精度1分子観察法を用いて、GPI アンカー型受容体で補体の制御タンパク質である CD59 を、リガンドの補体複合体で刺激後に形成される安定な4量体に、細胞内からシグナル分子が短期間リクルートされては、離れることを見出していた。リクルート1回あたりの時間は 0.1-0.5 秒程度と極めて短いことを発見した (図1)。一方で、western blotting などでも調べた細胞全体のシグナルは、数分~数十分は続いていた。

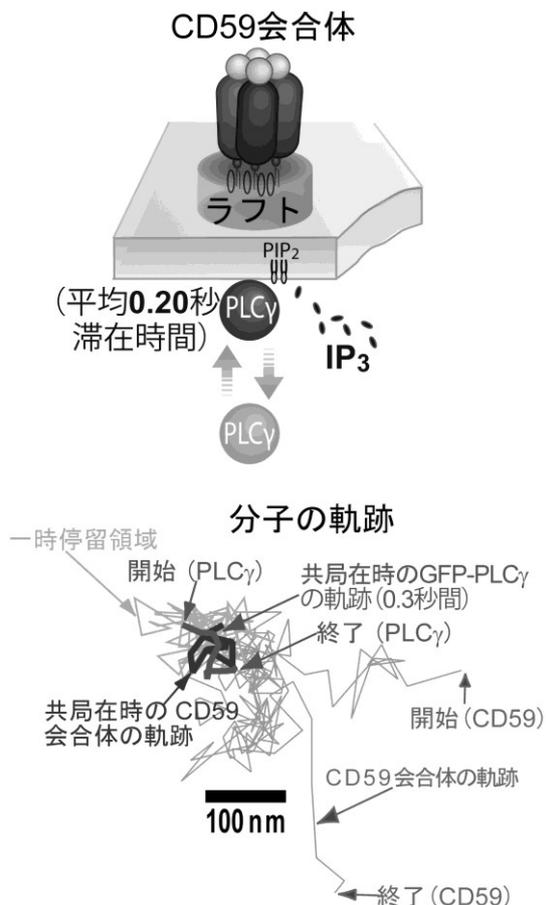


図1. PLC γ の CD59 会合体への短期間のリクルートの模式図 (上) と実際の2色同時1分子観察時の両者の軌跡 (下)。

2. 研究の目的

上記の実験結果に基づいて我々は、「細胞膜上の受容体をリガンド刺激後、数分以上続く細胞全体のアナログシグナルは、1分子レベルで見ると1秒以下の時間しか続かないパルス状の短期間シグナルから積算されて作られる。」とするデジタル式シグナルシステム仮説を立てていた。この仮説を検証することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

デジタル式シグナルシステム仮説を検証するために、シグナル分子の Src family kinase (SFK)が CD59会合体にリクルートされたとき、そこで、活性化される様子を1分

子観察する。そのため、蛍光標識 ATP アナログを細胞内へマイクロインジェクションで導入した。蛍光標識 ATP アナログが、蛍光標識 SFK mutant に結合する瞬間を1分子蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET)により可視化できるかを検討した。また、Phospholipase C γ (PLC γ)の活性化の1分子 FRET 法での可視化を試みた。そのため、IP $_3$ 受容体の IP $_3$ 結合ドメインの両端に halo-tag と snap-tag (共に高輝度で高光安定性の蛍光色素標識) がついた IP $_3$ センサーを PLC γ に融合させた分子を発現させ、1分子 FRET 観察を試みた。また、1分子 FRET 観察なしでも、シグナル分子の活性化の可視化するために、Halo-tag を細胞質側に結合させた EGF 受容体 (EGFR) を Tetramethylrhodamine (TMR) ラベルしたものをリガンド刺激し、下流のシグナル分子 Grb2-mGFP の EGFR へのリクルートを2色同時1分子観察し、リクルートを定量評価した。

4. 研究成果

この仮説を検証するために、まず、信号分子 (Src family kinase, Phospholipase C) の活性化を FRET 観察するためのプローブの作成に成功した。さらに FRET を観察するための最適化 (リンカーの長さを最適化) を行い、活性化を可視化するための1分子 FRET 観察には成功した。しかし、活性化-不活性化のサイクルを観察するためには、シグナル/ノイズ比を上げる必要があり、今後の試行錯誤が必要な状況である。

上の実験に平行して、EGF 受容体 (EGFR) への信号分子 Grb2 のリクルートの観察を行った (図2)。EGFR 刺激後、Grb2-GFP の

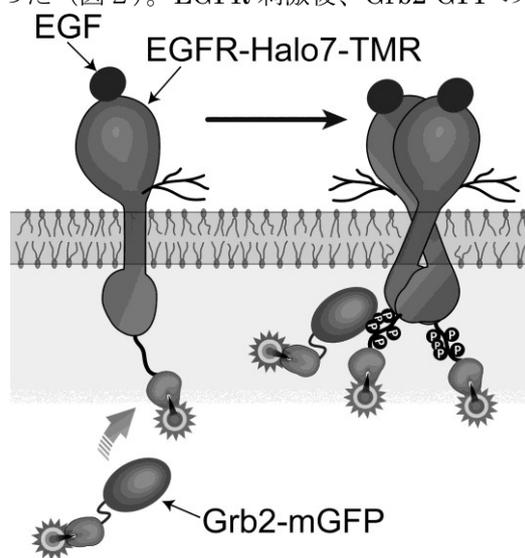


図2. Grb2 の EGF 受容体 (EGFR) への短期間のリクルートの模式図。

EGFR へのリクルートを観察したところ、CD59 会合体へのシグナル分子のリクルート同様に、0.5 秒以下の時間しか続かず、リクルートはパルス状であった。リクルートの1

回あたりの時間は短かったが、細胞全体のシグナル強度が高くなるにつれて、リクルート頻度も大きくなっていった。この結果は、細胞全体で見ると長時間続くシグナル伝達が、1つずつの分子で観察するとパルス状のシグナル伝達となっていることをさらに裏付けている。デジタル式シグナルシステム仮説を後押しする結果を得ることができた。

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 6 件)

- ① M. Kinoshita*, K. G. N. Suzuki* (*equal contribution), N. Matsumori, M. Takada, H. Ano, K. Morigaki, M. Abe, A. Makino, T. Kobayashi, K. M. Hirose, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, and M. Murata. (2017) Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs. *J. Cell Biol.* 216: 1183-1204. (査読有) [http://jcb.rupress.org/content/216/4/1183.long/DOI: 10.1083/jcb.201607086](http://jcb.rupress.org/content/216/4/1183.long/DOI:10.1083/jcb.201607086)
- ② 鈴木健一 (2017) 「ガングリオシドプローブの1分子観察によりラフト動態を探る」*生化学*, 89: 121-125 (査読有) [https://seikagaku.jbsoc.or.jp/index.html?vol=89&no=1/DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890121](https://seikagaku.jbsoc.or.jp/index.html?vol=89&no=1/DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2017.890121)
- ③ N. Komura*, K. G. N. Suzuki*, H. Ando* (*equal contribution), M. Konishi, M. Koikeda, A. Imamura, R. Chadda, T. K. Fujiwara, H. Tsuboi, R. Sheng, W. Cho, K. Furukawa, K. Furukawa, Y. Yamauchi, H. Ishida, A. Kusumi and M. Kiso. (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat. Chem. Biol.* 12: 402-410. (査読有) [https://www.nature.com/nchembio/journal/v12/n6/full/nchembio.2059.html/DOI: 10.1038/nchembio.2059](https://www.nature.com/nchembio/journal/v12/n6/full/nchembio.2059.html/DOI:10.1038/nchembio.2059)
- ④ T. K. Fujiwara, K. Iwasawa, Z. Kalay, T. A. Tsunoyama, Y. Watanabe, Y. M. Umemura, H. Murakoshi, K. G. N. Suzuki, Y. L. Nemoto, N. Morone, and A. Kusumi. (2016) Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane. (査読有) <http://www.molbiolcell.org/content/27/7/1101.long/DOI:10.1091/mbc.E15-04-0186>
- ⑤ K. G. N. Suzuki. (2016) Single-molecule imaging of signal transduction via GPI-anchored receptors. *Methods Mol. Biol.* 27: 1101-1119. (査読有)

[https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3170-5_19/DOI: 10.1007/978-1-4939-3170-5_19](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3170-5_19/DOI:10.1007/978-1-4939-3170-5_19)

- ⑥ K. G. N. Suzuki. (2015) New insights into the organization of plasma membrane and its role in signal transduction. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 317: 67-96. (査読有) [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644815000258/DOI: 10.1016/bs.ircmb.2015.02.004](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644815000258/DOI:10.1016/bs.ircmb.2015.02.004)

[学会発表] (計 29 件)

- ① 鈴木健一 (2017年3月) 1分子観察によるガングリオシドのクラスター形成機構とEGF受容体活性制御機構の解明 新学術領域「神経糖鎖生物学」最終班会議、名古屋 (招待講演)
- ② Y. Yano, S. Hanashima, T. Yasuda, H. Tsuchikawa, M. Murata, M. Kinoshita, N. Matsumori, K. G. N. Suzuki, S. J. Peter (2017年3月) Membrane behavior and sterol interactions of sphingomyelin antipode. The 97th Annual Meeting of Chemical Society of Japan, Yokohama (一般口頭発表)
- ③ 中野幹人、花島慎弥、原利明、村田道雄、樺山一哉、深瀬浩一、安藤弘宗、木曾真、鈴木健一 (2017年3月) 蛍光分光法を用いた生体モデル膜中におけるガングリオシドGM3とタンパク質EGFR膜貫通ドメインの相互作用解析 第97回日本化学会春季大会 横浜 (一般口頭発表)
- ④ 鈴木健一 (2017年1月) 高精度1分子観察で初めて明らかになった細胞膜構造とシグナル伝達機構 第3回医薬獣連携研究会プログラム、岐阜 (招待講演)
- ⑤ K. M. Hirose, B. Tang, N. Hiramoto-Yamaki, K. J. Yoshida, S. Nozaki, T. Tsunoyama, K. G. N. Suzuki, K. Nakayama, T. K. Fujiwara, A. Kusumi. (2016年11月) The immune signal adaptor molecule LAT works on cytoplasmic vesicles tethered to the plasma membrane: a single-molecule imaging study. 第54回日本生物物理学学会年会、つくば (ポスター)
- ⑥ T. Tsunoyama, K. G. N. Suzuki, T. K. Fujiwara, A. Kusumi. (2016年11月) Transient recruitment of focal adhesion molecules revealed by super-long single molecule tracking. 第54回日本生物物理学学会年会、つくば (ポスター)
- ⑦ M. Konishi, K. G. N. Suzuki, A. Imamura, H. Ando, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso. (2016年11月) Synthesis of fluorescent disialyl ganglioside probes useful for single molecule imaging. *Sialoglyco* 2016,

- Santa Barbara, USA (Poster)
- ⑧ N. Komura, K. G. N. Suzuki, H. Ando, A. Imamura, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso. (2016年11月) Ganglioside lipid raft interaction unveiled by novel ganglioside probes. Sialo Glyco 2016, Santa Barbara, USA (Poster)
- ⑨ 大野詩織、花島慎弥、土川博史、安田智一、村田道雄、木下祥尚、松森信明、安藤弘宗、木曾真、鈴木健一、楠見明弘、J. Peter Slotte (2016年11月) 重水素個体 NMR を用いた GM1 含有モデル膜における脂質分子の運動性解析 第6回 CSJ フェスタ 2016 東京 (一般口頭発表)
- ⑩ 中野幹人、花島慎弥、原利明、村田道雄、樺山一哉、安藤弘宗、木曾真、鈴木健一、楠見明弘 (2016年11月) 生体モデル膜中におけるガングリオシド GM3 とタンパク質 EGFR 膜貫通ドメインの相互作用解析 第6回 CSJ フェスタ 2016 東京 (一般口頭発表)
- ⑪ K. G. N. Suzuki (2016年10月) Regulation mechanisms of EGF receptor activity by gangliosides as revealed by single-molecule imaging. The 8th Asian Community for Glycoscience and Glycotechnology Annual Conference. Wuxi, China (招待講演)
- ⑫ 河村奈緒子、鈴木健一、安藤弘宗、小西美紅、今村彰宏、石田秀治、楠見明弘、木曾真 (2016年8月) ラフト分子の1分子イメージングに向けた蛍光ガングリオシドの開発 第35回日本糖質学会年会高知 (一般口頭発表)
- ⑬ 小西美紅、河村奈緒子、鈴木健一、今村彰宏、安藤弘宗、石田秀治、楠見明弘、木曾真 (2016年8月) 脂質ラフトの1分子イメージングに向けた b 系列ガングリオシドプローブの合成研究 第35回日本糖質学会年会 高知 (一般口頭発表)
- ⑭ 鈴木健一 (2016年7月) 1分子イメージングにより明らかになったガングリオシドの糖鎖相互作用による EGF 受容体活性制御機構 日本プロテオーム学会 2016年大会 東京 (招待講演)
- ⑮ N. Komura, K. G. N. Suzuki, H. Ando, M. Konishi, A. Imamura, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso. (2016年7月) Development of fluorescent ganglioside analogs for imaging of raft-based interactions. 2016 International Carbohydrate Symposium (ICS), New Orleans, USA (一般口頭発表)
- ⑯ K. G. N. Suzuki (2016年6月) Unraveling of raft organization and function by single-molecule imaging of new probes. The 21st iCeMS International Symposium. Kyoto (招待講演)
- ⑰ 高田美沙、花島慎弥、土川博史、安田智一、村田道雄、木下祥尚、松森信明、安藤弘宗、木曾真、鈴木健一、楠見明弘、J. Peter Slotte (2016年3月) ガングリオシド GM1 およびスフィンゴミエリン共存モデル膜における相分離の蛍光イメージング解明 日本化学会第96回春季年会 京田辺 (一般口頭発表)
- ⑱ 河村奈緒子、鈴木健一、安藤弘宗、今村彰宏、石田秀治、楠見明弘、木曾真 (2016年3月) 脂質ラフト機能解明に向けた光反応性ガングリオシドプローブの開発 日本農芸化学会 2016年度大会 札幌 (ポスター)
- ⑲ 山崎彩乃、河村奈緒子、鈴木健一、安藤弘宗、今村彰宏、石田秀治、楠見明弘、木曾真 (2016年3月) ラフトの1分子観察に向けた脂質および糖鎖変換型圭子 GM3 プローブの合成と機能評価 日本農芸化学会 2016年度大会 札幌 (ポスター)
- ⑳ 山口英利子、河村奈緒子、鈴木健一、安藤弘宗、今村彰宏、石田秀治、楠見明弘、木曾真 (2016年3月) 脂質ラフトの1分子観察に向けた蛍光ラクトシルセラミドの合成 日本農芸化学会 2016年度大会 札幌 (ポスター)
- ㉑ K. G. N. Suzuki (2016年1月) Raft organization and function revealed by single-molecule imaging of ganglioside probes. The 3rd International Symposium on Glyco-Neuroscience. Awaji (招待講演)
- ㉒ 鈴木健一 (2015年12月) ガングリオシド糖鎖相互作用が誘起するラフトの組織化と機能の1分子観察による解明 BMB2015 神戸 (招待講演)
- ㉓ A. Yamazaki, N. Komura, K. G. N. Suzuki, H. Ando, A. Imamura, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso. (2015年12月) Synthesis of fluorescent analogs of lipid-modified ganglioside GM3 for elucidating the function of ganglioside in the lipid raft. The 2105 International Chemical Congress of Pacific Basin Society (PAC CHEM). Honolulu, USA (Poster)
- ㉔ K. G. N. Suzuki (2015年11月) Unraveling raft organization and function by GPI-anchored receptors and gangliosides. Super-Resolution symposium. Bangalore, India (招待講演)
- ㉕ K. M. Hirose, K. J. Yoshida, S. Nozaki, T. Tsunoyama, K. G. N. Suzuki, K. Nakayama, T. K. Fjiwara, A. Kusumi. (2015年9月) New signal transduction mechanism mediated by plasmamembrane-tethered vesicles:

unraveling by single-molecule imaging.
第 53 回日本生物物理学会年会 金沢（一
般口頭発表）

26 K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura,
A. Yamazaki, H. Ishida, K. Furukawa,
K. Morigaki, A. Kusumi, M. Kiso. (2015
年 9 月)Unraveling of mechanisms of
ganglioside dimer formation as
revealed by single-molecule imaging.
第 53 回日本生物物理学会年会 金沢（ポ
スター）

27 T. Tsunoyama, J. Goto, K. G. N. Suzuki,
T. K. Fujiwara, A. Kusumi. (2015 年 9
月)Development of long-term
single-fluorescent-molecule tracking
revealed dynamic integrin
crossbridging for cell adhesion. 第 53 回
日本生物物理学会年会 金沢（一般口頭発
表）

28 山崎彩乃、河村奈緒子、鈴木健一、安藤
弘宗、今村彰宏、石田秀治、楠見明弘、
木曾真 (2015 年 7 月) 脂質ラフトの 1 分
子観察に向けた脂質変換型ガングリオシ
ド GM3 蛍光プローブの合成 第 34 回日
本糖質学会年会 東京（ポスター）

29 鈴木健一 (2015 年 5 月) 1 分子イメージ
ングにより明らかになったラフト組織化
と機能のための最初のステップ 日本顕
微鏡学会第 71 回学術講演会 京都（招
待講演）

〔図書〕（計 1 件）

- ① K. G. N. Suzuki. (2015)
Single-molecule imaging. In
“Glycoscience: Biology and Medicine”,
K. Kadomatsu Ed. Springer pp.
557-564.
- ② 安藤弘宗、鈴木健一、楠見明弘、木曾真
第 3 編 糖鎖の構造解析・プロファイリ
ング 第 8 章 1 分子観察用ガングリオ
シドプローブの開発と脂質ラフト研究へ
の応用「糖鎖の新機能開発・応用ハンド
ブック 創薬・医療から食品開発まで」、
津本浩平、加藤晃一、鷹羽武史、深瀬浩
一、古川鋼一編、(株) エヌ・ティー・エ
ス、東京、p277-279 (pp678)、2015

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木健一(SUZUKI, Kenichi)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
准教授

研究者番号：50423059

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

()