

These filaments were again assumed not to contribute to forming membrane corrals. The second and third classes of filaments are drawn in red in Fig. 6 C.

There were regions that were not amenable to such analysis. They were the areas where bundles of actin filaments were present [e.g., the structure crossing diagonally from the bottom left to the top right in Fig. 5], actin filaments were too crowded to be individually discerned, an actin filament was terminated in the middle of a domain (domains that contain a loose end of an actin filament), or CCPs, caveolae, and the smooth surface membrane invaginations were present. They were excluded from this analysis (Fig. 7 C, white regions).

#### Online supplemental material

Video 1 shows a series of 131 tilt images of the undercoat structure on the cytoplasmic surface. Video 2 presents a 3D reconstructed image of the undercoat structure on the cytoplasmic surface of the plasma membrane, which is shown by rotating the reconstructed image. Video 3 shows a series of 97 tilt images of the MSK in an NRK cell, and Video 4 shows a series of 121 sliced images of every 0.85 nm of the MSK of an NRK cell calculated from the data shown in Video 3. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200606007/DC1>.

We thank Y. Hirota (FEI) for her help in starting us with electron tomography, Drs. T. Baba and S. Ohno (Yamanashi University Medical School) for their help in preparing large platinum replicas, Dr. Mitsutoshi Setou (Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences) for encouragement, and Dr. J. Heuser (Washington University) for helpful discussions and encouragement.

This research was supported, in part, by a Health Labor Sciences Research grant (nano-001 to N. Morone), a National Institute of Biomedical Innovation grant (05-32 to S. Yusa), and Grants-in-Aid for Scientific Research and on Priority Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (to J. Usukura and A. Kusumi).

Submitted: 2 June 2006

Accepted: 4 August 2006

## References

- Apgar, J.R., and M.F. Mescher. 1986. Agorins: major structural proteins of the plasma membrane skeleton of P815 tumor cells. *J. Cell Biol.* 103:351–360.
- Bennett, V. 1990. Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol. Rev.* 70:1029–1065.
- Bennett, V., and L. Chen. 2001. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:61–67.
- Branton, D., C.M. Cohen, and J. Tyler. 1981. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell.* 24:24–32.
- Bussell, S.J., D.A. Hammer, and D.L. Koch. 1994. The effect of hydrodynamic interactions on the tracer and gradient diffusion of integral membrane proteins in lipid bilayers. *J. Fluid Mech.* 258:167–190.
- Bussell, S.J., D.L. Koch, and D.A. Hammer. 1995. Effect of hydrodynamic interactions on the diffusion of integral membrane proteins: diffusion in plasma membranes. *Biophys. J.* 68:1836–1849.
- Byers, H.R., and K.R. Porter. 1977. Transformations in the structure of the cytoplasmic ground substance in erythrocytes during pigment aggregation and dispersion. I. A study using whole-cell preparations in stereo high voltage electron microscopy. *J. Cell Biol.* 75:541–558.
- Discher, D.E., R. Winardi, P.O. Schischmanoff, M. Parra, J.G. Conboy, and N. Mohandas. 1995. Mechanochemistry of protein 4.1's spectrin-actin-binding domain: ternary complex interactions, membrane binding, network integration, structural strengthening. *J. Cell Biol.* 130:897–907.
- Edidin, M., S.C. Kuo, and M.P. Sheetz. 1991. Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers. *Science.* 254:1379–1382.
- Fujimoto, K. 1995. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J. Cell Sci.* 108:3443–3449.
- Fujimoto, K., M. Umeda, and T. Fujimoto. 1996. Transmembrane phospholipid distribution revealed by freeze-fracture replica labeling. *J. Cell Sci.* 109:2453–2460.
- Fujimoto, L.M., R. Roth, J.E. Heuser, and S.L. Schmid. 2000. Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic.* 1:161–171.
- Fujiwara, T., K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, and A. Kusumi. 2002. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J. Cell Biol.* 157:1071–1081.
- Gaidarov, I., F. Santini, R.A. Warren, and J.H. Keen. 1999. Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat. Cell Biol.* 1:1–7.
- Hartwig, J.H., and H.L. Yin. 1988. The organization and regulation of the macrophage actin skeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 10:117–125.
- Hartwig, J.H., and M. DeSisto. 1991. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J. Cell Biol.* 112:407–425.
- Hartwig, J.H., K.A. Chambers, and T.P. Stossel. 1989. Association of gelsolin with actin filaments and cell membranes of macrophages and platelets. *J. Cell Biol.* 108:467–479.
- Heuser, J.E. 1983. Procedure for freeze-drying molecules adsorbed to mica flakes. *J. Mol. Biol.* 169:155–195.
- Heuser, J.E., and M.W. Kirschner. 1980. Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 86:212–234.
- Heuser, J.E., and R.G. Anderson. 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* 108:389–400.
- Hirokawa, N., and J.E. Heuser. 1981. Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 91:399–409.
- Iino, R., I. Koyama, and A. Kusumi. 2001. Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys. J.* 80:2667–2677.
- Jacobson, K., E.D. Sheets, and R. Simson. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science.* 268:1441–1442.
- Katayama, E. 1998. Quick-freeze deep-etch electron microscopy of the actin-heavy meromyosin complex during the in vitro motility assay. *J. Mol. Biol.* 278:349–367.
- Kinoshita, M., C.M. Field, M.L. Coughlin, A.F. Straight, and T.J. Mitchison. 2002. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev. Cell.* 3:791–802.
- Kremer, J.R., D.N. Mastrorade, and J.R. McIntosh. 1996. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J. Struct. Biol.* 116:71–76.
- Kusumi, A., and Y. Sako. 1996. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:566–574.
- Kusumi, A., C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R.S. Kasai, J. Kondo, and T. Fujiwara. 2005. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:351–378.
- Lucic, V., F. Forster, and W. Baumeister. 2005. Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 74:833–865.
- Luna, E.J., and A.L. Hitt. 1992. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science.* 258:955–964.
- McIntosh, R., D. Nicastro, and D. Mastrorade. 2005. New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol.* 15:43–51.
- Medalia, O., I. Weber, A.S. Frangakis, D. Nicastro, G. Gerisch, and W. Baumeister. 2002. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science.* 298:1209–1213.
- Merrifield, C.J., M.E. Feldman, L. Wan, and W. Almers. 2002. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat. Cell Biol.* 4:691–698.
- Mohandas, N., and E. Evans. 1994. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:787–818.
- Moritz, M., M.B. Braunfeld, V. Guenebaut, J. Heuser, and D.A. Agard. 2000. Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* 2:365–370.
- Murase, K., T. Fujiwara, Y. Umemura, K. Suzuki, R. Iino, H. Yamashita, M. Saito, H. Murakoshi, K. Ritchie, and A. Kusumi. 2004. Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys. J.* 86:4075–4093.
- Pan, Z., T. Kao, Z. Horvath, J. Lemos, J.Y. Sul, S.D. Cranston, V. Bennett, S.S. Scherer, and E.C. Cooper. 2006. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J. Neurosci.* 26:599–613.
- Parton, R.G. 2003. Caveolae—from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:162–167.
- Perkins, G.A., C.W. Renken, J.Y. Song, T.G. Frey, S.J. Young, S. Lamont, M.E. Martone, S. Lindsey, and M.H. Ellisman. 1997. Electron tomography of large, multicomponent biological structures. *J. Struct. Biol.* 120:219–227.

- Pollard, T.D., and J.A. Cooper. 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 55:987–1035.
- Qualmann, B., M.M. Kessels, and R.B. Kelly. 2000. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 150:F111–F116.
- Rothberg, K.G., J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney, and R.G. Anderson. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68:673–682.
- Rutter, G., W. Bohn, H. Hohenberg, and K. Mannweiler. 1988. Demonstration of antigens at both sides of plasma membranes in one coincident electron microscopic image: a double-immunogold replica study of virus-infected cells. *J. Histochem. Cytochem.* 36:1015–1021.
- Sako, Y., and A. Kusumi. 1994. Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell Biol.* 125:1251–1264.
- Sako, Y., and A. Kusumi. 1995. 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.* 129:1559–1574.
- Sako, Y., A. Nagafuchi, S. Tsukita, M. Takeichi, and A. Kusumi. 1998. Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 140:1227–1240.
- Sanan, D.A., and R.G. Anderson. 1991. Simultaneous visualization of LDL receptor distribution and clathrin lattices on membranes torn from the upper surface of cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* 39:1017–1024.
- Saxton, M.J. 1989. The spectrin network as a barrier to lateral diffusion in erythrocytes. A percolation analysis. *Biophys. J.* 55:21–28.
- Saxton, M.J. 1990. The membrane skeleton of erythrocytes. A percolation model. *Biophys. J.* 57:1167–1177.
- Saxton, M.J., and K. Jacobson. 1997. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:373–399.
- Schoenenberger, C.A., M.O. Steinmetz, D. Stoffler, A. Mandinova, and U. Aebi. 1999. Structure, assembly, and dynamics of actin filaments in situ and in vitro. *Microsc. Res. Tech.* 47:38–50.
- Sheetz, M.P. 1983. Membrane skeletal dynamics: role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. *Semin. Hematol.* 20:175–188.
- Sheetz, M.P., and D. Sawyer. 1978. Triton shells of intact erythrocytes. *J. Supramol. Struct.* 8:399–412.
- Sheetz, M.P., J.E. Sable, and H.G. Dobereiner. 2006. Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35:417–434.
- Shen, B.W., R. Josephs, and T.L. Steck. 1986. Ultrastructure of the intact skeleton of the human erythrocyte membrane. *J. Cell Biol.* 102:997–1006.
- Suzuki, K., K. Ritchie, E. Kajikawa, T. Fujiwara, and A. Kusumi. 2005. Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques. *Biophys. J.* 88:3659–3680.
- Takeuchi, M., H. Miyamoto, Y. Sako, H. Komizu, and A. Kusumi. 1998. Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 74:2171–2183.
- Tomishige, M., Y. Sako, and A. Kusumi. 1998. Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 142:989–1000.
- Tsuji, A., and S. Ohnishi. 1986. Restriction of the lateral motion of band 3 in the erythrocyte membrane by the cytoskeletal network: dependence on spectrin association state. *Biochemistry.* 25:6133–6139.
- Tsuji, A., K. Kawasaki, S. Ohnishi, H. Merkle, and A. Kusumi. 1988. Regulation of band 3 mobilities in erythrocyte ghost membranes by protein association and cytoskeletal meshwork. *Biochemistry.* 27:7447–7452.
- Tsukita, S., S. Tsukita, and H. Ishikawa. 1980. Cytoskeletal network underlying the human erythrocyte membrane. Thin-section electron microscopy. *J. Cell Biol.* 85:567–576.
- Tsukita, S., S. Yonemura, and S. Tsukita. 1997. ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem. Sci.* 22:53–58.
- Ursitti, J.A., D.W. Pumplin, J.B. Wade, and R.J. Bloch. 1991. Ultrastructure of the human erythrocyte cytoskeleton and its attachment to the membrane. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 19:227–243.
- Usukura, J., and E. Yamada. 1987. Ultrastructure of the synaptic ribbons in photoreceptor cells of *Rana catesbeiana* revealed by freeze-etching and freeze-substitution. *Cell Tissue Res.* 247:483–488.
- Valentijn, J.A., K. Valentijn, L.M. Pastore, and J.D. Jamieson. 2000. Actin coating of secretory granules during regulated exocytosis correlates with the release of rab3D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:1091–1095.
- Wuestehube, L.J., and E.J. Luna. 1987. F-actin binds to the cytoplasmic surface of ponticulins, a 17-kD integral glycoprotein from *Dicystidium discoideum* plasma membranes. *J. Cell Biol.* 105:1741–1751.
- Zeuschner, D., W.J. Geerts, E. van Donselaar, B.M. Humbel, J.W. Slot, A.J. Koster, and J. Klumperman. 2006. Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COP11-coated transport carriers. *Nat. Cell Biol.* 8:377–383.



## Characterization of multimetric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering

Sachio Naito<sup>a,b,\*</sup>, Hideki Mochizuki<sup>b</sup>, Toru Yasuda<sup>b</sup>, Yoshikuni Mizuno<sup>b</sup>,  
Michihiro Furusaka<sup>c</sup>, Susumu Ikeda<sup>c</sup>, Tomohiro Adachi<sup>d</sup>, Hirohiko M. Shimizu<sup>d</sup>,  
Junichi Suzuki<sup>e</sup>, Satoru Fujiwara<sup>e</sup>, Tomoko Okada<sup>f</sup>, Kaori Nishikawa<sup>f</sup>,  
Shunsuke Aoki<sup>f</sup>, Keiji Wada<sup>f</sup>

<sup>a</sup> High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0801, Japan

<sup>b</sup> Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo 113-8421, Tokyo, Japan

<sup>c</sup> Department of Mechanical Intelligence Engineering, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Kita 13, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo 060-8628, Japan

<sup>d</sup> RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

<sup>e</sup> Japan Atomic Energy Research Institute, 2-4 Tokaimura-shirakata-shirane, Naka-gun, Ibaraki 319-1195, Japan

<sup>f</sup> Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, National Centre of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

Received 4 November 2005

Available online 21 November 2005

### Abstract

Here, we illustrated that the morphological structures of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) variants and Parkinson's disease (PD) exhibit good pathological correlation by a small-angle neutron scattering (SANS). UCH-L1 is a neuro-specific multiple functional enzyme, deubiquitinating, ubiquitinyl ligase, and also involved in stabilization of mono-ubiquitin. To examine the relationship between multiple functions of UCH-L1 and the configuration of its variants [wild-type, I93M (linked to familial Parkinson's disease), and S18Y (linked to reduced risk of Parkinson's disease)], in this report, we proposed that these were all self-assembled dimers by an application of a rotating ellipsoidal model; the configurations of these dimers were quite different. The wild-type was a rotating ellipsoidal. The globular form of the monomeric component deformed by the I93M mutation. Conversely, the S18Y polymorphism promoted the globularity. Thus, the multiple functional balance is closely linked to the intermolecular interactions between the UCH-L1 monomer and the final dimeric configuration.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Small-angle neutron scattering; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1; Structure in water; Parkinsonism

Although there are papers using neutron scattering to study the behavior of proteins in whole cells, this paper is actually about the conformation of a protein in solution. The crystal structure analysis of proteins by X-ray has advanced our understanding of the correlation between biological function and structure. Small-angle X-ray scattering and neutron scattering are useful analytical

methods to determine the configuration of proteins in water, such as hen egg-white lysozyme [1,2], myoglobin, hemoglobin,  $\alpha$ -lactalbumin, ribonuclease [3], and bovine serum albumin [4]. Recently, in the field of small- and wide-angle X-ray scattering measurement, intense X-ray beams became available at third-generation X-ray sources; however, radiation damage to biomacromolecules is acknowledged as a serious problem in modern structural biology at room temperature [5,6]. The reaction of the incident X-ray with water molecules creates hydroxyl or hydroperoxyl radicals that rapidly attach to the backbones

\* Corresponding author. Fax: +81 29 856 3202.  
E-mail address: [sachio@post.kek.jp](mailto:sachio@post.kek.jp) (S. Naito).

and/or side chains of proteins. In many cases, the interactions between the radical-activated proteins give rise to radiation-induced aggregates connected to each other by covalent and/or non-covalent bonds, such as cystine bond [6–9].

On the other hand, neutron beam generated from a cold-neutron source causes less damage to protein solution. Small-angle neutron scattering (SANS) experiments can provide useful information regarding the aggregation number, shape, and dimensions of the structure [10]. The SANS technique has been applied to analyze the conformational changes in brain protein; amyloid  $\beta$ -protein fibrillation [11–13] because SANS allows observation of amyloid aggregates in Alzheimer's disease without the anxiety of artificial aggregation caused by X-ray radiation.

A topical and biologically important issue is the mechanism of protein metabolism in living cells through the proteasome system, ubiquitination, and deubiquitination. In particular, deubiquitination is considered essential for negative regulation of proteolysis and for recycling of ubiquitin from polyubiquitin chains [14]. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) is an abundant multi-functional neuronal enzyme (1–2% of brain-soluble proteins [15]) involved in deubiquitination [14], ubiquitinyl ligase activity varied by the oligomerization in an aqueous solution [16], and stabilization of mono-ubiquitin [17,18]. The disordered neuronal functions linked to Parkinson's disease (PD) may be associated with accumulation of unnecessary proteins in cells by a dysfunctional proteasome system. The partial loss of UCH-L1 hydrolase activity in an I93M missense mutant may contribute to the disease [15]. Furthermore, an S18Y polymorphism may be associated with decreased risk of PD in Caucasian, German, and Japanese populations [19–23]. The aim of this study was to clarify whether UCH-L1 variants exist as a monomer or multimer in water without adding any chemical and physical modifications to the cysteine hydrolase and, in particular, to discuss the relation between the configuration of the variants and the risk of PD.

## Materials and methods

**UCH-L1 variants preparation.** Wild-type, I93M, S18Y, and I93/S18Y double-substituted recombinant proteins were cloned, expressed in *Escherichia coli*, and purified, as previously described [24]. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay reagent (Pierce). The purified proteins were resolved by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) under reducing conditions and visualized by Coomassie brilliant blue R-250 to confirm the purity. Each variant (0.85 mg) was dissolved into 1 ml of 40 mM Hepes buffer in deuterized water ( $D_2O$ ) containing 5 mM dithiothreitol and 0.5 mM EDTA.

**Small-angle neutron scattering.** Small-angle neutron scattering was undertaken at the High Energy Accelerator Research Organization using a wide-angle neutron diffractometer (WINK) installed at the pulsed neutron scattering facility, Tsukuba, Japan. The energy of a cold neutron beam at  $\lambda$  is 0.5–16.1 Å, while the neutron wavelength using a SANS measurement by WINK installed at KEK, is ca. 11–80 meV. We obtained good scattering curves in the momentum-transfer  $q$  range of 0.03–0.15 Å<sup>-1</sup>. Here,  $q$  is related to the Bragg angle ( $\theta$ ) by  $q = (4\pi\lambda)\sin\theta$ . For every pair of

solution and solvent, the scattering intensity was measured as a function of  $q$  and the transmissions for the neutron beam.  $T_{sol}$  and  $T_{solv}$ . After background (noise) and normalization corrections, intensity data recorded on the two-dimensional PSD were radially averaged, resulting in scattering functions of  $I(q)_{soln}$  and  $I(q)_{solv}$ . The scattering for the solvent was subtracted from that of the solution based on Eq. (1).

$$I(q) = I(q)_{soln} - I(q)_{solv}(T_{soln}/T_{solv}). \quad (1)$$

**SANS data analysis.** We obtained homology modeling structure information [(the atomic coordinates of the protein in the Protein Data Bank (PDB)) of human UCH-L1 from the highly homologous (57.7% identity) human UCH-L3 crystal structure [25] using SWISS-MODEL [26–28]]. The theoretical radius of gyration ( $R_g = 16.5$  Å) of UCH-L1 was calculated using the CRYSON program by Svergun [29,30] and the real radius,  $R$ , was calculated to be 21.5 Å ( $R = \sqrt{5/3}R_g$ ). In this measurement, the concentration of UCH-L1 variants (0.85 mg/ml, corresponding to 34  $\mu$ M) was sufficiently below  $C^*$ , the critical concentration, meaning that the molecules can disperse as a single molecule in a solvent. When a sphere protein having radius  $R$  disperses in a solution, the scattering intensity is described by

$$I(q) = \left( 3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right)^2 \quad (2)$$

where  $q$  is the momentum transfer. However, the actual SANS curves of UCH-L1 variants reflected that of dimer rather than monomer. Then, we assumed the dispersion of monomeric or dimeric and rotating ellipsoidal particle (short axis,  $a$ ; and long axis,  $b$  and  $c$ ,  $a \leq b = c$  or short axis,  $a$  and  $b$ ; and long axis,  $c$ ,  $a = b \leq c$ ) and obtained theoretical SANS curves by applying the following equation of Debye [31] based on the scattering intensity from correlations between one or two non-spherical bodies:

$$I(q) = \sum_i \sum_j f_i f_j \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}}, \quad (3)$$

where  $r_{ij}$  is the distance between any two points in the protein molecule, and  $f_i$  and  $f_j$  are the scattering lengths at each point. We assumed that the volume of the particle is retained even though the proportion of the long axis and the short one is changed. In the  $q$  range of the SANS measurement, we assumed a constant scattering factor in the UCH-L1 variants, and thus divided the rotating ellipse by the resolution of a 5 Å cube. We confirmed that the scattering curve of a spherical monomer obtained from Eq. (3) resembled that from Eq. (2). Therefore, Eq. (3) can be applied not only to the monomer but also the dimer. The scattering intensity, calculated from Debye's equation [31], was evaluated by the following equation:

$$R = \frac{\sum_q \{(mI_e(q) - n - I_c(q))q^2\}^2}{\sum_q (I_e(q)q^2)^2}, \quad (4)$$

where  $m$  is a scaling factor,  $n$  is a background factor, and  $I_e(q)$  and  $I_c(q)$  are the experimental and calculated scattering intensities, respectively. The factor,  $R$ , becomes minimum when the parameters,  $m$  and  $n$ , are changed [29,30].

**Circular dichroism.** Circular dichroism (CD) measurements were performed as described previously [24]. Purified recombinant human UCH-L1 and mutants were adjusted to a concentration of  $8.7 \times 10^{-4}$  M and dialyzed against a 20 mM Hepes buffer (pH 7.8). Far-UV CD spectra (195–250 nm) were recorded in a 1-mm quartz cuvette on a Jasco J-820 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) equipped with a temperature controller by scanning at a rate of 50 nm/min at 20 °C. For all spectra, six scans were averaged. All CD spectra were corrected by background subtraction of the spectrum obtained with the buffer alone and smoothed. The observed ellipticity was normalized to units of degrees  $cm^2 = dmol$ . The spectra were analyzed for percent secondary structural elements by a computer program based on an algorithm that compares the experimental spectra with those of known proteins [32].

## Result

### Characterization of purified recombinant human UCH-L1 proteins

To avoid artificial polymerisation among proteins by disulfide bonds, we carefully purified wild-type UCH-L1, I93M (linked to familial PD), and S18Y (linked to reduced risk of PD), and I93/S18Y double-substituted recombinant proteins (Fig. 1A) under reducing conditions as described

previously [24]. SDS-PAGE showed a single 28.9-kDa band for each of the 6HN-tagged proteins (Fig. 1B) in good agreement with the theoretical 27.8-kDa molecular mass of the 6HN-tagged UCH-L1. The expression levels for the wild-type and variant UCH-L1 proteins were equivalent. The residue 93 is proximal to the active site (C90), while the location of residue 18 is on the protein surface, distal from the active site (Fig. 1C).

### SANS analysis of tertiary structure of wild-type and human UCH-L1 variants in water

SANS curves of a protein mostly reflect the characteristics of the aggregation number, shape, and dimensions of the structure. The experimental profile for the wild-type fitted well to the theoretical SANS curve (calculated from Eq. (2), based on the distance between the center of the two particles being 43 Å) of the dimer consisting of the two spherical monomers rather than that of the monomeric one ( $R = 21.5$  Å) calculated from Eq. (2) (Fig. 2). We noted a rotating ellipsoidal monomer and dimer when the axis ( $a$ ) was changed by the resolution of a 5 Å (Fig. 3A) and calculated the theoretical curves by Eq. (3) (Fig. 3B–D). The ambiguous difference between the theoretical SANS curves of the rotating ellipsoidal monomer (Fig. 3B) and the rotating ellipsoidal dimer (Fig. 3C) was observed in the  $q$  range of 0.03–0.1. However,  $I(q)_{\text{dimer}}$  markedly diminished in the  $q$  range of 0.1–0.15, and then reached the first minimum value at  $q = 0.15$ , although the scattering intensity ( $I(q)_{\text{monomer}}$ ), gradually declined with increasing  $q$  value. Thus, the characteristic decrease of the scattering intensity

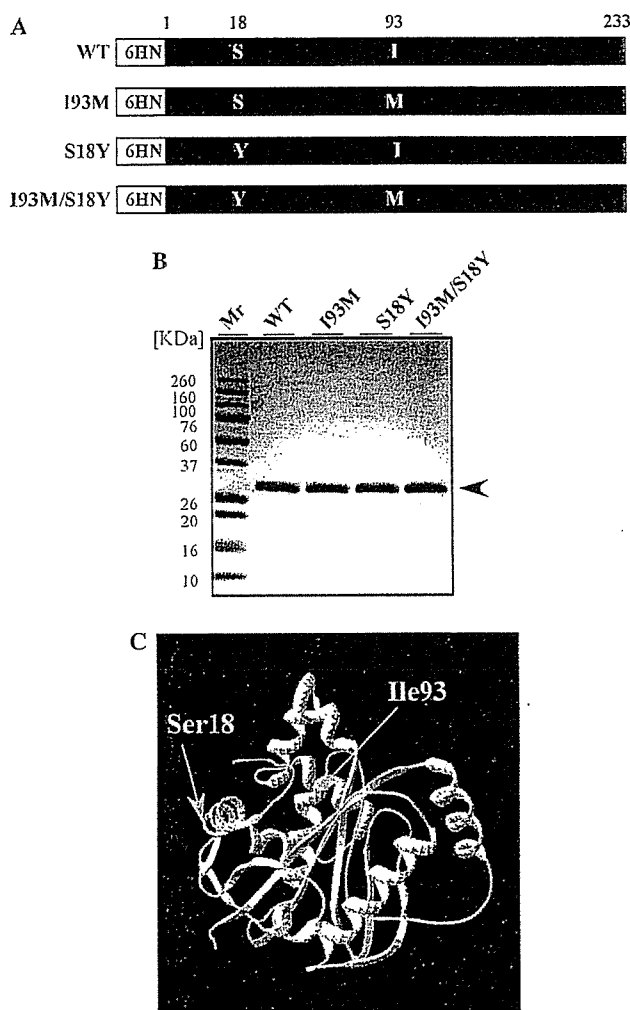


Fig. 1. Characterization and analysis of purified recombinant 6HN-tagged human UCH-L1s. (A) Schematic representation of 6HN-tagged human UCH-L1 wild-type (WT) and mutants I93M, S18Y, and I93/S18Y double-substituted recombinant. The numbers indicate the amino acid residues of the N- and C-termini of UCH-L1 (open reading frame). The positions of the point mutations are indicated. The N-terminal 6HN-tag is shown in white. (B) Visualization of recombinant human UCH-L1s by SDS-PAGE under reducing conditions and Coomassie staining. One microgram of each sample was subjected to analysis. The arrow indicates the 28.9-kDa 6HN-tagged human UCH-L1 bands. Mr, molecular weight markers (kDa). (C) The crystal structure of UCH L-1 was modeled after the crystal structure of human UCH-L3 [25] using SWISS-MODEL protein modeling [26–28]. The residue 93 is proximal to the active center (C90), while the location of residue 18 on the protein surface, distal from the active site.

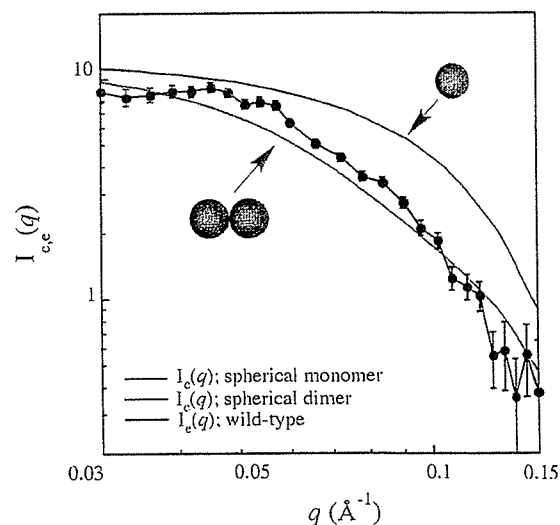


Fig. 2. The relative neutron scattering intensity ( $I(q)$ ) versus the magnitude of the scattering vector  $q$ .  $I_c(q)$  for the wild-type UCH-L1 (black closed circle). The blue line indicates theoretical curves;  $I_c(q)$ , monomeric sphere (diameter = 21.5 Å calculated from Eq. (3), based on the  $R$  ( $R = \sqrt{5/3}R_g$ ) value obtained using CRYSON program by Svergun [29,30]). The red line indicates theoretical curves;  $I_c(q)$ , dimeric spheres (calculated from Eq. (2), based on the distance between the center of the two particles being 43 Å).

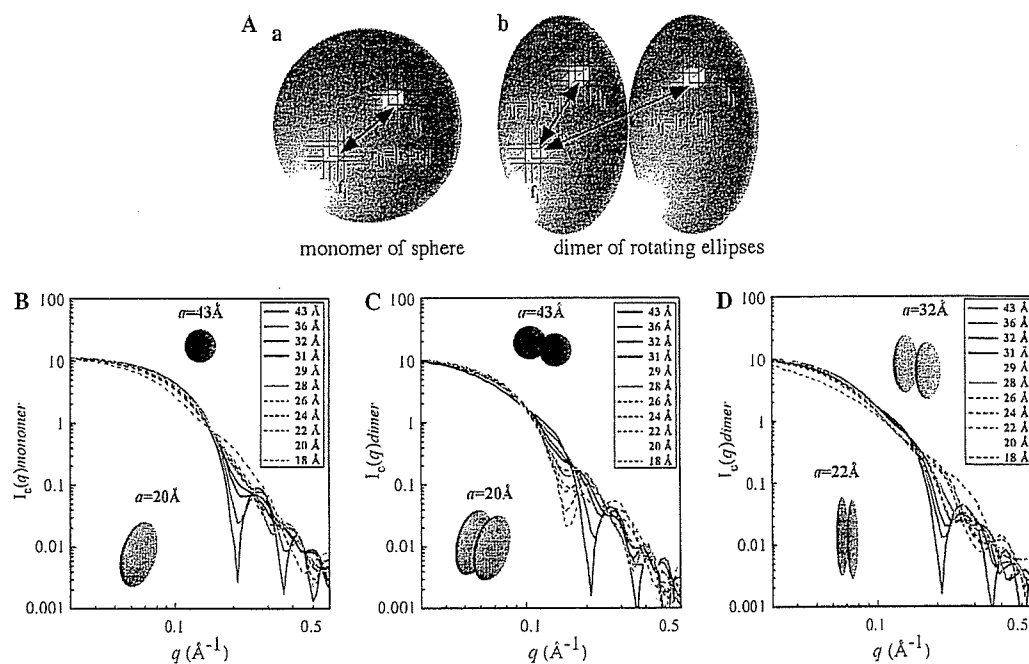


Fig. 3. Model calculations showing how ellipsoidal parameters affect the relative scattered intensity. (A) Schematic views of two body correlations. (a): monomer of a sphere. (b): dimer of rotating ellipses. In the  $q$  range of the SANS measurement, we assumed a constant scattering factor in the UCH-L1 variants, and thus divided the rotating ellipse by the resolution of a  $5 \text{ \AA}$  cube. (B)  $I_c(q)$  for the theoretical rotating ellipsoidal monomer, the remarks in the figure represent axis values of ellipsoid, e.g., when  $a$  is  $20 \text{ \AA}$ ,  $b$  and  $c$  are  $62 \text{ \AA}$ . (C)  $I_c(q)$  for the theoretical rotating ellipsoidal dimer (short axis,  $a$ ; and long axis,  $b$  and  $c$ ,  $a \leq b = c$ ). (D)  $I_c(q)$  for the theoretical rotating stick-like ellipsoidal dimer (short axis,  $a$  and  $b$ ; and long axis,  $c$ ,  $a = b \leq c$ ), the remarks in the figure represent axis values of ellipsoid, e.g., When  $a$  and  $b$  are  $22 \text{ \AA}$ ,  $c$  is  $164 \text{ \AA}$ . When  $a$  and  $b$  are  $32 \text{ \AA}$ ,  $c$  is  $78 \text{ \AA}$ .

in the  $q$  range of  $0.1$ – $0.15$  is observed on the SANS profiles of the rotating ellipsoidal dimers (short axis,  $a$ ; and long axis,  $b$  and  $c$ ,  $a \leq b = c$ ), however, not observed on the rotating stick-like ellipsoidal dimer (short axis,  $a$  and  $b$ ; and long axis,  $c$ ,  $a = b \leq c$ ) (Fig. 3D). The SANS profiles may provide the size of the rotating ellipsoidal dimers and therefore we applied this model to analyze the experimental SANS curves of UCH-L1 variants. The red lines in Fig. 4 are the best theoretical fits to a rotating ellipsoidal dimeric model determined individually for wild-type and each variant of UCH-L1s; the blue lines are those for a monomer having the same axis length. As shown in these figures, our data are consistent with this assumption in the  $q$  region. The wild-type is an ellipsoidal dimer [short axis,  $29 \text{ \AA}$ ; long axis,  $52 \text{ \AA}$  (Fig. 4A)], the I93M mutant is also an ellipsoidal dimer [short axis,  $20 \text{ \AA}$ ; long axis,  $62 \text{ \AA}$  (Fig. 4B)], the S18Y polymorphism is a spherical dimer [short axis,  $43 \text{ \AA}$ ; long axis,  $43 \text{ \AA}$  (Fig. 4C)], and the I93M/S18Y double-substituted variant is an ellipsoidal dimer [short axis,  $31 \text{ \AA}$ ; long axis,  $50 \text{ \AA}$  (Fig. 4D)]. The configuration of the aggregate was dependent on the monomeric protein structure caused by amino acid substitution. It is also quite clear that even the most deformed rotating ellipsoidal monomer never satisfies the experimental curve. The major component of UCH-L1 wild-type may exist as a dimer in water. These results imply that the most part of the wild-type and each UCH-L1 var-

iant self-assembles and exists as a dimer in water. Thus, the fitting evaluation of the difference in the size and the shape between monomer and dimer is available by analyzing the SANS curve in the optimum  $q$  range.

To address whether the observed configurational differences of the UCH-L1 variants in water reflect on altered secondary structure, we used CD spectroscopy to estimate the secondary structure in the recombinant proteins (Fig. 5A). The ratios of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, and other secondary structural features in these proteins were estimated from mean residue ellipticity data and are presented graphically in Fig. 5B. We previously indicated that relative to the wild-type, the I93M mutant displayed a slightly lower ellipticity over the range  $195$ – $200 \text{ nm}$ , indicating a decreased  $\alpha$ -helical content [24]. Relative to wild-type, the I93M substitution was also associated with the considerable increase in the content of  $\beta$ -sheet. On the other hand, the influence of the S18Y substitution on the variation of the secondary structures of UCH-L1 was smaller than that of I93M mutation, relative to the wild-type or the I93 mutant. However, the inclination was not only on the wild-type but also on the I93M mutant although the effect on increase of the  $\beta$ -turn content by the S18Y substitution of the amino acid sequence was small. These variations of the  $\beta$ -turn content were quite similar to those of the three-dimensional configuration of the ellipsoidal UCH-L1 based on SANS studies.

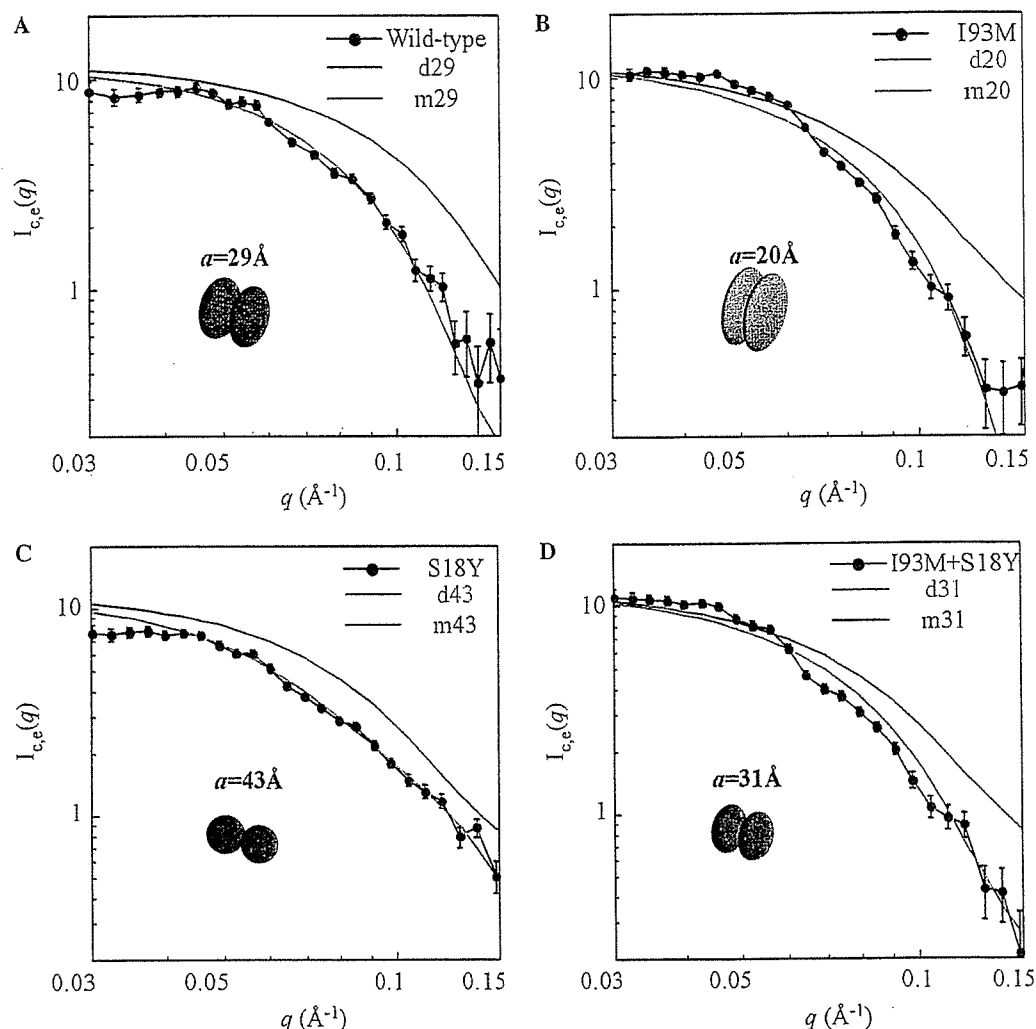


Fig. 4. Relative neutron scattering intensity  $I(q)$  versus the magnitude of the scattering vector  $q$ . (A)  $I_e(q)$  for the experimental curve of wild-type UCH-L1 (black close circle).  $I_e(q)$  for the calculated theoretical curves for dimer (d29) and monomer (m29). The red line corresponds to the theoretical fit for a rotating ellipsoidal dimer, ( $a$ , 29 Å;  $b$ , ( $=c$ ), 52 Å). The blue line represents for a rotating ellipsoidal monomer having the same diameter. (B)  $I_e(q)$  for the I93M mutant (black close circle). The red line corresponds to the theoretical fit for a rotating ellipsoidal dimer, ( $a$ , 20 Å,  $b$ , ( $=c$ ), 62 Å). The blue line represents for the monomer. (C)  $I_e(q)$  for the S18Y polymorphism (black close circle). The red line corresponds to the theoretical fit for a rotating spherical dimer, ( $a$ , 43 Å,  $b$ , ( $=c$ ), 43 Å). The blue line represents for the monomer. (D)  $I_e(q)$  for the I93M/S18Y double mutant (black close circle). The red line corresponds to the theoretical fit for rotating ellipsoidal dimer, ( $a$ , 31 Å,  $b$ , ( $=c$ ), 50 Å). The blue line represents for the monomer.

## Discussion

UCH-L1 is abundantly present neuronal brain protein enzyme with multiple enzymatic functions including hydrolysis of C-terminal ubiquityl esters, ubiquityl ligase activity, depending on multiple forms in an aqueous solution and stabilization of mono-ubiquitin. The aim of this study was to clarify whether UCH-L1 variants exist as a monomer or multimer in water and, in particular, to discuss the relation between the configuration of the variants and the risk of Parkinson's disease. We preferred SANS to address this question without adding any chemical modifications or physical force to proteins in water. We confirmed that no changes occurred on the SANS profiles of wild-type UCH-L1 and UCH-L1 variants during the measurement.

We first succeeded in demonstrating the configuration of UCH-L1 in an aqueous solution by SANS. The wild-type

was a dimer, and the monomeric component was ellipsoidal, contrary to the expectation based on the crystal structure (Fig. 1C). The I93M variant was a dimer, and the monomeric component was more ellipsoidal than that of the wild-type. The protective polymorphic variant, S18Y, was also a dimer, but the configuration was quite different compared to wild-type and I93M, the monomeric component retained its spherical shape. The size-distribution of the UCH-L1 wild-type and variants is dependent on the concentration based on the time derivative analysis of the sedimentation velocity [16]. The 80% of the total wild-type is a monomer ( $\sim 2.3S$ ),  $\sim 15\%$  is a dimer (4S), and  $\sim 5\%$  is a tetramer (8S) at 7  $\mu M$ . The populations of both oligomers increased with increased protein concentration, and the dimer became the predominant species at 70  $\mu M$ . A similar concentration-dependent size growth was observed on S18Y; all of S18Y existed as a monomer at 10  $\mu M$ , and

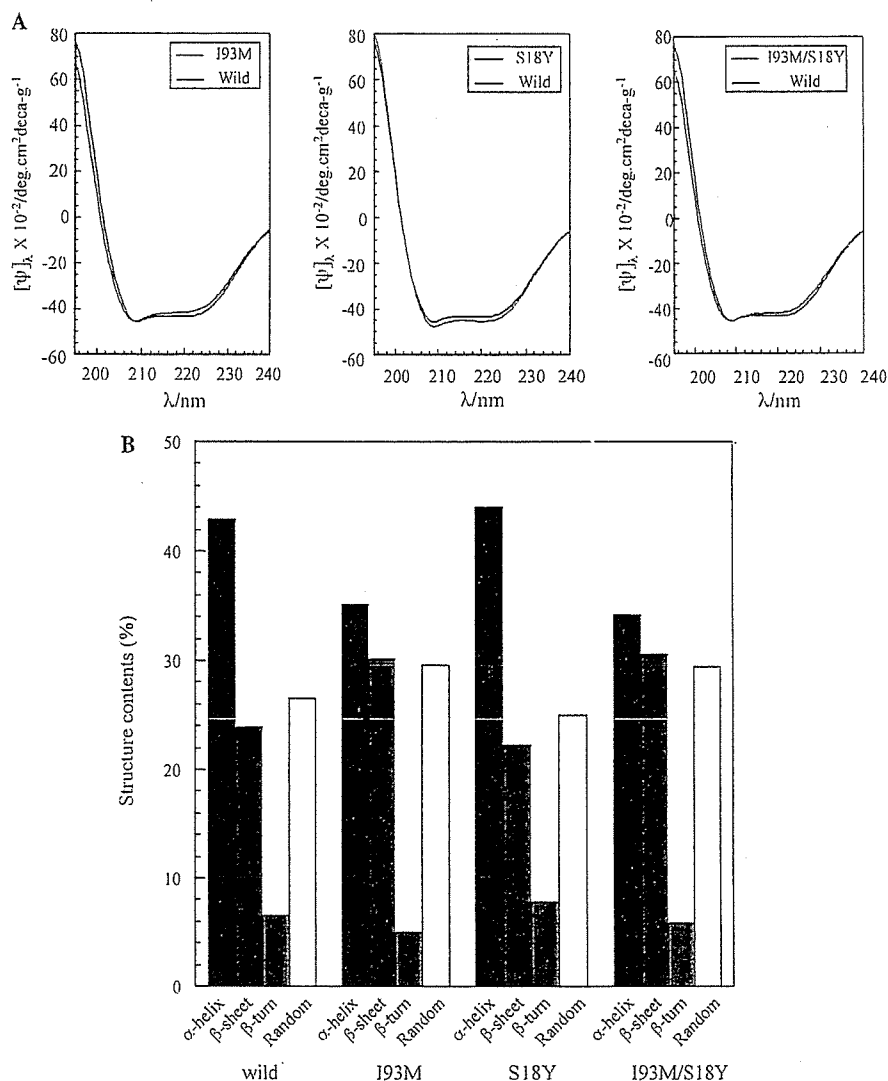


Fig. 5. CD spectra and secondary structural content of 6HN-tagged human UCH-L1s. CD spectra (mean residue ellipticity) for recombinant proteins ( $8.7 \times 10^{-4}$  M) in a 20 mM Hepes buffer (pH 7.8). (A) Wild-type UCH-L1 is shown in black, I93M in red, S18Y in blue, and S18Y/I93M in green. (B) Secondary structural content of recombinant human 6HN-tagged UCH-L1s.

the dimer was detected at 28  $\mu$ M. If homogeneity of the protein is attained in water, the configuration of protein should also be qualitatively equivalent at a lower concentration. Such an apparent size distribution was considered to be in a state of non-equilibrium, temporarily produced by adding a physical force, e.g., ultracentrifugation, to the protein.

In particular, we obtained important information about the shape of UCH-L1 in water by SANS observation; namely, the wild-type UCH-L1 and the variants formed rotating ellipsoids. The possible existence of the ellipsoidal dimer was suggested previously by analysis of the sedimentation velocity [16], indicating that the sedimentation value corresponding to the dimer (4S) was smaller than that of twice the monomer ( $\sim 2.3$ S). This discordance implied that the dimer was anisotropic, but not a sphere. Here, we noted the influence of a comparative change of the  $\beta$ -turn content by the substitution of amino acid to the protein structure,

because as is well known, the  $\beta$ -turn content is an important component for constructing a three-dimensional structure, i.e., the globularity of protein [33,34] despite the low content. The relationship between the relative change of globularity (circular ratio =  $a/b$ , see SANS data analysis) and that of  $\beta$ -turn content is summarized in Table 1. Based on the wild-type, I93M substitution decreases the circular ratio to 58% and the  $\beta$ -turn content to 76%, whereas S18Y substitution increased the circular ratio to 179% and the  $\beta$ -turn content to 118%. If the S18Y substitution occurs on the I93M mutant, the circular ratio increases to 193% and the  $\beta$ -turn also increases to 156%. Conversely, the circular ratio decreases to 52% and the  $\beta$ -turn also decreases to 64%, if an I93M substitution occurs on the S18Y polymorphism. An I93M mutation rendered the ellipsoidal dimer more stable because of a decrease of the  $\alpha$ -helix [24], increase of the  $\beta$ -sheet, and decrease of the  $\beta$ -turn. Conversely, S18Y substitution regained the globu-



Table 1  
Relation between the relative change of ellipsoidal and  $\beta$ -turn by amino acid substitution

Type	Amino acid substitution	Circular ratio	Relative change of ellipsoidal	$\beta$ -turn content (%)	Relative change of $\beta$ -turn
Wild	Non	1.8 <sup>a</sup>	—	6.6	—
	I93M	3.1 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	5.0	0.76 <sup>d</sup>
	S18Y	1.0 <sup>a</sup>	1.79 <sup>a</sup>	7.8	1.18 <sup>d</sup>
I93M mutant	S18Y	1.6 <sup>a</sup>	1.93 <sup>b</sup>	5.8	1.56 <sup>e</sup>
S18Y polymorphism	I93M	1.6 <sup>a</sup>	0.52 <sup>c</sup>	5.8	0.64 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> The relative changes of the circular ratio of I93M and S18Y were calculated based on the wild-type, <sup>b</sup>based on the I93M, and <sup>c</sup>based on the S18Y.

<sup>d</sup> The relative changes of the  $\beta$ -turn content of I93M and S18Y were calculated based on the wild-type, <sup>e</sup>based on the I93M, and <sup>f</sup>based on the S18Y.

\* The relative change of the circular ratio ( $a/b$ ) was calculated.

larity of the dimer, and resulted in changing the ellipsoidal form of wild-type up to spherical, and also the ellipsoidal form of the I93M mutant up to a similar circular ratio of wild-type. The globularity of UCH-L1 variants is closely related to the variation of the secondary structures, further, to the locations of the substitution of amino acids on the protein. The location of residue 93 is near the hydrolytic active site and the substitution may directly restructure the local geometric configuration and affect hydrolytic activity. On the other hand, although the location of residue 18 is distal from the active site, the position is on the hydrophilic surface of the protein and the substitution may often affect  $\beta$ -turn formation (Fig. 1C). When two protein molecules form a spherical dimer by a very weak attractive force, such as the S18Y polymorphism, the presence of this type of oligomer cannot be detected by other methods except by SANS. Thus, that the globularity of the UCH-L1 molecule depends on the  $\beta$ -turn content was responsible for not only the dimeric configuration, but also the risk of Parkinson's disease.

Finally, we considered the relationship between configuration of wild-type UCH-L1 and UCH-L1 variants and their functions, i.e., multiple enzymatic activities, C-terminal hydrolase, and ubiquityl ligase (Fig. 6) [15,16,19–24]. The progressive deformation of the ellipsoidal form by the I93M mutation simultaneously impaired both the hydrolytic and ubiquityl ligase activities. This configurational defect could cause impairment of dynamic flexibility, which is necessary for enzymatic functions by the enlargement of the hydrophobic region. We can surely imagine the relation between progressive deformation of ellipsoidal dimer caused by I93M mutation and impairment of enzymatic functions. The restoration of globularity of monomeric UCH-L1 by S18Y substitution augmented the hydrolytic activity. In contrast, it markedly decreased the ubiquityl ligase activity. However, it is not easy to imagine why the restoration of globularity by S18Y substitution simultaneously decreases ubiquityl ligase activity and increases hydrolytic activity. Hydrolysis may be the dominant activity of UCH-L1, but it seems to be very sensitive to the dimeric configuration. However, the ubiquityl ligase activity may vary, coupled with the hydrolytic one, if both active centers are adjoined. However, the increased hydrolytic activity of the S18Y coupled with its decreased ligase

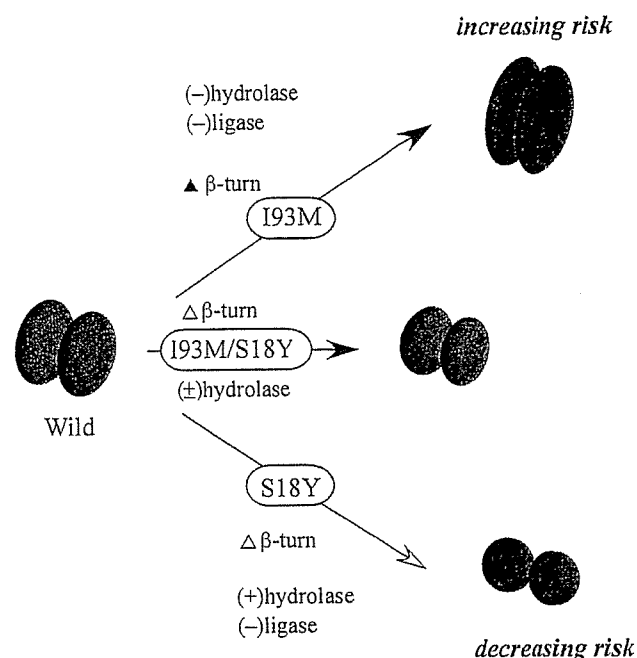


Fig. 6. Schematic speculative models of the relationship between the configuration of UCH-L1s in water and the multi-enzymatic activities. The self-assembled rotating ellipsoidal wild-type dimer in water has both ubiquitin hydrolase activity and a ubiquityl ligase one. Both ubiquitin hydrolase and ubiquityl ligase activities decrease, as the result of an I93M mutation promoting the ellipsoidal deformation by a decrease of the  $\beta$ -turn and. A S18Y substitution recovers the globularity by an increase of the  $\beta$ -turn, causing an increase of ubiquitin hydrolase activity and a decrease of the ubiquityl ligase one. Thus, the variation of UCH-L1 hydrolytic activity caused by the deformation of the globularity of monomer component correlates to the PD risk.

activity (which can prevent  $\alpha$ -synuclein degradation by K63-linked ubiquitin ligation) may be additive or synergistic with respect to the decreased risk of sporadic PD [16]. In this study, SANS observation may help in the confirmation of these hypotheses by observing either the hydrolytic digestion of ubiquitinated-proteins or oligomerization of free-ubiquitin based on the multiple enzymatic functions of PD-associated UCH-L1 variants. We demonstrated that SANS is an important technique for the direct observation of pathological protein assembly in water. We anticipate the design of a new SANS in the near future that is suitable for medical science and pathological analysis.

## Acknowledgments

All authors acknowledge that the first two authors contributed equally to the study and are joint First Authors. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, a grant from Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan, and a grant from Japan Science and Technology Agency.

## References

- [1] M. Hirai, M. Koizumi, T. Hayakawa, H. Takahashi, S. Abe, H. Hirai, K. Miura, K. Inoue, Hierarchical map of protein unfolding and refolding at thermal equilibrium revealed by wide-angle X-ray scattering, *Biochemistry* 43 (2004) 9036–9049.
- [2] Y. Yonezawa, S. Tanaka, T. Kubota, K. Wakabayashi, K. Yutani, S. Fujiwara, An insight into the pathway of the amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme obtained from a small-angle X-ray and neutron scattering study, *J. Mol. Biol.* 323 (2002) 225–237.
- [3] M. Hirai, H. Iwase, T. Hayakawa, K. Miura, K. Inoue, Structural hierarchy of several proteins observed by wide-angle solution scattering, *J. Synchrotron Rad.* 9 (2002) 202–205.
- [4] M. Tehei, D. Madern, C. Pfister, G. Zacai, Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and BSA measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 14356–14361.
- [5] W.M. Garrison, Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins, *Chem. Rev.* 87 (1987) 381–389.
- [6] S.D. Maleknia, C.Y. Ralston, M.D. Brenowitz, K.M. Downard, M.R. Chance, Millisecond radiolytic modification of peptides by synchrotron X-rays identified by mass spectrometry, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3965–3973.
- [7] G. Xu, M.R. Chance, Radiolytic modification of sulfur-containing amino acid residues in model peptides: fundamental studies for protein footprinting, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2437–2449.
- [8] S. Kuwamoto, S. Akiyama, T. Fujisawa, Radiation damage to a protein solution, detected by synchrotron X-ray small-angle scattering: dose-related considerations and suppression by cryoprotectant, *J. Synchrotron Rad.* 11 (2004) 462–468.
- [9] F.F. Robert, D.J. Rodi, A. Mirza, T.C. Irving, E. Kondrashkinad, L. Makowski, High-resolution wide-angle X-ray scattering of protein solutions: effect of beam dose on protein integrity, *J. Synchrotron Rad.* 10 (2003) 398–404.
- [10] F. Matumoto, K. Makiko, K. Maeda, H. Patzelt, Y. Maeda, S. Fujiwara, Conformational changes of troponin C within the thin filaments detected by neutron scattering, *J. Mol. Biol.* 342 (2002) 1209–1221.
- [11] W. Yong, A. Lomakin, M.D. Kirkitadze, D.B. Teplow, S.-H. Chen, G.B. Benedek, Structure determination of micelle-like intermediates in amyloid-protein fibril assembly by using small angle neutron scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 150–154.
- [12] A.J. Doig, E. Hughes, R.M. Burke, T.J. Suà, R.K. Heenanà, J. Luà, Inhibition of toxicity and protofibril formation in the amyloid- $\beta$  peptide  $\beta$ (25–35), *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 537–542.
- [13] K. Lu, J. Jacob, P. Thiyagarajan, V.P. Conticello, D.G. Lynn, Exploiting amyloid fibril lamination for nanotube self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2002) 6391–6393.
- [14] K.D. Wilkinson, K.M. Lee, S. Deshpande, P. Duerksen-Hughes, J.M. Boss, J. Pohl, Ubiquitin and the Biology of the Cell, Plenum Press, New York, 1998, pp. 99–125.
- [15] E. Leroy, R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M.J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan, T. Gasser, P.J. Steinbach, K.D. Wilkinson, M.H. Polymeropoulos, The ubiquitin pathway in Parkinson's disease, *Nature* 395 (1998) 451–452.
- [16] Y. Liu, H.A. Lashuel, A. Liu, P.T. Lansbury Jr., The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect  $\alpha$ -synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility, *Cell* 111 (2002) 209–218.
- [17] H. Osaka, Y.L. Wang, K. Takada, S. Takizawa, R. Setsuie, H. Li, Y. Sato, K. Nishikawa, Y.J. Sun, M. Sakurai, T. Harada, Y. Hara, I. Kimura, S. Chiba, K. Namikawa, H. Kiyama, M. Noda, S. Aoki, K. Wada, Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin ion neuron, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 1945–1958.
- [18] Y. Manago, Y. Kanahori, A. Shimada, A. Sato, T. Amano, Y. Sato-Sano, R. Setsuie, M. Sakurai, S. Aoki, Y.-L. Wang, H. Osaka, K. Wada, M. Noda, Potentiation of ATP-induced currents due to activation of P2X receptors by ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, *J. Neurochem.* 92 (2005) 1061–1072.
- [19] D.M. Maraganore, M.J. Farrer, J.A. Hardy, S.J. Lincoln, S.K. McDonnell, W.A. Rocca, Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease, *Neurology* 53 (1999) 1858–1860.
- [20] P. Wintermeyer, R. Kruger, W. Kuhn, T. Muller, D. Voitalla, D. Berg, G. Becker, E. Leroy, M. Polymeropoulos, K. Berger, H. Przuntek, L. Schols, J.T. Eppelen, O. Riess, Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients, *Neuroreport* 11 (2000) 2079–2082.
- [21] J. Zhang, N. Hattori, E. Leroy, H.R. Morris, S. Kubo, T. Kobayashi, N.W. Wood, M.H. Polymeropoulos, Y. Mizuno, Association between a polymorphism of ubiquitin carboxyterminal hydrolase L1 (UCH-L1) gene and sporadic Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.* 6 (2000) 195–197.
- [22] J. Satoh, Y. Kuroda, A polymorphic variation of serine to tyrosine at codon 18 in the ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 gene is associated with a reduced risk of sporadic Parkinson's disease in a Japanese population, *J. Neurol. Sci.* 189 (2001) 113–117.
- [23] Y. Momose, M. Murata, K. Kobayashi, M. Tachikawa, Y. Nakabayashi, I. Kanazawa, T. Toda, Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms, *Ann. Neurol.* 51 (2002) 133–136.
- [24] K. Nishikawa, H. Li, R. Kawamura, H. Osaka, Y.L. Wang, Y. Hara, T. Hirokawa, Y. Manago, T. Amano, M. Noda, S. Aoki, K. Wada, Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304 (2003) 176–183.
- [25] S.C. Johnston, C.N. Larsen, W.J. Cook, K.D. Wilkinson, C.P. Hill, Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution, *EMBO J.* 16 (1997) 3787–3796.
- [26] M.C. Peitsch, Protein modeling by E-mail, *Bio/Technology* 13 (1995) 658–660.
- [27] N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997) 2714–2723.
- [28] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3381–3385.
- [29] D.I. Svergun, C. Barberato, M.H.J. Koch, M. CRYSOLE—a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Crystallogr.* 28 (1995) 768–773.
- [30] D.I. Svergun, S. Richard, M.H.K. Koch, Z. Sayers, K.G. Zaccai, Protein hydration in solution: experimental observation by X-ray and neutron scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 2267–2272.
- [31] P. Debye, Zerstreung von Rontgenstrahlen, *Ann. Phys.* 46 (1915) 809–823.
- [32] J.T. Yang, C.S. Wu, H.M. Martinez, Calculation of protein conformation from circular dichroism, *Methods Enzymol.* 130 (1986) 208–269.

[33] R.H. Thomas, A.K. Roger, A.G. Margaret, F.G. John, O.F. Robert, Transfer of a b-turn structure to a new protein context, *Nature* 339 (1989) 73–76.

[34] A. Perezel, B.M. Foxman, G.D. Fasma, How reverse turns may mediate the formation of helical segments in proteins: an X-ray model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 8210–8214.

## 膜骨格 細胞骨格と細胞膜との相互作用

中田千枝子・諸根信弘・楠見明弘

細胞膜に接した部分の細胞骨格は、細胞膜機能の発現に必須であり、“膜骨格”とよばれる機会が増えてきた。膜骨格には多様な膜貫通型蛋白質が結合しており、短寿命の結合も含めると膜骨格のコントゥアーの15～30%は、膜貫通型蛋白質によって占められているようである。膜分子を1分子追跡することによって、細胞膜の概念にパラダイムシフトが必要なことがわかってきた。すなわち、膜骨格とそこにアンカーされた膜蛋白質（ピケット）は、細胞膜中のすべての分子に対しての拡散障壁となり、細胞膜を30～200 nm程度のコンパートメントに仕切っている。これが、細胞膜上でのシグナル変換の空間制御、大規模な拡散障壁の形成などを可能にしている。

▶▶ KEY WORDS : 細胞膜の仕切り 1分子追跡 神経細胞の極性形成

### はじめに：膜骨格の構造

赤血球の直径は約8  $\mu\text{m}$ 。それに対して、毛細血管の太さは3～5  $\mu\text{m}$ 。それでは、どのようにして、赤血球は毛細血管を通過していくのだろうか？ 答えは、くしゃくしゃと折りたたまれて通過する、ということである。だから、赤血球は全体としてきわめて柔らかい構造をもっているに違いない。しかし、同じ赤血球は太い動脈も通過しなくては行けない。ここでの流速は、瞬間的には毎秒数メートルにも達する。細い管の中でこのような速さで液体を流すとどうなるか？ 管壁上では摩擦のため液体は流れにくい。その結果、管の真ん中では管壁近くよりはるかに流れが速くなる。したがって、動脈中にある1個の赤血球では、壁近くの部分より真ん中の部分で前に大きく引っ張られ、大きな変形力（引きちぎる力となるので剪断力とよばれる）がかかる。もし、赤血球が柔らかかったら、大きく変形するだけではなく、引きちぎられてしまうかもしれない。赤血球は約1分間で体内を一巡し、寿命は120日程度なので、その間に、18万回もこのような折りたたみと剪断力に抗して踏みとどまる、という過程の繰返しに耐えなくては行けない。

これはどのようにして可能になっているのであろうか？ 赤血球の膜自体は、通常の脂質と膜蛋白質からできたリポソームのような膜であるので、十分に柔らかいが剪断力には弱い。そこで注目されたのが、細胞膜の細

胞質側表面を覆っていた線維状蛋白質のネットワークであり、“膜骨格 (membrane skeleton)” という名前を与えられた (図1)。1970年代のことである。この言葉は、今では、はるかに広い意味に用いられるが、それについては後述する。

赤血球膜の膜骨格構造を図1に示す<sup>1-5)</sup>。スペクトリンは非常に柔軟性のある蛋白質分子で、かかる力によって長さが大きく変わるし、折れ曲がりもかなり自由である<sup>2,6,7)</sup>。赤血球には細胞内に細胞骨格がなく、膜骨格だけで細胞の変形に対処している。このような膜骨格が、柔らかいほうはよいとして、どのように剪断力に耐えるかは、まだ、完全には解かれていない。しかし、ある程度引っ張られると、そこから先はスペクトリン4量体は伸びられないことが予想されるので、少なくとも、リポソームのように簡単に壊れたり引きちぎられたりはしないことが想像できる。

一方、白血球系の細胞は、血管通過の問題を別の方法で解決しているように思われる。すなわち、白血球系の細胞の多くには、細胞膜直下に数マイクロメートルの厚さでアクチンフィラメントがびっしりと存在している。これらのアクチンフィラメントは、赤血球の40 nm程度の短い線維ではなく、何マイクロメートルもの長さになっている。さらに、非常に多くのアクチン結合蛋白質が存在し、これらが、アクチンを側面どうしでつないでア

Chieko Nakada<sup>1</sup>, Nobuhiro Morone<sup>2</sup>, Akihiro Kusumi<sup>1,3</sup>, <sup>1</sup>京都大学再生医科学研究所 ナノ再生医工学研究センター, <sup>2</sup>国立精神・神経センター 神経研究所, <sup>3</sup>膜機構プロジェクト ICORP-JST E-mail: akusumi@frontier.kyoto-u.ac.jp <http://www.nanobio.frontier.kyoto-u.ac.jp/>

Membrane skeleton : Interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton

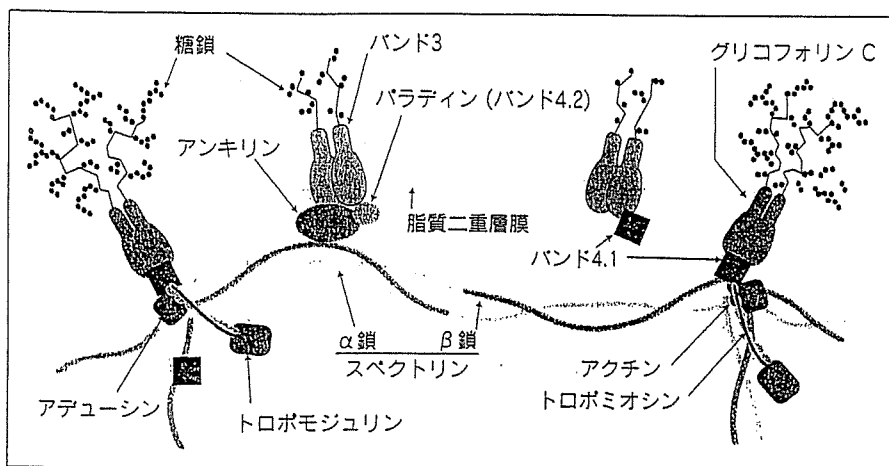


図1 赤血球の膜骨格

赤血球の膜裏打ち骨格と構成分子の代表的なものを描いた。グリコフォリンなどの膜蛋白質と膜表面にあるバンド4.1などの蛋白質複合体に、12~18個くらいのGアクチンからなる重合体が結合して、膜表面から33 nm程度伸びだしている<sup>34)</sup>(向きは確定的でない、膜に沿って存在している可能性もある<sup>35)</sup>)。この短いアクチンフィラメントはトロポミオシンに結合して、Gアクチンの個数はトロポミオシンの長さの分だけある。トロポモジュリンは短いアクチンフィラメントのpointed endでトロポミオシンと結合して、他のアクチン結合蛋白質とともにフィラメントを安定化させるといわれている。このように短いアクチンフィラメントが膜表面から杭のように出ているが、それらの杭の間を横につないでいるのがスペクトリンの4量体である。スペクトリンは線維状の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が横どうしで結合して2量体をつくり、それらが頭どうしで結合して4量体となっている。

クチンフィラメントを束にしたり<sup>8)</sup>、70°の角度で分岐させたり<sup>9)</sup>、直角に結合させたり<sup>10)</sup>する。このようにしてつくられたアクチンフィラメントのネットワークが、赤血球と違って細胞膜の内側表面から細胞質へと3次元的に広がっている。これを皮質アクチン(cortical actin)とよぶ。これが、白血球の変形能、血管での柔らかさと耐力性能を担っていると考えられている。細胞外から刺激をすると、板状の突起を激しく出し入れ(ラフリングとよぶ)したり、マクロファージのように、自分と同じくらい大きなものを飲み込もうとして変形したりするのも、皮質アクチンのはたらきによる。

血球系以外の細胞では、細胞質中に発達した細胞骨格がある。アクチンフィラメント、ケラチンフィラメントなどの中間径フィラメント、微小管(microtubule)の3種のうちで、とくにアクチンフィラメントが、細胞膜までネットワークを広げていて、細胞膜との相互作用が強い(諸根ら、投稿準備中)。このように、細胞骨格と膜骨格は連続しているので、はっきりとした定義は難しいが、アクチン細胞骨格の、細胞膜から数十ナノメートルの範囲が、しばしば“膜骨格”とよばれる。単に“細胞骨格”ではなく、“膜骨格”という言葉が使われるのは、以下

の理由による。

(1) その部分は、細胞膜と共同して機能することが多く、機能的には細胞膜の一部と考えたほうがよいことが多い。

(2) 細胞膜との相互作用のため、バルクの細胞骨格とは違う種類の蛋白質が存在し、また違った構造をとっている。アクチンフィラメントが細胞膜と相互作用するとき、多くは、速く重合するbarbed end側を細胞膜に向けて細胞膜(またはその内側表面)にある分子と相互作用していることに注意されたい。アクチンフィラメントは、barbed endを膜に向けて、その逆側(pointed end)から細胞質に向かって伸び出す。一部はその後、横に曲がって、細胞膜とその側面で結合する。

これらの細胞でも、膜骨格は、細胞膜の形を決めたり、変えたり、維持したり、浸透圧に抗したりするのに大きな役割を果たしているようである。しかし、いずれの細胞でも、膜骨格が細胞膜のシグナル変換やシグナルの空間制御にも役立っているらしいことがわかってきた。これについては、本稿の終わりのほうで述べる。

## I. 膜骨格の蛍光顕微鏡観察?

ここで簡単に、蛍光顕微鏡を用いた膜骨格や細いアクチンフィラメントのネットワークの可視化について説明しておきたい。非常に初歩的な誤りが多いからである。スペックルを見る場合を除いて、1本のアクチンフィラメントや、アクチンフィラメントからなるネットワークは、通常の蛍光顕微鏡法では線維やネットワークとしては見えない。シグナルが弱いうえに、光学顕微鏡の分解能300 nmの中に線維が複数本あって1本ずつは見えない。したがって、細胞全体がぼんやりと光っているように見えるのが、実は、1本の、あるいは、少数のアクチンフィラメントからなる細い線維のネットワークなのである。したがって、通常の蛍光顕微鏡で膜骨格の挙動を

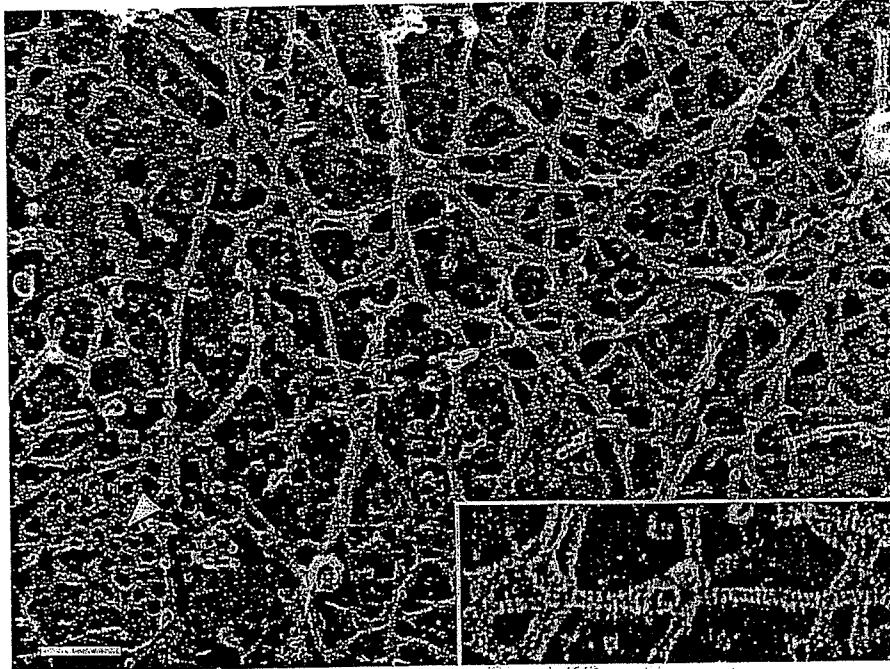


図2 膜骨格の電子顕微鏡写真

ラット由来のFRSK細胞の細胞膜を細胞質側からみた。網目状の膜骨格構造がみられる。1本1本の線維は斜めに細い縞模様をもつ(拡大図)ことから、膜骨格はおもにアクチンフィラメントからなることがわかる。なおこの写真では、六角形の格子が特徴的なクラスリン被覆ピットもみられる(矢頭)。スケールバー：100 nm。

観察するのは非常に難しい。

蛍光顕微鏡下で、はっきりと線維状に見えるものの多くは、多数のアクチンフィラメントが束になっているストレスファイバーである。ストレスファイバーの特徴は、線維が曲がらず、10 $\mu$ m以上にわたって直線的なものが多いことである。とくに、ファロイジンを用いた染色では、ストレスファイバーが強調されて可視化される(抗体では、ファイバー内へ入り込むのが難しいためか、それほどではない)。したがって、蛍光標識、とくに蛍光ラベルファロイジンを使ってアクチンを観察すると、多くの場合、アクチンフィラメントのほんの一部であるにすぎないストレスファイバーだけを見てしまうことになる。ストレスファイバーの様子だけから、アクチンフィラメント全体の挙動を推定することは不可能である。ストレスファイバーの増減は、1本の細いアクチンフィラメントの増減と相関しないことが多いからである。たとえば、アクチン重合阻害剤であるラトランキュリンをごくうすい濃度で含む培養液中に細胞を入れると、細いアクチンフィラメント(膜骨格のほとんどがこの1本のアクチンフィラメントからなる)の脱重合が急速に進むにもかかわらず、ストレスファイバーは長時間安定で、蛍光顕微鏡では、アクチンフィラメント(たとえば膜骨格)に変化がないように見えてしまう。また、アクチン分子を多く発現している細胞を長時間ラトランキュリン溶液とインキュベートしておくと、今度は、ス

トレスファイバーが分解して、アクチン余り現象が起こり、細いアクチンフィラメントのネットワークができ始めることがある。このときは、蛍光顕微鏡ではアクチンフィラメント(実はストレスファイバー)がないように見えるのに、実は、細いアクチンフィラメントのネットワークが再生しているという状況になる。

## II. 膜骨格はおもにアクチンフィラメントからなる：電子顕微鏡観察

図2は、培養細胞を用いて細胞膜の内側表面を電子顕微鏡で観察したものである。急速凍結-ディープエッチ-白金炭素蒸着、という方法で試料を準備した(実際には以下のプロセスを用いる。ガラス表面に培養した生細胞の上からもう1枚のカバーガラスを押しつけてからはがすと、細胞の上側の膜が剥離して付いてくる。すなわち、細胞膜の細胞質側表面が、ガラスと反対側に向けて露出した状態になる。このガラスを細胞膜を下にして、液体ヘリウムで-253 $^{\circ}$ Cまで冷やした純銅ブロックに押しつけて、細胞膜を急速に凍結させる。真空中-120 $^{\circ}$ Cでガラスナイフによって余分な水を削り落とした後、-100 $^{\circ}$ C付近で残った水を昇華させ、表面から200nmくらいまでの構造を真空中に露出させる。このままでは電子線を散乱できずコントラストがつかないので、そこに、白金と炭素を蒸着させ、試料表面の構造を透過型電子顕微鏡

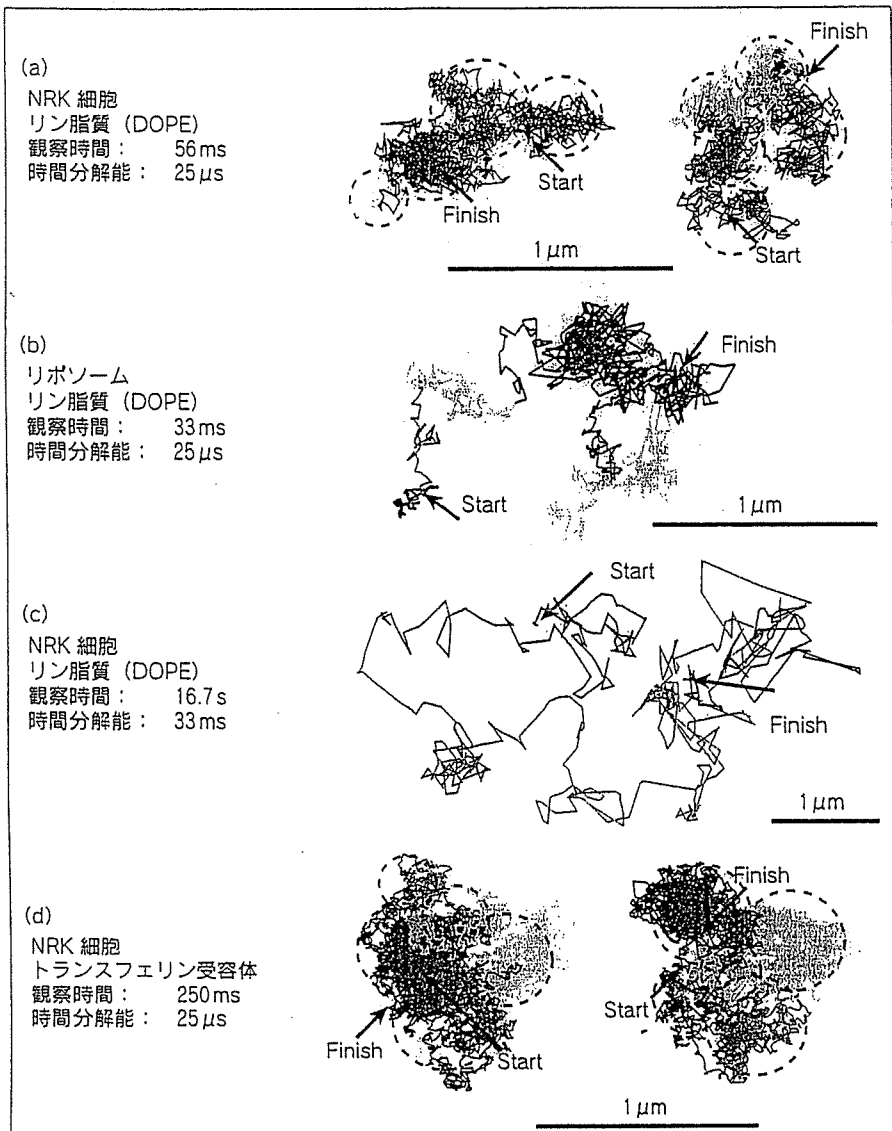


図3 膜分子の1分子ごとの動きをみる

リン脂質 (a~c) および膜蛋白質であるトランスフェリン受容体 (d) の, NRK 細胞膜上 (a, c, d) またはリボソーム膜上 (b) での典型的な運動を軌跡で示した。矢印で Start と示した場所が軌跡の開始点で, そこから紫→青→緑→黄色→赤の順に軌跡が移動している。観察の時間分解能が 25  $\mu$ s のとき, 細胞膜上では 2 種類の膜分子とも, 同様の大きさのコンパートメントに一時的に囲い込まれたホップ拡散をしている (点線でコンパートメントのおおよその境界を示した)。時間分解能が 33 ms である通常のビデオカメラでは, 細胞膜上のリン脂質は違い単純ブラウン運動にみえることに注目されたい (c)。また, 同じ数のコンパートメントを移動するのにかかる時間 (観察時間) から, 膜蛋白質のほうが 1 つのコンパートメントに囲い込まれる時間が長いために複数のコンパートメントを飛び越えて長距離を拡散するのに時間がかかることがわかる。膜骨格をもたないリボソームではホップ拡散はみられず, 速い自由拡散を行う (b)。

で観察する)。図2で, 左下のほうにはクラスリン被覆ピットが見える (矢頭) ので, 細胞膜の細胞質側表面を見ていることがわかる。真ん中から右のほうにかけてとくに多くなっている線維状網目構造が膜骨格である。それぞれの線維を見ると, 5.5 nm ごとに線維にほぼ垂直に縞模様が見える (拡大図)。これはアクチンフィラメントの特徴であることから, 膜骨格のほとんどがアクチンフィラメントであることがわかる。抗アクチン抗体で被覆した金粒子の標識を用いても, これは確認された。さらに, スペクトリンやアンキリンなどのアクチン細胞骨格に局在する蛋白質も見い出されている。また, このようなアクチンフィラメントの網目構造は, 細胞膜全面にわたって存在した。

### III. リン脂質の奇妙な動き: 細胞膜構造の パラダイムシフト

このような膜骨格の存在は, 細胞膜中の分子の運動にも大きな影響を与えている可能性がある。これを調べるために, 筆者らは不飽和リン脂質の DOPE に蛍光分子あるいは金コロイド粒子のプローブをつけ, 細胞膜上でプローブの挙動を観察した<sup>11)</sup> (mini-Column 参照)。

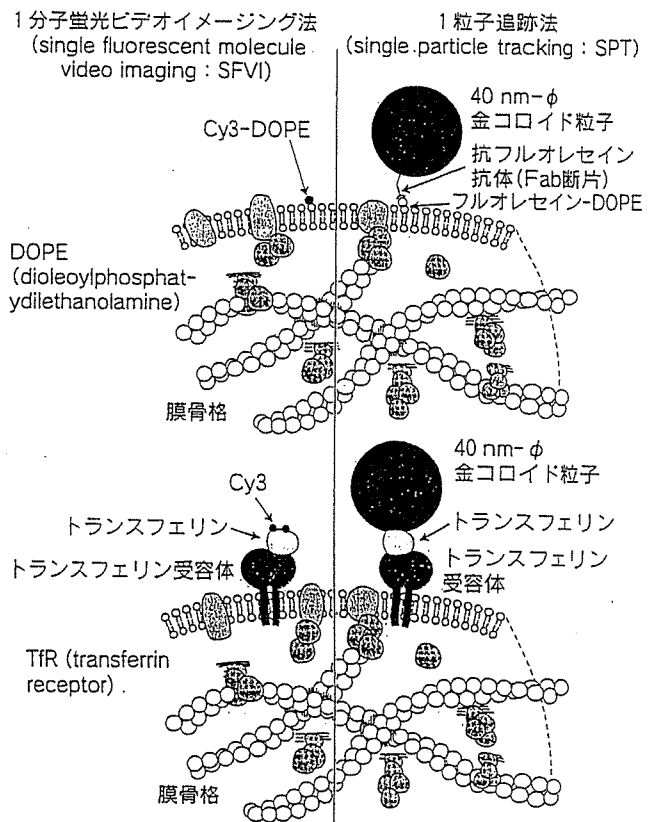
図3aは, ラット線維芽細胞 (NRK) の細胞膜で, 1 分子の DOPE 分子が熱拡散運動するのを追跡した典型的な軌跡である。それらは高速ビデオカメラを用いて, 分子の位置を 25  $\mu$ s おきに決め (15 nm 程度の精度), そ

### 1 分子観察法に用いるプローブの概要

図の左側は1分子蛍光ビデオイメージング法 (SFVI) で観察するときのプローブ。リン脂質を観察するためには、リン脂質のDOPEに蛍光分子Cy3を結合したものを合成し (Cy3-DOPE)、細胞膜外層に導入した。膜蛋白質のトランスフェリン受容体を観察するためには、リガンドであるトランスフェリンをCy3で標識した。蛍光分子はCy3に限らず、さまざまな分子を用いることができる。その際、高いモル吸光係数および量子収率をもち (明るい)、光褪色しにくい蛍光分子が観察しやすい。またGFPなどの蛍光蛋白質をプローブとすることも可能である。細胞膜上のこれらのプローブからの蛍光シグナルを増倍度の高いイメージンシファイアを通して高感度CCDカメラで検出し、その運動を観察することにより、知りたい分子の1分子ごとの運動を比較的簡便に調べることができる。SFVIのおもな利点は、分子の標識が簡便なことで、有機化合物の場合はプローブ自体の大きさが比較的小さいので、立体障害を与えにくいことである。

右側は1粒子追跡法 (SPT) で用いるプローブ。直径40 nmの金コロイド粒子表面に抗体やリガンドを結合させ、目的の分子を標識する。金コロイド粒子は細胞や膜構造に比べて散乱が強いので、高輝度の照明を用いた明視野照明系で画像を取得し、さらにコントラストを増強することによって黒い点として検出できる。この方法の利点は、コントラストが

強いので、高速ビデオカメラを用いることによって高時間分解能で分子の微細な運動を観察できること、また、蛍光分子のように褪色しないので長時間観察できることである。



の座標を時間順につないだものである。リン脂質分子は、速い熱運動をするが、ある領域に閉じ込められたように振る舞い、しばらくすると隣の領域に移ってふたたびその内部で速い運動をし、また次の領域に飛び移る、という運動をしていた。統計的な解析の結果、このような運動はランダムな熱運動ではありえない特徴的なものであることがわかった。これを筆者らはホップ拡散とよんでいる。リポソーム膜ではこのような運動は観察されない (図 3b)。

NRK細胞膜では、リン脂質を感じる細胞膜上の仕切りの大きさは平均230 nmであり、その内部ではリポソ

ーム膜と同じ  $5 \sim 10 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  という大きい拡散係数のブラウン運動をしていた。仕切りで囲まれた一つの区画 (コンパートメント) に滞在する時間は、平均11 msであった。これらの結果は、以下の2つのポイントを明らかにしている。

第1に、上でみられたコンパートメントの中に、さらに小さなコンパートメントがあるという可能性は低い。なぜなら、コンパートメント中の拡散係数はリポソーム中のそれとほぼ同じであったからである。

第2に、細胞膜の研究者は、この30年くらい、「なぜ、細胞膜上での拡散係数がリポソーム膜中のそれに比べて



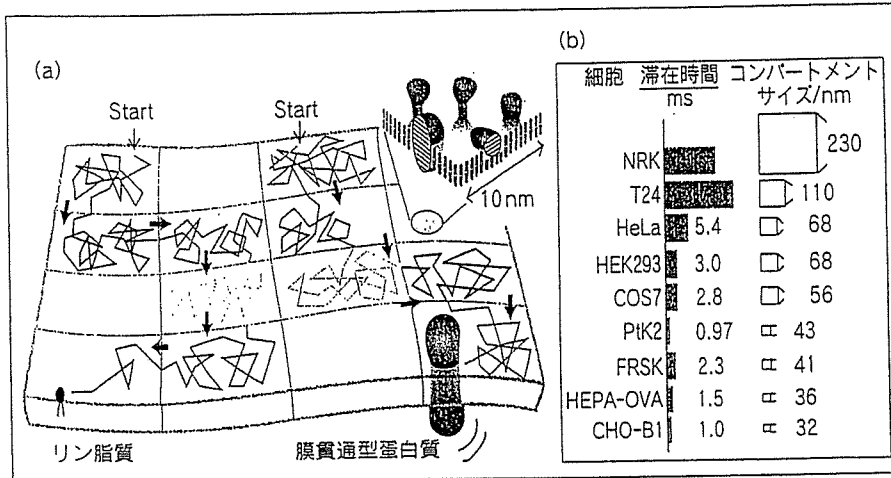


図4 シンガー-ニコルソンの流動モザイクモデルとホップ拡散

(a) 細胞膜は膜蛋白質およびリン脂質の拡散に対してコンパートメント化している。SingerとNicolsonの“流動モザイクモデル”<sup>12)</sup>は、コンパートメントよりも小さい、10 nm程度の微視的な環境において成り立っているといえる。  
 (b) これまでに調べた哺乳類細胞の細胞膜はすべてコンパートメント化していた。リン脂質の1分子観察によって調べたさまざまな細胞膜のコンパートメントサイズと平均滞在時間。

5～50倍も遅いのか」という難問に悩まされてきたが、上の結果は、その難問を基本的に解いてしまうものであった。すなわち、微視的な熱運動そのものはリボソームと変わらないが、細胞膜に仕切りが入っている（細胞膜がコンパートメント化されている）ため、隣のコンパートメントにホップするまでに時間がかかり、結果的に巨視的拡散が遅く見えていた、ということである。

なぜ、30年間もわからなかったことが、このように簡単にわかってしまったのであろうか？ これにも2つのポイントがある。第1に、“1分子追跡”である。2分子以上の運動の平均値をみると、ホップが起きていることは平均操作の中で埋もれてしまう。第2に、「時間分解能を十分に上げたこと」である。ホップが11msに一度起こるような条件では、33ms分解能（ビデオレート）での観察は遅すぎる（コンパートメントを2～3回通過してしまう、一つのコンパートメント内にせめて50点くらいはほしいので、最低でも時間分解能0.2msはほしい）。論より証拠。図3cにビデオレートで追跡したリン脂質の細胞膜上での拡散運動の典型的な軌跡を示しておく。あたかも遅い単純ブラウン運動をしているかのように見えるであろう。これでは、ホップ拡散に思い至らなかったもの無理はない。

これらの結果は、今までの細胞膜の構造と細胞膜中での分子運動の概念に大きな変革、パラダイムシフトが必要であることを示している。すなわち、コンパートメントの仕切りに出合わないような10nm程度までのスケールでは、今までのパラダイムであったSingerとNicolsonの流動モザイクモデル<sup>12)</sup>が成立するが（図4）、より広範囲で起こる現象を調べるときは、細胞膜のコンパートメントを考慮に入れる必要がある。ところで、

SingerとNicolsonの論文<sup>12)</sup>にある有名なマンガであるが、そのサイズがちょうど10nm四方程度の大きさを示すように描いてあるのは、偶然とはいえ面白いことである。

#### IV. 膜蛋白質もホップ拡散している

話が前後するが、膜貫通型蛋白質がホップ拡散を行うことは、リン脂質のホップ拡散より以前に見い出されていた<sup>13-17)</sup>。図3dに軌跡の例を示した。ここではトランスフェリン受容体の例が示してあるが、 $\alpha_2$ -マクログロブリン受容体、バンド3、E-カドヘリン、CD44といったこれまでに観察したすべての膜蛋白質において、ホップ拡散が見い出された。

では、膜蛋白質やリン脂質に対する細胞膜上の仕切りはどのようにしてできるのだろうか？

まず、膜蛋白質について。膜骨格が細胞膜に接しており、膜蛋白質の細胞内ドメインは膜骨格にぶつかるため、膜骨格の網目に閉じ込められたようになることがわかってきた（膜骨格フェンスモデル、図5左）。非常に多くの実験を行ったが、いくつかをここに挙げる（さらに詳しくは、文献18を参照）。カドヘリンとバンド3の場合、蛋白質の細胞質部分を小さくすると隣の領域へホップする頻度が増える<sup>13,14)</sup>。また、本当に膜蛋白質が膜骨格にぶつかっているかを確かめるために、光ピンセットを用いて、膜骨格全体を地引網のように引っ張る操作を行ったところ、膜上で拡散している膜蛋白質も一緒に引きずられていき、移動した先でふたたび拡散運動を繰り返した<sup>13-15,17)</sup>。

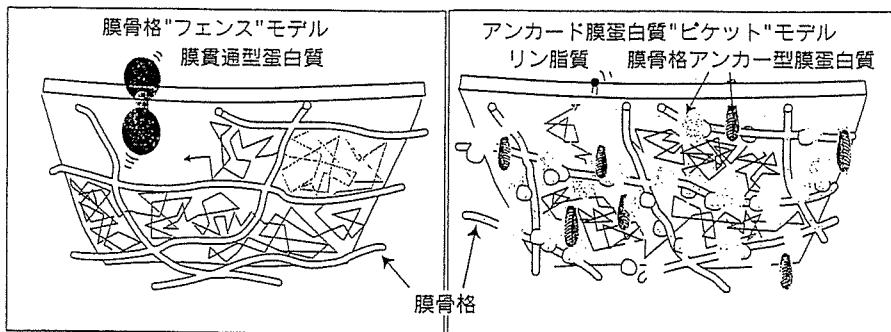


図5 膜骨格による膜分子の拡散抑制機構のモデル  
本文参照.

## V. 脂質の閉込め機構：アンカー膜蛋白質ピケットモデル

では、脂質分子はどのようにコンパートメントに閉じ込められ、ホップ拡散するのか<sup>11,18,19</sup>? 細胞外マトリックスと膜蛋白質の細胞外領域をトリプシンによって除去しても、コレステロールを除去してラフト様ドメインを分散させても、リン脂質に対するコンパートメントの大きさとホップ頻度は変わらなかった。一方、アクチンフィラメントの重合や膜との相互作用を阻害する薬剤を用いて、細胞を非常にマイルドにしかも短時間処理すると、コンパートメントの平均サイズが大きくなり、逆にアクチンフィラメントを安定化する薬剤では、ホップ頻度が減少した。さらに、同じ細胞では、リン脂質と膜蛋白質を感じる仕切りは同様の大きさであった。これは膜骨格フェンスがリン脂質の拡散をも抑制していることを示唆する。これは、非常に驚くべき結果である。われわれが観察しているリン脂質は、細胞膜の二重層の外層にある(とくに金粒子プローブは細胞内にはいる可能性はほとんどない)。一方膜骨格は、細胞膜の細胞質側表面にあり、両者は直接には相互作用できない。

この矛盾を説明するため、筆者らは、“アンカー膜蛋白質ピケットモデル(図5右)”を提案している。これは、筆者らが1分子追跡したすべての膜蛋白質には、アクチン膜骨格に結合するためと考えられる運動しない成分、または、短時間運動が止まる成分があるという観察に基づいている。また、膜のように粘性の高い液体中(膜の粘性は水の約100倍程度)に動かない物体があると、それらは流体力学的な摩擦効果によって周囲(10nm程度)の脂質や蛋白質の運動を大きく抑制することが知ら

れていた<sup>20-24</sup>。筆者らの作業仮説は次のようなものである。「アクチン膜骨格上では、多数のさまざまな種類の膜蛋白質が結合して(短期のものも含めて)運動を停止しており、それらの立体障害効果と周囲に対する摩擦効果、さらには、それらが10nm以内の間隔で膜骨格上に配列することによって膜骨格上にピケットラインが形成され、脂質をも通しにくい拡散

抑制障壁となる。」膜骨格に結合した膜蛋白質が杭(ピケット)のように並んでいるので、“アンカー膜蛋白質ピケットモデル”とよんでいる。ポイントは、ピケットが少なくとも10 $\mu$ s(脂質がコンパートメント境界近くに滞在する時間)くらいは動かないこと、それらが膜骨格に沿って並んでいることである。このピケットラインは、脂質に対しても膜蛋白質に対してもはたらく。したがって、膜蛋白質には“膜骨格のフェンス”と“アンカー膜蛋白質のピケット”の両方の効果がはたらくことになる(両方とも、膜骨格と同じ場所に境界をつくる)。

ピケットの効果で脂質の運動を抑えるためには、膜骨格上にびっしりとピケット(アンカー膜蛋白質)が立ち並ぶ必要があると誤解されることがときどきある。しかし、その必要はない。上で述べたように、動かないピケットのまわりには、粘性の高い液体に対する摩擦効果のため、10nm程度の動きにくい領域が生ずるからである。モンテカルロシミュレーションでは、コンパートメントの境界の15~30%程度がピケット蛋白質で覆われると、閉込め効果が生ずる。概算すると、これは、膜貫通型蛋白質全体の15%の分子が膜骨格に結合していることに匹敵し、以前から推定されていた値に近い<sup>22</sup>。さらに、繰返しになるが、これらのピケットは、長時間、膜骨格に結合しているのではないことに注意してほしい。1回の結合時間がたとえ100 $\mu$ sでも、脂質がその付近にいる時間より長いので、十分ピケットとして機能するのである。

## VI. 細胞膜の仕切りは一般的にみられる

これまで筆者らは、9種の哺乳動物の培養細胞を用いて、細胞膜中の脂質の運動を追跡し、すべての細胞で、脂質がホップ拡散することを見出した。ただし、コン

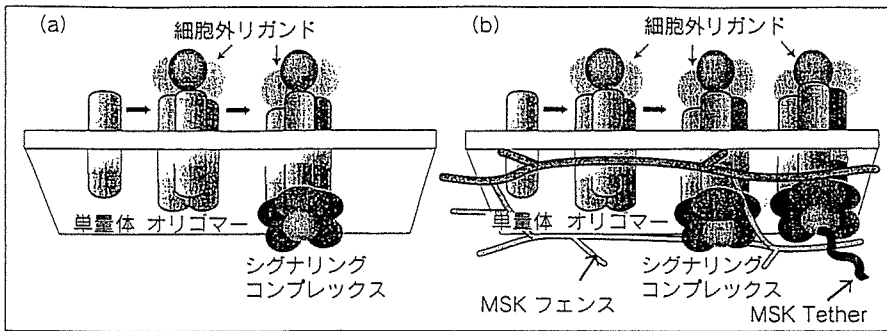


図6 Oligomerization-induced trapping model

膜分子が複合体を形成することによって、コンパートメントに困り込まれる効果が増大することを示すモデル。細胞膜において膜分子複合体がコンパートメントの境界を乗り越える(ホップする)確率は、一つひとつの膜分子が同時に膜骨格のフェンスを乗り越えなくてはならないため、単独で膜に存在する場合のホップ確率に比べて大幅に小さくなる(b)。さらに、複合体は細胞内のシグナル伝達分子と結合し、それによって(一時的であっても)細胞骨格にアンカーされやすくなるため、拡散が抑えられる。膜骨格がない膜では(a)、膜分子の直径は拡散速度にそれほど影響しない<sup>12,24)</sup>ので、これらの効果はみられない。

パートメントの大きさと脂質のホップ頻度は細胞によってさまざまである(図4b)。このように、細胞膜に脂質の拡散をも抑えるような仕切りがあることは、細胞種によらず普遍的であるらしいことがわかってきた<sup>19)</sup>。

## VII. 細胞膜の仕切りの生理的意義

細胞間接着分子E-カドヘリンにGFPを結合した分子を1分子追跡することによって、GFP-カドヘリンの拡散運動が、会合が進むにつれて大きく減少することが見出された<sup>25)</sup>。会合体の拡散係数が小さくなるのは当たり前だと読者は思われるかもしれないが、2次元拡散では、事情がまったく違っている。脂質二重層膜のような2次元の連続体中での拡散速度は、拡散する分子の大きさにあまり依存しない<sup>25)</sup>。たとえば、単量体が会合して1000量体をつくったとしても、拡散係数は1/6になるだけである。4量体になる程度では、変化を測定することさえも難しいであろう。

それでは、なぜ、GFP-カドヘリンが会合すると、細胞膜上での運動が劇的に減ったのであろうか? これは、ピケットとフェンスの効果であると考えられる。会合体がコンパートメントの境界を通り抜けるためには、膜と膜骨格の隙間、または、アクチンフィラメントが短期的に切れるとして、その隙間が単量体の場合に比べてはるかに大きくなくてはいけない。したがって、会合体が境界を通り抜ける頻度は大きく減少するのであろう。

このような、会合体形成によって、閉込め時間がはるかに長くなる現象を、oligomerization-induced trapping(オリゴマー化によって誘起されたトラッピング)と、筆者らは名づけた(図6)。

細胞外からやってきたシグナル分子が細胞表面の受容体に結合すると、受容体は会合したり、さらに、細胞質中のシグナル分子を結合して大きなシグナル複合体を形成することが多い。そうすると、これらの拡散係数は、シグナルを受容する前の受容体単量体に比べて劇的に減少し<sup>26-28)</sup>、シグナルを受け取ったコンパートメントの

周辺にトラップされることが予想される。これによって、シグナルを受け取った場所の情報がしばらくの間、保持される。このような空間情報の保持は、細胞骨格の極性をもった再編成や走化性を誘起するのに重要であろう。

第2の意義として、細胞が液体の細胞膜中にマクロスコピックな拡散障壁をつくるメカニズムがある。次項では、これを紹介する。

## VIII. 神経細胞の極性の維持

### 1. 神経細胞のイニシャルセグメント領域の細胞膜では脂質の拡散運動が止まる

神経細胞は、神経活動の入力を受ける樹状突起-細胞体領域と、出力担当の軸索という、2つのおもな領域からなる(図7)。また、この間には、イニシャルセグメント(IS)とよばれる境界領域が存在する。各領域には固有の膜分子が存在し(図7参照)、特異的な機能を担っている。これらの分子は、合成され細胞膜上に発現される際に選択的輸送機構により決められた領域に輸送される。しかし、細胞膜は一続きであり、しかも液体であるから、選択的に輸送された膜分子も、細胞膜上で拡散して混ざり合ってしまうように思える。

1992年に、Kobayashiらは入出力の境目にあたるISの細胞膜に、膜分子の拡散を妨げる拡散障壁が存在するという結果を示した<sup>29)</sup>。しかし、その後の追試や議論では結論が分かれてきた<sup>30-33)</sup>。とくに、液体の細胞膜

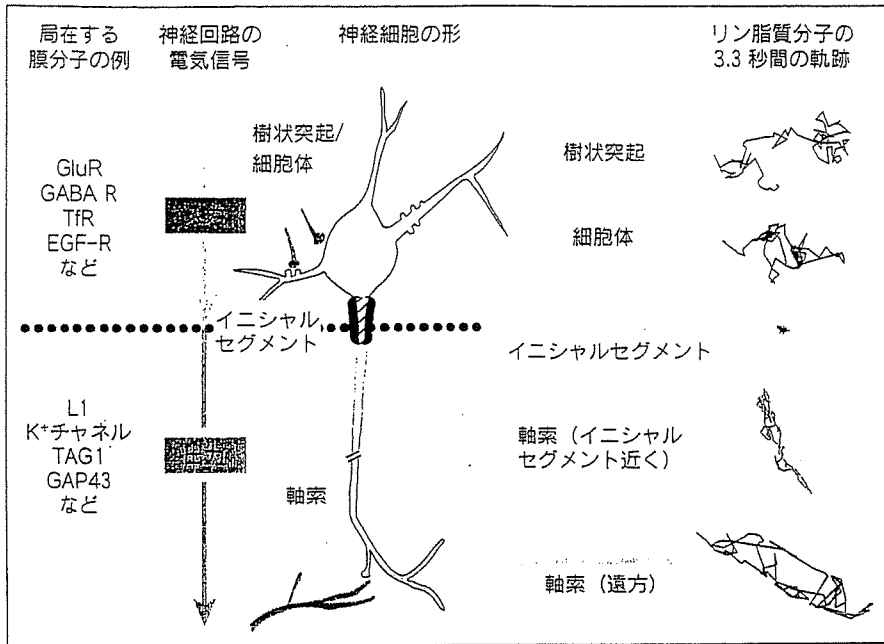


図7 神経細胞には機能極性がある

神経細胞の機能はイニシャルセグメントを境界として二分される。入力側・出力側のどちらかに局在すると報告されている膜分子の例を左に挙げた。右には培養海馬細胞の細胞膜上で観察したリン脂質の運動を軌跡として示した。イニシャルセグメントの膜上でリン脂質の運動がきわめて抑制されていることがわかる。

中でどのようにして脂質の拡散運動をも止めてしまうような拡散障壁がつけられるのかが見当もつかなかったため、この問題の解明は進んでいなかった。筆者らは、これがアンカー膜蛋白質ピケットが極端になった場合として説明できるのではないかと考えた。すなわち、「膜蛋白質、膜骨格がIS領域に集積して結合し、非常に密なピケットラインが、10~30μmにわたるIS領域の細胞膜に形成される。このため、脂質を含む細胞膜分子は、非常に小さなコンパートメントに長時間閉じ込められ、IS領域を通過することはほとんど不可能になる」と考えた(図8)。

この仮説を検証するため、筆者らは、神経細胞の細胞膜において、リン脂質を1分子追跡した<sup>34)</sup>。生後すぐから10日間培養したラット海馬細胞の細胞膜中での、リン脂質の典型的な軌跡を図7に示す。樹状突起、細胞体、軸索の先のほうでは、リン脂質は速い拡散をしているのに対し、IS膜上ではほとんど拡散運動していない。さらに、リン脂質に結合させた金コロイドプローブを光ピンセットで捕捉して、細胞膜に沿って牽引しようとしたところ、ISではできなかった<sup>34)</sup>。これらの結果は、ISの細胞膜には拡散障壁が存在することを示している。

## 2. IS膜のマクロスコピックな拡散障壁の形成機構

次に、IS部から軸索の領域で膜骨格蛋白質の密度と脂質の運動との相関を調べた。図9からわかるように、膜骨格密度が高くなるほどリン脂質の拡散が大きく抑制された。また、アクチンフィラメントを脱重合させる薬剤で細胞を処理すると、ISにおける拡散抑制は解消された。

さらに、培養海馬細胞(出生後すぐ培養開始)の培養中での発生過程を追い、IS膜でのリン脂質の拡散係数と膜骨格蛋白質アンキリンG、および、膜貫通型蛋白質の電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネル(Nav1.2)のIS膜への集積との相関を調べた(図9c)。アンキリンGは、膜蛋白質である電位依存性

Na<sup>+</sup>チャンネルの細胞質部分に結合し、このチャンネルを膜骨格にアンカーすることが報告されている<sup>35)</sup>。若いニューロンではリン脂質は速い拡散をしていたが、培養後6日目ごろから拡散係数が低下し始め、10日目以降にはカバーガラスに吸着したプローブの見かけの拡散係数と同程度、つまりノイズの範囲まで拡散係数が低下した。すなわち、拡散障壁は生後すぐの神経細胞には存在せず、ニューロンの成熟に伴って生後10日目ごろまでの間に形成されることがわかった。一方、Na<sup>+</sup>チャンネルとアンキリンGの密度は、培養後2~10日にかけて、10倍程度増加した(図9c)。しかし、これは、リン脂質の拡散係数低下とは、そこそこにしか相関していない。すなわち、これらの分子の集積が緩やかに終わりに達する時期に、脂質の拡散係数は劇的に下がっている。これは、ピケットとなる蛋白質や膜骨格蛋白質が集積し結合してピケットができてきても、そのときは、拡散に対する影響は小さく、集積が進んで、いよいよ本当にピケットが閉じ出してはじめて、拡散が劇的に抑えられることを示唆している。これは、モンテカルロシミュレーションによっても確認できた。以上の結果から、図8に示したような、膜骨格蛋白質およびピケットとなる膜蛋白質がIS