

## 細胞膜上のリン脂質の拡散運動遅延メカニズム：アンカード膜タンパク質ピケットモデル

藤原敬宏<sup>1)</sup>\*・楠見明弘<sup>1,2)</sup>

- 1) 科学技術振興機構 SORST楠見チーム 〒460-0012 愛知県名古屋市中区千代田5-11-33  
2) 京都大学 再生医学研究所 〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町53

### The Slowing Mechanism of Phospholipid Diffusion in the Cell Membrane: Anchored Membrane-protein Picket Model

Takahiro Fujiwara<sup>1)</sup>\* and Akihiro Kusumi<sup>1,2)</sup>

- 1) Kusumi Team, SORST, JST  
2) Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

The diffusion rate of lipids in the cell membrane is reduced by a factor of 5-100 from that in artificial bilayers. The slowing mechanism has puzzled cell biologists for about 30 years. In this study, phospholipid movement was studied in rat kidney fibroblasts at the level of single molecules at the temporal resolution of 25  $\mu$ s. The cell membrane was found to be compartmentalized by the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton meshwork, acting as rows of pickets which temporarily confine the phospholipids (anchored membrane-protein picket model). Phospholipids are confined within 230 nm- $\phi$  compartments for 11 ms on average before hopping to an adjacent compartment. The diffusion rate inside the 230-nm compartment is 5.4  $\mu$ m<sup>2</sup>/s, which is as fast as that of freely diffusing lipids in artificial bilayers, whereas the macroscopic diffusion rate is determined by the lipid hop rate across the compartment boundaries. Monte Carlo simulations demonstrated that compartmentalization of phospholipid could occur when 20-30% of the compartment boundary is occupied by anchored transmembrane proteins through steric hindrance and circumferential packing/frictional effects.

Key words : cell membrane / phospholipid / single particle tracking / membrane skeleton fence / anchored membrane-protein picket

#### 1. はじめに

従来、細胞膜の最も一般的なモデルは、Singer-Nicolsonの流動モザイクモデルにもとづいた、二次元連続流体モデルであった<sup>1,2)</sup>。しかし、このモデルに関して、細胞膜の研究者達がこの30年来抱いてきた大きな疑問が二つあった。一つめは、細胞膜上で

の膜タンパク質や脂質の拡散係数は、なぜリボソームなどの人工膜上での値に比べて1/5~1/100程度と非常に小さいのか、という疑問である。もう一つは、膜分子が会合したり複合体を形成したりすると、拡散係数が劇的に低下するのはなぜか、という疑問である。たとえば、膜上の受容体にリガンドが結合すると、受容体のオリゴマーやシグナル分子複合体が形成されるが、そのとき、拡散が大きく減少し、リガンドの結合した部位、すなわち空間情報がしばらく保持される。しかし、この運動の減少や停止の機構は全く不明だったのである。二次元連続流体モデ

\* Corresponding Author  
Tel : 052-243-5222 Fax : 052-243-5211  
e-mail : fujiwara@kusumi.jst.go.jp

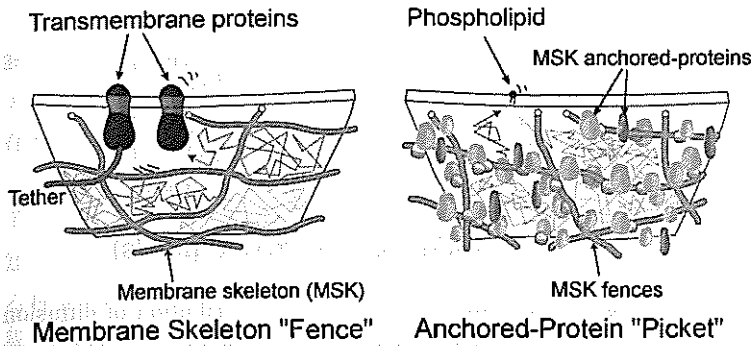


Fig. 1 The models of the membrane-skeleton "fence" /tether (left) and the anchored membrane-protein "picket" (right) that slow the diffusion of membrane molecules.

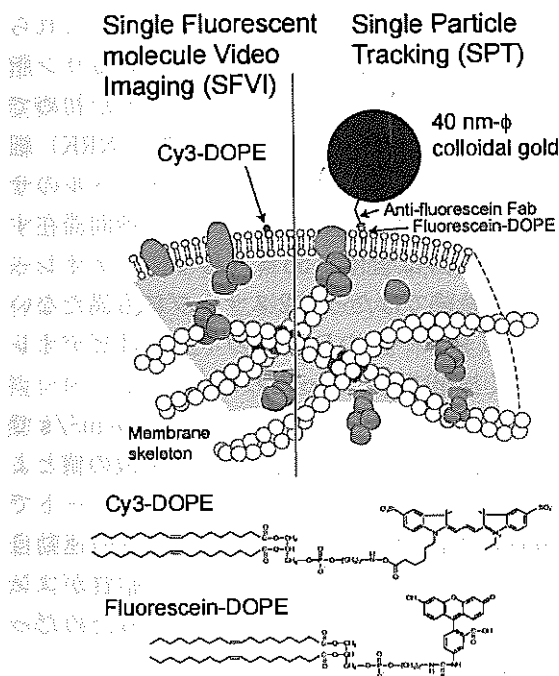


Fig. 2 Single fluorescent molecule video imaging (SFVI; left) and single particle tracking (SPT; right) techniques to track the movement of phospholipids in the cell membrane.

ルではこのような機構の説明が全くつかなかった。多分子の挙動を調べる様々な測定により、膜分子と膜骨格/細胞骨格との相互作用が重要であることがわかってきたが、そのメカニズムを解くには至らなかった。しかしその後、1分子法が登場することにより、膜分子の運動制御や細胞膜の構造に関する理解が大きく進むことになる。

粒子追跡 (Single Particle Tracking; SPT) 法は、生細胞上の膜分子を直径10~40ナノメートル程度の微小な金コロイド粒子で標識し、その運動を光学顕微鏡下で、数ナノメートルの空間精度で、1分子ごとにイメージングする技術である。以前、我々のグループではこの技術によって、細胞膜上の膜貫通型タ

ンパク質の多くが、微小なコンパートメント内に制限された運動と隣接するコンパートメントへの移動を繰り返すことによって長距離の拡散をおこなうことを見出した<sup>3~5)</sup>。我々はこのようなタイプの運動を「ホップ拡散」と呼んでいる。また、これらのコンパートメントの境界は主にアクチン線維やスペクトリンの膜骨格で構成されており、この膜骨格の網目が膜貫通型タンパク質の細胞質ドメインと衝突してフェンスのようにはたらくことから、我々はこのモデルを「膜骨格フェンスモデル」と名付けた (Fig. 1左)。このようなフェンス効果

に加えて、膜貫通型タンパク質の多くが、ある割合で膜骨格に繋ぎ止められることによって運動を抑制されていることもわかった (テザーモデル)<sup>6)</sup>。

それでは、膜骨格と直接ぶつかることのない細胞膜中の脂質に対しても何か制御があるのだろうか? この問いには、リン脂質を同じように微小な金コロイド粒子で標識し、その運動を高時間分解能で追いかけることによって答えることができた。その回答が本研究で紹介する「アンカード膜タンパク質ピケットモデル」 (Fig. 1右) である<sup>7)</sup>。

## 2. 細胞膜上のリン脂質1分子を標識し、イメージングする

運動を調べるリン脂質としては、2本の不飽和脂肪酸を持つDOPE (1, 2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) という分子を用いた。まずDOPEを蛍光色素のCy3と1:1で結合させ (Fig. 2左)、対物型全反射蛍光顕微鏡を用いた1分子蛍光ビデオイメージング (Single Fluorescent molecule Video Imaging; SFVI) 法で観察した。この方法は、見えている輝点が1分子だという保証を得やすい利点がある。しかし、信号/雑音比が低い時間分解能があげられない、すぐに褪色するので数秒以上の追跡が難しいという欠点がある。このような欠点を補うのがSPT法であり、金コロイドは高い信号/雑音比を与えるので、高時間分解能観察が可能になる。しかし欠点もあり、標的分子をクロスリンクしてしまうことがしばしば問題になる。クロスリンクされた膜分子は、Fig. 1に示したような拡散障壁のため、コンパートメント間の移動の頻度が大きく抑えられるからである。本研究では、フルオレセインを結合したDOPEを、培養細胞の細胞膜に導入し、それから抗フルオレセイン抗体Fab断片を少数吸着した直径40nmの金コロイドを結合させた (Fig. 2右)。DOPEの導入量、金コロ

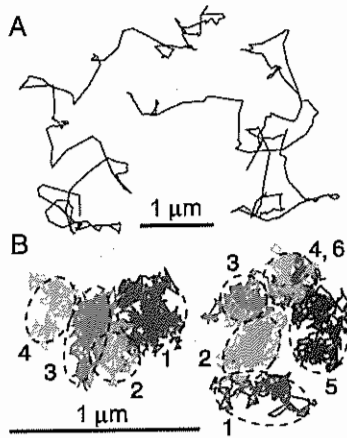


Fig. 3 Phospholipids undergo hop diffusion in the cell membrane.

- (A) Representative trajectories of single Cy3-DOPE molecules recorded at the video rate (30 frames/s) for a period of 5 s (150 frames).
- (B) Representative trajectories of gold-DOPE complexes recorded at a 25- $\mu$ s resolution (40,500 frames/s) for a period of 56 ms (2,250 frames). Hops among submicron-sized compartments are numbered sequentially.

イドに吸着させる Fab の量を変化させて、十分な特異的結合を保ちながら、クロスリンクによる拡散速度の低下が見えなくなるような条件を探した。このとき、100 ミリ秒レベルの拡散係数は、SFVI法で求めた Cy3-DOPE、SPT法で求めた金コロイド標識 DOPE (gold-DOPE) とともに約  $0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  と同じ値が得られた。このように金コロイド標識によるアーチファクトを調べるには、ビデオレートで SFVI 法の結果と直接に比較するのがよい。

### 3. リン脂質のホップ拡散

Fig. 3A は、Cy3-DOPE のビデオレート (33 ミリ秒分解能) での 5 秒間の典型的な軌跡を示す。このときの 3 秒間レベルの拡散係数は平均  $0.42 \mu\text{m}^2/\text{s}$  で (Fig. 4  $D_{3s}$ )、人工膜上の何も制限を受けていない脂質の拡散係数の  $1/10$  以下ではない<sup>8,9)</sup>。このことは、DOPE の運動を抑制する何らかの機構が細胞膜中に存在するが、時間分解能が低いためにその機構を観察できていないこと、を示唆している。しかし、SFVI 法ではビデオレート以上に時間分解能を上げることは困難である。そこで、高いコントラストの像を与える金コロイドを用い、高速カメラで時間分解能を 25 マイクロ秒 (ビデオレートの 1,000 倍以上) に上げて観察した。

Fig. 3B は、時間分解能 25 マイクロ秒で得た、gold-

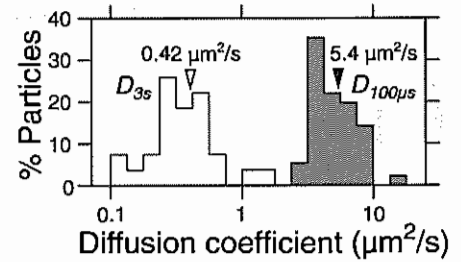


Fig. 4 Histograms showing the distribution of diffusion coefficients obtained by Cy3-DOPE at the video rate ( $D_{3s}$ ; 3-s time window) and by gold-DOPE at a 25- $\mu$ s resolution ( $D_{100\mu s}$ ; 100- $\mu$ s time window). The arrowheads indicate the mean values.

DOPE の 56 ミリ秒間の典型的な軌跡を示す。これらの軌跡から、細胞膜外層で拡散運動しているリン脂質も「ホップ拡散」をおこなっていることが初めて明らかになった。ラット腎臓繊維芽細胞 (NRK) 細胞膜上の DOPE の場合、平均 230 ナノメートルのサイズのコンパートメントに平均約 11 ミリ秒間滞在する。これらの軌跡は全体で 56 ミリ秒で、ビデオレートで得た A の軌跡ではたった 2 ステップにも満たないので、11 ミリ秒に一回の DOPE のホップはビデオレートでは全く検出できなかったわけである。

コンパートメント内の拡散係数は  $5.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  で (Fig. 4  $D_{100\mu s}$ )、人工膜上の脂質の自由拡散の値とよく合うこともわかった。すなわち、ビデオレートでのリン脂質の拡散速度の遅延は、リン脂質の運動自体が遅くなっているからではなく、リン脂質がコンパートメントの中にしばらく囲い込まれるためだったのである。

### 4. リン脂質のホップ拡散は、アクチン膜骨格依存的に起こる

金コロイドと細胞外の構造との相互作用や、細胞膜中のコレステロール依存的なラフト様ドメインの効果を調べたが、どちらもリン脂質のホップ拡散の原因ではなかった。唯一、リン脂質が囲い込まれるコンパートメントのサイズやその中の滞在時間に影響を与えたのが、アクチン膜骨格の脱重合、または、安定化を誘導する薬剤処理であった<sup>10, 11)</sup>。細胞膜外層にあるリン脂質の運動が、細胞膜の内側にあるアクチン膜骨格によりコンパートメント化を受けるといふ結果は一見奇妙に思える。しかし、本研究で提案する新しい運動制御モデル「アンカー膜タンパク質ピケットモデル」(Fig. 1 右) はこれをうまく説明できる。これは、膜骨格フェンスに結合した (アンカーされた) 膜貫通型タンパク質群がピケ

ラインのように並んで、リン脂質1分子の運動をも抑制する拡散障壁となっているというモデルである。大部分の膜貫通型タンパク質には膜骨格結合成分が存在する<sup>12, 13)</sup>。また、膜骨格に結合した膜貫通型タンパク質は流体力学的な摩擦効果を表面近傍の膜分子に及ぼしてその拡散速度を低下させること<sup>14, 15)</sup>が知られている。モンテカルロシミュレーションによる検証の結果、コンパートメントの境界の20~30%程度が膜タンパク質によって覆われていれば、リン脂質の運動を囲い込むのに十分であることが示唆された。

## 5. おわりに

したがって、冒頭に挙げた第一の疑問である、細胞膜上での広範囲での拡散が遅い原因は、「フェンス」と「ピケット」によって細胞膜が仕切られており、分子が一つのコンパートメントから隣接するコンパートメントにホップするのに時間がかかるためであることが判明した。第二の疑問は、膜分子はなぜ複合体を形成すると拡散係数が大きく減少するかということであった。これは、複合体が形成されると、複合体中のすべての分子が同時に仕切りを越えて移動することが必要となり、そのために、複合体のホップ頻度は1分子のホップよりもはるかに落ちるということで説明できる。すなわち、細胞膜の構造の概念においては、二次元連続流体モデルから、仕切りが入った(コンパートメント化された)流体モデルへのパラダイムシフトが今まさに必要とされている。

「フェンス/テザー」と、「ピケット」は、これまで我々が膜タンパク質と脂質の運動を調べた細胞株ではすべて見られたことから、細胞膜における分子運動の普遍的な抑制機構であると考えられる。細胞外からの刺激に反応して膜分子、あるいは細胞質中のシグナル分子が集合して複合体を形成し、「フェンス」や「ピケット」で囲い込まれて長距離の運動を抑制されたり、「テザー」で膜骨格に繋ぎ止められたりすること(oligomerization-induced trapping model)<sup>14)</sup>は、細胞膜上でのシグナル伝達を局在化するだけでなく、その場所で接着構造や安定なラフト様ドメインなどを形成するための核になっているかもしれない。1分子の運動追跡によって初めて明らかになった細胞膜中の仕切りという概念は、これからの新しいタイプのシグナリング調節機構の発見に大きく貢献することが期待される。

## 謝 辞

共同研究者の村越秀治博士と Ken Ritchie 博士(楠

見研究室)、及び、Ken Jacobson 博士(ノースカロライナ大学)に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Singer SJ, Nicolson GL: *Science*, **175** 720-731 (1972)
- 2) Saffman PG, Delbrück M: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72** 3111-3113 (1975)
- 3) Kusumi A, Sako Y, Yamamoto M: *Biophys. J.*, **65** 2021-2040 (1993)
- 4) Sako Y, Kusumi A: *J. Cell Biol.*, **129** 1559-1574 (1995)
- 5) Tomishige M, Sako Y, Kusumi A: *J. Cell Biol.*, **142** 989-1000 (1998)
- 6) Sako Y, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M, Kusumi A: *J. Cell Biol.*, **140** 1227-1240 (1998)
- 7) Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, Kusumi A: *J. Cell Biol.*, **157** 1071-1081 (2002)
- 8) Ladha S, Mackie AR, Harvey LJ, Clark DC, Lea EJ, Brullemans M, Duclouhier H: *Biophys. J.*, **71** 1364-1373 (1996)
- 9) Sonnleitner A, Schütz GJ, Schmidt T: *Biophys. J.*, **77** 2638-2642 (1999)
- 10) Ayscough, K: *Methods Enzymol.*, **298** 18-25 (1998)
- 11) Bubb MR, Spector I, Beyer BB, Fosen KM: *J. Biol. Chem.*, **275** 5163-5170 (2000)
- 12) Ryan TA, Myers J, Holowka D, Baird B, Webb WW: *Science*, **239** 61-64 (1988)
- 13) Saxton MJ: *Biophys. J.*, **70** 1250-1262 (1996)
- 14) Bussell SJ, Koch DL, Hammer DA: *Biophys. J.*, **68** 1836-1849 (1995)
- 15) Almeida PFF, Vaz WLC, Thompson TE: *Biochemistry*, **31** 7198-7210 (1992)
- 16) Iino R, Koyama I, Kusumi A: *Biophys. J.*, **80** 2667-2677 (2001)

(Received 30 November 2004;

Accepted 17 December 2004)

## 著者略歴

藤原 敬宏(ふじわら たかひろ)

1993年 京大理卒

1998年 東大院総合文化研究科修了

科学技術振興事業団ERATOおよびSORST研究員



楠見 明弘(くすみ あきひろ)

1980年 京大院理修了, 理博 ウィス

コンシン医大, プリンストン大のポス

ドク, 京大理助手, 東大教養助教授

(この間, 1984~1994年 ウィスコンシン医大客員教授), 名大院理教授を



を経て, 2005年より現職 1998~2003年 科学技術振興事業団ERATO 楠見膜組織能プロジェクト, 2003年より同SORST楠見チーム統括責任者を兼任