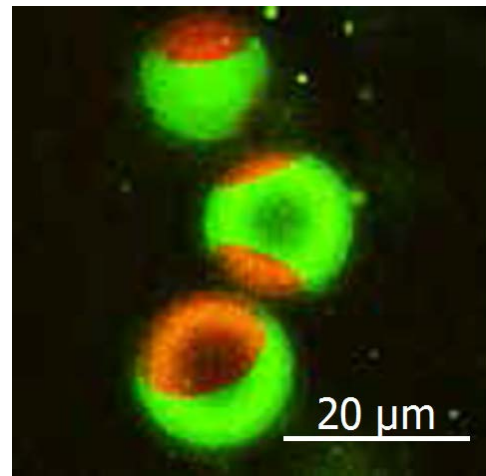
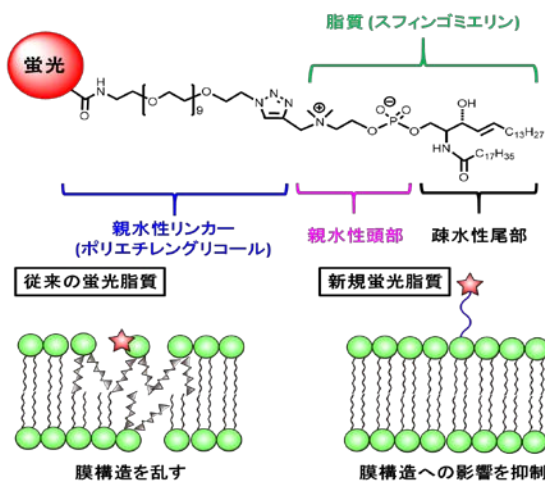


脂質の挙動をありのままに再現する蛍光プローブでラフトの形成機構を解明

九州大学大学院理学研究院の松森信明教授、木下祥尚助教、京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) の楠見明弘教授、鈴木健一特定拠点准教授、大阪大学の村田道雄教授 (科学技術振興機構 (JST) ERATO「村田脂質活性構造プロジェクト」研究総括を兼任) らの共同研究グループは、脂質の動きを「ありのまま」に再現する蛍光性の脂質アナログ分子 (※1) を合成することで、細胞膜上においてラフトが形成される様子を観察することに成功しました。

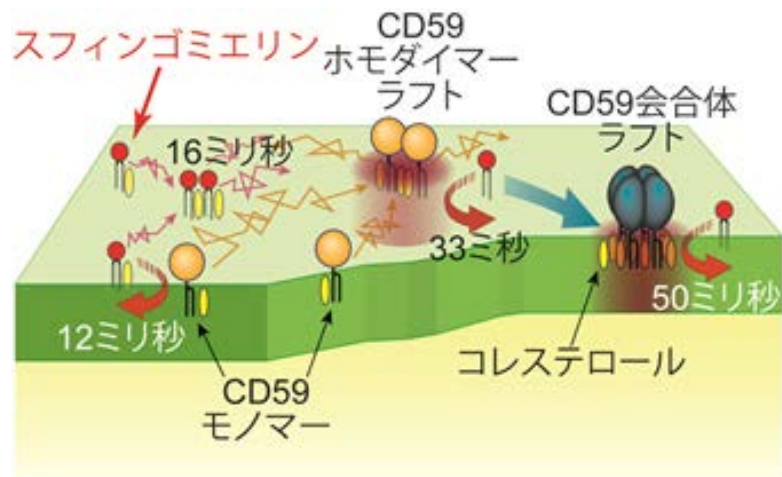
細胞膜にはスフィンゴミエリンなどの特定の脂質が集まったラフト領域と呼ばれる数ナノから数十ナノメートルの特殊領域が多数点在しており、細胞膜の重要な働きである信号伝達機能のかなりの部分を担っていると、この 25 年来仮定されてきました。しかし、これまでラフトの実態はよく分かっていませんでした。本研究グループでは、スフィンゴミエリン脂質に蛍光を発する分子を目印として結合させ、ラフトへの出入りを解明することに成功しました。今までの同様の試みでは、目印の結合により脂質の性質が変わってしまったのですが、蛍光の目印を水になじみやすいように工夫して脂質に結合させることで、この問題の解決を試みました (図 1)。新たに合成した蛍光スフィンゴミエリンをラフト様領域を含む人工膜に取り込ませたところ、天然のスフィンゴミエリンと同様の割合で、ラフト様領域に局在することがわかりました (図 2)。さらに、細胞膜上での 1 分子観察によって、蛍光目印のついたスフィンゴミエリンはラフト結合型受容体分子とラフト内で結合と解離を繰り返していること、しかも、結合時間は 10 ミリ秒程度であること、さらに受容体が活性化されると、結合時間は 5 倍も延びることなど、従来の教科書の記述を書き換えるような発見がなされました (図 3)。今後、このスフィンゴミエリンの蛍光アナログ分子は、ラフトの研究に大きく貢献すること、さらに、ラフトに関わるシグナル伝達の異常や感染症の解明に大きく寄与することが期待されます。

本研究成果は、米国学術誌「Journal of Cell Biology (Tools)」のオンライン版で 3 月 22 日に公開されました。



(図 1) (上) 新たに合成したスフィンゴミエリン蛍光アナログ分子。(下) 従来の蛍光アナログ脂質との違い。親水性の蛍光分子とリンカーを用いることで、天然の脂質と同じ振る舞いができる。

(図 2) 緑色の蛍光スフィンゴミエリン分子は、人工膜のラフト様領域に局在する。赤色の領域は、ラフトでない膜領域。



(図 3) 本研究で解明された、スフィンゴミエリンの様々な様態の CD59 への過渡的結合の模式図。

■用語解説

(※1) 蛍光性の脂質アナログ分子:

脂質分子の細胞膜内での挙動を調べたいとき、脂質分子を見るのは難しい。そこで蛍光を発する化合物を脂質分子に結合させ、その蛍光を目印として動きや局在を追跡することが可能になる。(図 1 参照)。このとき、目印が、元の脂質分子の性質を変えないように、うまい目印を、上手に結合させることが必要である。このような蛍光性化合物を目印に結合させた脂質分子の類似体を蛍光性の脂質アナログ分子と呼ぶ。

1. 研究の背景

細胞膜はどのような構造をしているのでしょうか？地球上のすべての細胞の細胞膜は2次元の液体です。細胞膜は、脂質とタンパク質からできていて、それらの分子は細胞膜の2次元液体中で熱運動して動き回っています。1972年に提案された Singer-Nicholson の流動モザイクモデルでは、細胞膜は一様な構造と想定されていましたが、その後、改訂され続けてきました。その中でも 20 世紀後半に提唱された筏ドメイン(ラフト)^{*1}モデルには、多くの研究者が注目しました [1]。このモデルでは、液体の細胞膜中に特定の脂質とタンパク質が集合した領域(筏ドメイン)が浮かんでいること(図 1)、比喩的には、不飽和脂肪酸の多いオリーブオイルの海の上を、コレステロールや飽和脂肪酸に富んだバターの筏が漂っている、といったところです。近年、細胞膜上での信号伝達や細胞分裂、ウイルス感染など様々な生体现象に、筏ドメインが必要であることが示唆されるようになり、ラフトは幅広い分野で注目を集めています。

一方、実際のデータは、「何か変わったことが起こっているらしい」ことを示すばかりで、筏ドメインは、「予想外の結果を解釈するための一つの仮定」でしかありませんでした。すなわち、筏ドメインは、多くの研究者の努力にかかわらず、生細胞の細胞内では検出できませんでした。では、なぜ、筏ドメインの検出が難しいのでしょうか？二つの問題がありました。一つは、ラフトを構成するのに必要とされている脂質を見る方法がなかったことです。脂質が筏ドメインを作る様子を観察するには、筏ドメインに集まりそうな脂質に蛍光性の化合物などで目印を付け、その脂質の動きを顕微鏡で観察することです(図 1)。



図 1. 筏ドメインモデルの描像。筏ドメインは特定の脂質やタンパク質が集合することで形成する。近年では、様々な生体機能が筏ドメインで発現することが示唆されている。筏ドメインの実態はよくわかっていなかった。

しかし、今までは、蛍光性分子を脂質に結合させると、脂質の性質も膜構造も変わってしまっていました (図 2 右)。もう一つは、ラフトが色々な方法で試しても見えないため、極めて小さく、また、短寿命である可能性が高かったことです。

本研究では、ラフトの形成に重要だと考えられているスフィンゴミエリン^{※2}というリン脂質の一種の分子に注目しました。スフィンゴミエリンは、筏ドメインのみならず、細胞膜全体を構成する重要な分子で、細胞膜にある分子の 10%程度を占める重要な脂質分子です。

以下の3つを目的として、検討を行いました。

- (1) スフィンゴミエリンや対照となるホスファチジルコリンを、生細胞の細胞膜中で分子1個ずつの単位で、可視化する方法を開発する。
- (2) スフィンゴミエリンと、筏ドメイン親和性と考えられている受容体 (GPI アンカー型受容体^{※3}) の1種である CD59^{※4} の相互作用 (どのように結合、解離するか) を明らかにし、さらに筏ドメイン形成に必須であると過程されているコレステロールの関与を解明する。
- (3) (2) の研究によって、生細胞の細胞膜中で筏ドメインを検出し、物性と機能を解明する。

2. 研究の内容

2-1 蛍光標識されたスフィンゴミエリン、ホスファチジルコリンの合成

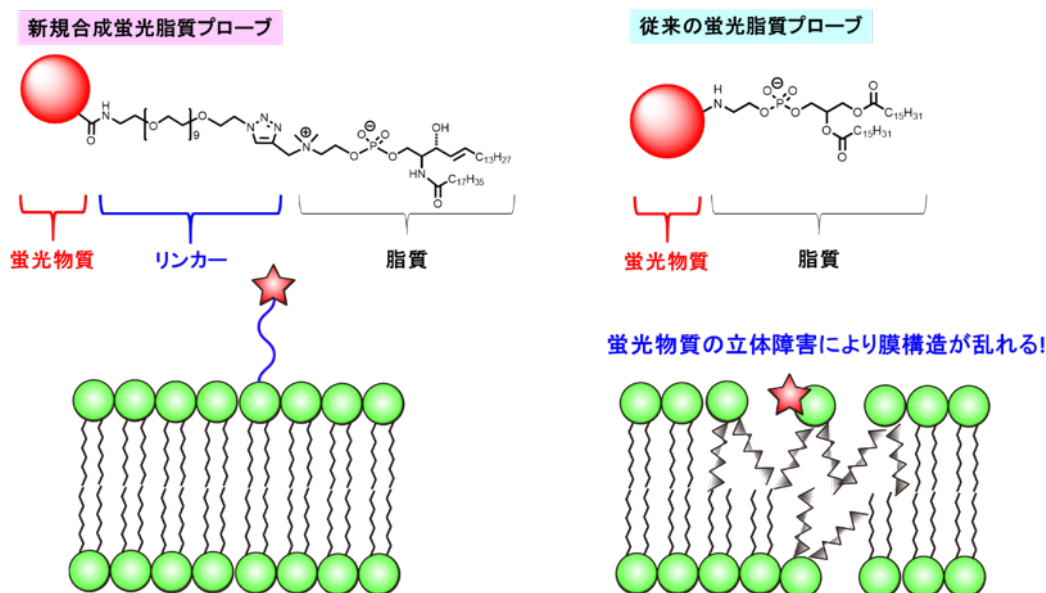


図 2. 従来型の蛍光脂質アナログと新規合成した蛍光脂質アナログの違い。新規アナログでは、脂質と蛍光物質の間にリンカーをはさむことで、蛍光物質が膜に接触しない分子設計になっている。

まず、我々は、スフィンゴミエリンなどのリン脂質本来の性質を変えずに蛍光化合物（分子）を結合させた分子（スフィンゴミエリン・アナログ）を開発しました。図2に示したのは、従来のスフィンゴミエリンの蛍光アナログ分子と新たに合成した蛍光アナログ分子の違いです。従来型とは違い、新規アナログでは、親水性の蛍光分子（目印にする部分の分子）を用い、蛍光分子とスフィンゴミエリン分子の間に長い親水性の鎖（リンカー）をはさみ、さらに、元の分子の荷電を変えないようにすることで、目印の蛍光分子が細胞膜に近づくことができないように設計してあります。これにより、スフィンゴミエリンや細胞膜に対する蛍光分子の影響を小さくすることができます。

実際、我々はスフィンゴミエリンと、ラフト外に多く存在する対照分子のリン脂質ホスファチジルコリンに蛍光化合物を同じ方法で結合させ、人工的に作製したラフト様領域を含む膜で分布を観察してみました。その結果、膜中で両者は互いに分離した異なる場所に分布することがわかりました(図3)。

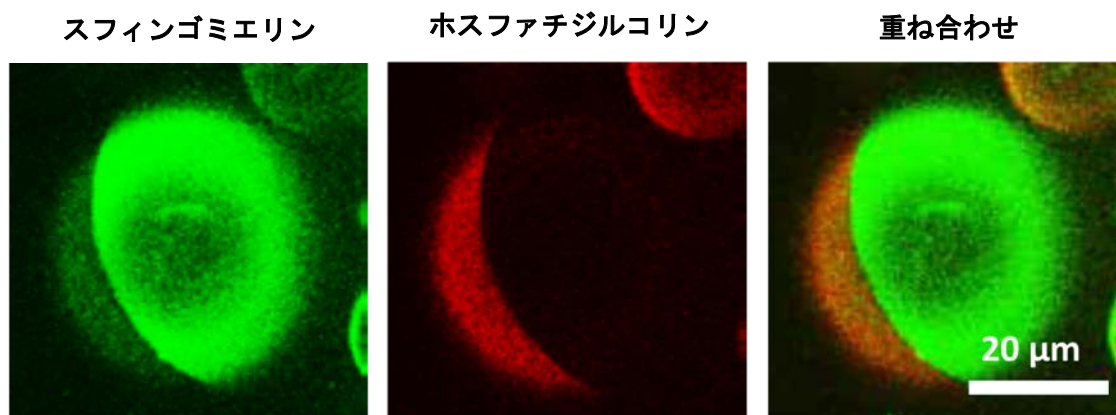


図3. 人工的に作製したラフト様領域を含む膜での観察結果。緑色蛍光標識したスフィンゴミエリンと赤色蛍光標識したホスファチジルコリン(ラフト外にありそうな対照分子)の分布を示す。スフィンゴミエリン・アナログとホスファチジルコリン・アナログは相補的な分布を示している。

2-2. 生細胞の細胞膜中での蛍光標識スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリンの1分子観察

生細胞中での1蛍光分子観察と追跡^{※5}は、私たちが世界をリードしてきた方法です。ここで、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリンの蛍光類似体アナログを、生細胞の細胞膜中に導入し、それらを1分子レベルで可視化することにしました。これによって、リン脂質の生細胞の細胞膜中での動きが、1分子毎に手に取るように分かるようになりました。

2-2 スフィンゴミエリンと、筏ドメイン親和性の GPI アンカー型受容体である CD59 が、コレステロールがあると、過渡的に結合・解離を繰り返すことを見いだした

以前私たちは、1 分子観察によって、GPI アンカー型受容体と呼ばれる一群の特殊な構造を持つ受容体 (図 4) は、コレステロールとも結合することによって、寿命が約 0.2 秒の二量体^{※6}を形成することを示しました (2012, Nature Chemical Biology [2])。さらに、GPI アンカー型受容体の一つである CD59 を調べることによって、受容体に細胞外からの刺激分子 (補体複合体や C8 という分子) が CD59 に結合すると、今度は、安定な四量体 (コレステロールを含む) を形成することも示しました。

それまでに、筏ドメインとは、もしそれが生細胞中の細胞膜に存在したら、コレステロールが必須の構造分子で、そこに、GPI アンカー型受容体や特殊な脂質が集まる会合体、であろうと考えられていました。それで、細胞膜中での筏ドメイン探しが、20 年以上行われてきました。しかし、確たる存在証明はありませんでした。

しかし、我々の 2012 年の論文[2]で、CD59 の作るタンパク質二量体がコレステロールで安定化された構造が、筏ドメインの 1 種であり、他の筏ドメインも類似の構造をもつ可能性が出てきました。それまでは、筏ドメインは直径が 20nm (0.02 ミクロン) 以上ある (直径が 0.1 ミクロンとか 1 ミクロンもあるような、細胞としては、非常に大きな構造と思っている人も多かった。細胞の大きさは、直径が数 10 ミクロン) と推定されていたのですが、CD59 の二量体+コレステロールの大きさは数 nm しかないこと、また、筏ドメインの寿命は数分以上と以前は仮定されていたのですが、1 秒未満である可能性が出てきました。

今回の実験で、筏ドメインを作る特殊な脂質の一種と思われていたスフィンゴミエリンと CD59 が結合すること、それにはコレステロールが必要であることが分かりました。すなわち、筏ドメインを作る 3 役者がそろい踏みで集合体を作ることが分かりました。すなわち、これが探していた筏ドメインであると考えられます。

GPI アンカー型受容体 (本研究の場合は CD59) は、上記のように、単量体、二量体、四量体と、様々な形態をとります。それらとスフィンゴミエリンとの結合を調べた結果、結

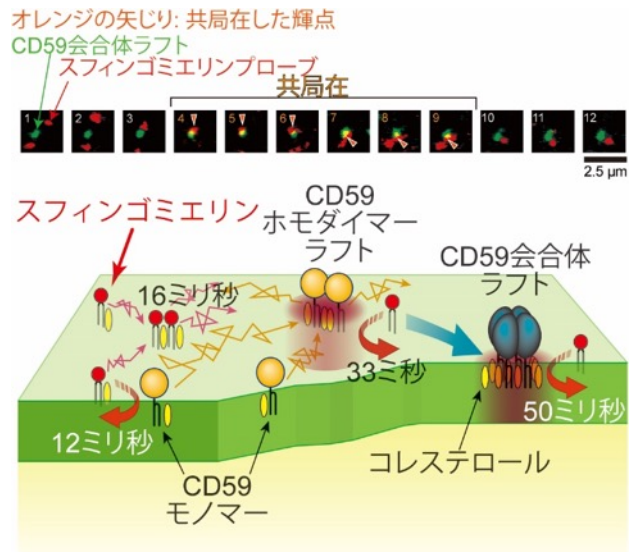


図 4. スフィンゴミエリンは、コレステロールがあるときにだけ、CD59 単量体、二量体、そして安定化された四量体へ 16~50 ミリ秒間という短い間、リクルートされた。

合時間は、それぞれ、0.016, 0.033, 0.050 ミリ秒であることが分かりました。つまり、スフィンゴリエリンは、複数の分子が次々と交替で CD59 に結合してきて、各分子は、非常に短時間しか CD59 には結合していないことが分かりました (図 4)。

すなわち、今までは、生細胞の細胞膜中で、安定で大きな筏ドメイン構造を探していたので見つからなかったのです。本研究によって、筏ドメインの大きさはせいぜい数ナノメートル、さらに、長くとも 0.2 秒程度で分解し、スフィンゴリエリンは、0.01~0.05 秒程度で入れ替わるような、極めて過渡的な分子集合体であることが分かりました。

2-3 生細胞の細胞膜中にある超過渡的筏ナノドメインの物性と機能 (まとめ)

(1) 細胞外から CD59 へのシグナルが来る前 ; CD59 は単量体 (単量体に関わる筏ナノドメイン) と二量体を中心とする筏ナノドメインという 2 つの状態間で、常に転換していました。二量体筏ナノドメインの寿命は 0.2 秒程度でした。このような筏ナノドメインができるにはコレステロールが必要で、コレステロールが CD59 筏ナノドメイン形成の必須アイテム (これは、以前、我々が 2012 年にやはり Nature Chemical Biology に出版したこと [2] をまとめました)。

(2) (1) の刺激前の細胞膜 ; CD59 の単量体と二量体に関わる筏ナノドメインに、スフィンゴリエリンは過渡的にやってきました。滞在時間はそれぞれ 0.016 秒と 0.033 ミリ秒。CD59 とスフィンゴリエリンの集合にはコレステロールが必要でした。したがって、CD59+スフィンゴリエリン+コレステロールで筏ナノラフトドメインができます。スフィンゴリエリンの滞在時間は短く、複数のスフィンゴリエリンが次々に CD59 筏ドメインにやってきては、すぐに、ラフト外にいる分子と交換することが分かりました。

(3) 細胞外から CD59 に刺激が入ったあと ; CD59 は主に四量体を中心とする筏ナノドメインを形成しました (我々の前回の Nature Chemical Biology 2012 [2])。そこにスフィンゴリエリンがリクルートされて来ました。滞在時間は 0.050 秒と、やはりとても短いものでした。

(4) すなわち、本研究で、初めて筏ドメインが生細胞中の細胞膜で観察できたといえます。大きさは数 nm であり、スフィンゴリエリンはきわめて動的に出入りします。滞在時間は 0.010~0.048 秒。すなわち、筏ドメインは極めて動的な構造であることがわかりました。

[今後の期待]

生体内にはおよそ数千種類もの脂質が存在しており、それぞれの脂質が異なる役割を担っています。それゆえ、脂質は生命科学最後のフロンティアといわれ、生体内における脂質の分布や挙動の可視化技術は幅広い分野で期待されています。本研究では、とくにスフィンゴリエリンとホスファチジルコリンの可視化に注目しました。

スフィンゴリエリンは、細胞膜の主要な構成成分であり、代表的な筏ドメイン脂質分子ですが、その局在や機能は分からない点が多いです。今回、本研究グループが開発したスフィンゴリエリン蛍光アナログによって、筏ドメイン形成機構が明らかになると期待されます。

さらに、スフィンゴリエリンは、その蓄積により発症するニーマン・ピック病や無 α リポタンパク質血症など、その代謝異常が多くの疾病の原因になるとされています。本研究で開発された蛍光標識スフィンゴリエリンドは、疾病の発症解明のための大きな一歩であるばかりでなく、疾病を阻止する薬剤開発にも寄与するもので、今後解明が進むことが期待されます。

[参考文献]

- [1] Simons & Ikonen, 1997. Nature. 387, 569-572.
- [2] Suzuki *et al.*, 2012. Nature Chem. Biol. 8, 774-783.

用語解説・注釈

※1 筏ドメイン (ラフト) : 細胞膜は2次元状の液体である (図1)。しかし、膜を作るすべての分子が、液体中でよく混じり合うわけではないことが分かってきた。ちょっとくっつきやすい分子とか、お互いにちょっと避ける分子など、色々な分子から細胞膜はできているということだ。その中で、コレステロールと親和性が高い分子群の存在に、この25年くらい注目が集まっている (膜脂質の30%程度がコレステロール)。それで、細胞膜を海面に例えると、そこにコレステロールを介して集まった分子がぶかぶか浮いているイカダ、というイメージから、筏ドメイン (ラフト) という名前が使われるようになった。細胞膜を模したような単純な人工膜では、このような膜領域を作り出すことができていない。細胞膜を弱い中性石鹼状分子で摂氏0度付近で溶かすと、コレステロールとともに色々な分子が溶けずに残るため、これらの分子が筏を作るのではないかと推定されてきた。しかし、生きている細胞中の細胞膜で、本当に筏ドメインが存在するのか、どのような機構でできるのか、どのような大きさで寿命はどれくらいか、筏ドメインを作る分子はコレステロール以外には何があるのか、など、不明な部分が極めて多かった。人工膜では、筏もどきを形成することができると考えられている。このためには、コレステロールと、1~2種類の飽和脂肪酸鎖を含む脂質分子 (バターなどの動物性脂肪に多い脂質分子として一般に知られている飽和脂肪酸と似たものです) を混合して膜を構成する。細胞膜中では、飽和脂肪酸鎖を含む糖脂質 (ガングリオシド) やスフィンゴリエリンというリン脂質がコレステロールと共にラフトを形成する重要な分子種であることが、徐々に明らかになりつつある。

- ※2 スフィンゴリエリン：動物界に広く分布する細胞膜リン脂質の一種で、スフィンゴ脂質の 85%をスフィンゴリエリンが占める。神経細胞では、神経パルスの電動を高速にする機能を助けている。分子内にセラミド構造を持ち、これに加えて親水性の頭部としてホスホコリンまたはホスホエタノールアミンを持つ。スフィンゴリエリンのほとんどは、細胞膜の表側に局在している。また、代謝産物であるスフィンゴシン-1-リン酸は、様々な生理活性を持っている。
- ※3 GPI アンカー型受容体：細胞膜上の受容体の 1 種で、特殊な構造を持っている (図 3)。すなわち、タンパク質部分が細胞膜内に全く埋め込まれておらず、細胞の外側表面だけにあり、そのタンパク質部分が glycosylphosphatidylinositol = グリコシル・ホスファチジルイノシトール (GPI) と呼ばれる細胞膜にあるリン脂質に共有結合して細胞膜の外層に繫留 (アンカー) されている受容体。このため、GPI アンカー型受容体と呼ばれる。ヒトゲノム中には、約 130 種の GPI アンカー型受容体をコードしている遺伝子があると考えられている。実際の細胞膜では、コピー数にして、受容体分子の約 10%を占めると推定されている。受容体の役割は、細胞外からのシグナル分子を結合し、さらに結合したことを、細胞内に伝えることである。それにもかかわらず、GPI アンカー型受容体は、細胞内に露出していないという逆説的な構造をもつ。すなわち、この受容体分子だけでは、外側のタンパク質部分に細胞外からのシグナル分子が結合したことを、細胞内にシグナルできない。そのため、GPI アンカー型受容体の細胞内へのシグナル機構に強い関心が集まっている。
- ※4 CD59：GPI アンカー型受容体の一種。それに細胞外から結合するリガンドは、免疫反応に関わる補体複合体や C8 という分子。抗体の自己攻撃を抑制するための重要な受容体。リガンドが結合するとコレステロールとともに四量体を形成する。
- ※5 生細胞中での 1 蛍光分子観察と追跡：生細胞中で観察したい目的分子に、蛍光を発する分子を結合させ、蛍光を目印に 1 分子分解能でその分子を観察する方法である。このためには、特殊な蛍光顕微鏡 (本研究では、研究室で開発し組み立てた顕微鏡) を用いる。多数の分子の挙動を 1 個ずつ見て、それらの動きや分布変化が追跡できる。本研究グループでは 1986 年以來、特殊な顕微鏡の開発だけでなく、細胞がよい状態のまま 1 分子観察をするための自動化技術、画像取得後にノイズの中からシグナルを拾って 1 分子を追跡するためのソフトウェアの開発などの技術開発を実施してきており、この分野での世界のリーダーとなっている。
- ※6 二量体 (dimer)：分子 2 個が結合して生成する 2 分子結合体のこと。結合寿命は様々で、結合体の定義が難しい場合も多い。3 つ・4 つの分子がまとまった場合は三量体・四量体と呼ぶ。それに対照して結合しない状態にある分子を呼ぶときは、単量体という言葉を用いる。