

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370055

研究課題名(和文)高精度1分子観察によるラフトシグナル機構の解明

研究課題名(英文)Unraveling of mechanisms of raft signaling as revealed by single-molecule imaging at high resolution

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、細胞膜上の「脂質ラフト」でのシグナル伝達とその制御機構を解明することである。そのため、代表的ラフトマーカーであるGPIアンカー型タンパク質や糖脂質(ガングリオシド)の1分子ずつの挙動を細胞膜上で追跡した。驚くべきことに、これらの分子はいずれもコレステロールにより安定化される短寿命のホモダイマーを形成していた。また、一般にヘテロダイマーは形成しにくく、タンパク質相互作用や糖鎖相互作用がホモダイマー形成を誘起することが示唆された。また、このホモダイマーは、さらに大きな会合体を形成するための基本ユニットであるという仮説を提案した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to unravel the regulation mechanisms of signal transduction in lipid rafts of cell plasma membranes. We tracked single molecules of representative raft molecules, GPI-anchored proteins and gangliosides in living cell membranes. Surprisingly, these raft markers formed transient homodimers which were stabilized by cholesterol. In general, the lifetime of the heterodimers were shorter than those of the homodimers. Our results suggest that these homodimers are induced by specific protein interactions or specific sugar-chain interactions. Based on these results, we proposed a hypothesis that these homodimers are basic units for creating greater raft domains.

研究分野：膜生物学

キーワード：細胞情報伝達機構 細胞膜ドメイン ラフト 1分子観察

1. 研究開始当初の背景

(1) ラフト領域は、細胞膜上のシグナル変換のためのプラットフォームと考えられている。しかし、実際ラフトの実体はほとんどわかっておらず、また、どのようにラフトが細胞膜上のシグナル変換に関与するのかも全くわかっていなかった。

(2) シグナル変換は生物学の最重要課題であり、ラフトの実体を知らずにこの課題を解決することは不可能である。ラフト研究は大論争の最中で混沌を極めており、その解決の遅れがシグナル変換の理解の主な妨げになっていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の作業仮説をもとにラフトシグナルを解明することである。

(1) シグナル伝達ラフト形成機構の作業仮説：シグナルが来る前の定常状態の細胞膜は準安定状態にあり、ラフトは小さく不安定であるが、リガンド刺激後には、大きな変化ができるように準備された状態にある。ラフト関与の受容体にリガンドが結合すると構造変化をして受容体が会合体を形成すると同時に、不安定ラフトも協同的に集まって会合体ラフトを作る。これがシグナル発生のプラットフォーム(シグナル伝達ラフト)となる。

(2) ラフトシグナル伝達の理解の鍵は以下の2点であるという作業仮説：

- ① アクチン骨格上にある多くのシグナル分子とラフトとの相互作用
- ② タンパク質相互作用+脂質相互作用

3. 研究の方法

(1) まず、定常状態でのラフト構造を探るために、代表的なラフト分子である GPI (グリコシルフォスファチジルイノシトール) アンカー型タンパク質の少量を(〜3000 分子/細胞) CHO-K1 細胞形質膜上に発現させて、tag を用いて高効率で蛍光ラベルした。

(2) もう一つの代表的なラフト分子である糖脂質(ガングリオシド) 蛍光プローブの少量を CHO-K1 細胞形質膜に導入した。

(3) 上のように細胞膜に導入した分子の1分子ずつを観察し、輝点同士が重なり分離する様子を観察し、ダイマー寿命を測定した。これを様々な条件下で検討し、ダイマー形成機構を調べた。

(4) GPI アンカー型タンパク質の一つである CD59 をリガンド刺激後、1分子観察し、CD59 会合体形成とシグナル伝達機構を調べた。

4. 研究成果

(1) 3種の GPI アンカー型タンパク質(CD59, DAF, Thy-1) が 150〜250 ミリ秒という短寿命のホモダイマーを形成することが明らか

になった。これは、1色での1分子観察のみならず、2色同時1分子観察、1分子蛍光共鳴エネルギー移動法、Bimolecular Fluorescence Complementation の1分子観察、クロスリンカーを用いた生化学実験など、多数の実験、観察により確かめられた。

(2) GPI アンカー型部分を非ラフトの貫通型タンパク質に置換したり、細胞膜からコレステロールを除去すると、ダイマー寿命は半分以下に短縮したが、コントロールのリン脂質分子よりは、まだダイマー寿命は長かった。これらの結果は、GPI アンカー型タンパク質のダイマー形成は、ラフト脂質相互作用により安定化されることを示唆している。

(3) GPI アンカー型タンパク質のタンパク質を様々なタンパク質で置換したところ、タンパク質部分の2量体形成能が高いほど、GPI アンカー型タンパク質のダイマー寿命は長く、タンパク質部分の2量体形成能がないと、GPI アンカー型タンパク質ダイマーも形成されないことが明らかとなった。従って、GPI アンカー型タンパク質のダイマー形成は、タンパク質相互作用により誘起されることが示唆された。

(4) 異種の GPI アンカー型タンパク質からなるヘテロダイマーは、ほとんど形成されなかった。タンパク質間の特異的相互作用がホモダイマーを誘起することがさらに裏付けられた。

(5) GPI アンカー型タンパク質密度が高くなるとホモダイマーのみならず、ホモオリゴマーの形成も観察されたが、その寿命は100ミリ秒程度と短かった。2種の異なる GPI アンカー型タンパク質のホモダイマー同士からなるヘテロオリゴマーは形成され、その寿命は100ミリ秒程度であった(図1)。

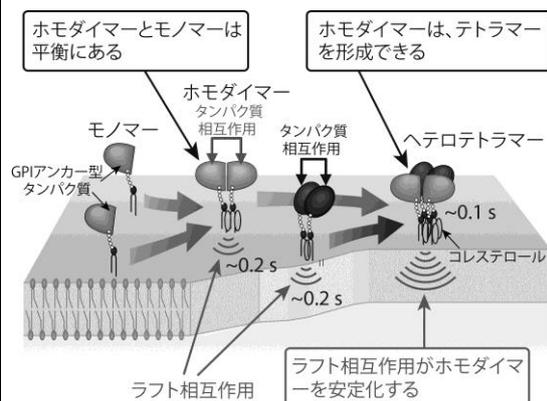


図1. GPI アンカー型タンパク質のホモダイマーとテトラマー。タンパク質間相互作用によるホモダイマーをラフト相互作用が安定化している。ホモダイマーから、テトラマーができる。

(6) GPI アンカー型タンパク質の一つ、補体制御タンパク質の CD59 をリガンド刺激後、CD59

は非常に安定な4量体を形成することが明らかとなった。この安定なホモテトラマー形成には、ラフト脂質相互作用が必須であり、細胞内カルシウム応答などの下流のシグナルを産生するためには、この安定なホモテトラマーが必須であることも明らかとなった。また、リガンド刺激前にCD59を抗体で架橋し、安定なダイマーを形成しておく、リガンド刺激後に飛躍的にカルシウム応答が高められていた。従って、定常状態で存在している短寿命のホモダイマーは、刺激が入ったときにできる安定化ホモテトラマーをより容易に形成させるための準備状態にあることが示唆された(論文8)。

(7)リガンド刺激後、CD59ホモテトラマー(会合体)は、平均0.6秒間ずつ一時停留を繰り返しながら、細胞膜上を拡散していた。ホモテトラマーが形成されないと、このような一時停留は見られず、シグナル伝達も観察されなかった。アクチン線維を破壊すると、一時停留が劇的に減少した。従って、以前の我々の結果と合わせて(Suzuki et al., JCB, 2007a, b)、ホモテトラマーは、アクチン線維上での一時停留時に、下流分子(Gai, Lyn, PLCγなど)へとシグナルを伝え、細胞質内のIP<sub>3</sub>濃度上昇後に、細胞内カルシウム応答を誘導することが示された。一時停留領域がシグナル伝達のためのプラットフォームとしてはたらくモデルを提案した(図2、論文2, 8)。

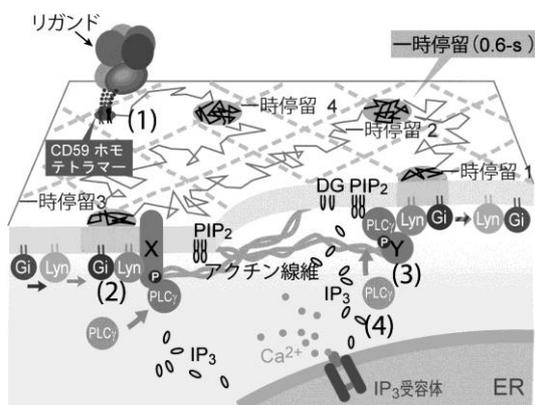


図2. リガンドにより GPI アンカー型タンパク質 CD59 を刺激すると、非常に安定なホモテトラマーが形成される。これが膜上を動き回り、一時停留時におシグナル伝達のプラットフォームとしてはたらく。

(8)もう一つの代表的ラフト分子である糖脂質(ガングリオシド)も、コレステロールにより安定化される短寿命のホモダイマーを形成した。ここでも特異的糖鎖相互作用がホモダイマー形成に必須で、ラフト脂質相互作用がホモダイマーを安定化していることが明らかとなった。糖脂質も密度が高くなると、より短寿命のホモオリゴマーを形成していた。

(9)GPI アンカー型タンパク質も糖脂質も、いずれも短寿命のホモダイマーを形成してい

るといふこれらの結果から、基本ユニットラフト仮説を提案した。ホモダイマーは、ラフトの基本ユニットで最小単位であり、これを元にさらに大きな会合体ラフトが形成されたり、刺激後にシグナル伝達のための安定なラフトが形成されるという仮説である。今後、この仮説を検証していきたい。

## 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13件)

- ① K. G. N. Suzuki. (2015) Single-molecule imaging of signal transduction via GPI-anchored receptors. *Methods in Mol. Biol.* in press (査読有)
- ② K. G. N. Suzuki. (2015) New insights into the organization of the plasma membrane and its role in signal transduction. *International Review for Cell Molecular Biology*, 317, 67-96. (査読有)  
DOI: 10.1016/bs.iremb.2015.02.004.
- ③ N. Hiramoto-Yamaki, K. A. K. Tanaka, K. G. N. Suzuki, K. M. Hirose, M. S. H. Miyahara, Z. Kalay, K. Tanaka, R. S. Kasai, A. Kusumi, and T. K. Fujiwara. (2014) Ultrafast diffusion of a fluorescent cholesterol analog in compartmentalized plasma membranes. *Traffic* 15: 583-612. (査読有)  
DOI: 10.1111/tra.12163.
- ④ 鈴木健一、楠見明弘 (2014) 「シグナル伝達におけるラフトの役割」分子消化器病 11(4): 63-69. (査読無)  
[http://www.sentan.com/cgi-bin/db\\_n.cgi?mode=view\\_backno&no=1098](http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=1098)
- ⑤ K. G. N. Suzuki, R. S. Kasai, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. (2013) Single molecule imaging of receptor-receptor interactions. *Methods in Cell Biol.* 117: 373-390. (査読有)  
DOI:10.1016/B978-0-12-408143-7.00020-7.
- ⑥ 鈴木健一、楠見明弘 (2013) 「新ラフト仮説:細胞膜ラフトによるシグナル伝達機構」生物物理 53(6): 295-300. (査読有)  
[http://www.biophys.jp/journal/journal\\_dl.php?fnm=53-6](http://www.biophys.jp/journal/journal_dl.php?fnm=53-6)
- ⑦ 鈴木健一 (2013) 「脂質ラフトを介したシグナル伝達」生化学 85(1):14-17. (査読有)  
<http://www.jbsoc.or.jp/old/event/magazine/pdf/85-01-07.pdf>
- ⑧ K. G. N. Suzuki, R. S. Kasai, K. M. Hirose, Y. L. Nemoto, M. Ishibashi, Y. Miwa, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. (2012) Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft

organization and function. *Nature Chem. Biol.* 8: 774-783. (査読有)

DOI: 10.1038/nchembio.1028.

- ⑨A. C. E. Shibata, T. K. Fujiwara, L. Chen, K. G. N. Suzuki, Y. Ishikawa, Y. L. Nemoto, Y. Miwa, Z. Kalay, R. Chadda, K. Naruse, and A. Kusumi. (2012) Archipelago architecture of the focal adhesion: Membrane molecules freely enter and exit from the focal adhesion zone. *Cytoskeleton* 69: 380-392. (査読有)

DOI: 10.1002/cm.21032.

- ⑩A. Kusumi, T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyama, R. S. Kasai, and K. G. N. Suzuki. (2012) Organization principles of the plasma membrane for signal transduction: molecular dynamics in the three-tiered hierarchical meso-scale domain architecture. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 28: 215-250. (査読有)

DOI:10.1146/annurev-cellbio-100809-151736.

- ⑪K. G. N. Suzuki (2012) Lipid rafts generate digital-like signal transduction in cell plasma membrane. *Biotechnol. J.* 7: 753-761. (査読有)

DOI: 10.1002/biot.201100360.

- ⑫A. Kusumi, T. K. Fujiwara, N. Morone, K. J. Yoshida, R. Chadda, M. Xie, R. S. Kasai, and K. G. N. Suzuki. (2012) Membrane mechanisms for signal transduction: The coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complex. *Sem. Cell Dev. Biol.* 23: 126-144. (査読有)

DOI: 10.1016/j.semdb.2012.01.018.

- ⑬楠見明弘、笠井倫志、吉田謙太、廣澤幸一朗、藤原敬宏、鈴木健一 (2012) 「シグナル伝達の1分子イメージング」実験医学 増刊 シグナル伝達研究最前線 (査読無)  
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758103213/>

[学会発表] (計 20 件)

- ①K. G. N. Suzuki (2015年3月) The very first steps for raft organization and function, revealed by single-molecule imaging of GPI-anchored proteins. The 15<sup>th</sup> International Membrane Research Forum. Kyoto, Japan (招待講演)

- ②K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, H. Ishida, K. Furukawa, A. Kusumi, M. Kiso (2014年11月) Single-molecule imaging of new ganglioside probes revealed the very first steps for raft organization and function. Glycobiology SFG & JSCR 2014. Honolulu, USA (ポスター発表)

- ③鈴木健一 (2014年10月) ガングリオシドの糖鎖間相互作用により誘起されるラフト構造と機能の解明 第87回日本生化学会大会シンポジウム、京都 (招待講演)

- ④鈴木健一 (2014年9月) Single-molecule tracking of GPI-anchored proteins and gangliosides revealed raft organization 第52回日本生物物理学会年会シンポジウム (講演+オーガナイザー)、札幌 (招待講演)

- ⑤鈴木健一 (2014年8月) ガングリオシド蛍光プローブの1分子追跡によるラフト構造と機能の解明 第33回日本糖質学会ワークショップ、名古屋 (招待講演)

- ⑥鈴木健一 (2014年6月) ガングリオシドプローブの1分子追跡によるラフト組織化と機能の解明 第66回日本細胞生物学会シンポジウム、奈良 (招待講演)

- ⑦K. G. N. Suzuki (2014年5月) The very fast steps for raft formation and function, revealed by single-molecule imaging. Bordeaux-Kyoto Symposium, Bordeaux, France (招待講演)

- ⑧K. G. N. Suzuki (2014年1月) The very first steps for raft formation and function, revealed by single-molecule imaging. Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, Ventura, USA (招待講演)

- ⑨K. G. N. Suzuki (2014年1月) The very fast steps for raft formation and function, revealed by single-molecule imaging of ganglioside probes. International Symposium of Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas, Awaji, Japan (招待講演)

- ⑩鈴木健一 (2013年11月) 糖鎖研究のための1分子イメージングの可能性と課題 平成25年度生理学研究所研究会、岡崎 (招待講演)

- ⑪鈴木健一、安藤弘宗、河村奈緒子、Rahul Chadda、石田秀治、木曾真、楠見明弘 (2013年10月) 新規ガングリオシドプローブの1分子追跡によるラフト組織化機能の解明 第51回日本生物物理学会年会、京都 (ポスター発表)

- ⑫N. Komura, K. G. N. Suzuki, H. Ando, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso (2013年10月) Development of a-series gangliosides probes for imaging of raft-associated signaling. The 5th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology. Khon Kaen, Thailand (ポスター発表)

- ⑬M. Konishi, K. G. N. Suzuki, A. Imamura, H. Ando, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso. (2013年10月) Synthesis and functional evaluation of fluorescent ganglioside GD1b useful for live imaging of cell membrane. The 5th Asian Communications

of Glycobiology and Glycotechnology. Khon Kaen, Thailand (ポスター発表)

- ⑭鈴木健一 (2013年9月) 1分子追跡による糖脂質ガングリオシドのEGF受容体活性制御機構の解明 包括脳夏のワークショップ 新学術3領域合同シンポジウム、名古屋 (招待講演)
- ⑮K. G. N. Suzuki (2013年9月) Dynamic organizing principles of cell plasma membranes that regulate signal transduction: single-molecule tracking studies. Kyoto University - Koc University Symposium on "New Frontiers in Health Sciences & Technologies". Kyoto, Japan. (招待講演)
- ⑯N. Komura, H. Ando, K. G. N. Suzuki, R. Chadda, H. Tsuboi, T. Ikeda, K. Tanaka, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso (2013年8月) Development of novel fluorescent glycolipid probe for single molecule imaging of mesoscale domain in living cell membrane. 15th Asian Chemical Congress. Singapore (招待講演)
- ⑰N. Komura, K. G. N. Suzuki, H. Ando, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso (2013年8月) Synthesis and evaluation of fluorescent gangliosides for the single molecule imaging of raft markers. The 32th Annual Meeting of Japanese Society of Carbohydrate Research. 大阪 (ポスター発表)
- ⑱K. G. N. Suzuki (2013年5月) Single-molecule imaging of receptor-receptor interaction in cell plasma membranes. The first University System of Taiwan-iCeMS Joint Symposium. Kyoto, Japan. (招待講演)
- ⑲K. G. N. Suzuki (2013年3月) Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. The 14th International Membrane Research Forum. Kyoto, Japan (招待講演)
- ⑳K. G. N. Suzuki, R. S. Kasai, K. M. Hirose, Y. L. Nemoto, M. Ishibashi, Y. Miwa, T. K. Fujiwara, A. Kusumi (2012年11月) Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function 第50回日本生物物理学会年会、京都 (一般口頭発表)

〔図書〕 (計2件)

- ①K. G. N. Suzuki. (2014) Single-molecule imaging. In "Glycoscience: Biology and medicine", K. Kadomatsu Ed. Springer pp. 557-564.
- ②鈴木健一 (2014) 化学フロンティア (23) 化学同人「1分子ナノバイオ科学の新パラダイム」第4部1分子からシステムへ第12章「膜タンパク質の動的相互作用による情

報処理戦略」

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 新規蛍光標識スフィンゴミエリン及びその利用

発明者: 村田道雄、松森信明、木下祥尚、楠見明弘、鈴木健一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2015-052518 号

出願年月日: 平成 27 年 3 月 16 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nig.icems.kyoto-u.ac.jp/>

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

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

安藤 弘宗 (ANDO Hiromune)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号: 20372518