

1 分子観察で初めて見えてくる細胞膜構造

鈴木 健一*, 楠見 明弘

*京都大学再生医科学研究所, 科学技術振興機構膜機構 ICORPプロジェクト

キーワード: 1分子追跡, 細胞膜, 膜骨格タンパク質, ピケットモデル, ラフト

1. はじめに

生きている細胞の膜中で, たった1個の分子の挙動を観察したり, その分子をレーザー光で捕捉して細胞内で自由に動かしたりすることが, できるようになってきた¹⁾. さらに最近では, 細胞膜上での分子の位置や運動を1分子ごとに追うだけではなく, その分子の活性化をも可視化できるようになってきた²⁾. 細胞の働き方を調べるのに, このような1分子法を利用し, 生細胞での観察に適した1分子法の開発をもっと進めようという研究が, 今まさに始まったところである.

1分子を見て触るような研究ができるようになると, 例えば, シグナル伝達分子が細胞内をどのように動き回り, シグナルを伝えていくのか, というようなことが, 次々にわかってきそうである. このような研究は途についたばかりであるが, すでに1分子観察以外ではわからないような興味深い結果が続々と得られつつある. 本稿では, このような結果の一部を紹介する. このような新しいタイプの研究に興味を持っていただくきっかけとなることを願っている.

2. なぜ, 細胞膜上での1分子観察か?

まず, 細胞膜中に導入した, 不飽和リン脂質の *dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine* (DOPE) の運動軌跡をご覧いただきたい (図1A). このような観察のためには, 図1Bに示すように, DOPEの極性頭部を蛍光分子 (例えばCy3) で標識したものを用いたり, 直径40 nmの金粒子に少数の抗体Fab断片を結合させたものを用いてDOPEを標識したりして実験する (方法については後述). 膜分子の拡散測定などは今までに蛍光退色回復法 (FRAP=fluorescence redistribution after photobleaching) で見飽きた結果で, それ

を1分子で見ただけのこと, とと思われる読者も多いことであろう. 実際, ビデオ速度で観察した結果は, 退屈な単純ブラウン運動が見えているように思われる (図1A左). しかし, 「細胞膜は, 人工膜と違って単純な理想液体ではあり得ない」というのが様々な過去の結果が示唆するところであったので, 思い切って時間と労力と研究費をかけて, 時間分解能25マイクロ秒 (ビデオ速度より1350倍も速い) を実現し, DOPEの運動をさらに本格的に調べた^{3,4)}. 典型的な運動軌跡を図1A右に示す. ご覧のように, 単純ブラウン拡散運動は見られず, 「細胞膜はすべての脂質の拡散運動に対してコンパートメント化され」ており, 「脂質分子は, 短期的にはコンパートメントに閉じこめられた運動をし, 長期的にはコンパートメント間を飛び移りながら拡散して大きな範囲を動き回る」. これは, 我々が開発した統計解析によって確認し, このような拡散をホップ拡散と名付けた.

本稿では, まず, (1) 細胞膜のコンパートメント化とホップ拡散について述べ, 次に, (2) 1分子観察の手法について簡単に紹介し, (3) 最後に, このようなコンパートメント化された膜で, ラフトと呼ばれるマイクロドメインがどのようにシグナル変換ドメインとして機能するようになるか, を1分子法で解明を進めた結果を報告する. この結果は, 1分子法以外では, 恐らくわからなかったものであった.

3. 細胞膜の概念のパラダイムシフト

細胞膜中での分子の挙動が, 人工膜中でのそれと2つの点で全く違っており, ふつうの拡散の理論では全く説明できないことは周知の事実となりつつあった. この2点とは, (1) 細胞膜上での分子の動きは, 拡散係数にして人工膜中の1/5~1/50程度と, きわめて強く抑制されているが, ここ30年来, その理由が全くわからないままである^{3,4)}, (2) 細胞膜中で膜分子が会合すると, 並進拡散係数が劇的に減少する^{4,5)}, これは, 細胞膜を2次元の液体と仮定すると, 拡散の理論と全く合わない (再構成膜中では理論と実験は一致する)^{6~8)}. 細胞膜のコンパートメント化と膜分子のホップ拡散は, この細胞膜の基本問題を一気に解決するものであった.

Kenichi Suzuki and Akihiro Kusumi: Cell plasma membrane structure as revealed by single molecule observation

*〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53

TEL: 075-751-4112; FAX: 075-751-4113

*E-mail: ksuzuki@frontier.kyoto-u.ac.jp

2007年8月20日受付

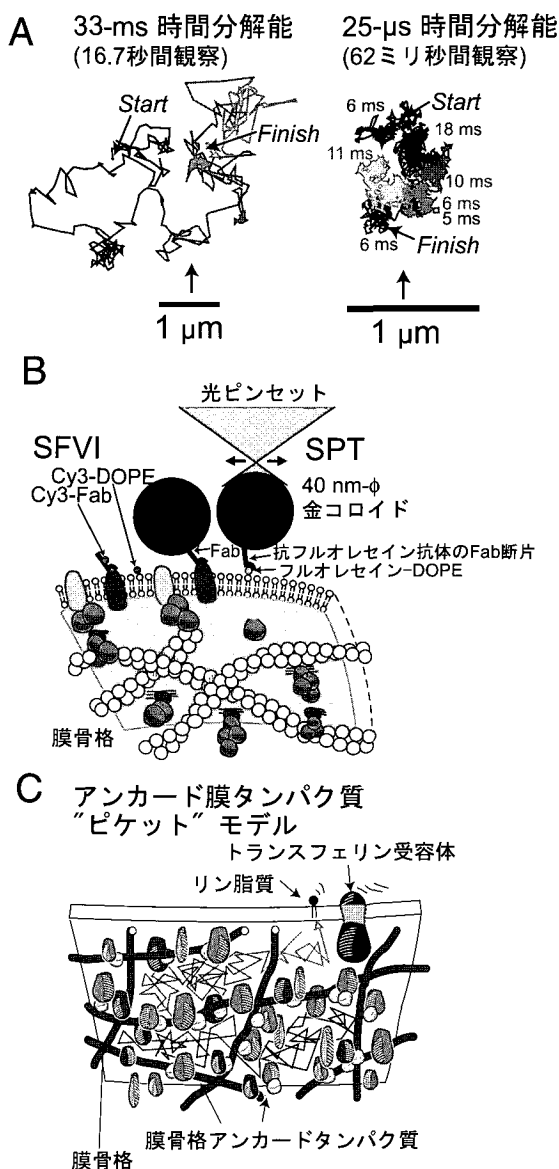


図1 DOPEのホップ拡散を示す軌跡とその機構。A. DOPEは、33ミリ秒/フレーム(左), または25マイクロ秒/フレーム(右)の時間分解能で観察された。軌跡の長さは16.7秒(左), 62ミリ秒(右)。左の図では3.3秒ごとに色を変え、右の図ではコンパートメントごとに色を変え滞在時間を横に示す。B. 細胞膜上の膜分子の運動を追跡するための1分子法。SPT法のプローブには、抗体Fab断片やリガンドを結合させた40nm金コロイド粒子を用いる。リン脂質の標識にはフルオレセイン基で標識したリン脂質を細胞膜に導入し、これに抗フルオレセイン抗体Fab断片を結合させた金コロイドを結合させる。SFVI法のプローブとしては、蛍光色素を直接共有結合で脂質に結合させたり、Fabに蛍光標識したり、GFP融合タンパク質を発現させたりしたものを用いる。C. アンカード膜タンパク質ピケットモデル; 脂質と膜タンパク質の両方にはたらく。膜骨格上に結合し、膜骨格上に立ち並んでいる膜貫通型タンパク質(ピケット)が、膜タンパク質や脂質の拡散のコンパートメント化を促している。

図1A右図のような軌跡を多数、定量的に解析した結果、例えば、NRKの細胞膜では、DOPE分子は230nmコンパートメントに平均11ミリ秒滞在しては、隣接したコンパート

メントを次々に跳び移っていくという運動をしていることがわかった³⁾。このようなコンパートメントは、今まで調べたすべての哺乳動物の培養細胞で見いだされ、コンパートメントの大きさは、平均が30-230nm(細胞種によって異なる)、平均滞在時間は1-17ミリ秒であった⁴⁾。

さらに、コンパートメント内での拡散係数は、人工膜中のそれと同じであった。これは2つのことを示している。(1)細胞膜上での大きな範囲でのリン脂質の拡散が遅いのは、膜の平均の粘性が高い(コレステロールや膜タンパク質のため)などのためではない。リン脂質は小さいコンパートメントの中では人工膜中と同様に速く拡散しているのであるが、隣接したコンパートメントに移動するのに時間がかかるので、大きな範囲の拡散係数(例えばFRAP観察での拡散係数)は劇的に小さくなる。(2)我々が見いだしたコンパートメントよりさらに小さなコンパートメントなどはない。

では、何が、細胞膜をこのように区画化しているのだろうか? 詳細を述べる紙幅はないが、コンパートメントは細胞膜の内側表面に結合しているアクチン線維(アクチン膜骨格)とそれに結合した様々な膜貫通型タンパク質によって作られることが、ここ10年来の我々の研究で明らかとなった^{9,10)}。この機構は「アンカード膜タンパク質「ピケット」モデル」と呼ばれている^{9,10)}(図1C)。すなわち、アクチン膜骨格に結合した膜貫通型タンパク質がコンパートメント境界部の20-30%を覆うようになると、リン脂質の拡散障壁となり(ピケットラインを形成し)、短時間の閉じこめが生ずるというモデルである(詳しくは図1Cの説明を参照)。

すなわち、細胞膜を2次元の液体と考えるモデルには、大きなパラダイムシフトが必要なことがわかった。Singer-Nicolsonの流動モザイクモデル⁶⁾は、モデル図からもわかるように、10nm程度の大きさの構造に対しては細胞膜中でも正しい。しかし、それを数10nm以上の大きな構造に適用するのが間違いだったのである。このような大域的なレベルでの分子の分布や運動については、細胞は、違ったレベルでのコントロールを行っている。細胞はアクチン膜骨格を制御することによって、膜のコンパートメントと膜分子の局在や運動を制御し得るのである。

4. 細胞膜分子の1分子追跡法

では、話を少し戻して、細胞膜分子の1分子観察法をまとめておこう。主な方法は、一粒子追跡法(single particle tracking; SPT)¹¹⁾と一蛍光分子ビデオイメージング(single fluorescent molecule video imaging; SFVI)^{5,12)}である(図1B)。SPTでは、少数の抗体Fab断片などを結合させた直径20-40nmの金粒子をプローブとして用いる。粒子を透過型光学顕微鏡を用いてとらえ、粒子の運動を自動追跡する。SFVIは、有機色素(抗体のFab断片、あるいはHalo-tagなどに結合させる)や緑色蛍光タンパク質の変異体(mGFP)などをプローブとして用いる。背景光を避けるためには、レーザーを用いた全反射照明や斜光照明を利用す

るのがよい^{13,14)}.

SPTでの観察の優れた点は1つの粒子を数10分間にわたり観察可能なこと(SFVIでは、せいぜい30秒くらい)、空

間精度が2 nmと高いこと(ビデオレート, SFVIでは20-30 nm程度), 時間分解能を25 マイクロ秒/フレームにまで上げて観察可能なこと(ただし, 空間精度は17 nmに落ちる. SFVIではミリ秒程度まで上げられる.)などである. また, 金粒子標識を用いると, 結合分子をレーザーを用いて(光ピンセット), 引っ張ることもできる^{15,16)}. しかしながら, SPTで1分子運動を観察する際には結合活性を持つ金コロイドラベルを調整するのが難しい. また, 立体障害やクロスリンクの問題を解決する必要がある¹⁷⁾. SFVIでは, クロスリンクの心配がなく, 細胞膜中のタンパク質を容易に確実に1分子を観察できるし, 最近では1分子毎の活性化までも観察できるようになった²⁾. 従って, 実験の目的に応じて方法を選ぶ必要がある. また, 高時間分解能での観察は信号/ノイズ比が落ちるためにSPTでしかできないが, その際プローブである金コロイドが1分子で目的とする分子に結合していることを示すためにSFVIでの拡散係数と比較し, 同じであることを確かめる必要がある. 従って, SPT, SFVIの両者をうまく組み合わせて実験するのがよい.

5. ラフト候補分子へのシグナル入力やクロスリンクによって安定なラフトが形成される

細胞膜上の受容体のうち約10%はGPI (Glycosylphosphatidylinositol) と呼ばれるリン脂質によりアンカーされている. このGPIアンカー型受容体は細胞膜内側には露出していないので, どのようにしてシグナルを膜の内側に伝えているのか長い間疑問であった. 一方近年, 細胞膜上のシグナル伝達のプラットフォームとして「脂質ラフト」という概念が注目されている¹⁸⁾. ラフトの構造として面白いところは, それが通常のタンパク質複合体ではなく, 細胞膜上のドメインであり, 様々なタンパク質や脂質が状況に応じて出入りし, その組成を変化させている点である. 最近GPIアンカー型受

図2 リガンド結合によるCD59クラスターラフトの形成とそれによる細胞内へのシグナル伝達の機構. A. 金コロイド FabプローブでCD59を標識しリガンドのC8を加えたり, 金コロイド粒子に多数のCD59抗体を結合させて細胞に加えると, CD59はクラスターを形成し, さらに安定化ラフトを作る. これによって細胞内ではカルシウム応答などが誘起される. B. 安定化CD59クラスターラフトの典型的軌跡. 時間分解能33ミリ秒で10秒間の軌跡. 2秒ごとに軌跡の色を変えて表示している. CD59クラスターラフトは拡散と一時停留を繰り返す. C. 安定化CD59クラスターラフトの示す一時停留領域へのGFP-PLC γ 1分子のリクルートの様子. 一時停留期間内外の軌跡と共局在中のCD59およびGFP-PLC γ の軌跡とで色を変えている. リクルートは一時停留期間中に起きている. D. 一時停留部位でシグナル分子が集まり下流にシグナルが伝わるという作業仮説. リガンド添加後CD59クラスターラフトはゆっくりと拡散する安定なラフト様ドメインを形成し, 短時間GaiやLynなどの信号分子をリクルートし, 一時停留領域を形成する. 一時停留領域で下流シグナルのIP $_3$ 産生や細胞内カルシウム応答に必要なPLC γ を短時間リクルートする. このシグナル伝達パルスを何度もトリガーしてまわる.

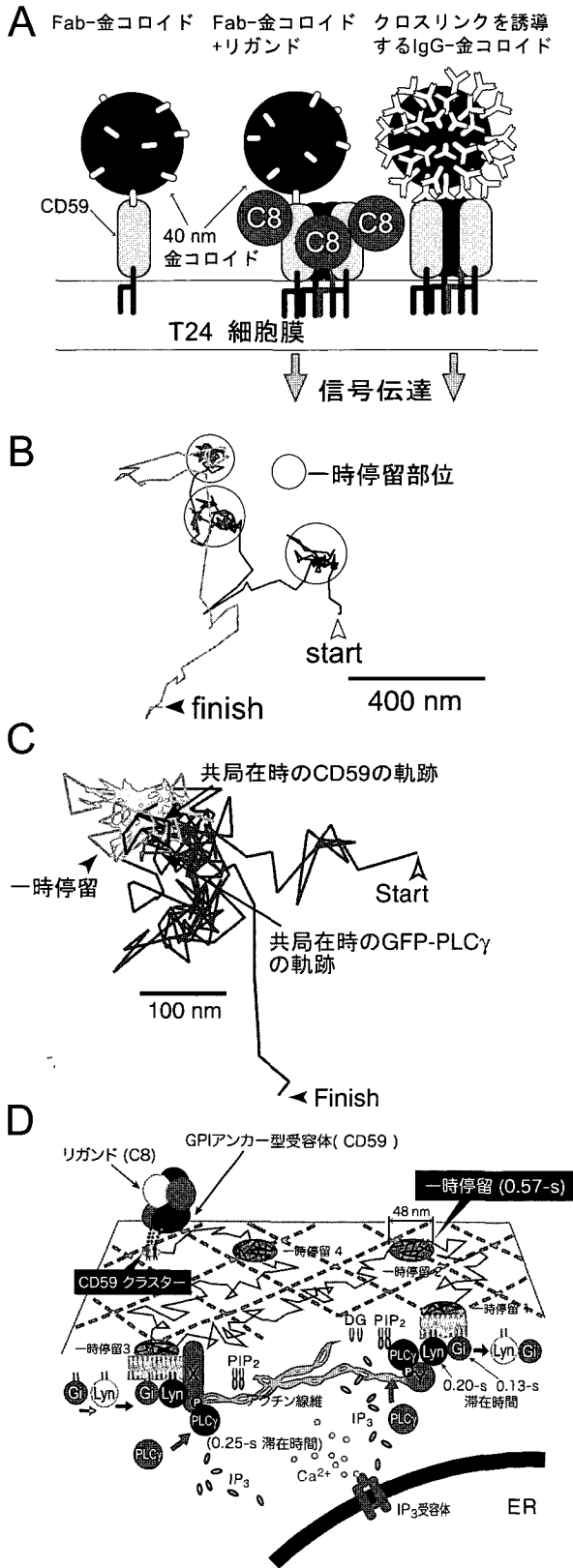


図2

容体によるシグナル伝達もラフトを介して起きているかもしれないと多くの研究者が考えるようになった。しかし、その機構は全く謎であった^{19,20)}。

GPI アンカー型受容体によるシグナル伝達を解明するために、CD59 という補体制御タンパク質の信号入力後の挙動を調べた。CD59 のリガンドを添加すると CD59 は会合する。このような会合が CD59 によるシグナルの第一ステップになるようである。すなわち、CD59 を抗体でクロスリンクしたり、多数の抗体を結合させた金粒子で CD59 を集合させても、細胞内シグナル（カルシウムスパイクや Src ファミリーキナーゼの活性化など）が誘起されるのである^{21,22)}。さらに、CD59 が会合した膜領域には、コレステロールやガングリオリシド GM3 も濃縮され、ラフト様ドメインが形成されることがわかった。そこで、信号入力下での CD59 の挙動を観察するために、このような CD59 をクロスリンクする金粒子をプローブとして使用した（図 2A）^{21,22)}。

金粒子によって CD59 をクロスリンクして形成された「安定化ラフト」を「CD59 クラスターラフト」と呼ぶことにしよう。1 個ずつの CD59 クラスターラフトを見ると、ホップの平均頻度は、クロスリンク前の約 1/8 程度であった。通常のビデオレートでの観察では、このホップは見えず、見かけ上の遅い単純拡散運動が観察される。しかし、それだけではなく、実に興味深い挙動を示すことがわかった。すなわち、平均で 3 秒に 1 回、約 0.6 秒間、運動が停止して一時停留しては、また拡散することを繰り返していた（図 2B）^{21,22)}。一時停留を消失させるような薬剤処理後に、下流のカルシウムシグナルなども無くなっていったので、この一時停留は細胞内シグナルに重要な役割を担っていると示唆された。

さらに、CD59 クラスターラフトの運動観察と GFP を結合させた Lyn, Gai, PLC γ などのシグナル分子の 1 分子観察を同時におこなった。この結果、一時停留直前に Lyn を活性化すべく、Gai の 1 分子が CD59 クラスターラフトへリクルートされてくる様子が観察された。また、カルシウム応答に必要な PLC γ がほぼ一時停留中にだけ（図 2C）平均 200 ms の期間リクルートされる様子が観察された。従って一時停留領域は CD59 シグナルを細胞内のカルシウムシグナルに変換するサイト（シグナル変換のプラットフォーム）であることがわかった（図 2D）^{21,22)}。このような機構は、多分子の平均を見ていたのでは、全くわからなかったであろう。

6. おわりに

以上のように細胞の中には、1 分子で見て初めてわかる基本メカニズムが、沢山ありそうである。生体分子システムは熱によって駆動されているため「確率過程論的に働く」。さ

らに、細胞内では、1 種の分子といえども、結合相手、活性化状態、周囲の環境が違っており、「本質的に heterogeneous」である。この実態を捉えるには分子の 1 個ずつを多数見て、何がどの程度の割合で起こっているかをなるべく高い時間分解能で調べるより手はない。読者の皆さんが、1 分子観察や操作の手法に興味を持たれ、自分の研究に生かしていただくきっかけと本稿がなれば、幸いである。

文 献

- 1) 楠見明弘ほか：バイオイメージングでここまでわかる，羊土社，東京，2003
- 2) Murakoshi, H., Iino, R., Kobayashi, T., Fujiwara, T., Ohshima, C., Yoshimura, A. and Kusumi, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 7317-7322 (2004)
- 3) Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 157, 1071-1081 (2002)
- 4) Murase, K., Fujiwara, T., Umemura, Y., Suzuki, K., Iino, R., Yamashita, H., Saito, M., Murakoshi, H., Ritchie, K. and Kusumi, A.: *Biophys. J.*, 86, 4075-4093 (2004)
- 5) Iino, R., Koyama, I. and Kusumi, A.: *Biophys. J.*, 80, 2667-2677 (2001)
- 6) Singer, S.J. and Nicolson, G.L.: *Science*, 175, 720-731 (1972)
- 7) Saffman, P.G. and Delbrück, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3111-3113 (1975)
- 8) Peters, R. and Cherry, R.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 4317-4321 (1982)
- 9) 楠見明弘, 佐甲靖志：表面，30, 44-51 (1991)
- 10) 藤原敬宏, Ken Ritchie, 鈴木健一：細胞工学，20, 697-703 (2001)
- 11) Kusumi, A. and Sako, Y.: *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, 566-574 (1996)
- 12) Sako, Y., Minoguchi, T. and Yanagida, T.: *Nature Cell Biol.*, 2, 168-172 (2000)
- 13) Axelrod, D.: *Method Enzymol.*, 361, 1-33 (2003)
- 14) Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A.H. and Yanagida, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235, 47-53 (1997)
- 15) Edidin, M., Kuo, S.C. and Sheetz, M.P.: *Science*, 254, 1379-1382 (1991)
- 16) Sako, Y. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 129, 1559-1574 (1995)
- 17) Tomishige, M., Sako, Y. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 142, 989-1000 (1998)
- 18) Simons, K. and Ikonen, E.: *Nature*, 387, 569-572 (1997)
- 19) Kusumi, A., Koyama-Honda, I. and Suzuki, K.: *Traffic*, 5, 213-230 (2004)
- 20) Simons, K. and Vaz, W.L.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 269-295 (2004)
- 21) Suzuki, K.G.N., Fujiwara, T.K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 177, 717-730 (2007)
- 22) Suzuki, K.G.N., Fujiwara, T.K., Edidin, M. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 177, 731-742 (2007)