

電子線〈フリーズレプリカ〉トモグラフィ法による  
細胞膜骨格の3次元イメージング諸根 信弘<sup>a</sup>, 白倉 治郎<sup>b</sup>, 楠見 明弘<sup>c</sup><sup>a</sup>国立精神・神経センター神経研究所, <sup>b</sup>名古屋大学エコトピア研究所, <sup>c</sup>京都大学再生医科学研究所

キーワード: 細胞膜, 膜骨格, フリーズレプリカ, 電子線トモグラフィ

## 1. はじめに: 細胞膜の構造

細胞膜の厚さは、わずかに約5 nm。このため、多くの場合、細胞膜は2次元の構造と考えられている。さらに、この構造は液体の性質を持ち、細胞膜の構成分子は、細胞膜の中でブラウン運動している。このような運動ができるからこそ、例えば、シグナル分子はお互いに衝突し、シグナルを伝えることができると考えられている。このような細胞膜の動的構造は、シンガー・ニコルソンの流動モザイクモデル(1972)として教科書に掲載され、細胞膜の基本概念となっている<sup>1)</sup>。その後、膜分子の運動解析・シミュレーションにより、細胞膜には、仕切りが入っていて<sup>2-6)</sup>、細胞膜における分子運動は流動モザイクモデルだけでは説明できないことが明らかになってきた。細胞膜の仕切りは、細胞膜の細胞質側表面を覆っているアクチン線維のネットワーク、「膜骨格(membrane skeleton)」でできていることが提案されている<sup>7,8)</sup>。

赤血球の膜骨格については、古くから構造解析が進められてきた。これは細胞質を除いたゴースト膜が簡単に単離できるため、膜骨格の生化学的・構造的な研究が簡単だったためである。この赤血球の膜骨格は、他の細胞のそれとは大きく異なっている。アクチンは、トロポミオシンに結合して、12~18個のGアクチンからなる40 nm程度の長さの短い線維を作り、これが細胞膜上に杭のように結合している。結合先は、膜貫通型タンパク質のグリコフォリンCとバンド4.1複合体である。この短いアクチン線維の杭の間をスペクトリンという鎖状分子の四量体が繋いでいる。すなわち、短いアク

チン線維の杭が、スペクトリン四量体をメッシュワーク状に組み立てて膜骨格を構築し<sup>9-14)</sup>、それが赤血球に柔軟性と剛性を与えている。

リンパ球では、細胞膜の直下から厚さ2~3 μmにわたってアクチン線維のネットワークがびっしりと存在している。これは「皮質アクチン(cortical actin)」と呼ばれている<sup>15)</sup>。これらのアクチンフィラメントは赤血球の40 nm程度の短い線維ではなく、マイクロメートルの桁の長さになっている。非常に多くのアクチン結合タンパク質が、これらのアクチンの側面どうしをつないで、アクチンフィラメントを束化したり、70°の角度で分岐させたり、直角に結合させたりしている。このようなアクチンフィラメントのネットワークが赤血球と異なって細胞膜の細胞質側表面から細胞質へと3次元的に広がっている。この皮質アクチンが、リンパ球に、変形能や血管での耐力性を与えていると考えられる。血小板の膜骨格は、細胞膜上の糖タンパク質複合体やゲルゾリンの皮質アクチンへの結合を媒介していると考えられ、主成分はスペクトリンだと考えられているが、スペクトリンの分布はまだ観察されていない<sup>16,17)</sup>。

非血球系では、小腸上皮組織の細胞膜直下に形成された膜骨格が、広川一・Heuserグループによって、急速凍結・ディープレッチング・白金レプリカ法を用いて、膜骨格研究の非常に初期に明らかにされ、有名である<sup>18,19)</sup>。細胞膜表面の微細毛の内部には、アクチンフィラメントの束が構築されていて、その先端部が、微細毛の先に結合し、根元では「terminal web」と呼ばれる構造に結合して、そこから、アクチン、ミオシン、中間径フィラメントからなる細胞骨格に繋がっている。これは、違う種類のフィラメントの微細構造の特徴や特異的ラベリング法により同定されて明らかになった。

哺乳動物の通常の培養細胞では、1980年代から膜直下の細胞質側表面に線維が存在することが分かっていた。しかし、線維の細胞膜上での分布、その主成分、線維の作る構造の特徴などはほとんど分かっていなかった。これを明らかにするために、細胞膜を広く剥離して、その細胞質側表面を露出させる

Nobuhiro Morone, Jiro Usukura and Akihiro Kusumi: Three dimensional imaging of the plasma membrane skeleton as revealed by freeze-replica and electron tomography

<sup>a</sup> 〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1

E-mail: morone@ncnp.go.jp

<sup>b</sup> 〒464-8603 名古屋市千種区不老町1-1

E-mail: usukuraj@esi.nagoya-u.ac.jp

<sup>c</sup> 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町

E-mail: akusumi@frontier.kyoto-u.ac.jp

2007年10月4日受付

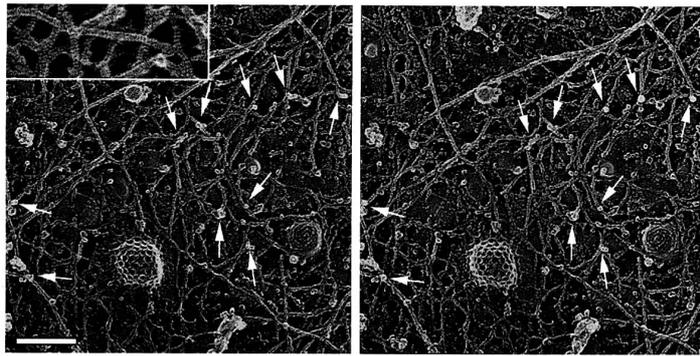


図1 膜骨格のディープエッチング像。ラット由来の線維芽細胞のアピカル細胞膜の細胞質側表面を観察した。無数のフィラメント構造が重なってメッシュワークを形成している。クラスリン被覆ピット（多格子模様）やカベオラ（渦巻き模様）の膜陥入構造が観察されることから、膜直下であることがわかる。1本1本の線維は約5nmごとのストライプ模様を表す（拡大図）ことから、膜骨格はおもにアクチンフィラメントからなることがわかる。細胞質側表面に広がって形成される膜骨格から細胞質側への繋がり（矢印）も観察されることから、膜骨格が細胞質内部の細胞骨格とも繋がって、3次元的なネットワークを構築していることが分かる。スケールバーは、100nm。

方法、観察された線維を同定する方法などの開発が必要であった。最近になって、筆者らは、急速凍結ディープエッチ免疫レプリカ電顕法と電子線トモグラフィー法の併用により、アクチンフィラメントを主成分とする分子ネットワークが細胞膜全体にわたって、細胞質側表面から数十ナノメートルの領域を覆っていることを、高分解能の電子顕微鏡観察により見出した（図1）<sup>20</sup>。フリーズレプリカ試料を電子線トモグラフィーに適用する、電子線〈フリーズレプリカ〉トモグラフィー法は、世界に先駆けた可視化技術であり、世界的にも非常に大きな注目を集めている。さらに、この新しい可視化法による膜骨格の3次元再構築構造により、最初に述べた細胞膜の仕切り<sup>20~22</sup>は、アクチン膜骨格によるものであることが強く示唆された。この研究について、概説する。

## 2. 膜骨格の3次元可視化法

### 2.1 細胞膜全体を剥離する方法

まず、培養皿に培養した細胞の上側（培養液側）の細胞膜の細胞質側を観察する方法を開発した（図2）。このためには、細胞の上から、低分子量のカチオン化試薬であるアルシアンブルーでコートした小さいカバーグラスを置き、細胞膜を結合させた後に、カバーグラスを剥がす、という操作をおこなう。試料調製法を細かく工夫することによって、ディープエッチング法で、アピカル側の細胞膜の約1/4程度の大きさの膜断片が、ほとんどいつも観察できるようになった。免疫金コロイド標識（免疫レプリカ）によって膜骨格がどのようなタンパク質で形成されているのかも調べることができた（図3）。

培養ディッシュへの接着面（ベサル側）の細胞膜の観察には、プローブ型の低出力超音波発生装置を利用する<sup>23</sup>。これによって、上側の細胞膜と細胞質の大部分を吹き飛ばす。最初、この方法では観察できる領域が狭く、部分的に膜骨格のメッシュワーク構造が壊れて、定量的評価が難しかった。カベオラのような小さな膜陥入構造の観察にも、注意深い試料調製が必要とされた。しかし、最近になって筆者らは直径1ミリ程度のプローブを数ミリワット以下の出力で使用することで、細胞の底面側の細胞質側表面全面で膜骨格やカベオラ・ピットを可視化できるようになった。

従来、細胞膜直下の皮質フィラメントを可視化するためには、界面活性剤（Triton-X100やPolyethylene glycol）による細胞膜の可溶化がおこなわれてきた。しかし、この方法ではカベオラやピットなどの膜裏打ち構造は観察されない。これまでに、血小板や魚のケラトサイト（ケラチン生成細胞、鱗の根元にある細胞）などで、皮質アクチンの形成が明瞭に観察されている<sup>16,17,24,25</sup>。

### 2.2 急速凍結法

細胞質側表面が露出した細胞膜を、次に細胞質側から急速凍結させる。細胞の上側の細胞膜を剥がして観察するにしても、下側に残った細胞膜を観察するにしても、細胞膜の外側表面は、ガラスに結合している。このガラスを上にし、細胞膜の細胞質側表面を下にして、液体ヘリウムで冷却した純銅ブロックの鏡面に圧着させる（メタルコンタクト法）ことにより、細胞膜を急速凍結させる。純銅ブロックの鏡面は、ダイヤモンドペーストで研磨して準備する。この凍結方法では、純銅の高い熱伝導率が液化ヘリウム温度付近で最大となる性質も利用している。極めて急速（10<sup>5</sup>°C/秒）に温度降下がおきるため、圧着面から20ミクロン程度の領域では氷晶形成が生じることなく、良好な凍結が得られる（図2）。

### 2.3 ディープエッチング法とフリーズレプリカ法

凍結試料は、凍ったまま超高真空（10<sup>-6</sup>Pa程度）の装置に入れて、ダイヤモンドナイフなどで、試料表面の氷などを削る。一番具合の良いところでは、細胞膜から0.2-1ミクロン程度の厚さの領域が、ガラス上に残るようにする。さらにこの試料の温度をやや上昇させて、-100~-70°Cくらいにし、表面から、氷を昇華させ、細胞膜上の構造が深いところまで氷の上に露出するようにする（1μm程度）。これをディープエッチング（deep etching）と呼んでいる。凍結切断法では細胞膜脂質二分子層の真中で細胞膜が割れた所（細胞膜中央の疎水面）を観察するのに対して、ディープエッチング法では、もっと表面の構造を、氷を昇華させることによって露出させて観察する。

ディープエッチング後に、白金・炭素を1~2nmの厚さで低角度（20度程度）回転蒸着する。細胞膜上の構造があると、そこには白金粒子が降り積もり、それによってコントラストを付けることができる。チャンバー内の真空度を上

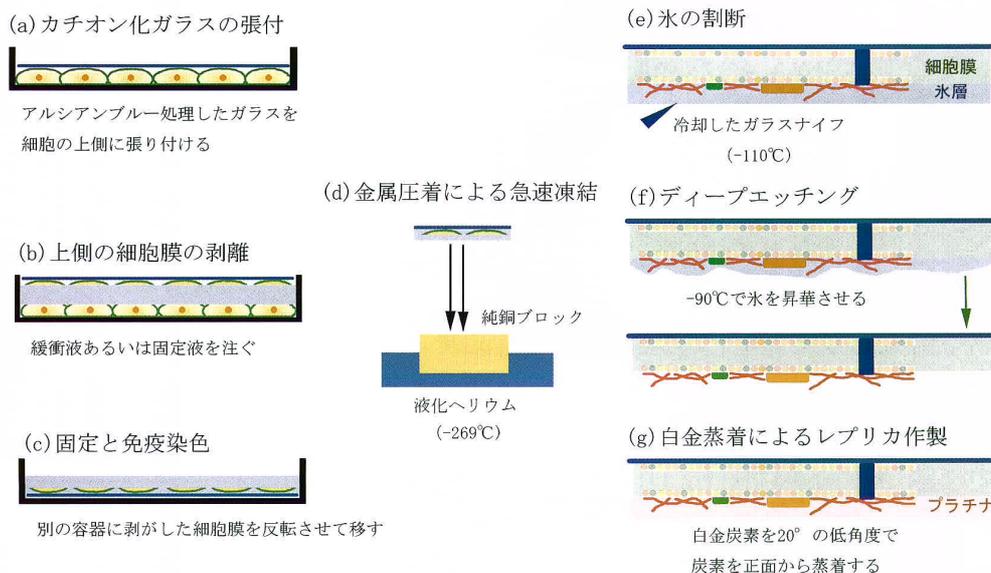


図2 細胞質側表面にある膜骨格の可視化法。(a) プラスチックシャーレに培養された細胞を緩衝液で2回洗浄する。自然乾燥しない程度まで水分を取り除いた後、アルシアンブルーでカチオン化処理したカバーガラスをアピカル側の細胞膜表面に乗せる。(b) 固定液(あるいは緩衝液だけ)をゆっくりシャーレの縁から注ぎ、ガラスが浮く力によって細胞膜を剥離させ、細胞質側表面を裸出させる。(c) さらに固定した後、緩衝液で洗浄する。この段階では、裸出した細胞質側表面に対して、免疫金コロイド染色によって分子標識することも可能である。さらに蒸留水で洗浄後、(d) 細胞質側表面の水分を、自然乾燥が生じない程度まで濾紙で吸収し、液化ヘリウムで浸した純銅ブロックの鏡面に圧着させ、急速凍結する。次に、(e) -110度まで冷却したガラスナイフで凍結面を切断する。(f) チャンバー温度を-90度まで上昇させて、切断面から1 μm以上の部分をディープエッチングさせる。(g) 白金・炭素は低角度(20度程度)で、次の補強用の炭素は正面(90度)から回転蒸着を行い、「細胞膜の裏打ち構造」のレプリカ膜を調製する。(d) ~ (g) は本文も参照。

げ、試料ステージの温度を下げることにより、プラチナ粒子が細くなり、より微細な構造を反映したレプリカが調製できる(図2)。

## 2.4 電子線トモグラフィー

基盤とする電子線コンピュータトモグラフィーは90年代に自動化され、現在、研究室で実施されている。

透過型電子顕微鏡を用いた電子線トモグラフィーの原理は、病気の診断で使われるエックス線断層撮影と基本的に同じで、エックス線源を電子線に換えて、微細な構造が見えるようにしたものと考えて良い。すなわち、試料を電子線に対して傾け、一つの視野に対して傾きが異なった画像を多数撮影し、これから、計算によって試料のスライス像を計算によって求める(図4a)。この方法は90年代から自動化され、細胞内部の微細構造を定量的に観察する方法として発展してきた<sup>26-30)</sup>。この過程で、以下の3つの主要な要素技術の開発がおこなわれ、現在のように普及し始めるに至った。①サイドエントリー型試料傾斜ホルダーとZ軸補正が可能なトモグラフィー電子顕微鏡の開発、②高感度・高精度 CCD カメラの開発、③これらを連動させて、自動的に連続傾斜像を撮影するソフトウェアの開発である。

我々は、細胞膜直下を電子線トモグラフィーにより定量的に可視化し、膜骨格が細胞膜と接している部分の構造を解明しようとした。実際の手順としては、まず、細胞質側を裸出

させた膜試料の同一視野について、 $\pm 70^\circ$  範囲で、 $1^\circ$  毎に、傾斜像を CCD カメラで位置補正しながら、合計 141 枚撮影する(図4a)。次に、これをもとに、計算によって、0.85 nm のスライス厚で 120 枚程度の連続スライス像を求め、3 次元再構築をおこなう。連続傾斜像から連続スライス像への変換計算は、コロラド大学ボルダー校の McIntosh 博士らが開発した演算プログラム「IMOD」<sup>31)</sup> で、連続スライス像から 3 次元構造の再構築は Template Graphics 社製の「AMIRA」を、我々は用いている。

## 3. 細胞膜の細胞質側表面は、全面にわたってアクチン膜骨格で覆われている

上記のように、細胞膜の非常に広い範囲にわたって、ディープエッチング電子顕微鏡観察を一気におこなうことができるようになった。それらの結果をまとめて述べる。まず、クラスリン被覆ピット(直径が約 200 nm の多角格子模様<sup>32)</sup>) やカベオラ(直径が約 50 ~ 80 nm のストライプ模様<sup>33)</sup>) がきわめて明瞭に観察され(図1)、細胞膜の細胞質側表面が同定できた。また、その表面に、フィラメントのネットワークが観察できた。アクチン線維は、モノマーである G アクチンの配列により、約 5.5 nm ピッチのストライプ模様<sup>28)</sup> が理想的な場合には観察されることが分かっていた<sup>20)</sup>。しかし、これが見えるのは、以前は、ほとんど in

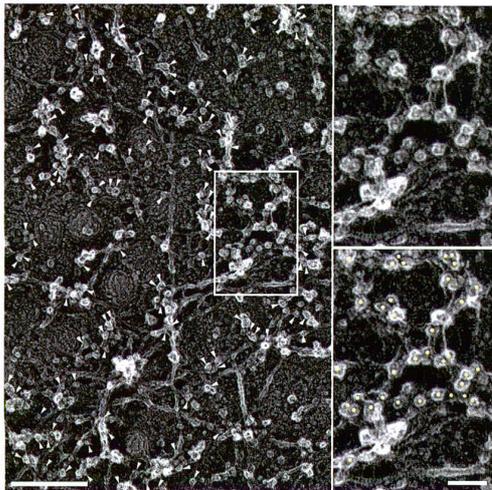


図3 膜骨格はアクチンフィラメントからなる。アクチンブロープの免疫金コロイド (5 nmφ) で標識した細胞膜のレプリカ像。膜骨格フィラメント上に並んでいる白い小さな点がブロープである (矢印)。白くはっきりした点の周囲にハロが見えるのが金コロイドブロープの特徴である (上拡大図)。金コロイドが黄色で強調されている (下拡大図)。スケールバーは 100 nm である。

in vitro で調製されたアクチン線維であり、細胞中では、まれに、少数の線維が、5.5 nm ピッチのストライプを示す程度であった。我々は、試料調製条件を細かく調整し、細胞膜上のほとんど全ての線維は、5.5 nm ピッチのストライプを示すことを証明した。これによって、膜骨格のほとんどは、アクチン線維から構成されていることが明らかになった。

試料を急速凍結する前に、免疫金コロイドで標識すると、ディープエッチング像で金コロイド粒子を観察することにより、見えている構造の構成分子が同定できる。本研究では、アクチンに結合する免疫金コロイド標識 (直径 5 nm) をおこなった。膜骨格を形成するフィラメント上に、金コロイド標識が並んで観察され、上記の 5.5 nm 毎のストライプパターンに加えて、膜骨格がアクチンでできていることが再確認された (図 3)。併せて、これまでにスペクトリン、アンキリン、フィラミン、テールリン、アデューシン、Arp2/3 など、線維上に同定されている。すなわち、膜骨格はアクチン線維を主成分とし、それに多数のアクチン結合タンパク質が結合してできていることがわかった<sup>20)</sup>。細胞質側表面に並行に広がる膜骨格から細胞質側への繋がりも観察され (図 1 矢印)、膜骨格のネットワークが細胞質内部の細胞骨格とも繋がって、3 次元的な広がりがあることが分かってきた。

#### 4. 膜骨格により細胞膜はコンパートメント化されている

最近、「細胞膜が膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質で仕切られている」という、細胞膜の流動モザイクモデルをさらに深化させた「新しい細胞膜構造モデル」<sup>6)</sup> が提唱されている。このモデルを検証するため、細胞膜直下の膜骨

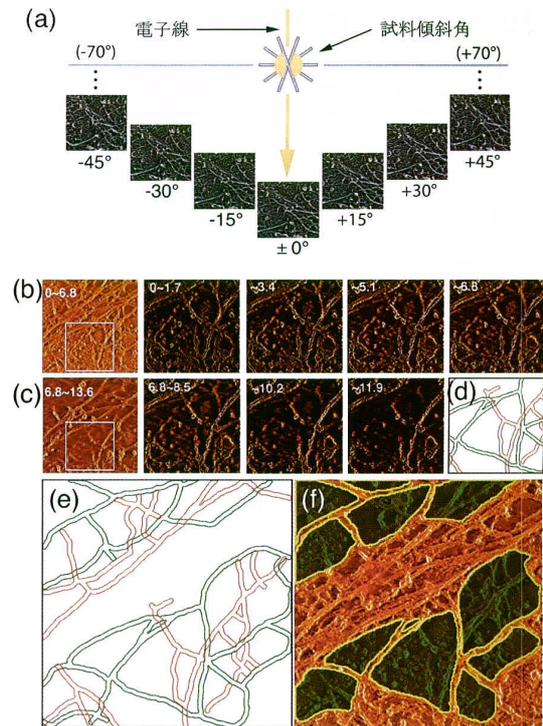


図4 電子線トモグラフィーにより細胞膜骨格を3次元的に選択した。(a) 筆者らは同一視野に対して $\pm 70$ 度の試料傾斜角度範囲を1度ステップで連続撮影した合計141枚のCCD画像をインテグレートしている。これらの連続傾斜像から $\alpha$ スライス像を計算により求める。最終的には、それらの連続スライス像と細胞質側表面からの部分的立体再構築像 [(b) 0~6.8 nm や (c) 6.8~13.6 nm の範囲を1.7 nm ごとに計算した像群] を相互に比較することで、細胞質側表面に再近接したフィラメント群を選択して、これらを「細胞膜直下の膜骨格」と決定した。(d, e) の緑色で縁取りされたフィラメントが細胞質側表面に、また赤色が細胞質に接近して局在していることが分かった。そのため、この緑色の成分が「細胞膜骨格」であり、この膜骨格で囲まれた領域 [(f) 黄色で縁取りされ、緑色で塗られたところ] が、細胞膜のコンパートメントである。

格のメッシュサイズの分布と、リン脂質の拡散から推定されるコンパートメントの大きさの分布を比較した。アクチン線維は、白金蒸着試料では、太さ (厚さ) が約 10 nm 程度になる。そこで、細胞膜の細胞質側表面から 10 nm 程度の厚さに局在するアクチンフィラメントを3次元再構築像において同定した (図 4, 5)。これらが、細胞膜分子の側方拡散運動に影響を与える膜骨格構造と考えられるからである。細胞質側表面から 1.7 nm ごとの部分的な3次元構築像 (図 4b, c) や 0.85 nm 毎の連続スライス像のムービーにより、フィラメントの3次元的位置を識別した。図 4d, e で、緑の線維は細胞膜から 10 nm 以内に局在する線維であり、赤の線維は、その上に載っている線維である。緑の線維で囲まれた領域が、細胞膜上での膜骨格で囲まれたメッシュであると考えられるので (図 4f)、その領域の面積を多数測定しヒストグラムにした (図 5)。このヒストグラムを、脂質の高速

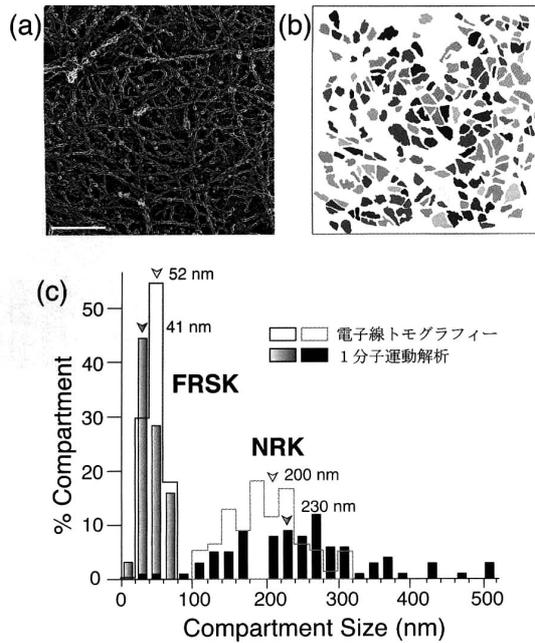


図5 電子線トモグラフィーと1分子運動解析で細胞膜のコンパートメントサイズが一致した。急速凍結・ディープエッチング法で観察した細胞質側表面 (a) には、膜骨格のメッシュワークで囲まれた膜コンパートメント (b) が存在することがわかった。色分けされた領域が1つ1つの膜コンパートメントを表している。(c) 2種類の細胞 (FRSKとNRK細胞) で電子線トモグラフィーと超高速カメラによる1分子運動解析で決定したコンパートメントサイズを比較してみると、平均値と中央値を含めてヒストグラム表示全体でほぼ一致した。スケールバー：100 nm。

1分子追跡によって求めた、膜分子に対する拡散障壁によるコンパートメントサイズ<sup>20~22)</sup>と比較した。そうすると、これらは、2種類の全くコンパートメントの大きさが異なる細胞 (NRKとFRSK細胞) でほぼ一致した。これは、「膜骨格フェンスモデルおよび膜骨格にアンカーされた膜貫通型タンパク質のピケットモデル」を強く支持するものである。

おわりに

急速凍結・ディープエッチ・白金蒸着によるレプリカ法と、電子線トモグラフィー法との組み合わせにより、細胞膜の構造の定量的研究は、大きく進んだ。この方法を様々な細胞に、また、刺激前後での変化の検討に応用することにより、膜骨格の機能解析がさらに大きく進むことが期待される。

謝辞：本研究の遂行にあたり、(株)三菱化学生命科学研究所の瀬藤光利先生、国立精神・神経センター神経研究所の湯浅茂樹先生、米国ワシントン大学医学部のジョン・ホイザー先生にお世話になりました。謹んでお礼を申し上げます。

- 1) Singer, S.J. and Nicolson, G.L.: *Science*, 175, 720-731 (1972)
- 2) Sheetz, M.P.: *Semin. Hematol.*, 20, 175-188 (1983)
- 3) Saxton, M.J.: *Biophys. J.*, 55, 21-28 (1989)
- 4) Edidin, M., Kuo, S.C. and Sheetz, M.P.: *Science*, 254, 1379-1382 (1991)
- 5) Kusumi, A. and Sako, Y.: *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, 566-574 (1996)
- 6) Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R.S., Kondo, J. and Fujiwara, T.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34, 351-378 (2005)
- 7) Luna, E.J. and Hitt, A.L.: *Science*, 258, 955-964 (1992)
- 8) Jacobson, K., Sheets, E.D. and Simson, R.: *Science*, 268, 1441-1442 (1995)
- 9) Tsukita, S., Tsukita, S. and Ishikawa, H.: *J. Cell Biol.*, 85, 567-576 (1980)
- 10) Branton, D., Cohen, C.M. and Tyler, J.: *Cell*, 24, 24-32 (1981)
- 11) Mohandas, N. and Evans, E.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23, 787-818 (1994)
- 12) Byers, T.J. and Branton, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6153-6157 (1985)
- 13) Bennett, V.: *Physiol. Rev.*, 70, 1029-1065 (1990)
- 14) Takeuchi, M., Miyamoto, H., Sako, Y., Komizu, H. and Kusumi, A.: *Biophys. J.*, 74, 2171-2183 (1998)
- 15) Bornens, M., Paintrand, M. and Celati, C.: *J. Cell Biol.*, 109, 1071-1083 (1989)
- 16) Hartwig, J.H., Chambers, K.A. and Stossel, T.P.: *J. Cell Biol.*, 108, 467-479 (1989)
- 17) Hartwig, J.H. and DeSisto, M.: *J. Cell Biol.*, 112, 407-425 (1991)
- 18) Hirokawa, N. and Heuser, J.E.: *J. Cell Biol.*, 91, 399-409 (1981)
- 19) Hirokawa, N., Tilney, L.G., Fujiwara, K. and Heuser, J.E.: *J. Cell Biol.*, 94, 425-443 (1982)
- 20) Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 174, 851-862 (2006)
- 21) Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 157, 1071-1081 (2002)
- 22) 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)
- 23) Heuser, J.: *Traffic*, 1, 545-552 (2000)
- 24) Svitkina, T.M., Verkhovskiy, A.B., McQuade, K.M. and Borisy, G.G.: *J. Cell Biol.*, 139, 397-415 (1997)
- 25) Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, A., Schleicher, M. and Shapiro, S.S.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 138-145 (2001)
- 26) Fung, J.C., Liu, W., de Ruijter, W.J., Chen, H., Abbey, C.K., Sedat, J.W. and Agard, D.A.: *J. Struct. Biol.*, 116, 181-189 (1996)
- 27) Perkins, G.A., Renken, C.W., Song, J.Y., Frey, T.G., Young, S.J., Lamont, S., Martone, M.E., Lindsey, S. and Ellisman, M.H.: *J. Struct. Biol.*, 120, 219-227 (1997)
- 28) Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G. and Baumeister, W.: *Science*, 298, 1209-1213 (2002)
- 29) McIntosh, R., Nicastro, D. and Mastrorarde, D.: *Trends Cell Biol.*, 15, 43-51 (2005)
- 30) Lucic, V., Forster, F. and Baumeister, W.: *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 833-865 (2005)
- 31) Kremer, J.R., Mastrorarde, D.N. and McIntosh, J.R.: *J. Struct. Biol.*, 116, 71-76 (1996)
- 32) Heuser, J.E. and Anderson, R.G.: *J. Cell Biol.*, 108, 389-400 (1989)
- 33) Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. and Anderson, R.G.: *Cell*, 68, 673-682 (1992)
- 34) Heuser, J.E. and Kirschner, M.W.: *J. Cell Biol.*, 86, 212-234 (1980)