

小脳プルキンエ細胞における
イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の構造と存在様式

舟橋 久幸

小脳プルキンエ細胞における
イノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体の構造と存在様式

平成8年3月

東京大学医科学研究所

微細形態学研究部

舟 橋 久 幸

論文の内容の要旨

論文題目 小脳プルキンエ細胞におけるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体の構造と存在様式

指導教官 片山栄作 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 3 年 4 月入学

第 3 種博士課程

第 1 基礎医学専攻

氏名 舟橋久幸

はじめに

細胞内情報伝達系におけるイノシトールリン脂質の重要な役割は既によく知られた事実であり、その伝達経路の詳細が次第に明らかにされてきている。ホルモンや神経情報伝達物質などが細胞膜表面の受容体に結合するとイノシトールリン脂質が分解され、その産物であるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) およびジアシルグリセロール (DG) が生成されるが、この IP₃ の受容体タンパク質がイノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体 (IP₃R) であり、細胞内膜系においてそれ自身が Ca²⁺ チャネルを形成する性質を持つことが判明している。

細胞内膜系において Ca²⁺ チャネルを形成することで知られるもう一つの受容体、ライアノジン受容体 (RyR) は、骨格筋内膜系の電子顕微鏡像において横管 (T-管) と筋小胞体膜 (SR 膜) を連結するいわゆる“フット”と称される構造に相当すると考えられている。また最近、精製した分子のネガティブ染色像やクライオ電子顕微鏡像からその高分解能の三次元再構成がなされている。

一方 IP₃R は、その特異抗体による免疫染色像から小脳プルキンエ細胞に、そしてとり分け重積した滑面小胞体より成る Cisternal Stacks (CS) と呼ばれる特有の袋状構造体に豊富に分布することが明らかにされている。その分子の微細構造に関しては、RyR と同様に界面活性剤を用いて精製した分子のネガティブ染色像が示されているが、個々の粒子の大きさおよび形状の差異が大きいため、膜内における生理的状态での構造を推定することは困難である。そ

ここで、細胞内におけるタンパク質分子の高分解能表面像を得ることが可能な技術、急速凍結・フリーズレプリカ電子顕微鏡法を用いて小脳プルキンエ細胞内における IP₃R 分子の構造と存在様式を探ることを試みた。

材料と方法

1. 動物の死後時間経過に伴う小脳プルキンエ細胞内部膜構造変化の追跡

成体マウスをネブタール麻酔 5 分後に頭骨を開き、小脳虫部をホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドを含む化学固定液に浸しながらスライスして、これを最も新鮮な対照試料とした。また別の個体を、麻酔 5 分後に断頭し固定開始までの時間を変えて死後 2 分から 1 時間までの試料を用意した。各試料をオスミウム酸で後固定後、通常の方法で電子顕微鏡用超薄切片を作製し観察した。

2. ウシ、マウス小脳組織の観察と抗受容体特異抗体による免疫染色

ウシの小脳は、屠殺後 1 時間以内に化学固定し前項と同様の試料作製過程を経て、その準超薄および超薄切片を作製し、顕微鏡観察によりマウス小脳との比較を行った。一方、両者の小脳をホルムアルデヒドを含む溶液で固定し、その凍結切片を抗 IP₃R 抗体およびフルオレセインイソチオシアネイト (FITC) 二次抗体により標識し、蛍光顕微鏡で観察した。

3. ウシ小脳プルキンエ細胞細胞体を豊富に含む分画の分離

プルキンエ細胞内に特異的にしかも豊富に存在する IP₃R 分子の構造をフリーズフラクチャー・レプリカ法により効率良く検索するための材料としてプルキンエ細胞の分画・単離を試みた。ウシ小脳の皮質をカミソリ刃を用いて氷上で細切し、ポリビニルピロリドン、ウシ血清アルブミン、および CaCl₂ を含む HEPES 緩衝液に浮遊させた。浮遊液を注射筒に入れ、ゆっくりとナイロンメッシュを通過させることにより組織をホモジェナイズした。この細胞浮遊液をショ糖密度勾配遠心法により分画し、得られた成分を位相差顕微鏡で観察した。また、この成分を化学固定し、前項と同様の過程を経て電子顕微鏡観察をした。

4. 急速凍結・フリーズフラクチャー・ディープエッチングレプリカの作製

前項のプルキンエ細胞細胞体分画そしてプルキンエ細胞樹状突起が広く分布する生のウシ小脳分子層組織とを金属鏡面圧着法により急速凍結した。また、骨格筋の筋小胞体ベジクル (調製は医学部薬理学教室の飯野、池本両博士による。両博士に感謝いたします。) はマイカ細片法を併用して急速凍結した。これらの凍結試料のフリーズフラクチャー/ディープエッチング後、レプリカを作製しそれらを電子顕微鏡観察した。

5. 凍結置換固定試料を用いた免疫細胞化学

急速凍結したウシ小脳分子層を液体窒素で冷却したタンニン酸/アセトンに移し、-80℃の

ディープフリーザー内で凍結置換固定を行った。固定液をエタノールに置換後、親水性樹脂に包埋した。切片を抗 IP3R 抗体および FITC 二次抗体で免疫染色してその蛍光顕微鏡像を冷却 CCD カメラで撮影した。また、それらを金コロイド標識二次抗体で免疫染色し電子顕微鏡で観察した。

6. フーリエ解析

プルキンエ細胞樹状突起内に豊富に存在する CS 膜の切片像を透過電子顕微鏡像をデジタル化し、コンピュータによる光回折にかけた。得られた二次元フーリエスペクトルから強度の高い反射を選択し、逆フーリエ変換により光濾過像を得た。

結果と考察

マウス小脳を用いた実験により、プルキンエ細胞内部においては、動物の死後時間経過に伴い急速に CS が形成されることが確認された。

ウシ小脳組織をマウスと比較したところ、皮質の層の厚さ、プルキンエ細胞細胞体のサイズおよび樹状突起の径が非常に大きいことが判明した。免疫染色の結果、ウシ小脳プルキンエ細胞にはマウスと同様に、IP3R が豊富に分布することを確認した。

密度勾配遠心法によって分離したプルキンエ細胞細胞体の凍結レプリカ像においてはその形状から CS に対応する構造体の膜面に不規則に並ぶ多数の粒子が観察され、IP3R であろうと推定したが、直接的な同定は不可能であった。

凍結置換後、樹脂包埋・薄切した小脳分子層組織を用いて抗 IP3R 抗体で免疫染色したところ、プルキンエ細胞細胞体および樹状突起に多くの点状の蛍光標識が認められた。金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法で同様の試料を観察すると予測通り、CSの膜外周部およびその間隙に高密度の金コロイド標識が認められた。

一方、小脳分子層組織の凍結レプリカ像においてはプルキンエ細胞樹状突起に対応する神経突起内部に、表面に格子を有するベジクル状の構造体が認められた。そこで、CS 膜面の切片像の光フーリエ解析を試みた。その結果、約 16 nm の周期を持つ格子の存在が示唆された。

さらに凍結レプリカ試料の広範な検索を試み、表面格子が明瞭に観察できる構造体を検出した。その結果、表面格子は 15 nm×17 nm のほぼ平行四辺形の配列であり、一辺が約 12 nm の正方形粒子がその構成単位となっていることが明らかとなった。この単位格子は CS 膜面切片像のフーリエ解析により存在が示唆された配列に相当すると考えられる。したがって、レプリカ像で観察されたこのベジクル状の構造体は、プルキンエ細胞樹状突起に存在するCSに対応すると考えられる。また、格子の構成単位である正方形粒子は、4 個のサブユニットより構成されていた。精製分子のネガティブ染色像と化学架橋実験の結果から IP3R が四量体構造を形成することが示唆されているが、この正方形粒子の存在はそれを支持する結果である。

骨格筋の SR 膜ベジクルの凍結レプリカ像に観察された RyaR は明らかに四量体を単位とする正方形の粒子でありその一辺は約 26 nm であった。一方、IP3R 粒子の一辺 (12nm) は

その 0.46 倍であった。RyaR と IP3R の分子量 (565 kD, 313 kD) に基き、両タンパク質を球状とみなしてその比を計算すると、0.83 となり観察された IP3R の大きさは著しく小さいものであった。精製した RyaR 分子のクライオ電子顕微鏡像から三次元再構成を行った Radermacher らは、RyaR の細胞質側の領域は各ドメイン間の結合が弱くその内部には多量の水が含まれているため、分子全体の占める体積は分子量に基く推定値よりはるかに大きいことを示した。また、彼らの三次元再構成像における RyaR の体積は通常のタンパク質分子を仮定してその分子量から推定される値の 2 から 3 倍であろうと議論している。もし、後者の値をそのまま採用するならば、両受容体の辺の比は約 0.55 程度となる。さらに諸事情を考慮すると両者の比はほぼ観測値に一致する。

今回実験材料として用いたウシ小脳は実験室内で調達することが困難なため死後ある程度時間が経過したものを使わざるを得なかった。現時点における最も重要な課題は、より生理的な条件の下での受容体の分布を検討することである。

小脳プルキンエ細胞における
イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の構造と存在様式

舟 橋 久 幸

要旨

細胞内情報伝達系においてイノシトールリン脂質代謝の役割が指摘され、近年その重要性はますます注目を集めつつある。この系の初期段階においては細胞表面膜の受容体刺激が引き金となってホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の分解が促進され、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃) が細胞内に遊離される。この IP₃ に対する受容体タンパク質がイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体 (IP₃R) であり、それ自身が細胞内膜上で Ca²⁺ チャネルを形成することが知られている (Ferris et al., 1990; Maeda et al., 1991; Miyawaki et al., 1990; Bezprozvanny et al., 1991)。IP₃R は、その特異抗体を標識とした免疫電子顕微鏡法により、小脳プルキンエ細胞内の滑面小胞体が積層した特徴的な構造体 (Cisternal Stacks (CS)) に豊富に局在することが判明しているが、その分子自体の微細構造に関しては、界面活性剤により可溶化して精製した分子のネガティブ染色像があるのみで、細胞内における分子構造については未だ報告されていない。そこで、小脳プルキンエ細胞における IP₃R 分子の微細構造を急速凍結・フリーズレプリカ電子顕微鏡法を用いて探ることを試みた。その結果、ウシ小脳分子層のプルキンエ細胞樹状突起内部に点在するベジクル状構造体の膜表面に一辺が約 12 nm の正方形粒子が 15 nm × 17 nm の平行四辺形の格子を持つ二次元結晶を形成する様子が観察された。同時に急速凍結した分子層組織を免疫電子顕微鏡法で検索した結果、プルキンエ細胞内の CS 膜外周部および膜の隙間に高密度の IP₃R が局在することが分かった。さらに同一試料の CS 膜面の切片像をフーリエ解析にかけることにより、その膜面に前記の配列と同等と考えられる周期的構造の存在が示された。種々の可能性を検討した結果、独立の 2 つの方法により見いだされた格子を構成する正方形粒子は、IP₃R 分子であろうと結論された。この正方形粒子は 4 個のサブユニットから成り、化学架橋実験の結果示唆された IP₃R 分子の四量体構造を支持する。また IP₃R 分子は、同一の方法により観察されたもう 1 つの細胞内 Ca²⁺ チャネル、ライアノジン受容体と比べて著しく小さいことは注目に値する。

はじめに

細胞内情報伝達系においてイノシトールリン脂質が重要な役割を果たすことは既によく知られた事実であり、その反応経路の詳細は次第に明らかにされてきている(Michell, 1975; Abdel-Latif, 1977; Gomperts, 1983; Streb et al., 1983; Cockcroft and Gomperts, 1985)。それによると、ホルモンや神経伝達物質など特定の物質が細胞膜表面の受容体に結合すると GTP 結合タンパク質が活性化され、次いでホスホリパーゼ C の活性化に伴いホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸が分解される。その結果、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃) およびジアシルグリセロールが生成されるが、この IP₃ の受容体タンパク質がイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体 (IP₃R) であり、後述のライアノジン受容体 (RyaR) と同様、細胞内膜系においてそれ自身が Ca²⁺ チャンネルを形成する性質を持つ (Ferris et al., 1990; Maeda et al., 1991; Miyawaki et al., 1990; Penner et al., 1989; Lai et al., 1988; Bezprozvanny et al., 1991)。これら 2 種類の受容体タンパク質のアミノ酸配列はそれぞれの cDNA の塩基配列より決定されているが、それによると、特に C-末端領域の配列は相同性が高く、その部位のアミノ酸配列の特徴から、膜を貫通してイオンチャンネルを形成する重要な部位であろうと推定されている (Furuichi et al., 1989; Takeshima et al., 1989)。もう一つの細胞内 Ca²⁺ チャンネルを形成することで知られる RyaR は四量体が単位となって 1 分子を形成しており、その性質はこの C-末端部分に由来すると考えられるが、相同の C-末端配列をもつ IP₃R も同様に四量体構造を持つと推定され、化学架橋の実験結果もそれを支持している。また、両受容体ともリガンド結合部位を含む大きな N-末端を細胞質側に有している点でも類似している (Maeda et al., 1991; Fleischer et al., 1989; Lai et al., 1989)。RyaR は、骨格筋収縮の引き金となる Ca²⁺ をその貯蔵部位である筋小胞体(SR)から遊離する役割を担うチャンネルタンパク質であり、電子顕微鏡で観察される細胞内の分子構築としては横管(T-管)と結合部SRとを連結する“フット”と称される構造に相当すると考えられている (Block et al., 1988)。RyaR 分子の微細構造に関しては、最近、精製した RyaR 分子のネガティブ染色像やクライオ電子顕微鏡像から高分解能の三次元再構成像が得られており (Radermacher

et al., 1994), 同様の方法を用いてさらに細かい機能部位の局在が探索されつつある (Wagenknecht et al., 1994)。これに対し IP₃R は、小脳プルキンエ細胞内に多く (全タンパク量の約 4%), なかでも重積した滑面小胞体 (sER) より成る特有の袋状構造体 (Cisternal Stacks(CS)) に豊富に分布することが判明している (Ross et al., 1989; Mignery et al., 1989; Otsu et al., 1990; Maeda et al., 1990; Satoh et al., 1990; Yamamoto et al., 1991) もの、その詳しい分子構築の研究は進んでいない。これまでに RyaR と同様に界面活性剤を用いて精製した分子のネガティブ染色像が示されてはいるが (Maeda et al., 1990; Chadwick et al., 1990), 個々の粒子の像に関してはその大きさおよび形状のばらつきが大きく、もちろん膜内における生理的状态での構造は明らかになっていない。そこで、本研究においては、細胞内におけるタンパク質分子の高分解能の表面像を得ることが可能な技術、急速凍結・フリーズフラクチャー・ディープエッチングレプリカ法 (Heuser et al., 1979; Katayama, 1989) を用いて細胞内における IP₃R 分子の構造と存在様式を探ることを試みた。フリーズフラクチャーレプリカ試料の性質上、組織や細胞内部の構造物は不連続な視野に観察され、連続性のある切片の像とは異なって観察部位の同定は必ずしも容易とは限らないので、実験を効率的に進めるために体積の大きいウシ小脳を用いて IP₃R 分子が豊富に存在する小脳プルキンエ細胞細胞体を集め、とりあえずそれを凍結試料として IP₃R 分子を検索した。またプルキンエ細胞樹状突起の広がる小脳分子層の組織も急速凍結し、レプリカを作製するとともに IP₃R に対する特異抗体を用いて免疫細胞化学を行った。これらの結果、細胞内における IP₃R の分子構造およびその存在様式を明らかにすることができた。一方、骨格筋より調製した SR 膜ベジクルの凍結レプリカ像において RyaR 分子を観察し、IP₃R 分子との比較検討を行った。

材料と方法

1. 動物の死後時間経過に伴う小脳プルキンエ細胞内膜構造変化の追跡

オスの成体マウスをネブタール麻酔 5 分後に頭骨を開き、小脳虫部を前固定液 (2 % ホルムアルデヒド + 2.5 % グルタルアルデヒド / 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH=7.4) に浸しながらカミソリでスライスして固定し (4 °C, 一晚), これを最も新鮮な対照試料とした。また別の個体を麻酔開始 5 分後に断頭し、頭骨を開いてから同様に固定した。断頭後固定までに 2 分間を要した。その他、固定までの時間を変えて死後 10 分, 30 分, および 1 時間の試料を用意した。続いて, 1 % オスミウム酸 / 0.1 M カコジル酸緩衝液で後固定 (4 °C, 2 時間) 後, エタノール系列による脱水, エポン・アラルダイト樹脂包埋を経て, 厚さ 80 nm の超薄切片を作製し透過型電子顕微鏡 (日本電子製 JEM-2000 ES, 加速電圧 80 kV) で観察した。

2. ウシおよびマウス小脳組織の観察と抗受容体抗体による免疫染色

本研究では, IP₃R の構造を研究するための材料としてウシ小脳を用いた。材料は, 東京都食肉市場内の芝浦臓器株式会社にて調達し, その場で前述の固定液で前固定を行った。研究室に持ち帰ってから後固定および脱水を行い樹脂包埋した後, 厚さ 0.5 μm および 80 nm の切片を作製し, それぞれを光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察した。この材料は死後 1 時間程度と推定してマウス小脳との比較観察を行った。一方, 蛍光免疫染色用の試料として, ウシおよびマウスの小脳を共に 4 % ホルムアルデヒド / 0.1 M リン酸緩衝液 (pH=7.4) で固定 (4 °C, 1 時間) し, 10, 20, 30 % のショ糖を含む PBS (10 mM リン酸緩衝液, 150 mM NaCl) に平衡化後, O. C. T. コンパウンドに包埋した。厚さ 10 μm の凍結切片を作製し, 抗体の非特異的結合を防ぐためのブロッキング (3 % ウシ血清アルブミン (BSA) + 10 % 正常ヤギ血清 (NGS) / PBS で室温, 1 時間) を行ってから, IP₃R に特異的なポリクローナル抗体 (10 μg/ml) (Nakade et al., 1994) とともに 4 °C で一晚置き, さらにフルオレセン イソチオシアネイト (FITC) で標識した二次抗体 (10 μg/ml) を加えて 4 °C で一晚反応させ, PBS で洗浄後蛍光顕微鏡で観察した。

本研究で IP₃R の局在検出のために用いた上記抗体は, マウス小脳より精製された IP₃R 分子

に特異的なポリクローナル抗体であり、医科学研究所化学研究部にて調製されたものである。ウシ小脳の同受容体に対するこの抗体の反応性を確認するためイミュノブロッティングを行った。ポッター型ホモジェナイザーにウシ小脳皮質の組織片を入れ0.32 M ショ糖, 1 mM エチレンジアミン四酢酸, 1 mM フェニルメタンスルホンフルオリド (PMSF), 1 μ M L-trans-エポキシスクシニルアミド-4-グアニジノブタン (E-64), 21 μ M ロイペプチン, 0.1 mM ジチオスレイトールを含む 4 $^{\circ}$ C の溶液 (組織片の 9 倍容) 中で 50 回ホモジェナイズをした。その懸濁液をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) により可溶化し, ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) にかけて。分離されたゲル上の成分をナイロン膜 (ハイボンド C) に転写し, 5 % BSA, 0.9 % NaCl を含む 10 mM トリス緩衝液 (pH=7.4) でブロッキング後, IP3R に対する上記特異抗体 (1 μ g/ml) で一晩, 室温にて反応後, ビオチン化二次抗体 (2 μ g/ml) および ワサビペロキシダーゼ標識アビジン (1.5 μ g/ml) を反応させ, n-クロロナフトールにより発色させた。図2a は転写前のゲルのクーマシーブリリアントブルー (CBB) によるタンパク質染色, b は転写膜の特異抗体による染色, そして c は非免疫 IgG による対照試料を示す。SDS 電気泳動における移動度が分子量 250 kD に対応する付近に特異抗体のみで染色される成分が検出された。この成分はその見かけの分子量がマウス IP3R とほぼ一致するものであり, ウシ小脳-IP3R と同定された。

3. ウシ小脳プルキンエ細胞細胞体分画の分離調製と凍結試料としての検討

ラット小脳からプルキンエ細胞を精製する方法 (Mikoshiba et al., 1979) にしたがって実験を行った。まず, 2 個のウシ小脳 (各 50 g) を, カミソリを用いて 1~2 mm の厚さにスライスし, 氷上で皮質部分を切り出した後さらに 1 mm 四方に細切して, 200 mM HEPES, 7.5 % ポリビニルピロリドン, 1 % BSA, 3.77 mM CaCl_2 , 1 mM PMSF, 1 μ M E-64, 21 μ M ロイペプチン (溶液 A) に浮遊させた。浮遊液を注射筒に入れゆるやかに圧力をかけながら先端にとり付けた 990, 512, 308, 108, 70, 50, 38 μ m のナイロンメッシュを順次通過させた。得られた細

胞の粗ホモジェネート (20 ml) を溶液 A で 6 倍に希釈し, 2.3 M および 1.3 M ショ糖を含む 200 mM HEPES (pH=7.4), 1 % BSA, および 3.77 mM CaCl_2 (溶液 B) に重層し 38,000×g で 30 分間遠心分離を行った。各分画の組成は位相差顕微鏡により検定した。プルキンエ細胞の存在する 2.3M-1.3M ショ糖界面をシリコン処理を施したピペットで集めた。この分画を, 200 mM HEPES (pH=7.4), 150 mM NaCl, 3.77 mM CaCl_2 , 0.7 M ショ糖 (溶液 C) の中で振盪 (10 分) と遠心 (1,500×g, 10 分) を繰り返して同溶液に置換した後, 2.5 % グルタルアルデヒド, 0.5 % オスミウム酸で固定, エポン/アラルダイト樹脂に包埋しその超薄切片の電子顕微鏡観察を行った。また, プルキンエ細胞細胞体内部の小器官の構造を保持するために必要な溶液組成の検討も行った。さらに, 分離した細胞体を抗 IP3R 抗体により直接標識することを試みた。この分画を開口サイズの小さいナイロンメッシュ (20, 10 μm) を通過させて細胞膜を破壊後, 4 % ホルムアルデヒドで化学固定し, 氷で冷却しながら等量の 6 % アガロース (55°C) と混合し, 細胞片を含むアガロースプレートを作製した (De Camilli et al., 1983)。プレートを 2mm 角に細切して前項と同様にブロッキング後, IP3R に対する特異抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), そして金化合物 (1.4nm 径) を共有結合した二次抗体 Fab' (原液を 2 倍希釈) を順次 4 °C で一晩反応させた。試料は 1 % グルタルアルデヒドで固定した後, 暗室にて銀増感反応を行い, 脱水, 包埋後, その超薄切片の電子顕微鏡観察を行った。

4. 急速凍結・フリーズフラクチャー・ディープエッチングレプリカの作製

調製したプルキンエ細胞細胞体分画および小脳から切り出した分子層組織を液体ヘリウム仕様の鏡面圧着法により急速凍結した (Polaron 社製 E-7200 "SLAMMER") (Heuser et al., 1979)。急速凍結用アルミニウムディスクの上にグルタルアルデヒドで長時間固定した肺切片を置き, その上に, 溶液 C から分注し, 溶媒を 30 mM HEPES に置換した細胞体分画を載せて凍結した。懸濁液をそのまま載せると, レプリカ上で細胞体とクッションとして用いた肺組織との区別が必ずしも明瞭ではないので, まず肺の上に 15 μm のナイロンメッシュを敷きその上にプルキンエ細胞細胞体分画を載せる工夫を行った。小脳組織に関しては虫部小脳回の長軸方向に対

して垂直にスライスした厚さ 1 mm の組織片を、隣り合う分子層が中心付近になるように細切 ($1 \times 2 \times 1$ mm) したものを同様に凍結した。また、医学部薬理学教室の池本、飯野両博士により調製された骨格筋 SR ベジクルをマイカ細片と混合し同様に急速凍結した (Katayama, 1989; Katayama et al., 1996)。これら凍結試料の一部はフリーズフラクチャーおよびディープエッチング (-104°C , 6~8 分) 後、レプリカ (角度 25° で白金-カーボン・シャドウィング) を作製し、透過型電子顕微鏡で観察およびステレオ写真撮影 (傾斜角 $\pm 10^\circ$) を行った。

5. 凍結置換試料を用いた免疫細胞化学

急速凍結したウシ小脳分子層組織の一部は、液体窒素で冷却した 2 % タンニン酸/アセトンに移し段階的に温度を上げて (-80°C で 2 晩, -20°C で 2 時間, 4°C で 2 時間) 凍結置換固定をした (Usukura, 1993)。固定液をエタノールに置換後、親水性樹脂 LR-White に包埋し、 4°C で促進剤を加えて重合させた。厚さ $1\ \mu\text{m}$ の切片を作製し凍結切片と同様のブロッキングを行った後、抗 IP₃R 抗体および FITC 標識二次抗体で免疫染色しその蛍光顕微鏡像を冷却 CCD カメラ (SBIG 社製, ST-8, 14 bit, 1534×1020 pixels, 1 pixel = $9\ \mu\text{m} \times 9\ \mu\text{m}$) で撮影した。また厚さ $0.1\ \mu\text{m}$ の切片は 10 nm の金コロイド二次抗体 (0.2 % ゼラチン + 3 % BSA + 10 % NGS/PBS で原液を 5 倍希釈) 標識 (4°C で一晩) 後、電子顕微鏡で観察した。

6. フーリエ解析

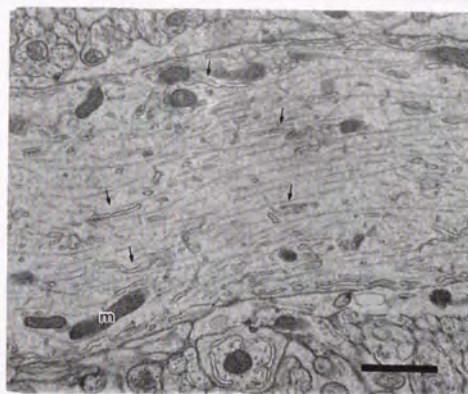
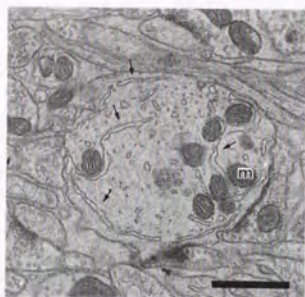
プルキンエ細胞樹状突起の切片像の中から CS の重層面に平行な領域を選び、その画像をフィルムスキャナ (マイクロテック製スキャンメーカー 45-T) でコンピュータにとり込んでデジタル化した後、フーリエ解析を行った (ニレコ社製 リアルタイム画像処理装置 ルーゼックス-F)。得られた二次元フーリエスペクトルから強度の高い反射を選択し、逆フーリエ変換により光透過像を得た。

結果

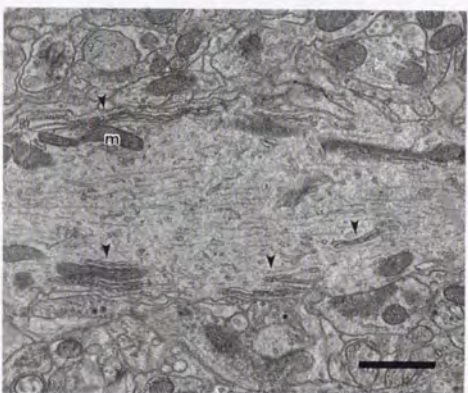
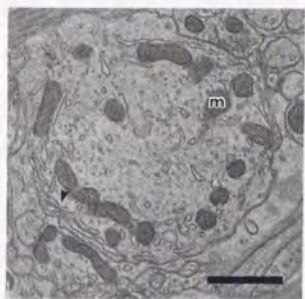
1. 死後の時間経過に伴うマウス小脳プルキンエ細胞内部の膜構造の変化

哺乳動物小脳プルキンエ細胞には IP3R 分子が豊富に分布しておりしかもその多くが特有な重層膜構造 (CS) に集中していることは良く知られた事実である (Ross et al., 1989; Mignery et al., 1989; Otsu et al., 1990; Maeda et al., 1990; Satoh et al., 1990; Yamamoto et al., 1991)。しかしながら CS 構造形成の由来については種々の議論がなされており、初期には化学固定自体によるアーティファクトと考えられたが (Herndon, 1964; Karlsson and Schults, 1966; Van Nimwegen and Sheldon, 1966; Hansson, 1981), 最近ではむしろ動物を灌流固定する際のアノキシアに伴う小胞体再構築の産物であろうとの見方が有力である (Takei et al., 1994)。本研究においては、プルキンエ細胞を大量に調製する目的で実験材料としてウシ小脳を選んだが、屠殺場から実験室へと輸送してくる都合上最短でも死後1時間程度は経過したものを扱わざるを得なかった。そこでこの間に、プルキンエ細胞内に起きる構造変化の概略を推定するためマウスを用いて対照実験を行うことにした。図1は、マウスプルキンエ細胞樹状突起の縦断面および横断面における死後時間経過の様子を示す。いずれも、最初に固定液に浸る切断面から約 100 μm 奥の像である。死後2分において既に、互いの膜表面を接する袋状の滑面小胞体が観察された (矢頭)。10分後には重積する膜の数が増え、3~10層で一つの構造体を形成していた。また、初期には細胞質全体に散在していた小胞体が死後の時間経過とともに表面膜付近に分布の中心を移し表面膜周辺で積層するようにみえた。また、この構造体 (CS) はしばしばミトコンドリアの外膜表面や、樹状突起の表面膜に沿って腕曲していた。死後10分以降では重積した滑面小胞体の形状および数に関してはそれ以上の変化は認められなかった。切断面から約 400 μm 奥では、最も新鮮な対照試料においてさえ3層以上の滑面小胞体の重層構造体がしばしば認められ、このような膜構築の変化が固定液の浸透よりも速く進行する現象であることを示唆している。プルキンエ細胞細胞体においても死後の時間経過に伴い急速なCS形成が検出されたが、樹状突起で形成されるものとは異なり、構成する小胞体最外側の膜がリボゾームを有する粗面小胞体に移行する様子がしばしば観察された。一方、樹状突起のCSにはリボ

0min



2min



10min

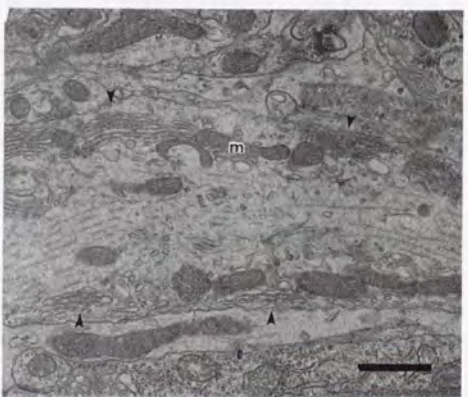
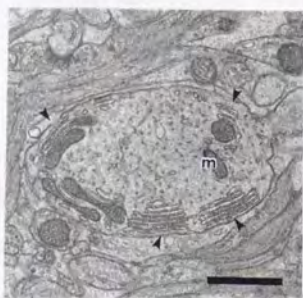


図1. マウス小脳プルキンエ細胞の樹状突起における死後時間経過に伴う滑面小胞体(sER)の形態変化

左は樹状突起長軸方向に対する横断面, 右はその縦断面の像を示す。死後の時間経過とともにsERの急激な再構築が起こり, 多層の袋状構造が重積してCSとよばれる特徴的な構造を形成する。矢印はsER, 矢頭はCS, mはミトコンドリアを示す。スケールバーは1 μm 。

ズームはほとんど付着していなかった。

2. ウシおよびマウス小脳虫部における IP₃R の分布とプルキンエ細胞の比較

図 3a, c はそれぞれウシおよびマウスの小脳皮質矢状断面の光学顕微鏡像を示す。ウシのプルキンエ細胞細胞体の径は約 40 μm であり、マウスの約 2 倍であった。また分子層もウシでは約 500 μm におよびマウスのほぼ 2 倍の厚さであった。樹状突起もウシの方が太くて長かった。図 3b, d はそれぞれウシおよびマウス小脳皮質の抗 IP₃R 抗体による免疫蛍光染色像を示す。マウスと同様、ウシにおいても IP₃R はプルキンエ細胞の細胞体、樹状突起、および軸索に特異的に局在しており他の細胞にはほとんど認められなかった。

次に電子顕微鏡切片において両者の比較を行った。図 4a, b は、それぞれウシ小脳プルキンエ細胞細胞体および樹状突起の、また図 4c, d は、比較のため死後約 1 時間後に化学固定したマウス小脳プルキンエ細胞細胞体および樹状突起の電子顕微鏡像を示す。単位面積当たりの CS の密度は、細胞体、樹状突起いずれの領域においてもウシの方で圧倒的に高かった。また、CS がしばしばミトコンドリアに隣接して存在する様子は共通して観察された。

3. ウシ小脳プルキンエ細胞細胞体分画の調製とその内部構造を保持するための条件の検討

次に急速凍結レプリカ法を用いてウシ小脳の IP₃R 分子を検出することをもくろんだが、その効率を上げる目的でプルキンエ細胞細胞体を集めるべくその単離を試みた。しかし、実際的な分画調製にはかなりの時間を要しその間に細胞体の小器官はしばしばひどく壊れていた。この内部構造を少しでも良い状態で保持するために、分画過程で用いる溶液の組成を検討した。

図 5a は、ショ糖密度勾配遠心法で 1.3 M-2.3 M ショ糖界面にきた神経細胞分画の位相差顕微鏡像を示す。主として、神経突起を消失した細胞体（径約 40 μm ）と細胞核（径約 10 μm ）とが観察された。小脳においてはこのような大型の細胞体をもつ細胞はプルキンエ細胞をのいてなく、間違いなく目的の細胞を豊富に含む分画が調製されたと判断した。図 5b~d は種々の溶液組成における細胞内小器官の構造を示す。200 mM HEPES (pH=7.4) を含む溶液 A の中で組織を細切

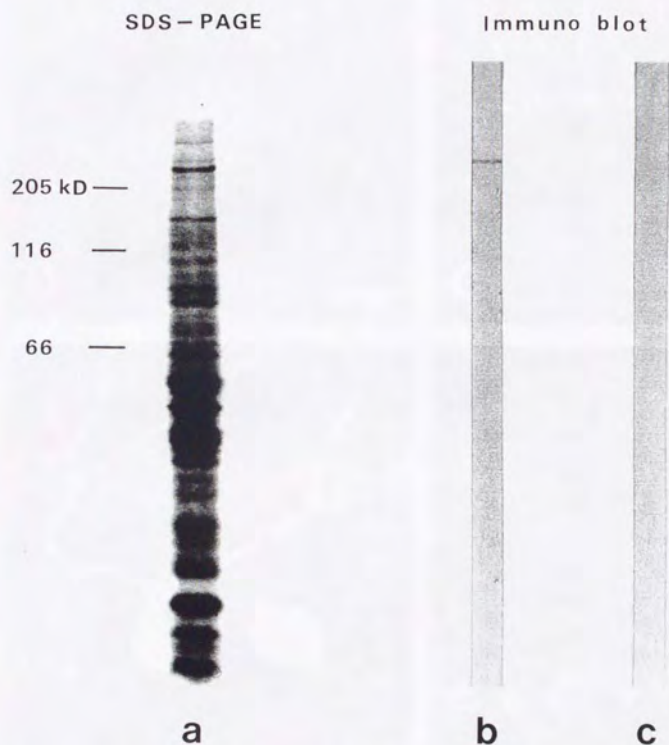


図2. 抗 IP₃R ポリクロナール抗体の特異性の検定

a はウシ小脳全ホモジェネートの SDS 電気泳動パターン。CBB 染色。b, c はナイロン膜に転写後の、それぞれ特異抗体および非免疫 IgG による染色パターンを示す。b において移動度が分子量 250 kD に相当する成分が特異的に染色され、ウシ小脳の IP₃R と同定された。

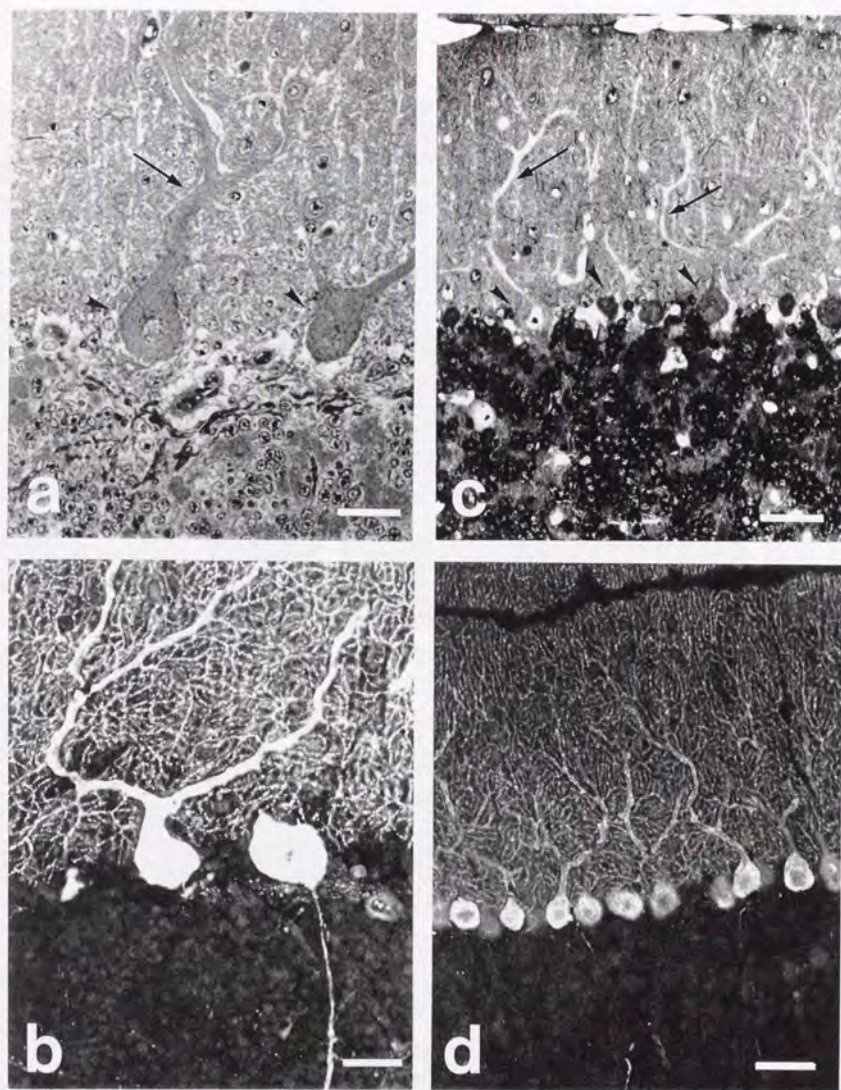


図3. 小脳虫部の矢状断面像と同部位における IP₃R の局在

a, b はウシの, c, d はマウスの小脳を示す。すべて同一倍率である。a, c はトルイジンブルー染色像。ウシプルキンエ細胞の細胞体はマウスのものに比べて著しく大きく、樹状突起も太い。b, d は IP₃R に対する特異抗体による蛍光染色像。IP₃R はプルキンエ細胞の細胞体、樹状突起、および軸索に特異的に存在することがわかる。矢頭はプルキンエ細胞の細胞体、矢印は樹状突起を示す。スケールバーは 40 μ m を示す。

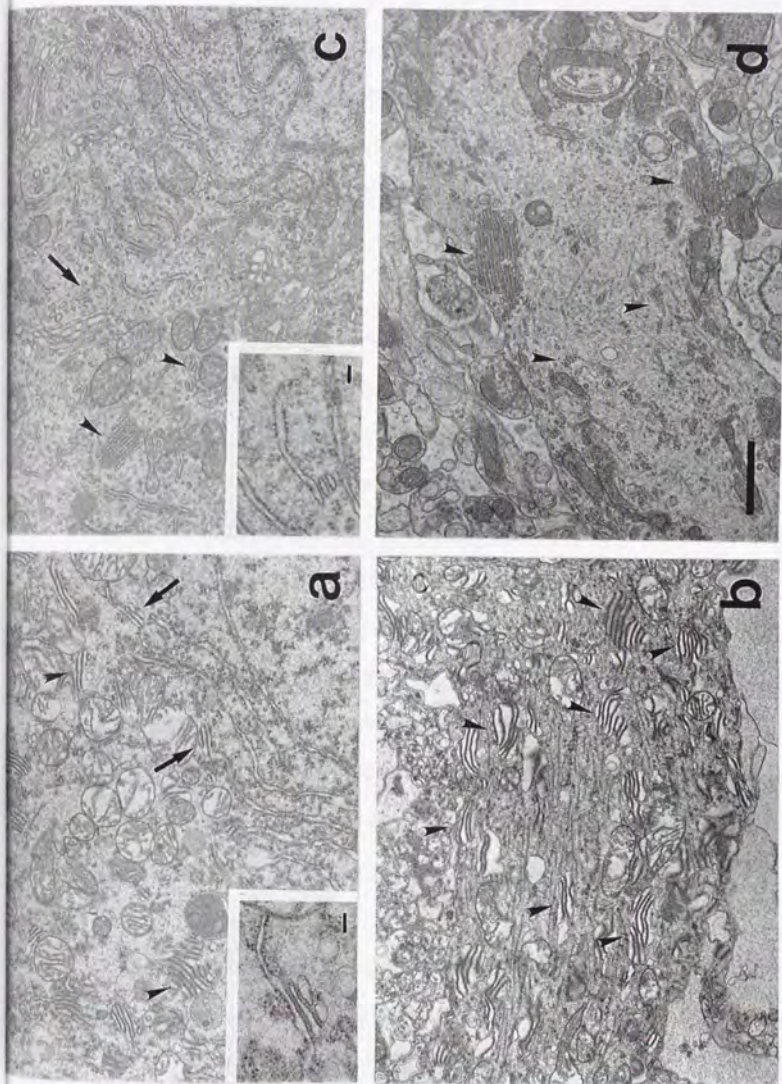


図4. ウシ、マウスの小脳プルキンエ細胞突起および樹状突起の内部構造の比較

a, bはウシの, c, dはマウスのプルキンエ細胞を示す。a, cはそれぞれの細胞体。ウシの方がCS構造体(矢頭)が多い。ウシ、マウスともにCSの一部は付着リボゾーム(矢印)を有する粗面小胞体に移行する(左下に拡大して示す。スケールバーは、0.1 μm)。b, dは樹状突起。ウシの方がCS構造体の数は多いが各CSを構成する層の数はマウスの方が多。スケールバーは1 μm を示す。

し更にシヨ糖を加えた溶液 B に積層して遠心分離を行った後、得られた分画を今度はシヨ糖を含まない溶液 D (他の組成は溶液 C と同じ) に置換した場合には、CS を構成する小胞体膜が膨化していた (図 5b)。HEPES を含まない溶液中で細切および遠心分離を行い、得られた分画を最終的にシヨ糖を含む溶液 C に置換した場合 (図 5c), CS 膜の膨化は改善されたが、ミトコンドリアのクリステの消失が著しかった。そこで、最初の条件で処理を行った後にシヨ糖を含む溶液 C に置換したところ、ミトコンドリア、CS 膜の両者ともかなり良く構造が保持された (図 5d)。

4. 分離されたプルキンエ細胞の直接的抗体標識

研究当初には、細胞内の IP3R 分子に直接的に抗体標識をしてその凍結レプリカ像を得ることを目標として実験を重ねた。細胞内小器官の構造をできるだけ良く保ったままで標識をするために、まず細胞体の径よりも開口サイズの小さいナイロンメッシュを通過させて表面膜をはぎとって内部を露出させ、更に二次抗体として、電子顕微鏡で検出できる市販品として最小の標識、すなわち 1.4 nm の金化合物を共有結合させた抗 IgG 抗体 Fab' を用いた。

プルキンエ細胞細胞体分画をナイロンメッシュを通過させた後アガロースに包埋した材料 (図 6a) においては内部の小器官が十分に露出し、しかも上記の溶液に保存することにより CS とミトコンドリアは識別可能な構造を残していた (図 6b)。つまり当初から目標としてきた条件は達成されたことになる。しかし、CS の外周部には抗体標識が特異的に存在するもののその数は少なくまた高密度の IP3R が存在するはずの膜の間隙には抗体は全く浸透しなかった。このような結果から直接標識による受容体分子の同定は困難であると判断した。

5. 密度勾配遠心法で分離された神経細胞の急速凍結レプリカ像

図 7a は、分離したプルキンエ細胞細胞体の急速凍結レプリカ像のうち、CS が高密度で存在する領域を示す。ディープエッチングにより新たに露出された CS の膜面には一定の径の粒子 ($6.3 \text{ nm} \pm 1.0 \text{ nm}$) が不規則に並んでいた (図 7b)。これらの像は CS の袋状の膜の内側の面を示

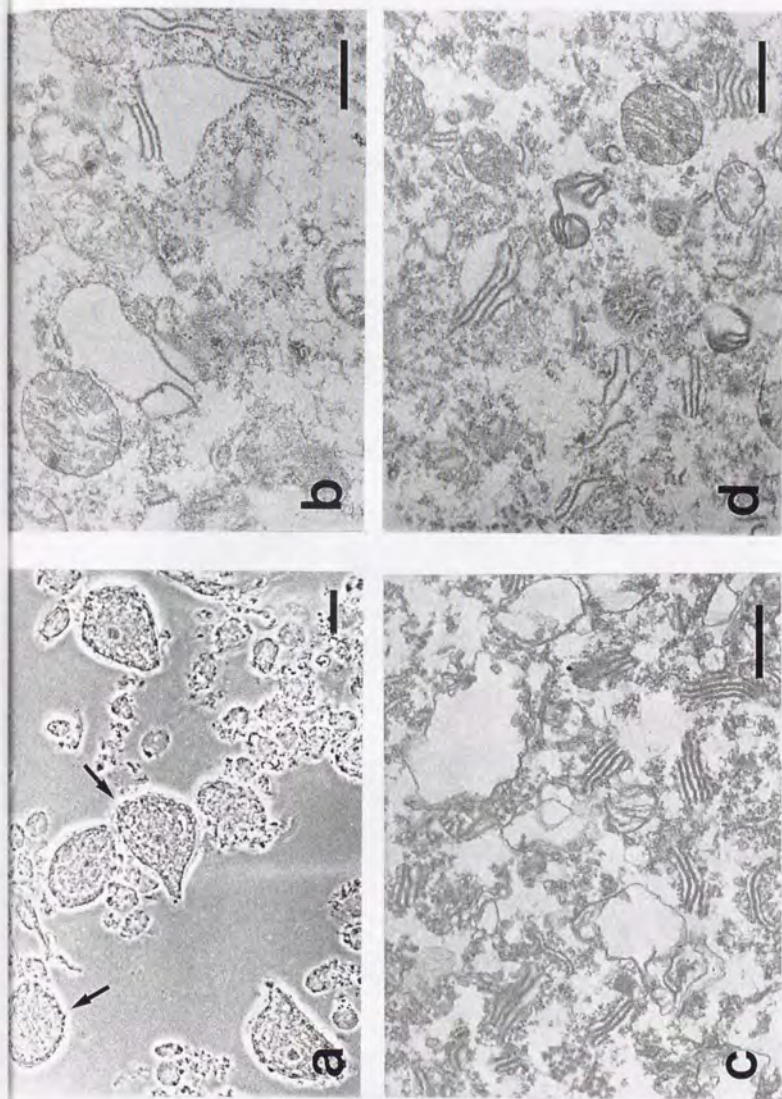


図5. ウシ小脳プルキンエ細胞細胞体のシヨ糖密度勾配遠心法による分離とその内部構造保持の検討

aは1.3M-2.3Mシヨ糖界面に得られた神経細胞分画の位相差顕微鏡像。大型の細胞はプルキンエ細胞細胞体(矢印)、スケールバーは20 μ mを示す。bでは遠心分離後、シヨ糖を含まない溶液に置換した。CSを構成する膜の膨化が認められる。cでは、HEPESを含まない溶液で処理した。ミトコンドリアのクリステの消失が著しい。dはHEPESを含む緩衝液中で遠心分離までの処理を行った後、シヨ糖を含む溶液に置換した場合の像を示す。CSの膨化もミトコンドリアのクリステの消失も起きていない。スケールバーは500 nmを示す。

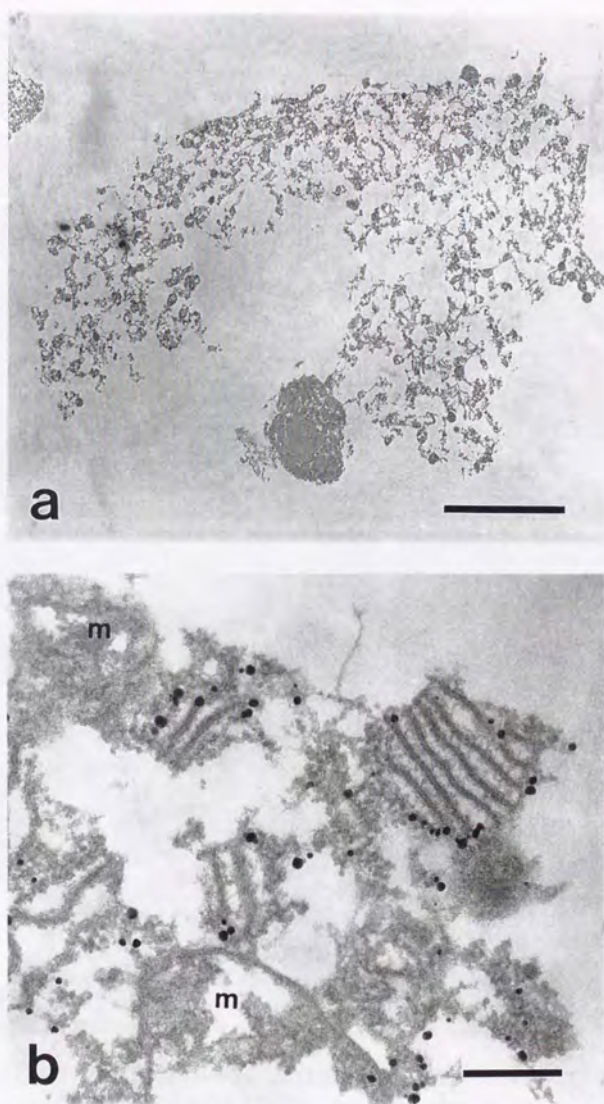


図6. 分離したウシ小脳プルキンエ細胞細胞体の細胞膜を除き、抗 IP₃R 抗体および金化合物標識 Fab' を反応させた像

a は細胞膜を破壊し、細胞質内部を露出させたプルキンエ細胞細胞体を示す。スケールバーは 5 μ m。b は CS の免疫染色像。CS に特異的な標識が認められたが標識密度は低い。m はミトコンドリア、スケールバーは 500 nm を示す。

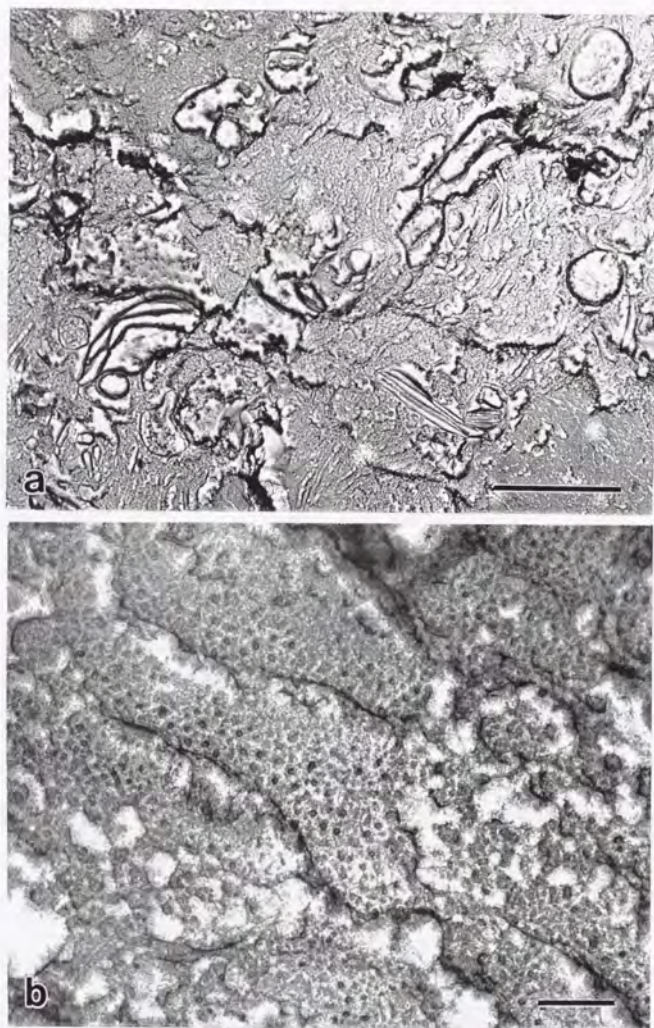


図7. 分離したウシ小脳グルキンエ細胞細胞体の急速凍結フリーズレプリカ像
 a は細胞体部分の低倍率の像を示す。全体的な構造保持は悪いが CS に相当する構造体が多数認められる。スケールバーは $1\mu\text{m}$ 。b は CS の拡大像。膜面には不規則に配列する多数の粒子が存在する。スケールバーは 100 nm 。

しているのかも知れない。

6. ウシ小脳分子層の凍結置換固定試料における IP₃R 分子の分布

図 8a は、ウシ小脳分子層組織の急速凍結試料を、その抗原性を保つ目的でタンニン酸で凍結置換固定し、LR-White に包埋したブロックから作製した準超薄切片上での IP₃R の分布を示す。試料が薄いため FITC 標識した蛍光顕微鏡像は蛍光シグナルが弱く通常の写真撮影は困難であったので高感度、高分解能で広い階調を有する冷却 CCD カメラで撮影した。プルキンエ細胞の細胞体および樹状突起の内部に点状の蛍光標識が多数認められた。点の多くは連続した線上に分布していた。一方、同一試料の免疫金コロイド電子顕微鏡像においてはプルキンエ細胞の細胞体と樹状突起内の CS とが特異的に標識され、IP₃R は CS の外周部表面と膜の間に集中していた (図 8b)。

7. ウシ小脳分子層のフリーズエッチングレプリカ像の観察

図 9 は、ウシ小脳分子層における神経突起の凍結レプリカ像を示す。突起の長軸方向に沿ってほぼ平行に走る多くの微小管およびそれらを架橋する構造物の存在が明らかである。また、表面の性状から区別される少なくとも 2 種類のベジクル状の構造体が見い出された。矢頭で示される径 1 μ m 程度の構造物の表面には特徴的な縞模様を観察された。一方、矢印で示されるベジクルの方にはそのような縞模様は認められなかった。

8. ウシ小脳樹状突起に存在する CS 膜表面の特徴

ウシ小脳のフリーズレプリカ像において、プルキンエ細胞樹状突起内に表面に縞模様を有するベジクル状の構造体の存在を観察した。このような構造体はその重積した膜の特徴から恐らく CS に相当するであろうと推定し、IP₃R 分子が豊富に分布することが明らかになった CS 膜面の切片像をコンピュータによるフーリエ解析にかけた。前記の免疫細胞化学に用いた凍結置換試料より作成したやや厚めの切片における CS の像をフィルムスキャナで読み込み、切り出した領域(図

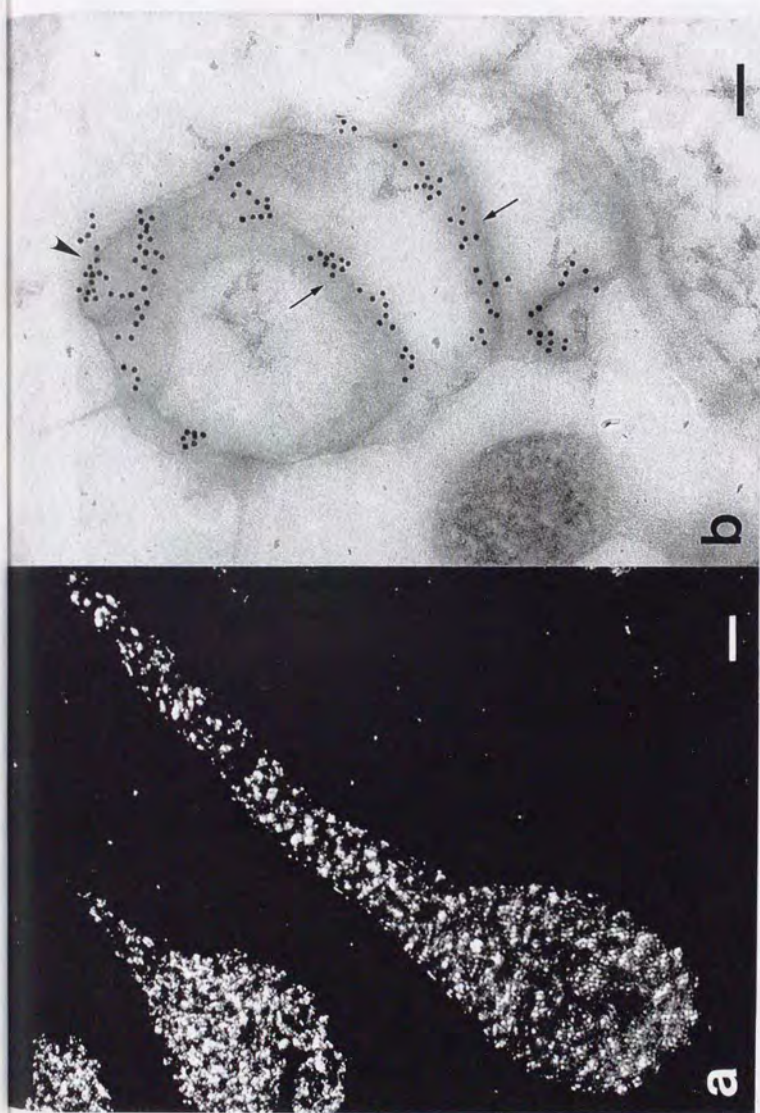


図8. ウシ小脳分子層組織の凍結置換試料における免疫組織化学

分子層組織を急速凍結、凍結置換固定、樹脂包埋後、切片を作製し、IP₃R に対する特異抗体による免疫染色を行った。a は蛍光染色した切片の冷却CCDカメラによる像。プルキンエ細胞の細胞体および樹状突起の内部に点状の蛍光標識が認められる。スケールバーは10 μ m。b は金コロイド標識抗体を用いた免疫電子顕微鏡像。重層した袋状の膜(CS)の外周部(矢頭)およびその間隙(矢印)に多くの金コロイドの存在が観察される。スケールバーは100 nm。



図9. ウシ小脳分子層の急速凍結フリーズレプリカ像

プルキンエ細胞の樹状突起内部には、表面に明らかな縞模様を有するベジクル状の構造物(矢頭)が存在していた。スケールバーは1 μm を示す。

10a)の二次元フーリエ解析を行った。図10bはそのスペクトルを示す。その中から強度の高い反射を抽出し(図10c)逆フーリエ変換により光濾過像(図10d)を得た。当該反射のスペーシングを測定した結果 CS の膜面には約 $16\text{ nm} \times 19\text{ nm}$ の周期を持つ格子配列が存在していることが裏付けられた。19 nm 周期に対応する反射は十分な強度を有してなかったが、16 nm 周期の格子は凍結置換試料の随所に認められたのみならず化学固定した試料の CS 膜面の像でも多くの部位で認められ、このような試料の CS 膜内に何らかの物質による格子配列が普遍的に存在することが確認された。プルキンエ細胞樹状突起中の CS と推定される構造物の膜面に独立の2方法により格子状の配列の存在が明らかになったことから、CS 膜面に何らかの粒子が規則的に配列している可能性が強く示唆された。

9. プルキンエ細胞樹状突起に存在する CS 表面の急速凍結レプリカ

急速凍結フリーズレプリカにおいてはその手技上、フラクチャー方向に平行な面の真表面の像(正面像)を得ることは困難である。ベジクル表面に配列する粒子を検出するために、フラクチャー後、通常の条件よりもずっと長い時間をかけて深いエッチングを行いできる限りそれに近い像を得た(図11a)。ベジクル状構造物の周囲には上記の低倍率像で得られた像と同一周期の縞模様が見られ、ここで初めて明瞭に観察された個々の構成粒子の配列が、正にベジクル表面の格子に対応していることが歴然としている。図11bはその粒子の配列の拡大像を示す。表面格子の構造単位は、約 $15\text{ nm} \times 17\text{ nm}$ の平行四辺形であった。この値は、上記フーリエ解析の結果樹脂包埋切片の CS 膜面に見られた格子間隔にほぼ一致するものであった。図11cは、この配列の模式図である。この格子の構造単位となる粒子は一辺約 12 nm の正方形であり、4 個のサブユニットから構成されているように見えた。さらにそれぞれの単位粒子は、その辺を格子の方向から約 20 度傾斜させて配列していた。また、個々の正方形粒子が一方向穴の開いた鍵型様に観察されるのは、シャドウイングが、エッチング過程で露出した面に対する斜めからの蒸着によってなされるためと考えられる。

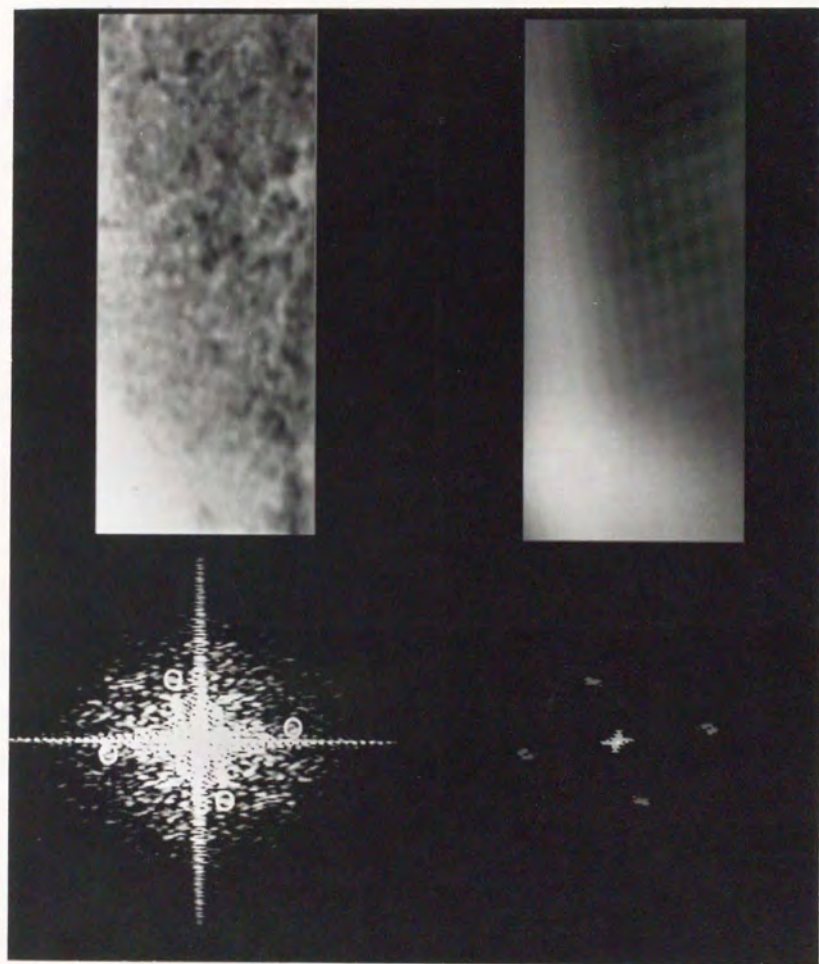


図10. コンピュータによるCS膜面のフーリエ解析(光濾過)

- 光濾過のために切り出したCS膜面の切片像。
- その二次元フーリエスペクトル。強度(振幅)が示される。
- 選択した成分(b)のスペクトルにおいて濃度の高い成分：丸印)。横軸に近い成分(A)は充分に強く確実であるが、もう一方の成分(B)は成分Aよりも弱い。
- 選択された成分のみから逆フーリエ変換して得られた光濾過像。格子の間隔は、約 16 nm (成分Aに対応) \times 19 nm (成分B) である。

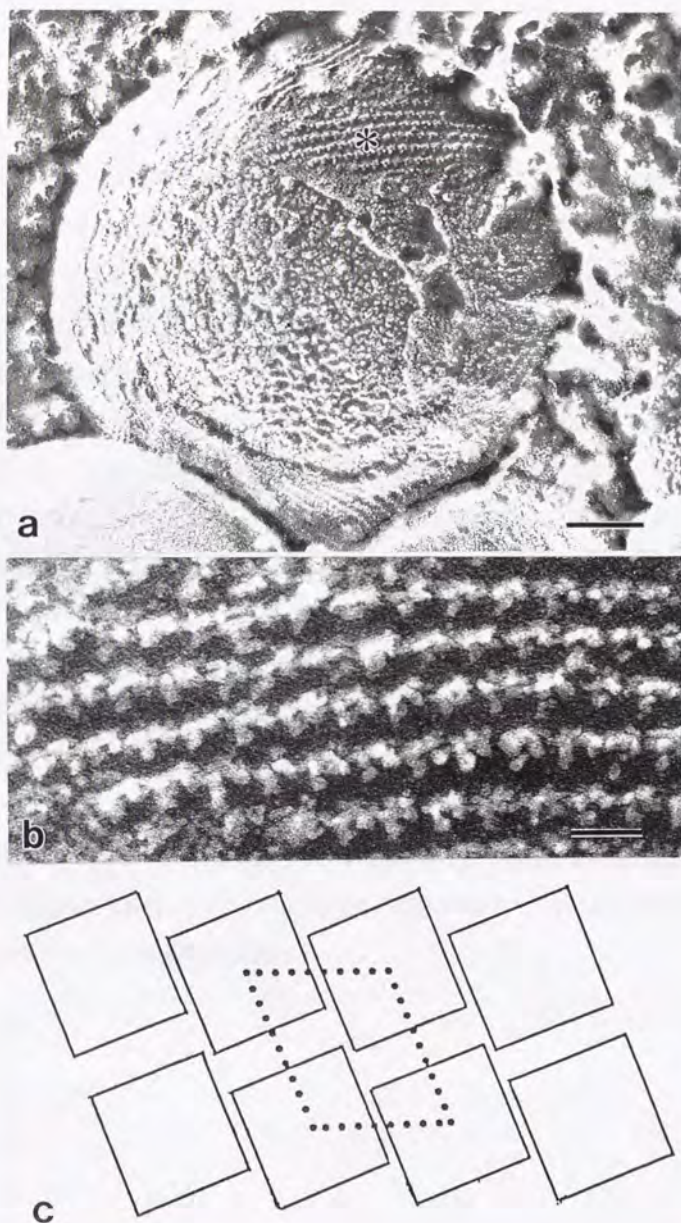


図1 1. 樹状突起内に観察された格子を有するベジクルのディープエッチングレプリカ像

a はベジクル全体の像を示す。b は a の * 印の部位の拡大, c は格子内の分子配列の模式図を示す。表面格子は約 $15\text{ nm} \times 17\text{ nm}$ の平行四辺形の配列をしていた。また、格子を構成する単位粒子は一辺が約 12 nm の正方形であり 4 個のサブユニットから構成されているように見えた。各粒子はその辺を配列格子から 20° 傾斜させて配列していた。スケールバーは、それぞれ 100 nm (a), 20 nm (b) を示す。

10. 骨格筋 SR 膜上の RyaR の構造と IP₃R との比較

骨格筋 SR 膜上に局在する RyaR はそのアミノ酸配列が IP₃R に似ているのみでなく、細胞内 Ca^{2+} チャネルを形成する (Penner et al., 1989) など機能の面でも IP₃R との相同性が指摘されている。そこで、同一の急速凍結フリーズレプリカ法を用いてこれら2種類の受容体の構造を比較した。RyaR を観察するための材料として、骨格筋 SR 膜分画をマイカ細片法を用いて急速凍結し (Katayama et al., 1996) そのフリーズレプリカ像を得た (図 12)。この RyaR 分子のレプリカ像は既に Franzini-Armstrong ら (1984, 1988) が発表しているが、全体が正方形をしており四量体構造をとっていることがようやく判別できる程度の像である。一方、精製された多数の RyaR 粒子のクライオ電子顕微鏡像から高分解能の三次元像が得られており (Radermacher et al., 1994)、それによると各サブユニットの表面に交叉する溝が存在することなどが明らかになっている。これらレプリカ試料においてはこの特徴的な表面構造が認識できることから判断して従来よりも格段に高い空間分解能を有することが明らかである。一方、同一の方法による高分解能のレプリカ中で観察された個々の IP₃R 分子はその正面像は同様に正方形をしているもののその一辺はわずか 12 nm であり、RyaR 分子のほぼ 1 サブユニットに対応する大きさしかなかった。両受容体のこの大きさの相違はそれらの分子量の比から説明できる程度をはるかに越えており更なる議論を要する。この小さな分子の詳しい表面構造は高分解能レプリカ法を用いても観察し難く、ステレオ画像を注意深く観察することにより円周方向に伸びている様子が辛うじて推量できる程度であった。

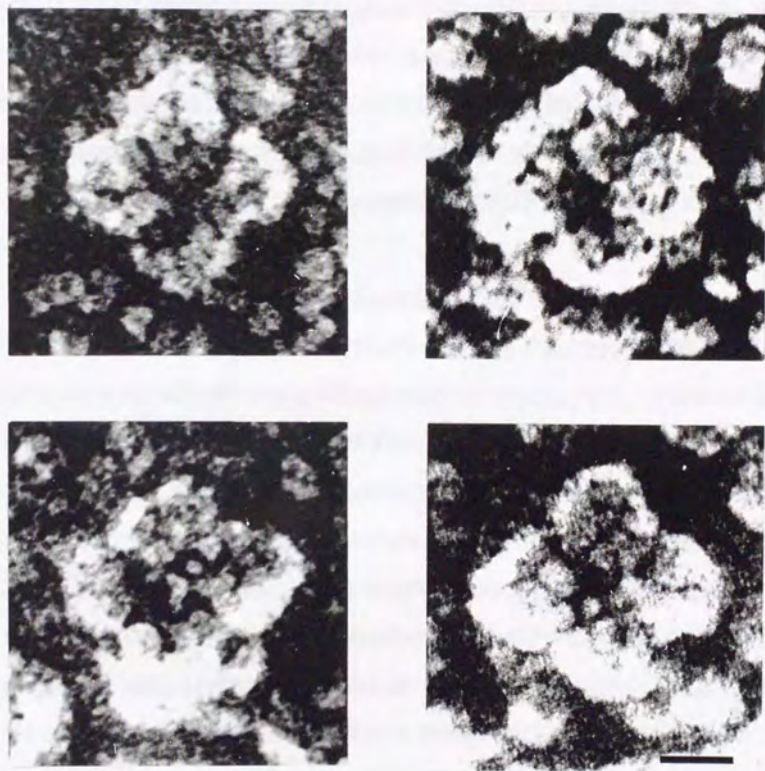


図12. 骨格筋 SR ベジクル表面のライアノジン受容体 (RyaR) の凍結レプリカ像

正面像は一辺が約 26 nm の正方形であり、明らかに 4 個のサブユニットから構成されている。サブユニットの一部には更に詳細な表面プロフィールが認識できる。スケールバーは 10 nm を示す。

考察

1. ウシ小脳組織の特徴

ウシ小脳皮質の光学顕微鏡像をマウスの像を対照として比較したところ、皮質の層の厚さ、プルキンエ細胞の細胞体および樹状突起の径はマウスのほぼ倍であり非常に大きかった。プルキンエ細胞の樹状突起は分子層の表面まで伸びており、ほぼ倍の厚さの分子層を持つウシの方がはるかに長いはずである。神経線維の膜興奮の伝導速度は一般に神経線維の径の平方根に比例するので太い神経突起ほど伝導速度は速く、厚い皮質を有するウシ小脳の機能によく対応する。ブタ小脳においても皮質は厚く、プルキンエ細胞の樹状突起は長くそれに従って太い。

2. 凍結レプリカ像で観察された粒子の物質的同定に関する妥当性

ウシプルキンエ細胞樹状突起内に点在するCSに相当すると推定された構造物の膜面上に二次元結晶を形成する粒子配列の存在が本研究で初めて明らかとなったが、その単位となる粒子は全体が正方形を成しそれぞれが4個のサブユニットから構成されているようにみえた。また、同時に急速凍結をしその後凍結置換固定を経た試料切片を用いて金コロイド標識による免疫染色を行った結果プルキンエ細胞樹状突起内部に点在するCSの外周部表面に検出されたIP₃R分子の豊富な分布は、レプリカ像で認められた配列粒子の存在様式に対応する可能性が示唆された。また、レプリカ像でCSと推定された構造物表面における正方形粒子の配列周期がCS膜の切片像に対するフーリエ解析の結果得られた周期性に近いことは、その構造物がCSに対応する可能性をさらに示唆するものと考えられた。このように本研究においては、免疫細胞化学法およびフーリエ解析を組合わせた手法により前記の正方形粒子がIP₃R分子に相当するであろうとの結論に達した。しかし、ここで用いた材料は精製したIP₃R分子ではないので、それらの粒子が他の分子である可能性も十分に検討されなければならない。そこでこのような形態的特徴から想定されしかも膜内で二次元結晶を形成する可能性を持ついくつかのタンパク質を列挙しそれぞれの妥当性を検討した。まず、リボソームである可能性を考えた。10℃以下の低温で数時間放置したニワトリ胚や(Byers, 1967)、冬眠中のトカゲ卵(Unwin, 1977)では、その粗面小胞体上において

4 個のリボゾームが正方形 (2 列×2 列) の単位構造を形成し、隣り合う単位が互いに 1 列ずつずれて配列すること、また後者においてはそのような小胞体膜同士が互いに向き合って重なった状態に配列することが報告されている。Heuser (1983) は本研究と同様の急速凍結レプリカ法を用いてこのようなリボゾーム複合体を観察した。それによると、観察された正方形粒子の一边は約 48 nm あり、今回観察された正方形粒子の 4 倍もの大きさがある。また、超薄切片の観察からプルキンエ細胞樹状突起内部の CS には付着リボゾームの存在はほとんど認められなかった (Rusakov et al., 1993; Takei et al., 1992; 本研究)。したがって、リボゾームに相当する可能性はない。次の候補である RyaR は骨格筋の T-管と SR 膜とを連結する「フット構造」に相当し (Block et al., 1988) そこで一種の二次元結晶を形成している。しかし、マウスプルキンエ細胞においては、RyaR は細胞体には分布するが樹状突起にはほとんど存在しないことが、心筋、骨格筋の両タイプに反応する抗体染色の結果判明している (Kuwajima et al., 1992; Nakanishi et al., 1992)。また、本研究で見いだされた骨格筋 SR 膜上の RyaR の構造は CS 上の粒子の構造とは明らかに異なるものであり、例え別のタイプの RyaR であっても電子顕微鏡で観察できる構造がそれほど大きく異なるとは考えられない。したがって、RyaR に相当する可能性も消滅する。次に、CS 表面の粒子が、細胞内 Ca^{2+} -貯蔵部位に ATP のエネルギーを使って積極的に Ca^{2+} を運び込む Ca^{2+} -ATPase である可能性を検討した。 Ca^{2+} -ATPase はホタテガイ SR 膜において二次元結晶を形成していることが報告され、その詳しい三次元再構成像も提出されている (Castellani et al., 1983)。また、哺乳動物の SR ベジクルに ATP/バナジン酸を加えておくとホタテガイのものと類似した Ca^{2+} -ATPase の二次元結晶が形成されてくることが知られている (Dux et al., 1983; Taylor et al., 1986)。そこで、それと同一の条件でマウス小脳 P3 分画を ATP/バナジン酸存在下に透析しそのネガティブ染色像を観察したが、二次元結晶様構造は検出できなかった。また、 Ca^{2+} -ATPase の結晶構造は二量体粒子の反平行配列を基本としているのに対し、今回観察された正方形粒子は四量体を単位として配列しており、 Ca^{2+} -ATPase に相当する可能性も低いと考えられる。

3. 骨格筋 SR 膜ベジクル上の RyaR 分子との比較

凍結レプリカ像で観察された RyaR 分子の正面像は一边が約 26 nm の正方形で明らかに四量体を単位としていた。一方, IP3R 分子の正面像は同じ正方形ではあったがその一边は 12 nm であり RyaR の 0.46 倍と算定された。RyaR と IP3R の分子量 (565 kD, 313 kD) に基づき, 両タンパク質を球状とみなして計算するとその比は 0.83 となるはずであり, それに比べ観察された IP3R の大きさは著しく小さいものである。両者に共通な C-末端の膜貫通部分を除くと, わずかながらその比は観測値に近づく方向にある。精製した RyaR 分子のクライオ電子顕微鏡像から三次元再構成を行った Radermacher らは, RyaR の細胞質側の各ドメイン間には大きな間隙が存在し, 分子全体の占める体積は分子量に基づく標準的な値よりはるかに大きいことを示唆した。実際, 彼らの三次元再構成像における受容体全体の体積は RyaR の分子量から推定される値の 2 倍から 3 倍であろうと議論している。もし, 後者の値を採用するならば, 両受容体の辺の比は約 55 % となり, 実際に観察された両者に対応する正方形粒子の約 46 % に近い。上記の議論は受容体タンパク質を完全な球と仮定しており, 例えば高さ方向にやや粒子が伸びていると想定すれば両者の比はさらに観測値に近くなる。したがって, IP3R は RyaR と異なり通常のタンパク質に近いコンパクトな構造をとっていることを想定すれば見かけ上の大きさの問題は解決できるかも知れない。

4. 結晶格子を形成する IP3R 分子の分布と配列上の特徴

二次元結晶内の正方形粒子は, その格子の一方には傾斜した状態で隣接分子と接触し, 別の方向には一定の間隔を保って配列していた。そのような配列の特徴は必ずしもこの粒子のみでなく, 他にも前記の SR 表面の RyaR や, 特殊な条件下のニワトリ胚細胞またはトカゲ卵の粗面小胞体におけるリボゾームでも観察されている。このような分子配列の由来としていろいろな説明が可能であると思われるが, 例えば二次元的に広がる表面膜内にできるだけ多くの分子を集めようとする表面張力と, タンパク質分子同士の間の静電力, とりわけ分子表面の特定の位置に規則的に分布する同一極性の電荷による斥力のバランスの結果として生じたものとも考えられる

(Katayama and Nonomura, 1979)。

5. IP₃R の二次元結晶を有する CS の機能的意義

このように IP₃R 分子が密集しているブルキンエ細胞の CS の機能についてはいくつかの見解がある。当然ながらも、CS 全体が細胞内 Ca^{2+} -貯蔵部位としての役割を果たしている可能性が考えられる。生理的な Ca^{2+} -貯蔵部位には、1) 濃度勾配に逆らって積極的に Ca^{2+} を取り込む Ca^{2+} -ポンプ-ATPase、2) 貯蔵部位内に Ca^{2+} を貯える低親和性・大結合容量の Ca^{2+} -結合タンパク質、3) 必要に応じて Ca^{2+} を細胞内に遊離するイオンチャネルの 3 つの要素が必須であると考えられている。CS は、本来別々に離れて存在しその表面に多くの IP₃R を有する sER の膜が、アノキシア状態に対応して急速に再構築されてきたものであり、隣接する膜表面の 2 個の IP₃R が互いにその先端を接触させて膜同士を架橋しているように見えることが特徴的である。もし CS が Ca^{2+} -貯蔵部位として働いているとするならば、アノキシアに伴う ATP の不足により Ca^{2+} -ポンプによる取り込みが止まり細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇するので、それに対応して IP₃R 同士がチャネルをふさぐように配置することにより Ca^{2+} 流出を止めるべく機能している可能性がある。しかしながら、免疫細胞化学的検索によれば CS への Ca^{2+} -ATPase の分布は他の部位と余り変わらず、高密度の IP₃R に匹敵するほどの量はない模様である (Villa et al., 1991; Takei et al., 1992)。また、典型的な Ca^{2+} -貯蔵部位である骨格筋 SR 膜内腔に多量に存在するカルセケストリン (MacLennan et al., 1971) またはその類似タンパク質の濃度は CS においては低いか、あるいはほとんど存在しないことが報告されており (Takei et al., 1992; Volpe et al., 1991), CS が Ca^{2+} -貯蔵部位として機能する可能性はかなり低いと考えられる。本研究では、IP₃R が生理的条件下で二次元結晶を形成している証拠は得ていない。しかし、sER の表面で IP₃R が非常に高密度に分布していることは間違いなく、細胞がその機能を果たすためにこのような状況を要求しているのであろう。IP₃R による Ca^{2+} チャネルの透過性は RyaR に比べて小さく (約 $1/10 \sim 1/2$) (Ehrlich and Watras, 1988)、局所的に大量の Ca^{2+} が必要な場合には多くの受容体分子が一挙に開口することが要求されと考えられる。小脳における唯一の出力発生細胞であ

り平行線維や登上線維から非常に多くのシナプスを受けているプルキンエ細胞には、細胞内の局所的で微妙な Ca^{2+} 濃度調節を担う IP_3R の需要が多く、必要に応じて受容体分子を Ca^{2+} -貯蔵部位へ送り込める体制を備えているとも考えられる。実際プルキンエ細胞においては、 IP_3R 分子の mRNA が細胞体のみならず粗面小胞体をほとんど含まない樹状突起にも分布することから遊離のリボソームで IP_3R 分子が生合成されることが示唆されており (Nakagawa et al., 1991), 既に合成された IP_3R 分子が CS において大量に貯蔵されているのにもかかわらず、新たな受容体分子の合成が同一領域で開始されている可能性を意味する。また、もし IP_3R が細胞体付近でのみ合成されているとすれば、大量の IP_3R が次々と樹状突起に輸送される必要があり更に大容量の IP_3R 分子の貯蔵部位が要求される。

まとめ

本研究の初期においては、プルキンエ細胞細胞体を単離して抗 IP₃R 抗体で標識後、その急速凍結試料のフリーズレプリカ像で IP₃R 分子を直接同定することを目標として努力を重ねた。また、未標識細胞体の凍結レプリカ像の観察も行ったが、IP₃R 分子の明瞭な同定は困難であった。一方、小脳分子層プルキンエ細胞樹状突起におけるフリーズレプリカ像においては、点在する Cisternal Stacks(CS: 小脳ではプルキンエ細胞に特有の滑面小胞体が積層した構造体)様構造物の表面に 4 個のサブユニットから構成される規則的な配列粒子の存在が観察された。また、同様の凍結試料の、凍結置換固定を経た切片における金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法によって、プルキンエ細胞樹状突起内部に点在する CS の外周部表面および膜の間に IP₃R 分子が非常に多く存在することが明らかとなった。なかでも外周部表面に存在する受容体分子の高密度分布からは、レプリカ像に観察された配列粒子の存在様式にまさに対応する可能性が示唆された。さらに、同一試料から作成したあるいは他の作製過程を経た試料における、CS 膜の切片像をフーリエ解析にかけた結果、CS 膜に何らかの物質による規則的な配列が普遍的に存在する可能性が明らかにされた。しかも、その規則性がレプリカ像に観察された配列粒子の周期性とほぼ同等であり、レプリカ像の前記構造物とその膜面の性質からも CS に対応する可能性が強く示唆された。以上の結果を総合し、プルキンエ細胞の CS 膜表面における IP₃R 分子の同定およびその微細構造と存在様式の観察に成功したと結論された。

このように、ここで明らかにされた IP₃R 分子の構造は CS の膜面に観察されたものである。故に、その構造の意義を考察するためには CS の存在意義を踏まえて議論する必要がある。また、今回観察された IP₃R 分子の存在様式は特徴的なものであるが、本研究で実験材料として用いたウシの小脳は動物の死後ある程度時間の経過したものであり、酸素不足状態における二次的な変化により特徴ある構造を示した可能性も考えられる。したがって、今後は CS の生理的機能も検討するべく実験を進める必要があり、また、様々な生理状態における IP₃R 分子の構造変化を追跡する必要がある。本研究で明らかにされた細胞内における *in situ* の IP₃R 分子の構造は、これらの研究を進めるための基礎となる知見である。

参考文献

- Abdel-Latif, A. A., Akhtar, R. A., and Hawthorne, J. N. (1977) Acetylcholine increase the breakdown triphosphoinositide of rabbit iris muscle prelabelled with [32 P] phosphate. *Biochem. J.* 162: 61-73
- Bezprozvanny, I., Watras, J., and Ehrlich, B. E. (1991) Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P $_3$ -and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351: 751-754
- Block, B. A., Imagawa, T., Campbell, K. P., and Franzini-Armstrong, C. (1988) Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 107: 2587-2600
- Byers, B. (1967) Structure and formation of ribosome crystals in hypothermic chick embryo cells. *J. Mol. Biol.* 26: 155-167
- Castellani, L. and Hardwicke, P. M. D. (1983) Crystalline structure of sarcoplasmic reticulum from scallop. *J. Cell Biol.* 97: 557-561
- Chadwick, C. C., Saito, A., and Fleischer, S. (1990) Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2132-2136
- Cockcroft, S. and Gomperts, B. D. (1985) Role of guanine nucleotide binding protein

- in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Nature* 314: 534-536
- De Camilli, P., Harris, S.M., Huttner, W.B., and Greengard, P.(1983) Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes. *J.Cell Biol.* 96: 1355-1373
- Dux, L., and Martonosi, A.(1983) Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca^{2+} -ATPase vesicles treated with vanadate. *J.Biol.Chem.* 258: 2599-2603
- Ehrlich, B.E. and Watras, J.(1988) Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature* 336: 583-586
- Ferris, C.D., Haganir, R.L., Supattapone, S., and Snyder, S.H.(1989) Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature* 342: 87-89
- Fleischer, S. and Inui, M.(1989) Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu.Rev.Biophys.Chem.* 18: 333-364
- Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K.(1989) Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 342: 32-38

Gomperts, B.D.(1983) Involvement of guanine nucleotide-binding protein in the gating of Ca^{2+} by receptors. *Nature* 306: 64-66

Hansson, H.(1981) Lamellar bodies in Purkinje nerve cells experimentally induced by electric field. *Brain Reseach* 216: 187-191

Herndon, B.M.(1964) Lamellar bodies, an unusual arrangement of the granular endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* 20: 338-342

Heuser, J.E., Reese, T.S., Dennis, M.J., Jan, Y., Jan, L., and Evans, L.(1979) Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J.Cell Biol.* 81: 275-300

Heuser, J.E.(1983) Procedure for freeze-drying molecules absorbed to mica flakes. *J.Mol.Biol.* 169: 155-195

Karlsson, U. and Schultz, R.(1966) Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. *J.Ultrastructure Res.* 14: 47-63

Katayama, E. and Nonomura, Y.(1977) Electron microscopic analysis of tropomyosin paracrystals. *J.Biochem.* 86: 1511-1522

Katayama, E.(1989) The effects of various nucleotide on the structure of actin-attached myosin subfragment-1 studied by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *J.Biochem.* 106: 751-770

Katayama, E., Tomoko, S., Oosawa, K., Baba, N., and Aizawa, S. (1996) Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of Salmonella typhimurium as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images. J. Mol. Biol. 255, in press

Kuwajima, G., Futatsugi, A., Niinobe, M., Nakanishi, S., and Mikoshiba, K. (1992) Two types of ryanodine receptors in mouse brain: Skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. Neuron 9: 1133-1142

Lai, F.A., Erickson, H.P., Rousseau, E., Liu, Q., and Meissner, G. (1988) Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. Nature 331: 315-319

Lai, F.A., Misra, M., Xu, L., Smith, H.A., and Meissner, G. The ryanodine receptor Ca^{2+} release channel complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 264: 16776-16785

MacLennan, D.H. and Wong, P.T.S. (1971) Isolation of calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 1231-1235

Maeda, N., Niinobe, M., and Mikoshiba, K. (1990) A cerebellar Purkinje cell marker P400 protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP_3) receptor protein. Purification and characterization of InsP_3 receptor complex. EMBO J. 9: 61-67

Maeda, N., Kawasaki, T., Nakade, S., Yokota, N., Taguchi, T., Kasai, M., and

Mikoshiba, K. (1991) Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *J. Biol. Chem.* 266: 1109-1116

Michell, R.H. (1975) Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta.* 415: 81-147

Mignery, G.A., Sudhof, T.C., Takei, K., and De Camilli, P. (1989) Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* 342: 192-195

Mikoshiba, K., Hachet, M., and Changeux, J.P. (1979) Biochemical and immunological studies on the P400 protein, a protein characteristic of the Purkinje cell from mouse and rat cerebellum. *Dev. Neurosci.* 2: 254-275

Miyawaki, A., Furuichi, T., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1990) Expressed cerebellar-type inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, P400, has calcium release activity in a fibroblast L cell line. *Neuron* 5: 11-18

Nakade, S., Rhee, S.K., Hamanaka, H., and Mikoshiba, K. (1994) Cyclic AMP-dependent Phosphorylation of an immunoaffinity-purified homotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (type I) increases Ca^{2+} flux in reconstituted lipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 269: 6735-6742

Nakagawa, T., Shiota, C., Okano, H., and Mikoshiba, K. (1991) Differential localization of alternative spliced transcripts encoding inositol 1,4,5-

triphosphate receptors in mouse cerebellum and hippocampus: In situ hybridization study. *J. Neurochem.* 57: 1807-1810

Nakanishi, S., Kuwajima, G., and Mikoshiba, K. (1992) Immunohistochemical localization of ryanodine receptors in mouse central nerve system. *Neuroscience Research* 15: 130-142

Otsu, H., Yamamoto, A., Maeda, N., Mikoshiba, K., and Tashiro, Y. (1990) Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor in mouse cerebellar Purkinje cells using three monoclonal antibodies. *Cell Struct. and Funct.* 15: 163-173

Penner, R., Neher, E., Takeshima, H., Nishimura, S., and Numa, S. (1989) Functional expression of the calcium release channel from skeletal muscle ryanodine receptor cDNA. *FEBS Lett.* 259: 217-221

Radermacher, M., Rao, V., Grassucci, R., Frank, J., Timmerman, A.P., Fleischer, S., and Wagenknecht, T. (1994) Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 127: 411-423

Ross, C.A., Meldolesi, J., Milner, T.A., Satoh, T., Supattapone, S., and Snyder, S.H. (1989) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature* 339: 468-470

Rusakov, D.A., Podini, P., Villa, A., and Meldolesi, J.(1993) Tridimensional organization of Purkinje neuron cisternal stacks, a specialized endoplasmic reticulum subcompartment rich in inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J. neurocytol.* 22: 273-282

Satoh, T., Ross, C.A., Villa, A., Supattapone, S., Pozzan, T., Snyder, S.H., and Meldolesi, J.(1990) The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in cerebellar Purkinje cells: Quantative immunogold labeling reveals concentration in an ER subcompartment. *J. Cell Biol.* 111: 615-624

Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I.(1983) Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306: 67-69

Takei, k., Stukenbrok, A., Metcalf, A., Mignery, A.G., Sudhof, T.C., Volpe, P., and De Camilli, P.(1992) Ca^{2+} stores in Purkije neurons: Endoplasmic reticulum sobcompartments demonstrated by the heterogenous distribution of the $InsP_3$ receptor, Ca^{2+} -ATPase, and Calsequestrin. *J.Neuroscience* 12: 489-505

Takei, K., Mignery, G.A., Mugnaini, E., Sudhof, C., and De Camilli, P.(1994) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 12: 327-342

Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., and Numa, S.(1989) Primary

structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339: 439-445

Taylor, K.A., Dux, L., and Martonosi, A. (1986) Three-dimensional reconstruction of negatively stained crystals of the Ca^{2+} -ATPase from muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Biol.* 187: 417-427

Unwin, P.N.T. (1977) Three-dimensional model of membrane-bound ribosomes obtained by electron microscopy. *Nature* 269: 118-122

Usukura, J. (1993) Rapid freezing and subsequent preparation methods in retinal cell biology. *Methods in Neuroscience* 15: 37-53

Van Nimwegen, D. and Sheldon, H. (1966) Early postmortem changes in cerebellar neurons of the rat. *J. Ultrastructure Res.* 14: 36-46

Villa, A., Podini, P., Clegg, D.O., Pozzan, T., and Meldolesi, J. (1991) Intracellular Ca^{2+} stores in chicken Purkinje neurons: Differential distribution of the low affinity-high capacity Ca^{2+} binding protein, calsequestrin, of Ca^{2+} ATPase and of the ER luminal protein, Bip. *J. Cell Biol.* 113: 779-791

Volpe, P., Villa, A., Damiani, E., Sharp, A.H., Podini, P., Snyder, S.H., and Meldolesi, J. (1991) Heterogeneity of microsomal Ca^{2+} stores in chicken Purkinje neurons. *EMBO J.* 10: 3183-3189

Wagenknecht, T., Berkowitz, J., Grassucci, R., Timerman, A.P., and Fleisher, S. (1994)

Localization of calmodulin binding sites on the ryanodine receptor from skeletal muscle by electron microscopy. *Biophysical J.* 67: 2286-2295

Yamamoto, A., Otsu, H., Yoshimori, T., Maeda, N., Mikoshiba, K., and Tashiro, Y.

(1991) Stacks of flattened smooth endoplasmic reticulum highly enriched in inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor in mouse cerebellar Purkinje cells.

Cell Struct. Funct. 16: 419-432

