

細胞膜上でのシグナル伝達の1分子可視化解析

鈴木健一^{1,2}, 楠見明弘^{1,2}¹京都大学再生医科学研究所ナノバイオプロセス研究領域²科学技術振興機構 ICORP 膜機構プロジェクト

はじめに

生きている細胞の細胞膜中で、たった1個の分子の挙動を観察したり、その分子をフォーカスされたレーザー光で捕捉して細胞内で自由に動かしたりすることが、できるようになってきた¹⁾。さらに最近では、分子の位置や運動を1分子ごとに追うだけではなく、その分子の活性化をも可視化できるようになってきた²⁾。細胞の働き方を調べるのに、このような1分子法を利用し、さらに、生細胞での観察に適した1分子法の開発をもっと進めようという研究が、今まさに始まったところである。

1分子を見て触るような研究ができるようになると、例えば、シグナル伝達分子が細胞内をどのように動き回り、どのようにしてシグナルを次々に伝えていくのか、というようなことが、どんどんわかってきそうである。このような研究はまだ始まったばかりであるが、既に面白い結果、しかも、1分子で見ないとわからないような結果が次々と得られつつある。本稿では、このような結果の一部をご紹介します。このような新しいタイプの研究に興味をもっていただくきっかけとなることを願っている。

細胞膜分子の1分子追跡法

はじめに細胞膜分子の1分子観察法をまとめておく。主な方法は、一粒子追跡法 (single particle tracking; SPT)^{3),4)} と一蛍光分子ビデオイメージング (single fluorescent molecule video imaging; SFVI)^{5),6)} である。細胞膜のほか、単分子膜やリポソーム膜上の脂質やタンパク質の一分子運動も追跡できる (Fig. 1)。SPTでは、少数の抗体 Fab 断片などを結合させた直径 40 nm (20 nm も使える) の金粒子をプローブとして用いる。粒子を透過型光学顕微鏡を用いてとらえ、画像のコントラストをアナログ-デジタル増幅して、粒子の運動を自動追跡する。SFVIは、有機色素や緑色蛍光タンパク質の変異体 (mGFP) などをプローブとして用いる。細胞の外側からの標識には、有機色素を結合させた抗体 Fab やリガンド、細胞膜の内側からの標識には、mGFP を用いるのが簡単である。有機色素の方が、吸光係数が高く、退色しにくく、長波長のものが選べるという利点がある。細胞内の自家蛍光などの背景光を避けるためには、レーザーを用いた全反射照明や斜光照明を利用するのがよい^{7),8)}。最近では、日本のメーカーから全反射蛍光顕微鏡も市販さ

この総説は、第32回日本磁気共鳴医学会大会特別企画「モレキュラーイメージング(2)」での講演を中心にもまとめたものである。

キーワード single molecule observation, live cells, lipid rafts, nanometer, signal transduction

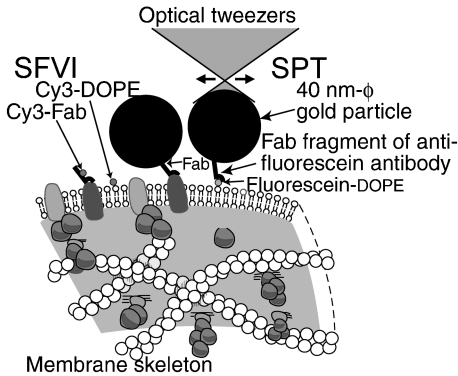


Fig. 1. Single molecule techniques to track the movement of membrane molecules in the cell membrane: single molecule tracking (=SPT) and single fluorescent molecule video imaging (=SFVI). As probes for SPT, 40 nm-gold particles coated with the Fab fragments of antibody IgG, or the ligands are employed. Conjugation of gold particle to a phospholipid (DOPE) was carried out first by introducing fluorescein-labelled DOPE into the cell membrane, and then gold particles coated with the Fab fragments of anti-fluorescein antibodies were added (note that fluorescein is simply used as a tag and not a fluorescent probe). For SFVI, phospholipids covalently conjugated with fluorophores such as Cy3, proteins fluorophore-labeled Fab attached to proteins, or green fluorescein protein (GFP) fused to proteins are often employed.

れ、顕微鏡の性能が大きく向上したこともあり、生細胞中でのSFVIが身近になった。

SPTでの観察の優れた点は一つの粒子を数十分間にわたって連続観察が可能なこと(SFVIでは、せいぜい20秒くらい)、空間精度が2 nmと高いこと(ビデオレート、SFVIでは20~30 nm程度)、時間分解能を25マイクロ秒/フレームにまで上げて観察可能なこと(ただし、空間精度は17 nmに落ちる。SFVIではミリ秒程度まで上げられる。しかし、退色

までに数百点位しか測定できない)などである。また、金粒子標識を用いると、結合分子をレーザーを用いて(光ピンセット)、引っ張ることもできる^{9),10)}。しかしながら、SPTで1分子運動を観察するには金コロイドラベルを調整するのが難しい。なぜなら、金粒子に結合したタンパク質のほとんどは変性するので、結合活性をもつプローブを作ることが難しく、また、特定分子を認識するプローブができたとしても、立体障害やクロスリンクの問題を解決する必要がある。例えば、これらの問題を解決するために、金コロイドラベルを細胞に加えるときに別にFab分子も同時に加えて、クロスリンクをなるべく防ぐ方法などがとられる¹¹⁾。

SFVIでは、クロスリンクの心配がなく、細胞膜中のタンパク質を容易に確実に一分子を観察できる。また、最近では、1分子ごとの動きや存在部位だけでなく、1分子ごとの活性化までをも観察できるようになった²⁾。したがって、実験の目的に応じて方法を選ぶ必要がある。また、高時間分解能での観察は信号/ノイズ比が落ちるためにSPTでしかできないが、その際プローブである金コロイドが1分子で目的とする分子に結合していることを示すためにSFVIでの拡散係数と比較し、同じであることを確かめる必要がある。したがって、SPT、SFVIの両者をうまく組み合わせて実験するのがよい。我々の研究室では、とりあえず簡単なSFVIを用いて実験を始め、必要に応じてSPTを取り入れるようにしている。

なぜ、細胞膜上での1分子観察か?

まず、細胞膜中に導入した、不飽和アルキル鎖(オレオイル基)をもつリン脂質のdioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(DOPE)の運動軌跡をご覧いただきたい(Fig. 2)。この

2005年5月23日受理

別刷請求先 〒606-8507 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ナノバイオプロセス研究領域 鈴木健一

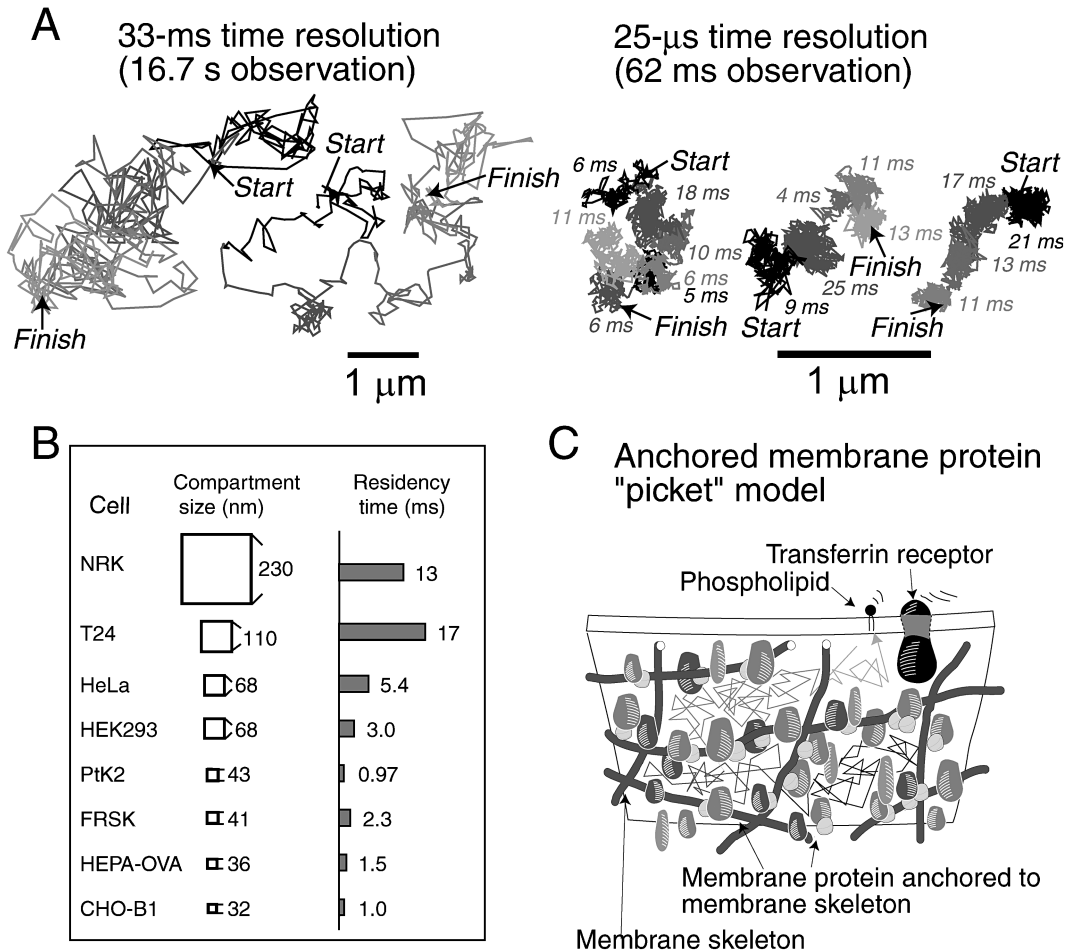


Fig. 2. Even phospholipids undergo hop diffusion in the cell membrane. A : Typical trajectories of DOPE recorded at temporal resolutions of 33 ms/frame (left), and 25 μ s/frame (right). The observation period for each trajectory was 16.7 s and 62 ms, respectively. In the left trajectory, color changes simply indicate the passage of time (every 3.3 s), whereas, in the right trajectory, color reflects the subtrajectory within each compartment (the residency time is also indicated). B : The compartment size and the residency time of DOPE undergoing hop diffusion, indicating that practically all DOPE molecules undergo hop diffusion in all of the confined cells we examined thus far. C : Anchored membrane protein picket model. This model could explain why even phospholipids located in the outer leaflet of the cell membrane undergo hop diffusion. The "picket" mechanism may act on both membrane lipids and proteins. Transmembrane proteins anchored to and aligned along the membrane skeleton (picket) retard the diffusion of membrane proteins and lipids in the membrane area along the membrane skeleton, effectively partitioning the plasma membrane for translational diffusion.

ような観察のためには、Fig. 1 に示すように、DOPE の極性頭部を蛍光分子（例えば Cy3）で標識したものをを用いたり、直径 40 nm の金

粒子に少数の抗体 Fab 断片を結合させたものを用いて DOPE を標識したりして実験する。上述したように金粒子が他の分子と相互作用し

たり、DOPE など目的とする分子をクロスリンクするような効果は、蛍光標識による結果と比較することによって検討しておく。DOPE の場合には、追跡の時間窓が 100 ミリ秒以内のときには、金粒子標識は問題がないことが確かめられた。

このようなものは今までに蛍光退色回復法 (FRAP=fluorescence redistribution after photobleaching) で見飽きた結果で、それを 1 分子で見ただけのこと、と思われる読者も多いことであろう。実際、ビデオ速度で観察した結果は、退屈な単純ブラウン運動が見えているように思われる (Fig. 2A, 上の軌跡)。しかし、「細胞膜は、人工膜と違って単純な理想液体ではあり得ない」というのが様々な過去の結果が示唆するところであったので、思い切って時間と労力と研究費をかけて、時間分解能 25 マイクロ秒 (ミリ秒ではなくマイクロ秒!!、ビデオ速度より 1350 倍速い) を実現し、DOPE の運動をさらに本格的に調べた^{12),13)}。このような実験によって得られた典型的な運動軌跡を Fig. 2A の下部に示す。ご覧のように、単純ブラウン拡散運動では実現し得ないような軌跡を、調べたすべての DOPE 分子が示した。すなわち、「細胞膜はすべての脂質の拡散運動に対してコンパートメント化され」ており、「脂質分子は、短期的にはコンパートメントに閉じこめられた運動をし、長期的にはコンパートメント間を飛び移りながら拡散して大きな範囲を動き回る」ことがわかったのである。これは、統計をとる手法と定量的解析の手法をまじめに開発することによって確認してある (実は、これは 1 分子法を成功に導く必須の過程である)。そこで、このような拡散をホップ拡散と名付けた。このような発見は 1 分子法以外では不可能であったと思われる。

本稿では、まず、(1)細胞膜のコンパートメント化とホップ拡散について述べ、次に、(2)1 分子観察の手法について簡単に紹介し、(3)最後に、このようなコンパートメント化された膜

で、ラフトと呼ばれるマイクロドメインがどのようにシグナル変換ドメインとして機能するようになるか、を 1 分子法で解明を進めた結果を報告する。この結果は、1 分子法以外では、なかなかわからなかったと思われるものであった。

細胞膜の概念のパラダイムシフト

細胞膜中での分子の挙動が、人工膜中でのそれと二つの点で全く違っており、ふつうの拡散の理論では全く説明できないことは周知の事実となりつつあった。この 2 点とは、(1)細胞膜上での分子の動きは、拡散係数にして人工膜中の 1/5~1/50 程度と、極めて強く抑制されているが、ここ 30 年来、その理由が全くわからないままである^{12),13)}、(2)細胞膜中で膜分子が会合すると、並進拡散係数が劇的に減少する^{5),13)}、これは、細胞膜を 2 次元の液体と仮定すると、拡散の理論と全く合わない (再構成膜中では理論と実験は一致する)^{14)~16)}。細胞膜のコンパートメント化と膜分子のホップ拡散は、この細胞膜の基本問題を一気に解決するものであった。

Fig. 2 の下図のような軌跡を多数、定量的に解析した結果、例えば、normal rat kidney (NRK) の細胞膜では、コンパートメントの大きさは平均 230 nm であること、DOPE 分子は 230 nm コンパートメントに平均 11 ミリ秒滞在しては、隣接したコンパートメントを次々に跳び移っていくという運動をしていることがわかった¹²⁾。このようなコンパートメントは、今まで調べたすべての哺乳動物の培養細胞で見いだされ、コンパートメントの大きさは、平均が 30~230 nm (細胞種によって異なる)、平均滞在時間は 1~25 ミリ秒であった (Fig. 2B)。

さらに、コンパートメント内部での拡散係数は、人工膜中のそれと同じであった。これは二つのことを示している。(1)細胞膜上での大きな範囲でのリン脂質の拡散が遅いのは、膜の平均

の粘性が高い（コレステロールなどのため）とか、浮遊しているタンパク質との結合の効果などのためではない。リン脂質は小さいコンパートメントの中では人工膜中と同様に速く拡散しているのであるが、隣接したコンパートメントに移動するのに時間がかかるので、大きな範囲の拡散係数（例えば FRAP で測定されるような拡散係数）は劇的に小さくなる。(2)コンパートメント内の拡散係数は人工膜中の拡散係数とほぼ同じであるから、我々が見いだしたコンパートメントよりさらに小さなコンパートメントなどはない。このようなホップ拡散は1分子ずつ（しかも高時間分解能で）見ることによって初めて観察できるものである。FRAP などでは、多数分子の平均的挙動を見ていたため、また、ビデオ速度での1分子観察では、長い時間平均をかけてみていたため（1~25 ミリ秒ごとに起こるホップを1コマ33ミリ秒のコマ速度でとらえるのは全く不可能）、ホップの瞬間は見えず、単に遅い運動に見えていたのである。

では、何が、細胞膜をこのように区画化しているのでしょうか？ 詳細を述べる紙幅はないが、コンパートメントは細胞膜の内側表面に結合しているアクチン線維（アクチン膜骨格）とそれに結合した様々な膜貫通型タンパク質によって作られることが、ここ10年来の我々の研究で明らかとなった^{17)~21)}。この機構は「アンカー膜タンパク質“ピケット”モデル」と呼ばれている^{19)~21)} (Fig. 2C)。すなわち、アクチン膜骨格に結合した膜貫通型タンパク質がコンパートメント境界部の20~30%を覆うようになると、リン脂質の拡散障壁となり（ピケットラインを形成し）、短時間の閉じこめが生ずるというモデルである（詳しくは Fig. 2C の説明を参照）。

すなわち、細胞膜を2次元の液体と考えるモデルには、大きなパラダイムシフトが必要なのことがわかった。Singer-Nicolson の流動モザイクモデル¹⁴⁾は、モデル図からもわかるよう

に、10 nm 程度の大きさの構造に対しては細胞膜中でも正しい。しかし、それを、数10 nm 以上の大きな構造に適用するのが間違いだったのである。このような大域的なレベルでの分子の分布や運動については、細胞は、違ったレベルでのコントロールを行っている。細胞はアクチン膜骨格を制御することによって、膜のコンパートメントと膜分子の局在や運動を制御し得るのである。

定常状態でのラフト

近年、細胞膜上で、様々な情報伝達分子が集まる膜ドメインとして、「ラフト領域」が注目されている。しかし、ラフト領域がどのように細胞膜上でのシグナル変換（細胞外のシグナル分子が受容体に結合したという情報がいかに細胞内の情報に変換されるか）を実行するのかは、不明である。この節と次節では、1分子観察によって初めて明らかになってきた、ラフトの驚くべき作動機構について簡単に述べよう。

脂質ラフトの定義は千差万別で、「定義ができたら、そのときに初めてラフトとは何かかわかったことになる」という様相を呈している。ここでは、作業用の定義として、「脂質鎖の相互作用を基本として形成される3分子以上からなる分子複合体」²²⁾としておこう。先に、「細胞膜は、人工膜と違って単純な理想液体ではあり得ない」と述べたが、この作業用定義は、その延長上にある。タンパク質間相互作用によってできる通常の信号伝達複合体とは違って、ラフトは脂質による相互作用を基本として形成されるため、リクルートされる分子を状況に応じて変えたり、それによって信号伝達のパスを変えたり、信号伝達経路間のクロストークが可能になっていると考えられる。これがラフトによるシグナル伝達の面白く斬新なところであろう。

細胞膜外層では glycosylphosphatidylinositol (GPI) によって膜にアンカーされた受容体タ

ンパク質 (GPI アンカー型タンパク質), コレステロール, スフィンゴ糖脂質などが, 内層では Src ファミリーキナーゼや低分子 G タンパク質など脂質鎖によってアンカーされた様々な信号伝達タンパク質が, ラフトと呼ばれる細胞膜上のマイクロドメインに濃縮されていると考えられるようになった (Fig. 3A)²³. また, 膜貫通型タンパク質にも, LAT, CD81, T 細胞受容体など, ラフトに局在するものがあると考えられている. 生化学的には, ラフトは低温下で界面活性剤に不溶の低密度画分として定義されてきており, 以上のような分子のラフトへの分配は, このような生化学的な方法で見いだされたものが多い²⁴. しかし, この定義では, 生理学的なデータと合わないものも多く, また, 界面活性剤が誘導する分子集合が, 元の分子集合をどの程度反映するかという本質的な疑問もある²⁵. 例えば, 活性化されていない低分子量 G タンパク質 H-Ras は代表的なラフト分子だと思われているが, 低温下での界面活性剤処理によって簡単に可溶化される.

ラフトの性質を明らかにするために, 様々な人工膜を用いて, コレステロールが多いドメインや秩序液晶層についての研究が進められている. しかしながら, 非常に多種の膜分子からなる生体膜中では, お互いの界面活性効果のために人工膜で見られるようなマイクロドメインは, それらの境界が崩され, はるかに小さなものしか存在できないと考えられる. 実際, 刺激を入れない定常状態の細胞では (さらに, 温度も下げず, 固定剤という名前のクロスリンカーなども使わない, 本当に生きている状態の細胞では) 光学顕微鏡でマイクロドメインは見えていないので, 定常状態でまともに生きている細胞でのラフトの大きさは, 光学分解能 (200~300 nm) 以下であると考えられる. すなわち, 生理的条件下で, 生きている細胞の細胞膜中での, ラフトのサイズや寿命, 様々な膜分子のラフトへの出入りは全くわからず, ラフト研究の最大の問題の一つとなっていた²⁶.

そこで, 筆者らは, ラフトに親和性が高い, または, 低いと思われる分子として, それぞれ, CD59 と DOPE を用い, それらを 1 分子観察することによって, まず, 外部からの刺激を入れる前の細胞でのラフトの研究を進めた. CD59 は界面活性剤に不溶性で, ラフトに親和性が高いと考えられている GPI アンカー型タンパク質 (補体制御タンパク質) である. DOPE は先に紹介した不飽和リン脂質である. これまでのラフトの常識では, ラフトは少なくとも数十秒くらいは安定で, 直径は少なくとも 50 nm はあるとされてきた^{27,28}. したがって, CD59 がこのようなラフトに例えば数秒以上入っているとすると, この間の CD59 の運動はラフト自体の膜中での拡散運動とラフト中での CD59 の拡散運動の重ね合わせになる. 50 nm もの直径のラフトは, 先に述べた膜骨格に結合した膜貫通型タンパク質のピケットラインを簡単には超えられないので, 数秒以上は, 一つの膜コンパートメントに閉じこめられたような運動をするはずである. これが確かめられれば, あるいは, 一つのコンパートメントに閉じこめられる時間などが出れば, ラフトの大きさや寿命, CD59 のラフトへの出入りなどについて, かなりのことがわかってくることが期待できたのである.

細胞膜のコンパートメントの平均サイズが 110 nm 程度である T24 細胞を用い, CD59, DOPE を金粒子ラベルして, 時間分解能 25 μ s/frame で運動を観察した. どちらの分子も平均で 110 nm の大きさのコンパートメント間をホップ拡散していたのは予想どおりであった. しかし, 驚いたことに, CD59 はコンパートメント中で長時間の滞在時間を示さないどころか, ラフトに入らないと考えられている DOPE と同じ平均 25 ms の滞在時間を示したのである (Fig. 3B)^{29~31}. これは, もう一つの典型的な非ラフト分子と考えられているトランスフェリン受容体の滞在時間, 62 ms よりも短いものであった. さらに, ラフトが形成され

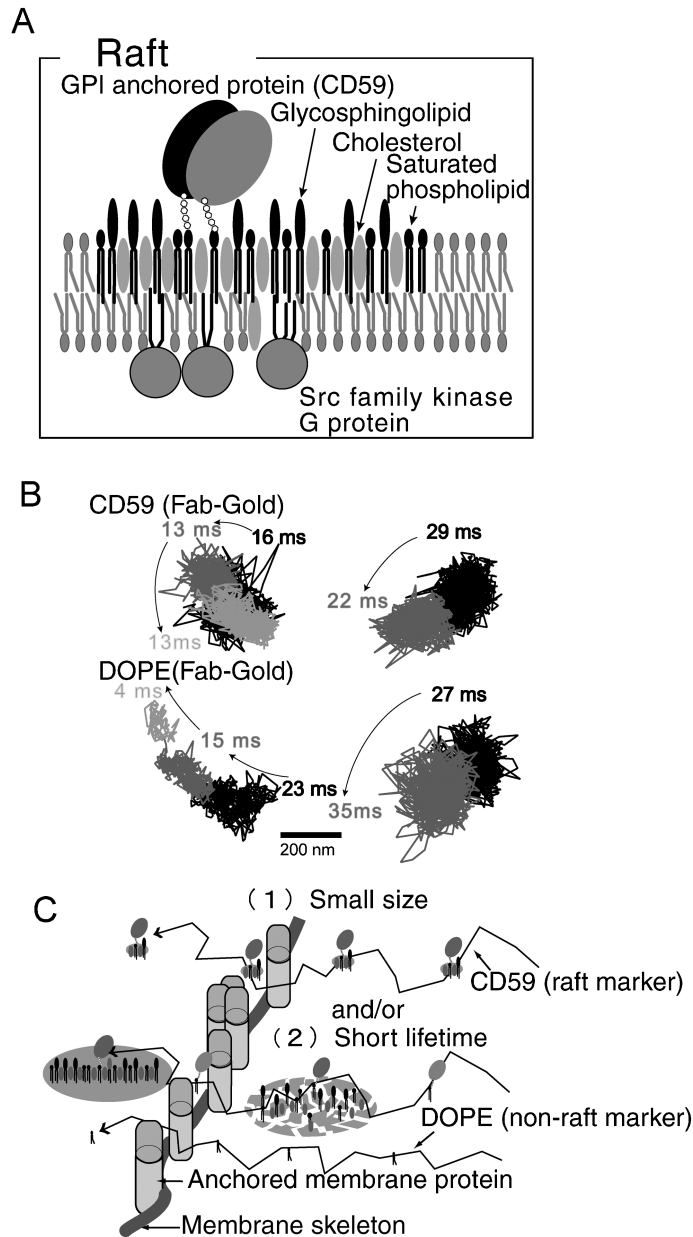


Fig. 3. Comparison of diffusion of single CD59 and DOPE molecules A : Schematic representation of lipid rafts. B : The trajectories of CD59 and DOPE observed at a temporal resolution of 25 μ s/frame. Both CD59 and DOPE undergo similar hop diffusion (110-nm compartment size and 25 ms residency time on T24 cells). C : CD59 and DOPE molecules both cross the compartment boundaries made of anchored protein pickets at about the same rate, suggesting that, in the absence of extracellular stimuli, rafts are very small (a few molecules), and/or its lifetime is very short (on the order of a millisecond or less).

るための必須成分と考えられているコレステロールを除去しても、CD59 と DOPE の示すコンパートメントサイズや滞在時間は有意には変化しなかった。他のラフト候補分子、GPI アンカー型タンパク質の PLAP, DAF, グリコスフィンゴ脂質の GM3 などとも全く同様の挙動を示した。すなわち、細胞膜上に 50 nm レベルの大きさの安定なラフトが存在する可能性は、ほとんどなくなった。

CD59 のホップ拡散も DOPE と同様に膜骨格にアンカーされた膜タンパク質のピケットによるものであることは以下のようにして確認できた。アクチン線維を部分的にマイルドに破壊する薬剤処理では、CD59 と DOPE の示すコンパートメントサイズは 1.5 倍程度広がり、安定化する薬剤処理では滞在時間が延びた。膜骨格のない membrane bleb と呼ばれる膜領域を形成させると、そこでは、ホップ拡散せず、リポソーム上と同じ速さの単純拡散運動が見られた。このような速いホップ拡散は T24 細胞だけではなく調べたすべての細胞で見出された。つまり、細胞外からシグナルの入らない定常状態の細胞では遅い拡散をするラフト分子は見つからなかったのである。

ピケットの間隔は 3~8 nm と見積もられること、CD59 は DOPE とほぼ同じ頻度でホップすることから、定常状態の細胞で CD59 が結合しているラフトは、おそらく数分子程度の大きさしかない、かつ/あるいは、ラフトの寿命は短く、おそらくミリ秒程度以下（ホップ頻度が 25 ミリ秒だから）と考えられる (Fig. 3C)^{29)~31)}。

安定ラフトの形成機構

CD59 のリガンドを添加すると CD59 は会合する。このような会合が CD59 によるシグナルの第一ステップになるようである。すなわち、CD59 を抗 CD59IgG 抗体でクロスリンクしたり、多数の IgG 抗体を結合させた金粒子で

CD59 を集合させても、細胞内シグナル（カルシウムスパイクや Src ファミリーキナーゼの活性化など）が誘起されるのである。

さらに、CD59 のクロスリンクを誘導する金粒子が細胞に結合すると、そこでは、CD59 がクロスリンクされるだけでなく、コレステロールやガングリオシド GM3 も濃縮されてくる、すなわち、ラフト様ドメインが形成されることがわかった。そこで、信号入力下での CD59 の挙動を観察するために、このような CD59 をクロスリンクする金粒子をプローブとして使用した (Fig. 4A)。

ここで注意したいことは、多くのラフトの実験で、期せずしてクロスリンクをしてしまい、それを、定常状態での細胞の振る舞いと誤解している実験が極めて多いことである。このような誤った実験と解釈、さらに、それをもとにした実験と解釈、これが、ラフト分野の混乱の主な原因の一つとなっている。ラフト関連の論文を読まれるときには、(1)固定剤という名のクロスリンカー（アミノ基に結合するものがほとんどで、脂質を固定することはできず、むしろ安定化ラフトを誘導している）を使っていないか、(2)使っているときは正しい使い方（4%パラフォルムアルデヒド、1時間以上、室温以上の温度+0.2~0.5%グルタルアルデヒドの方がさらによい、電顕では必須）と解釈（少なくとも読者への注意の喚起）がなされているか、(3)生理的温度（通常は 37°C）で実験しているか（温度を下げると、様々なドメインが形成される可能性があり、生物学的現象とは関係のない膜ドメインを議論している可能性が高くなる）、などの点に、鋭い注意を払って読んでいく必要がある。

安定化ラフトのシグナル変換機構

金粒子によって CD59 をクロスリンクして形成された「安定化ラフト」を「CD59 クラスターラフト」と呼ぶことにしよう。1 個ずつの

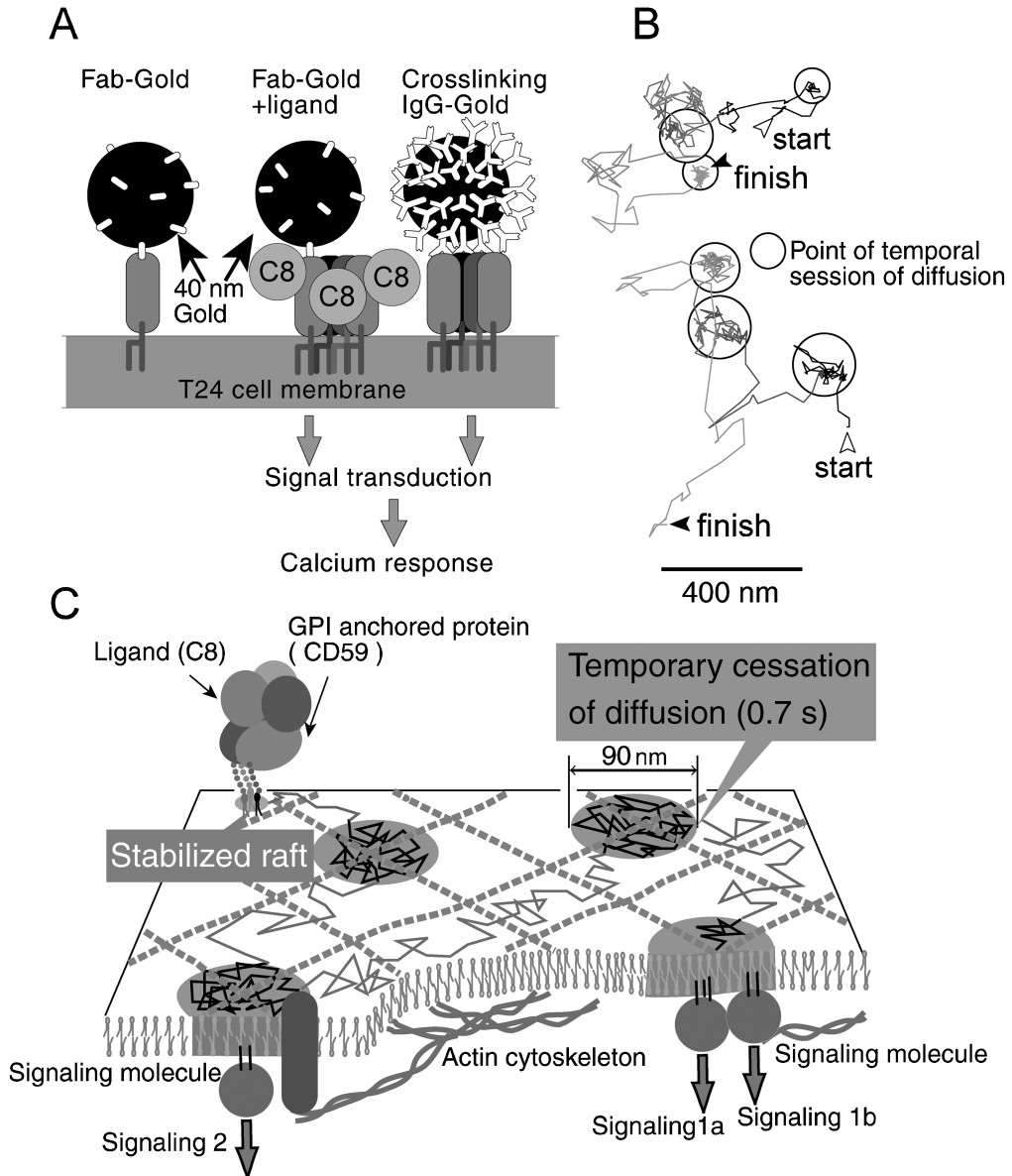


Fig. 4. Ligand-induced formation of CD59-cluster-rafts (stabilized raft), which form temporary platform for transmembrane signal transduction. A : Upon the addition of CD59 ligand (C8), or gold particles that can crosslink CD59, CD59 forms clusters, and induces stable rafts, which trigger intracellular signaling such as calcium mobilization. B : Typical trajectories of stabilized CD59-cluster rafts induced by crosslinking gold particles observed for 10 s at a 33 ms resolution. The color of the trajectory was changed every 2 s. CD59-cluster rafts undergo temporary cessation of diffusion, which lasts on average of 0.7 s, every 3 s on average. At video rate, hop movement is not detectable due to insufficient temporal resolution. C : A model showing how temporary cessation of diffusion of CD59-cluster rafts may be induced to form a platform for transducing the extracellular CD59 signal to the intracellular Ca^{2+} responses.

CD59 クラスターラフトを見ると、ホップの平均頻度は、クロスリンク前の約 1/8 程度 (200 ミリ秒に 1 回ホップする) である。通常のビデオレートでの観察では、このホップは見えず、見かけ上の遅い単純拡散運動が観察される。しかし、それだけではなく、実に興味深い挙動を示すことがわかった。すなわち、平均で 3 秒に 1 回、約 0.7 秒間、運動が停止して一時停留しては、また拡散することを繰り返していたのである (Fig. 4B)。

さらに、CD59 クラスターラフトの運動観察と GFP を結合させた Lyn と Gai などのシグナル分子の 1 分子観察を同時に行った。その結果、一時停留は、これらのシグナル分子がコレステロール依存的に CD59 クラスターラフトにリクルートされ、アクチン膜骨格への結合を誘起することによって起こることがわかった。一時停留時に限って、シグナル分子 phospholipase C γ もリクルートされ、細胞内カルシウム応答を引き起こした。詳しくは別の機会に譲るが、この結果は、一時停留中の CD59 クラスターラフトが CD59 シグナルを細胞内のカルシウムシグナルに変換するサイト (シグナル変換のプラットフォーム) であることが示すものである (Fig. 4C)^{29)~31)}。このような機構は、多分子の平均を見ていたのでは、全くわからなかったであろう。

おわりに

細胞膜のコンパートメント化と膜分子のホップ拡散、安定化ラフトが細胞膜上でのシグナル変換を行う機構など、一分子で見て初めてわかる基本メカニズムが、細胞の中にはたくさんありそうである。すなわち、細胞の中のシステムや生体分子は「確率過程論的に働く」ので (つまり、同期して働かないので)、実際に働く仕組みを調べようとすると、1 分子ごとに見る以外にないということである。

さらに、細胞内では、1 種の分子といえど

も、違った分子に結合したり、活性化状態が違ったり、周囲の環境が違ったりするのが普通である。すなわち、分子は「細胞内では本質的にヘテロジニアスなものとして働く」。この実態をとらえるには分子の一個ずつを多数見て、何がどの程度の割合で起こっているかを調べるより手はない。はじめから、多数分子の平均挙動を見るとというのは、実は何を平均しているのかわからず、むやみに平均しているということになるのである。一分子観察を行って何が起こっているのかを明らかにした後に、初めて、多数分子の平均に意味を与えることが可能になるのである。その時点で、多数分子のアンサンブル平均をとるような観察法は、創薬などの開発の現場にとっても有用な方法となるであろう。しかし、まずは、1 分子観察によって、何が起こっているかを知ることが先決である。読者の皆さんが、1 分子観察や操作の手法に興味をもたれ、自分の研究に生かしていただくきっかけと本稿がなれば、幸いである。

文 献

- 1) 楠見明弘. バイオイメージングから 1 分子観察と操作へ. 楠見明弘, 小林 剛, 吉村昭彦, 徳永万喜洋編, 実験医学別刷「バイオイメージングでここまで理解する」. 羊土社, 2003; 20: 10-14
- 2) Murakoshi H, Iino R, Kobayashi T, Fujiwara T, Ohshima C, Yoshimura A, Kusumi A. Single molecule imaging analysis of Ras activation in living cells. In: Proc Natl Acad Sci USA, 2004; 101: 7317-7322
- 3) Saxton MJ, Jacobson K: Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. Annu Rev Biophys Biomol Struct 1997; 26: 373-399
- 4) Kusumi A, Sako Y: Cell surface organization by the membrane skeleton. Curr Opin Cell Biol 1996; 8: 566-574
- 5) Iino R, Koyama I, Kusumi A: Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. Biophys J 2001; 80: 2667-2677

- 6) Sako Y, Minoguchi T, Yanagida T : Single molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nature Cell Biol* 2000 ; 2 : 168-172
- 7) Axelrod D : Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Method Enzymol* 2003 ; 361 : 1-33
- 8) Tokunaga M, Kitamura K, Saito K, Iwane AH, Yanagida T : Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; 235 : 47-53
- 9) Edidin M, Kuo SC, Sheetz MP : Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers. *Science* 1991 ; 254 : 1379-1382
- 10) Sako Y, Kusumi A : Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers : fence versus tether. *J Cell Biol* 1995 ; 129 : 1559-1574
- 11) Tomishige M, Sako Y, Kusumi A : Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking : corraling and tethering by the membrane skeleton. *J Cell Biol* 1998 ; 142 : 989-1000
- 12) Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Kusumi A : Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol* 2002 ; 157 : 1071-1081
- 13) Murase K, Fujiwara T, Umemura Y, Suzuki K, Iino R, Yamashita H, Saito M, Murakoshi H, Ritchie K, Kusumi A : Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys J* 2004 ; 86 : 4075-4093
- 14) Singer SJ, Nicolson GL : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972 ; 175 : 720-731
- 15) Saffman PG, Delbrück M. Brownian motion in biological membranes. In : *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975 ; 72 : 3111-3113
- 16) Peters R, Cherry RJ. Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers : experimental test of the Saffman-Delbrück equations. In : *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982 ; 79 : 4317-4321
- 17) 楠見明弘, 佐甲靖志 : 分子運動の直接観察による細胞膜のドメイン構造の研究. *表面* 1991 ; 30 : 44-51
- 18) 富重道雄, 楠見明弘 : 膜タンパク質を見て, 引っ張る—膜骨格による動的な制御機構を探る—. *生物物理* 1997 ; 37 : 244-248
- 19) 藤原敬宏, Ken Ritchie, 鈴木健一 : 細胞膜上での1分子観察と操作. *細胞工学* 2001 ; 20 : 697-703
- 20) 村瀬琴乃, Ken Ritchie, 藤原敬宏, 飯野亮太, 中田千枝子, 楠見明弘 : 細胞膜分子の膜骨格による組織化機構. *膜* 2002 ; 27 : 58-66
- 21) 楠見明弘. 1分子ナノバイオロジー. 多比良和成, 菅 裕明編, 蛋白質核酸酵素増刊「化学と生物学の接点がつくる New バイオテクノロジー」, 共立出版, 2003 ; 1559-1567
- 22) Kusumi A, Koyama-Honda I, Suzuki K : Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic* 2004 ; 5 : 213-230
- 23) Simons K, Ikonen E : Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997 ; 387 : 569-572
- 24) Brown DA, Rose JK : Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992 ; 68 : 533-544
- 25) Heerklotz H : Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J* 2002 ; 83 : 2693-2701
- 26) Munro S : Lipid rafts : elusive or illusive? *Cell* 2003 ; 115 : 377
- 27) Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Horber JK : Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 2000 ; 148 : 997-1008
- 28) Simons K, Vaz WL : Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2004 ; 33 : 269-295
- 29) Suzuki K, Sanematsu F, Fujiwara T, Edidin M, Kusumi A : Rapid, continual formation/dispersion of raft-like domains in the resting cell membrane. *Mol Biol Cell* 2001 ; 12 : 470a

- 30) Suzuki K, Sanematsu F, Fujiwara T, Edidin M, Kusumi A : Stimulation-induced formation of stabilized but temporal rafts. *Biophys J* 2002 ; 82 : 348a
- 31) Suzuki K, Fujiwara T, Ritchie K, Sanematsu F, Hirano H, Edidin M, Kusumi A : GPI-anchored proteins reside in smaller, transient, lipid rafts on a variety of cell membranes that have different cytoskeleton mesh size. *Biophys J* 2004 ; 86 : 9a

Single Molecule Imaging of Membrane Molecules on Cell Plasma Membranes

Kenichi SUZUKI^{1,2}, Akihiro KUSUMI^{1,2}

¹*Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University
53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507*

²*Kusumi Membrane Mechanisms Project, ICORP, Japan Science & Technology Agency*

Recent advancements in single-molecule methods allow us to observe with nanometer-level precision the movement, recruitment, and activation of single molecules in the plasma membrane in living cells. Employing various single-molecule observations, we found membrane mechanisms not previously detectable by conventional bulk observation methods. In this review, we describe two such examples. First, we will explain the partitioning of the entire plasma membrane into sub-micron compartments by the “fence” effect of the actin-based membrane skeleton as well as rows of transmembrane protein “pickets” anchored to the membrane skeleton fence. This partitioning entails virtually all molecules incorporated in the plasma membrane undergoing short-term confined diffusion within a compartment and long-term diffusion over many compartments, termed hop diffusion. Second, we will summarize our new data on how rafts may be involved in the signal transduction of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored receptors in the plasma membrane.