

動物培養細胞で発現させたクラミドモナス非保守的アクチン (NAP) の

フィロポディアへの局在性の検討

Lack of filopodial localization of Chlamydomonas unconventional actin (NAP) expressed in cultured animal cells

生命科学専攻 島田健太郎
SHIMADA Kentaro

目的と背景

アクチンは真核生物の細胞骨格として細胞内の様々な運動や形態生成において中心的な役割を果たしている。単細胞緑藻クラミドモナスには、保守的な配列（高等動植物のアクチンとアミノ酸配列で約 90%の相同性）を持つアクチンと非保守的な NAP（同じく約 64%の相同性）の、2つのアクチンが存在する。NAP はクラミドモナスのアクチン遺伝子の欠損時に高発現し、その機能を一部代替することがわかっている。しかし、それ以外の NAP 独自の働きについては全くわかっていない。EGFP で標識したクラミドモナスの NAP（EGFP-NAP）をアフリカツメガエル培養上皮細胞（A6）内で異所的に発現させると、網目状のアクチン繊維がダイナミックに形成と消失を繰り返す細胞辺縁部のラメリポディアには部分的に取り込まれるものの、比較的安定なアクチンの束からなるストレスファイバーにはほとんど取り込まれない。これは、NAP が非保守的なアミノ酸配列を持ったために、重合性などの性質が動物細胞の内在性アクチンと大きく異なるためであると考えられる。動物細胞では、アクチン繊維を含む構造として、上記のラメリポディアとストレスファイバーの他に、フィロポディアが形成される。フィロポディアは細胞辺縁部に生じる糸状突起構造で、ファシンやフィンブリンなどのアクチン結合タンパク質によって架橋されたアクチンの束からなる。異所的に発現した NAP がフィロポディアにおいてどのような挙動を示すのかは、NAP の性質を考えるうえで重要な知見となるが、A6 細胞ではフィロポディアがほとんど形成されないために、まだ調べられていない。

C キナーゼの活性化剤である TPA（12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate）は、ほ乳類の培養細胞においてフィロポディア形成を誘導する。TPA の効果は細胞種によって様々であり、ほ乳類培養細胞でのフィロポディア誘導の作用機序にもまだ不明な点が多い。しかし、TPA は C キナーゼの下流のシグナル伝達経路を活性化させる作用があるため、これにより細胞骨格の制御に関わる低分子量 G タンパク質の Rho や Rac、Cdc42 の活性化バランスを調整し、フィロポディア形成を誘導すると考えられる。本研究では、まず TPA 処理によって A6 細胞においてもフィロポディア形成が誘導できることを確認し、また TPA 処理の至適条件を調べた。その後、EGFP-NAP を発現させた A6 細胞（A6GN）を同様に TPA 処理してフィロポディア形成を誘導し、NAP がフィロポディアに局在するかどうかを調べた。

材料と方法

細胞培養 アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) A6 細胞および EGFP-NAP を恒常発現する A6 細胞 (A6GN) は、50% Leibovitz's L15 培地に 10% の FBS（ウシ胎児血清）、抗生物質を加えて培養した。培養温度は 22°C とし、CO₂ の供給は行わずに培養した。フィロポディアの形成を促す際には、培地に終濃度 1~100 nM の TPA を加えた。

免疫蛍光抗体染色 抗体染色は一般的な方法で行った。10%ホルマリン/PBS 溶液 (PBS は 0.8% NaCl, 0.02%

KCl、0.02% KH₂PO₄、0.1% K₂HPO₄) で固定した細胞を、マウス抗 GFP 1 次抗体 (mAb 11E5, Invitrogen)、Alexa Fluor 488 標識抗マウス 2 次抗体 (Life Technologies)、および rhodamine-phalloidin (Wako) を用いて染色した。

画像の取得 冷却 CCD カメラと Z 軸自動撮影制御装置を組み合わせた SPOT 蛍光イメージングシステム (セキテックノトロン) を搭載した蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus) と、共焦点レーザースキャン顕微鏡システム LSM510 を使用し、細胞の辺縁部のアクチン構造を観察、撮影した。

結果

A6 細胞における TPA 処理の至適条件を探るために、TPA 処理濃度と処理時間の検討を行った。その結果、100 nM の TPA を含む培地で 30 分処理した細胞で最も高頻度にフィロポディアの形成が認められた。A6GN を同様に処理して形成させたフィロポディアで NAP の局在は認められなかった。A6GN のラメリポディアで NAP の局在が認められた。

結論

カエルの細胞である A6 細胞でも TPA 処理によるフィロポディア形成の誘導が可能であることが確認された。したがって TPA 処理はウシの細胞だけではなく、両生類の細胞も含めた多様な細胞においてフィロポディア形成を誘導すると考えられる。また、今回検討した条件の中では 100 nM TPA で 30 分間の処理が A6 細胞のフィロポディア形成に最も有効であることが判った。

TPA 処理によって A6GN においてもフィロポディアの形成が認められたが、この領域に EGFP-NAP の染色は見られず、フィロポディアに NAP の局在は見られなかった。先行研究において、NAP はラメリポディアに部分的に局在し、ストレスファイバーには局在しないことがわかっている。したがって NAP は安定したアクチンの構造には局在せず、網状の構造であり形成と消失を繰り返す安定性に欠けた構造に局在すると考えられる。また、先行研究の FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) による解析ではラメリポディアに局在する NAP のほとんどは繊維を構成していない単量体であることが示唆されている。クラミドモナスの細胞では、アクチン繊維束からなる接合管が、NAP のみを発現する *ida5* 変異株では伸長しないことから、NAP の重合能が全くないか、極めて低いことが示唆される。NAP は非保守的なアミノ酸配列を持つために、重合性などの性質が動物細胞に内在するアクチンと大きく異なると考えられる。フィロポディアは多数のアクチン繊維がファシンやフィブリンなどのアクチン結合タンパク質によって架橋された束からなる安定した構造であり、アクチンに比べ重合能の低い NAP はそのような構造には取り込まれにくいものと考えられる。あるいは、ファシン等のフィロポディアに存在するアクチン結合タンパク質と NAP との結合性が低く、フィロポディア構造から除外された可能性もある。

参考文献

T. Kato-Minoura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 (2011) 723-727

J. D. Beckmann, D. J. Romberger, S. I. Rennard, J. R. Spurzem, *J. Cell. Phys.* 164 (1995) 123-131

D. Vignjevic, S. Kojima, Y. Aratyn, O. Danciu, T. Svitkina, G. G. Broisy, *J. Cell Biol.* 174 (2006) 863-875

T. Kato-Minoura, M. Hirono, R. Kamiya, *J. Cell Biol.* 137 (1997) 649-656