

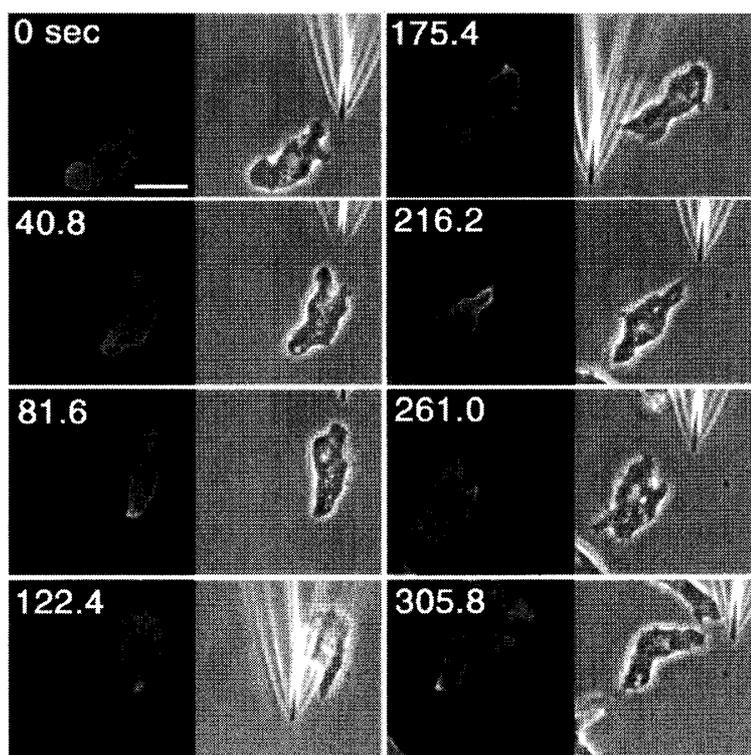
## 細胞性粘菌のアメーバ運動と細胞分裂の分子基盤

## —分子から力発生まで—

祐村恵彦 (山口大学理学部自然情報科学科)

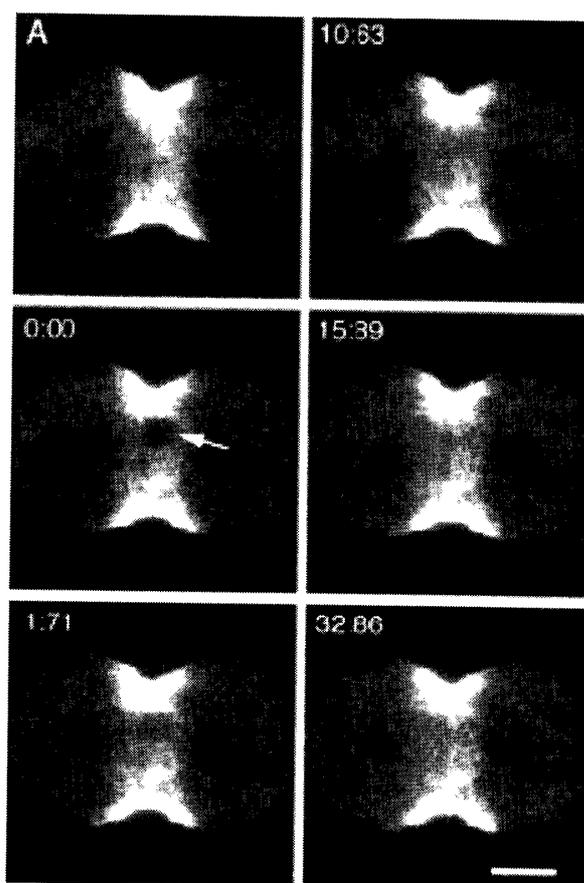
細胞運動のモデル生物として、我々は細胞性粘菌アメーバを用いている。アメーバ運動というと、細胞形態が不定形で、でたらめな運動が思い浮かべられるが、実際には細胞の形態から前後が識別できる‘形態極性’を持っている。この‘形態極性’は、例えば細胞は仮足を主に細胞前端に伸ばしていることから判断できる。さらに、細胞内部には‘形態極性’を支える分子構築があるはずである。細胞運動に関わる代表的分子であるアクチンやミオシンは細胞内で偏在しており、そのような候補と言えるだろう。ミオシンは細胞の尾部に局在し細胞運動のモーター分子として機能しており、同じく尾部に存在するアクチンと共に収縮力を発生させている。一方、細胞前端にはミオシンは存在せずアクチンのみ大量に存在し網目を形成しており、その重合により発生する力が仮足の伸長をもたらす原動力となっている。尾部の収縮と前端の伸長が交互に繰り返され、細胞は基質（地面）上を移動するのである。このような運動周期性があるため、細胞の形態から次にどのように動くかある程度予想することもできる。しかしながら、より確実に次に起こるイベントが予想できるという点では細胞分裂の方が優れた細胞運動のモデルとなる。分裂細胞は2つの接着した娘細胞が反対方向に移動することで分裂すると見ることができる。実際、分裂の両極側にはアクチンを多く含む仮足を形成され、分裂面にはミオシンが偏在する。分裂に特異的なのは、分裂面に集まったミオシンとアクチンは収縮環と呼ばれるリング状構造をとる点である。それでは、ミオシンはどのようにして移動している細胞の尾部や分裂細胞の分裂面に集まるのだろうか。また、ミオシンの力はどのように最終出力である細胞運動に反映されるのだろうか。

細胞性粘菌にはミオシン（ここではタイプII



ミオシンのこと) 遺伝子は1つしかないのだが、この遺伝子を破壊しても細胞は足場となる基質の上では分裂、増殖が可能である。一方、足場のない懸濁培養では、ミオシン欠損細胞は収縮環による収縮ができないため分裂ができず多核化し最終的に死に至る。足場がある場合は、収縮環に頼らずとも両娘細胞の足場依存的な運動によって細胞は分裂できると考えられている。おそらくそのような分裂機構は収縮環による細胞質分裂が進化する以前から備わっていたと考えられる。すなわちミオシンがこの世に出現する以前細胞は、足場依存的に分裂していたのかもしれない。細胞はミオシンを失っても効率は悪いが足場依存的に移動運動できる。ミオシン遺伝子が1つしか無いので、欠損細胞でGFP ミオシン(クラゲの蛍光蛋白質とミオシンの融合蛋白質)を発現させると、細胞内のすべてのミオシンをGFPにより標識されたものとするができる。この方法により、生きた細胞内でのミオシンの様子を直接観察することができる。図1に示すようにミオシンは移動細胞では進行方向に対して尾部に相当する部位に局在し、分裂細胞では分裂面に局在する。

細胞性粘菌は cAMP に対して正の走化性を示す。cAMP を細胞の局所に近づけると、細胞はその方向に仮足を伸ばす。ミオシンはこの時、近づけられた cAMP とは反対の細胞部分に局在するようになる。この後、cAMP を細胞の尾部側に近づけると形態極性の逆転が起こり、それまでの前端部分にミオシンが局在するようになる。この間およそ30秒程度であるが、この短時間にミオシンは素早く細胞の反対方向に移動しなければならない。自由に運動している細胞では頻りに細胞の極性は逆転するのでミオシンは細胞内でかなりダイナミックに動き回るものと考えられる。これを確かめるため、実験が容易な系として分裂細胞で、分裂面に集積した GFP ミオシンをレーザーで退色させる実験を行なった。退色後、GFP ミオシンの蛍光はハーフタイム約7秒で回復した(図2)。この観察結果は、収縮環を形成するミオシンは速やかに入れ替わっていることを示唆している。それでは、入れ替わる相手のミオシンはどこから来るのであろうか。さらに解析を進めたところ、細胞の表層部位からではなく細胞の内側、内質由来であることがわかった。

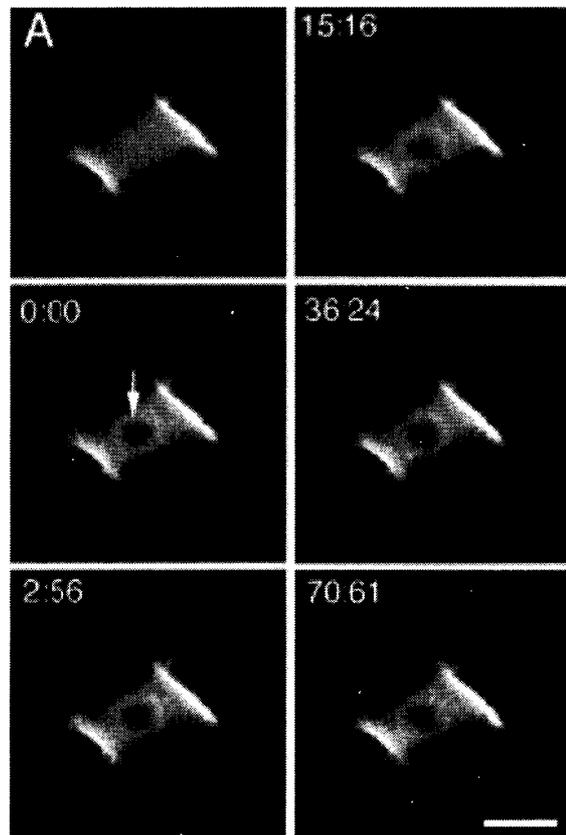


## 研究会報告

ミオシンの細胞内ダイナミクスの分子機構について述べる前に、ミオシン分子についてももう少し説明しておきたい。ミオシンは4つの軽鎖と2つの重鎖よりなるヘテロヘキサマーである。アクチンとの相互作用のもとATPを消費し力を発生する頭部と、長い尾部から構成される。後者には相互に会合する領域があるため、ミオシンIIは双極性の繊維を形成する。これはミオシンIIが他のミオシンファミリーと大きく異なる点である。細胞性粘菌の場合、繊維形成は重鎖のリン酸化によって調節されている。重鎖がリン酸化されると尾部が折れ曲がり、繊維形成ができなくなる。逆に、脱リン酸化されると繊維の形成が促進される。筋肉内でミオシンは繊維を形成しており、アクチン繊維と相互作用して筋収縮を引き起こされるが、この際、異なる極性をもつアクチン繊維がミオシン繊維の両極の頭部と相互作用することが重要である。もし、ミオシンが繊維構造をとらなければ、ミオシン単量体はアクチン繊維上を動くだけで、両方向からのびる極性の異なるアクチン繊維を引っ張ることはできない。ミオシンは繊維となることではじめて、筋収縮や細胞運動のモーターとなれるのである。よって、重鎖リン酸化の調節はミオシンのモーター化の調節と考えられる。ミオシン重鎖のリン酸化部位のアミノ酸は尾部C末端近くの3つのThr残基である。この3つのThr残基をAspに変えると(3Asp)、Aspの持つ負荷電の効果によりミオシンの尾部が折れ曲がり繊維形成ができなくなる。一方、Alaに変えると(3Ala)、脱リン酸化状態を真似ることになり、平衡は繊維形成に傾く。これらの改変ミオシンをミオシン重鎖欠損細胞で発現させると、細胞内のミオシンをすべてリン酸化した状態(3Asp)と、脱リン酸化した状態(3Ala)が再現できる。

GFP-3Ala ミオシンを発現した細胞を作成し、上記と同様の蛍光退色実験を行った。興味深いことにこの細胞では、収縮環の退色部分は退色したままにとどまり蛍光の回復は見られなかった(図3)。このことから、重鎖リン酸化が野生型ミオシンで観察された収縮環ミオシンの速いターンオーバーに参与することが示された。3Ala細胞のミオシンの分布を観察すると、細胞膜を裏打ちするように(いわゆるコーテックスに)繊維が観察された。野生型細胞では、細胞のより深部、内質側にも多くのミオシンが観察される。よって、表層にいるミオシン繊維は重鎖がリン酸化により脱重合し、内質へと移行すると考えられる。

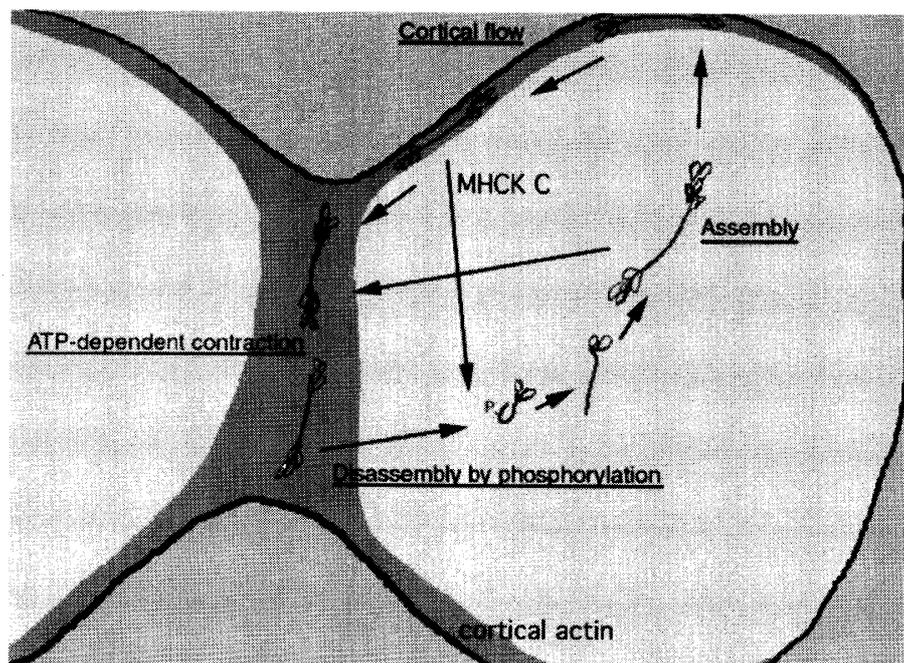
細胞内でミオシンが、表層と内質を



重鎖リン酸化を介して行き来することから、分裂細胞の両極と分裂面の間でリン酸化の勾配が存在すれば分裂面へのミオシンの集合は説明できるだろう(リン酸化勾配説)。しかしながら、リン酸化を受けない3Ala細胞でもミオシンは分裂面に集まったことから、この仮説は一応否定された。また、ミオシンの頭部のATPase活性部位の点突然変異によりATPase活性をもたない、すなわちモーター活性を欠いたミオシンをミオシン欠損細胞で発現させた場合でも、このミオシンはモーター活性がないにもかかわらず分裂面に集まった。もちろん、モーター活性がないので収縮環の収縮はまったく起こらない。この結果は、ミオシンは自らのモーター活性で分裂面に移動しているのではないということを示唆している。GFP-3Alaミオシンを発現している分裂期の細胞で、ミオシンが分裂面に集まる前に予想される分裂面の部位をレーザーで退色させると、残った両極のミオシンが表層を分裂面に向かって移動する様子が捕らえられた。ただし、この移動は野生型ミオシンのターンオーバーよりもゆっくり進行するので、野生型ミオシン細胞で同じ実験を行っても退色域の蛍光が速やかに回復するのみで、移動の様子は観察されない。しかしながら、分裂の際表層のミオシン繊維は分裂面に向かって表層を動いているのである。そして野生型ミオシンでは分裂面への移動と同時に内質との入れ替えが起こっているのである。

膜の流れのことを表層流という。生きた細胞内に蛍光標識ファロイジン(アクチン繊維に特異的に結合する抗生物質)を少量注入すると、表層のアクチンが染色される。この方法によって分裂細胞で、表層アクチンが分裂面に移動の様子が観察できる。細胞膜の外側面でも表層流は認められる。小さなビーズを細胞に載せると、ビーズは分裂面に向かって動く。移動運動している細胞では、表層流は細胞尾部に向かって流れている。モーター活性の無いミオシンが分裂面に集まったのもこのようなアクチンの表層流に乗って移動したのではないかと著者は考えている。図4はここまで述べた、ミオシンの分裂面への集積機構をまとめたものである。

ところで、ミオシンはどうしてせっかく形成された繊維を繰り返して壊しながら、



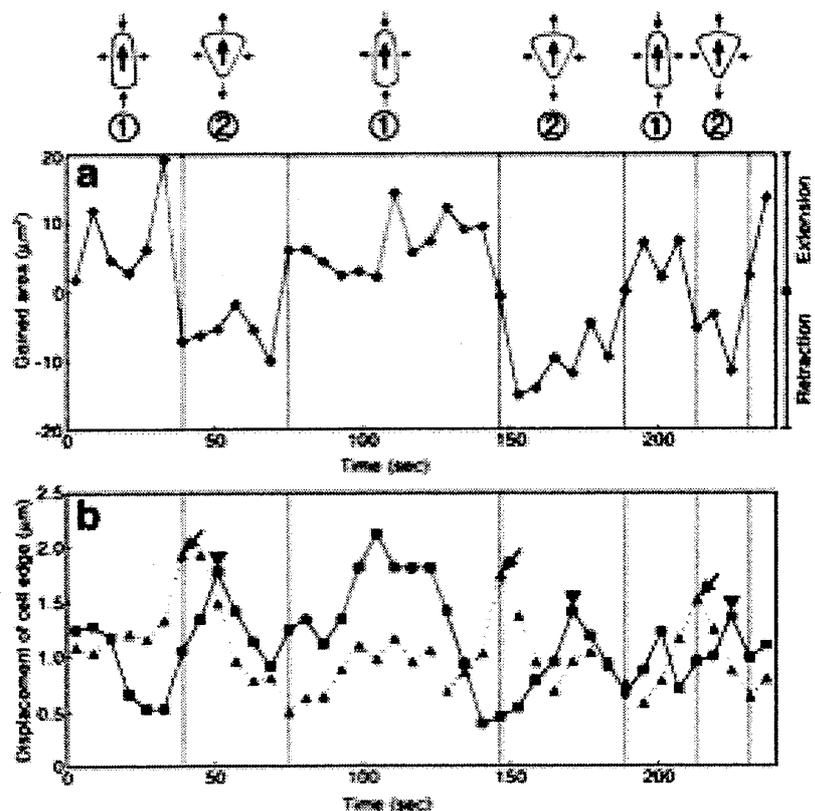
## 研究会報告

分裂面に集まるのであろうか？ 3A1a 細胞ではずっと繊維構造のまま表層に存在し分裂面に移動できる。しかしながらこの場合、集まったミオシンは細胞分裂終了後もその部位に大きな塊として残ってしまう。このことから、繊維の脱重合は分裂後の収縮環の分解に必要であると考えられる。また、細胞は時々なんらかのアクシデントで分裂を途中で失敗することがある。このような時、形成途中の収縮環はうまく具合に消滅する。様々な状況に臨機応変に対応するには、常に動的平衡状態である方が有利なのではないだろうか。

それでは、アクチン表層流自体はどのようにして生じるのであろうか？この問いに対する答えは残念ながら今のところ得られていないが、次のようないくつかの仮説が考えられる。1) 分裂の両極でアクチンの重合が起こり、分裂面で脱重合が起こればそのような流れを生み出すことができる。2) 細胞膜にはミオシンIのような他のミオシンファミリーが存在し、これらがアクチン繊維を動かしている。3) 両極で膜が付加され、分裂面で取り込みがおこれば膜全体の流れが生じ、アクチンはこの膜の流れに乗って動いている。今後、これらの仮説を検証していくことで、表層流の分子機構が明らかとなることを期待している。

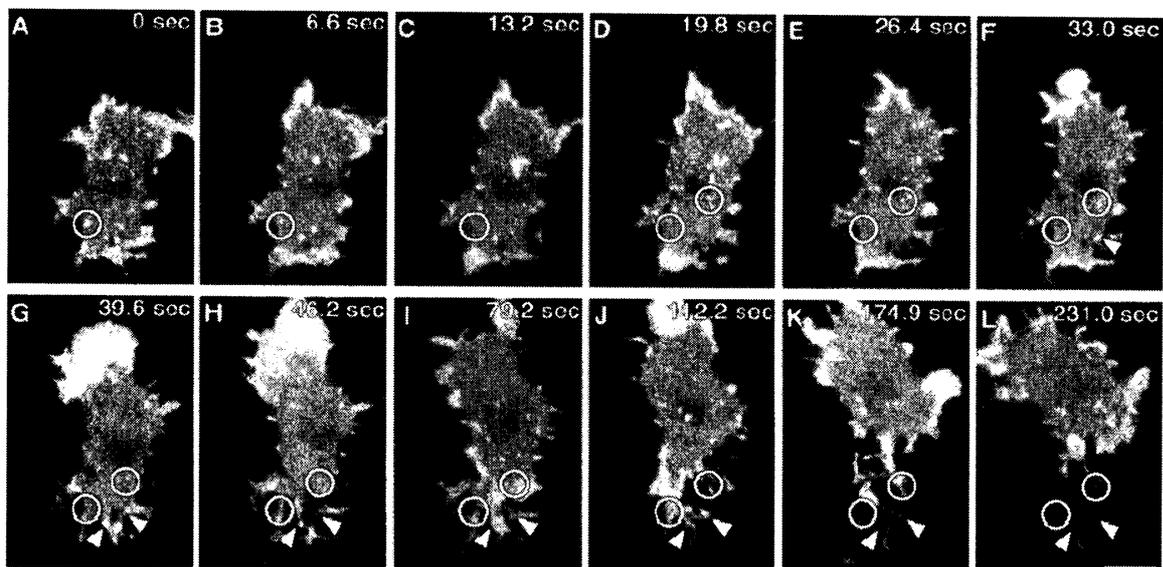
最後にミオシンが細胞運動の力にどのように働いているのかについて述べたい。細胞は基質に力を伝えながら動いている。その力を測定するためには、弾性のあるゼラチンゲルやシリコンゲルを基質として使うのがよいだろう。それらの基質に微小なビーズを埋め込み、細胞が及ぼす力で生じる基質の歪みを、ビーズを指標にして測定する。そのビーズの変位から力のベクトルを知ることができる。細胞

が出す力はナニュートンレベルであった。細胞の周りのビーズの動きを観察すると、細胞の前後のビーズが細胞方向に向かう動きと、逆に離れるような動きが交互に起こっていた(図5)。興味深いことにミオシン欠損細胞では離れるような動きは見られなかった。詳細な細胞運動の



解析から、これらのビーズの動きは細胞が仮足を伸長させる時期と尾部の収縮が起こる時期に相当することが分かってきた。仮足を伸長させる時期には細胞は基質を掴んで伸張し、尾部の収縮が起こる時期には特に尾部で基質との接着が切断されるために引き寄せられていたビーズは元の位置まで戻る。尾部の収縮はさらにビーズを細胞から離れる方向に移動させる力を生み出す。ミオシン欠損細胞では、仮足の伸張のみによって細胞は移動しているため、前者のビーズの動きのみが生じることになる。

細胞が移動運動する際、基質との接着は重要である。その接着部位、すなわち‘足’を順番に踏み変えることで細胞は前進できると考えられる。細胞性粘菌ではアクチンが集積した小さな点状の構造が基質接着面に観察されアクチン焦点と名付けられている(図6)。哺乳類培養細胞の焦点接着に相当する構造



と考えられる。焦点接着には膜貫通蛋白質であるインテグリンが存在し細胞外マトリックスと接続している。細胞性粘菌の場合、細胞外マトリックスは存在しない点で異なる。培養細胞でも細胞外マトリックスなしで基質に接着したり、運動したりできることからより原始的、あるいはより一般的な細胞基質間接着機構が存在するものと考えられる。アクチン焦点の数はミオシン欠損細胞で有意に増加している。このことはミオシンがアクチン焦点形成にネガティブに働くことを意味する。多くのアクチン焦点を持つミオシン欠損細胞は基質に強固に接着している。おそらくミオシンは足を基質から離すのに関わっているであろう。

今後、細胞は協調した足の踏み換えをどのように調節しているのか、仮足の伸張と尾部の収縮を交互に行なわせるリズムを生むシグナルはどのように発生しているのかについて研究していく必要があるだろう。

## 研究会報告

## 参考文献

- Uchida K.S., and S. Yumura (2004). Dynamics of novel feet of Dictyostelium cells during migration. *J Cell Sci.* 15:1443-1455.
- Yumura S., and T. Q. P. Uyeda (2003). Myosins and cell dynamics in cellular slime molds. *Int Rev Cytol.* 224:173-225.
- Uchida K. S, T. Kitanishi-Yumura, and S. Yumura (2003). Myosin II contributes to the posterior contraction and the anterior extension during the retraction phase in migrating Dictyostelium cells. *J Cell Sci.* 116:51-60.
- Yumura S. (2001). Myosin II dynamics and cortical flow during contractile ring formation in Dictyostelium cells. *J Cell Biol.* 154:137-146.
- Uyeda T.Q. P., C. Kitayama, and S. Yumura (2000). Myosin II-independent cytokinesis in Dictyostelium: its mechanism and implications. *Cell Struct Funct.* 25:1-10.
- Yumura S., and Y. Fukui (1998). Spatiotemporal dynamics of actin concentration during cytokinesis and locomotion in Dictyostelium. *J Cell Sci.* 111 :2097-2108.
- Yumura S, and T. Q. P. Uyeda (1997). Transport of myosin II to the equatorial region without its own motor activity in mitotic Dictyostelium cells. *Mol Biol Cell.* 8:2089-2099.
- Yumura S, and T. Q. P. Uyeda (1997). Myosin II can be localized to the cleavage furrow and to the posterior region of Dictyostelium amoebae without control by phosphorylation of myosin heavy and light chains. *Cell Motil Cytoskeleton.* 36:313-322.