

プレスリリース

タイトル

液体ヘリウム（零下 269℃）で生きている細胞を瞬間凍結し、脂肪分子の分布をナノメートルのレベルで見ることに成功した

ポイント

- 生きている細胞を液体ヘリウムで急速に凍結して、分子の動きを瞬時（0.1 ミリ秒以内）に止め、脂肪分子の分布をナノメートル（nm）レベルの精度で見ることに成功した。
- ガングリオシド（脂肪分子の一つ）が細胞膜中でクラスターを形成していることを証明し、さらにコレステロール濃度や温度の変化で分布が大きく変わることを見出した。
- 今回の手法は、注目を集めつつある他の ”脂質超分子構造”（脂肪肝で増加する脂肪滴など）を解析する上でも重要な手段となる。

要旨

細胞膜は脂肪、蛋白質、糖で形成されるが、コレステロールを含む一群の脂肪分子は特殊な領域（ラフト）を作り、シグナル伝達などの重要な現象が起こる場となると推測されている。しかしこれまで用いられてきた方法では脂肪分子を固定することができなかったため、生きている細胞の細胞膜で脂肪分子の分布を正確に捉えることができず、ラフトの正確な大きさや分布を知ることが困難であった。我々は細胞を液体ヘリウムで急速に凍結することで分子の動きを瞬時に止め、さらに白金と炭素の薄膜を細胞膜に蒸着することで分子を物理的に固定した標本を用い、脂肪分子の局在をナノメートルレベルで観察することに成功した。その結果、ラフトの主要成分とされるガングリオシド GM1 という脂肪分子（正確には糖脂質分子）が細胞膜上で直径約 60-90 nm のクラスターを形成していることが明らかになった。このクラスターは細胞膜のコレステロールを減少させたり、細胞を予め氷温で 30 分冷やすことによって、顕著に減少した。また GM1 と同様にラフトの構成分子と考えられている GM3 もクラスターを形成することが確かめられ、しかも GM1 と GM3 のクラスターが別々に存在することが分かった。今回の方法は細胞膜で脂肪分子のナノ局在を捉えることを可能にし、GM1 や GM3 がコレステロール減少や低温で崩壊するクラスターを形成することを初めて明らかにした。

ラフト以外にも脂肪分子が基盤となって形成される ”脂質超分子構造” があり、脂肪肝や粥状硬化症などとの関連が注目されている。今回の方法はそれらの構造を解析する上でも極めて有用な手段となると考えられる。

なおこの研究は医学系研究科・分子細胞学分野の藤田秋一（准教授）、藤本豊士（教授）が複数の共同研究者とともに行ったものであり、アメリカ細胞生物学会の機関誌であるモレキュラー・バイオロジー・オブ・ザ・セル（Molecular Biology of the Cell）6月号に掲載される（電子版刊行は5月25日頃の予定）。

1. 背景

1) 細胞膜は脂肪、蛋白質、糖で形成される構造である。細胞膜分子は二次元方向（＝ 膜の平面に沿った方向）に移動することができるが、個々の分子はランダムに分布するのではなく、場所に

よって密度に差がある。実際、蛋白質に関しては上記のような例が多数報告されている。しかし近年、細胞膜の場所による差を生み出す主役は蛋白質ではなく、脂肪の性質が重要であるという説が提出され、多くの分野に影響を与えてきた。特にコレステロールとスフィンゴ脂質がラフトという小さな領域(ミクロドメイン)を形成し、その領域にシグナル伝達に重要な蛋白質が集まることで、機能を発揮したり、必要な調節を受けるという考え方(ラフト仮説)は広く受け入れられている。また癌や神経変性疾患などの疾患ではラフトに様々な異常が生じることが報告され、それもラフトに関心を集めている大きな理由である。

2) しかしラフトの大きさや分布、寿命などについては論争があり、直径 10 nm 以下から 200 nm 程度まで様々な報告が出されてきた。またラフトの存在自体を疑問視する見方も存在する。このように見方が分かれている理由の一つは、想定されているラフトの大きさが光学顕微鏡の解像度より小さいため、ラフトを直接見るができないということにある。一方、電子顕微鏡の解像度であれば十分にラフトを見ることができるはずであるが、生きている細胞の状態を保ったまま電子顕微鏡で見るのが困難であった。すなわち今までの方法では、ラフト形成の基盤となっている脂肪分子を生きている状態のままで固定することができなかった。

3) 上記の問題点を克服するために、我々は細胞を瞬時に凍結し、極低温下で脂肪分子を物理的に固定する方法を用いる試みを行った。その結果、生きている細胞での脂肪分子の分布をナノメートルのレベルで見ることに成功した。

2. 研究成果

1) 生きている細胞を液体ヘリウムを使って急速に凍結し(凍結までにかかる時間は 0.1 ミリ秒以内と推定されている)、細胞膜の脂肪分子の分布をナノメートル (nm) レベルの精度で電子顕微鏡観察することに成功した。

2) 上記の方法を用いることにより、ラフトの主要成分とされている脂肪分子(ガングリオシド GM1, GM3) が直径 60-90 nm のクラスターを形成していることが分かった。

3) GM1, GM3 のクラスターは細胞膜のコレステロール濃度を低下させたり、細胞を低温 (0-4°C) におくことで大きく減少した。また GM1, GM3 のクラスターはほとんどの場合、別々に存在することが明らかになった。

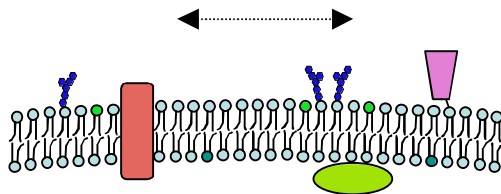
4) ラフトは生理的機能が発現する場であり、癌や神経変性疾患などの発症や病態との関連が推測されている。しかしこのような「場」の生理的意義や異常を明らかにするためには、細胞を溶解させる生化学的な方法ではなく、位置情報が保たれる形態学的方法が必須である。今回の方法はこのことを可能にした点に大きな意義がある。

3. 今後の展開

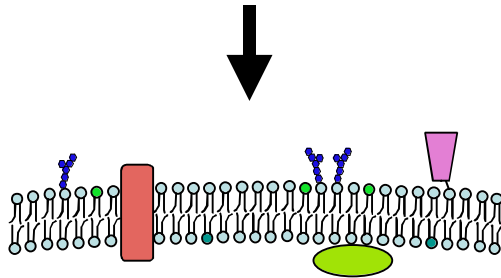
1) ラフトには様々なシグナル伝達関連の分子が集中し、ラフト機能の異常は種々の疾患の原因となると考えられている。今回の方法は他の細胞膜分子にも適用することが可能であり、細胞膜分子の分布をナノレベルで解明することによって、癌や神経変性疾患をはじめとする疾患の病因や病態の解明に貢献することが期待される。

2) ラフト以外にも脂質を基盤として形成される構造(たとえば脂肪肝や粥状硬化症などで脂肪が貯留する脂肪滴)があり、これまで知られていなかった機能が次々に明らかになりつつある。今回の方法はそれらの”脂質超分子構造”の機能を解明する上でも重要な手法である。

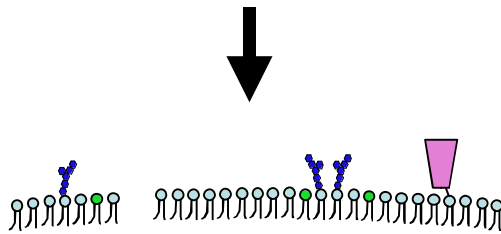
今回使った方法の説明図



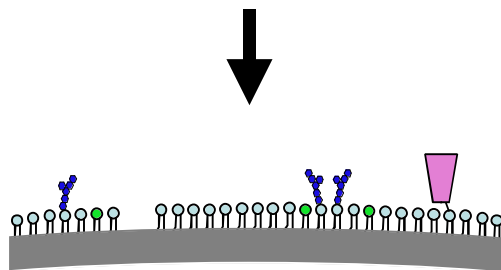
生きている細胞では細胞膜の分子はたえず動いている



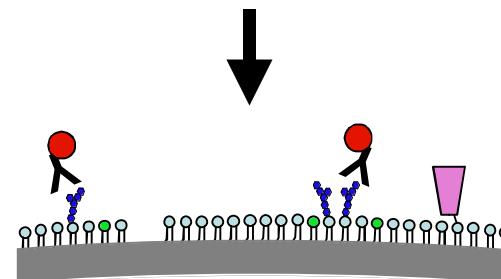
急速に液体ヘリウム温度まで冷却して分子の動きをとめる



凍結状態のまま力を加えると膜は中央で割断される



真空中でカーボン, 白金の薄膜を蒸着し膜分子を物理的に固定する



対象分子だけに結合するプローブで標識し, 電顕観察する

問い合わせ先

名古屋大学医学部・医学系研究科

所属・職名：分子細胞学分野・教授

氏名：藤本豊士

TEL: 052-744-2000

FAX: 052-744-2011

e-mail: tfujimot@med.nagoya-u.ac.jp

広報担当

名古屋大学医学部・医学系研究科総務課総務第一掛

TEL:052-744-2774

FAX:052-744-2785

e-mail: iga-soukika@post.jimu.nagoya-u.ac.jp