

細胞膜脂質ラフトを介したシグナル伝達機構

はじめに

初期の脂質ラフトの概念は、以下のようなものであった¹⁾。「細胞膜中には直径1 μm 以上の、コレステロール、糖脂質の濃度が高い膜領域が常に存在している。そこには、受容体や細胞内の脂質アンカー型シグナル伝達分子が濃縮されている。このラフト領域にある受容体が外部刺激で活性化されると、ラフト領域内の細胞膜内層に集積するラフト分子にシグナルが伝わる。このように、ラフトはシグナル伝達分子が予め集められているプラットフォームであり、効率よいシグナル伝達を可能とする。」しかしその後、この仮説を検証すべく多くの研究が行われたにも関わらず、このような大きく、多くのシグナル伝達分子を集めるようなラフトは、外部刺激以前には決して見つからなかったのである。現在、実存すると考えられているラフトは、コレステロール依存性の、直径5~20 nmの大きさの分子集合体、数個のラフト関連タンパク質 [主にグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質] の会合体だけである²⁻⁴⁾。我々の最近の研究では、これらの会合体の寿命は、わずか0.2秒程度であることがわかりつつある⁵⁾。今では、定常状態の細胞膜には、このようなタンパク質会合体を含んだ小さなラフトしかないというラフトの提案者の Kai Simons 博士自身も考えているようである⁶⁾。

一方で、膜受容体にリガンドを添加したり、抗体で架橋するなどの刺激後、大きく安定なラフト領域ができることが多くの細胞系で実証された。一方、刺激前のラフトの観察は以下の理由で間違った解釈が多いように思われる。これらの研究では免疫蛍光染色の実験が多用されるが、その際に、実際には刺激後に形成された大きなラフトが、刺激前から存在すると解釈してしまったという経緯がある。これが、初期のラフト仮説が広まってしまった要因の一つであると思われる。免疫蛍光染色の過程で、抗体での染色の前に細胞膜を固定するために、パラホルムアルデヒドなどで細胞を処理して、膜分子を化学架橋するのが一般的である。しかし、GPI アンカー型受容体や脂質アンカー型シグナル分子を化学架橋して膜上で固定させるのは非常に難しく、抗体による会合をとどめることができないため、大き

な会合体 (ラフト) が刺激前から存在しているように見えてしまう⁷⁾。

1. ラフト関連分子は刺激後会合体ラフトを形成する

1991年 Stefanova らは、GPI アンカー型受容体が、Src ファミリーキナーゼ (SFK) と免疫沈降で共沈すると報告した⁸⁾。その後 GPI アンカー型受容体を架橋すると細胞内カルシウム応答も誘起できることがわかった⁹⁾。これらの結果は、膜貫通部分がない GPI アンカー型受容体を介した膜の表裏でのシグナル伝達機構の存在を示唆している。

それでは、GPI アンカー型受容体を介したラフト経由のシグナル伝達はどのように起きているのだろうか？ ラフト関連分子の架橋によって、安定なラフトが形成されるという多くの報告がある。例えば、Thy-1 という GPI アンカー型受容体を架橋すると、他のラフト関連分子であるコレステロールや糖脂質が集まってくる¹⁰⁾ また、我々の1分子観察では、CD59 という GPI アンカー型受容体の会合体へ糖脂質が約100ミリ秒という短期間リクルートされては、去っていくことが明らかとなった (未発表データ)。従って、このような“受容体の会合体ラフト”中の脂質分子は、外部の脂質と素早く交換可能なようである。

Gaus らは、環境感受性蛍光色素 Laurdan を用いて、接着班の膜領域とコレラ毒素 B サブユニットやカベオラ領域の相状態を直接可視化し、どちらの膜領域も人工膜の秩序液晶相 (Lo 相ともいう。ここでは脂質が秩序だって並んでいる状態だが、分子の拡散係数はゲル相中よりもずっと速い) と似たような状態であると報告している¹¹⁾。従って、受容体の会合体ラフトは人工膜中の Lo 相に似ているかもしれない。

2. 細胞膜外層のラフト関連分子から内層の脂質アンカー型分子へのシグナル伝達

前述のように GPI アンカー型受容体や糖脂質は、脂質アンカー型の SFK や G タンパク質と膜表裏で相互作用している。脂質アンカー型シグナル伝達分子もラフト内にあるために、シグナル伝達はラフトを介して起こっているかもしれないが、まだその機構は明らかではない。細胞膜外層の受容体の会合体ラフトがいかにして、細胞膜内層のシグナル伝達分子をリクルートするのであるか？ それには二つの可能性がある。一つは、外層の受容体の会合体ラフト形成において、ある膜貫通タンパク質がリクルートされ、その細胞質ドメインとの相互作用で膜内層のシグナル分子が選択的に集まるという説である。例えば、GPI アン

カー型受容体の GFR α 1 は、リガンドの GDNF (グリア細胞由来神経栄養因子) 添加後、c-Ret という膜貫通タンパク質とラフト内で相互作用するようになると報告されている¹²⁾。もう一つは、リン脂質のあるいはタンパク質に修飾された脂肪酸のアルキル鎖が長いと、細胞膜の外層と内層にあるアルキル鎖の先端部分が、2分子膜の中間から反対側の層に突き抜け、膜内外層のアルキル鎖間に立体障害が生じ、そのため膜の外層と内層の分子間でも相互作用できるというモデルである。しかし、このモデルの場合、膜内層のシグナル分子を選択的に受容体の会合体ラフトへリクルートさせることは不可能である。このような膜表裏相互作用には、脂質間相互作用、タンパク質間相互作用の両方が重要であることが明らかになりつつあり、次にこれらの研究を紹介する。

3. シグナル分子をラフトへリクルートさせるのは、脂質相互作用か、タンパク質相互作用か？

シグナル分子の受容体へのリクルートにおける脂質間相互作用の貢献度を調べるために、脂肪酸修飾部位を含む SFK の N 末端の 10~20 アミノ酸に単量体 GFP (緑色蛍光タンパク質, 以下 mGFP) を融合させた分子がよく用いられてきた。例えば Douglass らは、Lck の N 末端アミノ酸の mGFP 融合タンパク質 Lck-N10-mGFP, あるいは野生型の Lck-mGFP の、T 細胞受容体クラスター内外での拡散を 1 分子観察して比較している¹³⁾。野生型 Lck はクラスター内で拡散が遅くなるが、Lck-N10 は変わらないので、タンパク質相互作用が受容体クラスターへの Lck のリクルートを誘起していると報告している。一方で、Tavano らは、T 細胞受容体に加えて CD28 が共刺激されて初めて GM1 や Lck-N10-mGFP のようなラフト関連分子が、アクチン結合タンパク質の filamin A を介して、受容体クラスターにリクルートされると報告している¹⁴⁾。また、B 細胞でも、脂質間の弱い相互作用が、強いタンパク質相互作用を調整しているという報告がある¹⁵⁾。

さらに、我々の 2 色同時 1 分子観察実験によると、SFK の一つである Lyn の CD59 受容体の会合体ラフトへのリクルート期間は平均 200 ミリ秒と、Lyn-N20-mGFP (100 ミリ秒) よりも長く、より頻繁であった¹⁶⁾。また、細胞膜からコレステロールを除去すると、シグナル伝達も受容体クラスターとシグナル伝達分子の共局在頻度も劇的に減少した¹⁶⁾。これらの結果は、脂質が関わる相互作用は弱いですが、シグナル強度を変えるには十分であることを示唆している。

以上の最近の報告や我々の結果に基づいて、以下のようなラフト経由のシグナル伝達のモデルを提案したい。

- 1) ラフト関連タンパク質を架橋するなどして刺激すると、他のラフト関連分子のラフトへのリクルートを誘起し、受容体の会合体ラフトが形成される。
- 2) タンパク質相互作用が GPI アンカー型受容体への膜貫通タンパク質のリクルートを促す主因子であるが、GPI アンカー型タンパク質クラスターによるラフト相互作用も膜貫通タンパク質のリクルートには重要である。
- 3) 細胞膜内層のラフト関連分子はタンパク質間相互作用と弱い脂質相互作用で受容体の会合体ラフトへリクルートされる。タンパク質間相互作用の方が強いが、脂質相互作用もシグナル強度を変えるには十分強い。

4. 膜骨格タンパク質により安定化される会合体ラフト

上述したように CD59 会合体ラフトは、タンパク質間相互作用と脂質相互作用の両方によって短期間 G α 2 と Lyn をリクルートしていた (図 1)。各々の CD59 会合体ラフトは、一時停留 (平均 0.57 秒間) と遅い拡散運動を繰り返していた¹⁶⁾。著者らは、この一時停留のことを stimulation-induced temporary arrest of lateral diffusion から STALL と命

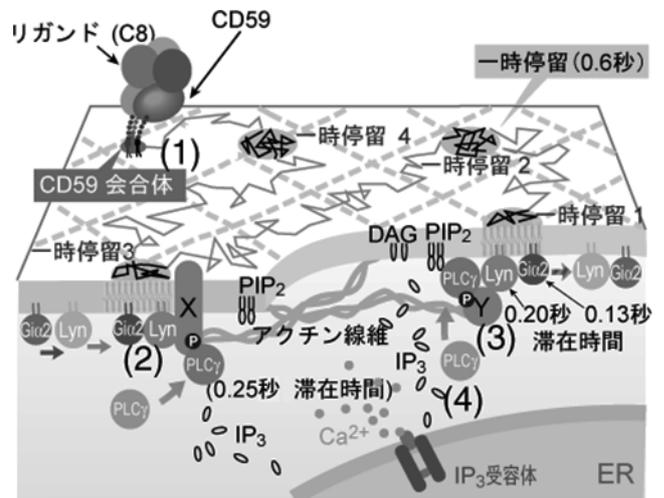


図 1 CD59 会合体ラフトによるシグナル伝達の素過程

シグナルにより受容体 CD59 が会合すると、安定なラフト (会合体ラフト) ができる。この会合体ラフトは膜上を動き回り、アクチン線維上で一時停留時に下流のシグナル伝達のプラットフォームとしてはたらく。ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP₂) が PLC γ により IP₃ とジアシルグリセロール (DAG) に分解されると、IP₃ は細胞内カルシウム応答を誘起する。

名した。会合体ラフトの STALL は, $G\alpha i2$ のリクルートの後に起きていて, おそらくは, $G\alpha i2$ の下流の Lyn の活性化により誘起された (図 1)。様々な実験によりこの会合体ラフトの STALL 形成は, アクチン線維への結合により誘起されることが示唆された。また, ホスホリパーゼ $C\gamma$ ($PLC\gamma$) 分子が 250 ミリ秒という短期間, もっぱら STALL 期間中に会合体ラフトへリクルートされ, そのことがイノシトール三リン酸 (IP_3)- Ca^{2+} シグナルを誘起していた¹⁷⁾。我々は, STALL を起こしている会合体ラフトが, 細胞外シグナルを細胞内の IP_3 - Ca^{2+} シグナルまでつなげるプラットフォームであると提案している (図 1)。

会合体ラフトがアクチン線維に結合する前に, $G\alpha i2$ や Lyn をリクルートしていたことは, $G\alpha i2$ や Lyn のリクルートにはアクチン線維が必要ではないことを示唆している。また, IP_3 - Ca^{2+} シグナルや $PLC\gamma$ のリクルートには, STALL 形成が必要であるので, Lyn より下流のシグナル伝達にはアクチン線維が必要であると思われる。従って我々は, Lyn によって足場タンパク質が活性化され, 会合体ラフトの運動を止め, $PLC\gamma$ のアクチン線維上の結合サ

イトへのリクルートを誘起するというモデルを提案している。この足場タンパク質を同定することは, 次の興味深いテーマである。

5. 受容体の会合体ラフトとラフト関連シグナル伝達分子の間の短期間相互作用により生まれるデジタル式シグナル伝達

上述のとおり, 個々のシグナル分子のリクルートは数百ミリ秒という短期間しか続かなかった。これは, バルクイメーシングやウェスタブロットティングなどで調べた細胞全体のシグナルが続く期間の 1 万分の 1 ほどの短い期間である。どのようにしてこの二つの現象を矛盾なく説明できるのだろうか?

図 2A の上のパネルは, 細胞全体のバルクシグナルの経時変化で, 通常のアナログ的变化を示している。モデル A で示されるとおり, 数分から数十分は続く個々のシグナルの重ね合わせで, 上記のバルクシグナルが生まれているものと思われた。しかし, 強度も時間も正しい上記のバルクシグナルを生み出すにもかかわらず, モデル A では, 次

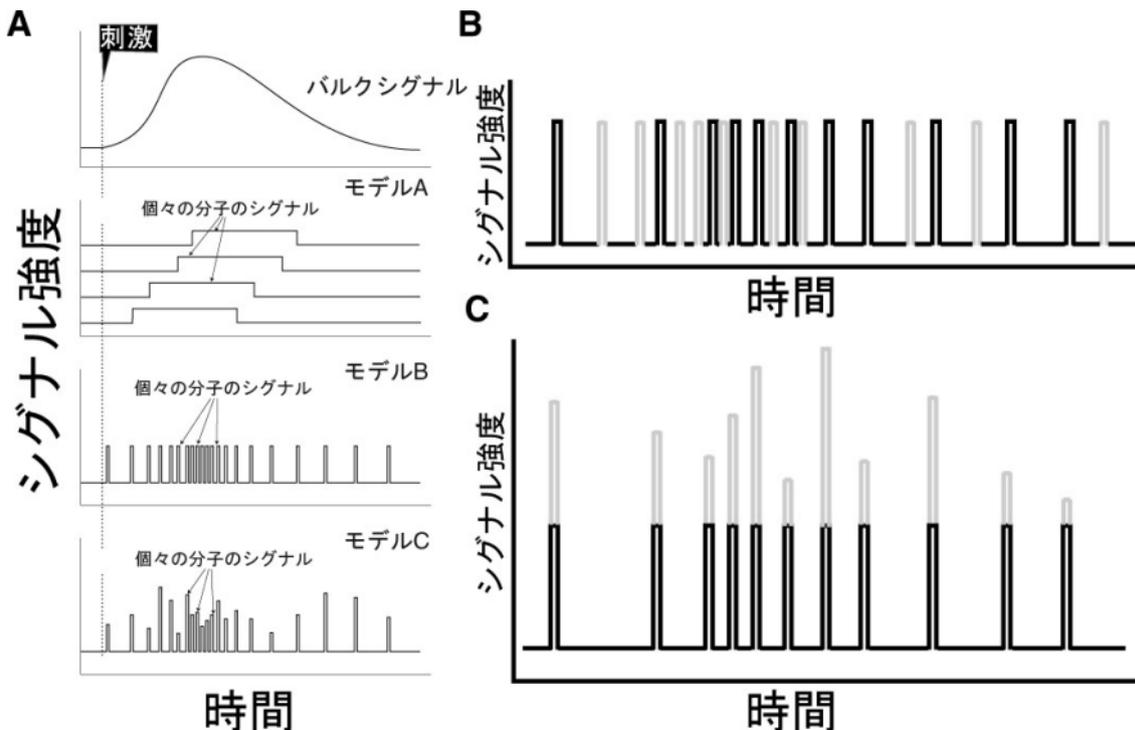


図 2 ラフト経由のデジタル式シグナル伝達

(A) バルクシグナルが, 個々のパルス状シグナルの重ね合わせにより生まれる概念図。(B) ラフトは, 付け加えられたグレーのパルスで示されるように, 個々のシグナルの発生頻度を増加させる。(C) ラフトは, パルスのグレー部分で示すように, 個々のシグナルの持続時間を延ばして, パルス強度を増大させる。

の分子の活性化のタイミングを計りながら、前の分子の不活性化のタイミングを予測せねばならない。細胞がどのようにして、このようなシグナルの複雑な制御をなしえているのか予想もできない。

しかし、1分子観察でわかったように、シグナル伝達の素過程は、数百ミリ秒の時間しか続かない。細胞全体のバルクシグナルの経時変化と比較して、各々の分子のシグナルはモデルBのようにパルス状である。この場合、ある時間におけるバルクシグナル強度は、単純にその単位時間あたりのパルス数で決まり、これならば、制御がやさしい。実際には、個々のシグナルの活性化時間にばらつきがあるため、個々のシグナルのパルス強度は、モデルCのようにばらついていると考えている。現在、著者らはシグナル伝達の基本はデジタル式であるという仮説に基づいて研究を進めている。

ラフトは、分子の局所濃度や衝突頻度を高め、個々のシグナルの発生確率を高める（図2Bのグレーのパルス）。さらに、ラフトは、非ラフト分子のホスファターゼによる脱リン酸化からラフト内のシグナル伝達分子を守り、シグナル分子の活性化時間を延ばし、個々のシグナルのパルス強度を高める（図2Cのパルスのグレー部分）。脂質相互作用は、タンパク質間相互作用よりも弱いので、数多くの脂質相互作用の積み重ねによって、ラフト分子間で様々な強さの相互作用を生成できると考えている。そのため、分子の会合度の変化などに応じて、分子のラフトへの分配のしやすさは、変わりうる。従って、ラフトは個々のシグナルのパルスの頻度と強度を変えることにより、バルクシグナル強度を微調整できると考えている。ラフトのこのような可塑的性質が、デジタル式シグナル伝達を正確で効率的に推し進めると考えている。

おわりに

本稿では、ラフト関連受容体の刺激から、細胞内バルクシグナル産生に至るまでの個々の過程を記述し、ラフト経由のシグナル伝達を解説した。ここで紹介した研究から共通して言えることは、すべてのシグナル伝達過程は、動的であり、デジタル式シグナルを生み出しているということである。将来的には、我々は、1) ラフトがその可塑的性質を利用し、どのようにしてシグナルを多くの経路へ同時に伝えているのか、2) ラフトはその数や大きさを変えて、どのようにしてシグナルの期間や強度を制御しているのか、といった問題に挑んでいきたい。

- 1) Simons, K. & Ikonen, E. (1997) *Nature*, **287**, 569–572.
- 2) 小林俊秀 (2009) 生化学, **81**, 17–23.
- 3) Tian, T., Harding, A., Inder, K., Plowman, S., Parton, R.G., & Hancock, J.F. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 905–914.
- 4) Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgram, S., Ghosh, S., Raghupathy, R., Chadda, R., Vishwakarma, R., Rao, M., & Mayor, S. (2008) *Cell*, **135**, 1085–1097.
- 5) Suzuki, K.G.N., Kasai, R.S., Hirotsawa, K.M., Nemoto, Y.L., Ishibashi, M., Miwa, Y., Fujiwara, T.K., & Kusumi, A. (2012) *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 774–783.
- 6) Simons, K. & Gerl, M.J. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 688–699.
- 7) Tanaka, K.A.K., Suzuki, K.G.N., Shirai, Y.M., Shibutani, S.T., Miyahara, M.S., Tsuboi, H., Yahara, M., Yoshimura, A., Mayor, S., Fujiwara, T.K., & Kusumi, A. (2010) *Nat. Meth.*, **7**, 865–866.
- 8) Stefanova, I., Horejsi, V., Ansotegui, I.J., Knapp, W., & Stockinger, H. (1991) *Science*, **254**, 1016–1019.
- 9) Gouy, H., Deterre, P., Debre, P., & Bismuth, G.J. (1994) *Immunology*, **152**, 3271–3281.
- 10) Marwali, M.R., Rey-Ladino, J., Dreolini, L., Shaw, D., & Takei, F. (2003) *Blood*, **102**, 215–222.
- 11) Gaus, K., Le Lay, S., Balasubramanian, N., & Schwartz, M.A. (2006) *J. Cell Biol.*, **174**, 725–734.
- 12) Takahashi, M. (2001) *Cytokine Growth Factor Rev.*, **12**, 361–373.
- 13) Douglass, A.D. & Vale, R.D. (2005) *Cell*, **121**, 937–950.
- 14) Tavano, R., Contento, R.L., Baranda, S.J., Soligo, M., Tuosto, L., Manes, S., & Viola, A. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1270–1276.
- 15) Sohn, H.W., Tolar, P., & Pierce, S.K. (2008) *J. Cell Biol.*, **182**, 367–379.
- 16) Suzuki, K.G.N., Fujiwara, T.K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M., & Kusumi, A. (2007) *J. Cell Biol.*, **177**, 717–730.
- 17) Suzuki, K.G.N., Fujiwara, T.K., Edidin, M., & Kusumi, A. (2007) *J. Cell Biol.*, **177**, 731–742.

鈴木 健一

(京都大学物質-細胞統合システム拠点)

Mechanisms for signal transduction in lipid rafts of cell plasma membranes

Kenichi G.N. Suzuki (Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)