

# Hopping fences

あらゆる細胞を包む脂質膜のなかで動きまわるタンパク質の様子はどんな具合なのかは長く議論が絶えなかった。だがついに、ある日本人研究者が超高速度カメラを用いて、このタンパク質の「ダンス」をかつてないほど詳細に撮影することに成功した。それでも論争の決着がつくのはまだ先のような。Alison Abbott が報告する。

## 壁を 飛び越える タンパク質



Alison Abbott Nature Vol.433 (680-682)/17 February 2005

楠見明弘は、細胞膜中で動くタンパク質をカメラに収めた。

灰色の背景のなかで激しく震え動く1個の分子を撮影した、ざらついたモノクロフィルムを楠見明弘が上映すると、聴衆にざわめきが起った。この映像を初めて見た者は、驚きのあまり口をぽかんと開け、そして疑念の目を向けた。質問が矢継ぎ早に飛んできた。「いったい何を測定したのか」「どんな方法で行ったのか」「速い分子の動きを本当にカメラに収めたのか」

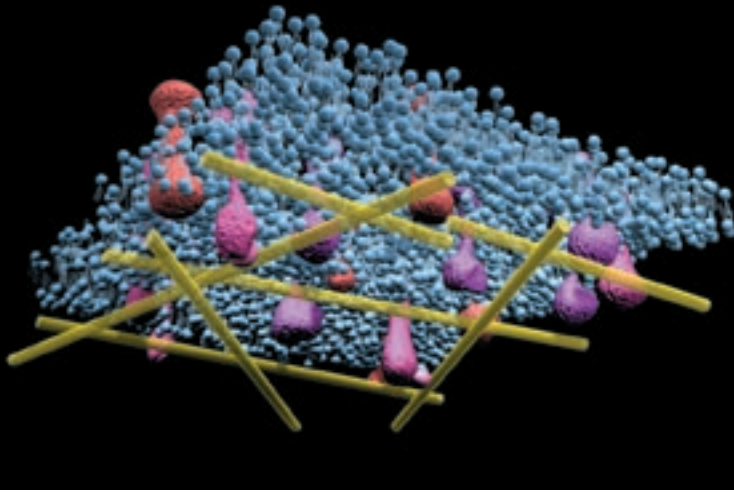
フィルムが上映されたのは、昨年秋にイタリアで開催された会議の席上だった。楠見は壇上から、哺乳動物の生細胞を包む脂質膜中のタンパク質の動きを、ミリ秒単位、ナノメートルのスケールで捕えたことを発表した。膜研究の分野では数十年来、これほど詳細にタンパク質の動きを観察した者は誰もいなかった。

楠見は解析結果を元に、細胞の膜動態を広い視野で説明する「ホップ拡散」仮説を提案した。分子は膜のなかを異常な速さで動いているが、細胞のアクチン細胞骨格（細胞の形状を保つ繊維の編み目）が作る「フェンス」によって狭い空間に閉じこめられていると楠見は言う。そして、閉じこめられていたタンパク質分子が時にフェンスの上を飛び越えて移動（ホップ）する。その結果、タンパク質分子が比較的緩やかな速度で長い距離を移動したように見えることになる（20ページの左上を参照）。

どちらかと言えば単純なこの仮説は、とても革新的な考えのように思われなくてもいいかもしれない。けれども、膜の生物物理学の分野にはセンセーションを巻き起こした。楠見の仮説が正しければ、タンパク質が膜の内部でどのように動

いているのかという長年の謎が解かれることになる。そしておそらくさらに重要な点として、細胞外から飛び込んでくるシグナルが膜を介して細胞内へと伝達される仕組みに光が当てられることになるだろう。シグナル伝達の一連の過程は、健康時や病気の際の細胞の挙動に中心的な役割を果たす。シグナル伝達の詳細を明らかにすることは現在、大きな課題なのだ。細胞生物学者や分子生物学者は、細胞膜と結合してシグナルを運んでいるとみられるタンパク質の同定に長年取り組んできた。だが、細胞内でタンパク質どうしがタイミングよく遭遇して情報をやりとりする仕組みはまだ説明できていない。

楠見の得た成果は、この数年、膜の生物物理学の研究者たちの中で議論を呼んでいる。過去に楠見は、論文の発



細胞膜の構造：脂質二重層（青色）には、さまざまなタンパク質が浮かぶ。細胞膜を裏から支えるアクチン細胞骨格（黄色）は、タンパク質の動きを制限している可能性がある。

表にも手こずる経験をした。これはある面では、従来誰も考え得なかった新技術、特に爆発の研究分野で用いられてきた超高速撮影技術を持ち込んだ学際的アプローチを楠見が採用したためでもある。しかし、この数年間で彼の成果は広く受け入れられつつある。それでもなお、実験結果に対する彼の大胆な解釈には異論を唱える研究者も少なくはない。

### 撮影監督

楠見は現在、研究の場を京都大学へと移しつつある。性格は底抜けに明るく、自説に対する批判も冷静に受けとめているようだ。前向きに物ごとを考え、ユーモアを片時も忘れない。研究対象であるタンパク質分子のように、狭いところに閉じこめられるのは好まない。そして科学の狭い専門領域にも収まるうとはしない。「大学では物理学と生物学を学びました。博士号は生物物理学で取りました」と楠見は語る。「研究人生の大半を装置相手に過ごしていると思われることが多いのですが、実際は頭のなかは生物学のことで常に一杯です」こうした背景からか、生物物理学と細胞生物学という2つの学問領域の橋渡しをするようになった。

楠見が独立して自分の研究室をもったのは1980年代の初めのことだ。当時、膜動態の作業仮説は、「流動モザイクモデル」だった。1972年に提出されたこのモデルでは、膜をタンパク質分子

を保持する脂質二重層と見たてる（上の写真）。一部のタンパク質は細胞外から入り込み、「脂質二重層」を通過して細胞内へと侵入する。また別の一群のタンパク質は、脂質層の外側に留まり、分子の頭部を膜から突き出す。細胞内から膜の内層へともぐり込むタンパク質もある。流動モザイクモデルによれば、膜タンパク質は固定されてはならず、脂質だらけの環境内をブラウン運動で自由に拡散可能である。ブラウン運動とは、熱エネルギーによる原子および分子のランダムな動きのことだ。

構造に関するこのような解釈は、現在でもほぼ妥当であるとされており、生化学的および顕微鏡レベルの証拠でも支持されている<sup>1</sup>。しかし、ブラウン運動だけで細胞膜中の分子が動くというこの仮説には大きな問題がある。

1980年代になると、生細胞中で膜のなかを動くタンパク質の速度は、実験室で調製可能な脂質を材料とする単純な人工膜中における移動速度と比べ、最大100倍も遅いことが生物物理学者たちの共通認識となった。このため、生きている細胞の膜のなかでは、何かタンパク質の自由拡散を抑えているはずだと研究者たちは考えるようになった。

### ラフト仮説

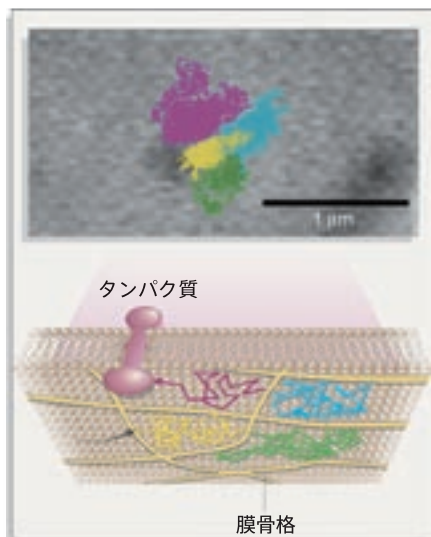
一方で細胞生物学者たちは、タンパク質が自由拡散で動くという考え方そのものにも疑問を抱くようになっていた。

自由拡散では、膜タンパク質の機能に関して当時続々と得られていた実験結果を説明できなかったのだ。多くの膜タンパク質は、細胞内シグナル伝達の複雑な過程に関与している。一般的なシグナルには、ホルモンや成長因子と、細胞から突き出した膜透過型受容体タンパク質の一部分との結合がある。両者の結合によって受容体はその形状を変え、脂質の海に浮かぶ他のタンパク質との一連の相互作用が誘導され、メッセージが細胞内にある適切な装置へと伝えられてゆく。

細胞生物学者と分子生物学者たちは、シグナル伝達経路に関与するタンパク質を多数見つけており、1990年代までには、一連のタンパク質が正しい時期に正しい場所に適切に集合して、確実に情報を交換する機構を説明するためには、自由拡散だけでは不十分だと考えるようになっていた。数多くのシグナル伝達分子を集合させるためには、膜のなかに高次の構造が存在する必要があるのは明らかだった。

そこで新しい仮説が登場する。タンパク質の動きが、さまざまな脂質混合物の物理化学的な特徴による制約を受けると考える、「脂質ラフト（いかに）仮説」がそれだ。この仮説では、細胞膜中のさまざまな脂質は、従来考えられていたようにランダムに分布しているのではなく、クラスターを形成可能であると想定する。そしてこのクラスターは、膜の他の部分と比べて粘性が高いとされる<sup>2</sup>。特定の脂質からなるこのような「浮遊するラフト」は、一部のタンパク質に好ましい環境をもたらす、限られた領域にタンパク質が効率よく閉じこめられることになる。シグナル伝達が始まる際には、複数の小さなラフトが集合することで、適切なタンパク質がすべて同じ部位に同時に揃うことになる。

ラフト仮説の登場は、細胞のシグナル伝達の動態を考える上で渡りに船であった。しかし疑問もあった。ラフトの存在は、顕微鏡下でこそ認められるが、その証拠の多くは間接的なものであり、



### フェンスに注意

楠見の仮説では、細胞内部の骨格（黄色）が、細胞膜内においてフェンスの役割を果たすとされている。タンパク質は、フェンスで囲まれた1つの区画の内側を高速で動きまわり、フェンスにぶつかると別の区画へとホップする。上の写真は数万コマの写真を合成したもので、約1秒間におけるタンパク質の位置がわかる。フェンスで囲まれた各区画内で動きまわるタンパク質の進路を示す線を同じ色で示してある。

解析対象細胞の調製段階で生じた人為的な産物ではないかと考える研究者もいる。未確認飛行物体(UFO)ならぬ、「未確認浮遊物体」と表現した者までいた。

### 撮影快調

ラフトが懸案の疑問に対する答えでないのなら、タンパク質分子群を狭い空間に長期間閉じこめて適切な相互作用を可能としている実体は何だろうか。その答えを得るためには、1個の分子の動きを追うしかないと思われ、楠見は判断した。そして、直径20～40 nmの金コロイド粒子を膜タンパク質に結合させ、それをビデオで撮影する方法を確立した。ラットの腎細胞を用いた最初の観察では、標識タンパク質がホップしながら拡散する様子をはっきりと確認できた<sup>3</sup>。金粒子は、膜の狭い領域を激しく動きまわった後に、近くの別の領域に飛び込むように見えた。膜全体をほとぼりの速度でランダムに動くのではなく、ラフトに留まっているわけでもなかった。

楠見は、この区画が維持される理由

は、細胞内の細胞骨格であるアクチンフィラメントから成るフェンスが膜の下面を押しているからだと推測した。この考え方は、コロビア大学(ニューヨーク)の生物物理学者 Michael Sheetz による理論研究を拡張するものだ。Sheetz は1983年に初めて、膜貫通型タンパク質が細胞骨格ネットワークによって拘束されている可能性を、赤血球を対象に提案した<sup>4</sup>。

しかし、赤血球を含む他の細胞を対象に、タンパク質がホップする様子を観察しようとしてもその現場を押さえることはできなかった。楠見が得たデータは、タンパク質はフェンスに囲まれていると考えられる領域に長く留まることごとく膜中を自由に動きまわっていることを示しているようだった。使用したカメラの空間分解能は、狭い領域において推定される小刻みな動きを捕えるのに十分であると楠見は思っていた。だがどうやらシャッタースピードが十分ではないのではないかと疑った。

この謎を明らかにするためには、さらに高速度の撮影が可能でカメラが必要だった。「爆発の研究者なら、シャッタースピードの非常に速いカメラを使っているのではないかと思います。マンハッタン計画で原爆開発に従事した研究者たちが爆発の瞬間を撮影していたことを思い出したのです」と楠見は語る。そこで、市販されている数台の最新モデルのカメラを調べてみたが、いずれも爆発研究用のものであり、微小な世界をのぞく仕様のもはなかった。

楠見は、とりあえず1秒間に4万コマの撮影が可能でカメラを1台手に入れた。この25マイクロ秒というシャッタースピードは、彼が従来使っていたカメラの1,000倍に相当する。「そのカメラを研究室にある顕微鏡に接続して、システムの条件を調整してゆくしか方法はありませんでした」と楠見は語る。一言に「調整する」とはいえ、やらなければならないことは数多くあった。コントラストを向上させ、カメラと顕微鏡と細胞のいずれにも適した光源を取

り付け、そして何よりも、データ解析速度を上げる必要があった。コンピューターの専門家から物理学者、生化学者に及ぶ20人からなる学際的な彼のチームでなければ、一見単純な映像を撮影するための複雑な装置の完成はおぼつかなかっただろうと楠見は振り返る。

### シャッターチャンス

新たなシステムが完成し、研究チームはすぐに、さまざまな細胞におけるホップ拡散の観察を始めた。平均して1～1,000ミリ秒間に1回のホップを、幅が約30～200ナノメートルの膜区画で観察することにした。その結果、生体膜と人工膜との間にみられる拡散速度の差を説明することができた。タンパク質分子は、どちらの膜でも同程度の速い速度で動いていた。しかし生体膜の場合は、タンパク質の進路がフェンスで妨げられ、このため長距離に及ぶ拡散の速度は遅くなっていた。「ホップの瞬間は、解像度が30ミリ秒程度のビデオカメラでは確認できていなかったのです」と楠見は語る。「30ミリ秒以下の世界でさまざまな現象が起こっていることになりました」

「実験の結果には満足でしたが、謎が残っていることは承知していました」と楠見は語る。つまり、タンパク質だけが膜の内部を動いているのではなく、脂質も動いているのではないかとという点だ。脂質も動くのであれば、たとえ脂質膜の外層と、膜を裏打ちする細胞骨格との間の距離が広くとも、通常の細胞では、拡散が人工膜の場合より遅く見えると考えられる。

脂質を標識して追跡することは、タンパク質の場合と比べてはるかに困難なことがわかってきた。しかし2年の歳月と数千本のフィルムを使用した結果、脂質もホップすることを示す統計的に信頼できる結果を得ることに成功した<sup>5</sup>。脂質は、1～100ミリ秒間に1回ホップしていた。この動きは、膜全体を動きまわる一部のタンパク質が細胞骨格から成るフェンスに固定されており、こ

のためフェンスのポスト（柱）またはピケット（杭）として作用するためであると楠見は考えた。この柱と杭が、膜脂質の動きを制限する囲いの境界となるというわけだ。

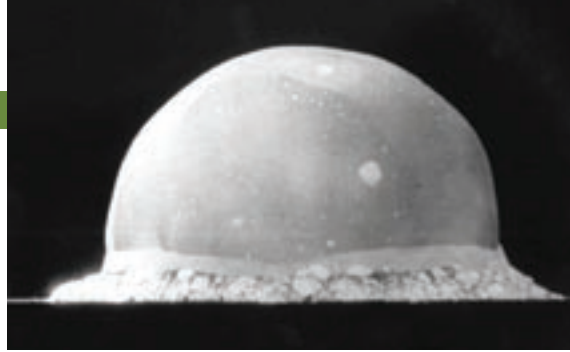
2001年から楠見は、それまで得られた結果と彼なりの解釈、そして膜がその秩序を保つ仕組みに関する一般的な見解を発表し始めた。同時に研究室では他方面からの実験を行い、仮説の正当性を固めていった<sup>6</sup>。電子顕微鏡とコンピューターによる細胞骨格の断層撮影、最新型の分光計による測定、そして分子ピンセットなどのハイテク技術による実験の結果<sup>7</sup>、フェンスで囲まれた区画の大きさが明らかになったと楠見は語る。また分子がフェンスを越えるのに必要な力が、仮説から推定される値と矛盾しないこともわかった。ただ、ラフトが細胞内シグナル伝達の開始に何らかの役割を果たしている現場を押さえることはできなかった。

自作のハイテク装置を用いて導かれた楠見の大胆な仮説は、同じ分野の研究者たちにインパクトを与えた。「楠見が膜の生物物理学の領域に大きな影響を与えたのは確かです」と、ノースカロライナ大学（チャペルヒル）の細胞生物学者 Ken Jacobson は語る。「彼は、この研究領域の限界をもっと先まで延ばしました」

自身も、楠見のチームが用いた機材ほど高速ではないビデオカメラで細胞膜中の1個の粒子を追跡している Jacobson は、「ホップ拡散モデル」は同業者から「ある程度」は受け入れられているとコメントしている。完全に賛意を得るまでに至っていない主な理由は、楠見の結果を別途独自に確認するための高速度カメラを、他の研究グループが持ち合わせていない点にあると Jacobson は指摘する。

## 金の話

別の問題は、追跡に使用される金粒子が比較的大きいことにある。金の粒子は、一部の区画より大きい場合もある。



1945年に撮影された核爆発から0.16秒後の写真。類似の撮影法が今日、細胞内分子の画像化に用いられている。

楠見は、金粒子をただ1個の分子と確実に結合させるために、時間をかけた大規模な対照実験を実施していると話した。彼をよく知る研究者たちによれば、楠見は実験に過剰なまでの厳密さを求めることで知られており、その技術的手腕には定評があると Jacobson も語る。「それでも40ナノメートル程度の粒子が実験の結果に何らかの影響を及ぼす可能性があることを否定できないのです」

楠見が観察した「フェンス-ピケット」モデルに異を唱える者たちもいると、インドの国立生物科学センター（バンガロール）の細胞生物学者 Jitu Mayor は語る。生細胞の膜のなかでタンパク質が単に集中することで、比較的低速度のタンパク質の動きを説明できるのではないかと考える研究者もいるというのだ。しかし、楠見ほどこの問題に真剣に挑み、広範囲に及ぶ相互に矛盾のない仮説を提示し、その妥当性の検証に取り組んでいる者はいないというのが Mayor の見方だ。「ライバルたちは、検証可能な予測さえ示していないのです」

楠見は、実験に明け暮れて自説を補強しているだけではない。ラフト仮説に関する疑問をめぐっては、自ら進んで中立を保とうともしている。必要なタンパク質の集合完了後に細胞がシグナル伝達過程を開始するのであれば、ラフト仮説の正しさを示す何らかの証拠が得られるはずだと楠見はみている。「分子がシグナルによる刺激を受けてクラスターを形成するところは捕えています。これがラフトであると見なせないことはありません」と、未発表の研究に言及して楠見は語る。「けれども、刺激を受

けていない細胞膜では、ラフトを見いだせません」

マックス・プランク細胞生物学会（独ドレスデン）の代表を務め、ラフト仮説の有力な擁護者の1人でもある Kai Simons は、この結果に満足げだ。楠見が細胞のシグナル伝達の開始前にラフトを見つけれられない

のであれば、おそらくその理由は、金粒子が実験系を大きく揺るがせているためであると Simons は語る。刺激を受けた細胞膜の挙動に関しては、自分と楠見の間には意見の相違はないと Simons は述べている。

楠見は、自説に向けられた批判を正面から受けとめている。その一方で、笑い飛ばす余裕も持ち合わせている。「新しいアイデアは理解されにくいものです。それに物理学者たちはブラウン運動が大好きですから」

楠見は前進を続けるつもりだ。研究対象は、細胞膜のタンパク質と、組織移植用のナノ材料との間の相互作用の観察にまで広げつつある。楠見はこの4月に、古巣の名古屋大学を後にして、境界領域を渡り歩く自らの傾向を反映するような名称の施設、「京都大学再生医科学研究所」へと移る予定だ。楠見が研究の場を変えるのは今回が初めてではない。これまでも約8年ごとに新たな環境に身を置いてきた。「私の人生は、ホップ拡散原理に従っているのです」と笑う。でも幸いなことに、楠見自身の姿をカメラに収めることには苦勞せずに助かった。 ■

## Alison Abbott はネイチャーのヨーロッパ上級特派員。

1. Edidin, M. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 414–418 (2003).
2. Simons, K. & Ikonen, E. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
3. Kusumi, A., Sako, Y. & Yamamoto, M. *Biophys. J.* **65**, 2021–2040 (1993).
4. Sheetz, M. P. *Semin. Hematol.* **20**, 175–188 (1983).
5. Murase, K. et al. *Biophys. J.* **86**, 4075–4093 (2004).
6. Kawasaki, K., Yin, J. J., Subczynski, W. K., Hyde, J. S. & Kusumi, A. *Biophys. J.* **80**, 738–748 (2001).
7. Nakada, C. et al. *Nature Cell Biol.* **5**, 626–632 (2003).