

## 生細胞中での1分子計測と制御

楠見 明弘<sup>\*,\*\*</sup>・藤原 敬宏<sup>\*\*</sup>

最近の光学顕微鏡技術の発展のおかげで、生きている細胞の中で機能しているタンパク質分子を、1分子レベルで、ナノメートル/サブピコニュートン/サブミリ秒の精度で観察したり操作することができるようになってきた<sup>1-6)</sup>。タンパク質分子のサイズは数ナノメートルであり、タンパク質間の相互作用の力はピコニュートンレベルであるから、われわれは、細胞が実際に分子を動かしたり制御したりするのと同じくらいの精度と力で分子の操作ができる段階に近づいている。生きている細胞内に「科学の手」を入れて、細胞のまねをしたり、細胞の邪魔をすることも徐々にできるようになってきた。たとえば、細胞が細胞内の構造を作ったり働かせたりするのにどのように熱ゆらぎを利用しているか、というような、生物が進化の歴史の中で獲得してきた重要な戦略についても理解が進みそうである。このような研究は、細胞が機能を発揮するための機構の理解に大きな革新をもたらさそうである。

1分子レベルで見ることが必要な理由は、以下の2つの理由による。まず、細胞がきわめてヘテロジニアスだということだ。同じ分子種にも、多くの制御機構が働いており、違う分子には違う機構が働いている可能性が高い。この場合には多数分子の平均的挙動を調べても意味がなく、多数の分子のおのおのについて個別に当たっていくしかない。もうひとつは、ナノメートルサイズの機械（生体高分子）は確率過程論的に動く、という点である。したがって、動作原理を調べようにも、多数分子を用いると、平均操作によって見たいところが消えてしまう（多数分子について、もしトリガーをかけて一斉に働かせることができ

ば、動作の一素過程についてはある程度の情報が取れる場合がある。しかし、多くの場合トリガーをかけるのは困難である）。

光学顕微鏡が重要であるのは、われわれは、生きている細胞に適用できる技術が必要だからである。働き方を調べるには、働いている状態をそのまま見たり、摂動を加えて応答を見たりする必要があるからである。本稿では、1粒子追跡法（1分子の観察と計測）と光ピンセット法（1分子の制御）を取り上げ、細胞膜分子と細胞骨格との相互作用の研究への応用について述べたい。

### 1. 1分子の運動を追跡する

細胞膜は2次元の液体のような構造を取っており、膜内のタンパク質はこの中を熱運動している。実際、この運動を1分子のレベルで見てもみたのが図1に示した軌跡である。これは、トランスフェリン受容体の培養細胞（NRK）の細胞膜上での約6分間の運動を示したものである。この結果は、図2に示すように、細胞膜は単なる2次元液体ではなく、受容体にとっては、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、運動の統計的・定量的な解析から、細胞膜は平均直径が600 nmのコンパートメントに仕切られており、細胞膜中の受容体は隣接するコンパートメントへと次々に移動することによって、細胞膜上を移動すること（最終的には、細胞内に受容体を取り込む構造体のクラスリン被覆ピットに入る）、1つのコンパートメント内の平均滞在時間は約25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などが示された<sup>7,8)</sup>。

どのような方法を使ってタンパク質の運動を追跡したかを、簡単に種明ししよう（図3）。生きている細胞の膜タンパク質に、直径30 nm程度（タンパク質と同じかやや

\*名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻（〒464-8602 名古屋市千種区不老町）

E-mail: akusumi@bio.nagoya-u.ac.jp

\*\*楠見膜組織能プロジェクト, ERATO, 科学技術振興事業団（〒460-0012 名古屋市中区千早 5-11-33）

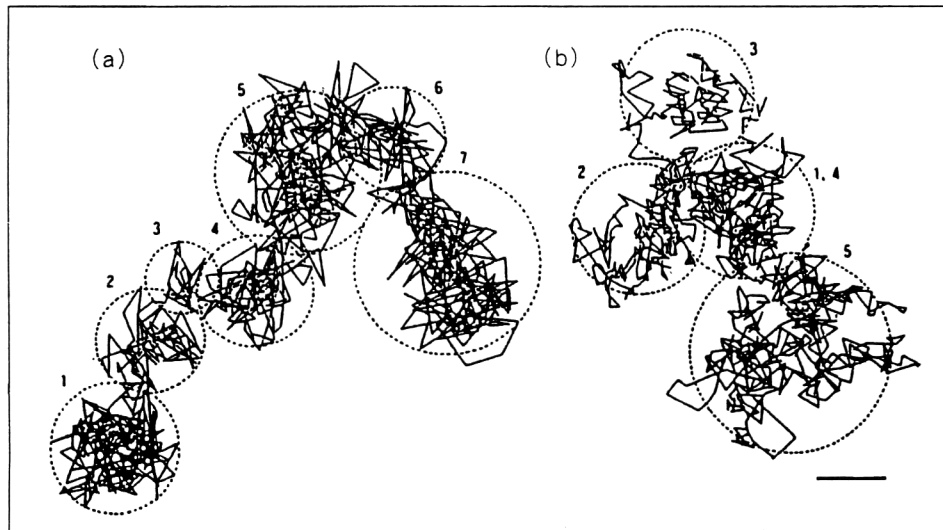


図1 トランスフェリン受容体の運動の軌跡。トランスフェリン受容体がドメイン間を移動して、隣接するドメインに移っていく様子を示す。330秒間の運動の軌跡。点が混みすぎるのを避けるために、330 msに1回の頻度で座標点が打ってある。バーは500 nm。点線は予想されるドメイン構造で、数字は粒子が移動した順序を示す。(b)では、1で示したドメインに粒子がまた戻ってきた(4)。

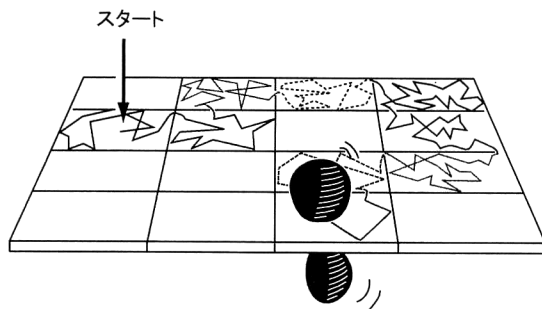


図2 受容体の拡散に対してコンパートメント化された細胞膜における、膜貫通型膜タンパク質の運動の様子を示すモデル。コンパートメントの境界は、膜骨格によるものと考えられる(膜骨格フェンス構造)。

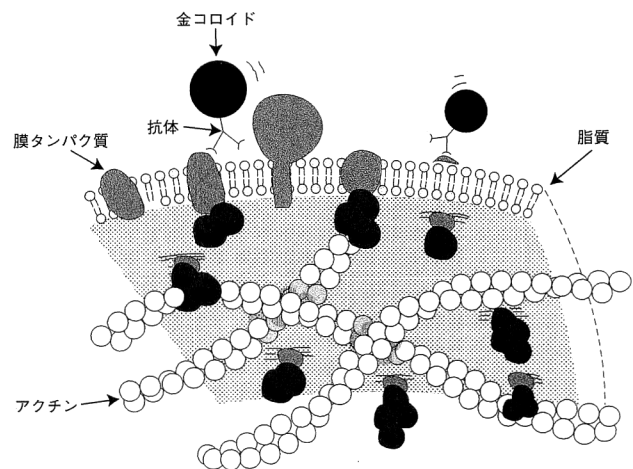


図3 1粒子追跡法の概略。

大きい程度の直径)の金コロイド微粒子をリガンドや抗体を介して結合させる。金コロイド微粒子は、光学顕微鏡のノマルスキー像をコントラスト増強処理する(リアルタイム画像処理装置を用いる)ことにより可視化し、各ビデオフレームにおける粒子の座標を求める。ビデオカメラ(通常CCDカメラを用いる)の撮像面における倍率は500倍程度である。座標決定の空間精度は1 nm程度、時間分解能は33 msである<sup>8)</sup>。ただし今では、顕微鏡の照明系を明るくし、また、明視野像を観察することにより、高速ビデオを用いて20  $\mu$ sの時間分解能で観察可能である<sup>9,10)</sup>。

われわれは、このような細胞膜のコンパートメント構造は、細胞膜構造の一般的な特徴であると考えている。また、赤血球膜での結果を考えあわせると、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(細胞骨格の細胞膜に接した部分、この部分には、通常の細胞質中の細胞骨格にはないようなタンパク質や構造があり、細胞膜との機能協調に重要な働きをしている)ではないかと考えられ、これを「膜骨格フェンス構造」と呼んでいる(図4)。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<sup>7-10)</sup>。

## 2. 光ピンセットとは

1986年に、Ashkinは「光ピンセット(光トラップ)」の原理とインプリメンテーションについての論文を出版した<sup>11,12)</sup>。レーザー光を開口数の大きい対物レンズを用いて

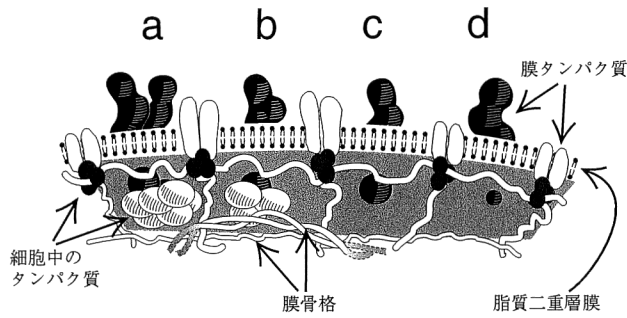


図4 膜骨格フェンス構造の模式図。細胞内部から細胞膜を見たところ、膜骨格は膜にきわめて近く隣接している部分が多い。膜タンパク質の細胞質部分（あるいは、膜タンパク質とそれに結合した細胞質タンパク質の複合体）は立体障害的に膜骨格ネットワークと衝突し、なかなか隣接するコンパートメントへ移動できない（a, c, d）。膜タンパク質の細胞質部分が小さいと、隣接コンパートメントへ移動しやすくなる（d）。また、多くの膜タンパク質は膜骨格に結合している（b）。

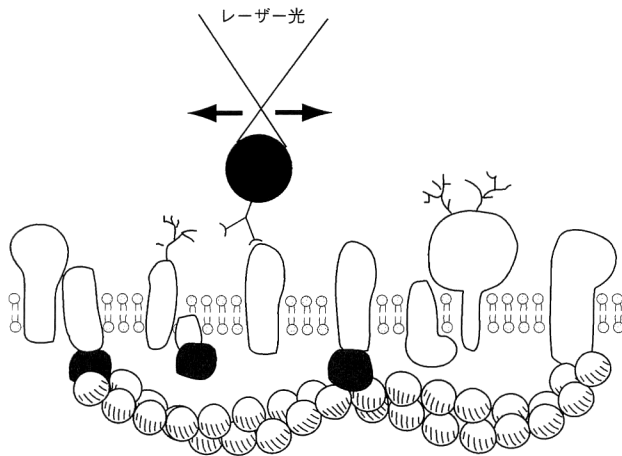
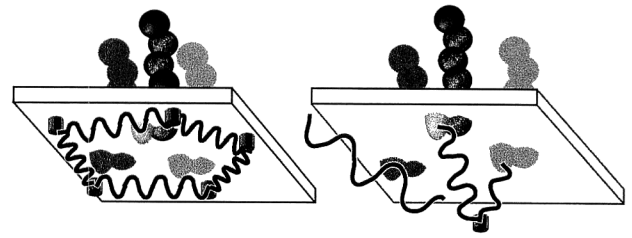


図5 光ピンセットによって金コロイドを捕捉し、細胞膜に沿って膜タンパク質を動かすことを示す模式図。

集光すると、焦点付近で強い電場勾配が生ずる。電場中にある物体には分極が誘導されるが、分極した物体は電場と相互作用して、電場の強いほう、すなわち、焦点のほうへ引き寄せられる。屈折率（複素）が水より大きい球体の場合には、焦点より少し先で、捕捉力のポテンシャルが最も深くなり、その辺りで安定に捕捉される。この方法により、直径数十 nm 程度以上の物体をレーザー光を用いて顕微鏡下で捕捉し、動かすことが可能である<sup>13-17)</sup>。また、赤外光を用いると生物試料に対する影響も小さく、バクテリアでは、捕捉している間に細胞分裂したケースも報告されている<sup>12)</sup>。

### 3. 光ピンセットを使って、細胞と綱引きをする (膜タンパク質と膜骨格との相互作用)

まず、膜タンパク質に金コロイド粒子を結合させ、それ



(1) フェンスモデル (2) 繫紐モデル

図6 膜貫通型タンパク質と膜骨格との2種の相互作用。(1) フェンスモデル：膜タンパク質は細胞質ドメインが膜骨格にぶつかるため、膜骨格の網目中に囲いこまれる。網目の中では自由に運動できる。(2) 繫紐モデル：膜タンパク質は、直接に、あるいは他のタンパク質を介して膜骨格と結合している。

を、光ピンセットでつかまえる。次に、光ピンセットを動かしてつかまえた膜タンパク質を膜上で引っ張っていく。そうすると、細胞はいろいろな機構で膜タンパク質を引っ張り返してくる。つまり、膜タンパク質1分子をはさんで、われわれは、細胞と綱引きをすることができる（図5）。そのときの細胞の応答から、さまざまな制御機構がわかってくる<sup>18-20)</sup>。

ここでは、CHO (Chinese hamster 卵巣) 細胞に強制発現させたマウスの免疫グロブリン G Fc 受容体 II-B2 (FcR) の例を紹介したい。膜貫通型タンパク質である FcR は骨格系と相互作用している。相互作用には2つの様式があり、FcR が骨格系の網目によって取り囲まれている場合（フェンスモデル）と、FcR と骨格系が結合している場合（繫紐モデル）がある（図6）。綱引きによってこの2つのモデルを区別できるだろうか？

図7(A) は Fab-金コロイド粒子を結合した FcR が光ピンセットによって上方向に引っ張られていく様子を微分干渉法で観察したものである。スケールは  $1 \mu\text{m}$  で、引っ張る速度は  $0.6 \mu\text{m/s}$  である。約1秒経過したところで（矢じり）、粒子がレーザー光の中心（○で示す）から遅れはじめる。(B)-1はこのときの時間と変位の関係をプロットしたものである。FcR は途中まではレーザー光によく追隨して牽引されたが、 $0.6 \mu\text{m}$  付近から遅れはじめ、 $1.1 \mu\text{m}$  付近で光ピンセットから外れてしまった。この例はフェンスモデルで説明できる。FcR はフェンスの中では自由に引っ張ることができるが、フェンスに引っかかるとレーザー光から遅れはじめる。その後もしばらく牽引できるのは、フェンスが弾性的な構造をもっており、フェンスを変形させながら牽引できるからであろう。実際、光ピンセットから外れた後、大部分の粒子はまるでばねにつながっているように牽引した方向とは逆の向きに引き戻され

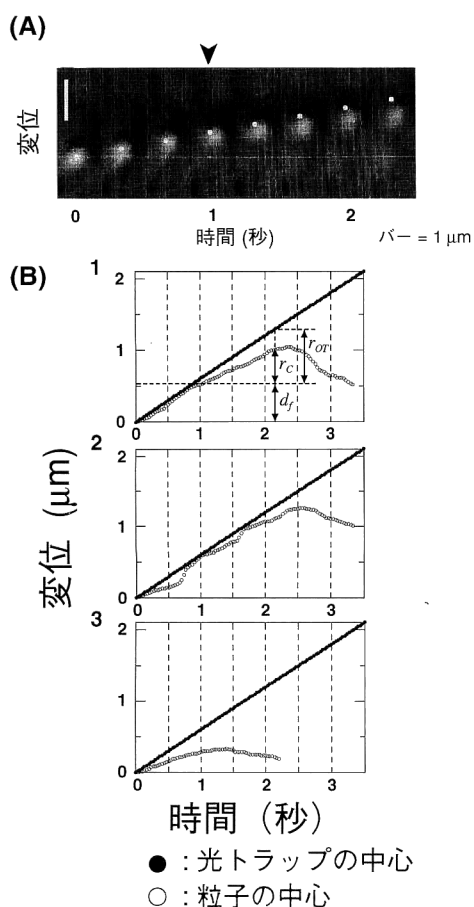


図7 膜タンパク質 (FcR) を細胞膜上で引っ張って応答を見ているところ。(A) 牽引中の粒子の微分干渉像。金粒子は抗体の Fab 断片を介して FcR に結合している、光ピンセットで上方方向に牽引されていく。スケールは  $1\ \mu\text{m}$  で、引っ張る速度は  $0.6\ \mu\text{m/s}$  である。約 1 秒経過したところで (矢じり)、粒子がレーザー光の中心 (○) から遅れはじめる。(B) FcR を牽引したときの変位 (縦軸) と時間 (横軸) のプロット。● はレーザー光の中心、○ は金粒子-FcR 複合体の変位を示す。1 は (A) で示した粒子である。r<sub>c</sub> は粒子の変位、r<sub>OT</sub> は光ピンセットの変位、d<sub>f</sub> は粒子の牽引を始めてから膜骨格に衝突するまでの freely dragged distance である。

ている。(B)-2 の例では FcR は途中で 2 度レーザー光から遅れてはまた追いつていることがわかる。3 度目に遅れたときはとうとう追いつけなかった。このような振る舞いは、フェンス構造を次々と乗り越えながら引っ張られていくことを想像すると容易に理解できる。

これらに対して (B)-3 の例では、引っ張りはじめるといきなり FcR はレーザー光から遅れはじめ、すぐにトラップから外れてしまう。この場合は、FcR が初めから骨格系に結合していた (繫紐モデル) と考えられる。この骨格系もまた弾性をもった構造である。この実験から、Fab-金コロイド粒子を結合した FcR の約 60% がフェンスモデル、約 40% が繫紐モデルの状態で見積も

ることができた。これは、全体の平均を見るのではなく、1 分子レベルで個々の応答を見ることで初めて得られる情報である。

光ピンセットのばね秤はあらかじめ較正してあるので、骨格系からの力が働きはじめてからの分子の応答を調べることによって、骨格系の弾性 (実効ばね定数) を求めることができる。このようにして求めた骨格系の実効ばね定数は約  $0.7\ \text{pN}/\mu\text{m}$  であった。これは、われわれの通常の感覚でいうと非常に小さい量で、このようなばねの先に 1 円玉をつけたとすると、10 km 以上も伸びてしまう。しかし、細胞の中で、細胞膜を支えたり、1 分子の運動を制御するには、ちょうどよい程度の大きさなのである。

生きている細胞の中で、分子運動を見たり、分子をつかまえて動かしてみたい、と多くの生物学者は願っている。そうすれば、ちょうど、幼児が普通の世界の力学を理解するのと同じようにして、細胞の世界の働き方がわかるのではないだろうか、と夢みるからである。この夢が、理想的な場合には、実現するようになってきた。生きている細胞の中で、機能している分子の動態を 1 分子のレベルで観察し、操作しようというわけだ。1 分子レベルで、ナノメートル計測とピコニュートンレベルでの操作をおこなう方法は、生物物理学、ナノバイオロジーの領域の主要な手法となりつつある。

## 文 献

- 1) 嶋本伸雄：“ナノバイオロジーの目標と成立の背景”，蛋白質核酸 酵素, **39** (1994) 1-9.
- 2) 楠見明弘：“ナノバイオロジーを可能にした直視・直接操作技術”，蛋白質 核酸 酵素, **39** (1994) 176-189.
- 3) 藤平正道：“走査プローブ顕微鏡とナノバイオロジー”，蛋白質 核酸 酵素, **39** (1994) 947-959.
- 4) 富重道雄, 楠見明弘：“生細胞研究のためのナノテクノロジー—光ピンセットとナノ計測—”，生体の科学, **48** (1997) 313-318.
- 5) 富重道雄, 楠見明弘：“膜タンパク質を見て、引っ張る—膜骨格による動的な制御機構を探る—”，生物物理, **214** (1997) 244-248.
- 6) 柳田敏雄, 石渡信一：ナノピコスペースのイメージング (吉岡書店, 東京, 1997).
- 7) 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** (1994) 1251-1264.
- 8) A. Kusumi, Y. Sako and M. Yamamoto: “Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovoid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cell,” Biophys. J., **65** (1993) 2021-2040.
- 9) M. Tomishige, Y. Sako and A. Kusumi: “Regulation of the

- movements of erythrocyte band 3 as studied by single particle tracking and laser tweezers," *Biophys. J.*, **72** (1997) A196.
- 10) M. Tomishige, Y. Sako and A. Kusumi: "Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton," *J. Cell Biol.*, **142** (1998) 989-1000.
  - 11) A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm and S. Chu: "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," *Optics Lett.*, **11** (1986) 288-290.
  - 12) A. Ashkin, J. M. Dziedzic and T. Yamane: "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams," *Nature*, **330** (1987) 769-771.
  - 13) 富重道雄, 楠見明弘: "一粒子追跡法と光ピンセット法による膜タンパク質の動態解析", *日本生理学雑誌*, **59** (1997) 11-22.
  - 14) S. M. Block: "Making light work with optical tweezers," *Nature*, **360** (1987) 493-495.
  - 15) 鈴木直哉, 木下一彦: "光ピンセット", *生体の科学*, **44** (1993) 159-165.
  - 16) 斎藤 究, 柳田敏雄: "光ピンセット法による分子操作とナノ計測", *蛋白質 核酸 酵素*, **39** (1994) 1344-1349.
  - 17) A. Kusumi, Y. Sako, T. Fujiwara and M. Tomishige: "Methods in Cell Biol. 55," Application of laser tweezers to studies of the fences and tethers of the membrane skeleton which regulate the movements of plasma membrane proteins, *Laser Tweezers*, ed. M. P. Sheetz (Academic Press, California, 1998) pp. 173-194.
  - 18) Y. Sako and A. Kusumi: "Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether," *J. Cell Biol.*, **129** (1995) 1559-1574.
  - 19) A. Kusumi and Y. Sako: "Cell surface organization by the membrane skeleton," *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8** (1996) 566-574.
  - 20) Y. Sako, A. Nagafuchi, S. Tsukita, M. Takeichi and A. Kusumi: "Cytoplasmic regulation of the movements of E-cadherin in the plasma membrane as studied by optical tweezers and single particle tracking," *J. Cell Biol.*, **140** (1998) 1227-1240.