

繊毛虫ブレファリズマの細胞運動に関する研究*

石田 正樹**

広島大学生物圏科学研究科

Studies on the Mechanism of Cell Movement in a Ciliate, *Blepharisma*

Masaki ISHIDA

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University

Hiroshima 730, Japan

要 旨

微小管はあらゆる真核細胞において、細胞運動に関与し、細胞骨格としても重要な働きをする基本的な機能単位として広く知られている。最も代表的な例では、繊毛の軸糸微小管として繊毛運動に関与するもの、細胞分裂の装置として働くもの、そして神経軸索内の顆粒移動に関わるものがあげられる。なかでも、繊毛や鞭毛の運動機構を解明することは細胞走性との関連も含めて注目を集めるところである。また、こうした微小管より構成される細胞内器官の運動制御・調節機構を理解することは、微小管の生物界における広範な分布ゆえに注目されている。

原生動物の繊毛虫類では、細胞表層によく発達した微小管のシートや束の存在が知られており、このようなシートや束を構成する微小管は、細胞変形運動に関係する機能単位として存在すると考えられている。繊毛や鞭毛の運動が多様で複雑なものであるのに対して、このような微小管のシートや束による運動は2次元的でより単純な系であり、繊毛や鞭毛の運動を解析する上でのよいモデル系となり得る。したがって、こうした微小管の運動制御・調節を生理・生化学的に調べて行くことは、現在注目されている繊毛や鞭毛の運動制御の機構を明らかにする上で、別の視点から新しい有用な知見を与えるものであると考える。

本研究では、光刺激により細胞伸長反応を示す繊毛虫 *Blepharisma* を用いた。現在までのところ、この細胞における細胞伸長の原動力は、細胞表層に存在する微小管繊維に起因するであろうと考えられている。したがって、まず第一に、この細胞伸長を引き起こす条件を、特殊な電極や薬物を用いることにより、細胞生理学的に調べた。次いで、第二に細胞表層の繊維系を超微形態学的に詳細に調べ、伸長時と収縮時での形態的差異、および繊維の配向状態の十分な把握を行った。さらに、第三段階として細胞を抽出したり破壊することにより得られた細胞モデルや単離繊維の活性化に要する条件を調べることによって、この細胞伸長反応を調節制御する機構を検討した。

繊毛虫異毛類に属する *Blepharisma japonicum* は、光刺激 (1,000 - 3,000 lux) により細胞の長軸

広島大学総合科学部紀要IV理系編、第18巻、pp135-138 (1992)

* 広島大学審査学位論文

口頭発表日 1992年2月4日、学位取得日 1992年3月25日

**現在の所属：Department of Microbiology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii 96822, U.S.A.

方向への変形、すなわち細胞伸長反応を示すことが知られている。この光刺激により誘導される反応は、環状モノヌクレオチド PDE の阻害剤として知られる一連の薬物によって阻害された。こうした阻害剤の導く効果としては、環状モノヌクレオチドの細胞内濃度上昇が考えられる。そこで、細胞内注入による環状ヌクレオチドの影響を調べたところ、cGMP の効果が最も顕著であり、細胞伸長反応を一過的に阻害した。また、カリウムイオン特異的イオノフォアとして知られるバリノマイシンは、光刺激の有無に関わらず細胞伸長反応を誘導し、環状モノヌクレオチド PDE の阻害剤による細胞伸長反応の阻害効果を、打ち消すことが判った。これらの結果は、細胞の電気的変化(過分極性)が、環状モノヌクレオチドの細胞内での減少により誘導され、細胞伸長につながるという過程を暗示する。

こうした細胞における電気現象を考えていく上で、細胞の膜電位を測定することは、必要不可欠である。そこで本研究では、特殊な電極を用いての細胞膜電位の測定を試みた。脂溶性イオンである TPP⁺ は、*Blepharisma* の膜電位に依存して細胞内に入出入りする。このイオンの性質を利用して、間接的に細胞の電位を測定するというのがこの電極の概要であるが、方法的には TPP イオンを選択的に通す膜をもった電極を用いるだけで、非常に簡便なものである。2 x 10⁻⁶ M の TPP を含んだ実験溶液中で、細胞はこの TPP イオンを取り込み、光刺激により TPP イオンを放出した。こうした TPP イオンの放出は、細胞の脱分極性応答を反映しているが、細胞伸長を誘発するとして知られる薬物 (10⁻⁶ M バリノマイシン、5 x 10⁻³ M CaCl₂、5 x 10⁻³ M CoCl₂) が外液に加えられたときには、常に観察された。また、このような細胞伸長反応は、電気刺激によっても誘発されることが判明した。こうした結果は、この伸長反応の過程における電気的現象の重要性を物語っているようにもとれるが、細胞が興奮するときに入出入りするイオンに重要な鍵があることを示しているようでもある。*Paramecium* の光驚動反応においては、光受容電位としてカルシウムイオン依存性の電位変化が知られているが、こうした細胞内のセカンドメッセンジャーとして知られるイオン関与の可能性は十分に考え得る。

細胞モデルを用いた実験結果によると、伸長に必要なものは Mg-ATP であり、このとき細胞は細胞前端部方向へ向かって遊泳している。一方、モデルを 10⁻⁶ M 以上のカルシウムを含んだ溶液にさらすと、細胞は収縮し回転遊泳をしていた。これらの事実は、この細胞が光驚動反応時の細胞内変化を反映していると考えられる。つまり、細胞が光刺激を受けたときには、細胞膜の興奮とともにカルシウムイオンの細胞内への流入、あるいは細胞内貯蔵部位からのカルシウム遊離が起こることが類推される。ところで、*Blepharisma* をカルシウムキレート剤である 0.1 mM EGTA を含む緩衝液中で光刺激し、細胞伸長を誘発すると、時間が経つにつれ細胞伸長を示さなくなることが判った。この処理による細胞内カルシウムの枯渇が、この細胞運動を阻害した可能性が考えられた。一方、カルシウムチャンネルブロッカーとして知られる薬物 (Mn²⁺, Co²⁺, La³⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Verapamil) を細胞外液に加えたが、このような一連のチャンネルブロッカーは、細胞伸長をあまり阻害しなかった。以上の結果は、カルシウムイオンが細胞伸長に重要な役割を持っていることを暗示するが、それは、チャンネルを通じて細胞外から流入するイオンよりは、細胞内に貯蓄されたものが利用されていることを暗示する。一方カルモデュリン阻害剤は、一様にこの細胞伸長反応を強く阻害するので、こうしたカルシウムイオンの関与は、カルモデュリンにより仲介されている可能性も考えられる。細胞内カルシウムの局在を、カルシウム・ピロアンチモン酸法により超微形態的に調べてみたところ、細胞表層に存在する液胞の中にカルシウム・ピロアンチモンの沈澱が観察された。このことは、細胞内でのカルシウム貯蔵部位が存在することを示しているが、この表層の液胞の周辺には、細胞伸長反応に関係すると考えられる微小管がシート状、あるいは束をなして観察される。な

かでも特に、伸長時の細胞では、束をなした微小管である液胞近接微小管 (vacuole-associated microtubules, VAMs) の上に、カルシウム・ピロアンチモンの沈澱が観察された。このことは、VAMs の細胞伸長反応への関与を示唆するが、この微小管の束が直接的な原動力を生み出しているか否かについては不明である。

単細胞生物である繊毛虫において、微小管やその他の収縮性の繊維から構成される細胞表層の繊維系は、細胞運動の機能的コンポーネントであると考えられている。細胞の種類によっても異なるが、繊毛虫異毛類においては、細胞収縮は糸筋 (myoneme) と呼ばれる繊維の関係した反応であり、細胞伸長反応は微小管の関係した反応であることが示唆されている。 *Blepharisma* では、細胞伸長の機能的コンポーネントの候補として、二つの繊維系が考えられている。その一つは、細胞長軸に沿って細胞後端部方向に伸びる微小管のシート、すなわち postciliary microtubular sheets (PMSs) であり、他方は、液胞に近接して細胞長軸方向に伸びる微小管の束すなわち VAMs である。電子顕微鏡で観察すると、この繊毛虫における繊毛基部は、ディキネチドと呼ばれる構造で、繊毛が生じる前側基底小体と PMSs が生じる後側基底小体の二つの基底小体に対合した構造である。この基底小体の間には、幾つもの結合繊維が存在するが、そのなかの一つに基底小体の間から伸び出す anterior fiber sheet (AFS) がある。VAMs は、この AFS に結合した7~8本の微小管の束と、前側基底小体に結合する7~8本の微小管からなる束が、合わさった構造であることが判った (このような AFS に端を発する微小管の報告はこれが初めての例である)。一方、PMS は後側基底小体の基部側半分に端を発し、細胞後端部方向に配向する。この PMS に沿って、細胞伸長時には、細胞後端部で特異的に隣り合うディキネチド間の距離が広がる。さらに、細胞が収縮した状態では AFS は PMS と連結した構造で観察されるが、細胞が伸長した状態ではこの連結が外れるようである。つまり、PMS と VAM は構造的には一つの複合体を形成しており、PMS-AFS の結合解離により細胞伸長が調節されていると考えられる。このほか二つのタイプの transverse microtubular ribbon が観察され、その一つは posterior transverse microtubular ribbon と呼ばれるが、本研究で用いた *Blepharisma* では、これが最初の報告となる。以上のような結果から、 *Blepharisma* の細胞表層繊維の3次元モデルを構築した。

Stentor では、こうした表層繊維の内、上に述べた候補繊維の内の一つである PMS の滑りが観察されており、この滑りが細胞伸長の原動力を発生すると考えられている。こうした繊維は、繊毛の基部に結合しているので、繊毛の間隔の変化が、表層繊維系での滑りを反映していると考えられる。同様の結果は、本研究においても示された。走査型電子顕微鏡により、隣り合う繊毛間の距離を測定して見たところ、伸長前と伸長後では、繊毛間の距離が細胞後端部で明らかに変化していた。こうした表層繊維の間での滑りは、透過型電子顕微鏡で観察した場合にも、基底小体間の距離の変化として観察された。したがって *Blepharisma* の場合にも、同様に PMSs の相互の滑りが起こっていることが考えられる。

しかしながら、その滑りが能動的であるという直接的証明がなされた訳ではなかった。本研究では、細胞を海面活性剤で軽く抽出した細胞モデルにおいてもこの滑りを観察することができた。それは Mg-ATP を必要とし、この細胞伸長反応がエネルギー依存的な反応であることを示していた。このことは、伸長時に観察された表層繊維のスライドが能動的である可能性を示唆している。おもしろいことに、この細胞モデルにおいて、二つの候補繊維の内 VAMs は、完全な束として観察されなかった。このことは、VAMs が細胞伸長の原動力を発生するという可能性を否定しているようである。しかしながら、上に述べたようにカルシウムピロアンチモンの沈澱が見られることから、全く無関係であるとは考えにくい。

ところで、この細胞モデルにおける収縮運動は、 10^{-6} M カルシウム存在下で観察され、このとき、ATP は必要とされなかった。一方、このモデルをさらに抽出し、ほとんど繊維構造だけにしてしまうと、細胞伸長は観察されなくなる。しかしながら、細胞収縮は観察され、その収縮は、やはりカルシウム濃度にだけ依存していた。さらに、基底小体複合体だけを単離して、微分干渉顕微鏡で観察してみると、基底小体間の間隔がやはりカルシウムイオン濃度依存的に短縮した。この複合体には糸筋が結合しているが、単離した糸筋が 10^{-6} M カルシウムにより収縮する。したがって、この複合体の短縮は糸筋によるものであると考えられる。一方、同カルシウム処理中に微小管繊維の一部 (PMSs) が消失するのが観察された。電子顕微鏡的にも同様に観察されるこの現象は、高濃度カルシウムによる微小管の解離によるものと考えられる。しかしながら、こうした微小管シートの崩壊によりはじめて観察される基底小体間距離の短縮は、この細胞モデルあるいは単離複合体では、微小管のシートが糸筋による収縮を妨げていたことを暗示する。換言するならば生理的条件下では、微小管シートを自由にする条件が存在するはずであり、細胞変形運動に対して機械的制限をかける因子の存在が考えられる。こうした制限因子として、さきに挙げた PMS-AFS の結合解離がその候補の一つとして考えられる。推論するならば、上で述べたように AFS は VAMs に結合しているの、VAMs はこの AFS-PMS の解離を助けるように働いているのではないかと考えられる。

本研究では、繊毛虫 *Blepharisma* における細胞伸長反応の機構を主に形態的側面や生理学的側面から調べてきた。この細胞の伸長運動において、カルシウムイオンは微小管運動の調節にとって重要な役割を果たしているようである。カルシウムの重要な働きは、繊毛の運動制御においても、かなり重要視されているが、繊毛や鞭毛といったカルシウムの関係する複雑な運動系の機構解明には、こうしたより単純な運動系における解析が重要な知見を与えるものとする。したがって、この実験系は、微小管の滑り運動制御機構解明にとって有益な実験系となり得るであろう。