

トピックス

化学固定後でさえも膜分子は動いている

鈴木健一^{1,2}, 田中賢治^{1,*}, 楠見明弘¹¹京都大学物質-細胞統合システム拠点²科学技術振興機構さきがけ

*現 株式会社味の素

1. はじめに

生体試料の「固定」は、18世紀末頃に、解剖をしやすくする方法として導入された。現在の化学固定法は、1960年代に、当時大きく進歩しつつあった光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて、細胞や組織の微細構造や分子分布を調べることを目的として開発された。この方法では、ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドなどの溶液を用いる。これらの分子は、重合したり、細胞内の分子と共有結合して架橋するので、細胞内の多くの分子はお互いにつながれてしまって動かなくなると考えられ、「化学固定」とよばれるようになった。一方、当時の「固定」というのは、その後の試料処理で、細胞形態が保存され、また、分子の抽出が起こらないという程度の意味であった。すなわち、細胞内で分子が本当に動かないかどうかということは検討されないまま、「固定」という言葉のみが一人歩きする結果となった。

「分子が動かない」という意味での固定は、免疫染色法において特に重要である。免疫染色法では、多くの場合、1次抗体と2次抗体を引き続いて反応させるが、このとき、もし抗原分子が動けると、抗体処理の過程で抗原分子が集合し、もとの分布とはまったく違った分布になる。細胞膜上では、分子の凝集自体がシグナルになることも多いため、上流分子の集合部分に下流の未固定分子がリクルートされてくる可能性がある。もしこれに気づかないと、「2種類の分子が集まって集合体を形成して働く」という「発見」をしたという誤解をする可能性がある。これがまさに、細胞膜上のシグナル伝達に重要な領域であるラフトの研究に大きな混乱を起こしていた^{1),2)}。

2. 細胞膜分子は「固定」されているか？

われわれは、多くの細胞膜分子が化学固定できるかを調べた(図1)。左端のトランスフェリン受容体と、右端の膜の基本分子であるリン脂質はラフトに入らない。それ以外の分子は、すべて、ラフト関連分子と考えられている。さまざまなラフト分子を化学「固定」した後に、われわれが開発してきた1分子イメージング法を用いて観察したところ、案の定、通常の化学固定条件では多くのラフト分子が、まだ動き回っていることがわかった(図2, 4%パラホルムアルデヒド)³⁾。したがって、「免疫染色法で観察すると、ラフト領域に多数のシグナル分子などが大きな会合体を作って働いている」という現象が、染色時の抗体濃度や細胞と抗体の相互作用時間などによって微妙に違って観察され報告されるのは、一般的な化学固定によって膜分子の動きが完全に止められていないからであることがわ

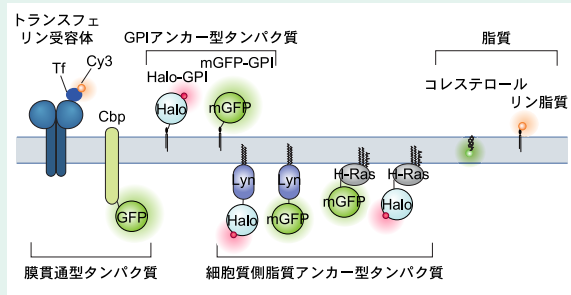


図1

化学固定されるかどうかを検討した細胞膜分子。膜貫通型タンパク質として、トランスフェリン受容体(TfR)とCbpを観察。GPIアンカー型タンパク質として、Halo-tagやmGFPをGPIアンカーしたモデル分子を用いた。細胞膜内層に飽和脂肪酸鎖でアンカーされている分子LynやH-Rasも調べた。脂質としては、ラフト親和性のあるBodipy-cholesterolとラフト親和性のないdioleoylphosphatidylethanolamine(Cy3-DOPE)を観察した。

Membrane Molecules Mobile even after Chemical Fixation

Kenichi G. N. SUZUKI^{1,2}, Kenji A. K. TANAKA^{1,*} and Akihiro KUSUMI¹¹Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University²PRESTO-Japan Science and Technology Agency

*Present Address: Ajinomoto Co., Inc.

※図1, 図2は、電子ジャーナル (<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

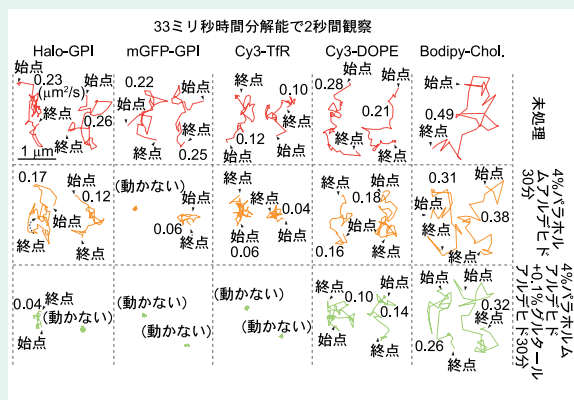


図2 2種の代表的な化学固定操作を行った後のさまざまな細胞膜分子の典型的な軌跡

かってきた。ここで、1分子法を用いて調べたのは、固定処理後の細胞膜分子のように、動きやすさが1分子ごとに大きく違うときに、それらを漏らさず調べるためにきわめて有用であったからである。このように、化学固定後の分子運動を1分子追跡によって調べた結果は、過去50年の免疫抗体染色データに見直しを迫ることとなった。

3. | 細胞膜分子は「固定」できるか？

化学固定の免疫抗体法への応用を考えると、次の2点の両方が達成できる必要がある。すなわち、生体分子に結合する固定剤分子の数を増やしていったとき、(1) 分子の動きを封じ、かつ (2) 分子に多数の固定剤が結合した条件にもかかわらず抗体が認識して結合できる、という2つの条件を満たす固定方法を見つける必要がある。後者の条件はこれまでのデータから大体わかっており、通常、「4% パラホルムアルデヒド⁴⁾+0.2% グルタルアルデヒド^{5,6)}、25°C前後、30分」を越えない程度が望ましい。免疫蛍光染色の時は、グルタルアルデヒドは背景の蛍光シグナルを与えることが多く、この条件からも使える上限濃度は0.2%程度であった。

図2に、分子の拡散運動の典型的な1分子軌跡を示す。これらの結果、上の(2)を満たす範囲で、細胞分子の固定ができる程度は、分子によって大きく異なることがわかった。

すなわち、結果は以下のようにまとめられる。

- 1) 膜貫通型タンパク質分子は、化学固定を強くすると、分子の固定が可能。
- 2) 主要なラフト関連タンパク質である GPI アンカー型タンパク質は、抗体の結合能をある程度保つことのできる条件の固定では、固定は不可能。

3) GPI アンカー型タンパク質は、固定の原点に戻って、アルコール固定すると、固定可能。しかし、18世紀とは違って冷凍庫があるので、 -40°C に冷やしたメチルアルコールを用い、固定中の細胞温度を -20°C くらいにして固定するのがマイルドでよい(5分以内、抗体の結合能が保たれやすい)。しかし、細胞からの背景蛍光が増えるので、化学固定がダメなときに限る。

4) 脂質はラフト関連分子も非ラフト分子も化学固定は不可能。アルコール固定をすると、ほとんどの脂質が抽出されて細胞からなくなり、実用的でない。

さらに、以下の重要な結果が得られた。

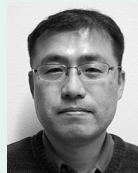
- (1) 上記の方法を用いても、固定されない分子が5-20%程度残る。動ける分子は、抗体によって集められるので、それを念頭に結果の解釈が必要。
- (2) 免疫染色抗体には、抗体から1価のFab断片を作製して用いる方が安全。

4. | おわりに

この50年来蓄積されたデータすべてについて、上記の固定条件を基準として、再検討することが必要である。具体的には、文献を読む際に、上記の固定条件より弱い固定で行われた実験結果については、抗体による凝集の可能性を考慮して、自分なりの解釈を行う必要がある。ラフト領域は、牛海綿状脳症などさまざまな疾病やウイルス感染・増殖などにもかかわっており、本研究によって、これらの研究の大きな障害の1つが取り除かれたことになる。

文 献

- 1) Mayor, S. *et al.* (1994) *Science* **264**, 1948-1951.
- 2) Kusumi, A., Suzuki, K. (2005) *Biochim. Biophys. Acta.* **1746**, 234-251.
- 3) Tanaka, K. A. K. *et al.* (2010) *Nature Methods* **7**, 865-866.
- 4) Metz, B. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 6235-6243.
- 5) Kierman, J. A. *et al.* (2000) *Microsc. Today* **00-1**, 8-12.
- 6) Kawahara, J. *et al.* (1992) *Anal. Biochem.* **201**, 94-98.



鈴木健一

鈴木健一 (すずき けんいち)

京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS) 准教授、兼 JST さきがけ研究者
1997年京都大学工学研究科合成・生物化学専攻博士後期過程修了。博士(工学)Duke大学博士研究員などを経て2011年4月より現職。
研究内容:細胞膜上の膜ドメインを解したシグナル伝達機構の解明
連絡先:〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53
E-mail: ksuzuki@frontier.kyoto-u.ac.jp
URL: <http://www.nanobio.frontier.kyoto-u.ac.jp>
田中賢治 (たなか けんじ)
京都大学 iCeMS (現・株式会社社味の素)
楠見明弘 (くすみ あきひろ)
京都大学 iCeMS 教授・再生医科学研究所教授