

Amoeba proteus に存在するアクチン繊維束

園部 誠司, 仙波 奈々世, 西上 幸範, 谷口 篤史 (兵庫県立大・院・生命理学)

Actin bundles in *Amoeba proteus*

Seiji SONOBE, Nanase SEMBA, Yukinori NISHIGAMI and Atsushi TANIGUCHI
(Grad. Life Sci. Univ. Hyogo)

SUMMARY

The motility of *Amoeba proteus* is well known to depend on the actomyosin system. Although the distribution of actin has been reported based on immunofluorescence microscopy, no report on actin bundles describes microinjection of fluorescently labeled actin, and electron microscopy. In this report, we describe actin bundles in pseudopods of *Amoeba proteus* using an improved method of fixation. Amoebae were attached to a coverslip and quickly sunk in -85°C methanol for 30 s; then they were transferred to 3.7% formalin in PEM (20 mM PIPES buffer, pH 7.0, 2 mM EGTA and 2 mM MgCl_2). Actin was stained with fluorescently labeled phalloidin. In some pseudopods, bundles of actin filaments oriented parallel to the extending axis of the pseudopod were observed. This finding is expected to provide a new viewpoint on the mechanism of amoeboid movement. Especially, we will discuss the mechanism of the movement of plasmalemma along with the pseudopod movement.

[目的] *Amoeba proteus* の運動はアクトミオシン系により駆動されている。アクチンの細胞内分布はこれまで、蛍光染色法、蛍光標識アクチンの顕微注射、電子顕微鏡などにより報告されているが、アクチン繊維束の存在に関する報告はない。一方、*Amoeba* 圧縮モデルや細胞質粗抽出液中ではアクチン繊維束が観察され、アクチン束化因子の存在が示唆されていた。したがって、我々は本来 *Amoeba proteus* 内にはアクチン繊維束が存在するのではないかと、観察されていないのは固定による破壊が生じているためではないかと考えるに至った。そこで、固定法の改良を試みた結果、アクチン繊維束の存在を示すことができたので報告する。

[方法] *Amoeba proteus* を親水処理したカバーガラス

に載せ、5 分間放置する。この間に *Amoeba* は仮足を伸ばし活発な運動を行うようになる。余分の培養液を捨て、1 分間置くと、*Amoeba* は運動を続け、扁平になる。 -85°C の冷却したメタノールに 30 秒間浸漬した後、3.7% formalin in PEM (20 mM PIPES buffer, pH 7.0, 2 mM EGTA and 2 mM MgCl_2) に移す。30 分放置した後、rhodamin-phalloidin あるいは Alexa 596-phalloidin で染色し観察した。

[結果] いくつかの仮足の中に、アクチン繊維束と思われる太いアクチン繊維が観察された。アクチン繊維束は仮足内に 1 – 5 本程度観察され、いずれも仮足の伸長方向に平行に配置していた。*Amoeba proteus* ではアクチン繊維が細胞膜に結合していることが知られている。したがって、細胞膜に仮足の伸長方向

と平行ににしわがあり、その直下のアクチンが繊維状に見えている可能性も考えられた。そこで固定後の *Amoeba* を蛍光標識 ConA で染色し観察した。その結果、細胞膜にはしわが生じているものの、その方向はランダムで仮足伸長方向に平行なしわはできていないことが判明した。また、染色後の *Amoeba* をカバーガラスからはがして集め、破碎して観察したところアクチン繊維束様の構造が観察された。 -20°C のメタノールで固定した場合は、アクチン繊維束様の構造は観察されなかった。以上の結果から、我々は *Amoeba proteus* 内にはアクチン繊維束が存在する、と結論した。

【考察】 -85°C という低温で急速凍結することにより、*Amoeba* 仮足内にアクチン繊維束を観察することができた *Amoeba proteus* 内のアクチン繊維束の報告はこれが始めてである。これまでの固定法ではアクチン繊維束が壊れていたと考えられる。しかし、現在の方法を用いても必ずしもすべての細胞でアクチン繊維束が観察されるとは限らず、またその数も一定ではない。したがって、まだ固定法の改良の余地

があるものと思われる。メタノール固定後のホルマリン処理の条件も検討する必要があるだろう。

ところで、我々は仮足伸長時の細胞膜の動きについて調べており、その結果は前回の大会で報告した。仮足伸長時には細胞膜も前方に動くことを示した。その際、非常に興味深いことに、細胞膜は前方に動くが細胞内のゲル層は基質に対して静止していることが判明した。このことは細胞膜とゲル層の間にずれが生じていることを示唆している。*Amoeba* 細胞膜にはアクチン繊維が結合していることが知られているが、このアクチン繊維がゲル層の一部であるとするこれらの運動は理解できない。我々は今回見出したアクチン繊維束が細胞膜とゲル層のずれに関わっているのではないかと考えている。細胞膜とゲル層の間にアクチン繊維束が存在し、細胞膜結合アクチン繊維との間ですべりが生じているのではないだろうか。アクチン繊維束の存在場所の詳細を明らかにすることが重要である。また、すべりを生じさせているモータータンパク質の検証も今後の課題である。