2P161

基質の微細線状パターンを認識した細胞運動の方向制御

○浅野 由香子、平塚 祐一、上田 太郎（産総研・ジーンファンクション）

細胞の形態や運動方向の制御には細胞同士の接触などの細胞外環境が関与している。細胞が線状の凹凸に沿って移動する「コンタクトガイダンス」現象は古くから知られているが、我々は、微細な凸状平行線のパターンをつけた基質上で、細胞性粘菌の変異株細胞が線に対し垂直方向へ移動する現象を見いだした。この細胞は分化時の細胞集合に必須な *amiB* 遺伝子の欠損株で、平面上ではケラトサイト様の形状を保持してランダムな方向に直進する。凸状線の間隔を変えたところ、間隔が $1.5 \mu\text{m}$ のときには垂直方向に進むが、それ以外の場合には平行方向に進むことが分かった。YFP 発現細胞を共焦点顕微鏡で観察したところ、細胞は凹凸の溝に潜り込みながら運動していた。垂直方向への重心の移動速度は平面上に比べて遅いが、細胞が基質の凹凸表面をたどると仮定した理論速度と良く一致した。このことは細胞の前端部の移動速度は平面上と等しいことを示唆している。また、興味深いことに、垂直方向に進む細胞は図のように周期約 30 分で左右に振動しており、細胞の進行方向決定に何らかのフィードバック機構が働いていることが考えられた。このような微細パターンの利用は細胞運動制御の新たな解析方法となることが期待される。

細胞が左右に振動しながら垂直方向に進む様子（細胞の輪郭の約 2 時間の経時変化）
凸状線の配向は縦方向。矢印は細胞の進行方向を示す。

Y.Asano, Y.Hiratsuka and T.Q.P.Uyeda : Directional control of cell motility on line-patterned substrates

2P163

細胞性粘菌の走化性に関する G 蛋白質の細胞内 1 分子イメージング

○宮永 之寛¹、上田 昌宏¹、Peter N. Devreotes²、柳田 敏雄¹
(¹ 阪大院・生命機能、² Johns Hopkins Univ.)

走化性を示している粘菌細胞は明確な細胞極性を形成し、細胞の前端では仮足の伸展、後端では尾部の収縮がおこる。このような細胞内の場所ごとに異なる反応は、受容体が受けた誘因物質による刺激を三量体 G 蛋白質が細胞内の分子群に伝達することから始まる。受容体と G 蛋白質は細胞膜上をほぼ一様に分布している。しかし、受容体や G 蛋白質の働き方が一様であるかは明らかになっていない。

本研究では蛍光蛋白質 (YFP) を融合した G 蛋白質 α サブユニット ($G\alpha$) 1 分子の挙動を生きた細胞内で観察することで、細胞内の場所ごとでの G 蛋白質の働き方を調べた。全反射顕微鏡を用いた細胞内 1 分子観察により、 $G\alpha$ -YFP 分子の輝点が細胞膜上に現れては消えるという現象が繰り返し観察された。輝点が見えている時間は $\sim 300\text{ms}$ だった。細胞膜上に安定して存在する受容体の場合は $G\alpha$ のように輝点が見える現象は観察されず、輝点が見えている時間は $\sim 1,000\text{ms}$ であった。これは YFP の褪色速度と一致する。この結果は $G\alpha$ が細胞膜上に安定して存在せず細胞質との間を行き来することを示唆する。

$G\alpha$ が細胞膜に滞在する時間は細胞を誘引物質で刺激すると短くなることがわかった。この変化は受容体欠損細胞では観察されなかったことから $G\alpha$ の細胞膜滞在時間が受容体の状態により変化することがわかった。そこで $G\alpha$ の膜滞在時間を指標にし、受容体活性状態の細胞内局在について調べた。走化性を示す細胞の前端部では、 $G\alpha$ の膜滞在時間が短く、誘引物質により受容体が活性化した時のものと一致した。一方、後端部では刺激していない細胞と同様の長い滞在時間がみられた。以上の結果から、走化性応答にみられる細胞応答の極性は、細胞内で一様に分布する受容体や G 蛋白質の働き方が細胞の前後軸に沿って変化することで実現されることが考えられる。

Y.Miyayama, M.Ueda, P.N.Devreotes and T.Yanagida : Single-molecule imaging of trimeric G-protein in *Dictyostelium* cells during chemotaxis

2P162

細胞表層アクトミオシン細胞骨格の機能解析

○吉岡 恭子、孫 怡、水野 敬文（(独) 産総研・生物機能工学）

トライトン処理をした細胞に ATP を添加することで引き起こされる収縮現象は、細胞表層にあるアクトミオシン細胞骨格の収縮によるものと考えられる。この収縮現象を解析することにより、アクトミオシンの収縮活性を、間接的にはあるが簡単に調べることができる。細胞性粘菌に一般的なアクチンとは性質が異なるテトラヒメナアクチンとのキメラ分子を発現させた細胞では、発生過程での集合期における運動速度が野生株に比べ低下し発生がマウンド期で停止する、また、野生株と混合して形成された集合体中では野生株細胞とうまく協調して運動できない、等の異常な形質が見られるものがある。細胞運動や変形、細胞間の相互作用にアクチンが関与していることを示唆する結果であるが、キメラアクチンの機能がどの程度異なり、形質の違いとして現れているのかわからない。そこで我々は、キメラアクチンの機能、特にミオシンとの相互作用を調べる目的で、キメラアクチン発現細胞の ATP 添加による収縮を解析した。

栄養増殖期の細胞に、0.02%トライトン + 0.1 mM ATP を同時に添加し、細胞の収縮を録画記録した。位相差顕微鏡下では、トライトンにより膜が溶出すると細胞は丸く黒く変化し、その直後から収縮を始める。細胞が黒く変化した点をゼロとし、その後の細胞のサイズ変化を解析した。その結果、形質異常を示すキメラアクチン発現細胞では、野生株に比べ収縮率に違いはないが収縮速度が低いことが解った。テトラヒメナアクチン発現細胞でも同様の速度低下が見られた。ミオシン欠損株及び ATP 無添加では、収縮はほとんど見られなかった。キメラアクチンを含むアクトミオシンの収縮速度は野生型より遅いことを示唆する結果が得られた。面倒な精製をしなくてもアクトミオシンの収縮活性を簡単に調べることのできる方法であることも示された。

K.Yoshioka, Y.Sun and T.Mizuno : Measurement of ATP-induced contraction of cytoskeletal cortex of *Dictyostelium*

2P164

走化性における PTEN 局在のポジティブフィードバック機構

松岡 里実¹、○上田 昌宏¹、Peter N. Devreotes²、柳田 敏雄¹
(¹ 阪大院・生命機能・ナノ生体科学、² Johns Hopkins University)

細胞性粘菌の走化性情報処理過程では、細胞の前進端と後進端にイノシトールリン脂質の $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ と $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ がそれぞれ局在する。こうした極性は、ある二つの酵素が細胞内で相互排他的に局在して、イノシトールリン脂質の代謝反応を逆方向に触媒することで形成される。すなわち、細胞の前進端には $\text{PI}3$ -キナーゼが局在し、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ のリン酸化反応により $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ を産生する。一方、後進端には PTEN が局在し、 $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ の脱リン酸化反応により $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ を産生する。これにより、細胞の前後に二つのイノシトールリン脂質が分かれて局在することになる。

本研究では、PTEN が細胞膜に結合する様子を 1 分子イメージングすることにより、PTEN の膜局在機構について調べた。PTEN の膜結合時間を測定したところ、PTEN が膜から解離するまでに何らかの中間状態をとることがわかった。その状態を特定するために、脱リン酸化活性を欠く変異体や N 末端の $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ 結合部位を欠く変異体の膜結合を調べた。その結果、PTEN は $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ 結合部位によって細胞膜へ安定して結合し、 $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ の脱リン酸化反応の後に細胞膜から解離することがわかってきた。中間状態は脱リン酸化反応を反映していた。PTEN は $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ の多い細胞膜に結合し、その近傍にある $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ を加水分解することで、さらに $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ を産生する。こうしたポジティブフィードバック機構により、PTEN の膜局在が安定化すると考えられる。

S. Matsuoka, M. Ueda, P. N. Devreotes and T. Yanagida : Positive feedback mechanisms of PTEN localization in *Dictyostelium* cells