特集:観て考える、考えて観る―細胞内オルガネラの空間構造変化

電子顕微鏡による膜細胞骨格の空間構造解析

臼 倉 治 郎

細胞内のタンパク質は必要な時合目的に複合体を形成し、多様な機能を発揮する.すな わち時空間的な局在性(場所特異性)を形成すると考えられる.これを検証するには細胞 内において分子レベルで構成要素を同定し、タンパク質相互の動的空間構造を明らかにす る必要がある.ここでは、unroofing 法と免疫標識を併用した新世代のフリーズエッチン グレプリカ法とクライオ電顕による膜細胞骨格(細胞膜裏打ち構造)を解説する.また、 これらの結果からアクチン結合タンパク質(ここでは IQGAP1 について)は全てのアク チンに等しく結合するのではなく場所特異性があることを示唆する.

形態学の役割は時代とともに変化している. 電子顕微鏡 の黎明期では細胞内を観察し記載すれば研究になったが, 現在では勿論電子顕微鏡で細胞を見ただけでは研究は成り 立たない. 生化学, 分子生物学の発展で生物学もタンパク 質や核酸などのモノを基盤とする学問へと衣替えをした. しかしながら、見ることの重要さは少しも変わっていな い.むしろモノと形態を結びつける必要性が増加してい る.より小さなものを正確に記載するためにタンパク質の 結晶回折を中心に据えた構造生物学という分野が新たに生 まれ、一方では生理現象を視覚化することを目的としてバ イオイメージングが生まれ、電子顕微鏡形態学も新たな展 開期を迎えている.分子生物学のメインイベントであった ヒト遺伝子の解読がおわり、取りあえず、私たちの体を構 成する物質が何であるかが分った.しかし、生命の場であ る細胞に戻って考えるとこれら既知の物質をどこにどのよ うに当てはめたらよいか分らない. 例えばアクチン結合能 があると予測されているタンパク質はおよそ 240 種類ほど 知られており、哺乳類の細胞内にはその半分ほどが常に存 在すると思われるが、これら全てが常時結合しているとは 考えにくい. 電子顕微鏡下ではアクチン線維は 7nm の太

名古屋大学エコトピア科学研究所(〒464-8603 名古屋 市千種区不老町 1-1)

Molecular organization of the membrane cytoskeleton revealed by electron microscopy さであり、Gアクチンが繋がっている様子を縞目模様とし て観察できる.もし、全てのアクチン結合タンパク質が常 時アクチン線維に結合しているとすればその太さは倍以上 になるしGアクチンの編目模様も見えないであろう.ま た,アクチン線維として正常に機能しないと思われる.お そらく、細胞内では多くのタンパク質は必要な時必要なタ ンパク質と結合し、複合体を形成し多様な機能を発揮する と推測される.これを検証するには細胞内において分子レ ベルで構成要素を同定し、タンパク質相互の動的空間構造 を明らかにする必要がある.このためには分子生物学的方 法, 生化学的方法, 形態学的な研究法を組み合わせる必要 がある.形態学的方法と言っても従来の方法を踏襲するの ではなく,光学顕微鏡による live cell imaging から高分解 能電子顕微鏡解析までのシームレスなイメージングとそれ らの結果の統合が必須である. 言い換えれば, 分子生化学 的に明らかになった事象を形態的方向から検証し新たな事 実を導くことである.最近ではクライオ電子顕微鏡や免疫 フリーズエッチングとトモグラフィー(電子顕微鏡内で試 料を傾斜させ,あらゆる角度から像を撮影し,それらの像 から本来の三次元像を復元する方法)を組み合わせた新世 代の電子顕微鏡形態学が活発になり、細胞内におけるタン パク質から細胞内小器官に至る高分解能空間構造が明らか になる可能性がある.我々は分子の構造ではなくメソス ケールのタンパク質複合体の機能構造を明らかにすること を目的として形態学を進めている.ここでは膜細胞骨格 (膜の裏打ち構造)を例に取り、最近のクライオ電子顕微

Jiro Usukura (EcoTopia Science Institute, Nagoya University, 1–1 Furo-cho Chikusa-ku, Nagoya 464–8603, Japan)

鏡や免疫フリーズエッチングにより何が明らかになるか紹 介したい.

1. 膜細胞骨格(膜の裏打ち構造)について

膜細胞骨格は細胞膜の細胞質側表面に密着している細胞 骨格や周辺タンパク質により形成される膜の裏打ち構造の 総称である¹⁾. 膜細胞骨格は膜の機能ドメイン, 運動, 情 報伝達など多くの重要な機能と密接に関与している。しか し、この構造を三次元的に調べることができるようになっ たのはここ10年ぐらいのことである。従来の切片法では 細胞膜は所謂 unit membrane と呼ばれる二次元的な線とし て表現され、その線に沿った細胞質側の多少電子密度の高 い領域が膜細胞骨格として観察される.したがって、その 空間構造は想像の域を脱しえなかった。しかし、膜細胞骨 格が存在することは赤血球ゴースト膜の切片観察から明ら かになり、スペクトリンの存在様式やその機能の重要さも 既に指摘されていた². 一方, 旧来のフリーズフラク チャーレプリカ (freeze fracture replica) 法では脂質二重層 の疎水性面に沿って割断された時、膜内在性タンパク質の 分布を二次元的に捉えることができるが、細胞質に接した 膜表面を見ることはできない.細胞膜の表面が観察される ようになったのは試料を急速凍結により処理し、フリーズ エッチングレプリカ (freeze etching replica) 法が可能になっ たことによる³. しかし、この場合でも細胞内を埋める細 胞骨格や可溶性タンパク質により、細胞膜の裏側は断片的 にしか見ることができなかった. 膜細胞骨格を広視野で調 べるためには細胞質内を埋めている多くの構造物を除かな ければならない. このため細胞膜とその膜細胞骨格を残し て細胞質の大半を除く細胞膜剥離法 (unroofing) が考案さ れた. unroofing には接着性を高めたガラスで背側 (apical) の細胞膜を剥ぎ取る方法と超音波刺激により腹側 (basal) の膜だけを残して洗い流す方法の2種類あるが,どちらも 培養細胞を対象としており,組織内の細胞には適用できな い.しかし,培養細胞でも運動やエンドサイトーシスにお いては組織細胞と共通部分がかなり存在するし,むしろ生 化学的に明らかになった事象を形態的に検証するには適当 であると考えられる.したがって,ここで紹介する電子顕 微鏡写真は全て培養細胞を用いて撮影された.

2. 急速凍結フリーズエッチング法による 膜裏打ち構造の観察

最初にタンパク質を同定せずに膜裏打ち構造の電子顕微 鏡像を概説する.図1はラット腎臓由来の培養 NRK 細胞 の背側細胞膜の細胞質側表面像である.細胞を壊し,細胞 質を洗い流してもなお相当量のアクチン線維や微小管,ク ラスリンなどが膜に付着している様子を観察できる.ここ に存在するアクチン線維はいわゆる細胞骨格とは別物とい うわけではなく,相互に連絡している.しかし,全く同じ ではなく,後述するようにこれらのアクチン線維に結合す るタンパク質は細胞質中のそれらとは異なるようである.



図1 細胞膜の細胞質側表面のフリーズエッチング像 膜に密着する線維構造の他クラスリン被覆小穴,カベオラなども存在する. 膜細胞骨格はこれ らを含む総称である.



図2 FRSK 細胞腹側膜の細胞質側表面 この写真で曲がりくねって走行している大半の線維がケラチンよりなる中間 径線維(10nm 線維)である.アクチン線維とは異なり膜面より少し浮いて 分布している.



図3 膜に密着するアクチン線維 Gアクチンに由来する縞目模様が明瞭に観察される.下半分に観察され る網目状の構造はクラスリンコートである.

一方,細胞種によっても裏打ち構造は異なる. ラットの皮 膚細胞由来である FRSK 細胞では中間径線維であるケラチ ン線維が膜直下にも豊富である(図2).しかし,アクチ ン線維のように膜に密着するわけではない(図3).なお, これらの線維は抗体標識によらずともそれらの太さと形状 で識別できる.

アクチン線維がなぜ膜に密着するのかその仕組みは分ら ないが、よく観察すると束ではなく1本1本のアクチン線 維として膜に付着している.図3のように拡大すると線維 上に明瞭な編目模様を見ることができるが,これはGア クチンの結合により線維が形成されているためである.要 するに編目間の粒状の物質がGアクチン分子そのもので ある.

3. トモグラフィーによる再構成

観察はまた計測でもあるので、「アクチン線維が膜に密 着している」との表現とともに数値で示さなければならな い.二次元的な大きさとは別に高さ方向を加えた三次元に



- **図**4 A: 傾斜像から水平断像を算出したものの1枚 B: x,y の切断位置を示す.
 - C:Bのx線に沿って切断し、レプリカを真横から見た像.
 - D:y 線に沿って切断し,レプリカを真横から見た像.



図5 トモグラフィーにより立体再構築 された膜細胞骨格

よる計測が必要となる.電子顕微鏡のレンズは開口数が小 さいため光学切片が切れないので、トモグラフィーは難し いと考えられてきたが、最近傾斜角を変えて撮影した像か ら水平断像を導くよいアルゴリズムが開発され、ブレーク スルーした.図4は90枚の連続傾斜像から算出した水平 断像の一部を示している.図5はこれらを重ね合わせ三次 元再構築した膜細胞骨格である.実際はあらゆる角度から 観察できるようになっている.このようにして解析すると 細胞膜と密着アクチン線維との間の距離は変化に富むがお よそ1~2nm であった⁴.

4. 免疫フリーズエッチングによる解析

免疫標識は物質と形態を結びつける有力な手段であり, これを利用した免疫細胞化学は光学顕微鏡,電子顕微鏡の 観察手段を問わず形態学で最も頻繁に使用されている.し かし,切片の表面に露出しているエピトープを免疫標識す るこれまでの電子顕微鏡免疫細胞化学では標的タンパク質 のおよその場所が分るだけであり,どの構造物の構成要素

であるかは分らない、フリーズエッチングと免疫標識を結 びつけることは困難であったが、unroofing により抗体を 容易に膜の細胞質表面に到達させることができるため可能 となった. 当然のことながら免疫フリーズエッチングレプ リカは電子顕微鏡で観察するため,二次抗体は電子線に対 してコントラストを持つ金コロイド標識のものを使用して いる.したがって、金コロイドがどこにあるかで標的タン パク質を同定する。例えば膜細胞骨格のアクチン線維とス ペクトリンが区別でき、Arp2/3がアクチン線維の枝分か れ部分に存在することなど、より詳細な存在場所が明らか となる⁵. 我々は免疫細胞化学ではなくむしろ免疫分子化 学に近いと考えている.図6は IQGAP1 に対する抗体で 標識した膜細胞骨格であり、このタンパク質がアクチン線 維上に存在することが分る. IOGAP1 は Rho-ファミリー GTPase である Cdc42, Rac1 の下流で機能するタンパク質 であるが、他のタンパク質を介せず直接アクチン線維と結 合できる⁶. Cdc42 は膜タンパク質であるので IQGAP1 は アクチン線維とCdc42を架橋し、アクチン線維を膜に付 着させるように働いているのかもしれない.したがって, Cdc42 は IQGAP1 を介し間接的に膜細胞骨格のアクチン線 維ネットワークの再編などに関与していると予測される. 実際, IOGAP1 は培養細胞では細胞質に近いストレス線維 よりも細胞周辺部の膜裏打ちアクチン線維に豊富であるこ とから、ラメリポディアや細胞の伸張運動に関与している と考えても不思議ではない.実はこのような観察結果は極 めて重要で、IOGAP1 はアクチン結合タンパク質であるが 場所特異性があり、場所と必要に応じてアクチン線維と結 合することを示唆している.これは他のアクチン結合タン パクについても言えることであろう. 必要に応じての結合 にはリン酸化などを考慮すればよいのであるが、なぜ場所 特異性が生まれるのかは今後明らかにされるべき問題であ る. すなわち, ストレススファイバーを形成するアクチン



図6 抗 IQGAP1 で標識した細胞膜細胞質側表面のフリーズエッチング像 コントラストを反転しているので金コロイドは白い点として見える.



図7 GFP-アクチンを発現している細胞の膜細胞骨格を抗 GFP 抗体で標識 したフリーズエッチング像

線維と膜に密着するアクチン線維は性質が異なることを意味しており,結合タンパク質がそれらを見分けてアクチン線維に結合していることになる.図7はGFP-アクチンを

発現している HeLa 細胞を抗 GFP 抗体で標識した膜細胞 骨格である.ほとんどのアクチン線維が抗 GFP 金コロイ ドで標識されているのが分る.蛍光顕微鏡と比較すること



図8 無固定新鮮状態の膜細胞骨格のクライオ電子顕微鏡像 黄色の二重矢印は微小管,一面に存在する細い線維(矢頭)はアクチン線維,SRは滑面小胞体を示す.

で光学顕微鏡による live cell imaging との整合性がとれる ので今後重要な標識法となるであろう.なお,これらの写 真は見やすくするためにコントラストを逆転させている (ネガフィルムのまま).したがって,金コロイドは白い点 として観察され,その周りには IgG のハローが存在する. 丁度二重丸のようにも見える.

5. クライオ電子顕微鏡による膜細胞骨格解析

クライオ電子顕微鏡は名前の通り極低温で観察できるの で、試料が十分薄ければ急速凍結することにより水を含ん だ新鮮材料を観察することができる.しかし、前処理を いっさいしない新鮮生物試料は電子散乱が少ないのでコン トラストが低く、かつ電子線照射による熱損傷を受けやす い. そのため長時間電子線を照射しながら目的の場所を探 すことは難しい. これまでは生細胞の観察よりは分離精製 したタンパク質の構造解析が中心に進められた. 電子線に より透過像が得られる厚さは加速電圧にもよるが 200nm 以下であるので細胞丸ごとの観察は難しい. 仮に電子線が 透過しても細胞質が厚く、多重散乱により像は不鮮明なも のとなる.しかし,最近 Max-Plankの Baumeister のグルー プは電子顕微鏡用のメッシュグリッド上に細胞を培養し, 急速凍結して細胞質の少ない周辺部分に電子線を当て観察 した. それでもかなり厚いので z 軸方向の構造の重複や多 重散乱による像の不明瞭さはさけられないが、トモグラ

フィーにより立体再構築することで解決した". 我々は膜 剥離により得た背側膜とその膜細胞骨格複合体を観察する ことを考えつき、よい結果を得た. 膜細胞骨格は前述のよ うに唯一フリーズエッチングでのみ観察可能であったが. クライオ電子顕微鏡による新鮮状態での観察はそれぞれの 方法の結果を相互に検証できることを意味しており大きな 進歩である.新鮮状態のアクチン線維は直線的ではなく, 流線を描いて走行し、微小管も大きなカーブを描きながら 断片化せず伸びていることが分った(図8).免疫標識も 可能であるが、抗体を反応させるために時間がかかるので 軽く固定する必要がある.しかし、水を含んだ状態で観察 できることと、前述のように免疫フリーズエッチングでし か得られない情報を別の方法で検証できるということは特 筆すべき点である. 図9は図6と同様アクチン結合蛋白の 一つである IQGAP1 に対する抗体で標識した膜の裏打ち 構造である. 脱水, 包埋などをしていないので抗原性がよ く保存されており、S/N比が小さく標識はアクチン線維 上にのみ存在する. また, 免疫フリーズエッチングとは異 なり白金も蒸着していないので、標識である金コロイド粒 子を容易に識別できる.

今後の展開

細胞の構造を見ただけでそれが如何なる組織の細胞であ るかを組織学者は当てることができる.なぜなら,細胞の



図9 抗 IGGAP1 抗体で標識した膜細胞骨格のクライオ電子顕微鏡像 緑色の小矢印はアクチン線維,矢頭は IQGAP1 の抗体標識,二重矢印は微小管

輪郭だけでなく細胞内のオルガネラの配置や量は各細胞種 により決まっているからである.しかし,どのようにオル ガネラの位置(空間構造)が決まっているかは分らない. 核の中の構造がどうであり如何に保たれているかも同様で ある.よく考えてみると興味ある問題である.研究が進ん でいる輸送についてもオルガネラの位置が決まり極性が形 成されているがゆえに生物学的意味が明瞭になる.した がって,今後はオルガネラの空間構造,細胞質や核質その ものについても物質を基盤とした形態学的解析を試みるこ とが必要である.

おわりに

最近の電子顕微鏡形態学で何が分るかを紹介した.モノ を基盤とする生化学研究者にとって,形態学というのはモ ノとしての実体がなく分りにくいかもしれない.しかし, 目で見るというのは極めて重要であり,目的とする物質が どこにあり,どのように変化するかを観察できればこれに 越したことはない.形態学も進歩し,モノと結びつける努 力はなされている.全ての生化学的現象を形態学的にとら えることは難しいが,チャレンジする価値はあると思う. 多岐にわたるため一つの研究室が全てを行うことは難しい が,効果的なコラボレーションをすることにより目的が達 成されると思う. 謝辞:ここに載せた写真の一部は楠見明弘教授(京都大学 再生医学研究所),貝淵弘三教授(名古屋大学大学院医学 系研究科)との共同研究により得られたものであり,ここ に改めて感謝の意を表す.また,これらの研究室から派遣 され一緒に実験を行った諸根信弘博士(現 国立精神・神 経センター)および渡辺崇博士(現 名古屋大学高等研究 院)には特に感謝したい.

文 献

- 1) 石川春律(1985)細胞骨格(石川編), pp. 1-9, 講談社サ イエンティフィク, 東京.
- Tsukita, S., Tsukita, Sa., & Ishikawa, H. (1980) J. Cell Biol., 85, 567–576.
- 3) Hirokawa, N. & Heuser, J.E. (1981) J. Cell Biol., 91, 399-409.
- 4) Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J., & Kusumi, A. (2006) *J. Cell Biol.*, 174, 851–862.
- Flanagan, L.A., Chou, J., Falet, H., Neujahr, R., Hartwig, J.H., & Stossel, T.P. (2001) J. Cell Biol., 155, 511–517.
- Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., & Kaibuchi, K. (2004) Dev. Cell, 7, 871–883.
- Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G., & Baumeister, W. (2002) Science, 298, 1209–1213.