

**(独) 科学技術振興機構
創造科学技術推進事業
追跡評価用資料**

**楠見膜組織能プロジェクト
(1998-2003)**

2010. 1. 29

目次

目次.....	1
概要.....	2
第1章 プロジェクトの概要.....	5
1.1 1 分子追跡法.....	5
1.2 細胞膜の拡散障壁.....	6
1.3 細胞膜が働く仕組み.....	8
第2章 プロジェクト終了から現在に至る状況.....	11
2.1 各研究テーマの現在の状況.....	11
2.1.1 1 分子追跡法.....	12
2.1.2 細胞膜の拡散障壁.....	14
2.1.3 細胞膜が働く仕組み.....	14
2.2 プロジェクトメンバーの活動状況.....	15
第3章 プロジェクト成果波及と展望.....	18
3.1 科学技術への波及.....	18
3.1.1 メゾ空間の研究.....	18
3.1.2 教科書への掲載.....	18
3.1.3 1 分子法による細胞研究の新潮流を主導.....	19
3.2 社会経済への波及.....	24
3.2.1 社会面.....	24
3.2.2 経済面.....	25
参考資料.....	26
A. 論文リスト.....	26
B. 特許リスト.....	26
C. 受賞リスト.....	26
D. プロジェクトメンバーの動静.....	26

概要

生物の細胞膜は液体状の 2 次元構造体であるが、この中での構造や膜タンパク質、脂質の運動や機能発現機構については殆ど知られていなかった。これまでの分子生物学や生化学的手法では、全体としての動きや平均値は分かるが、分子 1 つ 1 つがどのような動きをしているのか、何故そのような動きをしているのかは分からない。1980 年代半ばから、生きている細胞中の分子の動きや局在を 1 分子レベルで観察する手法が芽生え始めてきた。代表的な手法として、細胞膜中の膜タンパク質や脂質分子を金粒子（直径 20 nm~40 nm）で標識し、その運動を観察する SPT (*single particle tracking*) 法や、蛍光分子で標識する SFMT (*single fluorescent- molecule tracking*) 法がある。

本プロジェクトは、これらの手法を改良しながら、1 分子追跡法を駆使して、細胞膜内の微細構造及び細胞内への信号伝達の機構を明らかにすることを目指した。

上記の 1 分子解析法に関しては、高速カメラの開発、エバネッセント光を用いた全反射顕微鏡の使用、顕微鏡の照度やアームの適正化、実験の精度を高めることにより、信頼性の高いシステムを構築した。また、生細胞中で GFP (*Green fluorescent protein*: 緑色蛍光タンパク質) 1 分子を cDNA のレベルで標的タンパク質に結合させて、その挙動を観察することを可能にし、1 分子観察法に大きな進歩をもたらした。

細胞膜上での脂質の拡散速度が人工膜に比べて、5~100 倍遅いことは知られていたが、この理由は不明であった。細胞膜を構成する基本分子であるリン脂質の運動を 1 分子毎に観察することにより、細胞膜直下にある膜骨格に結合した膜タンパク質がピケットのように膜内に立ち並びコンパートメント化されていることを発見し、「アンカード膜タンパク質ピケットモデル」を提唱した。また、神経細胞の極性維持のための膜の仕切りにはピケットラインが密集していることが分かった。さらに、細胞膜上のシグナル伝達のメカニズムとして、タンパク質集合体による足場タンパク質および脂質間相互作用が関与する複合体であるラフトがプラットフォームになっていることを明らかにした。

プロジェクト終了後、プロジェクトの展開を目的として、幾つかの研究助成金を受けてきたが、特に 2005 年 3 月に発足した ICORP「膜機構プロジェクト」で、大きな展開が図られている。1 分子追跡法に関しては、時間分解能の大幅な改善が行われた。蛍光標識では従来の 30 倍の 0.1 ミリ秒を達成し、コンパートメント間のホップ拡散を見ることに成功した。金コロイド粒子を用いた時間分解能は従来の 5 倍の 6 マイクロ秒を達成している。また、多種分子同時 1 分子追跡法を開発し、分子間結合・解離の直接観察を可能にした。細胞内での分子間相互作用は非常にダイナミックで、常に、結合と解離を繰り返していることが分かった。

細胞膜の拡散障壁に関しては、電子線フリーズレプリカトモグラフィー法により、膜骨格の 3 次元可視化法を開発し、細胞膜内面は全面アクチン膜骨格で覆われており、膜

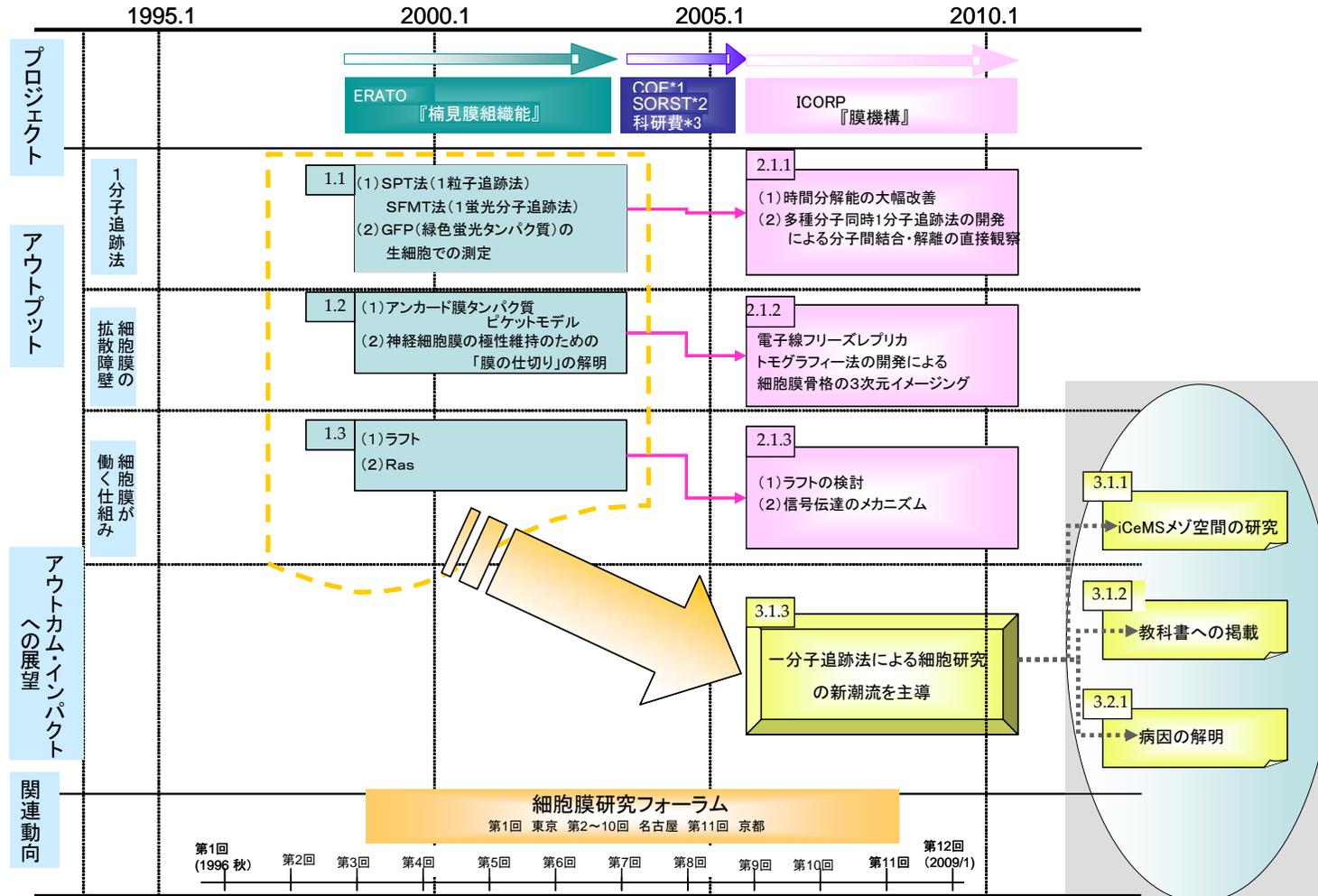
骨格により、細胞膜はコンパートメント化されていることを実証した。

信号伝達に関しては、ラフトの検討が進み、信号を加えた後でのラフトの存在を実証した。信号分子が伝達される時間は全体では数分続くが、1分子では0.2秒程度で、全体のシグナルは1分子毎のパルスシグナルが重なり合ったものと思われる。

プロジェクト成果の波及として、科学技術面では次の3つが挙げられる。まず、「文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム」の一環として、京都大学に物質-細胞融合システム (iCeMS) が設立された。当拠点は「メゾ空間」と「幹細胞」の2つを基本理念としている。次に、本プロジェクトで見出された3つの知見が、細胞分野で最も著名な教科書である"**Molecular Biology of THE CELL**" の第5版(2008)に掲載されており、研究成果が広く認知されたといえる。更に、本プロジェクトの先駆的研究が発足した1991年頃から出始めた1分子法による細胞膜の研究およびその後のラフトの研究論文が、本プロジェクトが終了した2003年頃から急増しており、一連の研究は1分子追跡法による細胞研究の新潮流を主導しているといえる。

狂牛病やプリオン病のようなタンパク質の変性による疾患は細胞膜上のラフト領域が関わっているという知見があり、今後検討すべき重要な課題であると思われる

プロジェクトの展開状況 (まとめ)



*1 一分子解析による細胞内シグナル伝達システムの作動原理の研究 (2002/4~2004/12)
*2 1分子観察/操作による細胞膜の動的情報交換システムの解明 (2003/10~2005/3)
*3 ① 基礎研究 (A)「1分子蛍光カメラの開発」 (2004年度~2006年度)
② 特定領域研究「1分子計測ラフトの研究」 (2005年度~2008年度)

図 プロジェクトの展開状況

第1章 プロジェクトの概要

はじめに

生物の細胞膜の分子を1個ずつ捕まえて、その動きを測定することにより、細胞膜の構造や働きを調べようという試みは1980年代半ばから開始されたが¹、系統的な研究は行われていなかった。楠見らは細胞膜中の種々のタンパク質の1分子の動きを、SPT法及びSFMT法で追跡し、タンパク質がコンパートメント間をホップしながら拡散するという、「膜骨格フェンスモデル」を1993年に発表した²。本プロジェクトでは、1分子測定技術を駆使して、細胞膜の構造や、働く仕組みについて、明らかにすることを目指した。

1.1 1分子追跡法

(1) 1分子追跡法の追究

1分子追跡法としては金コロイド粒子等で標識し、その運動を観察するSPT (*single particle tracking*)法と、蛍光標識した分子に励起光を当てて観察するSFMT (*single fluorescent-molecule tracking*)法の2つが知られていた。SPT法はS/Nや時間分解能が高く(25マイクロ秒)、測定可能時間も20分以上と長い、1分子に金コロイド粒子を結合するのがかなり困難であり、巨視的な拡散速度を測定するには適していない。一方、SFMT法は時間分解能が数ミリ秒と低く、測定可能時間も数秒程度と短い、1分子との結合が比較的容易で、広範囲を測定するのに適している。SPTとSFMTのデータを結びつけると極めて有効な結果が得られることを明らかにした。高速カメラの開発、エバネッセント光を用いた全反射蛍光顕微鏡の採用、顕微鏡の照度やアームの改良、ソフトウエアの開発を行い、信頼性の高い結果が得られるシステムを構築した。

(2) 生細胞のGFPによる観察

生きている細胞内での個々のGFP(緑色蛍光タンパク質)融合タンパク質の動きをビデオで撮影することに世界で初めて成功した³。GFPがくらげ以外の細胞(大腸菌や他の生物)で使えるようになったのは1994年になってからである⁴。1997年には*in vitro*

¹ De Brabander M *et al.*, *Cytobios*,43,273-283,1985

² Kusumi A *et al.*,*Biophys. J.*,65,2021-2040,1993

³ Iino R *et al.*,*Biophys.J.*,80,2667-2677,2001

⁴ Chalfie M *et al.*,*Science*,263,802-805,1994

で1分子の細胞に GFP を結合させる研究が3つの研究室から報告された⁵。しかし、生細胞中での GFP の1分子観察・追跡は、GFP の蛍光波長（～510 nm）付近で細胞の自家発光（背景光）が強いため無理であると云われていた。しかし、背景光は細胞の種類、培地、細胞活動により異なるため、条件の最適化を図り、エバネッセント光を励起光に用いて、細胞の1部を局所的に照明することで、背景光を低下させることによって、生細胞中での GFP の1分子追跡が可能となった。生細胞中での観察では、発現した GFP の密度が高すぎると個々の分子を識別できなくなるので、発現量の低い細胞をクローニングすることができるようにした。さらに、強制発現系では、過剰発現条件での実験が多いが、その条件では、細胞の状態が生理状態から著しく外れ、発現分子が、本来結合するところ以外に多数存在するという状況ができてしまい、その分子の通常の挙動が分からなくなる。そこで、発現量を出来る限り下げて、内在性の分子の発現量の数%以下にとどめる手法を取り入れた。これによって、生細胞中での意味ある分子挙動の観察法が確立できた。並進運動がそれほど速くない膜貫通型タンパク質である E-カドヘリンを最初の観察対象にしたことも生細胞中での1分子 GFP の追跡に成功したポイントであった。

1.2 細胞膜の拡散障壁

(1) アンカード膜タンパク質ピケットモデル

1972年に Singer と Nicolson が「生体膜の流動モザイクモデル」という論文を発表した⁶。細胞膜は流動性のある脂質2分子膜中に膜タンパク質がモザイク状に混在して浮いており、膜タンパク質は側方に自由に拡散運動しているというもので、現在でも、細胞膜の基本的な構造のモデルとして広く通用しているものである。一方、細胞膜中のリン脂質の典型的な分子として DOPE (*dioleoylphosphatidyl ethanolamine*) の拡散係数が測定されたが、その値は人工膜でのそれに比べて5~100倍遅いことが FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)法で観測された。その理由については、例えば、大きい塊の隙間を縫って動いているという「パーコレーションモデル」（飛び石モデル）等が提出されているが、これを確認できる技術はなかった。1993年に楠見、佐甲らは膜骨格の網目構造が膜タンパク質に対して「フェンス」のように働くことを見出し、「膜骨格フェンスモデル」を提唱した（図1）²。本プロジェクトでは、細胞膜を構成する基本分子であるリン脂質の運動を1分子毎に観察することにより、細胞膜直

⁵ Iwane A H *et al.*, FEBS Lett., 407, 235-238, 1997

Yu XC, EMBO J., 16, 5455-5463, 1997

Chishima T *et al.*, In Vitro Cell Dev Biol Anim, 33, 745-747, 1997

⁶ Singer S J *et al.*, Science, 175, 720-731, 1972

下にある膜骨格に結合した膜タンパク質がピケラインのように膜内に立ち並ぶため、液体の細胞膜中に仕切りができ、膜がコンパートメント化されることを発見し、「アンカード膜タンパク質ピケットモデル」を提唱した⁷ (図 2)。細胞としてはラットの繊維芽細胞を対象としている。この場合には平均 230 nm のコンパートメントが、更に大きな平均 750 nm のコンパートメントに囲まれていることが分かった。膜分子は小さなコンパートメント内を 11 ミリ秒 程度拡散し、隣の小さなコンパートメントに飛び込むことを平均 30 回位繰り返してから、障壁を飛び越えて、隣の大きなコンパートメントに移動していくことが分かった。その後 8 種の細胞について検討し、全ての細胞膜に 30~230 nm のコンパートメントが存在することを見出した⁸。脂質分子 1 個を、生きている細胞の上で高速で追跡できる技術を開発し、脂質が閉じ込められているという概念を提出したことがブレークスルーとなり、大きな反響があった。

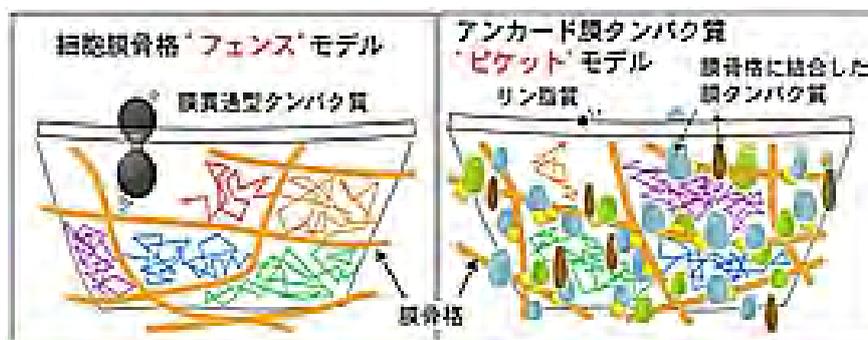


図 1 膜骨格フェンスモデル⁹ 図 2 アンカード膜タンパク質ピケットモデル⁹

(2) 会合によるホップ運動の阻害

GFP 融合 E-カドヘリンの 1 分子実時間観測により、その 1 部が会合体を形成し、ホップ運動が阻害されて、運動性が著しく低下することが分かった。この効果を "*Oligomerization-induced trapping model*" と名付けている³。

(3) 神経細胞膜の極性維持のための「膜の仕切り」の解明

神経細胞は他の神経細胞から来た電気信号を受け取り演算する樹状突起と細胞体部分および出力を行う軸索部分からなる。細胞膜中で膜を構成しているタンパク質やリン

⁷ Fujiwara T *et al.*, *J. Cell Biol.*, 157, 1071-1082, 2002

⁸ Murase K *et al.*, *Biophys. J.*, 86, 4075-4093, 2004

⁹ 再生医科学研究所附属ナノ再生医工学研究センター ナノバイオプロセス領域 HP

(http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1523/)

脂質が混じり合わない理由は解明されていなかった。2つの領域とその境界のイニシャルセグメント (IS) という部分での運動を 1 分子毎に追跡し、IS に仕切りができることが明らかになった。この仕切りは膜骨格に多数の膜共通型タンパク質分子が結合して立ち並びピケラインを形成することによって作られること、神経細胞の発達に伴ってピケラインが IS に密集することが分かった¹⁰。

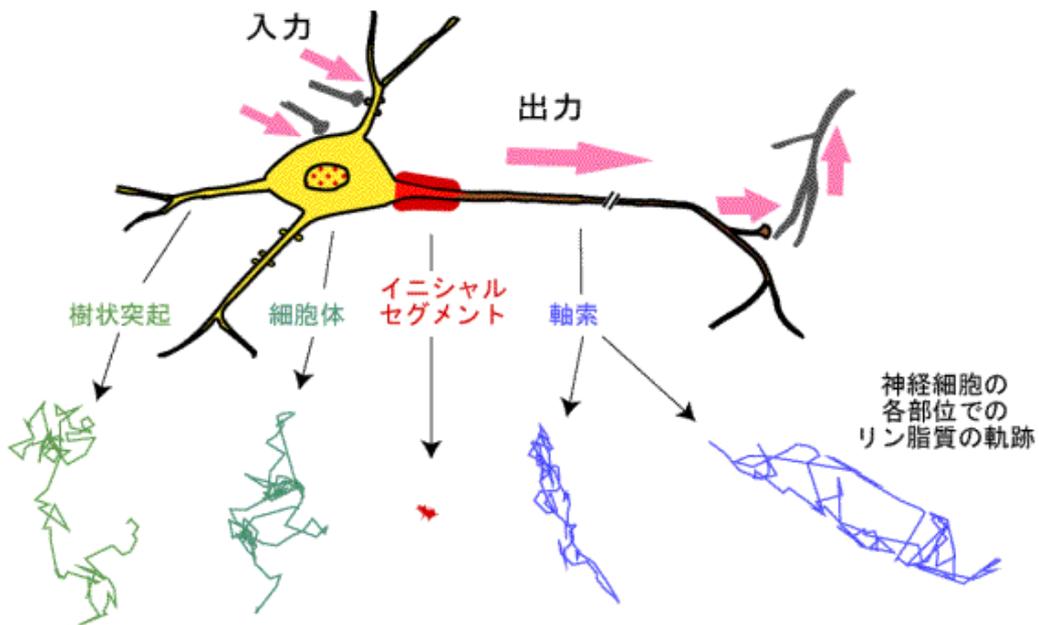


図 3 神経細胞の模式図¹¹

1.3 細胞膜が働く仕組み

細胞膜は細胞を外界から物理的に保護しているのみならず、情報、エネルギー、物質等をやりとりしている。細胞膜は生体分子のナノメゾサイズの集合体（ドメイン）が集積したシステムと言ってよいが、システムの動的構造や、どのように働くかという仕組みはほとんど分かっていない。ドメインには脂質ラフトが関与するシグナルタンパク質—脂質ラフト複合体と足場タンパク質群が作るシグナル伝達タンパク質複合体があり、検討結果下記のことが分かった。

¹⁰ Nakada C *et al.*, Nature, Cell Biol., 5, 626-632, 2003

¹¹ ERATO 終了報告書(www.jst.go.jp/erato/project/kmn_P/kmn_P/03.html)

(1) ラフト

ラフトは細胞膜上の情報伝達のプラットフォームで、信号伝達に関するタンパク質が濃縮されているのではないかという仮説（ラフト仮説）がある。

ラフトの構造は仮説的に図4に示すようなものであると考えられている。膜の外層には GPI (*glycosyl-phosphatidylinositol*) アンカー型タンパク質、スフィンゴ糖脂質、コレステロールなどが、内層には Src family kinase (SFK) や $G\alpha i$ 、H-Ras などの G タンパク質等、飽和脂肪酸修飾を受けたシグナル分子が濃縮されている。生化学的にラフト分子に分類される CD59 も、非ラフト分子である DOPE も 1 分子法で観察すると、拡散速度もホップ拡散も同じであることが分かった。この結果からラフトの大きさは非常に小さく数 nm 以下で、かつまたはラフトの寿命が非常に短いので、この隙間を通り抜けていく。つまり、ラフトは極めて小さいか、不安定であることが示された。細胞内にシグナルを加えたときのラフトの挙動については ERATO の期間内から引き続き実験を行い、研究結果は ERATO 終了 4 年後に発表されているので、第 2 章 2.1.3 (1) に記す。

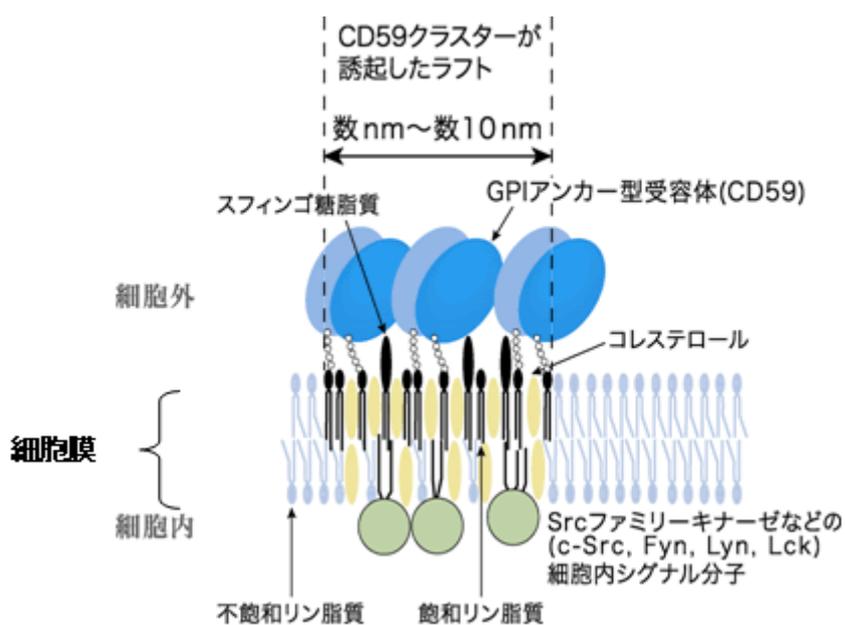


図 4 ラフトの模式図¹²

(2) Ras

1 分子 FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) 法を用いて、生細胞中で、癌遺伝子産物である低分子量 G タンパク質 Ras の運動と活性化を 1 分子毎に可視化することに成功した。不活性型の H-Ras 分子は細胞膜上で速い拡散運動をしているが、活

¹² JST プレスリリース(2007/5/21) 『シグナル伝達をする瞬間の細胞膜ラフトが見えた!』

(<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20070521/zu2.html>)

活性化したときには非常に短時間（0.67 秒以下）1 時停留することが分かった（多数分子で見ると数分間続いているように見える）。活性化した Ras 分子は足場タンパク質などと相互作用して複合体を形成し、下流にシグナルを流した後、直ちに複合体は分解していることが示唆された。1 分子イメージング解析により、Ras 分子の活性化は極めて厳密に制御されていることが明らかになった¹³。

¹³ Murakoshi H *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 7317-7322, 2004

第2章 プロジェクト終了から現在に至る状況

2.1 各研究テーマの現在の状況

研究助成金

プロジェクト終了後、プロジェクトの研究成果の展開を目的として獲得した研究助成金を表にまとめ、概略を記した。

研究助成金の種類	研究テーマ	研究の成果または進展	研究期間
21世紀 COEプログラム	1分子解析による細胞内シグナル伝達システムの作動原理の研究	細胞外からの刺激に対して、細胞内のシグナル分子、特に、キナーゼ類が、刺激部位に集合する仕組み、特に、ラフトを利用する仕組みを明らかにすることを目的として研究を進めた。	2002/4~2004/12
戦略的創造 研究推進事業 発展研究 (SORST)	1分子観察/操作による細胞膜の動的情報変換システムの解明	ERATOで行なった細胞膜における細胞膜分子の組織化機構の研究のうち、特に、細胞膜におけるシグナル変換にかかわる短寿命の動的な分子集合体を取りあげ、それらの形成機構と作動機構の研究を継続した。	2003/10~2005/3
科研費補助 金 基礎研究 (A)	1分子蛍光観察用の究極感度カメラ開発による細胞膜ナノドメインの機能の解明	ERATOで行なった生細胞の細胞膜における1分子追跡から、新たな超高感度カメラの開発の技術的可能性と、それが実現すると、細胞膜研究が大いに進むことが分かってきた。それを具体化し、実現することを目的として、本研究資金を獲得した。光シグナルを読み出すのに、通常の CCD ではなく、	2004~2006年度

		CMOS を用い、任意の部分画像を高速で読み出せるようにした。	
科研費補助金 特定領域研究	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	ERATO での研究によって、細胞外からのシグナルが細胞膜に到達した後の、細胞膜ラフトドメインの安定化の機構が見えてきた。さらに、通常のラフト型受容体ではなく、膜貫通型受容体にもラフトドメインを利用してシグナル変換を行う物があることが分かってきた。	2005～2008 年度
国際共同研究 (ICORP) 日本側 研究総括 ; 楠見明弘 インド側 研究総括 ; Satyajit Mayor	膜機構プロジェクト (1分子観察及び追跡技術ならびに FRET 法により、細胞膜の働きや膜を動かせる機構を明らかにする)	ERATO で行ってきた 1 分子観察と操作の技術、それらの解析のための理論的枠組みをさらに大きく展開し、また、ERATO で分かってきた細胞膜における細胞膜分子の組織化機構に基づいて、それらが膜機能の発現を起こす機構を明らかにすることを目的としている。インド側研究者の Satyajit Mayor 教授は、特に、ラフトドメインの動的構造に興味を持っており、蛍光寿命イメージング・蛍光相関分光法など、楠見らの 1 分子追跡と相補的な技術の開発が可能であり、この方面での協力が極めて有用であるため、国際共同研究を進めている。	2005/3～2010/3

2.1.1 1 分子追跡法

(1) 時間分解能の大幅改善

膜分子のホップ拡散の観察には金コロイド粒子を用いた SPT 法で行っていたが、金コロイド粒子が大きいこと (直径 40 nm) による立体障害、標的分子のクロスリンク、

粘弾性の効果が原因ではないかという根強い批判があった。そこで、蛍光標識での時間分解能を向上させる検討を行い、CMOS センサーを中心にした高感度カメラを開発し、時間分解能 0.1 ミリ秒、位置決め精度 60 nm を達成した。このシステムでヒト T24 細胞中の Cy3-DOPE の 1 分子運動を追跡した。結果は金コロイド粒子で測定したときと同様、120 nm コンパートメント間の 12 ミリ秒に 1 回のホップ拡散を検出することに成功した。金コロイド粒子の時間分解能は 6 マイクロ秒を達成した。

(2) 多種分子同時 1 分子追跡法の開発による分子間結合・解離の直接観察

生きている細胞の細胞膜中で、GPI アンカー型受容体とさまざまなシグナル伝達分子を、複数種同時に 1 分子追跡する方法を開発した。これによって、複数の分子の動きや、集合を直接観察することが可能となり、シグナル伝達の仕組みの解明につなげることができるようになった。

細胞のシグナルは 2 種以上の信号分子の結合や相互作用によって伝達される。これまでの多くの研究では、通常の蛍光顕微鏡による 2 色同時観察等が用いられてきたが、相互作用の詳細は不明であった。楠見グループでは、2 種類の蛍光分子を同時に 1 分子追跡し、それらが共局在しているかどうかを光学顕微鏡の精度内で判定する方法を開発した¹⁴。この方法は、生きている細胞中で複数の種類の生体分子が働く仕組みを調べるために大変有用であると思われる。

実際には 2 種類の分子を異なる励起・発光波長の蛍光色素で標識して同時に励起し、別々に 2 種類の蛍光を検出するための設備を開発した。カドフェリンに GFP(緑色)を結合した Ecad-GFP と、抗体を通して Alexa633(赤色)を結合した Alexa- α Ecad-Fab の共存について、GFP 励起用の Ar レーザー (488nm) と、Alexa633 励起用の He-Ne レーザー(594nm)光を同時に全反射照明し、GFP と Alexa633 の蛍光シグナルをダイクロミックミラーで底面と側面ポートに分離することによって測定した。各ポートの画像を増倍し、2 台の同期カメラで読み出す方法をとっている。画像の位置のずれや回転、それぞれのポートの光学系やカメラの補正が重要で、独特の手法を開発し、13 nm の解像精度を得ている。

ラフトの検討についても、それぞれの分子を標識し同時測定することにより、CD59 のクラスターの生成、Lyn のリクルート、STALL(Stimulation-induced Temporary Arrest of Lateral diffusion)の生成への Lyn の関与等が明確に観察できる。

細胞内での分子間相互作用は非常にダイナミックで、常に、結合と解離を繰り返していることが明白に分かる。

¹⁴ Koyama-Honda I *et al.*, Biophys.J.,88,2126-2136,2005

2.1.2 細胞膜の拡散障壁

(電子線フリーズレプリカトモグラフィ法の開発による細胞膜骨格の3次元イメージング)

細胞膜の内側表面を 0.5 nm 程度の分解能で、3 次元的に定量的に再構成する方法を開発した。細胞膜は、全面にわたって、アクチン繊維のメッシュワークで覆われていることを示し、さらに、通常の内側表面にはそれに平行に多数のアクチン繊維が結合していることが分かった¹⁵。これらの観察は、細胞膜と細胞骨格の研究者に大きな衝撃を与えたのみならず、方法論を開発した点で高い評価を得ている。

2.1.3 細胞膜が働く仕組み

(1) ラフトの検討

SORST 及び ICORP でラフトを中心に研究を続行している。1997 年に Kai Simons が Nature に、ラフトに関する総説を発表した¹⁶。この総説は、調査時点 (2008 年 11 月) までに 4000 件に近い累積被引用があり、細胞膜の研究ではラフトが注目されつつあることが分かる。人工膜では脂質の相分離を AFM (*atomic force microscope*) で測定するとドメインが見えてくる。通常の細胞膜では見えないので、ラフトの存在の有無について論争が続いている。ラフトは「レニンジャーの生化学」という教科書にも 3 ページ位、大きく載っているが、古いイメージの記述に留まっている。楠見グループは 1 分子の技術で解決したいと、プロジェクト終了後も研究を続けている。ラフトを 1 分子法で研究した論文も 2000 年頃から出始めているが、他所の技術レベルが必ずしも高くない、例えば 2000 年に発表された Schutz の論文は 280 件も引用されているが、楠見グループは実験を追試して、実験内容は正しくないと考えている。

GPI アンカー型受容体であり、自己補体による攻撃から細胞を守るシグナル経路で働いている補体成分のリガンド (C8) や、過剰の CD59IgG 抗体を結合した金コロイド粒子を加えると、CD59 がクロスリンクして会合体を作り、金コロイド粒子の下に、抗体と接触しない他のラフト分子がやってきて、ラフト様ドメインを作ることができる。金コロイド粒子を細胞に加えると、細胞内 Ca や Src キナーゼの 1 種である Lyn の活性化が見られた。こういった方法で細胞内に信号が誘起される。金コロイド粒子の運動はクロスリンクをかけると遅くなり、一時停留 (STALL) が起こる。薬剤処理をしてコレステロール、アクチンを除去し、Src の活性化を止めると一時停止が無くなり、細胞の Ca も信号伝達も停止するので、ラフトを介して、信号伝達が起こっているのではないかと考えた。細胞は Ca リリースと同時に IP₃(Ca を誘起する分子)を生成するが、PLC

¹⁵ Morone N *et al.*, J. Cell Biol. 174, 851-862, 2006

¹⁶ Simons K *et al.*, Nature, 387, 569-572, 1997

γ が膜上で働く必要がある。IP₃ の産生と一時停止は平行なので、IP₃ は一時停止の中で産生される。PLC γ と一時停止の関係を調べれば明らかになる。タンパク質 1 分子と金コロイド粒子の挙動を同時に見る必要があるが、本実験は楠見研究室でないと実現できない。CD59 が結合した金コロイド粒子が止まると、PLC γ が集まって来るとというのが測定できた。ラフトがアクチンと相互作用しているところが一時停止であると考えている。これらの実験は ERATO から ICORP に引き継いで行い、2007 年に発表した¹⁷。

(2) 信号伝達メカニズム

信号分子が CD59 にリクルートされている時間は 0.2 秒しかない。これを全体でみると十数分は続く。1 分子で測定した場合でもリクルートの時間は数分は続くと考えていたが、予期に反し、0.2 秒しかなかったので、全体のシグナルは 1 分子毎のパルスシグナルが重なり合わさったものと考えられる。パルスの頻度を変えると全体の頻度を変えることができる。「量子化シグナルシステム」の仮説と呼んでいる。新しいコンセプトであり、更に検証の実験を行う予定である。

2.2 プロジェクトメンバーの活動状況

(詳細は参考資料D参照)

プロジェクトメンバーは、総勢 21 名であるが、短期の研究者たちも多く、プロジェクト期間の半分以上在籍した研究者は半数の 10 名である。研究者たちは、高度な 1 分子技術および分子を直接観察する手法を身に付け、プロジェクト終了後、大学または研究機関に適職（教授 1 名、准教授 1 名、助教 3 名、研究室長 1 名、主任研究員 1 名を輩出している）を得て、大型プロジェクトに従事しており、プロジェクトは人材育成上大きな役割を果たしたといえる。主要研究者の活躍状況は次にまとめた。

(1) 飯野 亮太

生きている細胞内での個々の GFP 融合タンパク質の動きをビデオで撮影することに成功した飯野氏は本プロジェクトに 2002 年 3 月まで従事した後、2002 年 6 月からは ERATO 「吉田 ATP システムプロジェクト」に移り、2005 年 6 月からは大阪大学産業科学研究所助手（2007 年 4 月からは助教）として研究を続けている。研究の基本は 1 分子計測で、本プロジェクトの経験を生かして、細胞（バクテリア）の中で働いている世界最小のモータータンパク質である ATP 合成酵素について研究している。

¹⁷ Suzuki K *et al.*, *J. Cell Biol.*, 177, 717-730, 731-742, 2007

(2) 諸根 信弘

電子線フリーズレプリカトモグラフィー法により、細胞膜の内側表面の可視化に成功した諸根氏は、本プロジェクト終了後、三菱生命科学研究所で、現在は国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部神経形態研究室長として研究を行っている。2007年度厚生労働省科学研究費補助金「創薬基盤構造研究事業（ナノメディシン研究）」に採択され、「神経変性タンパク質の細胞局所場における動態・フィブリル化のイメージングに基づく効率的な医薬品評価系の開発」というテーマの下に研究を行っている。

(3) 鈴木 健一

米国留学中から本プロジェクト期間中および終了後も、一貫してラフトの生成、信号伝達の機構を研究している鈴木氏は2008年10月に「さきがけ」の研究者として選任され、研究領域「生命システムの動作原理と基盤技術」の研究課題「1分子追跡によるラフト量子化信号システムの解明」（2008年10月～2011年9月）で、研究を展開している。

細胞膜上でのシグナル伝達には、ラフトのようなナノドメインに分子を可塑的に集める機構が重要であることが明らかになりつつあり、1分子観察法により、ラフトのシグナル変換機構の解明を目指している。また、数十分続くラフト上の信号が1分子毎の0.1秒間隔のパルスの積算として起こるといふ仮説の正否も明らかにし、新たな説を確立させることが期待されている。

(4) 藤原 敬宏

「アンカー膜タンパク質ピケットモデル」を提唱した藤原氏は、ERATO、SORST、およびICORPと、一貫して1分子測定法の技術レベルの向上に努め、蛍光色素で30倍、金コロイド粒子で5倍の時間分解能を達成したが、更にその極限を目指している。一分子追跡法による細胞研究の新潮流の主導の中心的研究者としての活躍が期待される。

(5) Ritchie, Kenneth P.

Ritchie氏は、現在、Purdue大学、物理学科の准教授（テニユア付き）として活躍している。本プロジェクトでは「膜骨格フェンスモデル」「アンカー膜タンパク質ピケットモデル」のシミュレーションなどを担当した。これらの研究をさらに発展させ、大腸菌の二重膜（外膜と内膜）の分子組織化の解明、様々な遺伝病の赤血球膜骨格異常の病態と診断を膜タンパク質の1分子追跡によっておこなう方法の開発などの研究に従事し、大きな成果を挙げている。

(6) Marriott, Gerard

Marriott 氏は、現在、California 大学 Berkeley 校の正教授に着任したところである。本プロジェクトに参加した期間は 5 ヶ月と短いですが、そこで、「1 蛍光分子追跡法」の技術を学び、その経験も生かして、様々な蛍光プローブの開発と、新しい蛍光イメージング法の開発を行なっている。一方、同氏が本プロジェクト在籍中に改良し、プロジェクト内で広めた技術としては、細胞から精製したタンパク質を蛍光標識し、生細胞内に顕微注入して挙動を観察する方法がある。これは、以後の本プロジェクトの研究で様々な展開応用され、本プロジェクトの出身者達によって、様々な研究に応用されている。また、蛍光標識した「アンカード膜タンパク質ピケットモデル」のシミュレーションなども担当した。

第3章 プロジェクト成果波及と展望

3.1 科学技術への波及

3.1.1 メゾ空間の研究

細胞膜の 1 分子測定技術はメゾ空間の研究のために活用されることになった。2007 年 10 月に、「文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム」の一環として、京都大学に「物質—細胞融合システム拠点 (iCeMS) が設立された (拠点長 ; 京都大学再生医科学研究所・所長 (教授) 中辻憲夫)。当拠点は「メゾ空間」と「幹細胞」を 2 つの基本概念として構想された。「メゾ空間」とは 10~100 ナノメートルの空間である。多くの調節性のある細胞機能は、個々の分子の単なる衝突によって果たされるものではなく、例えば遺伝子の転写 (DNA を鋳型とした mRNA の合成) やシグナル伝達のように、10~100 ナノメートルというサイズの大きな分子複合体が担っていることが多い。当拠点では、細胞科学・化学・物理学・材料科学の全ての分野で重要な課題になりつつある、メゾ空間での重要な (弱い協同性を持つ) 分子間相互作用の普遍的原理の理解を、学際的協力によって推進すること、さらにメゾ空間レベルで物質を制御するための全く新しい技術の確立を目指している。

3.1.2 教科書への掲載

細胞分野で最も著名な教科書である "Molecular Biology of THE CELL" の第 5 版 (*Garland Science, a member of the Taylor & Francis Group, 2008*) に、プロジェクトの成果が 3 件引用されている。

(1) 細胞膜のフェンスモデル

第 10 章 Membrane Structure の [Fig.10-42 Corraling of membrane proteins by cortical cytoskeletal filaments] (Kusumi A. *et al.*, 2005 : 表 1 No.2 の論文) に掲載されている。

(2) 膜タンパク質に関して

第 10 章 Membrane Structure の参考文献として [神経細胞の仕切りの解明] に関する論文は引用されている (Nakada T. *et al.*, 2003 : 表 1 No.9 の論文)。

(3) Ras 分子活性化の 1 分子イメージング

第 15 章 Mechanism of cell communication の [Fig.15-59 Transient activation

of Ras revealed by single-molecule fluorescence resonance energy transfer (FRET)] (Murakoshi H. *et al.*,2004:表 1 No6 の論文) に掲載されている。

3.1.3 1 分子法による細胞研究の新潮流を主導

(1) 細胞研究への影響

生きている細胞内で個々の分子を直接観察できるようになったことで、分子生物学、生化学的手法で研究してきた研究者が、「*live cell imaging*」を始めるようになってきた。後述のように、1 分子法による細胞膜やラフトの研究の論文が急増している。他研究室との共同研究や技術の伝承を積極的に行っており、例えば 2 年前にはシカゴ大学の教授と博士研究員が半年位滞在し、昨年は英国の博士研究員が 4,5 ヶ月滞在して、何れも 1 分子測定法の技術を習得して帰国した。現在はインドと ICORP 国際共同研究を行っており、インドの研究者が滞在している。

(2) 代表的論文と被引用件数の年次推移

[H. Kusumi & membrane] をキーワードとして、Web of Science を検索した被引用論文件数のトップ 10 を表 1 に示し、1998 年から 2009 年まで論文毎の被引用件数の推移と累積推移を図 5 に示した。総括研究者が選んだ主要論文 6 報もこの中に含まれている。

表 1 被引用トップ 10 の論文リスト(以下文献について被引用件数年次推移を検索)

No.	書誌事項
1	<u>Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, Kusumi A</u> Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane J Cell Biol, 157, 1071-1082, 2002
2	<u>Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T</u> Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: High-speed single-molecule tracking of membrane molecules Annu Rev Biophys Biomol Struct, 34, 351-378, 2005
3	<u>Dietrich, C; Yang, B; Fujiwara, T; Kusumi, A; Jacobson, K</u> Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking Biophys J.,82, 274-284,2002
4	<u>Kusumi, A; Koyama-Honda, I; Suzuki, K</u>

	<p>Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts</p> <p>Traffic, 5, 213-230,2004</p>
5	<p><u>Murase K, Fujiwara T, Umemura Y, Suzuki K, Iino R, Yamashita H, Saito M, Murakoshi H, Ritchie K, Kusumi A</u></p> <p>Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques</p> <p>Biophys J, 86, 4075-4093, 2004</p>
6	<p><u>Murakoshi H, Iino R, Kobayashi T, Fujiwara T, Ohshima C, Yoshimura A, Kusumi A</u></p> <p>Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells</p> <p>Proc Nat Acad Sci Usa, 101, 7317-7322, 2004</p>
7	<p><u>Sako, Y; Nagafuchi, A; Tsukita, S; Takeichi, M; Kusumi, A</u></p> <p>Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: Corraling and tethering by the membrane skeleton</p> <p>J. Cell Biol.,140,1227-1240,1998</p>
8	<p><u>Pasenkiewicz-Gierula, M; Rog, T; Kitamura, K; Kusumi, A</u></p> <p>Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer polar region: A molecular simulation study</p> <p>Biophysic. J.,78,1376-1389,2000</p>
9	<p><u>Nakada C, Ritchie K, Oba Y, Nakamura M, Hotta Y, Iino R, Kasai RS, Yamaguchi K, Fujiwara T, Kusumi A</u></p> <p>Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization</p> <p>Nat Cell Biol, 5, 626-632, 2003</p>
10	<p><u>Iino R, Koyama I, Kusumi A</u></p> <p>Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface</p> <p>Biophys J, 80, 2667-2677, 2001</p>

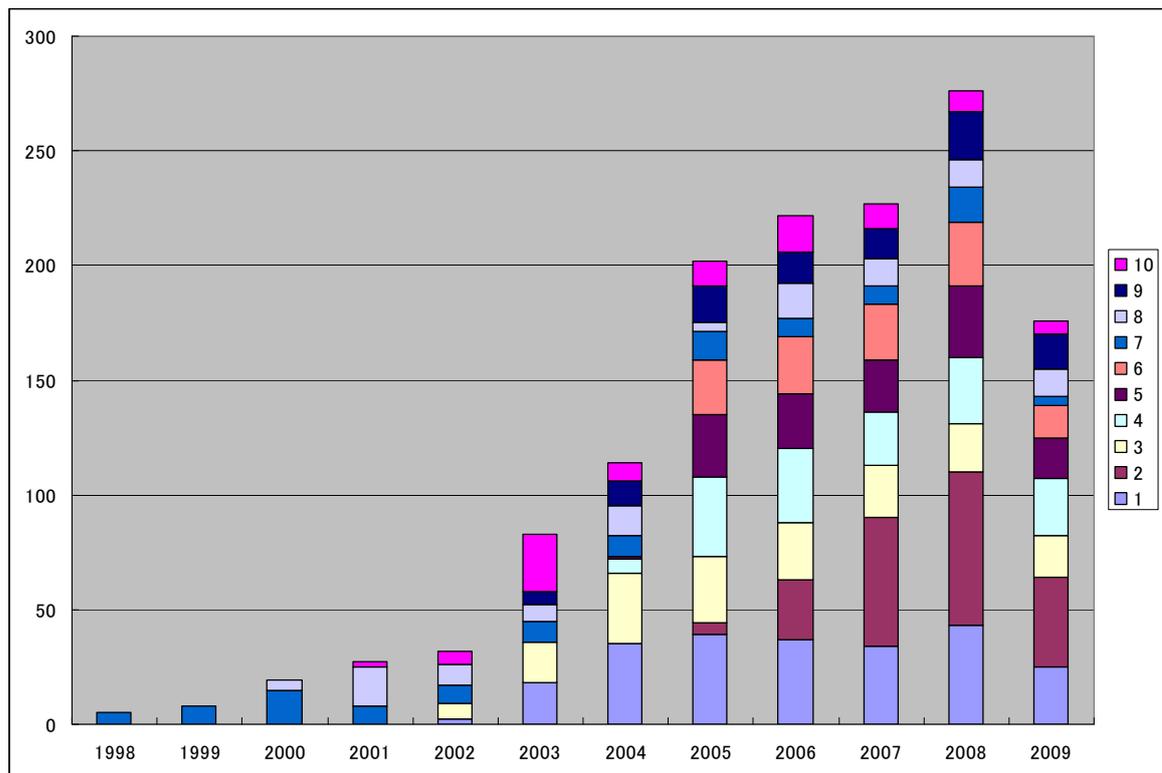


図5 被引用件数（累積） 2009/11/10 現在

（縦軸は被引用件数を横軸は年を表し、表1の論文に対応した番号を色分けして、論文毎の被引用件数を示した。）

図5から明らかなように、累計の被引用件数は本プロジェクトの終了する2003年より、急速に伸び、2005年には200件を超えて、増加傾向にある。特に被引用件数トップのNo.1の論文は細胞膜内がコンパートメント化されているという「アンカー膜タンパク質ピケットモデル」で、2003年から調査時点まで、毎年30-40件とコンスタントに引用されている。No.2の論文は1分子法での細胞膜の研究成果のレビューであるが、2005年の発表以来、増加傾向にある。No.4の論文はラフトの動き、No.5の論文は8種類の細胞膜でのコンパートメントの存在、No.6の論文は細胞膜中のRas複合体の研究で、いずれも2004年の発表以来、コンスタントに引用されている。また、No.9は神経細胞膜の仕切り、No.10の論文は生きている細胞内での個々のGFP融合タンパク質の動きを初めて可視化した論文であるが、被引用件数は毎年10-20件と多くはないが息の長い論文である。因みにNo.2、No.6およびNo.9の論文は3. 1. 2項の教科書への掲載にも取り上げられた論文である。これらの論文は、いずれも1分子追跡法により、細胞膜の微細構造や働きを明らかにしたもので、画期的な研究成果であり、プロジェクト終了後にこの研究は広く引用され、プロジェクトが新たな研究の潮流を主導したことを示唆している。

(3) キーワード検索の結果

本プロジェクトの研究の中心は1分子法による細胞膜の研究であるので、先ずキーワードとして、(*"single molecule(s)" or "single particle(s)" and ("cell"or"plasma") and membrane*)を選び、表2に示したキーワードの組合せで、該当論文数をWeb of Scienceで検索した。表3には著者と論文数を図6には総論分数と補見記載の論文数の年次推移を示した。

表2 キーワード検索(1)

①	TS= <i>single SAME molecule</i>
②	TS= <i>single SAME molecules</i>
③	TS= <i>single SAME particle</i>
④	TS= <i>single SAME particles</i>
⑤	TS= <i>cell SAME membrane</i>
⑥	TS= <i>cell SAME membranes</i>
⑦	TS= <i>plasma SAME membrane</i>
⑧	TS= <i>plasma SAME membranes</i>

式 (① OR ②) OR (③ OR ④) AND ((⑤ OR ⑥) OR (⑦ OR ⑧))

表3 キーワード検索した著者別の論文数の分析

Author	論文数
Kusumi A	38
Fujiwara T	18
Schutz GJ	18
Ritchie K	16
Choquet D	13

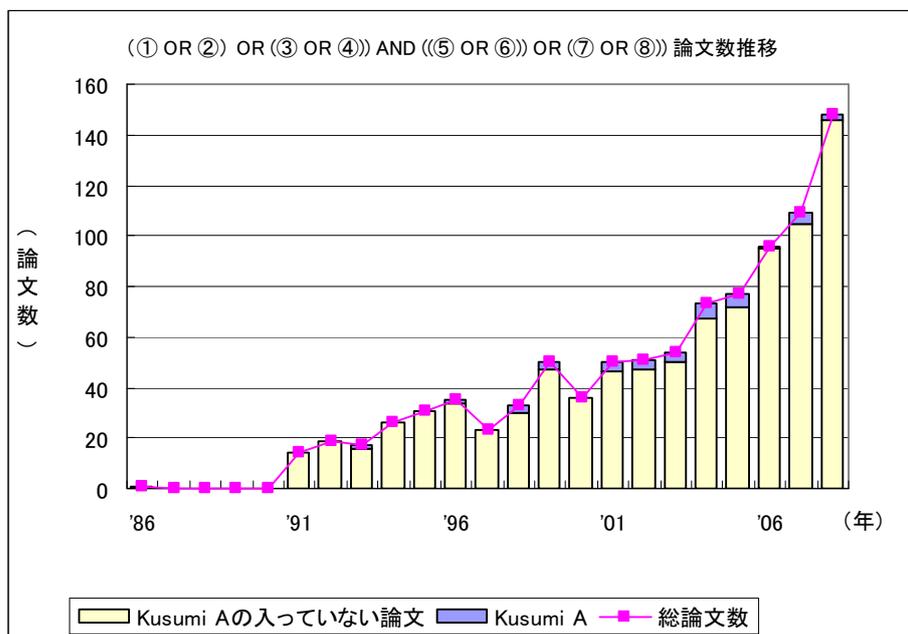


図 5 キーワード検索 2008/12/15 検索

表 3 から細胞膜の 1 分子法による研究の論文数は楠見グループが 38 報と最も多く、また、図 6 から本プロジェクトの先駆的研究が開始された 1991 年頃から論文が出始め、本プロジェクトが終了した 2003 年頃から急増していることが分かる。楠見グループの研究がこの分野の研究を牽引して、広範囲に研究を発展させていることが示唆される。

さらに、本プロジェクトの中心的課題である 1 分子法によるラフトの研究について次のキーワードで検索した。("single molecule(s)" or "single particle(s)") and "raft(s)" の組合せを表 4 に記した。

表 5 には著者と論文数を図 7 には総論文数と楠見記載の論文数の年次推移を示した。

表 4 キーワード検索(2)

①	TS= <i>single SAME molecule</i>
②	TS= <i>single SAME molecules</i>
③	TS= <i>single SAME particle</i>
④	TS= <i>single SAME particles</i>
⑤	TS= <i>raft</i>
⑥	TS= <i>rafts</i>

式 ((① OR ②) OR (③ OR ④)) AND (⑤ OR ⑥)

表 5 キーワード検索した著者別の論文数の分析

Author	論文数
--------	-----

Kusumi A	13
Fujiwara T	10
Hancock JF	7
Jacobson K	6
Suzuki K	6

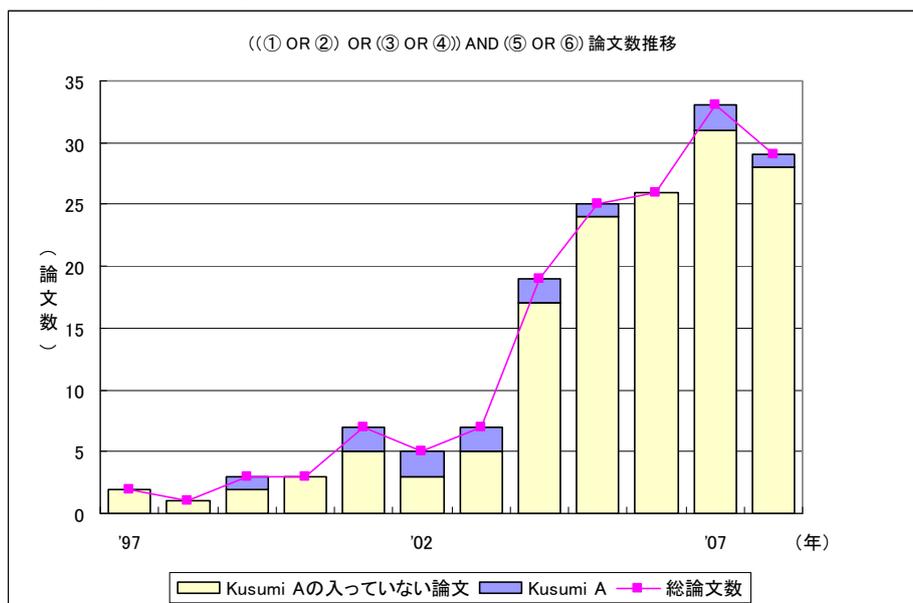


図 6 キーワード検索 2009/1/15 検索

1 分子法によるラフトの研究の論文数も楠見グループが最多で、プロジェクトが終了した 2003 年頃から急増しており、楠見グループの研究が牽引しながら他のグループでも研究が活発化している様子が窺える。

3.2 社会経済への波及

3.2.1 社会面

(1) 病因の解明

狂牛病、プリオン病、アルツハイマー、HIV 等タンパク質の変性による病気は、細胞膜上のラフト領域が関わっているという知見が増えつつある。即ち、細胞膜上での「特定タンパク質会合体が誘導するラフト領域」という概念はこれらの病気の発病過程を明らかにする上で極めて重要である。これらの病気に関与するタンパク質の会合とラフト誘導との関係を理解すること、タンパク質集合の阻害法などの開発が、今後の重要な課題となるであろう。

(2) 新薬の開発

薬剤は細胞膜を通じて作用するものが多い。細胞膜に存在するタンパク質や脂質の形態や性質の解明が進めば、新薬開発のスクリーニング技術の大幅な底上げにつながることを期待される。

(3) マスコミへの発表

プロジェクト発足以降、細胞膜の構造及びラフトに関する研究内容が一般紙に 13 回に涉って掲載されている。また、2007 年 5 月 22 日の日経バイオテクノロジーオンラインジャーナルに取り上げられ、最多のアクセスを得た。一般の人が文化的に面白い、豊かになると思ってもらえるのが、優れた社会貢献と思われる。

3.2.2 経済面

(1) 仕切りが入って拡散を制御する概念

ナノパターニング、ナノファブ리케이션という技術が進んできて、細胞膜の仕切りのようなものを基板上に作り、違う種類の分子を流して、分子の分離（ふるい）として使えるのではないかという論文もある。製品化は未だだが、概念として有用と考えている。

(2) ナノマシン、人工細胞

ナノスケールの微小なナノマシンや人工細胞を設計する上では、熱運動をいかに制御し、いかに利用するかが重要な課題である。生物がこの研究で見出されたようなコンパートメント構造を利用して、膜に存在する分子の運動や局在を制御している方法の解明が進むことで、ナノスケールの分子部品群を制御してナノマシン、人工細胞を組み上げる技術確立に向けた重要な指針となるであろう。

参考資料

- A. 論文リスト
- B. 特許リスト
- C. 受賞リスト
- D. プロジェクトメンバーの動静