

ディジタルシグナル変換場としてはたらく on-demand ラフトドメイン

楠見明弘^{1, 2)}*・鈴木健一^{1, 3)}

1) 京都大学 物質-細胞統合システム拠点 2) 科学技術振興機構ICORP膜機構プロジェクト
3) 科学技術振興機構さきがけ 〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町53

Functional Raft Domains Formed on Demand as a Platform for Digital Signal Transduction

Akihiro Kusumi^{1, 2)}* and Kenichi Suzuki^{2, 3)}

1) Membrane Mechanism Project, International Cooperative Research Project (ICORP), Japan Science & Technology Agency (JST), 2) Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan, 3) Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science & Technology Agency (JST)

In recent years, “raft hypothesis”, in which hypothetical membrane domains, called lipid raft domains, might act as platforms where signaling molecules are assembled for their interactions and functions in/on the plasma membrane. Using single-molecule tracking, we have found such domains are only formed on-demand upon stimulation-induced clustering of receptors that can be associated with raft domains. Furthermore, signaling molecules are recruited to such induced rafts transiently (of the order of 0.1 s). Therefore, in this review, we propose that raft-related bulk intracellular signals that tend to last over 1000 s might be pulse coded or frequency modulated by the pulse-like digital activation of individual molecules, and that the intensity of the bulk signal might mainly be determined by the number of pulses at a given time. Such on-demand rafts are considered to be involved in bovine spongiform encephalopathy development, HIV infection, and Alzheimer disease pathogenesis, and this finding sheds new light on these processes.

Key words : single molecule GPI-anchored protein / signal transduction / raft domains

1. はじめに

細胞を包んでいる細胞膜上の受容体に、細胞外からやってきたシグナル分子が結合すると、それが細胞内に伝わり、細胞反応が起こる。今までは、このようなシグナル変換過程は、受容体などのタンパク質が担うものと考えられてきた。

最近、私たちは、グリコシルホスファチジルイノ

シトール (GPI) アンカー型受容体において、タンパク質分子だけではなく、受容体分子の周辺の細胞膜構造が局所的に変化して、シグナルが伝わるという事例を初めて見つけた^{1, 2)}。具体的には、免疫関連の GPI アンカー型受容体 CD59 という受容体である。シグナル分子が CD59 に結合すると、CD59 が数個集まって (細胞膜は液体なので、このようなことが可能である) 集合体を形成する。そうすると、その集合体部分に、やはり細胞膜が液体であることを利用して、細胞膜中のコレステロールや糖脂質などが集合してくる。いわば細胞膜という海の中で、CD59 を中心にしたイカダのような構造 (ラフト) が形成され

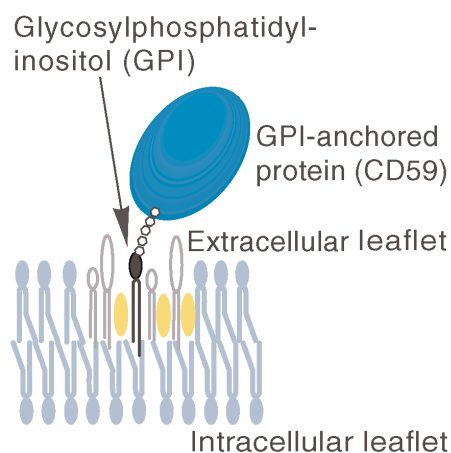


Fig. 1 Schematic drawing of a GPI-anchored protein, which is located in the extracellular leaflet of the plasma membrane.

ることがわかってきた。さらに、このラフトに多くのシグナルタンパク質が集まってきて、細胞内にシグナルが伝わるということがわかった。

従来は、ラフトは細胞膜上にいつも存在している膜領域だと考えられ、その存在を証明するために、世界中の学者が研究していた。しかし、私たちの結果は、機能性ラフトは、シグナルがきて初めて、オンデマンドで（必要に応じて）形成されることを示したという点で画期的であると考えている。さらに、細胞内へのシグナル伝達の仕組みの解明に大きな一歩を進めることができた。このような発見が可能になったのは、生細胞中で、複数種のシグナル分子を同時に1分子ずつ追跡する技術を開発できたからである^{3~5)}。この方法によって、ラフトが形成され、シグナル分子が集まってくる様子がまさに手に取るように見えてきたのである。

このような、オンデマンドで形成されるラフトは、牛海綿状脳症 (BSE)、エイズウィルスの感染、アルツハイマー病の発症に関わっていると考えられ、これらの感染や発病過程の解明につながることを期待される。

2. 研究の背景

細胞膜上には、ホルモンや成長因子のような細胞外からのシグナル分子を受け取って、細胞内にそのシグナルを伝える受容体分子が存在する。しかし、受容体分子の約10%は、受容体としては一見、不都合な構造を持っている。たとえば、GPIアンカー型受容体 (glycosylphosphatidylinositol = グリコシル・ホスファチジルイノシトール・アンカー型受容体)

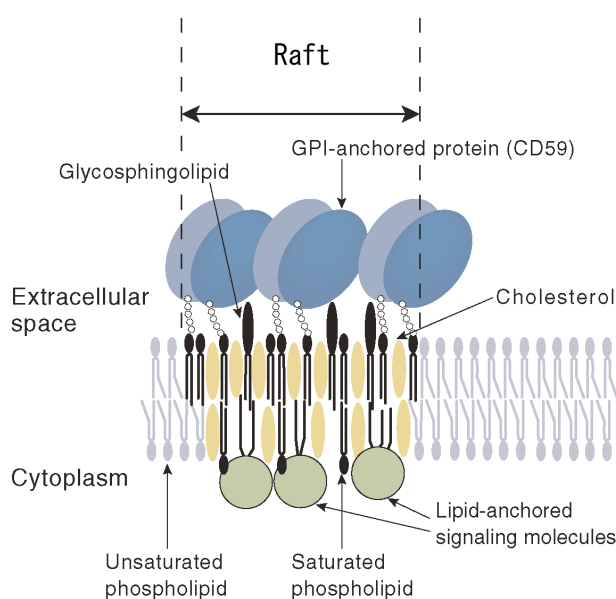


Fig. 2 Schematic figure showing the hypothetical structure and molecular composition of a raft domain, where GPI-anchored proteins, glycosphingolipids, cholesterol, and cytoplasmic lipid-anchored signaling molecules are concentrated.

と呼ばれる受容体は、細胞膜の外側表面にあり、細胞内に露出しておらず、したがって、この分子だけでは細胞内にシグナルが伝わらない (Fig. 1)。このような受容体が、どのように細胞内にシグナルを伝えるのか、というのは、この20年来の大きな疑問であった⁶⁾。

近年、GPIアンカー型タンパク質のシグナル変換は、ラフトを介して起きていると考える研究者が増えている。しかし、上記の通り、これがどのようにして起こるのかは全くわかっていない。最近、我々は、1分子レベルでの膜分子の運動^{4,7)}や分布・反応³⁾を調べる方法を開発し、生細胞中でラフトがはたらく仕組みの一端を解明した^{1,2)}。本稿では、その研究結果を解説したい。

今までは、細胞膜上に、直径100 nm～数ミクロンの大きさの安定な構造を持つラフトと呼ばれる領域が常に多数存在していて、その構造にいろいろな分子が取り込まれてシグナル伝達が起こるという考えが大勢を占めていた。しかし、そのようなラフトの存在は、多くの研究者の努力にかかわらず実証できなかった^{8,9)}。

ラフトの構造は、あくまで仮説ではあるが、Fig. 2に示すようなものであると想定されていた¹⁰⁾。膜の外層にはスフィンゴ糖脂質、コレステロール、GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型タンパク質

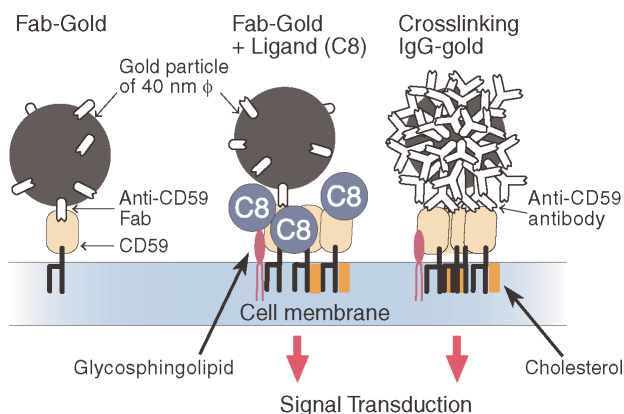


Fig. 3 Probes used in this work. Non-stimulated CD59 was observed using 40-nm ϕ -gold particles conjugated with small numbers of anti-CD59 Fab fragments (Fab-Gold; left), which hardly induced CD59 crosslinking. To observe CD59 engaged in signaling, CD59 was first tagged with an Fab-Gold particle, and then the ligand (C8) was added (middle), or CD59 was crosslinked by 40-nm ϕ -gold particles conjugated with anti-CD59 whole IgG (IgG-Gold; right). Clustering of CD59 induces the assembly of glycosphingolipids and cholesterol, i.e., a raft-like structure within the CD59 cluster, termed CD59-cluster raft.

などが、内層には Src family kinase (SFK) や G α i, H-Ras などの G タンパク質など、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とするものである。この仮説が初期には受け入れられやすかったのは、以下の事情による。まず、細胞膜には、低温下で Triton X-100 のような非イオン性界面活性剤で処理しても溶解しない成分があり、さらに、密度勾配遠心で低密度側に分画された成分は、このような、バルク細胞膜とは全く違う組成を持っていたことがある。さらに、人工膜で同様の操作をすると、秩序液晶相 (Lo 相) や固相 (S 相) の膜領域が同様な性質を示し、特に、糖脂質やコレステロールがこれらの相を作り易いだけでなく、低密度分画に回収される、ということもわかった。これらに基づいて、「ラフト成分」という分子群が定義されてきた¹¹⁾。しかし、最近では、それほど事情は簡単ではなく、界面活性剤不溶低密度分画 (detergent-resistant membrane fraction = DRM) と生理的条件下にある生細胞のラフト領域とは、同一ではないことが明らかにされている^{8,9)}。たとえば、活性化されていない H-Ras は代表的なラフト分子だと思われるが、低温下の界面活性剤処理によって簡単に可溶化される。したがって、きわめて多くの文献で、DRM のことをラ

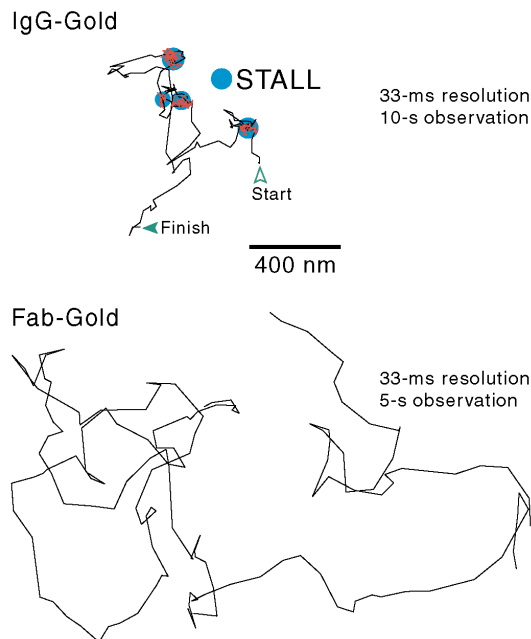


Fig. 4 CD59-cluster rafts undergo alternating periods of STALL and apparently-simple diffusion. (Top trajectory) A typical trajectory of a single CD59-cluster raft recorded at video rate. CD59-clusters exhibit alternating periods of apparently simple-Brownian diffusion (black trajectories) and STALL (magenta trajectories in the circular blue areas). (Bottom trajectory) A representative trajectory of a Fab-Gold attached to a CD59 molecule recorded at video rate, shown for comparison with the upper trajectory of IgG-Gold.

フト領域と表現しているが、これは間違いであり、この重要な研究領域に、無用の混乱を招いている。DRM のことは、DRM と書けば、正確で混乱を誘起する心配はない。しかも、DRM とラフト領域の間には、簡単ではないが、密接な関係があることはすでに周知なのである。

3. GPI アンカー型受容体の会合による on-demand 誘導ラフトの形成

我々は、まず、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。この方法によって、シグナル分子が集まってくる様子がまさに手に取るように見えてきたことで、面白い発見にいたったのである。

研究のパラダイムとしては、CD59 という GPI アンカー型受容体を用いた (Fig. 1, Fig. 3 左: 1 分子追跡のための金コロイドプローブの結合の様子も示す)。

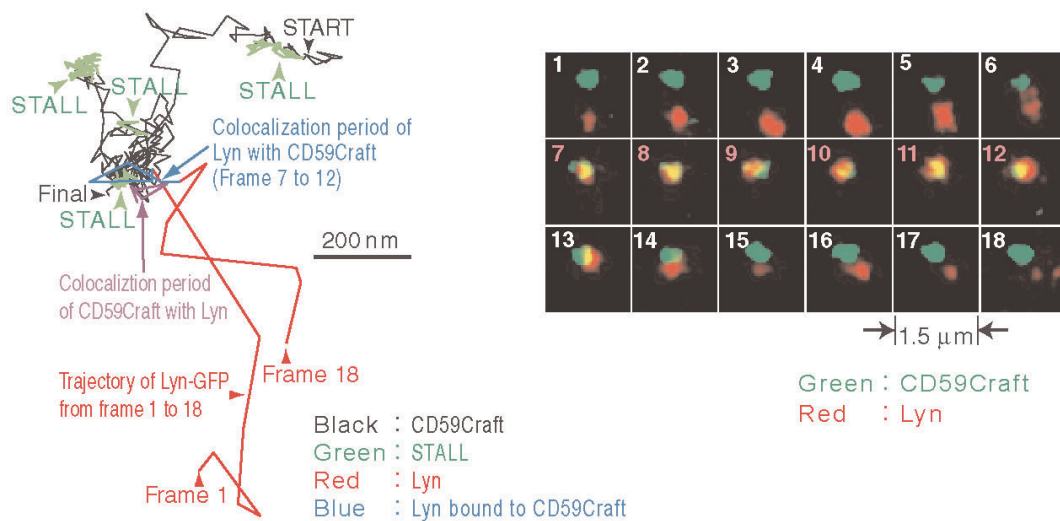


Fig. 5 Single-molecule detection of the transient recruitment of Lyn-GFP to CD59-cluster rafts. Right. Image sequences showing superimposed video frames of simultaneous recordings of a CD59-cluster raft (green spot) and single molecules of Lyn-GFP (red spot). A single Lyn-GFP molecule was colocalized from frame 7 until 12 (pink frame numbers). Left. A typical trajectory of a CD59-cluster raft (black), including STALL periods (the green parts of the trajectories) and a period (the purple part of the trajectories) in which it was colocalized with Lyn-GFP (blue part in the otherwise red trajectory; it overlaps with a STALL site, but at different times).

CD59は補体第8成分 (C8) の受容体で、自己の補体による攻撃から細胞を守るシグナル経路の最初にある受容体である。C8を添加するとCD59は会合する (Fig. 3中)。他の多くの受容体と同様に、ここでも、会合がシグナル経路をトリガーする。すなわち、多数の抗体を結合させた直径40 nmの金粒子でCD59を集合させても (Fig. 3右)、カルシウムスパイク、IP₃生成、Src-family kinase (SFK) の活性化などの細胞内シグナルが誘起された (我々の観察している初期過程では、すべてのカルシウムシグナルはIP₃による、すなわち、ERからIP₃チャネルを通して放出されること、このようなIP₃-Ca²⁺シグナルの発生にはSFKが必要なこともわかった)。

1個の金粒子直下には平均6個のCD59分子が集積され、コレステロールやガングリオシドが濃縮された (しかし、非ラフト分子は集まってこない)。すなわち、CD59が会合することで始めて、免疫染色法で観察できるような大きく安定なラフトドメインが形成されることがわかった (Fig. 3中、右)。これを、CD59クラスターラフト、簡単にはCD59Craft (あるいは、単にCraft) と呼ぶことにする。通常の実験では、このようなCraftが、細胞当たり平均600個できる条件、すなわち、3600個のCD59分子が信号入力に参加している条件で実験した。この条件下で、細胞のシグナルは非常に安定して起こる (Fig. 3中、右)。また、CD59をクロスリンクしない (少量の

Fab断片で被覆した) 金粒子をコントロールとして使用した (Fig. 3左)。

4. CD59 クラスターラフトの異常な挙動：STALL

細胞膜上で1個ずつのCD59Craftを観察すると、極めて異常な挙動が観察された。すなわち、単純ブラウン運動と一時停留を繰り返すのである。この2状態にある時間は、おのおの指数関数の分布を持ち、特性時間は、それぞれ、約1.2秒と約0.6秒であった。すなわち、すべてのCraftは、一時停留と拡散を約1:2の割合で繰り返すという、誰も予想していなかったような拡散運動を示したのである (Fig. 4上、下の図は、シグナル入力前のCD59モノマーの運動、上の軌跡は10秒間のもの、下は5秒間のもので、下では短時間であるにもかかわらず、大きな範囲をカバーしていることに注意)。

多数分子の平均運動を調べる方法、例えば、FRAPやFCSなどでは、このような奇妙な運動の発見は、難しいであろう。また、液体の細胞膜では、分子は運動して当たり前であり、その中で拡散運動が停止するというのは、そこで、極めて面白い制御機構がはたらいっていることを示唆する。そこで、このような一時停留を、Stimulation-induced Temporary Arrest of Lateral diffusion (STALL=失速の意) と名

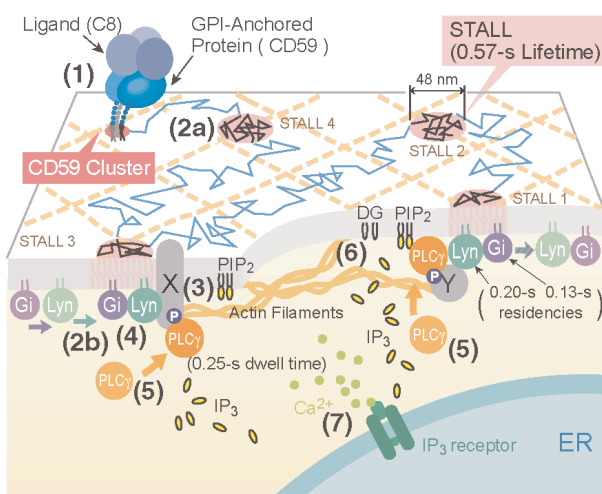


Fig. 6 A working model showing how STALL of CD59 clusters may be induced and how it may function as a transient platform for transducing the extracellular CD59 signal to the intracellular IP_3 - Ca^{2+} signal.

- (1) When CD59 is liganded, it forms clusters, which in turn concentrate cholesterol and glycosphingolipids, forming CD59-cluster rafts.
- (2) These CD59-clusters undergo slow, apparently-simple Brownian diffusion (2a), while frequently and transiently recruiting Lyn, for ≈ 0.20 s (median, 2b)
- (3) Lyn recruitment may be mediated by raft-based interactions as well as by protein-protein interactions with an as-yet unknown transmembrane protein X that has certain levels of affinity to the protein moiety of Lyn (and perhaps to $\text{Gai}2$) and to that of CD59 (avidity to CD59-clusters) as well as an affinity for the raft nanodomains.
- (4) $\text{Gai}2$ molecules are transiently recruited to CD59-cluster rafts, for ≈ 0.13 s (median). When the $\text{Gai}2$ molecule meets with Lyn molecules that are also recruited at the same CD59-cluster raft, they form a complex at the CD59-cluster rafts, leading to Lyn activation. Both $\text{Gai}2$ and Lyn soon leave the CD59-cluster rafts.
- (5) Lyn activation concurrently induces both STALL of the CD59-cluster rafts and transient $\text{PLC}\gamma 2$ recruitment at the CD59-cluster raft (≈ 0.25 s, median).
- (6) $\text{PLC}\gamma 2$ would produce 20 ~ 50 IP_3 molecules.
- (7) The increase in the IP_3 concentration will lead to the release of Ca^{2+} from the intracellular pool (ER).

付けた。さらに、細胞膜からコレステロールを部分除去したり、アクチン線維を部分破壊したり、SFKや Gai の活性を薬剤処理により阻害するとSTALLが消失すること、しかも、これと同時に、 IP_3 - Ca^{2+} シグナルも消失することがわかった。すなわち、STALL

は、CD59のシグナル変換の根幹に密接に関わっていることがわかってきたのである。

5. CD59 クラスターラフトへのシグナル分子の短寿命リクルートの1分子直接観察

そこで、CD59Craftにシグナル分子がやってくることを1分子観察し、それらがやってくるタイミングとSTALLのタイミングとの相関を調べることにした。これには、極めて進んだ1分子法、すなわち、Craftと、GFP標識したLyn (SFKの1種)、 Gai 、 $\text{PLC}\gamma$ などのシグナル分子の同時1分子観察が必要であるが、これを何とか達成した (Fig. 5は、LynのCraftへの短時間リクルートの様子を示す)。この困難な実験は、収穫も大きかった。すなわち、以下のようなめざましい発見があったのである (Fig. 6)。拡散しているCraft (Fig. 6 (1), (2)) にはLynがしょっちゅうリクルートされてきている (Fig. 6 (2b))。そこに、さらに Gai がリクルートされると (Fig. 6 (4))、0.3秒以内にCraftはSTALLを起こす。 Gai はLynの直接の上流シグナル分子であるので、同じCraftにリクルートされることでLynを活性化すると考えられる。活性化されたLynは膜の表裏をつなぐ未知の膜貫通型タンパク質 (Fig. 6 (3) のX)、膜骨格アクチン線維に結合している未知のタンパク質Yなどをリン酸化し、これがCraftのアクチン線維への結合、すなわちSTALLを誘起する、と推定している (Fig. 6 (5))。

さらに、LynがCraftにリクルートされるための分子間相互作用として、Lynのアルキル鎖であるパルミトイル基やミリストイル基とラフトとの相互作用が必要なこと、さらには、Lynのタンパク質部分とすでにCraft内にある他のタンパク質とのタンパク質部分での相互作用も重要であることがわかった (Fig. 6 (2b) (3))。

しかも、STALL中にのみ、 PIP_2 から IP_3 を産生する $\text{PLC}\gamma$ がリクルートされてきた (Fig. 6 (5), (6))。すなわち、STALL領域でのみ、 PIP_2 から IP_3 が産生されていると考えられる。ところで、STALLの継続時間は0.6秒程度であったので、 $\text{PLC}\gamma$ のCraft上での滞在時間はさらに短いはずである。実際に測定すると、平均で250ミリ秒であった。酵素のturnover速度を考えると、この時間内に、約50個の IP_3 分子が $\text{PLC}\gamma$ の1回のリクルートで産生されることになる。これがERの IP_3 チャネルを開いて、カルシウムシグナルを発生している (Fig. 6 (7))。すなわち、STALL領域は、細胞外からCD59にやってきたシグナルを細胞内のカルシウムシグナルに変換するプラットフォームなのである。このような機構は、多数分子の平均を

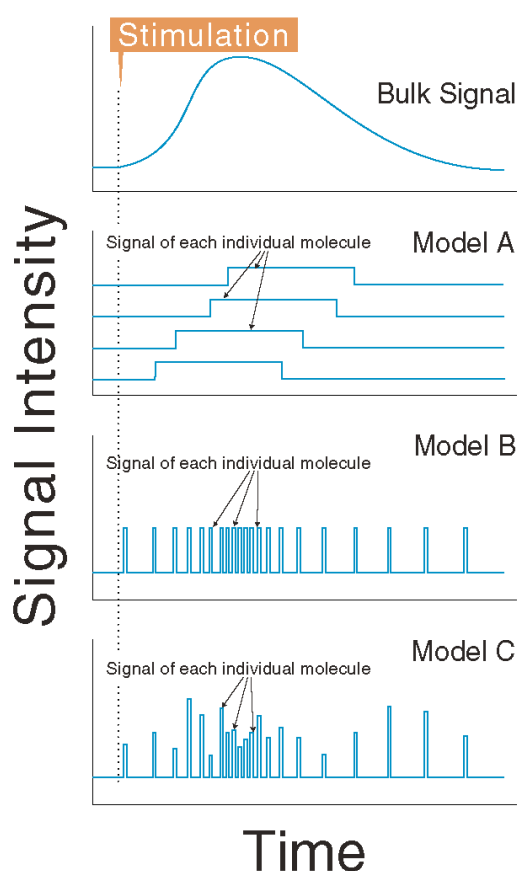


Fig. 7 Prolonged bulk signal (top panel) may be produced by the addition of extremely-short, pulse-like recruitment of single molecules. Model A, called the “complex integration model”, describes the case where each individual signaling event lasts for a length comparable to that for the bulk signaling, which would necessitate a complicated integration of these signals to realize the desired level of the bulk signal. Model B, called the “simple summation model” or “digital signal model”, describes the case where each single-molecule event occurs like a digital pulse, as compared with the duration of the bulk signal, which then can simply be added up to generate the desired bulk signal, without the need for complicated integration. Model C. Fuzzy digital signaling might be a possibility.

見ていたのでは、全くわからなかったであろう。

6. ラフトにおけるデジタル式シグナル変換機構

調べた3種のシグナル分子はすべて、Craft上での滞在時間は予想よりもはるかに短かく、0.1秒のオーダーだった。これも、全く想定外の発見で、イメー

ジングで見られるバルクの応答は1000秒のオーダーで継続するのに比べると、1万分の1である。この2つの現象は、どのように統一的に理解できるのだろうか？

Fig. 7をご覧ください。上のグラフは、イメージング法などで得られるような、細胞のある領域でのバルクシグナルの時間変化で、通常観察されるアナログ的变化を示している。このような数分から数十分続くようなシグナルは、1分子のレベルで見ても1分～数分間の活性化として観察できるものと仮定してきた。すなわち、真ん中のグラフに示すモデルAのような活性化が重なり合ってできるものと考えられてきた。しかし、個別の分子がモデルAのような活性化パターンを示すと、それらの分子の合計から、シグナル強度も時間も正しい上のようなグラフを作るのは、システム制御の観点からいうと極めて難しい。他の分子の不活性化時間を予測しながら、次の分子を活性化するタイミングを決めなくてはならないからである。それを、細胞がどのようにやっているかというのは想像もつかなかったのである。

ところが、本研究で、少なくともラフトが関わるシグナルでは、1分子のはたらく時間は0.1秒オーダーであること、すなわち、バルクシグナルに比べると、1分子のシグナルは、パルス状であることがわかった。そうすると、バルクシグナルのある時間での強度は、大雑把には、パルス数で決まることになり、これなら制御が極めて易しい（モデルB）。

現在、私たちは「細胞膜でのシグナル変換の基本はデジタル式」という作業仮説をもとに、研究を進めている。個々のパルスの大きさは、実際には、モデルCのように、ばらついているものと考えている。これは、システム工学的にはファジー制御と呼ばれるもので、これらの実態を明らかにしていきたい。また、他のラフト分子、さらには、ラフトに関わらない受容体のシグナル変換についても検討を進めている。

7. 今後の展開

今後は、上記の未知のタンパク質XとYを発見すること、ほかの種類のGPIアンカー型受容体では、これらのXとYがどのように違うのかを解明していきたい。これによって、誘導ラフトによるシグナル変換機構の研究は、さらに大きく進展することが期待できる。

さらに、GPIアンカー型受容体の会合がラフトを誘導する機構の解明も重要である。このようなラフトの刺激依存的な on-demand 形成は、牛海綿状脳症

(BSE), エイズウイルスの感染, アルツハイマー病の発症など, 細胞膜のラフトに関わる感染や発病過程の解明につながることが期待されるからである. 特定のタンパク質の細胞膜上での会合とラフト誘導との関係を理解することによって, これらの病気の発症を阻害する方法などの開発も可能になるかもしれない.

文 献

- 1) Suzuki KGN, Fujiwara TK, Sanematsu F, Iino R, Edidin M, and Kusumi A : *J. Cell Biol.*, **177**, 717-730 (2007)
- 2) Suzuki KGN, Fujiwara TK, Edidin M, and Kusumi A : *J. Cell Biol.*, **177**, 731-742 (2007)
- 3) Murakoshi H, Iino R, Kobayashi T, Fujiwara T, Ohshima C, Yoshimura A, and Kusumi A : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 7317-7322 (2004)
- 4) Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, and Fujiwara T : *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 351-378 (2005)
- 5) Koyama-Honda I, Ritchie K, Fujiwara T, Iino R, Murakoshi H, Kasai RS, and Kusumi A : *Biophys. J.*, **88**, 2126-2136 (2005)
- 6) Stefanova I, Horejsi V, Ansotegui IJ, Knapp W, and Stockinger H : *Science*, **254**, 1016-1019 (1991)
- 7) Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, and Kusumi A : *J. Cell Biol.*, **157**, 1071-1081 (2002)
- 8) Munro, S : *Cell*, **115**, 377-388 (2003)
- 9) Kusumi A, Koyama-Honda I, and Suzuki K : *Traffic*, **5**, 213-230 (2004)
- 10) Simons K, and Ikonen E : *Nature*, **387**, 569-572 (1997)
- 11) Brown D A, and Rose J K : *Cell*, **68**, 533-544 (1992)

(Received 20 July 2008 ;

Accepted 23 July 2008)

著者略歴

楠見 明弘 (くすみ あきひろ)

1975年 京都大学理学部卒業
 1980年 京都大学大学院理学研究科卒業 理学博士号取得 (大西俊一教授 指導)
 1980年 米国ウィスコンシン医科大学 National Biomedical EPR Center (James S. Hyde教授) 博士研究員
 1982年 プリンストン大学生物学科 (Malcolm S. Steinberg教授) 博士研究員
 1984年 京都大学理学部生物物



理学教室 助手

1988年 東京大学大学院総合文化研究科 助教授

1984年～1994年 ウィスコンシン医科大学 客員教授

1997年 名古屋大学大学院理学研究科 教授

1998～2003年 JST-ERATO 楠見膜組織能プロジェクト 総括責任者

2003～2005年 JST-SORST 楠見チーム チームリーダー

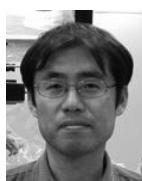
2005年 京都大学再生医科学研究所 教授

2007年 京都大学物質-細胞統合システム拠点 教授 (配置換え) (文科省 World Premier International Center Program によるセンター The Institute for Integrated Cell-Material Sciences = iCeMS)

同時に京都大学再生医科学研究所 教授

京都大学大学院工学研究科 (マイクロエンジニアリング専攻) 教授
 京都大学大学院医学研究科 教授を兼任

2005年～現在 JST-ICORP 膜機構プロジェクト 総括責任者



鈴木 健一 (すずき けんいち)

1991年 3月 京都大学工学部卒業
 1993年 3月 京都大学大学院工学研究科修士課程修了
 1996年 11月 京都大学大学院工学研究科博士号取得
 1996年 11月 デューク大学メディカルセンター博士研究員
 1999年 2月 科技振ERATO 楠見膜組織能プロジェクト研究員
 2003年 10月 科技振SORST研究員
 2005年 4月 京都大学再生医科学研究所 特任助手
 2007年 4月 同 特任助教
 2008年 4月 京都大学物質-細胞統合システム拠点 特任助教
 2008年 10月 科技振さきがけ研究者