原子間力顕微鏡と光ピンセット法による 細胞膜裏打ち構造の解析

楠 見 明 弘

東京大学教養学部基礎科学科第一 ☎ 153 目黒区駒場

Membrane Skeleton as Studied by Atomic Force Microscopy and Laser Tweezers

Akihiro Kusumi

Department of Pure and Applied Sciences, The University of Tokyo
Meguro-ku, Tokyo 153, Japan

Movements of transferrin and α_2 -macroglobulin receptor molecules in the plasma membrane of cultured normal rat kidney (NRK) fibroblastic cells were investigated by video-enhanced optical microscopy with 1.8 nm spatial precision and 33 ms temporal resolution by labeling the receptors with the ligand-coated nanometer-sized colloidal gold particles. For both receptor species, approximately 90% of the movement trajectories are of the confined diffusion type, within domains of $\approx 0.25 \mu\text{m}^2$ (500–700 nm in diagonal length). Movement within the domains is random with a microscopic diffusion coefficient (D_{micro}) = $10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$, which is consistent with that expected for free Brownian diffusion of proteins in the plasma membrane. The receptor molecules move from one domain to one of the adjacent domains at an average frequency of 0.034s^{-1} (the residence time within a domain = 29s), indicating that the plasma membrane is compartmentalized for diffusion of membrane receptors and that long-range diffusion is the result of successive intercompartmental jumps. The macroscopic diffusion coefficients for these two receptor molecules calculated on the basis of the compartment size and the intercompartmental jump rate are $\approx 2.4 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$, which is consistent with those determined by averaging the long-term movements of many particles. Partial destruction of the cytoskeleton decreased the confined diffusion mode, increased the simple diffusion mode, and induced the directed diffusion (transport) mode. Those results suggest that the boundaries between compartments are made of dynamically fluctuating membrane skeletons (membrane-skeleton fence model).

The mechanical properties of intercompartmental boundaries were then studied by tagging transferrin receptor (TR) with either 210 nm- ϕ latex or 40 nm- ϕ colloidal gold particles, and by dragging the particle-TR complexes laterally along the plasma membrane using laser tweezers. Approximately 90% of the TR-particle complexes that showed confined-type diffusion with D_{micro} of $10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$ could be

dragged past the intercompartmental boundaries in their path by laser tweezers at a trapping force of 0.35–0.8 pN. At the dragging forces between 0.05 and 0.1 pN, particle-TR complexes tended to escape from the laser trap at the boundaries, and such escape occurred in both the forward and backward directions of dragging. The average distance dragged was half of the confined distance of TR, which further indicates that particle-TR complexes escape at the compartment boundaries. The boundaries are likely present in the cytoplasmic domain, and are elastic. These results are consistent with the proposal that the compartment boundaries consist of membrane skeleton or a membrane-associated part of the cytoskeleton. Approximately 10% of TR exhibited slower diffusion ($D_{micro}=10^{-10}$ – 10^{-11} cm²/s) and binding to elastic structures.

Key words : membrane skeleton, cytoskeleton, laser tweezers, atomic force microscopy, transferrin receptor

1. 一粒子追跡法による細胞膜：膜骨格フェンスモデル上でのレセプターの運動

トランスフェリン受容体と α_2 マクログロブリン受容体を直径 20 または 40nm の金コロイド微粒子で標識し (図 1), ビデオエンハンス光学顕微鏡法を用いて培養細胞 (NRK) の細胞膜上での運動を観察した (約 6 分間). 結果を図 2 に示す. これは, 細胞膜が, レセプターの拡散運動にとっては, 微小領域にコンパートメント化されていることを示唆するものである. 実際, 統計的・定量的な解析をすることによって, 細胞膜は平均直径が 600nm のコンパートメントに仕切られており, これらのレセプターは隣接するコンパートメント間を次々に移動することによって, 細胞膜上を移動していくこと (最終的には被覆ピットに入る), 1つのコンパートメント内の滞在時間は約 30 秒であり, コンパートメント内部ではほぼ自由拡散していること (微視的拡散係数 $=D_{micro}=10^{-9}$ cm²/sec) などが示された. したがって, マイクロメートル以上のレベルでの膜タンパク質の拡散は, 微視的拡散係数ではなく, 各コンパートメント内の滞在時間と, コンパートメント間の移動頻度によって決まるということになる (巨視的拡散係数は 3×10^{-11} cm²/sec) (図 3).

これらは, 多数粒子の平均や, マイクロメートル程度の分解能で観察しては, 決して見いだ

図 1. 一粒子追跡法の概略を示す.

直径 5~40nm 程度 (実験によってサイズを変える) の金コロイド微粒子をリガンドや特異抗体を介して, 目標とするタンパク質に結合させる. 金コロイドはビデオエンハンス顕微鏡法により可視化できるので, 金コロイドの結合したタンパク質の運動を追跡することができる. この方法は膜タンパク質膜裏打ちタンパク質のネットワークとの相互作用, 膜ドメイン等を調べることができるなど, 生体膜の高次編製の制御の研究に有用である.

しえなかった結果である. また, 細胞が生きている状態でなければ, このような観察自体が不可能である.

ところで, カドヘリンの細胞質部分の大きさ (152 アミノ酸残基) を, cDNA を改変することによって変化させ, カドヘリンを発現していない細胞に導入して発現させた. カドヘリン結合タンパク質 (カテニン) の結合部位を除去する

図2. トランスフェリン受容体の運動の軌跡。
(a) 制限された範囲内での拡散運動の例。微小なドメイン内で、速い運動を行っている様子がわかる。
(b) トランスフェリン受容体がドメイン間を移動して、隣接するドメインに移っていく様子を示す。
(a), (b) ともに 500 ステップ (16.7 秒間) の運動の軌跡 (bar=100nm)
(c), (d) 受容体の 5.6 分間の運動軌跡 (1/10 倍速で観察)。点線は予想されるドメイン構造、数字は粒子が移動した順序を示す (bar=500nm)

と、 D_{micro} は約 3 倍増加したが ($3 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$)、運動の制限範囲の大きさは変わらなかった (直径 300nm 程度)。さらに細胞質部分を大きく欠失させると (細胞質部分 21 残基)、拡散係数はあまり増加しなかったが、運動の制限範囲の面積は約 4 倍に増加した (京大・竹市および生理研・永淵両氏との共同研究)。

このような結果から、我々は、コンパートメントの境界を作っているものは、膜裏打ちタンパク質のネットワークではないかと考えており、これを「膜骨格フェンス構造」と呼んでいる。すなわち、膜タンパク質の細胞質部分が立体障害のためにネットワークと衝突し、なかなか隣接するコンパートメントへ移動できないのである。

図3. 受容体の拡散に対してコンパートメント化された細胞膜における、トランスフェリン受容体や α_2 マクログロブリン受容体の運動の様子を示すモデル。

各コンパートメントの大きさは、対角線にして 600nm 程度である。各コンパートメントの内部では、受容体は自由拡散をおこなっており、拡散係数は $10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$ 程度である。これは、生体膜中での最も速い拡散運動に匹敵する。トランスフェリン受容体と α_2 マクログロブリン受容体の場合、1つのドメイン内部には平均 30 秒程度滞在し、次々と隣接するコンパートメントへと移動する。このような運動の繰り返しによって、巨視的な拡散が生じ、被覆格子や被覆ピットに集合していくものと考えられる。

2. 光ピンセット法を用いて、膜タンパク質 1 分子を動かす

コンパートメント間の境界の力学的性質をピコニュートンレベルの力での操作によって調べた

受容体を金コロイド微粒子で標識し、光ピンセットで金微粒子を捕捉して、受容体を細胞膜上において強制的に動かし、その応答を観察した (図 4)。図 5 は光ピンセットで動かしたトランスフェリン受容体の運動の軌跡を示したものである。 D_{micro} が大きい受容体 ($1.5 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$ 以上) については、0.8pN (ピコニュートン) の力で引っ張ると、光ピンセットの走査の端まで (この場合は $2 \mu\text{m}$) まで追従し (往路)、そこから走査の開始点までピンセットを逆向きに移動すると (復路) それにも追従してくる。しかし、捕捉力を弱くして 0.1pN にすると、往路の走査中でも復路の走査中でも、受容体はピンセットから逃げるが多くなる。図 5 (B) に示したように、復路で逃げた場合に逃げた場所の近くの往路の軌

図 4.

(A) 光ピンセットによって金コロイドを捕捉し、細胞膜に沿って膜タンパク質を動かすことを示す模式図。

(B) トランスフェリン受容体の運動を制御する2つの基本メカニズム：膜骨格フェンスモデルと繫紐モデル。NRK細胞中のトランスフェリン受容体の運動は、90%程度がフェンスモデルによって説明できる ($D_{micro} > 1.5 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$ の成分)。この成分は、0.1pN程度の弱い力で牽引すると、コンパートメントの境界（膜骨格）を越えることができない。1pN程度の強い力で牽引するとたいていの膜骨格フェンスを越えることができる。 $D_{micro} < 1.5 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$ の成分は繫紐モデルで説明できる。この受容体については、繫紐の実体は、クラスリン被覆構造（格子+ピット）である可能性が高い。カドヘリンの場合は、繫紐はアクチン線維のようである。

跡をみると、往路でもつまづいている場合（矢印）が多くみられた。これらは、膜骨格フェンス構造を支持するものである（図3参照）。さらに、多くの受容体は光ピンセットからはずれたときに、0.2秒程度の間、あたかも弓から放たれた矢のように急速に運動する。これは、膜骨格ネットワークの弾性的な構造を示すものである。

一方、 D_{micro} が小さい受容体 ($1.5 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$ 以下) については、0.8pN（ピコニュートン）の力で引っ張っても、200nm以内で光ピンセットからはずれてしまうトランスフェリン受容体がほとんどであった。この成分は全体の5~10%程度

図 5. 光ピンセットによって引っ張られている金コロイド-トランスフェリン受容体複合体の軌跡

光ピンセットは、左から右へと2μm移動した後、右から左へと動かして開始点へ戻っている。Aの実験では、金微粒子-トランスフェリン受容体複合体は光ピンセットの動きに追従して、往復する。Bの実験では、往路は完全に追従したが、復路で複合体は光ピンセットからはずれた。はずれた付近の往路の軌跡をみると、往路でも同じ障害物らしきものに当たっていることがわかる。

存在するが、被覆ピットに入っているか、膜裏打ちタンパク質/細胞骨格のネットワークに結合している成分であると考えられる。また、受容体の結合している構造も弾性的であった。

3. 原子間力顕微鏡 (AFM) によって細胞の外側から膜骨格 / 細胞骨格が見える

原子間力顕微鏡 (AFM) の観察原理は簡単である。すなわち、先端曲率半径が5~50nm程度の鋭利な探針で試料表面を走査して、試料表面の凹凸を検出し、それを画像化するのである。いわば、非常に洗練されたLPレコードの針（ピックアップ）のようなものだ（図6）。

赤血球ゴーストを固定後、凍結乾燥し、AFM観察すると、ゴースト膜の外側から探針で走査しているにもかかわらず、膜を裏打ちするスペクトリンネットワークがよく見えた（図7）。この構造がスペクトリン裏打ち構造であることは、抗スペクトリン抗体処理やトリプシン処理によって確認された。

次に、細胞の内側から膜の裏打ち構造を観察した。このために、カバーガラスに付着させた赤血

図6. 原子間力顕微鏡 (AFM) の観察原理

図8. 生きているNRK細胞のAFM像
培養液中での観察。膜骨格/細胞骨格やストレス
ファイバーが観察できる。スケールはμm単位。

球に、パストールピペットで水流を吹きかけて上側の膜を吹き飛ばした。こうすると、カバーガラスに張り付いた膜の細胞質側表面が露出する。この試料を固定後、凍結乾燥させてAFM観察したところ、細胞外から観察されたのよりもやや細かいネットワークが観察された。すなわち、細胞膜の外側から探針で走査しても、多くの膜骨格が

図7. 自然乾燥させたヒト赤血球ゴースト膜を細胞の外側からAFM観察した像
マスクメロンのような模様は、赤血球膜を裏打ちしているタンパク質線維（スペクトリン）のネットワーク。これが膜を強化し、また膜タンパク質の拡散に対する「仕切り」をつくっている。細胞の外側からでも、膜骨格が観察できることに注意。グルタンアルデヒドで固定後、凍結乾燥しても、同様の像が得られる

見えた、ということらしい。

凍結乾燥試料に炭素蒸着してAFM観察しても同様の膜骨格構造が観察された。

したがって、細胞の外側から膜骨格が見える理由としては、乾燥中に、脂質二重層の膜骨格に接触していない部分が落ち込んだため、結果的に膜骨格が浮きだしたものと考えられる。

生きている培養細胞を用いても、細胞外から膜骨格/細胞骨格をAFMで観察できることも確認された。ストレスファイバーのような太い構造ばかりでなく、きわめて細かいアクチンフィラメント様の構造も観察された（図8）。

4. AFMと一粒子追跡法によって膜骨格フェンス構造が検証できた

膜骨格は赤血球において最も研究が進んでいる。そこで、膜骨格の膜タンパク質の運動に与える影響を赤血球のアニオンチャネルのバンド3を用いて調べた。バンド3は、37℃では、20%が膜骨格に結合しており、残りの80%は膜内を拡散

していることは、我々が以前示した通りである。そこで、1粒子追跡法を用いて、バンド3の膜中での拡散運動を追跡し、AFMによって膜骨格を観察した。結果は、すべての分子がコンパートメントの存在する拡散運動を示した。次にスペルミン処理をして網目を細かくすると、コンパートメントのサイズは小さくなり、また、スペクトリンネットワークに影響を与えない程度の軽いトリプシン処理によってバンド3の細胞質部分を除去すると、バンド3は大きな範囲を単純ブラウン運動するようになった。これは、膜骨格フェンス構造のモデルを支持する結果である。

膜骨格フェンス構造は細胞膜の基本的な構造であるように思われる。個々の膜タンパク質については、膜骨格のフェンス効果に重畳されて、個別に運動の制御機構が働いているものと考えている。

参考文献

- 1) T. Oida, Y. Sako, and A. Kusumi. Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy) : Methodology development and its application to studies of endosome fusion in single cells. *Biophys. J.* **64**, 676-685 (1993).
- 2) A. Kusumi, Y. Sako, and M. Yamamoto. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.* **65**, 2021-2040 (1993).
- 3) Y. Sako, and A. Kusumi. Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell Biol.* **125**, 1251-1264 (1994).
- 4) Y. Sako, and A. Kusumi. Barriers for lateral diffusion of transferrin receptors in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers : fence versus tether. *J. Cell Biol.* in press (1995).

(受付 1995年1月31日)