

局所的な  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇がアメーバの仮足形成を誘導する

西上 幸範, 伊藤 真理子, 山本 珠実, 新免 輝男, 園部 誠司, 八田 公平  
(兵庫県立大学・大学院・生命理学)

Localized elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]$  induces pseudopod formation in *Amoeba proteus*

Yukinori NISHIGAMI, Mariko ITOH, Tamami YAMAMOTO, Teruo SHIMMEN, Seiji SONOBE  
and Kohei HATTA (Graduate School of Life Science, University of Hyogo)

SUMMARY

Strong arguments have been made for the role of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) in amoeboid movement. Results of our recent *in vitro* analysis have suggested the importance of increased  $[\text{Ca}^{2+}]$  in formation of pseudopods. In this study, therefore, we re-examined the  $[\text{Ca}^{2+}]$  distribution in cells of *Amoeba proteus*. Our present result indicated an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]$  at a region where a pseudopod was later formed. In addition, localized elevation of cation, using photoactivation of channel rhodopsin-2, induced a pseudopod. Viewed comprehensively, the present result strongly suggests that the localized elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]$  is closely related with formation of pseudopod in amoeboid movement.

**【目的】** 自由生活型アメーバである *Amoeba proteus* は方向性を持って運動を行うが、そのメカニズムについては不明な点が多い。*A. proteus* から単離した細胞膜にアクチンが結合しており、カルシウムイオン濃度を上昇させると、アクチンフィラメントが細胞膜から解離することが示されている (Kawakatsu *et al.*)。この結果から、我々は以下のような仮説をたてた。「*in vivo* において、膜結合アクチンは細胞膜の強度を保っているが、カルシウムイオンが外部から流入すると、アクチンが解離する。結果として、その部分の細胞膜の強度が低下し、細胞内圧によってその部分が押し出されると共に、その部分に細胞質が流入し、仮足が形成される」。この仮説が正しければ、仮足形成部分でカルシウムイオン濃度の上昇が期待される。自由生活型アメーバにおける  $[Ca^{2+}]$  は細胞内全体で低い (Cobbold, 1980)、後端部で高い (Kuroda *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 1980; Gollnick *et al.*, 1991) という報告がある。細胞の前方側での一時的な  $[Ca^{2+}]$  の上昇も報告されているが、仮足が活発に形成される先端部分での上昇ではなく、また必ずしも仮足伸長との相関が必ずあるわけではない (Taylor *et al.*, 1980)。逆に、仮足先端部の  $[Ca^{2+}]$  上昇は仮足が縮退するときにみられるという報告もある (Gollnick *et al.*, 1991)。私たちは、この問題を再検証するために  $[Ca^{2+}]$  分布のイメージングを行った。さらに光活性化カチオンチャネルであるチャンネルロドプシン (ChR2) (Nagel, 2003) を用いて陽イオンを局部的に細胞内に流入させることで、任意の場所と時間に仮足を形成させることを試みた。

**【方法】** *A. proteus* は KCM 溶液 (0.7 mg/l KCl, 0.8 mg/l  $CaCl_2$ , 0.8 mg/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 中で培養し、週に二回 *Tetrahymena pyriformis* を餌として与えた。実験には二日以上飢餓状態にした *A. proteus* を用いた。 $[Ca^{2+}]$  の可視化には Fluo-4 と Fura Red (ともに Invitrogen) を用いた。両試薬の濃度が 5 mM の水溶液を顕微注射によりアメーバに導入した。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM 510) で行った (励起光 488 nm, 検出 505-550 nm および 570 nm 以上)。505-550 nm と 570 nm 以上における蛍光強度の比から、 $[Ca^{2+}]$  を算出した。また、mChR2(N134R)-EYFP を顕微注射で細胞に導入することで ChR2-EYFP を発現した細胞を得た。細胞は KCM 溶液に入れ、明視野顕微鏡 (Olympus, BX60 または、Zeiss, Axioplan2) を用いて観察した。

**【結果】** 蛍光カルシウム指示薬を用いて  $[Ca^{2+}]$  分布を調べた結果、新たな仮足が観察される以前に、仮足形成部位の  $[Ca^{2+}]$  が上昇した。次に、mChR2-EYFP を導入した *A. proteus* を蛍光観察したところ、蛍光を発する小胞が複数個存在する細胞と、それに加えて細胞全体で蛍光が観察される細胞があった。

ChR2 刺激光 (青色光) を照射した時、前者は ChR2 を導入していない細胞と同様の挙動を示し、後者はそれとは異なる挙動を示した。よって、以下の実験には後者を用いた。細胞の一部を約 1 秒間青色光でパルス照射した場合、照射部分周辺の顆粒が一時的に停止したのち仮足が形成された。一方、細胞の一部に青色光を連続的に照射した場合、ChR2 を発現していない細胞と同様に、細胞内の顆粒の流れが一時的停止し、その後光が当たらない部分へと細胞は移動した。

**【考察】** ChR2 を発現した細胞において、青色光に対する挙動が変化したのは蛍光を発する小胞以外に、細胞全体に蛍光が確認された細胞であった。このことから蛍光を発する小胞以外の部分からカチオンが供給されていると考えられるが、それが細胞外由来なのか細胞内由来なのかは分からない。ChR2 を発現した細胞に長時間光照射を行うとコントロールと同じ挙動を示すが、これは *A. proteus* が本来持つ青色光レセプター (Harrington and Leaming, 1900) のはたらきによって ChR2 のはたらきが打ち消されたことが原因であると考えられる。短時間の照射では ChR2 の効果が打ち消されずカチオンが局所的に上昇したことで仮足が誘導されたと考えられる。今回行った実験では仮足を一時的に形成させることに成功したが、形成された仮足側に細胞が連続的に移動して行くことはなかった。このことから、アメーバが運動方向を変える際、仮足形成の後に、更なるステップがある可能性が示唆された。また、今回用いた系では ChR2 を活性化させた際の  $[Ca^{2+}]$  を測定することは出来なかったので  $Ca^{2+}$  の流入以外にも  $Na^+$  の流入などで仮足が誘導された可能性がある。しかし、 $[Ca^{2+}]$  イメージングの結果より、 $Ca^{2+}$  の流入が仮足形成を誘導している可能性が高い。以上のことから  $[Ca^{2+}]$  の部分的上昇が仮足形成を誘導することが強く示唆された。ChR2 を発現させると、任意の時間と場所で仮足形成を誘導することができるので、この系は仮足形成の更なるメカニズム解明に有効であることが期待される。

#### 【文献】

- 1) Cobbold, P.H. (1980) *Nature*, 285, 441-446.
- 2) Gollnick, F. *et al.* (1991) *Eur. J. Cell Biol.*, 55, 262-271.
- 3) Harrington, N.R. and Leaming, E. (1900) *Am. J. Physiol.*, 3, 9-16.
- 4) Kawakatsu, T., *et al.* (2000) *Cell Struct. Funct.*, 25, 269-277.
- 5) Kuroda, K. *et al.* (1988) *Protoplasma* 144, 64-67.
- 6) Nagel, G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 13940-13945.
- 7) Taylor, D.L. *et al.* (1980) *J. Cell Biol.*, 86, 599-607.