

脂質親和性プローブを用いたゾウリムシ収縮胞複合体膜の動態解析

喜多村 美香¹, 石田 正樹^{1*}

¹ 奈良教育大学理科教育講座

Dynamic analysis of the contractile vacuole membrane using lipophilic probe, FM 4-64 in *Paramecium multimicronucleatum*

Mika, Kitamura¹, Masaki Ishida^{1*}

¹ School of Science Education, Nara University of Education

要旨：本研究では、収縮胞複合体を構成する膜区画間での膜融合の動態を可視化するために、脂質親和性の高い蛍光色素であるFM 4-64 を用いてゾウリムシの膜を染色した。FM 4-64 による蛍光標識観察により、次に示す3つの新しい知見が得られた。1) 収縮胞の収縮期には、収縮胞膜が萎縮した場所に、FM 4-64 により標識される比較的蛍光強度の高い部分が出現する。2) 収縮胞の側方からの観察によれば、この蛍光強度の高い膜の集積は、収縮胞複合体の骨格として存在する微小管束に沿って存在している様に観察される。3) 収縮胞膜と瓶状部膜の融合直後に、収縮胞からより遠位の瓶状部から蛍光強度が上昇することが確認された。これらの観察結果は、収縮胞膜や瓶状部膜が他と融合し内部の溶液が移動する場合は、融合サイトから遠位の方からの膜の萎縮を伴うことを示唆していた。また、これらの萎縮した膜は、微小管の配向するその場にとどまっている様に観察された。

喜多村 美香, 石田 正樹 (2017) 脂質親和性プローブを用いたゾウリムシ収縮胞複合体膜の動態解析. 奈良教育大学自然環境教育センター紀要, (18): 1-7.

キーワード：瓶状部、収縮胞、集水管、蛍光顕微鏡、膜融合

Abstract: To visualize the dynamic process of membrane fusion between each membrane compartments that make up the contractile vacuole complex, *Paramecium* cells were stained with a highly lipophilic fluorescent dye, FM 4-64. From the fluorescence labeling observation with FM 4-64, the following four new findings were obtained. 1) At the end of systolic phase of the contractile vacuole, the high fluorescence intensity was observed on the portion where accumulated membrane of contractile vacuole located. 2) The observation from the lateral side showed that this accumulated membrane with high fluorescence intensity was seemed to locate along the ribbons of microtubules, the backbone of the contractile vacuole. 3) Shortly after the fusion between the membranes of the ampulla and contractile vacuole, the high fluorescence

* 〒630-8528 奈良市高畑町

School of Science Education, Nara University of Education, Takabatake-cho, Nara 630-8528, Japan.

Email: masaki@nara-edu.ac.jp 2016年10月31日受付、2016年12月6日受理

intensity was observed on the distal portion of the ampulla. These observations suggested that the transfer of internal solutions of contractile vacuole or ampulla were always accompanied by the membrane accumulation, which started from distal to the fusion site. And also such accumulated membranes of contractile vacuole or ampulla seemed to remain in the place where the microtubules locate.

Kitamura M, Ishida M (2017) Dynamic analysis of the contractile vacuole membrane using lipophilic probe, FM 4-64 in *Paramecium multimicronucleatum*. Bulletin of Center for Natural Environment Education, Nara University of Education, (18): 1-7.

Keywords: Ampulla; Contractile vacuole complex; Collecting canal; Fluorescent microscopy; Membrane fusion

はじめに

ゾウリムシに存在する収縮胞 (contractile vacuole, CV) は、原生動物に見られる液胞の一種であり、浸透圧調節を行う細胞内小器官と考えられている。Patterson (1980) のレビューによれば、収縮胞の観察が最初になされたのは、1776 年の Spallanzani の論文であるとされている。Saedeleer and Wolf (1931) は、電子顕微鏡観察により収縮胞が複数の膜系でできていることを発見し、この膜系全体をさして収縮胞複合体 (contractile vacuole complex, CVC) と名付けた。ゾウリムシの収縮胞複合体は、収縮胞孔 (contractile vacuole pore)、収縮胞 (contractile vacuole)、瓶状部 (ampulla)・集水管部 (collecting canal)、デコレテッド・スポンジォーム (decorated spongiome)、スムーズ・スポンジォーム (smooth spongiome) といった 5 つの形態的に異なる膜区画によって構成されている (Allen 2000)。収縮胞は、周期的に膨張と収縮を繰り返し、細胞内の水を細胞外へと汲み出すことにより細胞内の浸透圧をコントロールしている (Ishida et al. 1993)。収縮胞孔からの水の排出は、収縮胞と収縮胞孔の内側の細胞膜や、収縮胞と瓶状部膜といった収縮胞複合体の膜区画間で生じる膜融合によって達成されていると考えられている (Tominaga et al. 1999)。一般的に生体膜融合過程は、酵母から哺乳類にわたり保存されている可溶性の N-エチルマレイミド感受性因子 (N-ethylmaleimide sensitive factor, NSF) 結合タンパク質受容体 (soluble NSF attachment receptor, SNARE) 関連タンパク質の一群によって引き起こされると考えられている。Kissmehl et al. (2002) は、ゾウリムシの NSF 遺伝子をクローニングし、これに対する抗体を作成して、収縮胞膜、集水管部膜、収縮胞孔の細胞膜、収縮胞と瓶状部の結合部に抗体標識が観察されることを報告している。Kissmehl et al. (2002) の報告は収縮胞複合体における膜融合の証拠を示したものであるが、全ての観察は化学固定した細胞での観察である。では、生体における膜融合の動態は果たしてどのようになっているのだろうか? 本研究では、脂質親和性プローブである FM 4-64 を用いて、収縮胞複合体の各膜区画の間での膜融合の過程を可視化し、収縮胞複体内での膜融合の動態を解析することを目的とした。

材料と方法

細胞: *Paramecium multimicronucleatum* は、Agnes K. Fok と Richard D. Allen (Biology Program, Pacific Biosciences Research Center, University of Hawaii, Honolulu, HI 96822) の好意により分与された。培養は合成培地を使用し、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ にて無菌培養した (Fok and Allen 1979)。培養した細胞は、対数増殖期 (mid-logarithmic growth phase) にて収穫した。

飢餓処理: 飢餓処理は、細胞質内の食胞を減少させ、収縮胞を観察しやすくするために行った。処理には、塩類溶液 (pH 7.0) を使用した。塩類溶液は、0.03 g NaCl、0.3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.95 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.03 g KH_2PO_4 、0.034 g K_2HPO_4 を DDW 1 L に溶かし、pH を 7.0 に調整

したものである。作成した塩類溶液は、121℃、20 分の滅菌処理を行った後、室温 (24±1℃) にて保存した。培養 3 日目の細胞 13 ml を手回し遠心機 (1,000 xg) により集め、滅菌処理を行った塩類溶液で 3 度洗浄し、その後新鮮な同塩類溶液を加え、1 ml (約 9,000 cells/ml) に調整し、同液中で無菌的に 24±1℃ の恒温条件下にて培養し、1 日放置し、飢餓状態にした。

試薬：脂質親和性の高い蛍光色素である *N*-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide (FM 4-64) は、Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA) から入手した。FM 4-64 は、蒸留水で溶かし、ストック液として 10 倍濃度の 50 µg/ml で冷凍保存した。使用する際には、塩類溶液を加え 2 倍濃度の 10 µg/ml まで希釈し使用した。飢餓状態にした細胞を、手回し遠心機 (~100 xg) により、500 µl (細胞密度にして約 18,000 cells/ml) に濃縮し、等量の 10 µg/ml の FM 4-64 を加え、最終濃度 5 µl/ml で処理した。その後無菌塩類溶液で 3 回洗浄し、観察に使用した。

顕微鏡観察：FM 4-64 処理を行った細胞を 4 µl 分取 (約 36 cells) し、予めラテックスビーズ (直径 25 µm, Polysciences, Inc. Warrington, PA) を塗布しておいたスライドガラスに、メチルセルロース (Methyl Cellulose #8000, nacalai tesque, Kyoto, Japan) とともに載せ、カバーガラスをかけて蛍光観察に用いた。蛍光顕微鏡 (IX-70, Olympus, Tokyo, Japan) に搭載した落射蛍光装置を用い、FM 4-64 の赤色蛍光は U-MNIBA フィルターを用いて観察した。デジタルカメラ (DP71, Olympus, Tokyo, Japan) で動画撮影を行い、MPEG 録画された動画から 0.13 秒ごとに静止画を切り出し、JPEG イメージとして保存して測定に用いた。蛍光強度、収縮胞の直径、およびその面積の測定は、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) で開発されたフリーソフト ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html> 2016.10.28 確認) を用いて行った。

結果と考察

FM 4-64 処理時間及び観察時間の検討: FM 4-64 は付属のインストラクションにある推奨濃度 5 µg/ml で使用し、本研究では処理時間のみを検討した。FM 4-64 を外液に添加することにより、細胞膜をはじめ細胞内部のさまざまな膜系が染色されるのが観察された。収縮胞複合体においては、収縮胞、瓶状部、集水管部が染色されることを確認した (図1)。

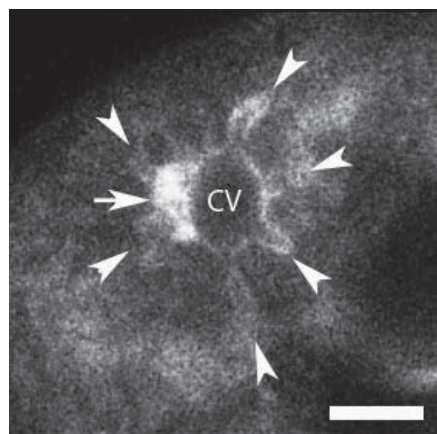


図1. FM 4-64 により蛍光標識された *P. multimicronucleatum* の収縮胞複合体の蛍光顕微鏡像。比較的蛍光強度の高い中央部 (白矢印) には、萎縮した収縮胞の膜構造が存在し、これを取り巻く様に 6つの放射水管 (瓶状部および集水管部) からなる；白鏝) が位置している。CV、収縮胞；スケールバーは、10 µmを示す

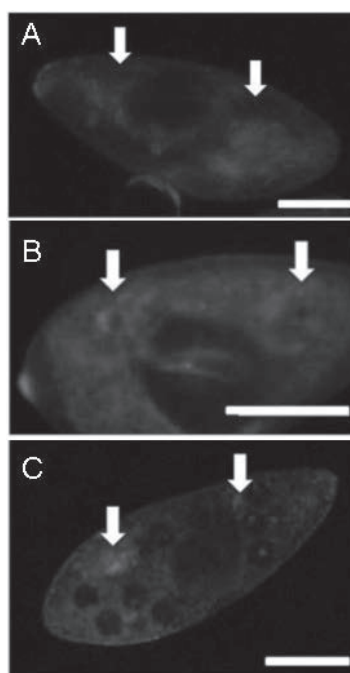


図2. FM 4-64 により蛍光標識された *P. multimicronucleatum* の蛍光顕微鏡像。A は 120 秒 FM4-64 処理を行った細胞。B は 150 秒 FM4-64 処理を行った細胞。C は 180 秒 FM4-64 処理を行った細胞を示している。矢印は収縮胞の位置を表す。A では、収縮胞がしっかりと染まっておらず、C では細胞内部の膜まで染まってしまっている。一方 B では収縮胞が比較的しっかりと観察できた。スケールバーは、50 µmを示す

しかしながら、細胞質中の食胞をはじめ多くの細胞内小器官の持つ膜も同時に染色されるため、収縮胞を確認しやすい処理時間の検討が必要とされた。そこで、30, 60, 90, 120, 150, 180 秒の時間スケールで比較し、収縮胞がクリアーに可視化される処理時間の検討を行った。図2に示したように、120 秒では収縮胞がしっかりと染まっておらず、一方、180 秒では細胞内部の膜まで染まってしまっていて収縮胞の観察がしにくかったため、150 秒が至適であると考えられた。

本研究では、生きた細胞の細胞内小器官を継続的に観察するために、細胞が動かないように機械的に固定する必要があるがあった。そこで、細胞を押しつぶしすぎないように細胞の厚みの約半分程度の直径 25 μm のラテックスビーズを使用し、さらに外液の粘性を上げる為に浸透圧には影響しないメチルセルロースを併用した。こうした条件下で FM 4-64 により標識された収縮胞を観察していると、観察する時間が長くなるほど、収縮胞の収縮頻度が下がる現象が観察された。観察開始から 15 分内外では、活発に活動しているように観察されるものの、やがて収縮胞の収縮頻度が少なくなると、収縮胞の膜に融合しない瓶状部が多くみられた (図3, 鎌)。また、放射水管 (瓶状部および集水管部に当たる部分) においてくびれが生じ、2 つの液胞状になることが観察された (図4)。おそらく、スライドガラスによりゾウリムシが圧迫され、収縮胞の排出口である収縮胞孔をカバーガラスが塞ぐことによる排出不能や、外水と接する細胞表面の減少がその原因と考えられるが、このため全ての測定は、スライドガラスに封入してから 15 分の間に行うことにした。

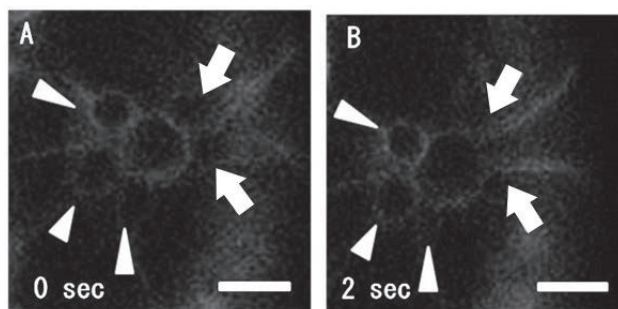


図3. FM 4-64により標識された *P. multimicronucleatum* の収縮胞複合体の蛍光顕微鏡像。観察開始から約 15 分後の蛍光写真を示している。AとBは2秒間隔で撮影された同一の収縮胞の連続写真である。Aの矢印で示される瓶状部膜は、Bでは収縮胞膜と融合しているが、Aの鎌で示される瓶状部膜は、2秒後のBでも収縮胞の膜と融合していない。スケールバーは、10 μm を示す

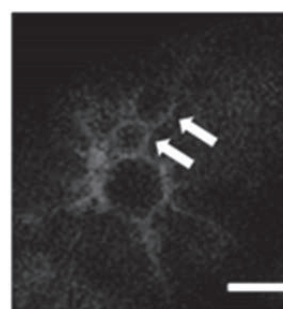


図4. FM 4-64によって標識された *P. multimicronucleatum* 収縮胞複合体の蛍光顕微鏡像。観察開始から約 15 分後の蛍光写真を示している。放射水管 (矢印) においてくびれが生じ、2 つの液胞状になることが観察された。スケールバーは、10 μm を示す

蛍光強度解析：本研究では、FM 4-64 により標識された細胞を蛍光顕微鏡にて観察し、光強度解析を行った。FM 4-64 により標識された細胞を観察していると蛍光顕微鏡の励起光照射により蛍光退色が観察された。このため、光強度の解析には蛍光退色を考慮に入れなくてはならない。本研究では、限られた視野におけるすべての蛍光退色スピードと、標的部分の蛍光強度を比較することでこの問題に対応した。結果として得られた視野中の蛍光退色のスピードは、約 -1.33%/sec であった (図5, ●)。

図5には、観察開始の蛍光強度を100%とした場合の蛍光強度の変化をプロットしている。図5の○に示すように、収縮胞の蛍光強度は、収縮した直後に上昇し、収縮胞が拡張するにつれて減少することが判明した。このことは、収縮胞が収縮している時は、収縮胞が存在する空間に膜が集積していることを示唆し、その集積した膜が収縮胞の膨張に伴い広げられ、その結果蛍光強度が低下したことを示唆している。また、次の収縮が始まる頃には、蛍光強度は再び上昇し (図5,

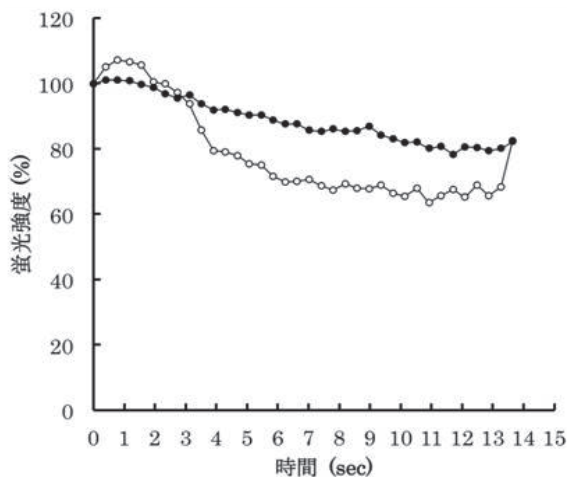


図5. *P. multimicronucleatum* 収縮胞複合体の収縮サイクルにおける FM 4-64 蛍光強度の変化。縦軸には、観察開始時の蛍光強度を100とした時の変化率(%)を、横軸には収縮胞萎縮直後を0秒とし、次の収縮までの1サイクルにかかった時間を示している。●には一定視野内の全体の蛍光強度変化を、○収縮胞の蛍光強度変化を示している

14 sec ●)、収縮サイクルを繰り返すことが示唆された。

図6には、細胞の背後から観察した収縮直後の収縮胞の様子を示している。収縮胞は、細胞の背中側に位置しているため、収縮胞を鳥瞰しているような状態である。収縮胞が萎縮した場所には、FM 4-64により標識される比較的蛍光強度の高い部分が発見される(図6, 矢印)。この部分には、多くの膜が蓄積していることが考えられる。

図7には、収縮胞の側面から観察した様子を示している。図6に示された蛍光強度の高い膜の集積は、収縮胞複合体の骨格として存在する微小管束に沿って存在している様に観察される(図7, 矢印)。本研究ではしかしながら、同一細胞中における微小管の局在を示す標識を実施していないので、議論の余地を残すところであるが、Hausmann and Allen (1977)が報告したように、*Paramecium*属の収縮胞孔(図7, P)を取り囲む微小管の束は、収縮胞、瓶状部、集水管に向かって放射状に配向している。

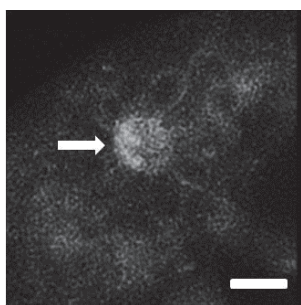


図6. FM 4-64により標識された *P. multimicronucleatum* 収縮胞複合体の蛍光顕微鏡像。収縮胞の収縮直後の蛍光写真を示している。矢印の部分に、比較的蛍光強度の高い部分を示す。スケールバーは、10 μmを示す

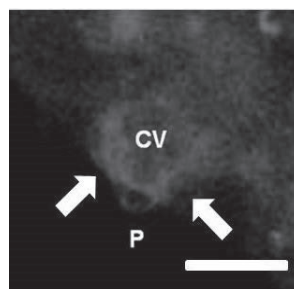


図7. FM 4-64により標識された *P. multimicronucleatum* 収縮胞複合体を側面から見た図を示す。CVは収縮胞、Pは収縮胞孔を示す。矢印の先に蛍光強度の高い膜の集積を表す。スケールバーは、10 μmを示す

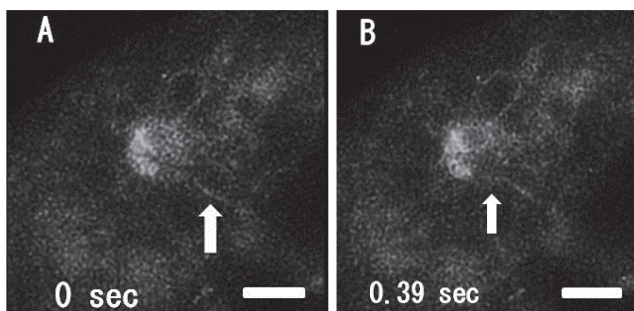


図8. FM 4-64により標識された *P. multimicronucleatum* 収縮胞複合体の収縮胞膜と瓶状部膜間の融合像。AとBは、0.39秒間隔で撮影された同一収縮胞複合体の連続写真である。Aの図の矢印は瓶状部を、Bの図の矢印は、瓶状部の膜が収縮胞の位置に滑り込む様子を示す。スケールバーは、10 μmを示す

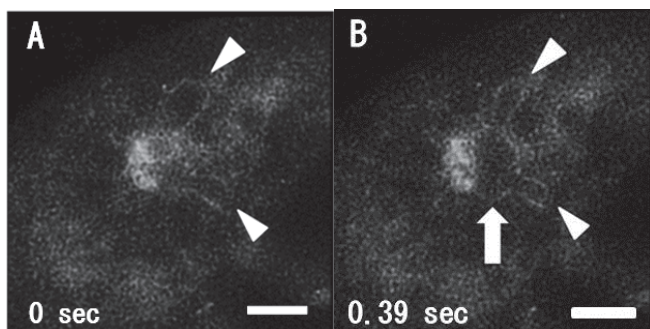


図9. *P. multimicronucleatum* 収縮胞複合体の収縮胞膜と複数の瓶状部膜が同時に融合する様子を表す連続写真。A と B は、0.39 秒間隔で撮影された同一収縮胞複合体の連続写真である。鏃は、瓶状部を、矢印は、収縮胞を示す。A の鏃で示される二つの瓶状部膜が、B では収縮胞膜に融合するように観察される。スケールバーは、10 μm を示す

図8と図9は同じ収縮胞を瓶状部の膨張・収縮から収縮胞の膨張までの時間経過にしたがって観察したものである。収縮胞の膨張には、近傍に位置する瓶状部の膨張(図8A, 矢印)が先行する。膨張した瓶状部膜は、やがて収縮胞膜と融合するが、この時あたかも瓶状部膜が収縮胞の位置に滑り込むように観察される(図8B, 矢印)。この時、滑り込んだ先の蛍光高強度は、減少する。この部分には、収縮胞の蓄積を示す蛍光が存在していたことから、収縮胞膜が膨張を始めたと考えられる。すなわち既存の収縮胞の膜に隣接する瓶状部膜が融合することによって内容物が移動し、収縮胞膜(図9B, 矢印)が膨張したと考えられる。また、図9Bでは、二つの瓶状部の内部溶液が収縮胞に移動することにより、収縮胞より遠位の瓶状部膜が萎縮の様子が観察される(図9, 鏃)。

図10には、この収縮胞より遠位の瓶状部膜の蛍光強度の時間変化を示している。時間経過に従った蛍光強度の解析から、収縮胞膜と瓶状部膜の融合直後に、収縮胞からより遠位の瓶状部において蛍光強度が上昇することが確認された。図10において収縮胞膜と瓶状部膜の融合を示す収縮胞膜の膨張は、1.17秒の時点から始まっている。収縮胞膜と瓶状部膜の融合により瓶状部内部の溶液の移動が生じると考えられるが、図10に示すように、融合部位から遠位の瓶状部膜の萎縮(蛍光強度の増加)は、ほぼ同時期に観察された。

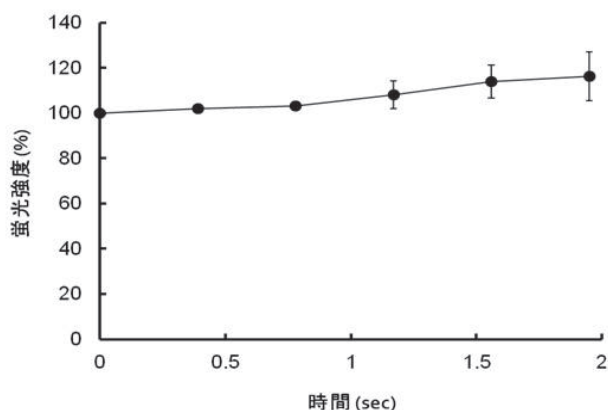


図10. *P. multimicronucleatum* の収縮胞に瓶状部が融合する前後の収縮胞より遠位の瓶状部の蛍光強度の変化。瓶状部と収縮胞は、1.17 秒の時点で融合している。グラフには、3つの瓶状部の蛍光強度測定から得られた平均の値をプロットしており、エラーバーは標準偏差を表す

Tominaga et al. (1999) は、詳細な電子顕微鏡観察とノマルスキー微分干渉顕微鏡観察により、収縮胞や瓶状部膜は、それぞれの萎縮後に管状化することを報告している。この現象は、本研究における収縮胞や瓶状部膜の萎縮時に観察される蛍光強度の増大と良く一致しており、こうした管状化による膜の集積が蛍光強度を増加させた可能性が高いと考えられる。また Tominaga et al. (1999) は、瓶状部膨張により瓶状部膜と萎縮した収縮胞膜との融合が生じた結果、瓶状部膜の内包する液体の移動により、収縮胞膜が膨張し、この際あたかも瓶状部膜が収縮胞膜に滑り込むように観察されることを報告している。この事は本研究における観察とよく一致する。

電子顕微鏡観察は、膜の微細な構造を強拡大で観察することができるが、生体中の膜の動態を直接観察することはできない。また、微分干渉顕微鏡による観察は、コントラストを強調することで細胞内の小さな粒子や膜の構造を生体内において観察することができるが、光学顕微鏡の分解能を下回る構造は観察できない。収縮胞や瓶状部、および集水管部では、萎縮した膜が直径約40 nmの管状に変化することが知られているが (Allen 2000; Tominaga et al. 1999)、このような管状化は、したがって微分干渉顕微鏡では観察することができない。一方、FM 4-64 は、脂質親和性の高い色素であり膜を直接染色しているため、こうした微細の構造変化を蛍光強度の増加という形で可視化させていると考えられる。また、本研究における FM 4-64 を用いた生体観察で得られた結果は、Tominaga et al. (1999) の仮説を強く指示するものである。

本研究では、あらかじめ FM 4-64 処理を行った細胞を蛍光顕微鏡で観察したが、蛍光顕微鏡下においてマイクロピペットにより FM 4-64 を収縮胞に直接注入あるいは近傍で収縮胞膜のみ噴射することにより、収縮胞と融合する膜が順次に染色される過程が観察されるものと考えられる。今後こうした方法により収縮胞複合体の膜の融合過程を観察することが望まれる。

謝辞

本研究を行うにあたって、ご指導いただいた本学の堀田広樹先生に深く感謝いたします。

引用文献

- Allen RD (2000) The contractile vacuole and its membrane dynamics. *BioEssays*, 22: 1035-1042.
- De Saedeleer H, Wolf E (1931) La genese de la vesicule contractile chez une amibe d' eau douce. Demonstration d' un complexe vacuolaire. *Comptes Rendus des Sances de la Societe de Biologie*, 106: 612-613.
- Fok AK, Allen RD (1979) Axenic *Paramecium caudatum*. I. Mass culture and structure. *J. Protozool*, 26: 463-470.
- Hausmann K, Allen RD (1977) Membranes and microtubules of the excretory apparatus of *Paramecium caudatum*. *Cytobiologie*, 15: 303-320.
- Ishida M, Aihara MS, Allen RD, Fok AK (1993) Osmoregulation in *Paramecium*: the locus of fluid segregation in the contractilevacuole complex. *J. Cell. Sci.*, 106: 693-702.
- Kissmehl R, Froissard M, Plattner H, Momayezi M, Cohen J (2002) NSF regulates membrane traffic along multiple pathways in *Paramecium*. *J. Cell Sci.*, 115: 3935-3946.
- Patterson DJ (1980) Contrantile vacuoles and associated structures. Their organization and function. *Biol. Rev.*, 55: 1-46.
- Spallanzani L (1776) *Opuscoli di fiscal animale e vegeabile*. Modena, Societa Tipografica.
- Tominaga T, Allen RD, Naitoh Y (1998) Electrophysiology of the in situ contractile vacuole complex of *Paramecium* reveals its membrane dynamics and electrogenic site during osmoregulatory activity. *J. Exp. Biol.*, 201: 451-460.
- Tominaga T, Naitoh Y, Allen RD (1999) A key function of non-planar membranes and their associated microtubular ribbons in contractile vacuole membrane dynamics is revealed by electrophysiologically controlled fixation of *Paramecium*. *J. Cell Sci.*, 112: 3733-3745.