

膜脂質分子をナノレベルで可視化する

Visualization of Membrane Lipid Molecules at the Nanoscale

藤田 秋一, 藤本 豊士

Akikazu Fujita and Toyoshi Fujimoto

^a名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞学分野

要旨 従来の免疫電顕法では、脂質分子の分布を捉えることは困難であった。急速凍結法と SDS 処理凍結割断レプリカ標識 (SDS-FRL) 法を組み合わせることにより、脂質を物理的に固定し、膜脂質の分布をナノレベルで定量的に解析することが可能になった。空間統計学的な解析を用いることで、膜内での二次元的分布を客観的に判断することもできる。この方法を応用することにより、糖脂質 GM1 とホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PI(4,5)P₂) の分布について、他の方法では得られない新たな知見を獲得することができた。

キーワード：ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸, GM1, フリーズフラクチャー, 膜脂質

1. はじめに

細胞膜は多種多様な脂質で形成され、それぞれの分布は均一ではない。個々の脂質分子はたえず側方拡散運動し、さらに脂質自身の性質に基づいて形成されるマイクロドメイン (ラフト) の存在が想定されている。ラフトの実体についての論争はまだ継続中であるが、ラフト自体が離合・集散を繰り返すダイナミックな存在であることは疑いない¹⁾。生物物理学的方法で捉えられた GPI 結合蛋白質の小さなクラスターはこのようなラフトの性質を反映すると思われるが、直径はわずかに 10 nm 以下、存在寿命は 1–25 msec に過ぎない²⁾。

膜脂質は果たしてラフトを作るのか、仮に作るとすればどこにどのような大きさで存在するのか、このような問題の解決には、対象を潰してしまう生化学的な方法は不向きである。多くの実験では界面活性剤不溶性膜 (Detergent-resistant membrane: DRM) とラフトを等価のものとして扱ってきたが、DRM を得る過程で膜分子の人工的な分布変化が起こることが確かめられている。これに対し、一分子追跡法、FRET、FRAP などの方法は生きたままの細胞を解析することができ、得られる情報も多面的である。しかしどの方法でも分子を可視化するために何らかのマーカ (蛍光、金コロイドなど) を結合させる必要がある。ラフトを形成する基盤が脂質分子間の弱い相互作用であるとする、マーカを結合させること自体が分子の挙動に何らかの影響を及ぼす可能性を否定できない。

我々は細胞に内在性に存在する膜脂質の分布をナノレベルで定量的に可視化したいと考えた。このためには電子顕微鏡

(電顕) を用いることが必要であり、またたえず動いている膜脂質を瞬時に固定するためには急速凍結法が非常に有効である。さらに凍結割断レプリカ法を用いることにより、膜脂質を物理的に固定した状態で標識を行うことができる。本稿ではこのような原理に基づく方法について解説し、得られた結果をご紹介します。

2. 電子顕微鏡による脂質分布の観察

2.1. 化学固定の問題点

上述したように GPI 結合蛋白質などが形成するクラスターの大きさは、通常の光学顕微鏡の解像限界を遙かに超えている。電顕を用いれば観察可能なはずだが、通常の試料作製に用いられるアルデヒド系の化学固定剤は蛋白質には作用するが、脂質とはほとんど反応しない。実際、これらの固定剤で固定した試料に抗体を作用させると、抗原分子間が架橋され、分布変化を起こすことが報告されている³⁾。一方、四酸化オスミウムは脂質、特に脂肪酸の不飽和結合と反応するが、固定後の試料を特異的に標識することは難しい。また仮に脂質を固定できる薬剤を使えるとしても、薬剤が対象となる分子に到達し、反応が完了するまでには数分の 1 秒～数秒かかると予想される。この間に脂質が動く距離は、光学顕微鏡による観察では問題にならないかもしれないが、電顕による nm レベルの観察の場合には大きく影響する。また単に動くだけでなく、固定剤の作用による凝集など、人工的な分布変化が起こる可能性も高い。

2.2. 急速凍結法と SDS-FRL 法の原理

急速凍結法と凍結割断レプリカ法を用いると、脂質分子を物理的に固定し、標識と観察を行うことができる。まず生きている状態の細胞を液体ヘリウム (沸点 -269°C) あるいは液体窒素 (沸点 -196°C) で冷却した純銅のブロックに圧着して急速凍結する (メタルコンタクト法) ことにより、

^a 〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65
TEL: 052-744-2001; FAX: 052-744-2011
E-mail: afujita@med.nagoya-u.ac.jp
2009年5月20日受付

分子運動を瞬時に完璧に停止させる。John Heuser らによれば、小さな骨格筋標本を液体ヘリウム温度のブロックで凍結した場合、コンタクト後、1 msec 以内に凍結することが報告されている³⁾。この報告の後、John Heuser は温度測定の時間分解能を上げて実験を重ね、0.1 msec 以内に凍結が起こることを確かめている（私信）。これが化学固定に比べれば遙かに短い時間であることは言うまでもない。しかし後述する GM1 の場合、リポソームでの拡散定数は 30°C で 5×10^{-9} cm²/sec であり、0.1 msec の間に最大 14 nm の距離を移動することができる。実際には 0.1 msec の間にも温度が下がり続けるので、これよりも移動可能距離は短い、急速凍結といってもナノレベルの世界では決して無視できない時間である。

凍結試料を真空中の低温ステージに装着し、切断すると、生体膜は脂質二重層の中央で劈開し、疎水性の面が広く露出される。この面に白金と炭素の薄膜を真空蒸着すると、膜内の蛋白質と脂質は疎水性界面の側から物理的に固定され、親水性の面（膜の本来の表面）を外に向けて保持される。レプリカは固体であり、レプリカに保持された膜分子が二次元方向に動くことはないと考えられる。このようにして得たレプリカを SDS で処理すると、レプリカで保持された膜分子以外の成分は溶解、除去される。一方、レプリカに保持された膜分子は SDS 処理しても脱落することなく維持される⁴⁾。またそれらの膜分子の親水性部分はレプリカと反対側に露出しているので、抗体などのプローブで特異的に標識することができる（SDS 処理凍結切断レプリカ標識 [SDS-FRL] 法⁵⁾（図 1）。オリジナルの SDS-FRL 法は故藤本和博士によって開発され、細胞間結合装置や神経シナプスなどにおける膜蛋白質分布の解析に欠かすことのできない方法となっている。

SDS-FRL 法の膜脂質に対する標識効率は次に述べる改良によって画期的に向上した。切断後にレプリカを作製するためには白金/炭素 (Pt/C) と炭素 (C) を蒸着する（図 1）。白金は電顕観察の際のコントラストを与え、炭素は物理的強度を与える。古典的な凍結切断レプリカ法では、まず白金/炭素を斜め 30–45° の角度で 1–2 nm の厚さで蒸着し、ついで炭素を垂直方向から 10–20 nm の厚さで蒸着する。SDS-FRL 法で蛋白質を標識する場合には多くの場合、この蒸着方法で問題はないが、脂質の場合には最初に炭素を蒸着することによって大幅に標識効率が改善される^{4,6)}。実際にはまず炭素を薄く (1–2 nm) 蒸着し、ついで通常の方法と同様の厚さで白金/炭素、炭素の順番で蒸着する 3 段階法を用いている。1 段階目に炭素を蒸着することによって、レプリカに保持される脂質分子の親水性頭部に若干の可動性が付与され（尾部は固定されているので二次元的には動けない）、抗体などとの反応性が増すためではないかと考えられる。

3. 細胞膜脂質分子の局在と動態

3.1. 細胞膜外葉の糖脂質 GM1

ラフト仮説によれば、ラフトはスフィンゴ脂質やコレステ

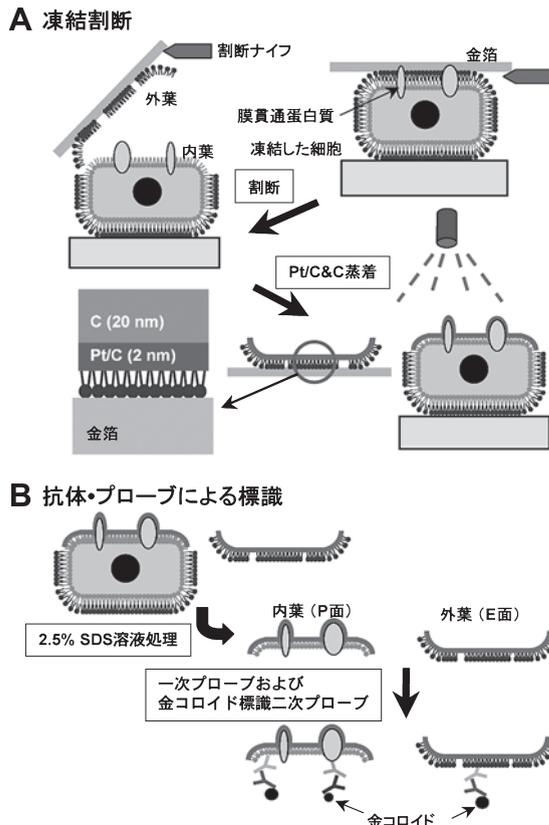


図 1 SDS-FRL 法の概略。(A)急速凍結した細胞を凍結切断し、炭素と白金/炭素を蒸着する。(B) 作製したレプリカを SDS 処理し、細胞成分を溶解、除去する。レプリカに保持された膜分子を抗体などのプローブで標識する。

ロールなどの脂質が基盤となって形成される液体秩序相の領域と考えられている（図 2A）。人工脂質膜では液体秩序相の形成を強く示唆する結果があるが、生きている細胞の膜に同様の領域が形成されるのかどうかは今のところ不明である。スフィンゴ糖脂質の GM1 は多くの実験でラフトのマーカーとして使われてきた。我々は細胞膜での GM1 の微細分布について SDS-FRL 法を用いて検討した⁶⁾。

図 2B はマウス線維芽細胞を急速凍結し、得られた細胞膜外葉のレプリカに抗 GM1 抗体、ついで金コロイド標識二次抗体を反応させた結果で、標識は二次元平面に分布する点として観察される。ラフト仮説を最も単純に解釈すると、GM1 はコレステロール依存性のクラスターを形成しているはずである（図 2A）。図 2B のコントロール（無処理正常培養条件下の細胞）の写真（左）に示した GM1 標識は、一見してクラスターを形成しているように見える。この GM1 標識の分布パターンを客観的に判断するために、点過程解析⁷⁾ という手法を用いる。点過程解析の代表的な方法として Ripley の K 関数 (Ripley's K-function) がある。大雑把にいうと K 関数は次のような考えに基づいている。点の分布が完全にランダムだとすると、ある点を中心として半径 r の円の中に入る点の密度は、サンプル数が大きくなれば、平面全体の点の平均密度に近づくはずである。一方、点がクラスターを形成する

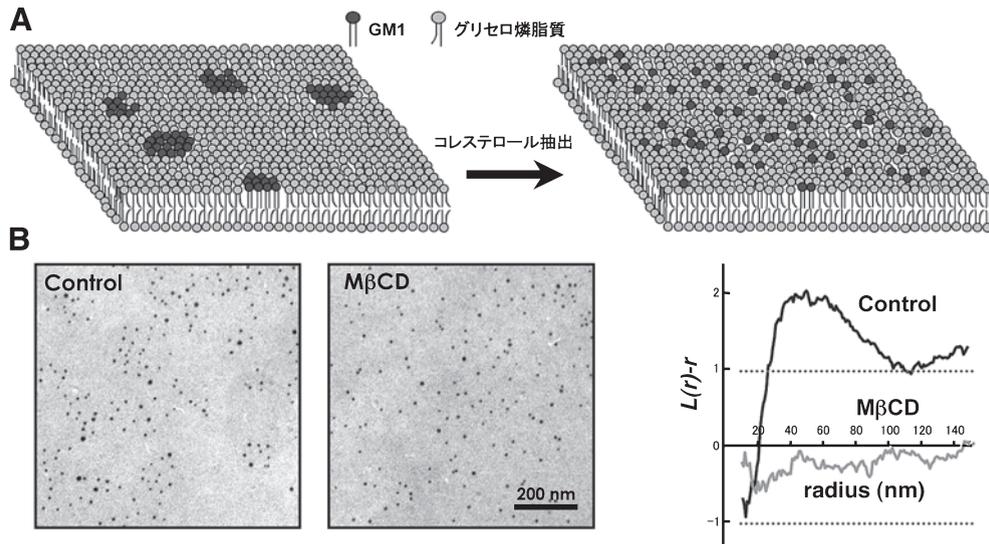


図2 ラフトの模式図 (A) およびマウス線維芽細胞の GM1 標識とコレステロール除去の影響 (B). (A) ラフト仮説によれば GM1 はコレステロール依存性にクラスターを形成すると予想される. (B) マウス線維芽細胞のレプリカをウサギ抗 GM1 抗体と浸漬した後, 5 nm 金コロイド結合抗ウサギ IgG 抗体で標識した. コントロール (左), methyl- β -cyclodextrin (M β CD) で処理して細胞膜のコレステロールを減少させた場合 (右) の結果を示す. グラフは GM1 標識の分布を L 関数で解析した結果である.

場合には, 半径 r の円の中に入る点の密度を示すグラフは, 平均密度と異なる極大点を示すと考えられる. 図 2B のグラフの横軸は半径 r , 縦軸の $L(r)-r$ は半径 r の円内の点密度を反映する値である. なおこの $L(r)-r$ は K 関数を改変した L 関数と呼ばれるもので, ランダムに分布する点の場合に 1 から -1 の範囲に入るように標準化されている. $L(r)-r$ が 1 よりも大きい値をとる場合に金コロイドの分布はクラスターしていると判断され, 関数のピークの r 値はクラスターの平均半径を表す. 従って図 2B のグラフは GM1 標識が半径約 50 nm のクラスターを形成していることを示す.

細胞膜のコレステロールを抽出する操作を行った後に細胞を凍結し, 同様の方法で GM1 の標識を行った結果が図 2B の右の写真である. この図の標識を L 関数で解析すると, グラフのピークが低くなり, ランダム分布に近づいていることが分かる. 同様にして多数例を解析すると, 同一の細胞膜においても GM1 の分布パターンは領域によって大きな差異があり, クラスター分布とランダム分布の領域が入り交じって存在することがわかった. 詳細な議論は省くが, 急速凍結の前に氷温においた細胞の結果などから, GM1 の分布がラフト自体の範囲を示す訳ではないことも明らかになった (文献 6, 8 を参照).

このように SDS-FRL 法の最大の利点は何の前処理も行っていない内在性の GM1 の分布を定量的に評価できることにある. また標識効率も十分に高く, ヒト線維芽細胞では存在する GM1 のうち 18-27% 程度の分子を捕捉できる⁶⁾. さらに細胞膜の広い領域 (レプリカ当たり平均 $100 \mu\text{m}^2$ 以上) を一度に観察できるのも大きなメリットであり, 細胞膜の局所的な分化を解析する上で大きな威力を発揮する.

3.2. 細胞膜内葉のイノシトール磷脂質 PI(4,5)P₂

イノシトール磷脂質の一つである PI(4,5)P₂ は, 細胞内情報伝達, アクチン細胞骨格の制御, イオンチャネルやトランスポーターの活性調節, エンドサイトーシス, エキソサイトーシスなどに関与することが報告されている. このように 1 種類の脂質分子が多数の機能に関与し, しかも相互に干渉しあわないためには, PI(4,5)P₂ が異なるコンパートメントに分かれて存在 (区画化) し, それぞれ独立に存在量が増減する仕組みの存在が予想されてきた. しかし PI(4,5)P₂ の区画化を検出する方法がないため, この予想の当否を確かめることはできなかった.

PI(4,5)P₂ と特異的に結合する Phospholipase C (PLC) δ 1 の PH ドメインと GFP の融合蛋白質 (GFP-PH) を細胞に発現させ, PI(4,5)P₂ の動態変化をライブ観察することができる. この方法では種々のアゴニスト刺激による細胞膜の PI(4,5)P₂ 量のダイナミックな変化を捉えることが可能である. しかしながらこの方法は, ①局所的な量の変化を追うには解像度が不十分である, ② PI(4,5)P₂ の分解で産生されるイノシトール三磷酸 (Ins(1,4,5)P₃) が GFP-PH とより高親和性で結合するため PI(4,5)P₂ との間で拮抗が起こる, ③ GFP-PH が結合することにより, PI(4,5)P₂ の挙動が影響される, ④エフェクター分子に結合している PI(4,5)P₂ には GFP-PH が結合できない, などの問題点が指摘されてきた.

一方, SDS-FRL 法を PI(4,5)P₂ に応用すると, ダイナミックな変化を捉えるのは労力を要するが, 上に述べたライブイメージング法の問題点をほぼ完全にクリアできる. すなわち, ①解像度は非常に高い, ② Ins(1,4,5)P₃ はレプリカ標識時には存在しないので拮抗の可能性はない, ③ GFP-PH のよう

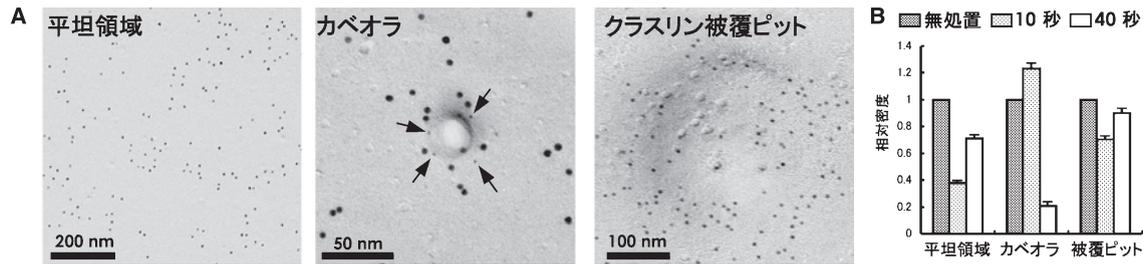


図3 ヒト線維芽細胞のPI(4,5)P₂ 標識.

ヒト線維芽細胞のレプリカをGST-PHと浸漬した後、ウサギ抗GST抗体に続いて5 nm金コロイド結合 protein Aで標識した。(A) 平坦な細胞膜領域、カベオラ、クラスリン被覆ピットのPI(4,5)P₂の分布。中央の写真はカベオリン-1 (5 nm金コロイド: 矢印)とPI(4,5)P₂ (10 nm金コロイド)の二重標識を示す。(B) 各領域のPI(4,5)P₂の標識密度。無処理, Angiotensin II投与10, 40秒後の結果を示す。それぞれの領域の無処理時の密度を1とした。

な外来性の蛋白質を細胞に発現させる必要はない、④可溶性のエフェクター分子はSDS処理で除かれるので問題にならない、ということになる。さらに検索対象の細胞には何の事前処理も必要とせず、動物体内の組織を含む種々の細胞に適用可能であることも大きな利点である⁹⁾。

レプリカによって捕捉したPI(4,5)P₂を標識するには、GSTとPLCδ1のPHドメインの融合リコンビナント蛋白質(GST-PH)をプローブとして用いる⁹⁾。この方法の標識特異性は以下の実験で確かめられた。1) PI(4,5)P₂を含むリポソームとは結合するが、他のイノシトール燐脂質を含むリポソームとは結合しない、2) GST-PHをあらかじめIns(1,4,5)P₃と浸漬すると標識が起こらないが、PHドメインに結合しないIns(1,3,4)P₃では吸収されない、3) PHドメインの2つのアミノ酸を置換したPI(4,5)P₂に結合しないミュータントでは標識は起こらない。これらの結果よりGST-PHをプローブとしてSDS-FRL法でPI(4,5)P₂を特異的に標識できることが分かった。

図3Aはヒト線維芽細胞の細胞膜内葉のレプリカを標識した結果である。細胞膜の平坦な領域におけるPI(4,5)P₂の標識はごく弱いクラスターを示していた。これに対し、カベオラの開口部にはPI(4,5)P₂の標識が強度に集中していた。カベオラへのPI(4,5)P₂の集中はマウス精管平滑筋などin vivoの細胞でも同様に認められた⁹⁾。またPI(4,5)P₂はクラスリン被覆ピットの形成に関与する複数の蛋白質に結合し、エンドサイトーシスに関与することが知られているが、実際、直径100–200 nmのクラスリン被覆ピットの凹みにも強い標識が見られた。

さらにアゴニスト刺激した細胞を経時的に急速凍結し、上記の3つの部位のPI(4,5)P₂量の変化を検索すると、部位ごとに大きな挙動の違いがあることが明らかになった(図3B)⁹⁾。ヒト線維芽細胞をangiotensin IIで刺激し、非分化平坦領域とカベオラ近傍のPI(4,5)P₂の標識密度を経時的に計測すると、平坦領域では刺激5, 10秒後に非刺激時の約40%まで減少するが、同じ時期のカベオラ近傍の標識密度には変化はない。しかし、刺激40秒後になると、平坦領域の標識密度はほぼ元のレベルにまで回復しているのに対し、カベオラ近傍では非刺激時の約20%まで減少していた。またクラスリン被覆ピットのPI(4,5)P₂標識密度は刺激10秒後に

約70%に減少したのみで、他の領域に比べて変化は少なかった。さらにCa²⁺イオンフォアで細胞内Ca²⁺濃度を上昇させた場合に見られるPI(4,5)P₂の減少は、angiotensin IIの場合と逆にカベオラ近傍で先行して見られ、平坦領域では遅延した。

これらの結果は、細胞膜のPI(4,5)P₂が平坦領域、カベオラ近傍、クラスリン被覆ピットの3領域でそれぞれ異なる挙動をとることを示している。従来では分からなかった細胞膜におけるPI(4,5)P₂の区画化を初めて実証した結果であると言える。

4. まとめ

ある特定の脂質分子の機能を理解するには、その局在と動態を、高解像度でしかも定量的に捉える必要がある、この点で急速凍結法とSDS-FRL法を組み合わせた方法は非常に有効である。特にPI(4,5)P₂の場合のように、細胞膜の近接する領域間で見られる脂質分子の挙動の違いを観察できるのは、今のところSDS-FRL法だけである。今後、SDS-FRL法の解像度と定量性をさらに高め、また他の脂質分子に対するプローブを新たに開発することで、SDS-FRL法の応用範囲を拡げ、その有用性を示して行きたい。

文 献

- 1) Kusumi, A. and Suzuki, K.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 1746, 234–251 (2005)
- 2) Sharma, P., Varma, R., Sarasij, R.C. et al.: *Cell*, 116, 577–589 (2004)
- 3) Heuser, J.E., Reese, T.S., Dennis, M.J. et al.: *J. Cell Biol.*, 81, 275–300 (1979)
- 4) Fujita, A. and Fujimoto, T.: *Histochem. Cell Biol.*, 128, 385–389 (2007)
- 5) Fujimoto, K.: *Histochem. Cell Biol.*, 107, 87–96 (1997)
- 6) Fujita, A., Cheng, J., Hirakawa, M. et al.: *Mol. Biol. Cell*, 18, 2812–2822 (2007)
- 7) Prior, I.A., Muncke, C., Parton, R.G. et al.: *J. Cell Biol.*, 160, 165–170 (2003)
- 8) Fujita, A., Cheng, J. and Fujimoto, T.: *Biochim. Biophys. Acta.*, in press, (2009)
- 9) Fujita, A., Cheng, J., Tauchi-Sato, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press, (2009)