

楠見膜組織能プロジェクトの研究成果

目次

1. 新たな細胞膜組織化機構 (アンカード膜タンパク質の「ピケット効果」)の発見	2
2. 1分子光ピンセット顕微鏡による 細胞膜ピケットフェンスの直接的可視化	4
3. 神経細胞膜の極性維持のための「膜の仕切り」の解明	6
4. 生細胞内での GFP の 1 蛍光分子ビデオイメージングを世界で初めて実現	8
5. 生細胞での Ras 分子活性化の 1 分子イメージング	10
6. 細胞膜ドメイン／ラフトの構造と機能の解明	12

1. 新たな細胞膜組織化機構（アンカー膜タンパク質の「ピケット効果」）の発見

膜骨格の網目構造は、膜タンパク質に対して「フェンス」のように働く。そのフェンスに加えて、膜骨格に沿って立ち並んだ膜貫通型タンパク質が、立体障害と流体力学的な摩擦効果によって、膜分子の拡散に対する障壁として働いていることを見出した。膜骨格のフェンスとそのピケットが、膜分子の動的組織化に重要な役割を果たしている。

研究成果の概要

本研究では、細胞膜を作る基本分子であるリン脂質の運動を、1分子毎に、ナノメートルレベルの空間精度で、しかも、1秒間に4万コマという世界最高速での光学顕微鏡像として撮影することに世界で初めて成功し、これによって、細胞膜は、すべての分子に対して、直径30-200ナノメートルの微細なコンパートメントに仕切られていること、しかもリン脂質はコンパートメント間を2-20ミリ秒に1回の頻度で飛び移る（ホップする）ことによって長距離の移動をおこなうことをつきとめた（図1-1）。さらに、細胞膜直下にある膜骨格という構造に結合した多数の膜タンパク質が、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も発見した（図1-2）。これらのピケラインの制御によって、受容体などの膜分子を集合させたり、それらの運動を抑制したりするらしい。それでも細胞膜が働くためには、分子のカオス的な熱運動（ブラウン運動）は不可欠である。そこに仕切りによる制御がはいる、ランダムさと秩序の両方が膜に組み込まれて、両者がうまくバランスして膜の働きと調節をおこなっているという描像も見えてきた。

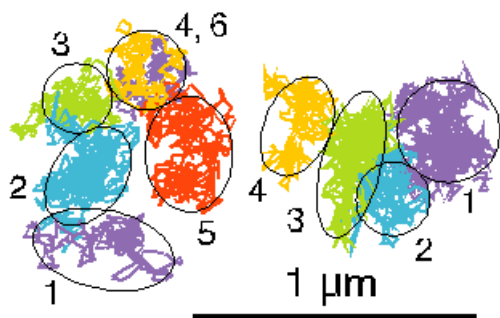


図 1-1 時間分解能 25 マイクロ秒でみた、リン脂質の典型的な軌跡。56 ミリ秒間の軌跡を示す。滞在したコンパートメントの順に番号で示す。

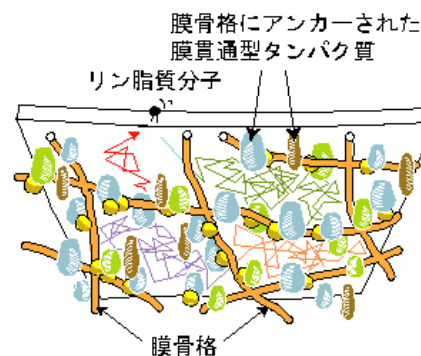


図 1-2 アンカー膜タンパク質ピケットモデル。

将来への展望・応用の可能性

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。

特許出願

なし

論文・報告書他

- 1) Fujiwara, T.; Ritchie, K.; Murakoshi, H.; Jacobson, K.; Kusumi, A. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J. Cell Biol.* 157, 1071-1082 (2002).
- 2) 藤原敬宏; Ritchie, K.; 鈴木健一. "細胞膜上での1分子観察と操作: 細胞膜上のコンパートメントやドメインの構造と機能を調べる." *細胞工学*. 20, 697-703 (2001).
- 3) 藤原敬宏. "1分子のリン脂質の運動をも抑制する細胞膜中の仕切り." 実験医学別冊「バイオイメージングでここまで理解る」楠見明弘、小林 剛、吉村昭彦、徳永万喜洋編. 羊土社 (2002), 61-66.
- 4) Ritchie, K; Iino, R; Fujiwara, T.; Murase, K.; Kusumi, A. The Fence and Picket Structure of the Plasma Membrane of Live Cells as Revealed by Single Molecule Techniques. *Mol. Membrane Biol.* 20, 13-18 (2002).

2. 1分子光ピンセット顕微鏡による細胞膜ピケットフェンスの直接的可視化

1分子の膜タンパク質をプローブとして膜内を動かし、その分子が受ける力を画像化するという分子間力顕微鏡を開発した。これにより、細胞膜ピケットフェンスの可視化に成功した。

研究成果の概要

細胞膜上の膜貫通型タンパク質は小さなコンパートメント間をホップ拡散することが明らかになってきた。コンパートメント間の拡散障壁の形成には、膜骨格が重要な役割を果たしている。本研究では、このような拡散障壁の膜上での分布と時間変化を可視化する方法を開発した。すなわち、膜貫通型タンパク質の CD44 に抗体を介して金コロイドを結合させ、ホップ拡散をおこなっている CD44 を光ピンセットでトラップして、細胞膜上の矩形領域を2次元走査した(図2-1)。トラップの中心からのプローブのずれを測定することにより、CD44 が細胞膜から受けた力を求めた。すなわち、膜タンパク質1~数分子をプローブとし、光ピンセットをカンチレバーとする走査型力顕微鏡によるイメージング法である。分子をプローブとすること、バネ定数が小さいこと(5 pN/ μm)が特徴である。走査の結果、膜骨格のメッシュワークと考えられる拡散障壁が可視化された(図2-2)。メッシュサイズは約0.5-1 μm 、障壁を乗り越えるのに必要な力は約1 pNであった。

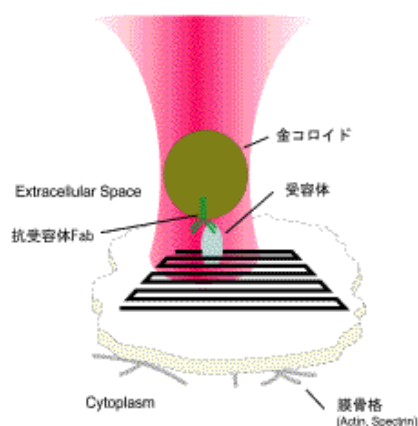


図 2-1 細胞膜上の受容体 1 分子を光ピンセットで走査して、膜骨格フェンス構造を可視化する。受容体に金コロイドを結合させて光ピンセットで牽引すると、受容体の細胞質部分がフェンスとぶつかった時に受ける力を、サブピコニュートンレベルで検出することができる

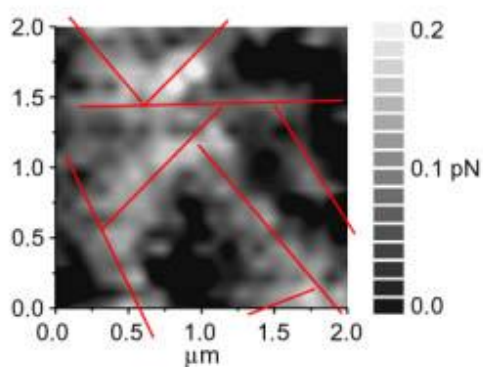


図 2-2 CD44 が受ける力を各点で測定して明るさで表示した画像の例。

将来への展望・応用の可能性

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。

特許出願

なし

論文・報告書他

- 1) 藤原敬宏; Ritchie, K.; 鈴木健一. "細胞膜上での1分子観察と操作: 細胞膜上のコンパートメントやドメインの構造と機能を調べる." 細胞工学. 20, 697-703 (2001).
- 2) リッチーケン. "光ピンセットと1分子走査型光ピンセット力顕微鏡." 実験医学別冊「バイオイメージングでここまで理解る」 楠見明弘、小林 剛、吉村昭彦, 徳永万喜洋編. 羊土社 (2002), 121-125.
- 3) Ritchie, K; Iino, R; Fujiwara, T.; Murase, K.; Kusumi, A. The Fence and Picket Structure of the Plasma Membrane of Live Cells as Revealed by Single Molecule Techniques. Mol. Membrane Biol. 20, 13-18 (2002).
- 4) K. Ritchie and A. Kusumi. Single molecule probe scanning optical force imaging microscope for viewing live cells. J. Biol. Phys. 28, 619-626 (2002).
- 5) Ritchie, K; Kusumi, A. Single Particle Tracking Image." Methods In Enzymol. 360, "Biophotonics", G. Marriott and Ian Parker, editors. pp. 618-634 (2003).

3. 神経細胞膜の極性維持のための「膜の仕切り」の解明

1分子観察・操作法を用いて、神経細胞の発達に伴い膜貫通型タンパク質分子の「ピケット」が密集して細胞膜上の「仕切り」となり、神経細胞膜で入出力領域間での分子の混合を防いで分子の分布を正しく保つことを解明した。

研究成果の概要

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り（図3-1）、それぞれの部分には異なる分子が存在している。細胞膜は液体のような性質を持っており、細胞膜中では膜を構成しているタンパク質やリン脂質などの分子は自由に動いて混じり合ってしまうはずであるが、実際は混じり合わない。何故このようなことが起こるのかは解明されていなかった。

本研究では、細胞膜を作る基本分子であるリン脂質の拡散運動を、ラット脳海馬の神経細胞膜表面上でビデオ撮影し、1分子毎に追跡することに世界で初めて成功した。追跡精度は数ナノメートルである。2つの領域とその境界のイニシャルセグメントという部分（補足説明図1）での運動を1分子毎に追跡し、さらに光ピンセットという方法でリン脂質分子を1分子ずつ引っ張った。イニシャルセグメントに仕切りができること、生後10日目頃までに仕切りが完成することがわかった。「仕切りの存在」についてはこれまで世界的に論争となっていたが、これによって存在が証明された。さらに、この仕切りは、細胞膜直下にある膜骨格という網目構造に、多数の膜貫通型タンパク質分子が結合して膜内に立ち並び、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イニシャルセグメントに密集して仕切りとなることわかった（図3-2）。

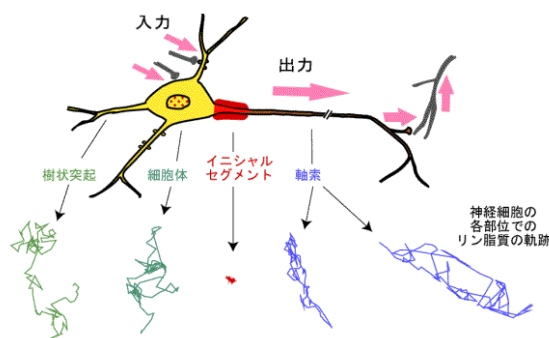


図 3-1 1個の神経細胞の模式図。神経活動の入力・出力領域の境目は「イニシャルセグメント」と呼ばれる。各部位での典型的な軌跡も示す。

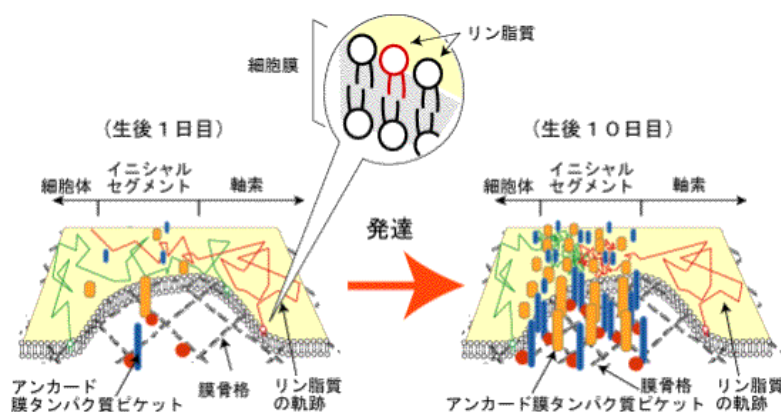


図3-2 イニシャルセグメントに仕切りができる仕組み

したがって、2領域での分子の特異的な局在について、以下のような仕組みがあると考えられる。新しく合成された膜タンパク質や脂質は、細胞内小胞の膜に組み込まれる。膜小胞は細胞質内を輸送され、細胞膜上の決まった領域に送られて、そこで膜タンパク質や脂質は細胞膜に組み込まれる。イニシャルセグメントの密集ピケラインは、細胞膜で入出力領域間での分子の混合を防いで分子の分布を正しく保つための仕切りとして働く。

将来への展望・応用の可能性

細胞は、液体の細胞膜中に、拡散障壁を作り得ることが示されたことで拡散障壁が必要な構造、例えば精子や酵母の出芽構造、等の理解が進む。また、神経細胞の極性形成（2領域形成）の重要な部分が理解でき、神経回路網の形成機構理解の重要なステップが確立された。隔壁がある人工膜作製のための設計の指針が得られた。

特許出願

なし

論文・報告書他

- 1) C. Nakada, K. Ritchie, Y. Oba, M. Nakamura, Y. Hotta, R. Iino, R.S.Kasai, K. Yamaguchi, T. Fujiwara, and A. Kusumi. Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers as neurons develop polarization. *Nat. Cell Biol.* 5(7): 626-632 (2003).
- 2) 木下一彦; 小林 剛; 中田千枝子; 楠見明弘. "1分子細胞生物学の魅力を語る." *細胞工学*. 20, 638-655 (2001).
- 3) 中田千枝子; 楠見明弘. "光ピンセットによる1分子操作法：ニューロンの細胞膜で1分子を見て引っ張る." シリーズ バイオサイエンスの新世紀 第12巻「感覚器官と脳内情報処理」御子柴克彦, 清水孝雄編, 共立出版 (2002), 200-209.
- 4) 中田千枝子. "神経細胞極性形成と膜上の拡散障壁." 実験医学別冊「バイオイメージングでここまで理解する」楠見明弘、小林 剛、吉村昭彦, 徳永万喜洋編.羊土社 (2002), 72-77.

4. 生細胞内での GFP の 1 蛍光分子ビデオイメージングを世界で初めて実現

細胞間接着分子 E-カドヘリンと GFP (緑色蛍光タンパク質) との融合タンパク質 1 分子の生細胞形質膜上での可視化に成功し、細胞接着領域以外の自由表面でも E-カドヘリンが会合体を形成することを見いだした。

研究成果の概要

GFP は、生細胞中でのタンパク質の局在や運動の研究に有用である。しかし、生細胞中で GFP 1 分子を可視化した例はない。我々は、細胞間接着分子 E-カドヘリンと GFP との融合タンパク質 (E-cad-GFP) 1 分子の生細胞形質膜上での可視化に成功し、細胞接着領域以外の自由表面でも E-cad-GFP が会合体を形成することを見いだした。

E-cad-GFP を L 細胞に発現させ、形質膜基底面を全反射型蛍光顕微鏡を用いて観察した結果、E-cad-GFP は蛍光強度の異なる数多くの輝点として観察された (図 4-1)。一方、野生型 L 細胞の自家蛍光は十分弱く輝点としては観察されなかった (図 4-1)。輝点の強度は量子的分布を示し (図 4-2)、最小ピーク相当の強度の輝点は実時間観察において 1 段階での褪色を見せた (図 4-3)。また分布の最小ピークの蛍光強度は、野生型 L 細胞表面に非特異的に結合させた GFP (大腸菌で産生) 1 分子と同じであった (図 4-2)。これらは、生細胞中で GFP 1 分子が可視化されていることを示す。各輝点の強度は各点で大きく異なるが、これらの輝点は分離せずに拡散運動することから、E-cad-GFP は細胞自由表面でも会合体をつくっていることが明らかになった。また、強度 (会合数) が増加すると拡散係数が大きく低下した。これは膜の粘性の効果では説明できず、膜骨格のフェンス効果 (+結合効果の可能性もある) が会合数とともに増大するためだと考えられた。E-カドヘリンの形質膜上での運動は、会合状態の変化および膜骨格との相互作用により制御されていることが示唆された。

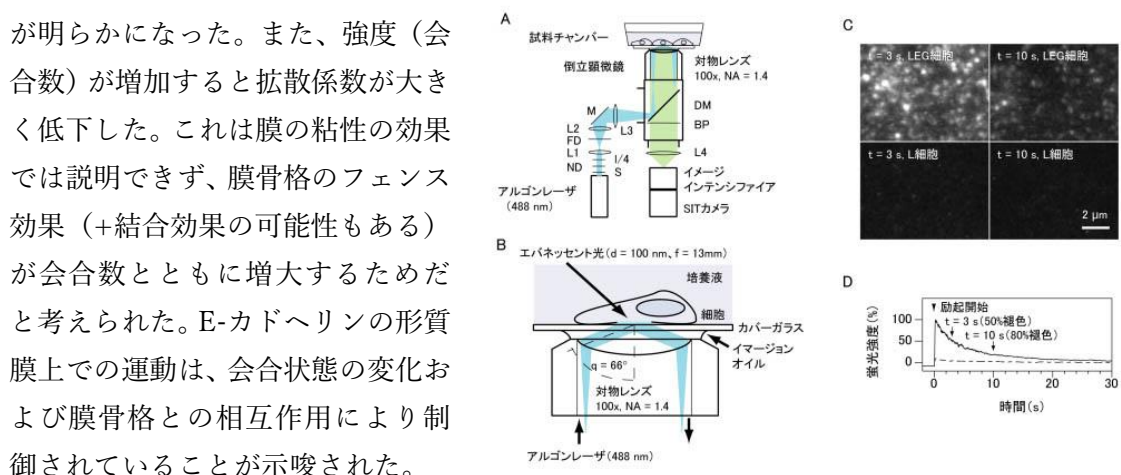


図 4-1 生細胞中で GFP 1 分子を可視化するための光学系と観察画像 A, 対物レンズ型全反射型蛍光顕微鏡の光学系。S、電磁シャッター；ND、減光フィルター；FD、視野絞り；DM、ダイクロイックミラー；BP、バンドパスフィルター；L1-L4、レンズ。B, 試料周辺部の拡大図。NA、対物レンズの開口数。C, LEG 細胞 (上段) と L 細胞 (下段) の蛍光画像。D, 個々の LEG 細胞 (実線) と L 細胞 (破線) の褪色による蛍光強度の変 (5.8 $\mu\text{m} \times 5.8 \mu\text{m}$ の領域)。個々の LEG 細胞の蛍光強度 (E-cad-GFP の発現量) には平均の $\pm 50\%$ 程度のばらつきがあり、C, D には平均的な LEG 細胞を示している。L 細胞の蛍光強度は、細胞の自家蛍光、励起光の迷光でフィルターを透過したもの、光学系の発する蛍光、および検出器や電子回路からの熱ノイズなどを含んだコントロールである。

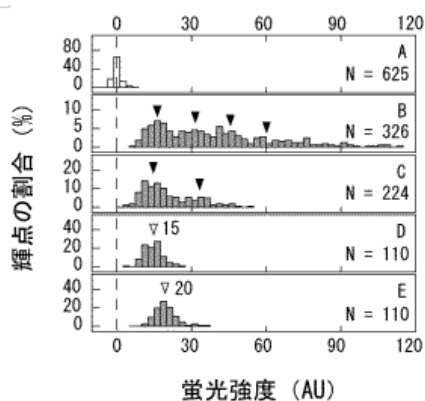


図 4-2 E-cad-GFP および GFP の輝点の蛍光強度の分布 A, L 細胞の蛍光強度 (408 nm×408 nm の領域)。B および C, 50% (B) または 80% (C) の GFP を褪せさせた際の LEG 細胞上の E-cad-GFP の各輝点の蛍光強度。黒い矢尻は量子的なピークを示す。D および E, L 細胞形質膜上 (D) またはカバーガラス上 (E) に非特異的に結合した GFP の蛍光強度の分布。白い矢尻は平均値を示す。

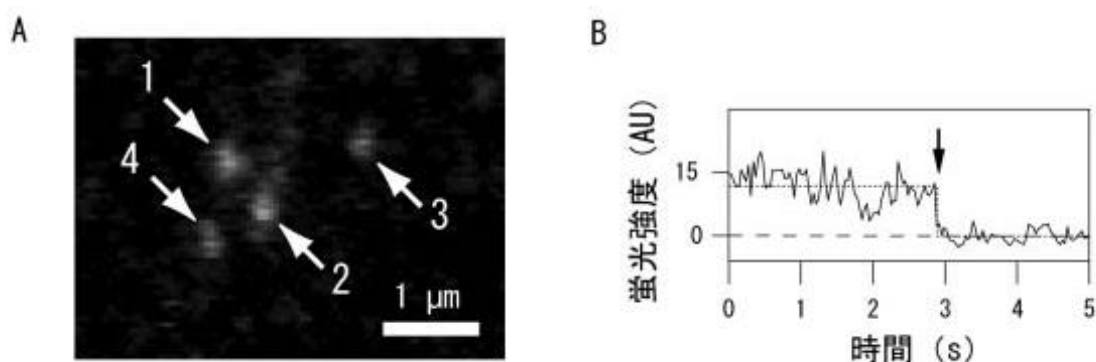


図 4-3 1 分子の E-cad-GFP の画像と 1 段階褪色の様子
A, E-cad-GFP 1 分子の蛍光像 (矢印)。B, E-cad-GFP の輝点の 1 段階での褪色。
矢印で示した点で褪色がおきている。

将来への展望・応用の可能性

細胞内のナノシステムの働きを理解するための強力な手段であり、今後の生命科学研究に大きな貢献する可能性。

特許出願 なし

論文・報告書他

- 1) Iino, R.; Koyama, I.; Kusumi, A. Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys. J.* 80, 2667-2677 (2001).
- 2) 飯野亮太; 小山郁子. "GFP 融合タンパク質 1 分子の生細胞中での可視化解析." *細胞工学*. 20, 691-696 (2001).
- 3) Iino, R; Kusumi, A. Single fluorophore dynamic imaging in living cells. *J. Fluorescence*. 11, 187-195 (2001).

5. 生細胞での Ras 分子活性化の 1 分子イメージング

生細胞において、1 分子 FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) によって、H-Ras 1 分子の位置や運動だけでなく、その分子の活性化の瞬間を 1 分子レベルで観察することに成功した。それに基づき、短寿命シグナル分子複合体により Ras のシグナル伝達は時空間的に厳密に制御されていることを見出した。

研究成果の概要

本研究では、癌遺伝子産物である低分子量 G タンパク質 Ras のシグナル伝達機構を明らかにするため、生細胞中で H-Ras 分子を 1 分子可視化し、1 分子 FRET 法を用いて H-Ras 分子の運動のみならず活性化を、1 分子毎に可視化することに成功した (図 5-1)。その結果から、H-Ras 分子は、細胞膜上で、不活性化型のときは速い拡散運動をしているが、活性化した時に運動を変え、一時的に停留することがわかった (図 5-1)。Ras が一時停留する時間は、FRET シグナル同様に非常に短く、ほとんどが 0.67 秒以下であった。これらは、Ras 分子の活性化は多数分子で見ると数分間続くように見えるが、1 分子毎に見ると停留した場所で、とても短い停留時間の間に起こっていることを示している。すなわち、H-Ras は停留した場所で、下流分子にシグナルを伝達し、不活性化されるなど、活性が空間的・時間的に厳密に制御されている。また、活性化型 Ras は、SUR-8 などの Ras スキャッフオールディングタンパク質との相互作用により複合体を形成し、細胞膜上で運動停止し、下流にシグナルを流した後、直ちに複合体を解消し、再び拡散すると考えられる (図 5-2)。

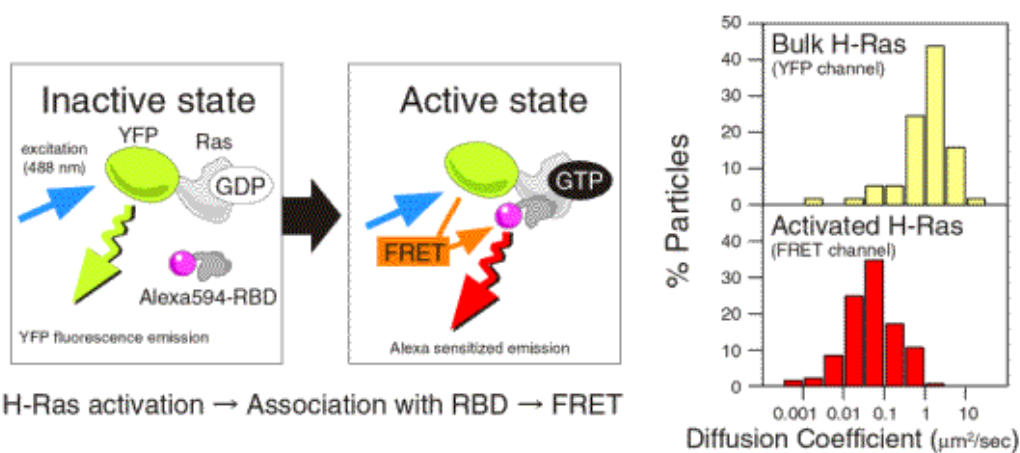


図 5-1 1 分子の H-Ras の活性化を可視化する 1 分子 FRET 法

(左) Raf-1 の Ras 結合ドメイン(RBD)は、活性化した Ras に強い親和性を持つ。その RBD を蛍光色素 Alexa594 で標識し、YFP 融合 H-Ras を発現した培養細胞内にマイクロインジェクションする。Ras が活性化されていないときは Ras と RBD は離れており、YFP を励起すると YFP の蛍光が観察される。Ras が GTP と結合し活性化されたときには、RBD が Ras に結合し YFP と Alexa594 が近づいて FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) が起こる。すなわち、Ras が活性化しているときには、YFP のみを励起しても、(YFP の蛍光に加えて) Alexa594 の蛍光 (sensitized 発光) が観察される。

(右) 1 分子 FRET 法で見た活性化した Ras 分子は、不活性化型のものに比べほとんど運動を停止していた。

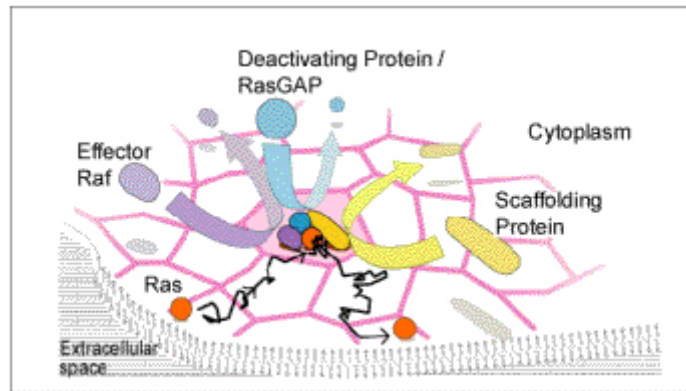


図 5-2 活性化した H-Ras が細胞膜上で一時的に停留しシグナル伝達する機構のモデル

不活性型の Ras は、細胞膜上で速い拡散運動を行っている。しかし、活性化に伴い、細胞膜上の活性化型の Ras を認識する分子、例えば、Spred、SUR-8 などのスキヤッフオールディングタンパク質と相互作用して停留し、その場所で短時間に信号伝達をおこなって、すぐに不活化されると考えられる。このように、癌遺伝子産物である H-Ras のシグナル伝達は空間的・時間的に厳密に制限され、暴走しないように制御されているのであろう。

将来への展望・応用の可能性

生細胞中の 1 分子ナノバイオロジー技術は、今後、他分野の研究で広く使われ、例えば、新規薬剤の超高感度 HTS 技術の大幅な底上げ等につながる事が期待される。また、細胞膜は、細胞が外界と情報を交換し応答反応を決定する情報変換システムを担う重要な場であり、本研究をさらに深めることにより、細胞膜上の情報変換の基本的なアルゴリズムが解明され、癌や免疫応答などの疾病の発症メカニズムなどの理解が進むことが期待される。

特許出願

なし

論文・報告書他

- 1) 小林 剛; 村上瑞奈; 吉村昭彦. "1 分子で見る細胞膜受容体とシグナル伝達分子: 情報伝達における空間情報の制御." 細胞工学. 20, 683-690 (2001).
- 2) 小林 剛; 村上瑞奈; 吉村昭彦; 楠見明弘. "生細胞中でのシグナル伝達分子の 1 分子観察法." 実験医学. 20, 585-589 (2002).
- 3) 小林 剛; 楠見明弘. "生細胞内のシグナル伝達の一分子観察." 光学. 31, 472-476 (2002).

6. 細胞膜ドメイン/ラフトの構造と機能の解明

ラフト様ドメインのマーカ分子の 1 分子観察により、定常状態でラフトは小さく（数分子程度）不安定（ミリ秒以下の寿命）であり、信号入力によって、ラフトは安定化し、ここに、さまざまな下流分子をリクルートする事を明らかにした。ラフトは可塑的な構造で、信号パスの調整や、クロストークに基本的な役割を果たす、ことが示唆された。

研究成果の概要

近年、細胞膜上で情報伝達分子群が働く場としてラフトが注目されているが、構造、安定性、機能などはほとんど分かっていない。これらの解明を進めるため、GPI アンカー型タンパク質 CD59 などのラフトのマーカ分子を時間分解能 $25 \mu s$ で 1 分子可視化して運動追跡した。その結果、ラフトのマーカ分子は、ラフトに入らないと考えられる分子とまったく同様に細胞膜上でホップ拡散運動していることがわかった。従って、ラフトは、定常状態では、数分子程度の大きさで、かつ/または、ミリ秒オーダーの短い寿命であると考えられる（図 6-1）。一方、信号入力した際には、ラフトのマーカ分子は安定化したラフト様ドメインを形成し、一時停留（平均 0.7 秒間、約 3 秒毎）した。この一時停留は、コレステロール、アクチン線維、Lyn などの src family キナーゼ、三量体 G タンパク質依存的であった。また、安定化されたラフトと信号分子の同時観察を行ったところ、停留部位の直前か初期に G タンパク質が、Lyn は一時停留とは無関係に、PLC は一時停留中に限りリクルートされるのが観察された。これらの結果より、（1）リガンド結合により、クラスターラフトが形成され、（2）ここに Lyn と G タンパク質が同時にリクルートされると、（3）未知のタンパク質 X が Lyn によってリン酸化され、（4）リン酸化タンパク質がクラスターラフトのアクチン結合（即ち、一時停留）と PLC のリクルートを誘起し、（5） Ca^{2+} シグナルが生ずるといふ信号伝達機構（図 2）が考えられる。

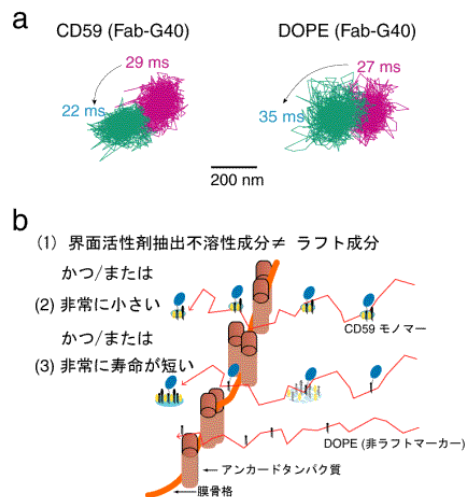


図 6-1

- a 細胞膜上でのラフトのマーカ分子 (CD59) と非ラフトマーカ分子 (DOPE) の運動
- b 信号入力ないときの、小さなかつ/または寿命の短いラフトの模式図

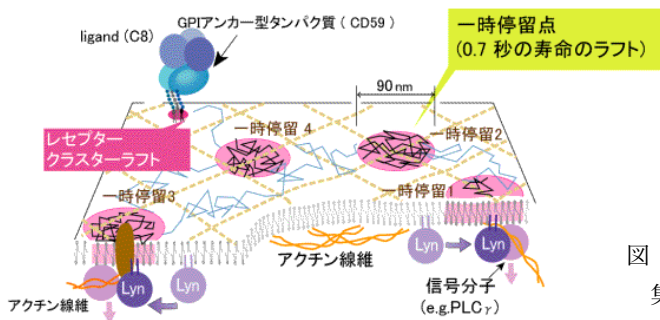


図 6-2 一時停留部位で、シグナル分子が集まり下流にシグナルが伝わるモデル図

将来への展望・応用の可能性

ラフトを介した様々な疾病(狂牛病、アルツハイマー病、エイズなど)の発症機構の解明。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。

特許出願

なし

論文・報告書他

- 1) Suzuki, K.; Sanematsu, F.; Fujiwara, T.; Edidin, M.; Kusumi, A. Rapid, continual formation/dispersion of raft-like domains in the resting cell membrane. *Mol. Biol. Cell.* 12, 470a (2001).
- 2) 藤原敬宏; Ritchie, K.; 鈴木健一. "細胞膜上での1分子観察と操作: 細胞膜上のコンパートメントやドメインの構造と機能を調べる." *細胞工学.* 20, 697-703 (2001).
- 3) Suzuki, K.; Sanematsu, F.; Fujiwara, T.; Edidin, M.; Kusumi, A. Stimulation-induced formation of temporal but stabilized rafts. *Biophys. J.* 82, 348a (2002).
- 4) 鈴木健一. "前駆ラフトとシグナリングラフト." *実験医学別冊 「バイオイメージングでここまで理解る」* 楠見明弘、小林 剛、吉村昭彦, 徳永万喜洋編. 羊土社 (2002), 48-53.
- 5) Subczynski, W. K.; Kusumi, A. Dynamics of raft molecules in cellular and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim. Biophys. Acta Reviews on Biomembranes* 1610, 231-243 (2003).