Review

アメーバ運動の機構

園部 誠司

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 〒678-1205 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

Mechanism of amoeboid movement

Seiji SONOBE

Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Hyogo 678-1205, Japan

SUMMARY

Cell motility is one of the most attractive phenomena among cell activities, and variety types of motility are observed in protozoa. I have studied on the mechanism of amoeboid movement, employing glycerinated model, reconstitution model, analysis of membrane dynamics and compression model. The data demonstrates that the dominant motive force of the movement is the hydrostatic pressure which was generated by the contraction of actomyosin layer in the subcortical cytoplasm. The plasma membrane is pushed by the pressure and extends forward by unfolding the wrinkles of the cell surface at the rear region. The smooth extension of the plasma membrane is achieved by its high fluidity.

Key words: Glycerinated model, Reconstitution, Membrane dynamics, Actomyosin, Amoeba proteus

細胞運動は細胞活動の最も目立つもののひとつであり、多くの人々を魅了してきました.特に原生生物には多くのおもしろい運動形態を示すものがあり、観察しているといったいどのようにしてこうした運動がなされているのかと、興味・妄想が掻き立てられます.こうした運動が主としてタンパク質や脂質で構成される分子機械で行われていることを考えると驚異的です.これまでに私が興味を持った原

生生物の中で、少しでも研究の手をつけたものを挙げてみると・・・・最初に出会ったのは Amoeba proteus で、細胞小器官が細胞膜の袋に詰め込まれたものがなぜエサを摂ることができるのだろう、エサをどのように感知して仮足を伸ばすのだろう、速い動きはどんな力によるのだろう、などの疑問を持ちました. 次は Spirostomum です. この巨大な繊毛虫の素早くちぢこまる動きはかわいいですね. その後ゆっくり伸長しますが、収縮と伸長にはそれぞれカルシウム依存性収縮繊維(ミオネーム)と微小管に依存していることは知られていますが、詳しい仕組みはわかっていません. Euplotes は繊毛の束ででき

Tel: +81-791-58-0176 /Fax: +81-791-58-0175 E-mail sonobe@sci.u-hyogo.ac.jp

Received: 04 April 2016; Accepted: 19 May 2016.

た足で歩きます! 単細胞なのにどのように足の動きを制御しているんでしょうか. とんでもない首の伸長を見せる Lacrymaria (ロクロクビムシとは全くその通りです) の細胞膜はどうなっているんだろう. 細胞体を物陰に隠して、口だけ外に出してエサを摂るなど、よくこんな生き物が現れたものです. そしてケイソウはガラスの細胞壁を持ってどのような仕組みで滑走運動しているのだろう. 他にも実物は見たことはありませんが、まだまだ興味を惹かれ、研究してみたいものがたくさんいます.

私が生物学に興味を持ったのは高校で生化学の初歩を学んでからです。化学反応で生物の活動を表記できることに驚き、自分でも研究してみたいと思いました。しかし、大学に入り、本格的に生化学を学んでいくうちに、膨大な知識の必要性、すなわちたくさんのことを覚えなくてはならないことや目に見えない現象を相手にしていることへのいら立ちのようなものがありました。「DNA が転写される時、RNA ポリメラーゼが DNA 上を動く」と言われて、むしろどうやって、どんな力が働いて動いているのだろう、というのが気になっていました。今ではそれらを 1 分子計測や、高速 AFM で見ることができる時代になりましたね.

卒業研究で研究室を選ぶ時期には生化学以外の研 究をやろうという気になっていました. 当時私が興 味を持っていたのは視覚に関することで、どうして 見ることができるのか、ということでした. しか し, 真にそれを理解するには神経系の, さらには中 枢の働きがわからなければならない. それは自分が 生きているうちには無理だろう, と思ってしまいま した. そこで選んだのが細胞運動でした. 大学 1 年 生の時に神谷宜郎先生の講義があり、そこではさま ざまな細胞運動、とくに原生動物の興味深い運動の 様子を 16 mm 映画(当時は動画と言えばこれが主流 で、「映画」と言っていた)で見せていただいてい ました. まあ本当に面白く, どうやってこんな動き をしているんだろうと思い,神谷先生がそれを説明 してくださるかと思いきや,「おもしろいです ねー」でおしまい、そのどれもがわかっていないと いうことでした.

最も印象深かったのはイカダケイソウの運動でした。細胞が横並びに(本当は縦に重なっている?)整列し、隣同士の細胞がすべりあい、まるで南京玉簾のように動いていました。細胞外には鞭毛や繊毛のような運動器官は全く見えず、一体どうなっているのか想像もできませんでした。実はこのことがここ数年、学生の山岡君とケイソウの運動機構を調べる動機になりました。というわけで卒業研究は旧神谷研(私が3年生の時神谷先生は退官されていた)に行くことになりました。卒業研究は黒田清子先生

について行うことになりました. いくつかテーマが 出されましたが、その中にアメーバ運動がありました (残念ながらイカダケイソウは研究室にはいませんでした). 黒田先生は神谷先生と共に原形質流動の研究をされており、驚異的な手先の器用さで、車軸藻をミシン糸でくくったり、筒状の細胞を剃刀で切って開きをつくったりされていました.

さて、アメーバ運動ですが、いまでも教科書では 細胞質が細胞後部でゾル化して前方に流れ, 先端で ゲル化するという, いわゆるゾルゲル変換によって 動いている, という説明がなされることが多いです が, ゾルゲル変換のしくみや前方に細胞質が流れる ための力発生機構などは説明されていません. この 力発生に関して当時有名な論争がありました. その ころアメーバ運動の材料として主に使われていたの はいわゆる巨大アメーバと呼ばれる Amoeba proteus や Chaos 類です. それらは 0.5-3 mm という巨大な もので、光学顕微鏡で観察しやすく、古くから研究 されていました. Mast (1926) や Goldacre (1961) は運 動の観察からその運動の原動力は外側のゲルが収縮 することによって発生した圧力が細胞質を前方に押 し出している,とする後部収縮説を唱えました.確 かに、アメーバを見ていると後部が収縮するように 見えます. ところが 1960 年に Allen が奇妙な現象を 見つけました. 彼はガラスキャピラリーにアメーバ を入れて観察している時,誤ってキャピラリーを壊 してしまいました. 中のアメーバは細胞膜が破れ細 胞質がキャピラリーの中に流れ出してきたのです が,その細胞質が流動していたのです.キャピラ リーの中ですから圧力の発生は考えられません. そ こで Allen が考えたのは細胞質(ゾル) 自体が収縮 能を持ち、またゾル中に繊維状の連続構造があり、 収縮によってそれが引っ張られることで流動が起こ る, すなわち収縮は前方で起こり, 後ろのゾルを前 方に引っ張るのだ、という前部収縮牽引説でした (Allen, 1961). これはその後前方のゾルがゲルに なるとき収縮が起こるというファウンティンゾーン 収縮説に発展しましたが、いずれにしても後ろか前 かという極端な対立となり、論争が勃発したのでし た. 私が卒業研究を始めたのはこの論争が沈静化し たころでした. 沈静化したのは論争に決着が着いた からではなく, Allen が亡くなったことが大きかった と思います.

私の卒業研究はアメーバのグリセリンモデルをつくるというものでした. グリセリンモデルというのは脱膜モデルの一種で, 細胞を 50% のグリセロール溶液に浸漬し, 細胞膜を破壊して透過性を持たせ, その後 ATP を添加することによって運動を再活性化するというものです. 細胞膜の破壊は浸透圧の急激な変化によるものと考えられています. また, グリ

セロールは著しい凝固点降下を引き起こし、50% 水溶液の凝固点は -23℃ くらいになります。このことは冷凍保存の酵素類などがグリセロール溶液になっていることからもよく知られていることです。凍結なしで低温にできるためタンパク質の保存に適しています。さらに細胞を浸漬すると細胞内のタンパク質の変性を防ぐという効果が期待できます。初めに骨格筋のグリセリンモデルがつくられ、その後Hoffmamm-Berling (1954) によって非筋細胞にも応用されました。彼女は動物の培養細胞やツリガネムシなど様々な材料を用いてグリセリンモデルを作っています。

さて、アメーバのグリセリンモデルを作る意図で すが、収縮の場が前か後ろかということであれば、 グリセリンモデルを作って収縮させ, どちらが収縮 するか確認すればよい、ということです。同様の意 図からそれまでにいくつかグリセリンモデルが報告 されていました (Simard-Duquesne and Couillard. 1962; Rinaldi and Opas, 1976; Opas, 1976) . しかしい ずれもグリセリン処理による細胞の変形や破壊が激 しく, 良い状態, つまり細胞の前後が保持されてい るモデルはありませんでした. 材料は A. proteus を 使いましたが、こいつは非常に運動が速く、環境変 化にすぐに反応して丸くなってしまいます. また, A. proteus では、いろいろな薬剤が細胞内に浸透しに くいという性質があります. A. proteus の細胞膜は脂 質二重層の外側に糖衣 (glycocalyx) とよばれる層が あり、これが薬剤の浸透を妨げていると考えられま す. 実際, A. proteus に 1% Triton-X 100 やホルマリ ンなどの過激な薬剤を与えても, すぐには死なず, 丸くなってしまいます. これが細胞の形を保つこと が難しい最大の原因でした.

細胞のこうした反応を防ぐにはどうすればよい か、を考えなければなりませんでした。そこで考え たのは低温にすることでした. しかも急激な低温処 理をすれば丸くならないのではないか、と考えまし た. 当時電顕室にあったフロンスプレーの缶を逆さ まにしてフロンの液体を噴出させたり, A. proteus を 這わせたシャーレの裏側から液体窒素を当てる, な どということをしました. 液体窒素は効果的で, 処 理してすぐにグリセリン溶液を入れるとアメーバは 丸くならず, 這っている時の形を保ったグリセリン モデルになりました. これで大成功!と思ったので すが ATP 溶液を添加すると少しは収縮を示すもの の, すぐに細胞膜が破れて細胞質が漏れ出してくる という現象が起こりました. どうもこれは液体窒素 で細胞周囲の水が凍結され、氷晶が細胞膜を傷つけ ているからではないかと思われました. この方法で しばらく実験していたのですが、そのうちグリセリ ンモデルにした細胞の中に見え方の違う、コントラ

ストの強いアメーバがいることに気づきました.こ れらは数百個の細胞のうちの数個、という少数でし たが、このモデルの ATP に対する反応が非常にダイ ナミックで、激しい収縮を示しました. なぜこのよ うな細胞ができるのだろう、と不思議でした. しか し、コンスタントにこのようなモデルができれば研 究は進むのではないかと, 少しドキドキしながらい ろいろ試していました. 液体窒素の処理時間やグリ セロール溶液の温度や入れ方など、細かい条件を調 べていました. そのうち液体窒素で処理せず, -20℃ に冷やしたグリセロール溶液をいきなりアメーバに かけるとこのようなモデルができることがわかりま した、細胞の周りの水がグリセロール溶液によって 押し流されて除去され、氷晶の形成がなくなったの かもしれません. -20℃ という温度も, アメーバが 丸くなるのを防いだと考えられます. 実験台の上で グリセロール溶液を -20℃ に保つために、発泡スチ ロールの箱にドライアイスを入れ、小さい脚付きの 台を置き、その台の上に溶液を置きました。台の高 さをうまく調整すると台の上をちょうど -20℃ にす ることができました. こうして, 這っている時の形 を保ったアメーバのグリセリンモデルを作ることが できました (Kuroda and Sonobe, 1981).

先に述べたように、こうして作ったグリセリンモ デルは ATP の添加によって著しい収縮を示しまし た. 初めに後部あるいは核周辺に収縮が起こり、核 の周りに細胞内顆粒の塊が形成されます. これだけ 見ると後部収縮説が正しい、という結論になりそう ですが、話はそれほど単純ではありませんでした. 初めの収縮に続いて他の部分がさらに核周辺に引っ 張られていきました. そして非常に面白いことに細 胞内に分散していた顆粒が流動を示したのです. こ れは Allen がガラスキャピラリーの中で見た流動と そっくりでした. グリセリンモデルは細胞膜に穴が 開いているはずですから、細胞内圧力が発生してい るとは考えられません. 流動の起こっている部位を 電子顕微鏡で観察したところ, アクチン繊維の網目 が観察されました (Sonobe and Kuroda, 1986). 流動 はこの網目が手繰り寄せられることによって起こっ ていると考えられ、したがって Allen が主張してい た機構が存在することがわかりました. しかし, こ れから直ちに前部収縮説が支持されたわけではあり ません. 先に述べたように初めの収縮は主として後 部で起こりました. このことは当初の目的からする と後部収縮説を支持することになります. というわ けで、グリセリンモデルを用いた研究はいずれの説 も支持するという非常にあいまいな結果になってし まいました. グリセリンモデルを用いた研究やその 後のアクチンのリン酸化 (Sonobe et al., 1986) など については 2004 年に本誌に総説を書いていますの でそちらもご参照ください (Sonobe and Nishihara, 2004).

私はアメーバ運動で学位を取ってから大阪大学で助手をすることになりましたが、材料は原生動物ではなく、植物細胞になりました。主に使っていたのはタバコの培養細胞で、BY-2 と呼ばれるこの細胞はかつての専売公社の研究所で作り出されたもので、高度に細胞周期を同調化できることで世界的に有名になった細胞です(Nagata et al., 1981). その後 20年以上植物の細胞骨格の研究を行っていました。1994年に姫路工業大学(現兵庫県立大学)に移り、アメーバ運動の研究を少しだけ再開していました。2000年に論文を発表しましたがそれについては後で触れます。

アメーバ運動の研究は 2007 年に西上幸範君と谷口篤史君が研究室に来てから飛躍的に進みました. 西上君は人工アメーバによる原動力発生機構とゾルゲル変換機構,谷口君はアメーバ運動に伴う細胞表層のダイナミクスという問題について目覚ましい成果を挙げました. 以下に彼らの研究を紹介し,それらの研究を踏まえた上でのアメーバ運動の機構に関する考えを述べたいと思います.

人工アメーバ

A. proteus を電子顕微鏡観察すると細胞膜の裏打ち にアクチン繊維の層が観察され、細胞質全体にミオ シンの thick filament が見られます (Sonobe and Kuroda, 1986) . このように A. proteus では常にミオシン の thick filament が存在しています. したがってア メーバを破砕して遠心するとミオシンは沈殿になり ます. この沈殿を塩抽出したものを透析するとミオ シン粗分画が得られます.一方,上清にはミオシン はほとんど存在せず G-アクチンが大量に存在しま す. 温めると G-アクチンは重合し, F-アクチンや それが束化したものが大量に現れます. ミオシン粗 分画と上清を混合し、ATP を加えると全体が著しい 収縮を示します. 当初, この現象を利用して収縮の Ca²⁺ 感受性を調べていましたが、ある時上清にミオ シン粗分画を滴下したところ, ミオシン粗分画の白 い塊がうねうねと動き出し、収縮し、内部からミオ シン粗分画が白い煙のように噴出したのです. 噴出 したミオシン粗分画は再び収縮し、内部のミオシン 粗分画が噴出しました. まるでアメーバが仮足を伸 ばしたり縮めたりしているようでした(Fig. 1). ア メーバ運動を in vitro で再現してしまった!というの が最初の感想でした(Nishigami et al., 2013). かつ てかのセントジェルジが骨格筋アクトミオシン溶液 中で超沈殿を観察した時「試験管内で筋収縮を再現 した!」と叫んだという逸話を思い出しました.

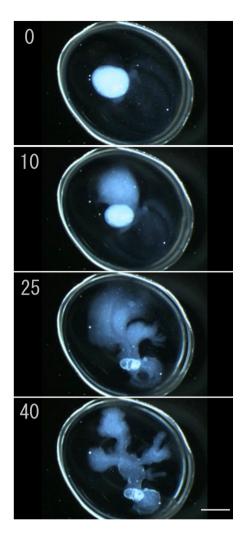
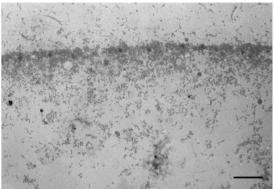


Fig. 1. Time lapse images of reconstructed amoeboid movement *in vitro*. Numbers indicate times in second after injection of the crude myosin. Bar = 1 mm.

我々はこの系を人工アメーバとか試験管内アメーバなどと称して喜んでいました。電子顕微鏡で観察するとミオシン粗分画の周囲はアクチンとミオシンが密に集積した皮が形成されていました(Fig. 2). 膜構造はありません. 細胞膜なしでアメーバ運動が再現されたというのも驚きでした. また, 次に述べる谷口君による研究においても, 原動力発生機構と細胞膜の独立性が示唆されました. さて, こうした観察から人工アメーバの運動はミオシン粗分画の周りにアクトミオシンの層が形成され, これが収縮することによって内圧が高まり, アクトミオシン層の弱いところが破れて内部のミオシンを噴出させる, と



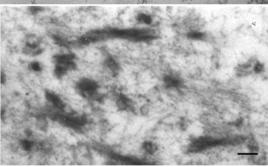


Fig. 2. Electron micrographs of the cortex region of the crude myosin. Lower and higher magnified images are shown. The crude myosin fraction is surrounded by highly condensed actin and myosin. Bars = $5 \mu m$ (upper) and 100 nm (lower). Modified from Nishigami et al. (2013).

いうことを繰り返して起こっていると思われました (Fig. 3). 生きているアメーバにおいて細胞膜直下 にはアクチン層があり、細胞質全体にミオシンが存 在します. またしばしばアクチンとミオシンがつな がった構造も見られます. Stockem らは以前から plasma gel sheet と呼ばれるアクトミオシン層の存在 を示していました (Stockem et al., 1982) . 人工ア メーバで見られたアクトミオシンの皮はまさに plasma gel sheet です. 人工アメーバの成功により我々は アメーバ運動の原動力が plasma gel sheet の収縮に よって発生した静水圧であると確信するに至りまし た. 一方, Allen の観察やグリセリンモデルで見られ た流動はどうでしょうか. 実は人工アメーバでも同 様な現象は見られます. 外液の Ca²⁺ 濃度を 10⁻⁵ M 以上に上げると皮は非常に弱くなり、吹き出しの現 象が見られなくなります (Fig. 4). 代わりにミオシ ン粗分画がずるずると引っ張られて動くという現象 が見られます(Fig. 4, 矢印). この現象は溶液中で ミオシンとアクチンのつながりにより形成された網 目がすべりによって動かされていると考えていま

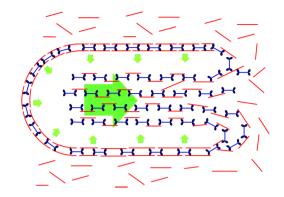


Fig. 3. A representative diagram of reconstructed amoeboid movement *in vitro*. The crude myosin fraction is surrounded by a layer consisted of actin (red line) and myosin (bipolar symbol). The layer contracts (small green arrows) and generates hydrostatic pressure (large green arrow) which pushes the crude myosin into the region where the actomyosin layer is mechanically weakened. Actomyosin layer is formed again surrounding the spouted crude myosin.

す. 皮の形成と Ca²⁺ との関連は明確ではありません が、アクチン同士を架橋するゲル化因子が関与して いる可能性が考えられます. いずれにしてもアメー バではゲルの収縮による静水圧の発生とミオシンと アクチン繊維の引っ張り合いによる運動が, 少なく とも起こり得るといえます. 実際のアメーバ運動で は静水圧による力が大きく, 運動の原動力の主体と なっていると考えられます. 同様のことが真正粘菌 Physarum でも見られます. Physarum の原形質流動は 神谷と黒田によって静水圧で動いていることが証明 されました (Kamiya and Kuroda, 1958). 一方, Physarum を 10 mM カフェイン溶液に入れると内部 のゾルが噴出し、カフェインドロップと呼ばれるも のが形成され(Hatano, 1970), その内部では活発な 運動がみられます. この運動は静水圧で動いている とは考えにくくアクトミオシンの収縮弛緩の繰り返 しによって起こっていると考えられます. このよう にいわゆるゾルにも運動を引き起こす能力が備わっ ているけれども、細胞全体の運動は静水圧によって 駆動されているのです. こうした細胞質の性質がア メーバ運動の機構解明に混乱を生じさせたのではな いでしょうか.

ところで人工アメーバはミオシン粗分画と細胞質 可溶性分画を再会させることによってできました. その動きは非常に複雑で、まるで生きているようで す.この成功の一つのポイントは不均一な混合、と いう点であると思います.均一に混合すると、単に

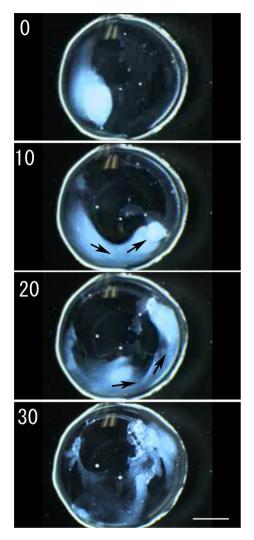


Fig. 4. Time lapse images of reconstructed amoeboid movement *in vitro* in the presence of 10^{-4} M Ca^{2+} . Numbers indicate times in second after injection of the crude myosin. The crude myosin is dispersed and pulled each other. Arrows indicate the flow of the crude myosin fraction. Bar = 1 mm.

全体の収縮が起こるだけです、細胞は生きるために エントロピーを小さくしています。そのためにエネ ルギーを使って物質の集積や合成を行っているわけ です。人工アメーバでは人工的に物質の不均一な分 布状態を作り、あとは勝手に動く、という状態で す。人工アメーバに不可欠な因子はアクチンとミオ シン以外はわかっていませんが、それらの因子を不 均一に配置すれば、あとはそれぞれの性質が混合さ れ相互作用し、最終的に調和の取れたアメーバ運動 が出現するということになります。これを考えると、生命とは何か、という質問に対して、集められた生体物質のそれぞれの物性の調和である、という答えを出したくなります。生体物質が持つさまざまな物性が相互作用しあって予想外の生命活動を出現させているところが、われわれには神秘的に見えているのかもしれません。

最近よく耳にする言葉に「構成的研究法」という ものがあります. これは既知の生体物質を組み合わ せて生理現象を再現するという手法でしくみを理解 しようというものです. 人工アメーバも一応この中 に入ると思いますが、 さらに進めて人工アメーバを 脂質膜に封入し,動く人工細胞を作ろうという研究 も行いました. これは現在, 西上君が進めており, 動く脂質膜小胞の作成にも成功しています (Nishigami et al., 2016; Ito et al., 2015) . 脂質膜に人 エアメーバを封入しただけなら、膜のない人工ア メーバと同様のランダムな運動が起こるだけだと思 われます. しかし, 脂質膜にイオンチャンネルや刺 激受容体などを埋め込むと, 刺激に応じた運動が起 こることが期待されます. 今後こうした構成的手法 を用いてアメーバ運動の機構を明らかにしていく道 も有力だと思っています. 現在までの人工アメーバ は不可逆的な運動を示すだけです. つまり収縮だけ が起きて弛緩は起こっていません. 生きている細胞 内では収縮弛緩が繰り返されています. 人工細胞に 弛緩のしくみを加えてやればアメーバ運動が永続的 に起こるのではないかと思っていますが, 今のとこ ろアイデアは全くありません.

細胞膜のダイナミクス

アメーバは基質上を移動しますが、この時に基質 と接している細胞膜は細胞の移動に重要な役割を果 たしているはずです. 一体どのように働いているの か. 昔からアメーバ運動に伴う細胞膜の動きに関す る研究が多くあります. ほとんどの場合, 炭粒やポ リスチレンビーズを細胞表層に付着させてその動き を観察するという手法で行われていました (Griffin and Allen, 1960; Grebecki, 1986). その結果, 細胞の 背側は進行方向に動いているというのが一致した見 解となっていました. しかし, マーカー粒子が基質 に付着する場合もあり、腹側の細胞膜がどのように 動いているかはっきりしていませんでした. ところ でアメーバ運動に伴う膜の動きについては主に3つ のモデルが考えられています. 1 つ目は Rolling motion (RM) model (Griffin and Allen, 1960; Abé, 1962; Seravin, 1964) で、細胞膜がキャタピラーのように回 転しているというものです. この場合, 細胞膜背側 は前方に動き, 先端で腹側になり, 後端部で再び背

側になる、ということになります.腹側は基質に対して静止することになります.2 つ目は Retrograde lipid flow (RLF) model です (Bell, 1961; Goldacre, 1964; Stockem, 1972) .これは後部で細胞膜を取り込み,前方へ運び,先端で融合する,というものです.この場合,背側も腹側も基質に対して静止していることになります.3 つ目は Total folding and unfolding (TFU) model です(Czarska and Grebecki, 1966; Haberey et al., 1969; Grebecki, 1986).これは後部表層で起こった収縮により細胞膜にしわができ,そのしわを伸ばすことによって仮足を伸長させるというものです.この場合,仮足の背側も腹側も前方に動くことになります.

谷口君はこの問題に挑戦して、見事な成果を挙げ ました(投稿準備中). 初めに行ったのは細胞膜を 蛍光標識したレクチンの一種, Concanavalin A (Con A) で染色してそのダイナミクスを観察することで す. 先にも述べましたが、A. proteus の細胞膜は少し 特殊な構造をしており, 脂質二重層の外側に厚さ約 20 nm の電子密度の高い層があり、その外側に約200 nm の長さの繊維状構造が存在しています (Mercer, 1959) . これらはそれぞれ amorphous layer, filamentous layer と呼ばれ、2 つをまとめて glycocalyx と呼 ばれています. Glycocalyx はその名からわかるよう に糖が含まれていますが、 タンパク質も存在します (O'Neill, 1964) . Con A は filamentous layer に結合 することがわかっています (Wise, 1974). さて, Con A で染色したアメーバを観察すると仮足の伸長 が起こっても常に細胞表層は染色されていました. 仮足先端の蛍光量の減少は見られませんでした. ま た、細胞内への蛍光の取り込みも 1 時間くらいは見 られませんでした. このことは仮足の伸長に伴う, さらには移動に伴う膜の取り込みと放出が起こらな いことを示しており、上記の RLF モデルには該当し ないことを示しています.

Con A は細胞膜を均一に染めるため細胞膜自体の動きを見ることができません。そこで、以前から行われていた方法、すなわち炭粒を細胞表層に付着させる方法で観察しました。すると背側や側面の細胞膜は前方に動き先端や後端に付着した炭粒は動きませんでした。これらは RM モデルと合致しない結果ですが、腹側の細胞膜の動きは見ることはできませんでした。これは腹側にある炭粒が細胞に付着しているのか基質に付着しているのか区別しにくいからです。

これを解決するために、新兵器、Digital scanned light-sheet microscope (DSLM) を用いることにしました (Keller et al., 2008). これは基礎生物学研究所の野中研究室との共同研究で行いました. この顕微鏡はレーザーの励起光をガルバノミラーで高速に振動

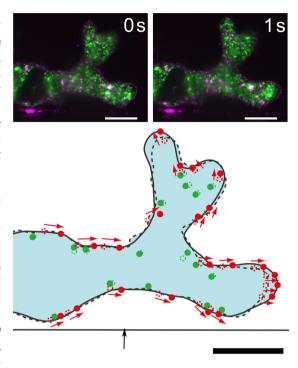


Fig. 5. DSLM live imaging. (upper) Photograph of DSLM live imaging of the cortex marked with DiI (magenta) and mitochondria stained with MitoTracker Deep Red (green) were taken at 0 (left) and 1 second after (right). (lower) A merged drawing composed from the traces of upper images. Several DiI clusters and mitochondria were selected, and tracings of their movements for 1 second are shown. Dotted and filled circles indicate the position at 0 and 1 second after, respectively. Red arrows indicate the movement of DiI clusters. Black arrow indicates the substrate. Bar = $10~\mu m$.

させ光のシートを作って試料に当てて観察するものです。観察用レンズは励起光と直角の位置に設置されています。この顕微鏡を用いると光シートによって細胞断面を二次元像として観察することが出来るためレーザー走査型共焦点顕微鏡と比較して、素早く細胞の断面像を得ることができます。アメーバは DiI と MitoTracker で染色しました。DiI は親油性の蛍光試薬で、通常、細胞膜を染色するのに使われますが、水中では粒状に分散します。これをアメーバに添加すると、細胞表面に DiI の粒が付着し、動きな過うことが可能になります。 MitoTracker はミトコンドリアを染める試薬で、細胞内の動きを観察するために用いました。こうして染めたアメーバをDSLM で観察すると背側、腹側両方の膜は前方に動いていることがわかりました(Fig. 5)。このような

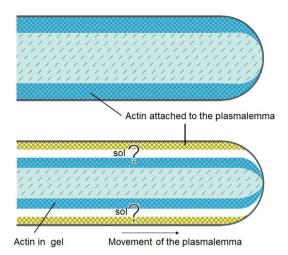


Fig. 6. Representative scheme of the structure of *Amoeba*. (upper) actin filaments bind to the plasma membrane and they are incorporated into the gel layer. In this case, The plasma membrane is impossible to slide on the gel. (lower) The thin sol layer between the plasma membrane and gel layer enable smooth extension of the plasma membrane.

動きは TFU モデルと合致するものです. これらの結果から, A. proteus では細胞膜のしわを利用して仮足を伸長させていると結論しました. よく知られているようにアメーバにエサを与えると食作用によりエサを細胞膜で包み込んで細胞内に取り込みます. この時細胞の体積は増加し,細胞の表面積は減少しているはずです. エサを大量に取り込んだアメーバは仮足を引っ込めて丸くなります. これは仮足を形成するための十分な膜のしわがなくなったためではないかとも考えられます.

細胞膜とゲルのすべり

アメーバの細胞質は前方に流動しているゾルとそれを取り囲むゲルで構成されています. ゲルは基質に対して動きません. ゲルは細胞膜直下に存在していますから, 細胞膜が前方に動くとゲルとの間ですべりが生じることになります. このことは昔から指摘されていましたが (Mast, 1926; Allen, 1961), DSLM による観察でより明確になりました. ゲル中のミトコンドリアと細胞膜の位置が細胞の移動に伴ってずれていたのです (Fig. 5). アメーバの細胞膜にはアクチン繊維が結合しています (Sonobe and Kuroda, 1986; Kawakatsu et al., 2000). また, ゲルはアクチン繊維が架橋されたものだと考えられていました (Fig. 6, upper). したがって細胞膜のアクチン

繊維はゲルの一部に取り込まれており、一体化していると考えていました.しかし、細胞膜とゲルのずれが観察されたことからこの考えは間違っていると考えざるを得ません.実際、細胞膜直下をよく観察すると、顆粒が流れている、すなわちゾルが存在することがわかりました(Fig. 6, lower).このことはアメーバ運動の機構を説明する際、大きな問題になりますが、それについては後で述べます.また、細胞膜とゲルのすべりと細胞膜直下のゾルの存在については西上君が人工アメーバの解析から、ずり応力によるゲルのゾル化で説明しています(Nishigami et al., 2013).

細胞膜の動きと接着

さて、アメーバが移動している時、細胞膜は前方 に動いていることがわかりましたが、ここで大きな 疑問が生じました、接着の問題です、アメーバは基 質を移動している時細胞の一部を基質に接着させて います. この接着部位と細胞膜の動きはどのような 関係があるのでしょうか. これを調べるために Con A で染色したアメーバを基質側からニポウディスク 共焦点顕微鏡で観察しました. Con A 染色は高倍で 観察すると砂粒状に見えます. アメーバの移動に 伴って砂粒状の蛍光は前方に流れていましたが、細 胞膜の一部に動かない部分がありました. 細胞膜は この部分をよけて流れていたのです. 川の中に杭を 立てた状態を想像するとわかりやすいと思います. つまり、細胞膜は非常に高い流動性を持ち、何らか の仕組みで動かない接着部位の細胞膜をよけて動い ているのです. こうした高い流動性が、接着と膜の 動きを両立させていることがわかりました.

接着部位がどのようにして形成されているかは非 常に興味深い問題です、細胞膜の一部がどのような 仕組みで接着性を示すようになるのか. 先ほど述べ ましたが、細胞膜直下にはゾルが存在します. 流動 しているゾルが細胞膜の一部を固定するとは考えら れません. おそらく基質に対して動かないゲルと細 胞膜の間につながりがあって,接着をコントロール しているのではないかと考えています. 一般的には アクチン繊維が接着に関与していることが知られて いますから、たとえばストレスファイバーのような アクチン繊維の束が細胞膜に伸びているのかもしれ ません. 細胞膜直下のゾル層は、そうした繊維をよ けて動いているのでしょうか. また, 基質との接着 には細胞の最外層にある filamentous layer が重要な役 割を果たしていると考えられます. この糖鎖の繊維 がなぜ基質に接着するのかが謎です. 先に述べたグ リセリンモデルは処理後もシャーレに付着していま すが,一度はがすと再び付着することはありませ

ん. また、単離細胞膜も基質には付着しません. こうしたことから、糖鎖の基質に対する接着性を細胞が制御している可能性が考えられます.

仮足形成機構

先にも述べましたが、A. proteus の細胞膜にはアク チン繊維が結合しています. 15 年以上前にこれに関 する仕事をしました (Kawakatsu et al., 2000) . その 時もモデルを利用しました. アメーバをスライドグ ラスとカバーグラスに挟んで間の培養液を抜いてい くと, 丸く扁平になり, やがて細胞膜が破れ, 細胞 質の顆粒が流出してきます. 同時に細胞内の顆粒が 中心方向に集まり、細胞膜との間に透明な層が形成 されました. アメーバが仮足を伸ばすとき, 仮足先 端に透明層と呼ばれる, 顆粒が存在しない部位が一 時的に形成されることは以前から知られていまし た. 私は押しつぶした細胞で形成された透明層が生 きている時仮足先端で見られる透明層と同じではな いか、と考えました. この現象を引き起こす因子を 考えた時に細胞膜 - アクチン - カルシウムという図 式が頭に浮かびました. これは大学院時代に細胞膜 とアクチンの結合を電子顕微鏡で観察したり、グリ セリンモデルの Ca²⁺ 感受性について調べたりしてい たからです。さて、上記の「押しつぶしモデル」で 透明層ができた時の外液は培養液で、これには50 μM ほどの Ca^{2+} が含まれています. そこで EGTA を 加えた培地で押しつぶしてみると,透明層はできま せんでした. EGTA 存在下でつぶしたのちに Ca²⁺ を 含む ATP 溶液を添加すると透明層が形成されまし た. これらの過程を蛍光ファロイジンでアクチンを 染色して観察すると、Ca²⁺ 存在下ではアクチン繊維 が細胞膜から脱離していることがわかりました.次 に、アメーバを Ca²⁺ 存在下あるいは非存在下で破砕 し、細胞膜を単離してアクチンの有無を調べたとこ ろ, やはり Ca2+ 存在下ではアクチンが細胞膜からな くなっていました. こうした研究からアメーバの仮 足形成時には先端から Ca2+ が流入して細胞膜からア クチン繊維が脱離し、弱くなったところにゾルが流 れ込んでくる,という仮説を立てるに至りました.

アメーバ運動のしくみ

最後にこれまでの成果をまとめて,仮定や想像も 含めつつアメーバ運動のしくみを述べてみたいと思 います.

構造的には細胞膜にアクチンが結合し、その内側にゲル、さらにその内側にゾルがあります.ゲルはアクトミオシン層に囲まれており、細胞膜のアクチン繊維とゲルは弱く結合していると仮定します.ゲ

ル中のアクトミオシンの収縮によりゾル内の静水圧 が高くなります。エサが触れるなどの刺激があると そこから Ca²⁺ が細胞内に流入します. Ca²⁺ は細胞膜 とアクチン繊維を脱離させます. 同時にアクチン繊 維同士の架橋の解離や断片化によって, 先端部のゲ ル層のゾル化を引き起こす可能性もあります. 細胞 内圧はその部位に向けてゾルを押し出します. 細胞 膜はゾルに押されて伸展しますが、細胞膜は後部の しわを伸ばすことによって供給されます. 細胞膜は ゲル上をすべり,前方へ動きます.しかしこの説明 では刺激がなければ動かないことになります. 実際 はアメーバは一見何もなさそうなスライドグラス上 を這いまわっています. 刺激がなくても Ca2+ の流入 はあるのか、あるいはアメーバだけが感じる刺激が 常にあるのでしょうか. アメーバの細胞膜電位を測 定した研究があり (Bingley, 1966), 仮足先端は電位 が高く (-20 mV) 後部は低く (-65 mV) なっている と報告されています。前後で常にこのような膜電位 が保たれていることが刺激なしに仮足が形成される 要因かもしれません. ちなみにアメーバを電場の中 に置くと負極側に仮足を出します. アメーバをスラ イドグラス上で長時間這わせているとしばしば長細 い形になります. 前後の極性が安定化されてこうし た形状になるのかもしれません.

動物細胞との比較

2015年のCellにブレブ機構をベースにして発展させたアメーバ運動の機構が報告されました(Liu et al., 2015; Ruprecht et al., 2015). それによると平衡を保っていた表層の収縮のfluctuationが何らかの刺激によって平衡が破れ、そこから定常的なブレブが形成され、連続的な後部コーティカルの収縮と表層の後部への連続的な流れがアメーバ運動を引き起こすということです. 移動は細胞表層と基質との摩擦によると考えられています. したがって、細胞内では後部で細胞膜成分の取り込みが起こり、前部で付加されると考えられます. これは RLF モデルに合致しています.

一方、A. proteus において、細胞表層は前方へ動いていました。Glycocalyx と細胞膜が別々に動いており、細胞膜は基質に対して動いていない可能性も考えられますが、我々のフォトブリーチの結果はこれを否定しています。さらに細胞膜とゲル層の間のゾルの存在は、再構成モデルからの予想に合致しており、さらにこのゾル層が前方へ流れていたという結果は、細胞膜自身も前方へ動いていることを強く示唆しています。したがって、A. proteus の運動には基本的にはブレブベースの機構が働いているものの、移動の機構、すなわち細胞膜と基質との関係では動

物細胞とは異なる機構が働いていると考えられます.こうした発見は動物細胞の運動の進化を考えると非常に興味深いものがあります.動物細胞と最も大きな違いは運動速度です. A. proteus は動物細胞(0.1-15 mm/min)の 10 倍以上の速度(180 mm/min)で移動します.このような高速の移動速度は細胞膜の取り込みと再生という RLF モデルでは説明が難しいのではないでしょうか.しわを伸ばすという方法が速そうです.そして,この速い運動は,動きの速い繊毛虫を取り込むという目的にかなっており,そのために独自の運動機構を進化させたのかもしれません.

今後の課題

これまでの研究でアメーバ運動のしくみはかなり わかってきましたが、まだ興味深い問題は残ってい ます.一つは接着の問題です. 先にも述べました が、細胞膜の一部が接着部位になっており、これは 移動と共に形成消滅を繰り返しているようです.細 胞膜の一部を接着部位にする仕組みが全く分かって いません. アメーバをアクチン阻害剤で処理すると 丸くなり、基質から離れてしまうことからアクチン の関与が考えられますが, こうした現象は培養液の イオン強度を上げても見られ、必ずしも特異的な反 応とは言えません. アメーバを入れたシャーレを ゆっくり振ってやるとアメーバは接着することがで きず丸くなりますが、やがて細長い仮足を放射状に 伸ばします. ここにポリスチレンビーズを入れてや るとビーズは細い仮足の先端に特異的に付着します (Fig. 7). これは仮足先端を接着部位にして接着す る場所を探しているものと考えられます. この現象 は接着のしくみを調べるのに非常に良い実験系だと 考えています. 仮足先端のアクチンの構造がどう なっているのか知りたいところです. しかしアメー バのアクチンを観察するのは非常に困難です. これ まで蛍光ファロイジンで染色を試みていますが一定 の染色像が得られていません. 時には非常に太く, きれいなアクチン繊維束が仮足内に見られることも あります. しかしこうした繊維束が常に細胞内に存 在しているとは考えにくいと思っています. アメー バの素早い運動にはこうした構造は邪魔になると思 われるからです. アメーバの細胞質を取り出して温 めるとアクチンが重合してゲル化しますが, 同時に アクチン繊維が多数形成されます. 細胞内では G-ア クチンであったものが取り出すと非常に重合しやす くなるようです. アクチンの重合制御機構がはずれ るからかもしれません. 蛍光染色する前にメタノー ルやホルマリンで固定しますが、この間にアクチン の重合が起こっている可能性を否定できません. 接

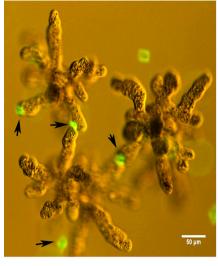


Fig. 7. *Amoeba* extending filopodia under floating condition. Fluorescently labeled polystylene beads attached to the filopodia tips (arrows). Bar = $50 \mu m$.

着に関しては glycocalyx も関与しているはずです. 細胞の最外層にある filamentous layer が基質と結合すると考えられますが、接着部位の filamentous layer だけがなぜ接着できるのか. アメーバが這った後には glycocalyx の filament が残されているとも言われており (Komnick et al., 1973), 不可逆的な性質の変化が filamentous layer に起こっている可能性もあります. いずれにしても filamentous layer も含めて glycocalyx の性質を明らかにしなければなりません. またそのことも含めて、細胞膜の高い流動性がどのような仕組みでもたらされているのかも興味深いところです. 谷口君が細胞膜の運動を観察している際に仮足が回転していることを発見しましたが、この現象はアメーバの細胞膜が持つ性質の特徴を表しているものと思われます.

終わりに

本稿ではアメーバ運動に関する研究だけを紹介しましたが、これまで多くの原生生物を材料にして、また多くの学生たちと研究を行ってきました。山岡望海君はケイソウの運動機構の研究を行い、ミオシンの同定にまで至りました。この研究は山口県岩国市のミクロ生物館の末友靖隆館長にお世話になり、そこでイカダケイソウを採集したことがきっかけでした。かつてどんな機構か想像もできなかったイカダケイソウの滑走運動機構がある程度説明できるようになりました。また機会があればご紹介したいと

思います.梁瀬隆二君は現在,Lacrymaria の Proboscis の伸縮機構の研究を行っており,Ca²⁺ や微小管構造について新しい知見が得られつつあります.小橋川剛君は吸管虫の捕食機構の研究を行い,捕食における膜のダイナミクスが食胞形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしました.また,運動ではありませんが西原絵里さんはアメーバの収縮胞の研究を行い,アクアポリンを同定しました.原生生物の研究を一緒にやってくれたすべての学生の名前を挙げるのは紙面の都合上不可能ですが,この場を借りて皆さんに対する感謝の意を表したいと思います.そして彼らを通じて原生生物のおもしろさが社会に広がっていくことを願っています.

謝辞

本総説を書くに当たり、西上君、谷口君から図をいただきました。この場をお借りして感謝いたします。細胞膜ダイナミクスの研究における DSLM の使用に当たり、大学共同利用機関法人自然科学研究機構基礎生物学研究所時空間制御部門の野中茂紀博士、高尾大輔博士、小林(梶浦)弘子さんにお世話になりました。また、基礎生物学研究所から DSLM共同利用研究プログラムの援助を受けました(15-709)。

引用文献

- Abé, T. H. (1962) Morpho-physiological study of ameboid movement II. Ameboid movement and the organization pattern in a striata ameba. Cytologia, 27, 111 –139.
- Allen, R. D. (1961) A new theory of ameboid movement and protoplasmic streaming. Exp. Cell Res., Suppl. 8, 17–31.
- Bell, L. G. E. (1961) Surface extension as the mechanism of cellular movement and cell division. J. Theor. Biol., 1, 104–106.
- Bingley, M. S. (1966) Membrane potentials in *Amoeba proteus*. J. Exp. Biol., 45, 251–267.
- Czarska, L. and Grebecki, A. (1966) Membrane folding and plasma-membrane ratio in the movement and shape transformation in *Amoeba proteus*. Acta Protozool., 4, 201–239.
- Goldacre, R. J. (1961) The role of the cell membrane in the locomotion of amoebae, and the source of the motive force and its control by feedback. Exp. Cell Res., Suppl. 8, 1–16.
- Goldacre, R. J. (1964) On the mechanism and control of

- amoeboid movement. *In:* Primitive Motile Systems in Cell Biology. Allen, R. D. and Kamiya, N. (eds.). Academic Press, New York, pp. 237–255.
- Grebecki, A. (1986) Two-directional pattern of movements on the cell-surface of *Amoeba proteus*. J. Cell Sci., 83, 23–35.
- Griffin, J. L. and Allen, R. D. (1960) The movement of particles attached to the surface of amebae in relation to current theories of ameboid movement. Exp. Cell Res., 20, 619–622.
- Haberey, M., Wohlfarth-Bottermann, K. E. and Stockem, W. (1969) Pinocytose und Bewegung von Amöben. VI. Kinematographische Untersuchungen über das Bewegungsverhalten der Zelloberfläche von Amoeba proteus. Cytobiologie, 1, 70–84.
- Hatano, S. (1970) Specific effect of Ca²⁺ on movement of plasmodial fragment obtained by caffeine treatment. Exp. Cell Res., 61, 199–203.
- Hoffmann-Berling, H. (1954) Adenosintriphosphat als Betriebssoff von Zellbewegungen. Biochim. Biophys. Acta, 14, 182–194.
- Ito, H., Nishigami, Y., Sonobe, S. and Ichikawa, M. (2015) Wrinkling of a spherical lipid interface induced by actomyosin cortex. Phys. Rev. E, 92, 062711.
- Kamiya, N. and Kuroda, K. (1958) Studies on the velocity distribution of the protoplasmic streaming in the myxomycete plasmodium. Protoplasma, 49, 1–4.
- 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.
- Keller, P. J., Schmidt, A. D., Wittbrodt, J. and Stelzer, E. H. (2008) Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. Science, 322, 1065–1069.
- Komnick, H., Stockem, W. and Wohlfarth-Bottermann, K. E. (1973) Cell motility: Mechanisms in protoplasmic streaming and ameboid movement. Int. Rev. Cytol., 34, 169–249.
- Kuroda, K. and Sonobe, S. (1981) Reactivation of a glycerinated model of amoeba. Protoplasma, 109, 127– 142.
- Liu, Y.-J., Le Berre, M., Lautenschlaeger, F., Maiuri, P., Callan-Jones, A., Heuzé, M., Takaki, T., Volturiez, R. and Piel, M. (2015) Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. Cell, 160, 659–672.
- Mast, S. O. (1926) Structure, movement, locomotion, and stimulation in amoeba. J. Morphol., 41, 347–425.

- Mercer, E. H. (1959) An electron microscopic study of Amoeba proteus. Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci., 150, 216–232.
- Nagata, T., Okada, K., Takebe, I. and Mitsui, C. (1981) Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). Mol. Gen. Genet., 184, 161– 165.
- Nishigami, Y., Ichikawa, M., Kazama, T., Kobayashi, R., Shimmen, T., Yoshikawa, K. and Sonobe, S. (2013) Reconstruction of active regular motion in amoeba extract: Dynamic cooperation between sol and gel states. PLOS ONE, 8, e70317.
- Nishigami, Y., Ito, H., Sonobe, S. and Ichikawa, M. (2016) Non-periodic oscillatory deformation of an actomyosin microdroplet encapsulated within a lipid interface. Sci. Rep., 6, 18964.
- Opas, M. (1976) Course of glycerination of *Amoeba proteus* and contraction of glycerinated models. Acta protozool., 15, 485–499.
- O'Neill, C. H. (1964) Isolation and properties of the cell surface membrane of *Amoeba proteus*. Exp. Cell Res., 35, 477–496.
- Rinaldi, R. and Opas, M. (1976) Graphs of contracting glycerinated Amoeba proteus. Nature, 260, 525– 526
- Ruprecht, V., Wieser, S., Callon-Jones, A., Smutny, M., Morita, H., Sako, K., Barone, V., Ritsch-Marte, M., Sixt, M., Volturiez, R. and Heisenberg, C.-P. (2015)

- Cortical contractility triggers a stochastic switch to fast amoeboid cell motility. Cell, 160, 673–685.
- Seravin, L. N. (1964) Critical survey of the modern concept of amoeboid movement. Tsitologiia, 6, 653–667.
- Simard-Duquesne, N. and Couillard, P. (1962) Amoeboid movement. I. Reactivation of glycerinated models of *Amoeba proteus* with adenosine triphosphate. Exp. Cell Res., 28, 85–91.
- Sonobe, S. and Kuroda, K. (1986) Ultrastructural aspects of a glycerinated model of *Amoeba proteus*. Protoplasma, 130, 41–50.
- 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.
- Sonobe, S. and Nishihara, E. (2004) Cell biology of *Amoeba proteus*. Jpn. J. Protozool., 37, 159–167 (in Japanese).
- Stockem, W. (1972) Membrane-turnover during locomotion of Amoeba proteus. Acta Protozool., 11, 83–93.
- 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.
- Wise, G. E. (1974) Ultrastructural localization of surface concanavalin A binding sites in a unicellular organism, *Amoeba proteus*. Cell Tissue Res., 150, 161– 166.