

総説

デジタルシグナル変換場としてはたらく誘導ラフトドメイン

鈴木健一^{1,2}, 楠見明弘^{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PRESTO³科学技術振興機構ICORP膜機構プロジェクト

Hypothetical membrane domains, called lipid raft domains, have been investigated, using single-molecule tracking. Such domains are formed on-demand upon stimulation-induced clustering of raft-associable receptors. Furthermore, signaling molecules are recruited to such induced rafts transiently (of the order of 0.1 s). Therefore, 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.

single-molecule tracking / plasma membrane / signal transduction / raft domains

1. はじめに

近年、「ラフト仮説」が大きな注目を集めている。細胞膜上には、ラフト領域という特殊な膜領域が存在し、そこに、さまざまなシグナル分子が濃縮されて相互作用を行い、シグナル変換をおこなうという仮説である^{1)~4)}。ラフト領域は、細胞の増殖や接着、免疫など、非常に広範囲にわたる生命現象において、シグナル変換のためのプラットフォームとしてはたらくしていることを示唆するデータが蓄積しつつある。

ラフトの構造は、あくまで仮説ではあるが、**図 1**に示すようなものであると想定されている。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などが、内層には Src family kinase (SFK) や Gαi, 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。

ところで、細胞膜上の受容体のうち約 10% は、細胞外にあるタンパク質部分が GPI とよばれるリン脂質に共有結合することにより細胞膜にアンカーされており、GPI アンカー型受容体とよばれている。この受容体は細胞膜内側には露出していないので、どのようにして細胞外からのシグナルを細胞内に伝えているのか

が長い間疑問であった⁵⁾。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、これがどのようにして起こるのかはまったくわかっていなかった。最近、われわれは、1分子レベルでの膜分子の運動^{6),7)}や分布・反応⁸⁾を調べる方法を開発し、これを GPI アンカー型受容体シグナル伝達系に適用し、受容体が生細胞中でラフトを介してはたらく仕組みの一端を解明した^{9),10)}。本稿では、その研究結果を解説したい。

2. 刺激によって GPI アンカー型受容体は会合し、誘導ラフトを形成する

具体的な実験系として、CD59 という GPI アンカー型受容体のシグナル変換機構を調べた。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。他の多くの受容体と同様に、ここでも受容体の会合がシグナル伝達を誘起する (**図 2a**(1))。多数の抗 CD59 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、IP₃ 信号系の活性化による Ca²⁺ スパイク、IP₃ 生成、Src-family kinase (SFK) の活性化などの細胞内

Induced Raft Domains Working as a Platform for Digital Signal Transduction

Kenichi G. N. SUZUKI^{1,2} and Akihiro KUSUMI^{1,3}¹Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University²The Dynamic Mechanism of and Fundamental Technology for Biological System, Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science & Technology Agency (JST)³Membrane Mechanism Project, International Cooperative Research Project (ICORP), Japan Science & Technology Agency (JST)

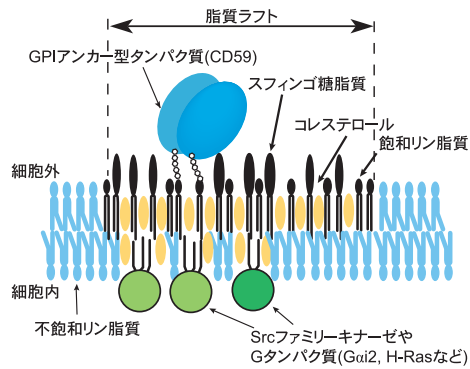


図1 ラフトの模式図。

シグナルを誘起させることができる。1個の金粒子直下には平均6個のCD59分子が集積される条件を用いた。通常の実験では、このような会合体が、細胞あたり平均600個でき、3,600個のCD59分子が信号入力に参加している条件を用いた。この条件下で、細胞のシグナルは非常に安定して起こる。

さらに興味深いのは、CD59会合体にコレステロールやガングリオシドが濃縮されたが、非ラフト分子は集まってこなかったことである。すなわち、CD59が会合することで、大きく安定なラフトドメインが初めて誘導形成されることがわかったのである(図2a(1),(2))。これを、CD59会合体ラフトとよぶことにする。

3. CD59 会合体ラフトの異常な拡散挙動:STALL

細胞膜上で個々のCD59会合体ラフトを観察すると、単純ブラウン運動と一時停留を繰り返すというきわめて特異な挙動が観察された(図2a(5))。この2状態にある時間は、おのおの指数関数の分布をもち、寿命はそれぞれ約1.2秒と約0.6秒であった。つまり、すべての会合体ラフトは、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(図2b)。

多数分子の平均運動を調べる方法、たとえば、FRAP(蛍光退色回復法)やFCS(蛍光相関分光法)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、2次元液体の細胞膜では、分子は運動してあたり前であり、その中で拡散運動が停止するというのは、そこできわめて面白い制御機構がはたらいていることを示唆している。そこで、このような一時停留を、Stimulation-induced Temporary Arrest of Lateral diffusion

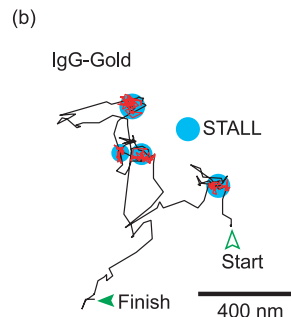
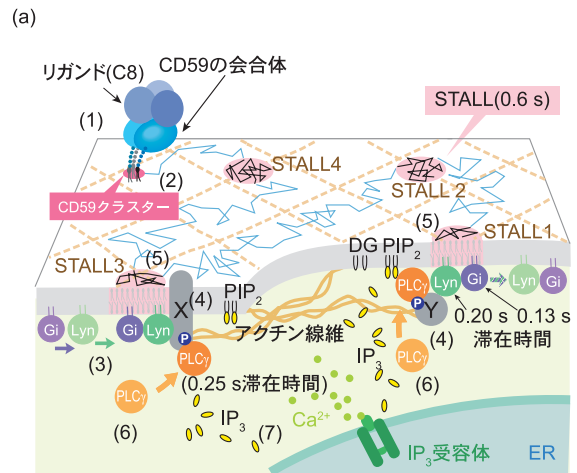


図2 (a) CD59会合体ラフトにシグナル分子が集まり、STALLが誘導され、そこで、IP₃シグナルが誘起されるという作業仮説。(b) CD59会合体ラフトの典型的軌跡。時間分解能33ミリ秒で10秒間の軌跡。CD59会合体ラフトは拡散(黒い軌跡)とSTALL(軌跡の赤色部分、青でハイライト)を繰り返す。

(STALL = 失速の意)と名付けた(図2a(5))。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、IP₃-Ca²⁺シグナルも消失することがわかった。つまり、STALLは、動態として面白いばかりでなく、CD59のシグナル変換の根幹に密接にかかわっていることがわかってきたのである。

4. CD59 会合体ラフトへのシグナル分子の短寿命リクルート

そこで、シグナル分子がCD59会合体ラフトにやってくるのを1分子観察し、リクルートとSTALLの時間相関を調べることにした。これには、きわめて進んだ1分子法、すなわち、会合体ラフトと、GFP標識したLyn(SFKの1種)、Gai、PLCγなどのシグ

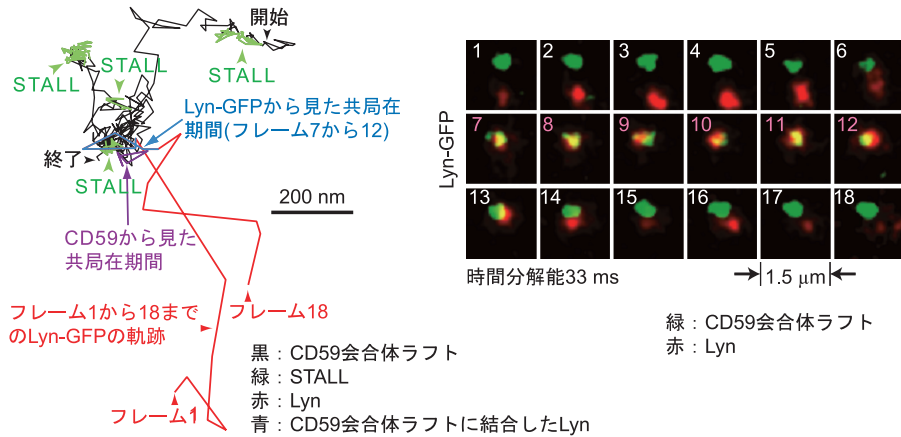


図3 1分子同時観察による Lyn-GFP の CD59 会合体ラフトへのリクルートのようす。

ナル分子の同時1分子観察法を開発し、それを用いた(図3は、Lynの会合体ラフトへの短時間リクルートを示す)。この困難な実験は、収穫も大きく、以下のようなめざましい発見があった(図2, 図3)。拡散している会合体ラフトにはLynが頻繁にリクルートされてきている(図2a(3))。そこに、さらにGαiがリクルートされると(図2a(3))、0.3秒以内に会合体ラフトはSTALLを起こす。

GαiはLynの直接の上流シグナル分子であるので、同じ会合体ラフト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(図2a(4)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、これが会合体ラフト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(図2a(5))。

しかも、PIP₂からIP₃を産生するPLCγが、会合体ラフトにSTALL中にのみリクルートされてきた(図2a(5), (6))。すなわち、STALL領域でのみ、PIP₂からIP₃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、PLCγの会合体ラフト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IP₃分子がPLCγ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IP₃受容体を開いて、カルシウムシグナルを発生している(図2a(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

分子の平均を見ていたのでは、まったくわからなかったであろう。

5. 誘導ラフトにおけるデジタル式シグナル変換機構

本研究で調べた3種のシグナル分子はすべて、会合体ラフト上での滞在時間は、予想よりもはるかに短かく、0.1秒のオーダーであった(図2a)。従来のイメージング法で見られるような、多数分子の合計シグナルは1,000秒のオーダーで継続するのに比べると、1万分の1の時間である。この2つの現象は、どのように統一的に理解できるのであろうか？

図4上のグラフは、イメージング法などで得られ

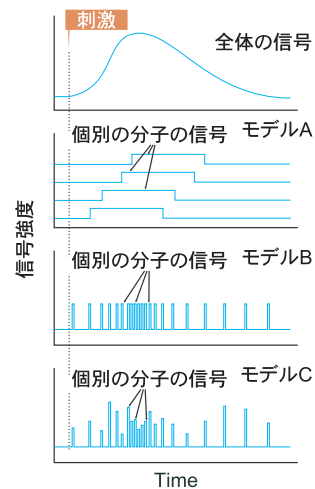


図4 細胞内シグナルの構成の概念図。

るような、細胞のある領域での合計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（モデルA）。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一致する合計シグナルのグラフを作るのは、システム制御の観点からいうときわめて難しい。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いけないからである。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。

しかし、本研究によって、ラフトにおけるシグナル変換では、1分子のはたらく時間は0.1秒オーダーであることがわかった。つまり、信号系全体の応答時間に比べると、1分子の発生するシグナルは、パルス状であることがわかったのだ（モデルB）。そうすると、信号全体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、これなら制御がきわめてやさしい。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よばれるもので、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、ラフトにかか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。

6. おわりに

ラフトの実体と機能の研究における混乱の要因は、生細胞中の細胞膜において、ラフトの大きさや寿命を調べたり、さまざまな分子のラフトへの出入りを観察することが非常に困難であったことにある。最近、やっと、定量的電子顕微鏡法によって、サイズの見積

もりがなされるようになった（直径が15-50 nm程度）¹¹⁾⁻¹³⁾。一方、ラフトやラフトに出入りする分子の挙動は、FRAPで大雑把に速度を測って意味があるほど単純な過程ではないことは、上述の通りである。確率過程論的な過程であることに加えて、いくつかの過程が並行して起こっているのも、通常の方法で何が起こっているかを解明することは難しかったのである。1分子法を用いてはじめて、ラフトの形成機構、シグナル分子のリクルート機構とシグナル変換機構が見えはじめたといつてよい。

シグナル伝達を特定の場所で起こさせたり、シグナルを安定して発生させたりするという視点から、足場タンパク質が注目を集めている。ラフト領域は、似たような機能をもつが、安定した組成や構造をもたず、ダイナミックな相互作用を行うところが特徴である。そこで、(1) ラフト領域の可塑性を利用して、シグナル伝達のパスを変えたり、一気に多くのシグナルパスにシグナルを流したりというようなことが可能なのではないか？ (2) 外部シグナル強度に応じて、ラフトの数を変えるだけでなく、大きさも変えてシグナル強度や持続時間を制御しているのではないか？ などの疑問にも答えたい。これらを通じて、細胞内シグナル系のシステム論的理解に貢献したいと考えている。

文 献

- 1) Simons, K. and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569-572.
- 2) Brown, D. A. and Rose, J. K. (1992) *Cell* **68**, 533-544.
- 3) Munro, S. (2003) *Cell* **115**, 377-388.
- 4) Kusumi, A., Koyama-Honda, I. and Suzuki, K. (2004) *Traffic* **5**, 213-230.
- 5) Stefanova, I., Horejsi, V., Ansotegui, I. J., Knapp, W. and Stockinger, H. (1991) *Science* **254**, 1016-1019.
- 6) Suzuki, K., Ritchie, K., Kajikawa, E., Fujiwara, T. and Kusumi, A. (2005) *Biophys. J.* **88**, 3659-3680.
- 7) Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R. S., Kondo, J. and Fujiwara, T. (2005) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 351-378.
- 8) Murakoshi, H., Iino, R., Kobayashi, T., Fujiwara, T., Ohshima, C., Yoshimura, A. and Kusumi, A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

- 101, 7317-7322.
- 9) Suzuki, K. G. N., Fujiwara, T. K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M. and Kusumi, A. (2007) *J. Cell Biol.* **177**, 717-730.
 - 10) Suzuki, K. G. N., Fujiwara, T. K., Edidin, M. and Kusumi, A. (2007) *J. Cell Biol.* **177**, 731-742.
 - 11) Prior, I. A., Muncke, C., Parton, R. G. and Hancock, J. F. (2003) *J. Cell Biol.* **160**, 165-170.
 - 12) Parton, R. G. and Hancock, J. F. (2004) *Trends in Cell Biology* **14**, 141-147.
 - 13) Fujita, A., Cheng, J., Hirakawa, M., Furukawa, K., Kusunoki, S. and Fujimoto, T. (2007) *Mol. Biol. Cell* **18**, 2112-2122.



鈴木健一

鈴木健一 (すずき けんいち)

科学技術振興機構・さきがけ研究者 (生命システムの動作原理と基盤技術) および京都大学物質-細胞統合システム拠点特任助教

研究内容: 脂質ラフト機構の解明

連絡先: 〒 606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町 53 京都大学再生医科学研究所

E-mail: ksuzuki@frontier.kyoto-u.ac.jp

楠見明弘 (くすみ あきひろ)

京都大学物質-細胞統合システム拠点教授

研究内容: 1 分子ナノバイオロジー

連絡先: 同上

E-mail: akusumi@frontier.kyoto-u.ac.jp

URL: <http://www.nanobio.frontier.kyoto-u.ac.jp>