

生細胞内のシグナル伝達の一分子観察

小林 剛*・楠見 明弘**

Single Molecule Imaging of Signal Transduction in Living Cells

Takeshi KOBAYASHI and Akihiro KUSUMI

In the early stages of chemotaxis, a cell senses an extracellular stimulus gradient. However, most of membrane receptors or signaling molecules exhibit fast lateral diffusion in the cell membrane. If it diffuses fast in the plasma membrane even during the period for its signal transduction, the cell could lose the spatial information of where they received the extracellular stimulus. Thus, the cell may not be able to migrate in the correct direction. To answer this point, we visualized the dynamics and activation of membrane receptors or signaling molecules in living cells at the single molecule level, using the single particle tracking, single fluorophore video imaging, and single molecule fluorescence resonance energy transfer techniques. Surprisingly, the activation of stem cell factor receptor or H-Ras dramatically decreased its diffusion. Such confinement of signaling molecules may be a critical step for memorizing where the extracellular signal arrived and inducing the polarized intracellular signaling.

Key words: intracellular signaling, single particle tracking, single molecule video imaging, single molecule fluorescence resonance energy transfer (single molecule FRET)

細胞は、細胞外から増殖因子・サイトカインなどの刺激を受け取ると、転写を調節したり細胞骨格を変化させたりして増殖・分化・細胞死などの応答反応を行う。その初期過程には、レセプターによる細胞内シグナル伝達系の活性化が起きる。細胞内のシグナル伝達系の実態は、シグナル分子間の相互作用や、分子のリン酸化などの反応・構造変化であることが、近年の研究により明らかにされてきた。それらの研究では、主に、シグナル分子を細胞から抽出して *in vitro* に取り出し解析されてきた。しかし、実際の細胞内で行われているシグナル伝達は、試験管の中で見る反応とは異なっている。実際の細胞内のシグナル伝達は、数多い相手の中で特定の分子と、特定の時間・特定の場所において相互作用することにより成り立ち、空間・時間的に巧妙に制御されている。したがって、細胞をすりつぶして解析した場合には、その空間・時間情報を失ってしまう恐れがある。そこで、シグナル伝達系のシステムをより深く

理解するためには、以下の2つのアプローチをとることが肝要だろう。

1つめは、シグナル伝達の挙動を、生きた細胞においてリアルタイムに直接に見て解析することである。この場合は、時間・空間情報のロスが抑えられる。シグナル伝達の可視化は、最近の光学顕微鏡・画像解析技術の進歩や、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) などの新規プローブの開発により容易になり、現在、一般的な方法として用いられている¹⁾。また、分子の局在や運動の解析に加えて、分子間相互作用や分子の活性化状態などもイメージングすることが可能になっている。

2つめは、生体分子の挙動を多数平均のマスで観測するのではなく一分子レベルで見ることである^{2,3)}。細胞内のシグナル伝達系においては多数の分子のうちで実際に反応を担っているのは、ほんの少数であると考えられる。少数派の分子の情報は、巨視的な解析では多数派の情報と一緒に

* 科学技術振興事業団 ERATO 楠見膜組織能プロジェクト (〒460-0012 名古屋市千種区千代田 5-11-33) E-mail: takeshik@kusumi.jst.go.jp

** 名古屋大学大学院理学系研究科生命理学専攻 (〒464-8602 名古屋市千種区不老町)

平均されて検出されないことが多い。しかし、一分子レベルの解析では多数分子の中に隠れた少数派の情報を得ることができる。したがって、シグナル伝達のシステムの成り立ち・働きを理解するために、一分子レベルの解析は、大変強力な手段となり得る。また、一分子レベルの解析により、今まで予想もつかなかったことがみえてくる場合がある。筆者らの研究室では一粒子追跡法⁴⁾を用いて、細胞膜上の分子の運動はコンパートメント化されていることを明らかにしてきた^{5,6)}。これは、個々の分子のレベルで膜上の分子の拡散運動をみることによって、はじめて知ることができた情報である。

本稿では、主に、上に述べた2つのアプローチ、すなわち、生きている細胞において細胞膜上のレセプターやシグナル伝達分子を一分子レベルで観察したときに、どんな情報が得られて、どんなことがわかるのかを紹介したい。以下、SCF (stem cell factor) レセプターと低分子Gタンパク質 Ras ファミリーの一種である H-Ras 分子の運動の解析を例にあげて説明する。

1. 細胞膜上での SCF レセプターの運動

細胞が、細胞外から走化性を引き起こす刺激を受ける際は、どちらから刺激がきたのか、勾配がどの方向にあるのか、という情報が重要である。ところで、細胞膜上のレセプターは、多くの場合、細胞膜上でとても速い拡散運動を行っていることがわかってきた⁵⁾。それは、感度を上げるため、または、動的な細胞膜上で常に四方にアンテナを張る必要があるためと考えられる⁷⁾。しかし、レセプターが細胞膜上を速く拡散運動をしていると、細胞が刺激を受け取る際に、リガンドがレセプターに結合してから下流にシグナルが伝達するまでに、レセプターが速く動いてしまうと、どこで刺激を受け取ったかという位置情報が不鮮明になり正しい方向へ遊走できない可能性がある。

細胞がこの問題を克服するためには、2つの解決法があると思われる。1つめは、レセプターが刺激を受けて下流へシグナルを伝えるまでの時間をできるだけ短縮する方法である。2つめは、レセプターがシグナルを受けたらその位置を記憶して、下流にシグナルを伝えていく際にその情報を織り込んでいく方法である。一番簡単なのは、刺激を受けたレセプターは即座に運動を停止してしまえばよい。そうすれば、刺激が入ったその場所からレセプターは下流にシグナルを伝えることができる。すなわち、レセプターが入力の空間情報を記憶していることになる。さて、実際、細胞はどうしているのだろうか。ここでは、走化性を誘導するレセプターの中で、リガンド刺激直後に、シグナル伝達

系が比較的速く活性化する G タンパク質共役型受容体型の走化性因子レセプターではなく、シグナル伝達系が比較的ゆっくり活性化されるレセプター型チロシンキナーゼの SCF レセプターの解析例を取り上げる。

SCF レセプターは、分子量 145~160 kDa の膜 1 回貫通のレセプター型チロシンキナーゼで、その発現は、造血系細胞、肥満細胞、生殖細胞そしてメラノサイトにみられる。リガンドである SCF が結合すると SCF レセプターはダイマー化・自己リン酸化し、そこに多くのシグナル分子が集積する。そして、PI3 キナーゼや Ras-MAP キナーゼ・カスケードへシグナルが伝達されていく^{8,9)}。その結果、細胞の増殖や細胞接着、そして正の走化性が誘導される。マウスでは、SCF-SCF レセプターのシグナルが、発生段階のメラノサイト前駆細胞の移動や生存に働いていることが明らかになっている¹⁰⁾。

筆者らは、この SCF レセプターの運動を、培養メラノサイト細胞膜上で一粒子追跡法と一分子蛍光観察法を用いて可視化した¹¹⁾。一粒子追跡法では、直径 40 nm の金コロイド粒子で抗体 Fab (抗原認識部位を1つにしたイムノグロブリン抗体の断片) を介して細胞膜上の SCF レセプターを標識し、明視野観察法とビデオエンハンス法を用いることにより可視化した。筆者らは、水銀灯の光を光ファイバースクランプラーと 530 nm のフィルターを通したものを光源として顕微鏡に導入し、画像増強装置によりコントラストを増強し、CCD カメラで試料像を得ている。一分子蛍光観察では、蛍光色素 Cy3 で標識した Fab を用いて SCF レセプターを標識し、全反射顕微鏡によりその運動を可視化した。

いずれの観察方法においても、図1に示すように、定常状態では SCF レセプターは細胞膜上を単純拡散運動していた。その運動は、一般的な膜タンパク質の中でも比較的速いもので、拡散係数は 37°C で 0.1~0.2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。

しかし、細胞をリガンドで刺激すると、SCF レセプターの拡散運動は変化し、刺激後2分までにその運動性は大きく減少した (図1)。すなわち、膜上のコンパートメントに閉じ込められたような運動をしたり、停止するのが観察された。また、この運動変化は、キナーゼ活性のない突然変異体では観察されなかった。同じ条件で刺激した細胞を用いてシグナル伝達系の活性化を生化学的に解析したところ、SCF レセプターの活性化は刺激後2分をピークに、SCF レセプターと PI3 キナーゼの相互作用は2~5分にピークをもち、Shc と Grb2 の相互作用は2~4分に、Ras の活性化は3~4分に検出された。したがって、SCF レセプターは、下流にシグナルを伝達すると同時に、それ以前

コントロール(定常状態)

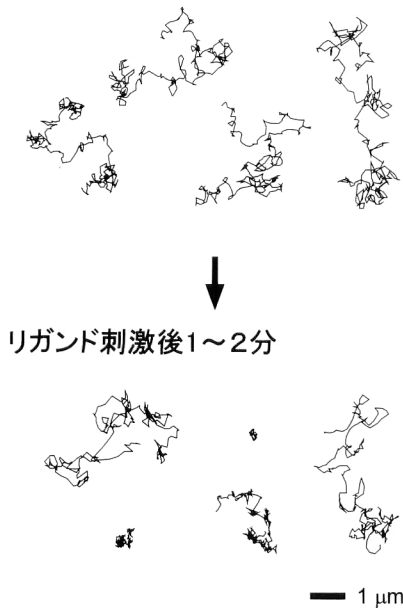


図1 細胞膜上でのSCFレセプターの運動の刺激依存的な変化。一粒子追跡法(40 nmの金コロイド粒子で標識)により可視化したSCFレセプターの運動の軌跡(10秒間)。刺激前のコントロール状態では、ほとんどのレセプターが比較的速い拡散運動(拡散係数が $0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 程度)を行っているのに対し、リガンド刺激後には、拡散運動が大きく減少するものがみられる。時間分解能は、30フレーム/秒。

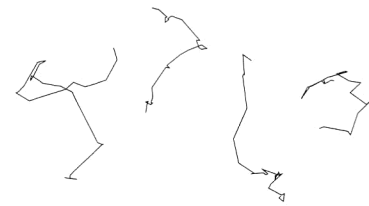
に運動を変えていると考えられる。よって、このSCFレセプターの場合、細胞は刺激の位置情報を保持するために、レセプターの運動停止という上に述べた2つめの方法をとっていると考えられる。

SCFレセプターはリガンド刺激依存的にダイマー化・自己リン酸化し、そこに多くのシグナル伝達分子を集積し、信号複合体(signaling complex)を形成すると考えられる⁸⁾。その信号複合体は、膜骨格の網目の中に閉じ込められたり結合したりして^{5,12)}、レセプターの運動停止が起きると筆者らは考えている。すなわち、細胞は膜レセプターから下流へシグナルを伝達するために、レセプターやシグナル分子間で相互作用し信号複合体を形成するが、同時に、そのシステムは、膜骨格との相互作用によって、シグナルの位置情報を保持するためにも機能していると考えられる。また同時に、レセプターは細胞内への取込み装置とも相互作用し、運動停止すると考えられる。

2. 細胞膜でのH-Ras分子の運動

癌遺伝子産物である低分子量Gタンパク質H-Rasは、さまざまなシグナル伝達系で分子スイッチとして機能し、成長因子などの刺激によりGTP(guanosine triphosphate)と結合して活性化し、下流へとシグナルを伝える。

H-Ras野生型



H-Ras常時活性化型(V12変異体)

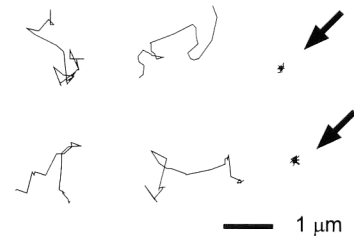


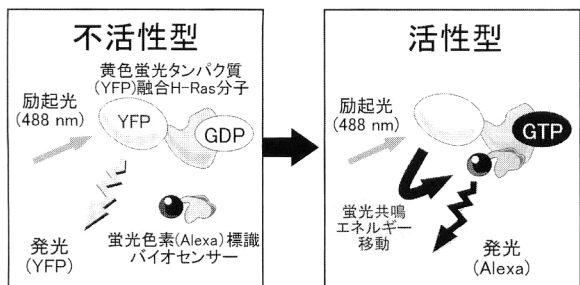
図2 細胞膜でのH-Ras野生型と常時活性化型(V12変異体)の運動。生細胞にGFP融合H-Rasを発現させH-Ras分子を全反射蛍光顕微鏡により一分子可視化した。図では、観察より得られたH-Ras野生型分子と、常時活性化型(V12変異体)分子の運動の代表的な軌跡(1秒間、ビデオレートで記録)を示す。野生型と同様に速い拡散運動を示すもののほかに、常時活性化型分子では、ほとんど停留している分子(矢印)が約3割観察された。

メラノサイトにおいても、SCF刺激により、刺激後3~4分後にRasが一過的に活性化し、さらに、下流のRaf-1等のエフェクターが活性化される。H-Rasはカルボキシ末端で脂質修飾を受けて細胞膜に局在化し、膜近傍で非常に速い拡散運動をしていることが予想される^{13,14)}。細胞外からの刺激に反応してSCFレセプターは運動を停止したが、ではRasも活性化すると運動を止めるだろうか。

筆者らは、このH-RasをGFP結合タンパク質として細胞内に発現させ、全反射顕微鏡を用いてその運動を一分子レベルで観察した¹⁵⁾。すると、Ras分子が細胞膜上で活発に動き回る様子がみられた(図2上)。その運動はとても速く、膜上のリン脂質の運動に匹敵するものであった。一方、恒常的に活性化したH-Rasの変異体(V12)の運動を観察した場合には、その拡散係数が全体的に若干小さいのに加えて、明らかにほとんど動かないような分子(図2下:矢印で示した)が3割ほどみられた。これらの観察結果から、H-Rasは活性化すると停留するのではないかと考えられる。

そこで、筆者らは、一分子蛍光共鳴エネルギー移動(一分子fluorescence resonance energy transfer; 一分子FRET)法を用いて、活性化したRas分子を直接的に観察した。Rasの下流分子であるRaf-1のRas binding domain(RBD)は、活性化したRasに強いaffinityをもつ。その

A Ras分子の活性化 → バイオセンサーとの結合
→ 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)



B バルクの H-Ras の軌跡



活性化した H-Ras の軌跡

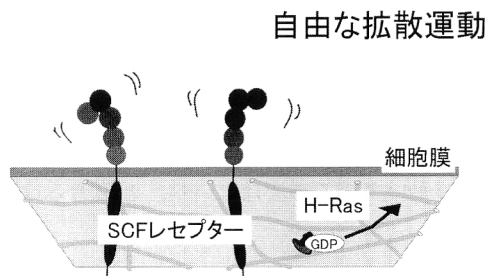


図3 一分子蛍光共鳴エネルギー移動 (一分子 FRET) 法による活性化している H-Ras 分子の運動の可視化. A. 一分子 FRET 法の原理図. ここで用いたバイオセンサー (RBD; Ras の下流分子である Raf-1 の Ras binding domain) は、活性化した GTP 結合 Ras に強いアフィニティーをもつ. 黄色蛍光タンパク質 (YFP) 融合 H-Ras (野生型) を発現した細胞内にマイクロインジェクションすることにより蛍光色素 Alexa594 を標識したバイオセンサーを導入した. Ras が GDP 結合型 (不活性化) のときは、Ras とバイオセンサーは離れており、488 nm で励起すると YFP の蛍光のみが検出される. Ras が GTP 結合型 (活性化) のときには、バイオセンサーが Ras に結合し YFP と Alexa594 が近づき蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が起こる. このときには、488 nm で励起しても、(YFP の蛍光に加えて) Alexa594 の発光 (sensitized emission) が観察される. B. 一分子 FRET 法により観察された活性化状態の H-Ras の運動. YFP チャネルで観察したバルクの H-Ras 分子と、FRET (Alexa) チャネルで検出した活性化した H-Ras 分子の軌跡 (330 ms 間). 活性化した H-Ras の運動はほとんど停止しているのがわかる.

RBD を蛍光色素 Alexa594 で標識し、YFP-H-Ras (GFP の長波長変異体 YFP (yellow fluorescent protein) を融合した H-Ras) を発現した培養細胞内にマイクロインジェクションする. Ras が活性化されていないときは、Ras と RBD は離れていて、YFP を励起すると YFP の蛍光が観察される. Ras が GTP と結合し活性化されたときには、RBD が Ras に結合し YFP と Alexa が近づいて FRET が起こる. すなわち、このときは、YFP のみを励起しても、(YFP の蛍光に加えて) Alexa594 の蛍光 (sensitized emission) が観察されるのである (図 3A).

実際の観察では、Ras の活性化が生化学的に検出される

A 定常状態



B 活性化状態 (刺激後)

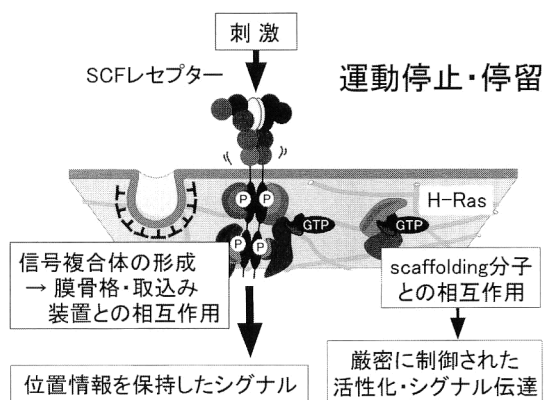


図4 SCF レセプターと H-Ras の刺激依存的な運動変化メカニズムのモデル. A. SCF レセプターや H-Ras は定常状態 (刺激前) では、自由な拡散運動をしている. B. リガンド刺激を受けると SCF レセプターはダイマー化・自己リン酸化し、他のシグナル分子を集めて信号複合体を形成する. その信号複合体は、細胞内取込み装置と相互作用したり、膜骨格内に閉じ込められたりアンカーされて、運動が変化すると考えられる. H-Ras は、活性化すると SUR-8 などの scaffolding 分子と相互作用したり活性化状態を認識する分子と結合したりするために停留すると考えられる. 筆者らはこのようなレセプターの運動の停止には、リガンド刺激等のシグナル入力の位置情報をシグナル伝達系において保持する役割があると考えている.

刺激後 3~4 分をピークとして、FRET を起こす H-Ras が顕著に検出された. また、ドナー、アクセプター非存在下や、ドナーとして Ras の dominant negative 変異体 N17 を用いた場合には、FRET シグナルの増加は観察されなかった. 図 3B に示すように、FRET チャネルで見た活性化した H-Ras の運動は、ほとんど停止したものであった. したがって、Ras は GTP が結合して活性化すると運動性が低下することが直接みて示されたのである. Ras の運動変化の機構は、Ras が活性化すると SUR-8 といった scaffolding タンパク質と結合したりしてアンカーされるためと考えられる¹⁶⁾.

ところで、別の解析から、その H-Ras の運動停止時間は、とても短い (ほとんどが 1 秒未満) ことがわかった.

H-Ras が速く拡散しているときは、Ras の活性化を認識する RBD は結合しないので、そのときは、H-Ras は不活性化状態にあると考えられる。したがって、H-Ras の活性化は、細胞膜上で非常に tight な時間・空間に制限されており、細胞にとって危険な Ras の暴走を抑えるようなコントロールが働いているのではないかと、筆者らは考えている (図 4)。

蛍光分子、GFP などの新規プローブの発見・開発や顕微鏡観察・画像解析技術の進展により生細胞内の分子の挙動をリアルタイムで見ることが容易になり、細胞生物学における機能解析の重要な技術のひとつとなっている¹⁾。その解析を、一分子レベルで行うことにより、まったく新しい観点から生体分子の機能やその調節機構を観察することが可能なのである。今回、紹介した知見も、従来の解析方法では検出することが難しく、生細胞内においてリアルタイムで一分子レベルの観察を行うことによってはじめて得られたものである。このような一分子レベルの解析を、従来のマクロな解析と併用することによって、シグナル伝達機構の研究は大きく進むと期待される。ところで、今回、紹介した活性化した Ras の観察のように、一分子 FRET などの技術を組み合わせ一分子レベルで生体分子間の相互作用や活性化状態を知ることができるようになっている¹⁷⁾。また、観察するだけでなく、光ピンセット法などを用いて分子を操作することができる。今後、これらの技術を用いて、複雑で巧妙な細胞のシステムの成り立ち・働きが少しでも理解できるのではないだろうか、と、筆者らは考えている。

文 献

- 1) P. I. H. Bastiaens and R. Pepperkok: "Observing proteins in their natural habitat: The living cell," *Trends Biochem. Sci.*, **25** (2000) 631-637.
- 2) S. Weiss: "Fluorescence spectroscopy of single biomolecules," *Science*, **283** (1999) 1676-1683.
- 3) K. E. von Holde: "Biochemistry at the single-molecule level," *J. Biol. Chem.*, **274** (1999) 14515.
- 4) J. Gelles, B. J. Schnapp and M. P. Sheetz: "Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision," *Nature*, **331** (1988) 450-453.
- 5) A. Kusumi and Y. Sako: "Cell surface organization by the membrane skeleton," *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8** (1996) 566-574.
- 6) M. Tomishige and A. Kusumi: "Compartmentalization of the erythrocyte membrane by the membrane skeleton: Intercompartmental hop diffusion of band 3," *Mol. Biol. Cell*, **10** (1999) 2475-2479.
- 7) D. Bray: "SIGNALING COMPLEXES: Biophysical constraints on intracellular communication," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27** (1998) 59-75.
- 8) D. Linnekin: "Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31** (1999) 1053-1074.
- 9) J. Schlessinger: "Cell signaling by receptor tyrosine kinases," *Cell*, **103** (2000) 211-225.
- 10) S. Nishikawa, M. Kusakabe, K. Yoshinaga, M. Ogawa, S. Hayashi, T. Kunisada, T. Era, T. Sakakura and S. Nishikawa: "In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: Two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development," *EMBO J.*, **10** (1991) 2111-2118.
- 11) 小林 剛, 村上瑞奈, 吉村昭彦: "1 分子で見る細胞膜受容体とシグナル伝達分子", *細胞工学*, **20** (2001) 683-690.
- 12) A. Kusumi, K. Suzuki and K. Koyasako: "Mobility and cytoskeletal interactions of cell adhesion receptors," *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11** (1999) 582-590.
- 13) H. Yokoe and T. Meyer: "Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement," *Nat. Biotechnol.*, **14** (1996) 1252-1256.
- 14) H. Niv, O. Gutman, Y. I. Henis and Y. Kloog: "Membrane interactions of a constitutively active GFP-Ki-Ras 4B and their role in signaling," *J. Biol. Chem.*, **274** (1999) 1606-1613.
- 15) R. Iino, I. Koyama and A. Kusumi: "Single molecule imaging of GFP in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface," *Biophys. J.*, **80** (2001) 2667-2677.
- 16) P. W. Sternberg and J. Alberola-Ila: "Conspiracy theory: RAS and RAF do not act alone," *Cell*, **95** (1998) 447-450.
- 17) Y. Sako, S. Minoguchi and T. Yanagida: "Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells," *Nat. Cell Biol.*, **2** (2000) 168-172.

(2002 年 2 月 27 日受理)