

平成22年5月31日現在

研究種目：特定領域研究  
研究期間：2005～2009  
課題番号：17081010  
研究課題名（和文） 1分子計測・操作による細胞膜ラフト分子複合体の形成と機能の解明  
研究課題名（英文） Single-molecule tracking study of the formation and functions of raft molecular complexes  
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）：

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ことが明らかになった。一方、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ふべき、小さく、寿命の短いラフト様構造を準備していることがわかった。

## 研究成果の概要（英文）：

Intracellular lipid-anchored signaling molecules,  $\text{G}\alpha\text{i}2$ , Lyn, and PLC $\gamma$ , were found to be transiently recruited to ligand-induced CD59-cluster rafts, leading to intracellular IP $_3$ -calcium signaling.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	4,800,000	0	4,800,000
2006年度	10,800,000	0	10,800,000
2007年度	9,300,000	0	9,300,000
2008年度	9,300,000	0	9,300,000
2009年度	9,300,000	0	9,300,000
総計	43,500,000	0	43,500,000

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項目以上、8個以内）：IgE-Fc受容体、可塑的ナノドメイン、細胞膜、1分子追跡・1分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

以前の「ラフト仮説」は、細胞膜上には「ラフト」という特殊な膜領域が存在し、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」というものであった。これは、全く間違っていると考え、本研究を開始した。

一方我々は、生きている細胞内で、細胞膜上でのシグナル伝達過程を1分子可視化することに成功しつつあった。すなわち、シグナル分子が活性化されたとき、下流のエフェクター分子、足場タンパク質やラフトとの相互作用の一部が1分子観察によって見えはじめた。

## 2. 研究の目的

本研究では、以上に述べたようなそれまでの研究をさらに発展させ、「ラフト分子複合体は可塑的で、状況に応じて違ったシグナル分子を集積して、経路間の切り替えやクロストークを起こす場として重要である」という作業仮説の成否を検討することを目的とした。特に、CD59などのGPI-アンカー型受容体を系として解明を進めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

我々が開発してきた1分子追跡法によって、本研究は初めて可能になったものであり、その方法を用いた。また、ラフト研究に合うように方法自体の開発も進展させた。その結果、ナノ-メゾサイズの分子集合体の形成と分解や、作動機構の研究に威力を発揮する1分子イメージング法が開発でき、これを駆使した。さらに、通常の可視化法、分子生物学的・細胞生物学的・免疫化学的方法を使った。

## 4. 研究成果

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ことが明らかになった。ラフト領域を作らせるというところで、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、シグナル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ふべき、小さく、寿命の短いラフト様構造を準備しているのだと考えられる。

具体的には、1分子観察法を用いて、「ラフト仮説」の実体を明らかにするような、以下の発見をした。

(1) グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型受容体がりガンド結合すると、おそらく、タンパク質部分の構造変化によって、会合が誘導される。

(2) この会合体部分に糖脂質とコレステロールが集まってきて、いわば、on-demand 形成されるラフト構造ができる。

(3) そこに、3量体 G タンパク質が細胞質から、Lyn が細胞膜の内側表面上での拡散によって、リクルートされてくる。この誘導ラフトサイズは 10nm と小さいので、Lyn はただちに G タンパク質のサブユニットである  $G\alpha$  によって活性化される。

(4) 活性化 Lyn は、やはりラフト相互作用に助けられてリクルートされていた未知の膜貫通型タンパク質 X をリン酸化する。

(5) リン酸化された X はアクチン線維に結合し、これによって CD59 会合体ラフトは拡散運動を停止する (STALL)。

(6) さらにリン酸化された X の別のリン酸化部位には、PLC $\gamma$  がリクルートされてくる。

(7) PLC $\gamma$  は PIP2 から IP3 を生成し、ER の IP3 チャネルを介してのカルシウムの放出が起こる。

これらはすべて、1分子追跡とシグナルのイメージングによってわかってきたものである。さらに、生理条件下で形成される小さな CD59 クラスタでは、分子のリクルートや会合体ラフトの拡散運動停止は、0.1-0.5 秒間程度の短時間しか起こらない。すなわち、全体としては 10 分間程度継続するようなシグナルも、1分子のレベルで見ると 0.1 秒というようなパルス的な現象であり、それらのパルスの重ね合わせとしてラフトシグナルができていたことがわかった。すなわち、デジタル方式・変形 FM 方式といってよいであろう。

これらは、電子回路で、トランジスタの増幅機構を用いたスイッチというアナロジーを考えるとよくわかる。制御回路に小さな電流（例えば 1mA）を流すと、普段は電流が流

れていない主回路に大きな電流（例えば 1A）が流れるようにするというような回路である。このとき、制御回路に小さなノイズが入ってもスイッチはオンにならないようにしておく必要がある。すなわち、スイッチ回路は、小さいシグナルを入れたときに、突然、大きな出力をオンにすること、さらに、閾値より小さなノイズが来ても、それに一々応答して大電流が流しては困るので、ノイズでは応答しないようにしておく必要がある。細胞膜でのシグナル変換は、実際には単純なスイッチ機能以上のことをしているが、スイッチという要素だけを見ても、上の電子回路と同じような要求をうまく満たしていること、その仕組み、などが本研究で明らかになってきたのである。

#### 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 2 2 件）

- ① Y. M. Umemura, M. Vrljic, S.Y. Nishimura, T.K. Fujiwara, K.G.N. Suzuki, and A. Kusumi, Both MHC class II and its GPI-anchored form undergo hop diffusion as observed by single-molecule tracking, *Biophysical Journal*, 査読有, Vol.95, 2008, 435-450
- ② K. G. N. Suzuki, T.K. Fujiwara, M. Edidin, and A. Kusumi, Dynamic recruitment of phospholipase C $\gamma$  at transiently immobilized GPI-anchored receptor clusters induces IP $_3$ -Ca $^{2+}$  signaling: single-molecule tracking study 2, *Journal of Cell Biology*, 査読有, Vol.177, 2007, 731-742
- ③ K. G. N. Suzuki, T. K. Fujiwara, F. Sanematsu, R. Iino, M. Edidin, and A. Kusumi, GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and Ga for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1, *Journal of Cell Biology*, 査読有, Vol.177, 2007, 717-730
- ④ N. Morone, T. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura, and A. Kusumi, Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography, *Journal of Cell Biology*, 査読有, Vol.174, 2006, 851-862

- ⑤ I. Koyama-Honda, K. Ritchie, T. Fujiwara, R. Iino, H. Murakoshi, R. S. Kasai, and A. Kusumi, Fluorescence imaging for monitoring the colocalization of two single molecules in living cells, *Biophysical Journal*, 査読有, Vol.88, 2005, 2126-2136

〔学会発表〕（計 7 7 件）

- ① 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)
- ② 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)
- ③ A. Kusumi, Single-molecule tracking of transient signal transduction complexes, Medical Sciences Congress, 2008年11月26日, クイーンズランド(ニュージーランド)
- ④ A. Kusumi, Single-molecule tracking in the living cell plasma membrane: compartments, nanodomains and signaling, Principles of Cell and Tissue Organization, 2008年11月10日, ドレスデン (ドイツ)
- ⑤ A. Kusumi, Single-molecule tracking reveals partitioning of the plasma membrane and signal transduction processes, The 3rd Asian and Pacific Rim Symposium on Photonics & Biophotonics, 2007年7月9日, ケアンズ (オーストラリア)
- ⑥ A. Kusumi, Single-molecule tracking reveals transient nature of molecular interactions in signal transduction, *Nature Chemical Biology*, The First Annual Symposium "The Chemical Biology of the Cell", 2006年11月11日, ボストン (アメリカ)
- ⑦ A. Kusumi, Ligand-induced stabilized raft as a signaling platform for Gpi-anchored receptors: A single-molecule tracking study, Keystone Symposia "Lymphocyte Activation and Signaling", 2006年1月

8 日, スチームボートスプリングス (アメリカ)

- ⑧ A. Kusumi, Single-molecule imaging of signal transduction in the plasma membrane of living cells, The 2005 Conference of the French Cell Biology Society (SBCF), 2005 年 11 月 7 日, パリ (フランス)

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 :