Review

脂質シグナリングからみたアメーバ運動

八木澤　仁*

兵庫県立大学大学院生命理学研究科　〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

Amoeba movement from a lipid-signaling point of view

Hitoshi YAGISAWA

Laboratory of Biological Signaling, Graduate School of Life Science, University of Hyogo

3-2-1 Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo-ken 678-1297, Japan

１．アメーバ運動

これまでに解析されている多細胞生物における細胞の運動パターンは、主に以下の３種類であると考えられている。第一は、ひとつの細胞が基質の上で伸展し、周囲の細胞との接着にいたるまで移動していく単一細胞運動 (single cell movement) と呼ばれるもの、第二は、細胞が集団として基質上で相互作用をしながら動いていく、いわゆる集団的運動 (collective motion) と言われるもの、そして第三は、単一細胞が形を自由に変えながら動くいわゆるアメーバ様運動 (amoeboid movement) である。これらの細胞運動の中にはケモタクシス（走化性）のように方向性をもったものとそうでないものがある。後述するように、前２者では伸張先端におけるアクチン細胞骨格の再構成がドライビングフォースとなっていると考えられている。アメーバ様運動では、細胞が基質に付着した状態で細胞の一部を伸張させた仮足（偽足）を伸ばし、基質との間に新たな付着点が形成されると、ふつう仮足伸張のおこる側とは逆の細胞表面が収縮し、結果的に細胞に方向性をもった移動が起きる。この運動様式では、基本的にはアクトミオシンの収縮がドライビングフォースとなると考えられているが、その機構の多くは不明である。

アメーバ運動は、哺乳類など高等動物の細胞から単細胞動物である自由生活性のアメーバまで、多くの真核生物にみられる運動である。動物細胞では、免疫担当細胞の一部である好中球、多形核白血球、マクロファージなど、また中枢神経系のグリア細胞の一部がアメーバ様の運動を行うことが知られている。興味深いのは、がん転移とがん細胞のアメーバ運動との関係である。がん細胞の一部は、通常の細胞伸展や移動以外にドラスチックなアメーバ様の運動をすることにより原発部位を離れ、さらに血管内皮をすりぬけ、血流中に入り込むことにより転移の原因になっている場合があると考えられている (Yamazaki et al., 2005)。したがって、このような細胞運動様式の分子機構を理解することは、細胞生物学的な意義はもとより、医学的にも重要なことと思われる。

*Corresponding author
Tel: +81-791-58-0204
Fax: +81-791-58-0198
e-mail: yagisawa@sci.u-hyogo.ac.jp
(Received: 30 June 2006)

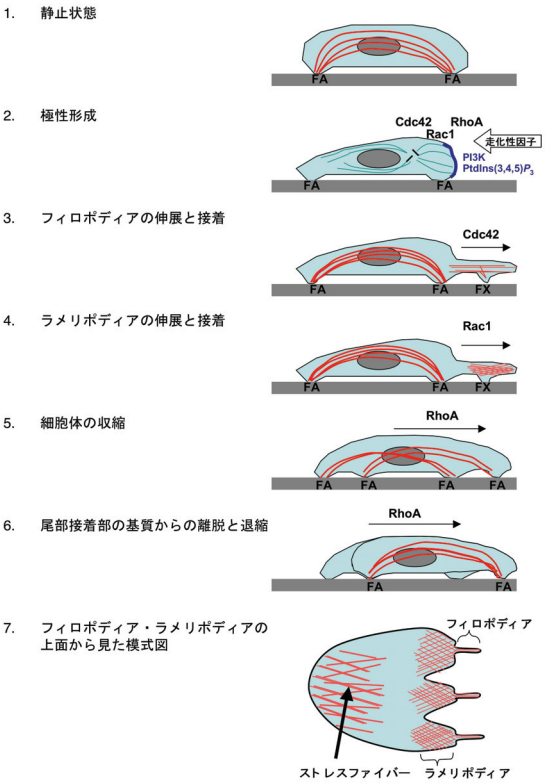


図 1．脊椎動物細胞における細胞遊走の過程とアクチン細胞骨格をコントロールする Rho ファミリータンパク質

細胞が右側方向からの走化性刺激によって移動する様子。図中の太い曲線はアクチンフィラメント、ただし、極性形成時の図中の細い曲線は MTOC から出ている微小管である。極性形成時には、PI3K が伸展方向にリクルートされ、膜の PtdIns(3,4,5)P_3 の局所的形成が見られる。アクチンの重合の場はこの局所的蓄積に一致し、束化アクチン伸張（フィロポディア）あるいはアクチンメッシュの拡大（ラメリポディア）という形でおこる。細胞伸張端の根本にはフォーカルコンプレックス（FX）が形成され、やがてそれは接着斑（FA）となり基質との新たな結合サイトを形成する。細胞体の収縮が行われ、尾部における接着の解除が行われると、遊走の 1 サイクルが完了する。［渡邊ら、蛋白質・核酸・酵素 51:683-692 (2006) をもとに改変］

2．細胞運動における細胞膜と細胞骨格

細胞はどんなものであっても細胞膜という「袋」で包まれている。細胞の形態変化や運動を理解する時には、細胞の中に存在する骨格系のタンパク質の動態とともに、それらが足場をつくっている膜構造の変化に目を向けなければならない。これらのタンパク質と膜との相互作用の変化は細胞運動の分子機構の基本である。さらに、細胞の一部が伸張する時は、その部分に膜の構成成分である脂質がどこからか運ばれてこなければならず、また収縮する時はその部分の脂質が速やかに除去されなければ安定的な動的膜構造は保たれない。局所的な脂質輸送と細胞全体の脂質供給バランスもまた、細胞運動を考える上で極めて重要なファクターである。また、膜は外界との仕切りであり、化学的にはイオンや物質の濃度勾配や物理的には圧力など仕切りになっている。運動のもととなる「力」がどのような形で得られるのか？それは ATP の分解のエネルギーが細胞骨格系タンパク質の構造変化に使用されるものであるのか、それとも細胞内外の圧力差が関係するのか？また運動の方向性はどう決まるのか？などを考えるうえで、細胞膜の動態を解析することはきわめて重要である。

3．多細胞生物における細胞運動

3－1．アクチン細胞骨格系の制御

発生、分化など多細胞生物体の組織構築、および、その維持のための種々の細胞機能の発現においては、細胞接着と細胞運動が協調して働くことが必須である。このような細胞接着や細胞運動を調整・制御するのは主にアクチン細胞骨格系の分子群である。

現在までに、細胞運動を引き起こすアクチン繊維の形態はおおざっぱに言って、ストレスファイバー、フィロポディア（糸状仮足）、ラメリポディア（葉状仮足）の 3 種類に分類され、それぞれ 3 種の代表的 Rho ファミリー G タンパク質、RhoA、Cdc42、Rac1 によって制御されていると考えられている(Nobes and Hall, 1995; Nobes and Hall, 1999; Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 2003)（図 1，2）。RhoA は束化したアクチン繊維であるストレスファイバーの構築を制御し、Cdc42 は細胞表面から突き出されるような直径 1 μm 程の糸の様な仮足であるフィロポディア形成を、Rac1 は広く扁平な仮足であるラメリポディアを構築する。このように細胞が運動するためには、細胞内シグナル伝達系で制御された、速くてダイナミックな細胞骨格の再編成が起こることが必要である。細胞が運動や遊走を行う場合には、まず、進行方向の先端部で Cdc42 が活性化され、これが N-WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) / Arp2/3 (actin related protein 2/3) 系を活性化する。そしてアクチンの急激な重合により、束化したアクチン繊維が前方に伸張し、突起（フィロポディア）が形成され、細胞伸張の方向性が決定される。次に Rac が活性化され、これが WAVE (WASP-family verprolin homologous protein)/Arp2/3 系を活性化する。アクチン繊維の平板的メッシュ構造がアクチンの重

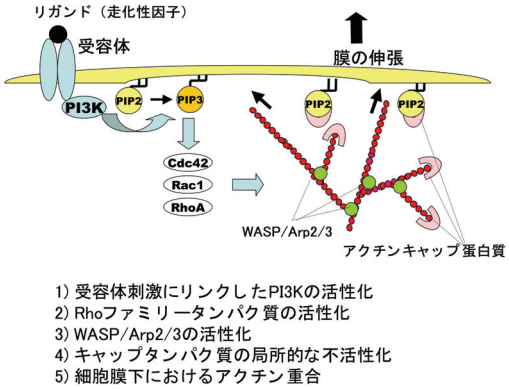


図２．細胞性粘菌および好中球の細胞膜近傍における PtdIns(3,4,5)P_3 (PIP3)と PtdIns(4,5)P_2 (PIP2)の役割

合により拡張し、膜を押し出すことによりラメリポディアが形成され、細胞膜全体が前方へ伸展する。前述の単一細胞移動と集団的細胞移動では、主にこの Rac と WAVE の関与する系が関与すると考えられている。つまり伸張先端におけるアクチン細胞骨格の再構成がドライビングフォースとなっている。伸張部の根本の部分には接着斑が形成され、インテグリンや E-カドヘリンなどの分子と基質との相互作用する場ができる。細胞の尾部では Rho が活性化され、アクチンストレスファイバーが発達する。尾部の退縮もスムーズに細胞が移動するのに必須であるといわれている（図１）。

３−２．イノシトールリン脂質：細胞の「骨（骨格）」を制御する「油（脂質）」

このような細胞骨格系のタンパクを調整するものとして、近年、細胞膜構成脂質の一種であるイノシトールリン脂質が関与していることが明らかになってきた(Yin and Janmey, 2003)。その主なものとして、PtdIns(3,4,5)P_3、もしくは、PtdIns(4,5)P_2による細胞運動制御が特に注目され、多くの研究者により、多様な実験系を利用した研究が著しい勢いで展開されつつある。

イノシトールリン脂質は細胞内に存在するリン脂質の僅か数%を占めるにすぎない。生体はイノシトール環にリン酸付加のない PtdIns に加え、Ptdhs(3)P、Ptdhs(4)P、Ptdhs(5)P の３種類の一（モノ）リン酸、Ptdhs(3,4)P_2、Ptdhs(3,5)P_2、Ptdhs(4,5)P_2 の３種類の二（ビス）リン酸、そして、三（トリス）リン酸である Ptdhs(3,4,5)P_3 の計８種類を利用している（図３）。このうち、一リン酸は細胞内の物質輸送に関わることが最近明らかにされつつある。また、二リン酸のうち代表的な Ptdhs(4,5)P_2 は、細胞外刺激に共役したホスホリパーゼ C (PLC)の作用により、セカンドメッセンジャーである Ins(1,4,5)P_3 とジアシルグリセロール(DAG)に変換されることで有名である。PLC は、様々なホルモン、神経伝達物質、細胞増殖因子、また、細胞運動を引き起こす走化性因子などにより活性化される、リン脂質のヘッドグループとグリセロール骨格の間のリン酸ジエステル結合を切断する加水分解酵素(EC3.1.4.3)である。産生された DAG はタンパクキナーゼ C(PKC)を活性化する。一方、Ins(1,4,5)P_3 は小胞体の受容体や細胞膜上の Ca^{2+}チャネルを活性化し、貯蔵部位からの Ca^{2+}の動員や細胞外からの Ca^{2+}流入によって細胞内 Ca^{2+}を上昇させる。最近、Ins(1,4,5)P_3 はさらに高次リン酸化イノシトールに変換され、細胞核の機能を初めとする種々の重要な生理作用に寄与している可能性が指摘されている。後述するように、PLC の作用によりアクチンの動態を直接制御する PtdIns(4,5)P_2 が分解されるので、セカンドメッセンジャーの産生という点に加え、細胞骨格系の再編成にもこの酵素は大きく関与していると考えられるようになった。

PtdIns(3,4,5)P_3 はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) により PtdIns(4,5)P_2 から産生される (Toker and Cantley, 1997)。これにより、細胞運動において、いつ、どこでアクチンを再構成するかといった方向性が決定される。PI3K は様々な細胞膜受容体の刺激にともなって活性化され、イノシトールリン脂質のイノシトール環の 3 位をリン酸化する。これまでに、インスリン刺激など細胞増殖因子の細胞内シグナリングにおいて、PI3K の活性化が関与することを示す多くの研究があり、アクチンの再構成のような短期の細胞応答にもこの酵素が関与していることが知られている。その応答の引き金として、例えば運動性脊椎動物細胞においては、内因性走化性因子のケモカインや、補体成分 C5a や、感染菌由来のホルミルペプチド (fMLP)などに対して、GTP 結合タンパク質共役型受容体(GPCR)に応答して PI3K（脊椎動物細胞の場合はγ型）が活性化する。その結果増加したイノシトール環の 3 位にリン酸基のある PtdIns(3,4)P_2 や PtdIns(3,4,5)P_3 を認識して細胞内のセリン・トレオニンキナーゼであるタンパクキナーゼ B（PKB: protein kinase B: Akt とも呼ばれる）が活性化され、さらに下流にシグナルを伝達すると考えられている(Franke et al., 1997; Insall and Weiner, 2001)。

哺乳動物の免疫機能を担当する好中球では、通常細胞膜上に 50 nM 程度しか存在しない極微量の PtdIns (3,4,5)P_3 が、走化性因子 fMLP に応答して細胞の伸張先端に一過的に蓄積する（約 10 秒以内に 2 μM 程度ま

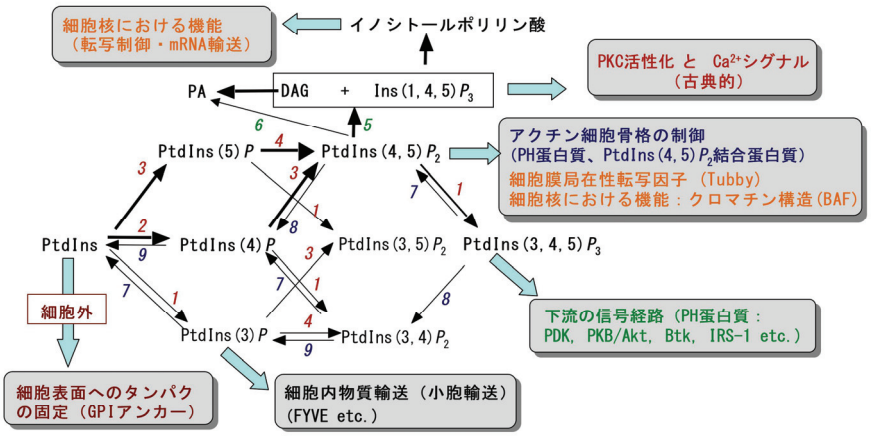


図３．生体が利用する８種類のイノシトールリン脂質とその生理的役割
主たる合成系は PtdIns から PtdIns-4K を介して PtdIns(4)*P* ができ、それが I 型 PIP キナーゼ（PIPKI/PIP-5K）によって PtdIns(4,5)P_2 に至る系である。イノシトールリン脂質の代謝に関わる酵素類は、1: PI-3K (PI3K), 2: PtdIns-4K, 3: PIPKI/PIP-5K, 4: PIPKII(PIP-4K)からなるリピッドキナーゼファミリー、5: PLC と 6: PLD（ただしイノシトールリン脂質より PtdCho の方が基質として利用されやすい）の２つからなるリパーゼファミリー、7: PI-3Pase (PTEN を含む), 8: PI-5Pase（SHIP を含む）, 9: PI-4Pase からなるリピッドホスファターゼファミリーの３種類に分類される。BAF: Brahma-associated factor（クロマチンリモデリング複合体）、Btk: ブルトンチロシンキナーゼ、DAG: ジアシルグリセロール、FYVE: Fab1p, YOTB, VAC1p と EEA1 に共通するイノシトールリン脂質結合ドメイン、GPI: glycosyl phosphatidylinositol、IRS-1: インスリン受容体基質-1、PA: ホスファチジン酸、PDK: イノシトールリン脂質依存性キナーゼ、PH: プレクストリンホモロジー、PKB: タンパクキナーゼ B、PKC: タンパクキナーゼ C

で上昇すると言われる）(Stephens et al., 1991)。この時、細胞膜に生じた PtdIns(3,4,5)P_3 の局所的な集積により、膜下にアクチン繊維の形成がおこり、細胞運動が引き起こされる（図１）。好中球の場合、正常な細胞運動のためには PtdIns(3,4,5)P_3 が分解されることも重要である。イノシトール環の 3 位の脱リン酸化酵素である PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10)が細胞の尾部に局在化し、そこで PtdIns(3,4,5)P_3 を PtdIns(4,5)P_2 に変換していると考えられている。このメカニズムは、後述の細胞性粘菌の運動にも見られるが、これには異論もあり、運動性の維持のためにはイノシトール環の 5 位のリン酸の脱リン酸化酵素である SHIP-1 が重要であるとの説もある(Sasaki et al., 2006)。

PI3K や Akt/PKB のノックアウトマウスの細胞株では、刺激応答に対する方向性を持つ細胞運動が阻害されることから、PI3K シグナル系が細胞運動、特にその方向性の決定に重要であることは間違いない(Hannigan et al., 2002; Hannigan et al., 2004)。また、最近、Akt/PKB 以外にも細胞運動に重要と考えられるグアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factor; GEF)の Vav などが、PtdIns(3,4,5)P_3 依存的に細胞膜ラッフリングを誘導することや(Han et al., 1998; Ma et al., 1998)、cytohein-1 や Tiam-1 といった PtdIns(3,4,5)P_3 に親和性を持つプレックストリンホモロジー(PH)ドメインを持つ Arf-GEF や Rho-GEF などの下流においても、Rac1→WAVE2→Arp2/3 というカスケードでアクチン細胞骨格系の再構成を引き起こしていることが示唆されている(Jackson et al., 2000)。このように、多細胞生物の細胞運動では、外界からの情報をイノシトール環 3 位のリン酸化という形で方向性の情報に変換しており、PtdIns(3,4,5)P_3 はセカンドメッセンジャーとして機能していると考えられる(Miki et al., 2000)。

一方、PtdIns(4,5)P_2 は直接的にアクチンの動態を制御する。PtdIns(4,5)P_2 が細胞膜とアクチン細胞骨格との間の相互作用に関係していることが、光学ピンセットを用いた PtdIns(4,5)P_2 結合タンパクドメインを固定したビーズの細胞膜牽引などによる実験によって明らかになっている(Raucher et al., 2000)。また、アクチンの動態はアクチン調節タンパクにより制御されることが知られているが、これらの多くのものに対して

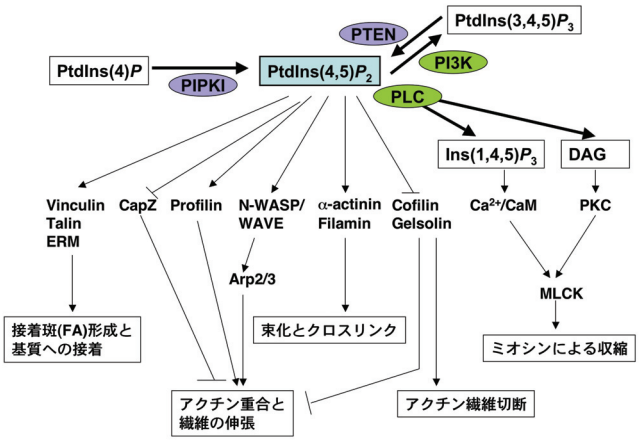


図４． PtdIns(4,5)P_2 によるアクチン細胞骨格の制御

細胞膜上における PtdIns(4,5)P_2 の量は、PtdIns(4)P から I 型 PIP キナーゼ (PIPKI/PIP-5K) によって合成される 系と、主に PLC によって Ins(1,4,5)P_3 と DAG にに加水分解される系とのバランスによって調節されている。PtdIns(4,5)P_2 のごく一部（数%を超えることはない）は膜上の受容体近傍にリクルートされる PI3K によって PtdIns(3,4,5)P_3 に変換される。これら Ins(1,4,5)P_3、DAG、PtdIns(3,4,5)P_3 は PtdIns(4,5)P_2 同様、セカンドメッセンジャーとしてアクチン細胞骨格系を修飾する。CaM ：カルモジュリン、PKC ：タンパクキナーゼ C、MLCK ：ミオシン軽鎖キナーゼ。［参考：(Logan and Mandato, 2006; Suetsugu and Takenawa, 2003; Yin and Janmey, 2003)］

表１ 種々の細胞の移動速度の比較

細胞	速度 (μm /min)	注	文献
好中球	10		(Moghe et al., 1995)
多形核白血球	3 - 30	速い動き	(Rivero et al., 1989; Zigmond, 1993)
繊維芽細胞	0.08 - 1	遅い動き	(Zigmond, 1993)
マクロファージ	2	普通の動き	(Farrell et al., 1990)
ミクログリア	1 - 2		(Ohsawa and Kohsaka, 2005)
星状細胞	0.1 - 0.2	推定	(Kornyei et al., 2000)
細胞性粘菌 *D. discoideum*	10 - 15	移動体は約30 μm /min	(Chung et al., 2000)
自由生活アメーバ *A. proteus*	50 - 100		筆者らの観察

http://www.math.ubc.ca/~ais/website/status/movements.html をもとに改変

PtdIns(4,5)P_2 は直接結合し、それらの機能に影響をおよぼすことが知られている(Suetsugu and Takenawa, 2003)。例えば、プロフィリンはアクチンモノマーに結合するが、PtdIns(4,5)P_2 はこの複合体に結合し、複合体を解離することでアクチンへの切断作用を抑制し、その結果アクチンの重合が促進される。また、PtdIns(4,5)P_2 によるゲルゾリンやビリンの活性化には、PtdIns(4,5)P_2 が分解されることによる細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇が関係している。PtdIns(4,5)P_2 は架橋タンパクαアクチニンと結合し、その作用を著しく強化する。また、細胞接着斑でアクチンフィラメントを架橋しているビンキュリンにも PtdIns(4,5)P_2 は結合し、その機能を修飾する。また、脱重合タンパク質のコフィリンや ERM タンパク質（エズリン／ラディキシン／モエシン）など、ほとんどすべてのアクチン調節タンパク質の活性に対して PtdIns(4,5)P_2 は影響を及ぼす。表２，図４にこれらの PtdIns(4,5)P_2 結合性アクチン制御タンパク質の一覧(Janmey et al., 1999)を示す。

このように、PtdIns(4,5)P_2 は多くのアクチン調節タンパクを制御することでアクチンの動態を変化させることができるが、アクチン繊維の伸張を直接制御するのは主に２つの機構による（図２右半分）。一つはアクチンキャッピングタンパク質を不活性化することによるものである。アクチン重合は活性化した

表２ PtdIns(4,5)P_2によって制御されるアクチン調節タンパク質・アクチン結合タンパク質

アクチンモノマーへの結合：プロフィリン(profiling)
繊維切断：コフィリン(cofilin)，N-WASP/WAVE，Arp2/3
繊維切断とキャッピング：ゲルゾリン(gelsolin)，ビリン(villin)，セバリン(severin)
キャッピング：CapG，CapZ，Cap32/34
膜結合：ERMタンパク質［エズリン(ezrin)，ラディキシン(radixin)，モエシン(moesin)］，ICAM I/II，ビンキュリン(vinculin)，テーリン(talin)
フィラメントクロスリンク：フィラミン(filamin)，αアクチニン(α-actinin)，ジストロフィン(dystrophin)
アクチン繊維結合：プレクチン(plectin)，コータクチン(cortactin)，スペクトリン(spectrin)，タイチン(titin)，MARCKS，ミオシンI/X

参考：(Logan and Mandato, 2006; Suetsugu and Takenawa, 2003; Yin and Janmey, 2003)

キャッピングタンパク質がアクチン繊維の矢じり端に結合することにより阻害される。ところが、Ptdhs(4,5)P_2がキャッピングタンパク質に結合し、アクチン重合の場における活性化キャッピングタンパク質の濃度が下がるとアクチンの重合が継続しておこるようになり、その結果として細胞膜は押し出されることになる(Pollard et al., 2001)。もう一つは、活性化したCdc42の存在のもと、WASPファミリーのN-WASPが細胞膜上の PtdIns(4,5)P_2 と結合して活性化され、Arp2/3の活性化を促進する経路である(Blanchoin et al., 2000b; Higgs and Pollard, 2000; Rohatgi et al., 2000; Rohatgi et al., 2001; Skoble et al., 2000)。アクチンは重合する際に重合核を形成するが、その律速段階となるアクチンの重合核形成を早めるために細胞内にはArp2/3 複合体が大量に存在する(Borisy and Svitkina, 2000; Svitkina and Borisy, 1999)。Arp2/3は重合核になるだけでなく、アクチン繊維を 70 度の角度で枝分かれさせ(Blanchoin et al., 2000a)、網目状の構造を作る。この分岐構造の形成は、ラメリポディアの形成において極めて重要である(Miki et al., 2000)。

このように、細胞膜内葉における PtdIns(3,4,5)P_3の生成がアクチンの重合されるべき方向を提示し、細胞に極性を持たせるのに対し、PtdIns(4,5)P_2 レベルの変動は直接アクチンの動態を制御することが可能である。このような巧妙な機構によりアクチン繊維の伸張、ひいては細胞の伸張が制御されていると考えられている(Insall and Weiner, 2001)。これら機能的リン脂質の細胞膜での動態は、脂質リン酸化酵素と脱リン酸化酵素、ならびに、PLCやホスホリパーゼDのようなリン脂質加水分解酵素の活性化と不活性化の絶妙なバランスのもとに制御されていると考えられる。

ちなみに近年注目されている多細胞生物のアメーバ様細胞運動には、Rac1→WAVE→Arp2/3活性化以外の系が関わっていると考えられている。というのも、このタイプの運動には、接着斑(FA)の形成やインテグリンなどの接着分子の関与はないからである。しかし、他の細胞運動同様、ドライビングフォースとなるのは、基本的にはアクトミオシンの収縮力であると考えられており、それにはRhoを介するミオシン鎖の修飾が関わっている可能性があるが、詳細は明らかでない。

４．細胞性粘菌におけるリン脂質シグナリング

細胞性粘菌はアメーバ性の単細胞真核生物（10-15 μm程度）であるが、普段は土壌中の細菌などを貪食して数時間ほどの倍加時間で増殖しながら生きているが、周囲に餌がなくなると増殖をやめ、約10万個以上のアメーバ細胞が走化性物質に引き寄せられて集合して1ー2 mm程度の1つの多細胞集合体（移動体）を形成する。その後、移動体はアメーバ細胞（10-15 μm/分）よりも速い移動速度（30 μm/分）で動き、適当な分化モルフォゲンによって分化し、子実体を形成する。このような生活環をもつため、これらは社会性アメーバと呼ばれている。細胞の大きさやその移動速度が脊椎動物の運動性細胞（好中球など）と似ていることから（表１）、それらの運動を解析するためのモデル動物として利用されている(Janssen and Schleicher, 2001)。

細胞性粘菌の一種であるキイロタマホコリカビ（*Dictyostelium discoideum*）はcAMPを走化性物質および分化のモルフォゲンとして利用している。*D. discoideum* はほぼその大きさに匹敵する 10 μm程度に存在する cAMP の濃度差を感知して移動方向を決めて

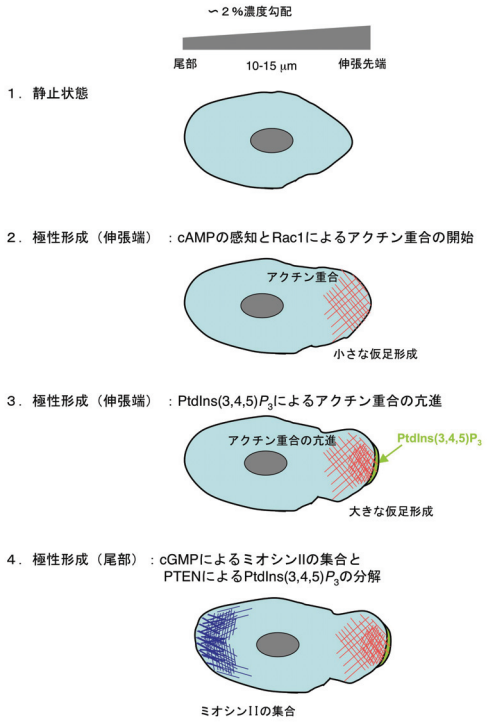


図５．細胞性粘菌 *D. discoideum* の遊走の模式図
伸張端にはアクチン、PI3K、PtdIns(3,4,5)P_3、尾部にはミオシン II、PTEN が分布する。Ras は細胞全体に、cAMP 受容体は細胞表面にあまねく存在する。ミオシンとアクチンは別々に制御されている。尾部におけるミオシン II フィラメントの形成は cGMP に、リン酸化によるその崩壊にはミオシン重鎖キナーゼ A (MHCK-A)が関与していると考えられている。［参考：(Postma et al., 2004a)］

いる。細胞表面には７回膜貫通型 GPCR である cAMP 受容体が存在しており、リガンドの結合により GTP アーゼの活性化がおこる。この下流にイノシトールリン脂質の代謝が関わる、運動の方向性制御のための分子機構が存在し、その解析が現在も精力的になされている(Luo et al., 2003; Manahan et al., 2004; van Haastert and van Dijken, 1997)

D. discoideum の細胞伸張の機構も、脊椎動物と同様に、アクチンの重合がドライビングフォースになり、細胞膜が押されることで仮足伸長が起きることによるものと考えられている(Condeelis, 1977; Theriot and Mitchison, 1991; Yumura and Fukui, 1998)。

走化性などの細胞の運動には、方向の感知と細胞極性の形成という２つの側面が重要である(Devreotes and Janetopoulos, 2003)。*D. discoideum* では走化性物質(cAMP)の濃度勾配に対して、細胞膜上の受容体の分布、リガンド結合した受容体の分布、G タンパク質の分布に偏りはない。これに対し、PI3K、PtdIns(3,4,5)P_3 生成、および細胞膜下におけるアクチン重合は、明らかに cAMP 濃度の高い側、すなわち、細胞伸張が起こる方向の伸張先端に局在化する（図５）。

PtdIns(3,4,5)P_3 は好中球では PI3Kγが産生するが、*D. discoideum* では PI3K1 および PI3K2 という２つの遺伝子産物が合成する(Huang et al., 2003; Zhou et al., 1995)。PI3K 遺伝子ノックアウト細胞株では細胞の cAMP 濃度勾配に対して正しい極性形成する割合も、遊走速度も野性株に比べて著しく低下する(Postma et al., 2004b)。興味深いことに、好中球と同様に、PI-3 ホスファターゼである PTEN が cAMP 濃度の低い側である尾部に集積することも判明した(Iijima et al., 2002)。これらの応答は、濃度勾配の変化の方向性を、かなり速く変化させても可逆的におこる（cAMP を流出させるピペットを細胞の周りで回転させると、それにともない、細胞膜上の上記の極性分布も回転する）。また、ラトランキュリン A 処理によりアクチンの脱重合をおこし、仮足形成ができないような細胞でも、「cAMP 濃度勾配感知→PtdIns(3,4,5)P_3 の生成」による極性形成は起こる(Postma et al., 2003; Postma et al., 2004b)。これらは、濃度勾配の感知機構の一貫としての伸張先端における PtdIns(4,5)P_2 から PtdIns(3,4,5)P_3 の生成と、尾部での PtdIns(3,4,5)P_3 から PtdIns(4,5)P_2 への脱リン酸化がかなり速い可逆的な反応であることを示している。どのような機構で PI3K が仮足伸張部にリクルートされるかについての詳細は不明であるが、PtdIns(3,4,5)P_3 の生成は伸張先端におけるアクチンの重合に重要であるが、*D. discoideum* の場合は好中球の場合と異なり、PTEN の過剰発現によって PtdIns(3,4,5)P_3 のレベルを全体的に下げてもアクチン重合には変化は見られない。ただし、逆に PTEN 欠損細胞では、PI3K 欠損細胞同様、走化性物質の濃度勾配に対する配向と遊走速度は低下する(Postma et al., 2004b)。PTEN が細胞の尾部にリクルートされる分子機構は、好中球では活性化状態の RhoA が PTEN と共局在することから、Rho/ROCK 系が関わっている可能性が高い。好中球では PtdIns(3,4,5)P_3 の分解が 5 ホスファターゼである SHIP-1 によって担われている可能性があるが、*D. discoideum* でも特異性が異なる複数のイノシトール 5 ホスファターゼが PtdIns(3,4,5)P_3 を分解するという報告もある(Loovers et al., 2003)。

D. discoideum の場合は尾部に cGMP 濃度に依存したミオシン II のフィラメント形成が見られることが、cGMP 合成酵素や、cGMP を分解するホスホジエステ

ラーゼなどの欠損株を用いる実験によって明らかにされている(Goldberg et al., 2002)。cGMPは低分子量のため拡散が速く、空間的な局在性を制御するセカンドメッセンジャーとしては不適であると考えられたので下流のシグナルが探索され、ミオシン重鎖キナーゼA(MHCK-A)がミオシンIIの細胞尾部におけるアセンブリーに関わっているらしいことが明らかになってきた。ミオシンIIはリン酸化されると重合できない。MHCK-Aがcgmpを含む何らかの刺激により伸張先端にリクルートされ、ミオシンIIのリン酸化による脱落がおこり、結果的に尾部のみに重合したミオシンIIが残るのではないかと考えられている(Goldberg et al., 2006)。

*D. discoideum*では、高濃度のcAMPを加えた場合にはCa^{2+}流入による細胞内Ca^{2+}の局所的上昇が見られることが指摘されていた。しかし、$G\alpha_2$を欠損する変異体においてもcAMPによるCa^{2+}応答は変わらないことから、この応答にPLC（特にGタンパク質に共役するβアイソフォーム）の関与は無いと考えられている(Schlatterer et al., 1994)。

脊椎動物にはPLCをコードする遺伝子オルソログが複数存在し、これらのアイソフォーム間には機能的相補性も報告されているが、*D. discoideum*には単細胞真核生物の酵母(*Saccharomyces cerevisiae*および*Schizosaccharomyces pombe*、遺伝子はそれぞれ*ScPLC1*および*SpPLC1*)と同様にPLCをコードする遺伝子は一つ(*DdPLC*)しか存在しないと考えられている(Drayer and Van-Haastert, 1992)。単細胞真核生物のPLCは、いずれも脊椎動物細胞のδタイプのPLCアイソフォームに良く似た構造をもっている(Rebecchi and Pentyala, 2000)。飢餓状態やその後の分化にともない*DdPLC*のmRNAレベルは上昇するが、この遺伝子の過剰発現によっても(Drayer and Van-Haastert, 1992)、あるいは逆に、遺伝子破壊によっても(Drayer et al., 1994)細胞運動や分化に顕著な影響はないという。*DdPLC*欠損細胞でもcAMP刺激により Ins(1,4,5)*P*3の濃度が上昇するが、これはイノシトールポリホスフェートのホスファターゼによる分解によるものと考えられている(Van Dijken et al., 1997; Van Dijken et al., 1995a; Van Dijken et al., 1995b)。これらの結果は、遺伝子破壊により分裂停止をひきおこすことのできる酵母のPLCとは異なり、DdPLCは細胞の運動性や増殖の制御には直接関わっていないことを示唆しており、極めて興味深い。*D. discoideum*の場合、PLC活性化は飢餓状態のアメーバ細胞から分泌されるCMF (conditioned media factor)と呼ばれるタンパク質のシグナル受容（やはりGPCRを介する）に関与しており、いわゆる細胞密度の感知に役だっているとの報告 (Brazill et al., 1998)がある。DdPLCはCMF受容体に共役する$G\alpha_1$か、$G\beta\gamma$によって直接的に制御されているらしい。cAMP受容体に共役する$G\alpha_2$にもこれらは間接的に影響を与えるようである (Brazill et al., 1998)。

５．自由生活アメーバの細胞運動

５－１　*Amoeba proteus*の運動とアクチン細胞骨格

我々はダイナミックな細胞運動にともなう脂質シグナリングのモデルとして自由生活アメーバ*A. proteus*を対象に研究を行っている（なお*A. proteus*に関しては共同研究者の園部らによる本誌総説(Sonobe and Nishihara, 2003)も参照されたい）。*A. proteus*は根足虫類に属する原生動物であり、基質に付着して生活する。通常、バクテリアや他の原生動物を餌とし、給餌後の状態では運動性はみられないが、飢餓状態になると運動が活発になり、仮足形成を行って移動する。この単細胞生物の体長は300-500 μmにおよぶことがある。これは、多くの脊椎動物細胞や細胞性粘菌（大きさはだいたい直径数ー数十μm）と比べて非常に大きく、また、細胞移動速度も50-100 μm／分とそれらと比較してかなり速い（表１）。したがって、この生物の細胞運動の分子機構が、運動性脊椎動物細胞や細胞性粘菌のそれと同じであるのか、また、異なっているとしたらどのような点が異なるのかという問題は、細胞運動の多様性や進化を考えるうえで興味深い。

運動時の*A. proteus*では、細胞の移動にともない、非常に活発な原形質流動が起きている。細胞の中央部をゾル状の原形質が前方に流れていき、仮足の先端部で外側へ反転し、細胞膜直下にあるゲル状原形質に融合する。一方、尾部では細胞膜直下のゲル状原形質が内側に溶けてゾルの流れになり、再び前方へ向かうというような、原形質のゲル・ゾル変換と流動が起こっており、これがアメーバ運動の原動力として考えられてきた。このようなアメーバ運動の機構に対して『後部収縮説』、ならびに、『前端部収縮説』が唱えられた。前者は「後部のゲル層が収縮し、細胞の前後に圧力差が生まれることにより、ゾルを前方に押し出し仮足が伸張する」と言う古典的な説 (Mast, 1923)であり、後者は「前方の仮足部分の収縮性タンパク質が後方のゾルを引っぱる」(Allen, 1961)というものである。後者の根拠となったのは、細胞を破壊して得た原形質が自ら動くことであり、これはさらにTaylorらによる「原形質にはフィラメント状の構造が含まれ、その動きはCa^{2+}の濃度によって制御される」という観察によって支持された(Taylor et al., 1973)。*A. proteus*においては仮足伸展の原動力が後部収縮であるという説は一時ほどポピュラーではなくなったが、後部収縮が仮足伸展と細胞移動に必要なステップであることは間違いないと

思われる。

A. proteus の運動にアクトミオシン系が関与しているということは、破壊細胞の細胞質がATP依存的に収縮し、その収縮がサイトカラシンBによって阻害されること(Condeelis and Taylor, 1977)、また、蛍光顕微鏡や電子顕微鏡によりアクチン繊維、ミオシン繊維が観察されており、微小管は見いだされてないこと(Stockem et al., 1982; Taylor and Wang, 1978)、アクチン(Kuroda and Sonobe, 1981)、ミオシン(D'Haese and Hinssen, 1974)が単離されていることなどからも明らかである。束化アクチンはプラズマゲルシートという構造の中、細胞膜の近傍に存在しており、仮足形成の場所では細胞膜から解離している(Stockem et al., 1982)。注目すべき観察として、*A. proteus* では *D. discoideum* や好中球などは異なり、仮足先端にアクチン繊維が観察されないということである(Grebecki, 1990)。つまり、この細胞では、運動性脊椎動物細胞や細胞性粘菌のようにアクチン重合により細胞膜が突出するのではなく、仮足の先端で細胞膜からアクチン繊維が一時的に脱離し、細胞質が流れ込むことにより、仮足伸長が起こっている可能性が高い(Grebecki, 1986)。

仮足形成時に、どのようなシグナルにより束化したアクチンが細胞膜から解離するのか、またその位置を決めるのは何か、また、仮足伸張の際に必要な他の細胞と比べて膨大な量の膜脂質はどこからどのように供給されるのか、さらに、仮足基部に束化アクチンはどのように再構成されるのかという疑問が生じる。Taylorらの発見以来、*A. proteus* の運動が細胞内 Ca^{2+} によって制御されていることを示す証拠は多い(Allen and Taylor, 1975; Cobbold, 1980; Condeelis and Taylor, 1977; Gollnick et al., 1991; Kuroda and Sonobe, 1981; Sonobe et al., 1986; Yanai et al., 1996)。グリセリンモデルでは遊離 Ca^{2+} 濃度×10^{-6}M 程度で原形質周回運動が起こる(Sonobe et al., 1986; Sonobe and Nishihara, 2003)。エクオリンの細胞内導入による Ca^{2+} 測定では、細胞内 Ca^{2+} 濃度が後部および仮足の根本において一時的に上昇するとの報告(Taylor et al., 1980)がある一方、細胞全体に均一であるとの報告（ただし、アメーバとして *Chaos carolinense* 使用）もある(Cobbold, 1980)。Fura-2を指示薬とした Ca^{2+} 濃度測定では、尾部やアクトミオシンの収縮にともない膜下細胞質がゲルからゾルへの変換の起こっている領域で Ca^{2+} が静止期の10倍以上に上昇していることが報告されている(Gollnick et al., 1991)。

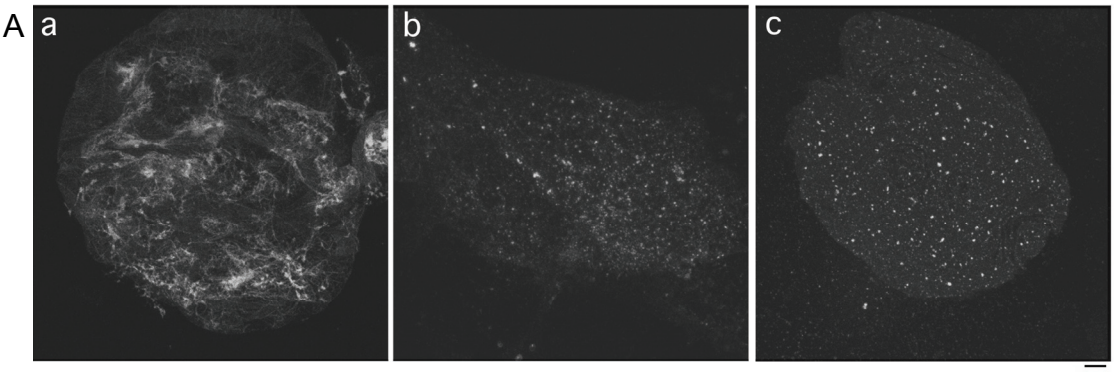
これまでに、*A. proteus* の細胞骨格系のシグナル伝達系因子による調節には、Ca^{2+} の関与の他には余り詳しく解析されておらず、低分子量GTPアーゼRhoファミリータンパク質の関与を示唆する結果が最近ようやく報告されるようになった。*A. proteus* に抗ヒトRac1抗体のマイクロインジェクションを行うと仮足は縮退するが、Rac1様分子は主に核周辺の細胞骨格に存在する(Klopocka and Redowicz, 2003)。Rac1様分子はアクチン重合の核化とミオシン重鎖キナーゼ(MHCK)の調節に関与しているらしい(Klopocka et al., 2005)。また、抗RhoA抗体のマイクロインジェクションやC3トキシン処理により、細胞運動は顕著に阻害される(Klopocka and Redowicz, 2003)。さらに、ROCK/Rhoキナーゼの阻害剤である Y-27632 による処理、あるいは、抗 ROCK/Rho キナーゼ抗体マイクロインジェクションにより、アクチンにより活性化されるミオシンII の Mg-ATP アーゼ活性が亢進されることより、*A. proteus* では脊椎動物細胞とは異なり、Rho/Rhoキナーゼ系の不活性化によりミオシン II による過剰収縮が起こり、正常な運動ができなくなると思われる(Klopocka and Redowicz, 2004)。

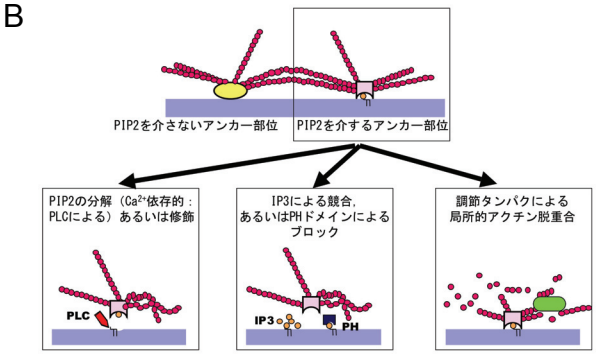
5－2　*A. proteus* の運動と脂質シグナリング

これまでに *A. proteus* の運動性と脂質シグナリング因子との関係に関しては、飲作用にともなう膜変化において Ca^{2+} 依存性ホスホリパーゼ A_2(PLA_2)活性化が重要な役割を果たしていることが、PLA_2 阻害剤とリゾリン脂質の添加実験により 報告されているのみであり(Johansson et al., 1992; Josefsson et al., 1988)、イノシトールリン脂質シグナル系の研究報告はほとんど無い。以下、我々のこれまでの研究の概略を紹介する。

Kawakatsu らは、*A. proteus* より調整した細胞膜画分、および、細胞膜裏打ち構造の一部を残した単離膜シートを用いた細胞膜モデル系（図６）を利用して、Ca^{2+} 依存的に単離膜からアクチン繊維の解離がみられたことから、膜とアクチンの相互作用には Ca^{2+} 依存的な細胞質因子が関与しており、細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化により膜とアクチンの結合状態が制御されている可能性を示した(Kawakatsu et al., 2000)。

前述した好中球や *D. discoideum* の運動は、PI3Kの阻害剤であるワートマニンによって抑制されることがよく知られている。しかし、飢餓状態で運動性を示す *A. proteus* をワートマニンで処理してもその運動性には変化は無かった(Maeda, 2003)。これに対し、PLCの阻害剤として知られる U73122 で生細胞を処理すると、仮足は縮退し、移動は停止した。この時、膜表面の波立ち運動 (blebbing) は残っており、原形質も動いていたことから、仮足伸張の方向性が失われたものと考えられる(Kawakatsu, 2001)。この実験結果は *A. proteus* の運動に PLC の活性が重要であることを示すものであったので、我々は実際に細胞抽出液を調整し、放射性 PtdIns(4,5)P_2 を基質としてその PLC 活性を





PIP2非依存的アンカー部位（上図左側）周辺にアクチン繊維が残る（ドット化）

図 6 . *A. proteus* 単離膜シートにおけるアクチン繊維のドット化

A. proteus をコンカナバリン A でコートした 2 枚のカバーガラスに挟み、開いたのち適当な緩衝液で残存物を洗い流すと、カバーガラス表面に細胞膜下の構造を一部保持した膜シートが残る。A : FITC-ファロイジン染色による単離膜シートの像（バー：50 μm）。Ca^{2+}の存在しない条件で作成した *A. proteus* 単離膜シートにはアクチン繊維のメッシュ状構造が見られる(a)。この膜シートに PLCδ_1 の PH ドメイン(δ_1PH)を添加する（室温、15 分）と、アクチン繊維のメッシュ構造はドット様の構造に変化する(b)。ドット形成は、δ_1PH 添加時に 0.1 mM Ca^{2+}が存在することによって影響を受けない(c)。膜シートに PLCδ_1 を添加すると、アクチン繊維のメッシュ構造は b, c と同様にドット様の構造に変化するが、添加時に Ca^{2+}が存在するとドット形成は速く進む（5 分で観察可能：データ示さず）。B:アクチンメッシュのドット化機構のモデル。

測定したところ、Ca^{2+}依存的な PtdIns(4,5)P_2 の Ins(1,4,5)P_3 への分解が見られ、他の真核細胞同様、*A. proteus* には PLC が存在することが強く示唆された(Maeda, 2003)。

前述の細胞膜シートをキレート剤添加によって Ca^{2+} が存在しない状態で作製した場合には繊維状のアクチンが観察される。この細胞膜シートを 10^{-6} ー 10^{-4} M の Ca^{2+}溶液や ATP 溶液で処理しても繊維状のアクチンに変化は見られない。ところが、この膜シートに精製した組換え PLCδ_1、あるいは PtdIns(4,5)P_2 に高い親和性で結合する(Yagisawa et al., 1998) PLCδ_1 の PH ドメイン（δ_1PH）を過剰に加えると、繊維状のアクチンが点状になった（図 6 (A)）(Kawakatsu, 2001)。これは細胞膜上の PtdIns(4,5)P_2 とアクチン繊維との間の相互作用が、PLCδ_1 あるいはδ_1PH によって競合を受けることを示している。Ca^{2+}存在下で PLCδ_1 を細胞膜シートに添加した場合には、繊維状のアクチンのドット化の速度は亢進した。これは PtdIns(4,5)P_2 が分解されることにより、アクチンの一部が膜と結合できなくなったことを反映している。これらの結果は、*A. proteus* の細胞膜の裏打ち構造をとるアクチン繊維のメッシュ構造の一部が PtdIns(4,5)P_2 によって膜に繋留されていることを示しており（図 6 (B)）、実際の細胞におけるプラズマゲルシートの膜からの解離においても、内在性 PLC の Ca^{2+}による活性化が重要な役割を果たしている可能性を示している。

PLC 活性化により *A. proteus* の細胞膜のアクチンメッシュ構造が崩壊する機構が他にも考えられる（図 6 (B)）。ひとつは、分解産物 Ins(1,4,5)P_3 の関与である。Ins(1,4,5)P_3 は PtdIns(4,5)P_2 のヘッドグループそのものであるので、PLC の触媒部位に対する生成物阻害や PH ドメインに対する PtdIns(4,5)P_2 との競合など、Ins(1,4,5)P_3 の局所的な増加がアクチン繊維と PtdIns(4,5)P_2 との相互作用に阻害的に働く可能性がある。ただし、Ins(1,4,5)P_3 は拡散が速いので、この様な局所的作用には適さないとも考えられる。もう一つはアクチン

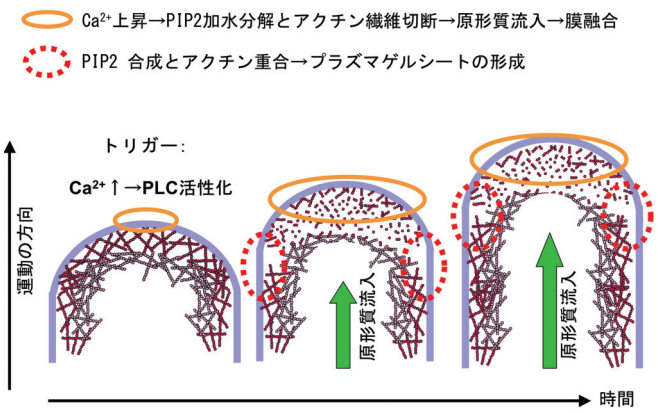


図７．*A. proteus* における仮足形成の模式図
細胞膜の局所で Ca^{2+} の上昇が起こる（何らかの刺激によるものか、Ca^{2+} 流入の揺らぎによるものか不明）。PLC の局所的活性化がおき、PtdIns(4,5)P_2 の分解がおき Ins(1,4,5)P_3 の産生がおこる。アクチンメッシュ構造が崩壊し、ゾル化する。原形質流動にともなう小胞膜の融合がおこり、細胞膜のテンションが減少したところで、膜が伸展する。仮足の根本では PIPK 活性化にともない PtdIns(4,5)P_2 が合成され、アクチンのメッシュ構造が仮足伸張の方向へ伸展し、膜直下にプラズマゲルシートが再生される。一見、好中球や細胞性粘菌とは異なる機構のようであるが、膜の裏打ち構造が壊れる、あるいは、物理的に揺らぐことは、もっと小規模にこれらの細胞でも起こっているものと考えられる。

フィラメントの脱重合、あるいは、アクチン繊維間のクロスリンクの消失である。*A. proteus* にもアクチンの重合や束化を制御する種々の調節タンパク質が存在すると考えられるが、それらが脊椎動物細胞や細胞性粘菌と同様に、PtdIns(4,5)P_2 結合によって制御されている可能性がある。

一般的に種々のアクチン調節タンパク質を介するアクチン重合調節の全体は、PtdIns(4,5)P_2 の存在がアクチン繊維切断活性を抑制し重合を促進するのに対し、Ca^{2+} の濃度上昇は切断活性を促進するという逆相関の関係にある。PLC 活性化は基本的に Ca^{2+} に依存するので、これはある意味で当然である。PtdIns(4,5)P_2 濃度の低下は、細胞膜直下に存在するアクチン繊維の断片化や脱重合を引き起こし、結果として原形質と膜との間の相互作用を破壊する。*A. proteus* の仮足形成の場では、膜の局所での PLC 活性化が引き金となって細胞膜直下と原形質部分のアクチン繊維の解離が起こり、そこに引き続く変化（原形質で運搬された膜小胞の融合と膜の伸展など）が起こると思われる（図７）。

我々は実際に、生きている *A. proteus* における PtdIns(4,5)P_2 の動態の可視化を行った。ラット PLCδ_1 の PH ドメイン(δ_1PH)を緑色蛍光タンパク質(GFP)融合タンパク質として大腸菌に発現させ、精製タンパク質を得た。これらを *A. proteus* の細胞質内にマイクロインジェクションし、蛍光顕微鏡下で観察した。コントロールである GFP や、PtdIns(4,5)P_2 への結合能を失った PH ドメイン変異体である GFP-δ_1PH R40A の蛍光は細胞質全体に分布するのに対し、GFP-δ_1PH のそれは細胞膜に分布した。伸張する細胞膜先端では GFP-δ_1PH の蛍光はみられなかったことから、実際に仮足の先端では PtdIns(4,5)P_2 のレベルが下がっていることが判明した(Maeda, 2003)。

さらに、PtdIns(4,5)P_2 分解産物である Ins(1,4,5)P_3 と運動性との関係を検討した(Maeda, 2003)。給餌後の *A. proteus* の細胞内 Ins(1,4,5)P_3 のレベルは、移動速度や細胞の凹凸度と相関し、最も運動性の高くなる時には給餌直後レベルの数倍以上になった。また逆に、静止状態の細胞に Ins(1,4,5)P_3 をマイクロインジェクションすると細胞の運動性が亢進した。EGTA による細胞外液の Ca^{2+} 除去や、小胞体 Ca^{2+} 貯蔵部位を枯渇させるタプシガルギンによる細胞処理によって Ins(1,4,5)P_3 マイクロインジェクションの効果は抑制されたので、Ins(1,4,5)P_3 の *A. proteus* の運動性への効果は、細胞内 Ca^{2+} レベルの調節を介するものと考えられる。

A. proteus における PLC による PtdIns(4,5)P_2 分解の意義を調べるためには、PLC 遺伝子の同定が必須である。我々は *A. proteus* の cDNA から真核生物 PLC の触媒ドメインをコードする領域に対して作成した縮重プライマーを用いた PCR クローニングにより、脊椎動物細胞のδ型に近い構造を持った PLC 様遺伝子を得た(Shinki et al., 2005)。これがこの生物の唯一の PLC 遺伝子であるのか、実際に運動性に関わっているのかという点は現時点では不明である。この遺伝子の改変やノックダウン、あるいは発現産物に対する抗体のマイクロインジェクションなどによる機能修飾により *A. proteus* の運動性がどのように影響を受けるのかを調べていくつもりである。

６．今後の展望：アメーバ運動のゲノムからの解析

昨年（2005 年）、人体寄生性アメーバである赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）のゲノムが解読された(Loftus et al., 2005)。*E. histolytica* による感染症は発展途上国などで致死性の病状をもたらすのみならず、先進

諸国でも性感染症(STD)として重要性を増している。ゲノム解析により代謝系の詳細が明らかになれば、治療薬の標的を見つけることができる。

E. histolytica にごくわずか遅れたが、細胞性粘菌 *D. discoideum* についても昨年、ゲノムの解読が完了した(Eichinger et al., 2005)。その結果、この生物が哺乳動物と共通する遺伝子を多く持っていることが判明した。

E. histolytica や *D. discoideum* はアメーボゾア類(仮足伸張により移動する：変形菌や細胞性粘菌や多くの寄生性・自由生活アメーバが含まれる）に属するが、これらのゲノムをはじめて他の真核生物グループのゲノムと比較できるようになった。いくつかの遺伝子の系統樹解析の結果は、*D. discoideum* がバイコンタ類（植物や藻類、および、ほとんどの原生動物が含まれ、細胞の前か側面に鞭毛を持つものが多い）よりオピストコンタ類（動物＋菌類＋襟鞭毛虫など遊走細胞が後方に鞭毛を持つという特徴がある）に近いことを示唆しているようである(Williams et al., 2005)。

これに対し、自由生活アメーバのゲノム情報は乏しい。例えば、遺伝子データベースに登録されている *A. proteus* の遺伝子は、アクチンなど細胞骨格系タンパク質関連の数種類のみである。これは多くの場合、自由生活アメーバが人間の生活（特に病気）とは無関係であり、研究者人口も少ないからであると思われる。しかし、日本では例は少ないが、自由生活型アメーバによる重篤な人体感染症（FLA (free-living amoeba) infection）として急性型中枢神経感染症（例えばネグレリア属のアメーバによる）が存在する。また、慢性型中枢神経感染症やコンタクトレンズに由来する核膜潰瘍の形成（アカントアメーバ属による）も知られている。後者は特に免疫不全時の日和見感染をひきおこす危険性があり、その感染経路やアメーバの運動制御機構に関心がもたれている。

社会性アメーバである細胞性粘菌、赤痢アメーバなどの寄生アメーバ、そして自由生活アメーバ、それぞれのゲノム情報の充実化により、これらの配列の比較研究を行い、多細胞化や寄生による遺伝子進化に関する知見を得ることができるようになる。それぞれの生物で繰り広げられてきた代謝系や生活環の調節機構の解析とともに、アメーバ運動の分子機構に関わるタンパク質の構造やそれらをコードする遺伝子の発現調節機構などの解明が、今後加速度的に速まることが期待される。

7．あとがき

私事で恐縮であるが、私は現職に就く前に医科大学の医動物学（寄生虫学）教室に４年間奉職していた。研究は免疫細胞におけるサイトカインの細胞内シグナル伝達機構について行っていたが、実習で寄生原虫の動きを見せたり、これらの生活環や治療法などについて医学生に教えたりすることもあった。*E. histolytica* を実際に顕微鏡下で医学生とともに観察しながら、この不思議な単細胞生物の動きに魅せられたことを昨日のように思い出す。また、大学院の頃には現在 *A. proteus* の餌に使用しているテトラヒメナの細胞膜に関する研究論文(Thompson and Nozawa, 1977)を興味深く読んだ。細胞の変化を追跡するには、細胞内脂質の代謝と生体膜の動態変化を知ることが重要であるという私の研究における基本的なスタンスはその頃に形成されたように思う。本文でもふれたように、今日では寄生原虫のゲノム解析がすすみ、赤痢アメーバや細胞性粘菌についてもゲノムプロジェクトが完成し、その運動性や生活環が分子レベルで解明される日が近づいている。この小文では、細胞運動のシグナリングに機能脂質の代謝が重要であることを示した。また、本稿ではあまりふれることはできなかったが、細胞が運動するためには、骨格系タンパク質の再構成ばかりでなく、膜脂質の供給と除去に関しても、適切な時間・空間的制御が必要である。

アメーバ運動は、細胞運動のうち、原生動物から脊椎動物細胞まで共通するものである。その分子機構の解明が、原虫寄生虫病やがんの予防や治療に役立つ日を夢見ている。

謝辞

本研究で紹介した内容の一部は兵庫県立大学大学院生命理学研究科分子機械講座（新免輝男教授）の園部誠司助教授との共同研究による。初期の研究を行った元大学院生の川勝智生（分子機械学）、前田佳祥子（生体情報学 II）の両氏、現院生の新木良子氏（生体情報学 II）に深謝する。また、アメーバの飼育などのサポートや討論を通じて協力してくださった西原絵里氏（分子機械学講座院生）に感謝する。

参考文献

Allen, R. D. (1961). A new theory of ameboid movement and protoplasmic streaming. Exp Cell Res *Suppl 8*, 17-31.

Allen, R. D., and Taylor, D. L. (1975). The molecular basis of amoeboid movement. Soc Gen Physiol Ser *30*, 239-258.

Blanchoin, L., Amann, K. J., Higgs, H. N., Marchand, J. B., Kaiser, D. A., and Pollard, T. D. (2000a). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar pro-

teins. Nature *404*, 1007-1011.

Blanchoin, L., Pollard, T. D., and Mullins, R. D. (2000b). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. Curr Biol *10*, 1273-1282.

Borisy, G. G., and Svitkina, T. M. (2000). Actin machinery: pushing the envelope. Curr Opin Cell Biol *12*, 104-112.

Brazill, D. T., Lindsey, D. F., Bishop, J. D., and Gomer, R. H. (1998). Cell density sensing mediated by a G protein-coupled receptor activating phospholipase C. J Biol Chem *273*, 8161-8168.

Chung, C. Y., Lee, S., Briscoe, C., Ellsworth, C., and Firtel, R. A. (2000). Role of Rac in controlling the actin cytoskeleton and chemotaxis in motile cells. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 5225-5230.

Cobbold, P. H. (1980). Cytoplasmic free calcium and amoeboid movement. Nature *285*, 441-446.

Condeelis, J. S., and Taylor, D. L. (1977). The contractile basis of amoeboid movement. V. The control of gelation, solation, and contraction in extracts from Dictyostelium discoideum. J Cell Biol *74*, 901-927.

D'Haese, J., and Hinssen, H. (1974). Structure of synthetic and native myosin filaments from Amoeba proteus. Cell Tissue Res *151*, 323-335.

Devreotes, P., and Janetopoulos, C. (2003). Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. J Biol Chem *278*, 20445-20448.

Drayer, A. L., Van, der, Kaay, J, Mayr, G. W., and Van, H. P. (1994). Role of phospholipase C in Dictyostelium: Formation of inositol 1,4,5-trisphosphate and normal development in cells lacking phospholipase C activity. EMBO J *13*, 1601-1609.

Drayer, A. L., and Van-Haastert, P. J. M. (1992). Molecular cloning and expression of a phosphoinositide-specific phospholipase C of Dictyostelium discoideum. J Biol Chem *267*, 18387-18392.

Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glockner, G., Rajandream, M. A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q*., et al.* (2005). The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. Nature *435*, 43-57.

Farrell, B. E., Daniele, R. P., and Lauffenburger, D. A. (1990). Quantitative relationships between single-cell and cell-population model parameters for chemosensory migration responses of alveolar macrophages to C5a. Cell Motil Cytoskeleton *16*, 279-293.

Franke, T. F., Kaplan, D. R., and Cantley, L. C. (1997). PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. Cell *88*, 435-437.

Goldberg, J. M., Bosgraaf, L., Van Haastert, P. J., and Smith, J. L. (2002). Identification of four candidate cGMP targets in Dictyostelium. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 6749-6754.

Goldberg, J. M., Wolpin, E. S., Bosgraaf, L., Clarkson, B. K., Van Haastert, P. J., and Smith, J. L. (2006). Myosin light chain kinase A is activated by cGMP-dependent and cGMP-independent pathways. FEBS Lett *580*, 2059-2064.

Gollnick, F., Meyer, R., and Stockem, W. (1991). Visualization and measurement of calcium transients in Amoeba proteus by fura-2 fluorescence. Eur J Cell Biol *55*, 262-271.

Grebecki, A. (1986). Two-directional pattern of movements on the cell surface of Amoeba proteus. J Cell Sci *83*, 23-35.

Grebecki, A. (1990). Dynamics of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrrated in vivo by video-enhancement. Protoplasma *154*, 98-111.

Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., White, M. A., and Broek, D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. Science *279*, 558-560.

Hannigan, M., Zhan, L., Li, Z., Ai, Y., Wu, D., and Huang, C. K. (2002). Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 3603-3608.

Hannigan, M. O., Huang, C. K., and Wu, D. Q. (2004). Roles of PI3K in neutrophil function. Curr Top Microbiol Immunol *282*, 165-175.

Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. J Cell Biol *150*, 1311-1320.

Huang, Y. E., Iijima, M., Parent, C. A., Funamoto, S., Firtel, R. A., and Devreotes, P. (2003). Receptor-mediated regulation of PI3Ks confines PI(3,4,5)P3 to the leading edge of chemotaxing cells. Mol Biol Cell *14*, 1913-1922.

Iijima, M., Huang, Y. E., and Devreotes, P. (2002). Temporal and spatial regulation of chemotaxis. Dev Cell *3*, 469-478.

Insall, R. H., and Weiner, O. D. (2001). PIP3, PIP2, and

cell movement--similar messages, different meanings? Dev Cell *1*, 743-747.

Jackson, T. R., Kearns, B. G., and Theibert, A. B. (2000). Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling. Trends Biochem Sci *25*, 489-495.

Janmey, P. A., Xian, W., and Flanagan, L. A. (1999). Controlling cytoskeleton structure by phosphoinositide-protein interactions: phosphoinositide binding protein domains and effects of lipid packing. Chem Phys Lipids *101*, 93-107.

Janssen, K. P., and Schleicher, M. (2001). Dictyostelium discoideum: a genetic model system for the study of professional phagocytes. Profilin, phosphoinositides and the lmp gene family in Dictyostelium. Biochim Biophys Acta *1525*, 228-233.

Johansson, P., Cobbold, P. H., and Josefsson, J. O. (1992). Reversal by concanavalin A of the inhibitory effects of extracellular Ca2+ on pinocytosis in Amoeba proteus. Acta Physiol Scand *144*, 89-99.

Josefsson, J. O., Arvidson, G., and Cobbold, P. (1988). Possible regulation of cation-induced pinocytosis in Amoeba proteus by phospholipase A. Eur J Cell Biol *46*, 200-206.

Kawakatsu, T. (2001). ［川勝智生： A. proteus の仮足形成時における細胞膜とアクチン繊維との相互作用．姫路工業大学大学院理学研究科修士論文］

Kawakatsu, T., Kikuchi, A., Shimmen, T., and Sonobe, S. (2000). Interaction of actin filaments with the plasma membrane in Amoeba proteus: studies using a cell model and isolated plasma membrane. Cell Struct Funct *25*, 269-277.

Klopocka, W., Moraczewska, J., and Redowicz, M. J. (2005). Characterisation of the Rac/PAK pathway in Amoeba proteus. Protoplasma *225*, 77-84.

Klopocka, W., and Redowicz, M. J. (2003). Effect of Rho family GTP-binding proteins on Amoeba proteus. Protoplasma *220*, 163-172.

Klopocka, W., and Redowicz, M. J. (2004). Rho/Rho-dependent kinase affects locomotion and actin-myosin II activity of Amoeba proteus. Protoplasma *224*, 113-121.

Kornyei, Z., Czirok, A., Vicsek, T., and Madarasz, E. (2000). Proliferative and migratory responses of astrocytes to in vitro injury. J Neurosci Res *61*, 421-429.

Kuroda, K., and Sonobe, S. (1981). Reactivation of a glycerinated model of amoeba. Protoplasma *109*, 127-142.

Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J*., et al.* (2005). The genome of the protist parasite Entamoeba histolytica. Nature *433*, 865-868.

Logan, M. R., and Mandato, C. A. (2006). Regulation of the actin cytoskeleton by PIP2 in cytokinesis. Biol Cell *98*, 377-388.

Loovers, H. M., Veenstra, K., Snippe, H., Pesesse, X., Erneux, C., and van Haastert, P. J. (2003). A diverse family of inositol 5-phosphatases playing a role in growth and development in Dictyostelium discoideum. J Biol Chem *278*, 5652-5658.

Luo, H. R., Huang, Y. E., Chen, J. C., Saiardi, A., Iijima, M., Ye, K., Huang, Y., Nagata, E., Devreotes, P., and Snyder, S. H. (2003). Inositol pyrophosphates mediate chemotaxis in Dictyostelium via pleckstrin homology domain-PtdIns(3,4,5)P3 interactions. Cell *114*, 559-572.

Ma, A. D., Metjian, A., Bagrodia, S., Taylor, S., and Abrams, C. S. (1998). Cytoskeletal reorganization by G protein-coupled receptors is dependent on phosphoinositide 3-kinase gamma, a Rac guanosine exchange factor, and Rac. Mol Cell Biol *18*, 4744-4751.

Maeda, K. (2003). ［前田佳祥子：自由生活アメーバ A. proteus を細胞モデルとした細胞運動におけるイノシトールリン脂質の制御．姫路工業大学大学院理学研究科修士論文］

Manahan, C. L., Iglesias, P. A., Long, Y., and Devreotes, P. N. (2004). Chemoattractant signaling in dictyostelium discoideum. Annu Rev Cell Dev Biol *20*, 223-253.

Mast, S. O. (1923). Mechanics of Locomotion in Amoeba. Proc Natl Acad Sci U S A *9*, 258-261.

Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. Nature *408*, 732-735.

Moghe, P. V., Nelson, R. D., and Tranquillo, R. T. (1995). Cytokine-stimulated chemotaxis of human neutrophils in a 3-D conjoined fibrin gel assay. J Immunol Methods *180*, 193-211.

Nobes, C. D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell *81*, 53-62.

Nobes, C. D., and Hall, A. (1999). Rho GTPases control

polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. J Cell Biol *144*, 1235-1244.

Ohsawa, K., and Kohsaka, S. (2005). [Regulatory mechanisms of microglia activation with special reference to the cell motility]. Seikagaku *77*, 309-319.

Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D. (2001). Actin dynamics. J Cell Sci *114*, 3-4.

Postma, M., Bosgraaf, L., Loovers, H. M., and Van Haastert, P. J. (2004a). Chemotaxis: signalling modules join hands at front and tail. EMBO Rep *5*, 35-40.

Postma, M., Roelofs, J., Goedhart, J., Gadella, T. W., Visser, A. J., and Van Haastert, P. J. (2003). Uniform cAMP stimulation of Dictyostelium cells induces localized patches of signal transduction and pseudopodia. Mol Biol Cell *14*, 5019-5027.

Postma, M., Roelofs, J., Goedhart, J., Loovers, H. M., Visser, A. J., and Van Haastert, P. J. (2004b). Sensitization of Dictyostelium chemotaxis by phosphoinositide-3-kinase-mediated self-organizing signalling patches. J Cell Sci *117*, 2925-2935.

Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J. D., Sheetz, M. P., and Meyer, T. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. Cell *100*, 221-228.

Rebecchi, M. J., and Pentyala, S. N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. Physiol Rev *80*, 1291-1335.

Ridley, A. J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell *70*, 389-399.

Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. Science *302*, 1704-1709.

Rivero, M. A., Tranquillo, R. T., Buettner, H. M., and Lauffenburger, D. A. (1989). Transport models for chemotactic cell populations based on individual cell behaviour. Chem Eng Sci *44*, 2881-2897.

Rohatgi, R., Ho, H. Y., and Kirschner, M. W. (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. J Cell Biol *150*, 1299-1310.

Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., and Mayer, B. J. (2001). Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. J Biol Chem *276*, 26448-26452.

Sasaki, T., Nishio, M., Sasaki, J., and Suzuki, A. (2006). Role of phosphoinositide phosphatases in chemotaxis. Paper presented at: 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and 11th FAOBMB Meeting (Kyoto).

Schlatterer, C., Gollnick, F., Schmidt, E., Meyer, R., and Knoll, G. (1994). Challenge with high concentrations of cyclic AMP induces transient changes in the cytosolic free calcium concentration in Dictyostelium discoideum. J Cell Sci *107 (Pt 8)*, 2107-2115.

Shinki, R., Maeda, K., Kamata, H., Hirata, H., Shimmen, T., Sonobe, S., and Yagisawa, H. (2005). Role of phospholipase C in the motility of Amoeba proteus. Jpn J Protozool *38*, 46-48.

Skoble, J., Portnoy, D. A., and Welch, M. D. (2000). Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and Listeria monocytogenes motility. J Cell Biol *150*, 527-538.

Sonobe, S., and Nishihara, E. (2003). [Cell biology of Amoeba proteus]. Jpn J Protozool *37*, 159-167.

Sonobe, S., Takahashi, S., Hatano, S., and Kuroda, K. (1986). Phosphorylation of Amoeba G-actin and its effect on actin polymerization. J Biol Chem *261*, 14837-14843.

Stephens, L. R., Hughes, K. T., and Irvine, R. F. (1991). Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. Nature *351*, 33-39.

Stockem, W., Hoffmann, H. U., and Gawlitta, W. (1982). Spatial organization and fine structure of the cortical filament layer in normal locomoting Amoeba proteus. Cell Tissue Res *221*, 505-519.

Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2003). Regulation of cortical actin networks in cell migration. Int Rev Cytol *229*, 245-286.

Svitkina, T. M., and Borisy, G. G. (1999). Progress in protrusion: the tell-tale scar. Trends Biochem Sci *24*, 432-436.

Taylor, D. L., Condeelis, J. S., Moore, P. L., and Allen, R. D. (1973). The contractile basis of amoeboid movement. I. The chemical control of motility in isolated cytoplasm. J Cell Biol *59*, 378-394.

Taylor, D. L., and Wang, Y. L. (1978). Molecular cytochemistry: incorporation of fluorescently labeled actin into living cells. Proc Natl Acad Sci U S A *75*, 857-861.

Taylor, D. L., Wang, Y. L., and Heiple, J. M. (1980). Con-

tractile basis of ameboid movement. VII. The distribution of fluorescently labeled actin in living amebas. J Cell Biol *86*, 590-598.

Thompson, G. A., Jr., and Nozawa, Y. (1977). Tetrahymena: a system for studying dynamic membrane alterations within the eukaryotic cell. Biochim Biophys Acta *472*, 55-92.

Toker, A., and Cantley, L. C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. Nature *387*, 673-676.

Van Dijken, P., Bergsma, J. C., and Van Haastert, P. J. (1997). Phospholipase-C-independent inositol 1,4,5-trisphosphate formation in Dictyostelium cells. Activation of a plasma-membrane-bound phosphatase by receptor-stimulated Ca2+ influx. Eur J Biochem *244*, 113-119.

Van Dijken, P., de Haas, J. R., Craxton, A., Erneux, C., Shears, S. B., and Van Haastert, P. J. (1995a). A novel, phospholipase C-independent pathway of inositol 1,4,5-trisphosphate formation in Dictyostelium and rat liver. J Biol Chem *270*, 29724-29731.

Van Dijken, P., Lammers, A. A., and Van Haastert, P. J. (1995b). In Dictyostelium discoideum inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate is dephosphorylated by a 3-phosphatase and a 1-phosphatase. Biochem J *308 (Pt 1)*, 127-130.

van Haastert, P. J., and van Dijken, P. (1997). Biochemistry and genetics of inositol phosphate metabolism in Dictyostelium. FEBS Lett *410*, 39-43.

Williams, J. G., Noegel, A. A., and Eichinger, L. (2005). Manifestations of multicellularity: Dictyostelium reports in. Trends Genet *21*, 392-398.

Yagisawa, H., Sakuma, K., Paterson, H. F., Cheung, R., Allen, V., Hirata, H., Watanabe, Y., Hirata, M., Williams, R. L., and Katan, M. (1998). Replacements of single basic amino acids in the pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta1 alter the ligand binding, phospholipase activity, and interaction with the plasma membrane. J Biol Chem *273*, 417-424.

Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2005). Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. Cancer Sci *96*, 379-386.

Yanai, M., Kenyon, C. M., Butler, J. P., Macklem, P. T., and Kelly, S. M. (1996). Intracellular pressure is a motive force for cell motion in Amoeba proteus. Cell Motil Cytoskeleton *33*, 22-29.

Yin, H. L., and Janmey, P. A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. Annu Rev Physiol *65*, 761-789.

Zhou, K., Takegawa, K., Emr, S. D., and Firtel, R. A. (1995). A phosphatidylinositol (PI) kinase gene family in Dictyostelium discoideum: biological roles of putative mammalian p110 and yeast Vps34p PI 3-kinase homologs during growth and development. Mol Cell Biol *15*, 5645-5656.

Zigmond, S. H. (1993). Recent quantitative studies of actin filament turnover during cell locomotion. Cell Motil Cytoskeleton *25*, 309-316.