

試験管内アメーバ運動モデルの動きに必要な因子の探索

西上 幸範^{1,2}, 大西 愛美¹, 新免 輝男¹, 園部 誠司¹
(¹兵庫県立大・院・生命理学, ²日本学術振興会特別研究員)

Essential factors for motility of ‘*in vitro* amoeba’

Yukinori NISHIGAMI^{1,2}, Ami ONISHI¹, Teruo SHIMMEN¹ and Seiji SONOBE¹
(¹Grad. Sch. Life Sci., Univ. Hyogo, ²JSPS Research Fellow)

SUMMARY

Free-living amoebae, *Amoeba proteus*, show typical amoeboid movement depending on actomyosin. Despite the many studies that have been done, few proteins that are important for this movement have been identified because of the

absence of *in vitro* assay system to detect the activity. Results show that crude myosin II solution moved as amoebae when injected to cell extract of *Amoeba proteus*. We inferred that this model system was extremely useful to detect the proteins important for actomyosin-dependent amoeboid movement and sought necessary factors for the movements. When purified myosin II was injected into the fraction, which was prepared from cell extract using by column chromatographies, it did not move. Addition of purified actin to purified myosin II, however, induced *in vitro* movement. These results indicate that actin in the crude myosin is necessary for movement. Additionally, we have tried to purify necessary factors in cell extract.

【目的】 自由生活型アメーバである *Amoeba proteus* は、その名のおりアメーバ運動を行う。アメーバ運動は原生動物アメーバの移動のみならず、多くの生物の発生過程や、癌の転移、傷の治癒など様々な過程で重要な生命現象である。これまでアメーバ運動の駆動力は仮足前端部分でのアクチン重合によると考えられていた¹⁾。しかしながら、近年多くの細胞でアクチンダイナミクスに依存しない運動様式が存在が示されてきている^{2,3)}。現在、好中球などを用いて、この運動に必要なタンパク質の同定が精力的に進められているが、ほとんど同定するには至っていない。この原因として、これまで試験管内でアメーバ運動を評価する系が存在しなかったことがあげられる。我々は以前 *A. proteus* から抽出した、粗精製ミオシンを細胞抽出液に注入すると、アメーバ様の運動を行うことを発見した。この系は試験管内再構築系なので、その組成を任意に変更することができる。そこで、この系をアッセイ系として使い、アクトミオシン依存的なアメーバ運動に必要なタンパク質を同定することを試みた。

【方法】 *Amoeba proteus* を超遠心することで破碎した（これらの過程は2°Cで行った。なお特に断りがない限り以下の過程も同様）。得られた、沈殿にの3 M KCl 溶液（3 M KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20 µg/ml leupeptin, 20 µg/ml pepstatin A, 20 mM imidazole-HCl, pH 7.0）を加えた後、ホモジェナイズし、さらに超遠心を行った。生じた上清を透析溶液（50 mM KCl, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.2 mM ATP, 20 mM imidazole-HCl, pH 7.0）で5時間以上透析した。透析終了後、遠心し、沈殿を1 mM DTTと2 mM ATPを含むEMP緩衝液に溶解したものを、粗精製ミオシンIIとした。この粗精製ミオシンIIをKI溶液（1 mM DTT, 20 µg/ml leupeptin, 20 µg/ml pepstatin A, 2 mM MgCl₂, 0.4 M KI, 20 mM PIPES-KOH, pH 7.0）で溶解し、超遠心した上清をゲル濾過クロマトグラフィー（KI溶液で平衡化したもの）で分画し、ミオシンIIが含まれる部分を透析溶液で8時間透析した。その後、

遠心し、得られた沈殿を1 mM DTTと2 mM ATPを含むEMP緩衝液に溶解したものを、精製ミオシンIIとした。次に、*A. proteus* を超純水で洗浄後、等量の破碎緩衝液（1 mM DTT, 20 µg/ml leupeptin, 20 µg/ml pepstatin A, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0）を加えソニケートした後、超遠心し、得られた上清を陰イオン交換カラムで分画した（破碎緩衝液で平衡化した後、1 M NaClを加えた破碎緩衝液で抽出した）。室温で、得られた画分10 µlに1 µlの粗精製ミオシンIIを注入し、運動が起こったものをヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーで分画（20 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で平衡化したものを600 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で抽出した。上述と同様にて、活性のある画分を得、ゲルろ過クロマトグラフィー（10⁻⁵ M カルシウム緩衝液⁴⁾で平衡化したもの）で分画した。すでに述べた方法で活性があった画分を活性画分とした。なお、精製アクチンはSonobe et al. (1986)の方法⁵⁾に従い調製した。

【結果・考察】 活性画分に粗精製ミオシンIIを注入すると運動は起こるが、細胞抽出液（運動は数分継続）と比べてその運動継続時間は短くなった（20秒ほど）。このことから、運動の継続に必要な因子は精製の段階で失われていることが考えられる。今後はこのような因子を特定することが重要であると考えられる。次に、活性画分に精製ミオシンIIを注入したところ運動は起こらなかったが、粗精製ミオシンIIと精製アクチンを注入したところ、運動活性が復活した。このことから、粗精製ミオシンの中でアクチンとミオシンが重要であることが分かった。

【文献】

- 1) Pollard and Borisy (2003) Cell, 112, 453-465.
- 2) Charras (2008) J. Microsc., 231, 466-478.
- 3) Fackler and Grosse (2008) J. Cell Biol., 181, 879-884.
- 4) Cande (1980) J. Cell Biol., 87, 326-335.
- 5) Sonobe et al. (1986) J. Biol. Chem., 261, 14837-14843.