

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21387

研究課題名(和文) 形質膜内層の微小ドメイン動態：超解像顕微鏡法および1分子イメージングによる解明

研究課題名(英文) Microdomain dynamics in the inner leaflet of plasma membranes as revealed by super-resolution microscopy and single-molecule imaging

研究代表者

鈴木 健一 (Suzuki, Kenichi)

岐阜大学・高等研究院・教授

研究者番号：50423059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、1分子蛍光観察と高速超解像蛍光観察を組み合わせた高精度イメージング法により、細胞形質膜内層での脂質分子の分布とその変化、ラフト形成の有無、飽和脂肪酸修飾されたシグナル伝達分子の分布とその変化を明らかにし、膜内層の脂質によるシグナル伝達場形成などの膜動態を解明することである。観察の結果、形質膜内層の脂質は、小さなドメインを形成することを見出し、脂質の種類により共局在しやすさが異なることを見出した。また、信号伝達分子と脂質ドメインの共局在の程度を定量することにも成功した。本研究により、脂質ドメインによる信号伝達や制御機構を解明するための実験系を確立できたと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、1分子観察と超解像顕微鏡観察を同時に行い、細胞形質膜内層における脂質ドメイン形成の有無を検証し、脂質ドメイン同士の共局在の程度を定量した。結果、脂質の種類に応じて、共局在する程度が大きく異なることを発見した。また、信号分子と脂質ドメインの共局在の程度は、脂質の種類により大きく異なることも発見した。これらの研究成果は、今まで実態が明らかではなかった形質膜内層の脂質動態を解明するのに大いに貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to observe distribution of lipids and signaling molecules containing saturated fatty acid chains and raft formation in the inner leaflet of cell plasma membranes by single-fluorescent molecule imaging and super-resolution fluorescence microscopy, and to unravel the dynamic membrane mechanisms such as formation of signaling platform. As a result, I found that a variety of lipids in the inner leaflet formed tiny membrane domains and the degree of colocalization totally depended on lipid species. Furthermore, I developed a software to quantitatively determine the degree of colocalization between lipid domains and signaling molecules. I succeeded to develop experimental systems to unravel the mechanisms of signal transduction and regulation by lipid domains in cell plasma membranes.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：1分子観察 超解像顕微鏡観察 脂質ドメイン 信号伝達分子

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上の脂質の局在を調べる際には、常にアーチファクトのない条件下で観察を行う必要がある。しかし、最も強い固定条件、4%パラホルムアルデヒド+0.3%グルタルアルデヒドで細胞を固定しても、脂質分子の80%近くは、速く運動し続けることを我々は見出ししていた(Nat. Methods, 2010)。従って、細胞固定後に抗体を用いて蛍光染色する免疫染色法や、抗体や結合タンパク質で被覆した金コロイドが脂質に結合後、その金コロイドを観察する免疫電子顕微鏡法では、架橋後の脂質分子の分布を見ていることになる。さらに本研究で用いている超解像顕微鏡法にしても、細胞固定後、蛍光標識した脂質結合タンパク質の分布を観察し、1枚の超解像静止画を得るのが、一般的である。従って、ここでも化学固定による分子架橋の影響を受けた脂質分子の分布を見ているかもしれない。この技術的制約のために、形質膜内層の脂質分子、シグナル伝達分子の局在を調べる研究は、大変遅れていた。

一方、我々は、生細胞の形質膜上で2種分子が結合・解離する様子を1分子観察することに先駆けて成功し(2007年にJ. Cell Biol.に2報連報)、膜分子間の1分子FRETにより短寿命のホモダイマーやヘテロダイマー形成(Nat. Chem. Biol., 2012, Nat. Chem. Biol., 2016, J. Cell Biol. 2017, Nat. Commun., 2019)を検出することができていた。これにより生細胞膜上の分子間相互作用を手取るように調べることに成功していた。さらに最近では、顕微鏡装置や蛍光プローブを大きく改善し、高時空間分解能で3色同時1分子観察することにも成功していた。これにより、細胞膜構造を高速で超解像顕微鏡観察しながら、膜受容体1分子が膜構造物に出入りするかどうかをリアルタイムで調べられるようになった。本研究では、この高速超解像観察法+1分子観察法を駆使した。

また、最近でも、脂質結合特異性が低いタンパク質プローブを用いて実験を行い、結論を出している論文が頻繁に見られるが、本研究で用いた脂質結合タンパク質は、どれも細胞毒性が低く、かつ脂質結合特異性が高いものばかりであった。

2. 研究の目的

化学固定後の分子架橋の問題を解決するために、本研究では、生きている細胞の形質膜内層での脂質分子の分布とその変化、ラフト形成の有無、飽和脂肪酸修飾されたシグナル伝達分子の分布とその変化を明らかにし、膜内層の脂質による信号伝達場形成などの膜動態を解明することを目的としている。これにより、非常に基本的な知見にもかかわらず、その膜構造はおろか脂質組成すら曖昧であった形質膜内層やシグナル伝達場の研究を推進することを目指す。

3. 研究の方法

- (1) 様々な脂質結合タンパク質に mEos4b あるいは、Halo7-tag を融合させた分子をコードした cDNA を作成した。
- (2) CHO-K1 細胞に (1) で作成した様々な脂質結合タンパク質の2種類を同時に導入し、分子を発現させた。導入する cDNA の量の比を少しずつ変えて、発現量(見えている輝点の数)が同程度になるように調整した。
- (3) ガラスベースディッシュに細胞をまいた。

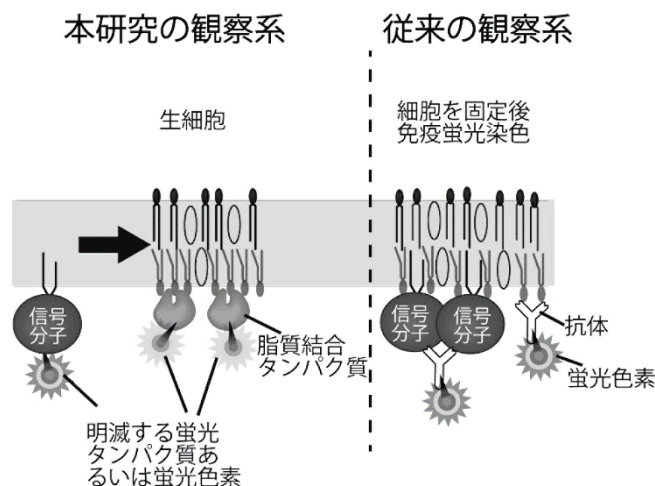


図1. 従来は、細胞固定後に観察するが多かったが、本研究では、生細胞中の脂質ドメインの動態を観察した。

- (4) 顕微鏡観察の前に、Halo7-tag 融合タンパク質を HM-SiR で標識した。
- (5) mEOS4b 融合タンパク質は、全反射照明下、405 nm のレーザーで活性化し、561 nm のレーザーで励起し、1 分子の輝点の明滅を高速観察した。一方、HM-SiR 標識したタンパク質は、全反射照明下、647 nm のレーザーで励起し、1 分子の輝点の明滅を高速観察した。(図 1)
- (6) 明滅する輝点の位置をトラッキングし、Fiji の plugin である Thunderstorm を用いて、超解像画像を得た。
- (7) 得られた超解像顕微鏡画像を連ね、動画を作成した。
- (8) 2 色の動画を位置補正して、重ね合わせた。
- (9) 重ね合わせた動画を解析するための Degree of Colocalization (DoC) 解析ソフトを作成した。
- (10) この解析ソフトを用いて、脂質ドメイン同士の共局在の程度を定量した。
- (11) また、細胞膜内層に局在して、脂肪酸修飾された様々な信号分子と脂質結合タンパク質の 2 色同時超解像顕微鏡観察も行い、同様の手法で共局在解析を行った。

4 . 研究成果

- (1) 全反射照明下、脂質結合タンパク質プローブの 1 分子の輝点は、細胞の下側の形質膜上で短時間、シグナル/ノイズ比が高い状態で観察できることを確認した。
- (2) 全反射照明下、見えている輝点は完全に形質膜上のものであるかどうかを検証するために、全反射照明下、ゴルジ体のマーカータンパク質の輝点をトラッキングして、超解像画像が作成できるかどうかを調べた。結果、輝点数が極めて少なく、見えているものは形質膜上の分子であることを確認できた。
- (3) また、脂質結合プローブの特異性を検証するために、脂質分解酵素で形質膜内層の脂質を分解後、プローブのリクルートを観察した。結果、脂質分解後には、プローブのリクルートは、著しく減少することを見出した。脂質結合プローブは確かに特異的に脂質に結合していた。
- (4) 何フレームの 1 分子観察で 1 枚の超解像画像を得るのが妥当かを検証するため、フレーム数を変化させて、得られる超解像顕微鏡画像中の脂質ドメインのサイズや密度を定量した。この実験の結果、十分なフレーム数を確定することができた。
- (5) 脂質ドメインサイズは、脂質の種類によってあまり違いはないことが明らかになった。
- (6) 共局在期間を定量するソフトウェアを現在開発中である。
- (7) 脂質ドメインはずっと形成されたままではなく、形成・消滅を繰り返していることが明らかになった。
- (8) 2 色同時で超解像顕微鏡観察して得られた脂質ドメイン同士の共局在を解析するソフトウェアを大変な労力をかけて開発したが、これを用いて上手く解析できることを確認した。
- (9) 脂質ドメイン同士の共局在の程度は、脂質の組み合わせによって全く異なっていることが明らかになった。
- (10) 共局在の程度を DoC 解析により定量し、DoC 値の 2 次元分布を色で示し、経時変化を追うことができるようにした。
- (11) 信号分子と脂質ドメインの 2 色同時超解像顕微鏡観察の結果、信号分子が局在する脂質ドメインは、細胞膜上の受容体を刺激前後で、大きく変化することを明らかにした。

今後は、脂質の脂肪酸組成を精密に制御した細胞を用いたり、様々な摂動をかけて、同様の実験を行っていく予定である。これらの実験によって、細胞膜内層における脂質ドメインが信号伝達のプラットフォームを形成するかどうかという、昔からある非常に根本的な問いを解明していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. L. Higashi, K. M. Hirose, K. G. N. Suzuki, K. Matsuura, M. Ikeda.	4. 巻 30
2. 論文標題 One-pot construction of microcomponent supramolecular materials comprising self-sorted supramolecular architectures of DNA and semi-artificial glycopeptides.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 9082-9092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.0c01316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 I. Koyama-Honda, T. K. Fujiwara, R. S. Kasai, K. G. N. Suzuki, E. Kajikawa, T. A. Tsunoyama, A. Kusumi.	4. 巻 219
2. 論文標題 High-speed single-molecule imaging reveals signal transduction by induced transbilayer raft phases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e202006125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202006125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M. Konishi, N. Komura, Y. Hirose, Y. Suganuma, H. N. Tanaka, A. Imamura, H. Ishida, K. G. N. Suzuki*, H. Ando*	4. 巻 85
2. 論文標題 Development of Fluorescent Ganglioside GD3 and GQ1b Analogs for Elucidation of Raft-Associated Interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 15998-16013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c01493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagai Rurika, Sugimachi Ayane, Tanimoto Yasushi, Suzuki Kenichi G. N., Hayashi Fumio, Weikert Dorothee, Gmeiner Peter, Kasai Rinshi S., Morigaki Kenichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Functional Reconstitution of Dopamine D2 Receptor into a Supported Model Membrane in a Nanometric Confinement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Biology	6. 最初と最後の頁 2100636-2100636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adbi.202100636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shintani Yuki、Ohtomi Taku、Shibata Aya、Kitamura Yoshiaki、Hirosawa Koichiro M.、Suzuki Kenichi G. N.、Ikeda Masato	4. 巻 28
2. 論文標題 Formation of Supramolecular Nanostructures through in Situ Self Assembly and Post Assembly Modification of a Biocatalytically Constructed Dipeptide Hydrazide**	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 e202104421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202104421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 エクソソーム膜動態の超解像・1分子可視化解析
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenichi G. N. Suzuki
2. 発表標題 Raft organization and function as revealed by single-molecule imaging
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysics of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuki Isogai, Koichiro M. Hirotsawa, Yasuhiko Kizuka, Yasunari Yokota, Kenichi G. N. Suzuki
2. 発表標題 Regulation of exosome function by glycans as revealed by single-molecule imaging
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 高精度1分子観察で明らかになったラフト組織化と機能
3. 学会等名 分子夾雑化学東海地区シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣澤幸一朗、磯貝樹、木塚康彦、横田康成、鈴木健一
2. 発表標題 生細胞での超解像・1分子可視化解析による標的細胞におけるエクソソーム取り込み機構の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯貝樹、廣澤幸一朗、木塚康彦、横田康成、鈴木健一
2. 発表標題 糖鎖による細胞外小胞の標的細胞への結合制御：1粒子解析法による解明
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第16回 「若手の力」フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 高精度1分子観察によるラフト組織化と機能の解明
3. 学会等名 生物工学・脂質駆動学術産業創生研究部会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣澤幸一朗、横田康成、鈴木健一
2. 発表標題 単粒子追跡法と超解像顕微鏡法を用いたエクソソーム粒子の標的細胞への取り込み機構の解明
3. 学会等名 令和2年度 日本生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯貝 樹、廣澤 幸一朗、木塚 康彦、横田 康成、鈴木 健一
2. 発表標題 細胞外小胞の標的細胞への結合制御：1粒子解析法による解明
3. 学会等名 令和2年度 日本生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森俊貴、廣澤幸一朗、田口友彦、横田康成、鈴木健一
2. 発表標題 リアルタイム超解像動画観察による形質膜内層脂質ドメインの共局在解析
3. 学会等名 令和2年度 日本生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 1粒子・超解像動画同時観察による細胞外小胞の動態解明
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣澤幸一朗、横田康成、鈴木健一
2. 発表標題 超解像・1分子可視化解析を用いた細胞外小胞の分類と生細胞での細胞外小胞の取り込み機構の解明
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯貝樹、廣澤幸一朗、正彩乃、木塚康彦、横田康成、鈴木健一
2. 発表標題 細胞外小胞の標的細胞への結合制御：1粒子解析法による解明
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuki Isogai, Koichiro M. Hirose, Ayano Sho, Yasuhiko Kizuka, Yasunari Yokota, Kenichi G. N. Suzuki
2. 発表標題 Mechanisms of selective binding of small extracellular vesicles to recipient cells as revealed by single-particle tracking
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koichiro M. Hirose, Yasunari Yokota, Kenichi G. N. Suzuki
2. 発表標題 Subtypes of small extracellular vesicles and their uptake routes as revealed by super-resolution microscopy and single-particle tracking
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenichi G. N. Suzuki
2. 発表標題 Mechanisms of homodimer formation of gangliosides as revealed by single-molecule imaging and simulation
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenichi G. N. Suzuki
2. 発表標題 Membrane dynamics of exosomes as revealed by single-molecule imaging
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木健一
2. 発表標題 ラボ訪問
3. 学会等名 第17回糖鎖科学中部拠点若手のカフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森俊貴、廣澤幸一朗、笠井倫志、田口友彦、横田康成、鈴木健一
2. 発表標題 超解像顕微鏡観察による細胞膜内層シグナリングプラットフォームの可視化解析
3. 学会等名 令和3年度生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川合登偉、笠井倫志、廣澤幸一朗、森俊貴、横田康成、鈴木健一
2. 発表標題 2色同時超解像顕微鏡観察によるGPIアンカー型タンパク質の階層構造と膜表裏カップリングの検証
3. 学会等名 令和3年度生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市川大悟、笠井倫志、廣澤幸一朗、横田康成、鈴木健一
2. 発表標題 GPCRの細胞膜内層脂質ドメインへの局在の超解像動画・1分子同時可視化解析
3. 学会等名 令和3年度生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木健一、廣澤幸一朗、磯貝樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 EVs 細胞外小胞の生物学 第4章3. 1分子・超解像イメージングによる細胞外小胞動態解明	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------