



Ca²⁺-dependent cytoplasmic and nuclear contraction in protozoa

有川, 幹彦

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Date of Publication)

2008-11-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2767

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002767>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 2 2 4 】

氏 名 ・(本 籍) 有川 幹彦 (熊本県)

博士の専攻分野の名称 博士 (理学)

学 位 記 番 号 博い第200号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

Ca²⁺-dependent Cytoplasmic and Nuclear Contraction in Protozoa
(原生動物の細胞質および核内に存在するCa²⁺依存性
収縮系の解析)

審 査 委 員

主 査 教 授 松田 吉弘

教 授 土屋 禎三

教 授 林 文夫

助教授 洲崎 敏伸

原生生物に見られる細胞運動の中には、アクトミオシン系や微小管系以外にも、既知の分子機構では説明できない、まったく新しい仕組みによる運動系が数多く知られている。それらの多くは、細胞内の微細な繊維構造が関与しており、細胞の形態変化をとまなう運動として良く研究されている。本研究では、原生動物太陽虫を材料として、細胞質内に存在するカルシウム依存性の収縮機構について研究を行った。太陽虫は球形の細胞体から軸足と呼ばれる長い有軸仮足を放射状に伸ばした特有の形態をしている。餌となる小型の生物が軸足の表面に接触すると、それを接着させて捕らえ、軸足を短縮させることによって細胞体へ引き寄せ、エンドサイトーシスにより食胞内へ取り込む。この軸足の収縮運動もアクトミオシン系や微小管系とは異なると考えられており、そのメカニズムはまだ明らかにされていない。先行研究において、収縮した軸足の細胞質内部に、繊維状から顆粒状へと形態変化した contractile tubules と呼ばれる繊維構造が観察されている。しかし、細胞質の収縮運動と contractile tubules の形態変化とを結びつける直接的な証拠はまだ得られていなかった。そこで本研究では、太陽虫の細胞質の収縮運動と contractile tubules との関連性を明らかにし、太陽虫の細胞質内に存在する特殊な収縮機構のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

最初に、オオタイヨウチュウ *Echinospaerium akamae* を材料として、膜の透過性を高めたセルモデルを作成し、その細胞質のカルシウムに対する反応性について検討した。高濃度の EGTA 処理を行うことにより、軸足が伸張した状態のセルモデルを得た。このセルモデルにカルシウムを加えると、微小管は保存されたまま、軸足細胞質の部分的な収縮が生じた。電子顕微鏡による観察の結果、通常は繊維状である contractile tubules が、収縮した細胞質内部で顆粒状へと形態変化していた。このことから、*E. akamae* の軸足細胞質の収縮運動はカルシウム依存性の contractile tubules の粒状化が原動力になっていることが明らかになった。次に、界面活性剤処理によって、脱膜処理した細胞体のセルモデルを得た。細胞体モデルはカルシウムの添加によって収縮し、カルシウムの除去によって弛緩した。この収縮-弛緩は、カルシウムの添加-除去を交互に繰り返すことにより、何度も生じさせることができた。このような細胞質の収縮運動は、ATP を必要とせず、cytochalasin B によって阻害されなかったことから、*E. akamae* の細胞質内には、カルシウム依存性の収縮機構が存在していることが明らかとなった。

別種の太陽虫、*Actinophrys sol* についても、同様の実験を行った。*A. sol* は *E. akamae* と同目に属しており、外部形態や餌の捕食様式も非常に類似している。したがって、細胞質の収縮の仕組みも2種間で共通していると考えられる。*E. akamae* の場合と同様に、高濃度の EGTA 処理によって、伸張した状態の軸足のセルモデルを得た。カルシウムを添加すること

により、微小管が脱重合することなく、細胞質の収縮が観察された。また、細胞体のセルモデルにおいても、細胞質の収縮-弛緩がカルシウム依存的に生じた。さらに、*A. sol* の細胞破碎液にカルシウムを加えることによって、カルシウム濃度依存的に沈殿物が生じることを見出した。電子顕微鏡による観察の結果、細胞破碎液中には contractile tubules 様の繊維構造が多数含まれていた。この繊維構造はカルシウムの添加によって粒状化した。この繊維構造の形態変化は、生きた細胞における contractile tubules の粒状化と非常に類似していた。

A. sol の細胞破碎液にカルシウムを加えることによって得られる沈殿物の生化学的、生理学的解析を行った。電気泳動による解析の結果、沈殿物は多くのタンパク質を含んでいることが分かった。カルシウムの添加-除去を繰り返すことによって、複数回生じさせた沈殿物においても、含まれるタンパク質組成が変化することはなかった。BSA を含む溶液中で沈殿物を生じさせた場合、沈殿物中に BSA が濃度依存的に取り込まれることから、沈殿物中には、沈殿物の形成に必要なタンパク質以外にも多くの細胞質タンパク質が含まれていることが考えられる。しかしながら、その中にカルシウムに対して感受性を持つタンパク質は検出できなかった。得られた沈殿物をスライドガラス上に貼り付け、カルシウムを加えることにより、沈殿物の収縮が観察された。この収縮は、カルシウムの添加-除去によって繰り返し生じさせることができた。また、沈殿物の収縮度合いとカルシウムの濃度との関係を調べた結果、沈殿物の収縮はカルシウム濃度に依存していることが分かった。このように、*A. sol* の細胞破碎液にカルシウムを加えることによって得られた沈殿物が示す収縮性は、セルモデルの実験で得られた細胞質の収縮性と高い類似性を示したことから、太陽虫の細胞質収縮運動を沈殿物の収縮という形で *in vitro* で再現できたとと言える。

本研究では、研究の途上において、核内にカルシウム依存性の収縮機構が存在することを新たに見出した。そこで、このような核の収縮性について検討するとともに、核の収縮性が真核生物においてどれだけ普遍的に存在しているのかを追及することも目的とした。核の形態変化は原生動物、特に繊毛虫において顕著に観察される。また、核の収縮が核膜の収縮によって、あるいは核膜孔の構造変化によって引き起こされるという報告例もある。本研究では、繊毛虫 *Euplotes aediculatus* の大核を単離し、さらに核膜を除去する方法を考案した。単離・脱膜処理した大核の表面構造を高分解能走査型電子顕微鏡によって3次元解析を行った。さらに、このような単離・脱膜後の大核がカルシウム依存性の収縮性を保持していることが分かった。このことは、核の収縮には核膜および核膜孔は関与していないことを示している。

(氏名： 有川 幹彦 NO. 3)

クロマチン体および複製帯の3次元構造解析を目的として、0.25 M sucrose 溶液中で冷・解凍した *Euplotes aediculatus* から核を単離し、1% acetic acid 処理によって脱膜を行った大核の高分解能走査型電子顕微鏡による表面構造の観察を行った。その結果、大核はたくさんの異なるサイズのクロマチン体(直系約 0.2-1.0 μm) から構成されていることが分かった。それらのクロマチン体は、さらに小さな顆粒(直径約 50 nm) によって構成されており、繊維構造によって隣り合うクロマチン体と連結されていた。複製帯では、クロマチン体が崩れ、50 nm の顆粒が広がっていた。また局所的に、10 nm の微顆粒にまで崩れている箇所も観察された。

上述の方法で、単離・脱膜処理した *Euplotes aediculatus* の大核がカルシウム依存的な収縮性を持つことが分かった。スライドガラス上に貼り付いた大核は、EGTA を加えることによって弛緩し、続けてカルシウムを加えることによって収縮した。この大核の収縮運動は、EGTA とカルシウムを交互に加えることにより、繰り返し生じさせることができた。このことは、大核の収縮がカルシウムのみによって制御されていることを示している。この大核の収縮は細胞周期のどの時期においても観察された。しかし、S 期に出現する複製帯部分は比較的、収縮性に乏しかった。このようなカルシウム依存的な核の収縮は、*Euplotes* だけでなく、タイヨウチュウ *Actinophrys sol* や、繊毛虫 *Paramecium bursaria*、さらにはヒト培養細胞 (HeLa 細胞) においても観察された。このことは、カルシウム依存的な核の収縮性が真核生物一般に広く存在している可能性を示している。

タイヨウチュウ *Actinophrys sol* の核内に、カルシウム依存性の収縮機構が存在することが明らかになった。単離核にカルシウムを加えることにより、核の直径が約 16.5 μm から約 11.0 μm に減少した。このような核の収縮はマグネシウムでは引き起こされず、colchicine や cytochalasin B によっても阻害されなかった。収縮した核は、EGTA を加えることによって弛緩し、続けてカルシウムを加えることによって再び収縮した。この収縮-弛緩は、カルシウムの添加-除去を繰り返すことにより、何度も生じさせることができた。また、核の収縮性は 2 M NaCl 処理によっても失われなかったことから、この収縮には核骨格系が関与していることが示唆された。電子顕微鏡による観察の結果、弛緩した状態の核では、細い繊維構造が核内に均一に広がっていたのに対し、収縮した状態の核では、それらがお互いに凝集し、太い繊維構造を形成していた。続けて核を弛緩させた状態では、太い繊維構造が崩れるようにして、再び核内に均一に広がっていた。このことから、核の収縮-弛緩は、核内繊維構造の凝集-拡散によって引き起こされている可能性が示唆された。

(別紙 1)

論文審査の結果の要旨

氏名	有川 幹彦		
論文 題目	Ca ²⁺ -dependent Cytoplasmic and Nuclear Contraction in Protozoa 原生動物の細胞質および核内に存在する Ca ²⁺ 依存性収縮系の解析		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	松田 吉弘
	副 査	教 授	土屋 禎三
	副 査	教 授	林 文夫
	副 査	助教授	洲崎 敏伸
	副 査		
要 旨			
原生生物に見られる細胞運動の中には、アクトミオシン系や微小管系以外にも、既知の分子機構では説明できない、まったく新しい仕組みによる運動系が数多く知られている。それらの多くは、細胞内の微細な繊維構造が関与しており、細胞の形態変化をとまう運動として良く研究されている。本研究では、原生動物太陽虫を材料として、細胞質内に存在するカルシウム依存性の収縮機構について解析が行われた。太陽虫は球形の細胞体から軸足と呼ばれる長い有軸仮足を放射状に伸ばした特有の形態をしている。餌となる小型の生物が軸足の表面に接触すると、それを接着させて捕らえ、軸足を短縮させることによって細胞体へ引き寄せ、エンドサイトーシスにより食胞内へ取り込む。この軸足の収縮運動もアクトミオシン系や微小管系とは異なると考えられており、そのメカニズムは明らかにされていなかった。先行研究においては、収縮した軸足の細胞質内部に、繊維状から顆粒状へと形態変化した contractile tubules と呼ばれる繊維構造が観察されていた。しかし、細胞質の収縮運動と contractile tubules の形態変化とを結びつける直接的な証拠はまだ得られていなかった。そこで申請者は、太陽虫の細胞質の収縮運動と contractile tubules との関連性を明らかにし、太陽虫の細胞質内に存在する特殊な収縮機構のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。			
まず最初に、申請者はオオタイヨウチュウ <i>Echinospaerium akamae</i> を材料として、膜の透過性を高めたセルモデルを作製し、その細胞質のカルシウムに対する反応性について検討した。高濃度の EGTA 処理を行うことにより、軸足が伸張した状態のセルモデルを得た。このセルモデルにカルシウムを加えると、微小管は保存されたまま、軸足細胞質の部分的な収縮が生じた。電子顕微鏡による観察の結果、通常は繊維状である contractile tubules が、収縮した細胞質内部で顆粒状へと形態変化していた。このことから、 <i>E. akamae</i> の軸足細胞質の収縮運動はカルシウム依存的な contractile tubules の粒状化が原動力になっていることが明らかにされた。次に、申請者は界面活性剤処理によって、脱膜処理された細胞体のセルモデルを得た。細胞体モデルはカルシウムの添加によって収縮し、カルシウムの除去によって弛緩した。この収縮-弛緩は、カルシウムの添加-除去を交互に繰り返すことにより、何度も生じさせることができた。このような細胞質の収縮運動は、ATP を必要とせず、cytochalasin B によって阻害されなかったことから、 <i>E. akamae</i> の細胞質内には、カルシウム依存性の収縮機構が存在していることが明らかになった。			
続いて、別種の太陽虫 <i>Actinophrys sol</i> についても同様の実験が行われた。 <i>A. sol</i> は <i>E. akamae</i> と同目に属しており、外部形態や餌の捕食様式も非常に類似している。したがって、細胞質の収縮の仕組みも 2 種間で共通していると考えられる。申請者は、 <i>E. akamae</i> の場合と同様に、高濃度の EGTA 処理によって、伸張した状態の軸足のセルモデルを得た。カルシウムを添加することにより、微小管が脱重合することなく、細胞質の収縮が観察された。また、細胞体のセルモデルにおいても、細胞質の収縮-弛緩がカルシウム依存的に生じた。さらに、 <i>A. sol</i> の細胞破砕液にカルシウムを加えることによって、カルシウム濃度依存的に沈殿物が生じることを見出した。電子顕微鏡による観察の結果、細胞破砕液中には contractile tubules 様の繊維構造が多数含まれていた。この繊維構造はカルシウムの添加によって粒状化した。この繊維構造の形態変化は、生きた細胞における contractile tubules の粒状化と非常に類似していた。そこで申請者は、この <i>A. sol</i> の細胞破砕液にカルシウムを加えることによって得られる沈殿物の生化学的、生理学的解析を行った。電気泳動による解析の結果、沈殿物は多くのタンパク質を含んでいることが分かった。カルシウムの添加-除去を繰り返すことによって、複数回生じさせた沈殿物においても、含まれるタンパク質組成が変化することはなかった。BSA を含む溶液中で沈殿物を生じさせた場合、沈殿物中に BSA が濃度依存的に取り込まれることから、沈殿物中には、沈殿物の形成に必要なタンパク質以外にも多くの細胞質タンパク質が含まれていることが考えられた。しかしながら、その中にカルシウムに対して感受性を			

印

氏名	有川 幹彦
持つタンパク質は検出できなかった。得られた沈殿物をスライドガラス上に貼り付け、カルシウムを加えることにより、沈殿物の収縮が観察された。この収縮は、カルシウムの添加・除去によって繰り返し生じさせることができた。また、沈殿物の収縮度合いとカルシウムの濃度との関係を調べた結果、沈殿物の収縮はカルシウム濃度に依存していることが分かった。このように、<i>A. sol</i>の細胞破砕液にカルシウムを加えることによって得られた沈殿物が示す収縮性は、セルモデルの実験で得られた細胞質の収縮性と高い類似性を示したことから、太陽虫の細胞質収縮運動を沈殿物の収縮という形で <i>in vitro</i> で再現できたと結論した。 申請者は、研究の途上において、核内にカルシウム依存性の収縮機構が存在することを新たに見出した。そこで、このような核の収縮性について検討するとともに、核の収縮性が真核生物においてどれだけ普遍的に存在しているのかを追及することも本研究の目的とした。核の形態変化は原生動物、特に繊毛虫において顕著に観察される。また、核の収縮が核膜の収縮によって、あるいは核膜孔の構造変化によって引き起こされるという報告例もある。本研究において申請者は、繊毛虫 <i>Euplotes aediculatus</i> の大核を単離し、さらに核膜を完全に除去する方法を考案した。単離・脱膜処理した大核の表面構造を高分解能走査型電子顕微鏡によって3次元解析を行った。さらに、このような単離・脱膜後の大核がカルシウム依存的な収縮性を保持していることが分かった。このことは、核の収縮には核膜および核膜孔は関与していないことを示している。 まず最初に、クロマチン体および複製帯の3次元構造解析を目的として、0.25 M sucrose 溶液中で冷・解凍した <i>Euplotes aediculatus</i> から核を単離し、1% acetic acid 処理によって脱膜を行った大核の高分解能走査型電子顕微鏡による表面構造の観察が行われた。その結果、大核はたくさんの異なるサイズのクロマチン体（直径約 0.2・1.0 μm）から構成されていることが分かった。それらのクロマチン体は、さらに小さな顆粒（直径約 50 nm）によって構成されており、繊維構造によって隣り合うクロマチン体と連結されていた。複製帯では、クロマチン体が崩れ、50 nm の顆粒が広がっていた。また局所的に、10 nm の微顆粒にまで崩れている箇所も観察された。 上述の方法で、単離・脱膜処理した <i>Euplotes aediculatus</i> の大核がカルシウム依存的な収縮性を持つことが分かった。スライドガラス上に貼り付いた大核は、EGTA を加えることによって弛緩し、続けてカルシウムを加えることによって収縮した。この大核の収縮運動は、EGTA とカルシウムを交互に加えることにより、繰り返し生じさせることができた。このことは、大核の収縮がカルシウムのみによって制御されていることを示している。この大核の収縮は細胞周期のどの時期においても観察された。しかし、S 期に出現する複製帯部分は比較的、収縮性に乏しかった。このようなカルシウム依存的な核の収縮は、<i>Euplotes</i> だけでなく、タイヨウチュウ <i>Actinophrys sol</i> や、繊毛虫 <i>Paramecium bursaria</i>、さらにはヒト培養細胞（HeLa 細胞）においても観察された。このことは、カルシウム依存的な核の収縮性が真核生物一般に広く存在している可能性を示している。 申請者は、タイヨウチュウ <i>Actinophrys sol</i> の核内に存在するカルシウム依存性の収縮機構について更なる解析を行った。単離核にカルシウムを加えることにより、核の直径が約 16.5 μm から約 11.0 μm に減少した。このような核の収縮はマグネシウムでは引き起こされず、colchicine や cytochalasin B によっても阻害されなかった。収縮した核は、EGTA を加えることによって弛緩し、続けてカルシウムを加えることによって再び収縮した。この収縮・弛緩は、カルシウムの添加・除去を繰り返すことにより、何度も生じさせることができた。また、核の収縮性は 2 M NaCl 処理によっても失われなかったことから、この収縮には核骨格系のみが関与していることが示唆された。電子顕微鏡による観察の結果、弛緩した状態の核では、細い繊維構造が核内に均一に広がっていたのに対し、収縮した状態の核では、それらがお互いに凝集し、太い繊維構造を形成していた。続けて核を弛緩させた状態では、太い繊維構造が崩れるようにして、再び核内に均一に広がっていた。このことから、核の収縮・弛緩は、核内繊維構造の凝集・拡散によって引き起こされている可能性が示唆された。 以上のように、本研究は、タイヨウチュウの細胞質収縮運動を生化学的、生理学的手法と観点から研究したものであり、そのメカニズムを解明するうえで重要となる contractile tubules の機能解明に非常に有用な知見を得たと言える。さらに、真核生物の核が普遍的にカルシウムに依存した収縮性を持つという観察は、この分野における初めての発見であり、高く評価することができる。よって学位申請者有川幹彦は博士（理学）の学位を得る資格があると認める。	