

Mechanism for signal transduction in the induced-raft domains as revealed by single-molecule tracking

1 分子追跡が明らかにした誘導ラフト領域におけるシグナル変換機構

Suzuki, Kenichi G. N.^{1,2}; and Kusumi, Akihiro^{2,3}

¹Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO),
Japan Science & Technology Agency (JST),

²Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Institute for Frontier Medical Sciences,
Kyoto University, Kyoto, 606-8507 Japan,

³Membrane Mechanism Protect, International Cooperative Research Project (ICORP),
Japan Science & Technology Agency (JST)

FAX: +81-75-751-4113, E-mail: ksuzuki@frontier.kyoto-u.ac.jp

(Received on September 23, 2008, accepted on September 25, 2008)

Key Words: single-molecule tracking, plasma membrane, membrane skeleton, signal transduction, induced raft domain

Abstract

Raft domains have been proposed to work as a platform where raftophilic signaling molecules assemble and interact for efficient signal transduction. However, this raft hypothesis has been difficult to prove. Our recent single-molecule tracking experiments revealed that cytoplasmic signaling molecules were frequently, but very transiently recruited to the rafts formed on demand by the clusters of raftophilic glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored receptors (e.g., CD59) that were generated after the engagement of the receptors by the binding of extracellular signaling molecules. All of the cytoplasmic signaling molecules examined thus far, Gai2, Lyn, and PLC γ , exhibited short residency times of ~ 200 ms within the CD59-cluster rafts. This recruitment period of each individual signaling molecule was short, compared with the periods of overall bulk activation of these molecules by a factor of 4,000. Argument has been advanced that the analogue bulk signal, which lasts for over several thousands seconds, is generated by the superposition of the short-lived, digital-like individual signals, which last for a fraction of a second.

要約

ラフトドメインは、分子が効率的にシグナル伝達を行うために集まり、相互作用するプラットフォームであると提案されている。最近我々は1分子追跡実験により、細胞外シグナル分子の結合による受容体刺激後に形成された、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型受容体 (例えば CD59) のクラスターにより、オンデマンドに形成されるラフトへ、細胞質側のシグナル分子がしばしば、しかし非常に一時的にリクルートされることを明らかにした。今までに調べたすべての細胞質側のシグナル分子、Gai2, Lyn, PLC γ は、CD59 クラスターラフト内で ~ 200 ミリ秒の短い滞在時間を示していた。各々のシグナル分子のリクルート期間は、これらの分子全体のバルクの活性化期間と比較して4000倍も短かった。数千秒以上もの間続くアナログ型のバルクシグナルが、1秒以下しか続かない短寿命のデジタル式の個々のシグナルの重ね合わせにより生み出されていることについて議論を進めた。

A. Introduction

In recent years, so-called raft hypothesis, initially conceived and proposed by Simons and van Meer (1) and Simons and Ikonen (2), has attracted extensive attention as a platform for signal transduction on the plasma membrane. According to the raft hypothesis, upon the reception of extracellular queues by raftophilic receptors in the plasma membrane (receptors are often considered to parti-

A. はじめに

Simons と van Meer ら (1), そして Simons と Ikonen ら (2) により最初に提案されたラフト仮説は、形質膜上のシグナル伝達のためのプラットフォームとして近年非常に注目されている。ラフト仮説によると、形質膜上のラフト様受容体 (細胞を低温下で Triton 処理し超遠心後に、受容体が低密度画分に回収されれば、その受容体は形質膜上のいわゆるラフト

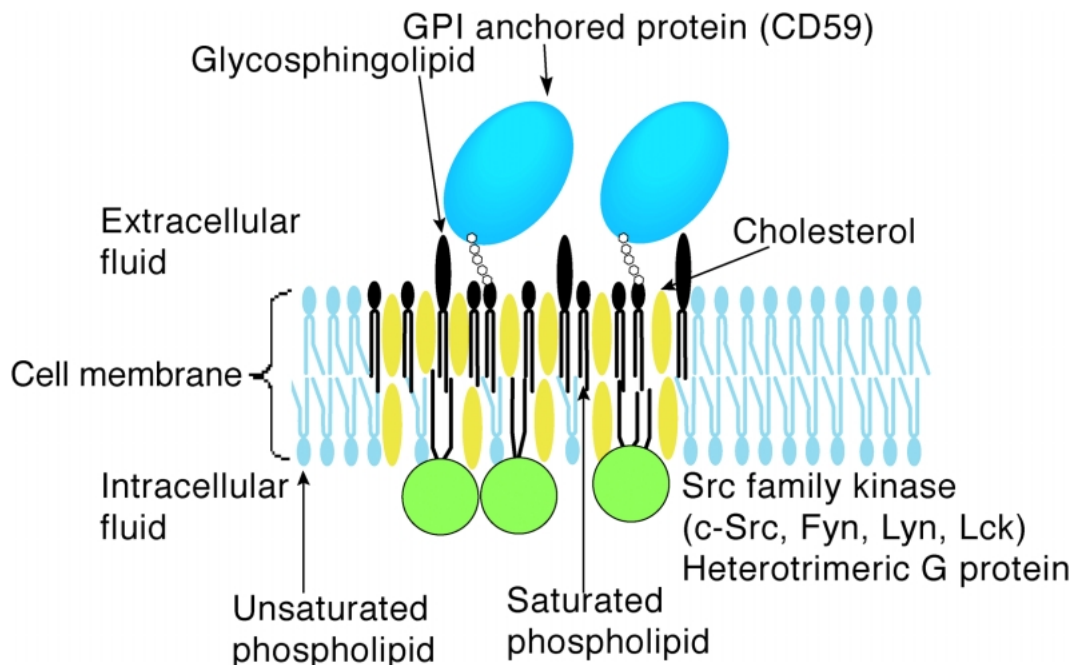


Fig. 1. A schematic drawing of the hypothetical composition and structure of the raft domains.

tion into so-called raft domains in the plasma membrane if they are recovered in the low-density fraction by ultracentrifugation after cold-Triton treatment of the cell, and therefore, these receptors are called raftophilic in this review), these receptors as well as raftophilic intracellular lipid-anchored signaling molecules assemble in the pre-existing rafts or form new stabilized rafts, where, due to higher concentrations of the molecules in the stabilized rafts, the raftophilic signaling molecules efficiently interact with each other to carry out signal transduction, involved in, to name a few, cell growth (3), cell adhesion (4,5), neuronal activity (6-8), and immunological responses (9,10). Raft domains are considered to be enriched in glycosphingolipids (11-14), cholesterol (15), glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins (16) in the outer leaflet, and in lipid (saturated fatty acid)-anchored signaling molecules such as heterotrimeric G proteins and Src family kinases (SFKs) (17), in the inner leaflet (Fig. 1).

About 10% of the signal receptors in the plasma membrane are considered to be anchored to the plasma membrane by way of the covalent linkage to a phospholipid, called glycosylphosphatidylinositol or GPI (18), and therefore, these receptors are called GPI-anchored receptors (GPI-ARs), or GPI-anchored proteins. Since these GPI-ARs are not exposed to the cytoplasmic surface of the plasma membrane, how GPI-anchored receptors transduce signals from the outside world to the inside of the cell has been a long-standing enigma (17). In recent

ドメインへ分配されていると考えられている。従って、この総説ではこれらの受容体をラフト様受容体と呼んでいる)によって細胞外のシグナルが受け取られると、これらの受容体は、ラフト様の細胞内脂質アンカー型シグナル分子と同様に、刺激前から存在するラフト中に集まってくるか、新しい安定化ラフトを形成する。この安定化ラフトにおいて、ラフト様シグナル分子の濃度が高くなるために、お互いの分子が効率よく相互作用し、シグナル伝達を行う。例えばラフトに関連したシグナル伝達の例を2, 3挙げると、細胞の増殖(3)、細胞接着(4,5)、神経活動(6-8)、免疫反応(9,10)などがある。膜の外層のラフトドメインにはスフィンゴ糖脂質(11-14)、コレステロール(15)、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(16)などが、内層のラフトドメインには三量体Gタンパク質やSrcファミリーキナーゼ(SFK)(17)など脂質(飽和脂肪酸)アンカー型シグナル分子が濃縮されていると考えられている(図1)。

ところで、細胞形質膜上の受容体のうち約10%は、GPI(18)と呼ばれるリン脂質に結合することにより細胞膜にアンカーされていると考えられており、従って、これらの受容体はGPIアンカー型受容体(GPI-ARs)、あるいはGPIアンカー型タンパク質と呼ばれている。これらのGPI-ARsは細胞膜内側に露出していないので、GPI-ARsがどのようにして細胞外からのシグナルを細胞内に伝えているのかが長い間疑問であった(17)。近年、GPI-ARsのシグナル伝達はラフトを介して

years, many researchers started to believe that the signal transduction of GPI-ARs is carried out in raft domains, but how this is done is totally unknown.

Recently, we approached this problem by using single-molecule tracking techniques we developed and advanced. These techniques are extremely useful for tracking movement, distribution, interaction of two or three molecules, and the reaction of molecules at the level of single molecules in living cells (19–22). We applied this technique to the study of signal transduction *via* GPI-ARs by observing the behavior of GPI-ARs and several cytoplasmic signaling molecules upon the engagement of GPI-ARs (23,24). In the present review, we briefly summarize the methods employed and the results obtained in this research.

B. GPI-anchored receptors form cluster-rafts upon stimulation

As a prototypical GPI-AR, we employed CD59, the receptor for the eighth component of the complement (C8), which works at the first step in the signaling pathway of protecting cells against the self-attack of the complement system. Upon the addition of C8, CD59 forms clusters, which trigger the signal transduction (Fig. 2(1)).

起きているかもしれないと多くの研究者が信じ始めているが、これがどのようにして起こるのかは全くわかっていない。

最近我々は、自ら開発した1分子追跡法を用いて、これらの課題に取り組んでいる。これらの手法は、分子の運動、分布や、2分子または3分子間の相互作用や、分子の反応(19–22)を、生きている細胞膜上で1分子レベルで追跡するのに極めて有益である。我々は GPI-ARs 刺激後の GPI-ARs と細胞質側のシグナル分子の挙動を同時に1分子観察すること(23,24)により、GPI-ARs によるシグナル伝達の研究を行った。この総説では、我々の研究で用いられた手法とそこで得られた結果を簡単にまとめる。

B. 刺激によって GPI アンカー型受容体はクラスターラフトを形成する

典型的 GPI-AR として、我々は、自己の補体による攻撃から細胞を守るシグナル経路の最初にある受容体である CD59 という補体の第 8 成分 (C8) の受容体を用いた。C8 を添加すると CD59 は会合し、シグナル伝達を誘導する (図 2(1))。

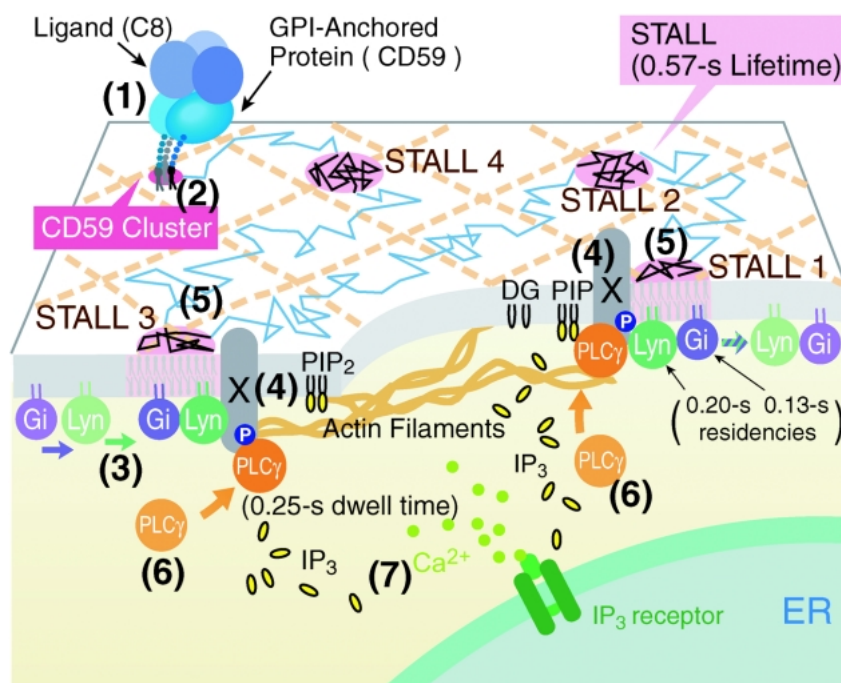


Fig. 2. CD59-cluster rafts trigger intracellular signaling at STALLED sites. A working model showing how STALL of the CD59-cluster raft might be induced and how it might function as a transient platform for transducing the extracellular CD59 signal to the intracellular IP₃-Ca²⁺ signal (via PLCγ2 recruitment to STALLED CD59-cluster raft). See the text for further details.

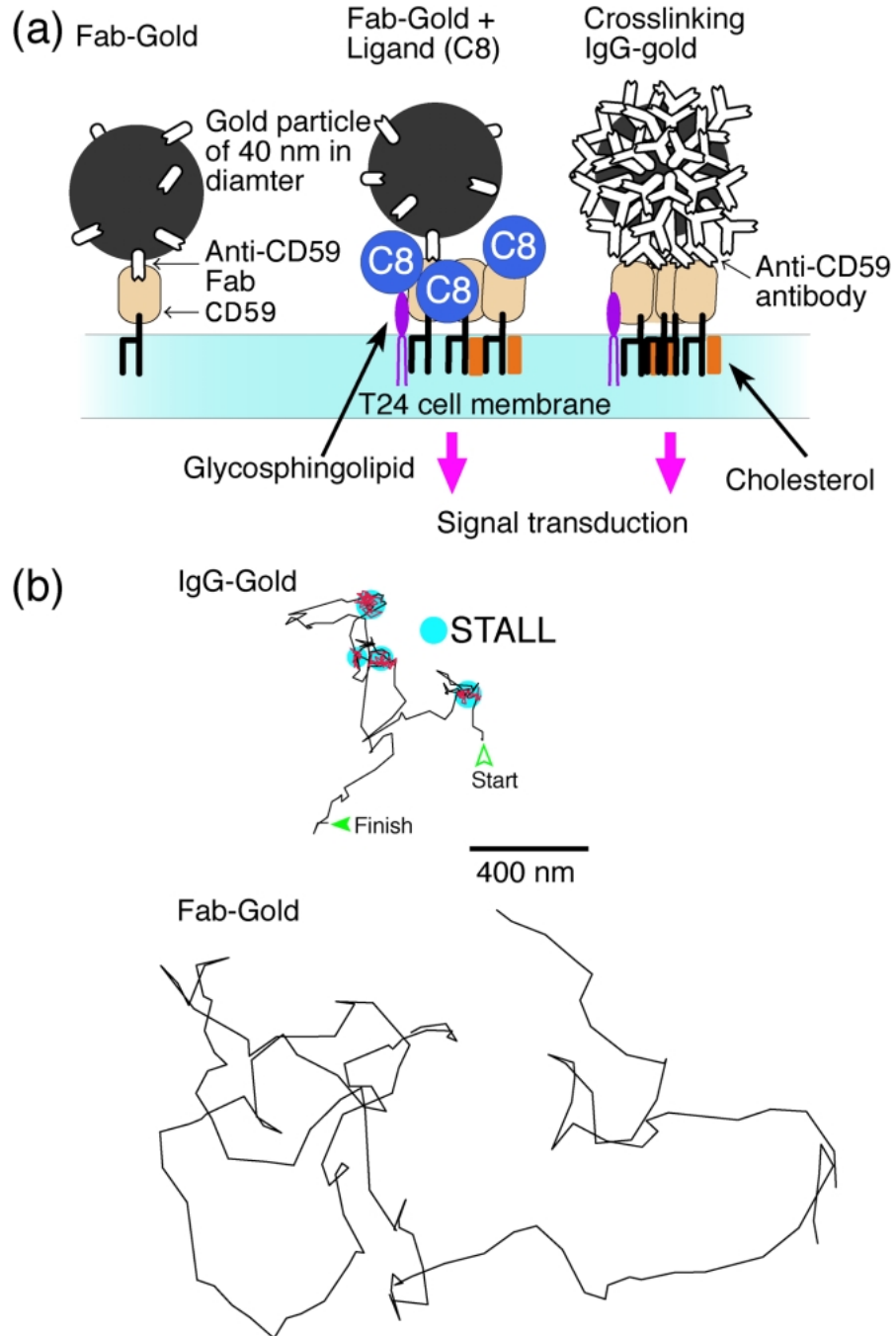


Fig. 3. CD59-cluster rafts undergo alternating periods of STALL and apparent, simple-Brownian diffusion. (a) Stimulation of CD59 with IgG-Gold, or C8-Fab-Gold induces clustering of CD59, which then turn into CD59-cluster rafts. (b) (Top trajectory) A typical trajectory of IgG-Gold recorded for 10 s at video rate. CD59-cluster rafts exhibit alternating periods of apparent, simple-Brownian diffusion (black trajectories) and STALL (magenta trajectories in the circular blue areas). (Bottom trajectory) A representative trajectory of Fab-Gold recorded for 5 seconds at video rate, shown for the comparison with those of IgG-Gold.

By the same token, directly crosslinking CD59 with 40 nm-colloidal gold particles coated with many molecules of anti CD59 immunoglobulin G (IgG-Gold, Fig. 3a) also induced intracellular signaling such as IP₃ production, calcium mobilization, and SFK activation. We used the condition in which an average of six molecules of CD59 were clustered underneath a gold particle, and approximately 600 such CD59 clusters were formed on the basal plasma membrane: namely 3,600 copies of CD59 per cell were engaged. These experimental conditions were selected, because the intracellular signaling was triggered very robustly under these conditions, and the diffusional movement of gold particles that crosslinked six CD59 molecules were similar to that of CD59 clusters induced by the binding of the natural ligand C8. Interestingly, the CD59-cluster-induced signaling was blocked by cholesterol depletion, and reinstated by the subsequent repletion of cholesterol, suggesting that these CD59 clusters induced raft-like domains within the cluster (Fig. 2(1)(2)). Hence, the IgG-Gold-induced CD59 clusters are called CD59-cluster rafts.

C. Extremely anomalous diffusion of CD59-cluster rafts: Stimulation-induced Temporary Arrest of Lateral diffusion = STALL

The behaviors of single individual CD59-cluster rafts, observed at video rate (33 ms/frame), were extremely peculiar. They exhibited alternating periods of apparent simple-Brownian diffusion (with the effective diffusion coefficient in the 100-ms window smaller than that of non-stimulated CD59 by a factor of 8) and temporary immobilization. Both lengths of simple-Brownian and immobilized periods exhibited exponential distributions, with lifetimes of 1.2 and 0.57 s, respectively (Fig. 3b). Since the plasma membrane is like a two-dimensional liquid, the temporary immobilization was totally unexpected, and named Stimulation-induced Temporary Arrest of Lateral diffusion or STALL (Fig. 2(5)). STALL would have been difficult to find by the methods to observe the ensemble-averaged behavior of many molecules, such as FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) or FCS (fluorescence correlation spectroscopy).

After treatments like partial cholesterol depletion, partial actin depolymerization, or blocking of the activity of SFKs, or G α i, STALL as well as IP₃-calcium signaling almost disappeared. Based on these results, we hypothesized that STALL was induced by the binding of CD59-cluster raft to the actin-based membrane skeleton, which might be triggered by G α i activation, which induced SFK activation. This hypothesis is consistent with the previous results obtained by optical tweezers (25,26).

同様に多くの抗 CD59 IgG 抗体で被覆した直径 40 nm の金粒子 (IgG-Gold, 図 3a) で CD59 を集合させても, IP₃ 産生やカルシウム応答, SFK 活性化などの細胞内シグナルが誘起されていた。1 個の金粒子直下に平均 6 個の CD59 分子が会合され, このような CD59 クラスターの 600 個が細胞膜上に形成される条件, つまり細胞あたり 3600 個の CD59 分子が刺激されるという条件を用いた。この条件下で, 細胞内のシグナルは非常に安定して起こり, CD59 の 6 分子をクロスリンクする金粒子の拡散運動は, リガンド C8 結合により誘導された CD59 クラスターの拡散運動に近かったために, 我々はこの実験条件を選んだ。興味深いことに, CD59 クラスターが誘起したシグナルは, コレステロール除去により阻害され, 引き続きコレステロールを戻すことによって回復していた。これは, CD59 クラスターがクラスター内にラフト様ドメインを誘起したことを示唆している (図 2(1)(2))。従って, IgG-Gold が誘起した CD59 クラスターを CD59 クラスターラフトと呼んでいる。

C. CD59 クラスターラフトの極めて異常な拡散挙動: STALL

ビデオレート (33 ミリ秒/フレーム) で観察された個々の CD59 クラスターラフトの挙動は極めて奇妙なものであった。見かけ上の単純ブラウン運動 (100 ミリ秒の時間スケールでの拡散係数は刺激前の CD59 の場合の 8 倍小さい) と一時停留の期間を繰り返していた。単純ブラウン運動と一時停留の期間の長さは両方とも指数関数分布を示しており, それぞれ 1.2 秒, 0.57 秒の寿命を持っていた (図 3b)。細胞膜は 2 次元の液体状であるので, この一時停留は全く予想外であった。この一時停留を Stimulation-induced Temporary Arrest of Lateral diffusion あるいは STALL と名づけた (図 2(5))。多数分子のアンサンブル平均の挙動を調べる方法, 例えば, FRAP (蛍光退色回復法) や FCS (蛍光相関法) などでは, STALL を見つけ出すことは難しかったであろう。

細胞膜からコレステロールを部分除去したり, アクチン繊維を部分破壊したり, SFK や G α i の活性を阻害すると, IP₃-カルシウムシグナルとともに STALL がほとんど消失していた。これらの結果に基づいて我々は, G α i の活性化によって SFK が活性化され, その活性化が CD59 クラスターラフトのアクチン膜骨格への結合を誘起し, STALL が誘起されるという仮説を立てた。この仮説は光ピンセットにより得られた以前の結果とも一致している (25,26)。

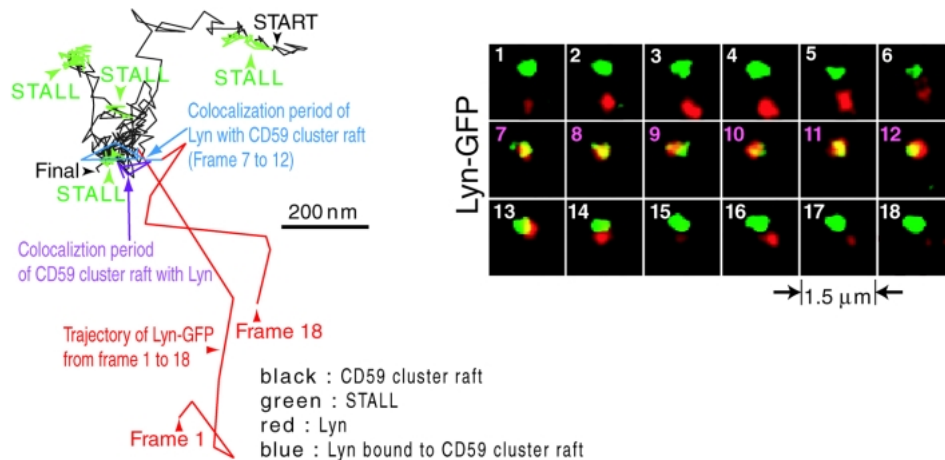


Fig. 4. Simultaneous observations of individual CD59-cluster rafts and individual Lyn-GFP molecules. Right. Image sequences showing superimposed video frames of simultaneous recordings of a CD59-cluster raft (green spot) and single molecules of Lyn-GFP (red spot). A single Lyn-GFP molecule was colocalized from frame 7 until 12 (pink frame numbers). Left. A typical trajectory of a CD59-cluster raft (black), including STALL periods (the green parts of the trajectories) and a period (the purple parts of the trajectories) in which it was colocalized with Lyn-GFP (blue part in the otherwise magenta trajectory; it overlaps with a STALL site, but at different times).

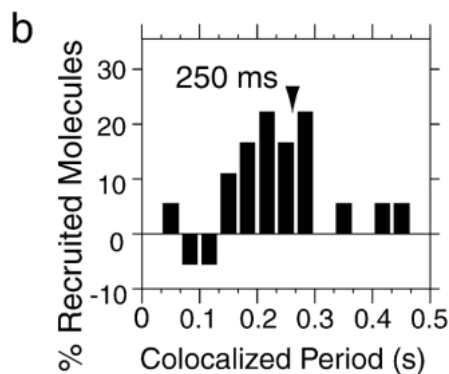
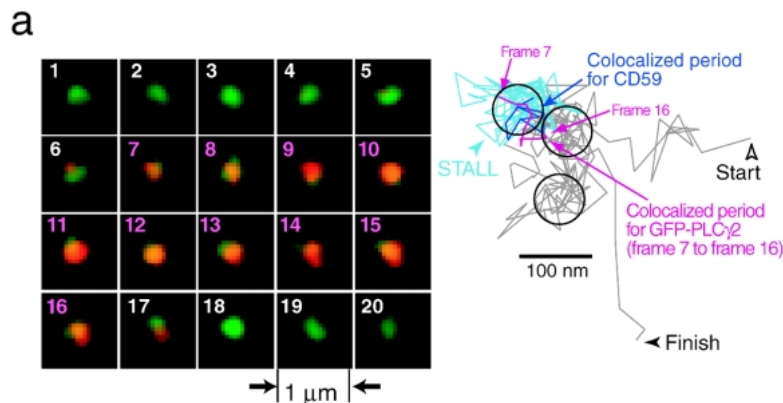


Fig. 5. GFP-PLC γ 2 is recruited at CD59 clusters almost exclusively during the STALL period. (a) Left: Image sequences showing superimposed video frames of simultaneous recordings of a CD59-cluster raft (green spot) and single molecules of GFP-PLC γ 2 (red spot). They were colocalized from frame 7 until frame 16 (pink frame numbers), which are within a STALL period. GFP-PLC γ 2 suddenly appears from and returns to the cytoplasm. Right: A typical trajectory of a CD59 cluster (gray), which includes three STALL periods (three circles). During one of the STALL periods (the blue part of the trajectory), a GFP-PLC γ 2 molecule was recruited (magenta trajectory; the CD59 cluster trajectory during the colocalized period is shown in indigo). The colocalized period is completely included within the CD59-cluster's STALL period. (b) Distribution of the period of GFP-PLC γ 2 colocalization with CD59 clusters (median 0.25 s), showing transient recruitment of GFP-PLC γ 2.

D. Transient recruitment of intracellular signaling molecules to CD59-cluster raft

Simultaneous observations of individual CD59-cluster rafts and each single copy of intracellular signaling molecules conjugated to GFP (Lyn-GFP, Gai2-YFP, and GFP-PLC γ 2) were achieved, using the instruments and methodologies developed in our laboratory (transient recruitment of Lyn-GFP to CD59 cluster is shown in Fig. 4). This difficult experiment handsomely paid off, leading to the following interesting observations (Fig. 2, Fig. 4). Lyn molecules were constitutively and frequently recruited to the diffusing CD59-cluster raft (Fig. 2(3)). Gai2 molecule was also recruited to the CD59-cluster raft, and right after the recruitment of Gai2, STALLing of the CD59-cluster raft was induced. Since Gai2 is known to directly activate SFKs, it is likely that when Gai2 and Lyn molecules are recruited to the same CD59-cluster raft (Fig. 2(3)), Gai2 would bind to Lyn, activating Lyn, which in turn would phosphorylate as-yet unknown transmembrane protein X (see Fig. 2(4)), leading to the binding of the CD59-cluster raft to actin filaments, immobilizing the CD59-cluster raft, i.e., STALLing the CD59-cluster raft (Fig. 2(5)).

Furthermore, PLC γ 2, which is an enzyme involved in the IP $_3$ -calcium signaling pathway that produces IP $_3$ by hydrolyzing PIP $_2$, was recruited to CD59-cluster rafts exclusively during their STALL periods (Fig. 2(5)(6)). The transient recruitment of a GFP-PLC γ molecule to a CD59 cluster raft is shown in Fig. 5a. This result suggests that IP $_3$ is produced from PIP $_2$ only at the STALL site. Because the STALL lifetime (the exponential decay time) is 0.57 s, the duration of PLC γ 2 recruitment has to be shorter than the STALL period. The actual measurement showed that the duration of GFP-PLC γ 2 recruitment was 0.25 s (median value), as shown in Fig. 5b. Since the turnover rate of PLC γ is 70–200 per second (27), a single PLC γ molecule could produce 20–50 IP $_3$ molecules during its stay at the STALLED CD59-cluster raft.

Since CD59-clustering-induced calcium mobilization was totally inhibited by heparin, an inhibitor of IP $_3$ receptor on the ER membrane, the IP $_3$ molecules generated at the STALLED CD59-cluster raft is likely to be entirely responsible for the rise of the cytoplasmic free calcium concentration (Fig. 2(7)). Therefore, we propose that the CD59-cluster raft in STALL is a key platform for transducing the extracellular CD59 signal to the intracellular IP $_3$ -calcium signal. Such mechanisms would have never been revealed without single-molecule observations.

D. CD59 クラスターラフトへの細胞内シグナル分子の一時的リクルート

我々の研究室で開発した装置と方法論を用いることで、個々の CD59 クラスターラフトと GFP 標識した細胞内シグナル分子 (Lyn-GFP, Gai2-YFP, GFP-PLC γ 2) の各々の 1 分子づつを同時観察することを達成した (図 4 には CD59 クラスターラフトへの Lyn-GFP の一時的リクルートを示している)。この困難な実験は、相当に収穫も大きく、以下のような興味深い観察をもたらした (図 2, 図 4)。拡散している CD59 クラスターラフトには Lyn 分子が恒常的に、頻繁にリクルートされてきていた (図 2(3))。Gai2 も CD59 クラスターラフトヘリクルートされ、Gai2 のリクルートの直後に CD59 クラスターラフトの一時停留 (STALLing) が誘起された。Gai2 は直接に SFK を活性化することが知られているので、Gai2 と Lyn 分子が同じ CD59 クラスターラフトヘリクルートされる時に (図 2(3))、Gai2 は Lyn に結合し、Lyn を活性化すると考えられる。活性化された Lyn が未知の貫通型タンパク質 X (図 2(4)) をリン酸化し、これが CD59 クラスターラフトのアクチン線維への結合を誘起し、CD59 クラスターラフトの運動を止める、すなわち、CD59 クラスターラフトの STALL を誘起している (図 2(5)) と考えている。

しかも、PIP $_2$ を加水分解して IP $_3$ を産生する IP $_3$ -カルシウムシグナル経路に関わっている酵素の PLC γ 2 が、CD59 クラスターラフトへ STALL の期間中にだけリクルートされていた (図 2(5)(6))。GFP-PLC γ の CD59 クラスターへのリクルートを図 5a に示す。このことは STALL 領域でのみ PIP $_2$ から IP $_3$ が産生されていることを示唆している。STALL の継続時間 (指数関数の減衰期間) は平均 0.57 秒であったので、PLC γ 2 の CD59 クラスターラフト上での滞在時間は、さらに短いはずである。実際に測定すると、平均で 250 ミリ秒 (中央値) であった (図 5b)。PLC γ のターンオーバー速度は 70–200/秒であるので (27)、STALL を起こしている CD59 クラスターラフトヘリクルートされている間に PLC γ の 1 分子は、20–50 個の IP $_3$ 分子を産生するだろう。

CD59 クラスターラフトが誘起したカルシウム応答は、ER 膜上の IP $_3$ 受容体の阻害剤であるヘパリンによって完全に阻害されたので、STALL を起こしている CD59 クラスターラフトにおいて産生される IP $_3$ 分子が、細胞質内のフリーカルシウム濃度上昇の原因であると考えられる (図 2(7))。従って、我々は STALL 中の CD59 クラスターラフトは細胞外の CD59 のシグナルを細胞内の IP $_3$ -カルシウムシグナルにまで変換するプラットフォームであると提案したい。このような機構は、1 分子観察以外では全く見出せなかっただろう。

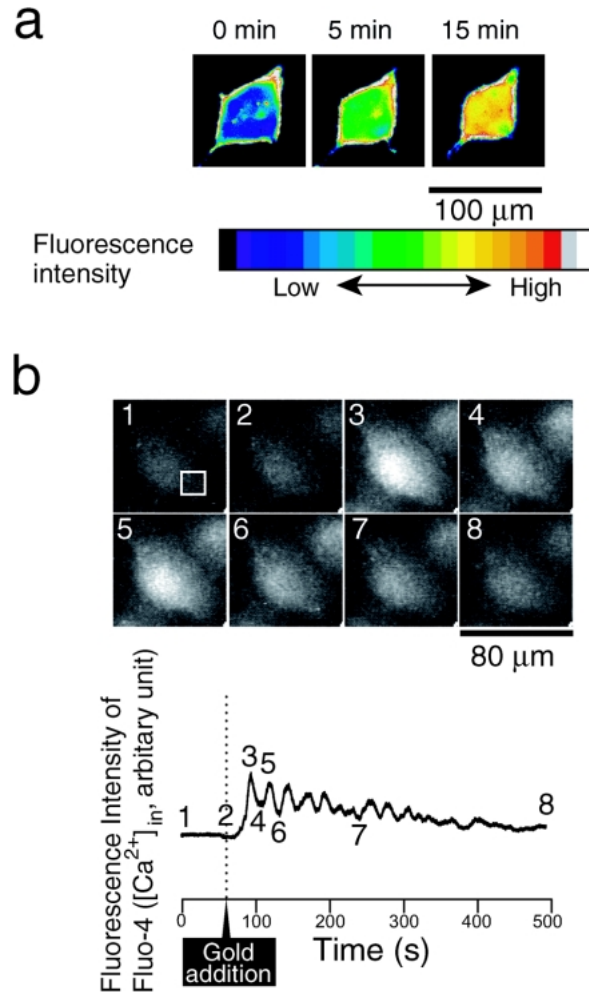


Fig. 6. Long lasting Bulk signaling by CD59-cluster rafts. (a) Increase of the cytoplasmic IP₃ concentrations induced by CD59 clusters, as observed by the epi-fluorescence imaging of the PH domain (from PLCδ1)-GFP expressed in T24 cells. CD59 clustering was induced by the addition of IgG-Gold particles. (b) (Top) Typical time-dependent changes of the cytoplasmic Ca²⁺ concentrations after the addition of IgG-Gold particles (via the release of Ca²⁺ from ER through IP₃ receptor), as observed by epi-fluorescence microscopy of fluo-4 in live T24 cells. The numbers in the images correspond to the numbers shown in the bottom trace. (Bottom) The fluorescence intensity of Fluo-4 measured in the box of the first image of the top figure (24 × 24 pixels), plotted as a function of time.

E. Digital-like signal transduction in raft signaling

As described in the previous section, the bulk IP₃-calcium signaling lasts for an order of 1000 s (Fig. 6a and b), whereas each event of PLCγ recruitment (and IP₃ production) lasts for only about 0.25 s (Fig. 5b). Namely, the periods for individual signaling events are several-thousand fold shorter than the duration of the bulk signaling. This was totally unexpected when we started the present research. When we initiated this work, we, without deep thoughts on the durations of individual signaling events, somehow assumed that the duration of each signaling event might be perhaps 10-fold shorter than the bulk

E. ラフトにおけるデジタル式シグナル変換

前のセクションで述べたように、バルクのIP₃-カルシウムシグナルは1000秒のオーダーで継続するが(図6aとb)、PLCγのリクルート(とIP₃の産生)は、わずか0.25秒しか続かなかった(図5b)。つまり、個々のシグナルの起こる期間は、バルクシグナルの起こる期間の数千倍も短い。このことは、当初全く予想だにしないことであった。我々は、研究開始時には、あまり深く考えることもなしに、個々のシグナルの起こる期間はバルクシグナルよりもたぶん10倍程度短いくらいであろうと考えていた。安定化ラフトを作り出し、

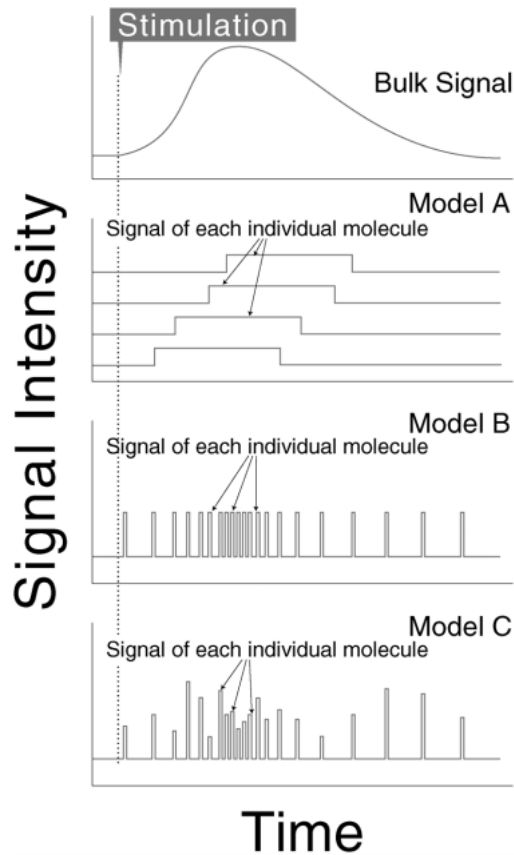


Fig. 7. Schematic diagram showing how the bulk signal is produced from the individual signaling events. See the text for details.

duration. The cell spends so much resources and energy to create stabilized rafts, and then turn them into STALLED rafts, and finally to bring PLC γ 2 and PIP $_2$ in the STALLED rafts to generate IP $_3$. Therefore, if efficiency were the matter of importance, it would be much better to keep the STALLED rafts in the same place, and keep recruited PLC γ 2 molecules in the same STALLED raft so that more and more IP $_3$ molecules are generated, as long as the supply of PIP $_2$ at the same place is not limited. The diffusion of CD59-cluster rafts can be considered as spatial sampling, which might also be necessary for compensating the limited supply of PIP $_2$ at the same place. Or perhaps, IP $_3$ signaling system is designed so that the bulk signal is formed as the sum of short digital pulses rather than the sum of long-lasting signaling events of the recruitment of PLC γ 2 to the STALLED CD59-cluster raft, because the digital-like signaling is simply a better signaling system (although we will still have to find out why digital signaling based on individual pulse-like signals works better in the cell environment).

See Fig. 7. The top panel shows the time course of the bulk signal. Model A (second panel) describes the

STALL を誘起し、最終的に STALL を起こしているラフト中で PLC γ と PIP $_2$ に IP $_3$ を産生させるために、細胞はかなり多くの資源とエネルギーを費やしている。従って、もし効率が重要な問題であれば、同じ場所に STALL を起こしているラフトを保持して、そこにリクルートされた PLC γ 分子を保持している方が、同じ場所で PIP $_2$ の供給が続く限り、より多くの IP $_3$ が産生されるので、良いであろう。CD59 クラスターラフトが拡散することは、同じ場所だけでは限られている PIP $_2$ の供給を補填するのに必要な空間サンプリングだと考えることもできる。あるいは IP $_3$ シグナル系は、STALL を起こしている CD59 クラスターラフトへ PLC γ 2 のリクルートが長時間続く場合のシグナルの総和よりも、短いデジタル式パルス状シグナルの総和として、バルクシグナルが形成されるようにデザインされているのであろう。この理由は単にデジタル式シグナルがより良いシグナル系であるからである（個々のパルス状シグナルに基づくデジタル式シグナルが細胞の環境の中でうまく機能する理由を我々は見つけなければならぬ）。

図7を見ていただきたい。一番上のパネルはバルクシグ

“complex integration model”, where each individual signaling event lasts for a length comparable to that for the bulk signaling. In Model A, to realize the desired level of the bulk signal and its time course, complicated integration of individual signals is required. How the cell can manage such complicated integration has remained enigmatic. Model B (third panel) describes the “simple summation model”, where each single-molecule event occurs like a digital pulse, as compared with the duration of the bulk signal. These pulses can then simply be added up to generate the desired bulk signal, without the need for complicated integration.

Presently, our working hypothesis for the raft signaling is digital signaling based on pulse-like single events, with variable durations and signal intensities, as shown in Model C (bottom panel). This is similar to the “fuzzy digital control system” in the field of system electronic engineering. Further clarification of this interesting problem would certainly be needed.

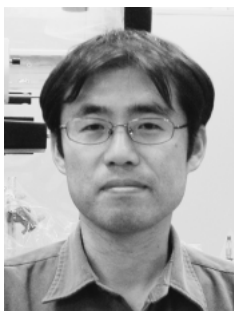
ナルの経時変化を示している。モデル A (2 番目のパネル) は個々のシグナルがバルクシグナルに匹敵するくらい長く続いている「複雑な積分モデル」を表している。モデル A では、シグナル強度も時間も一致する上のバルクシグナルのグラフを作るのに、個々のシグナルの複雑な積分を必要とする。それを、細胞がどのようにやっているのかは疑問であった。モデル B (3 番目のパネル) は個々の 1 分子反応が、バルクシグナルの期間と比較してデジタル式にパルス状に起こるといふ「単純な総和モデル」を表している。複雑な制御の必要なくして、これらのパルスを単純に足し合わせることで望みの強度のバルクシグナルを生み出すことが可能である。

現在、ラフトシグナルの我々の作業仮説は、モデル C (一番下のパネル) に示すようにシグナルの期間も強度もばらついているパルス状シグナルに基づいたデジタル式シグナルである。これは、システム電子工学の分野でいう「ファジーデジタル制御システム」に近い。この興味深い問題のさらなる解明が確かに必要であろう。

References

1. Simons, K., and van Meer, G. (1988) *Biochemistry* **27**, 6197–6202
2. Simons, K., and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569–572
3. Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y., and Inokuchi, J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 13678–13683
4. Iwabuchi, K., Zhang, Y., Handa, K., Withers, D. A., Sinay, P., and Hakomori, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 15174–15181
5. Todeschini, A. R., Dos Santos, J. N., Handa, K., and Hakomori, S. I. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1925–1930
6. Yuyama, K., Sekino-Suzuki, N., Sanai, Y., and Kasahara, K. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 26392–26400
7. Suzuki, K., Baba, J., Tohyama, K., Kanai, K., Kuwabara, S., Hirata, K., Furukawa, K., Furukawa, K., Rasband, M. N., and Yuki, N. (2007) *Glia* **55**, 746–757
8. Nishio, M., Fukumoto, S., Furukawa, K., Ichimura, A., Miyazaki, H., Kusunoki, S., Urano, T., and Furukawa, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **32**, 33368–33378
9. Itoh, K., Sakakibara, M., Yamasaki, S., Takeuchi, A., Arase, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Okada, M., and Saito, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **168**, 541–544
10. Nakayama, H., Yoshizaki, F., Pronetti, A., Sonnino, S., mairi, L., Takamori, K., Ogawa, H., and Iwabuchi, K. (2008) *J. Leukoc. Biol.* **83**, 728–741
11. Fujita, A., Cheng, J., Hirakawa, M., Furukawa, K., Kusunoki, S., and Fujimoto, T. (2007) *Mol. Biol. Cell* **18**, 2112–2122
12. Ishitsuka, R., Yamaji-Hasegawa, A., Makino, A., Hirabayashi, Y., and Kobayashi, T. (2007) *Biophys. J.* **86**, 296–307
13. Nagatsuka, Y., Tojo, H., and Hirabayashi, Y. (2006) *Methods Enzymol.* **417**, 155–167
14. Yanagisawa, K. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 1943–1951
15. Waheed, A. A., Shimada, Y., Heijnen, H. F., Nakamura, M., Inomata, M., Hayashi, M., Iwashita, S., Slot, J. W., and Ono-Iwashita, Y. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4926–4931
16. Sharma, P., Varma, R., Sarasij, R. C., Krishnamoorthy, I. G., Rao, M., and Mayor, S. (2004) *Cell* **116**, 577–586
17. Stefanova, I., Horejsi, V., Ansotegui, I. J., Knapp, W., and Stockinger, H. (1991) *Science* **254**, 1016–1019
18. Kinoshita, T., Inoue, N., and Takeda, J. (2008) *Annu. Rev. Med.* **47**, 1–10
19. Kusumi, A., Koyama-Honda, I., and Suzuki, K. (2004) *Traffic* **5**, 213–230
20. Suzuki, K., Ritchie, K., Kajikawa, E., Fujiwara, T., and Kusumi, A. (2005) *Biophys. J.* **88**, 3659–3680
21. Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K., and Kusumi, A., (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 1071–1081
22. Murakoshi, H., Iino, R., Kobayashi, T., Fujiwara, T., Ohshima, C., Yoshimura, A., and Kusumi, A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 7317–7322
23. Suzuki, K. G. N., Fujiwara, T. K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M., and Kusumi, A. (2007) *J. Cell Biol.* **177**, 717–730
24. Suzuki, K. G. N., Fujiwara, T. K., Edidin, M., and Kusumi, A. (2007) *J. Cell Biol.* **177**, 731–742
25. Suzuki, K., Sterba, R. E., and Sheetz, M. P. (2000) *Biophys. J.* **79**, 448–459
26. Suzuki, K., and Sheetz, M. P. (2001) *Biophys. J.* **81**, 2181–2189
27. Wahl, M. I., Jones, S., Nishibe, S., Ohee, S. G., and Carpenter, G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10447–10456.

Profile of the Authors



Kenichi G. N. Suzuki received his Ph.D. in 1997 at the Graduate School of Engineering, Kyoto University (advisor: Prof. Junzo Sunamoto), and then immediately joined the laboratory of Prof. Michael P. Sheetz at Duke University Medical Center, where he worked as a postdoctoral fellow for 2 years. He joined the Kusumi Membrane Organizer Project (ERATO-SORST, JST) in 1999, and then the Membrane Mechanisms Project (ICORP, JST). He was also appointed as Research Assistant Professor at the institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University in 2005 (transferred to Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS) at Kyoto University in 2007). He became a researcher of Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science & Technology Agency (JST) in 2008. His research focuses on the membrane dynamics and the functional mechanism of lipid raft domains using single-molecule tracking techniques.



Akihiro Kusumi received his Ph.D. in 1980 at the Graduate School of Science, Kyoto University (advisor: Prof. Shun-ichi Ohnishi). He worked as a postdoctoral fellow in the laboratories of Prof. James S. Hyde at the Medical College of Wisconsin and of Malcolm S. Steinberg at Princeton University from 1980 till 1984. He became an Assistant Professor at Kyoto University (Ohnishi lab), and then moved to the University of Tokyo as an Independent Associate Professor. In 1997, he became a Professor of Nagoya University, and then moved to Kyoto University in 2005. He was the leader for the Kusumi Membrane Organizer Project (ERATO-SORST, JST), and is now leading the Membrane Mechanisms Project (ICORP, JST). His research interests include the methodology development of single-molecule biophysics and nanobiology and membrane structure-function studies using single-molecule techniques.