

研究終了報告書

「定量的超解像法 superPAINT の開発と細胞膜シグナル統合基盤の解明」

研究期間: 2021年10月～2024年3月

研究者: 角山 貴昭

1. 研究のねらい

[目的1: 定量的超解像法「superPAINT」の開発]

細胞内でのシグナル伝達や代謝、細胞分裂など、重要な細胞機能の発現のためには、多種類の分子が多数集まって会合体として働くことが多い。しかし、これら会合体を生細胞中で定量的に解析する方法は限られている。特に「会合体中での特定分子のコピー数」、「それぞれの分子種について、分子1個の会合体中での滞在時間」、「会合体全体の寿命」といった重要なパラメーターの知見はほとんど得られていない。そこで、これらを調べるための実験法を考え、superPAINT と名付けた新規の定量的超解像法のアイデアを得た。

superPAINT では従来の uPAINT 法はるかに改善する。uPAINT では結合の弱い蛍光プローブを用いて目的分子をまばらに、次々とラベルしながら超解像画像を再構成する手法であるが、プローブの解離定数 K_d の最適化が試みられたことがなかった。そこで本研究では、Enhanced Monomeric Avidin (eMA) タグタンパク質を系統的に改変した一群の eMA ライブラリーを作製する (eMA に系統的に変異を入れて K_d を変化させる)。興味ある会合体の性質に合わせて、このライブラリーから適切な eMA を数種選択して標的タンパク質との融合タンパク質を発現させ、biotin を蛍光標識したものをプローブとして用いる。この superPAINT と名付けた手法の開発と応用を第一の目標とする。

[目的2: シグナル経路を統合する共通シグナル基盤の解明]

細胞膜上には多様な受容体が存在し、多種のシグナル経路が同時並行で動いている。しかも、異なったシグナル経路でも、共通の下流分子を利用することでシグナル経路間でのクロストークが起こる。クロストークの研究は進んでいるが、これを実行するための構造体 (プラットフォーム)、すなわち、共通シグナル基盤の存在は見つかっていない。このような構造体は、細胞が複雑なクロストークのシステムを制御する方法として、極めて重要であると思われる。すなわち、必要な分子を、必要な量、必要な場所、必要な時間だけ集合させ、それらの相互作用を促進させるという戦略である。

私は最近、いくつかの細胞質タンパク質が細胞膜上で会合体を形成し、そこに様々なシグナル分子や足場分子がリクルートされるという驚くべき結果を得た。この会合体が共通シグナル基盤として働いている可能性の検証が第二の目標である。このため、上記の superPAINT 法の活用も進めていく。

2. 研究成果

(1) 概要

研究テーマ1 「新規超解像法 superPAINT の開発」

従来の uPAINT 法を改善し、細細胞中でナノスケールの会合体構造のダイナミクスを測定でき

る手法、superPAINT の開発を目指した。このために、Enhanced Monomeric Avidin (eMA) タグタンパク質を変異させた一群の eMA ライブラリーの作成を行なった。

まず、eMA の細胞膜上での安定性の向上を試みた。オリジナルの eMA は細胞膜上で頻繁に二量体を形成し、さらに多くの分子が ER に蓄積していた。様々なアミノ酸変異を組み合わせることでこの問題を解決し、完全な単量体化と劇的なフォールディング安定性の向上が達成できた。

次に Biotin との相互作用に重要なアミノ酸部位を特定し、それらを変異させることで、1ms ~ 1min に及ぶ、非常に広い結合時間を持つ eMA ライブラリーの作成に成功した。

研究テーマ 2 「細胞膜シグナル統合基盤の発見と解明」

新規に発見した細胞膜上に存在するシグナル統合基盤の機能解明を目指した。

GPI アンカー型受容体とチロシンキナーゼ受容体という全く異なる種類の受容体が、刺激依存的に、新発見の細胞膜上のタンパク質集合体にリクルートされることを見出した。タンパク質集合体を構成分子の頭文字から iTRVZ と名付けた。

iTRVZ は複数の受容体からの信号を統合するだけでなく、その信号を非線形的に増幅しており、iTRVZ は AND 論理ゲート、coincidence detector として働いていることが明らかになった。ノイズの多い細胞質内において、iTRVZ はノイズフィルターとしても機能すると考えられる。

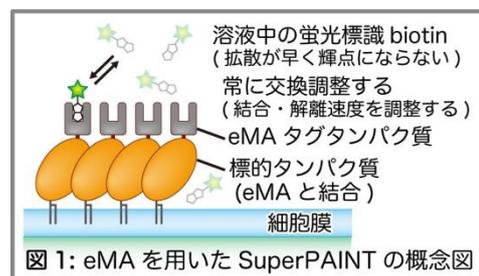
また、iTRVZ は液—液相分離 (LLPS) によって形成されることを発見した。50nm 程度の大きさでの LLPS はほとんど報告がなく、驚くべき発見であった。

最後に、in vivo での iTRVZ の機能解析としてマウス xenograft モデルを用い、iTRVZ がマウス中で腫瘍成長を促進していることを示した。

(2) 詳細

研究テーマ 1 「新規超解像法 superPAINT の開発」

生細胞での超解像顕微鏡法としては uPAINT 法がある。しかし、観察の成功例が極めて限られていた。私は、その理由として、蛍光プローブの結合解離速度の tuning が系統的になされたことがないのが原因だと推定した。そこで、enhanced monomeric avidin (eMA) に様々な変異を導入し、蛍光標識ビオチンに対して多様な結合解離速度をもつ eMA ライブラリーの開発を目指し成功した。ライブラリーから系統的に eMA 変異体を選び、予備実験に用いて、それぞれの実験に最適な eMA 変異体を選ぶ。これを superPAINT と名付けた (図 1)。



[成果 1-1: eMA の完全な単量体化とフォールディング安定性の劇的向上]

eMA は単量体とされていたが、膜タンパク質に結合させると多量体形成をおこし ER に蓄積することもあった。そこで、eMA に数多くの変異を導入し、完全な単量体化と生細胞中でのフォールディング安定性を劇的に向上させることに成功した。

[成果 1-2: eMA ライブラリーの作成]

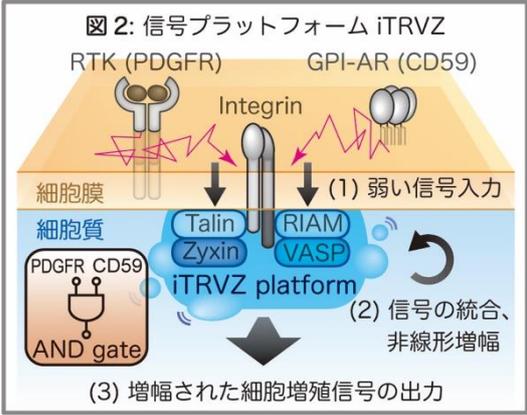
Biotin 結合に関与するアミノ酸変異をさまざまに組み合わせることで、解離時間 1ms ~ 1min に及ぶ、非常に広い観察時間スケールを網羅する eMA ライブラリーの作成に成功した。

研究テーマ 2 「細胞膜シグナル統合基盤の発見と解明」

細胞膜上では数多の信号経路が同時並行している。経路間の制御の仕組みとして、私は、細胞膜上に複数の信号経路を統合するプラットフォームが存在するという仮説を検証した。

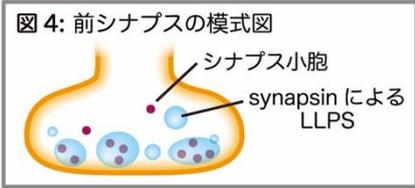
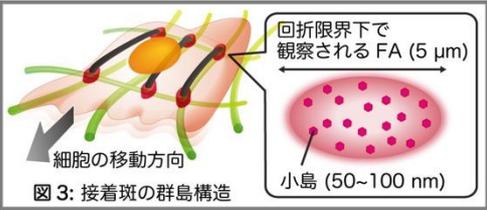
[成果 2-1: シグナル統合基盤、iTRVZ の発見]

GPI アンカー型受容体 (特に CD59) とチロシキナーゼ受容体 (RTK) という全く異なる種類の受容体が、刺激依存的に、新発見の細胞膜上のタンパク質集合体 (直径 ≈ 50nm) にリクルートされることを見出した。この集合体は Integrin, Talin, RIAM, VASP, Zyxin から成るので、iTRVZ (アイターヴズ) と命名した。接着斑の分子構成と似ているが、いくつかの必須分子を欠いており、さらに細胞膜上面にも存在することから、接着斑とは異なる構造である。両受容体を同時に刺激すると iTRVZ からの出力信号は劇的に増加した。即ち、iTRVZ は AND 論理ゲート、coincidence detector として働き (図 2)、ノイズの多い細胞質内においてはノイズフィルターとしても機能すると考えられる。iTRVZ の構成分子は常に高速で交換しており、発見のためには高速の 1 分子観察システムの開発が必須で、成果論文 1,2 として発表した。



[成果 2-2: iTRVZ は LLPS によって形成される]

iTRVZ は液—液相分離 (LLPS) によって形成されることを発見した。50nm 程度の大きさでの LLPS はほとんど報告がなく、iTRVZ の特殊な性質と考えていた。しかし当初の想定に反し、興味深いことに接着斑 (成果論文 2, 図 3) や、シナプス小胞 (成果論文 3, 図 4) においても似通った凝集体を見出し、LLPS によるナノスケール集合体が細胞のあらゆる場所に存在し、細胞機能を発現させる基本戦略の一つであるという仮説を発想するに至った。



[成果 2-3: iTRVZ はマウスでの腫瘍成長のシグナルに必須である]

当初の予定ではゼブラフィッシュ発生における iTRVZ 機能の解明を行う予定であったが、

CD59 と RTK の実験が劇的に進んだことからマウス xenograft モデルに変更した。iTRVZ をシグナルのための足場に用いる CD59 と RTK は、それぞれ、ガンの免疫逃避にガンの促進に関わるので、マウスモデルがより適切である。その結果、iTRVZ は腫瘍成長のシグナルに必須であることを発見した。

3. 今後の展開

(1) superPAINT を用いた、定量的超解像顕微鏡法の応用と発展

本研究で開発した superPAINT のための eMA ライブラリーでは、1ms ~ 1min という非常に広い結合時間をカバーすることに成功した。世界最速の 1 蛍光分子観察システムを開発したので（時間分解能 33 マイクロ秒；成果論文 1）、1ms という結合時間も使い道がある。今までの超解像法はダイナミクスを完全に犠牲にした固定細胞でしか使えず、1 分子追跡法では、発現量を生理的発現量の 1/100~1/1000 に抑えることが多かった。それに対し、superPAINT では、生細胞で、生理的発現量で動態を追跡できることが極めて重要で、またラベル率を実験しながら簡単に変化できることも使い勝手がよい。

私は、以下に記すように、今後も iTRVZ、および、他のナノスケールの動的集合体の機能とその仕組みの解明を進めていきたいと考えているが、それには superPAINT 法は非常に適した手法であり、これからも方法の改善を進めながら（さらに細かい結合解離速度の tuning；蛍光ビオチン標識側のバリエーションの増強など）、私の主要な方法として、活用・発展を期す。さらに、superPAINT 法が広まるよう、eMA ライブラリーの提供を積極的に行っていく。

(2) iTRVZ の機能解析と医療応用

iTRVZ は、シグナル統合を担うナノ集合体のハブである。シグナル経路間のクロストークはよく調べられているにもかかわらず、クロストークを担う構造体が見出されたのは初めてだと思う。それが機能する機構もユニークで、直径 50nm 程度の液滴であり、しかも 10 秒程度の寿命で、次々と新しい iTRVZ が生成する。また、iTRVZ は細胞膜上のラフト領域とアクチン膜骨格によって形成が促進される。細胞膜上での iTRVZ の平均個数密度は 0.25 個/ μm^2 で、ほぼクラスリン被覆ピットと同程度である。今後も以下に示すように iTRVZ の機能解明を進めていく。

(2-1) iTRVZ を利用する他の受容体系の検索、(2-2) iTRVZ にリクルートされ、シグナル分子として極めて重要な分子である、Akt, PI3K 経路のより詳細な解析、(2-3) iTRVZ における phosphoinositides (PIPs) のリクルートとメタボリズムの解明、(2-4) 免疫逃避と細胞増殖の両経路が iTRVZ で統合／増幅されている可能性をさらに追求・解明する。

(3) ナノスケール(液体)集合体の普遍性、形成機構の普遍性、細胞内の機能単位としての普遍性

iTRVZ の形成には LLPS が関与していることを見出したが、このような、50nm スケールの LLPS 液滴の存在に驚いた。報告がある LLPS 液滴は数ミクロンからサブミクロン程度で、ナノスケールの LLPS 液滴は見つかっていなかったからである。当初は、これは iTRVZ に固有の特殊な分子集合様式かと考えたが、すぐに、類似の構造を 2 つ発見できた。すなわち、接着斑は、

50nm 程度の大きさのタンパク質が島を作り、それが集まった群島構造から成ることを見出し (図 3; 成果論文 2)、前シナプスでは Synapsin がナノスケールの LLPS 液滴を作ってシナプス小胞を濃縮していることを見出した (図 4; 成果論文 3)。

これらの発見から、私は他の多くの細胞機能やシグナル経路においても、ナノスケールのタンパク質集合体が機能ユニットとして働いている可能性に強い興味を持つに至った。重要なことは、単に数分子だけを集める足場タンパク質 1 個とかが働くのではなく、足場タンパク質を含む多数のタンパク質が集合体を作って、機能分子を集める可能性である。例えば、iTRVZ では、基本の 5 種の構成分子は、1 個の iTRVZ の中に 1~10 コピーくらい存在し、平均の分子個数は 30 個程度である。iTRVZ では、これらが液状にゆるく会合しているので、直径が 50nm 程度になっている。液滴なので、基本構成分子 5 種でさえ、iTRVZ 内の滞在時間は、平均 1~2 秒程度である (1 分子での滞在時間、次々と新しい分子もやってくる)。そこに、受容体と下流のシグナル分子が、おそらく合計 10 分子程度存在して結合解離をくり返していると推定される。これが、私が想定しているナノ集合体機能ユニットの基本的構造・分子動態・機能、および、機能の仕組みである。

様々な分子を取り込む必要から、分子 stoichiometry の自由度は高い必要があり、また、そこでの機能分子の相互作用を考えると、集合の仕方は液滴というのがふさわしいと考える。しかし、そのような分子動態と集合の機構がすべて LLPS と IDR (タンパク質の天然変性領域) で担われているのか、また別の機構を考えなくてはいけないのか、は、極めて重要で興味深い問題であり、この検討も進めていく。

すなわち、このような方向で、iTRVZ を超えて、さらに研究を大きく発展、展開させ、新たな価値の創造に邁進していきたいと考えている。

ナノスケール集合体の生理的意義としては、多種の機能分子を集めることで複雑な制御が可能になる、場合によっては逆反応を担う分子を排除することもできる、集合体の寿命は 10 秒程度 (iTRVZ の場合) とすると、集合体を作るのに必要な分子の供給を止める (例えばリン酸化をする) ことで、10 秒後には反応の進行が一気に止められる (すなわち、off にするのが確実に早い)、等が考えられる。これらを解明するのも、将来の大きな楽しみである。

ナノスケール集合体の構造・分子動態、そこでの分子間相互作用と反応の観察は難しく、それぞれか、ナノスケール集合体の存在自体も、時空間的に限られた今までの観察では多くが見逃されてきた可能性が高い。私の最大の武器は 1 分子感度からのイメージング技術であると自負しており、ACT-X の研究では superPAINT という強力なツールも開発することもできた。これからの研究では、ACT-X で得られた知見とツールを最大限に活用し、iTRVZ と様々なナノスケール集合体を明らかにしていきたいと考えている。

4. 自己評価

本研究では当初に予定していた目標は概ね達成することができた。

ゼブラフィッシュを用いた発生過程におけるシグナル統合基盤の機能解析を当初は計画していたが、ガン関連分子である RTK の関与が強く示唆されたために、マウスを用いた腫瘍形成モデルを用いることに計画を変更した。結果として、シグナル統合基盤が生体内での腫瘍形成に重要な役割を持っているという目覚ましい結果を得ることができたので、この方針変更

は成功したと考えている。

superPAINT のシグナル統合基盤観察への応用は、本研究期間中では実現することができなかった。これは想定よりも superPAINT の基礎技術の開発に時間がかかったためであるが、結果としてより安定で有用なシステムを開発することができた。本研究は加速フェーズに採択されたので、その期間での応用を目指す。

「研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果」

本研究で開発した superPAINT は今までの超改造顕微鏡法の限界を打ち破る、画期的な手法であると信ずる。これを用いることによって、細細胞内でのナノスケール会合体のダイナミクスを直接測定することが可能となり、広い研究領域でのより根本的な生命現象の理解が促進されると予想している。

また、本研究で見出したシグナル統合基盤 iTRVZ は今までにない性質をもった分子複合体であり、様々な信号経路に参与していることから、特定の研究領域に限らない、広いシグナル研究の分野に大きなインパクトを与えていると考えている。腫瘍成長への関与も明らかとなったので、新しいコンセプトからの創薬や治療法の開発への期待も高い。

最後に、ナノスケール液体複合体が様々な生命構造の基本ユニットであるという可能性を示すことができた。これは今までの古典的な分子複合体像を根本から覆すものであり、新しい細胞生物学のパラダイムとして重要となる可能性を秘めていると信ずる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 3件

1. T.K. Fujiwara, S. Takeuchi, Z. Kalay, Y. Nagai, T.A. Tsunoyama , T. Kalkbrenner, K. Iwasawa, K.P. Ritchie, K.G.N. Suzuki, A. Kusumi. Development of ultrafast camera-based single fluorescent-molecule imaging for cell biology. (2023) J. Cell Biol. 222:e202110160
2. T.K. Fujiwara, T.A. Tsunoyama , S. Takeuchi, Z. Kalay, Y. Nagai, T. Kalkbrenner, Y.L. Nemoto, L.H. Chen, A.C.E. Shibata, K. Iwasawa, K.P. Ritchie, K.G.N. Suzuki, A. Kusumi. Ultrafast single-molecule imaging reveals focal adhesion nano-architecture and molecular dynamics. (2023) J. Cell Biol. 222:e202110162
3. C. Hoffmann*, J. Rentsch*, T.A. Tsunoyama* (*equal contribution), A. Chhabra, G.P. Aguilar, R. Chowdhury, A. Korobeinikov, F. Trnka, S.H. Ali, M. Ganzella, G. Giannone, S.O. Rizzoli, A. Kusumi, H. Ewers, D. Milovanovic. Synapsin condensation controls synaptic vesicle sequestering and dynamics. (2023) Nat. Commun. 14(1):6730

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Taka-aki Tsunoyama. Nanoscale condensed liquid platform on the plasma membrane for signal integration. OIST-Kyoto University Joint Workshop. 2022/03/11 [招待講演]
2. Taka-aki Tsunoyama. Nanoscale LLPS-based liquid-like signaling platform that cooperatively integrates RTK, GPCR, and GPI-anchored receptor signals. The 45th annual meeting of the molecular biology society of Japan. 2022/12/01 [招待講演]
3. T. A. Tsunoyama, C. Hoffmann, D. Sasaki, B. Tang, K. M. Hirose, Y. L. Nemoto, R. S. Kasai, T. K. Fujiwara, K. G.N. Suzuki, H. Ishikawa, D. Milovanovic, A. Kusumi. Nano-liquid platform on the plasma membrane that integrates receptor signals for cancer promotion. The 61st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. 2023/11/16 [招待講演]
4. Taka A. Tsunoyama, Christian Hoffmann, Daiki Sasaki, Bo Tang, Koichiro M. Hirose, Yuri L. Nemoto, Rinshi S. Kasai, Takahiro K. Fujiwara, Kenichi G.N. Suzuki, Hiroki Ishikawa, Dragomir Milovanovic, Akihiro Kusumi. iTRVZ: Liquid-like nanoscale signaling platform on the plasma membrane that integrates receptor signals leading to cancer promotion. 68th Annual Meeting of Biophysical Society. 2024/2/11 [oral]