

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—

¹名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

²東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系

富重道雄^{1,2}, 楠見明弘¹

Interaction between erythrocyte band 3 and the membrane skeleton was analyzed at a level of individual molecules. By observing the movement of band 3 molecules and by dragging the membrane skeleton using optical tweezers, it was found that the cytoplasmic portion of band 3 collides with the membrane skeleton, which causes temporal confinement of band 3 within a mesh of spectrin network of ~ 100 nm ϕ . Band 3 hops to an adjacent mesh at an average of once every 350 ms. These results demonstrate that single molecule observation/manipulation techniques provide unique and valuable tools for the study of living cells.

optical microscopy / optical tweezers / single particle tracking / erythrocyte membrane / membrane skeleton

1. はじめに

機能している生体分子を1個ずつ見て、かつ操作することが可能になってきた。しかも、これを生きている細胞中でおこなうことができる。いまや、「一分子観察・一分子操作」が生物物理学や細胞生物学の新しい手法の一つとして確立されつつある。この手法は、光学顕微鏡で検出できるような標識（ビーズや蛍光分子）をタンパク質につけて可視化¹⁾、その標識をナノメートルの精度で検出し²⁾、さらに、その標識（ビーズ）を光ピンセットによって操作する³⁾、という三つの技術発展の流れが統合されたものである。

我々は、生きている細胞中で機能している個々の分子を観察・操作する方法を確立し、それを細胞機能の研究に応用することを目標として研究してきた。特に、膜タンパク質分子を一分子のレベルで観察し操作することによって、膜タンパク質の運動がいかにして制御されているのかを解明しようとしてきた。同一の膜タンパク質であっても、生細胞中の各分子には多様な運

動制御がはたらいている。したがって、何千、何万という多数分子を同時に観測して平均値を得ても、膜タンパク質の運動の制御機構についてはあまり意味のある情報が得られないからである。本稿の主眼は、一分子のレベルで観察し操作することが細胞機能の理解に有効であることを、読者の方々に共感していただくところにある。我々の最近の研究のいくつかを紹介しながら話を進めたい。

2. 膜骨格による膜タンパク質の運動制御

膜タンパク質は細胞膜内を拡散運動によって移動し、会合したり、集合体を形成したりする。この過程は、信号伝達、高分子の取り込みと分泌、細胞間接着などの重要な膜機能の発現に直接かかわっている。したがって、細胞は、膜タンパク質の「機能」を制御するために、膜タンパク質の「集合や局在」を正確に制御しているのである。しかしながら、どのようなしくみで、膜タンパク質の集合や局在が制御されているのかについては、ほとんどわかっていない。

Direct mechanical manipulation of membrane protein dynamics: interaction of membrane proteins with the membrane skeleton

Michio TOMISHIGE^{1,2} and Akihiro KUSUMI¹

¹Department of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University

²Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

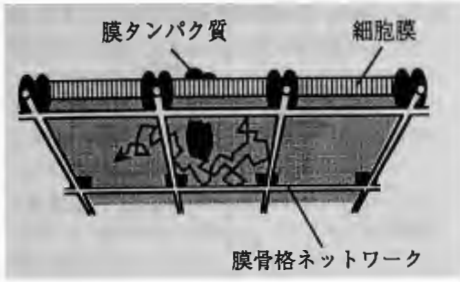


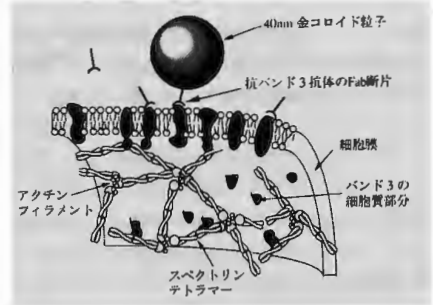
図1 膜骨格フェンスモデルの模式図。

我々は、膜タンパク質の集合や局在の制御には、膜タンパク質と細胞骨格/膜骨格の相互作用が大きく関与していると考えている⁹⁾。とりわけ、膜骨格が、膜タンパク質の拡散の障壁となるフェンス効果（膜骨格フェンスモデル）と、膜タンパク質を結合してつなぎ止めておく効果、という2種のものが必要であることを提唱している^{9), 6)}。本稿では、主に、膜骨格フェンスモデル（図1）について述べる。このモデルは、「細胞膜の裏側には膜骨格の網目構造が広がっている。膜タンパク質の細胞質部分が膜骨格にぶつかることにより、膜タンパク質の運動は、膜骨格の網目の内部に一時的に制限されている。だが、膜骨格の構造は動的に変化している（膜法線方向に揺らいだり、重合/脱重合したり）ため、膜タンパク質はフェンスの隙間をぬって、ときどき隣の網目に移動することができ、それを繰り返しながら膜上をゆっくりと拡散運動を行う」というものである。したがって、細胞は、膜骨格の網目を制御したり動かしたりすることによって、膜タンパク質の運動性や局在を制御することができるのである⁹⁾。

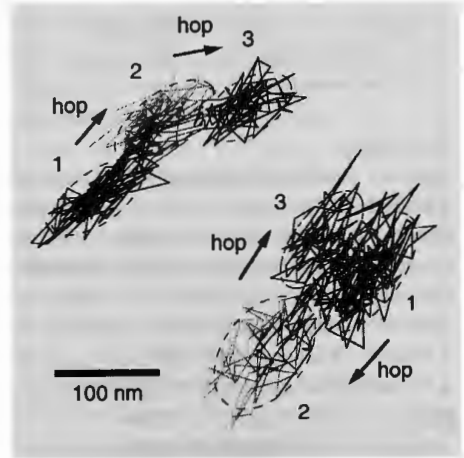
このモデルを検証するための実験系として、我々は赤血球膜を選んだ。赤血球は核やオルガネラなどの細胞内の膜構造を持たないため、膜骨格を完全に残した細胞膜を容易に調製することができる。そのため、赤血球膜の構造は非常によく調べられている。赤血球膜の膜骨格は、スペクトリンテトラマーがネットワークを形成し、網目の結節点の位置に短いアクチンフィラメントとプロテイン4.1が存在する（図2A）。赤血球の膜骨格構成分子の類似タンパク質が多く種類の細胞で見つかっており、赤血球で明らかにされた基本原理の多くは有核細胞においても成り立つことがわかってきた⁷⁾。

3. 赤血球膜上でのバンド3分子の運動を見る

まず、赤血球バンド3の運動制御の特徴を明らかにす



(A)



(B)

図2 バンド3分子の運動の観察。(A) 赤血球膜上でのバンド3の運動を観察する方法（一粒子追跡法）。直径40nmの金コロイド表面に少数の抗バンド3抗体のFab断片をつけ、溶液中にFabが存在する条件でバンド3に結合させる。金コロイド粒子はビデオエンハンス顕微鏡法により可視化する。(B) 膜骨格に結合していないバンド3の運動の軌跡(2msの時間分解能で0.7秒間観察)。バンド3はいくつかのドメイン間をホップしながら移動していくように見えた。各々のドメインを点線で示す。数字はドメインを通過した順番。

るために、バンド3分子の運動を一分子レベルで観察した。*in vitro*においては蛍光分子をタンパク質につけて一分子をイメージングすることができるようになった⁹⁾が、*in vivo*では細胞からの背景光が大きいため、細胞内の蛍光一分子を観察することは今のところ不可能である。我々は直径20～40nmの金コロイド粒子を膜タンパク質に特異的に結合させ、この金コロイド粒子を光学顕微鏡で可視化することにより、膜タンパク質の

運動のイメージングを行っている(図2A)¹⁾。金コロイド標識の作り方を改良することによって、理想的な場合には、生細胞上の膜タンパク質一分子一つの金コロイド粒子で標識するという条件をほぼ実現できる。バンド3はこれが成功した例である。また、金コロイド粒子のコントラストは非常に高く、粒子の重心の位置をナノメートルの空間精度で求めることが可能である²⁾。さらに、高速カメラを用いることによって、時間分解能を0.2ミリ秒まで向上させることができた。つまり、膜タンパク質一分子の運動を、ナノメートルの空間精度とサブミリ秒の時間分解能で追うことができたのである。

このようにしてバンド3分子の運動を観察したところ、バンド3の約30%はほとんど動かなかったのに対して、残りの70%はドメイン間をホップしながら移動していくという運動を示した(図2B)¹⁾。前者は膜骨格に直接結合しているバンド3であると考えられる。後者のバンド3は膜骨格には直接結合していないにもかかわらず、制限された運動をしていた。その運動の特徴は、数百ミリ秒の間は直径100nm程度のドメイン内部に制限され、その内部で速い拡散運動(拡散係数は $5 \times 10^{-2} \text{cm}^2/\text{s}$ で、自由拡散と考えられる)をしているが、平均して350ミリ秒に一度隣のドメインに移り、それを繰り返しながら広い範囲を運動していく、というものであった。このような運動の特徴は前節で示した膜骨格フェンスモデル(図1)と一致する。

つぎに、バンド3の細胞質部分を切断したところ、バンド3のドメイン内部での拡散係数とドメインのサイズは切断前とほぼ同じで変化しなかったが、隣のドメインへ移動するホップの頻度のみが切断後は60ミリ秒に一回へと6倍上昇した¹⁾。この結果は、バンド3の細胞質部分の大きさがドメイン間のホップのしやすさを決める要因であることを示唆するものである。

バンド3がドメイン間をホップしながら運動しているということは、たくさんのバンド3の運動の平均を測定していた従来の方法(蛍光退色回復法など)では、直接調べることができなかった。全体の平均を見ていたのでは、巨視的な拡散の速度が遅いということしかわからないからである。1個1個のバンド3の運動を十分な空間的・時間的精度で見ることができるようになってはじめて、バンド3が空間的・時間的に複雑な制御を受けていることが明らかになったのである。

4. 光ピンセットによるバンド3と膜骨格の相互作用の検出

バンド3の拡散を抑えているフェンスの実体は膜骨

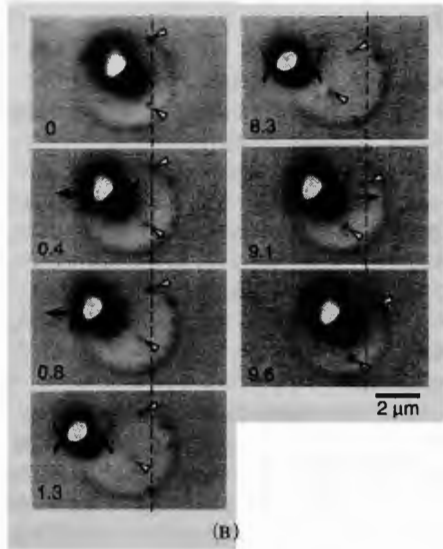
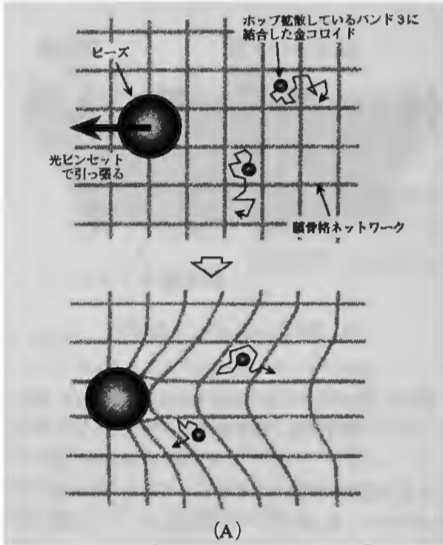


図3 膜骨格を光ピンセットで引っ張り、膜骨格に直接結合していないバンド3との間の相互作用を調べる。(A) 実験の模式図。膜骨格に結合したビーズを光ピンセットで引っ張ると、膜骨格は大規模に変形する。バンド3が膜骨格と何らかの相互作用をしているのであれば、膜骨格の変形とともにバンド3は変位するはずである。(B) 光ピンセットを走査してビーズを右から左へ2μm動かすと、ホップ拡散運動をしていたバンド3(白点)は同じ方向へ移動した。光ピンセットの走査を止めた後は、バンド3は拡散運動を続けた。数字は走査を開始してから時間(秒)

格であるというのが我々の仮説である。しかし、単に運動を見ているだけでは、バンド3が膜骨格にぶつかっているのかどうかを知ることはできない。そこで、バンド3の細胞質部分が実際に膜骨格にぶつかっているのかどうかを確かめるために、光ピンセットで膜骨格をつかんで引っ張ってみることにした¹¹⁾。もし、バンド3と膜骨格との間に相互作用(立体障害)が存在するのであれば、膜骨格を引っ張ると、バンド3分子は細胞質部分で膜骨格に引っかかって、同じ方向へ引きずられるはずである(図3A)。

膜骨格を引っ張るために、表面にバンド3に対する抗体をたくさん吸着させた直径1 μm のラテックスビーズを、赤血球膜に結合させた。30%程度のバンド3は膜骨格に直接結合しているので、このビーズはバンド3を介して膜骨格に結合している。このビーズを光ピンセットで捕捉し、引っ張ることによって、膜骨格のネットワークを大きく変形させることができた¹²⁾。さらに、同時に金コロイド粒子を用いて、同じ赤血球膜上の他の部位にあるバンド3を標識しておいた。

図3Bに矢印で示した2つのバンド3分子は、膜骨格に結合しておらず、ドメイン間を移動しながら拡散運動をしていた。しかし、光ピンセットでビーズを左方向に動かして、膜骨格を引っ張ると、これらのバンド3は、膜骨格を引っ張っている間だけ、膜骨格と同じ方向へ移動した。光ピンセットの走査を止めた後は、移動先で再び拡散運動を続けた。つまり、膜骨格を引っ張ると、バンド3は拡散運動しながらも同じ方向に引きずられたのである。この結果は、バンド3の細胞質部分が膜骨格とぶつかっていることを直接的に示すものである。

分子間の相互作用を生きた細胞中で直接検出する方法はほとんどない。しかし、光ピンセットはこれを可能にするものである。我々は日常生活において、2つの物がくっついているのかどうかを、手でつかんで引っ張ってみるによって調べようとする。このような検証法を、光ピンセットというミクロの「光の手」を用いることによって、生きている細胞の中でおこなうことができるのである。

5. 膜骨格の動的構造を探る

光ピンセットを細胞レベルの研究に用いることの利点は、細胞内で分子間の相互作用を同定できるというだけにとどまらない¹³⁾。図4は、バンド3に結合した金コロイド粒子を、光ピンセットで異なった速度で引っ張ったときの様子を示している。光ピンセットを1.5 $\mu\text{m/s}$ 以下の速度で動かしてバンド3をゆっくりと

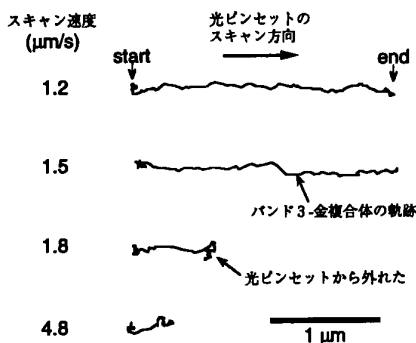


図4 同一のバンド3分子を同一方向へさまざまな速度で引っ張ったときの応答。バンド3に結合した金コロイド粒子(図2A参照)を、光ピンセットで捕捉し(最大捕捉力は約0.25pN)、右方向に2.5 μm 、一定速度で引っ張ったときの粒子の軌跡を示す。

引っ張った場合には、赤血球膜上でバンド3を自由自在に動かすことができた。しかし、同じ分子を同じ力で引っ張ったにもかかわらず、光ピンセットを1.5 $\mu\text{m/s}$ 以上の速度で動かした場合には、バンド3は途中でフェンスに引っかかって光ピンセットからはずれるようになった。つまり、膜骨格のフェンス(スペクトリンテトラマー)はダイナミックにゆらいでおり、十分ゆっくりとバンド3を動かせば、バンド3の細胞質部分がフェンスに引っかかってフェンスを引き伸ばしても、次のフェンスにぶつかる前に乗り越えるので、自由にバンド3を動かすことができるのである。この実験結果から、スペクトリンテトラマーは平均70ミリ秒に一回、バンド3の細胞質部分を通すほどの大きな構造変化をしていることが示唆された。このように、ただ光ピンセットで動かすのではなく、動かしかたを変化させて、その応答変化を調べることによって、膜骨格の動的な特徴を、一分子レベルでしかも *in vivo* で、調べることができたのである。

6. おわりに

未知の系を研究するための方法として最も基本的なものの一つは、「系にさまざまな摂動を加え、それに対する系の応答を調べる」ということであろう。これまで「摂動」としては、化学的なもの(たとえば Ca^{2+} 濃度変化やリン酸化など)と遺伝的なもの(強制発現や発現阻害など)が主であった。それに加えて、光ピンセットやマイクロピペット¹⁴⁾などを用いた物理的な摂動(動かしたり、固定したり、伸ばしたり…)が可能になりつつある。しかも、一分子レベルで可能になりつつあ

るので、きわめて直接的に、調べたいタンパク質やその複合体の作動機構にアプローチすることができる¹⁵⁾。

現在の生命科学の研究は、現象に関わっている役者(タンパク質分子)を明らかにして、その役者の間を矢印でつないで終わってしまっていることが多い。だが、そこから一步進んで、相互作用を *in vivo* で直接に力学的/確率過程論的にとらえることによって、細胞の機能の制御機構がはるかに見通しよく理解できるようになると我々は考えている。だからこそ、一分子観察・操作技術にさらに磨きをかけて、*in vivo* で一分子の動態を直接調べられるようにすることが重要なのである。現在は、一分子観察・操作の *in vivo* での応用は膜タンパク質に限られている感があるが、今後の技術の進歩により、近い将来、一分子観察・操作技術を細胞内部の分子に適用することができるようになるだろう。これが、生物物理学の重要なブレイクスルーとなることが期待される。

文 献

- 1) De Brabander, M., Nuydens, R., Geuens, G., Moeremans, M. and de Mey, J. (1986) *Cell Motil. Cytoskel.* **6**, 105-113.
- 2) Gelles, J., Schnapp, B. J. and Sheetz, M. P.

- (1988) *Nature* **331**, 450-453.
- 3) Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E. and Chu, S. (1986) *Opt. Lett.* **11**, 288-290.
- 4) Kusumi, A. and Sako, Y. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 566-574.
- 5) Sako, Y. and Kusumi, A. (1994) *J. Cell Biol.* **125**, 1251-1264.
- 6) Sako, Y. and Kusumi, A. (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 1559-1574.
- 7) Bennett, V. and Gilligan, D. M. (1993) *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 27-66.
- 8) 船津高志 (1996) 生物物理 **36**, 5-9.
- 9) 佐瀬一郎, 吉川博, 宮田英威, 木下一彦 (1996) 生物物理 **36**, 20-24.
- 10) Kusumi, A., Sako, Y. and Yamamoto, M. (1993) *Biophys. J.* **65**, 2021-2040.
- 11) Tomishige, M., Sako, Y. and Kusumi, A. (1997) *Biophys. J.* **72**, A196.
- 12) 富重道雄, Evans, E., 楠見明弘 (1996) 生物物理 **36**, S23.
- 13) 富重道雄, 楠見明弘 (1997) 生体の科学 **48**, 313-318.
- 14) Discher, D. E., Mohandas, N. and Evans, E. (1994) *Science* **266**, 1032-1035.
- 15) 楠見明弘 (1994) 蛋白質 核酸 酵素 **39**, 176-189.

日本生物物理学会編集

ナノピコスペースのイメージング—生物分子モーターメカニズムを見る— (生物物理から見た生命像3)

編集 柳田 敏雄, 石渡 信一 (吉岡書店, 京都, 1997)

「機能は動きである」機械工学の友達の言葉である。「コンピュータだって機能があるが動きはないぞ」「いや、動きというのは狭くとらえてはいけない。コンピュータの中では電子が縦横に動いている。」確かに分子機械と言われるタンパク質でも基質の動きや、その中の電子の動きまで含めればタンパク質が機能するときにも何らかの動きがある。

本書は副題にもあるように、まさに機械らしい動きをする生物分子モーターのメカニズムについての研究を紹介したものである。しかし、生物分子モーターの実体は非常に小さくメカニズムの解明のためには、ナノメートル・ピコニュートンの動きを明らかにしなければならない。このため、ナノメートル・ピコニュートンの動きの現場を観察するための

技術が最近開発され、それについての紹介がかなりの紙面を占めている。一方分子モーターについては、スナップショットしての原子レベルの分子構造がすでにいくつか解析されている。これに、ATPの分解反応などエネルギー変換を有機的に関係付けることができれば、生物分子モーターのメカニズムを完全に理解することが可能になると考えられる。

本書を読むと日本の研究がこの問題の解明に向けて、大変肉薄していることがよく分かる。最終的には、やはり分子の力学問題を解くことになるのではないかと思われるが、著者達や同分野の研究者にもうひとがんばりしていただきたいと思う。

美宅 成樹 (東京農工大学 生命工学科)