

1) プライマーの設計

プライマーの基本構造として、5'末端に数塩基程度の予備配列とIIS型制限酵素の認識配列とを並べ、さらに切断配列を挟んで3'側にテンプレート配列へのハイブリダイゼーション配列を設ける(図5)。インサートとベクターに対してそれぞれプライマーを設計し、IIS型制限酵素による切り口どうしが、うまく結合するように設計する。複数断片の同時ライゲーションを行う場合には、切断部位を複数種類用意し、それぞれがクロストークしないように留意する。

2) FASTR反応

- ① Aの条件でPCRを行う。
- ② PCR産物をBの条件で混ぜ合わせ、室温で15~60分静置する。
- ③ FASTR反応産物5 μ lで50 μ lのコンピテント大腸菌をトランスフォームする。

A. FASTRプロトコールで用いるPCRの条件

フォワードプライマー (5pmol/ μ l)	3	μ l
リバースプライマー (5pmol/ μ l)	3	μ l
テンプレートDNA (100ng/ μ l)	0.2	μ l
10 \times KOD plus バッファー	2	μ l
dNTPs (2mM)	2	μ l
MgSO ₄ (25mM)	0.8	μ l
KOD plus (Toyobo)	0.4	μ l
超純水	8.6	μ l
合計	20	μ l

94 $^{\circ}$ C	2分	1サイクル
	↓	
94 $^{\circ}$ C	15秒	30~35サイクル
65 $^{\circ}$ C	30秒	
68 $^{\circ}$ C	1分/1000bp	
	↓	
68 $^{\circ}$ C	5分	1サイクル

B. FASTR反応溶液の組成

Tangoバッファー (Fermentas)	0.5 μ l
T4 DNA Ligase バッファー (NEB)	0.5 μ l
PCR産物(インサート)	1 μ l
PCR産物(ベクター)	1 μ l
アフィデコリン(10mM, 和光017-09813)	0.2 μ l
ATP(10mM)	1 μ l
Lgul (Fermentas)	0.2 μ l
DpnI (NEB)	0.2 μ l
T4 DNA ligase (NEB)	0.2 μ l
超純水	5.2 μ l
合計	10 μ l

●おわりに

FASTR技術は、今までできなかったことをできるようにする技術ではないが、多くの研究者が多大な労力を注ぐプラスミド構築を迅速・簡便化し、研究全体の効率を改善するものである。プラスミド構築が避けて通れないものである以上、最先端の技術を駆使してできるだけ短時間で通り過ぎるしかない。FASTRにより労力や時間を節約し、それを新たな発見やイノベーションのために使うことができたとすれば、この技術の開発者にとって何よりの喜びである。

PROFILE 小寺一平

■北海道大学 電子科学研究所 ナノシステム生理学分野

PROFILE 永井健治

■北海道大学 電子科学研究所 ナノシステム生理学分野 教授

■E-mail: tnagai@es.hokudai.ac.jp

■専門: 発生生物学

■趣味: 飲酒、読書、キャンプ、スキーなど

1998年東京大学大学院医学研究科修了。1998年 理化学研究所 基礎科学特別研究員。2001年科学技術振興機構さきかけ研究者等を経て2005年より北海道大学電子科学研究所、教授。

文献

- 1) Kotera I, et al: J Biotechnol (2008) 137: 1-7
- 2) Szybalski W, et al: Gene (1991) 100: 13-26
- 3) Ikegami S, et al: Nature (1978) 275: 458-460
- 4) Cann IK; et al: Genetics (1999) 152: 1249-1267

for beginners

- ・ 福井泰久, 岩松明彦著: 「手抜き実験のすすめ バイオ研究五輪書」羊土社 (2003)
- ・ Sambrook and Russel: "Molecular Cloning-A Laboratory Manual-" 3rd ed. CSHL PRESS (2001)

特集 生命システムの階層間をまたぐイメージング技術

細胞結合振動子システムを対象にした 超高感度大規模イメージング

Ultra-sensitive and large-scale imaging of cellular coupled oscillator systems

堀川一樹・永井健治

脳や遺伝子プログラムは細胞や遺伝子などの機能単位から構成される複雑なネットワークである。その動作原理を理解したいという野心的な挑戦のためには、要素レベルの空間解像度を備えた大規模イメージングが必須である。本稿では、細胞結合振動子システムを材料に、構成単位である細胞の動的な活動を超高感度かつ大規模にイメージングする2つの方法を紹介する。

Key words

●生物リズム ●分節時計 ●Ca²⁺イメージング

はじめに

細胞結合振動子システムとは、なんらかのリズムを発振する多数の細胞が機能的に相互作用した多細胞ネットワークのことで、動的ネットワークの動作原理を研究する際のすぐれたモデル系である。脳や心臓はその典型例で、そのリズムとは膜電位や細胞内イオン濃度の周期的な変動である。本稿では、単位振動子が数百個から最大10万個ほど集まった大規模ネットワークを材料に、システムの動作原理にせまることをめざしたイメージング技術を紹介する。

たくさんの細胞結合振動子が協調的につくり出すリズム現象の研究は容易ではない。それぞれの細胞は細胞間相互作用を介して相手の時計を進めたり遅らせたりするが、その結果、自らにもリズムを変化させるような相互作用シグナルが入力される。こうなると、振動子集団全体のリズムを要素の足しあわせとして単純に記述することはできないので、これまで慣れ親しんだ還元型手法とはまったく異なるアプローチが必要になる。研究を進めるうえで確立された方法があるわけではないが、もっとも有効とされる最初の一步としては、相互作用が維持された複雑なシステムをばらすことなくたくさんの構成単位のダイナミクスを同時に計測することがあげられる。つまり、細胞結合振動子な

ら、システム全体を細胞1個の分解能で大規模にイメージングすることが必要になる。本稿では、2つの具体例を材料に、階層間をまたぐイメージングの重要性を解説する。

I 分節時計

1. 分節時計の可視化と集団振動

脊椎動物の体は背骨やあばらのような節を単位として構成されるが、このくり返し構造は“時間の周期性を空間の周期性に変換する”ことで生み出される^{1,2)} [図1, 体節形成とclock&wavefrontメカニズム, →今月のKey Words (p.1918)]. 本稿で議論する分節時計とは時間の周期性をつかさどる振動体のことで、その実体は分節形成に参加するすべての細胞(未分節中胚葉)内でくり返される複数の遺伝子の周期的な発現である。分節形成は動物種ごとに固有の周期、つまり、マウスでは120分周期、ニワトリでは90分周期、そして、筆者らの研究材料であるゼブラフィッシュでは30分周期で進行するが、分節形成に必要な遺伝子群もこの周期で振動的に発現している。規則正しい分節パターンの構築にはそれぞれの細胞内で遺伝子発現が振動するだけでは不十分で、全体として調和がとれている必要がある。以下では、個々の細胞での振動と全体としての振動とにどのような関係があるのかについて、イメージングをとおしてせまる。

リズムの実体のひとつは、細胞内で自らの転写を抑制する転写因子のON/OFFであるので、リズムを可視化するには時計遺伝子の発現を生細胞イメージングするのが最適である³⁾。ただし、生細胞イメージングで動物の個体を対象

Kazuki Horikawa, Takeharu Nagai
北海道大学電子科学研究所 ナノシステム生理学分野
E-mail: kazu@es.hokudai.ac.jp

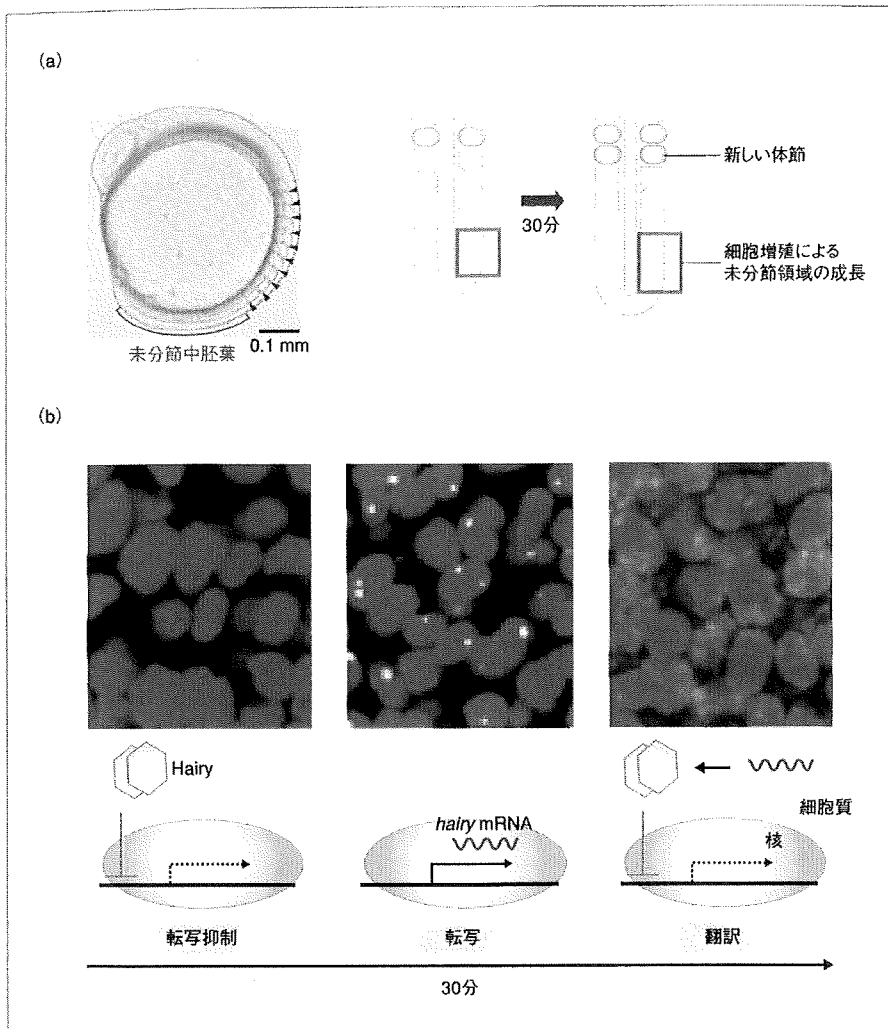


図1 分節時計の超高感度イメージング

(a) 分節化の模式図。ゼブラフィッシュ胚の体節(矢じり)は未分節中胚葉から30分周期でつくり出される。未分節領域を構成するすべての細胞が時計遺伝子を振動発現している。

(b) 分節形成ごとにくり返される転写因子Hairyの同調した転写サイクル。振動の位相状態は hairy mRNAの細胞内局在により、転写抑制(シグナルなし)、転写(核内でのドット状の検出)、翻訳(細胞質での検出)、という3つの状態に分けられる。未分節領域の細胞での転写サイクルは同調している、ピンク色で染色されているのは核。

とした遺伝子発現の周期的なON/OFFを検出することはそう簡単なことではない。遺伝子組換え動物の作出には多くの手間と時間を要するのにくわえて、生細胞イメージングには超高感度カメラなどの高級なデバイスを必要とするからである。ところが、転写・翻訳で駆動される振動体のリズムならば、実に簡単な方法で可視化することが可能である。それは、実験生物学者にはなじみの深い *in situ* ハイブリダイゼーション法である。この方法では、アンチセンスオリゴヌクレオチドをプローブとして特定の遺伝子の mRNA の分布パターンを判別できる。ただし、固定サンプルを用いるため、時間に関する情報の大部分は失われてしまう。よって、なんらかの工夫により時系列データを再構築する必要がある。通常の *in situ* ハイブリダイゼーション法では、mRNA の空間分布はOFFないしONの強弱とし

て検出されるが、ここから遺伝子発現の時間変化を再構築することは容易ではない。そこで、操作方法を工夫して高感度蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を行なうと振動状態を3つの位相に分離でき、時系列データの再構築が可能となる⁴⁾。時計遺伝子のひとつで自らの転写を抑制する転写因子をコードする hairy 遺伝子を例にすると、その mRNA の細胞内局在は、検出されない、核内にドット状に検出される、細胞質に検出される、の3つの状態に分けられ、それぞれ、転写抑制因子Hairyによる自らの転写抑制状態、転写抑制が解除され核内で hairy mRNA が転写される状態、hairy mRNA が細胞質に移り翻訳が可能になっている状態、に対応する(図1b)。遺伝子発現はセントラルドグマにしたがって進行するので、それぞれのスナップショットをこの順列で時系列データとして再構築できることが

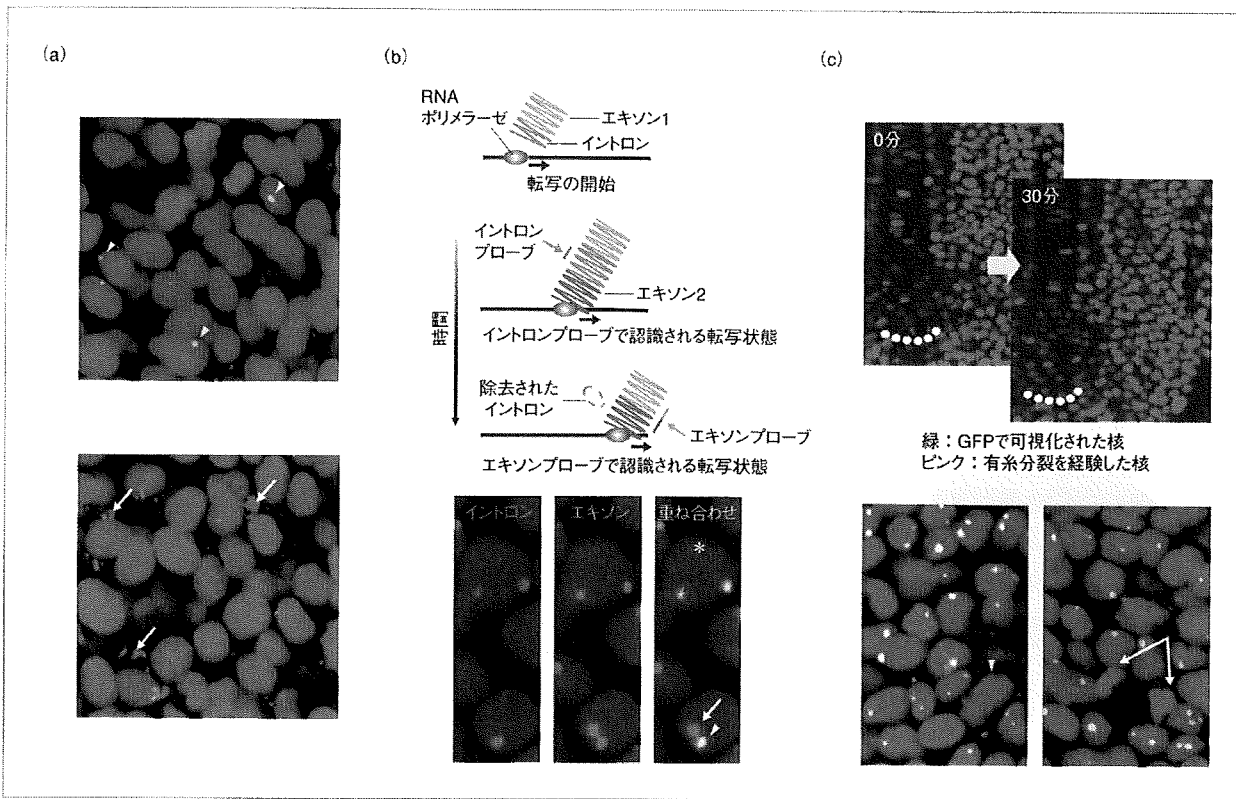


図2 分節時計の位相のずれ

わかる. 失われる情報がほとんどない生細胞イメージングが動画なら, この方法で得られる情報はパラパラ漫画かもしれない. しかし, その順列さえ再構成できれば, むしろ, エッセンスだけを抽出した有用な情報といえる.

この方法を用いることで, 生物時計の刻む時間はどれくらい正確かを定量することができる. 実は, ほとんどの生物時計はさまざまなノイズに対する感受性がとても高く, それほど安定に振動しているわけではない. 振動をつくり出すのは遺伝子の転写, 翻訳, または, 活性修飾などの化学反応であるが, 分子スケールで見るとこれらはすべて確率的な反応である. さらに, 個体ごとの遺伝的な差異や環境要因なども含め, 生物時計をとりまく環境は非常に "noisy" であることから, 生物時計の振動がゆらぎやすいことは簡単に想像できるだろう⁵⁾.

分節時計の振動もノイズの影響をうけているのかを明らかにするため, 約150個の細胞において振動子の位相状態, つまり, *hairy* mRNAの細胞内局在パターンを単一細胞の分解能でイメージングしたところ, 位相状態にはばらつきがあり, 集団としての同調性は約80%であることがわかった⁴⁾. 図2にその一例を示す. *hairy* mRNAの転写状態が周囲よりも進んだり遅れたりする細胞が孤立して存在することは, 細胞ごとに振動パターンがわずかに異なることを意味している (図2a). また, こうした細胞間での位相のずれにくわえて, 細胞内においても別の "ずれ", つまり, 遺伝子座レベルで転写のタイミングが異なっているようすも観察された (図2b). これらはいずれも化学反応の確率的な性質を反映したものと考えられるが, 発生中にはもっと厄介なノイズの存在することがわかった. それは, 細胞増殖

である。同調振動領域での細胞分裂パターンをくわしく調べたところ、30分という1回の分節周期のあいだだけでも約15%という、まったく予想しなかったほどたくさんの細胞が有糸分裂を経験しており(図2c)、有糸分裂の完了には平均15分も要していることがわかった⁴⁾。これは、時計遺伝子の正確な振動にとっては危機的な状況である。なぜならば、分裂期にはほとんどの遺伝子の転写や翻訳が止まることが知られているからである⁶⁾。30分という振動周期のなかで15分ものあいだ“振動を駆動する化学反応”が止まるなら、振動パターンに大きな影響をあたえるはずである。実際、時計細胞集団のなかには位相のずれを共有するペアがみつかり⁴⁾、有糸分裂中の凝縮したクロマチンには*hairy* 遺伝子の転写シグナルは観察されない(図2c)。これらの結果から、生体内で分節時計が刻むリズムは化学反応の確率性や細胞増殖などの影響を受け、細胞周期や位相にずれが生じていることがわかった。

2. 振動子間相互作用による位相の同期

ノイズの影響で時計細胞集団における振動の同調性が脅かされる一方、実際の時計細胞集団では全体として約80%の同調性が保たれていた⁴⁾。これは、分節時計が位相のずれを補正している可能性を強く示唆している。分節時計にかぎらず、生体システムはすべからずノイズと切り離すことのできない存在であり、システムパフォーマンスを安定化させるための戦略が要求される。現在、多くの研究者がこうした問題の解明に取り組んでいるが、筆者らも分節時計の安定化戦略の解析を行なった。その結果、時計細胞間で機能するNotchシグナルがノイズの影響を緩和するために中心的な役割を担っていることがわかった。

一般に、互いの位相を補正できるような振動子系は、相互作用依存的に同調することができる。現象としての同調の最初の記載は、300年以上も前のホイヘンスによる振り子

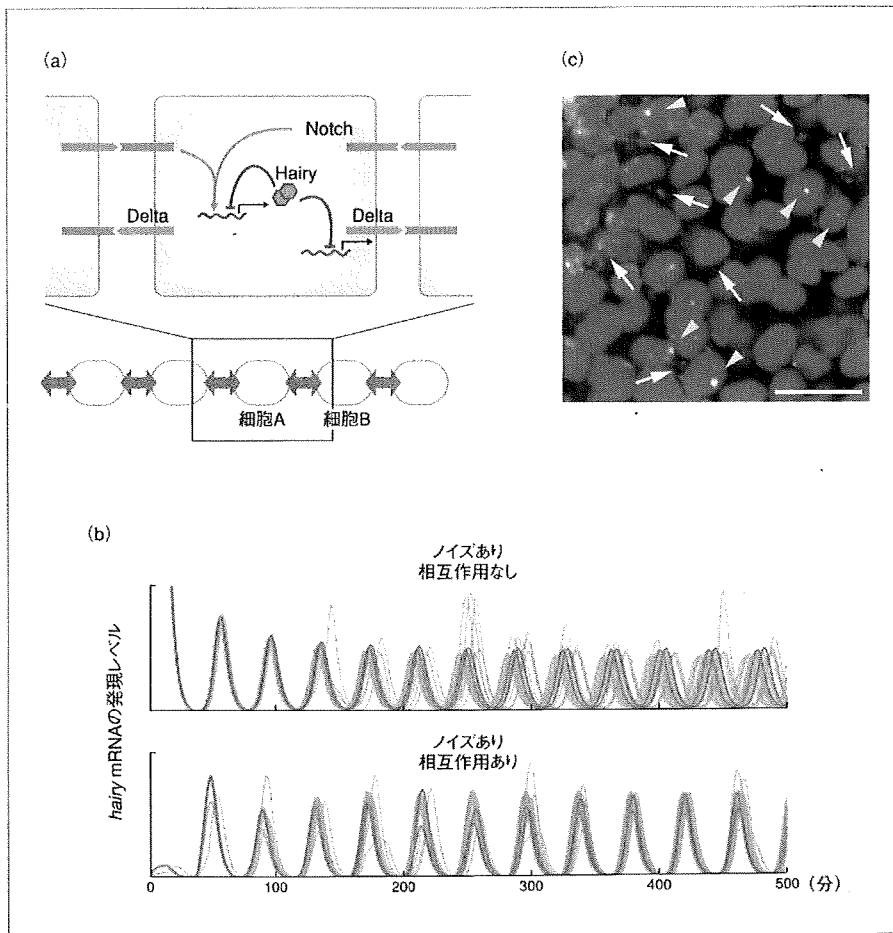


図3 振動子間相互作用を介したリズムの同調

(a) 分節時計の振動子間相互作用における遺伝子ネットワーク構造。Hairyは自らの転写を抑制することで周期的に発現する(青)。Deltaの発現もHairyに抑制されているので振動する(緑)。Deltaにより活性化されたNotchの細胞内ドメインは核内に移行し、*hairy* 遺伝子の転写を活性化する(ピンク)。

(b) (a)の遺伝子ネットワークにもとづいた固有の振動数かわずかに異なる細胞15個の振動シミュレーションの結果。振動子間に相互作用がない場合、集団の同調はノイズの影響によりすみやかに解消される(上)。振動子間に機能的相互作用のある場合、集団の同調性は維持される(下)。

(c) 振動子間相互作用シグナルであるNotchシグナルを一時的に阻害すると、細胞集団における時計遺伝子発現の同調性がなくなり、あらゆる位相状態の細胞が混在する。矢印：細胞質のシグナル、矢じり：核内のシグナル、スケールバー：20μm。

時計の同調までさかのぼり⁷⁾、身近な例としては、ホテルの集団発光やコンサート会場での拍手などがあげられる。分節時計の振動は *hairy* 遺伝子における転写の活性と抑制とのバランスの変化で駆動されているが、Delta-Notch 複合体を介した細胞間相互作用はこのバランスを変化させることで位相を補正することができる。単純化のために、細胞 A と細胞 B という 2 つの振動する細胞を例に考えてみたい (図 3a)。細胞 A が細胞 B に対して Notch のリガンドである Delta を提示する。すると、細胞 B では Notch の細胞内ドメインが切断され核内に移行したあと、*hairy* 遺伝子の転写を活性化しようとする。このとき、細胞 B では *hairy* 遺伝子の活性化と抑制のバランスが変化するので、時計の進みが少しだけ変化する。細胞 B の位相の変化は、分節時計に制御される Delta の発現を変えることで細胞 A の位相を変化させ、再帰的に同じことがくり返される (図 3a)。このように、互いに位相補正しようというシステムが時間発展のちどんな状態になるかを直感的に理解することはむずかしいが、多くの細胞結合振動子系と同様、同調する可能性が考えられた。実際に Notch シグナルを介して位相を補正し同調性を保っている可能性を、シミュレーションと実験の両方で検討するため、つぎのような検証を行なった。まず、ノイズの影響を考慮した確率モデルで集団の振動パターンを計算すると、相互作用なしでは振動の同調性はあつというまに失われることが予測された (図 3b)。同様のことを生体内でも検討するため、いちど同調振動が確立したあと阻害剤を使って Notch シグナルを一過的に切断した。すると、数サイクル後の細胞集団ではさまざまな位相状態の細胞が混在することから、同調振動を維持するには Notch シグナルによる細胞間カップリングが必須であることがわか

った (図 3c)。振動子 1 個の分解能で 100 個をこえる振動子の位相分布をシステムティックに計測することで、分節時計がもつマイクロレベルでのノイズ感受性とマクロレベルでのノイズ解消機構とが明らかとなった。

II 超高感度大規模 Ca²⁺イメージング

動的遺伝子ネットワークを研究する場合、生細胞イメージングが最適な手法であることに疑いの余地はない。いまだ簡単ではないと紹介したこの技術も、いくつかの重要なポイントをおさえさえすれば、さまざまな現象に適用が可能である。ここでは、細胞結合振動子ネットワークの自発的な活動を最大 10 万個の細胞集団でも同時に計測することを可能にする、超高感度大規模 Ca²⁺イメージング法を紹介する。

1. 超高感度 Ca²⁺指示薬の開発

Ca²⁺ はシグナル伝達におけるセカンドメッセンジャーのひとつであり、その濃度変化は神経や筋肉などの興奮性細胞の発火にとどまらず、さまざまな細胞における生理活動をひき起こす。Ca²⁺ イメージングには、Fura2 などの小分子化合物性指示薬と遺伝子にコードされた指示薬の 2 種類が用いられる。Cameleon は遺伝子にコードされた Ca²⁺ 指示薬のひとつで、センサー部分であるカルモジュリン-M13 (CaM-M13) 融合ペプチドが CFP と YFP の 2 つの蛍光蛋白質にはさまれた構造をもつ^{8,9)}。CaM-M13 融合ペプチドに Ca²⁺ が結合すると、Cameleon はその立体構造を大きく変化させるが、このとき、CFP-YFP 間の FRET 量が変化する。FRET とは、それぞれエネルギーの供与体および受容体で

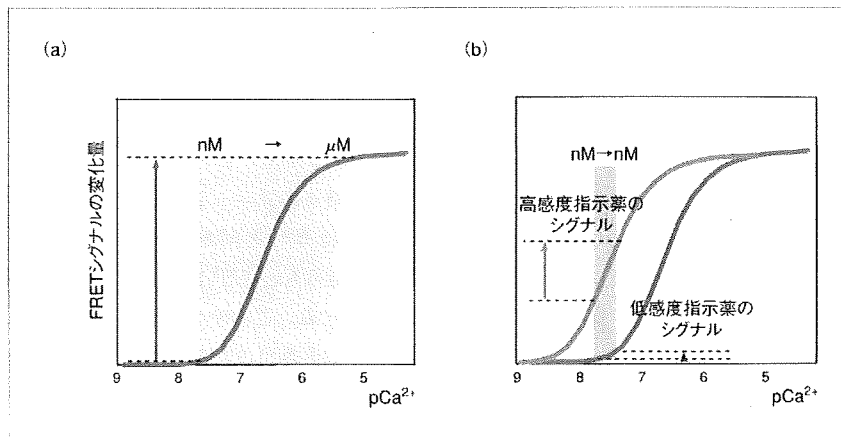


図4 Ca²⁺指示薬の感度と *in vivo* での Ca²⁺濃度変動レンジの関係

FRET シグナルの変化量を Ca²⁺濃度の関数としてプロット。

(a) 人為的刺激への Ca²⁺濃度変動レンジ。人為的刺激に対しては細胞内 Ca²⁺濃度は nM から μM まで大きく変動するので、既存の指示薬でもシグナル変化として十分に検出できる。

(b) 自発活動での Ca²⁺濃度変動レンジ。生理的条件下での刺激や自発活動に対しては細胞内 Ca²⁺濃度は nM レンジの微小変化にとどまるので、従来の指示薬では微少な Ca²⁺濃度変動は検出が困難である (青)。新たに開発した超高感度指示薬 (ピンク) なら十分に大きなシグナル変化として検出が可能である。

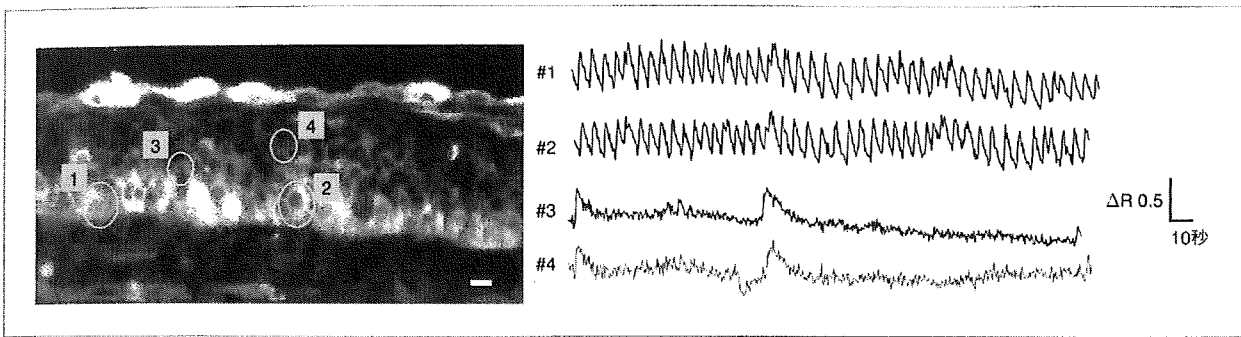


図5 超高感度指示薬により検出されたゼブラフィッシュ胚における神経細胞の自発的活動パターン
微弱なCa²⁺発火を最大200個の神経細胞から、同時に、1 Hzで数時間、記録することができる。スケールバー：20 μm。

あるCFPとYFPのあいだで起こるエネルギー移動のことで、FRET量(簡単には、CFPとYFPの蛍光量の比率)を計測することでCa²⁺濃度やその変化を知ることができる。小分子化合物性指示薬が非常に簡単に使えるという利点をもつものに対し、遺伝子にコードされた指示薬には、細胞内ならどのコンパートメントでも、また、多細胞ネットワーク内なら特定の回路だけに自由に局在化させることができ、かつ、持続的な計測が可能である、という小分子化合物性指示薬にはないメリットがある。さらに、Cameleon(YC3.60)はシグナル変化量がずばぬけて大きいという特長をもつため⁹⁾、これを細胞結合振動子システムにおけるネットワーク活動の計測に利用しない手はない。培養細胞でのイメージングは枚挙にいとまがないほど報告されているので簡単かと思いきや、*in vivo*での成功例となるとその数は大きく減る。さらに、ネットワークダイナミクスを研究するには、人為的な刺激への応答ではなく自発的な活動パターンを計測する必要があるのだが、その検出例は数えるほどしかなかった。その原因を探るべく試行錯誤を重ねた結果、自発活動時におけるCa²⁺濃度の変動レンジが指示薬の感度レンジと大きく乖離していることがわかった。

一般に、細胞内のCa²⁺濃度は50 nM以下といわれ、これが人為的な刺激応答時にはμMオーダーまで上昇する。こうした大きなCa²⁺濃度の変動は、YC3.60など既存のCa²⁺指示薬を用いることで大きなFRETシグナル変化として検出できる(図4)。一方で、神経ネットワークをはじめとする*in vivo*細胞結合振動子システムにおける自発活動時のFRETシグナルの変化は、仮に得られたとしても微々たるものだった。つまり、*in vivo*での自発活動時に起こる細胞内のCa²⁺濃度変動はnMレンジにおいてほんのわずかしかならぬと推測された。事実、多くの自発的な細

胞活動はOregon greenBAPTA488などの比較的高感度のCa²⁺指示薬で報告されることが多いこともこの仮説を支持していた。では、どうすればよいか? 微弱なCa²⁺濃度の変動を効率よく検出するには、指示薬の検出感度を上げること以外に方法はない(図4)。そこで、筆者らは*in vivo*における細胞の自発活動にともなう微弱なCa²⁺濃度変化を検出できる程度にCameleonのCa²⁺親和性を向上させるべく、センサー部分に改良を施した。その結果、K_d=100 nMをこえていた既存のCa²⁺親和性を最大K_d=20 nMにまで段階的に上昇させることができた(筆者ら:論文準備中)。*in vivo*生細胞イメージングにおける効果はてきめんで、これまで遺伝子にコードされた指示薬でのイメージングがほとんどうまくいっていなかった細胞性粘菌やゼブラフィッシュの神経ネットワークなど、さまざまな対象での自発活動にともなうCa²⁺濃度の変動をロバストに計測することができている(図5)。

2. 大規模ライブイメージング

社会性アメーバ(*Dictyostelium Discooidum*)はその体制を単細胞相から多細胞相へと切り替えることのできる興味深い生物である。1万個~10万個の細胞からなる多細胞体を形成するため、その移行過程では、ミリメートルからセンチメートル四方に散在する細胞が自己組織的に走化性による集合流を形成する。個々のアメーバは走化性物質であるcAMPの濃度が高いほうへと向かって遊走するが、cAMPに反応した細胞は自らもcAMPを合成・放出し新たなcAMP濃度勾配を形成する。このサイクルがくり返されることで脈動的な集合流が生み出されるのだが、そのメカニズムはシグナル伝達の観点だけではなく、数理研究の対象としても注目されている。集合流の形成機構の理解を目

的とした従来のイメージングは暗視野照明像の時間差分強調処理による間接的な手法で行なわれてきたが、この方法では細胞ひとつひとつの情報は平均化されてしまい、単一細胞の情報を得ることができなかった。しかし、今回、開発したCa²⁺指示薬なら、1細胞の分解能で走化性シグナルへの細胞応答を直接に検出できる。この方法がどれくらいの時空間スケールにまで拡張できるか調べたところ、最大で10万個の細胞を同時に視野におさめられる空間スケールでのイメージングが可能で、走化性シグナルの空間パターンを長時間にわたって計測することができることがわかった。

社会性アメーバの自己組織的な集合流形成については、シグナル伝達機構など多くのことが理解されているにもかかわらず、集合をトリガーする最初のイベントがなんであるかというもっとも重要な問題が明らかになっていない。集合流形成は走化性シグナルのリレーにはほかならないので、集合を開始するためには集団内の細胞のいずれかが自発的に走化性物質を放出しなくてはならない。これは、1細胞のスケールで起こる非常に稀なイベントであると考えられるので、集団の情報を平均化してしまう既存のイメージング法や、少数の細胞にだけフォーカスしたようなイメージングでの検出は期待できない。しかし、筆者らの開発したCa²⁺イメージング法なら話は別で、長年の謎とされてきた集合をトリガーする走化性物質の自発的放出だけでなく、その時空間パターン変化を計測できるようになった。1細胞の分解能をもつ大規模イメージングがいかに有効であることを示す格好の例である。

おわりに

あらゆる遺伝子ネットワークは観測のスケールに応じて2つの相反する姿をみせる。つまり、マクロスケールでのアウトプットは往々にして安定である一方で、ミクロスケールでのダイナミクスはノイズの影響をうけるので不安定である。すべての生化学反応は確率的なプロセスであるし(反応

ゆらぎ、熱ゆらぎ)、ときには関与する分子数の離散性が顕在化する(分子数ゆらぎ)ので、ノイズの影響はさげられないからである。したがって、遺伝子ネットワークが高い信頼性をもって機能するには、ノイズに対するなんらかの対応機構が存在しなくてはならない。その機構を理解するには、ノイズの影響やその解消機構といった“隠れた姿”を可視化しなくてはならないが、ミクロとマクロの両方の空間的階層をまたぐ単一細胞レベルの分解能を備えた大規模イメージングはこうした問題にアプローチするほぼ唯一の有効な手段といえよう。こうした研究により、長い進化の過程で洗練されたさまざまな遺伝子ネットワークにねむる隠れた姿がつつぎと明らかになることが期待される。

分節時計の研究は東京大学の武田洋幸教授と大阪大学の近藤 滋教授との共同研究である。関係者に深く感謝します。

文 献

- 1) Cooke, J., Zeeman, E.C.: *J. Theor. Biol.* 58, 455-476 (1976)
- 2) Pourquie, O.: *Science*, 301, 328-330 (2003)
- 3) Masamizu, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 1313-1318 (2006)
- 4) Horikawa, K. et al.: *Nature*, 441, 719-723 (2006)
- 5) Raser, J. M., O'Shea, E. K.: *Science*, 309, 2010-2013 (2005)
- 6) Prescott, D. M., Bender, M. A.: *Exp. Cell Res.*, 26, 260-268 (1962)
- 7) Pikovsky, A., Rosenblum, M., Kurths, J.: in *Synchronization*, pp.357-361. Cambridge Univ. Press, Cambridge (2001)
- 8) Miyawaki, A. et al.: *Nature*, 388, 882-887 (1997)
- 9) Nagai, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10554-10559 (2004)

堀川一樹

略歴：2002年 京都大学大学院理学系研究科博士課程 修了、東京大学大学院理学系研究科 ポスドク、同 助手を経て、2006年より科学技術振興機構さきがけ 研究員および北海道大学電子科学研究所 特任准教授。

19

Paradigm Shift of the Molecular Dynamics Concept in the Cell Membrane: High-Speed Single-Molecule Tracking Revealed the Partitioning of the Cell Membrane

Akihiro Kusumi, Yasuhiro Umemura, Nobuhiro Morone, and Takahiro Fujiwara

19.1

Introduction

The plasma membrane is the outermost membrane of the cell, surrounding the entire cell and determining the boundaries between the cell and the outside world. All of the living organisms on the earth share essentially the same fundamental plasma membrane structure. The plasma membrane has, like all of the other membranes in the cell, a quasi-two-dimensional liquid-like structure, but it is not a simple liquid. Rather, it is a nonideal mixture of various molecules with differing miscibilities in the fluid state. Therefore, the plasma membrane contains dynamic structures, like molecular complexes and domains, functioning on various time scales and space scales, and forming and dispersing continually within the plasma membrane. These molecular complexes and domains range from small protein clusters with short lifetimes, like transient dimers of rhodopsin [21], to large micron-sized stable domains, like cell-to-cell or cell-to-substrate adhesion structures (see Figure 19.1 for various membrane domains).

Another interesting feature of the plasma membrane, which makes it different from a simple two-dimensional ideal liquid, is its association with the cellular filamentous protein meshwork that consists of actin filaments, called the cytoskeleton. The actin cytoskeleton is a three-dimensional structure present throughout the cell, for the creation, modification, and maintenance of the cellular morphology. On the cytoplasmic surface of the plasma membrane, the actin filament interacts with many plasma-membrane-integrated proteins and lipids, indirectly, but specifically, via connecting molecules, and also directly, but with lower affinities (but at many sites). At the interface between the actin-based cytoskeleton and the plasma membrane, the cytoskeleton uses various protein components different from those of the bulk cytoskeleton to interact with the plasma membrane molecules, and as a result, its structure at the interface differs from the bulk structure of the cytoskeleton. Furthermore, the part of the cytoskeleton that associates with the plasma membrane is, both structurally and functionally, an integrated part of the plasma mem-

Anomalous Transport: Foundations and Applications.

Edited by Rainer Klages, Günter Radons, and Igor M. Sokolov

Copyright © 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ISBN: 978-3-527-40722-4

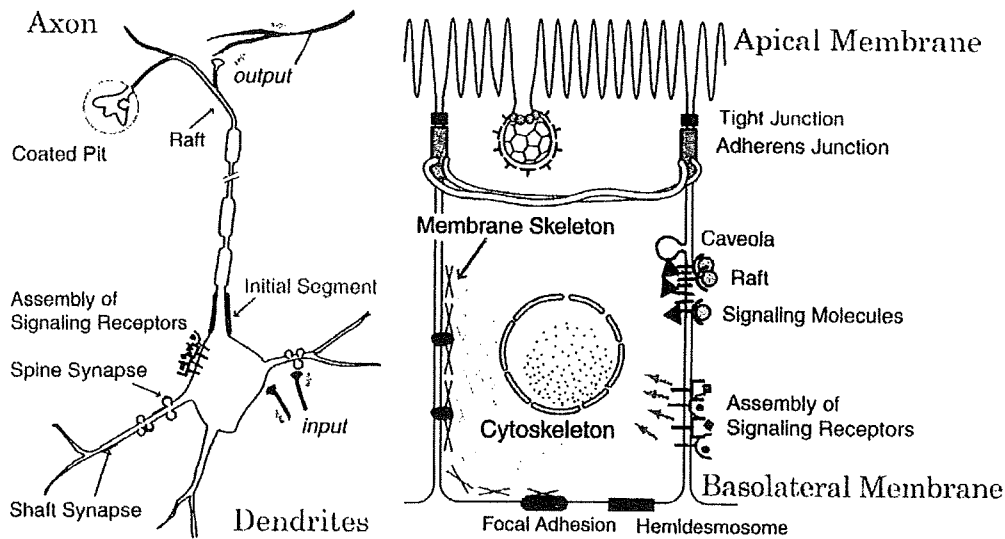


Figure 19.1 The plasma membranes are full of transient molecular complexes, domains, and compartments. Shown here are a plethora of specialized domains, key to a cell's function, which must be continually formed and dissolved during the life of a cell. Their lifetimes range between microseconds

and hours. Understanding the basic mechanisms and principles for organizing these molecules is a key objective of biophysical studies of biological membranes. Schematic figures of the plasma membranes of a neuron (left) and an epithelial cell (right) are shown.

brane. Therefore, this part of the cytoskeleton is often called the membrane skeleton (Figure 19.2). Recent research has revealed that this close association of the membrane skeleton with the plasma membrane profoundly affects the dynamics and functions of membrane molecules and their interactions [22,24].

Since the plasma membrane is likely to have complex dynamic domain structures, many of which are smaller than the optical spatial resolution of 300 nm or so, unlike those in artificial membranes, the use of normal optical microscopy and electron microscopy for the studies of these complex dynamic domain structures has turned out to be difficult. The experimental results could be explained by various completely different models, and allow different interpretations, i.e., the experimental results are often unable to reveal which models better represent the dynamic membrane structure and molecular dynamics in the membrane. To clarify these complex spatiotemporal organizations and molecular dynamics, one of the best approaches appears to be high-definition single-molecule tracking, with enhanced time and spatial resolutions.

The recent advent of single-molecule techniques now allows researchers to track single molecules or small groups of molecules in the plasma membrane, even in living cells. These methods include single-fluorescent molecule tracking (SFMT) with the use of fluorescent probes, and single-particle tracking (SPT) using colloidal gold probes with a diameter of 20 or 40 nm

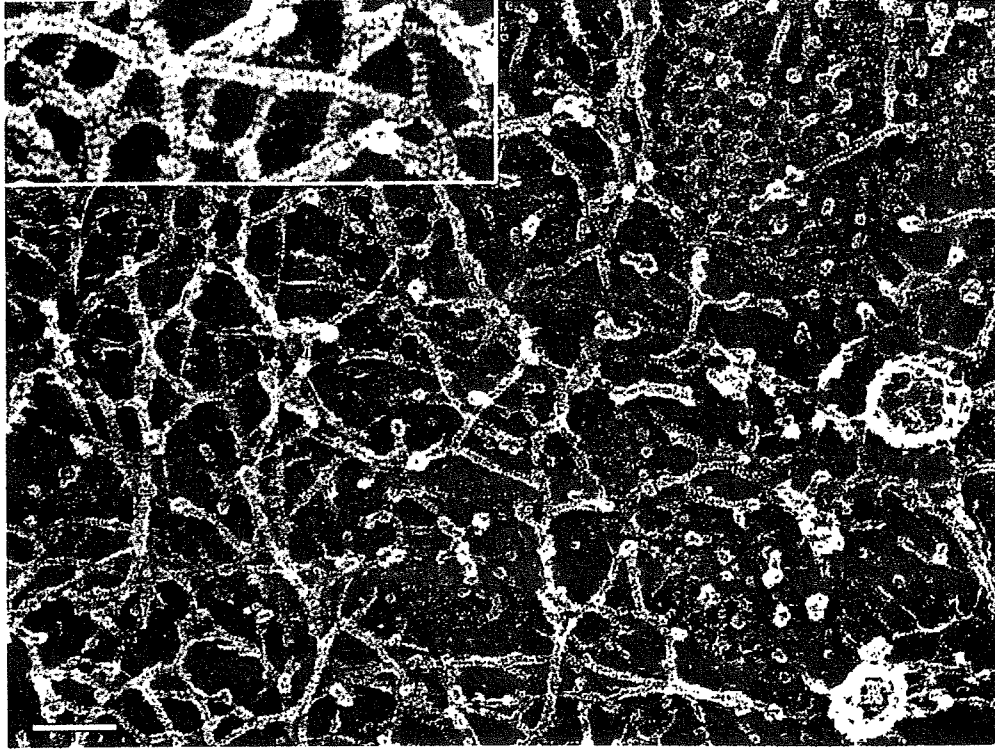


Figure 19.2 The cytoplasmic surface of the upper membrane, observed by electron microscopy. The plasma membrane specimen was rapidly frozen on a copper block pre-cooled in liquid helium, deeply etched to remove excess ice, and platinum-carbon replicated. The presence of clathrin-coated structures (structures that look like a honeycomb or a soccer ball) shows that this image represents that of the cytoplasmic surface of the plasma membrane. The striped band-

ing patterns with the 5.5-nm periodicity on individual filaments (see the inset) are characteristic of actin filaments. This banding pattern can be found in every filament, showing that the membrane skeleton is made of actin filaments and their associated proteins. This image also reveals the close links of the actin filaments of the membrane skeleton with the clathrin-coated structures. Bar = 100 nm (50 nm for the inset).

[1,6–8,14,16,18,25,29,34,36,50,59,61,65,67–69]. SFMT is advantageous in that the researcher can be sure that s/he is following a single molecule, whereas SPT gives better image contrast, allowing her/him to observe at faster frame rates or higher spatial precisions. By using both of these techniques for the same target molecule, the problems of each method can be compensated for each other. Therefore, they together have given researchers the unprecedented ability to directly observe the movement, assembly, and localization of individual, single molecules in the plasma membrane of living cells in culture [24, 57, 61, 68, 69]. Furthermore, not only the movement of single molecules, but also the *activation* of cellular signaling molecules, including the small GTP binding proteins (G proteins) H- and K-Ras, has been tracked at the level of single molecules in the living cell membrane [36].

The next important step in the development of single-molecule techniques has been the great improvement of the frame rate in SFMT and SPT. In particular, with SPT, a frame rate of 40 000 frames per second (fps), or a time resolution of 25 μ s, has been achieved in the tracking of single phospholipid molecules in the plasma membrane of living cells, with a relatively small loss of the spatial precision in the determination of the positions of gold particles in the two-dimensional plane (24 nm in two-dimensional space [12]).

The ability to track single molecules at high frame rates with sufficient spatial accuracies has fostered a new fundamental understanding of molecular diffusion in the cell membrane. High-speed SPT and SFMT are revealing that the plasma membranes of virtually all mammalian cells in culture are parceled up into apposed domains, with regard to the translational diffusion of practically all of the membrane molecules. In addition, virtually all of these molecules undergo non-Brownian diffusion in the plasma membrane, i.e., short-term confined diffusion in a compartment and long-term hop diffusion between the compartments in the cell membrane (Figure 19.3; details will be given later; Fujiwara et al. [12], Kusumi and Sako [24], Murase et al. [37]).

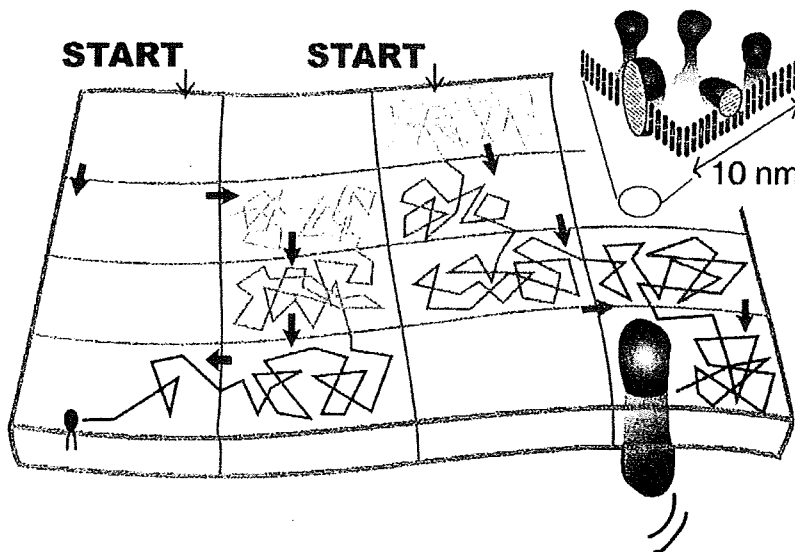


Figure 19.3 A paradigm shift for the plasma membrane concept is required from the (two-dimensional) continuum model to the compartmentalized fluid model, in which the membrane constituent molecules undergo short-term confined diffusion within a compartment and long-term hop diffusion between the compartments. The plasma membrane is partitioned into many compartments with regard to the translational diffusion of membrane-incorporated molecules,

and practically all of the molecules undergo macroscopic diffusion, by repeating their confinement within a compartment and hopping to an adjacent one. The two-dimensional fluid model of Singer and Nicolson is perfectly suitable if the scale is limited within 10 nm (inset), as shown in the cartoon of their original article, but it cannot be over-extended to a cell membrane structure over several 10s of nanometers.

This entails a paradigm shift of the structure of the plasma membrane from the fluid-mosaic model, proposed by Singer and Nicolson [66], and widely accepted for over 30 years: the plasma membrane in space scales greater than several 10s of nanometers should not be considered as a two-dimensional continuum fluid, but rather that partitioned into closely apposed compartments (*compartmentalized fluid model*, Figure 19.3).

In this chapter, we will first summarize the various observations that led to the concept of the partitioned plasma membrane, which induces hop diffusion of practically all of the molecules in the cell membrane. The membrane-skeleton fence model and the anchored-protein picket model will be described. We will critically compare these models with other observations and models, and evaluate them. Finally, we will discuss the important consequences of plasma membrane compartmentalization in signal transduction in the plasma membrane.

19.2

Thirty-Year Old Enigma about the Diffusion Rate of Membrane Molecules in the Plasma Membrane

For many years, physicists interested in biological membranes have struggled to understand two enigmas. First, for over 30 years, they have wondered why the diffusion coefficients for both proteins and lipids in the plasma membrane are smaller than those found in artificially reconstituted membranes and liposomes, by factors of 5 to 50, with a factor of 20 being a good round number to keep in mind (see Table 1 in Murase et al. [37] and Table 1 in Kusumi et al. [22]). Since a factor of 20 is large, this could not be explained by the crowding of membrane proteins [43] or by the presence of cholesterol [9, 31]. Note that here the diffusion coefficients are those measured at length scales greater than 300 nm, using methods like fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) or fluorescence correlation spectroscopy (FCS), or those observed by SFMT or SPT at the normal video rate (time window of about 100 ms). In this chapter, we call these *macroscopic* diffusion coefficients. In a classical view of diffusion, one might think it strange to talk about microscopic diffusion and macroscopic diffusion, because, whatever the time scale is, the diffusion should be self-similar. However, in the case of a nonideal fluid where various membrane domains with different solubilities with the probe molecule exist, and which interacts with the associated membrane-skeleton meshwork, the diffusion depends on the time scales and the length scales over which the measurements are taken.

The second enigma for membrane biophysicists is the following. When membrane molecules, including receptor molecules and other signaling molecules in the membrane, form oligomers or molecular complexes, either

their macroscopic diffusion rates drop dramatically or they may be temporarily immobilized [17, 18, 40]. This is completely opposite from the general view of membrane biophysicists. Based on the fluid-mosaic model of Singer and Nicolson [66], Saffman and Delbrück (1975) [47] derived an equation that relates the diffusant size to the translational diffusion coefficient in a two-dimensional continuum fluid. For a cylinder (a transmembrane protein) of radius a and height h , floating in a two-dimensional fluid of viscosity μ with a matched thickness (h) immersed in an aqueous medium of viscosity μ' (Figure 19.4), the translational and rotational diffusion coefficients, D_T and D_R , respectively, for the cylinder can be expressed as,

$$D_T = \frac{k_B T}{4\pi\mu h} \left(\log \frac{\mu h}{\mu' a} - \gamma \right) \quad (19.1)$$

$$D_R = \frac{k_B T}{4\pi\mu a^2 h'} \quad (19.2)$$

where γ is the Euler constant (≈ 0.5772). This equation predicts that translational diffusion is very *insensitive* to the diffusant size: tetramer formation from monomers (an increase in radius by a factor of 2) will decrease the diffusion rate by only a factor of 1.1, and even 100mers (an increase in radius by a factor of 10) will have their diffusion rate reduced by only a factor of 1.4 from monomers, assuming a 0.5 nm monomer radius of the membrane-spanning domain. (One should be aware that, at variance with the translational diffusion coefficient (Eq. (19.1)), the rotational diffusion rate is quite sensitive to changes in the oligomer size (Eq. (19.2)). It is inversely proportional to a^2 , i.e., to the number of proteins in a complex in larger oligomers.) Furthermore, Peters and Cherry [43] found that the Saffman-Delbrück theory worked well in the reconstituted membranes of bacteriorhodopsin, which was further supported later [75]. Therefore, the considerable decreases in the diffusion coefficients of membrane receptors upon ligand binding could not be explained by ligand-induced receptor oligomerization. Alternatively, the formation of very large aggregates of thousands of receptor molecules has to be assumed to explain the reduction of the diffusion coefficient upon receptor engagement.

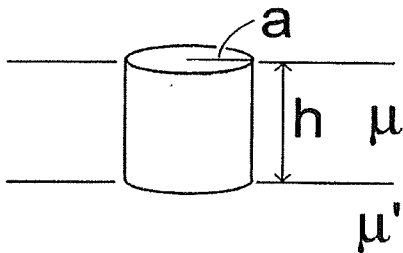


Figure 19.4 A cylinder floating in the two-dimensional fluid continuum in water.

However, the induction of such large aggregates of receptors upon liganding has never been found.

Recently, the Saffman–Delbrück theory was challenged by Gambin et al. [13]. These authors asserted that the dependence of the diffusion coefficient on the diffusant size is much stronger, based on the data by Lee and Petersen (2003) [28]. However, in their presentation, they omitted the diffusion data for the largest diffusant in the Lee and Petersen paper, which are rather consistent with the Saffman–Delbrück theory, and inconsistent with their theory. Steeper changes with an increase in the diffusant radius than those expected from the Saffman–Delbrück theory did take place around the radius of the phospholipid (the basic membrane constituent molecular species, which form the fluid membrane matrix; ~ 0.45 nm in radius) and that of an α -helix (~ 0.55 nm in radius), with the dependence on radius being $1/[\text{radius}]$ (based on the free area theory). If we adopt this model, then when a transmembrane α -helix forms a dimer, the diffusion coefficient will decrease by a factor of 1.4. The breakdown of the Saffman–Delbrück theory in this scale regime, where the diffusant size becomes comparable to the size of the phospholipid, which forms the membrane matrix, has been expected because the Saffman–Delbrück theory assumes the diffusion in a two-dimensional continuum fluid [76]. This was also implied in 1982, when the collision rates of molecular oxygen with lipid membrane probes were measured [26].

Therefore, a convenient rule of thumb with regard to the relationship between the size of the transmembrane α -helix of an integral membrane protein and its diffusion coefficient may be that the diffusion coefficient would decrease by a factor of about 1.4, following the $1/[\text{radius}]$ law, when the protein forms a dimer, and then any oligomers greater than dimers may follow the Saffman–Delbrück relationship, i.e., very slight dependence of the diffusion coefficient on protein oligomerization.

19.3

Macroscopic Diffusion Coefficients for Transmembrane Proteins are Suppressed by the Presence of the Membrane Skeleton

We will deal with the first enigma, i.e., why the macroscopic diffusion coefficients for both proteins and lipids in the plasma membrane are smaller than those found in artificially reconstituted membranes and liposomes, by a factor of ≈ 20 . To clarify the idea, we will initially limit our argument to the diffusional motion of transmembrane proteins.

Even before the single-molecule era, there were quite a few FRAP reports indicating that the reduction of the macroscopic diffusion coefficient in the plasma membrane from that found in artificial membranes may be caused by

the actin-based membrane skeleton [42, 52, 63, 64, 71, 73, 74, 81]. Sheetz and colleagues found that the transmembrane protein band 3 (the majority of the ConA receptor observed in this study is known to be band 3) diffuses about 10 times faster [64] in spectrin-deficient mutant mouse erythrocytes than in normal cells. In mammalian red blood cells, the spectrin meshwork, instead of the f-actin network, forms the membrane skeleton. Furthermore, a number of reports have shown that the lateral diffusion coefficients of transmembrane proteins were increased in blebbed membranes or after partial depolymerization of actin filaments (for example, see Paller [42], Tank et al. [71], Wu et al. [81]).

Tsuji and Ohnishi [74] and Tsuji et al. [73] carried out *both translational and rotational diffusion measurements* for the transmembrane protein band 3 in human red blood cell ghost membranes, and showed that the translational diffusion coefficient of band 3 was increased (decreased) when the spectrin network was stabilized (destabilized, i.e., the tetramer–dimer equilibrium of spectrin was shifted toward the tetramer [dimer]), whereas the rotational diffusion coefficient of band 3 was unaffected. These results clearly indicate that (1) the spectrin meshwork partitions the membrane into small compartments, (2) the non-specific collision of band 3 with the spectrin tetramer, which forms the compartment boundary, is responsible for the reduction of the translational diffusion coefficient in the erythrocyte membrane, and (3) the spectrin tetramer is the effective barrier, and when it temporarily dissociates into dimers, band 3 molecules can cross the compartment boundary. Based on these observations, Tsuji et al. [73] proposed a “spectrin dimer–tetramer equilibrium” gate model (SPEQ gate model).

As such, data showing the involvement of the membrane skeleton in the reduction of the translational diffusion rate were abundant in the era before single molecule observations, particularly in human red blood cells, but direct observations of molecules undergoing short-term confined diffusion within a compartment (made of the membrane skeleton) and long-term hop diffusion between the compartments had to wait until the single-molecule technologies became available. The percolation threshold idea advanced by Saxton played an important role in these studies [53].

19.4

Single-Molecule Tracking Revealed That Transmembrane Proteins Undergo Hop Diffusion

SPT was developed in the late 1980s [6–8, 14, 20, 25, 60, 65]. Using SPT, Sako and Kusumi [48] were the first to directly observe the “hop diffusion” of membrane molecules: transferrin receptor, a transmembrane protein, is temporarily confined in a compartment of about 700 nm in diameter in the membrane,

and then it hops to an adjacent apposed compartment, where it again becomes trapped temporarily (we later found that NRK cells have nested compartments of 230 nm within 700 nm compartments. However, in earlier techniques, only the larger compartments of 700 nm could be detected). By repeating such confinement and hop movements between the compartments, a phenomenon termed hop diffusion, the receptor covers macroscopic areas (Figure 19.5). Since virtually all of the examined transferrin receptor molecules and α 2-macroglobulin receptor molecules were found to undergo hop diffusion, it was proposed that the entire plasma membrane is parceled up into small, apposed domains (except for specialized membrane domains, such as clathrin-coated pits, cell-cell and cell-substrate junctions, and microvilli).



Figure 19.5 Typical trajectories of 40-nm gold probes bound to transferrin receptor, recorded at a time resolution of 25 μ s for a duration of 250 ms (10 000 frames). The background is the actual image of a single frame. Different colors represent various plausible compartments, detected by computer software developed in our laboratory

(in a time sequence of purple, blue, green, yellow, and red). These trajectories suggest that transferrin receptor molecules undergo short-term confined diffusion in a compartment and long-term hop diffusion between the compartments. This was confirmed by the statistical analysis method developed by Fujiwara et al. [12].

The detection of such hop diffusion or temporary confinement within a compartment requires statistical analysis, because such trajectories might occur as a consequence of thermal diffusion [12, 25]. Here, we briefly explain how such an analysis is carried out.

For each molecule's trajectory, the mean-square displacement (*MSD*), $\langle \Delta r(\Delta t)^2 \rangle$, for every time interval is calculated according to the formula [25, 45, 65]:

$$\begin{aligned} MSD(\Delta t) &= MSD(n\delta t) \\ &= \frac{1}{N-1-n} \sum_{j=1}^{N-1-n} \left\{ \left[x(j\delta t + n\delta t) - x(j\delta t) \right]^2 \right. \\ &\quad \left. + \left[y(j\delta t + n\delta t) - y(j\delta t) \right]^2 \right\}, \end{aligned} \quad (19.3)$$

where δt is the frame time and $(x(j\delta t + n\delta t), y(j\delta t + n\delta t))$ describes the molecule's position following a time interval $\Delta t = n\delta t$ after starting at position $(x(j\delta t), y(j\delta t))$, N is the total number of frames in a recording sequence, n and j are positive integers, and n determines the time increment.

We have developed a statistical method to classify each trajectory into the following three modes of motion (Figure 19.6): (1) simple Brownian diffusion mode, in which $MSD(\Delta t) = 4D\Delta t$, (2) directed diffusion mode, in which a molecule moves in a direction at a constant drift velocity (v_x, v_y) , with superimposed random diffusion, $MSD(\Delta t) = 4D\Delta t + v^2(\Delta t)^2$, where $v^2 = v_x^2 + v_y^2$, and (3) confined diffusion mode, in which a molecule undergoes Brownian diffusion while totally confined within a limited area (compartment; $0 \leq x \leq L_x$, $0 \leq y \leq L_y$) during the observation period. The $MSD(\Delta t)$ plot levels off and asymptotically approaches a constant value, as expressed by

$$\begin{aligned} MSD_x(\Delta t) &= \frac{L_x^2}{6} - \frac{16L_x^2}{\pi^4} \sum_{n=1(\text{odd})}^{\infty} \frac{1}{n^4} \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left(\frac{n\pi\sigma_x}{L_x} \right)^2 \Delta t \right\} \\ MSD_y(\Delta t) &= \frac{L_y^2}{6} - \frac{16L_y^2}{\pi^4} \sum_{n=1(\text{odd})}^{\infty} \frac{1}{n^4} \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left(\frac{n\pi\sigma_y}{L_y} \right)^2 \Delta t \right\} \end{aligned} \quad (19.4)$$

$$\begin{aligned} \sigma_x^2 &= 2D_x, \quad \sigma_y^2 = 2D_y, \quad 4D = 2D_x + 2D_y \\ L_r^2 &= L_x^2 + L_y^2. \end{aligned}$$

To describe a molecule undergoing intercompartmental jumps during the observation period, an equation for the $MSD(\Delta t) - \Delta t$ plot has been derived by Powles et al. [44], based on the model in which a Brownian particle (diffusion coefficient in the absence of barriers, D_{micro}) is placed in an infinite array of evenly spaced (L), semipermeable (with a permeability, P) barriers. At long times, relative to the average residency time in a compartment, the transitions over many compartments will look like simple Brownian diffusion with a constant diffusion coefficient, defined as D_{MACRO} , which has the relationship,

$D_{\text{MACRO}}/D_{\text{micro}} = [1 + (PL)^{-1}]^{-1}$. The average residency time within each compartment, τ , is often a useful parameter, and can be determined through the average compartment size and the average long-term diffusion coefficient as $\tau = L^2/4D_{\text{MACRO}}$ (see Kusumi et al. [25], Sako and Kusumi [48], Fujiwara et al. [12] and Suzuki et al. [67] for the details).

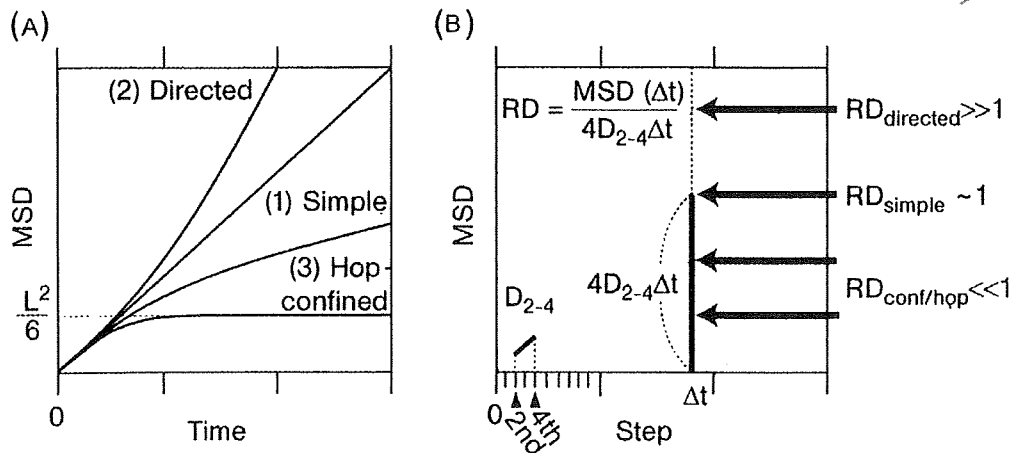


Figure 19.6 Analysis of single-molecule trajectories based on the $MSD(\Delta t) - \Delta t$ plot, and their statistical classification into the three modes of motion. (A) Theoretical $MSD(\Delta t) - \Delta t$ curves representing (1) simple Brownian diffusion, (2) directed diffusion, and (3) confined/hop diffusion. See the text for their equations. The graphs are drawn assuming that the short-term diffusion coefficients that are proportional to the slope near time 0 are identical for all of the cases. (B) The definition of the relative deviation (RD).

RD is defined as the ratio of an experimental $MSD(\Delta t)$ to the fictitious MSD at time $\Delta t (4D_{2-4}\Delta t)$, assuming that the molecule undergoes simple Brownian diffusion without confinement or directed diffusion with a diffusion coefficient determined from the initial slope ($4D_{2-4}$, determined from a linear fit to the MSD values at the second, third, and fourth steps of elapsed time). The more or less that the RD deviates from 1 reflects the chances that the molecule undergoes directed or confined/hop diffusion, respectively.

In essence, the shape of the $MSD(\Delta t)$ curve is characterized based on the relative deviation (RD) from ideal Brownian diffusion (Figure 19.6). RD is defined as $MSD(\Delta t)/4D_{\text{micro}}\Delta t$, where D_{micro} is the two-dimensional short-term diffusion coefficient that is proportional to the slope of the $MSD(\Delta t) - \Delta t$ plot near time 0, which is practically determined from a linear fit to the $MSD(\Delta t) - \Delta t$ plot at the second, third, and fourth frames of elapsed time (D_{2-4} as described in Kusumi et al. [25]; one has to be careful about the accuracy of these values. See Saxton [56] and Martin et al. [33]). This diffusion coefficient only reflects the viscosity properties in the space scale of tens of nanometers, and therefore can be determined independently of the motional modes (one must consider classifying molecules with very small D_{2-4} into the immobile mode, but its value has to be decided for each set of experiments, depending on the noise level and the overall distribution of the diffusion coefficient). The theoretical distribution of RD for free diffusion (which should