



## SDS 処理凍結割断レプリカ免疫標識法の神経組織への応用

### Application of SDS-digested Freeze-fracture Replica Labeling for Molecular Localization in Neural Tissues

深澤 有 吾, 重 本 隆 一

Yugo Fukazawa and Ryuichi Shigemoto

<sup>a</sup>生理学研究所・脳形態解析部門

**要 旨** 細胞膜上の機能ドメインを構造と分子局在の両面から理解することが、細胞間情報伝達の分子機構の理解に必要である。SDS 処理凍結割断レプリカ標識法は細胞膜の微細構造と分子分布を高解像度で定量的に観察できる方法だが、種々の細胞が混在する生体組織に適用するには技術的な改良が必要であった。そこで本稿では脳組織に適用するために我々が行った工夫について解説した。この方法に取り組む方々の一助になれば幸いである。

キーワード：凍結割断レプリカ、高圧凍結、分子局在、免疫標識、細胞膜

#### 1. はじめに

多細胞生物は機能的に特殊化した細胞により構成されている。それぞれの細胞は全ての細胞が共通に持つ基本構造に加えて、それぞれ固有の機能を果たす上で必須な細胞形態や細胞内小器官を発達させていることが光学顕微鏡や電子顕微鏡を駆使して見事に明らかにされてきた。一方、近年の生化学的解析や分子生物学的解析によって細胞の固有機能を担う分子の基盤が明らかにされつつあり、これら機能分子が細胞構造上のどこに、いつ、どれだけ発現しているのかを明らかにし、機能や反応との相関をとり、更には因果関係を明らかにすることが生命現象のより深い理解へ向けた次のステップだと考えられる。このためには電子顕微鏡を用いた分子局在解析がもっとも解像度が高く、各機能分子の微細構造上の分布解析に適している。しかし、現在広く用いられている超薄切片を用いた免疫電子顕微鏡法（包埋前標識法と包埋後標識法）は必ずしも万能ではない。包埋前標識法は、組織切片の表面からの距離に依存してシグナルが減弱し、また、我々が主に研究対象としている神経シナプスのようにタンパク質が

密に集積した部位では、分子複合体の中に目的分子が存在し抗原露出が少ない、或いは、抗体の浸透が悪いなどの理由でシグナルが得られないことが多く、目的分子の分布を細胞全体に亘って定量的に解析することは難しい。一方、包埋後標識法はタンパク質が密に集積した部位でもシグナルが得られるが、抗体が適用できる確率が低く、出来ても感度が低い、試料間で結果が安定しないなど、再現性の高い結果を得ることが難しい<sup>1)</sup>。また、これら超薄切片を用いた標識法では膜タンパク質に対する標識が細胞の断面像の上に観察されるので、目的分子の細胞膜上分布を2次的に解析することや細胞膜上分子と細胞内膜上分子の標識を明瞭に区別しながら解析することが難しいなどの問題もある。

そこで我々は細胞膜上に発現している分子を選択的に、また、より定量的に電子顕微鏡レベルで解析できる方法として、故・藤本和博士が発明された SDS 処理凍結割断レプリカ標識法 (SDS-digested freeze-fracture replica labeling 法, 以下 SDS-FRL 法)<sup>2)</sup> に着目し、SDS-FRL 法を神経組織に応用できるように最適化してきた。既に、SDS-FRL 法が既存法の欠点を補完し、より定量的な分子局在情報が得られることを示している<sup>3-5)</sup>。そこで本稿では、SDS-FRL 法の原理や利点と欠点、また、現在我々がやっている神経組織を用いた解析プロトコールや留意点について解説する。

#### 2. SDS-FRL 法の原理

SDS-FRL 法は、既に各分野で頻繁に用いられてきた凍結割断レプリカ法と SDS 処理によるタンパク質可溶化と変性、そして免疫金標識法の3つを組み合わせた方法である(図1)。凍結割断レプリカ法の原理は、凍結組織中では脂質2重膜の疎水結合面が最も結合力が弱く、割断時に頻繁にこの疎水性面で脂質2重膜が剥離され、細胞膜内面が露出されることによる。この際、細胞外側の膜内面 (exoplasmic face, E-face) 或いは、細胞内側の膜内面 (protoplasmic face, P-face) の2面が露出し、脂質膜に発現していた分子はどちらかの膜に分配される。SDS-FRL 法では分子をレプリカ膜に均一に固定化する目的で薄い炭素膜 (~5 nm) を蒸着する。次にプラチナを角度を付けて蒸着し、膜の凹凸や膜タンパク質が膜面から突出した部分を陰影付け、その後、さらに炭素膜を蒸着して膜全体を補強する。この一連の処理により割断表面に露出した単層の脂質膜とそこに存在するタンパク質が固定化され、免疫標識工程に十分に耐えられる強度のレプリカ膜を作製する<sup>6)</sup>。レプリカ膜作製後は、生化学的解析で頻繁に用いられるイオン性界面活性剤 SDS で処理し、固定化されなかった生体分子を除去する。固定化された分子も SDS 化による変性を受ける。この SDS 化によりレプリカ膜はまるで電子顕微鏡で微細形態が観察可能なウェスタンブロット膜のような状態となるので、この後に免疫金標識2次抗体を用いた免疫標識を行えば、目的分子の生体膜上局在を電子顕微鏡レベルで2次的に可視化し、免疫金標識の分布を定量的に解析できる。

<sup>a</sup> 〒 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: yugo@nips.ac.jp  
2008年3月28日受付

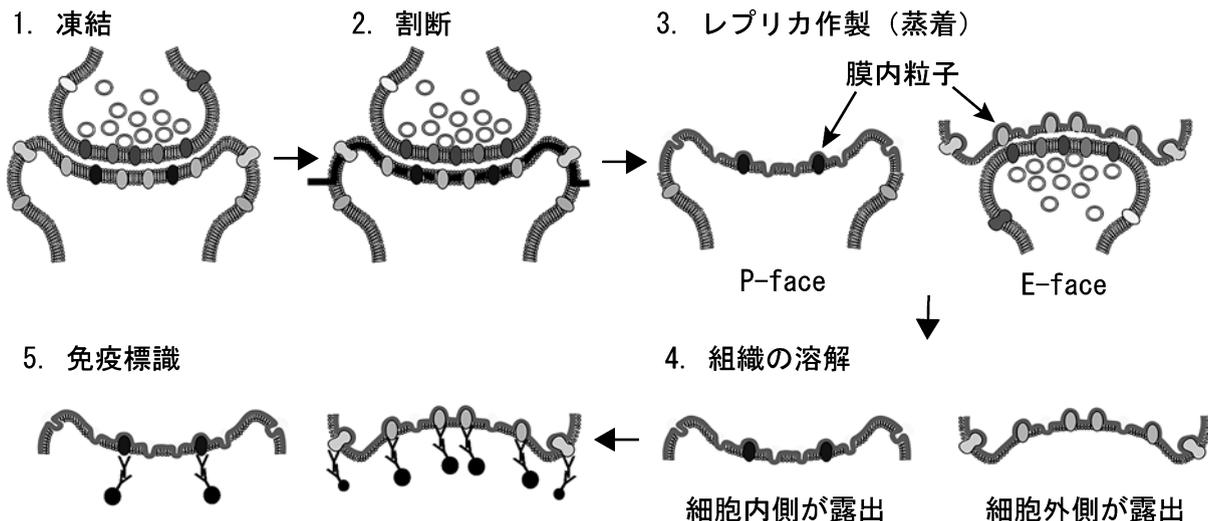


図1 SDS-FRL法の原理

固定、或いは無固定の組織を急速凍結し(1)、低温下で切断すると脂質2重膜の疎水性面で頻りに切断が起こる(2、太線)。切断により暴露された膜内面に薄い炭素膜を蒸着後、プラチナを蒸着して膜の凹凸情報を可視化し、最後に炭素を蒸着しレプリカ膜を作製する(3)。SDS溶液中で組織を溶解除去した後(4)、免疫金標識抗体を用いて目的分子を標識し(5)、電子顕微鏡下で金標識の分布を観察する。P-faceに分配された目的分子は、細胞内ドメインを認識する抗体で、E-faceに分配された目的分子は、細胞外ドメインを認識する抗体でのみ検出可能である。

### 3. SDS-FRL法の利点と欠点

SDS-FRL法の利点は、なんと言っても細胞膜下構造にかかわらず標的膜分子を均一に検出し、その分布を2次的に可視化できる点にある。既存の免疫電子顕微鏡法の場合、目的分子周囲の環境や抗原部位の他分子との結合状態が抗体の浸透に影響するが、SDS-FRL法の場合、SDS処理による非固定化分子の除去により、目的分子の抗原部位が均一に露出される。それ故、高い検出効率と高い定量性の両方が可能となる。また、細胞膜に発現した分子を細胞内膜系に発現している分子と分けて解析できる点、シナプス前と後の細胞膜のように互いに近接した細胞膜上に発現する分子を明瞭に区別して解析できる点が挙げられる。その他にも、複数の分子種の細胞膜上の共存関係を2次的に可視化することもできる。

一方、欠点としては、脳のように複雑な組織構造を持つ組織の場合、レプリカ像の解釈、特に個々の膜面断片が、興奮性神経細胞、抑制性神経細胞やグリア細胞などどの細胞なのか、どのシナプス結合なのか、また、樹状突起上の位置や軸索起始部、シナプスの膜特化領域など、どの細胞膜上の機能ドメインなのか、と言ったそれぞれの膜面の由来を形態から判断しにくいことが挙げられる。また、切断には厚みが無く、さらに目的構造を選択的に切断することが出来ないため、厚い組織スライスを用いても目的細胞や目的構造のレプリカ膜を効率よく集めることが難しく、また、目的の構造が部分的にしか複製されないことも多々ある。そのため、SDS-FRL法を神経組織へ応用するために行った工夫は、「1枚の凍結組織から確実に可能な限り多くの情報を得るための工夫」と言える。

### 4. 脳スライス用のSDS-FRLプロトコール

我々が行っている標準的なプロトコールを表1にまとめた。レプリカ作製を除き、その他のプロトコールはどの研究室でも容易に行えることが分かると思う。レプリカ像を正確に解釈し、正確な解析をするために、組織構造が電子顕微鏡下で容易に判別できるスライスのトリミングを行い、最終的に電子顕微鏡グリッドにマウントするまで組織構造情報を保つよう、細心の注意を払って各操作を行う。

無固定脳からのスライスも使用するが、固定脳に比べて一頭体から得られるスライスの数が限られ結果の再現性も低いので、殆どの場合パラホルムアルデヒドで弱めに固定した脳を用いている。スライス培養や電気生理学的実験に用いた後の急性脳スライスも同様な方法で解析可能である。その際は試料キャリアーに挟むスペーサーをスライスの厚みに合わせる必要が有る。

作製したレプリカ膜の形を最後まで保つために、スタラーによる攪拌や激しい振とうは行わない。60 rpmでレプリカ膜が溶液中で揺れるくらいの振とうで十分に均一な組織の可溶化や抗体反応が行える。また、レプリカ膜は反応や移動の際に染色皿や白金線に付着し、これを解離させる際にもっとも損傷しやすい。そこで付着防止のために全ての溶液に低濃度のウシ血清アルブミンを添加している。

標的細胞の細胞膜上に発現しているマーカータンパク質が判明している場合には多重染色を行う。その場合、定量解析する分子に対する1次抗体反応を先に行い、その後、マーカー分子に対する1次抗体を反応し、2次抗体反応も段階的に行う。この2次抗体は大ききの異なる金標識が付いたものを用い顕微鏡下で区別できるようにしている(図2)。

組織スライスの作製

- 未固定脳、或いは、パラフォルムアルデヒド (0.5, 2, 4%) で灌流固定した脳を摘出し、70–150  $\mu\text{m}$  厚のスライスを作製する。
- 1.5 ミリ大にトリミングし、固定脳スライスの場合は 30% グリセリン–0.1 M リン酸緩衝液に 4°C で一晩浸漬する。

高圧凍結

- 高圧凍結装置 (HPM010) を用いて、銅、或いは、金キャリアーに銲んだスライスを凍結する。この際、市販の事務用両面テープをドーナツ状に挟みスペーサーとして使用し、トリミングした組織は中央の穴に入れて凍結する。
- 凍結した試料は液体窒素中に保存する。

レプリカ作製

- 凍結切断レプリカ作製装置 (BAF060) に双面レプリカテーブルにセットした凍結試料を装着し、–110 から –120°C に試料温度を安定させる。凍結組織を割断したら、
- 第 1 層：炭素を 90 度から回転蒸着 (0.3 nm/sec 以下の蒸着速度で 5 nm)
- 第 2 層：プラチナを 60 度から一方向蒸着 (1 nm/sec 以下で 2 nm)
- 第 3 層：炭素を 90 度から回転蒸着 (15 nm)

SDS 処理による非固定化組織の溶解除去

- 組織付きレプリカ膜を SDS 溶液 (2.5% SDS, 20% sucrose, 15 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.3) に移し、80°C で 18 時間振とうする。

免疫反応

- SDS 溶液で 1 回洗浄する。
- 洗浄緩衝液 (0.1% Tween-20, 0.05% BSA, 0.05%  $\text{Na}_3\text{N}$ , 25 mM Tris-HCl buffered saline, pH 7.2) で 3 回洗浄する。
- ブロッキング液 (洗浄液に BSA を加え最終 5% 濃度にしたもの) で室温 1 時間処理する。
- 1 次抗体反応：1 次抗体を BSA を 1% 含む洗浄液 (1–5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30  $\mu\text{l}$ ) に希釈した溶液中で、15°C で 1 晩以上振とうする。
- 洗浄緩衝液で 3 回洗浄する。
- ブロッキング液で室温 30 分処理する。
- 2 次抗体反応：金コロイド標識 2 次抗体をブロッキング液に希釈し (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30  $\mu\text{l}$ )、15°C で 1 晩以上振とうする。
- 洗浄緩衝液で 3 回洗浄する。
- 純水で 1 回洗浄：この時、白金線を用いてレプリカ膜を水面に展開する。
- パイオロフォルム膜やホルムバル膜を張った電子顕微鏡用グリッドにマウントする。

電子顕微鏡観察

## 5. 脳スライス用の工夫点や実験機器等

凍結切断レプリカが作製できれば SDS-FRL 法は可能である。しかし、実験結果の精度と再現性の向上、レプリカ像の解釈を容易にするために以下の実験機器で行っている。主要な装置とその理由を示す。

## 5.1 高圧凍結 (HPM010, BAL-TEC 社製)

一つの凍結組織からより多くの情報を得るために後述する双面レプリカを作製するが、そのためには比較的良好な凍結状態を組織切片の深部まで均一に得る必要があり、この点で高圧凍結法が最も適している。また、組織のオリエンテーションが判別し易く、また、比較対象領域が含まれるレプリカ膜を作製できるように、最大で直径 2 ミリの組織が凍結できる大きな試料キャリアーを使用している。

## 5.2 双面レプリカ作製用試料台

凍結切断レプリカで最も頻りに用いられる割断法はナイフによる割断であるが、この方法では個々の脂質 2 重膜の片側からしか観察試料が得られない。このため同時に解析できる分子が限られ、また、観察対象を同定するのに十分な情報が得られないことがある。そこで我々は 1 枚の凍結組織から

補な面を持つ 2 枚のレプリカ膜が作製できる双面レプリカ法を用いている。この方法では凍結組織を引き裂くことで割断するので組織中のどの部位で割断するかは調節できないが、一つの細胞膜から相補的な P、E 両面のレプリカ膜が容易に得られ、単一細胞膜からより多くの形態情報や分子局在情報が得られる (図 2)。我々は頻りに、片方を目的分子の標識用に、もう片方を細胞種や膜ドメインの同定用に用いている。

## 5.3 凍結切断レプリカ作製装置 (BAF060, BAL-TEC 社製)

定量的な分子局在解析を行うためには、分子標識が再現性良く得られるレプリカ膜が安定に作製できる実験基盤が必要である。凍結切断を再現性良く行い、脂質 2 重膜上の分子をレプリカ膜上に均一に固定化するためには、割断温度と炭素膜の蒸着速度を一定に保つことが重要であると我々は考えている (表参照)。そのため試料温度と蒸着速度がモニターできるようにレプリカ作製装置を改造している。特に樹状突起や絨毛のような小さい突起状膜構造からレプリカ膜を作製する際には、–115°C 前後の高い温度で割断を行うと割断面が比較的良好に細胞膜に沿うので実験上都合が良い。しかし、この温度域の直上では氷の昇昇速度が急激に増加し、また、急

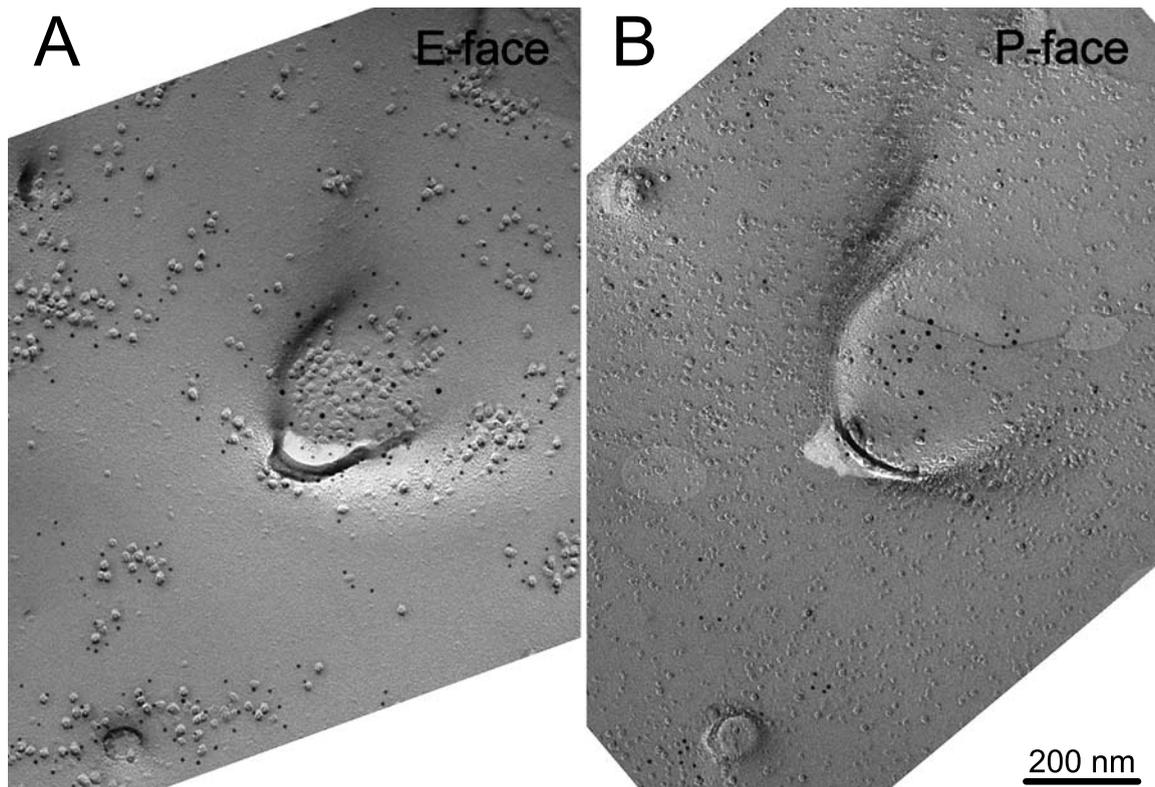


図2 2重免疫金標識した双面レプリカ像

グルタミン酸受容体標識を相補な2枚のレプリカ膜(A, E-face, B, P-face)で比較した。ラット海馬CA1領域錐体細胞の樹状突起。A) AMPA型グルタミン酸受容体の全てのサブユニットを認識する抗体の免疫金標識(5 nm)と、NMDA受容体サブユニット1(NR1)の免疫金標識(10 nm)。どちらも細胞外ドメインを認識する抗体を使用。B) AMPA型グルタミン酸受容体GluR2/3サブユニットの細胞内アミノ酸配列に対する免疫金標識(5 nm)。シナプス後足場タンパク質PSD-95の免疫金標識(10 nm)を用いてシナプス後膜特化領域を同定した。NMDA受容体はシナプスに局限して発現しているが、AMPA受容体はシナプス外にも多く発現していることが分かる。

速な炭素の蒸着は昇華を加速してしまう。レプリカ膜作製時に昇華が激しく起きた時のレプリカ膜には膜面上分子の周囲や膜面周囲に水分子の再凝縮が起きることがあり、これが免疫標識の低下や非特異反応の増加に繋がるので、適切な試料温度を保ち氷の昇華を抑えながら一定の速度以下で炭素を蒸着する必要がある。

#### 5.4 インキュベーター

標識結果の再現性を確保するためのもう一つの重要な実験基盤は、免疫標識過程の再現性である。そのためにはSDS化と免疫金標識を均一且つ安定に行えるよう、温度と時間を一定に保ち、且つ、レプリカ膜を常に適度に振とうすることが重要である。そこで温度と振とう条件が正確に制御できるハイブリダイゼーションオープンを使用している。

#### 5.5 試料傾斜可能な試料ホルダーを実装した透過型電子顕微鏡(Tecnai10, FEI)

細胞膜は立体的な細胞構造物なので、透過型電子顕微鏡下で観察する際に、個々の膜の凹凸に合わせて観察対象が最も広く投影されるように傾斜させないと面積の誤差が大きくなってしまふ。また、レプリカ像と標識の分布をより正確に解析したり、レプリカ膜に対する非特異的な標識の有無を判

断する上でも、ステレオ像を観察することが有効である(図3)。これらの理由から観察試料を最低 $\pm 45^\circ$ 傾斜できる試料ホルダーが必要である。

## 6. その他の留意点

### 6.1 特異的標識の評価

電子顕微鏡下で観察している標識が、どの程度目的分子の分布を示しているのかを知ることは、他の免疫標識実験と同様SDS-FRL法でも重要である。上記のプロトコールを1次抗体を抜いて実施した場合、レプリカ上に金標識は殆ど残らない。それでも使用する1次抗体の種類と濃度によっては、非特異的標識が無視できない場合もあり、特異的標識と非特異的標識の比較を行う必要がある。我々の研究室では目的分子の遺伝子欠損マウスから作製したレプリカ膜を用いたり、目的分子を発現していない細胞や脳領域から作製したレプリカ膜を用いて、目的分子に対する特異的標識とそれ以外の標識との割合を評価している。また、用いた抗体が認識する抗原部位とは反対の膜内面の標識(細胞外ドメインに対する抗体ならP-faceの標識、細胞内ドメインならばE-faceの標識)を検討することも有効と考えられる。

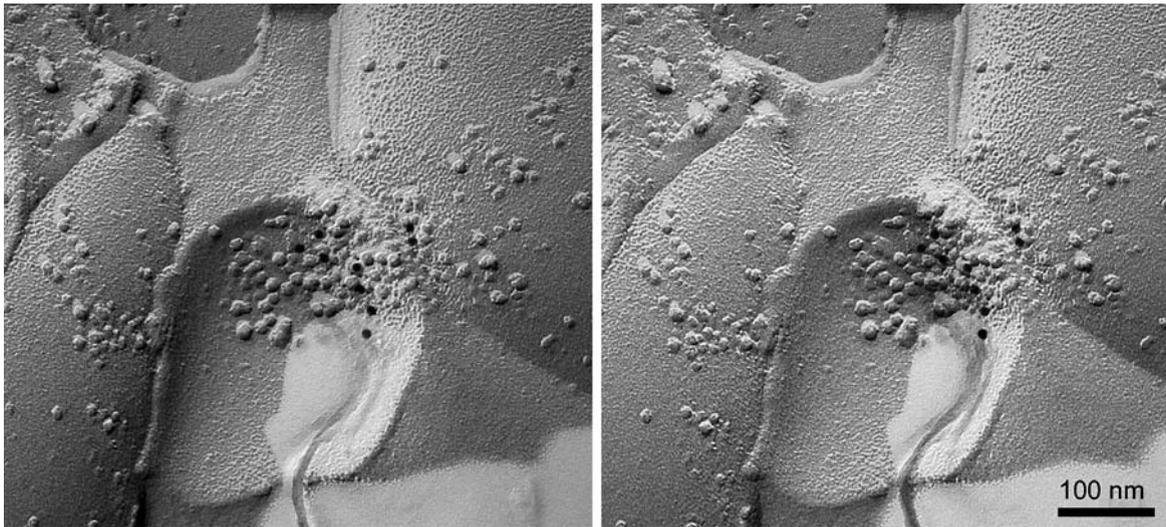


図3 免疫金標識したレプリカ膜の電子顕微鏡ステレオ像  
 ラット海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起上シナプス. NMDA 受容体サブユニット (NR1) 標識 (10 nm). ステレオ像を観察するとレプリカ膜が立体的であることが分かる. 全ての標識金粒子がレプリカ膜の後ろに見える. レプリカ膜に対する非特異的標識がある場合はレプリカ膜の手前に標識が見える.

## 6.2 膜上分子の割断時の分配について

各膜貫通分子が脂質 2 重膜の割断時にどの様に外側と内側の脂質膜に分配されるかについてはまだ良く分かっていない. SDS-FRL 法は原理的にイムノブロット法に近いが, 目的分子がどちらの膜に分配されるかにより露出される抗原部位が異なることに注意する必要がある (図 1). 新規の目的分子を解析する場合は, 細胞内と細胞外の抗原部位を認識する抗体をそれぞれ用意し, 特異的標識が多く得られる抗体で解析を行っている.

## 6.3 多重染色

複数の目的分子が特に狭い膜領域に集積している場合, 標識に用いる抗体の立体障害の影響を無視できない. そこで定量的な分子局在解析は 1 レプリカにつき 1 種類と考えた方がよい. 定量したい目的分子の標識を先に行い, その後, マーカー分子などの標識を行うことで目的分子の標識の定量性を確保できる.

## 7. おわりに

本稿ではより多くの研究者に SDS-FRL 法の原理と実際の実験過程を理解して頂くことを目的に, 脳スライスで実験を行う上でポイントとなることを中心に記述した. 実際の研究例については, これまでに報告した研究論文<sup>3~5)</sup>や他の技術解析書<sup>7~9)</sup>を参照して頂きたい. 凍結割断レプリカ法は 1960 年代に発明され, 日本の多くの研究機関でも導入されたが現在では形態学領域での使用は少ない. これは組織レプリカ像の解釈の困難さが原因の一つと考えられるが, SDS-

FRL 法を用いることで観察対象の同定が容易になり, 像の解釈を正確に行えるようになった. 現時点ではまだまだ改良の余地が残され, 対象とする分子に合わせて工夫する必要があるが, 空間解像度と緻密な分子定量が網羅的にできる点で電子顕微鏡レベルの分子局在解析技術は必須である. この方法がそれぞれの研究目的に合わせてさらに改良され, 多岐に亘る研究テーマに適用できる方法になることを期待している.

## 文 献

- 1) Masugi-Tokita, M. and Shigemoto, R.: *Current Opinion in Neurobiol.*, 17, 387-393 (2007)
- 2) Fujimoto, K.: *J. Cell Sci.*, 108, 3443-3449 (1995)
- 3) Tanaka, J., Matsuzaki, M., Tarusawa, E., et al.: *J Neurosci.*, 25, 799-807 (2005)
- 4) Hagiwara, A., Fukazawa, Y., Deguchi-Tawarada, M., et al.: *J Comp. Neurol.*, 489, 195-216 (2005)
- 5) Kulik, A., Vida, I., Fukazawa, Y., et al.: *J Neurosci.*, 26, 4289-4297 (2006)
- 6) Fujita, A. and Fujimoto T.: *Histochem. Cell Biol.*, 128, 385-389 (2007)
- 7) Severs, N.J. and Shotton, D.M. (ed): *Rapid freezing, freeze fracture, and deep etching*, Wiley-Liss, New York (1995)
- 8) 重本隆一, 深澤有吾: *生体の科学*, 57, 273-280 (2006)
- 9) Fukazawa, Y., Masugi-Tokita, M., Tarusawa, E., et al.: in "Modern Cryo-preparation Methods for Transmission Electron Microscopy." CRC press (in press)