膜マイクロドメインによる成長因子受容体の制御

樺山 一哉

Modulation of Growth Factor Receptors in Membrane Microdomains

Kazuya Kabayama

Institute of Glycoscience, Tokai University; 4-1-1 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa 259-1292, Japan.

(Received October 11, 2011)

Membrane lateral heterogeneity is accepted as a requirement for the function of biological membranes, and the notion of the “raft/microdomain” gives specificity to this concept. Recently, fluorescence-based techniques such as fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), single particle tracking (SPT), and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) have shown promise for application to the dynamics of membrane molecules in microdomains. We previously revealed, by performing live-cell FRAP and SPT studies, a mechanism of insulin resistance in which dissociation of the insulin receptor (IR)–caveolin-1 (Cav1) complex was caused by an interaction between the IR β subunit and the ganglioside GM3 cluster, a glycolipid-enriched membrane microdomain. We hoped to demonstrate that an alteration in the lipid component of microdomains affects lateral diffusion of membrane receptors. We therefore established an experimental system for monitoring the membrane organization of receptors by analyzing their lateral diffusion parameters in the plasma membranes of living cells using FRAP and SPT. In this study, measurement of the lateral diffusion of the IR was performed by fitting analysis to fluorescence recovery curves and trace analysis to individual fluorescent spots, which provided the diffusion constant. The results show how fast IR molecules diffuse before and after a change in membrane environment, such as stimulation by cholesterol depression or treatment with a glycosphingolipid (GSL) inhibitor. Using these techniques, we have established a method for determining the diffusion constant for the lateral movement of IR-EGFP, expressed in CHO-K1 cells. We will use these techniques for the lateral diffusion analysis of membrane receptors under other assay conditions, such as use of GSL-deficient cells or pathologic samples.

Key words——microdomain; insulin receptor; glycolipid; ganglioside; fluorescence recovery after photobleaching

1. はじめに

膜の不均質性が生体膜において重要な役割を果たしていることがこれまでの研究で実証されており、Lipid Raft (マイクロドメイン) の概念がその基盤となっている。しかしながら、Lipid Raft 研究の分野では解析手法が手詰まりの状態で、生体膜を時空間に支配された液層として研究する物理的手法はまだ開発途中である。これが実際の細胞を解析する際の生物学的手法、物理化学的手法との間に大きな溝を作っている。

Lipid Raft の一種、糖脂質マイクロドメインの構成成分として知られているガングリオシドは、シア

ル酸を含むスフィンゴ糖脂質 (GSL) ファミリーの総称であり、GM3 はその生合成経路における最初の分子である。GM3 はヒトを含む哺乳動物の種々の細胞に広く発現していることから、その生理機能及び病態生理学的意義が注目されている。ガングリオシドは細胞膜表面に発現しがん細胞の接着や浸潤、受容体活性、増殖因子様活性、細胞間認識などに関与しており、がんの悪性度との関連においても多数の報告がある。^{1,2)} これらの作用機序の1つとして膜受容体分子の糖脂質マイクロドメインへの集積あるいは解離が想定されている。しかしながらその解析手法は、シヨ糖密度勾配超遠心を主軸とした「界面活性剤に不溶性か可溶性か？」によって細胞膜上の不均質な局在を評価する方法に留まり、この域を脱していない。さらに、汎用される Triton X-100 のような非イオン性界面活性剤は脂質-タンパク質相互作用を切る性質を持つため、静電的相互作用も

東海大学糖鎖科学研究所 (〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1)

e-mail: kaba@tokai-u.jp

本総説は、日本薬学会第 131 年会シンポジウム OS02 で発表したものを中心に記述したものである。

考慮にいたした「膜受容体分子の糖脂質マイクロドメインへの集積あるいは解離」の評価は困難であると考ええる。

そこで筆者は界面活性剤を「使わない手法」で糖脂質マイクロドメインの機能解明を目指し、蛍光顕微鏡を用いた分子動態解析を導入することを考えた。近年、蛍光標識分子を用いた可視化技術の発展は目覚しく、基礎研究のみならず臨床応用も視野に入れた分子動態解析が注目されている。なお、本総説には一部未発表データも含まれているが、詳細は原著論文として投稿中であることをご理解頂き、拝読願えれば幸甚である。

2. 糖脂質マイクロドメインにより制御される膜受容体の動態解析

2-1. FRAP 法によるインスリン受容体の動的な局在の検討

筆者らは以前に、脂肪細胞のインスリン抵抗性作用機序として、カベオリン 1 (Cav1) に結合してカベオラに局在するインスリン受容体 (IR) が、GM3 との静電的相互作用によりカベオラから解離しシグナルを抑制することが原因の 1 つであることを、光学顕微鏡による膜分子の動態観察法を用いて実証している。研究背景の概要については以前の報告³⁾及び日本語総説⁴⁾を参照されたい。

上記の研究において細胞膜上で IR-Cav1 及び IR-GM3 の相互作用を解析するために、免疫沈降法や、光反応性の GM3 誘導体を用いて生化学的な検討を行った後、生細胞イメージングによる解析法を試みた。解析には共焦点顕微鏡による FRAP (光退色後の蛍光回復測定) 法を用いた。FRAP 法ではターゲットとなる分子に蛍光標識を施すことが必要である。細胞において分子の動態を解析したい領域 (ROI) に強いレーザーを短時間照射し、分子の機能を壊さずに蛍光のみを退色 (ブリーチ) させる。もし目的分子が不動ならば、ブリーチ領域の蛍光は回復しない。動的な分子ならば、拡散することで、周囲の未退色分子が混ざり合い、ブリーチ領域の蛍光は回復していく。この時間経過にともなう蛍光回復率をグラフにプロットすることで、目的分子の動的成分比率や拡散速度を算出することができる (Fig. 1)。

この手法を用いて細胞に発現させた IR-GFP 融合タンパク質及び Cav1-RFP 融合タンパク質の動的成分の比率を測定した。IR-GFP 融合タンパク質

のみを発現させた HEK293 細胞において、IR-GFP の蛍光回復率は 60% であった。一方、IR-GFP と Cav1-RFP を共発現させた場合、Cav1-RFP が形成するドット状の構造体 (Cav1 が形成するカベオラ構造と推定される) が含まれる領域においては、IR-GFP の蛍光回復率は 25% 程度まで減少した。この減少効果は、IR との結合ドメイン (スキュフォールドドメイン) を不活化した変異体 (Cav1^{F92A/V94A}-RFP) との共発現では起こらなかった (Fig. 2)。

以上のことから、FRAP 法によって IR の動的比率すなわち不動化した Cav1 との結合比率を測定できることを確認した。次に、筆者らが以前に構築していた GM3 再構成細胞 (GM3 (+) 細胞) とその親細胞 (GM3 (-) 細胞)⁵⁾において FRAP 法を行った。その結果、GM3 (+) 細胞において IR-GFP の蛍光回復率が 10% 程度高かったことから、細胞膜上で GM3 の発現上昇が IR-Cav1 複合体の解離を促進することが示された (Fig. 3)。

2-2. GM3 が構成する脂質マイクロドメインと IR との相互作用解析

脂肪細胞において、IR と Cav1 は細胞膜内側でそれぞれの結合ドメインを介して結合し、Cav1 を構成成分とするカベオラに局在していることが知られている。^{6,7)} 一方、GM3 は外膜側に存在し、非還元末端に酸性基であるシアル酸を有している。IR は膜貫通領域の細胞外側直上に塩基性アミノ酸のリジンを持つ。ところで、膜近傍には電荷の勾配が存在しており、細胞内膜では膜脂質 (酸性リン脂質ホスファチジルセリン) と C-キナーゼタンパク質のリジンクラスターとの静電的相互作用が細胞内のシグナル制御に関与していることが物理化学的に実証されている (MARCKS のミリストイル静電気スイッチ)。⁸⁾ このことから、外膜においても GM3 が IR-Cav1 複合体に与える影響として、GM3 と IR の静電的相互作用が考えられた。そこで、IR の膜貫通領域直上のリジンを他のアミノ酸残基に置換して FRAP 法を行った。その

樺山一哉

東海大学糖鎖科学研究所特任准教授。
1997 年慶應義塾大学理工学部卒業、
1999 年慶應義塾大学大学院理工学研究
科修士課程修了、2002 年北海道大学大
学院薬学研究科博士課程修了、その後
同大学博士研究員、CREST 研究員を
経て 2006 年東北薬科大学分子生体膜研
究所助手～助教、2009 年より現職。

Fig. 1. FRAP System

FRAP techniques needed to tagging the membrane protein of interest, with a specific fluorescent group and bleaching the fluorescent group in a small area by laser. If target protein was immobile, bleach area was stably dark (Upper panel; Cav1-GFP). However, target protein was mobile, bleach area's fluorescence intensity was recovered, meaning its protein was diffused (Upper panel; IR-GFP) (A). In this study, measurement of the lateral diffusion of the IR was performed by fitting analysis to fluorescence recovery curves, which provided M_f (ratio of mobile fraction) and the diffusion constant (B).

結果, 中性アミノ酸であるバリン, セリン, グルタミンに置換した IR-GFP 変異体すべてにおいて, 蛍光回復率の低下がみられた (Fig. 4). 以上の結果から, GM3 の発現上昇によって IR β サブユニットの細胞膜直上のリジン残基と GM3 のシアル酸残基の静電的相互作用が増大した結果, IR-Cav1 複合体が解離する分子機構が明らかにされた. 筆者は上皮成長因子受容体 (EGFR) や血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) などの成長因子受容体においても, 膜直上の塩基性アミノ酸残基が酸性糖脂質の形成する環境場と静電的に相互作用していることを想定しているが,³⁾ 最近になり Simons らの研究によ

り EGFR の細胞膜直上に存在するリジンをグルタミンに変異させると GM3 との相互作用が減少することも示された.⁹⁾

2-3. 細胞膜の脂質組成変化によるインスリン受容体の動態解析 このメカニズムをさらに詳細に検討していくために, IR の膜上での動態が脂質組成の変化によりどのような影響を受けるのかを測定した. まず, IR-EGFP の安定発現株を CHO-K1 細胞を用いて作成し, 蛍光標識した受容体がインスリンにより活性化することを確認した (Data not shown). 次に細胞株に対して FRAP 計測を行った.

測定には共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Olympus

Fig. 2. Immobilization of IR by Cav1 in Living Cells
The fluorescence recovery of Cav1-RFP (Upper; open circle) or the Cav1-RFP mutant (Upper; closed circle) co-expressed with IR-GFP, and the fluorescence recovery of IR-GFP expressed alone (Lower; open circle) or co-expressed with Cav1-RFP (Lower; triangle) or the Cav1-RFP mutant (lower; closed circle) were measured.

Fig. 4. The Lysine Residue IR944 is Essential for the Interaction of IR with GM3
Specificity of the interaction between lysine at IR944 and GM3 by FRAP analyses. Schematic structure of IR-GFP mutants in which the lysine at IR944 is replaced with basic and neutral amino acids (A). Fluorescence recovery of IR-GFP mutants in GM3(+) cells (B).

Fig. 3. Enhanced Mobility of IR in GM3-enriched Membrane
Glycosphingolipid analysis of GM3-reconstituted cells [GM3(+)] and mock cells [GM3(-)]. Glycosphingolipids extracted from these cells, corresponding to 1 mg of cellular protein, were separated on HPTLC plates and stained with resorcinol-HCl reagent to visualize gangliosides, or with cupric acetate-phosphoric acid reagent for neutral glycosphingolipids as described in Materials and Methods (A). FRAP analyses. Shown is fluorescence recovery of IR-GFP in GM3(-) and GM3(+) cells expressing equal levels of Cav1 (Inset) (B).

FV1000-D) を用いた。対物レンズは UPLSAPO の 60 倍水浸仕様で開口数は 1.20、蛍光の励起にはマルチアルゴンレーザー（波長 488 nm）を用いた。イメージサイズは 512×512 pixel とし、スキャンスピードは 4.0 μ s/pixel、ズームは 5.0 倍（0.082 μ m/pixel）に設定した。スキャン設定は、ブリーチ前にレーザーパワー 1.0% で 5 フレーム、ブリーチ ROI の形状を円形（radius 30 pixel=2.46 μ m）にし、レーザーパワー 100% で ROI を 3 回ブリーチした後、レーザーパワー 1.0%、94 フレームを取得する条件で行った。細胞は 35 mm ガラス底ディッシュに培養し、測定前にフェノール非含有培地である Opti-MEM に交換した後、顕微鏡に設置した培養ステージにて 5 分間以上安定させた。

まず、コントロールとなる IR-EGFP 安定発現株に対して FRAP を行い、得られた蛍光回復曲線に対して非線形カーブフィッティング解析を行った。カーブフィッティングとは、実験的に得られたデータに対して、決められた条件に最もよく当てはまるような曲線を求めることで、今回筆者は、IR が細胞膜上で複数の異なる側方拡散を行う成分に分離できる（すなわち、細胞膜が 2 つ以上の不均質な成分で構成され、そこを IR が拡散している）と仮定し、Fig. 5(A) のようなモデル式を当てはめた。計算には OriginPro 8.0 (Light Stone 社) を用いて最小自乗法を使用した。その結果、IR の拡散成分が 1 成分であると仮定したよりも、2 成分と仮定した方が、オリジナルデータと計算結果の間の 2 乗誤差の

和を示すカイ 2 乗値 (χ^2) が減少することがわかり、Fig. 5(B) に示されるようにフィッティングカーブも 1 成分（左図）より 2 成分（右図）の方が実測値に重なった。このようにして成分数を増やした結果、3 成分以降では至適な成分比が得られなかったため、本研究では IR を 2 成分に分けて以降の検討を行った。

今回のモデル式によるフィッティング解析から、動的成分を 100% としたときの成分比率、蛍光回復率の収束値（＝動的比率）及び各成分が完全に蛍光回復するまでの時間の半値（T-half）を求めた。その結果、遅い拡散（T-half=30.33(s)）をする成分は 45.7%，速い拡散（T-half=5.54(s)）をする成分は 31.9%，動的比率は 0.79 となった。

続いて膜脂質の組成を外因的に調節するために、本研究では、コレステロールを包括し除去する試薬である M β CD と糖脂質生合成阻害剤の D-PBPP を用いて検討を行った（Fig. 6）。M β CD が細胞の形状及び生死に影響がない条件を種々検討した結果、濃度及び処理時間は 5 mM 10 min に確定した。この条件において FRAP 計測を行いコントロールと比較した結果、動的比率が 0.79 から 0.68 に減少した。興味あることに、この時 IR の遅い成分には影響はなく、速い成分の成分比率のみが同程度減少していた。また、それぞれの IR の拡散定数を算出したところ、M β CD 処理による顕著な変化はみられなかった。一方、糖脂質生合成阻害剤である D-PBPP の処理条件は常法により 20 μ M 48 時間で行

Fig. 5. Equation of Multi-component Fitting Model and Curve Fitting Analyses of Mobile Insulin Receptors

The equation of multi-component fitting model was described into the square (A). One- and two-component fits to FRAP data using OriginPro 8.0 software. Mobile molecules of IR-EGFP were separated into two components (B).

Fig. 6. Curve Fitting Analyses by Treatment with Lipid Regulators

Ratio of fast component and the M_f values of IR decreased by treatment with M β CD (A, D). On the other hand, Ratio of slow component and the M_f values of IR increased by treatment with D-PBPP (B, D). Fluorescence recovery ratio of IR-EGFP was affected by treatment with M β CD or D-PBPP (C).

った。この条件において同様に FRAP 計測を行いコントロールと比較した結果、動的比率は M β CD とは逆に 0.76 から 0.82 に増加した。この時 IR の速い成分には影響はなく、遅い成分の成分比率のみが同程度増加していた。IR の拡散定数は各成分とも若干減少したが顕著なものではなかった。

また、それぞれの処理条件において、IR のインスリン刺激による自己リン酸化を調べたところ、M β CD では活性の増減は観察されなかったが D-PBPP では顕著な低下がみられた(Data not shown)。

この結果は、膜受容体が脂質組成変化の影響が異なる複数の領域（マイクロドメインを含む）に存在し、領域毎に受容体の活性調節が行われている可能性を示しており、生細胞において 1 分子観察以外の方法でマイクロドメインの存在を示す重要な証拠となり得る。ただし FRAP から得られる情報は、それ自体が測定領域における「拡散の平均」を示しているため、原理的にも多成分 fitting による解析結果が厳密にターゲット分子を複数の速度成分に区分けしたことにはならない。今後は新たなモデル式も導入し、脂質組成の違いによる受容体の流動性の変化を解析していく予定である。

2-4. 不均質な膜分子環境における 1 粒子追跡法

の有用性 全反射顕微鏡も膜受容体の側方拡散を解析する上で有用な装置である。以前に筆者らは、全反射顕微鏡を用いて細胞膜上の IR-GFP と Cav1-GFP の動態観察を行った。³⁾ しかし、拡散速度を測定する上では GFP は退色が激しいため条件設定に制約が生じる。そこで現在は、GFP の代わりに低分子リガンドと特異的な共有結合を形成するタグタンパク質を利用した Halo-Tag テクノロジー（プロメガ社）を用いて、テトラメチルローダミン (TMR) を標識した IR-TMR 及び Cav1-TMR を作成し、解析を行った。これにより標識分子の形成する粒子 (1 分子であるかどうかは検証の必要がある) の拡散係数をヒストグラムとして表示することが可能になる。つまり、ウエスタンブロットなどの生化学的データが反応の平均を示しているのに対して、各々の分子の反応パラメータの分布をみることが出来る。このことは、カベオラや糖脂質マイクロドメインなどが存在する不均質な膜分子環境において、受容体の動態を調べるのに適した手法であると考えている。

また、拡散係数の計測においては、輝点追跡ソフト「G-Track (ジートラック)」(ジーオングストローム社) を使用することにより、画像取得後の解析ま

Fig. 7. Single Particle Tracking Analysis by G-track Software
 ①: Image stack (AVI movie). ②: Trace analysis of fluorescent spot.
 ③: Histogram plot of diffusion constant.

での行程をスムーズに進めることが可能になった (Fig. 7).

3. 展望

このところ蛍光顕微鏡装置は、超解像の原理を模索し実用化していく新たな潮流がある一方で、既存の装置をさらに使いこなすべく、解析手法やアプリケーションソフトの改良が施され、イメージングの機器から計測機器へと日々発展を遂げている感もある。上述したように FRAP 法も蛍光回復曲線に対し非線形カーブフィッティングを行うことで、異なる速度成分に分離することが可能であり、そこから膜の質的变化を予想することができる。1 粒子追跡法においても、拡散係数の分布をヒストグラム化して表現することで不均質な膜環境の変化を観察することができる。最近では、蛍光相関スペクトル法 (FCS) の概念を二次元に拡張した画像相関スペクトル法 (ICS) が話題に上るようになってきた。とりわけ筆者は、既存の共焦点顕微鏡を用いて解析できるラスタ画像相関スペクトル法 (RICS)^{10,11)} が膜分子の拡散測定や相互作用解析に有用ではないかと考えており、糖脂質マイクロドメインの生命現象への積極的な関与をこの手法で実証できないかと試行錯誤の日々である。

謝辞 本研究は札幌、仙台と場所を移しながら常に暖かくも厳しくご指導頂いた井ノ口仁一教授 (東北薬科大学分子生体膜研究所) の下で、多くの共同研究者とともに実施した研究を基盤とし、湘南平塚の地で 2009 年に立ち上げた研究室において進展させたものである。東海大学大学院工学研究科修士課程の尾田和隆君並びに共同研究者各位にこの場を借りて感謝申し上げたい。

REFERENCES

- 1) Inokuchi J., Kabayama K., *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **20**, 353–371 (2008).
- 2) Yoshikawa M., Go S., Takasaki K., Kakazu Y., Ohashi M., Nagafuku M., Kabayama K., Sekimoto J., Suzuki S., Takaiwa K., Kimitsuki T., Matsumoto N., Komune S., Kamei D., Saito M., Fujiwara M., Iwasaki K., Inokuchi J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9483–9488 (2009).
- 3) Kabayama K., Sato T., Saito K., Loberto N., Prinetti A., Sonnino S., Kinjo M., Igarashi Y., Inokuchi J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13678–13683 (2007).
- 4) Inokuchi J., Kabayama K., Nagafuku M., Sato T., *Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, **53**, 1552–1557 (2008).
- 5) Uemura S., Kabayama K., Noguchi M., Igarashi Y., Inokuchi J., *Glycobiology*, **13**, 207–216 (2003).
- 6) Okamoto T., Schlegel A., Scherer P. E., Lisanti M. P., *J. Biol. Chem.*, **273**, 5419–5422 (1998).
- 7) Cohen A. W., Razani B., Wang X. B., Combs T. P., Williams T. M., Scherer P. E., Lisanti M. P., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **285**, C222–C235 (2003).
- 8) McLaughlin S., Murray D., *Nature*, **438**, 605–611 (2005).
- 9) Coskun U., Grzybek M., Drechsel D., Simons K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9044–9048 (2011).
- 10) Digman M. A., Brown C. M., Sengupta P., Wiseman P. W., Horwitz A. R., Gratton E., *Biophys. J.*, **89**, 1317–1327 (2005).
- 11) Digman M. A., Wiseman P. W., Horwitz A. R., Gratton E., *Biophys. J.*, **96**, 707–716 (2009).