

電子線トモグラフィーによる細胞内アクチンフィラメント構造解析

Structural Analysis for Actin Filaments in the Cell by Electron Tomography

成 田 哲 博
Akihiro Narita

名古屋大学理学研究科構造生物学研究センター

要 旨 近年電子線トモグラフィーにより細胞内構造の可視化が急速に進展している一方で、細胞内蛋白質構造のような微細構造の解析は未だ難しい。主な原因は、1:細胞内構造のS/Nの悪さ、2:ミッシングエッジやミッシングピラミッドなどの、データが存在しない逆空間領域の取り扱いの二つである。筆者らは、細胞の中で膜構造に次いで顕著な構造物である線維状蛋白質構造、特にアクチンフィラメント網構造の解析に的を絞り、共同研究者のJohn Victor Smallらが1の問題を負染色法によって部分的に解決、筆者らが2の問題を回避する方策を考案することによって、ある程度有用な細胞内構造解析技術を構築することができた。本項ではその技術を概説する。

キーワード: 電子線トモグラフィー, アクチンフィラメント, 画像解析, 負染色

1. 背 景

細胞の中には、微小管や中間径フィラメント、アクチンフィラメントなどの多くの線維状構造が存在する。それらは、細胞の状態によって柔軟に構造を変化させ、細胞の様々な動きを生み出している。その中で特にアクチンフィラメントは動的であり、細胞骨格、細胞運動、細胞接着、細胞質分裂、物質の取り込み、排出など様々な役割を担う中で、細胞内アクチンフィラメント網はその構造を柔軟に変化させる(図1)。そのアクチンフィラメント網の解析には、主に光学顕微鏡と電子顕微鏡が用いられてきた。光学顕微鏡法は、細胞内のフィラメント動態をリアルタイムに観察することが可能だが、フィラメント一本一本を分離するには解像度が不足するため、アクチンフィラメント網の詳細はわからない。近年は超解像技術により、光学顕微鏡の分解能も向上してはいるが、それでも電子顕微鏡には遠く及ばず、また多くの超解像技術は時間分解能を大幅に犠牲にする。一方、電子顕微鏡においては、急速凍結+凍結置換法や、フリーズレプリカ法などが用いられており、古くからフィラメント一本一本が分離できる分解能が得られている。しかし、これらの手法では蛋白質の構造が壊れてしまっており、蛋白質構造レベルの解析はできない。また、処理の過程でアクチンフィラメント網が変形する可能性がある。一方で、ドイツのBaumeister¹⁾らがクライオ電子線トモグラフィー法によって、細胞内の天然アクチンフィラメント網構造を直接可視化することに成功し、

その後、クライオ電子線トモグラフィーは急速に発展、普及した。

2. アクチンフィラメント網動態を理解するには

さて、細胞内のアクチンフィラメント網動態を理解するには、どのような情報が必要であろうか?アクチンフィラメントは分子量42 kDaの球状蛋白質が重合することによって形成される(図1E)。細胞内のほとんどのアクチンフィラメントは動的に、形成、分解を繰り返す。ストレスファイバー(図1D)のような、比較的安定に見える構造であっても、数分から数十分で内部のアクチン分子は入れ替わっている。この動態が、状況に応じて様々なアクチンフィラメント網を柔軟に作り出し、アクチンというたった一種の蛋白質が数え切れないほどの重要な役割を担うことを可能にしている。この重合、脱重合は様々な制御蛋白質によって空間的、時間的に厳密に制御されている。この制御蛋白質の分布がわかれば、アクチンフィラメント網の構築原理を理解する重要な手がかりになるだろう。また、アクチンフィラメントには極性があり、片方の端をP端(Pointed end)、もう片方の端をB端(Barbed end)と呼ぶ(図1E)。細胞内のアクチンフィラメントはP端が脱重合端であり、B端が重合端である。アクチンフィラメント上を動くモーター蛋白質であるミオシン分子は、そのほとんどがB端に向かって動く。従って、アクチンフィラメントの極性がわかれば、そのフィラメント網がどちらから形成され、どちらから消滅していくのか、ミオシンによる力はその方向に働くのかがわかる。つまり、アクチンフィラメント網動態の方向性がわかるのである。

以上のことを踏まえ、細胞内のアクチンフィラメント網動

〒464-8601 名古屋市千種区不老町
TEL: 052-747-6473; FAX: 052-747-6471
2013年4月8日受付

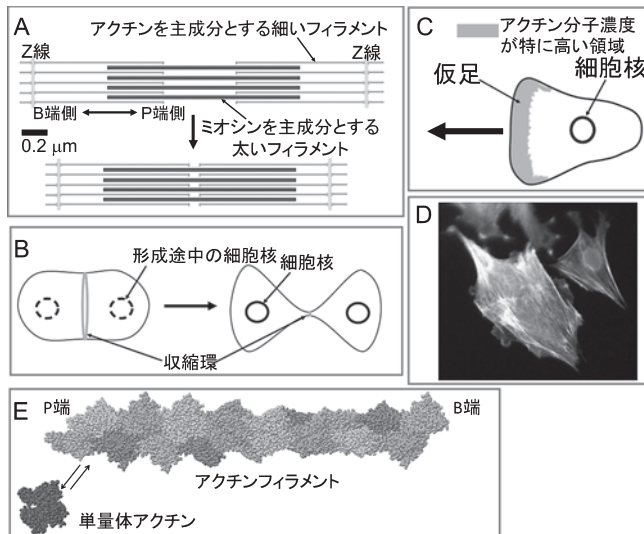


図1 アクチンフィラメント。A: 筋肉とB: 細胞質分裂のための収縮環はアクチンとミオシンが主成分である。C: 葉状仮足の先端部はアクチンが非常に多く存在し、アクチンの重合が細胞膜を前に押し出す。D: アクチンフィラメントと細胞核を染色した培養細胞の光学顕微鏡像。線状に見える構造はアクチンとミオシンを主成分とするストレスファイバーである。ストレスファイバーを含む細胞骨格は、細胞の形を規定すると同時に、インテグリンなどの細胞接着因子と結合することで、細胞接着に主要な役割を果たす。E: 球状の単量体アクチンが重合することで、アクチンフィラメントを形成する。細胞内では重合はB端で、脱重合はP端で起こる。

態を理解するためには、以下の三つの情報が必要である。1: アクチンフィラメントが細胞内のどこを何本走っていて、端がどこにあるのか。2: そのアクチンフィラメントのどちら側がP端、B端であるのか。3: アクチンフィラメント結合蛋白質はフィラメント網のどこにいくつ結合しているのか。

これらのことを明らかにするには、光学顕微鏡ではまったく力不足である。1については、従来の凍結置換法やフリーズレプリカ法が有効であるが、複雑な処理によるアクチンフィラメント網の変形の可能性は否定できない。2については、抗体染色が用いられてきたが、電子顕微鏡法における抗体染色は一般に感度が悪く、抗原蛋白質のごく一部しか検出されない。3については、アクチンにミオシン頭部を結合させることによってできるやじり構造による極性決定が行われてきた²⁾。そのためには、細胞膜に穴をあけて大量のミオシン頭部を導入し、アクチンに結合させる。この方法は多くの成果を上げてきたものの、このやじり構造はアクチンフィラメント単体の3倍以上の直径があり、やじり構造の形成自体がアクチンフィラメント網を大きく乱してしまう。

細胞内のフィラメント構造をできるだけ乱さずに観察し、そのなかの構造情報を用いて、アクチンフィラメントの極性、分布、結合蛋白質の位置を明らかにできることが理想である。クライオ電子線トモグラフィーにおいては、天然の構造を急速凍結し、無染色で観察するため、蛋白質の構造が完全に保たれており、それらができる可能性がある。

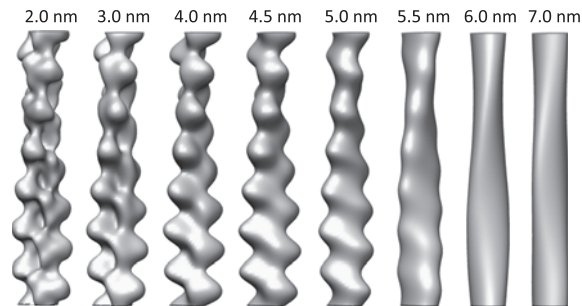


図2 クライオ電子顕微鏡写真の解析から得られたアクチンフィラメント像に様々なローパスフィルタをかけ、分解能ごとの見え方を計算した。4.5 nm から6.0 nm 分解能の間で急速に構造が無くなる。これは、アクチンフィラメントの大きな構造因子が、この分解能領域に存在するからである(図5I)。

しかしながら、クライオ電子線トモグラフィーにも難点がある。細胞の中は細胞質で満たされており、アクチンフィラメントなどの蛋白質と細胞質の密度差は極めて小さい。細胞間接着のような、細胞外の構造解析はうまくいく³⁾一方で、細胞内部の蛋白質構造解析はコントラストが低く、非常に困難である。そのため、アクチンフィラメント網可視化のためには非常に大きな10 μm 程度のデフォーカス(焦点外れ)をかけることが多い。デフォーカスが大きければ低分解能成分のシグナルが向上するため、フィラメントの存在が確認しやすくなるのである。しかし、その一方で大きなデフォーカスは分解能を失う。

3. 分解能とデフォーカス、アクチンフィラメント構造

アクチンフィラメントの分解能ごとの見え方を図2に示す。4.5 nm よりも分解能が悪くなると、アクチンフィラメントは急速に構造を失い、6 nm 分解能でほぼただの棒に見える。これは、アクチンフィラメント構造の強いシグナルが、この領域に集中しているからである(図5I)。したがって、5 nm 分解能付近のシグナルは非常に重要である。良く知られていることだが、電子顕微鏡像は、三次元物体の投影像に Contrast Transfer Function (CTF) という関数による変調がかかったものである。加速電圧300 kV の場合のCTF の例を図3Aに示す。CTF はデフォーカス量が大きいほど低分解能成分が大きくなり、コントラストが高くなるが、その分最初の零点も低分解能に寄るので、高分解能成分を失う(図3A)。5 nm 分解能付近で十分なシグナルを得るためには加速電圧300 kV の場合デフォーカス量8 μm 以下が望ましい。また、電子線トモグラフィーにおいては、試料を傾斜して撮影するので、場所によってデフォーカス量が異なる(図3B)。高傾斜時に端の部分でも8 μm 以下のデフォーカスを保つには、中心位置でのデフォーカス量は、視野の大きさにも依るが、6-7 μm 程度が望ましい。しかし、このデフォーカスでクライオ電子線トモグラフィーを行うと、細胞内アクチンフィラメントのコントラストはかなり低い。このため、原理的には可能であるにもかかわらず、クライオ法を用いた

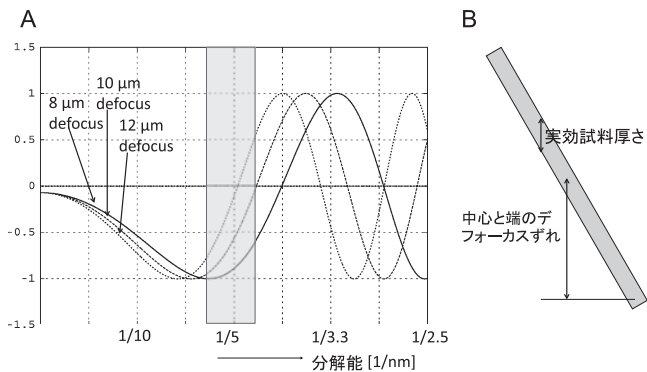


図3 A: デフォーカス量とCTFの関係。アクチンフィラメントの大きな構造因子が存在する分解能領域を灰色で示した。10 μm 以上のデフォーカスをかけると、最初の0点がこの分解能領域にかかる。B: 60度試料傾斜時の中心と端のデフォーカスずれと実効試料厚さ。傾斜角 θ 、非傾斜時の中心からの距離 d 、試料厚さ h とした場合、デフォーカスずれ量は $d\sin\theta$ 、実効試料厚さは $h/\cos\theta$ となる。もし、視野の中心から端までの距離が1 μm 、試料厚さ100 nmであれば、60度時の中心と端のデフォーカスずれ量は0.87 μm 、実効試料厚さは200 nmになる。

アクチンフィラメントの細胞内構造解析はほとんど進んでいない。

4. 負染色法とクライオ法

この状況のなかで、筆者の共同研究者であるオーストリアのJohn Victor Smallらは、細胞骨格を負染色によって観察する手法を確立した⁴⁾。細胞膜にグルタルアルデヒド存在下で、界面活性剤で細胞膜に穴をあけ、細胞骨格を保持しつつ細胞質をシリコタングステン酸と置換、乾燥する。この手法を用いると、クライオ法と比べてコントラストと電子線耐性が高くなり、アクチンフィラメント構造も良く保存された状態で観察することができる(図5, 7)。デフォーカスも5 μm 程度で十分である。その結果、クライオ法による電子線トモグラフィーよりも高い分解能情報を容易に得ることができる。残念ながら、細胞が薄いところでしか良い像質が得られるような染色ができないのだが、アクチンフィラメント構造はクライオ法に比べて遙かに良く見える。この手法と電子線トモグラフィーを組み合わせることによって初めて細胞内アクチンフィラメントの構造解析が可能になった。しかし、実際に構造解析をするためには、電子線トモグラフィーのミッシング領域による構造のひずみを理解する必要がある。

5. 電子線トモグラフィーとミッシング領域

電子顕微鏡写真には、CTFによるひずみ(図3A)が入っているが、CTFは関数形がわかっているために零点以外は補正可能である。ここでは単純に電子顕微鏡写真を試料密度の投影像とみなす。三次元物体のある投影方向に対する二次元投影像(一枚の電子顕微鏡写真に対応)のフーリエ変換は、三次元物体構造全体のフーリエ変換のなかの、投影方向を法線とし、原点を通る1平面上のデータと同じになる⁵⁾。これ

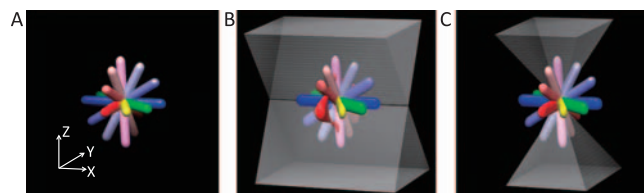


図4 ミッシング領域とシリンダのひずみ。A: ひずみのない状態の様々な方向へのシリンダ。グリッド平面をX-Y平面とする。B: ミッシングエッジによる、各シリンダのひずみ。逆空間におけるミッシングエッジ(傾斜軸はX軸)を重ねて表示した。逆空間の原点は、全てのシリンダが重なり合う点に合せている。傾斜軸に垂直でグリッド面に平行なフィラメント(赤)はひずみが非常に大きく、フィラメントの原型をとどめていない。C: ミッシングピラミッドによる各シリンダのひずみ。逆空間におけるミッシングピラミッド(傾斜軸はX軸とY軸)を重ねて表示した。Bのような大きなひずみはどの方向でも存在しない。

を中央断面定理と言う。従って、様々な投影方向の二次元投影像を集めると、三次元構造全体のフーリエ空間内の全てのデータを集めることができる。データが揃えば、逆フーリエ変換することで三次元像を再構築できる。これは、X線CTで用いられているのとまったく同じ原理である。

電子線トモグラフィーは、試料グリッドを傾斜させながら同一視野の多数の電子顕微鏡写真(=二次元投影像)を撮影することによって、三次元構造を計算する手法である。しかしながら、電子顕微鏡の場合グリッドの側面からの撮影は不可能であるので、撮影できる傾斜角に限りがある。その結果、逆空間の中で埋められないデータ領域が存在する。これがミッシング領域である。

一軸トモグラフィーと呼ばれる方法の場合には、電子顕微鏡の試料を一つの軸の周りに回転させることで傾斜する。その場合、たとえば試料傾斜角が ± 60 度であれば、データを持たない逆空間領域は図4Bのようになる。三角柱の原点側の頂角は(90-最大傾斜角)の2倍であり、最大傾斜角60度であれば頂角は60度である。この領域をミッシングウェッジ(missing wedge)と呼ぶ。データを持たない領域を小さくするためには、試料傾斜角を大きくとればよいが、試料傾斜角が大きいほど試料が電子線方向に対して厚くなり(図3B)、シグナルが弱くなる。このため、普通は ± 70 度程度が限界である。

一つの軸周りの傾斜像シリーズを撮影したあとに、一度目の軸とは垂直の傾斜軸で傾斜像シリーズを撮影することで、このミッシング領域は図4Cのように縮小される。この二つの傾斜像シリーズから三次元構造を計算する手法を二軸トモグラフィーと呼ぶ。二軸トモグラフィーの場合のミッシング領域はその形状からミッシングピラミッド(missing pyramid)と呼ばれる。

6. 一軸トモグラフィーと二軸トモグラフィー

一軸トモグラフィーは二軸トモグラフィーに比べて、像の

ひずみが大きくなる。このひずみがフィラメント像に与える影響を示したのが図4である。一軸トモグラフィーの場合は、傾斜軸に垂直でグリッド面に平行な方向のフィラメント像がまったく原型をとどめていない(図4B)。一方で二軸トモグラフィーの場合は、どの方向もフィラメントが見えなくなることはない(図4C)。細胞骨格の構造解析を行う場合、一軸トモグラフィーでは、フィラメントの方向によって見えないものが存在するので、解釈に危険が伴う。出来る限り二軸トモグラフィーを用いるべきである。

7. アクチンフィラメントの切り出しと、二軸トモグラフィー時のフィラメントのひずみ

二軸トモグラフィーを負染色細胞に対して適用した例が、図5である。この中のアクチンフィラメント構造を解析するためには、まず一本一本のアクチンフィラメント三次元像をトモグラムから切り出さなくてはならない。まず、肉眼でおおまかなトレースを行い(図5A)、周辺を切り出す(図5B)。そのあとフィラメントの直径にあわせたシリンダ像(図5C)をフィッティングすることで、トレースを精密化する(図5D)。このトレースをもとに、曲がり補正をしたフィラメント三次元像を切り出す(図5E)。

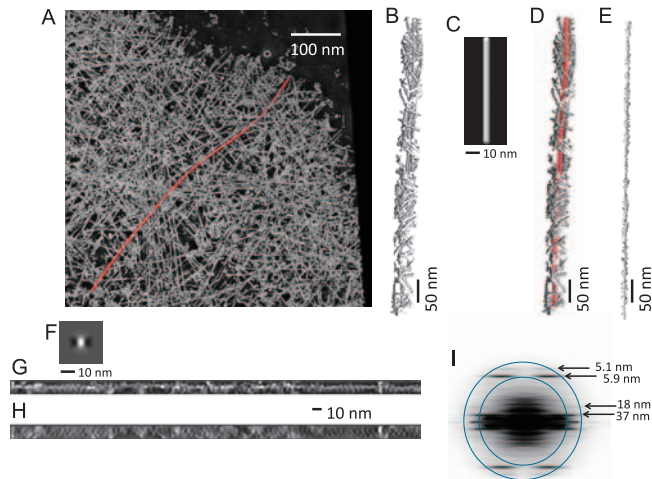


図5 負染色電子線トモグラムの解析。文献6)より一部改変して引用。A:負染色電子線トモグラムの一例。この中からフィラメントを手動でトラックする(赤チューブ)。B:トラックしたフィラメントの周辺を切り出す。C:Bにフィットするためのシリンダ。D:CをBにフィットすることによって、精密なトラッキングを行う(赤チューブ)。E:Dのトラッキング情報に基づいて、フィラメントの曲がり補正を行った結果。F:Eのフィラメント軸への投影像。横軸方向がグリッド面。ミッシングピラミッドの影響で縦に伸びて見える。G:Eのフィラメント軸を含み、グリッド面への傾斜角が最も小さい平面への投影像。H:Eのグリッド面に対して垂直な平面への投影像。I:Gの投影像のフーリエ像を57本分集め、平均化した像。アクチンフィラメント構造において最も強い4本の層線(矢印)がはっきり見える。それに4.5 nm分解能(外側)と6.0 nm分解能(内側)を示す円を重ねた。この二つの円の間5.1 nm, 5.9 nm, 18 nm層線のシグナルの主要部が存在する。

これを解析するわけだが、二軸トモグラフィーの場合でも、ミッシング領域の影響は無視できない。フィラメントが見えなくなることは無いが、グリッドと垂直な方向のデータは欠けており、蛋白質構造としてのひずみが存在する。フィラメント三次元像(図5E)のフィラメント軸方向への投影像を見ると、本来円盤状になるはずの密度が縦に引き延ばされたようになっている(図5F)。これはグリッドに垂直方向の情報が見失われているからである。より顕著なのは、グリッドに垂直な平面への投影像である(図5H)。グリッド面に近い平面への投影像(図5G)では、はっきりとフィラメント構造が観察されるのに対して、図5Hではどこにフィラメントがあるのかさえわからない。三次元像のままこのひずみの影響を考慮しつつ解析するのは、可能ではあるが非常に大きな計算能力を必要とする。

8. 切り出した三次元フィラメント像の投影像を解析することで、ミッシング領域を回避

このミッシング領域の影響を回避する最も簡単な方法は、ミッシング領域が存在しないデータ領域を使って解析することである。図5Gで見たように、うまく投影方向を選んで、ひずみの少ない二次元像を得ることで、それを実現できる場合がある。二軸トモグラフィーの場合のミッシングピラミッドと投影方向の関係をシミュレートしたのが、図6である。フィラメント軸の方向がミッシングピラミッド内に存在しない場合(図6A)、フィラメント軸を含み、グリッド平面に対する傾斜角が最も小さい平面に対する投影像を計算する(図6B)ことで、ミッシングピラミッドの影響を受けない二次元像を得ることができる(図6C)。こうして得られた二次元像には、通常の単粒子解析で用いる三次元構造解析、フィ

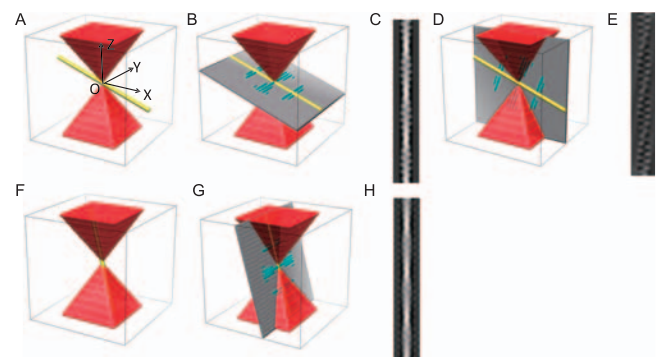


図6 ミッシングピラミッドとアクチンフィラメントの投影像。文献6)より一部改変して引用。グリッド平面をX-Y平面とし、ミッシングピラミッドを赤、フィラメント軸方向を黄色で表した。B, E, Gにおいては、それぞれ投影像C, E, Hに対応する逆空間内の平面を灰色で示し、平面上には図5Iで示したアクチンフィラメントの主要なシグナルを水色で表現した。Cはフィラメント軸方向がミッシングピラミッド外にある場合の、フィラメント軸を含み、もっともグリッド平面への傾斜角が小さい平面への投影像。Eは同じフィラメントのグリッドに垂直な平面への投影像、Hはフィラメント軸方向がミッシングピラミッド内にある場合のCと同じ条件の投影像である。

ラメント極性決定などの手法を用いることが十分可能である。もし、グリッド面に垂直な平面への投影像を計算してしまると (図 6D), ほとんどフィラメントは見えない (図 6E) のは, 図 5H ですでに見た通りである。

ただし, フィラメント軸方向がミッシングピラミッドの中にある場合 (図 6F) には同じように投影像を計算すると, ミッシングピラミッドの影響を受けて (図 6G) 変形してしまう (図 6H)。このような場合は, 投影像を作らず, 三次元構造のまま解析する必要がある。今まで解析してきた細胞の薄い部分についてはこのようなグリッド面に対して大きな角度を持つフィラメントは観察されていないが, 将来そのようなフィラメントを解析するにはさらなる技術開発が必要だろう。

9. フィラメント極性の決定と分岐構造の平均化

さて, 実際に負染色トモグラムからアクチンフィラメントの一部を切り出して, 通常の単粒子解析を用いてフィラメント極性解析を行った例を図 7 に示す⁶⁾。フィラメントの B 端は細胞膜の方向に向いているのが確認でき, ミオシンをアクチンに結合させなくても, フィラメントの極性を決めることができているのがわかる。また, 黄色で示したのは, アクチンフィラメントの分岐構造で, Arp2/3 複合体由来の分岐角度と一致する⁷⁾。また, 分岐角度と各フィラメントの極性も矛盾しない。

この分岐構造を三次元的に平均化することもできる⁸⁾。分岐構造周辺の三次元像を切り出し, 図 8A のようなシリンダを分岐させた構造を初期構造モデルとしてフィッティング (図 8B), フィッティングに基づいて平均化 (図 8C) し, それをモデルとして収束するまで繰り返すことによって, 最終構造を得る (図 8D)。最終構造の分解能は 2.9 nm で, アクチンフィラメント構造モデルと Arp2/3 複合体構造モデルが良くフィットする。

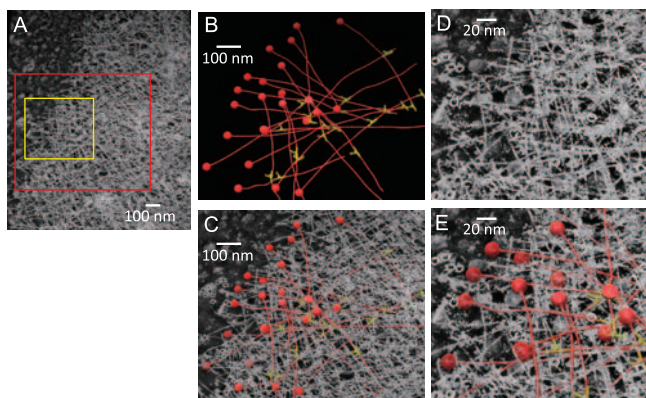


図 7 A: 培養細胞 NIH3T3 の葉状仮足の負染色トモグラム⁶⁾。赤い四角は B, C, 黄色い四角は D, E で表示している領域を示す。B: アクチンフィラメントのトレース (赤) と, 分岐構造 (黄色) の位置。各フィラメントの B 端は赤い球で示した。C: B とトモグラムを重ねて表示。D: トモグラムの拡大像。E: D に B を重ねて表示。

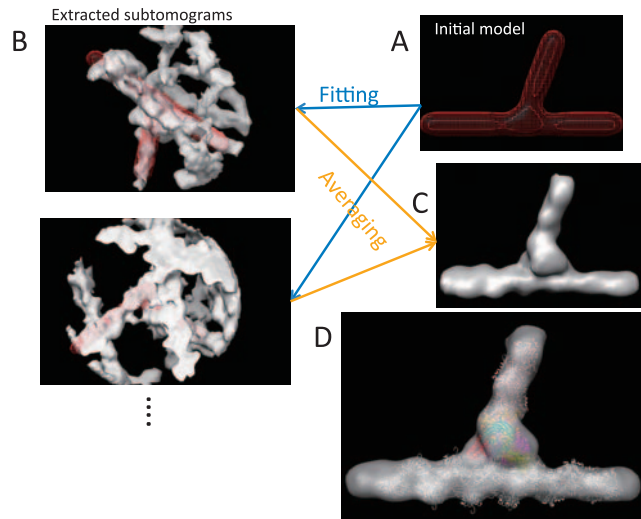


図 8 アクチンフィラメント分岐構造の平均化⁸⁾。A: 初期構造モデル。B, C 切り出してきた分岐構造周辺像。これに A をフィッティングした結果を赤で示す。C: フィッティングに基づいて平均化する。D: 最終構造と, 最終構造に当てはめた原子座標モデル。654 の分岐構造を平均化した。

10. 利点と欠点, まとめ

前項で示したように, 負染色細胞トモグラフィーと私たちの画像解析の組み合わせは 3 nm を超える分解能で細胞内分子構造を解析でき, 原子座標モデルをフィットするのに十分な構造情報を得ることができる非常に有用な方法である。これを用いることで, 細胞内アクチンフィラメントの極性決定や, アクチンフィラメント結合蛋白質の分布決定が, 抗体やミオシンを使わず, 電子線トモグラムが持つ構造情報だけを用いて可能になる。しかし, 残念ながら以下の大きな欠点がある。1: 界面活性剤で膜を溶かしてしまうため, 細胞膜とアクチンフィラメントが結合する様子がわからない。2: きれいに観察できるのは, 細胞の薄いところだけ。厚いところはそもそも電子線を通らないので, きれいに染色できているかどうかもわからない。3: 電子顕微鏡法に共通のことであるが, 蛋白質の形にはっきりした特徴が無いと, そこに蛋白質があることはわかっていても, それが何であるかを同定するのが非常に難しい。これらを乗り越えるには, 他の様々な手法と組み合わせる必要がある。たとえば, 細胞膜とアクチンフィラメントの結合部位を観察するためには, 超音波によって基質側の細胞膜とそこに結合した細胞骨格以外を飛ばすアンルーフィング (unroofing) と, 負染色を組み合わせることで解決できるかもしれない。細胞の厚いところを観察するためには, 超高圧電子顕微鏡を用いることが一つの解になるだろう。蛋白質の同定については, 蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で同視野観察する相関顕微鏡法 (correlative microscopy) がある程度役に立つ。最近 FEI から発売された, TEM の中に蛍光顕微鏡を入れて同視野観察する装置や, 現在臼倉治郎教授が中心に, 私たちも開発に参加している STEM, SEM と蛍光顕微鏡を組み合わせた装置によって, より簡単に相関電子顕微

鏡法ができるようになれば、大いに有効であろう。これらの他の技術との組み合わせを用いることにより、対象を広げていくことができれば、本項で紹介した技術はアクチンフィラメントをはじめとする線維状蛋白質複合体の細胞内構造を解析するための必要不可欠なツールになると期待している。

文 献

- 1) Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G. and Baumeister, W.: *Science*, **298**, 1209–1213 (2002)
- 2) Ishikawa, H., Bischoff, R. and Holtzer, H.: *J. Cell Biol.*, **43**, 312–328 (1969)
- 3) Al-Amoudi, A., Diez, D.C., Betts, M.J. and Frangakis, A.S.: *Nature*, **450**, 832–837 (2007)
- 4) Urban, E., Jacob, S., Nemethova, M., Resch, G.P. and Small, J.V.: *Nat. Cell Biol.*, **12**, 429–435 (2010)
- 5) 河田 聡, 南 茂夫: 科学技術計測のための画像データ処理, CQ出版, 東京 (1994)
- 6) Narita, A., Mueller, J., Urban, E., Vinzenz, M., Small, J.V. and Maeda, Y.: *J. Mol. Biol.*, **419**, 359–368 (2012)
- 7) Rouiller, I., Xu, X.P., Amann, K.J., Egile, C., Nickell, S., Nicastro, D., Li, R., Pollard, T.D., Volkman, N. and Hanein, D.: *J. Cell Biol.*, **180**, 887–895 (2008)
- 8) Vinzenz, M., Nemethova, M., Schur, F., Mueller, J., Narita, A., Urban, E., Winkler, C., Schmeiser, C., Koestler, S.A., Rottner, K., Resch, G.P., Maeda, Y. and Small, J.V.: *J. Cell Sci.*, **125**, 2775–2785 (2012)