

博士論文

「基質の地形と接着性によって変調される
アメーバ形態のダイナミクス」

"Modulation of amoeboid cell morphology
by substrate topography and adhesivity"

令和元年度

広域科学専攻 相関基礎科学系

本田 玄

目次

研究背景：細胞骨格系と細胞形態	6
真核細胞の形態形成	6
細胞骨格系とその制御因子	6
アクチンフィラメントの高次構造と細胞内配置	11
細胞外環境への応答性.....	15
本研究で扱う生物材料.....	18
第1部 細胞性粘菌のアクチン波の地形依存性	20
1. 背景	20
2. 方法	23
微細加工による細胞接着基質の作製.....	23
走査型プローブ顕微鏡による基質表面の形状測定.....	25
細胞観察用チャンバーの組み立て	28
PDMS チャンバーの作製.....	29
細胞株の作製	29
細胞の培養と観察準備.....	30
細胞の顕微鏡観察	31
薬理阻害.....	33
画像解析.....	33
3. 結果	36
マイクロスケールのリッジに沿ったアクチン波の伝播と細胞の移動	36
マイクロリッジ上のアクチン波の生成と持続性	40
リッジ上のアクチン波における分子の空間分布	42
リッジ追従的な細胞移動のアクチン波への依存性.....	44
基質表面の正負の曲率によるアクチン波の伝播方向への制約	48
酵母粒子に対する推進力の発生.....	55
4. 考察	57
アクチン波.....	57

基質上の曲面によるアクチン波の伝播方向の制限.....	58
貪食過程との関係.....	60
5. 第1部のまとめ	62
第2部 アメーバ細胞形態の基質接着依存性	63
1. 背景	63
2. 方法	66
細胞-基質間接着の促進.....	66
細胞株の作製.....	67
細胞の培養と顕微鏡観察.....	68
薬理阻害.....	69
画像解析.....	70
3. 結果	72
基質接着を強めた状況での細胞性粘菌の移動形態.....	72
基質接着を強めた状況での仮足形態.....	74
アクチンコーテックス構造と仮足の形成.....	78
アクチンコーテックスと SCAR 複合体の膜局在の関係.....	80
アクチン重合制御に関わる分子の局在パターン.....	86
細胞底面の接着斑の局在パターン.....	89
ヒト好中球様細胞の移動形態における基質接着依存性.....	91
4. 考察	95
SCAR 複合体の膜局在機構.....	95
基質接着が強い状況における膜伸展のダイナミクス.....	98
基質接着が強い状況における細胞の極性形成.....	99
好中球様細胞の形態における基質接着依存性.....	101
5. 第2部のまとめ	102
総括	103
引用文献	104

研究背景：細胞骨格系と細胞形態

この章では本論文の内容に関する研究背景を概説する。第1部、第2部の研究内容に関するより具体的な背景は各部でまた別途述べる。

真核細胞の形態形成

細胞の形態変化および遊走は、細胞の栄養摂取、分裂、発生、組織修復、免疫応答、癌の浸潤といったあらゆる機能の基礎となる過程である。その不全は、言うまでもなく生体のあらゆる異常につながる。細胞の変形過程には自発性があるように見える一方で、環境からの様々な制約に対する適応性を備えている。細胞の形態は骨格系に支えられたものであり、環境要因への対処の多くは遺伝子発現の変化を待たない即時的なものであるから、細胞の形態および行動における自発性や適応性は細胞骨格系の状態とその制御の性質に依る面が大きい。本章では、細胞骨格系を構成する主要な分子の説明と、それらの相互作用によって形成される高次構造、および単一細胞内における構造形成と、その環境応答的な性質について述べる。

細胞骨格系とその制御因子

細胞の形態は、細胞骨格系の構築と解体のダイナミクスによって形づくられている。真核細胞の骨格系タンパク質にはアクチン、微小管、中間径フィラメントが存在し、多くのタンパク質や脂質がこれらの時間空間的な制御に関わる。ここでは主にアクチンとその制御因子について、細胞性粘菌などから得られた知見に基づいて述べる。

・アクチン^{1,2}

単量体の G-アクチン (Globular actin) はおよそ球形の構造をしており、片側に大きな溝をもつ。溝の深部には ATP、ADP と結合する部位があり、これらヌクレオチドとの結合状態が G-アクチンどうしの結合性に影響する。G-アクチンには溝の側をマイナス端 (Pointed end)、反対側をプラス端 (Barbed end) とする構造的な方向性があり、配向をそろえて重合することで直径約 5-9 nm の 2 重らせん状のフィラメント

(Filamentous actin, F-actin) を形成する。G-アクチンの配向に由来してフィラメントにも方向性がある。ATP と結合した G-アクチンはフィラメントのプラス端側への結合性が高く、重合によってフィラメントを伸長させる。ATP はフィラメント中ですぐに脱

リン酸化されて ADP となり、ADP と結合した G-アクチンがフィラメントのマイナス端側で解離することでフィラメントは短縮する。G-アクチンのオリゴマーは不安定であるが、3 量体以上の断片が形成されれば重合は速やかに進行し、安定なフィラメントが形成される。細胞内では 100 種を超えるタンパク質がアクチンの重合や脱重合の制御、キャッピング、架橋、束化、切断などに関わることで、フィロポディア（糸状仮足）やラメリポディア（葉状仮足）、エンドサイティックカップ、ストレスファイバー、アクチンコーテックス（Cortical actin）などの特徴的な高次構造を形成する。これらの構造がいつどこで形成され、また解体されるかによって細胞膜が変形し、細胞の形態制御とそれに媒介された機能が果たされる。そのように高度な構造が細胞内の分子の相互作用によって自己組織的に形成されるためには、自発的な反応はある程度抑えられ、よく制御される必要がある。アクチンは細胞内で最も存在量が多く、全タンパク質重量の 5% 以上を占めている。細胞内のアクチン濃度は十分に高いため、いたるところで自発的な重合反応が進んでしまいそうに思われるが、細胞質中の G-アクチンはチモシン $\beta 4$ やプロフィリンと結合して存在し、G-アクチン間の結合は常に抑制された状態にある。したがって F-アクチンの重合反応を開始するためにはフォルミンや Arp2/3 複合体などの核形成因子が必要とされる。

・フォルミン³⁻⁵

フォルミン（Formin）はアクチンフィラメントのプラス端における重合反応を促進する機能を持つ。哺乳類の mDia（mammalian Diaphanous-related formins）と呼ばれるサブグループや細胞性粘菌のほとんどのフォルミンは Rho GTPases によって活性制御を受ける。mDia のドメイン構造は N 末側から GBD-FH3、FH1、FH2、DAD の順の並びが標準型とされる。FH2 ドメインは F-アクチンのプラス端に結合し、FH1 ドメインには G-アクチン-プロフィリン複合体が結合する。N 末側の FH3 と C 末の DAD

（Diaphanous Autoinhibition Domain）の結合によってフォルミンは自己抑制的な構造をとり、GBD に Rho GTPase が結合することによって活性化状態となる。

細胞性粘菌にはフォルミンファミリータンパク質が 10 種類存在し、配列の比較研究や⁵、いくつかのアイソフォームについては個別の詳しい解析がなされている。上記の mDia 型の構造は ForC、ForI を除く 8 つでは保たれているが、詳細な構造には違いがある。このことが示唆するように、細胞内でのフォルミンの機能はアイソフォームによって違いがあり、Faix らを中心としてこれまでにそのいくつかが特徴づけられている。ForH（dDia2）は Rac1A と相互作用し、フィロポディアの形成に関わる⁶。ForA、ForE（or dDia3）、ForH（or dDia2）は RacE によって活性制御され、アクチンコーテッ

クスの形成に大きく関わる^{7,8}。ForG は RasB、RasG と直接相互作用してファゴサイティックカップやマクロピノサイティックカップの形成、および細胞の増殖に関わる⁹。また、ForC は唯一 FH1 ドメインを持たないものの F-アクチンとの共局在を示し、forC の遺伝子破壊株では移動体や子実体形成に強い異常が生じることが知られている¹⁰。構造解析により、ForC は GBD-FH3 ドメインを介して細胞膜のイノシトールリン脂質に結合することが示唆されている¹¹。

・ Arp2/3 複合体¹²⁻¹⁴

Arp2/3 複合体はプロフィリンと相互作用する分子としてアcantamoeba から同定され¹⁵、現在ではフォルミンに次いで広く真核生物に保存することが知られる核形成因子である。Arp2、Arp3 (Actin related protein)、ArpC1-5 からなる C 字の構造をしたヘテロ 7 量体であり¹⁶、アクチンフィラメントの側面に結合する。WASP ファミリータンパク質によって活性化され、Arp2 と Arp3 が重合核となることで、1 次フィラメントに対して約 70°の角度方向へ 2 次フィラメントを成長させ、樹状のアクチンネットワークを形成するのに本質的な役割を果たす。

・ WASP ファミリータンパク質¹⁷⁻¹⁹

WASP ファミリーに属するタンパク質の C 末には Arp2/3 複合体の活性化に関わる特徴的な配列がある。この配列は 3 つの領域に分けられ、各領域を表す頭文字をとって VCA ドメインと呼ばれる。V 領域 (Verprolin、WH2 ドメインとも呼ばれる) には G-アクチンが結合し、C 領域 (Connecting, Central or Coil) には G-アクチンと Arp2/3 が結合する、A 領域 (Acidic) には酸性残基が多く存在し、Arp2/3 の結合と活性化に関わる。WASP ファミリータンパク質は VCA ドメインの存在によって定義され、WASP、SCAR/WAVE 複合体、WASH 複合体、WHAMM/JMY などが知られている。54 種の真核生物を対象にしたゲノムの比較解析から、このうち WASH 複合体が最も広く保存していることや、WHAMM/JMY は無脊椎動物以降に出現したことが示唆されている¹⁸。現在までに構造と機能がよく解析されているのは WASP と SCAR/WAVE 複合体である。

WASP は、ウイスコット-アルドリッチ症候群 (Wiskott-Aldrich Syndrome) という免疫不全症の原因遺伝子として 1994 年に同定された最初の WASP ファミリータンパク質である²⁰。Arp2/3 複合体の活性化の他に、クラスリン媒介性のエンドサイトーシスや細胞内小胞輸送にも関わる。WASP の構造は真核生物種間でよく保存しており、N 末側から、WH1 ドメイン、塩基領域、CRIB ドメイン、プロリン-リッチ領域、VCA

ドメインである。塩基領域によって細胞膜中の PI(4,5)P2 などのイノシトールリン脂質と結合する²¹。CRIB ドメインと C 末の α -ヘリックスが結合して自己抑制的な構造をとり、低分子量 GTPase が CRIB ドメインへ結合することで活性化される。哺乳類動物では Cdc42^{22,23}、細胞性粘菌では RacC がこれを担う²⁴。哺乳類動物には WASP と N-WASP の 2 種類が存在し、C 末の WH2 ドメイン (V 領域) が WASP では 1 つ、N-WASP では 2 つ連続して存在する。N-WASP は神経細胞から同定されたが²⁵、現在ではより広範に発現していることが知られている。一方、WASP は免疫系の細胞など造血幹細胞の系列にしか発現しない¹⁷。

SCAR/WAVE 複合体は、WASP 関連タンパク質として 1998 年に細胞性粘菌とヒトで発見された^{26,27}。細胞性粘菌では、cAMP の受容体 cAR の遺伝子破壊株の表現型に関わる遺伝子として (SCAR; suppressor of cAR)、ヒトでは WASP および N-WASP の WH2 ドメインとの相同性検索によって (WAVE; WASP family Verprolin-homologous protein)、探索された。WASP とは異なって CRIB ドメインを持たないため、それ自身では自己抑制的な構造をとらないが、細胞内では複合体を形成することで活性が制御される。SCAR/WAVE 複合体はヘテロ 5 量体であり、SCAR/WAVE、Abi、HSPC300、Nap1、PIR121 からなる (サブユニットの呼称は生物種によってかなり異なる)。ほとんどの生物種において 5 つのサブユニットはすべてゲノム上に保存されているため、複合体の形成がその機能において本質的に重要と考えられる¹⁸。WAVE1 複合体の構造解析から、SCAR/WAVE、Abi、HSPC300 は 4 本の α -ヘリックスが束ねられるようにして三量体を形成している一方で、Nap1 と PIR121 はほぼ対称的な構造をしており、SCAR/WAVE の C 末端領域を内包するような配置になっていることが明らかにされた^{28,29}。Nap1 と PIR121 の表面に分布する正電荷によってイノシトールリン脂質と静電的に相互作用し、細胞膜上での複合体の配向が決まること、および PIR121 に Rac-GTP が結合することで構造変化が生じ、SCAR/WAVE の VCA ドメインが露出して Arp2/3 を活性化することが示唆された。

・低分子量 GTPase³⁰

低分子量 GTPase は分子量 20 kDa 程度のタンパク質で、GTP と結合して加水分解する。GTP または GDP との結合に応じて 2 状態をとり、状態間の遷移はリン酸化/脱リン酸化の酵素である GEF/GAP によって調節される。GTP/GDP との結合状態に応じて細胞内の他の分子と相互作用するため、シグナル伝達においてスイッチのような役割を果たす。C 末端のテトラペプチド CAAX (C: Cysteine, A: Aliphatic amino acids, X: any amino acid) にプレニル化、ミリストイル化、パルミトイル化といった翻訳後修飾が施

されて疎水基が付与されることで細胞膜上へ結合する。また、イノシトールリン脂質との相互作用も細胞膜上における局在性に関係する³¹。

Rho ファミリータンパク質は細胞骨格系を制御し、細胞の極性形成や基質接着、細胞質分裂などに関わる。代表的な分子には Rac1、Cdc42、RhoA がある。それぞれ SCAR/WAVE 複合体や WASP、フォルミンの活性化を担い、ラメリポディア、フィロポディア、ストレスファイバー等の形成に関わる³²。Ras ファミリータンパク質は G タンパク質共役受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR) からのシグナルを下流に伝え、細胞の増殖や走化性などに関わる。Rap は Ras ファミリーに属し、細胞の極性や走化性、発生、細胞質分裂、基質接着、浸透圧変化への応答などに関わると考えられている。

・イノシトールリン脂質³³⁻³⁵

ホスファチジルイノシトール (Phosphatidylinositol, PtdIns, PI) は、グリセロール、脂肪酸、イノシトール環からなるリン脂質である。細胞膜を構成する脂質としては少量であり、比較的多く存在する PI(4,5)P2 でも細胞膜中の全脂質の約 1% しか占めない。PI3K などの酵素によってイノシトール環の 3, 4, 5 位のヒドロキシ基が任意のリン酸化を受けることで 7 通りの状態をとりうる。リン酸化状態によって多様なシグナル分子との相互作用を示し、アクチン骨格系を制御するシグナル伝達に関わる。タンパク質との相互作用はリジンやアルギニンを含有する塩基性残基との静電的なものと考えられ、リン酸化状態による結合特異性はタンパク質の立体構造によるものと考えられる。細胞骨格系におけるイノシトールリン脂質の役割は、これまでに細胞の遊走や走化性、エンドサイトーシスなどに関連して研究されている。たとえば、走化性を示す細胞性粘菌や好中球細胞では、G タンパク質共役受容体を介して PI3K が細胞膜上へ移行し、細胞の前側に PI(3,4,5)P3、後ろ側に PI(4,5)P2 が分布した状態となることが知られる³⁶⁻³⁸。

・BAR タンパク質^{39,40}

BAR (Bin-amphiphysin-Rvs167) ドメインは多数のタンパク質に保存された脂質結合性ドメインであり、*in vitro* で脂質膜の陥入や管状構造を形成する。BAR ドメインの α -ヘリックスはバナナ型の立体構造をしており⁴¹、細胞膜の曲率に依存した局在や、エンドソーム形成のような膜陥入変形や仮足の形成に関わると考えられている。BAR ドメインを有するタンパク質はヒトでは 74 種類が知られており、(N-) BAR ファミリー、F-BAR ファミリー、I-BAR ファミリーに分けられる。バナナ型の曲率には多様性

があり、数十～数百 nm の曲率半径の膜構造に関連すると考えられている。また、amphiphysin や IRSp53 のように SH3 ドメインを持つタンパク質も存在し、N-WASP や SCAR/WAVE 複合体と相互作用してアクチン重合を媒介し、小胞形成やフィロポディア、ラメリポディアの形成に関わることが示唆されている。

- ・ ミオシン^{42,43}

ミオシン II は、ミオシン重鎖 (myosin heavy chain; MHC)、ミオシン必須軽鎖 (essential light chain; ELC)、ミオシン調節軽鎖 (regulatory light chain; RLC) のそれぞれ 2 つずつからなる複合体である。10-20 個のミオシン II はフィラメントを形成し、アクチンコーテックスを架橋する。ミオシン重鎖の N 末にはモータードメインがあり、ATP の加水分解によって構造変化を起こすことで F-アクチンを引き寄せるモータータンパク質として機能する。ミオシン I は重鎖が 1 つの構造であり、細胞性粘菌には 7 種類存在するが、それぞれ細胞内での局在位置が異なることが知られている。

アクチンフィラメントの高次構造と細胞内配置

以上に説明した代表的な分子に加えて多数の分子が協調的に働くことによって、細胞内には多様なアクチン構造が各所で形成、維持、解体され、細胞の形態変化を引き起こす。フィロポディア (糸状仮足) は F-アクチンが平行に束ねられて形成される細長い突起構造である。ラメリポディア (葉状仮足) は Arp2/3 が媒介する樹状の F-アクチンネットワークによって形成される薄いシート状の膜構造であり、基質上を這うような細胞の移動に関わる。アクチンコーテックス (Cortical actin) は、細胞膜を裏打ちするように形成される網目状の F-アクチンネットワークである。フィラミンやミオシン等によって架橋され、細胞形態の維持や収縮力の発生に関わる。細胞底面の接着斑を足場として細胞全長くらいにまで伸びるアクトミオシンのケーブル構造はストレスファイバーと呼ばれる。上皮組織中では細胞間接着領域にアクトミオシンが形成され、たがいに強い牽引力を発生して組織構造を保っている。また、細胞外から栄養や物体を取り込むエンドサイトーシスの過程では細胞膜の陥入あるいは陥出の変形が生じる。これにはクラスリンや BAR タンパク質等に関わる数十 nm スケールの膜構造から、マクロピノソームやファゴソームのような数 μm スケールの膜構造がある。以上のようなアクチン高次構造の形成と解体によって細胞の形態変化が引き起こされる。アクチン構造の多様性が膜変形を伴う細胞の行動における多様性の基礎にあり、いくつかの形態変化のパターンから状況に応じて選択され、継続あるいは反復されることで、細胞の行動や機能が果たされる。また、細胞内ではいくつかの異なるアクチン構

造がたがいに分離された状態で構築される。これに関して、アクチン波と細胞の前後極性の形成の場合について述べる。

(1) アクチン波

細胞性粘菌のアクチン波は、細胞外からの刺激等を必要とせず、実験室の比較的均一とみなせる状況において、細胞内で自発的に形成される構造である。細胞底面の膜上のある点から形成されて直径数 μm まで広がり、速さ $\sim 5 \mu\text{m}/\text{min}$ で細胞膜上を空間的に伝播する。細胞底面に生じることから顕微鏡観察がしやすく、また構造が比較的大きく動的であるため、アクチン骨格系の自発的な構造形成や分子間の相互作用関係に関する研究対象とされてきた⁴³⁻⁴⁷。アクチン波のパターン形成は次のように理解されている⁴⁶。細胞膜上の PI(4,5)P₂ の 3 位が PI3K によってリン酸化を受けることで PI(3,4,5)P₃ が生成される。下流の F-アクチンからのポジティブフィードバックによって PI(3,4,5)P₃ は自己触媒的に増幅され、細胞膜上を拡散することで領域を拡大する。PTEN による脱リン酸化や分解による PI(3,4,5)P₃ から PI(4,5)P₂ への逆反応が遅れて起きることで PI(3,4,5)P₃ に共局在する F-アクチン構造は解体される。このような興奮のないし一過的な PI(3,4,5)P₃ の生成反応によって細胞膜上に有限サイズのパッチ状/スポット状の領域が形成され、さらに他の分子との相互作用によってアクチンの構造を形成する。PI(3,4,5)P₃ 局在領域には Ras-GTP や Rac-GTP が共局在し、Arp2/3 やフォルミンによる樹状の F アクチン構造が形成される。外部の PI(4,5)P₂ 局在領域には Cortaxillin やミオシン II が関わるアクチンコーテックス構造が形成される⁴⁸⁻⁵⁰。PI(3,4,5)P₃ 領域を縁取るように SCAR/WAVE 複合体と Arp2/3 がリング状に局在し、特に高密度の F-アクチン構造が形成される⁵¹。最近のクライオ電子線トモグラフィーを使った解析から、アクチンフィラメントの配向はパッチ状領域の内外では細胞膜に対して主に平行向きであり、境界領域では Arp2/3 を核とする 2 次フィラメントが細胞膜へむかう方向に伸長していることが明らかにされている⁵²。

(2) 細胞の前後極性の形成

F-アクチンの樹状構造は膜の伸展を担い、コーテックス構造はミオシンモータータンパク質との相互作用などによって膜の収縮に関わるものである。それぞれ移動する細胞の前側、後ろ側に形成される。細胞外の走化性誘因物質などの外場が与えられたときには、受容体を介したシグナル伝達によって細胞の前端および後端の構造形成が誘導される。しかし、そうした方向性のある外部入力に明確に存在しないような場合にも細胞は極性を形成、維持し、這い回り運動などをする⁵³。

細胞の膜伸展領域は仮足 (Pseudopod) と呼ばれ、細胞種によって仮足のサイズや持続時間はある程度決まった値になり、細胞の形を特徴づける一つの要因となる。間葉系の細胞や、神経細胞の成長円錐では1つの大きなラメリポディアが安定に形成される。非腫瘍性の単独の上皮細胞では全周方向に堅固なアクトミオシンが形成されており、円形に伸展して移動しないが、ミオシン II の阻害剤である Blebbistatin で処理すると間葉系細胞のようにラメリポディアが形成されて移動するようになる⁵⁴。細胞性粘菌のようなアメーバ細胞は一過的に伸展する仮足を複数形成し、仮足の分岐と選択によって移動する。

一方で、細胞の後端構造の重要性も強調されている。繊維芽細胞をアクチン重合阻害剤 Latrunculin A で処理して内在のアクチン構造を壊した状態としてから、阻害剤を除去してアクチン骨格系の再編成過程を追うと、最初に全周方向へラメリポディアが形成され、その後、片側でラメリポディアが消失して後端様構造が形成されるとともに、細胞膜の収縮が起きて細胞の重心移動が生じることが観察されている⁵⁵。魚の表皮細胞であるケラトサイトでも、円形に伸展した状態から並進を開始する際には細胞片側での収縮が伸展に先んじて起こる。さらに、細胞の片側に対してミオシン収縮の増強や接着阻害の処理を施すことによって対称性の破れを誘導できることが示されている^{56,57}。細胞性粘菌に走化性誘因物質 cAMP を提示したときには膜の伸展が誘起されるが、走化性忌避物質 8CPT-cAMP に対してはミオシン II 局在を伴う収縮が先に起きる⁵⁸。

以上のような観察に基づいて、細胞骨格系を制御するシグナル伝達系のうち少数の因子に注目して、極性形成の原理を抽出しようという試みがなされている (Fig 1-1)。細胞性粘菌や好中球細胞のアクチン波の伝播に伴って細胞端では膜が伸展し、細胞の変形や重心移動が引き起こされる^{46,59}。これには PI3K と F-アクチン間のポジティブフィードバックによる興奮的ないし一過的なアクチン重合に基づいた前端構造の形成が提案されている。低分子量 GTPase の Rac1 や Cdc42 はアクチン重合による伸展を促進し、RhoA はアクトミオシンによる収縮を促す。Rac1 と RhoA の間に示唆されている相互抑制関係をもとにした細胞前後での両者の空間的な分離機構が考えられている⁶⁰。分子クラッチモデル (Molecular clutch model) に基づいたアクチン後方流 (Actin retrograde flow) と細胞極性の関係はこの数年で特に注目を集めている^{54,57,61-64}。アクチン後方流の考えは⁶⁵、1970年代に細胞膜上の粒子が細胞の移動に伴って細胞の中心方向へむかって流れることの観察に端を発する。その後、細胞前端の F-アクチンネットワークによって膜が伸展することが理解されるとともに、後方流と細胞の移動速度の逆相関関係が示された。これらの観察から分子クラッチモデルが提唱された⁶⁶。F-ア

クチンと接着斑の相互作用が強いときにはF-アクチンの重合によって膜の伸展が生じるが、接着斑との相互作用が弱ければ膜はあまり伸展せず、F-アクチンは押し戻されるようにして後方へ流れてしまうというのが、その主な考えである。基質に接着した細胞の前端部は、アクチンの構造に基づいてラメリポディア領域とラメラ領域に分けられる (Fig 1-1b)。ラメリポディアの前端部では Arp2/3 依存性の速いアクチン重合が起こり、フィラメントの伸長によって膜が前方へ伸展する。F-アクチンのプラス端は細胞膜側に向けられているため、細胞膜のゆらぎによって膜とF-アクチンの間にすきまが生じたときにG-アクチンが先端に重合することで膜は前方へ押し出されると考えられる (Brownian ratchet mechanism)。F-アクチンは接着斑を介して基質に繋ぎとめられているが、膜張力が高いこと等によって細胞膜の変位に制限がある状態でF-アクチンの重合速度が高く保たれるときには、F-アクチンは約 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}/\text{min}$ の速度で後方へ流れていき、大部分はラメラ領域との境界で脱重合される。ラメラ領域ではアクチンコーテックス構造が形成され、ミオシン II との相互作用によって $0.25 \sim 0.5 \mu\text{m}/\text{min}$ の速度で後方流が生じている。Hela 細胞⁶¹、上皮細胞⁵⁴、造血幹細胞⁶²、T 細胞⁶³ など多くの動物細胞でアクチンコーテックスの後方流が移動速度と逆相関関係にあることが示されている。アクチンコーテックスの後方流の速さは接着斑とF-アクチンの相互作用の強さに依存し、細胞の基質接着が弱い場合や収縮力が強い場合にはアクチンおよびミオシンの後方流が非常に強くなる。この流れによってミオシンなどの後端因子が後方へ輸送されることで極性を強化すると考えられている^{61,62,64}。また好中球細胞では細胞底面のミオシンが基質に対して静止しているが、細胞の移動に伴って後方へ集積することが観察されている。これによって後端構造が強化され、方向転換頻度が下がること示唆されている⁶⁷。

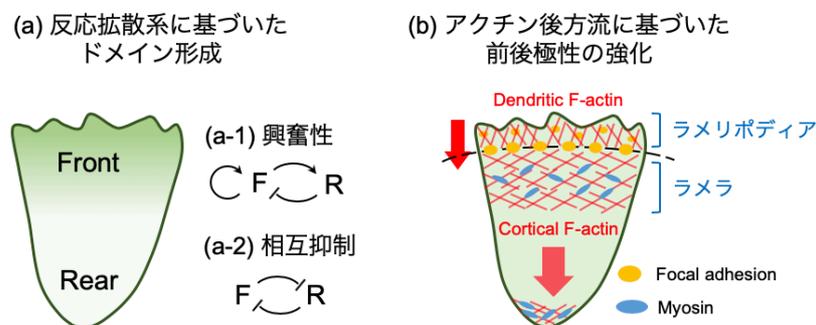


Fig 1-1: 代表的な細胞極性形成のモデル

(a) 前後の構造を特徴づける 2 状態間の相互作用によって空間構造がつけられる。(b) F-アクチン重合やミオシンの収縮力がアクチンの後方流を発生させ、後端形成因子を輸送すると考えられている。

細胞外環境への応答性

細胞外のさまざまな環境要因は受容体として機能する分子を介して細胞骨格系のシステムに変調を及ぼす。環境への応答性は細胞の生存のための行動決定において重要であり、多細胞生物においては個々の細胞の行動を制御する手段となる。以下では、液性因子、接着因子、力学因子に分けて概説する。

(1) 液性因子

細胞が液中の特定の分子を検出し、その分子の空間濃度場に応じた方向性のある移動を示す性質を走化性 (chemotaxis) という。たとえば、細胞性粘菌は他の細胞が分泌した cAMP に対する走化性を示して集合する。免疫細胞や捕食者はバクテリアの分泌する葉酸や fMLP ペプチド (formyl-Met-Leu-Phe) を感知して近づいていく。このような走化性誘因物質は G タンパク質共役受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR) を介して Ras シグナル経路を活性化し、アクチン骨格系に干渉する⁶⁸。細胞性粘菌などの真核細胞は、誘因物質の空間的な濃度勾配を検出して前後極性を形成し、これに対する走性を示す。cAMP の空間濃度勾配下に置かれた細胞性粘菌が cAMP 源へ向かって直進せずに仮足の分岐と選択によって近寄っていくことは、cAMP の絶対濃度に線形に応答するのではなく、細胞内在性の極性形成機構がはたらくことをよく示している^{69,70}。一方、走化性忌避物質は後端形成の促進や前端形成の阻害によって細胞の極性形成を誘導すると考えられている^{58,71,72}。また、溶液中の成長因子やアミノ酸などの栄養成分はエンドサイティックカップの形成を活性化し、細胞の成長や増殖の制御に関わる⁷³。

(2) 接着因子

コラーゲンやフィブロネクチン、ラミニンなどの繊維状タンパク質や、細胞組織は細胞外マトリックス (Extracellular matrix; ECM) として細胞の活動の足場となる。動物細胞では、インテグリン (Integrin) が細胞-基質間接着を媒介する分子として中心的な役割を果たす^{65,74}。インテグリンは α 鎖と β 鎖からなる細胞膜貫通型のヘテロ 2 量体である。最初はフィブロネクチンの受容体として発見され、フィブロネクチン内の 3 つのアミノ酸配列 Arg-Gly-Asp (RGD) がその結合に十分であることが示されている。インテグリンの細胞外ドメインがリガンドと結合すると構造変化が起こり、細胞内で α -actinin やタリンと結合する。これを足場として非常に多くの分子が関わる構造である接着斑 (Focal adhesion) が細胞底面に形成される。接着斑は F-アクチンと結合して基質に繋ぎとめることで、ストレスファイバーなどが発生するを力を媒介する。

また、接着斑の形成や成熟自体にも F-アクチンの発生する力が関わると考えられている。一方、細胞内の Rap1 などのシグナルによってもインテグリンは構造変化を起こし、ECM との結合が制御される。

生体内の白血球やリンパ球が血管やリンパ管内を循環する際には、これらの細胞組織の表面に提示された分子によって運動制御を受ける。白血球/リンパ球の血管内壁への接着にはセレクトイン (Selectin) が関わる⁷⁵。セレクトインは C 型レクチンに分類される (レクチン: 糖結合タンパク質)。体内で炎症が発生した際、炎症部から分泌されたサイトカイン刺激誘導的に血管内皮細胞表面に E-セレクトインが発現する。E-セレクトインは白血球/リンパ球の表面に存在する L-セレクトインや PSGL-1 に含まれる糖鎖シアリルルイス X, a (sLe^x, sLe^a) と相互作用し⁷⁶⁻⁷⁸、血液中を流れている白血球/リンパ球を血管内腔に捕捉する。sLe^x はしばしばがん細胞表面に発現しており、がんの血行性転移に関わると考えられている。サイトカインの刺激を受けた血管内皮細胞表面には VCAM-1 や ICAM-1 といったリガンドも発現し、インテグリンがこれに結合する。白血球/リンパ球は血管内皮細胞の間隙をすり抜けて組織中へと浸潤し、炎症部に向かって遊走する。リンパ組織中では、間質細胞や樹状細胞の表面にインテグリンのリガンドとなる ICAM や、ケモカイン CCL19/21 が提示されている。組織特異的に発現する PNA^d や MAdCAM-1 のようなアドレスシン (Addressin) は L-セレクトインと相互作用する。これらの接着分子や不動化されたケモカインによって白血球/リンパ球の運動性の制御および移動経路の規定がなされることが考えられている。

同種細胞間の接着によっても細胞骨格系の再編成が引き起こされ、組織形成に寄与する。上皮組織では隣接する細胞間にカドヘリン (Cadherin) 分子の同親性結合を基礎としたアドヘレンスジャンクションが形成される。カドヘリンの細胞質側ドメインにはカテニンやビンキュリンが結合し、アクチン骨格系が強い収縮力を発生する足場となる。また、カドヘリンの 1 種であるプロトカドヘリン-10 (PCDH10) は細胞間接着領域の細胞質側で SCAR/WAVE 複合体と相互作用する^{79,80}。PCDH10 ノックアウトマウスの脳の神経細胞では軸索成長に異常が生じることが報告されている⁸¹。細胞性粘菌の追従運動においても、細胞前端部の細胞間接着領域に SCAR/WAVE 複合体の持続的な局在が形成され、F-アクチンの樹状構造を形成して膜伸展力を発生する⁸²。

貪食 (Phagocytosis) における膜変形は対象との接触をきっかけにして開始される。生体内では B 細胞が分泌した免疫グロブリン (Immunoglobulin; Ig) が細菌等の表面に付着し、マクロファージや白血球の Fc 受容体と結合して細胞の接着を促進するとともに、チロシンキナーゼ Syk 経路を活性化する⁸³。近年では、G タンパク質共役受容体 (GPCR) も貪食に関わることが示唆されている⁸⁴⁻⁸⁶。

(3) 力学因子

基質の硬さは細胞の運動性や分化^{87,88}等にも影響を与える。アクリルアミドのゲルを基質として使用した実験で、繊維芽細胞が基質のより硬い方向へ移動することや⁸⁹、好中球細胞や魚のケラトサイトが硬い基質上でよく伸展することが観察されている^{90,91}。多くの細胞は液体の流れに対する走性を示すことが知られる。増殖期や集合期の細胞性粘菌に緩衝液の流れによって 5-60 dyn/cm² のせん断応力をかけたときには、cAMP への走化性時に起きるのと似た時定数の Ras や PH-CRAC の一過的な膜局在が生じ、その後、10 dyn/cm² 以下では流れに逆らう方向へ、25 dyn/cm² 以上では流れと同方向へ移動することが観察されている⁹²。せん断応力への応答は細胞内への Ca²⁺ の流入を必要とすることから、イオンチャネルが関わりとされている。血管内皮細胞はせん断応力の変化を感知して一酸化窒素やエンドセリンを分泌し、平滑筋細胞を制御して血管の拡張や収縮を調節する。また、これに伴う基質の伸展と収縮は、血管走行方向への細胞の極性形成に寄与する。血管内皮細胞をシリコンの基質上で培養し、血管の伸展収縮を模した一軸方向への基質の伸縮を作用させると、細胞内でのアクチンストレスファイバーの解体と再構築に伴い、数十分後には細胞は基質の伸縮と垂直な軸方向へ伸長した紡錘型となる^{93,94}。アクチンフィラメントに数 pN の引張力が働いている状態ではコフィリンの結合率が低いが、引張を緩めるとフィラメントのねじれ角が変化することによってコフィリンが結合しフィラメントが切断されることが光ピンセットを使った実験や数値シミュレーションから示唆されている^{2,95}。このことから、アクチンフィラメントは細胞内で負の張力のセンサーとして機能すると考えられている⁹⁶。ストレスファイバーはまた、基質表面の曲率の感知にも関わりとすることが示唆されている⁹⁷。ガラス円筒上で培養された血管内皮細胞では、数十 μm～数百 μm の曲率半径に依存して細胞の腹側と背側に形成されるストレスファイバーの長さや配向が変化する。これらはストレスファイバーの曲げ剛性と収縮力のバランスで決まると考えられている。

本研究で扱う生物材料

(1) 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum*⁹⁸

細胞性粘菌は土壤中に生息している。栄養が豊富な状況では単独の細胞としてアメーバ運動し、細菌や液中の栄養分を取り込んで増殖するが、周囲の栄養源が乏しくなると、飢餓状態となると、アデニル酸シクラーゼ ACA が発現し、環状アデノシンーリン酸 cAMP の生成と分泌をはじめ。細胞表面には cAMP の受容体である cAR1 もまた発現しており、他の細胞から分泌された cAMP を受容して走化性を示す。cAMP への走化性と細胞間接着による追従運動によって細胞は集合する（ストリーミング）。集合期には cAMP の受容によって細胞の運動が活性化し、また徐々に前後極性の明確な縦長の形態へと変化していく。集合した細胞塊はマウンドと呼ばれ、この時期にその後胞子になる細胞（予定胞子細胞）と柄になる細胞（予定柄細胞）の2種類に分化するとともに、両者は集合塊中で空間的に分離される。予定柄細胞が集まったマウンドの中心が突出して移動体またはスラッグと呼ばれる集団運動形態へと移行し、非常に移動性の高い状態となって場所を移す。移動が完了すると先端部分が内部へ陥入して柄となり、胞子細胞を上方へ持ち上げる（子実体）。胞子は風で飛ばされるなどして栄養豊富な場所に行き着くと発芽して内部からアメーバ細胞が這い出し、再び単独の細胞として餌を探し求める（Fig 1-2）⁹⁸。以上のような生活環をもつ細胞性粘菌の一種 *Dictyostelium discoideum*（和名キイロタマホコリカビ）はモデル生物としてアメーバ運動や走化性、集団運動、分化等の研究に用いられてきた。単細胞時の大きさが 20 μm 程度で、1 分間に 1 細胞長程度移動する。真核細胞としては非常に動きの速い部類の細胞である。

(2) ヒト好中球様細胞⁹⁹

HL60 細胞（Human promyelocytic leukemia cell）は、急性前骨髄性白血病の 36 歳の女性に由来する好中球性の前骨髄球である。浮遊細胞であり、栄養培地中で継続的に増殖する。ジメチルスルホキシド（DMSO）やレチノイン酸、ビタミン D3 や TPA 等の投与によって好中球性の顆粒球やマクロファージへ分化させることができ、血液細胞の分化や細胞運動の研究に使用されている。本研究では、好中球様に分化させて運動における基質接着性の解析に使用した。

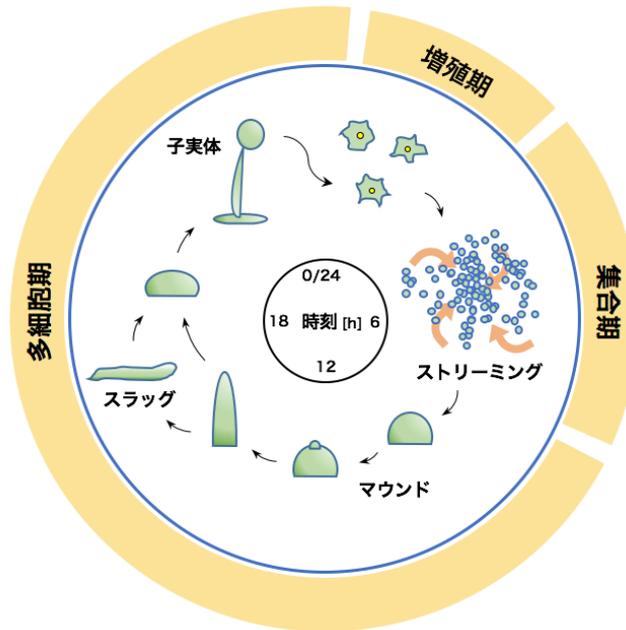


Fig 1-2: 細胞性粘菌の生活環

細胞性粘菌は栄養豊富な状況では単独のアメーバ細胞として存在するが、飢餓状態になると集合して多細胞体となり、最終的に子実体を形成する。胞子が栄養豊富な場所へ行き着くと発芽して再び単細胞状態となる。

第 1 部 細胞性粘菌のアクチン波の地形依存性

1. 背景

細胞の移動や貪食のような行動は、基質表面に沿った膜の伸展によって媒介されるため、基質の硬さや地形といった物理的な性質から大きな影響を受ける¹⁰⁰⁻¹⁰⁵。基質表面に存在する数十 nm～数 μm スケールの溝や、山型のライン（以下、リッジ Ridge）の構造は、これに沿った方向への細胞の伸展や移動を促すことが古くから知られている¹⁰⁶⁻¹⁰⁹。この現象はコンタクトガイダンスと呼ばれ、生体内では細胞外マトリックスを構成するコラーゲン繊維等の配向が細胞の移動方向の決定に寄与し、神経ネットワークの構築や組織の修復、免疫応答、癌の浸潤などに関わると考えられている^{110,111}。近年の微細加工技術の発達により、高精度かつ再現性の高い微細構造が付与された基質を利用できるようになり、また構築できる形状の自由度が増してきたことも加わって、地形感知の機構に関する理解が進んできている^{112,113}。細胞の地形感知のメカニズムに関する代表的なモデルは、細胞底面に形成される接着斑の分布や成長方向が基質上のリッジや溝によって制約を受けることにより、アクチンストレスファイバーの配向がそろい、異方的な収縮力が発生するようになるというものである¹⁰³。しかし、好中球や T 細胞、細胞性粘菌といった移動性の高い細胞は、接着斑をそれほど発達させずストレスファイバーを形成しないが、コンタクトガイダンスを示すことが知られている^{108,114115-117}。これらの細胞においては、F-アクチンの重合反応が基質のリッジや溝に沿った方向へバイアスされることで細胞の膜伸展の方向や前後極性が方向づけられると考えられているが、基質表面の地形と骨格系の反応を結びつける分子的な基盤に関して現状ではまったく分かっていない。

免疫細胞や細胞性粘菌のような移動性の高い細胞は貪食（Phagocytosis）の機能も果たす。貪食は、バクテリアのような数 μm サイズの粒子を細胞膜の変形によって細胞内へと取り込む過程である。粒子との接触面から膜の変形が生じ、F-アクチンの重合によってカップ状の膜構造（ファゴサイティックカップ; Phagocytic cup）が形成される。カップの先端は粒子表面に沿って伸展していき、粒子を完全に包み込んだところで膜が閉じて貪食胞（Phagosome）が形成され、粒子は細胞内に取り込まれて分解される⁸³。貪食効率は粒子のサイズに依存し^{73,118}、マクロファージにおいては、粒子の直径が 2-3 μm 以上の範囲では粒子が大きいくほど貪食効率は低下する¹¹⁸。マクロファージの RAW264.7 細胞では、直径が 3 μm よりも大きな粒子の貪食は PI3K の阻害によって強く抑制される¹¹⁹。また、フィラメント状の桿菌に対する貪食過程では、フィラメン

トの末端部分から伸長方向に沿って細長いカップ構造が形成されるが¹²⁰、直径 1 μm 未満である末端部分におけるカップ構造の形成は PI3K に依存しない過程である¹²⁰。したがって細胞の貪食能における粒子サイズ依存性は単にカップを構成する分子の量的制約だけによるものではなく、PI3K の膜曲率への依存性が関係することが示唆されている¹²⁰。粒子の形状もまた、貪食の成否を分けることがマクロファージを用いた実験で報告されている¹⁰⁵。さまざまな形状のビーズを用いた解析から、細胞と接触したビーズ表面の開き角がカップ形成に重要であることが示されている。カップの発達段階においても、出芽酵母のくびれ部分でファゴサイティックカップの伸展が停止することが細胞性粘菌で観察されている¹⁰⁴。これらの観察は、貪食過程においても粒子表面の形状が膜の伸展動態を左右することを示している。飲作用 (Macropinocytosis) もまた数 μm サイズのカップ状の膜構造 (マクロピノサイティックカップ; Macropinocytic cup) の形成を伴う過程であり、液体中の栄養分や抗原の取り込みを担う^{73,83}。このようなエンドサイトーシスに関わるカップ状の膜形態 (以下、フィーディングカップ; Feeding cup) は、分子的には相似な構造をしている (Fig 2-1)。フィーディングカップが形成される初期段階では、細胞膜上のイノシトールリン脂質 PI(4,5)P₂ の領域に PI(3,4,5)P₃ の円形のドメイン (パッチ状局在) が形成される¹²²。このパッチ状局在は Ras-GTP と共局在し、その辺縁部に SCAR/WAVE 複合体を伴う⁵¹。また、Myosin IB は辺縁部において細胞膜と F-アクチンを繋ぎとめる役割を果たす^{43,123}。細胞膜上の F-アクチンの層の細胞質側にはコロニン (Coronin) が存在し、F-アクチンの脱重合を行う¹²³⁻¹²⁵。RasGAP の NF1 や IqgC はカップのサイズ制御に関与し、これらの欠損によって貪食および飲作用が亢進される^{73,126,127}。反対に、PI(4,5)P₂ から PI(3,4,5)P₃ を産生する PI3K の阻害によってこれらは強く抑制される。

フィーディングカップと類似の分子構造をもつ F-アクチンのパッチ状局在は細胞の基質面側にも見出され、アクチン波と呼ばれる。アクチン波は前端部で F-アクチンの重合反応、後端部で脱重合反応が起きることで細胞膜上を空間的に伝播する。アクチン波を構成する分子の空間配置は、フィーディングカップの分子構造と知られている限りすべて一致している (Fig 2-1)^{43,45,50,51,128,129}。また、Ras や PI3K の活性制御に干渉した際にこれらの生成頻度や持続性は同様の傾向で変化することから、同一の Ras、PI3K、F-アクチン間のフィードバック経路を介した F-アクチンの一過的な重合反応によって形成されることが示唆されている^{46,130}。したがって、細胞性粘菌の底面に生じるアクチン波は、フィーディングカップの初期段階に形成される分子構造と考えられる^{123,128}。

細胞膜の形状とエンドサイトーシスに関わる分子の相互作用は、クラスリンやカベ

オリン、BAR タンパク質を対象としてナノスケールの現象でよく調べられている。微細加工によって作製されたナノコーンやナノピラーは細胞膜を陥入変形させ、その近傍にクラスリンや BAR タンパク質の局在が生じることが観察されている^{131,132}。これらのタンパク質の局在は曲率半径が 200 nm より小さい範囲で生じるため、それより大きな地形の認識にはまた異なる機構が必要になると考えられるが^{97,133,134}、マイクロスケールの膜変形を伴う過程に関してはまだよく理解されていない。貪食において膜の伸展動態が標的粒子の形状によって影響を受けることが示唆されているが^{104,105}、粒子形状の種類の制約や細胞と粒子の相対的な向きをそろえることの難しさなどがあり、これまで明確に理解されていなかった。本研究では、細胞底面内に限定された現象であるアクチン波を対象とし、微細加工によって作製したマイクロスケールの構造をもつ基質上において、その生成、伝播、消滅の過程を解析した。その結果、基質上のリッジ構造は細胞性粘菌の底面におけるアクチン波の生成率を上昇させることから、曲率をもった基質上では PI3K 依存性のアクチン重合が促進されることが示唆された。また、基質の凸曲面および凹曲面はそれぞれ波の伝播方向に対して異なる制限をかけ、リッジに沿った方向への波の伝播と膜の伸展を誘導することを明らかにした。

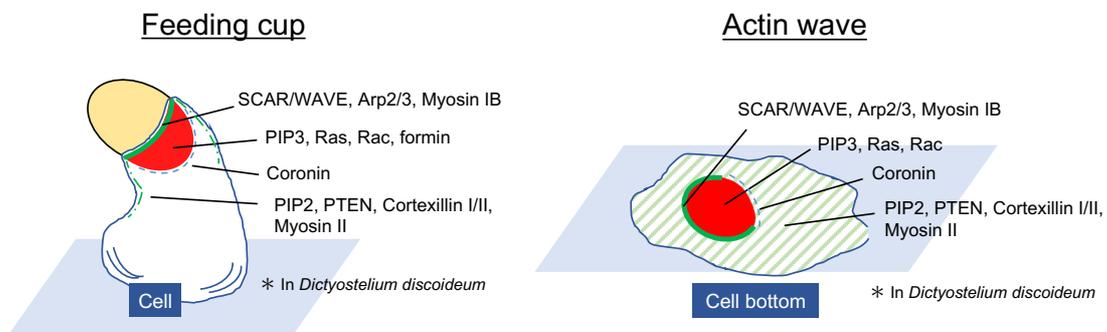


Fig 2-1: フィーディングカップとアクチン波の分子構造

細胞性粘菌のファゴサイトーシスやマクロピノサイトーシス時のカップ状の膜構造（フィーディングカップ）と細胞底面のアクチン波では、たがいに類似した分子構造が形成される。PI(3,4,5)P₃ のパッチ状の局在には Ras や Rac が共局在し、それらを縁取るように SCAR/WAVE 複合体や Myosin IB が局在する。パッチの外側には PI(4,5)P₂、PTEN、Cortexillin I/II、Myosin II が存在する。細胞質側には Coronin が分布する。

2. 方法

微細加工による細胞接着基質の作製

・カバーガラスの洗浄

細胞の観察および微細加工用の基板として、カバーガラス（松浪硝子工業, 24x60 mm, No.1, C024601 または ϕ 25 mm, No.1, C025001）を洗浄して使用した。洗浄は、染色バット内で洗浄溶液に浸した状態で超音波洗浄機を用いることにより行った。洗浄溶液として 10% アルカリ性洗剤コンタミノン（R）LS-II（富士フイルム和光）、99.5% エタノール（和光一級）、0.08 M 水酸化ナトリウム水溶液を順に使用し、各溶液での洗浄後には超純水ですすぐ操作を行った。洗浄後のカバーガラスは水気を切って乾燥滅菌器内で乾燥させ（140 °C, 1 時間）、染色バット内に入れて室温で保管した。

・クロムマスクの作製 (Fig 2-2)

レーザー描画装置（NEOARK, DDB-201-TW）を使用して、マスクブランク（クリーンサアフェイス, CBL4006Du-AZP, 101.2 mm², AZP1350 レジスト層 540 nm, クロム層 100 nm, ガラス基板 1.5 mm）上に設計図に従ったレーザー描画（半導体レーザー, $\lambda = 408$ nm）を行った。設計図は CAD ソフト（頭脳 RAPID）で作成し、DXF 形式で出力したファイルを使用した。レーザー出力 1.0 V、描画速度 100 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、Z シフト値（AF オフセット）-0.8 V の条件で、50% 重複させた 2 本線の描画によって幅 3 μm のラインパターンを得た。レーザー描画後のマスクブランク表面のレジストおよびクロムを現像液 NMD-3（東京応化）、クロムエッチャント MPM-E350（DNP ファインケミカル）に浸して溶解させ、アセトンで洗浄してクロムマスクを得た。

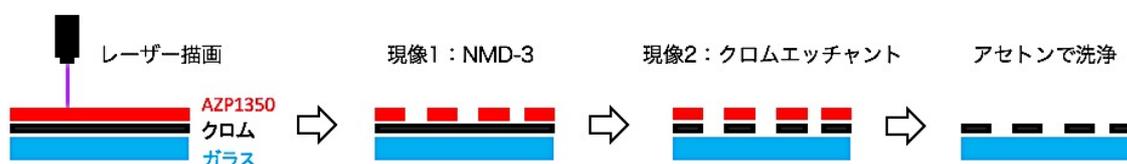


Fig 2-2: クロムマスクの作製手順

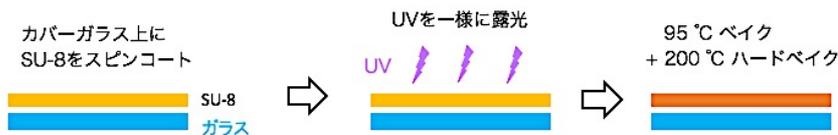
設計図に従ったパターンをレジスト上にレーザー描画する。レーザー光が照射された部分は現像液中で溶解し、クロムが露出する。次にクロムを溶解させ、アセトンで基板表面のレジストを除去する。

・SU-8 基板の作製 (Fig 2-3)

大気プラズマ処理（400 mTorr, 30 sec, PDC-32G, Harrick Plasma）を施したカバーガラ

ス表面に SU-8 2 (MICRO CHEM) をスピコートし (3000 rpm, 30 sec, MS-A150, MIKASA)、ホットプレート上で加熱 (65 °Cで1分間, 95 °Cで3分間) して溶媒を飛ばし、平らな場所に静置して室温まで冷ました。マスクアライナー (MA-20, MIKASA) で基板表面へ一様に UV を照射し、ホットプレート上で加熱 (65 °Cで1分間, 95 °Cで3分間, 200 °Cで5分間) して重合反応を促進し、平らな場所に置いて室温まで冷ました。2層目の SU-8 2 を同様にスピコートして、クロムマスクと 350 nm ロングパスフィルターを通して UV 照射を行い、重合促進の加熱を行った (65 °Cで1分間, 95 °Cで1分間)。高さ 1 μm、幅 3 μm のリッジ構造の場合、照射時間は 6 秒程度で行った。SU-8 現像液に浸して未重合部分を溶解させ、ブローで表面を乾かして、200 °Cのホットプレート上で5分間の加熱を行った。最終的なパターンを反射顕微鏡で確認し、原子間力顕微鏡または触針式表面形状計測器での構造測定を行った (後述)。

(1) 1層目



(2) 2層目

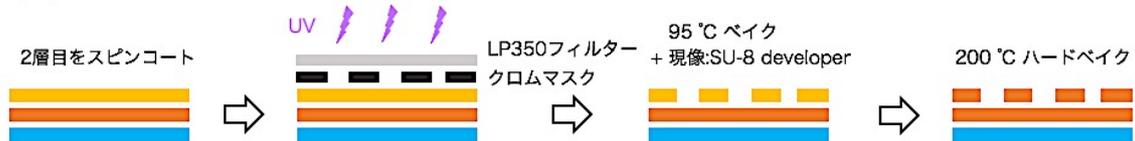


Fig 2-3: 2層構造の SU-8 基板の作製手順

カバーガラス上にスピコートした SU-8 に対して UV を一様に照射し、重合反応促進のための加熱を行う。この上に 2層目の SU-8 をスピコートし、マスクを使用したパターン状の UV 照射を施す。基板を現像液に浸して三次元構造を形成した後、堅焼きする。

・ガラスのエッチング (Fig 2-4)

スパッタ装置 E-200S (ANELVA) を使用してガラス表面にクロムをコートした (クロムスパッタリング)。まずサンプル室にカバーガラスを設置して $\sim 7 \times 10^{-3}$ Pa の真空条件とし、30.00 cc/min で Ar を流入させて 10 Pa になるように排気量を調節した。300 W でプラズマ化した Ar を電場によってクロム表面へ衝突させ、飛散したクロム粒子をガラス表面へ付着させた。ターゲット (クロム) - サンプル (ガラス) 間距離は 75

mm とし、約 8 分間行った。サンプル室を大気圧に戻し、表面に厚さ 100 nm 程度でクロムがコートされたガラス基板を回収した。

クロムコートされたガラス基板上に SU-8 のパターンを作製し、SU-8 で保護されていない部分のクロムを溶解液によって除去した。基板をサンプル台にセットしてエッチング装置 NLD-5700Si (ULVAC) へ導入し、Ar 270 sccm*、O₂ 10.0 sccm、C₄F₈ 10.0 sccm、CHF₃ 10.0 sccm をサンプル室へ流入させ、0.67 Pa となるように排気した。これらの気体を 1800 W でプラズマ化し、ガラス表面へ衝突させることでエッチングを行った。表面の侵食速度はおよそ SU-8 : ガラス : クロム = 10 : 7 : 1 である。100 秒間のエッチングを 2 回行い、ガラス表面に深さ約 500 nm の溝を形成した。90 °C に温めたピラニア溶液 (濃硫酸, 過酸化水素水) にガラスを浸して SU-8 等の有機物を洗浄し、続いてクロム溶解液に浸して残存のクロムを除去した。最終的なパターンを反射顕微鏡で確認し、原子間力顕微鏡または触針式表面形状計測器での構造測定を行った (後述)。上に述べた方法でガラスを洗浄し、細胞の観察に使用した。

* sccm (standard cubic centimeter per minute): 流量単位。1 sccm = 1.69 Pa · L/s (ULVAC 定義)。

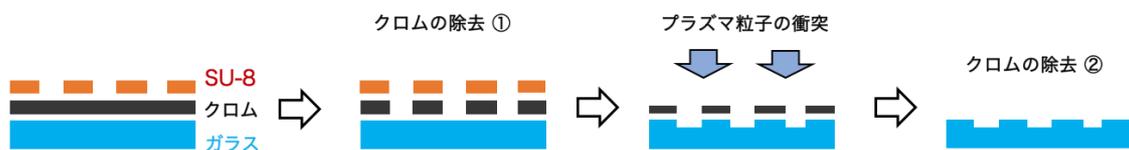


Fig 2-4: ガラスエッチングの手順

クロムをコートしたカバーガラス上に SU-8 のパターンを付与し、クロムを部分的に溶解させる。フッ素系気体のプラズマ粒子を基板表面に衝突させることで、ガラス基板を侵食して溝を形成する。

走査型プローブ顕微鏡による基質表面の形状測定

作製した基板表面の三次元形状を測定するために、原子間力顕微鏡または触針式表面形状計測器を用いた。これらは探針を用いて走査することで試料表面の微小な凹凸を計測するため、走査型プローブ顕微鏡と呼ばれる (Scanning Probe Microscopy, SPM)。

- ・原子間力顕微鏡による基板表面形状の測定 (Fig 2-5)

原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy: AFM) は SPM の一種であり、カンチレバーと呼ばれる探針で試料表面を走査することにより数 nm ~ 数 μm オーダーの高さの変化を高精度に測定することができる。カンチレバーの先端と試料表面の原子の間に

はたらく原子間力がつりあう位置を基準として、たがいの距離がそれよりも小さければカンチレバーは斥力を受けて試料表面から遠ざかる方向に変形するが、反対に距離が大きくなればカンチレバーは引力を受けて試料表面方向にむかって変形する。カンチレバー背面にはレーザーが照射されており、その反射光を4分割フォトダイオードで受光しているため、カンチレバーの微小な変形はフォトダイオード間の電位差として検出される。この電位差を打ち消すようにピエゾ素子が制御され、カンチレバー全体が上下に移動する。カンチレバーをXY方向に走査させながらピエゾ素子の時々刻々の座標をZセンサーで計測することで、試料表面の高さ分布が得られる。カンチレバーは共振周波数に近い周波数で振動させながら振幅を一定に保つようにして走査することで、試料表面やカンチレバーへの損傷を少なくしている。

原子間力顕微鏡 (Nanowizard 3, JPK (現 Bruker)) を顕微鏡 IX70 (オリンパス) に搭載して使用した。顕微鏡はアクティブ除振台 TS140 (Herz, OEM 製品) 上に設置した。測定に使用したカンチレバーの特性を表 2.1 に示す。較正には高さ 500 nm の標準サンプル (BudgetSensors, HS-500MG) を使用した。

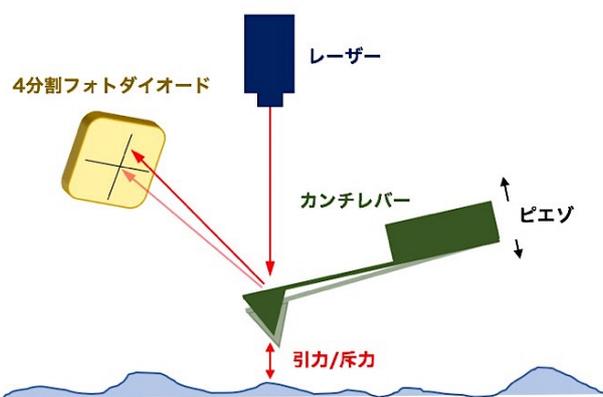


Fig 2-5: AFM の測定原理

試料表面との相互作用により生じるカンチレバーの微小な変形を反射光のずれとして検出する。

製品名	Tap300-G	ACTA
製造元	BudgetSensors	AppNano
材質	シリコン	シリコン
チップサイズ	3.4 x 1.6 x 0.3 mm	3.4 x 1.6 x 0.315 mm
共振周波数	300 ± 100 kHz	300 ± 100 kHz
ばね定数	20 - 75 N/m	13 - 77 N/m
長さ	125 ± 10 μm	125 ± 10 μm
幅	30 ± 5 μm	30 ± 5 μm
厚さ	4 ± 1 μm	4 ± 0.5 μm
探針部高さ	17 ± 2 μm	15 ± 1 μm
先端半径	< 10 nm	< 10 nm
探針部半頂角	10°	-

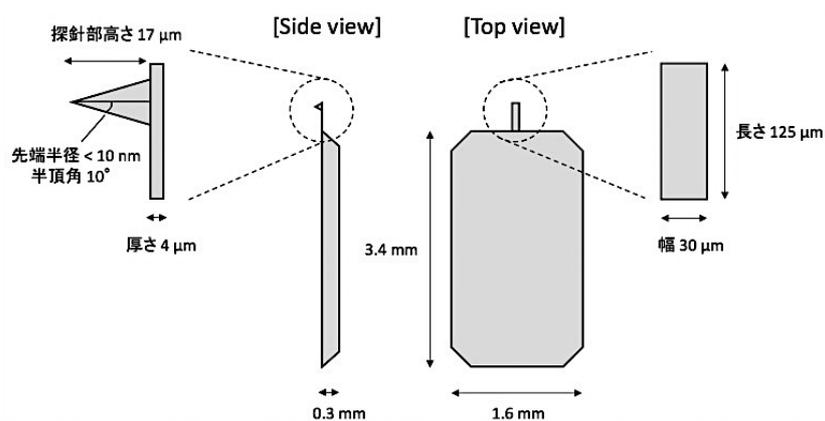


表 2.1: AFM 測定に使用したカンチレバーの特性

・触針式表面形状計測器による基板表面形状の測定

触針式表面形状計測器 (Bruker, DexTak XT) はダイヤモンドチップの先端を基質表面に接触させた状態でステージを動かして表面形状を測定する。チップは線形可変差動変圧器 (LVDT) に接続しており、チップの微小変位を電気信号に変換することで表面の高さ変化を測定することができる (Bruker)。ダイヤモンドチップは先端径 $0.2 \mu\text{m}$ のものを使用し、基質表面との接触圧は 0.1 mg とした。

細胞観察用チャンバーの組み立て

細胞観察用の基板は以下のいずれかの方法でチャンバーに組み込んで使用した。(1) ガラスボトムカルチャーディッシュ (P35G-0-14-C, MatTek; ディッシュ径 35 mm 、測定ホール径 14 mm) の底についているカバーガラスを外し、フレームシール (BIO-RAD, SLF0201) を用いて自前で用意した基板を貼り付けた (Fig 2-6)。細胞を基板上一様に散布されるようにするため、チャンバー全体に大気プラズマ処理 (400 mTorr , 2 min) を施して基板の親水性を向上させた。(2) 直径 25 mm の丸カバーガラスの場合、Attofluor cell chamber (A7816, Molecular Probes; ディッシュ径 35.6 mm 、測定ホール径 18.5 mm) も使用した。

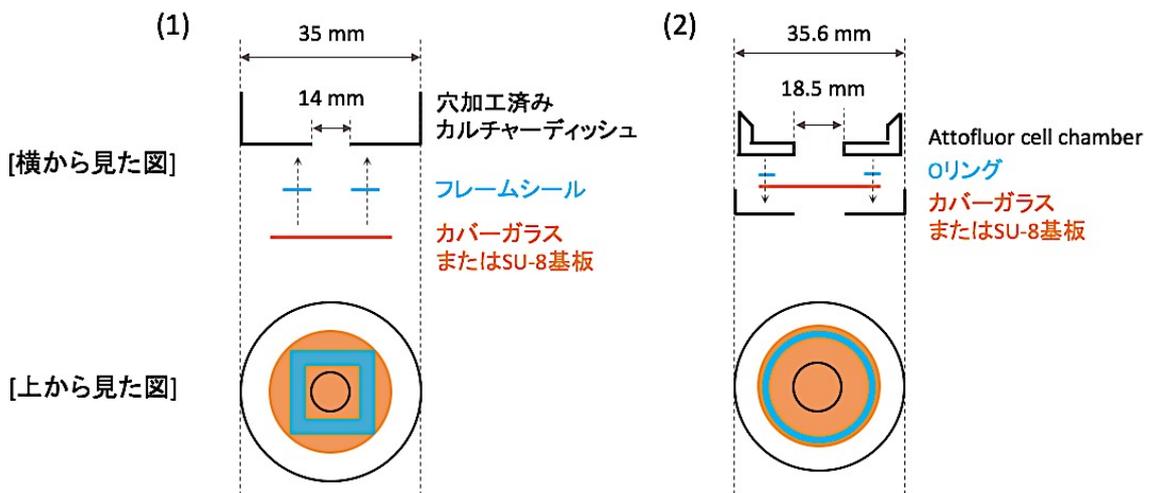


Fig 2-6: 細胞観察用チャンバーの組み立て

PDMS チャンバーの作製

細胞の観察に使用する PDMS チャンバーは次のようにして作製した。PDMS と重合剤 (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning) を重量比 10:1 でよく混合し、 $\phi 90$ mm のシャーレ内に置いたシリコン基板上に注いだ。シリコン基板表面には 5~100 μm の高さの SU-8 パターンを形成し、PDMS の鋳型とした。デシケーター内で 20 分間脱気後、ブローで表面の気泡を除去して、75 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間加熱し、取り出して室温に冷ました。カッターを用いて 24 x 50 cm 程度のサイズに切り出し、生検トレパン ($\phi 1.5$ mm) を使用して溶液の出入口となる穴を開けた。メンディングテープで PDMS 表面の埃や切り屑等を除去してから PDMS 面と洗浄したカバーガラス (24 x 60 mm, No.1) の表面に大気プラズマ処理 (400 mTorr, 30 sec) を施して両面を接合させ、75 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間加熱して完成とした。実験に使用する際は先にチャンバー内の流路に緩衝液を満たしてから細胞懸濁液を導入し、気泡が入り込まないように注意を払った。

細胞株の作製

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の無菌培養株 Ax4、Ax2、野生株 NC4 を実験に使用した。以下の株を新たに作製した：GFP-mhcA/PH_{CRAC}-RFP/Ax4、Lifeact-neon/PI3K1^{N1-487}-RFPmars/Ax4、Lifeact-neon/*ctxI*-、Lifeact-mRFPmars/GFP-*CtxI/ctxI*-、Lifeact-neon/*ctxI/ctxII*-、Lifeact-neon/*mhcA*-、Lifeact-GFP/NC4。G418 および Hygromycin B 耐性のプラスミド pDM304 と pDM358¹³⁵ はナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) Nenkin から入手した。蛍光タンパク質 neon の配列を含むプラスミドは Jonathan Chubb 博士から供与いただいた。pDM304-MCS-neon と pDM358-MCS-neon を構築し、合成した Lifeact 配列 5'-GATCTATGGGTGTCGCTGACCTGATAAAG AAGTTTGAAGCATCTCCAAG GAAGAGA-3' と 3'-CTAGTCTCTTCCTTGGAGATGCTTTCAAACCTTCTTA TCAGGTCAG CGACACCCATA-5' を挿入した (島田奈央博士、杉田登代子さん)。プラスミド pDGFP-MCS-Neo-CI¹³⁶ は Igor Weber 博士から供与いただいた。プラスミド pBIG-GFP-myo¹³⁷ は dictyBase Stock Center から入手した。Ax4、変異株 *ctxI*- (NBRP, S00100)、*ctxI/ctxII*- (NBRP, S00404)、*mhcA*- (dictyBase Stock Center, DBS0236379) は標準的なエレクトロポレーションのプロトコル¹³⁸ に従って形質転換とクローン化を行った。以下の細胞株は論文の記述^{46,82} に準ずる：GFP-Lifeact/Ax4、Lifeact-mRFPmars/Ax4、GFP-Lifeact/PH_{CRAC}-RFP/Ax4、PTEN-GFP/PH_{CRAC}-RFP/Ax4、CRIB_{PakB}-mRFP1/GFP-Lifeact/Ax4、Lifeact-GFP/RFP-RBD_{Raf1}/Ax4、HSPC300-GFP/Lifeact-mRFPmars/Ax4、PI3K1^{N1-487}-RFPmars/Ax4。作製した細胞株は増殖期または胞子の状態でジメチルスルホ

キシド (DMSO; 富士フイルム和光, 047-29353) を 5%含むウシ胎児血清 (FBS) 中に懸濁して-80 °Cで凍結保存した。

Lifeact は出芽酵母の F-アクチン結合タンパク質 Abp140 の F-アクチン結合部位に由来する、17つのアミノ酸から成る低分子量ペプチドである¹³⁹。F-アクチンの機能に影響を与えずに細胞内 F-アクチンの動態を可視化するためのプローブとして広く用いられており、固定染色剤としてよく利用されているファロイジンと似た蛍光分布を示す。PH (Pleckstrin-homology; プレクストリン相同) ドメインは 120 程度のアミノ酸から成り、細胞内情報伝達や細胞骨格系に関わる多くの分子に共通して存在する¹⁴⁰。PI(3,4)P₂ および PI(3,4,5)P₃ に結合することが知られている CRAC の PH ドメインをプローブとして使用した¹⁴¹。

細胞の培養と観察準備

Klebsiella aerogenes (Ka) を SM 液体培地 (表 2-2) 中で 4~5 時間振盪培養し (37 °C, 225 rpm)、SM 寒天培地上に広げて 37 °Cで一晩培養した。Ka のプレート上に針を使って細胞性粘菌の凍結ストックの氷片を落とし、22 °Cで培養した。無菌培養株の場合、4~5 日後に形成された摂食前線から細胞を採取し、PS 液体培地 (表 2-2) 中に移して 50 ml 遠沈管で振盪培養 (22 °C, 155 rpm) または ϕ 90 mm シャーレで静置培養 (22 °C) した。野生株 NC4 は大腸菌 B/r を OD = 6 で含む DB (Developmental Buffer, 表 2-2) 中で静置培養 (22 °C) した。プラスミドを保持する細胞の選択剤として 10 μ g/ml G418 (Neomycin)、60 μ g/ml Hygromycin B、10 μ g/ml Blastcidin S を必要に応じて培地に添加した。培養時は細胞密度が 2×10^6 cells/ml を超えないように維持し、細胞観察時は $1-2 \times 10^6$ cells/ml で培養しているものを使用した。実験には培養を開始して 2 週間以内の細胞を使用した。

細胞の発生を進めるため、細胞密度 $1-2 \times 10^6$ cells/ml の培養液から 2.5×10^7 cells だけ回収して遠心分離し (1970 rpm, 3 分間)、上澄みを除いた。DB で懸濁して遠心分離し上澄みを除く操作を 2 回繰り返した。5 ml の DB で懸濁して密度 5×10^6 cells/ml とし、1 時間振盪 (22 °C、155 rpm) した。cAMP (Sigma, A6885-500MG) を DB で希釈して 5 μ M に調製し、振盪中の細胞懸濁液に対して 50 μ l (終濃度 50 nM) を 6 分おきに 4 時間半のあいだ滴下した (パルシング)。パルシング終了後、全量を遠心分離して (1970 rpm, 3 分間) 上澄みを除き、DB 5 ml で懸濁して、細胞密度 1×10^4 cells/cm² 程度でチャンバーへ導入した。10 分以上静置して細胞が基質に接着してから観察を開始した。酵母 *Rhodotorula.sp* との観察には PDMS チャンバーを使用した。

SM (寒天) 培地		PS培地		Developtental Buffer	
Dextrose	10.0 g/L	Dextrose	15.0 g/L	KH ₂ PO ₄	0.816 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g/L	KH ₂ PO ₄	1.4 g/L	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0.107 g/L
KH ₂ PO ₄	2.2 g/L	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0.12 g/L	CaCl ₂ · 6H ₂ O	0.044 g/L
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	1.88 g/L	OXOID Special Pepton	10.0 g/L	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.492 g/L
Bacto Peptone	10.0 g/L	OXOID Yeast Extraxt	7.0 g/L		
Bacto Yeast Extract	1.0 g/L	Antibiotic Antimycotic	10 mL/L		
(Bacto Agar)	18.0 g/L	vitamin B12	40 µg/L		
		Folic acid	80 µg/L		

表 2-2: 培地等の組成

細胞の顕微鏡観察

共焦点スキャナユニット CSU-W1、CSU-X1 (横河電機)、全反射照明蛍光顕微鏡ユニットを搭載した倒立型顕微鏡 IX-83 または IX-81 (Olympus) を使用して、GFP または RFP を発現する生細胞の画像を取得した。CSU-W1 による共焦点観察では、GFP 観察には励起波長 488 nm、蛍光フィルター透過域 520-535 nm、RFP 観察には励起波長 561 nm、蛍光フィルター透過域 617-673 nm とした。CSU-X1 による共焦点観察では、GFP 観察にはフィルターキューブ U-MNIBA3 (オリンパス: 励起フィルター透過域 470-495 nm、ミラー反射域 >505 nm、蛍光フィルター透過域 510-550 nm)、RFP 観察にはフィルターキューブ U-MWIG3 (同上) を使用した。

共焦点顕微鏡では、レーザー光を対物レンズで集光して焦点面内の 1 点を照明し、その点で試料から発せられた蛍光をピンホールに通過させて受光することで、焦点面からの蛍光のみを高い分解能で得ることができる (Fig 2-7 右)。このような点照明で面内を走査することにより 2 次元画像を構築する。スピニングディスク共焦点顕微鏡では、螺旋状に複数のピンホールが空いたスピニングディスクを使うことにより高速のスキャンを行う (Fig 2-8)。径の大きなレーザー光で多数のピンホールを通してサンプル上の複数地点を同時に照明することで、ピンホールアレイディスクが 1 回転するとレーザー光はサンプル上を隈なくスキャンすることができる。このディスクは元来、映像伝送用に発明されたもので、発明者にちなんでニポウディスクとも呼ばれる。CSU (Confocal Scanning Unit; 横河電機) ではマイクロレンズが埋め込まれたディスクをピンホールアレイディスクの上方に配置してレーザー光の集光を行うことで、レーザー強度を抑えつつ生物試料からの微弱な蛍光を検出できる。

細胞を三次元的に観察するために共焦点顕微鏡を用いて Zstack 画像の取得を行った。対物レンズを高さ方向に $0.5 \mu\text{m}$ 間隔で動かして焦点をずらしながら、高さ方向 $2\sim 10 \mu\text{m}$ の幅で共焦点画像を取得した。実際の画像取得条件は図註に記述する。Zstack 画像データの多くは最大値投影法によって表示した。最大値投影法とは、複数の Z 位置における画像からピクセルごとに最大輝度値 $\tilde{I}(x, y) = \max_z I(x, y, z)$ を抽出して 1 枚の平面に表示する方法である。

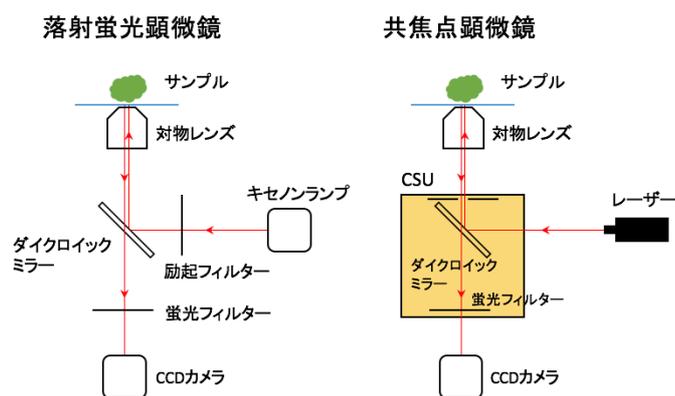


Fig 2-7: 共焦点顕微鏡の原理

落射蛍光顕微鏡では、キセノン光源からの光を励起フィルターに通過させてサンプルを照明する。サンプルが発した蛍光はダイクロイックミラーによって励起光と分離され、蛍光フィルターを通過して CCD カメラに受光される。共焦点顕微鏡では、蛍光をピンホールに通過させることで焦点面からの光のみを得ることができる。

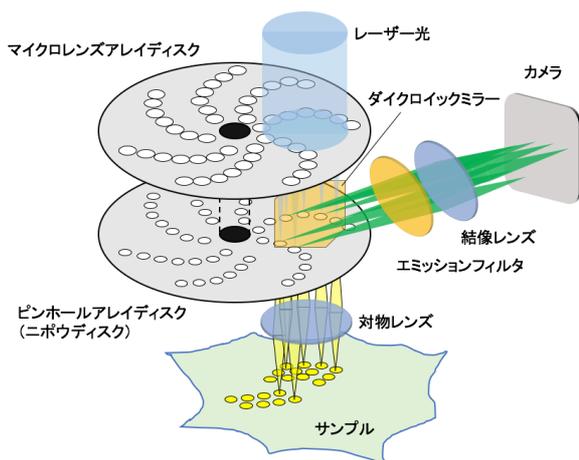


Fig 2-8: スピニングディスク共焦点顕微鏡の原理

径の大きなレーザー光を複数のピンホールが空いたスピニングディスクに通してサンプル上の複数地点を同時に照明する。マイクロレンズが埋め込まれたディスクをピンホールアレイディスク上に配置することでレーザー光の集光を行い S/N 比の高い画像を得る。

薬理阻害

LY294,002 はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) の活性を阻害する。LY294,002 塩酸塩 (Sigma, L9908-1MG) を DMSO (富士フィルム和光, 047-29353) に溶かして濃度 10 mM で調製し、分注して-30 °Cで冷凍保存した。細胞を処理する際は DB で希釈して目的濃度の 2 倍となる 20~100 μ M とし、細胞が導入されたチャンバー内の溶液と等しい容量を 30 秒ごとに数滴ずつ、5 分程度かけて滴下した。cAMP

(Sigma, A6885-500MG) は超純粋に溶かして濃度 100 μ M で調製し、分注して-30 °Cで冷凍保存した。細胞の発生や走化性実験に使用した。SQ22536 は cAMP 合成酵素 ACA を阻害する。SQ22536 (Calbiochem, 568500-5MG) をリン酸緩衝液 (PB) に溶かして 10 mM で調製し、分注して-30 °Cで冷凍保存した。集合期の細胞をガラス基質上へ導入する際、cAMP の分泌を抑制する目的で細胞懸濁液に 300 μ M で混合して使用した。蛍光物質 Alexa Fluor 594 (Invitrogen, A10438, 以下 Alexa594) はアルミ箔で遮光し、濃度 1 mg/ml で 4 °Cで冷蔵保存した。

マイクロニードルを使用して cAMP 濃度勾配の形成と LY294,002 の投与を行った。DB で希釈して調製した 100 nM cAMP, 100 μ g/ml Alexa 594 溶液、または 1 mM LY294,002, 10 μ g/ml Alexa594 を、マイクロニードル Femtotips II (Eppendorf) に 20 μ l 充填し、電子マイクロインジェクタ FemtoJet (Eppendorf) に接続し、マイクロマニピュレータ Transferman NK2 (Eppendorf) に装着した。もしくは、電動マイクロインジェクタ IM300 (NARISHIGE) に接続し、マイクロマニピュレータ Transferman 4r (Eppendorf) に装着した。ニードル内に 80-100 hPa の圧をかけることで先端から極微量の cAMP 溶液が排出され、チャンバー内で拡散して、ニードル先端からの距離で指数関数的に減衰する濃度勾配が形成される。ニードルの先端は基質表面から高さ 20 μ m の位置に設置した。

画像解析

画像解析には ImageJ を用いた。数値データの処理は Python と Excel (Microsoft 社) で行った。

アクチン波と細胞の移動の関係を定量的に解析するため、20 倍の対物レンズを用いて、GFP-Lifeact を発現した細胞の共焦点および透過光のタイムラプス画像を 1 分間隔で 50 分間取得し、これを 6 回続けて行った。各時刻においてアクチン波の有無を目視で判別し、1 か 0 を割り当てた。この値を時間平均し、続いて集団平均して、各時間帯におけるアクチン波の生成率を算出した。次に、細胞の重心をマニュアルまたはオートでトラッキングし、1 分間の変位から速さと方向を計算した。平坦な基質上、リ

リッジ上それぞれでアクチン波の有無で分けて平均速度と移動方向の分布を得た。また、平均二乗変位 (Mean square displacement; MSD) に対してパーシスタントランダムウォークモデル (PRWM, 式 1) をフィッティングし^{142,143}、直進性の指標となるパーシスタンス時間 P を得た。

$$MSD(\Delta t) = 2S^2P(\Delta t - P(1 - \exp(-\Delta t/P))), \quad S: \text{speed}, P: \text{persistent time} \quad (1)$$

PRWM は各時刻の粒子の移動方向が直前の移動方向と相関をもつようなランダムウォークのモデルであり、式 (1) は粒子の速度が一定の場合の表式である。PRWM の MSD は短い時間スケールでは時間の 2 次に依存し、十分時間経過後には 1 次関数に漸近する (Fig 2-9)。パーシスタンス時間 P は時間依存性が切り替わるおおよその時間に対応し、運動の直進性の指標となる。

cAMP 源の方向への移動速度は、マイクロニードルの先端から細胞の重心までの距離を r として、 $-\Delta r/\Delta t$ で計算した ($\Delta t = 10$ sec)。LY294,002 処理時のアクチン波の残存率は、処理直前 15 分間の平均生成率と、同視野における処理後 10-25 分の 15 分間の平均生成率の比を算出し、データを取得した全視野について平均値と標準誤差を求めた (Fig 2-14A)。

段差形基質上の境界線に沿って伝播しているアクチン波の存在領域を定量するため、GFP-Lifeact 発現株の共焦点顕微鏡による Z スタック画像を 10 sec 間隔で取得した。Fig. 2-16C における x 軸方向へ最大値投影した画像を使い、基質表面上の凸角から上面、側面内におけるアクチン波の端点までの距離 D_U 、 D_H 、凹角から底面内におけるアクチン波の端点までの距離 D_L 、アクチン波の横幅に相当するこれらの和 $D = D_U + D_H + D_L$ を求めた。全細胞の時系列データからそれぞれの長さの比率 D_U/D 、 D_H/D 、 D_L/D の平均値と標準誤差を求めた。これを段差の高さ別に取得したデータから計算してプロットした (Fig. 2-16D)。

水平面内で曲がったリッジ (高さ $1.5 \mu\text{m}$ 、幅 $4 \mu\text{m}$) に沿って伝播するアクチン波における F-アクチン量の時間変化を定量するため、GFP-Lifeact 発現株の共焦点画像を底面から高さ $1 \mu\text{m}$ の位置で 12 sec 間隔で取得した。アクチン波がリッジの角を通過する過程に注目し、波の重心が曲がり角の直上に来た瞬間を時刻 0 として前後 120 sec ずつのタイムラプス画像を取り出した。曲がり角の外側と内側に沿ってキモグラフを取得し、それぞれからアクチン波の領域における GFP-Lifeact 蛍光輝度の空間積算値を計算した。T = -120 sec での値が 1 になるように規格化し、全イベントでの平均値と標準誤差を計算してプロットした (Fig. 2-18C)。Y 字形に分岐したリッジ上でのアクチン波の伝播と膜の伸展を定量するため、分岐後の各リッジに沿ったキモグラフを取得した。持続する側の波のラベルを s 、消滅する側の波のラベルを d として、リッジの分

岐点から膜前端までの長さ l_s 、 l_d 、波の長さ D_s 、 D_d を測定した (Fig. 2-19C, D)。リッジの外側への細胞の伸展を定量するため、GFP-Lifeact または Lifeact-neon の共焦点画像から細胞底面領域のマスクを作製し、リッジの部分を差し引いた面積を求めた。波が分裂している時間帯と非分裂時それぞれでの面積を A_S 、 A_{NS} とした (Fig. 2-19F)。

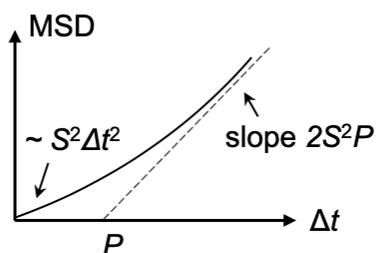


Fig 2-9: PRWM の平均二乗変位の時間依存性¹⁴⁰

3. 結果

マイクロスケールのリッジに沿ったアクチン波の伝播と細胞の移動

マイクロスケールの構造を持った基質上における依存性を大まかにつかむため、直線形のリッジ構造を平行に並べた基質上での細胞の移動を調べた (Fig 2-10A)。細胞は、GFP-Lifeact を発現した集合期の細胞性粘菌 Ax4 株を使用した。基質は全面 SU-8 とし、細胞の接着性を向上させるため大気プラズマ処理を施した。リッジは高さ 1 μm 、幅 3 μm 、間隔 3 μm とした。アクチン波を生じる細胞は SU-8 基質上に静置して約 2 時間後から出現し、その後徐々に増加して最大で $79 \pm 13\%$ (Fig 2-10B, Flat)、 $98 \pm 1\%$ (同図, Struc.) となった。細胞の移動方向は平坦な基質上では等方的となり、移動距離に関してはアクチン波の存在下で小さくなった (Fig 2-10C, Flat)。アクチン波は細胞底面の膜上を伝播し、波面が外へ伝わるのに伴って細胞の基質接着面が獲得された (Fig 2-10D)。アクチン波の伝播方向が頻繁に変化することは (同図, 赤線)、細胞の移動距離が小さいことと対応している。一方、リッジ構造を持つ基質上では、リッジに沿った方向への直進移動を示す細胞が多数出現することが観察された (Fig 2-10C, Struc.)。そのような細胞の底面では、移動方向の前端部にアクチン波が定在しており、一方向へむかって伝播しつづけた (Fig 2-10E)。アクチン波および細胞はリッジ上に存在し (Fig 2-10E, 下)、アクチン波の存在下において細胞の移動方向は 80%以上がリッジと平行になり (Fig 2-10F)、1 本のリッジから逸脱することは少なかった。細胞の移動速度はアクチン波の有無によってほとんど変わらなかったが (Fig 2-10G)、直進性はアクチン波を伴ってリッジ上を移動する場合に最も高かった (Fig 2-10H)。そのような細胞の軌跡を個別に見ると (Fig 2-10I)、ある細胞は 30 分以上一定速度で直進を続けて 100 μm 以上の距離を移動したが、別の細胞は頻繁に方向転換をしたため正味の移動距離は小さかった。1 本のリッジ上での方向転換には 2 通りのパターンがあった。ひとつは、あるとき細胞前端からアクチン波が離れて逆方向への伝播をはじめ、細胞後端に到達して新たな移動前端となる場合である (Fig 2-10J)。もうひとつは、アクチン波が分裂し、後方の波が元とは逆方向へ伝播して細胞後端に到達し、前方の波との競合を経て、消滅しなかった場合である (Fig 2-10K)。正味の移動距離が小さい細胞ではこのような波の方向転換や分裂が頻繁に生じており、一つの波が安定して移動前端にとどまることがなかった (Fig 2-10L)。いずれの場合も、アクチン波の伝播方向が細胞の移動方向とよく相関していた。

このようなリッジに沿った直進性の高い移動は、増殖期の細胞ではめったに観察されなかった (Fig 2-11A)。この時期の細胞ではアクチン波が大きく広がり、細胞底面全

体を覆うこともしばしば起きた (Fig 2-11B, Flat, 48 sec)。リッジと平行な方向へアクチン波が伝播する傾向はあるものの (Fig 2-11B, Ridge, 0-24 sec)、リッジから逸脱して大きく広がりやすく (同図, 48-72 sec)、多方向への細胞膜の伸展を引き起こすことが多かった (同図, 96-120 sec)。したがってこの時期の細胞では、1つの安定な移動前端が生じることはきわめてまれだった。

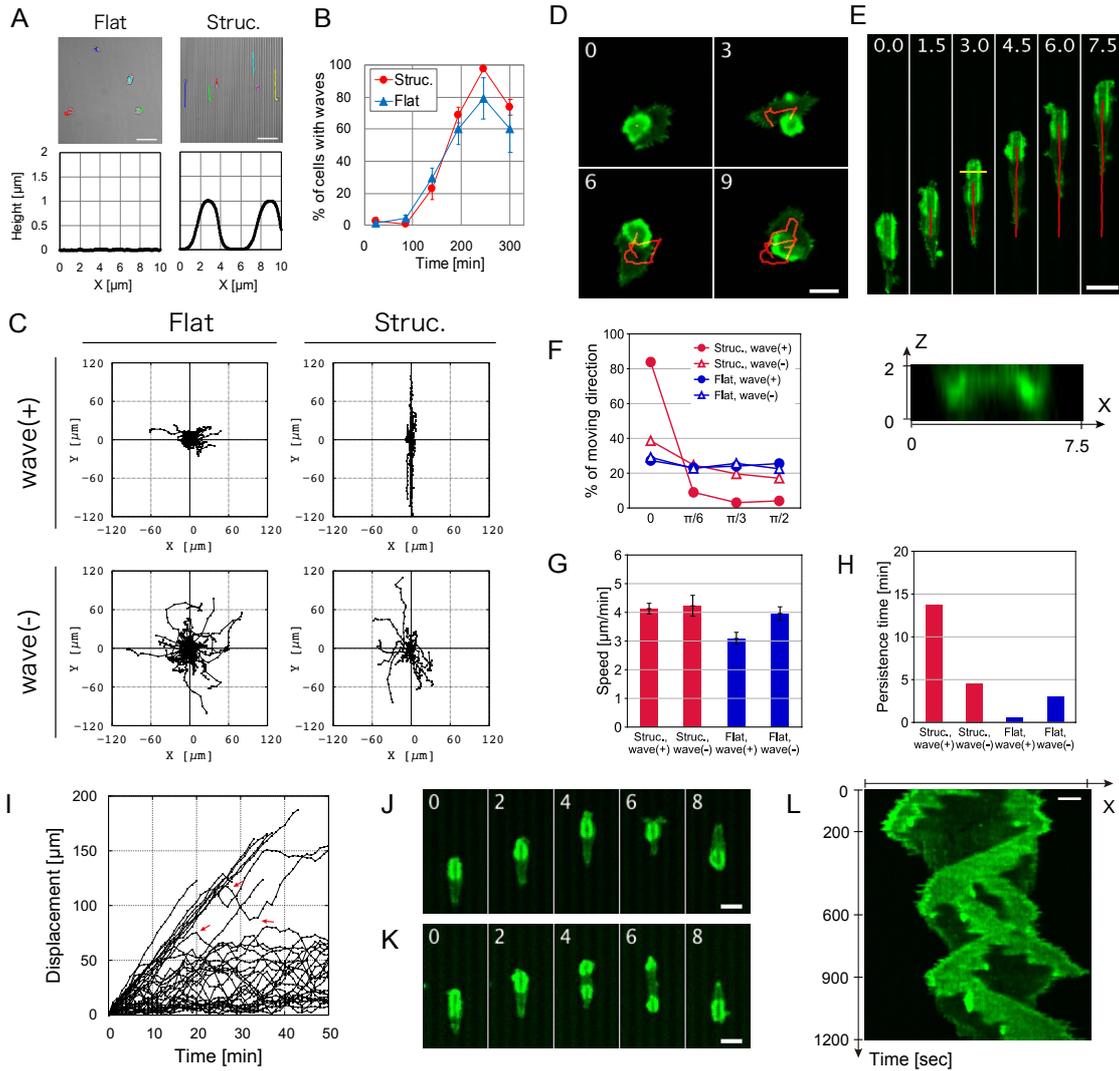


Fig 2-10: マイクロリッジ上のアクチン波の伝播と細胞の移動

(A) 平坦な基質、リッジ形基質上の代表的な細胞の軌跡を色線で示す (上)。基質表面の形状 (下)。(B) SU-8 基質上での静置時間とアクチン波を生じる細胞の割合。エラーバーは標準誤差を示す。(C) 20 分間の細胞の重心移動の軌跡。N = 21 (Flat, wave(+)), 48 (Flat, wave(-)), 34 (Struc., wave(+)), 25 (Struc., wave(-)) cells。(D, E) 平坦な基質上 (D) とマイクロリッジ上 (E) のアクチン波の共焦点画像 (緑: GFP-Lifeact, 赤: 波の重心の軌跡)。数字は時刻を示す [単位: min]。リッジ上の画像は基質底面から高さ方向 $2\ \mu\text{m}$ の幅を $0.5\ \mu\text{m}$ 刻みで取得した Z スタックの最大値投影像。画像中の黄色線に沿った XZ 断面図を下に示す (軸の単位: μm)。(F) リッジの方向に対する細胞の重心移動方向の角度分布。(G) 細胞の重心速度。エラーバーは標準誤差を示す。N = 32, 21, 23, 36 cells。(H) 細胞の重心移動のパーススタンス時間。(I) リッジ上でアクチン波を伴う細胞の重心変位。N = 36 cells。赤矢印は方向転換の瞬間を示す。(J, K) リッジ上でアクチン波を伴う細胞の方向転換。数字は時刻を示す [単位: min]。スケールバー: $10\ \mu\text{m}$ 。(L) GFP-Lifeact 共焦点像のリッジに沿ったキモグラフ。リッジ上で重心移動距離が小さい細胞。スケールバー: $5\ \mu\text{m}$ 。

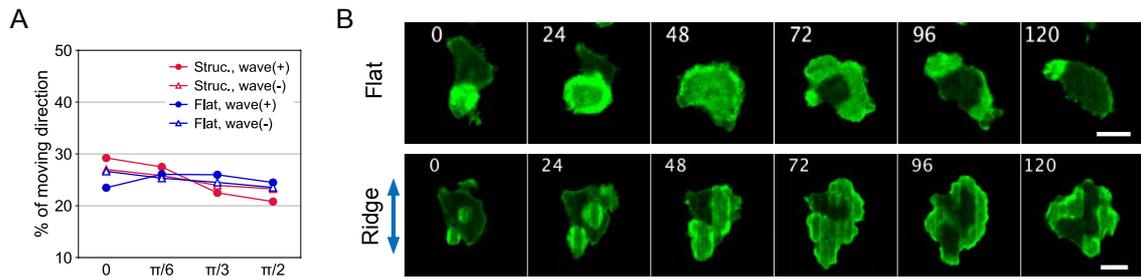


Fig 2-11: マイクロリッジ上における増殖期細胞のアクチン波の伝播

(A) リッジの方向に対する細胞の重心移動方向の角度分布。(B) GFP-Lifeact を発現した増殖期細胞の基質面近くでの共焦点顕微鏡画像 (上: 平坦, 下: リッジ上)。リッジの形状は Fig 2-10 で使用したのと同じである。リッジ上での画像は、高さ方向 $2\ \mu\text{m}$ の幅を $0.5\ \mu\text{m}$ 刻みで取得した Z スタック画像を最大値投影したもの。数字は時刻を示す [単位: sec]。スケールバー: $10\ \mu\text{m}$ 。

マイクロリッジ上のアクチン波の生成と持続性

次に、基質表面の形状によるアクチン波の出現率や持続時間への影響を調べた。リッジ形基質上でアクチン波の出現した場所を計測すると、集合期、増殖期いずれの細胞でもアクチン波の大部分はリッジ上で生成することが分かった (Fig 2-12A; "AX4, agg", N = 27 waves; "AX4, veg", N = 28 waves)。アクチン波が生成した瞬間の細胞の重心位置はリッジ直上にはなかったため (Fig 2-12A, 下)、これは細胞がリッジ上に長く滞在していることによるものではない。細胞内にアクチン波が存在し続ける時間は、増殖期細胞では平坦な基質上で 244 ± 54 sec (N = 20 events)、リッジ形基質上で 654 ± 111 sec (N = 24 events) だった。ただし、細胞内に一度に複数のアクチン波が生じることが多く、個別に持続時間を測定することは困難であったためこの指標とした。集合期細胞ではいずれの基質上でもアクチン波が存在し続ける時間が非常に長く、50 分間のデータ中で途切れないことも多かったため、持続時間の正確な測定はできなかった。アクチン波はマクロピノサイトーシスとともに液体培養株において形成が亢進されていることが先行研究^{51,126}で示唆されているため、野生株 NC4 でも測定を行った。大腸菌と二員培養された NC4 細胞は、先行研究⁵¹で言われているように平坦な基質上では細胞底面にアクチン波様のパッチ状局在 (以下、アクチン波) はまれにしか形成されなかったが (4.3 %, N = 23 cells)、リッジ形基質上ではアクチン波の生成率が大きく上昇することが見出された (67 %, N = 18 cells)。単位時間あたりのアクチン波の発生数は、 0.35 ± 0.08 /min (Fig 2-12B, Struc.)、 0.03 ± 0.03 /min (Fig 2-12B, Flat) だった。さらに、AX4 株と同様にアクチン波の大部分はリッジ上で生成することが分かった (Fig 2-12A; "NC4, veg", N = 45 patches/waves)。この結果は、野生株 NC4 においても細胞底面にアクチン波が形成され、基質のリッジ形状がそのトリガーとして作用することを示している。NC4 細胞に生じるアクチン波の持続時間は数十秒と比較的短く (Fig 2-12C, Struc.: 21 ± 2 sec, N = 42 waves, Flat: 34 ± 5 sec, N = 8 waves)、リッジに沿った直進性の高い移動を示す細胞は出現しなかったが、アクチン波が生成して消滅するまでの間、細胞の移動前端が停止することはときどき観察された (Fig 2-12D, E, 赤矢印)。集合期の NC4 細胞ではアクチン波の生成は観察されなかった。以上の結果は、アクチン波の生成と持続性が地形に依存することを示している。

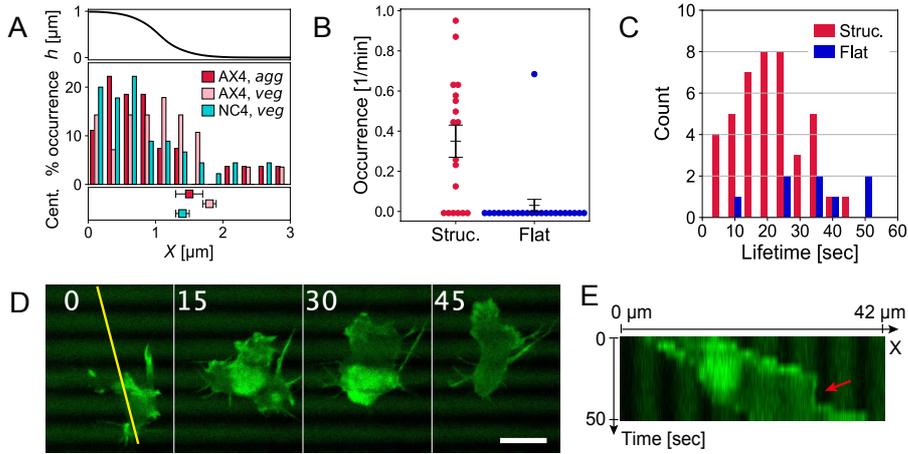


Fig 2-12: マイクロリッジ上におけるアクチン波の生成位置

(A) 集合期 (*agg*) と増殖期 (*veg*) の AX4 細胞、増殖期の NC4 細胞におけるアクチン波の開始位置の分布 (上: リッジの XZ 断面。下: アクチン波が生成した瞬間の細胞重心の平均位置。エラーバーは標準誤差を示す。N = 27 (AX4, *agg*), 28 (AX4, *veg*), 45 (NC4, *veg*) waves)。 (B) 増殖期の NC4 細胞における単位時間あたりのアクチン波の生成数。プロットは各細胞での値を示し、バーは平均値 ± 標準誤差を示す。N = 18 (Struc.), 23 (Flat) cells。 (C) 増殖期の NC4 細胞におけるアクチン波の持続時間のヒストグラム。 (D) リッジ上に置かれた NC4 細胞の Lifeact-GFP の共焦点画像。画像は、基質底面から高さ方向 3 μm の幅を 0.5 μm 刻みで取得した Z スタック画像を最大値投影したもの。数字は時刻を示す [単位: sec]。スケールバー: 10 μm 。 (E) D 中の黄色線の位置でのキモグラフ。画像は時間軸方向へ 8 倍に拡大したものである。赤矢印は細胞の移動前端が停止している瞬間を示す。

リッジ上のアクチン波における分子の空間分布

液体培養株ではアクチン波の生成率と持続性が大きく向上しているため、地形との関係を解析するのに有用である。以後の解析は主に液体培養株を用いて行った。リッジ上に存在するアクチン波を対象として、これを構成する分子の空間配置を観察した。蛍光シグナルが弱いプローブはSU-8の自家蛍光に隠れてしまい観察が困難であったため、ここではエッチングによって同一のリッジ形状を持たせたカバーガラスを使用した (Fig 2-13A)。ガラス基質上では細胞の接着性はやや低いものの、アクチン波がリッジ上を伝播し、リッジに沿った細胞の直進移動が生じることは観察された。ガラスのリッジ上のアクチン波において、F-アクチンはリッジの側面に強く、上面にも分布していた (Fig 2-13B, GFP-Lifeact, Lifeact-mRFPmars, Lifeact-neon)。PI3K (PI3K1^{N1-487}-RFPmars) はLifeactと共局在を示し、SCAR複合体 (HSPC300-GFP) はLifeact局在の端部にあたるリッジ側面の下端に局在した。PIP3 (PH_{CRAC}-RFP)、Ras-GTP (RFP-RBD_{Raf1})、Rac-GTP (CRIB_{PakB}-mRFP1) はリッジの側面と上面へ同程度に局在した。一方、Cortexillin I (GFP-CtxI)、PTEN (PTEN-GFP)、Myosin II (GFP-mhcA) は同領域では存在量が低く、外側の細胞膜上に分布していた。これらのシグナルの相対的な位置関係は、増殖期細胞でこれまでに報告されているアクチン波のものとよく対応する (Fig 2-1)。

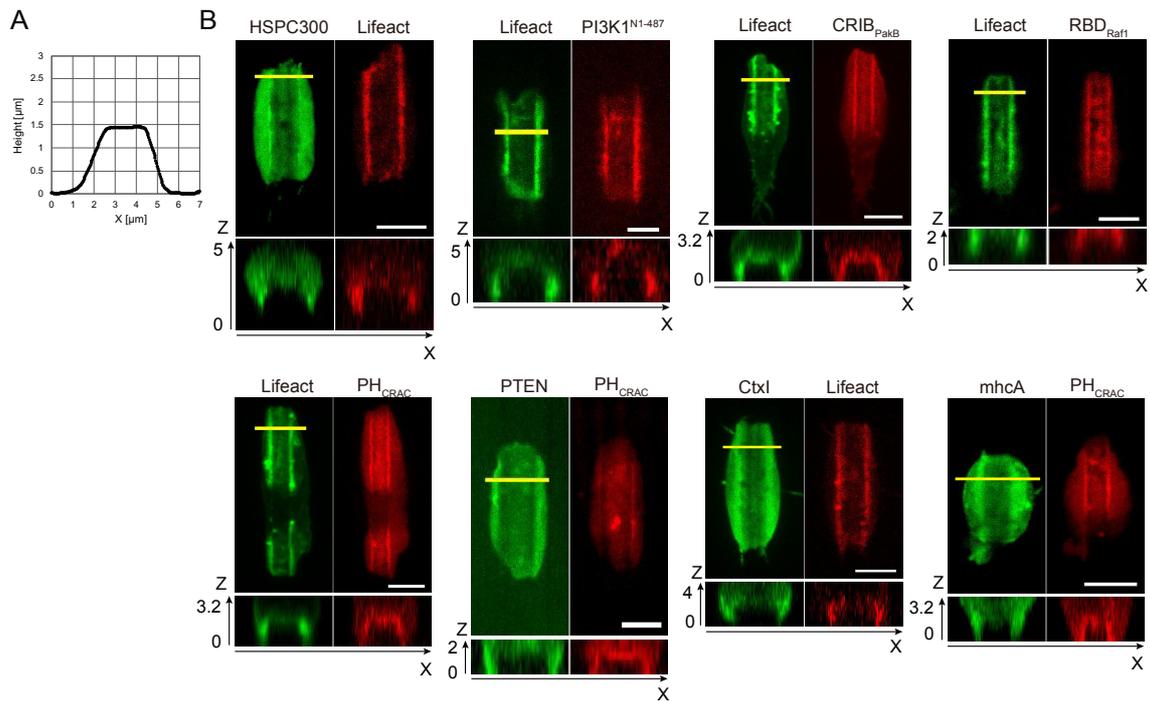


Fig 2-13: リッジ上のアクチン波における分子の空間分布

(A) 観察に使用したガラス基質。リッジの高さ 1.5 μm 、幅 3 μm 、間隔 3 μm 。(B) アクチン波における HSPC300-GFP/Lifeact-mRFPmars、Lifeact-neon/PI3K^{N1-487}-RFPmars、GFP-Lifeact/CRIB^{PakB}-mRFP1、Lifeact-GFP/RFP-RBD^{Raf1}、GFP-Lifeact/PH_{CRAC}-RFP、PTEN-GFP/PH_{CRAC}-RFP、GFP-CtxI/Lifeact-mRFPmars、GFP-mhcA/PH_{CRAC}-RFP の共焦点画像。画像は Z スタック画像の最大値投影像 (各上段) と黄色線の位置での XZ 断面像 (各下段) を示した [軸単位: μm]。スケールバー: 5 μm 。

リッジ追従的な細胞移動のアクチン波への依存性

アクチン波には PI(3,4,5)P3 が共局在し、PI3K の阻害剤である LY294,002 によって細胞を処理するとアクチン波が消滅することから⁴⁶、PI3K による PI(3,4,5)P3 の産生がアクチン波の形成に重要と考えられる。集合期の細胞でも同様に 50 μ M の LY294,002 で処理することによって、細胞内のアクチン波は完全に消滅した (Fig 2-14A)。アクチン波を伴ってリッジ上を移動している細胞に対してマイクロニードルによって LY294,002 を投与したとき、アクチン波は消滅するとともに細胞がリッジから外れて移動することが観察された (Fig 2-14B, C)。このときの細胞の移動方向の分布は、アクチン波を伴わない場合と同等のレベルまで低下した (Fig 2-14D, Fig 2-10F)。溶媒として使用した DMSO を投与したときには、アクチン波は消滅せず、リッジに沿った細胞の移動も損なわれなかった (Fig 2-14D, DMSO)。この結果は、リッジに沿った細胞の移動が PI3K に依存したものであり、数百 nm スケールのリッジに沿った PI3K 非依存性の細胞の移動¹¹⁷とは異なるものであることを示している。

動物のいくつかの癌細胞株の底面に観察されるアクチン波にはインテグリンが関わっており、インテグリンと ECM の結合解離のサイクルが必要とされる¹⁴⁴。Mn²⁺の投与によってインテグリンの解離を抑制すると波の伝播が阻害されることから、アクチン波の形成や伝播には基質との接着がある程度弱くなければならないことが示唆されている。WGA レクチンを SU-8 基質上にコートして細胞性粘菌の接着を強めたとき、アクチン波の生成は著しく抑制された (Fig 2-14E, F)。リッジ上での細胞の移動方向の分布はノンコートした基質上でアクチン波を伴わない場合と同等になり、リッジに沿った細胞の移動は観察されなかった (Fig 2-14G)。この結果は、リッジに沿った細胞の移動にはアクチン波が必要であることを示している。WGA をコートした基質上の細胞の形態や運動性については第 2 部で扱う。

次に、細胞外の cAMP に対する走化性応答を調べた。cAMP の刺激を受容した細胞性粘菌では Ras や PI3K が一過的に細胞膜上へ移行することが知られている。したがって cAMP 刺激によって細胞底面のアクチン波に対して外乱が加わることが予想される。アクチン波を生じた細胞に対して、マイクロニードルによって cAMP の濃度勾配を形成したとき、5 分以内に約半数の細胞でアクチン波の消滅が観測された (Fig 2-15A, E)。そのような細胞は、その後 cAMP 源の方向へむかって移動した (Fig 2-15A, 120-360 sec; C-D, 赤線)。一方、残りの半数の細胞ではアクチン波が持続し、cAMP 濃度勾配とは無関係にリッジに沿った移動が続いた (Fig 2-15B; D, 黒線)。cAMP 源の方向への細胞の移動速度はアクチン波の存在下では大きく低下した (Fig 2-15F)。同一の

細胞においても、cAMP 源の方向へ移動している過程でアクチン波が出現したときには細胞の移動速度が低下し、消滅後すぐに移動速度が上昇することが観測された (Fig 2-15G)。また、ごく少数ではあるが、リッジ上でアクチン波が生じた状態で cAMP 源の方向へ突起が形成され、そこから隣接するリッジ上へ新たなアクチン波が生じて細胞全体が乗り移るようにして徐々に cAMP 源へ近づいていく細胞も観察された (Fig 2-15H)。これらの結果は、リッジに沿った細胞の移動がアクチン波を必要とするものであること、および cAMP への走化性とは両立しない過程であることを示している。

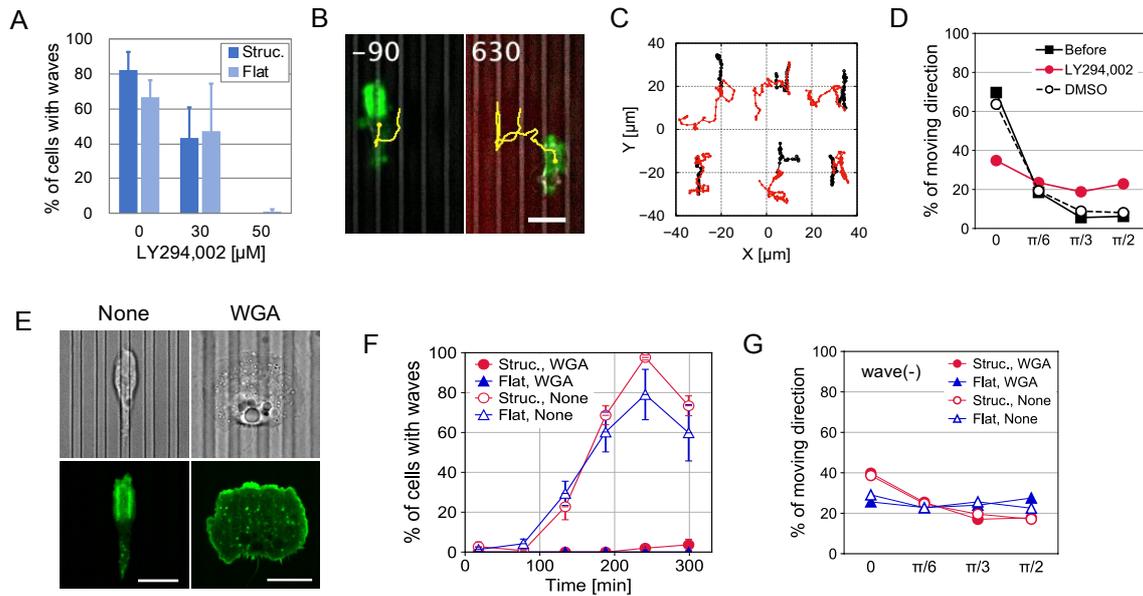


Fig 2-14: PI3K 阻害と基質接着増強によるアクチン波の消滅とリッジ追従性の低下

(A) LY294,002 処理後のアクチン波の残存率 (平均値 ± 標準誤差)。左から N = 4, 4, 3, 4, 3, 4 fields。(B) LY294,002 処理前後の共焦点画像 (緑: GFP-Lifeact、赤: Alexa594) と重ねた透過光画像。黄色線は細胞の重心の軌跡を示す。数字は時刻を示し [単位: sec]、時刻 0 sec でマイクロニードルによって LY294,002 を投与した。スケールバー: 10 μm 。(C) LY294,002 投与前 5 分間 (黒線) と投与後 13 分間 (赤線) の細胞の重心の軌跡。(D) リッジの方向に対する細胞の重心移動方向の角度分布 (LY294,002 投与前: 黒実線、投与後: 赤実線, N = 6 cells, DMSO 投与後: 黒点線, N = 8 cells)。(E) ノンコート、30 $\mu\text{g/ml}$ WGA コートした SU-8 基質上の細胞の透過光画像 (上段) と共焦点画像 (GFP-Lifeact, 下段)。スケールバー: 10 μm 。(F) WGA コートした SU-8 基質上での静置時間とアクチン波を生じる細胞の割合 (closed, 平均値 ± 標準誤差)。ノンコートのデータ (open) は Fig 2-10B と同一。(G) WGA コートした基質上でのリッジの方向に対する細胞の重心移動方向の角度分布。ノンコートのデータ (open) は Fig 2-10F 中の wave(-) のデータと同一。凡例の上から N = 173, 160, 21, 36 cells。

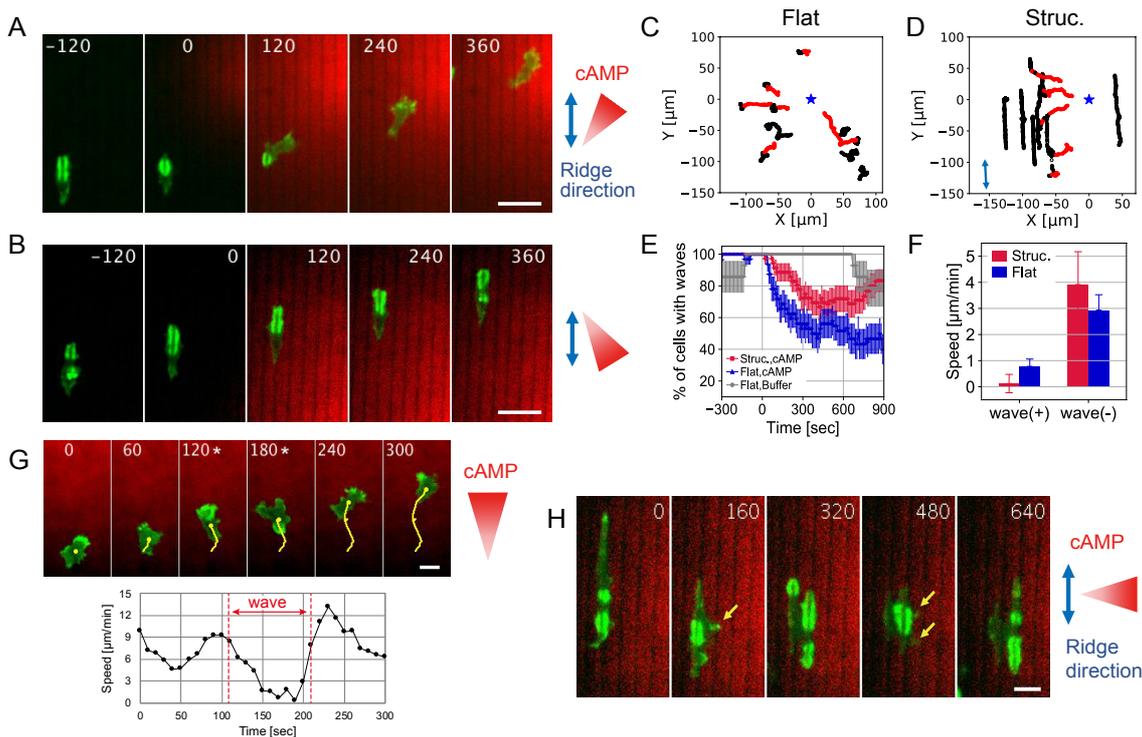


Fig 2-15: リッジ上のアクチン波と cAMP への走化性の排他性

(A, B) リッジ上の細胞の共焦点画像 (緑: GFP-Lifeact, 赤: Alexa594)。数字は時刻を示し [単位: sec]、時刻 0 sec でマイクロナードルによって cAMP を投与した。スケールバー: 20 μm 。(C, D) 平坦な基質上、リッジ形基質上それぞれの代表的な 10 細胞の重心の軌跡 (cAMP 投与前 5 分間: open、投与後 15 分間: closed、アクチン波あり: 黒、アクチン波なし: 赤)。青星は cAMP 源の位置を示す。(E) cAMP 投与後のアクチン波を生じている細胞の割合の推移。凡例の上から N = 30, 30, 14 cells。(F) アクチン波の存在下および非存在下における cAMP 源の方向への細胞の移動速度 (平均 \pm 標準誤差)。左から N = 36, 32, 17, 25 cells。(G, H) 細胞の共焦点画像 (緑: GFP-Lifeact, 赤: Alexa594)。数字は時刻を示す [単位: sec]。スケールバー: 10 μm 。(G) 平坦な基質上。アクチン波が生じているフレームをタイムスタンプの右にスターで示す。下: 細胞の移動速度の変化。(H) リッジ上。黄矢印: cAMP 源の方向への突起。

基質表面の正負の曲率によるアクチン波の伝播方向への制約

基質表面のいかなる幾何学的特徴がアクチン波の伝播方向を決定するのかについて解析するため、段差の形状を持った SU-8 基質を作製して観察に使用した (Fig 2-16A, B)。段差形の基質を用いることで、リッジの幅と間隔の影響を排除して、凸曲面と凹曲面上のアクチン波のふるまいを調べることを意図した。段差が十分に高いとき ($h = 8.5 \mu\text{m}$)、アクチン波の端が凹曲面から離れた状態で、段差の凸曲面に沿って伝播することが観察された (Fig 2-16A)。次に、段差が低い場合 ($h = 3.5 \mu\text{m}$)、段差上面から伝播してきたアクチン波が側面を伝って段差下端に到達したとき (Fig 2-16B, 00:00 ~ 01:00)、段差の底面側へは伝播せず、その後、段差の境界線方向へ伝播することが観察された (Fig 2-16B, 01:00 ~ 01:30)。したがって、アクチン波は基質の凸曲面に沿って伝播し、凹曲面を横ぎるような伝播をしない傾向があることが分かった。これらの傾向を定量的に評価するため、段差に沿って伝播しているアクチン波の存在形態を調べた (Fig 2-16C, 詳細は 2.方法)。共焦点顕微鏡によって取得した三次元再構成画像を使用し、段差上端の凸角から基質上面内、側面内におけるアクチン波の端点までの距離を D_U 、 D_H 、段差下端の凹角から基質底面内におけるアクチン波の端点までの距離を D_L とした。段差の高さ $h = 8.5 \mu\text{m}$ のとき、 $D_U/D = 48 \pm 1 \%$ 、 $D_H/D = 51 \pm 1 \%$ (Fig 2-16D, $N = 83$ timepoints) となった。これはアクチン波が上面と側面へ等しく広がっていることを意味する。 $h = 3.5 \mu\text{m}$ のときには、 D_U/D は $59.4 \pm 0.9 \%$ に上昇し、 D_H/D は $35.8 \pm 0.7 \%$ に低下して、 $D_L/D = 4.9 \pm 0.5 \%$ となった (同図, $N = 117$ timepoints)。 D_L/D が依然小さく、 D_U/D が他 2 つの和よりも大きいことは、アクチン波が上面側へ偏って広がっていることに対応し、したがって凹角部でアクチン波の伝播が妨げられていることを示す。 $h = 1 \mu\text{m}$ では、 $D_L/D = 23.8 \pm 0.6 \%$ まで上昇した。これはアクチン波が底面側へ広がる頻度が増したことに対応する (同図, $N = 407$ timepoints)。

この解析結果は、アクチン波が凸曲面上に誘導され、凹曲面では伝播が妨げられることを示している。遺伝子破壊株 *ctxI-/ctxII-* および *mhcA-* では、 $h = 1.5 \mu\text{m}$ のときの D_L/D 値がそれぞれ $19 \pm 1 \%$ 、 $25 \pm 2 \%$ と AX4 株の $9.9 \pm 0.4 \%$ に比べて高い値となった (Fig 2-16E)。さらに、*ctxI-/ctxII-* および *mhcA-* ではリッジから基質底面側へアクチン波が広がりやすく (Fig. 2-19A, Fig 2-17A)、*mhcA-* ではリッジや段差を横切ることもよく観察された (Fig 2-17B, C)。Cortexillin I/II (CtxI/II) とミオシン II はアクチンコーテックスを架橋し、細胞性粘菌のアクチンコーテックス構造の維持と膜張力に関わることが知られている^{42,145}。このことから、細胞の背側 (dorsal-side) の細胞膜およびアクチンコーテックスが凹角部におけるアクチン波の伝播抑制に関わることが示唆される。

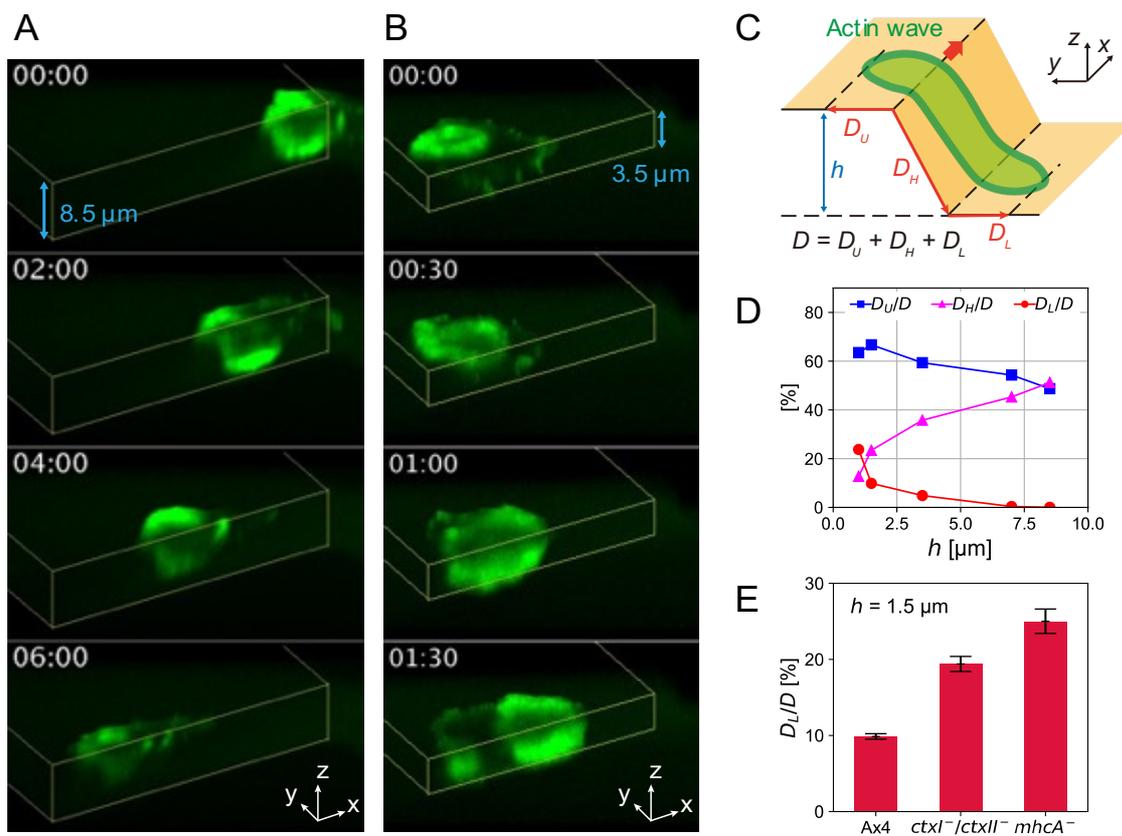


Fig 2-16: 段差形基質上におけるアクチン波の伝播

(A, B)アクチン波を生じた細胞の共焦点顕微鏡による3次元タイムラプス画像(緑: GFP-Lifect, 黄色線: 段差の輪郭線)。画像は、Z軸から60°の方向への最大値投影画像。段差の高さはA: 8.5 μm 、B: 3.5 μm 。タイムスタンプは[min:sec]。(C) D_U 、 D_H 、 D_L 、 D 、 h の定義。(D) AX4株での D_U/D 、 D_H/D 、 D_L/D の h 依存性。(E) AX4株、*ctxI*/*ctxII*-株、*mhCA*-株での $h = 1.5 \mu\text{m}$ 時の D_L/D (平均値 \pm 標準誤差)。N = 5, 9, 3 cells。

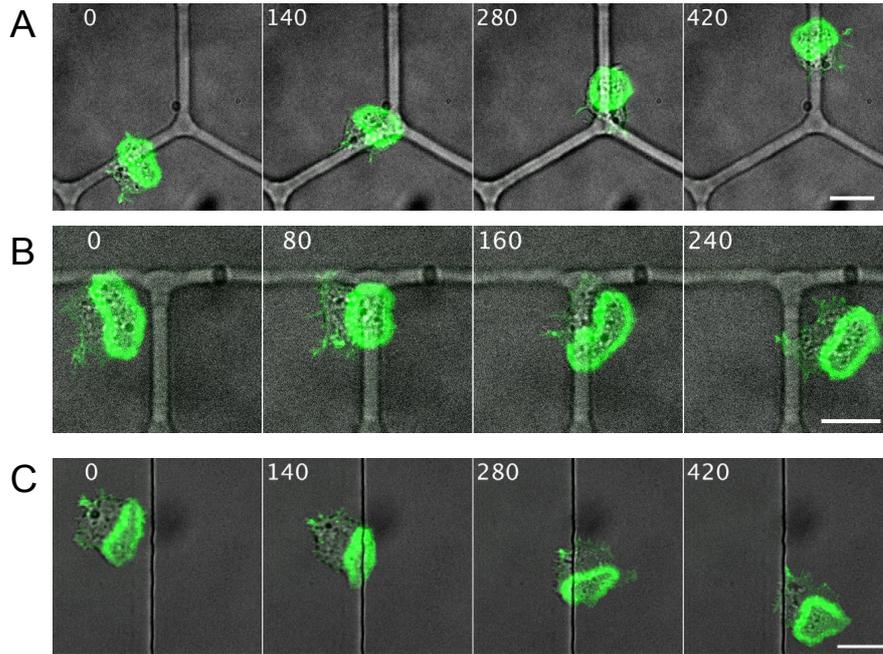


Fig 2-17: *mhcA* 遺伝子破壊株のアクチン波

(A-C) Lifeact-neon を発現した *mhcA*-細胞の透過光画像（グレー）と重ねた共焦点画像（緑）。(A, B) 基質面付近の画像。リッジの高さ $1.5\ \mu\text{m}$ 、幅 $4\ \mu\text{m}$ 。(C) 基質面から高さ方向 $2\ \mu\text{m}$ の幅を $0.5\ \mu\text{m}$ 刻みで取得した Z スタック画像の最大値投影画像。数字は時刻を示す [単位: sec]。スケールバー: $10\ \mu\text{m}$ 。

高さ方向に曲面の形状を変えることは3D フォトリソグラフィを必要とするものであり技術的に困難であったため、水平面内でリッジのパターンを変えることで、アクチン波の伝播に対する基質表面の曲率の影響を解析した。90°の角度でジグザグに曲がったリッジ上では、直線状のリッジの場合と同様に、アクチン波の伝播とともにリッジに沿った細胞の移動が観察された (Fig 2-18A)。曲がり角を通過する過程に注目すると (Fig 2-18B)、曲がり角の外側では F-アクチン (GFP-Lifeact) が連続的に伝播するのに対して、内側では角に到達したところで F-アクチンの強い局在が消滅し (同図, -90 ~ -30 sec)、波全体が曲がり角を通過したあとで再び局在が出現する様子が観察された (同図, 0 ~ 60 sec)。GFP-Lifeact 蛍光輝度の空間積算値は、曲がり角の外側では初期値の 1.6 倍まで上昇するのに対し (Fig 2-18C, 左, 90°)、内側では 0.2 倍まで減少した (同図, 右, 90°)。曲がり角が 120°の場合は F-アクチン集積量の変動幅は小さくなったことから (同図 C, 120°)、F-アクチン集積への曲面の作用は曲率依存的である。

リッジが T 字形に分岐している場合 (Fig 2-18D)、アクチン波は直線形の側では伝播を続けるのに対し (同図, 90 ~ 360 sec)、分岐側では凹角部で伝播が停止し (同図, 90 ~ 180 sec)、その後全体が進行方向を反転させることがあった (15.5 %, N = 84 events, Fig 2-18F (a), "Reverse")。T 字形や十字形に分岐の場合には分岐点で両側が凹角となる。アクチン波の伝播は分岐点の手前で停止し (Fig 2-18E, 0 ~ 180 sec)、その後全体が逆方向へ伝播することが観察された (Fig 2-18E, 240 ~ 360 sec)。伝播方向の反転が起きる割合は、T 字形に分岐の場合には 17.2 % (N = 29 events, Fig 2-18F (b), "Reverse")、十字形に分岐の場合には 27.6 % (N = 76 events, Fig 2-18 F (c), "Reverse") となった。また Y 字形に分岐の場合には AX4 株で 29.3 % (N = 58 events, Fig 2-18G, AX4, "Reverse") となった。これらは段差形の基質上で観察した凹曲面でのアクチン波の伝播抑制と整合する結果である。一方、*ctxI*-株、*ctxI*/*ctxII*-株では Y 字形に分岐点で伝播方向の反転が観察されなかった (N = 43, 57 events, Fig 2-18G)。

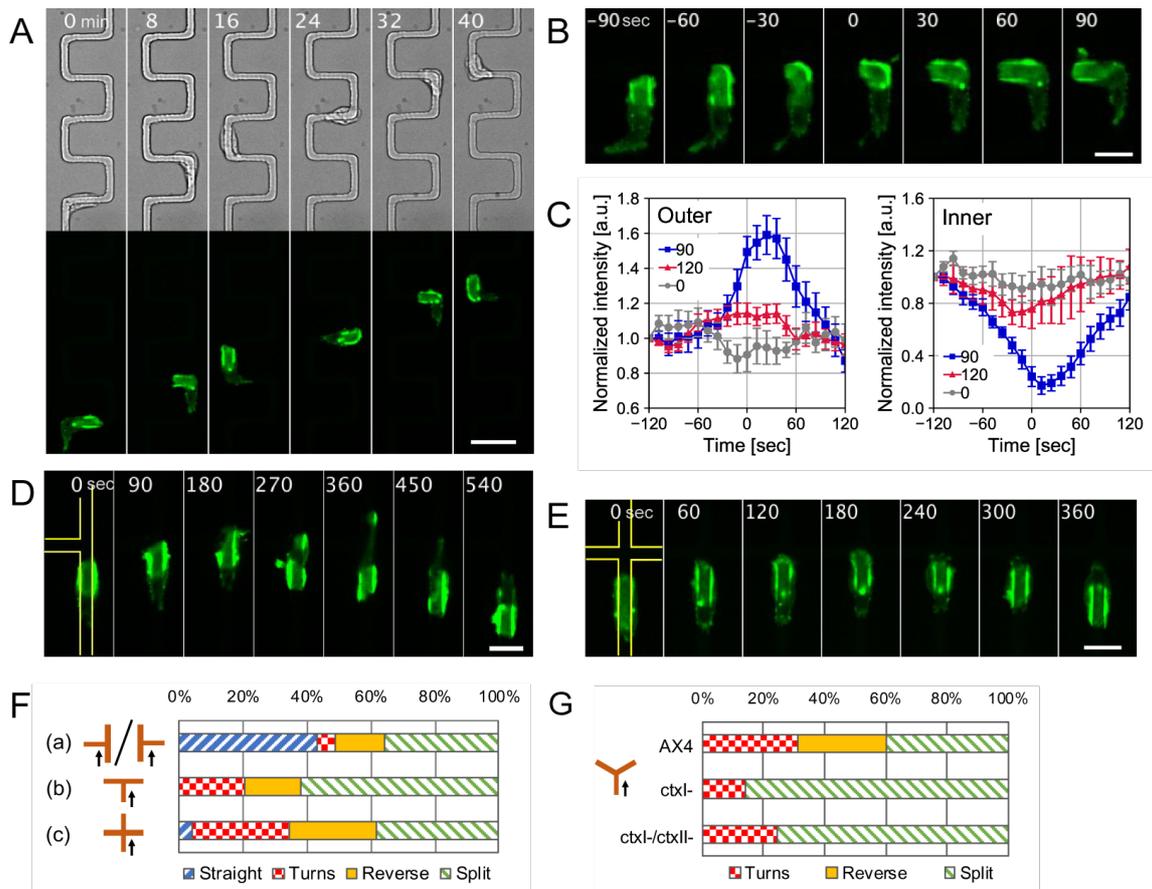


Fig 2-18: 曲がり角や分岐のあるリッジ上でのアクチン波の方向転換

(A) 90°の角度でジグザグに曲がったリッジ（高さ 1.5 μm 、幅 4 μm ）に沿ってアクチン波を伴って移動する細胞の透過光画像（上）と共焦点画像（下; GFP-Lifeact, 基質底面から高さ方向 2 μm の幅を 0.5 μm 刻みで取得した Z スタックの最大値投影像）。(B) 曲がり角を通過する過程の拡大像。(C) 曲がり角の外側（左）と内側（右）に沿った GFP-Lifeact 蛍光量の時間変化（平均値 \pm 標準誤差）。アクチン波の重心が曲がり角の直上に来た瞬間を時刻 0 sec とした。角度は 90°（青）、120°（赤）、0°（グレー）。順に N = 16, 21, 11 events。(D, E) ト字形 (D)、十字形 (E) の分岐点におけるアクチン波の方向転換。黄色線はリッジの輪郭を示す。画像中の数字は時刻を示す [単位: (A) min, (B, D, E) sec]。スケールバー: (A) 20 μm , (B, D, E) 10 μm 。(F) ト字形、T 字形、十字形 (a-c) の分岐点における AX4 株のアクチン波のふるまいの分類とその発生率。N = 84, 29, 76 events。(G) Y 字形の分岐点における AX4 株、*ctxI*-株、*ctxI/ctxII*-株のアクチン波のふるまいの分類とその発生率。N = 58, 43, 57 events。

リッジ上の分岐点では、アクチン波の分裂も観察された (Fig 2-18F, G, "Split")。アクチン波の分裂に関しては Y 字形に分岐したリッジを使用して調べた。十字形よりも分裂パターンが少なく、3 回対称性によって T 字形よりデータ取得効率がよいためである。Y 字形の分岐点でアクチン波の分裂が生じたのは、AX4 株で 40.0 %、*ctxI*-株で 86.0 %、*ctxI/ctxII*-株で 75.4 % だった (Fig 2-18G, "Split")。分裂後の波はそれぞれリッジに沿って伝播し、膜を伸展させた (Fig 2-19A, 150 ~ 450 sec)。その後、一方の波が消滅してもう一方はリッジ上を伝播し続けた (同図, 600 ~ 750 sec)。途中で片方の波が伝播方向を反転させることは無く、また細胞体が分裂することもなかった。膜の伸展中は徐々に伸展速度が低下し、細胞体が最も伸展したときに波が消滅する側では停止した (Fig 2-19B, 左)。リッジの分岐点での分裂時に波のサイズは非対称となり、ほとんどの場合その大小関係はその後維持され (Fig 2-19C)、波の大きい側が常により伸展し (Fig 2-19D)、小さい方の波が消滅した。波が消滅した直後には伸展していた膜が即座に収縮することや (Fig 2-19A, 600 ~ 750 sec)、膜張力の低い *ctxI*-株、*ctxI/ctxII*-株では膜の最大伸展率が大きくなったことから (Fig 2-19E)、分裂した 2 つの波は細胞膜の張力を介して相互に膜の伸展を抑制していると考えられる。また、前述したように *ctxI*-株、*ctxI/ctxII*-株ではアクチン波がリッジの外側へ広がりやすいが (Fig 2-19A, 0 sec)、波の分裂中には側方への膜の伸展も抑制され (同図, 450 sec)、波の消滅直後には再び外側へ広がった (Fig 2-19A, 750 sec)。波の分裂時、非分裂時それぞれでリッジの外側に広がった細胞の面積を測定すると、両者の比 A_S/A_{NS} は、AX4 株で 1.06 ± 0.04 (N = 8 events)、*ctxI*-株で 0.68 ± 0.04 (N = 14 events)、*ctxI/ctxII*-株で 0.71 ± 0.04 (N = 17 events) となった (Fig 2-19F)。これらの観察結果から、細胞膜の張力の上昇が膜の伸展とアクチン波に対して抑制的に働くこと、および膜張力がリッジへの波の閉じ込めに関わることが示唆される。

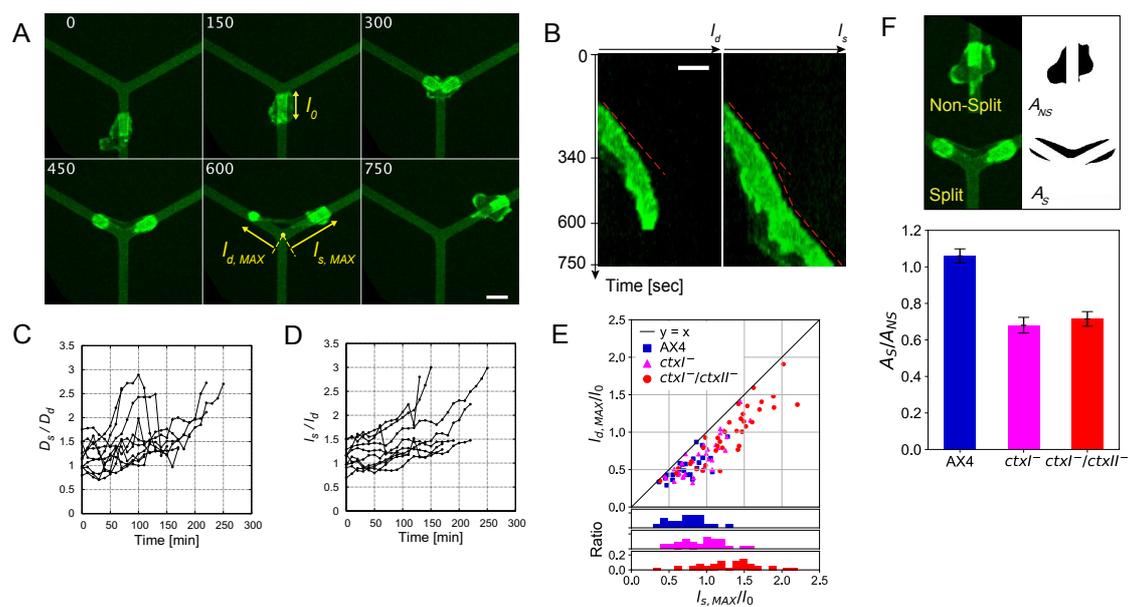


Fig 2-19: Y 字形に分岐したリッジ上におけるアクチン波の分裂と膜の伸展

(A) Y 字形に分岐したリッジ（高さ $1.5 \mu\text{m}$ 、幅 $4 \mu\text{m}$ ）上の *ctxI/ctxII*-細胞の共焦点画像（緑: Lifeact-neon, SU-8 の自家蛍光）。数字は時刻を示す [単位: sec]。B: A 中の左右のリッジに沿ったキモグラフ（添字 s: survived, d: disappeared）。画像は時間軸方向へ 4 倍に拡大したもの。(C, D) キモグラフから測定した分裂後の 2 つの波の直径の比 (C) と膜伸展率の比 (D) の時間発展。データは AX4 株のもの。(E) AX4 株、*ctxI*-株、*ctxI/ctxII*-株での最大膜伸展率 $l_{s,MAX}/l_0$ 、 $l_{d,MAX}/l_0$ のプロット。各量の定義は A 中に示した。順に $N = 23, 32, 36$ cells。(F) 波の分裂時、非分裂時におけるリッジ外の細胞面積の比（平均値 \pm 標準誤差）。左から $N = 8, 14, 17$ events。

酵母粒子に対する推進力の発生

以上の観察は、基質表面の形状によってF-アクチンのパッチ状局在の形成と伝播および膜の伸展が誘導されることを示している。細胞がリッジ上にとどまるためには基質の凸曲面へ向かう膜伸展力が発生していることが必要と考えられることから、凸曲面を有する自由粒子に対しては推進力を発生することが予想された。観察を容易にするために細胞性粘菌と酵母粒子（直径 $\sim 5 \mu\text{m}$ ）をPDMSチャンバー内（ガラス-PDMS 間距離 $7 \mu\text{m}$ ）に導入して高さ方向の運動を制限し、細胞が粒子に接触したときの応答を観察した。増殖期の細胞が酵母粒子と接触したとき、大きなF-アクチンのパッチ状局在の形成とカップ状の膜の伸展が生じ、ほとんどの場合、粒子は取り込まれずカップは退縮した（Fig 2-20A）。この膜伸展の過程で粒子は細胞から離れる方向へ動くことが多かった。集合期の細胞では酵母粒子との接触領域にF-アクチンのパッチ状局在がより持続して形成され、酵母を追いかけるような移動が観察された（Fig 2-20B）。パッチ状局在の持続時間は増殖期の $190 \pm 40 \text{ sec}$ （ $N = 7 \text{ patches}$ ）に比べて集合期では $345 \pm 108 \text{ sec}$ （ $N = 8 \text{ patches}$ ）と長くなった（Fig 2-20C）。また、酵母粒子との接触面から細胞質側への顕著なアクチン後方流が観察された（Fig 2-20B, 120 sec など）。

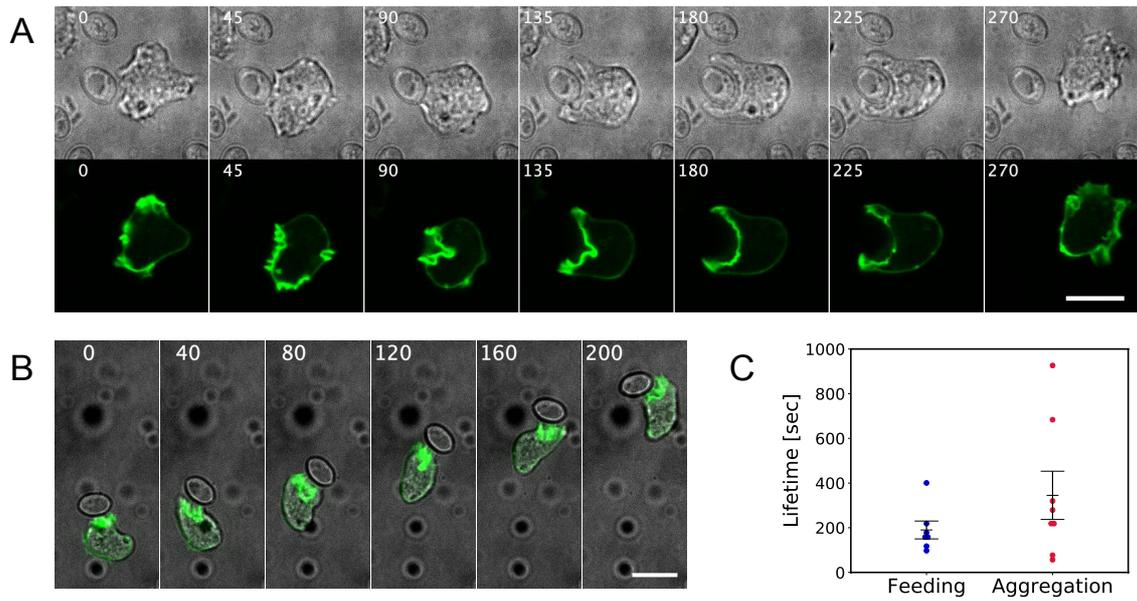


Fig 2-20: 酵母粒子へのカップ形成に伴う細胞の重心移動

(A, B) 酵母粒子と接触した AX2 細胞の透過光画像と共焦点画像 (Lifeact-neon)。細胞は PDMS チャンバー内に導入して観察した。ガラス-PDMS 間距離は $7\ \mu\text{m}$ 。(A) 増殖期の細胞。(B) 集合期の細胞。数字は時刻を示す [単位: sec]。スケールバー: $10\ \mu\text{m}$ 。(C) 酵母粒子との接触面に形成される F-アクチンのパッチ状局在の持続時間 (平均値 \pm 標準誤差)。左から $N = 7, 8$ patches。

4. 考察

本研究では、細胞性粘菌の底面に形成されるアクチン波のふるまいに基質表面の形状が与える影響を解析した。マイクロメートルスケールの構造化された基質上においてアクチン波の生成率が上昇し、生成位置は溝よりもリッジ側へ偏る傾向が見られた。また、生起後の波は基質の凸曲面へ誘導され、凹曲面からは排除される傾向があることを明らかにした。興味深いことには、基質の曲率に依存したアクチン波の伝播に伴い、細胞の直進運動や方向転換、細胞前端の分岐が観察された。アクチン波を伴った細胞のリッジ構造への高い追従性は、PI3K の阻害 (Fig 2-14A-D)、基質接着 (Fig 2-14E-G)、走化性誘引物質 cAMP による刺激 (Fig 2-15) によってアクチン波を消滅させることで失われた。先行研究^{116,117}で報告されているナノスケールの地形に沿った F-アクチンの伝播を伴う細胞の移動は PI3K 非依存の現象であり、今回明らかになった過程とは異なると考えられる。また、増殖期の細胞ではアクチン波が基質表面に存在するの円形の井戸 (直径 1.8-3.0 μm 、深さ約 5 μm) にトラップされ、その内壁に沿ってリング状の構造を形成することが報告されている¹⁴⁶。この現象は本研究で明らかにしたアクチン波の凸曲面への走行性と凹曲面からの排斥性によって説明される。すなわち、アクチン波が井戸の内壁に沿って広がるが、井戸の底面には伝わらないことでリング状になると考えられる。以上から、基質表面のマイクロスケールのリッジ構造が PI3K に依存したアクチン波の形成を促進し、アクチン波の伝播とそれに伴う膜の伸展を誘導すると結論した。以下、結果に対する考察を詳しく述べる。

アクチン波

2000 年に細胞性粘菌で発見されて以来¹⁴⁷、多くの生物種でアクチン波と似た現象が報告されている¹⁴⁸。細胞性粘菌では、Ras GTPase や PI(3,4,5)P3 などと共局在する直径数 μm のパッチ状/スポット状の F-アクチン領域が細胞底面を伝播し、細胞の変形を誘起する^{46,149}。好中球では細胞前端にパッチ状の F-アクチン領域が形成され、空間的に伝播することで細胞の移動や走化性に関わる⁵⁹。神経細胞では、細胞体から突起の先端へ向かって伝播するアクチン重合反応が観察され、分子の輸送や突起伸長に関わると考えられている^{150,151}。繊維芽細胞のような間葉系細胞では、細胞の背側に自発的あるいは成長因子誘導的に F-アクチンのパッチ状局在とともにカップ状の膜の突出が形成される。これは円形背側ラッフル (Circular Dorsal Ruffles, CDRs) と呼ばれ、マクロピノソームの形成に関わる^{152,153}。免疫グロブリン G (Immunoglobulin G, IgG) をコートした基質上に置かれたマクロファージでは、細胞底面に PI(3,4)P2 のパッチ状局在と

F-アクチンのリングが形成される¹⁵⁴。この現象は Frustrated phagocytosis とも呼ばれている。カエルの胚やヒトデの卵母細胞では、細胞膜上の一面に RhoA と F-アクチンの波が伝播し、Cdk1 による制御を受けることなどから、細胞分裂における収縮力の発生や分裂溝の形成に関わるものと考えられている¹⁵⁵。ラットの脂肪細胞の底面には~1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の非常に速い波の伝播が観測され¹⁵⁶、分裂溝の位置決定や¹⁵⁷、F-BAR タンパク質やクラスリンとの関係からエンドサイトーシスに関わることが示唆されている¹⁵⁸。また、魚の表皮細胞であるケラトサイトでは、RGD ペプチドを高密度にコートした基質上において膜突出領域が左右方向へ伝播する現象が生じる^{159,160}。このように、アクチン波の一過的かつ比較的大きな構造は、速くて大きな膜変形を伴う細胞の移動やマクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシスに関わるものとして考えられている。本研究では、細胞性粘菌におけるアクチン波の形成と伝播が基質表面の曲率に依存することを示した。アクチン波はこれまで平坦な基質上で観察されていたため、水平方向への細胞膜の変形との関係が解析されてきたが、本研究で観察したリッジ上のアクチン波の局在位置と膜形態から (Fig 2-10E, 下)、アクチン波が存在する細胞膜上ではカップ状の膜形態を形成するような力が生じていることが示唆される。このことは細胞底面のアクチン波とフィーディングカップの分子構造上の類似性 (Fig 2-1) に加えて、細胞性粘菌のアクチン波がフィーディングカップの形成初期段階の構造であることを支持する。

基質上の曲面によるアクチン波の伝播方向の制限

細胞性粘菌のアクチン波、ファゴサイティックカップ、マクロピノサイティックカップの形成では PIP3 と Ras が構造上の核であると考えられている¹⁶¹。細胞性粘菌にはクラス I に分類される PI3K が 5 種類存在する。そのうち PI3K1, 2 はマクロピノサイティックカップ形成の初期段階における PIP3 生成に必要であり、PI3K4 はカップを閉じてマクロピノソームへと作り変える段階に関わっている¹²²。PI3Ks は RasG および RasS と相互作用し、PI3K1 の N 末部分は Ras 結合ドメイン (Ras binding domain; RBD) とは独立に F-アクチンと結合する¹²² (Fig 2-13)。Ras、PI3K、F-アクチン間のポジティブフィードバック経路がアクチン波の形成に関わると考えられている^{46,130}。イノシトールリン脂質 PIP3 は PI3K に媒介されて生成・増幅されることで細胞膜上に円形のパッチ状局在を形成し、SCAR 複合体はそれを縁取るような局在を示す⁵¹。F-アクチンは PIP3 パッチの縁において特に高密度に重合され、この位置でアクチンフィラメントは Arp2/3 を核として細胞膜へむかう向きに伸展していることから⁵²、円環状の膜突出力が発生していると考えられる。細胞底面のアクチン波においては基質の存

在によって、この突出力による膜の変形は観測されないが、細胞上方ではマクロピノサイティックカップの形成に関与すると考えられ、膜の伸展に伴ってこの円環状の突出力が徐々に中心向きに傾くのであれば、カップは成長してやがて閉じることが理論的に予想されている [斉藤稔博士, private communication]。細胞底面においてもこのようなカップが閉じる方向への膜の伸長を仮定すると、アクチン波の存在する領域は凸曲面に対して親和的である一方で、反対方向への変形には強い制約がかかるため、波の伝播の停止や消滅が起きることで凹曲面が避けられると考えられる。また、*ctxII*-株や *mhcA*-株では凹曲面での波の伝播に対する抑制が弱かったことから、膜張力が関与することが示唆される。ミオシン II を欠損した細胞性粘菌は酵母¹⁰⁴やバクテリアに対する貪食能を失ってはいるが、バクテリアプレート上での増殖は遅いことが知られている¹⁶²。マクロファージでは、ミオシン II はファゴサイティックカップと粒子の密着性を維持するために必要と言われている^{163,164}。

細胞膜の曲率に依存した局在を示すタンパク質が曲面上のアクチン波の伝播方向の決定に関わる可能性も考えられる。BAR タンパク質は細胞膜の曲率に依存した局在または曲率をもった膜構造の形成に関与することが知られている^{39,40}。細胞性粘菌が出芽酵母に対してファゴサイティックカップを形成する際、酵母表面のくびれ部分に F-アクチンが集積して酵母が切断されるが、そのくびれ部分には I-BAR タンパク質である IBARa の局在が観察されている^{104,165}。膜の形状と分子局在の関係についてはナノスケールのエンドサイトーシスの過程でよく研究されている。N-BAR ドメインをもつタンパク質や、クラスリンやダイナミンは、高さ 200 nm、直径 50 nm のナノコーンによって陥入変形させられた細胞膜上へ局在を示す¹³¹。ナノピラー上に置かれたメラノーマ細胞では、クラスリンやダイナミンを含むエンドサイトーシス関連のタンパク質が直径 200 nm 以下のピラーによって陥入した細胞膜上に局在し、この現象には正負の曲率選択性が示されている¹³²。細胞膜の微小変形とタンパク質局在の相互依存性は、ラット肥満細胞のアクチン波に関する研究で解析されている^{156,158}。細胞性粘菌ではアクチン波の開始点にクラスリンが共局在することもあれば、そうでないこともあるため、クラスリンの膜局在は必須ではないと考えられる⁴⁹。膜曲率に依存したタンパク質が基質上の凸凹曲面に局在し、アクチン波の形成や伝播に関わっているかもしれないが、リッジ上のアクチン波における分子の空間的な配置関係は平坦な基質上の場合と変わらなかったため (Fig 2-13)、波の伝播方向の決定に膜曲率感知タンパク質が関わるにしてもその配置関係を保つように作用する必要があると考えられる。

貪食過程との関係

細胞性粘菌のアクチン波は、液体培養株におけるファゴサイティックカップ、マクロピノサイティックカップ形成の亢進に関係したものと考えられている⁵¹。液体培養株では *axeA*、*axeB* に変異があり、このうち *axeB* は RasGAP の NF1 の遺伝子として同定されている¹²⁶。NF1 の欠損によって、ファゴサイティックカップ、マクロピノサイティックカップのサイズが大きくなり、形成頻度が上昇する¹²⁶。これに関連して、非液体培養性の野生株 NC4 では、アクチン波は存在しないとされていた⁵¹。しかし、先行研究で言われているように平坦な基質上ではアクチン波はめったに形成されなかったが、リッジ上においてはその形成頻度が大きく上昇することが見出された (Fig 2-12)。基質上には細胞と二員培養しているバクテリアが少量ではあるが混入しているため、バクテリアやその分泌物と基質の曲率の効果が両方合わさって作用することも考えられるが、液体培養株である AX4 細胞でもアクチン波の形成位置はリッジ上に偏ることが観測されたことから、その可能性は低いと考えられる。基質表面には何らのコーティングも施していないことから、この結果は物理的な要因によってアクチン波の形成が促進されることを示している。アクチン波の核形成に重要と考えられる PI3K は、PI(3)P の生成を指標とした場合に、曲率半径が数十-200 nm の範囲で高い酵素活性を持つことが示されている¹⁶⁶。また、ガラスビーズ表面に PI(4.5)P2 をコートしてカエル卵の抽出液中でアクチン重合速度を測定した場合、直径 150-400 nm のビーズに比べて直径 1 μm のビーズ上では 2-3 倍の上昇効果が見られる¹⁶⁷。このような脂質膜の曲率に依存した酵素活性が関わるのかもしれない。動物の免疫細胞では、対象表面に存在する抗原の認識が貪食を開始するトリガーとなる。無差別な貪食は生体の崩壊につながる恐れがあるため、そのような抗原特異的に応答を制御する機構が必要と考えられる。しかし、マウスの樹状細胞や細胞性粘菌が無修飾のポリスチレンビーズを取り込むことが可能であることは、貪食の開始には受容体を介したシグナルとは別に物理的な要因が関わることを示している¹⁶⁸。

走化性と貪食はともに細胞の摂食や免疫応答に関わる過程である。細胞はバクテリアの分泌する誘因物質を検出して近づいていき、接触するとこれを取り込む。走化性と貪食はバクテリアへ向かう仮足の形成によって媒介される過程である点で類似性がある¹⁶⁹。最近の研究から、好中球細胞の G タンパク質共役受容体が、バクテリアの分泌する fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) ペプチドへの走化性とバクテリアの貪食の両方に関わることが示唆されている⁸⁶。細胞性粘菌でも G タンパク質共役受容体 fAR1 が、バクテリアの分泌する葉酸とバクテリア表面の主要構成物質であるリポ多糖の受容体として機能し、走化性と貪食の両方に関与することが示唆された^{84,85}。ただし fAR1 は

葉酸への走化性には重要であるものの貪食に必要ではないことが示されている¹⁷⁰。走化性と貪食は両者を媒介する仮足の種類に違いがあると考えられるが、それらを構成する分子群には重なる部分が多く、現状ではその区別が明確に理解されているわけではない。仮足レベルで観察される走化性誘因物質への応答性の違いはその分類のための情報となる。細胞性粘菌の葉酸への走化性はマクロピノサイトーシスとは同時に起こらず、PIP3 局在を伴わない仮足は葉酸の高濃度側へ向かって多く形成されるが、マクロピノサイティックカップの形成方向にはバイアスが見られない¹⁷¹。本研究で示したアクチン波と cAMP への走化性の排他性もこれと同様の傾向を示す結果である (Fig 2-15)。巨大化させた細胞では、アクチン波が存在する状態で cAMP への走化性が起こることを示唆する報告がある¹⁷²。一つの細胞内に形成される異なるアクチン構造の間で共通の分子や細胞膜が必要とされる場合、それらの量的な制約が働くと考えられる。巨大化させた細胞ではそのような制約が弱いのかもしれない。

アクチン波の伝播を伴うリッジ追従的な細胞の移動は cAMP への走化性とは独立に生じた。アクチン波の分子構造はファゴサイティックカップを形成するパッチ状局在と相似であることから、貪食の過程が持続することによって細胞の重心移動が生じていると考えられる。集合期の細胞では、増殖期にくらべて酵母粒子との接触面に形成される F-アクチンのパッチ局在の持続時間が長くなり、粒子に追従するような運動が生じることが観察された (Fig 2-20B, C)。貪食と同種細胞間の追従運動にはアナロジーがある。細胞性粘菌のマウンド形成期には、予定孢子細胞と予定柄細胞の2種の分化細胞が集合塊の内外に選別される。これは分化状態によって細胞間の追従傾向の強さと cAMP への応答性が異なることによるものと考えられている⁸²。貪食と細胞間追従運動を駆動するのに必要とされるアクチン構造の分子組成には違いがあるだろうが、細胞-粒子間または細胞-細胞間の接着面に形成される PIP3 と SCAR 複合体の配置関係は共通していることが指摘されている⁵¹。進化の観点から両者の関係を探ることは興味深い問題と思われる。

5. 第1部のまとめ

貪食や飲作用と呼ばれる過程では、外界から栄養源を取り込むためにマイクロスケールのカップ状の膜構造（フィーディングカップ）が形成される。貪食の効率は対象となる粒子のサイズや形状に依存することから、カップ構造の形成や発達の過程が、粒子表面の地形によって規定されることが示唆されていた。細胞性粘菌の底面に形成されるアクチン波は、Ras や PIP3、F-アクチン等の空間的な配置関係や遺伝学的な研究から、フィーディングカップ形成の初期段階と同一の分子構造であると考えられている。アクチン波は細胞底面に形成される構造であり、顕微鏡による解析が比較的容易であることから、本研究ではアクチン波を主な解析対象とし、微細加工によって作出したマイクロスケールの地形を有する基質上において、基質表面の形状とアクチン波の生成、伝播、消滅の過程を詳細に解析した。その結果、基質表面のリッジ形状（山型のライン構造）によってアクチン波の生成率が上昇することを見出し、これが PI3K に依存した反応であることを示唆した。また、アクチン波の伝播方向が基質表面の地形によって制約を受け、凸曲面に沿うように伝播する一方で、凹曲面を横切らない傾向があることを明らかにした。出芽酵母の表面をカップが伸展する際、くびれの部分で膜の伸展が停止することが観察されているが^{104,165}、アクチン波の伝播が凹曲面で停止することはこれと同様の傾向であり、凸曲面に沿って伝播することは今回新たに明らかとなった性質である。アクチン波の伝播に伴い、マイクロスケールのリッジに沿って細胞が直進性の高い移動を示すことも観察された。この現象は PI3K 依存性であるため、数百 nm スケールのリッジに沿った PI3K 非依存性の運動^{116,117}とは異なるものである。以上の結果は基質表面のコーティングを必要としないものであることから、受容体を介したシグナルとは別に、基質表面の形状がフィーディングカップの形成と発達の制御因子として働くことを示唆する。

第2部 アメーバ細胞形態の基質接着依存性

1. 背景

真核細胞の多くは膜の伸展と収縮の素過程からなる変形を示す。アメーバは「変化」を表すギリシャ語に由来し、狭義にはこのような変形を示す原生生物、広義には細胞一般を指す。また、上皮・間葉系の細胞と区別して、免疫細胞や癌細胞のように活発な変形と速い移動を示す細胞を指すこともある。ここでは数 μm スケールの細胞膜の突出構造である仮足 (Pseudopod) の形成を伴う変形をアメーバ運動とし、これを示す細胞をアメーバ細胞と呼ぶことにする。細胞の形態変化は、移動や貪食、細胞質分裂など多くの機能と関わるものである。細胞の移動は形態変化にもとづくため、その速度や直進性といった運動特性は膜の伸展と収縮のダイナミクスに直結する。細胞の形態は時々刻々と移り変わるが、くりかえし出現する形状のパターンがあることから、細胞には典型的な形態があるとみなすことができる。繊維芽細胞は紡錘型をとり、神経細胞は軸索や樹状突起のような特徴的な構造をもつ。上皮細胞や魚のケラトサイトは横に広がった大きな仮足を形成し、半月型の一定の形状を保って移動する^{54,173}。白血球の仮足はこれよりも横方向に狭くなり、細胞体は比較的円形に近い^{59,67}。細胞性粘菌は増殖期にはやや円形であるが、集合期には縦に長く伸びた形態となる。このように真核細胞の形態は実に多様であるが、いずれもよく保存されたアクチン骨格系のダイナミクスに基づいた表現型であることを考えれば、これらを統一的な視座に立って理解することが可能であると期待される。

同一の細胞種でも異なる形態をとることがある。遺伝要因は細胞の形態に大きな影響を与え、特定の遺伝子の過剰発現や破壊による表現型として細胞形態に変化が生じることがこれまでによく観察されてきている。アクチンの重合制御に関わる WASP をノックダウンした HL60 細胞は、好中球様に分化させた状態でラメリポディアの形成が損なわれ、大きな突起構造を形成するようになる¹⁷⁴。細胞性粘菌では、低分子量 GTPase である Rap1 の常活性型過剰発現株は基質に大きく伸展するようになり¹⁷⁵、*amiB* や *racE* の遺伝子破壊株ではケラトサイトのような横方向に広がった形態をとることがある^{8,176}。また多細胞生物において、細胞の分化状態によって形態や運動性が大きく異なることは明らかである。Bakal らは、*Drosophila* の BG-2 細胞を使って細胞の形態形成に関わる遺伝子の過剰発現株やノックダウンを施した細胞の画像から形態の特徴量を評価し、それをニューラルネットワークに基づいた分類器の出力によってクラスタリングすると、細胞の前端や後端の形成因子、基質接着関連因子等によって

分離されることを示した¹⁷⁷。すなわち、形態を指標としてその細胞にどのような遺伝子変異が生じているかある程度推測することが可能となっている。

一方で、細胞の形態は外的要因によっても強い影響を受ける。走化性誘引物質による刺激は細胞の伸展を促進する。細胞性粘菌は cAMP の濃度勾配によって極性の方向づけを受けるとともに、cAMP 源の方向へむかう大きな伸展を伴った移動を示す¹⁷⁸。T 細胞は間質細胞表面に提示されるケモカイン CCL19、CCL21 を受容することによって前後方向への伸展が促進される⁶³。血管内皮細胞では、血流のせん断応力や血管径の弛緩と収縮運動によって極性が強化され、血管走行方向に沿った紡錘型の形態となる^{93,179}。上皮細胞組織ではカドヘリンを介した細胞間の強い接着が形成されているが、細胞間接着能の喪失に伴い、遊走性が獲得される¹⁸⁰。この現象は上皮-間葉転移 (Epithelial-to-Mesenchymal Transition; EMT) と呼ばれ、形態形成や癌の浸潤と関連すると考えられている。基質接着面の広さはケラトサイトの移動速度を強く規定するため、集団運動において辺縁部の細胞と内部に位置する細胞の運動性の違いをもたらす原因として考えられている¹⁸¹。基質の接着性や硬さもまた、細胞の伸展性や運動性に強い影響を与える^{90,91,159,160,182}。環境要因は受容体として機能する分子を介して細胞骨格系に変調をもたらし、細胞の形態変化を生じさせる。したがって、たとえば生体内の細胞の形態を見ることでそれが遺伝子変異のある癌細胞であるか否かを早期に推し量ることは現時点では難しい。環境要因の種類と強度によって細胞の形態にどの程度の変化が生じるかを調べることは、細胞骨格系の動作原理についての理解を進めるために有用であり、表現型の多様性の理解にも寄与すると考えられる。また、病理診断上の目的においても重要である。

数値実験では、一つの数理モデル内においてパラメータを変えることで実際の細胞に似た多様な形態を演繹することがいくつかの研究で成功しているが¹⁸³ [井元大輔, 2018 年度博士論文]、実験的な成果はまだ少ない。一つの例は、ポリエチレングリコール (PEG) のコートによって細胞の接着を阻害した基質を用いて、上皮系や間葉系の細胞を挟み込んだ場合に、これらの細胞が前後軸方向に安定な極性を形成して通常の約 10 倍の速さで移動するようになるというものである⁶¹。これは間葉-アメーバ転移 (Mesenchymal-to-Amoeboid Transition; MAT) と呼ばれており、同様の形態は細胞の収縮性を強める処理をしたときにも出現する⁶⁴。この「アメーバ」形態では細胞前端にブループが安定に形成され、非常に直進性の高い移動を示すようになる。したがって本論文で定義するところのアメーバとは異なるが、状況に依存して細胞の仮足形態および運動モードが劇的に変化することを示している。それでは、逆にアメーバ細胞を上皮系や間葉系の細胞に近づけることは可能だろうか。上皮・間葉系の細胞では前端

部に安定なラメリポディアが形成されるが、これは細胞性粘菌をはじめとするアメーバ細胞の一過的な伸展収縮を示す仮足動態とは顕著に異なる¹⁸⁴。いずれの仮足も Arp2/3 複合体が媒介する F-アクチン樹状構造の構築と解体の反応によって形成されるものであり、その制御には WASP や SCAR/WAVE 複合体が関与する点で共通している^{18,174}。上皮・間葉系の細胞とアメーバ細胞の大きく異なるもう一つの点は、基質接着性である。前者は基質に強く接着して接着斑をよく発達させるのに対し、細胞性粘菌や免疫系の細胞では接着斑は小さく、あまり発達しない。基質の接着性は仮足の動態に影響を与える重要な要因である。フィブロネクチンや RGD ペプチドのコート濃度を変えることによって、インテグリンを中心とする接着斑の安定性や分布が変化し、仮足の伸展速度や幅などに影響が生じることが上皮細胞やケラトサイトを用いた実験で示されている^{159,160,182}。

本研究では、細胞性粘菌および好中球様に分化させた HL60 細胞を使用して、細胞形態における基質接着への依存性を調べた。細胞性粘菌の基質接着を強めることで仮足の形態が大きく変化し、動物の上皮・間葉系細胞が形成するラメリポディアとよく似た形態となることを見出された。強接着条件における細胞性粘菌の仮足形態の変化は WASP や SCAR 複合体、基質接着分子の局在性の変化を伴うものであり、仮足の形成に関わる分子構造においても動物細胞のラメリポディアと似た特徴を備えていた。ヒト好中球様細胞では、レクチンを用いた基質接着の促進によって、同様に Arp2/3 依存性の F-アクチン重合が促進されることが示唆された。またフィブロネクチンとの併用により細胞性粘菌に似た形態をとることも見出された。

2. 方法

細胞-基質間接着の促進

洗浄したカバーガラス（第1部, 方法）をフレイムシールを用いてφ35 mm ガラスボトムディッシュの底に貼り付けることによってチャンバーを作製した。チャンバー全体に大気プラズマ処理（400 mTorr, 2 min）を施し、表面の濡れ性が向上したガラスに対して、以下のコーティング処理を行った。

・WGA（富士フイルム和光, 126-02811）

WGA は 1 mg/ml で超純水に溶かして分注し、-30 °Cで保存した。DB で 10 ~ 300 μg/ml に希釈した WGA 溶液 100 μl を滴下してガラス表面全体を覆い、22 °Cで 1 時間静置した後、上澄み液を除去して細胞の観察に使用した。

WGA（Wheat germ agglutinin, コムギ胚芽凝集素）はコムギから単離された分子量 36 kDa の糖結合タンパク質（レクチン）で、2つの同一サブユニットから構成される。N-アセチルグルコサミンやシアル酸と結合することが知られており、主に細胞膜表面に存在する糖鎖の探索に用いられてきた。細胞性粘菌では、WGA の標的のうち主要なものとして集合期に発現する CsA（Contact site A, or GP80）が同定され、解析されている¹⁸⁵。糖タンパク質 CsA は N 末側に相同な球状のドメインが 3 つ連なり、その各ドメイン内にある 8 塩基のペプチド YKLVNDS を介した同親性結合によって細胞間接着に寄与する¹⁸⁶。C 末端の 25 アミノ酸残基はリン脂質と共有結合し、細胞膜へのアンカーとして機能する（GPI anchor）¹⁸⁷。細胞質側にはドメイン構造を持たないため、細胞内のシグナル伝達に直接関与する可能性は低いと考えられている。好中球の表面には L-セレクトリンが恒常的に発現している。L-セレクトリンは糖鎖 sLe^x を含み、これはシアル酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、フコースからなる 4 炭糖である。このうちシアル酸と N-アセチルグルコサミンが WGA の結合標的の候補として挙げられる。

・PLL（Poly-L-lysine, Sigma, P4832-50ML）

PLL 溶液は 1%濃度（原液）で 4 °Cで保存した。超純水で 10 ~ 100 μg/ml に希釈した PLL 溶液 100 μl を滴下してガラス表面全体を覆い、22 °Cで 1 時間静置した後、上澄み液を除去して大気中で約 2 時間静置して表面を完全に乾かし、細胞の観察に使用した。

PLL は正電荷を帯びたポリマーであり、負に帯電した細胞膜とガラスの間の相互作用を静電的に媒介する。細胞の基質接着を向上させる目的でよく使用される。

・CTK (Cell-tak, 富士フイルム和光, 646-54971)

CTK 溶液は 1.95 mg/ml 濃度で 5 % 酢酸に溶けた状態で 4 °C に保存した。pH が中性～弱塩基性になると接着性となるため、緩衝液で希釈した後は素早く操作する。超純水で 1 ~ 400 µg/ml に希釈した CTK 溶液 20 µl を滴下してガラス表面全体を覆い、大気中、室温で 30 分以上静置して表面を完全に乾かし、細胞の観察に使用した。

CTK はヨーロッパイガイ *Mytilus edulis* の足糸から抽出された接着性タンパク質である。足糸は、海中で岩盤や船底に付着した貝の表面に見出される粘着物質である。ガラス、プラスチック、金属、鉱物、木材、骨、細胞、その他の生物組織と強く結合することが知られている。足糸中に含まれる Mefp には L-ドーパやヒドロキシプロリンが多量に存在し、そのヒドロキシ基による水素結合や芳香環の π - π 相互作用、その他に静電相互作用などが接着メカニズムとして考えられているが、その非特異的な接着機構はまだよく理解されていない¹⁸⁸。

・FN (Fibronectin, Corning, 354008, ヒト血漿由来)

FN は 1 mg/ml で超純水に溶かして分注し、-80 °C で保存したストックを要時に融解して使用した。PBS で 10 ~ 300 µg/ml に希釈した FN 溶液 100 µl を滴下してガラス表面全体を覆い、22 °C で 1 時間静置した後、上澄み液を除去して細胞の観察に使用した。

FN は動物体内の ECM を構成する繊維状タンパク質の一種としてよく知られる。好中球細胞のインテグリンのリガンドとして使用した。

細胞株の作製

IBARa は先行研究¹⁶⁵を参考にしてプライマーを 5'-GCGAGATCTAAAATGTCAAAC GCTAAAAACAAC-3'、3'-GGAAGTTGAATATAACTTATGCATTGATCAGCG-5' と設計し、増殖期の AX4 細胞の cDNA を鋳型にして PCR で増幅した。これをカラム精製して細胞性粘菌の G418 耐性発現プラスミド pDM317 に挿入した。プラスミドはエレクトロポレーションによって細胞内へ導入し、形質転換株を作出した。以下の細胞株を今回新たに作製し、実験に使用した：PH-CRAC-Venus/Ax4、PakBCRIB-Venus/Ax4、PakBCRIB-GFP/Ax4、Lifeact-RFP/RalGDS-RBD-GFP/Ax4¹、PaxB-GFP/Ax4²、Lifeact-mRFPmars/PaxB-GFP/Ax4、VinA-GFP/Ax4²、GFP-IBARa/Ax4、Venus-WASPA/Ax4、GFP-LactC2/Ax4、HSPC300-GFP/Ax2、Lifeact-neon/*racE*-、HSPC300-GFP/*racE*-、HSPC300-GFP/*mhcA*-、HSPC300-GFP/*pten*-。GFP-LactC2 のプラスミド、Ax2 株、*racE*-null 株は Johns-Hokins 大学の飯島美帆博士、妹尾裕司博士からご供与頂いた。

¹中村允博士が作製した株を頂いた。

²藤森大平博士が作製した株を頂いた。

好中球の観察には RIKEN Bio Resource Center より入手した HL60 株 (RiKEN Cell Bank #0041) を使用した。細胞内 F-アクチンの観察のため、pLifeact-mTurquoise2 (Addgene, 36201) から制限酵素 XhoI と NotI によって目的配列を切り出し、pEBMultiNeo (富士フイルム和光, 057-08131) にリガーゼ (New England Biolabs, 0202) を使用して挿入した。これをエレクトロポレーション (NEPAGENE, Super Electroporator NEPA21) によって細胞内へ導入し、1 mg/ml G418 によって薬剤選抜をかけた。なお、pEBMulti ベクターは S 期に複製され、細胞分裂時に娘細胞へ分配されるため、宿主細胞内で長期にわたって保持される。これらの HL60 株は澤井研究室の石田元彦さんから頂いて使用した。

細胞の培養と顕微鏡観察

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* Ax4 株を 4 時間半の cAMP パルシングによって分化誘導して使用した (第 1 部 方法を参照)。コーティングを施したガラス基質上に細胞を導入し、基質とよく接着させるため、約 1 時間静置してから観察を開始した。

HL60 細胞株の培養には 10 % FBS と抗生物質 antibiotic antimycotic を添加した RPMI-1640 培地 (L-グルタミン、フェノールレッド、HEPES 含有, 富士フイルム和光, 189-02145) を使用し、 ϕ 70 mm シャーレで 37 °C、5 % CO₂ インキュベータにて培養した。細胞密度は 1×10^6 cells/ml を超えないようにして培養を続けた。観察の 6 日前に細胞密度 0.1×10^6 cells/ml の培地中に 1.3 % 濃度で DMSO (Sigma, D2650) を添加することで好中球様細胞への分化を誘導した。DMSO の投与から 3 日目に培地の交換を行った。観察時は 1×10^5 cells を遠心機にかけて (100 rcf, 2 min, 4 °C) 培地を除去し、緩衝液 HBSS (フェノールレッド含有, 富士フイルム和光, 082-09365) 1 ml で懸濁して 1×10^4 cells/cm² で基質上へ導入した。細胞を導入したチャンバーは 37 °C、5 % CO₂ インキュベータで 10 分間静置した後、蓋をした状態でパラフィルムをまき、37 °C 条件で顕微鏡観察を行った。細胞の輪郭抽出を簡便にするため、野生株の観察の際は膜標識剤として Vivid Fluor NeuroRed (富士フイルム和光, 222-02121) を濃度 2.5 μ g/ml でチャンバー導入前に懸濁液に投与して使用した。培地、DMSO、HBSS、膜標識剤は 4 °C で保存した。

・全反射照明蛍光顕微鏡 (Total Internal Reflection Fluorescence; TIRF microscopy)

屈折率の異なる媒質の界面に対してレーザー光を十分大きな角度で斜めに入射させると全反射が起きる。このとき界面の向こう側には光の浸み出しが生じる (エバネッセント光)。細胞試料を観察する際の標準的なセットアップでは、浸み出しの厚みは 100 nm 程度となる。このエバネッセント光を蛍光試料の励起光として使用するのが全反射照明蛍光 (TIRF) 顕微鏡である。TIRF 顕微鏡では観察可能な範囲がガラス面近傍のみに限られるが、その代わり上方からの蛍光シグナルを拾わないため、底面付近の SN 比の高い画像を取得することができる。

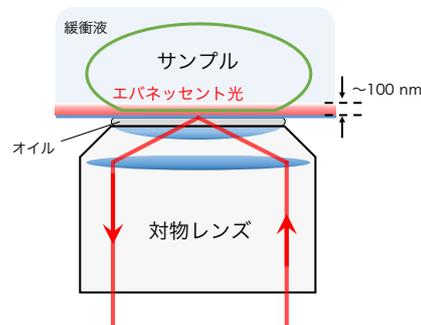


Fig 3-1: TIRF 顕微鏡の原理

薬理阻害

第 1 部に記述したものに加えて、以下の試薬を使用した。細胞を処理する際は、融解させたストックを DB で希釈して目的濃度の 2 倍に調製し、細胞が導入されたチャンバー内の溶液と等しい容量を滴下した。LatrunculinA は G-アクチンに結合することでアクチンの重合を阻害し、細胞内のアクチン構造を解体させる¹⁸⁹。Latrunculin A (富士フィルム和光, 125-04363) を DMSO に溶かして濃度 1 mM で調製し、分注して -30 °C で冷凍保存した。細胞を処理する際は調製した試薬を 30 秒ごとに数滴ずつ、5 分程度かけて滴下した。CK666 は Arp2/3 複合体の活性化状態への構造変化を阻害する¹⁹⁰。CK666 (Sigma, SML0006-5MG) を DMSO に溶かして濃度 100 mM で調製し、分注して -30 °C で冷凍保存した。SMIFH2 はフォルミンの FH2 ドメインを介した F-アクチンへの結合を競合的に阻害する¹⁹¹。SMIFH2 (Sigma, S4826-5MG) を DMSO に溶かして濃度 10 mM で調製し、分注して -30 °C で冷凍保存した。Dextrose (Difco, 215530) は DB に溶かして 100 mM で調製し、フィルター滅菌をして使用した。蛍光物質 Uranine (富士フィルム和光, 213-00092, 以下フルオレセイン) は DB に溶かして 1 mM で調製し、アルミ箔で遮光して 4 °C で冷蔵保存した。

画像解析

画像解析には ImageJ, Python, Excel を使用した。

基質上の細胞の形態評価のため、細胞性粘菌の場合は 1 分間隔で 50 分間、HL60 細胞の場合は 30 秒間隔で 30 分間のタイムラプス画像を取得した。ImageJ を用いて GFP-Lifeact または細胞膜標識剤の蛍光画像からマスクを作成し、各時刻の重心座標と、マスクを楕円近似したときの長軸および短軸の長さ、画像内における長軸の角度、面積、周囲長を得た。細胞重心の軌跡を前後計 5 フレームで平均して平滑化し、差分から各時刻の瞬間速度を計算して、長短軸のうち重心移動の方向により近いほうを前後軸、もう一方を左右軸とした。また、真円度 (Circularity) を $4\pi \times (\text{面積}) / (\text{周囲長})^2$ で計算した。これは 0~1 の値をとり、値が 1 に近いほど真円に近いことを示す指標である。重心速度、前後軸と左右軸の長さの比 (FB/LR)、面積、真円度の時系列データから時間平均値と標準誤差を算出してプロットした。細胞性粘菌のデータでは、次に Fig 3-3C のようにグラフ内に Bin を設定し、Bin 内に含まれる細胞の平均二乗変位 (Mean Square Displacement; MSD) を WGA コート濃度別に平均して、これにパーシスタントランダムウォークモデルの MSD 式 (第 1 部, 方法) をフィッティングすることで、フィッティングパラメータとして重心速度 S 、パーシスタンス時間 P を得た。好中球細胞のデータでは、重心速度と FB/LR の関係 (Fig 3-12C) について移動性の高い細胞のデータの傾向を抽出するため、速さで重みづけしたヒストグラムを付した。FB/LR = 1~5 を 0.125 刻みで区分けして、各 Bin (i) に含まれる細胞 ($j = 1 \sim n_i$) に関して $\sum_{j=1}^{n_i} v_{i,j} / \sum_{i,j} v_{i,j}$ をグラフの縦軸とした。

細胞の形態変化をさらに詳細に解析するため、細胞膜の局所的な変形と分子局在を解析した¹⁹²。HSPC300 または Lifeact の蛍光画像から細胞のマスクを作成し、マスク重心から Y 軸負の方向に引いた直線と輪郭が交じわる点を開始点として、時計回りにたどることで輪郭上各点の座標を取得した (Fig 3-2A)。次に、長さ P の輪郭を $N (= 100)$ 個の断片に分割した。各断片が整数個の輪郭点を含むようにするためには、 $D = P/N$ として整数 A, B を $A \leq D, B = A+1$ とするとき、 $P = Aa + Bb$ ($\text{all} \in \mathbf{Z}$) となる a, b は $a = BN - P, b = P - AN$ であるから、 m 番目の断片の長さは累積長が $D \cdot m$ と近くなるように a 個の A と b 個の B の中から選んで決めればよい。このように分割された断片 m を次の時刻の断片 m' と対応づけるため、まず断片 m に含まれるすべての輪郭点 (~10 個) の重心の座標を断片 m の座標とした。断片 m の始点と終点を結ぶ線分を接ベクトルと近似し、これと直交する外向きの法線ベクトルを得た。時刻 t_i の断片 m と時刻 t_{i+1} の断片 m' の重心座標の差分から断片 m の重心速度を計算し、その法線成分の二乗和 $\sum_{m=1}^N |\mathbf{v}_{m,m'} \cdot \mathbf{n}|^2$ が最小となるように m' を選んだ (Fig 3-2B)。細胞膜上の

分子の局在量はプローブの蛍光強度を指標とし、断片 m に含まれるすべての輪郭点から 2 pix だけ細胞内側へ入った厚み 5 pix の領域 (~ 50 pix) の平均輝度値を断片 m における輝度値とした (Fig 3-2C)。使用した画像では 1 pix = 0.067 μm である。これを、さらに細胞内側へ入った厚み 10 pix の領域の輝度値を全断片に関して平均した値で規格化してプロットした。各断片の重心速度 [$\mu\text{m}/\text{sec}$] と規格化された蛍光輝度値 [a.u.] を擬似カラーで表現し、断片 $m = 1 \sim 100$ に関する時間の関数として 2 次元ヒートマップでプロットした (Fig 3-5A, B など)。また、(重心速度, 蛍光輝度値) の組みの頻度を 2 次元ヒストグラムとして擬似カラーで表示した (Fig 3-5C, F)。重心速度、蛍光輝度値の 2 次元配列 ($M \times T$) を $X = S, F$ とするとき、時間方向の自己相関関数は、 $\Delta X_{m,t} = X_{m,t} - \langle X \rangle_{m,t}$ として、 $I_X(\Delta t) = \sum_{t=\Delta t}^{T-\Delta t} \sum_m \Delta X_{t,m} \cdot \Delta X_{t+\Delta t,m} / I_X(\Delta t = 0) \cdot T / (T - \Delta t)$ を計算した (Fig 3-2D)。空間方向の自己相関関数は、 $X_{m+\Delta m} := [X_m$ を m 方向に Δm だけ循環したもの]、 $\Delta X_m = X_m - \langle X \rangle_m$ として、 $I_X(\Delta m) = 1/T \sum_t \Delta X_m \cdot \Delta X_{m+\Delta m} / I_X(\Delta m = 0)$ を計算した (Fig 3-2E)。

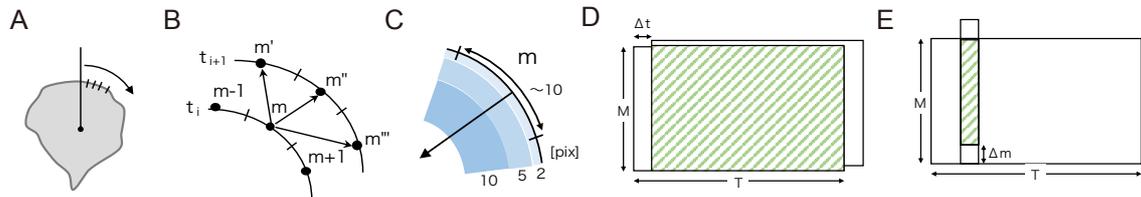


Fig 3-2: 画像解析による細胞輪郭の断片化と追跡の方法

(A) 細胞の輪郭を 100 個の断片に分割する。(B) 時刻 t の断片 m と時刻 $t+1$ の断片 m' を対応づける。(C) 断片 m における蛍光量は、細胞内側へ深さ 5 pix の領域の平均輝度値をより内側の深さ 10 pix の領域の平均輝度値で規格化した。(D, E) 輪郭上の各位置における速さと蛍光量の時間発展を示す 2 次元配列から、時間方向と空間方向の相関を計算した。

3. 結果

基質接着を強めた状況での細胞性粘菌の移動形態

基質への接着性と細胞の形態および運動性の関係を調べるために、さまざまな濃度で WGA をコートしたガラス上に集合期の細胞性粘菌を接着させ、その移動形態を顕微鏡で観察した。ノンコートの基質上で細胞は縦に長く伸びた形態で移動したが (Fig 3-3A, 上)、WGA をコートした基質上では、細胞は基質に大きく伸展し、扇形や横長の形で移動することが見出された (Fig 3-3B, 上)。GFP-Lifeact の蛍光像から細胞のマスクを作成し、WGA の各濃度条件について細胞の形態と重心移動の軌跡を定量的に評価した。細胞の伸展面積 (Expansion area) と前後左右の長さの比 (FB/LR) は WGA 濃度条件に依存して大きく変化した (Fig 3-3C)。WGA コート濃度が低い場合 (同図, 0, 10 $\mu\text{g/ml}$)、大部分のデータ点は伸展面積 $0 \sim 200 \mu\text{m}^2$ 、 $\text{FB/LR} = 1.0 \sim 4.0$ の領域に分布した。これは細胞が縦に伸びた形状をしていることを示す。WGA コート濃度が高い場合 (同図, 100, 300 $\mu\text{g/ml}$)、データ点は伸展面積 $0 \sim 700 \mu\text{m}^2$ 、 $\text{FB/LR} = 0.5 \sim 2.0$ の領域に分布した。これは細胞が円形ないし横長の形状であることを示している。中間的な濃度の場合には (同図, 30 $\mu\text{g/ml}$)、データ点は両領域にまたがって分布した。細胞の運動性を評価するため、同図中に赤線で示したように 4 つの Bin を設定し、WGA 濃度条件別に各 Bin 内に含まれる細胞に関して平均二乗変位を算出し、パーシスタントランダムウォークモデルのフィッティングによって、細胞の平均速度とパーシスタンス時間を得た。これらのプロットから、Bin 1 から Bin 4 にかけて平均速度は低下していく一方で、直進性は上昇する傾向にあることが分かった (Fig 3-3D, E)。WGA コート濃度が 30 $\mu\text{g/ml}$ の場合にはすべての Bin にデータ点が分布しているが、この同一濃度条件内でも平均速度と直進性に同様の傾向が見られる。細胞の基質接着性を向上させる別の方法として、Poly-L-lysine (PLL) および Cell-tak (CTK) をコーティング剤として使用した場合にも、同様の扇形や横長の形態をとる細胞が観察された (Fig 3-3F, G)。ただし、PLL、CTK を高濃度でコートした際には、しばしば細胞が破裂したため、扇形の形態が出現する割合は低くなった (Fig 3-3H)。これらの観察結果は、扇形や横長の移動形態は WGA コート条件で特異的に出現するのではなく、基質接着が強い状況で出現するものであることを示している。

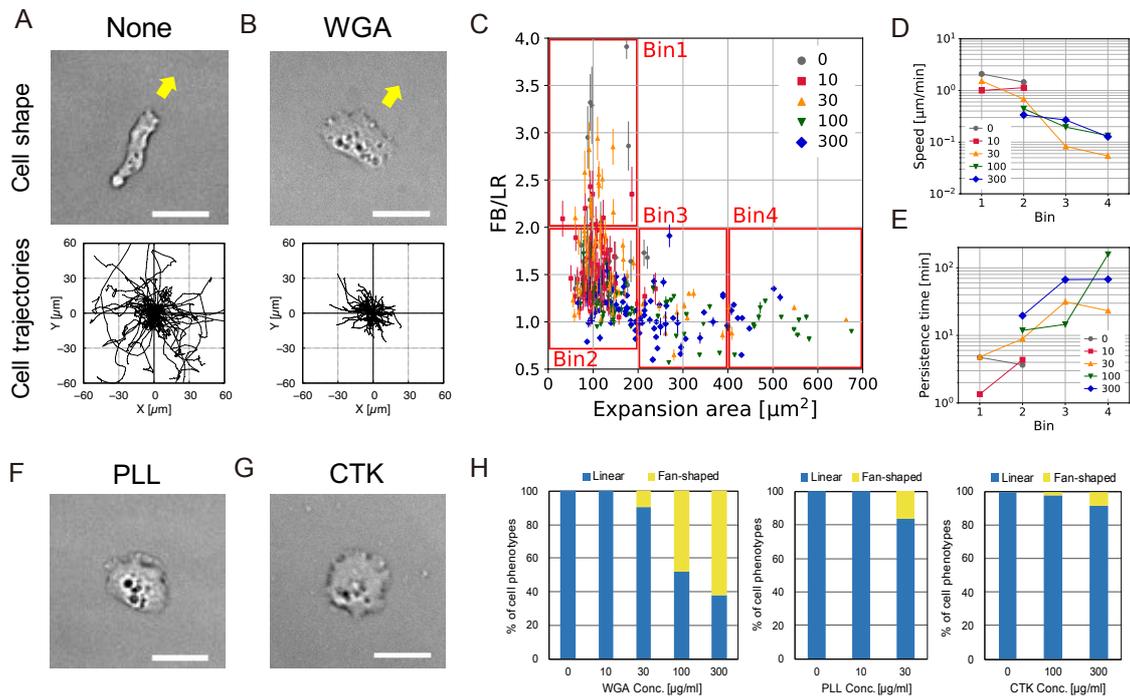


Fig 3-3: 基質接着を強めた状況の細胞性粘菌の形態と軌跡

(A, B) WGA コートしたガラス上 (コート濃度 A: 0 $\mu\text{g/ml}$, B: 300 $\mu\text{g/ml}$)における細胞の形状と重心移動の軌跡 (1 分間隔, 50 分間)。 (C-E) 細胞の形態および重心移動の基質接着依存性。 (C) WGA コートしたガラス上における細胞の基質伸展面積と前後左右の長さの比 (FB/LR) の関係。データ点は各細胞の時間平均値、エラーバーは標準誤差を示す。 (D, E) 図 C の Bin 1~4 内の細胞の平均速度 (D) とパーシスタンス時間 (E)。凡例は WGA コート濃度を表す (単位: $\mu\text{g/ml}$)。N = 54 (0), 74 (10), 78 (30), 62 (100), 83 (300) cells; ()内はコート濃度。 (F) 30 $\mu\text{g/ml}$ で PLL コートしたガラス上の扇形形態の細胞。 (G) 400 $\mu\text{g/ml}$ で CTK コートしたガラス上の扇形形態の細胞。 (H) WGA, PLL, CTK コートしたガラス上の縦長の形状の細胞 ("Linear") と扇形の形状の細胞 ("Fan-shaped") の出現率。両形態は目視で判別した。WGA: N = 54 (0), 74 (10), 78 (30), 62 (100), 83 (300) cells。 PLL: N = 42 (0), 38 (10), 57 (30) cells。 CTK: N = 33 (0), 44 (100), 99 (300) cells。 ()内はコート濃度。スケールバー: 20 μm 。

基質接着を強めた状況での仮足形態

細胞の形態をより詳細に調べるため、高倍率での観察を行った (Fig 3-4A)。ノンコート条件では、幅 5 μm 程度で伸展する仮足が形成され、細胞全体は縦に長く伸びた形状だった (Fig 3-4A, None)。画像のように、細胞はしばしば 2 つ以上の仮足を伴った分岐形態を示した。仮足の先端付近には高密度の GFP-Lifeact (F-アクチン)、HSPC300-GFP (SCAR 複合体のサブユニット)、Venus-WASP A (WASP)、GFP-Arp2 (Arp2/3 複合体のサブユニット) の局在が観察された (Fig 3-4A-C, None)。仮足の先端付近以外の細胞膜上には、これを裏打ちするようにアクチンコーテックス構造が形成されていた (Fig 3-4A, None, Lifeact)。Arp2/3 複合体の活性化を阻害する CK666 を 100 μM で処理したときには、仮足の新規形成と細胞の自発的な運動は完全に阻害され、細胞は丸い形状となった (Fig 3-4D 左)。CK666 処理下では細胞膜上の全周方向でアクチンコーテックス構造が形成された (Fig 3-4D, None)。一方、WGA、PLL、CTK コートした基質上の細胞では、細胞底面の端部から基質に沿って薄くシート状に伸展した膜形態が観察された (Fig 3-4A, 透過光像, 画像中の上側)。これは動物の上皮・間葉系細胞などに見られるラメリポディアとよく似た形態である。シート状の膜領域には GFP-Lifeact の強い蛍光が観察された。同領域の膜端部には HSPC300-GFP、Venus-WASP A、GFP-Arp2 が局在していることから (Fig 3-4A-C)、F-アクチンの樹状構造が形成されていると考えられる。仮足の形成と細胞の自発運動は CK666 処理によって完全に阻害され、細胞膜上の全周方向でアクチンコーテックス構造が形成された (Fig 3-4D 右, E)。以上の結果は、細胞性粘菌の仮足の形態が、細胞-基質間の接着を促進することによって大きく変化し、細胞底面の端部において Arp2/3 複合体とこれを活性化する SCAR 複合体および WASP の膜局在が促進されることを示している。なお、細胞性粘菌の Ax4 株では *talin A* 遺伝子への変異によってタリン A の C 末部分にあるアクチン結合ドメインが翻訳されない。タリン A は基質接着に関わる分子であり、細胞後端に局在することが報告されているが¹⁹³、*talinA* 遺伝子の野生型配列を保持する Ax2 株でも細胞底面の HSPC300-GFP の局在パターンは同様であったことから (Fig 3-9B, WT)、SCAR 複合体の膜局在性の変化はタリン A の欠損による異常形質ではないと考えられる。

WGA をコートしたガラス基質上に伸展した細胞内の GFP-Lifeact の三次元的な空間分布を共焦点顕微鏡によって調べると、細胞底面の端部において GFP-Lifeact の強い蛍光が観察された (Fig 3-4F)。WGA をコートしたガラスと PDMS で細胞を挟んだ場合には、ガラス側と PDMS 側の両方でラメリポディア様の仮足が形成され、中間の非接着部分ではコーテックス様の構造となっていた (Fig 3-4G)。一方、ノンコートのガラ

スと PDMS で細胞を挟んだ場合にはこのようなラメリポディア様の仮足の形成は観察されなかった (Fig 3-4H)。これらの結果から、細胞膜-基質間の親和性が高い条件では基質との接着面の端部において F-アクチンの樹状構造の形成が促進されることが示唆される。

細胞膜の伸展動態における基質接着依存性を定量的に解析するため、HSPC300-GFP の TIRF 画像から細胞底面の輪郭を抽出し、細胞輪郭上の各点における HSPC300-GFP の蛍光輝度と局所的な膜伸展速度の時間発展を調べた。ノンコート条件では細胞がしばしば浮き上がってしまい輪郭を取ることが困難であったため、WGA を低濃度でコートした場合と高濃度でコートした場合を比較することとした。WGA を低濃度でコートしたガラス上では、底面側の細胞端で HSPC300-GFP の一過的な局在に伴い (Fig 3-5A)、膜の伸展が生じた (Fig 3-5B)。HSPC300-GFP の蛍光量と膜伸展速度の二次元ヒストグラムは、これらがよく相関することを示している (Fig 3-5C)。一方、WGA を高濃度でコートしたガラス上では、HSPC300-GFP は細胞底面側の端部に沿った広い範囲にわたって持続的に局在したが (Fig 3-5D)、膜の伸展はなお一過的であった (Fig 3-5E)。HSPC300-GFP の蛍光量と膜伸展速度の二次元ヒストグラムには HSPC300-GFP の局在があっても膜の伸展が起きない領域が認められる (Fig 3-5F, 赤枠)。HSPC300-GFP の局在の持続時間とサイズは WGA コート濃度依存的に増大するのに対し (Fig 3-5G, I)、膜伸展に関してそれらは大きく変わらなかった (Fig 3-5H, J)。以上の解析結果は、ゆるやかな接着条件では底面側の細胞端における SCAR 複合体の局在と相関した膜の伸展が見られるが、強い接着条件では膜の伸展を駆動する別の要因が存在することを示唆している。なお、GFP-Lifeact 発現株を使って解析した場合にも仮足動態に関する解析結果は同様の傾向を示したため (Fig 3-6)、高濃度の WGA コート条件で仮足の寿命が短くサイズが小さいことは、SCAR 複合体のサブユニットである HSPC300 の過剰発現やこれに GFP を付与したことの影響ではない。

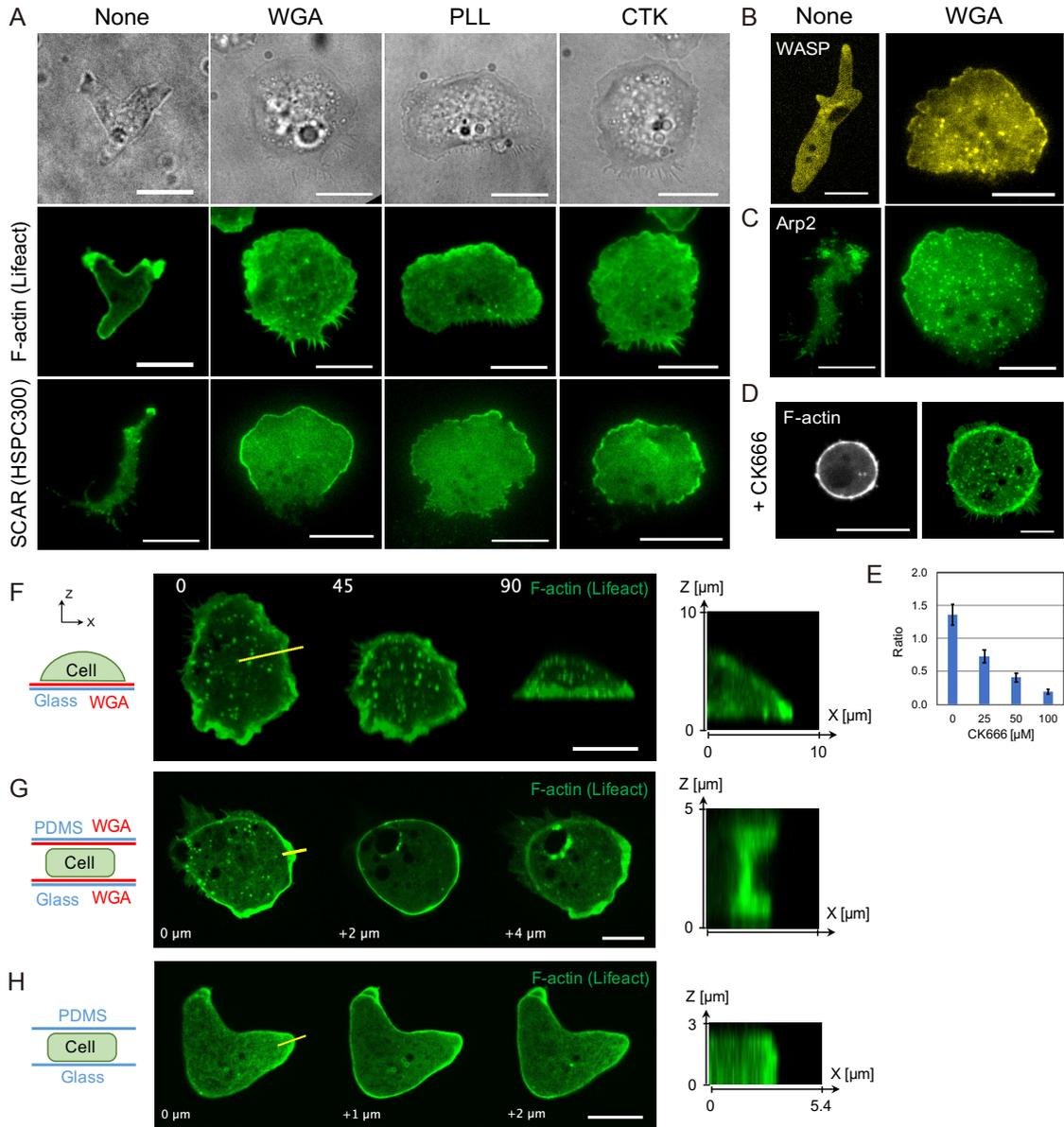


Fig 3-4: 基質接着を強めた状況の仮足形態

(A) 各コート条件における細胞の透過光画像 (上)、GFP-Lifeact 蛍光像 (中, "None"は共焦点、その他は TIRF)、HSPC300-GFP 蛍光像 (すべて TIRF)。 (B, C) ノンコート条件、WGA コート条件の Venus-WASP (B)と GFP-Arp2 (C) の蛍光像。 (D) 100 μ M CK666 投与後の GFP-Lifeact の共焦点画像。 (E) WGA コート条件で CK666 投与前 15 分間と投与後 15~30 分の細胞の平均速度の比。エラーバーは標準誤差を示す。左から N = 8, 8, 7, 7 cells。 (F-H) 各条件 (左側にイラストで図示) における細胞内 GFP-Lifeact の 3 次元観察結果。 (F) WGA コートしたガラス上の細胞。高さ 10 μ m の幅を 0.5 μ m 刻みで取得した共焦点画像を Z 軸からの角度 0°, 45°, 90° の方向に最大値投影した。 (G) WGA コートしたガラスと PDMS に挟まれた細胞。ガラス-PDMS 間距離 4 μ m。ガラス面側から 0, 2, 4 μ m の位置の共焦点画像。 (H) ノンコートのガラスと PDMS に挟まれた細胞。ガラス-PDMS 間距離 1.7 μ m。ガラス面側から 0, 1, 2 μ m の位置の共焦点画像。 D-F それぞれの画像中の黄色線に沿った XZ 断面図を右に示す。スケールバー: 10 μ m。

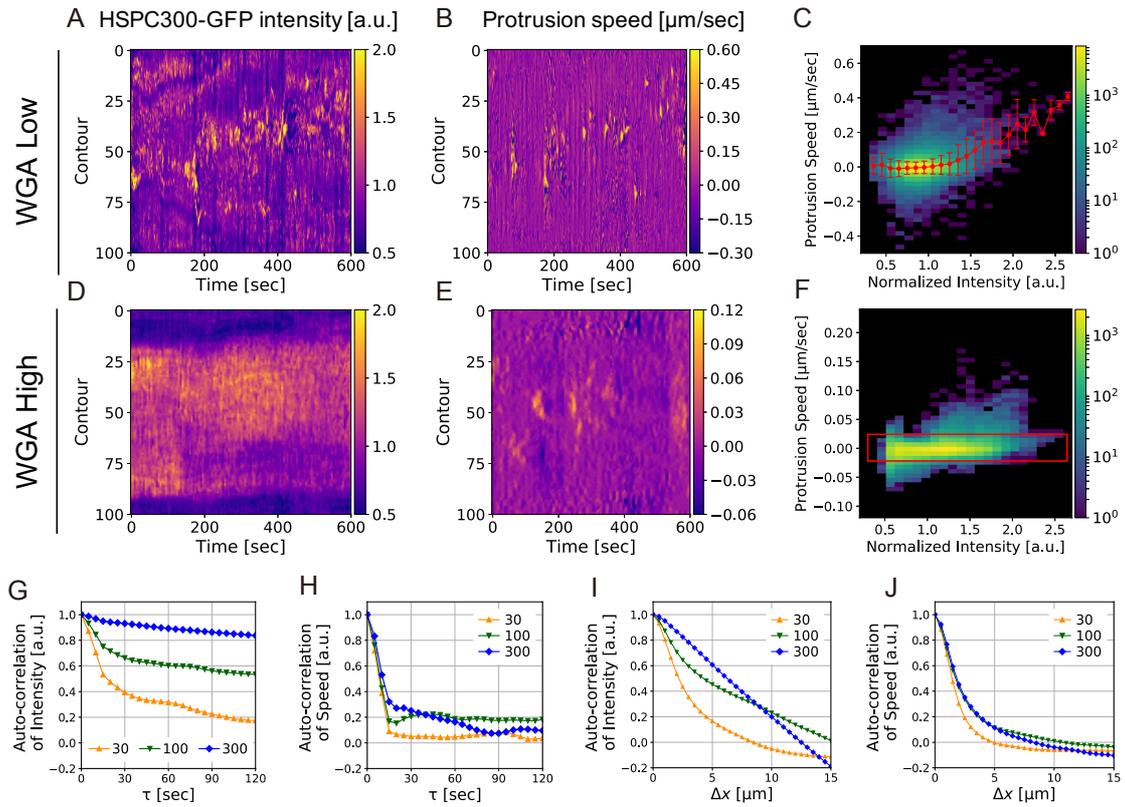


Fig 3-5: SCAR 局在と膜伸展ダイナミクスの基質接着依存性

(A-F) WGA コートしたガラス上 (A-C: 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, D-F: 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の細胞底面の輪郭上各点における HSPC300-GFP 蛍光輝度 (A, D)、膜伸展速度 (B, E) の時間発展とこれらの 2 次元ヒストグラム (C, F)。(G-J) 細胞底面の輪郭上における HSPC300-GFP 蛍光輝度の時間方向の自己相関 (G) と空間方向の自己相関 (I)、膜伸展速度の時間方向の自己相関 (H) と空間方向の自己相関関数 (J)。凡例は WGA コート濃度を示す (単位: [$\mu\text{g}/\text{ml}$])。

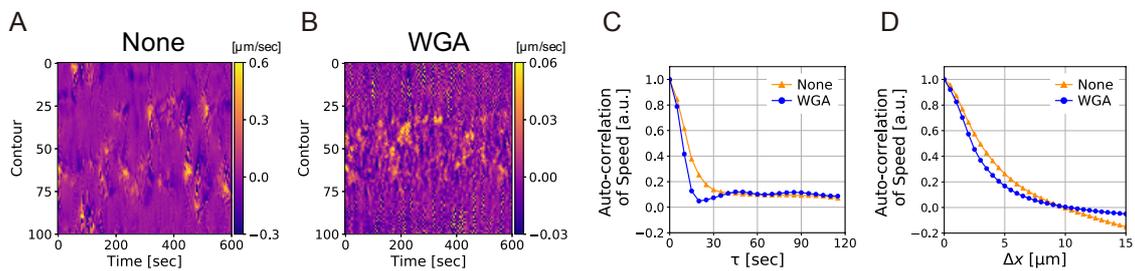


Fig 3-6: 膜伸展ダイナミクスの基質接着依存性

GFP-Lifect 発現株を用いた解析結果。(A, B) WGA コートしたガラス上 (A: 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, B: 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の細胞底面の輪郭上各点における膜伸展速度の時間発展。(C, D) 細胞底面の輪郭上における膜伸展速度の時間方向 (C) と空間方向 (D) の自己相関関数。

アクチンコーテックス構造と仮足の形成

移動細胞の膜上には、仮足先端付近に F-アクチンの樹状構造が形成され、その周囲にはコーテックス構造が形成される。強接着条件の細胞底面では、HSPC300-GFP が局在しない領域 (Fig 3-7A) にアクチンコーテックスとその形成に関わる分子である PTEN-GFP、GFP-CtxI (Cortexillin I)、mRFP1-DGAP1、GFP-mhcA (ミオシン II 重鎖) の局在が観察されたことから、収縮性のアクチン構造が形成されていると考えられる (Fig 3-7A)。集合期の細胞が cAMP 濃度勾配下に置かれたとき、Ras-GTP や PI3K が cAMP 高濃度側の細胞膜上へ局在するとともに膜の伸展が促進される¹⁹⁴。細胞外から膜の伸展を誘導したときの応答と細胞内 F-アクチン構造の関係を見るため、WGA コート条件で扇形の形態をした細胞に対して、マイクロニードルによって cAMP 濃度勾配を提示した。細胞前方から濃度勾配を形成したときには、cAMP 源の方向へむかって PH-CRAC (PI(3,4,5)P3 と PI(3,4)P2 のプローブ) の局在を伴う膜の伸展が観察された (Fig 3-7B)。このとき細胞後端は前端にくらべて移動速度が遅く、細胞全体は徐々に縦長の形態へ変化する様子が観察された (Fig 3-7C)。一方、細胞後方から濃度勾配を形成した場合には、細胞底面の後端部分から仮足が形成されることはなく (N = 5 cells)、細胞側方から形成された仮足が cAMP 源の方向へ伸展し、細胞全体が徐々に旋回するようにして方向転換が起きた (Fig 3-7D-E)。cAMP 源の方向への細胞の重心移動には、細胞前方から濃度勾配を形成したときに比べて時間的な遅れが生じた (Fig 3-7F)。以上の観察は、細胞後端のアクチンコーテックス構造は新規の仮足形成に対して抑制的に働くことを示唆している。

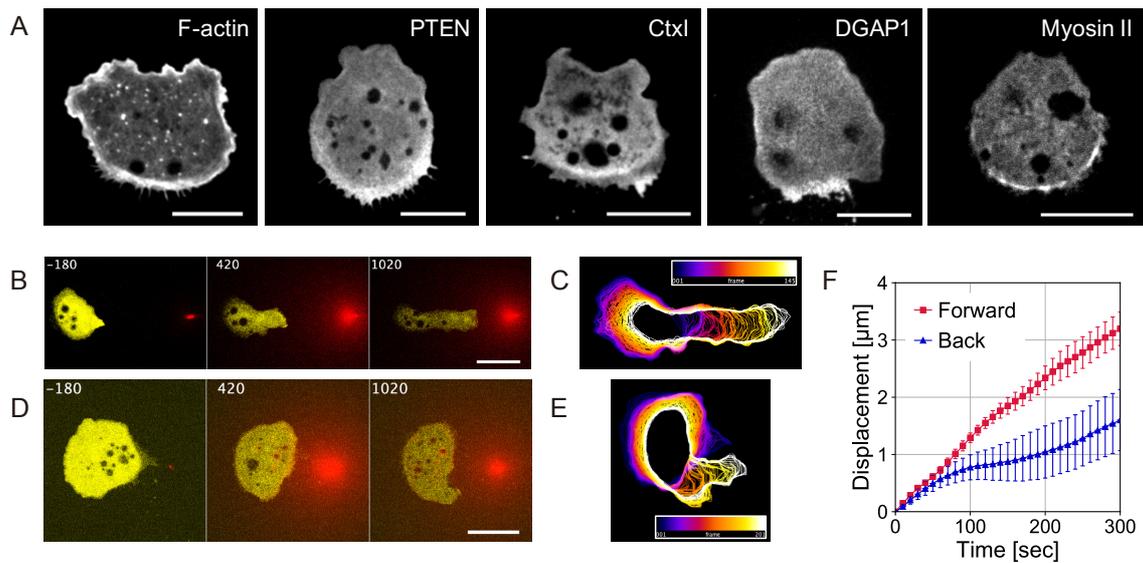


Fig 3-7: アクチンコーテックスと仮足の形成

(A) WGA コート条件における細胞底面近傍の GFP-Lifeact、PTEN-GFP、GFP-CtxI、mRFP1-DGAP1、GFP-mhcA の共焦点画像。画像上側を細胞の前方向としてそろえた。スケールバー: 10 μm 。(B, D) WGA コート条件の細胞に対して前側 (B) と後ろ側 (D) からマイクロニードルによって cAMP 濃度勾配を形成したときの細胞の変形過程。マイクロニードルには 100 nM cAMP, 10 $\mu\text{g/ml}$ Alexa594 (赤) が満たされており、細胞は PH-CRAC-Venus (黄) を発現している。画像中の数字は時刻を示す [単位: sec]。時刻 0 sec で濃度勾配の形成を開始した。スケールバー: 20 μm 。(C, E) それぞれ B, D の細胞の輪郭の時間推移を示す。色は時刻に対応する。(F) cAMP 濃度勾配形成後の細胞の重心位置の時間変化。濃度勾配の形成を開始した時点での細胞の向きとニードル-細胞重心間を結ぶ線分がなす角を θ として、Forward: $\theta < 60^\circ$, Back: $\theta > 120^\circ$ と定義した。細胞の向きは目視で判断した。エラーバーは標準誤差を示す。N = 6 (Forward)、5 (Back) cells。

アクチンコーテックスと SCAR 複合体の膜局在の関係

細胞内 F-アクチンと SCAR 複合体の膜局在の関係を調べるために、アクチン重合阻害剤の Latrunculin A (LatA) で細胞を処理した。ノンコート条件で細胞を LatA 処理した場合、細胞内の F-アクチンの構造が失われるとともに、細胞膜上に多量の HSPC300-GFP の蛍光が観察された (Fig 3-8A, None, HSPC300)。これは F-アクチンが SCAR 複合体の膜局在に対して抑制的に働くことを明瞭に示している。WGA コート条件で LatA 処理した場合には、HSPC300-GFP は細胞側面の局在に加えて、大部分が細胞底面の端部に集中するような局在が観察された (同図, WGA, HSPC300)。一方、細胞底面の中央領域には HSPC300-GFP の蛍光はほとんど観察されなかった。したがって、基質と強く接着した細胞膜上では、アクチン構造とは独立に、SCAR 複合体を接着面の端部へ局在させる機構があることが示唆される。Venus-WASP A も LatA 処理によって細胞膜上に多量の局在を示したが (同図, None, WASP)、WGA コート条件においては底面端部には集中せず、側方や底面に局在を示した (同図, WGA, WASP)。したがって、WASP と SCAR 複合体の膜局在には接着依存性の点で違いがある。

WGA コート条件で LatA 処理した細胞では、細胞底面の端部から基質に沿って HSPC300-GFP 蛍光を伴う細長い膜の伸展が観察された (Fig 3-8B)。この細い膜の幅は $0.335 \pm 0.006 \mu\text{m}$ 、長さは $10.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ まで伸びて、最大伸長速度は $2.0 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$ だった (N = 48)。伸長する膜の先端に GFP-Lifeact 蛍光は観察されるものの、非常に微弱だった (Fig 3-8C)。動物細胞の I-BAR タンパク質 IRSp53 はラメリポディアの先端に局在し、SCAR/WAVE 複合体と相互作用することでアクチン重合に関与することが示唆されている¹⁹⁵。細胞性粘菌には I-BAR ドメインを含むタンパク質は IBARa の一種類のみ存在する¹⁹⁶。WGA コート条件で細胞内の GFP-IBARa の観察を行った結果、ラメリポディア様の仮足を含めて細胞底面で IBARa の局在は観察されなかったが (Fig 3-8D)、LatA 処理後に端部から伸長する膜の内部には強い蛍光が観察された (Fig 3-8E)。この細長い膜の伸展には IBARa が関わっていることが示唆される。ただし、先行研究¹⁶⁵で述べられているように GFP を付与した IBARa は細胞内でほとんど局在を示さず、この観察結果の他には局在が確認できていない。

F-actin と SCAR 複合体の膜局在の関係をさらに調べるため、細胞内外の浸透圧を操作することで細胞の形態変化を誘起した。細胞外にデキストロースを投与すると、糖濃度を平衡化する方向に浸透圧が変化し、細胞体が収縮する (Fig 3-8F)。これに伴って細胞骨格系の一過的な再編成が起きる。ノンコート条件でデキストロースを投与したとき、投与後 10 分頃にアクチンコーテックスがやや断片化するとともに細胞膜上に HSPC300-GFP の局在が生じた (Fig 3-8G, 10 min)。投与後 30 分頃にはコーテックス構

造が回復するとともに、細胞膜上の HSPC300-GFP 蛍光は大きく低下した (Fig 3-8G, 30 min)。WGA コート条件でデキストロースを投与したときには、同様に細胞側面で一過的な HSPC300-GFP の膜局在が生じるとともに (Fig 3-8H 上, 10 min)、細胞底面全体でも HSPC300-GFP 蛍光の一過的な上昇が生じた (Fig 3-8H 下, 10 min)。これらの観察結果は、浸透圧変化への応答時のアクチンコーテックス構造の解体によって SCAR 複合体の膜局在が生じることを示唆する。

細胞性粘菌の RacE は哺乳類細胞の RhoA の相同タンパク質であり、フォルミン (ForA, E, H) を活性化してアクチンコーテックスの形成に寄与する⁸。racE-null 細胞ではアクチンコーテックスの密度が野生型に比べて大きく低下していることが電子顕微鏡によって観察されている⁸。ノンコート条件、WGA コート条件で racE-null 細胞内の F-アクチン (Lifeact-neon) の空間分布を観察すると、両条件ともに仮足領域には局在が見られるものの、細胞底面や側面のアクチンコーテックス構造はほとんど観察されなかった (Fig 3-9A, 野生株は Fig 3-4F)。ノンコート条件で、racE-null 細胞の側面における SCAR 複合体の局在量は野生型にくらべて顕著な差はなかったが (Fig 3-9B, None)、WGA コート条件では、細胞底面の端部で全周囲にわたって HSPC300-GFP の局在が観察された (Fig 3-9B, WGA)。WGA コート条件で基質に大きく伸展した racE-null 細胞は、しばしば移動中に停止したり (Fig 3-9C 上; 12-24 min)、逆に円形で静止した状態から移動がはじまることがあった (Fig 3-9C 上; 24-48 min, 下; 0-24 min)。これに伴って重心移動の軌跡が急角度で変化することや (Fig 3-9C 上)、弧を描くように曲がることも多く見られた (Fig 3-9C 下, Fig 3-9D)。野生株では WGA コート濃度が高くなるほど重心移動の直進性が上昇するのに対して、racE-null 細胞ではそのような傾向はなかった (Fig 3-9E)。WGA コート条件で静止している racE-null 細胞では、HSPC300-GFP の局在パターンと対応して底面の全周方向で F-アクチンの樹状構造が形成されていた (Fig 3-9F, 0 sec)。細胞の片側でコーテックス様のアクチン構造が形成されるのに伴って収縮が起こり (Fig 3-9F, 90-120 sec, 左下部分)、細胞全体の重心移動が開始した。アクチンコーテックス構造のマーカーとなる DGAP1、Myosin II の蛍光プローブを発現する racE-null 株の作出は、試みたが成功しなかった。

フォルミンの機能阻害剤として開発された SMIFH2¹⁹¹ は 5 μ M で細胞性粘菌の運動を完全に阻害し、ノンコート条件で細胞はアクチンコーテックス構造を伴って丸くなった。10 μ M ではアクチンコーテックスと細胞膜の部分的な剥離が観察されたため (Fig 3-9G 中央, 矢印)、コーテックスの非常に強い収縮が起きていることが示唆される。この状態でさらに LatA 処理を行っても F-アクチンの構造が失われなかったことから、コーテックスを構成するアクチンフィラメントが堅固に架橋されて安定化して

いると考えられる (Fig 3-9G 右)。マウス胚性幹細胞を SMIFH2 で処理した場合にもアクチンコーテックス密度の上昇が電子顕微鏡観察によって確認されている¹⁹⁷。WGA コート条件で細胞性粘菌を 5 μ M SMIFH2 によって処理した場合には、ただちに細胞の接着面積が減少し (Fig 3-9H)、細胞は上方に伸びた形状となった (Fig 3-9I)。WGA コート条件で静止した状態の *racE*-null 細胞に対して、マイクロニードルによって細胞の片側から SMIFH2 を投与したとき、ただちにマイクロニードルから離れる方向への細胞の重心移動が生じることが観察された (Fig 3-9J, K)。

以上の結果から、アクチンコーテックス構造によって SCAR 複合体の膜局在が抑制されることが示唆される。また、アクチンコーテックス構造の形成、維持と解体の空間的制御が細胞極性の形成において重要と考えられる。

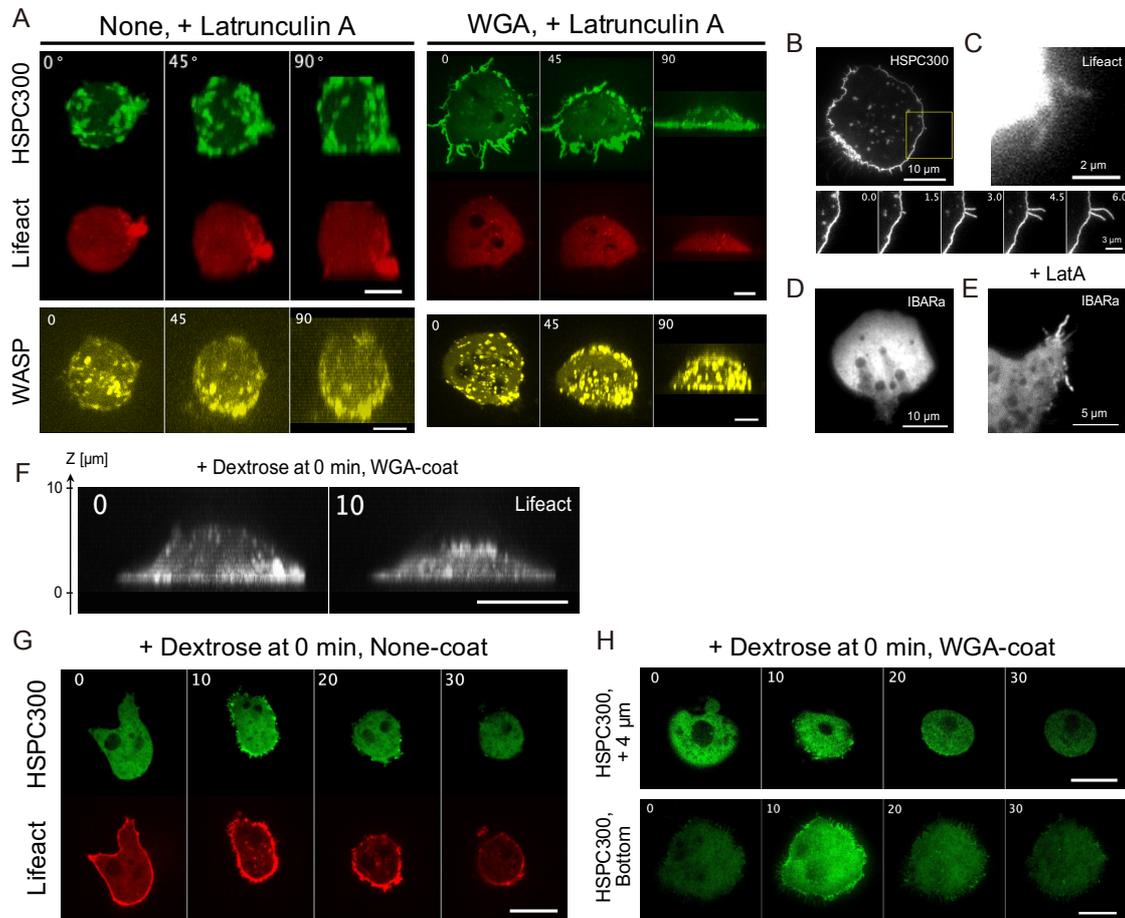


Fig 3-8: アクチンコーテックスと SCAR 複合体の膜局在

(A) ノンコート、WGA コート条件において 3 μ M Latrunculin A (LatA)で細胞を処理したときの HSPC300-GFP、Lifeact-mRFPmars、Venus-WASP A の共焦点画像。0.5 μ m 刻みで取得した共焦点画像を Z 軸からの角度 0°, 45°, 90°の方向に最大値投影して示した。スケールバー: 5 μ m。(B) WGA コート条件で LatA 処理した細胞の HSPC300-GFP の TIRF 画像。左画像中の黄色枠内のタイムラプス画像を下に示す。数字: 時刻 [min]。(C) LatA 処理後に伸長した膜における GFP-Lifeact 蛍光の TIRF 画像。(D, E) WGA コート条件で LatA 処理する前 (D)と後 (E)の増殖期細胞底面の GFP-IBARa の TIRF 画像。(F-H) 50 mM Dextrose を投与したときの HSPC300 と Lifeact の蛍光画像。画像中の数字は時刻を示す [単位: min]。スケールバー: 10 μ m。(F) WGA コート条件。高さ方向 10 μ m の幅を 0.5 μ m 刻みで取得した GFP-Lifeact の共焦点画像を Z 軸から 90°の方向に最大値投影した画像。(G) ノンコート条件。基質面から 3 μ m あたりの高さで取得した HSPC300-GFP と Lifeact-mRFPmars の共焦点画像。(H) WGA コート条件。上: 基質面から 4 μ m の高さで取得した HSPC300-GFP の共焦点画像。下: 細胞底面で取得した TIRF 画像。

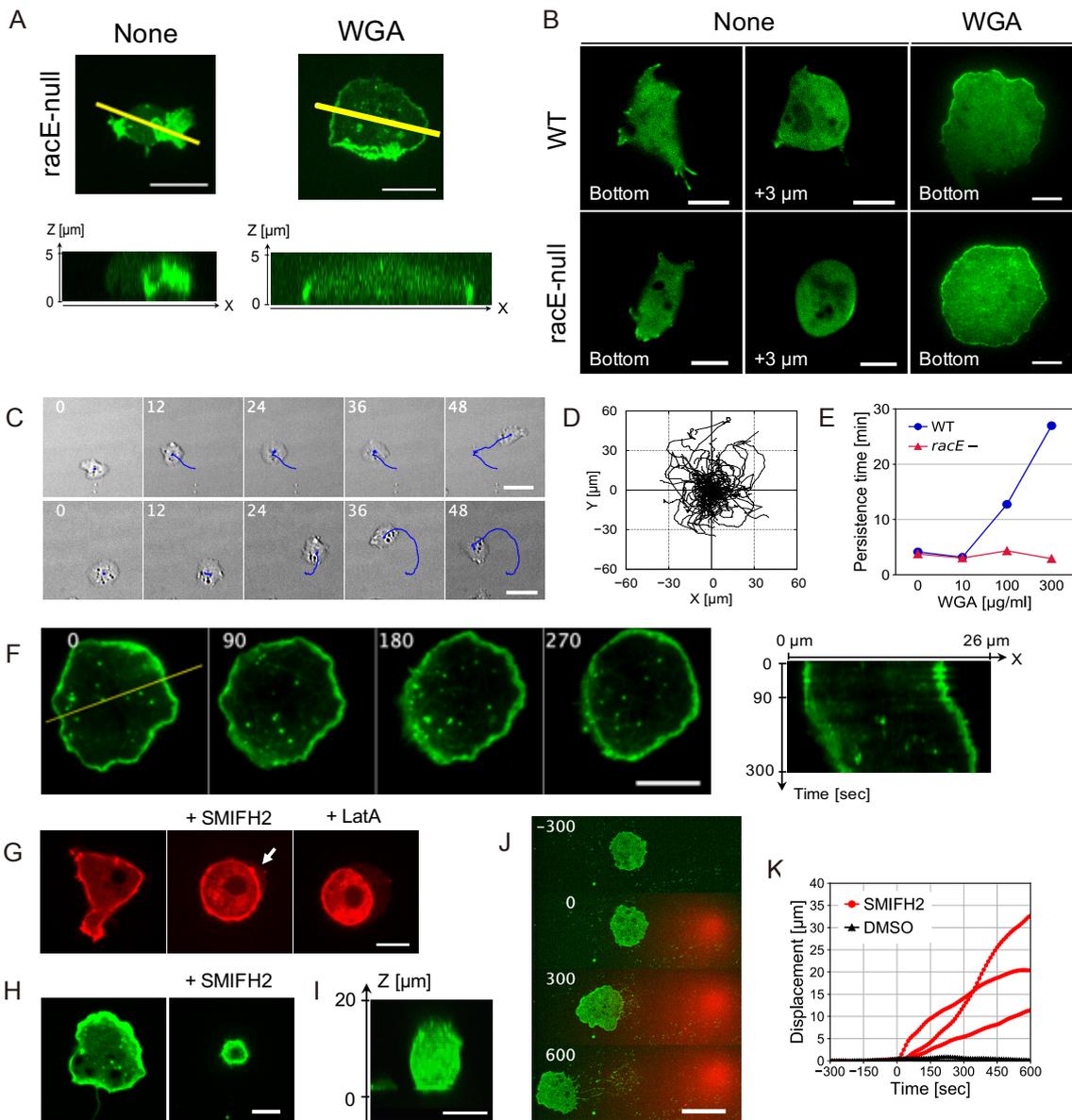


Fig 3-9: *racE* 遺伝子破壊株の SCAR 複合体の局在と細胞極性

(A) ノンコート条件と WGA コート条件における Lifact-neon/*racE*-の共焦点画像。画像は高さ方向 5 μm の幅を 0.5 μm 刻みで取得した。上: 最大値投影像。スケールバー: 10 μm 。下: 上図中の黄色線に沿った XZ 断面図。(B) ノンコート条件と WGA コート条件における HSPC300-GFP 蛍光画像。上: 野生株 (Ax2 株)。下: *racE*-null 株。ノンコート条件は細胞底面から高さ 0 μm , 3 μm の位置での共焦点画像、WGA コート条件は TIRF 画像。スケールバー: 5 μm 。(C) WGA コートした基質上の *racE*-null 細胞の代表的な重心移動の様子。細胞の重心の軌跡を青線で重ねて示す。数字: 時刻 [min]。スケールバー: 20 μm 。(D) WGA コート条件における *racE*-null 細胞の 50 分間の重心の軌跡。N = 105 cells。(E) WGA コートした基質上の細胞の軌跡に関するパーシスタンス時間。(F) WGA コートした基質上の *racE*-null 細胞の Lifact-neon の TIRF 画像 (左) と黄色線に沿ったキモグラフ (右)。数字: 時刻 [sec]。スケールバー: 10 μm 。(G) ノンコート条件で 10 μM SMIFH2 で処理した後 (中央)、引き続き 3 μM LatA で処理した (右)、Lifact-mRFPmars/Ax4 の共

(Fig 3-7 Caption 続き)

焦点画像。スケールバー: 5 μm 。(H) WGA コート条件で 5 μM SMIFH2 で処理する前後の細胞底面における GFP-Lifeact/Ax4 の共焦点画像。(I) SMIFH2 処理後の GFP-Lifeact/Ax4 の共焦点画像。画像は高さ方向 20 μm の幅を 0.5 μm 刻みで取得し、Z 軸から 90°の方向へ最大値投影したもの。(J) WGA コート条件で *racE*-null 細胞の片側からマイクロニードルによって SMIFH2 を投与したときの細胞の重心移動の様子。マイクロニードルには 10 μM SMIFH2 と 10 $\mu\text{g/ml}$ Alexa594 が含まれる。細胞底面における HSPC300-GFP (緑)と Alexa594 (赤)の共焦点画像を重ねて示す。数字: 時刻 [sec]。スケールバー: 20 μm 。(K) マイクロニードルで SMIFH2 を投与する前後の細胞の重心移動距離の時間変化。時刻 0 sec で投与を開始した。各プロットは異なる細胞のデータを示す (SMIFH2: N = 3 cells, DMSO: N = 2 cells)。

アクチン重合制御に関わる分子の局在パターン

SCAR 複合体の膜局在によって細胞膜直下では Arp2/3 が活性化され、F-アクチンの樹状構造が形成されるが、膜の伸展ダイナミクスは SCAR 複合体の局在パターンによって完全に決まるわけではない (Fig 3-5, Fig 3-6)。SCAR 複合体の活性化にはイノシトールリン脂質と Rac-GTP の両方が必要であることが *in vitro* の解析で示されていることから^{28,198}、これらの局在パターンを調べた。

Rac-GTP のプローブである PakBCRIB は、ノンコート条件において細胞の仮足前端に強い局在を示し、コーテックス上にもときどき比較的弱い局在を示した (Fig 3-10A, PakBCRIB, None)。WGA コート条件では、細胞底面の広い範囲で数秒でプローブ蛍光の濃淡が観察された (同図, WGA)。このような発火パターンは TIRF 顕微鏡による高分解能観察で見出され、共焦点顕微鏡ではほとんど検出されなかった。数秒間隔の高い時間分解能でのデータ取得時には、しばしば細胞が収縮し、発火パターンが消失してしまったため、定量的な特徴づけは行えなかったが、およそ数秒からそれ以下の時定数で変化する空間パターンと思われる。PakBCRIB-Venus の高輝度領域は細胞前方に出現することが多く、前端近傍に出現したときにしばしば膜の伸展が観察された (同図, 40-80 sec)。低分子量 GTPase の Rap1 は GxcA や GxcC などの RacGEF との相互作用を介して Rac の活性化に関与することが示唆されている^{199,200}。また Rap1 の常活性型変異株は基質に大きく伸展し、細胞端部にアクチンが強く集積することが観察されていることから、Rap1 は細胞骨格系の制御や基質接着に関わる分子と考えられている¹⁷⁵。Rap1-GTP のプローブ RalGDS-RBD-GFP は、ノンコート条件において細胞の仮足に局在を示した (Fig 3-10A, RalGDS-RBD, None)。WGA コート条件の細胞底面では前方に多く分布し、PakBCRIB と似た発火パターンを示した (同図, WGA)。前端近傍に RalGDS-RBD-GFP の高輝度領域が出現したとき、しばしば膜の伸展が観察された (同図, 0-40 sec)。

次に、イノシトールリン脂質の分布を調べた。PI(3,4)P₂ と PI(3,4,5)P₃ のプローブである PH-CRAC は cAMP に対する走化性を示す細胞の前端には局在を示すが (Fig 3-7B)、ノンコート条件で自発運動する細胞膜上に明確な局在は観察されなかった (Fig 3-10B, PH-CRAC)。WGA コート条件で TIRF 顕微鏡によって観察した場合にも、細胞底面全体で蛍光量はほとんど一様だった。PI(4,5)P₂ のプローブである PH-PLCδ-EGFP はノンコート条件では細胞膜上の後方に局在し、細胞前方の仮足部分には局在を示さなかった (同図, PH-PLCδ)。WGA コート条件の細胞底面ではほぼ一様に分布しており、PH-CRAC と同様に前端あるいは後端への局在や発火パターンは検出されなかった。これら PH-CRAC、PH-PLCδ の細胞底面での一様な蛍光分布は、PakBCRIB や

RalGDS-RBD の発火パターンが細胞膜自体の高さ方向の変形に起因したものではないことを示している。PI(4,5)P₂ に結合する PTEN-GFP は WGA コート濃度が低いときには細胞後方に局在を示した (同図, PTEN。ノンコート条件のデータなし)。WGA コート濃度が高い条件では、細胞底面の後方に多く分布し、PakBCRIB、RalGDS-RBD と似た発火パターンを示した。また、底面前端の膜伸展領域にも局在が観察された。WGA コート条件の *pten-null* 細胞では底面の HSPC300-GFP の局在パターンは野生株と同様であったことから (Fig 3-10C, 野生株は Fig 3-9B, WT)、PTEN が SCAR 複合体の局在に直接関与している可能性は低い。PI(4,5)P₂ に結合する GFP-CtxI は²⁰¹、ノンコート条件で細胞後方の膜上に局在を示した (Fig 3-10B, CtxI)。WGA コート条件の細胞底面では後端の収縮領域への局在が顕著であり、底面中央領域では PTEN に比べるとやや目立たないものの発火パターンが観察された。PTEN とは異なり、底面前端の伸展部分に局在は生じなかった。ホスファチジルセリンのプローブ GFP-LactC2 は、ノンコート条件では細胞膜上に微弱なシグナルが検出され、前後の偏りなどは明確には観察されなかった (同図, LactC2)。WGA コート条件の細胞底面を TIRF 顕微鏡で観察した場合には、中央領域の蛍光輝度が高く、辺縁部では相対的に輝度が低かった。

WGA コート条件の細胞底面では PH-CRAC が一様な分布を示し、PTEN が前端に局在したことから、細胞前端における F-アクチン重合は PI3K に依存しないことが考えられた。PI3K の阻害剤 LY294,002 を 50 μM で投与したとき、ノンコート条件ではただちに細胞の変形が抑制されて丸くなり (Fig 3-10D, None, E)、重心移動が大きく阻害されたが (Fig 3-10F)、WGA コート条件では細胞前端におけるアクチン重合と膜の伸展は維持され (Fig 3-10D, WGA)、形状の大きな変化は起こらず (Fig 3-10E)、移動速度はほとんど低下しなかった (Fig 3-10F)。したがって、基質に強く接着した細胞底面での膜伸展とこれに関わるアクチン重合は PI3K に依存しないことが示唆される。

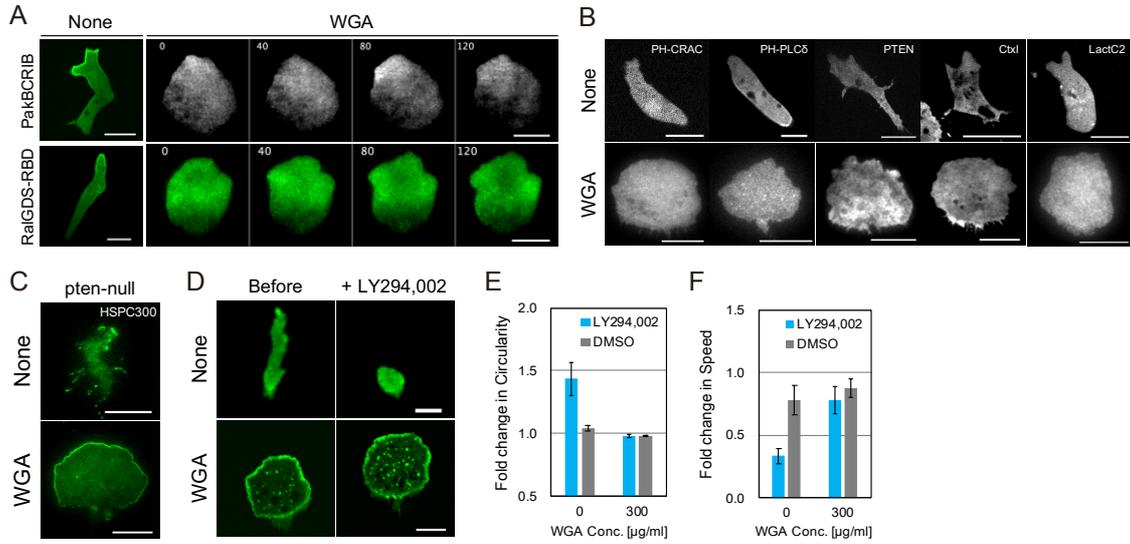


Fig 3-10: 低分子量 GTPase とイノシトールリン脂質の分布

(A) ノンコート条件、WGA コート条件における PakBCRIB-GFP/Ax4 (None)、PakBCRIB-Venus/Ax4 (WGA)、RalGDS-RBD-GFP/Ax4 の蛍光画像 (None: 基質面から高さ 2 μm の位置での共焦点画像、WGA: TIRF)。画像中の数字は時刻を表す [sec]。(B) PH-CRAC-Venus/Ax4, PH-PLC δ -EGFP/Ax4, PTEN-GFP/Ax4, GFP-CtxI/cxtI-, GFP-LactC2/Ax4 の蛍光画像 (None: 共焦点画像, 基質面から高さ 2 μm の位置, WGA: TIRF)。ただし PTEN のみ、"None"は 30 $\mu\text{g/ml}$ WGA コート条件でのデータを示す。"None"の画像は左上、"WGA"は画像の上を細胞の前方としてそろえた。(C) HSPC300-GFP/pten- の TIRF 画像。(D-F) 50 μM LY294,002 投与前後の GFP-Lifeact/Ax4 の共焦点画像 (D)、真円度の変化 (E)、速度変化 (F)。真円度、速度は投与前 15 分間の平均値と投与後 5-20 分の平均値の比を示す。エラーバーは標準誤差を示す。グラフ左から N = 6, 26, 22, 17 cells。スケールバー: 10 μm 。

細胞底面の接着斑の局在パターン

基質接着に関わる分子と F-アクチンの相互作用は膜伸展力の発生に関わると考えられるため、PaxB-GFP と Dd α -ctnn/VinA-GFP を TIRF 顕微鏡によって観察した。PaxB、Dd α -ctnn/VinA はそれぞれ動物細胞のパキシリン、 α -カテニンおよびビンキュリンの相同タンパク質と考えられている²⁰²⁻²⁰⁴。WGA を低濃度でコートした基質上では、細胞底面に PaxB-GFP の輝点状の局在が観察された (Fig 3-11A, WGA Low)。PaxB-GFP の輝点状の局在は新たに獲得された接着領域に形成され (同図, 0-20 sec)、基質に対して静止していた (同図中右下の輝点, 0-20 sec)。WGA を高濃度でコートした基質上では、このような輝点状の局在が細胞底面の端部に沿って多量に形成されていた (Fig 3-11A, WGA High)。細胞前端側では、膜の伸展によって獲得された新規接着領域の端部に沿って PaxB-GFP の局在列が形成され、膜の伸展に伴って内側へ入り込んだ古い局在列は徐々に消滅した (同図左パネル, 0-90 sec)。細胞後端側では、PaxB-GFP の輝点状局在の消滅に伴って接着領域が退縮し (同図右パネル, 0-60 sec)、端部に再び PaxB-GFP の局在が形成された (同, 90 sec)。LatA 処理によって細胞底面の PaxB-GFP の局在は消滅したことから、動物細胞の接着斑と同様に PaxB 局在の形成には細胞内のアクチン骨格が必要である (Fig 3-11B)。Dd α -ctnn/VinA-GFP は、WGA の低濃度コート条件では輝点状の局在がわずかに形成されることはあったが、ほとんど検出されない場合が多かった (Fig 3-11C, WGA Low)。WGA の高濃度コート条件では、PaxB-GFP に比べると蛍光シグナルは弱いものの、同様に細胞底面の端部に沿って多量の輝点状局在が観察された (Fig 3-11C, WGA High)。

動物細胞ではミオシンが接着斑の形成やラメラ領域におけるアクチン後方流に寄与する⁶⁵。接着の強い状況での細胞性粘菌の形態および移動におけるミオシン II の寄与を調べるため、細胞内のミオシン II の分布を観察した。ノンコートの基質上で自発運動する細胞性粘菌では、細胞後端や仮足が退縮する際に細胞膜上に GFP-mhcA の局在が観察された (Fig 3-11D)。細胞底面を TIRF 顕微鏡で観察すると、GFP-mhcA は底面全体で小さなフィラメント状の局在を示し、数秒で生成と消滅をしていた (Fig 3-11E, None)。このような局在パターンは WGA コート条件でより顕著に観察され、GFP-mhcA が多く集積する領域は数秒以内に移り変わった。 (Fig 3-11E, WGA)。細胞後端に安定な局在は示さず、一過的な集積に伴って収縮が起きた。mhcA の遺伝子破壊株は WGA コート条件で野生株と同様に扇形の移動形態となり、細胞前端部で活発なアクチン重合を示した (Fig 3-11F, Lifeact)。HSPC300-GFP はふちに沿って広く安定に局在しており (Fig 3-11F, HSPC300)、racE-null 株 (Fig 3-9B) のように全周方向に局在している細胞もしばしば観察された (71%, N = 7 cells)。

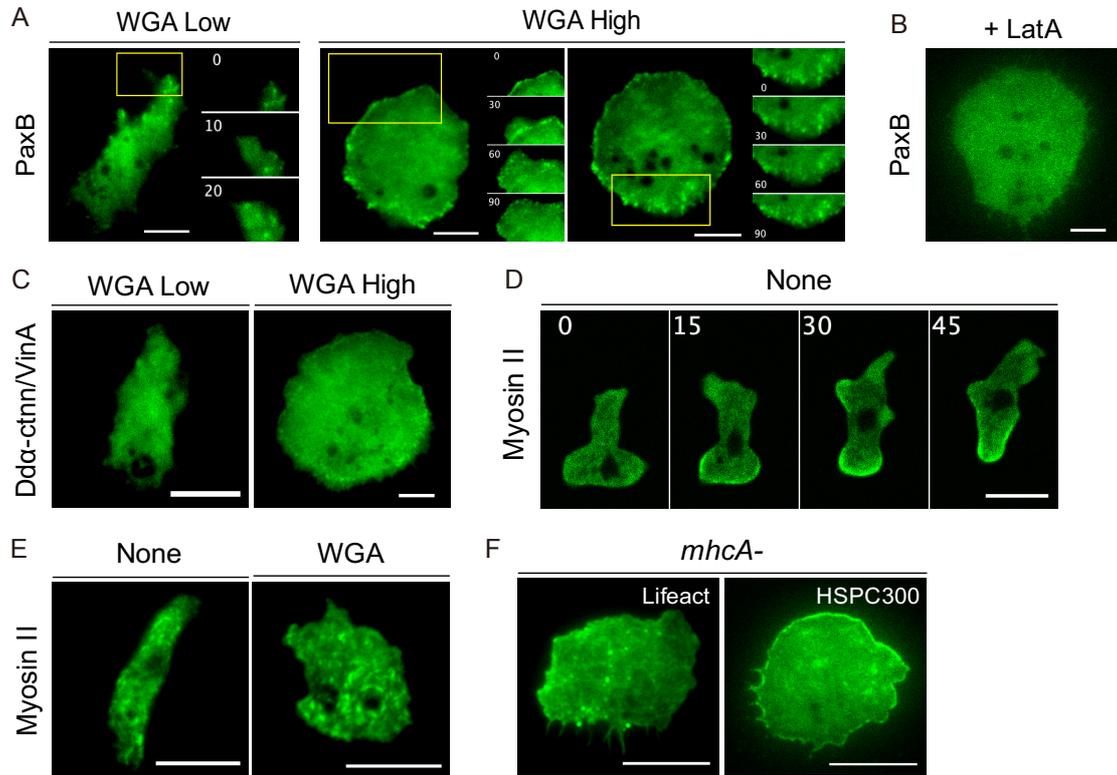


Fig 3-11: 接着斑とミオシンの分布

(A, C) WGA コート条件 (Low: 30 $\mu\text{g/ml}$, High: 300 $\mu\text{g/ml}$) における細胞底面の PaxB-GFP/Ax4、Dda-ctnn/VinA-GFP/Ax4 の TIRF 画像。A では黄枠内領域のタイムラプス画像を右に並置して示した。画像中の数字は時刻を表す [単位: sec]。 (B) 300 $\mu\text{g/ml}$ WGA コート条件で 3 μM LatA 処理した細胞の PaxB-GFP の TIRF 画像。 (D) ノンコート条件の細胞の GFP-mhcA の共焦点画像。基質から高さ約 2 μm の位置での画像。数字は時刻を示す [単位: sec]。 (E) ノンコート条件、WGA コート条件における GFP-mhcA/Ax4 の TIRF 画像。 (F) WGA コート条件における Lifact-neon/mhcA-、HSPC300-GFP/mhcA- の TIRF 画像。スケールバー: 10 μm 。

ヒト好中球様細胞の移動形態における基質接着依存性

動物細胞では基質受容体であるインテグリンを中心とする接着斑の機能が接着依存的な遊走において重要である。基質接着性が細胞の形態と遊走へ与える影響に関してさらなる洞察を得るため、ヒト好中球細胞を用いて基質リガンドへの依存性を調べた。白血球の基質接着分子であるインテグリン、セレクチンをターゲットとしてフィブロネクチン (FN)、WGA をガラス表面にコートし、細胞の形態と遊走を観察した。好中球様に分化誘導した HL60 細胞はノンコートガラス基質によく接着し、頻繁に変形を起こしたものの重心移動は示さなかった。FN がコートされたガラス上では、FN 濃度依存的に重心移動を示す細胞が多く現れるようになった (Fig 3-12A, B)。このような細胞は、細胞体がやや球状に膨らみをもち、前端部に薄いシート状の仮足が形成されていた (Fig 3-12A, FN)。WGA がコートされたガラス上では、細胞は基質上で大きく円形に伸展した形態となり (Fig 3-12A, WGA)、細胞の重心移動は全く起こらなかった (Fig 3-12B, 右上)。細胞の変形に伴う重心の変動が少なくなったことにより、平均速度は WGA 濃度依存的に低くなった。基質に大きく伸展した細胞では細胞膜の端部に隆起構造があり、ときどき外から内へ向かう隆起構造の流れが観察された (同図, 左下部分)。FN と WGA が両方コートされたガラス上では、FN のみをコートした条件に比べて細胞は細長い形状となり、小さな仮足が頻繁に形成されながら移動する様子が観察された (Fig 3-12A, FN + WGA)。画像のように同時に複数個の仮足が形成されることも多かった。透過光画像のコントラストから、細胞側方が持ち上がった形状をしており、仮足や細胞後端は基質に薄く伸展していることが分かる。次に、FN と WGA の濃度を変えて形態と遊走性を調べた。WGA 濃度を一定にして FN 濃度を上げたとき、重心移動を示す細胞の割合は徐々に増加した (Fig 3-12B, 左下)。移動速度は FN のみをコートした場合にくらべて全体的に低くなった。FN 濃度を一定にして WGA 濃度を上げたときには、細胞の移動速度は徐々に低下した (Fig 3-12B, 右下)。FN と WGA を様々な濃度でコートしたときの細胞形状の前後左右の長さの比

(FB/LR) と移動速度の関係をプロットした (Fig 3-12C)。FN のみをコートした条件では $FB/LR = 1.5$ 付近に移動速度のの早い細胞が多く分布しており、WGA 濃度を上げるにつれてそのピークの位置が FB/LR 値の大きい方向へシフトしていく傾向が見られた (Fig 3-12C, 左上)。重心移動を示した細胞に注目するために速さで重みづけした FB/LR 値のヒストグラムはその傾向を示している (Fig 3-12C, 左下)。WGA 濃度を一定にして FN 濃度を上げていった場合にも、細胞の移動速度は FB/LR 値の大きい方向へシフトしていった (Fig 3-12C, 右)。これらの結果は、FN のみをコートした場合にくらべて WGA を混合したときには細胞体の横幅が小さくなること、および WGA の

みコートした条件で円形に伸展した状態から FN 濃度が上がるにつれて仮足の形成を伴い前後方向の細胞の伸長が生じるようになったことに対応すると考えられる。

各基質コート条件での細胞膜の三次元イメージングによって細胞の形状を調べた (Fig 3-12D)。ノンコートのガラス上で HL60 細胞は基質によく接着し、接触角は鋭角となっていた。FN コート条件では細胞体の側方は接触角が約 90° で立ち上がり、WGA コート条件では反対にノンコート条件よりも接触角が鋭くなっていた。FN+WGA コート条件では、仮足部分は接触角が鋭角になっていたが側方は約 90° で立ち上がり、細胞体は円筒状となっていた。

各基質コート条件での細胞内 F-アクチンの分布を調べた。FN コート条件で重心移動を示す細胞では、細胞前端付近に Lifeact-mTurquoise2 の大きなパッチ状の局在が形成されており、この局在の空間的な伝播に伴って細胞前端の伸展と重心移動が起きた (Fig 3-12E, FN)。この局在はアクチン波と呼ばれており、Arp2/3 および SCAR 複合体のサブユニット Hem1 の局在を伴う⁵⁹。細胞底面の輪郭上各点における膜伸展速度 (Fig 3-12F, FN) と Lifeact-mTurquoise2 の蛍光分布 (Fig 3-12G, FN) はよく対応している。WGA コート条件では細胞底面の中央領域に Lifeact-mTurquoise2 の蛍光はほとんど検出されなかったが、端部には全周方向に強い蛍光が観察された (Fig 3-12E, WGA, Fig 3-12G)。この局在は膜の変位をほとんど伴わなかったが (Fig 3-12F)、細胞膜近傍の Lifeact-mTurquoise2 の蛍光量は $300 \mu\text{M}$ CK666 処理によって減衰したことから (Fig 3-12H, I)、Arp2/3 依存性の F-アクチン構造であることが示唆される。FN と WGA を両方コートした条件では、端部への Lifeact-mTurquoise2 の強い局在に伴い膜の突出変形が起きた (Fig 3-12E-G, FN+WGA)。このような仮足は同時に複数個形成されることも多かった。同条件では他に多数の輝点状の局在や、比較的シグナルの弱いパッチ状の明滅が観察された。FN コートされたガラスと PDMS の間 (高さ $3.5 \mu\text{m}$) に細胞を導入した場合にも、Lifeact-mTurquoise2 の大きなパッチ状の局在は形成されず、仮足近傍の局在と底面の輝点状の局在が観察された (Fig 3-12J)。細胞膜-基質間の物理的な距離が細胞底面でのアクチン重合の活性度に影響すると考えられたため、再びガラス基質上に細胞を接着させ、細胞外に蛍光物質フルオレセインを導入して細胞底面を TIRF 観察した。FN コート条件では、細胞膜-基質間に侵入した蛍光が検出されることから隙間が多く存在することが分かる (Fig 3-12K, FN)。一方、WGA コート条件では蛍光がほとんど検出されず、細胞膜と基質が隙間なく密着していた (Fig 3-12K, WGA)。これらの観察結果は、細胞膜-基質間の接着によって Arp2/3 依存的なアクチン重合が抑制されることを示唆する。

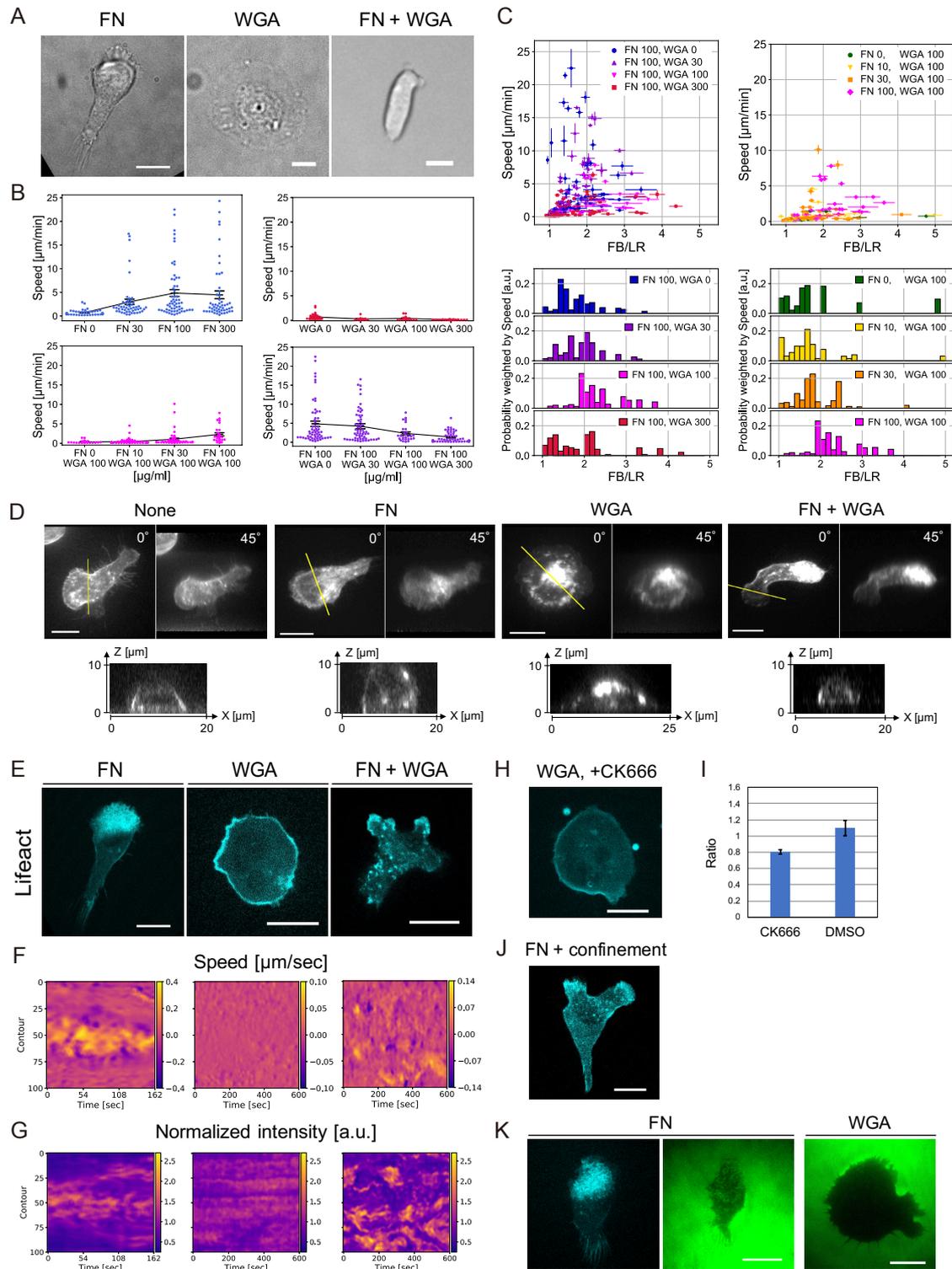


Fig 3-12: 好中球様 HL60 細胞の形態における基質接着依存性

(A) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronectin (FN)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ WGA、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FN + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ WGA コート条件における HL60 細胞の形態。(B) 細胞の移動速度における FN および WGA コート濃度依存性。バーは平均値と標準誤差を示す。(C) 各コート条件における細胞の前後左右の長さの比 (FB/LR) と移動速度の散布図 (上)。プロットは 1 細胞の平均値、エラーバ

(Fig 3-10 Caption 続き)

ーは標準誤差を示す。速さで重みづけしたヒストグラム (下)。凡例は FN および WGA のコート濃度を示す [単位: $\mu\text{g}/\text{ml}$]。 (D) 各基質コート条件における細胞の三次元的な形状。高さ方向に $10\ \mu\text{m}$ の幅を $0.5\ \mu\text{m}$ 刻みで取得した細胞膜 (VividFluor NeuroRed) の共焦点画像を Z 軸から $0^\circ, 45^\circ$ の方向へ最大値投影した画像 (上) と黄色線に沿った XZ 断面図 (下)。 (E) FN、WGA、FN + WGA コート条件の細胞底面における Lifact-mTurquoise2 の共焦点画像。 (F, G) E 中の細胞の底面の輪郭上各点における膜伸展速度 (F) と Lifact-mTurquoise2 蛍光輝度 (G) の時間発展。 (H) WGA コート条件で $300\ \mu\text{M}$ CK666 処理後の細胞底面の Lifact-mTurquoise2 の共焦点画像。 (I) $300\ \mu\text{M}$ CK666 処理後の細胞輪郭近傍の Lifact-mTurquoise2 蛍光輝度の減衰率。CK666 処理前 15 分間と処理後 15~30 分での平均輝度値の比を計算した。エラーバーは標準誤差を表す。N = 5 (CK666), 4 (DMSO)。 (J) FN コートされたガラスと PDMS の間 (高さ $3.5\ \mu\text{m}$) の細胞のガラス側底面における Lifact-mTurquoise2 の共焦点画像。 (K) 細胞外に $10\ \mu\text{M}$ で導入したフルオレセインの TIRF 画像。スケールバー: $10\ \mu\text{m}$ 。

4. 考察

本研究では基質接着の強さやリガンドの種類によって、細胞性粘菌や好中球様細胞の形態が質的に大きく変わることを示した。この実験結果は、細胞の形態や運動の特性が種によって一通りに定まったものではなく、環境要因などに応じて多様な形態をとりうるものであることを明瞭に示している。特に、アメーバ細胞の形態を特徴づける上で重要な仮足の形態は著しい変化を示した。細胞性粘菌では、基質接着の弱い条件において細胞膜上に WASP および SCAR 複合体の局在を伴う一過的な膜の伸展が生じるのに対し、基質接着を強めた条件では細胞底面の端部にこれらの持続性の高い局在と接着斑を伴うラメリポディア様の仮足が形成されることが見出された。SCAR 複合体の膜局在性の変化およびラメリポディア様の仮足の形成は、細胞-基質間の接着を促進する 3 種類の異なるコーティング条件において観察されたことから、基質上の特異的なリガンドに依存した現象ではないと考えられる。また、ガラスと PDMS によって細胞を物理的に圧着させたときには SCAR 複合体の局在促進およびラメリポディア様の仮足の形成は観察されなかったことから、細胞膜と基質間の距離ではなくこれらの親和性が重要な要因と考えられる。基質接着性に依存した SCAR 複合体の膜局在機構は、細胞種間の仮足形態の多様性の理解につながる可能性があるだけでなく、貪食⁵¹や細胞間追従運動⁸²のような接着に依存したアクチン重合を含む過程にも関わることを考えられる。以下、結果に対する考察を詳しく述べる。

SCAR 複合体の膜局在機構

SCAR/WAVE 複合体は、間葉系細胞等のラメリポディア前端には非常に安定した局在を示すが^{205,206}、好中球や T 細胞のような免疫系の細胞では数十秒程度の短い寿命の局在を示す^{59,207,208}。細胞性粘菌では細胞膜上に 10 秒程度の輝点状の局在を示し、一過的な仮足の形成に寄与するが²⁰⁹、細胞の基質接着を促進させた条件では接着面の端部に沿って広範囲に安定な局在を示すことが見出された (Fig 3-4A)。WASP と Arp2/3 も同様の局在パターンを示し、細胞前端部では活発なアクチン重合が観測された (Fig 3-4A-C)。これによって広い角度方向への膜伸展力が生じ、細胞が横へ広がった形態になったと考えられる。

SCAR 複合体の活性化機構はある程度明らかになってきているが、膜局在の機構についてはまだよく理解されていない。複合体の活性化には Rac-GTP とイノシトールリン脂質の両方が必要であることが、*in vitro* の解析によって示されている¹⁹⁸。複合体の活性化はイノシトールリン脂質の負電荷と相関があり、PI(3,4,5)P3 によって最も高い

活性化を示すが²⁰⁵、その他の PI(3,4)P2 や PI(4,5)P2、さらにはイノシトール環を持たないホスファチジルセリンによっても活性化される。複合体の結晶構造解析の結果などから、イノシトールリン脂質は PIR121 および Nap1 との静電相互作用によって細胞膜上における SCAR 複合体の配向を決定し、Rac-GTP は PIR121 に結合して複合体の構造変化を引き起こすことで^{210,211}、SCAR の VCA ドメインを露出させると考えられている²⁸。イノシトールリン脂質との相互作用から複合体が細胞膜上に直接結合することが示唆されているが、細胞内での局在の位置決定がいかになされるかの問題が解決されていない。ヒトの培養細胞や細胞性粘菌では、細胞間接着によって接着領域への SCAR 複合体の局在が促進されることが報告されている^{79,82}。プロトカドヘリン 10 の細胞質側ドメインから SCAR 複合体と相互作用する特徴的なアミノ酸配列が同定されており、Abi、PIR121 上の結合サイトの配列が動物ではよく保存している。相同性検索によって SCAR 複合体と結合する候補タンパク質群が新たに見つかっている⁸⁰。細胞間接着の場合にはこのような接着分子を介して SCAR 複合体が細胞膜上へリクルートされると考えられるが、単独の細胞の場合に細胞膜上で SCAR 複合体と相互作用する分子はまだあまり知られていない。本研究では細胞性粘菌の基質接着を強めることで接着面端部への SCAR 複合体の局在が促進されることを明らかにした。この傾向は WGA、PLL、CTK コートのいずれの条件でも観察された (Fig 3-4A)。これらは異なる機構で細胞-基質間の接着を促進することから、基質表面に存在する特定のリガンドに依存した現象ではないと考えられる。

LatA 処理によるアクチン構造の解体時と、浸透圧変化に対するアクチン構造の再編成時に細胞膜上へ HSPC300-GFP の局在が観測されたこと (Fig 3-8)、および WGA コート条件での *racE*-null 細胞の HSPC300-GFP の観察結果は (Fig 3-8, Fig 3-9)、細胞膜を裏打ちするアクチンコーテックス構造が SCAR 複合体の膜局在に対して抑制的に働くことを示している。アクチンコーテックスの存在によって SCAR 複合体の細胞膜へのアプローチが物理的に妨げられるか、コーテックス上に SCAR 複合体の局在を抑制する分子が存在する可能性が考えられる。アクチンコーテックスが局所的に解体されることで SCAR 複合体は脂質の種類にはそれほど依存せずに細胞膜上へ移行する機構が考えられる。細胞底面の端部はコーテックスが形成されにくい部分なのかもしれない。一方で、LatA 処理によって細胞内のアクチン構造を解体したときには、細胞底面の端部への HSPC300-GFP の集中的な局在が観察された (Fig 3-8A)。したがって細胞が基質に強く接着した条件では、アクチンコーテックス構造とは独立に、底面端部への SCAR 複合体の膜局在が促進されることが示唆される (Fig 3-8A)。細胞を物理的に基質へ圧着させた場合には接着面端部への SCAR 複合体の局在促進は起こらなかった

ことから (Fig 3-4G, H)、細胞膜と基質の単なる接近ではなく、細胞膜-基質間の親和性が大きく関わっている。膜と基質の親和性は接触角が指標となり、WGA コートされた基質上で細胞膜の接触角は鋭角となっていた (Fig 3-4F)。BAR タンパク質は細胞膜の曲率と関連した機能をもち、膜曲率を認識した局在や、膜の変形を誘起する⁴⁰。I-BAR タンパク質は細胞膜の凸曲率を認識するとされ、哺乳類細胞の IRSp53 はラメリポディアの先端に安定な局在を示し、SH3 ドメインを介して Rac および WAVE と相互作用する^{195,212,213}。一方、細胞性粘菌に唯一存在する I-BAR タンパク質の IBARa はイノシトールリン脂質に結合し、細胞膜の突出構造に局在を示すが、細胞前端における SCAR 複合体の局在やフィロポディアの形成には必要ない^{165,196}。細胞膜-基質間の親和性が高い状況では IBARa が SCAR 複合体の膜局在に対して促進的にはたらく可能性が考えられたため観察を行った。ラメリポディア様の仮足前端に IBARa の局在は観察されなかったが、LatA 処理時に細胞底面の端部から伸長する細長い膜の内部には強い蛍光が観察された (Fig 3-8D, E)。IBARa の関与について現状では明らかではないが、IBARa への GFP 付与は局在性に大きく影響する可能性があるため、先行研究¹⁶⁵のように抗体染色などで内在のタンパク質を観察すべきかもしれない。

接着斑は細胞-基質間接着の促進によって強められ、アクチン骨格系と相互作用するが⁶⁵、細胞前端における PaxB、Dd α -ctnn/VinA の局在パターンは HSPC300 とは異なっていた (Fig 3-11A, C)。また、Lat A 処理時には PaxB の局在は消滅した (Fig 3-11B)。したがってこれらの接着斑関連分子は SCAR 複合体の膜局在に直接関与していないと考えられる。

イノシトールリン脂質と相互作用する PH-CRAC、PH-PLC δ 、LactC2 は WGA コート条件において細胞底面で一様に分布していた (Fig 3-10B)。一方、PTEN は細胞後方や細胞前端に分布し、CtxI は細胞後端に局在が観察された。PH-PLC δ 、PTEN、CtxI はいずれも PI(4,5)P2 に結合するが、これらの分布が異なっていたのは PI(4,5)P2 結合ドメイン以外の部分に関わるためと考えられる。CtxI は PI(4,5)P2 との結合によって C 末で F-アクチンと結合することが示唆されている²⁰¹。イノシトールリン脂質には多くの状態があり、必ずしもそれらに特異性の高いプローブが確立されてはいないため、すべての分布を正確に把握することは容易ではないが、WGA コート条件では PI3K 阻害剤の LY294,002 による処理後にも仮足領域におけるアクチン重合は維持されたため (Fig 3-10D-F)、基質接着が強い状況での仮足形成に関して、細胞性粘菌の場合には哺乳類細胞で示されているような PI(3,4,5)P3 への依存性は考えにくい²⁰⁵。細胞の仮足形成における PI3K および PI(3,4,5)P3 の役割に関しては先行研究で意見が分かれている。cAMP への走化性を示す細胞性粘菌や fMLP への走化性を示す好中球様細胞では、細

胞前方に PI(3,4,5)P3 の局在が観察されるが^{36,38,178}、細胞性粘菌の PI3K1-5 および PTEN の遺伝子をすべて破壊しても、細胞の自発運動および走化性能は失われない²¹⁴。また、細胞性粘菌の葉酸への走化性においては、PI(3,4,5)P3 の局在を伴う仮足の形成方向は濃度勾配に依存せず、むしろ局在を伴わない仮足が強い方向づけを受ける¹⁷¹。PI3K の阻害剤である LY294,002 での処理によって、基質接着の弱い条件では仮足の形成が強く抑制されたが、接着の強い条件では仮足およびアクチン重合が維持されることが観察された (Fig 3-10D-F)。細胞膜の突出変形を駆動するアクチン重合の機構には幾種類か存在し、それらの PI3K への依存性の程度が違っていることが考えられる。

WASP A は SCAR 複合体と同様に、細胞前端に局在し、基質接着が強い状況では底面端部に沿った広範囲に安定な局在を示した (Fig 3-4B)。LatA 処理によって細胞膜上に多量の WASP A 局在が出現したが、SCAR 複合体とは異なり、WGA コート条件では接着面端部への集中的な局在は観察されなかった (Fig 3-8A)。WASP は塩基領域を介してイノシトールリン脂質と結合し、*in vitro* では PI(3,4)P2、PI(4,5)P2、PI(3,4,5)P3 と同レベルの結合性を示す²¹。WASP A は F-BAR タンパク質 NLP、SLP と相互作用し、細胞内での小胞輸送にも関与することが知られる^{18,215}。WASP と SCAR 複合体はともに真核細胞に広く保存しており、両者を保持する生物のみがアメーバ運動を示すことが示唆されている²⁰⁸。これらの膜局在性の違いは分子機能や膜局在機構自体にも重要な情報となるだろう。

基質接着が強い状況における膜伸展のダイナミクス

Arp2/3 複合体および SCAR 複合体は F-アクチンの樹状構造の形成に必須の因子であるため、これらの局在は膜の伸展が起こりうる領域を示す。しかし基質接着が強い状況では SCAR 複合体の膜局在と膜の伸展は必ずしも対応しなかった (Fig 3-5F)。膜の伸展ダイナミクスを記述するためには別の要因を考慮する必要がある。SCAR 複合体は細胞質中では不活性状態で存在し、活性化には Rac-GTP の結合を必要とする。

WASP もまた自己抑制的な構造であり、哺乳類では Cdc42^{22,23}、細胞性粘菌では RacC が CRIB ドメインに結合することによって活性化される²⁴。動物細胞のラメリポディアを対象とした超解像顕微鏡による 20 msec の時間分解能での 1 分子追跡の解析結果によれば²¹⁶、SCAR 複合体のサブユニット Abi1 や I-BAR タンパク質の IRSp53 は、ラメリポディア領域では拡散的にふるまい、細胞膜の先端部では拡散係数が大幅に低下し、ほぼ不動化している。一方、Rac1 分子は同領域において高い拡散性を維持するが、変異体では拡散係数が変化することから、ラメリポディアの先端付近で一過的に活性化されて SCAR 複合体などと相互作用することが示唆されている。光遺伝学的手

法によって Rac1-GTP をラメリポディア先端ヘリクルートしたときには膜の伸展が起きることが観察されている²¹⁶。

WGA コートされた基質上の細胞性粘菌の底面において、PakBCRIB (Rac-GTP のプローブ) は、数秒で移り変わるパッチ状の発火パターンを示した (Fig 3-10A)。これと似た時定数の局在の移り変わりは、Rap1-GTP (RalGDS-RBD)、PTEN、CtxI、Myosin II (Myosin heavy chain A) にも観測された (Fig 3-10A, B, Fig 3-11E)。これらを定量的に特徴づけることはできていないが、PH-CRAC にはこのような局在パターンが観察されなかったことや変化の時定数から、アクチン波とは異なる現象と考えられる。このような細胞膜上でシグナルの発火パターンは共焦点顕微鏡ではほとんど検出されず、TIRF 顕微鏡によって観察されたものである。基質接着の強さによって膜伸展の寿命や横幅はほとんど変わらなかったことから (Fig 3-5H, J)、基質接着が強められていない状況においてもこのような発火が細胞膜上で起きていて、その時定数やドメインサイズは基質接着にはそれほど依存しないことが予想される。これは今後の課題である。

基質接着が強い状況における細胞の極性形成

細胞-基質間の接着を促進することで SCAR 複合体は細胞底面の端部に沿った広い範囲に安定な局在を示すようになったが、全周方向には局在しなかった。SCAR 複合体の局在しない領域にはアクチンコーテックス構造が形成され、細胞の移動後端となっていた。アクチンコーテックス構造の形成に欠陥のある *racE-null* 細胞では SCAR 複合体が全周方向に局在していることが観察された (Fig 3-9B)。WGA コート条件で *racE-null* 細胞はしばしば静止状態となり、静止状態から並進移動を開始する際には、細胞の後端となる側にコーテックス様の F-アクチンの集積が観察された (Fig 3-9F)。アクチンコーテックスの形成を促す SMIFH2 で細胞の片側を処理することによって、その側を後端とする細胞の並進移動が引き起こされた (Fig 3-9J)。SMIFH2 はフォルミンの FH2 ドメインを介した F-アクチンへの結合を競合的に阻害することでフォルミンの機能を阻害する¹⁹¹。細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* にはフォルミンファミリータンパク質は 10 種類存在し、そのいずれにも FH2 ドメインは保存されていることから⁵、SMIFH2 処理によってすべてのフォルミンの機能が阻害されていると考えられる。フォルミンは F-アクチン重合を促進する核形成因子であり、この観察結果は素朴には直観と矛盾するようであるが、コーテックス構造の形成はフォルミン等による F-アクチン重合だけでなく、Filamin や Cortexillin などのような多数の因子が関わるものであるから、これらの相互作用を考慮しなければ正しい理解は得られないと思われる。静止

状態にある *racE*-null 細胞の底面では全周方向で樹状の F-アクチン構造が形成されているが、どの程度の伸展力が発生しているかは未知であるため、伸展力のつりあいによって静止しているのか、あるいはどの部分でも基質接着に抗して細胞膜を変位させられるほどの力は発生していないのかは定かではない。このような後端形成を伴う対称性の破れは Cramer や Theriot らが解析している⁵⁵⁻⁵⁷。Theriot らは、ミオシン II 収縮を促進するホスファターゼ Calyculin A やインテグリンによる基質接着を阻害する RGD ペプチドを魚の表皮細胞であるケラトサイトの片側から投与することによって極性形成を誘起し、そのときのアクチン後方流や基質にかかる力の分布を測定している^{56,57}。著者らは、ミオシン II 収縮の増強や基質接着の抑制によってアクチン後方流が強められ、F-アクチンとインテグリンの強い結合が形成できなくなることにより、さらにアクチン後方流が強まるというポジティブフィードバック機構を提案している。膜伸展力を失った側で収縮性の状態が維持されるとすると、誘起された細胞極性が持続的に安定する。ケラトサイトほどの顕著なアクチン後方流は単独の細胞性粘菌では観察されないため、この理論がそのまま適用できるかどうかは分からないが、細胞極性における後端構造の重要性が示されている。

基質接着を強めることで細胞の移動における直進性が上昇することが観測された (Fig 3-3E)。基質接着が弱い条件で移動する細胞性粘菌では、仮足が新規に形成される場合と、既存の仮足から分岐するように形成される場合がある。後者においては、既存の仮足の伸展方向に対して約 45°の角度方向に次の仮足が形成される頻度が高く^{53,217}、分岐した二つの仮足から一方が選択されて細胞の移動方向が決定される。このような機構で細胞の移動方向が変化することで、細胞の移動に探索性が生じると考えられる。細胞-基質間の接着を促進することにより、膜の伸展の寿命はほとんど変わらず (Fig 3-5H)、伸展速度は低下したため (Fig 3-5C, F)、1 回の伸展距離は低下していた。基質接着の強い条件では、SCAR 複合体の局在が示す大きな扇形の前端領域の各所で小さな伸展がくりかえし起こりながら細胞が徐々に並進移動し、ある 1 ヶ所が突出することは起きにくい状態となっていた。したがって、この状態の細胞では仮足の分岐と選択による探索性が失われていると考えられる。あるいは、細胞の前後それぞれから cAMP 濃度勾配を形成した時に観察された膜伸展性の違いから (Fig 3-7)、細胞後端ではアクチンコーテックス構造が新規の仮足形成を抑制していることが示唆される。アクチンコーテックス形成に欠陥のある *racE*-null 細胞では、基質接着の増強によって直進性が上昇する傾向は認められなかった (Fig 3-9E)。これらのことから、基質接着の強い状況では細胞の移動方向の決定はアクチンコーテックスの形成位置に強く依存し、アクチンコーテックス構造に依存した細胞の収縮変形には仮足の分岐形成の

ような方向変化を保証するアクティブな機構が備わっていないことで、直進性の高い軌跡になった可能性が考えられる。

好中球様細胞の形態における基質接着依存性

免疫細胞の遊走環境では、細胞の足場となる基質表面にはインテグリンのリガンドとなるフィブロネクチン (FN) や ICAM 等に加えて、セレクチンやケモカイン等が存在している。これらが及ぼす複合的な影響について評価することが生体環境中の細胞のふるまいを理解する上で重要である。好中球様に分化させた HL60 細胞は、FN をコートした基質上では底面に F-アクチンのパッチ状の局在が形成され、その空間的な伝播に伴って移動する。このパッチ状の局在はアクチン波と呼ばれ、その形成には WAVE 複合体および Arp2/3 が必要とされる⁵⁹。WAVE 複合体のサブユニット Hem-1 (Nap1) はアクチン波の前面だけでなく内部にも多数の断片や輝点状の局在を示す。

ノンコート条件にくらべて、FN コート条件では HL60 の細胞体は高さ方向に大きく膨らんでおり、接触角は 90°前後となっていた。また、細胞底面と基質の間には隙間が多く存在した (Fig 3-12D, K)。インテグリンが細胞外のリガンドと結合すると、細胞質側でのシグナル伝達により RhoA を介してミオシン収縮を促進する²¹⁸。これにより、基質表面に存在する FN の密度が高いほど細胞全体の収縮性が上昇し、重心移動を示す細胞が多く出現するようになったと考えられる (Fig 3-12B)。L-セレクチンとの結合を想定した WGA コート条件では、細胞は基質によく伸展し、底面端部においてアクチン重合が活発に起きていたが、膜変形および重心移動をほとんど示さなかった。端部におけるアクチン重合がいかなる分子構造のものであるかを識別するためのマーカーの観察が必要であるが、CK666 での処理時に Lifeact-mTurquoise2 蛍光の減衰が観察されたことから (Fig 3-12H, I)、Arp2/3 に媒介される樹状のネットワーク構造であることが予想される。FN と WGA をコートした条件では、HL60 細胞の仮足の形態は FN のみをコートした条件にくらべて、横幅が小さく、寿命が短く、一度に複数形成されやすい特徴があった。生体内で間質中を遊走する好中球や T 細胞はこのように縦に長く伸びてしばしば分岐形態を示すことが観察されている^{63,219}。基質表面のコート条件と好中球の仮足形態の関係を明らかにするためにはさらなる解析が必要であるが、本研究の観察結果は、生体内の細胞の形態的特徴が比較的少数の要因によって現れることを示している。

5. 第2部のまとめ

真核細胞の運動は膜の伸展と収縮のダイナミクスによるものである。膜の伸展には Arp2/3 を媒介として形成される F-アクチンの樹状構造が必要とされる。Arp2/3 とその制御因子である WASP ファミリータンパク質は真核細胞できわめてよく保存しており¹⁸、仮足形成の分子メカニズムの共通性が示唆されるが、細胞の仮足の大きさや持続性は種によって異なっている。その顕著な例は、アメーバ細胞の細長くて厚みがあり一過的な伸展を示す仮足 (Pseudopod) と、動物の上皮間葉系細胞に見られる、薄くシート状に広がり持続性の高い伸展を示すラメリポディア (Lamellipodia) である。両仮足構造間の違いをもたらす分子メカニズムを明らかにするため、本研究では細胞性粘菌アメーバの移動形態における基質接着依存性を解析した。その結果、WGA レクチンなどのコーティングを施した基質上において、細胞性粘菌の形態や運動性に質的な変化が生じるだけでなく、動物のラメリポディアに似た薄いシート状の仮足が形成されることが見出された。この仮足形態の変化には WASP や SCAR 複合体、Arp2/3、基質接着関連分子の局在性の変化が伴い、それぞれ強接着条件において動物の上皮間葉系細胞のラメリポディアにおける局在パターンと似た特徴を備えていた。シート状の仮足領域における活発なアクチン重合は PI3K の阻害剤による処理後にも持続したため、PI3K 非依存性の反応である。細胞性粘菌でのラメリポディア様の仮足の形成、および細胞端部における SCAR 複合体の局在範囲の拡大と持続時間の上昇は、細胞-基質間接着を促進する 3 種類の異なるコーティング条件において観察されたことから、基質上の特異的なリガンドに依存した現象ではないと考えられる。近年、細胞間接着に関わるプロトカドヘリンの配列から細胞間接着領域へ SCAR 複合体の膜局在を誘起する候補タンパク質群が見つかっているが⁸⁰、本研究の結果は、リガンドに依存しない非特異的な接着によって SCAR 複合体の膜局在が促進される分子メカニズムの存在を示唆している。細胞の基質接着性に依存したアクチン重合の促進機構は、基質上を這い回る細胞の仮足形成機構や細胞種間の仮足形態の多様性の理解につながると考えられる。

総括

本研究では、細胞の形態変化のしくみとその環境応答的な性質を調べるため、基質の地形と接着性がアメーバ細胞の形態に及ぼす影響について解析した。

第1部では、基質表面の地形への依存性について解析した。細胞性粘菌のアクチン波は、貪食や飲作用において形成されるフィーディングカップと同一の分子構造を有する動的な構造である。本研究では、フィーディングカップの形成に関わる細胞骨格系のダイナミクスの地形依存性を調べるため、細胞底面に形成されるアクチン波を対象として、微細加工技術と顕微鏡画像による解析を行った。その結果、アクチン波の生成率や伝播方向が基質上の曲面によって規定されることを初めて明らかにした。また、蛍光プローブの観察および薬理的な解析から、凸曲面上でのアクチン波の生成率の上昇には PI3K が関与することが示唆された。この結果は、基質上の曲面が受容体を介したシグナルとは別にフィーディングカップの形成と発達の制御因子として働くことを示唆する。

第2部では、基質の接着性が細胞および仮足の形態へ与える影響を解析した。仮足の大きさや持続性は、細胞の形態や運動性を特徴づける要因であり、種によって様々である。仮足形成の分子メカニズムと形態上の多様性に関する理解を得るため、基質表面改変と顕微鏡画像の解析によって、細胞の仮足動態における基質接着依存性を調べた。基質表面への細胞の接着を促進することで、細胞性粘菌アメーバの形態や運動性に変化が生じたことに加え、動物の上皮間葉系細胞に見られるラメリポディアと似た薄いシート状の膜伸展形態が形成されることが見出された。蛍光プローブの観察により、このラメリポディア様の仮足領域では WASP ファミリータンパク質や基質接着関連分子の局在性が劇的に変化しており、これらの分子の局在パターンにおいても動物細胞のラメリポディアの特徴を備えていることが確認された。細胞性粘菌におけるラメリポディア様の仮足の形成、および SCAR 複合体の局在範囲の拡大と持続時間の上昇は、細胞-基質間の接着を促進する方法に依存せずに観察されたことから、基質上の特異的なリガンドに依らない現象と考えられる。本研究の結果は、リガンドに依存しない非特異的な接着によって SCAR 複合体の膜局在が促進される分子メカニズムの存在を強く示唆しており、基質上を這い回る細胞の仮足形成機構や細胞種間の仮足形態の多様性の理解につながるものと考えられる。

本研究では、基質の地形や接着性といった物理的な要因が細胞骨格系の状態に干渉し、細胞形態のダイナミクスに変調を及ぼすことの一部を明らかにした。本研究の結果は、細胞の膜変形の分子メカニズムや環境応答性の理解に寄与すると考えられる。

引用文献

1. Pollard, T. D. & Cooper, J. A. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**, 1208–12 (2009).
2. 佐藤正明 編著. 細胞のマルチスケールメカノバイオロジー. (森北出版, 2017).
3. Kühn, S. & Geyer, M. Formins as effector proteins of rho GTPases. *Small GTPases* **5**, e29513 (2014).
4. Breitsprecher, D. & Goode, B. L. Formins at a glance. *J. Cell Sci.* **126**, 1–7 (2013).
5. Rivero, F. *et al.* A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from *Dictyostelium*, fungi and metazoa. *BMC Genomics* **6**, 28 (2005).
6. Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. & Faix, J. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat. Cell Biol.* **7**, 619–625 (2005).
7. Ramalingam, N. *et al.* A resilient formin-derived cortical actin meshwork in the rear drives actomyosin-based motility in 2D confinement. *Nat. Commun.* **6**, 8496 (2015).
8. Litschko, C. *et al.* Functional integrity of the contractile actin cortex is safeguarded by multiple Diaphanous-related formins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 3594–3603 (2019).
9. Junemann, A. *et al.* A Diaphanous -related formin links Ras signaling directly to actin assembly in macropinocytosis and phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E7464–E7473 (2016).
10. Kitayama, C. & Uyeda, T. Q. P. ForC, a novel type of formin family protein lacking an FH1 domain, is involved in multicellular development in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Sci.* **116**, 711–723 (2003).
11. Dames, S. A. *et al.* Structure, dynamics, lipid binding, and physiological relevance of the putative GTPase-binding domain of *Dictyostelium* formin C. *J. Biol. Chem.* **286**, 36907–36920 (2011).
12. Molinie, N. & Gautreau, A. The Arp2/3 regulatory system and its deregulation in cancer. *Physiol. Rev.* **98**, 215–238 (2018).
13. Rotty, J. D., Wu, C. & Bear, J. E. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 7–12 (2013).
14. Pollard, T. D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 451–477 (2007).

15. Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. & Pollard, T. D. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* **127**, 107–115 (1994).
16. Robinson, R. C. *et al.* Crystal Structure of Arp2 / 3 Complex. **294**, 1679–1685 (2001).
17. Thrasher, A. J. & Burns, S. O. WASP: A key immunological multitasker. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 182–192 (2010).
18. Veltman, D. M. & Insall, R. H. WASP family proteins: their evolution and its physiological implications. *Mol. Biol. Cell* **21**, 2880–93 (2010).
19. Pollitt, A. Y. & Insall, R. H. WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *J. Cell Sci.* **122**, 2575–2578 (2009).
20. Derry, J. M. J., Ochs, H. D. & Francke, U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **78**, 635–644 (1994).
21. Myers, S. A., Han, J. W., Lee, Y., Firtel, R. A. & Chung, C. Y. A *Dictyostelium* homologue of WASP is required for polarized F-actin assembly during chemotaxis. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2191–2206 (2005).
22. Rohatgi, R., Ho, H. Y. H. & Kirschner, M. W. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* **150**, 1299–1309 (2000).
23. Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-manan, N., Liu, G. A. & Rosen, M. K. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* **404**, 151–158 (2000).
24. Han, J. W., Leeper, L., Rivero, F. & Chung, C. Y. Role of RacC for the regulation of WASP and phosphatidylinositol 3-kinase during chemotaxis of *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* **281**, 35224–35234 (2006).
25. Miki, H., Miura, K. & Takenawa, T. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 5326–5335 (1996).
26. Bear, J. E., Rawls, J. F. & Saxe, C. L. SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late *Dictyostelium* development. *J. Cell Biol.* **142**, 1325–1335 (1998).
27. Miki, H., Suetsugu, S. & Takenawa, T. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* **17**, 6932–6941 (1998).
28. Chen, Z. *et al.* Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature*

- 468, 533–538 (2010).
29. Davidson, A. J. & Insall, R. H. Actin-based motility: WAVE regulatory complex structure reopens old SCARs. *Curr. Biol.* **21**, R66–R68 (2011).
 30. Bustelo, X. R., Sauzeau, V. & Berenjano, I. M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: Regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays* **29**, 356–370 (2007).
 31. Heo, W. Do *et al.* PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* **314**, 1458–61 (2006).
 32. Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509–14 (1998).
 33. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).
 34. Lemmon, M. A. Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* **4**, 201–213 (2003).
 35. Lemmon, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 99–111 (2008).
 36. Servant, G. *et al.* Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* **287**, 1037–40 (2000).
 37. Iijima, M. & Devreotes, P. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell* **109**, 599–610 (2002).
 38. Parent, C. a & Devreotes, P. N. A cell's sense of direction. *Science* **284**, 765–70 (1999).
 39. 末次志郎 & 伊藤弓弦. BARドメインと細胞膜の相互作用. *生化学* **84**, 30–35 (2012).
 40. Antony, B. Mechanisms of Membrane Curvature Sensing. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 101–123 (2011).
 41. Peter, B. J. *et al.* BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495–9 (2004).
 42. Bosgraaf, L. & van Haastert, P. J. M. The regulation of myosin II in *Dictyostelium*. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 969–979 (2006).
 43. Brzeska, H., Koech, H., Pridham, K. J., Korn, E. D. & Titus, M. A. Selective localization of myosin-I proteins in macropinosomes and actin waves. *Cytoskeleton* **73**, 68–82 (2016).
 44. Bretschneider, T. *et al.* Dynamic Actin Patterns and Arp2/3 Assembly at the Substrate-Attached Surface of Motile Cells. *Curr. Biol.* **14**, 1–10 (2004).
 45. Bretschneider, T. *et al.* The Three-Dimensional Dynamics of Actin Waves, a Model of Cytoskeletal Self-Organization. *Biophys. J.* **96**, 2888–2900 (2009).

46. Taniguchi, D. *et al.* Phase geometries of two-dimensional excitable waves govern self-organized morphodynamics of amoeboid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 5016–5021 (2013).
47. Miao, Y. *et al.* Wave patterns organize cellular protrusions and control cortical dynamics. *Mol. Syst. Biol.* **15**, e8585 (2019).
48. Gerisch, G., Schroth-Diez, B., Müller-Taubenberger, A. & Ecke, M. PIP3 waves and PTEN dynamics in the emergence of cell polarity. *Biophys. J.* **103**, 1170–1178 (2012).
49. Schroth-Diez, B. *et al.* Propagating waves separate two states of actin organization in living cells. *HFSP J.* **3**, 412–427 (2009).
50. Asano, Y., Nagasaki, A. & Uyeda, T. Q. P. Correlated waves of actin filaments and PIP3 in *Dictyostelium* cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **65**, 923–934 (2008).
51. Veltman, D. M. *et al.* A plasma membrane template for macropinocytic cups. *Elife* **5**, 24 (2016).
52. Jasnin, M. *et al.* The Architecture of Traveling Actin Waves Revealed by Cryo-Electron Tomography. *Structure* **27**, 1211-1223.e5 (2019).
53. Li, L., Nørrelkke, S. F. & Cox, E. C. Persistent cell motion in the absence of external signals: A search strategy for eukaryotic cells. *PLoS One* **3**, (2008).
54. Lomakin, A. J. *et al.* Competition for actin between two distinct F-actin networks defines a bistable switch for cell polarization. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1435–1445 (2015).
55. Mseka, T., Bamburg, J. R. & Cramer, L. P. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization. *J. Cell Sci.* **120**, 4332–4344 (2007).
56. Yam, P. T. *et al.* Actin–myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J. Cell Biol.* **178**, 1207–1221 (2007).
57. Barnhart, E., Lee, K.-C., Allen, G. M., Theriot, J. A. & Mogilner, A. Balance between cell–substrate adhesion and myosin contraction determines the frequency of motility initiation in fish keratocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5045–5050 (2015).
58. Cramer, L. P., Kay, R. R. & Zatulovskiy, E. Repellent and Attractant Guidance Cues Initiate Cell Migration by Distinct Rear-Driven and Front-Driven Cytoskeletal Mechanisms. *Curr. Biol.* **28**, 995-1004.e3 (2018).
59. Weiner, O. D., Marganski, W. A., Wu, L. F., Altschuler, S. J. & Kirschner, M. W. An actin-based wave generator organizes cell motility. *PLoS Biol.* **5**, 2053–2063 (2007).
60. Holmes, W. R. & Edelstein-Keshet, L. Analysis of a minimal Rho-GTPase circuit

- regulating cell shape. *Phys. Biol.* **13**, (2016).
61. Liu, Y. J. *et al.* Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell* **160**, 659–672 (2015).
 62. Maiuri, P. *et al.* Actin flows mediate a universal coupling between cell speed and cell persistence. *Cell* **161**, 374–386 (2015).
 63. Hons, M. *et al.* Chemokines and integrins independently tune actin flow and substrate friction during intranodal migration of T cells. *Nat. Immunol.* **19**, 606–616 (2018).
 64. Ruprecht, V. *et al.* Cortical contractility triggers a stochastic switch to fast amoeboid cell motility. *Cell* **160**, 673–685 (2015).
 65. Case, L. B. & Waterman, C. M. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat. Cell Biol.* **17**, 955–963 (2015).
 66. Mitchison, T. & Kirschner, M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* **1**, 761–772 (1988).
 67. Tsai, T. Y. C. *et al.* Efficient Front-Rear Coupling in Neutrophil Chemotaxis by Dynamic Myosin II Localization. *Dev. Cell* **49**, 189-205.e6 (2019).
 68. Artemenko, Y., Lampert, T. J. & Devreotes, P. N. Moving towards a paradigm: common mechanisms of chemotactic signaling in *Dictyostelium* and mammalian leukocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3711–3747 (2014).
 69. Andrew, N. & Insall, R. H. Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of PtdIns 3-kinase by biased choices between random protrusions. *Nat. Cell Biol.* **9**, 193–200 (2007).
 70. Insall, R. H. Eukaryotic chemotaxis mechanisms. (2010).
 71. Keizer-Gunnink, I., Kortholt, A. & Van Haastert, P. J. M. Chemoattractants and chemorepellents act by inducing opposite polarity in phospholipase C and PI3-kinase signaling. *J. Cell Biol.* **177**, 579–585 (2007).
 72. Rijal, R., Consalvo, K. M., Lindsey, C. K. & Gomer, R. H. An endogenous chemorepellent directs cell movement by inhibiting pseudopods at one side of cells. *Mol. Biol. Cell* **30**, 242–255 (2018).
 73. Williams, T. D. & Kay, R. R. The physiological regulation of macropinocytosis during *Dictyostelium* growth and development. *J. Cell Sci.* **131**, jcs213736 (2018).
 74. 林正男. 新細胞接着分子の世界. in (羊土社, 2001).
 75. Ivetic, A., Green, H. L. H., Hart, S. J., Hoskins Green, H. L. & Hart, S. J. L-selectin: A

- Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front. Immunol.* **10**, 1–22 (2019).
76. Phillips, M. L. *et al.* ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Le^x. *Science* **250**, 1130–2 (1990).
 77. Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M. & Seed, B. Recognition by ELAM-1 of the Sialyl-Le^x determinant on myeloid and tumor cells. *Science* **250**, 1132–5 (1990).
 78. Lowe, J. B. *et al.* ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell* **63**, 475–484 (1990).
 79. Nakao, S., Platek, A., Hirano, S. & Takeichi, M. Contact-dependent promotion of cell migration by the OL-protocadherin-Nap1 interaction. *J. Cell Biol.* **182**, 395–410 (2008).
 80. Chen, B. *et al.* The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell* **156**, 195–207 (2014).
 81. Uemura, M., Nakao, S., Suzuki, S. T., Takeichi, M. & Hirano, S. OL-protocadherin is essential for growth of striatal axons and thalamocortical projections. *Nat. Neurosci.* **10**, 1151–1159 (2007).
 82. Fujimori, T., Nakajima, A., Shimada, N. & Sawai, S. Tissue self-organization based on collective cell migration by contact activation of locomotion and chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 4291–4296 (2019).
 83. Swanson, J. A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 639–649 (2008).
 84. Pan, M., Xu, X., Chen, Y. & Jin, T. Identification of a Chemoattractant G-Protein-Coupled Receptor for Folic Acid that Controls Both Chemotaxis and Phagocytosis. *Dev. Cell* **36**, 428–439 (2016).
 85. Pan, M. *et al.* A G-protein-coupled chemoattractant receptor recognizes lipopolysaccharide for bacterial phagocytosis. *PLoS Biol.* **16**, e2005754 (2018).
 86. Wen, X. *et al.* G-protein-coupled formyl peptide receptors play a dual role in neutrophil chemotaxis and bacterial phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **30**, 346–356 (2019).
 87. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
 88. Totaro, A., Panciera, T. & Piccolo, S. YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nat. Cell Biol.* **20**, 888–899 (2018).
 89. Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. & Wang, Y. L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* **79**, 144–152 (2000).

90. Riaz, M., Versaevel, M., Mohammed, D., Glinel, K. & Gabriele, S. Persistence of fan-shaped keratocytes is a matrix-rigidity-dependent mechanism that requires $\alpha 5\beta 1$ integrin engagement. *Sci. Rep.* **6**, 1–14 (2016).
91. Oakes, P. W. *et al.* Neutrophil morphology and migration are affected by substrate elasticity. *Blood* **114**, 1387–1395 (2009).
92. Artemenko, Y., Axiotakis, L., Borleis, J., Iglesias, P. A. & Devreotes, P. N. Chemical and mechanical stimuli act on common signal transduction and cytoskeletal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E7500–E7509 (2016).
93. Naruse, K., Yamada, T. & Sokabe, M. Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **274**, H1532–1538 (1998).
94. 曾我部正博, 早川公英, 河上敬介, 成瀬恵治 & 辰巳仁史. 機械刺激に対する細胞の形態応答とインテグリン/細胞骨格系の役割. *日本バイオレオロジー学会誌* **16**, 8–20 (2002).
95. Hayakawa, K., Tatsumi, H. & Sokabe, M. Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *J. Cell Biol.* **195**, 721–727 (2011).
96. 辰巳仁史, 早川公英 & 曾我部正博. アクチン繊維は張力を感じ、コフィリンとの相互作用を介して細胞骨格の動態を制御するメカノセンサーである. *生物物理* **55**, 187–191 (2015).
97. Bade, N. D., Kamien, R. D., Assoian, R. K. & Stebe, K. J. Curvature and Rho activation differentially control the alignment of cells and stress fibers. *Sci. Adv.* **3**, 1–8 (2017).
98. Fey, P., Kowal, A. S., Gaudet, P., Pilcher, K. E. & Chisholm, R. L. Protocols for growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Nat. Protoc.* **2**, 1307–1316 (2007).
99. Birnie, G. D. The HL60 cell line: A model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br. J. Cancer* **58**, 41–45 (1988).
100. Rajnicek, A. M., Britland, S. & McCaig, C. D. Contact guidance of CNS neurites on grooved quartz: influence of groove dimensions, neuronal age and cell type. *J. Cell Sci.* **110**, 2905–2913 (1997).
101. Teixeira, A. I. *et al.* The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. *Biomaterials* **27**, 3945–3954 (2006).
102. Kim, D. H. *et al.* Mechanosensitivity of fibroblast cell shape and movement to

- anisotropic substratum topography gradients. *Biomaterials* **30**, 5433–5444 (2009).
103. Ray, A. *et al.* Anisotropic forces from spatially constrained focal adhesions mediate contact guidance directed cell migration. *Nat. Commun.* **8**, 1–17 (2017).
 104. Clarke, M. *et al.* Curvature recognition and force generation in phagocytosis. *BMC Biol.* **8**, 154 (2010).
 105. Champion, J. A. & Mitragotri, S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 4930–4934 (2006).
 106. Harrison, R. G. The reaction of embryonic cells to solid structures. *J. Exp. Zool.* **17**, (1914).
 107. Weiss, P. & Garber, B. Shape and Movement of Mesenchyme Cells as Functions of the Physical Structure of the Medium: Contributions to a Quantitative Morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **38**, 264–280 (1952).
 108. Eckert, B. S., Warren, R. H. & Rubin, R. W. Structural and biochemical aspects of cell motility in amebas of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **72**, 339–350 (1977).
 109. Wilkinson, P. C., Shields, J. M. & Haston, W. S. Contact guidance of human neutrophil leukocytes. *Exp. Cell Res.* **140**, 55–62 (1982).
 110. Reig, G., Pulgar, E. & Concha, M. L. Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development* **141**, 1999–2013 (2014).
 111. Friedl, P. & Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell* **147**, 992–1009 (2011).
 112. Nguyen, A. T., Sathe, S. R. & Yim, E. K. F. From nano to micro: Topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *J. Phys. Condens. Matter* **28**, (2016).
 113. Baptista, D., Teixeira, L., van Blitterswijk, C., Giselbrecht, S. & Truckenmüller, R. Overlooked? Underestimated? Effects of Substrate Curvature on Cell Behavior. *Trends Biotechnol.* **37**, 838–854 (2019).
 114. Wilkinson, P. C. & Lackie, J. M. The influence of contact guidance on chemotaxis of human neutrophil leukocytes. *Exp. Cell Res.* **145**, 255–264 (1983).
 115. Kwon, K. W. *et al.* Nanotopography-Guided Migration of T Cells. *J. Immunol.* **189**, 2266–2273 (2012).
 116. Driscoll, M. K., Sun, X., Guven, C., Fourkas, J. T. & Losert, W. Cellular contact guidance through dynamic sensing of nanotopography. *ACS Nano* **8**, 3546–3555 (2014).
 117. Sun, X. *et al.* Asymmetric nanotopography biases cytoskeletal dynamics and promotes

- unidirectional cell guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 12557–12562 (2015).
118. Tabata, Y. & Ikada, Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* **9**, 356–362 (1988).
 119. Cox, D., Tseng, C. C., Bjekic, G. & Greenberg, S. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* **274**, 1240–1247 (1999).
 120. Prashar, A. *et al.* Filamentous morphology of bacteria delays the timing of phagosome morphogenesis in macrophages. *J. Cell Biol.* **203**, 1081–1097 (2013).
 121. Swanson, J. A. Phosphoinositides and engulfment. *Cell. Microbiol.* **16**, 1473–1483 (2014).
 122. Hoeller, O. *et al.* Two distinct functions for PI3-kinases in macropinocytosis. *J. Cell Sci.* **126**, 4296–4307 (2013).
 123. Gerisch, G. Self-organizing actin waves that simulate phagocytic cup structures. *PMC Biophys.* **3**, 1–9 (2010).
 124. Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. & Gerisch, G. Coronin involved in phagocytosis: Dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag. *Cell* **83**, 915–924 (1995).
 125. Hacker, U., Albrecht, R. & Maniak, M. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **110**, 105–112 (1997).
 126. Bloomfield, G. *et al.* Neurofibromin controls macropinocytosis and phagocytosis in *Dictyostelium*. *Elife* **4**, 1–25 (2015).
 127. Marinović, M. *et al.* IQGAP-related protein IqgC suppresses Ras signaling during large-scale endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 1289–1298 (2019).
 128. Gerisch, G. *et al.* Self-organizing actin waves as planar phagocytic cup structures. *Cell Adh. Migr.* **3**, 373–382 (2009).
 129. Brzeska, H., Pridham, K., Chery, G., Titus, M. A. & Korn, E. D. The association of myosin IB with actin waves in *Dictyostelium* requires both the plasma membrane-binding site and actin-binding region in the myosin tail. *PLoS One* **9**, e94306 (2014).
 130. Sasaki, A. T. *et al.* G protein-independent Ras/PI3K/F-actin circuit regulates basic cell motility. *J. Cell Biol.* **178**, 185–191 (2007).
 131. Galic, M. *et al.* External push and internal pull forces recruit curvature-sensing N-BAR domain proteins to the plasma membrane. *Nat. Cell Biol.* **14**, 874–881 (2012).
 132. Zhao, W. *et al.* Nanoscale manipulation of membrane curvature for probing endocytosis

- in live cells. *Nat. Nanotechnol.* **12**, 750–756 (2017).
133. Bridges, A. A., Jentzsch, M. S., Oakes, P. W., Occhipinti, P. & Gladfelter, A. S. Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **213**, 23–32 (2016).
 134. Elliott, H. *et al.* Myosin II controls cellular branching morphogenesis and migration in three dimensions by minimizing cell-surface curvature. *Nat. Cell Biol.* **17**, 137–147 (2015).
 135. Veltman, D. M., Keizer-Gunnink, I. & Haastert, P. J. M. V. An extrachromosomal, inducible expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid* **61**, 119–125 (2009).
 136. Faix, J. *et al.* Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins. *EMBO J.* **20**, 3705–3715 (2001).
 137. Moores, S. L., Sabry, J. H. & Spudich, J. A. Myosin dynamics in live *Dictyostelium* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 443–446 (1996).
 138. Nellen, W., Silan, C. & Firtel, R. A. DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2890–2898 (1984).
 139. Riedl, J. *et al.* Lifeact: A versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **5**, 605–607 (2008).
 140. Gibson, T. J., Hyvönen, M., Musacchio, A., Saraste, M. & Birney, E. PH domain: The first anniversary. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 349–353 (1994).
 141. Huang, Y. E. *et al.* Receptor-mediated Regulation of PI3Ks Confines PI(3,4,5)P3 to the Leading Edge of Chemotaxing Cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1913–1922 (2003).
 142. Harms, B. D., Bassi, G. M., Horwitz, A. R. & Lauffenburger, D. A. Directional persistence of EGF-induced cell migration is associated with stabilization of lamellipodial protrusions. *Biophys. J.* **88**, 1479–1488 (2005).
 143. Othmer, H. G., Dunbar, S. R. & Alt, W. Models of dispersal in biological systems. *J. Math. Biol.* **26**, 263–298 (1988).
 144. Case, L. B. & Waterman, C. M. Adhesive F-Actin waves: A novel Integrin-Mediated adhesion complex coupled to ventral actin polymerization. *PLoS One* **6**, (2011).
 145. Reichl, E. M. *et al.* Interactions between Myosin and Actin Crosslinkers Control Cytokinesis Contractility Dynamics and Mechanics. *Curr. Biol.* **18**, 471–480 (2008).
 146. Jasnin, M., Ecke, M., Baumeister, W. & Gerisch, G. Actin Organization in Cells Responding to a Perforated Surface, Revealed by Live Imaging and Cryo-Electron

- Tomography. *Structure* **24**, 1031–1043 (2016).
147. Vicker, M. G. Reaction–diffusion waves of actin filament polymerization/depolymerization in *Dictyostelium* pseudopodium extension and cell locomotion. *Biophys. Chem.* **84**, 87–98 (2000).
 148. Inagaki, N. & Katsuno, H. Actin Waves: Origin of Cell Polarization and Migration? *Trends Cell Biol.* **27**, 515–526 (2017).
 149. Gerhardt, M. *et al.* Actin and PIP3 waves in giant cells reveal the inherent length scale of an excited state. *J. Cell Sci.* **127**, 4507–4517 (2014).
 150. Katsuno, H. *et al.* Actin migration driven by directional assembly and disassembly of membrane-anchored actin filaments. *Cell Rep.* **12**, 648–660 (2015).
 151. Winans, A. M., Collins, S. R. & Meyer, T. Waves of actin and microtubule polymerization drive microtubule-based transport and neurite growth before single axon formation. *Elife* **5**, 1–22 (2016).
 152. Bernitt, E. *et al.* Dynamics of actin waves on patterned substrates: A quantitative analysis of circular dorsal ruffles. *PLoS One* **10**, 1–19 (2015).
 153. Bernitt, E., Döbereiner, H. G., Gov, N. S. & Yochelis, A. Fronts and waves of actin polymerization in a bistability-based mechanism of circular dorsal ruffles. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
 154. Masters, T. A., Sheetz, M. P. & Gauthier, N. C. F-actin waves, actin cortex disassembly and focal exocytosis driven by actin-phosphoinositide positive feedback. *Cytoskeleton* **73**, 180–196 (2016).
 155. Bement, W. M. *et al.* Activator-inhibitor coupling between Rho signalling and actin assembly makes the cell cortex an excitable medium. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1471–1483 (2015).
 156. Wu, Z., Su, M., Tong, C., Wu, M. & Liu, J. Membrane shape-mediated wave propagation of cortical protein dynamics. *Nat. Commun.* **9**, 1–12 (2018).
 157. Xiao, S., Tong, C., Yang, Y. & Wu, M. Mitotic Cortical Waves Predict Future Division Sites by Encoding Positional and Size Information. *Dev. Cell* **43**, 493-506.e3 (2017).
 158. Yang, Y., Xiong, D., Pipathsouk, A., Weiner, O. D. & Wu, M. Clathrin Assembly Defines the Onset and Geometry of Cortical Patterning. *Dev. Cell* **43**, 507-521.e4 (2017).
 159. Barnhart, E. L., Lee, K.-C., Keren, K., Mogilner, A. & Theriot, J. A. An Adhesion-Dependent Switch between Mechanisms That Determine Motile Cell Shape. *PLoS Biol.*

- 9, e1001059 (2011).
160. Barnhart, E. L., Allard, J., Lou, S. S., Theriot, J. A. & Mogilner, A. Adhesion-Dependent Wave Generation in Crawling Cells. *Curr. Biol.* **27**, 27–38 (2017).
 161. Williams, T. D., Paschke, P. I. & Kay, R. R. Function of small GTPases in *Dictyostelium* macropinocytosis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **374**, 20180150 (2019).
 162. De Lozanne, A. & Spudich, J. A. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**, 1086–91 (1987).
 163. Araki, N., Hatae, T., Furukawa, A. & Swanson, J. A. Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fcγ-receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages. *J. Cell Sci.* **116**, 247–57 (2003).
 164. Rougerie, P., Miskolci, V. & Cox, D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunol. Rev.* **256**, 222–239 (2013).
 165. Linkner, J. *et al.* The inverse BAR domain protein IBARa drives membrane remodeling to control osmoregulation, phagocytosis and cytokinesis. *J. Cell Sci.* **127**, 1279–1292 (2014).
 166. Hübner, S. *et al.* Enhancement of phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) activity by membrane curvature and inositol-phospholipid-binding peptides. *Eur. J. Biochem.* **258**, 846–53 (1998).
 167. Gallop, J. L., Walrant, A., Cantley, L. C. & Kirschner, M. W. Phosphoinositides and membrane curvature switch the mode of actin polymerization via selective recruitment of toca-1 and Snx9. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 7193–7198 (2013).
 168. Mu, L. *et al.* A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate redistribution-based sensing mechanism initiates a phagocytosis programing. *Nat. Commun.* **9**, 1–16 (2018).
 169. Heinrich, V. & Lee, C.-Y. Blurred line between chemotactic chase and phagocytic consumption: an immunophysical single-cell perspective. *J. Cell Sci.* **124**, 3041–3051 (2011).
 170. Meena, N. P. & Kimmel, A. R. Chemotactic network responses to live bacteria show independence of phagocytosis from chemoreceptor sensing. *Elife* **6**, 1–25 (2017).
 171. Veltman, D. M., Lemieux, M. G., Knecht, D. A. & Insall, R. H. PIP3-dependent macropinocytosis is incompatible with chemotaxis. *J. Cell Biol.* **204**, 497–505 (2014).
 172. Ecke, M. & Gerisch, G. G. Co-existence of Ras activation in a chemotactic signal transduction pathway and in an autonomous wave - forming system. *Small GTPases* **10**,

- 72–80 (2019).
173. Keren, K. *et al.* Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature* **453**, 475–480 (2008).
 174. Fritz-Laylin, L. K., Lord, S. J. & Mullins, R. D. WASP and SCAR are evolutionarily conserved in actin-filled pseudopod-based motility. *J. Cell Biol.* **216**, 1673–1688 (2017).
 175. Rebstein, P. J., Weeks, G. & Spiegelman, G. B. Altered morphology of vegetative amoebae induced by increased expression of the *Dictyostelium discoideum* ras-related gene rap1. *Dev. Genet.* **14**, 347–355 (1993).
 176. Asano, Y. *et al.* Keratocyte-like locomotion in amiB-null *Dictyostelium* cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **59**, 17–27 (2004).
 177. Bakal, C., Aach, J., Church, G. & Perrimon, N. Quantitative morphological signatures define local signaling networks regulating cell morphology. *Science* **316**, 1753–6 (2007).
 178. Iijima, M., Huang, Y. E. & Devreotes, P. Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Dev. Cell* **3**, 469–478 (2002).
 179. Malek, A. M. & Izumo, S. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J. Cell Sci.* **109**, 713–726 (1996).
 180. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
 181. Mohammed, D. *et al.* Substrate area confinement is a key determinant of cell velocity in collective migration. *Nat. Phys.* **15**, (2019).
 182. Gupton, S. L. & Waterman-Storer, C. M. Spatiotemporal Feedback between Actomyosin and Focal-Adhesion Systems Optimizes Rapid Cell Migration. *Cell* **125**, 1361–1374 (2006).
 183. Satulovsky, J., Lui, R. & Wang, Y. L. Exploring the control circuit of cell migration by mathematical modeling. *Biophys. J.* **94**, 3671–3683 (2008).
 184. Titus, M. A. & Goodson, H. V. An evolutionary perspective on cell migration. *J. Cell Biol.* **216**, 1509–1511 (2017).
 185. Yoshida, M., Stadler, J., Bertholdt, G. & Gerisch, G. Wheat germ agglutinin binds to the contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum* and inhibits EDTA-stable cell adhesion. *EMBO J.* **3**, 2663–70 (1984).
 186. Kamboj, R. K., Garipey, J. & Siu, C.-H. Identification of an octapeptide involved in homophilic interaction of the cell adhesion molecule gp80 of *Dictyostelium discoideum*. *Cell* **59**, 615–625 (1989).

187. Barth, A., Müller-Taubenberger, A., Taranto, P. & Gerisch, G. Replacement of the phospholipid-anchor in the contact site A glycoprotein of *D. discoideum* by a transmembrane region does not impede cell adhesion but reduces residence time on the cell surface. *J. Cell Biol.* **124**, 205–215 (1994).
188. Bandara, N., Zeng, H. & Wu, J. Marine mussel adhesion: Biochemistry, mechanisms, and biomimetics. *J. Adhes. Sci. Technol.* **27**, 2139–2162 (2013).
189. Coue, M., Brenner, S. L., Spector, I. & Korn, E. D. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* **213**, 316–318 (1987).
190. Nolen, B. J. *et al.* Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature* **460**, 1031–1034 (2009).
191. Rizvi, S. A. *et al.* Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Formin-Mediated Actin Assembly. *Chem. Biol.* **16**, 1158–1168 (2009).
192. Machacek, M. & Danuser, G. Morphodynamic profiling of protrusion phenotypes. *Biophys. J.* **90**, 1439–1452 (2006).
193. Tsujioka, M. *et al.* Talin couples the actomyosin cortex to the plasma membrane during rear retraction and cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 12992–12997 (2012).
194. Nichols, J. M., Veltman, D. & Kay, R. R. Chemotaxis of a model organism: progress with *Dictyostelium*. *Curr. Opin. Cell Biol.* **36**, 7–12 (2015).
195. Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. & Takenawa, T. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* **408**, 732–5 (2000).
196. Veltman, D. M. *et al.* Functional analysis of *Dictyostelium* IBARa reveals a conserved role of the I-BAR domain in endocytosis. *Biochem. J.* **436**, 45–52 (2011).
197. Xia, S. *et al.* Nanoscale Architecture of the Cortical Actin Cytoskeleton in Embryonic Stem Cells. *Cell Rep.* **28**, 1251-1267.e7 (2019).
198. Lebensohn, A. M. & Kirschner, M. W. Activation of the WAVE Complex by Coincident Signals Controls Actin Assembly. *Mol. Cell* **36**, 512–524 (2009).
199. Mun, H. & Jeon, T. J. Regulation of actin cytoskeleton by Rap1 binding to RacGEF1. *Mol. Cells* **34**, 71–76 (2012).
200. Plak, K. *et al.* GxcC connects Rap and Rac signaling during *Dictyostelium* development. *BMC Cell Biol.* **14**, 6 (2013).
201. Stock, A. *et al.* Domain analysis of cortexillin I : actin-bundling , PIP 2 -binding and the rescue of cytokinesis. **18**, 5274–5284 (1999).

202. Bukharova, T. *et al.* Paxillin is required for cell-substrate adhesion, cell sorting and slug migration during *Dictyostelium* development. *J. Cell Sci.* **118**, 4295–310 (2005).
203. Nagasaki, A., Kanada, M. & Uyeda, T. Q. Cell adhesion molecules regulate contractile ring-independent cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Res.* **19**, 236–246 (2009).
204. Dickinson, D. J., Nelson, W. J. & Weis, W. I. A polarized epithelium organized by beta- and alpha-catenin predates cadherin and metazoan origins. *Science* **331**, 1336–9 (2011).
205. Oikawa, T. *et al.* PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat. Cell Biol.* **6**, 420–426 (2004).
206. Steffen, A. *et al.* Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* **23**, 749–759 (2004).
207. Lam Hui, K., Kwak, S. I. & Upadhyaya, A. Adhesion-dependent modulation of actin dynamics in Jurkat T cells. *Cytoskeleton* **71**, 119–135 (2014).
208. Fritz-Laylin, L. K. *et al.* Actin-Based protrusions of migrating neutrophils are intrinsically lamellar and facilitate direction changes. *Elife* **6**, 1–41 (2017).
209. Huang, C. H., Tang, M., Shi, C., Iglesias, P. A. & Devreotes, P. N. An excitable signal integrator couples to an idling cytoskeletal oscillator to drive cell migration. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1307–1316 (2013).
210. Schaks, M. *et al.* Distinct Interaction Sites of Rac GTPase with WAVE Regulatory Complex Have Non-redundant Functions in Vivo. *Curr. Biol.* **28**, 3674-3684.e6 (2018).
211. Chen, B. *et al.* Rac1 GTPase activates the WAVE regulatory complex through two distinct binding sites. *Elife* **6**, 1–22 (2017).
212. Nakagawa, H. *et al.* IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J. Cell Sci.* **116**, 2577–2583 (2003).
213. Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P. & Suetsugu, S. IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol.* **18**, 52–60 (2008).
214. Hoeller, O. & Kay, R. R. Chemotaxis in the Absence of PIP3 Gradients. *Curr. Biol.* **17**, 813–817 (2007).
215. Lee, S., Han, J. W., Leeper, L., Gruver, J. S. & Chung, C. Y. Regulation of the formation and trafficking of vesicles from Golgi by PCH family proteins during chemotaxis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**, 1199–1209 (2009).
216. Mehidi, A. *et al.* Transient Activations of Rac1 at the Lamellipodium Tip Trigger

- Membrane Protrusion. *Curr. Biol.* **29**, 2852-2866.e5 (2019).
217. Bosgraaf, L. & Van Haastert, P. J. M. The ordered extension of pseudopodia by amoeboid cells in the absence of external cues. *PLoS One* **4**, e5253 (2009).
 218. Lawson, C. D. & Burridge, K. The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases* **5**, e27958 (2014).
 219. Lam, P. & Huttenlocher, A. Interstitial leukocyte migration in vivo. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 650–658 (2013).

謝辞

指導教官である澤井哲教授には、修士課程からの五年間ご指導いただきました。実験データに関する議論や、研究の軌道修正、論文執筆から予算書の作成まで、研究遂行上のあらゆる面に渡ってご教授いただきました。生物学の教養がほとんど皆無だった私を研究室に受け入れてくださり、論文執筆がなかなか進まなかった時期にも、いつも寛大に見守ってくださいました。私がここまで研究を進めていくことができましたのも、澤井先生のお人柄あってのことと思います。重ねて御礼申し上げます。

澤井研究室の方々、OB・OGの皆様には実験や考察を進める上でご指導、ご協力をいただきました。島田奈央先生、中島昭彦先生、城川祐香さん、中村允さん、福神史仁さん、藤森大平さん、千田優子さん、井元大輔さん、石田元彦さん、樋渡翔太郎さん、入江陽一さん、橋村秀典さん、後藤佳奈子さん、藤城美奈さん、杉田登代子さん、水沼周子さん、安達智子さん、どうもありがとうございました。島田奈央先生、藤城美奈さん、杉田登代子さんにはプラスミド構築等でご指導とご協力をいただきました。中島昭彦先生には、マイクロ流体デバイスの作製などの技術面や実験データの解釈等でご指導をいただきました。研究室のOB・OGである中村允さん、福神史仁さん、千田優子さんは、アクチン波や細胞の基質接着性に関する私の研究の礎を築いてくださいました。藤森大平さんは生物学や研究生活上の質問に対していつも丁寧にお答えくださいました。井元大輔さんにはシミュレーションの環境構築等で、石田元彦さんには HL60 細胞の培養や管理に関して、橋村秀典さんには酵母の実験でご協力いただきました。皆様には重ねて御礼申し上げます。

若本祐一先生、中岡秀憲先生、大倉玲子さんにはマイクロ流体デバイスの作製やクリーンルームの管理に関していつもお世話になりました。御礼申し上げます。

竹内昌治先生、大崎寿久先生、吉田寛文さんにはガラスエッチングに関してご協力いただきました。御礼申し上げます。

リヨン大学の Jean-Paul Rieu 博士には、WGA が細胞の接着を促進するのに有用であることをお教えいただきました。また、実験データの議論もしていただきました。御礼申し上げます。

日本学術振興会には特別研究員制度によって研究資金援助を頂きました。御礼申し上げます。

私が今日まで学業を続けていくことができたのは、東京大学、日本学生支援機構、日本学術振興会、それから両親、祖父母、妹、親戚の皆様のご支援のおかげです。この場を借りて御礼申し上げます。

