

凍結切断レプリカ標識法で見た中枢神経系ギャップ結合の形態学的多様性

Morphological Diversity of Gap Junctions in the Central Nervous System

釜澤 尚美

Naomi Kamasawa

¹生理学研究所・脳形態解析研究部門

要旨 凍結切断レプリカ標識法による観察から、中枢神経系のギャップ結合は、斑状だけでなく、ひも状、リボン状、網状と多様な形態を頻繁に呈すること、また、直径 0.1 μm 以下の小さなギャップ結合が多数存在することが明らかになった。さらに、双面レプリカ標識法によって、網膜の神経細胞間において 2 種類のコネクシンで構成されるギャップ結合では、それぞれのホモ 6 量体コネクソンがサブドメインを形成して 2 つの細胞間で連結していることが判明した。

キーワード：凍結切断レプリカ標識法、ギャップ結合、中枢神経系、網膜、双面レプリカ

1. はじめに

SDS 処理凍結切断レプリカ免疫標識法 (SDS-digested freeze-fracture replica labeling, SDS-FRL 法) は、生体膜を 2 次元で観察できるというレプリカ法の利点を生かし、同時に、膜上に存在する生体分子を抗原抗体反応によって同定することが可能な方法として、1995 年に故藤本和博士によって報告された¹⁾。本手法を中枢神経の研究に用いているのは、世界でも限られた研究室のみであるが、脳の機能を解明するための重要な役者である各種チャンネル、トランスポーター、受容体などは細胞膜タンパクとして存在しており、細胞膜上のこれらの分子の配置と局在、あるいはタンパク分子の会合状態、分子同士の 2 次元的な位置関係を電子顕微鏡レベルで可視化・同定できる本法は非常に有用である。詳しい原理や実験手法については他の総説に詳しく記されているので^{2,3)}、ここでは、本法によって観察された、中枢神経系のギャップ結合の形態学的多様性を中心に紹介しながら、レプリカ標識法の有用性について述べたい。

2. レプリカ標識法

筆者が所属する部門では、脳組織におけるシナプス解析のために改良した SDS-FRL 法を用いている。方法の概略は以下の通りである。脳組織はパラホルムアルデヒド溶液で灌流固定後、ビブラトームで均一な厚さのスライスを作製し、グリセリン処理を行う。1.5 mm 大にトリミングした試料を 2 枚の金属キャリアーで挟み、加圧凍結装置 (HPM010, BAL-TEC/Leica) を用いて凍結する。双面レプリカ用試料台に凍結試料キャリアーを装着して、BAF060 (BAL-TEC/Leica) で切断・蒸着を行う。免疫染色の効率向上のために、カーボン、プラチナ/カーボン、カーボンの 3 層を、カーボンは 90 度から回転蒸着、プラチナは 60 度から一方向蒸着で用いている。このとき、膜タンパクの pit 構造等の微細構造を明瞭に検出する必要がある場合には、最初のカーボン (プレカーボン) 層を薄くする必要がある。たとえば当部門では、通常試料には 5 nm のプレカーボン蒸着を行うが、高解像度の解析が必要な場合には、1.5 nm-2 nm に減少させている。プレカーボンの存在は、抗原性の保持だけでなく、プラチナの蒸着粒子の粒状性を減少させる効果もあり、より詳細な構造観察が可能となる。コロラド州立大学 Rash 研究室では、高解像度のレプリカ上に抗原抗体反応を得るために、通常 1 nm 以下のプレカーボン蒸着を行っている。しかし、この条件を再現性よく実現するためには、効率の良いコールドトラップが必要であり、同研究室では試料のまわりに箱状のシュラウドを装着した JEOL9010c 改変機をクライオポンプと共に用いている。

3. レプリカ標識法で観察されるギャップ結合

ギャップ結合はコネクシン (connexin, Cx) タンパクの 6 量体により形成されたコネクソン同士が、隣接する 2 つの細胞の膜間で連結したチャンネル構造である。レプリカ像では直径が約 9 nm のコネクソンが中心間距離 10 nm を保って会合した特徴的な構造として、他の膜タンパクと区別できる。細胞膜の脂質 2 重層の間に生じた凍結切断面は、ギャップ結合が存在する部分では、2 つのコネクソン間に移行する (図 1 左)。このとき、下側の細胞膜の protoplasmic face (P-face) においては、コネクソンは intramembrane particle (IMP) となり、切断面が上側の細胞膜に移行した部分では、上側の細胞のコネクソンの足跡がついた exoplasmic face (E-face) が、下側のコネクソンの上についた状態で蒸着され、E-face pit として観察される。一つのギャップ結合のクラスター中でも切断面が上下の細胞膜間に移行するため、P-face IMP と E-face pit が共存した像が観察される (図 1 右および図 2, 3 参照)。

レプリカ標識法では、イオンチャンネルや受容体のような通常の膜タンパクの場合は、切断によって膜内タンパク粒子が細胞膜の P-face か E-face のどちらかに移行するため、タンパク粒子が抜けた側の面には抗原抗体反応が起こらない。これに対し、構造的に連結したギャップ結合の場合は、P-face への標識に加えて、上側の細胞のコネクソンが抜けて出来た

¹ 〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1
TEL: 0564-59-5279; FAX: 0564-59-5275
E-mail: kamasawa@nips.ac.jp
2009 年 5 月 13 日受付

E-face にも、その下側に存在する未切断のコネクションに対する標識が起こる (図 1 右). 言い方を変えると、レプリカ上でギャップ結合の E-face が標識された像は、相補なレプリカ面をつきあわせて観察することなく、このギャップ結合が構造的に連結していたことを示すことになる.

4. 中枢神経系におけるギャップ結合

神経細胞におけるギャップ結合の研究の歴史や神経ネットワークについての新知見は、昨年の本誌に福田孝一博士が解説されているが⁴⁾、ギャップ結合は発見からの長い歴史と比較して、また、化学的シナプスに関する膨大な研究報告と比較して、形態・機能のいずれの情報も少ないのが現状である. ギャップ結合を構成するコネクシンは約 20 種類が存在する. Rash らは、レプリカ標識法で得られた結果を基に、中枢神経系では細胞種特異的に、異なる種類のコネクシンが発現してギャップ結合を形成することを報告した⁵⁾. 神経細胞では Cx36, Cx45, Cx57 がギャップ結合を形成し、電気的シナプス

として機能している.

古くから「gap junction plaque」という言葉が示すように、典型的なギャップ結合は斑状 (plaque) を呈し、しばしば規則正しい結晶様構造をもつ. 著者らはレプリカ標識法により、ギャップ結合が斑状以外の形態を頻りに呈することを報告した⁶⁾. 網膜の内網状層は、機能的に OFF-sublamina と ON-sublamina の 2 層に分かれているが⁶⁾、OFF-sublamina 特異的に、約半数のギャップ結合がひも状やリボン状に会合した形態を示した (図 2). そして、これらのギャップ結合も斑状の場合と同様に、P-face から E-face へなめらかに移行し、E-face 部分にも Cx36 に対する標識が認められた. すなわち、ひも状の形態を保ちながら相手側の細胞のコネクションと連結し、細胞間のチャンネルとして機能しうると考えられた. このような多様な形態は、細胞の種類や部位に特異的であるか、あるいは何らかの外的要因によって可逆的に形態変化が生じる可能性が考えられ、ギャップ結合が、チャンネル開閉のみならず、より動的に細胞間コミュニケーションに関与している

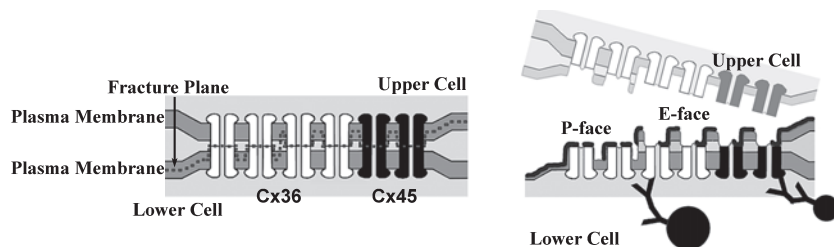


図 1 ギャップ結合の凍結切断レプリカ標識の模式図

切断面 (点線) は、ギャップ結合では連結したコネクション間に生じ、下の細胞の膜に沿って割れた場合には P-face IMP, 上の細胞の膜に沿った部分は E-face pit として露出・蒸着される. E-face pit に対する標識は、下の細胞の未切断のコネクシンに対して起こる.

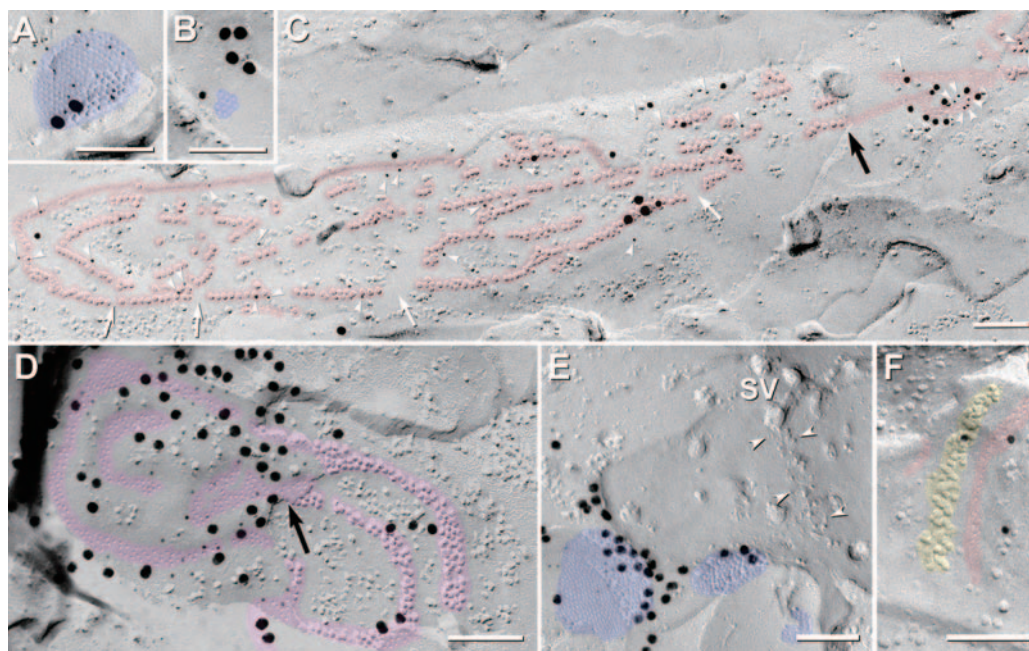


図 2 凍結切断レプリカ標識法で観察された神経細胞ギャップ結合の多様な形態 (金粒子は Cx36 に対する標識)

A) コネクションが結晶構造を呈した斑状のギャップ結合 (青色). クラスター内に E-face と P-face が観察される. B) 11 個の E-face pits からなるギャップ結合 (青色). C) ひも状のギャップ結合 (赤色) は数か所できれながら (白矢印), なめらかに P-face から E-face へ移行した (黒矢印). 白矢印は 5 nm の金粒子を示す. 中央 3 個の大きな金粒子 (18 nm) は抗 ZO-1 標識を示す. D) コネクションが 2-3 列に並んだリボン状のギャップ結合. P- から E-face への移行部 (黒矢印) は細胞外の距離が狭く、ギャップ結合の特徴を示す. E) リボンシナプス (矢頭) の近傍の細胞膜に、斑状のギャップ結合が観察された. SV はシナプス小胞. F) リボンシナプスのシナプス後膜に特徴的な E-face 膜タンパク構造 (黄色) の横には小さなひも状のギャップ結合 (赤色) が存在した. Mag bars = 100 nm 文献 6) を一部改変し, 許可を得て転載.

可能性が示唆された。また、OFF-sublamina に存在するギャップ結合の75%以上は100コネクソン以下（斑状の場合で直径約0.1 μm）でありながら、ギャップ結合の数密度はON-sublamina と同等であった。網膜はギャップ結合の研究対象として古くから用いられ、ON-sublamina のギャップ結合は存在部位や役割が報告されているが、OFF-sublamina のギャップ結合は「稀なもの」として記され、生理学的意義は解明されていない。これまでの研究に用いられてきた手法、例えば蛍光顕微鏡観察では、様々な大きさの点状シグナルが存在する組織では特に、大きなシグナルのハレーションを防ぐために観察の明るさを調節することが多く、小さなシグナルは消失、あるいはバックグラウンドと区別が難しくなる。一方、超薄切片法による電子顕微鏡観察では、直径100 nm以下の円盤状構造や、細胞膜間の接点として観察されるひも状構造は検出されにくいと考えられる。また、生理学的な実験系においても、大きなギャップ結合と同等の色素の移動や、電気的な応答は検出できないことが予測される。本法を用いた網膜の試料では、リボンシナプスと同定される構造の近傍の細胞膜や、リボンシナプスのシナプス後膜にも小さなギャップ結合が観察され（図2E, F）、網膜における縦方向の、グルタミン酸を介した情報伝達にもギャップ結合が関与する可能性が示された。これらの結果は、レプリカ標識法が、これまで見落とされがちだった膜タンパク分子に関する形態学的情報を大幅に更新しうることを提示したと考えられる。

5. 双面レプリカ標識法で何がわかったか

脳組織と同様に、網膜の神経細胞においてもCx36が主要なコネクシンであるが、Cx45も少数存在する。しかし、両者が同一の細胞で発現するのか、別々の細胞で発現するのかについては議論が分かれている。また、一つのギャップ結合内のコネクソンは、単一のコネクシンから構成されるホモ6量体なのか、複数のコネクシンからなるヘテロ6量体なのか、さらに、生体内でギャップ結合が形成される時には、同種のコネクソンのみが結合するのか、異種間の結合があるのか等の詳細については未解決のままである。図3A-Dは、2つの細胞間でギャップ結合が形成される際のコネクシンの構成を示したモデル図である。Aは単一のコネクシンからなるホモ・コネクソン同士が結合する場合（homotypic 結合）、Bは異なる2種類のホモ・コネクソンが結合する場合（heterotypic）、Cはギャップ結合の片側（ヘミプラーク）が、それぞれに2種類のホモ・コネクソンを持ち、2細胞間では同種コネクソン同士が連結する場合（bi-homotypic）、Dはヘテロ・コネクソン同士が連結する場合（heteromeric）を示す。今回、Cx36とCx45に対する抗体で標識した試料の双面レプリカを観察したところ、興味深い結果を得ることができた⁷⁾。図1に示したように、ギャップ結合のレプリカ標識では、相補するレプリカ面を突き合わせて観察することで、連結した上下2細胞それぞれのコネクシン構成を解析することができる。網膜試料においては、レプリカ上の90%以上のギャッ

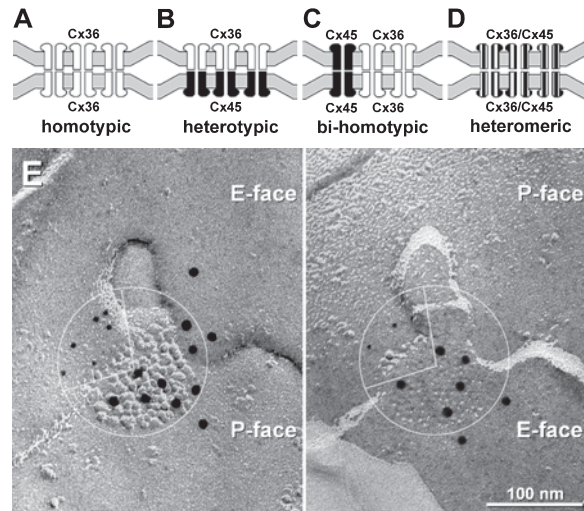


図3 ギャップ結合の構成を示す模式図と双面レプリカ2重標識像。A-D) Cx36とCx45が6量体コネクソンを形成し結合する際のパターン。E) 相補するレプリカの両面で、Cx36 (10 nm)とCx45 (5 nm) に対する標識は、混在せずに同じ部位に観察された。文献7)を一部改変し、許可を得て転載。

プ結合はCx36のみで標識され、それらは、相補するレプリカ上でもCx36に対する標識のみが観察された（図3A）。一方、全体の約9%にあたるギャップ結合でCx36とCx45の共局在が観察されたが、これらは、相補レプリカ面でも共局在が認められた（図3E）。すなわち、図3BのようにCx36とCx45が結合しているのではないことが分かった。さらに、2種類のコネクシンに対する標識は、一つのギャップ結合のクラスターの中でドメインを形成して観察され、相補するレプリカ面においてもドメインは保持されていたことから、図3Cに示したような「bi-homotypic」として構成されていると考えられた。同時に、2種類の標識が混在せずに観察されたことで、コネクソンは、図3Dのようなヘテロ6量体でないことが示された。

6. おわりに

高い空間解像度で各種生体分子の分布と会合状態を可視化できるレプリカ標識法が、今後、脳神経分野のみならず多方面へ応用されることを期待し、超微構造学から機能研究へ新しい知見を提案する機会を増やすことができれば幸いである。本研究は、コロラド州立大学のJohn E Rash教授、および、生理学研究所の重本隆一教授の研究室で行ったものである。両教授ならびに研究室の皆様へ感謝する。

文 献

- 1) Fujimoto, K.: *J. Cell Sci.*, 108, 3443-3449 (1995)
- 2) 重本隆一: 生体の化学, 57, 273-280 (2006)
- 3) 深澤有吾, 重本隆一: 顕微鏡, 43, 144-148 (2008)
- 4) 福田孝一: 顕微鏡, 43, 188-197 (2008)
- 5) Rash, J.E. et al.: *Cell Commun. Adhesion*, 8, 315-320 (2001)
- 6) Kamasawa, N. et al.: *Neuroscience*, 142, 1093-1117 (2006)
- 7) Li, X., Kamasawa, N. et al.: *J. Neurosci.*, 28, 9769-9789 (2008)