

細胞膜タンパク質の拡散運動の制御機構： 単一粒子追跡法による研究

佐甲 靖志 <東京大学教養学部基礎科学科 153 東京都目黒区駒場 3-8-1>

楠見 明弘 <東京大学教養学部基礎科学科 153 東京都目黒区駒場 3-8-1>

1. 細胞膜の基本構造

Singer と Nicolson の流動モザイクモデル¹⁾によれば、細胞膜（細胞の一番外側にあり、外界と細胞内部との境界を構成している生体膜）をはじめとする生体膜は、リン脂質の2重層中に疎水的な部分を持つタンパク質が埋め込まれたような構造をもっている（図1参照）。リン脂質分子の中で○印の部分（親水基）を示し、2本の線が疎水的な2本のアルキル鎖を示す。膜の厚さは4ナノメートルくらいである。この構造について本質的に重要な点は、これらの分子は膜構造中で自由に拡散（熱運動）をおこなっていることである。生体膜は各構成分子が疎水結合によって集合しているだけであり、分子間に共有結合のような強い結合がないためにこのような芸当が可能になっているのである。

現在でも、このモデルは基本的に正しいと考えられている。しかし実際の生体膜、特に細胞膜は、もっと複雑な構造をもち、それが膜タンパク質の運動を制御しているらしい。^{2,3)} もし細胞膜を構成するタンパク質や脂質分子が完全に自由に拡散し得るならば、それらが混ざりあって細胞

膜は完全に均一になっているはずであるが、実際にはそうではない。たとえば、表皮細胞の細胞膜上には細胞間接着タンパク質が集合したアドヘレンス結合やデスモソームのように、特定のタンパク質が集合した機能構造領域が存在する。細胞外からの物質の取り込みを行うコーテッドピットという領域には、特定の受容体分子が集合してくる。この他にも連続した1枚の細胞膜上で、特定のタンパク質が一部の領域に局在している例が多数知られている。つまり、細胞膜のタンパク質の分布と拡散は細胞によって制御されており、細胞膜の微小領域化は細胞膜が機能を発揮するために必須の構造であると考えられる。

2. 1分子レベルでの膜タンパク質の運動の直接観察

(1) 単一粒子追跡法

最近、タンパク質の動きを、生きている細胞中で1分子のレベルで観察する方法がベルギーの DeBrabander ら⁴⁾と米国の Sheetz ら⁵⁾のグループによって開発された（単一粒子追跡法）。方法の概略は図1に示されている。すなわち、生きている細胞膜上の膜タンパク質に、直径20-40 nm（タンパク粒子と同程度の大きさ）の金コロイド微粒子を特異的結合タンパク質や抗体を介して結合させる。金コロイド微粒子は、微分干渉光学顕微鏡像をビデオレートで画像処理することにより可視化する。したがって、金コロイドで標識することによって、生きた細胞を用いて、膜タンパク質の個々の分子の動きを追うことが可能になる。座標決定の空間精度は1ナノメートル程度、時間分解能は33ミリ秒が達成されている。

光源として100 W水銀灯の光を光ファイバーと530 nmのフィルターに通して均一化したものを用い、正立顕微鏡下の試料像を追記型光ディスクレコーダに記録する。33ミリ秒毎に記録した各画面の静止画像をパーソナルコンピュータに送って、各画面における金コロイド粒子の座標を計算する。座標の計算には、Gelles らの方法⁶⁾を用いた。

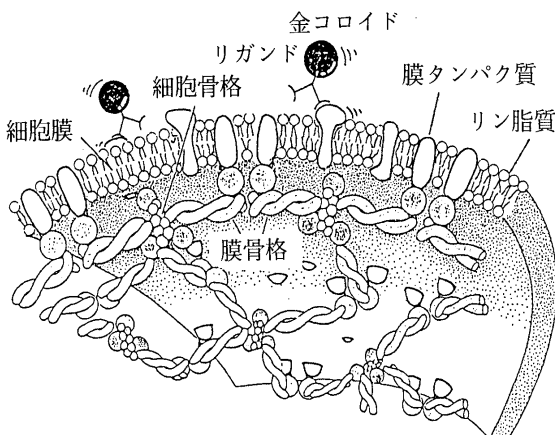


図1 細胞膜の模式図。詳しくは本文参照。さらに、この図は単一粒子追跡法の概略をも示す。この方法は膜タンパク質と膜裏打ちタンパク質のネットワークとの相互作用、膜ドメイン等を調べることができるなど、生体膜の高次編製の制御の研究に有用である。

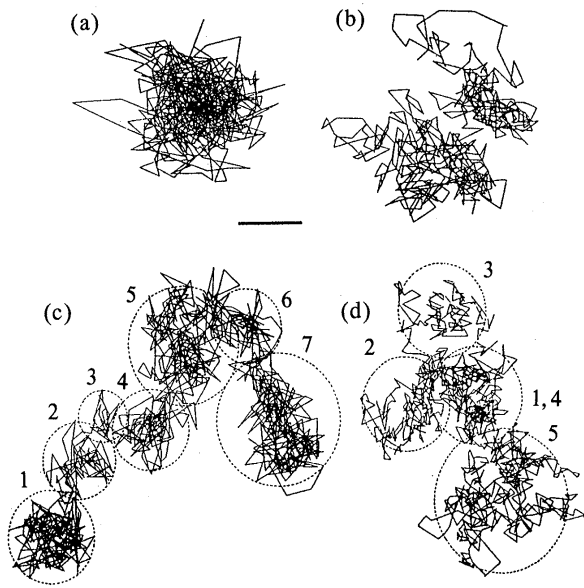


図2 トランスフェリン受容体の運動の軌跡。(a) 制限された範囲内での拡散運動の例。微小なドメイン内で、速い運動を行っている様子がわかる。(b) トランスフェリン受容体がドメイン間を移動して、隣接するドメインに移っていく様子を示す。(a), (b) ともに500ステップ(16.7秒間)の運動の軌跡。(bar=100 nm) (c), (d) 受容体の5.6分間の運動軌跡(1/10倍速で観察)。点線は予想されるドメイン構造、数字は粒子が移動した順序を示す。(bar=500 nm)

(2) 膜タンパク質の運動の解析

トランスフェリン受容体は、細胞膜上において、血清中の鉄イオンの輸送タンパク質であるトランスフェリンを捕捉し、細胞の食作用によってこれを細胞内に取り込むという重要な機能を担う膜貫通型タンパク質である。金微粒子をトランスフェリンを介してトランスフェリン受容体に結合させ、生きている細胞の膜上における運動を観察した。運動の観察例を図2に示す。

このような運動軌跡から、平均2乗変異($\langle d^2 \rangle$)と時間(t)の関係性を求めた。このプロットから、種々の膜タンパク質の細胞膜上での運動は、以下の三つの運動モードに大別できるとわかってきた。

i) 単純拡散運動

粒子が拡散運動をしているときのプロットは図3(b)のようになり、これは、

$$\langle d^2 \rangle = 4Dt \quad (D \text{ は拡散係数}) \quad (1)$$

であらわされる直線となる。

ii) 制限された範囲での拡散運動

限られた運動範囲($0-L$)内で拡散運動を行う場合(簡単のため、境界では完全弾性衝突が起こると仮定する)には、

$$\langle d^2 \rangle = L^2/6 - (16L^2/\pi^4) \sum (1/n^4) \exp\{-1/2(n\pi D/L)^2 t\} \quad (n \text{ は奇数}) \quad (2)$$

であらわされる曲線となる(図3(a))。ただし(2)式は、1

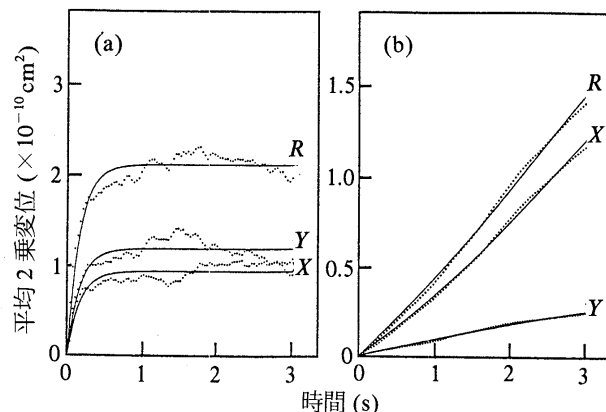


図3 平均2乗変位の時間に対するプロット。図2に示したような1個の金コロイド粒子の運動軌跡の各点における座標データから、各時間間隔における平均2乗変位を計算し、プロットした。本文に述べたように、プロットは、単純拡散運動(b)では直線になり、制限された範囲(L)での拡散運動(a)では $L^2/6$ に漸近線をもった上に凸の曲線になる。X, Yはそれぞれ、最も変位の大きい方向(最小2乗法で決定)と、それに直行する方向の1次元の運動の平均2乗変位のプロット、Rは2次元の運動のプロットを示す。

次元の範囲制限付き拡散運動の理論式((1)及び(3))は2次元面内での運動についての式)であって、実際の解析では、運動をx, yの2軸に分解して各々について(2)式を適用した後、各成分について得られた D_x, D_y および L_x, L_y の値から2次元のD, Lを計算する。

$$4D = 2D_x + 2D_y, \quad L^2 = L_x^2 + L_y^2$$

という関係がある。

iii) 拡散運動を伴う方向性を持った運動

粒子が、ある方向の速度Vをもった運動をしながら拡散運動しているときは、tに対する $\langle d^2 \rangle$ のプロットは

$$\langle d^2 \rangle = 4Dt + V^2 t^2 \quad (3)$$

であらわされる放物線となる。

単純拡散でも見かけの速度や制限を示すことがあり得るので、各粒子の拡散運動モードを類別するために、200例ほどの単純拡散運動をコンピュータ内に発生させて統計処理を行い、単純拡散では各々5%以下の確率でしか起こらないものを方向性を持った運動あるいは制限された範囲での運動と呼ぶことにした。

3. 膜タンパク質の運動と細胞膜のドメイン構造

(1) 受容体の運動の制限

トランスフェリン受容体に結合した金微粒子の運動を72例観察し、以上3種の運動モードに分類して、各々の拡散係数の分布(図4)を求めた。その結果、運動モードについては、18%が単純拡散運動に分類され、81%が制限された範囲での拡散運動に分類された。全ての粒子が単純拡散しているとすると、5%の確率でしか起こらないはずの運動が81%も見られるということは、細胞膜上の受容体分子

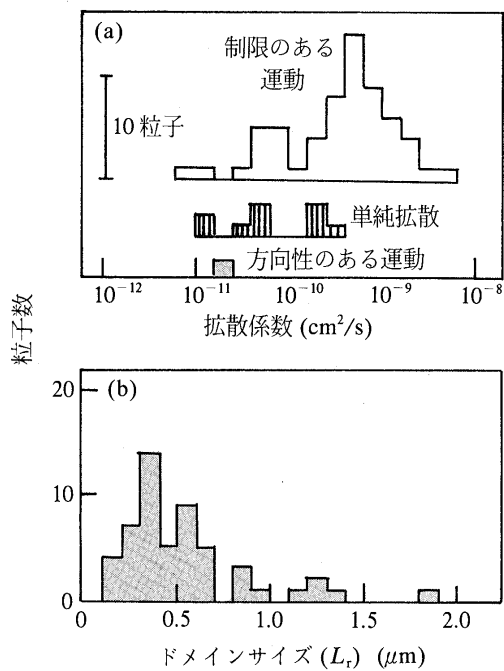


図4 拡散係数、運動範囲のヒストグラム。(a) 0-5ステップ(0-167ミリ秒)の平均2乗変位のプロットの立ち上がりから求めた微視的な拡散係数のヒストグラム。(b) 運動範囲に制限があるものについての制限の大きさのヒストグラム。式(2)(本文)に基づいて決定した L_r の最適値。

の多くが単純な拡散運動ではなく、運動範囲の制限された運動を行っていることを示している。

また、方向性をもった運動をする粒子はほとんど見られなかった(72例中1例)。このことから、少なくとも広い領域にわたって長時間連続するような、細胞膜の流れや膜裏打ち-細胞骨格系による受容体分子の輸送機構は、存在しないと考えられる。

拡散係数のヒストグラムから分かるように、単純拡散と制限された範囲での拡散とでは、後者の拡散係数の方が大きい。したがって、単純拡散運動に分類されている粒子に対しても、実際は運動範囲の制限がある可能性が大きい。おそらく、遅い運動の場合には30秒程度の観察時間では制限が見えてきていないのであろう。単純拡散粒子の拡散係数が小さくなっているのは、受容体分子が同種または異種のタンパク質間でかなり大きな集合体を形成しているか、あるいは細胞質部分での膜裏打ち構造体との相互作用の結果であると考えられる。単純拡散といっても、決して自由な拡散運動をしているわけではない。

(2) 細胞膜のドメイン構造

トランスフェリン受容体に結合した金微粒子の運動を観察していると、図2(a)の様に運動範囲が制限されているように見えることが多い。図2(b)に例を示したように、ある運動領域から隣の運動領域に移動する様に見えることもしばしばある。このような運動が観察されるときに各々の領域内での運動を解析すると、確かに運動領域が制限されていることがわかる。コンピュータ内に発生した単純拡散運動でも、一見したところ領域間の移動の様なものが見

えることも多いが、それらの場合を解析しても、単純拡散との区別がつかないことがほとんどである。

このような結果は、細胞膜が微小領域(このような微小領域を、ここでは特にドメインと呼ぶ)に分割されていて、受容体の運動がドメイン構造によって制限されていることを予想させる。そこで1/10倍速で長時間観察を行い、長期間の運動を見た。結果の例を図2(c), (d)に示す。金微粒子があるドメインから隣接ドメインへと移動して行く様子が分かる。図2(d)の例では、図に番号で示した最初のドメイン(1)から飛び出した粒子が(2), (3)のドメインを経由して、ドメイン(4)すなわち(1)と同じドメインに戻ってくるのが観察された。つまり、ドメイン構造は少なくとも数分間は安定な構造であることが分かる。あるドメインから飛び出した受容体が、すぐ隣の領域で再び制限を受けた拡散運動を始めることは、細胞膜がこうしたドメインで敷き詰められたような構造を持っていることを示している。

(3) 膜タンパク質の長期的な運動

細胞膜中での膜タンパク質の拡散係数は、人工膜に埋め込まれた膜タンパク質に較べて、10-100倍程度小さいことが多く、その原因を解明するために多くの研究がなされてきた。我々は、赤血球膜において膜骨格フェンスモデル(スペクトリン2量体-4量体平衡ゲートモデル)を提唱してきたが、^{6,7)} 通常の細胞においては、このモデルの正否は不明であった。

ところで本研究の結果によれば、ドメイン内部での受容体の運動の拡散係数の平均値は $7 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ であり、これは、人工膜に埋め込まれた膜タンパク質や、網膜視細胞桿体の外節膜のように裏打ち構造の存在しない生体膜上での膜タンパク質の運動⁸⁾とほぼ同様の値である。つまり、膜ドメインの内部では受容体はほぼ自由な拡散運動を行っている。しかし、一つのドメインから外に出なければ、ドメイン内でどんなに速く運動していても巨視的には静止しているのと同じことである。

言い替えると、受容体分子の巨視的な運動は、微視的な拡散運動の速さで決まっているのではなく、ドメインの面積と、ドメイン間の移動の頻度で決定されていると予想され、これが細胞膜中での拡散係数を小さくしている原因かも知れない。そこで、平均2乗変異-時間プロットから(2)式で求められたドメインの面積と、ドメイン間の移動の頻度から、受容体の巨視的な運動の拡散係数を予測すると、 $1.6 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ という値になる。

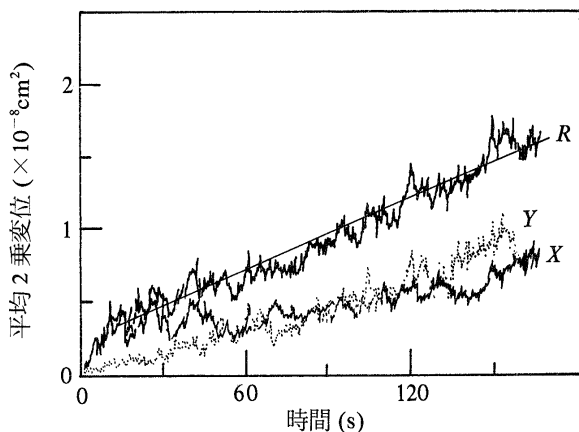


図5 受容体分子の運動を長時間観察して得られた、時間に対する平均2乗変位のプロット。トランスフェリン受容体に結合した金コロイド微粒子の運動を1/10倍速(1ステップ=1/3秒)で500ステップ(2.78分)録画し、24個の粒子の平均2乗変位を時間に対してプロットした。急速な立ち上がりはドメイン内部での速い拡散運動を反映したものであり、その後の緩やかな傾きが巨視的な拡散運動を示す。直線は、30-500ステップについて最小2乗法により求めた。

一方、図2(c), (d)の様な長期間の運動軌跡24例から、平均2乗変位と時間の関係を求めてプロットしたものが図5である。 $\langle d^2 \rangle$ が時間と共にほぼ直線的に増加することが分かる。つまり、わずか24粒子の運動を平均しただけで運動範囲の制限は見えなくなり、単純な拡散運動として記述されるようになってしまう。このことは1分子レベルでの運動の観察がいかに重要であることを示している。この方法によって求められた長距離の拡散係数は $2.1 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ であり、ドメイン構造を仮定した場合の予測とよく一致している。

4. おわりに

単一粒子追跡法によって、細胞膜が微小ドメインのパッチワーク構造を持っており、その構造が膜タンパク質の運動を制御していることがわかった。この様なドメイン構造の存在は、この方法によって初めて明らかになったものであり、この構造に基づいて細胞膜の機能を考え直す必要があるものと思われる。

この様な運動制御の機構は、他の細胞、他の膜タンパク質にも一般的に見られるようである。最近我々は、細胞間

認識と接着に関与する膜タンパク質であるカドヘリンにおいて、遺伝子工学的手法を用いて細胞質部分をほとんど欠失させた変異体を細胞に発現させ、その運動を解析した。その結果、変異体が野生型に較べ大きな運動領域を持っていることが明らかになった。細胞膜の裏側には、編目状の膜裏打ち構造が存在するが(図1)、カドヘリンで得られた結果は、膜ドメインを形成する膜裏打ち構造と膜タンパク質の細胞質部分との相互作用が、膜タンパク質の運動を規定していることを示唆している。今後は、膜タンパク質の運動の細胞質側からの制御機構について研究を進めたいと考えている。

参考文献

- 1) S. J. Singer and G. L. Nicolson: *Science* **175** (1972) 720.
- 2) M. Edidin: *Curr. Top. Membr. Transp.* **29** (1987) 91.
- 3) M. Edidin: *Curr. Top. Membr. Transp.* **36** (1990) 81.
- 4) M. DeBrabander, *et al.*: *Cytobios* **43** (1985) 273.
- 5) J. Gelles, *et al.*: *Nature* **331** (1988) 450.
- 6) A. Tsuji and S. Ohnishi: *Biochemistry* **25** (1986) 6133.
- 7) A. Tsuji, *et al.*: *Biochemistry* **27** (1989) 7447.
- 8) M. Poo and R. A. Cone: *Nature* **247** (1974) 438.

非会員著者の紹介: 佐甲靖志氏は1961年大分生まれ。1984年京大理学部卒。1989年同大学院博士課程修了。現在、東京大学教養学部助手。専門は細胞生物学。楠見明弘氏は1952年京都生まれ。1975年京大理学部卒。1980年同大学院博士課程修了。京大理学部助手を経て、現在、東京大学教養学部助教授。専門は生物物理学、分子細胞生物学。