

研究報告書

「1分子追跡によるラフト量子化信号システムの解明」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：鈴木 健一

1, 研究のねらい

本研究課題の目的は、細胞膜上での2種類の分子を同時に1分子ずつ観察する技術(世界初)を用いて、ラフト経由のシグナル伝達機構の全容を解明することであった。ラフトは細胞膜上のシグナル伝達のプラットフォームとして提唱されているが、脂質相互作用だけで細胞刺激前にラフトは、「本当に存在するのか?」、あるいは「刺激後ラフトがどのようにしてシグナルを伝えているのか?」といった基本的な問題は何ら解決されていなかった。本研究では、これらの課題に、高精度1分子観察技術をさらに改善しつつ挑んだ。また、ラフト経由のシグナル伝達は短寿命で、パルス的に起きるが、これが、どのようにして長くアナログ的に続く細胞全体のシグナルを生み出すのかを解明しようとした。

2, 研究成果

細胞膜上の受容体の2量体、多量体形成観察のための基盤技術の開発

ラフトへの分子の濃縮を調べるためには、細胞膜上でラフトマーカを蛍光ラベルし、その1分子ずつが、結合(2量体化)しては、離れる様子を全反射顕微鏡で観察する必要がある。しかし、そのためには、1)「細胞膜上で観察対象となる分子を低レベル(1細胞あたり5000分子以下)で発現させ、どの分子種でもだいたい同じ密度で観察する」、2)「発現している観察対象の分子を高い効率で蛍光ラベルする」の両条件とも満たす必要である。そこで、筑波大学・三輪先生にお願いして、Doxycyclineで膜分子の低レベル発現を誘導、調節できるベクターをいただき、対象分子の配列を組み込んだコンストラクトを作成した。また、蛍光ラベル効率を高めるために、Halo-tagやACP-tagといったtagをタンパク質のC末側あるいはN末側に融合させた。こうして発現された膜分子を95%以上の効率で蛍光ラベルすることができた。顕微鏡技術に加え、1分子観察向けのこのような膜タンパク質発現、ラベルの基盤技術をまず開発した。

定常状態の細胞膜上での GPI アンカー型タンパク質の2量体形成機構

CD59というラフト親和性の GPI アンカー型受容体で補体制御タンパク質は、平均160ミリ秒間という短い時間だが、コントロールで非ラフトリン脂質分子DOPEに比べて、4倍の長さで2量体を形成していた(図1)。また、CD59の2分子間のFRET(蛍光エネルギー共鳴移動)実験でも確かに、コントロール分子よりも長く頻繁に2量体形成が確かめられた。これらの結果は、CD59の2量体は、確かに形成され、何らかの機構で分子は濃縮され、ランダムに分布しているわけではないことが明らかとなった。

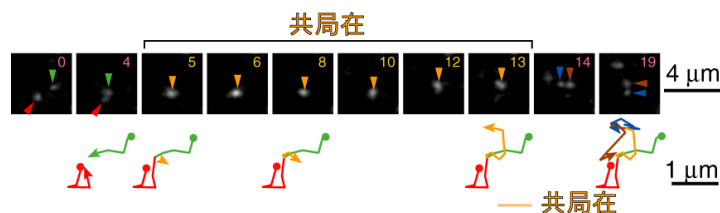


図1: CD59モノマー同士が会合し、拡散した後、再び解離するビデオ画像(上)と軌跡(下)

次に、この分子濃縮機構を調べた。細胞膜からコレステロール除去すると CD59 の 2 量体の寿命は半分の 80 ミリ秒になり、またコレステロールを細胞膜に戻すと 2 量体の寿命は長くなった。CD59 の GPI アンカー鎖の代わりに、非ラフト貫通型タンパク質(LDL 受容体の膜貫通部分)を融合したキメラタンパク質の 2 量体の寿命は、やはり 75 ミリ秒と短いものであったが、その寿命へのコレステロール除去の効果は見られなかった。従って、これらの結果は、コレステロールや GPI アンカー鎖など脂質相互作用が CD59 の 2 量体を安定化していることを示唆している。

次に、ectodomain タンパク質間相互作用も 2 量体形成に重要かどうかを検証するために、2 量体形成能の異なる様々なタンパク質を ectodomain に持つ GPI アンカー型タンパク質の 2 量体の寿命を調べた。結果、ectodomain タンパク質の 2 量体形成能が高いほど、GPI アンカー型タンパク質の 2 量体の寿命が長くなっていたことから、確かに、ectodomain のタンパク質部分の相互作用も GPI アンカー型タンパク質の 2 量体の形成に重要であることが示された。一方で、タンパク質部分に 2 量体形成能がない場合には、GPI アンカー型タンパク質の 2 量体の寿命は、ほとんどコントロールの非ラフトリン脂質と同程度であった。このことから、GPI アンカー型タンパク質の 2 量体形成は、タンパク質相互作用によって誘起され、脂質相互作用がそれを安定化していることが示唆された。

また、タンパク質間の特異的相互作用が GPI アンカー型タンパク質の 2 量体形成に重要なことは、ホモ 2 量体の寿命の方が、ヘテロ 2 量体の寿命よりも、ずっと長かったことから示された。

ヘテロ 2 量体の寿命は、コントロールの非ラフトリン脂質の 2 量体とあまり変わらなかったが、この結果は、脂質相互作用だけでは、2 量体を形成できないことをさらに支持していた(図 2)。

1 分子 FRET 観察、1 分子 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 観察や、クロスカーを用いた生化学アッセイなど、他の手法を用いても実験を行ったが、その結果は 1 分子共局在観察の結果とよく一致していた。

定常状態の細胞膜上での GPI アンカー型タンパク質の多量体形成機構

また、膜上の CD59 の発現密度を上げさえすれば、2 量体だけではなく、3, 4 量体などの多量体も頻繁に見られるようになったが、コントロールの分子では見られなかった。従って、CD59 の多量体形成は、化学平衡下で起きていることが示唆された。以前、GPI アンカー型タンパク質は、非平衡過程で、ヘテロオリゴマーが形成されるとする結果が報告されている(Sharma et al., Cell, 2004)。この報告では、発現分子密度が私の系の 1000 倍ほど高い条件下で FRET 観察を行っていた。そのため、ほとんどホモ 2 量体形成していた GPI アンカー型タンパク質が、脂質相互作用でヘテロ多量体を形成したと推測した。

そこで、この仮説を検証するために、IgG 抗体で CD59 と DAF のホモ 2 量体を形成させ、そのホモ 2 量体間 (CD59 と DAF の IgG 抗体間) で形成されるヘテロ 4 量体を観察した。結果、ヘテロ 2 量体の場合と異なり、ヘテロ 4 量体の寿命は、コントロールの非ラフトリン脂質の 4 量体や

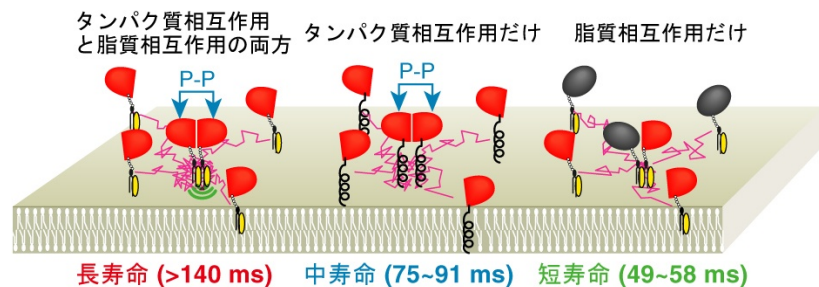


図 2: GPI アンカー型タンパク質の 2 量体形成は、タンパク質相互作用によって誘起され、脂質相互作用がそれを安定化している

CD59TM-DAFTM のヘテロ4量体の寿命よりも2倍程度長いものであった。これらの結果は、いったんホモ2量体が形成されると、脂質相互作用が高まり、やや長寿命のヘテロ4量体を形成できるようになったことを示唆していて、上の仮説が正しいことを示している。

以上の結果から、定常状態において GPI アンカー型タンパク質は、タンパク質相互作用によって誘起されたホモ2量体を脂質相互作用が安定化し、さらに分子密度が高い場合には、化学平衡下、ホモ4量体やヘテロ4量体を形成するということが明らかとなった。

高速時間分解能1分子観察により推測されたラフト構造

以上の結果から、少なくとも CD59 など GPI アンカー型タンパク質は、分子の濃縮が見られることが明らかとなったが、まだこれらの結果は、2量体や4量体のまわりにどのくらいの範囲でラフトドメインが広がっているのかという問いに答えていない。そこで、この問いに答えるために、CD59 のほとんどは2量体以上である高発現下で、CD59 と非ラフト分子の拡散を比較し、膜から受ける抵抗を測ることで、ラフトの大きさを見積もろうと試みた。

そのため、CD59 の1分子の運動を高速カメラを用いて時間分解能 56 μ s で追跡したところ、CD59 の拡散は、単純拡散ではなく、軌跡はコンパートメント化していた。また、コンパートメントの大きさは 110nm ほどで、コンパートメント内での滞在時間は、平均 25 ミリ秒であった。驚くべきことに、非ラフトリン脂質の DOPE も CD59 とほぼ同じホップ拡散をしていた。

このホップ拡散は、膜骨格に直線上にアンカーされた貫通型タンパク質 (ピケライン) の効果により起こることが知られている。モンテカルロシミュレーションの結果からアンカーされた貫通型タンパク質間の距離は、平均で5ナノメートルであると見積もられた。また、上記のように、CD59 はホモ2量体に基づくラフトを形成しており、平均で 160 ミリ秒ほどラフトと相互作用していると考えられる。これは、コンパートメント内での平均の滞在時間25ミリ秒よりも6-7倍長い時間である。つまり、CD59 の2量体形成後、平均で6-7回はピケラインを飛び越えて、ホップしているはずである。これらの結果より、CD59 の2量体化によって形成されるラフトの大きさは、ピケラインを構成する膜貫通型タンパク質間の距離よりも小さい数ナノメートル以下であると推定することができた(図3)。同じ IgG 抗体でラベルされた CD59 同士は 10 ナノメートル離れているが、この IgG で誘起された CD59 の2量体のホップの頻度が、CD59 の1分子のホップの頻度の半分になっていた。このことは、定常状態で自然に形成される CD59 の2量体が入っているラフトの大きさが数ナノメートル以下であるという考えとよく一致している。他に様々な高速1分子追跡を行ったが、これらの結果もラフトが数ナノメートル以下の大きさしかないことを支持していた。

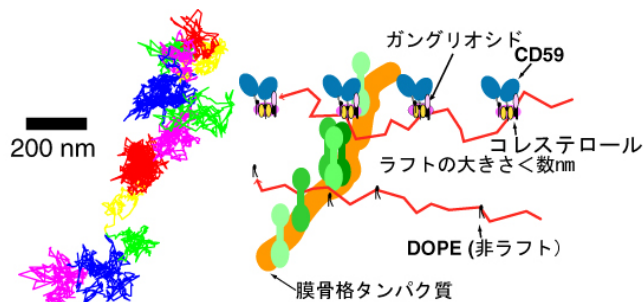


図3 (左) 56 μ s の時間分解能で蛍光観察された CD59 の 1 分子の 0.33 秒間の軌跡。コンパートメントに分かれている。
(右) アンカーされた膜貫通タンパク質間をすり抜ける CD59 の 2 量体形成で生じた直径数ナノメートルのラフト。

リガンド刺激後に形成され細胞内シグナル伝達を誘起する安定化ラフト

次に定常状態で形成された短寿命の2量体や4量体に基づくラフトの生物学的意義について

調べた。CD59 の機能は、補体のコンプレックス(membrane attack complex, あるいは MAC)の自己攻撃から形質膜を守ることだが、MAC が形成されると、CD59 は MAC の受容体なので、MAC と CD59 は結合する。観察の結果、MAC 形成後の CD59 は、非常に安定なホモ4量体を形成していることが明らかとなった。このホモ4量体は、コレステロール除去後や、CD59 の貫通型キメラタンパク質で非ラフト分子の場合には、MAC 形成後もあまり形成されなかった。これらの結果は、ラフト相互作用が刺激依存的な CD59 のホモ4量体形成に必須であることを示唆している。

MAC 形成後に誘起された CD59 のホモ4量体は、他のラフト分子である GM3 や GM1 を 100 ミリ秒ほどリクルートしていたが、コントロールの非ラフトリン脂質はリクルートされなかった。従って、CD59 クラスターラフトとも呼ぶべき構造が形成されていることが明らかとなった。

さらに MAC 形成により誘起される CD59 クラスターラフトは、運動しては一時停留するといった非常に奇妙な挙動を示した。2007 年にこの一時停留のことを Stimulation-induced temporal arrest of Lateral diffusion から STALL と名づけたが、STALL は、細胞内信号分子の PLC γ の結合サイトを用意し、細胞内カルシウム応答のプラットフォームとしてはたらくことを見出している。案の定、MAC 形成後に細胞内カルシウム応答が確認され、CD59 の貫通型キメラタンパク質を発現した細胞では、確認できなかった。これらの結果は、MAC 形成により誘起された CD59 の安定なクラスターラフトが、STALL というシグナル伝達のプラットフォームを形成し、細胞内のカルシウム応答を誘起していることを示している。

定常状態における細胞形質膜は、準安定状態にある、つまり、ほんのわずかなタンパク質の変化が分子間の相互作用の微妙なバランスをシフトさせ、安定なクラスターラフトを誘起し、それが細胞内信号伝達を誘起すると提案した。

免疫染色のための細胞膜分子の固定法

ラフト内外での分子の分布を研究するために、細胞膜を固定後抗体ラベル金コロイドで分子をマーキングし、電子顕微鏡で観察することが、しばしば行われてきた。しかし、固定が不十分な場合、抗体処理の過程で抗原分子が集合してしまい、もとの分子の分布とは全く違った分布になってしまう。細胞膜上では、分子の凝集自体がシグナルになることも多いので、さらに、その部分に別の未固定分子がリクルートされてくる可能性がある。従って、「2種類の分子が多数集まって働いている」という「発見」をしたという誤解が起こりうる。これが、まさに細胞膜上でのラフト研究において起こり、ラフト研究に大きな混乱を起こしていたことが分かってきた。さきがけ研究により、様々なラフト分子を化学「固定」した後に、我々が開発してきた1分子イメージング法を用いて観察したところ、通常の化学固定条件では、多くのラフト分子が、まだ動き回っていることがわかった。1分子法は、固定処理後の細胞膜分子のように、易動度が1分子毎に大きく違うときに、それらを細大漏らさず調べるために極めて有用であった。さらに、最近の多くの固定法では、抗体の結合を減らさないという配慮が優先され、固定の程度が極めて弱いことが示された。このように、化学固定後の分子運動を1分子追跡によって調べた結果は、過去50年の免疫抗体染色データに見直しを迫ることとなった。この成果は、Nature Methods, 7, 855-856, 2010 に掲載された。また、読売新聞、京都新聞、日刊工業新聞で報道された。

3, 今後の展開

刺激後、CD59 は安定なホモオリゴマーを形成し、短期間一時停留を繰り返しながら、カルシ

ウム応答などの細胞内の下流シグナルを誘起することを明らかにした。一方で、様々なシグナル分子が CD59 クラスターラフト内で 100-200 ミリ秒という短期間活性化されていることを、さきがけ研究以前に見出していた。個々のパルスのシグナルが、どのようにして細胞全体のシグナル強度を調整しているのかという問題は、次の面白い課題である。1 分子 FRET の観察技術は、このさきがけ期間中に確立したので、シグナル分子の活性化や不活性化の瞬間を高速 1 分子 FRET 観察することで、この課題に挑みたい。蛍光色素のプリンキング (明暗を繰り返すこと) が、1 分子 FRET による活性化と不活性化のサイクルの高速時間分解能観察の邪魔になるのが問題だった。しかし、最近になってプリンキングを制御し、蛍光 1 分子を長時間観察する方法も見出せそうになったので、シグナル分子の活性化の可視化解析は実現できると考えている。

また、1 分子共局在観察、1 分子 FRET 観察、1 分子 BiFC 観察など、膜分子のホモ多量体、ヘテロ多量体やクラスターの形成を観察するための基盤技術を創出できたので、今後はこの技術を利用し、ラフト分子に限らず他の様々な重要な受容体に関する問題に挑戦していきたい。

4, 自己評価

当初の目的は、信号入力前の定常状態でのラフト構造を明らかにし、ラフト中の GPI アンカー型受容体刺激後、どのようにしてシグナルを細胞内へ伝達するのかを解明することであった。さきがけ研究では、GPI アンカー型受容体の短寿命ホモ 2 量体が形成されることを見出した。また、このホモ 2 量体は、受容体刺激後にシグナル伝達分子をリクルートし、シグナルを下流へ伝える能力を持つ安定なホモ 4 量体形成のためのソースとなっていることを発見した。また、高速時間分解能での受容体の拡散の観察から、ホモ 2 量体のまわりに広がるラフトの大きさは、大きくてもせいぜい数ナノメートル程度であることが明らかとなった。つまり、ラフト経由のシグナル伝達を誘起するための最小ユニットを見出したといえる。「コレステロールなどの脂質相互作用の関わる分子集合体をもラフトと呼んでも良い」と多くの研究者が言い始めているのを考慮すると、このシグナル伝達のための最小ユニットもラフトと言っても良いであろう。当初の目標の一部を達成できたと思うが、一方で、これでラフトの全容が分かったわけではない。細胞膜上で 37°C で脂質相互作用だけで 1 μ m くらいの直径のラフトが形成されるという「初期ラフト仮説」を多くの研究者が疑問視するようになってきたが、ラフトについて、まだまだ分かっていないことが多い。ラフト分子、非ラフト分子の拡散挙動を高精度で観察し、研究を続けていく必要がある。

5, 研究総括の見解

細胞膜上で膜受容体を低発現させ高い蛍光ラベル効率で 1 分子観察する手法を確立したことを高く評価する。そのことより、高速時間分解能 1 分子観察により推測されたラフトの基本構造モデルを提唱するまでに進めた。今後、さらに、新しい視点を加えて、ラフト経由のシグナル伝達機構を解明することを目指してほしい。

6, 主な研究成果リスト

(1) 論文 (原著論文) 発表

1. Suzuki, K. G. Biotechnology Journal (Review) in press.
2. Kusumi, A., Suzuki, K. G., Kasai, R. S., Ritchie, K., Fujiwara, T. K. Hierarchical mesoscale

domain organization of the plasma membrane. (Review) Trends in Biochemical Sciences, 36, 604-615, 2011.
3. Kasai, R.S., <u>Suzuki, K.G.</u> , Prossnitz, E.R., Koyama-Honda, I., Nakada, C., Fujiwara, T. K., Kusumi, A. Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. J. Cell Biol. 192, 463-480, 2011.
4. Tanaka, K.A.*, <u>Suzuki, K.G.</u> * (*equal contribution), Shirai, Y. M., Shibutani, S. T., Miyahara, M. S., Tsuboi, H., Yahara, M., Yoshimura, A., Mayor, S., Fujiwara, T. K., Kusumi, A. Membrane molecules mobile even after chemical fixation. Nature Methods, 7, 855-856, 2010.
5. <u>Suzuki, K. G.</u> , Kusumi A. Mechanism for signal transduction in the induced-raft domains as revealed by single-molecule tracking. (Review) Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 20, 341-351, 2008.

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物等)

国際学会招待講演

1. K. G. N. Suzuki (2011, Aug.)
Single-molecule imaging studies of meso-scale raft domains in cell plasma membranes. International Conference on futuristic science and technology in frontier areas & 2nd annual conference of indian JSPS alumni association, Trivandrum, India (Invited Speaker)
2. K. G. N. Suzuki (2011, Jul.)
The 2nd Heidelberg-Kyoto Joint Symposium, Heidelberg, Germany (Invited Speaker)
3. K. G. N. Suzuki (2010, Dec)
How does the meso-scale raft domain exist and transform to work? : a single-molecule imaging study. The 2nd iCeMS-NCBS Joint Symposium, Kyoto, Japan (Invited Speaker)
4. K. G. N. Suzuki (2010, Nov.)
Single-molecule imaging studies of meso-scale raft domains in steady-state cells. Association of Pacific Rim Universities Research Symposium, Kyoto, Japan (Invited speaker)
5. K. G. N. Suzuki (2010, Nov.)
Meso-scale raft domains: whether and how they exist and work in steady-state cells? The 8th iCeMS international symposium, Kyoto, Japan (Invited speaker)
6. K. G. N. Suzuki (2010, Jan.)
Lipid-stabilized homo-dimers of GPI-anchored proteins based on ectodomain protein interactions. The 13th International Membrane Research Forum, Kyoto, Japan (Invited speaker)
7. K. G. N. Suzuki (2009, Jun.)
Mechanism for RAFT-based signal transduction as studied by single-molecule tracking. The 5th Leukocyte Signal Transduction Workshop, Crete, Greece (Invited Speaker)