
Review

ゾウリムシ・ディディニウムのエクストルゾームの放出とカルシウム

岩楯 好昭
徳島大学総合科学部
〒770-8502 徳島市南常三島町1-1

Calcium dynamics in *Paramecium-Didinium* system

Yoshiaki IWADATE

*Department of Life Science, Faculty of Integrated Arts and Sciences,
The University of Tokushima, Tokushima 770-8502, Japan*

1. はじめに

原生動物細胞では、他の細胞同様に、カルシウムイオンはきわめて重要な細胞内情報伝達物質である。繊毛打方向の逆転やエキソサイトーシス、細胞骨格系の運動などカルシウムイオンによって制御される細胞機能は多岐にわたる。カルシウムイメージング法やケイド化合物の開発など近年の新しい技術と相まって、繊毛虫を材料とした細胞内カルシウムイオンの研究はおおいに発展してきた。

さて、肉食性繊毛虫ディディニウム (*Didinium nasutum*) はゾウリムシ (*Paramecium* spp.) を特異的に認識し捕食する。このときディディニウムはゾウリムシを捕らえるためにエクストルゾーム (extrusome) を放出し、かたや、ゾウリムシもこれに应答してエクストルゾームを放出する。本稿では、ゾウリムシやディディニウムのエクストルゾームの放出とカルシウムイオンの関係について述べる。

2. ゾウリムシのトリコシスト (trichocysts) 放出とカルシウム

2-1 膜融合とトリコシストの伸張

ゾウリムシのエクストルゾーム、トリコシストの放出は (1) トリコシスト膜と細胞膜の融合 (2) トリコシスト本体の伸張という 2 段階の現象である (図 1)。トリコシスト膜と細胞膜の融合は細胞内のシグ

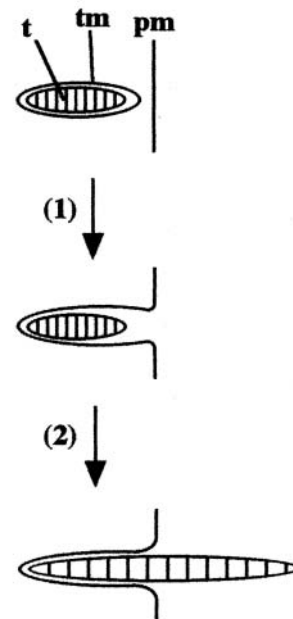


図1 ゾウリムシのトリコシスト放出の過程。トリコシスト放出は、トリコシスト膜と細胞膜の融合(1)、トリコシスト本体の伸張(2)という2段階の現象である。t; トリコシスト, tm; トリコシスト膜, pm; 細胞膜。

ナルによって誘発されるが、膜の融合の後トリコシスト本体は細胞外液に触れるため、トリコシスト本体の伸張は細胞外の溶液条件に依存する。

2-2 膜融合とカルシウム

カルシウムの由来

細胞外液のカルシウムイオンをキレートした状態でゾウリムシに外部から刺激を与えても、光学顕微鏡下で細胞外へ放出されたトリコシストを観察することはできない。このとき、光学顕微鏡レベルで観察しても、トリコシストの放出の過程が上記のトリコシスト膜と細胞膜の融合の段階で止まっているのか、あるいは、膜同士は融合しており、トリコシストの伸張のみが起きていないのかわからない。Knoll (Knoll et al., 1991) らはゾウリムシ (*P. tetraurelia*) を AED (aminoethyl-dextran ポリアミン, トリコシスト放出誘発剤) で刺激し急速凍結することで、トリコシスト放出過程の細胞膜の様子を、ms の時間分解能で電子顕微鏡で観察した。彼らは、外液のカルシウムイオンをキレートした条件でも、細胞膜とトリコシスト膜の融合が起きることを確認した。Knoll et al. (1993) は、electron spectroscopic imaging を用いて、AED 刺激前後の細胞内カルシウムイオンの分布を画像としてとらえた。AED 刺激前にアルベオラサック (alveolar sacs) 内に分布していたカルシウムシグナルは、刺激後、アルベオラサック内には見られず、その周辺に見られた。この結果から、細胞内のカルシウムストアとして、細胞表層のアルベオラサックが有力な候補者となっている。

一方、Kerboeuf et al., (1990) と Knoll et al. (1992) は $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いて、AED 刺激後、ゾウリムシ (*P. tetraurelia*) 細胞内へ外液カルシウムイオンの流入があることを測定した。この結果は、膜融合に細胞内ストアからのカルシウム放出だけではなく外液カルシウムイオンも関与していることを示唆している。

Plattner et al. (1997) は、外液カルシウムイオン存在下と外液カルシウムイオンをキレートした時とで、膜融合の起こる頻度を詳細に計測した。外液カルシウムイオンをキレートした場合、融合口ができなくなることは無かったものの融合口のできる割合は減った。

これらの結果から、細胞膜とトリコシスト膜の融合は、細胞内ストアからのカルシウムイオンの放出のみでも起きるが、細胞内ストアからのカルシウムイオンの放出により細胞外からのカルシウムイオンの流入が誘導され、この流入が膜融合を促進させるのだと考えられる。

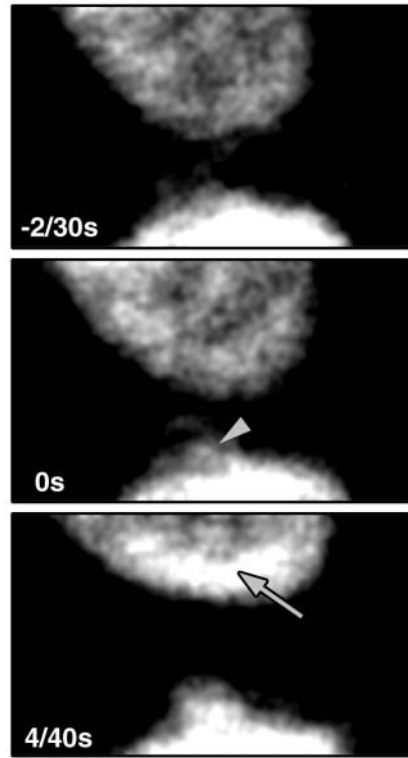


図2 ゾウリムシとディディニウムの捕食-被食相互作用時の細胞内カルシウムレベルの可視化。上;ゾウリムシ, 下;ディディニウム。表示時刻は双方の細胞の接触時を0 sとしたときの時刻。ゾウリムシをディディニウムの口吻の先端に接触させると、ディディニウムの口吻の基部のカルシウムレベルが上昇し(白矢印頭), 続いて、ゾウリムシのディディニウムに攻撃された箇所(白矢印)のカルシウムレベルが上昇する(白矢印)。スケールバー; 30 μm 。

カルシウムイメージング

さて、膜融合を引き起こすカルシウムイオンの細胞内での振る舞いをより正確に知るためには、細胞内でのカルシウムイオン濃度の時間空間的な変化を生きた細胞を用いて調べることが望ましい。Plattner ら (Erxleben et al., 1997, Klauke and Plattner, 1997, 1998, Klauke et al., 1998, Klauke et al., 2000) と我々 (Iwadate et al., 1997) は、それぞれ独立に、生きたゾウリムシを使ってトリコシスト放出時の細胞内カルシウムイメージングを行った。

Plattner らは、AED の刺激によるトリコシスト放出

時の細胞内カルシウムレベルを記録した。一方、我々は、よりナチュラルに、ディディニウムとゾウリムシの接触により双方のエクストルゾーム放出を誘導したときの、細胞内カルシウムレベルを双方の細胞で同時に記録することを試みた。光学顕微鏡下でゾウリムシ (*P. caudatum*) とディディニウム (*D. nasutum*) を固定し、双方にカルシウム感受性蛍光色素 Calcium green-1 dextran を顕微注射する。マイクロマニピュレータを使ってディディニウムの口吻先端にゆっくりとゾウリムシを接触させ、このときの蛍光強度の変化を記録した (図2)。ゾウリムシはディディニウムの攻撃により確かに攻撃された箇所では蛍光強度を上昇させた。蛍光強度の上昇はディディニウムに攻撃された箇所から細胞表層に沿って広がり、トリコシスト放出後、細胞深部まで広がりディディニウムに飲み込まれてしまうまで続いた。トリコシスト放出後続く蛍光強度の上昇は、おそらく細胞外からのカルシウムイオンの流入なのであろう。

細胞外からのカルシウムイオンの流入

Klauke, et al. (2000) は、外液カルシウムを BAPTA でキレートした条件で、生きたゾウリムシ (*P. tetraurelia*) に AED をスプレーしても細胞表層のカルシウムレベルが上昇することを示した。また、Iwadate and Kikuyama (2001) は、顕微画像と蛍光強度を光路の切り替えなく同時に測定できる実験系を用いて、トリコシスト放出と細胞内カルシウムレベルの関係を調べた。外液カルシウムイオン存在下でゾウリムシ (*P. caudatum*) にエタノールをスプレーすると、大きなカルシウムトランジェントと共にトリコシスト放出が確認された。一方、外液カルシウムイオンを EGTA でキレートした状態でエタノールをスプレーすると、トリコシストの伸張は確認できず、ごく小さなカルシウムトランジェントのみを確認した。さらに、外液カルシウムを薄い EGTA で一時的にキレートした場合、2相のカルシウムトランジェントが生じ、2相目のカルシウムトランジェントの最中にトリコシストの伸張が確認できた。外液のカルシウムイオンを完全にキレートした時にゾウリムシの細胞内で観察されたカルシウムトランジェントは細胞内ストアからのカルシウムイオンの放出で、外液のカルシウムイオンを薄い EGTA で一時的にキレートした時の2相に分かれたカルシウムトランジェントは細胞内ストアからのカルシウムイオンの放出と細胞外からの流入だと考えられる。これらの結果は、トリコシスト放出時のカルシウムトランジェントのカルシウムの由来が細胞内ストアと細胞外の両方であることを示している。

さて、Klauke et al. (2000) は外液カルシウムをキレ

トした状態で、4-chloro-m-cresol により細胞内ストアのカルシウムイオンを枯渇させ、その後細胞を外液カルシウムイオン存在下に移すと、細胞内カルシウムレベルが上昇することを示した。トリコシスト放出時の外液からのカルシウム流入は、細胞内ストアのカルシウム枯渇による store-operated Ca^{2+} influx (SOC) なのかもしれない。

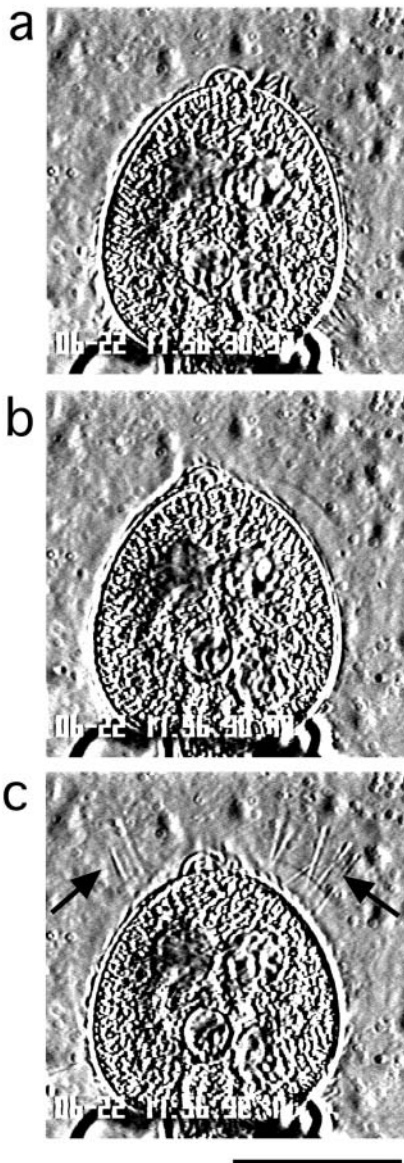
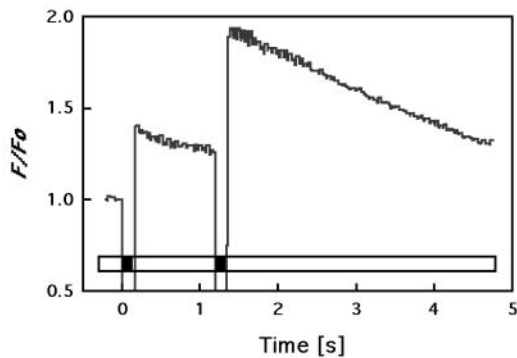
膜融合のカルシウムの閾値

ゾウリムシにはトリコシスト放出の他に、繊毛逆転および細胞体の収縮というカルシウムイオンによって引き起こされる細胞機能がある。いずれもカルシウムイオン濃度によって制御される機能であるにもかかわらず、これらは必ずしも同時に起きるわけではない。我々 (Iwadate et al., 1999a) はケイジドカルシウムを使って、細胞全体の細胞内カルシウムレベルを人為的に上昇させ、これらの3つの細胞機能を引き起こすカルシウムレベルの閾値の違いを調べた。ゾウリムシ (*P. caudatum*) にケイジドカルシウム NP-EGTA を顕微注射し、紫外線を段階的に照射することで NP-EGTA からカルシウムイオンを解放させ、段階的に細胞内カルシウムレベルを上昇させたときの細胞の応答を見た (図3)。NP-EGTA と共に Calcium green-1 をゾウリムシに顕微注射し、紫外線を 125 ms ずつ2回照射すると、Calcium green-1 の蛍光強度、すなわち細胞内カルシウムレベル、は確かに2段階に上昇した。ゾウリムシの細胞機能を観察すると、1回目のカルシウムレベルの上昇では繊毛逆転と細胞体の収縮が起き、トリコシストの放出は起きなかった。2回目のカルシウムレベルの上昇で初めてトリコシストの放出が確認できた。この結果はトリコシスト放出の膜融合を引き起こす細胞内カルシウムレベルの閾値が繊毛逆転・細胞体収縮の閾値よりも高いことを示している。

2-3 トリコシスト伸張とカルシウム

単離したトリコシストはカルシウムイオンを含む溶液中で伸張する (Lima et al., 1989) ので、トリコシストの伸張もカルシウムによって引き起こされる現象である。細胞膜とトリコシスト膜の融合後、トリコシスト本体は細胞外液に露出されたため、細胞外液のカルシウムイオンによってトリコシスト本体は伸張するのだろう。

カルシウムがトリコシストを伸張させるメカニズムについて、Bilinski et al. (1981) は X-ray microanalysis による測定を元に、トリコシストを構成しているタンパク質の正電荷に結合しているリン酸 (PO_4^{3-}) が正電



荷を持つ外液のカルシウムイオンによって取り除かれることで、トリコシトの急激な伸張が起きると説明した。一方, Garofalo et al. (1983) はカルモジュリンの阻害剤 TFP や W-7 がピクリン酸によるトリコシトの伸張を阻害することを観察しており, カルモジュリンの関与を示唆した。

2-4 ゾウリムシのトリコシト放出とカルシウムのまとめ

ゾウリムシのトリコシト放出過程は次のように考えられる。まず外部からの刺激により, 細胞内カルシウムストア (アルベオラサック) からカルシウムイオンが放出される。このカルシウムイオンが細胞膜とトリコシト膜の融合を誘導すると共に, 外液からのカルシウムイオンの流入を引き起こす。膜の融合はこの外液から流入するカルシウムイオンによってさらに促進されるのかもしれない。膜の融合後外液にさらされたトリコシト本体は外液カルシウムイオンによって急激に伸張する。

外部からの刺激がアルベオラサックからのカルシウム放出を引き起こすメカニズム, そのカルシウムチャネルの同定や外液から流入するカルシウムのチャネルの同定, また, カルシウムがトリコシト本体の伸張を引き起こすメカニズムなど, 今後の研究が待たれるところである。

3. ディディニウムのエクストルゾーム放出とカルシウム

3-1 ディディニウムのエクストルゾーム

ディディニウムの口吻の構造は Yagiu and Shigenaka (1965), Wessenberg and Antipa (1970) によって電子顕微鏡によって観察された。Wessenberg and Antipa (1970) は, ディディニウムの口吻には pexicysts,

図3 ゾウリムシのケイジドカルシウム (NP-EGTA) 光分解による細胞内カルシウムレベルの変化(グラフ下のバーの黒色部が紫外線照射時) (上) と細胞の様子 (下)。a; 紫外線照射前, b; 1度目の照射後, c; 2度目の照射後。照射時間は125 ms。1度目の細胞内カルシウムレベルの上昇で繊毛反転と細胞体収縮が見られ, 2度目でさらにトリコシト放出 (矢印) が見られた。スケールバー; 50 μm 。

toxicysts という 2 種類のエクストルゾームが格納されており、ゾウリムシの捕獲に際して、これらのエクストルゾームが 2 段階に放出すると結論づけた。一方、Yagiu and Shigenaka (1965) の電子顕微鏡観察からは、2 種類のエクストルゾームは見られない。我々の光学顕微鏡下で観察したディディニウムのエクストルゾームの放出でも 2 種類のエクストルゾームは確認できなかった。従って、本稿では以下、pexicysts と toxicysts をまとめてエクストルゾームと呼ぶこととする。

3-2 電気生理的研究

Hara et al. (1985) は、外液にカルシウムイオンを含む溶液中で、ディディニウムへ強い内向き電流を流すとエクストルゾームが放出されることを見いだした。一方、外液のカルシウムイオンを EGTA でキレートした条件下で内向き電流を流してもディディニウムはエクストルゾームを放出しなかった。この結果は、内向き電流に伴って口吻に流入したカルシウムイオンが、ディディニウムのエクストルゾームの放出を引き起こすことを示唆している。

3-3 上昇箇所の検討

カルシウムイメージング

Hara ら (Hara et al., 1985) の示唆したとおり、ディディニウムのエクストルゾームの放出が口吻のカルシウムイオン濃度の上昇によるものであるか、我々は、ディディニウムのエクストルゾーム放出時に口吻でカルシウムイオン濃度が上昇するかどうか測定した (図 2)。Calcium green-1 dextran を顕微注射したディディニウムの口吻先端にゾウリムシを接触させると、ディディニウムは口吻基部から蛍光強度を上昇させた (Iwadate et al., 1997)。この結果はゾウリムシの口吻先端への接触がディディニウムの口吻内部のカルシウムレベルの上昇を引き起こすことを示している。

顕微注射

ディディニウムの口吻内部のカルシウムレベルの上昇がエクストルゾーム放出の結果ではなく原因であることを確認するため、我々は、カルシウムバッファを直接ディディニウムの口吻に顕微注射したときディディニウムがエクストルゾームを放出するかどうか観察した (Iwadate et al., 1999b)。カルシウムバッファを口吻基部表層に顕微注射したとき、ディディニウムはエクストルゾームを放出した。この結果

は、口吻内部のカルシウムレベルの上昇が、確かにエクストルゾーム放出の原因であることを示している。

カルシウムイオンの由来

ディディニウムは外液のカルシウムイオンを EGTA でキレートした条件下でもゾウリムシを捕食する (Hara et al. 1985)。これは、ディディニウムのエクストルゾーム放出に必要なカルシウムイオンの出所が、細胞内のストアのみであることを示唆している。ゾウリムシのトリコシスト放出に関しては、膜融合における細胞外からのカルシウムの流入、トリコシスト本体の伸張の外液カルシウムイオン依存性が示されており、ディディニウムのエクストルゾーム放出に必要なカルシウムイオンの出所が細胞内のストアのみであれば、ディディニウムのエクストルゾーム放出機構がゾウリムシのトリコシスト放出機構と違って興味深い。

3-4 補食-被食相互作用

ディディニウムとゾウリムシのカルシウムレベルを同時に記録した結果 (Iwadate et al., 1997, 図 2) から、双方のカルシウムレベルの変化を比較すると、ディディニウムの口吻基部のカルシウムレベルの上昇が、ゾウリムシのディディニウムに攻撃された箇所のカルシウムレベルの上昇に比べて、ビデオレートで 1 コマ先立ってきた。これは、双方の細胞の接触により、まずディディニウムがゾウリムシを認識しエクストルゾームを放出し、その攻撃を受けて始めてゾウリムシがトリコシストを放出することを示唆している。

3-5 ディディニウムのエクストルゾーム放出とカルシウムのまとめ

ディディニウムはゾウリムシとの接触により、口吻基部表層のカルシウムイオン濃度を上昇させる。このカルシウムイオン濃度の上昇がエクストルゾームの放出を引き起こす。カルシウムイオンの出所は細胞内ストアだと思われる。ディディニウムのエクストルゾームの放出とカルシウムについてはカルシウムが原因であるということがわかったばかりで、ゾウリムシとの接触から口吻表層のカルシウムレベルの上昇に至る過程、カルシウムストアやカルシウムチャンネルなど、未知の部分が多く、今後の詳細な研究が待たれる。

ディディニウムとゾウリムシのカルシウムレベルを同時に記録した結果から、これらの補食-被食相互作用は以下のような過程で起こると考えられる。(1)

ディディニウムの口吻先端とゾウリムシ(おそらく繊毛)の接触により,ディディニウムの口吻基部表層のカルシウムレベルが上昇する。(2)このカルシウムレベルの上昇によりディディニウムがエクストルゾームを放出する。(3)この強い機械的な刺激によりゾウリムシは攻撃を受けた箇所でカルシウムレベルを上昇させる。(4)ゾウリムシはトリコシストを放出する。ディディニウムのエクストルゾームの攻撃が非常に強いのとゾウリムシのトリコシスト放出よりも先立つことから,ゾウリムシはディディニウムから逃れられないのだろう。

4. 終わりに

繊毛虫細胞はそのサイズが大きく光学顕微鏡下での観察が容易である。また,カルシウム感受性蛍光色素やケイジド化合物など試薬の導入,紫外線の照射などに対して非常に丈夫で,細胞機能が損なわれることが少なく実験操作がやりやすい。繊毛虫細胞はエクストルゾームをはじめとして,繊毛運動など細胞機能と細胞内シグナルの非常に良い研究材料である。

エクストルゾームの放出ではカルシウムが重要な役割を果たしていることはわかったものの,カルシウムイオンのターゲットやカルシウムチャンネルなどまだまだ未知のことが多い。今後,多くの研究者に繊毛虫細胞のエクストルゾームや細胞内カルシウムイオン動態の研究に興味を持っていただきたい。

参考文献

- Bilinski, M., Plattner, H. and Matt, H. (1981) Secretory protein decondensation as a distinct, Ca^{2+} -mediated event during the final steps of exocytosis in *Paramecium* cells. *J. Cell Biol.*, 88, 179-188.
- Erxleben, C., Klauke, N., Flötenmeyer, M., Blanchard, M.-P., Braun, C. and Plattner, H. (1997) Microdomain Ca^{2+} activation during exocytosis in *Paramecium* cells. Superposition of local subplasmalemmal calcium store activation by local Ca^{2+} influx. *J. Cell Biol.*, 136, 597-607.
- Garafolo, R. S., Gilligan, D. M. and Satir, B. H. (1983) Calmodulin antagonists inhibit secretion in *Paramecium*. *J. Cell Biol.*, 96, 1072-1081.
- Hara, R., Asai, H. and Naitoh, Y. (1985) Electrical response of the carnivorous ciliate *Didinium nasutum* in response to discharge of the extrusive organelles. *J. Exp. Biol.*, 119, 211-224.
- Iwadate, Y., Katoh, K., Asai, H. and Kikuyama, M. (1997) Simultaneous recording of cytosolic Ca^{2+} levels in *Didinium* and *Paramecium* during a *Didinium* attack on *Paramecium*. *Protoplasma*, 200, 117-127.
- Iwadate, Y., Kikuyama, M. and Asai, H. (1999) Photolysis of caged Ca^{2+} induces trichocyst discharge in *Paramecium caudatum*. *Protoplasma*, 206, 11-19.
- Iwadate, Y., Katoh, K., Kikuyama, M. and Asai, H. (1999) Ca^{2+} triggers toxicyst discharge in *Didinium nasutum*. *Protoplasma*, 206, 20-26.
- Iwadate, Y. and Kikuyama, M. (2001) Contribution of calcium influx on trichocyst discharge in *Paramecium caudatum*. *Zool. Sci.*, 18, 497-504.
- Kerboeuf, D. and Cohen, J. (1990) A Ca^{2+} influx associated with exocytosis is specifically abolished in a *Paramecium* exocytotic mutant. *J. Cell Biol.*, 111, 2527-2535.
- Klauke, N. and Plattner, M. (1997) Imaging of Ca^{2+} transients induced in *Paramecium* cells by a polyamine secretagogue. *J. Cell Sci.* 110, 975-983.
- Klauke, N. and Plattner, H. (1998) Caffeine-induced Ca^{2+} transients and exocytosis in *Paramecium* cells. A correlated Ca^{2+} imaging and quenched-flow/freezefracture analysis. *J. Membr. Biol.* 161, 65-81.
- Klauke, N., Kissmehl, R., Plattner, H., Haga, N. and Watanabe, T. (1998) An exocytotic mutant of *Paramecium caudatum*: membrane fusion without secretory contents release. *Cell Calcium*, 23, 349-360.
- Klauke N, Blanchard M and Plattner H. (2000) Polyamine triggering of exocytosis in *Paramecium* involves an extracellular Ca^{2+} /(polyvalent cation)-sensing receptor, subplasmalemmal Ca-store mobilization and store-operated Ca^{2+} -influx via unspecific cation channels. *J. Membr. Biol.*, 174, 141-156.
- Knoll, G., Braun, C. and Plattner, H. (1991) Quenched flow analysis of exocytosis in *Paramecium* cells: time course, change in membrane structure, and calcium requirements revealed after rapid freezing of intact cells. *J. Cell Biol.*, 113, 1295-1304.
- Knoll, G., Kerboeuf, D. and Plattner, H. (1992) A rapid calcium influx during exocytosis in *Paramecium* cells is followed by a rise cyclic GMP within 1 s. *FEBS Letter*, 304, 265-268.
- Knoll, G., Grassle, A., Braun, C., Probst, W., Hohne-Zell, B. and Plattner, H. (1993) A calcium influx is neither strictly associated with nor necessary for exocytotic membrane fusion in *Paramecium* cells. *Cell Calcium*, 14, 173-183.
- Lima, O., Gulik-Krzywicki, T. and Sperling, L. (1989) *Paramecium* trichocysts isolated with their mem-

- branes are stable in the presence of millimolar Ca^{2+} .
J. Cell Sci., 93, 557-564.
- Plattner, H., Braun, C. and Hentschel, J. (1997) Facilitation of membrane fusion during exocytosis and exocytosis-coupled endocytosis and acceleration of "ghost" detachment in *Paramecium* by extracellular calcium. A quenched-flow/freeze-fracture analysis. J. Membr. Biol., 158, 197-208.
- Wessenberg, H. and Antipa, G. (1970) Capture and ingestion of *Paramecium* by *Didinium nasutum*. J. Protozool., 17, 250-270.
- Yagiu, R. and Shigenaka, Y. (1965). Electron microscopy of the ectoplasm and the proboscis in *Didinium nasutum*. J. Protozool., 12. 363-381.