

---

## Review

---

### ツリガネムシ類とその $Ca^{2+}$ 駆動収縮性スパズモネーム

浅井 博

早稲田大学理工学部 (院) 生命理工学部門

(現在: 早稲田大学名誉教授)

〒169-8655 東京都新宿区大久保3-4-1

郵便配達住所; 〒202-0004 西東京市下保谷4-16-7

### $Ca^{2+}$ -driven contraction of spasmoneme in Vorticellidae

Hiroshi ASAI

Major in Bio-Science and Bio-Engineering, Graduate School of Science and Engineering,

Waseda University, Tokyo 169-8555

#### 1. はじめに

##### 1-1. ツリガネムシのストークの収縮と再伸長

ツリガネムシ類 (*Vorticellidae*) は、釣鐘状またはベル状の虫体 (zooid) とそこから細長く伸びた柄 (茎、ストーク) の部分から出来ている単細胞動物である。Peritrich Ciliate に属する。ストークは、非常に速いコイル状の収縮とゆっくりした再伸長をときどき繰り返す。文献によれば、この一見して奇妙な運動の第一発見者は、光学顕微鏡を発明したガラス職人のレーヴェンフック (Leeuwenhoek) である。後で詳しく述べるようにツリガネムシ類には、一個の虫体と一本のストークのみの真の単細胞からなる孤立形態のボルチケラ (*Vorticella*) と、コロニー状に枝分かれした型のカルケシウムとズーサムニウム (blanched *Vorticellidae*; *Carchesium* と *Zoothamnium*) の2形態に分類される。カルケシウムは、その枝分かれしたストークが個々ば

らばらに収縮するのに対して、ズーサムニウムの枝分かれしたストークの全ては、一緒に収縮・再伸長をする。レーヴェンフックが最初に観察した種は、おそらくボルチケラ の一種であろう。著者がたまたま 16 ミリフィルムの画面中に紛れ込んでいるのを見たのも、ボルチケラであった。ツリガネムシの奇妙な再伸長のときの運動は、それ以来、脳裏に焼き付けられた。レーヴェンフックと似た偶然の体験であった。レーウエンフックが体験した感想として Curtis (1967) がその本の中で、「あたかもこころを持った小動物がもだえ苦しんでいるようにも見える」、と述べている。収縮するときの様子は、普通の方法のビデオなどでは観察できない。収縮は数ミリ秒前後で完了するからである。私のツリガネムシストーク観察の体験は、約 300 年近く遅れの 1965-6 年頃のことであった。それ以来自分で研究室を持つ事ができたら、是非研究テーマの 1 つにしたいと考えるようになった。研究発表のときに、「ツリガネムシは、何のために収縮するのか？」

---

Tel/Fax: +81-424-24-8655

E-mail:asai@waseda.jp

(Received: 28 June 2005)

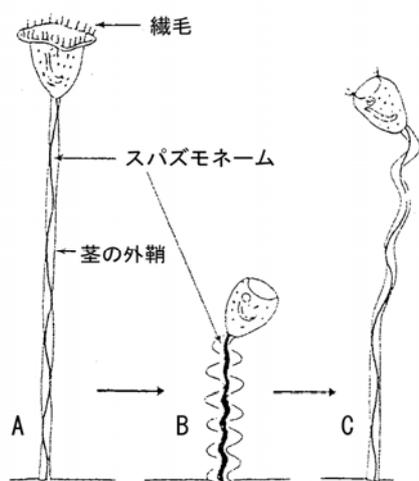


図 1. 木の葉などに付着して棲息しているボルチケラ。左の図は、ストークが伸びた状態で、頭部 (Zooid、その直径は約 40-60 ミクロン) も収縮していない。ストーク内のスバズモネームの直径は約 1 ミクロンである。中の図は、スバズモネームが収縮していることを示す。右の図は、ストークが再伸長している途中の状態を示す。頭部近くのストークの部分がまだやや収縮したままである。図 2 のように、グリセリン処理したボルチケラのストークでも再現できる。

とよく質問されるが、その質問に正しく答えるのは大変難しい。何故ならば、枝分かれツリガネムシの一種の中にストークは収縮しなくて、虫体のみ収縮する種であるエピスティリス (*Epistylis*) があるからである。エピスティリスのストーク内には、複屈折性の細胞内小器官が無い。強いて答えるとすれば、虫体中の未消化の細菌類を収縮の反動で、吐き出すためか、天敵であるワムシを驚かすためであろう。

ツリガネムシのストークが収縮するのは、繊維状の収縮器官が存在するからである。実際、Schmidt (1940) は、偏光顕微鏡でツリガネムシのストークが収縮するときに収縮性器官の複屈折が消失するのを観察している。複屈折がある細胞内器官とは、その器官の素材が繊維状であるという事である。複屈折性の細胞内繊維の典型は、筋肉の F アクチンフィラメントとミオシンフィラメントである。複屈折が消失するというのは、収縮性器官の収縮のメカニズムがゴム弾性のようなものであることを暗示する。実は、1930 年代から 1950 年代の後半にかけて、殆どの高分子物理化学者

は、大変形を示す筋肉の収縮がゴム弾性的であると、素朴に考えていた。ツリガネムシの収縮性器官も、最初は筋肉繊維を意味するミオネームと最初は呼ばれていた。しかし、1958 年以降には、スバズモネームと呼ばれるべき器官となった。ちなみに、スバズモとは、痙攣的に収縮する、という意味である。グリセリン処理した *Vorticella* sp. のストークがカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) のみや  $\text{Ca}^{2+}$  と ATP で収縮するように観えるので、Hoffmann-Berling (1958) は、筋肉の一種にはあまりにも変な筋肉であると論文で発表している。その後の研究によって、ツリガネムシのストークの収縮は、確かに、 $\text{Ca}^{2+}$  のみの存在によって起こることが確かめられた。筋肉収縮や繊毛・鞭毛運動とはまったく異なり、ATP も直接的には必要としない第三の生物運動であることが、次第に確実となってきた。収縮のエネルギー源は、当然のことながら、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質との結合のエネルギーである。そこには酵素反応は介入していない。スバズモネームの再伸長は、細胞質に分散していた  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を下げて、 $\text{Ca}^{2+}$  を回収することによる。筋小胞体様 (Favard and Carasso, 1965; Carasso and Favard, 1966) の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ機構が働くからである。だから、再伸長は非常におそい。したがって、ツリガネムシのスバズモネームの収縮は、「純物理学的現象であると同時に、生理学的または生物学的現象である」、と言える。

## 1-2. ツリガネムシの種類

日本名ではツリガネムシは、ただ一種類のように思われるけれども、4 種類ある。ただ一個のベル状の頭部とそこから細長く伸びた柄 (ストーク) をもったボルチケラは、孤立して木の葉などに付着して棲息している。春から初夏にかけて、どこの河川や沼にも見られる。一年を通じて安定して見付けられるのは、下水処理場の曝気槽で見付かる。一年を通じて水温が安定しているからである。摂氏 20 度前後が一番よい棲息環境である。しかし、著者は観察したことが無いが、摂氏 4 度前後の低温でも摂氏 40 度前後の高温でもボルチケラが棲息している、という報告もある (楠丘泰博士の個人的情報)。ボルチケラの付着形態には、比較的群がって木の葉に付着しているものと、ほぼ等間隔でばらばらに生息しているものとある。どちらも実験室で長期間培養できるが、ばらばらに生息する種の方が人工培養しやすい。学名には、300 種以上も記載されていて、多少重複があるかもしれない (Kahl, 1935)。棲息環境によって形態が多少異なる可能性があるからである。遺伝子レベルで分類を見直す必要があった (Miao et al., 2001; Itabashi et al., 2002)。緑ツリガネムシと呼ばれる *Zoochlorella* を頭部に共生して

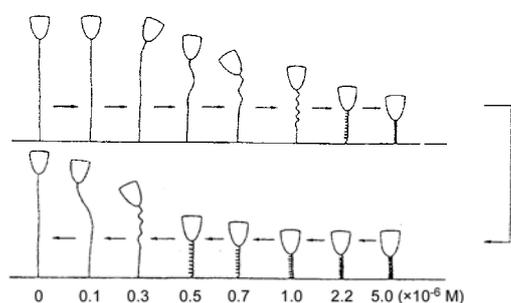


図2. グリセリン処理したボルチケラのストークの収縮と再伸長。外液のカルシウムイオン濃度の増減によって、収縮と再伸長を100回以上も繰り返せる。

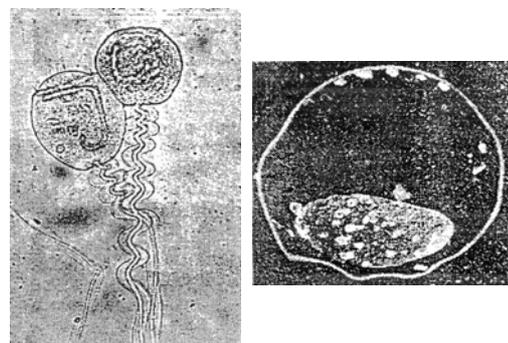


図3. 左の図は、カルケシウムの光学顕微鏡写真で、図1の右に似ている。右の図は、ストークの輪切り電子顕微鏡写真。ストークの端近くにスパズモネーム（直径は約2ミクロン）が存在している。伸長状態で、ストーク近くにスパズモネームが右ネジのラセン状に伸びているので、スパズモネームが直線的に収縮しても、巻き戻しによってストークは左ネジ状となる。

いる種もある。先に述べたようにカルケシウムのストークは、ばらばらに収縮する。一方、ズーサムニウムのストークが同時に収縮するのは、収縮性繊維であるスパズモネームが枝を通じてすべて繋がっているからである。繋がっていれば、何故に収縮するのだろうか。それは、収縮の信号が筋小胞体様の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵庫を通じて、 $\text{Ca}^{2+}$  放出が起こるためであろう。細胞膜の興奮のための細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度よりもスパズモネームの収縮のための  $\text{Ca}^{2+}$  濃度レベルの方が低い、と考えられる (Shiono and Naitoh, 1997)。その理由は、スパズモネームの収縮の起動が  $\text{Ca}^{2+}$ -induced calcium release であるためだろう。孤立型の *Vorticella* の頭部とストークとの収縮運動の過程を高速ビデオ (1秒当たり9,000コマのスピード) で観測したことがある。それを球状の頭部に摩擦抵抗を持ち長いバネで繋がった減衰調和振動子モデルで解析した。収縮は9ミリ秒で終了するが、収縮の時間発展の過程は、このモデルで良く一致した。しかし、バネのスプリング定数は、時刻ゼロではほぼゼロであり、その後2ミリ秒までほぼ直線的に上昇し、その後は一定のスプリング定数を保つことが出来た (Moriyama et al., 1998)。ツリガネムシの虫体とその近くのスパズモネームの収縮が、 $\text{Ca}^{2+}$ -induced calcium release を通じて起こったと考えられる。さらに、収縮の情報がその隣のスパズモネームの収縮を逐次引き起こす。スパズモネームは、 $\text{Ca}^{2+}$  放出の伝播を引き起こす能力を持っている、と言える。枝分かれズーサムニウムの沢山のストークが一斉に

収縮するように見えるのは、その理由による。

ところで、カルケシウムも、下水処理場の曝気槽や、流出堰で普通に見られる。河川や沼にも時々見つけられるが、亜種として異なっているように見える。しかし、分類が難しいために *C. polypinum* という学名しか思いつかない。図1に孤立形態の *Vorticella* sp. のポンチ画、図2に、グリセリン処理モデルの  $\text{Ca}^{2+}$  収縮の各段階、図3の左側に、*Carchesium* sp. の写真、右側に、ストークの輪切り電子顕微鏡写真が載せてある。断面の下側にスパズモネームの断面が見え、ところどころに、筋小胞体様の顆粒が見える。

*Zoothamnium* で Zoo というのは、当然動物の意味であるが、thamnium は、ギリシャ語で樹木と言う意味である (Forrest, 1879b)。通常ツリガネムシのストーク内収縮器官の細長いスパズモネームの直径は  $1 \sim 2 \mu\text{m}$  であるが、枝分かれ *Zoothamnium* 種の中には、その幹部分のスパズモネームの直径が  $20 \sim 40 \mu\text{m}$  もあるものがある。*Z. geniculatum* Ayrton または *Z. arbuscula* Ehrenberg である (Forrest, 1879a; Wesenberg-Lund, 1925; Furssenko, 1929)。種のライフサイクルの詳細も記載されている。その幹の部分に、巨大なスパズモネームを持つ。幹部分にある巨大なストークは、膝を折り曲げたように曲がるだけである。ちなみに、*geniculate* または *geniculation* はフランス語や英語で、膝のように折れ曲がる、という意味である。中にある巨大スパズモネームは縦に収縮する。巨大スパズモネームの端から根元にかけて、腱状 (tendon) の細い



図4. デンマークのヒラロッド市郊外の森林に囲まれた沼の睡蓮の葉の裏に付着して生息している巨大ズーサムニウム (*Zoothamnium geniculatum* strain Hilleroed)。全体の大きさは、約3-5ミリ。ストークの幹の部分で膝を折り曲げたように曲がっている。ストークには、沢山のワムシがたまたま付着していた。ストークの先端には体細胞 (somatic cell) が付いている。ところどころに、より大きな生殖細胞 (reproductive cell、大きさは約230ミクロン) が見える。

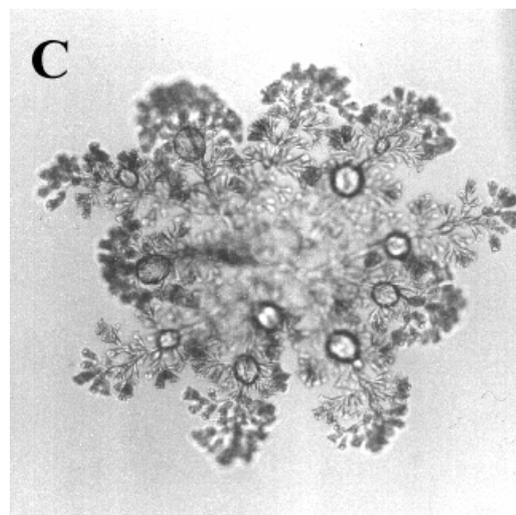
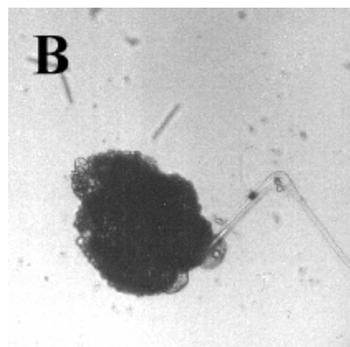
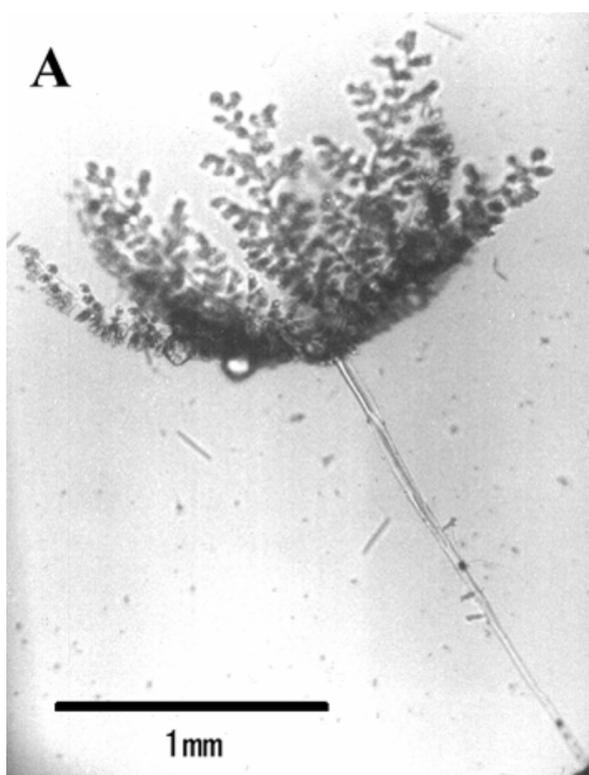


図5. 埼玉県川越市郊外の伊佐沼近くの川で、発見された巨大ズーサムニウムの光学顕微鏡写真。デンマークのもの (図4) よりもややスリムである。その他はほぼ似ている。Aはすべてのストークが伸長している状態。Bは収縮している状態。幹ストークは、膝のように折れ曲がっている。Cは真上から撮ったもの。



図 6. 埼玉県川越市郊外の伊佐沼近くの川の風景写真。川縁に沢山の葦が生えている。川の水質は、中性かややアルカリ性である。日本の酸性土壌にしては珍しい。秩父山中の石灰岩の  $\text{Ca}^{2+}$  が地下水を通じて、溶け出したと推定される。

繊維が伸びている。Wesenberg-Lund の論文に記載されている巨大ズーサムニウムは、デンマーク国コペンハーゲンの北約 30 キロの小都市ヒラロッドの沼で見付かる (図 4)。沼の睡蓮の葉の裏側 (したがって水面下) に、附着して生息する。我々はこの種を発見される地名に因んで *Z. geniculatum* strain Hilleroed と呼ぶことにしている。一方、Furssenko が記載している巨大ズーサムニウムは、エストニアに近いロシアの小都市、ピーターホッフの川や池のカナダモの葉に附着して棲息している。*Z. arbuscula* Ehrenberg と呼んでいるが、*Z. geniculatum* strain Hilleroed と同種かどうか論文の図からだけでは判明できない。Ayrton (1903) は、巨大ズーサムニウム (*Z. geniculatum* と *Z. arbuscula*) をイギリスでみつけ、両者の違いを論じている。その論文を読んだだけでは、違いが判然としない。百聞は一見にしかず、で両者を観察し、比較しないと分かりづらいことが後で分かった。ちなみに、*arbuscula* とは、ラテン語で小さな木という意味である (Forrest, 1879b)。

当時大学院生であった森山は、埼玉県川越市郊外の伊佐沼近くの川で、似た種を偶然に発見した (図 5)。図 6 は、伊佐沼近くの川の風景である。梅雨のときに、川縁の葦や蚊帳釣り草の古い葉に附着棲息しているのが見付かる。発見された巨大ズーサムニウムは、ヒラロッド市郊外の沼の睡蓮の葉に附着するものとは、一見やや異なってみえる。SDS-PAGE によるタンパク質分布の詳細は、かなり異なる。そこで前に述べたように、ヒラロッドの沼で発見される種を *Z. geniculatum* strain Hilleroed と呼び、川越市郊外で発見されたものを *Z. arbuscula* strain Kawagoe と呼ぶことにした訳である。この種でも巨大ツリガネムシのストークの幹の部分、膝のように折れ曲がった様になる。これは、ドイツの Münster 市郊外の河川に、1970 年に発見された種と似ていた (Mueller, 1980a and 1980b)。また、*Z. geniculatum* strain Hilleroed よりもやや小ぶりでもある。どちらの巨大型ズーサムニウムの虫体には、体細胞 (somatic cell) に相当するものと、生殖細胞 (reproductive cell) に相当するものと 2 種類の細胞が

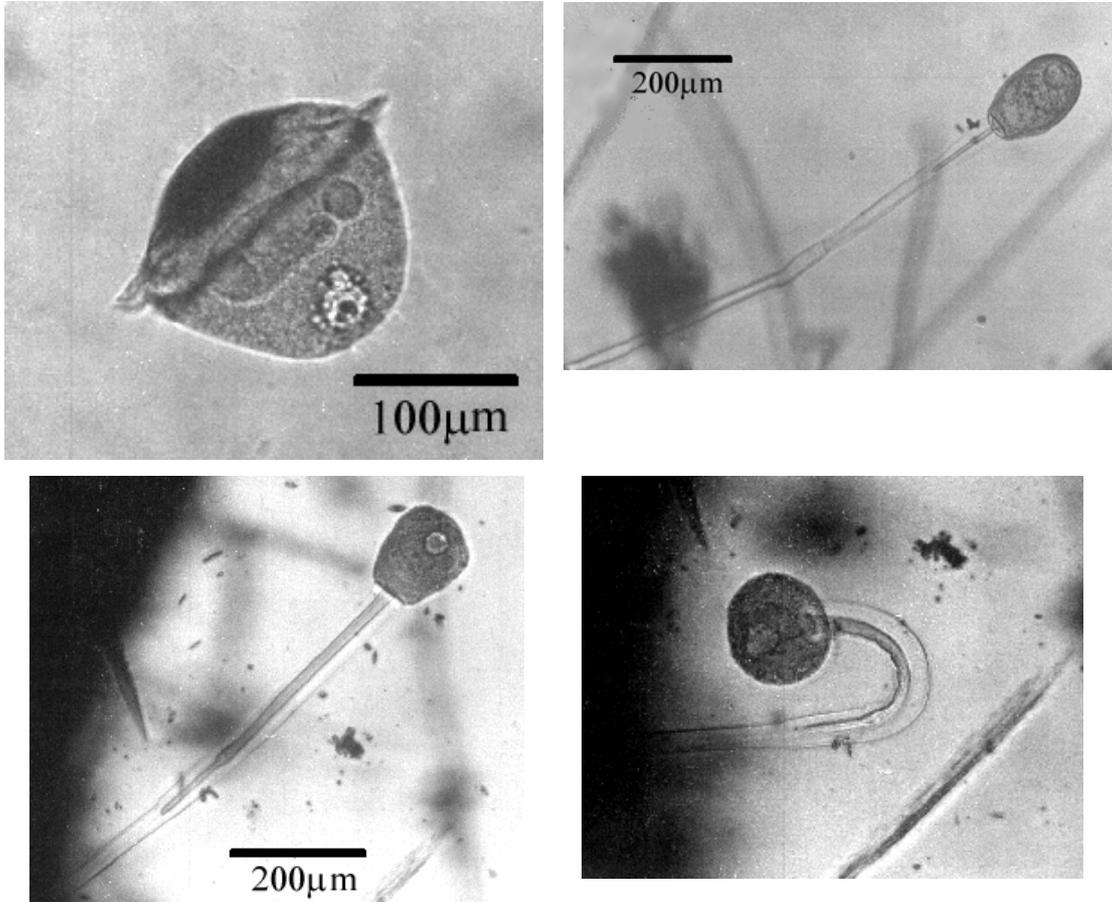


図7.川越産の巨大ズーサムニウムの生殖細胞が遊泳状態になったもの(図の左上)。他の3図は、遊泳していた生殖細胞が植物の葉に付着して、ストークを成長しつつある状態。

ある。どちらの巨大型ズーサムニウムでも、その reproductive cell の直径は  $230\ \mu\text{m}$  もある。reproductive cell の首の部分の外れると、遊泳形態になり、新天地をもとめて遊泳することになる(図7)。これは、他のツリガネムシ類についても言える。遊泳形態の虫体の形態は、固着形態のときの虫体の形態よりもより亜種の違いを反映している印象をもっているが、そのような研究はまだ始まっていない。

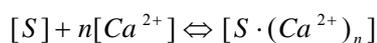
## 2. スパズモネーム収縮要素に共同的に吸着する $\text{Ca}^{2+}$ 個数

1960年代の末まで、ツリガネムシのストークの収縮メカニズムに関連する意味のある研究は、極限すれば、Hoffmann-Berlingによるもののみであった。さら

に、 $\text{Ca}^{2+}$  の特異的キレート剤である EGTA を使っていないという欠点があった。そのために、Townes and Brown (1965) は、ツリガネムシのストーク収縮性の pH 依存性について、複雑で奇妙な研究結果を発表してしまった。また、Levine (1956) は、 $\text{Ca}^{2+}$  のみならず  $\text{Mg}^{2+}$  などの2価のアルカリ金属イオン一般が、ツリガネムシのストークの収縮を引き起こすという結果を得てしまった。Levine は2価の金属イオンの非特異的キレート剤である EDTA を使っていた。そのために、 $\text{Mg}^{2+}$  溶液の試料中に混入していたマイクロモラ程度の  $\text{Ca}^{2+}$  がストーク収縮を引き起こしたのだろう。実際に、軟性のガラス容器に保存していた蒸留水でもストーク収縮を引き起こす事がある。実は、Hoffmann-Berling も EDTA を使用したが、容器または、 $\text{Mg}^{2+}$  溶液に  $\text{Ca}^{2+}$  が少なかったという幸運にめぐまれ

たのだろう。上記の研究では、研究試料にエネルギー源となる ATP の残存が直接的に関係している可能性もあった。そこで、Ca<sup>2+</sup> の特異的キレート剤である EGTA を使用する必要の他、添加した ATP 分解酵素の存在中で、EGTA を用いて追試的な研究から始めようとした。1967 年頃のことである。グリセリン処理モデルを用いた研究は、変性し易く困難な面もあった。スバズモネーム収縮要素に Ca<sup>2+</sup> が吸着すると ATP 無しで確かに収縮することが分かった。しかし、似た結論は、Amos が先に発表してしまった (Amos, 1971; Weisfogel and Amos, 1972; Amos, 1972)。また、吸着する Ca<sup>2+</sup> 個数は、1 個で収縮するという結論であった。収縮度と Ca<sup>2+</sup> 濃度との関係がミハエル・メンテンの式に合ってしまったからである。実は、我々は *V. convallaria* を用いていたのに、彼はデンマークで採集される *Z. geniculatum* strain Hilleroed を用いていたためである事が後で分かった。

グリセリン処理モデルの Ca<sup>2+</sup> 励起収縮の実験データの解析法を述べる。Ca<sup>2+</sup> のみで収縮するのであるから、Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質が収縮の主役であることは、確かである。その Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質を含む収縮の最小単位をスバズモネーム収縮要素という事にする。



$$\frac{[S][Ca^{2+}]^n}{[S \cdot (Ca^{2+})_n]} = K = K_m^n$$

伸長状態のスバズモネームの張力発生要素に、n 個の Ca<sup>2+</sup> が結合することによりその張力発生要素が張力を発生すると仮定すると、上に示す Hill の式が得られる。この式において [S] は伸長状態の張力発生要素、[S · (Ca<sup>2+</sup>)<sub>n</sub>] は Ca<sup>2+</sup> が結合した張力発生状態の張力発生要素である。相対張力  $T_R$  は free Ca<sup>2+</sup> 濃度、[Ca<sup>2+</sup>] の関数として以下のように表される。

もしくは

$$T_R = \frac{[S \cdot (Ca^{2+})_n]}{[S] + [S \cdot (Ca^{2+})_n]} = \frac{1}{1 + \left( \frac{K_m}{[Ca^{2+}]} \right)^n}$$

$$\log_{10} \frac{T_R}{1 - T_R} = n(-pCa - \log_{10} K_m)$$

となる。n は Hill パラメーターと呼ばれる。K<sub>m</sub> はみかけの平衡定数であり、平衡定数の逆数である。T<sub>R</sub> は発生した張力の相対値だから、最大張力のとき、すなわ

ち Ca<sup>2+</sup> 濃度充分のときには、T<sub>R</sub> = 1 となる。Ca<sup>2+</sup> 濃度が K<sub>m</sub> に等しくなると、T<sub>R</sub> は半分になる。勿論、n = 1 のときには、酵素反応式や、ミグロビンの酸素吸着式と同じである。上の最後の式は、データの解析に便利である。

この Hill の式による Ca<sup>2+</sup> 結合の解析法をストック付きの *V. convallaria* に適用した。グリセリン処理した *V. convallaria* の場合、ストックからスバズモネームを分離すると、変性しやすくなるので、ストック付きでしか張力測定できない。Ca<sup>2+</sup> 濃度を増加させていく時は Hill パラメーターとみかけの解離定数は、それぞれ n = 3.2 と K<sub>m</sub> = 0.40 μM になり、Ca<sup>2+</sup> 濃度を減少させていく時は n = 2.5、K<sub>m</sub> = 0.16 μM となった。このことはスバズモネーム内の張力発生要素に約 3 個の Ca<sup>2+</sup> が協同的に結合することにより、張力発生状態になることを意味する (Moriyama et al., 1996)。Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加に伴う収縮過程と、Ca<sup>2+</sup> 濃度の減少に伴う再伸長の過程で曲線が異なり、ヒステリシスループを描くのは、筋肉繊維などと同じである。ところで、グリセリン処理した *V. convallaria* の場合、ストック付きのスバズモネーム収縮の Hill パラメーターとみかけの解離定数は、簡便のためには、発生張力の測定ではなくて、ストックの長さの変化高であっても良いし、ストックのコイル数でもよい。したがって、ヘモグロビンの酸素吸着やその他いろいろな構造変化を伴う現象に適用できる。

それ以前に行われた研究で、ストック長の変化高の測定時には、約 2 強という値を得ている (Asai et al., 1978; Ochiai and Asai, 1981; Ochiai et al., 1984)。この場合には、図 2 で示したようにストックの場所で Ca<sup>2+</sup> 依存性が異なってくる。ストックの硬さ (Ochiai et al., 1983; Sugi, 1960) やスバズモネームの新鮮度が影響するのもかもしれない。したがって、収縮性繊維であるスバズモネームのみの張力測定の方が、ストック外皮の影響がないという意味で熱力学的にはより正確である。しかし、簡便法としては、どんな方法でもよい。研究とは、盲目の人が象を初めて触れて状態を探るようなものだからである。いずれにしても、ツリガネムシのスバズモネーム収縮要素に吸着する Ca<sup>2+</sup> 個数は 2-3 個であろうということになった。後で、収縮要素の主役は、カルモデュリンに似た Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質 (スバズミン) であることが分かったので、妥当な数である。カルモデュリンは、4 個の活性 EF hands 構造をもっているが、スバズミンの場合には、4 個の EF hands 構造のうちの一部が退化してしまっている場合が多い (Itabashi et al., 2003)。ところで、Ca<sup>2+</sup> ではなくて Tb<sup>3+</sup> や Eu<sup>3+</sup> などのランタノイドイオンや他の金属イオンを用いると、n は 6 近くの値をとるものと、3 近くの値をとるものとの 2 種類に分かれることが

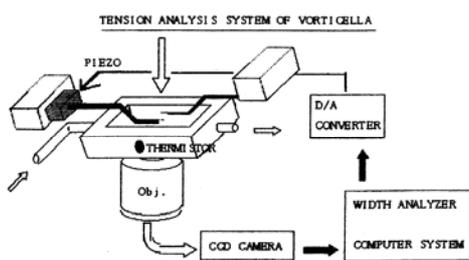
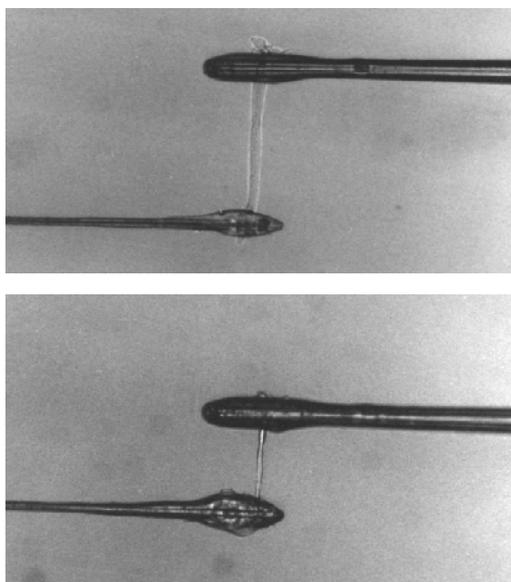


図 8. ストックから分離した巨大スパズモネームの両端を太いガラス棒と細いガラス棒で固定した様子。細いガラス棒は、その曲がり度で、発生張力を測定できる。上の図は  $\text{Ca}^{2+}$  不存在下で、その下は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が充分のとき。一番下の図は、長さ vs. 張力の測定器具の模式図。

判った (Yokoyama and Asai, 1987)。さらに、 $K_m$  の値は、 $\text{Ca}^{2+}$  と同じイオン半径のときが一番小さく、それから外れると  $K_m$  の値は大きく、したがって収縮のためには高濃度の金属イオンを必要とすることが分かった (Yokoyama and Asai, 1987)。多分、 $\text{Mg}^{2+}$  を用いれば 20-30 mM 必要となる。しかし、この濃度では、スパズモネームは変性してしまう。収縮に間接的に関係する言わば収縮調節重金属結合部位の存在が推定された。実際に、*V. convarallia* などでは、次の節で述べるように  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質が 3-4 種類もある (Yamada and Asai, 1982)。ゾウリムシやテトラヒメナでは、非カルモデュリン  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質が 6 種

類もあることが判っている。筋肉におけるトロポニンや軽鎖タンパク質のように、収縮調節タンパク質があっても変ではない。タンパク質の構造変化や機能変化を上 Hill の式を用いて調べるのは、応用も広く有用である。余談になるが、グリセリン処理ゾウリムシから  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤の EGTA 存在下で、未伸長のトリコシスト (non-discharged trichocyst) の抽出に成功したことがあった。未伸長のトリコシストは溶液中での  $\text{Ca}^{2+}$  添加で非可逆的に伸長する、ことを発見した。論文にする前に念のために、文献検索したが、同じ Hoffmann-Berling が殆ど知られないドイツ語の科学雑誌に記載していることを知り、がっかりしたことを覚えている。未発表だが、何と、伸長の Hill parameter,  $n$ , は、7 に近かった (山崎達男の修士論文)。

前に述べたように Amos は、*Z. geniculatum* strain Hilleroed の分離スパズモネームを用いて、その張力を種々の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度において測定し、 $n=1.0$  という結論を得た (Amos, 1975)。ミハエル・メンテンの式に合う  $\text{Ca}^{2+}$  吸着収縮という訳である。我々も、似た測定を試みた。この分離スパズモネームは、直径が 30-40  $\mu\text{m}$  もあるので、張力測定に便利である。ただし、外皮からスパズモネームを分離するのに、手間と多少のコツを要する。発生張力は、細いガラス棒のたわみから測定する (図 8)。ちなみに、ボルチケラやカルケシウムでは、ストックからスパズモネームを引き抜くとき、約 6 倍に伸びるが伸びすぎて、変性してしまう。図 9 に *Z. geniculatum* strain Hilleroed の分離スパズモネームを用いたデータが示されてある。 $n \approx 1.5-1.7$  となった (Asai et al., 1998)。先に述べたように、Amos は、 $n \approx 1.0$  と結論付けた。張力が半分のところを中心にして、縦軸の勾配を評価したからである (図 9 を参照)。差は小さいが、ことは、重大である。 $\text{Ca}^{2+}$  結合に協同性があったか、それともまったく無かったかであるからである。協同性がある方が収縮を完了するのに短時間で済む事もある。張力が半分のところでは、勾配が 1 よりもやや小さい。これは、 $K_m$  の値が異なるスパズモネーム収縮要素が少なくとも 2 種類あることを暗示している。このデータを酸素吸着能が異なる 2 種類ヘモグロビン混合液のアロステリック転移に相当する式を使って解析すると、高結合部位の収縮要素と低結合部位の収縮要素の 2 種類ある事が分かる (図 9)。ちなみに、Hill の式は、 $y=1/2$  近くのみで適用できる近似式なので使えない。どちらの収縮要素も  $\text{Ca}^{2+}$  結合の共同性は、約 2 となった (解析法も含めて未発表)。ツリガネムシ類一般に云えることであるが、収縮の主役タンパク質は、スパズミン蛋白質そのものと考えて、今のところ矛盾は発生していない。しかし、大変形は、別のタンパク質がその役割りを担っている筈である。

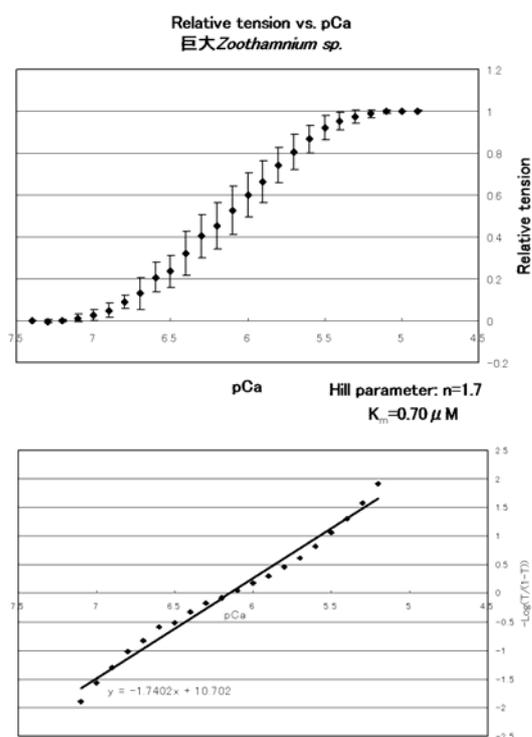


図9. 分離した巨大スパズモネームの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 vs. 等尺性発生張力の関係の Hill の式によるプロット。その勾配が  $\text{Ca}^{2+}$  吸着の協同性を示す。多数の分離巨大ズーサムニウム平均をとってある。勾配が 1 のときには、協同性がないことを顕す。

### 3. $\text{Ca}^{2+}$ 結合蛋白質としてのスパズミン

Amos 等は、*Z. geniculatum* strain Hilleroed から  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質を抽出した。分子量は約 20 kDa であった。Amos は、このタンパク質をスパズミンと名付けた。破傷風に罹ったときのように、痙攣的な早い収縮を繰り返すからである。ちなみに、破傷風毒素も spasmin または spasmotoxin という。だから、我々は、スパスティン (spastin) と名付け変えを試みたが定着しなかった (Yamada and Asai, 1982)。我々の *V. convarallia* による研究では、分子量 18-23 kDa の  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質がアイソフォームとして 3-4 種類あることが分かった (Yamada and Asai, 1982)。似た分子量の  $\text{Ca}^{2+}$  非結合型の蛋白質も存在するかもしれない。これらの蛋白質は、6-8 M の尿素溶液中でしか溶けない。Amos 等が抽出した *Z. geniculatum* strain Hilleroed のスパズミン

は、A 型と B 型の 2 種類ではほぼ間違いない。後で述べる似た巨大型の *Z. arbuscula* strain Kawagoe の場合も 2 種類である (Itabashi et al. 2003)。いずれの種からのスパズミンもシステイン残基やトリプトファン残基を持たない。その点、通常のカルモデュリンと同じである。Hoffmann-Berling が、最初に見付けたことであるが、グリセリン処理ツリガネムシのストークの収縮性は、システイン残基化学修飾剤で処理しても、収縮性は、損なわれない。Amos 等も我々もそれを確かめていた。*Zoothamnium* sp. や *Vorticella* sp. のみを用いていたからである。*Carchesium* sp. のコロニーは、古くなると、自然に収縮性を喪失してしまうので、研究試料としては、使いにくい。また、培養も難しかった。

スパズミンの cDNA は、最初に *V. convarallia* で Bhuse Jr. らが決定し (Maciejewski et al., 1999)、かなり遅くなって、我々は、*Z. arbuscula* strain Kawagoe で決定した (Itabashi et al., 2003)。まわりの構造を含むゲノム gDNA は *C. polypinum* で 2 種決定している (Sugihara et al., 1999)。イントロンが 22 base pairs と当時の最小であったことは、注目し値する。植物起源の非カルモデュリン  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質の cDNA は、*Chlamydomonas reinhardtii* で、Huang 等が、最初に決定し、カルトラクチンと名付けた (Huang et al., 1988)。続いて、Ogawa and Shimizu (1993) がカルトラクチンの cDNA をマウスの精子で決定している。ちなみに、*C. reinhardtii* や *Tetraselmis striata* (Pleurostrophyceae) などの緑藻類の鞭毛の基部にも  $\text{Ca}^{2+}$  で収縮する微細繊維器官 (rizoplast) があることを Salisbury らは見付けていた (Salisbury and Floyd, 1978)。ところで、浮遊形態のツリガネムシの繊毛基部の微細繊維構造が、固着状態になるとスパズモネームに分化することを、中島らは電子顕微鏡的に観察している (Nakajima et al., 1986)。真核細胞のセントロゾームでも非カルモデュリン  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質を見付けた Salisbury は、それをセントリン (centrin) と名付けた (Salisbury, 1989)。しかし、cDNA の決定は、Huang からかなり遅れて決定された (Errabolu et al., 1994)。けれども、最近では、スパズミンも含めてセントリンという名前が区別なく定着しつつある。ヒトやイーストなど沢山の非カルモデュリン  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質の cDNA の決定をしたからであろう。

### 4. $\text{Ca}^{2+}$ 結合・収縮性の 3 nm 直径フィラメント

ツリガネムシのスパズモネームは、約 3 nm 直径フィラメントの束から出来ている。試料をタングステン酸かうラニール酢酸で負染色し、電子顕微鏡によって初めて観察される。図 10 に示してある。試料切片では、見付けにくい。F-アクチンフィラメントの半分乃

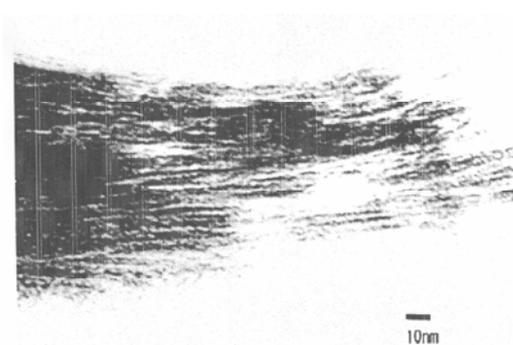


図 10. ズーサムニウムからの細いフィラメントの束の酢酸ウラニール負染色による電子顕微鏡写真。フィラメントの直径は約 2-3 ナノメートルである。束をほぐすのは難しい。

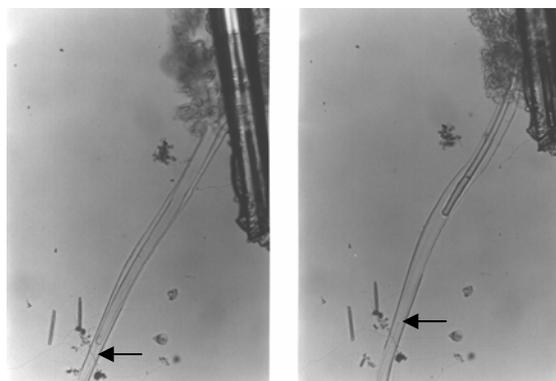


図 11. グリセリン処理された川越産のズーサムニウムの巨大スパズモネームが、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下では著しく脱水していることを示す。幹ストークの両端が固定してあるので、ストークは折れ曲がっていない。

至三分の一の直径しかないからである。電子顕微鏡用の試料切片で観察されている例は、真核単細胞生物のみである。ツリガネムシ・スパズモネームの 3 nm 直径フィラメントの場合、負染色前に  $\text{Ca}^{2+}$  添加した試料と逆に EGTA を添加した試料を電子顕微鏡観察と比較したが、構造変化や顕著な長さ変化は、見られなかった。一工夫が必要であろう。

##### 5. $\text{Ca}^{2+}$ 励起による巨大スパズモネームの張力発生

張力測定による研究には、巨大スパズモネームを使用するのが、便利であるが、巨大枝分かれツリガネムシは、川越市で見付けてしまったので、もうデンマークまで出かける必要はなくなってしまった。そして、研究も進んだ。しかし、最近では、地球温暖化のため採集できない年も増えている。図 10 に示したように、スパズモネームは、3 nm 直径フィラメントの束からなっている。したがって、縦に収縮するのみである。そこで、そのストークは、折れ曲がる。一方、*Vorticella* sp. や *Carchesium* sp. のストークが左ネジ状のコイルになるのは、ストーク内で、スパズモネーム繊維が右ネジ状に存在しているからである。*Vorticella* sp. や *Carchesium* sp. のスパズモネームの複屈折は、収縮すると著しく減少する (Schmitt, 1940) が、巨大スパズモネームの場合には、複屈折は期待したほど変化しない。しかし、収縮によってその体積が約 1/4 に減少することが発見された (Moriyama et al., 1999)。大変な大脱水である (図 11)。スパズモネーム束の直径も収縮によって小さくなるので、複屈折はあまり変化しないと解釈される。川越産のスパズモネームは、デンマーク産のものに比べてその表面が滑らかである

で、体積が評価し易いという特徴をもっていた。巨大スパズモネームの場合、水はゴムの場合と似たように可塑剤として働いている、と考えられる。何れにしても、大脱水とは、驚異的な生理現象である。他の生物器官を通じてこのような発見のその後の研究は、まだない。

種々の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度においてスパズモネームの長さに対する張力を測定すると、図 12 のようになる。張力なしでも、巨大分離スパズモネームは、 $\text{Ca}^{2+}$  を加えると約 70% に収縮する。図 12 の場合、その長さは 600  $\mu\text{m}$  から 420  $\mu\text{m}$  へ縮小する。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  がいない状態でも全てのツリガネムシ類のスパズモネーム自然長は、ストーク外皮を剥がす事によって少し収縮すると考えられる。言い換えれば、自然の状態のスパズモネームは、ストーク外皮によって引き伸ばされた状態になっている。このほうが  $\text{Ca}^{2+}$  吸着によって素早く収縮するようになる、と考えられる。ちょうど引き伸ばされたバネの止め金が外されたようなものである。ファイマンは、その力学教科書の中で、重力で駆動される柱時計のような仕掛け (ラチェット・メカニズムという) が生物の中にある管である、と言っている (Feynman et al., 1963)。スパズモネームを構成する 3 nm 直径フィラメントは、バイオラチェット・メカニズムそのもの、と言って良い。バネ弾性的な構造と、基質吸着または基質分解に伴う止め金が外し、またはそのエネルギー伝播である。

実際に、図 12 をゴム弾性論 (Treloar, 1975) によって解析すると、 $\text{Ca}^{2+}$  が十分のときも、 $\text{Ca}^{2+}$  がいないときも、ゴム弾性的要素の分子量は、約 50 kDa となった。この値は、スパズミンの分子量の 2 倍半であることに注目したい。気体については、ボイル/シャルルの法

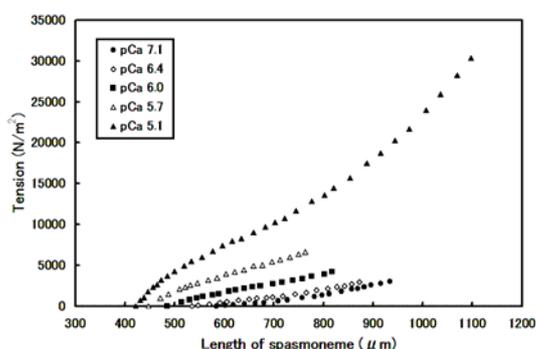


図 12. 種々の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度における巨大スバズモネームの長さに対する発生張力の関係図。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の有無による曲線の面積から為された仕事が計算できる。

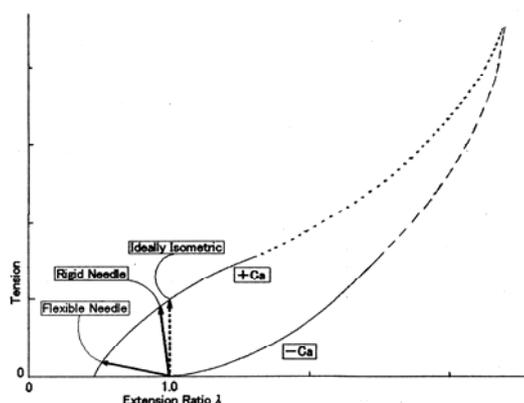


図 14. 巨大ゾーサムニウムの長さ vs. 張力の関係を極限まで行ったときの想像図。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度をゼロから充分量まで増加させたときの等尺性収縮と等長性収縮の理想図も矢印で載せてある。

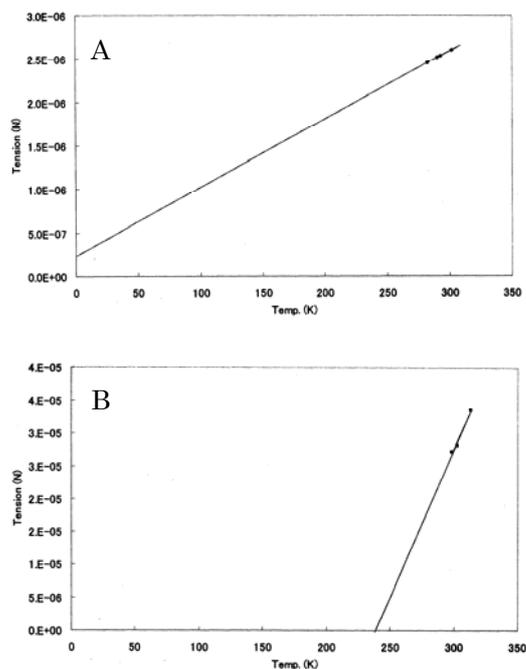


図 13. 等尺性張力の温度依存性の絶対温度表示図。熱変性のため測定は 35 度 C までのみ成された。A は  $\text{Ca}^{2+}$  不存在のときで、絶対温度がゼロのときに張力がほぼゼロであることを示す。ゴム弾性論やボイル・シャルルの法則に合致する。B は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が充分のときで、内部エネルギーの項に著しい温度依存性があることを示す。

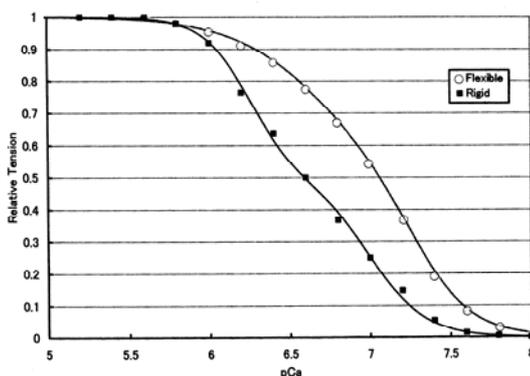


図 15. 実際に硬くて太目のガラス棒を用いたときの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 vs. 張力の曲線 (■) と細くて柔らかいガラス棒を用いたときの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 vs. 張力の曲線 (○)。

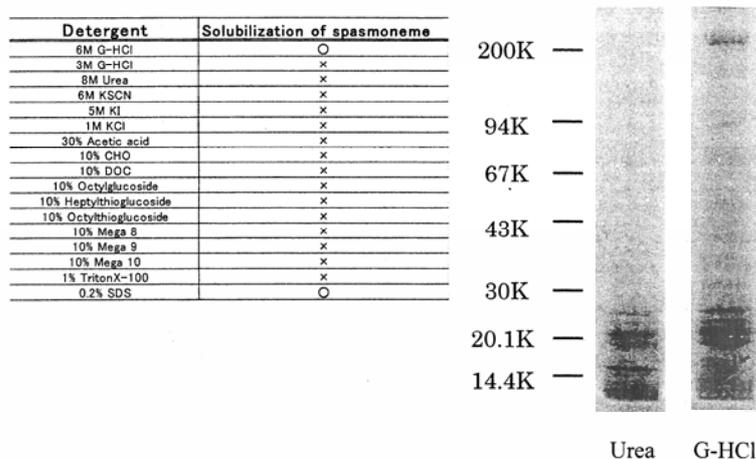


図 16. カルケシウムのストークから 200 kDa タンパク質を抽出するには、6 M グアニジン塩酸塩かまたは、0.2% の SDS が必要であることを示す。右の電気泳動図は、20 kDa 近くのスパズミンなどは、8 M 尿素で抽出されるが、200 kDa タンパク質は、6 M グアニジン塩酸塩で抽出されることをしめす。200 kDa タンパク質は、スパズモネームを失活させる化学修飾剤 DHNBS の特異的抗体と反応する。これは、200 kDa タンパク質がスパズモネームの  $\text{Ca}^{2+}$  駆動性収縮に必須であることを示す。

則という関係式がある。ゴム弾性論といっても熱力学的には、この気体のガス圧に対する体積と似たような関係の式である。圧力または張力は、絶対温度に比例する (図 13A)。 $\text{Ca}^{2+}$  が十分のとき、分離スパズモネームの張力は、ほぼ絶対温度に比例した。理想的なゴムに近いことが示されたと言える。 $\text{Ca}^{2+}$  がないときには、温度勾配が大きく、絶対ゼロ度にまで外挿すると、大きな負の張力となる (図 13B)。 $\text{Ca}^{2+}$  がないとき 3 nm 直径フィラメントの弾性的要素は、張力または、温度変化によって、融解度と結晶化度を変化させる、と解釈できる。高名な高分子化学者のフローリーは、融解/結晶化を筋肉収縮のモデルに提案したことがある。勿論、1930 年代から 1960 年代近くまで、多くの高分子物理学者や物理化学者は、「筋肉とは電荷を持ったゴムのようなものである」という夢を抱いていた。その夢がツリガネムシの 3 nm 直径フィラメントで実現された、と言える。

図 12 および図 14 は、まだ多くのことをもの語っている。長さを体積に、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度を温度に置き換えて考えれば、熱力学の建設の切っ掛けとなったカルノーサイクルと似た関係図である。長さ vs. 力関係の面積から仕事計算されるが、図 14 の伸長比  $\lambda$  が 1 までの面積からエネルギーを計算すると、 $\text{Ca}^{2+}$  結合のエネルギーの約 7% が仕事に費やされたことになるが、少なすぎる。張力を  $\text{Ca}^{2+}$  有り無しで長さが一致するところ

まで延長するとイモのような形の図 14 になる。その総面積を考えれば、エネルギーの仕事への変換効率は、70% 近くになるかもしれない。また、高い張力では、 $\text{Ca}^{2+}$  結合能 ( $K_m$  の逆数) は小さくなる筈である。これも等圧および等張での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度対発生張力の実験データ解析から証明されている。すなわち、柔らかくて細いガラス針で測定した張力対  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の関係式と、硬いガラス針で測定した張力対  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の関係式とを比較すると、後者の方が  $K_m$  値がおおきくなった。すなわち、張力が高いところで  $\text{Ca}^{2+}$  結合能が低くなった (図 15)。スパズミンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位である EF hand 部位近傍の構造が張力によって変化すること、言い換えれば、スパズミンは張力センサーであることを暗示している (Asai et al., 2001)。

3 nm 直径フィラメントに加えられた張力が  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質であるスパズミンに伝えられ、その  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を減少させたのであるから、スパズミン自身も強い弾性要素をもっている筈である。ただし、大きな変形の役割を担っているのは、スパズミンではなくて、その相補的な役割をもつ 50 kDa タンパク質だと考えられる。カルモデュリンと似た構造と機能を持っているスパズミンが大変形する筈がない。スパズミンとその受容 50 kDa タンパク質の複合体がファイマンの言うバイオリャレット・メカニズムである事が、ますます確からしくなった。ところで、3 nm 直径フィラ

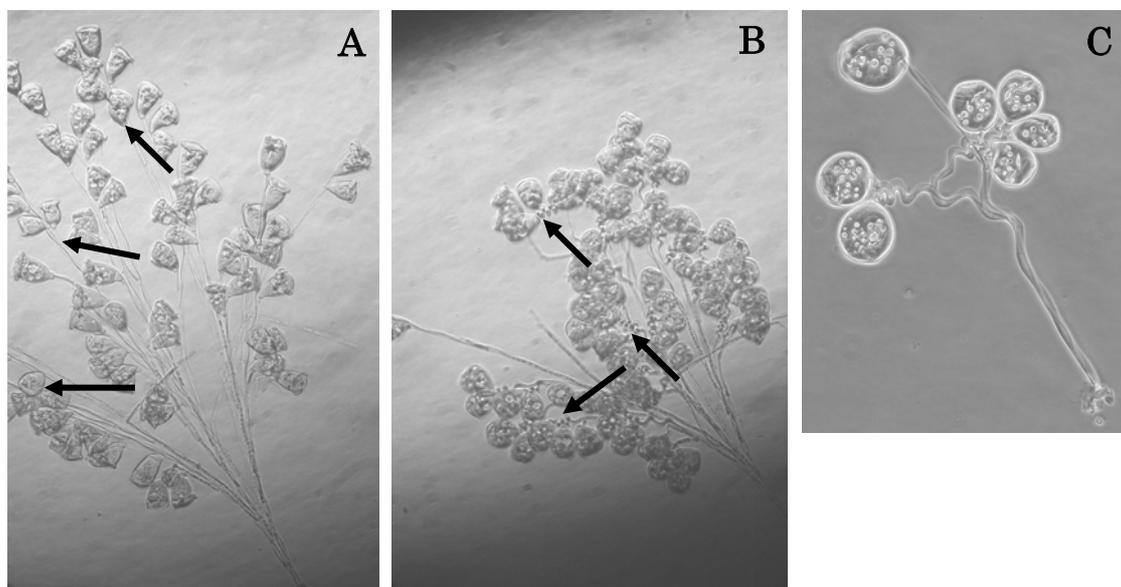


図 17. 枝分かれが多くて、成熟したカルケシウムと体細胞が数個のみの若いカルケシウムの写真。中央の B 図のように、収縮は体細胞に近い若いゾーサムニウムでのみ起きることを示す。右の C 図は、全てのゾーサムニウムが収縮後で再伸長する途中の瞬間の写真図。

メントを引っ張れば  $\text{Ca}^{2+}$  が分泌されるので、機械受容器や圧力受容器にもなり得る (Asai et al., 2001)。

#### 6. スパズモネームの化学修飾とスパズミン受容タンパク

スパズミンが、 $\text{Ca}^{2+}$  励起/駆動による収縮性 3 nm 直径フィラメントの主要タンパク質である事は確かであるが、それだけが主役とは考えられない間接的な証拠は、沢山ある。まずフィラメントを 6 倍も伸長させると変性する。0.3-0.4 M の KCl など容易に変性する (Asai and Ochiai, 1987; Ochiai et al., 1984)。35 度 C 以上の高温にさらしても変性する (Asai et al., 1998)、pH 9 以上ではストークは収縮しない (Ochiai et al., 1981) などである。これらの変性は、カルモデュリンと似たスパズミンだけでは、絶対に説明できない。もっと変性しやすい高分子量のタンパク質も主役であるに違いない。この相補的役割をするタンパク質の探索に多くの時間と労力が費やされた。スパズミンでも 0.6-0.8 M 尿素でしか溶けない。他のタンパク質は、さらに 0.6 M のグアニジン塩酸でしか溶けない (図 16)。高分子量の可能性もあるし、例え溶けたとしても、溶剤を除いたときに活性が元に戻るという保証もない。

ある生理学的機能・生化学的機能に直接的または間

接的に関連する蛋白質を探索するには、アミノ酸残基の化学修飾試薬を使用するのが良い。通常、化学修飾試薬は、酵素などの活性部位に係わるアミノ酸残基の研究に使用される (Asai and Morales, 1965)。この方法をスパズミンと相補的な役割を果たすタンパク質の有無の検索に使用された (Fang et al., 2002)。そこで、このもう 1 つの収縮に必須タンパク質の存在の決定的証拠は、次の実験で示された。酵素などタンパク質の活性部位に関与するアミノ酸残基を調べるには、特定の残基に特異的に反応する化学修飾試薬をまず用いるのが便利である。もっとも特異的に良く反応する試薬は、システイン残基修飾試薬である。他の化学修飾試薬は、システイン残基にも反応することが多い。幸いにして、スパズモネームは、活性システイン残基を持たない。そこで、2-Hydroxy-5-nitrobenzyl bromide (HNBB) の水溶性類似のトリプトファン残基修飾試薬として dimethyl (2-hydroxy-5-nitrobenzyl) sulfonium bromide (DHNBS) が用いられた。DHNBS は、*Vorticella* sp. のストーク内のトリプトファン残基を化学修飾して、収縮性を喪失させる事が分かった。幸いにして、スパズミンはカルモデュリンと同じように、通常トリプトファン残基を持たない。そこで、このストークの収縮性喪失は、非スパズミンであって活性トリプトファン残基を持つ新規のタンパク質であ

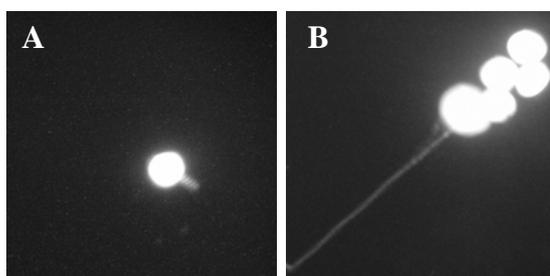


図 18. 若いカルケシウムの DACM による化学修飾したときの蛍光顕微鏡写真。A は、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下。B は、 $\text{Ca}^{2+}$  不存在下。

る可能性ができた (Kono et al., 1997)。種によるが、ツリガネムシのストークには、非スパズミンで分子量が 40 - 200 kDa のタンパク質が 40% 近く存在する。*C. polyipinum* のストークの場合には、約 200 kDa に比較的多量のタンパク質があることが、SDS-PAGE で分かった (図 16)。トリプトファン残基修飾試薬の反応化合物が 200 kDa のタンパク質中のみを検出されれば、それが新規の非スパズミン収縮性タンパク質ということになる。タンパク質を抽出する実験には、グリセリン処理した大量の *C. polyipinum* コロニーが用いられた。タンパク質の抽出の前に DHNBS で化学修飾した。幸いに、反応した DHNBS の特異的抗体を入手する事が出来、200 kDa タンパク質がスパズミンと相補的な役割をする新規のタンパク質である、と結論付けた (Kono et al., 1999)。

他の全く予期しない方法によっても、上の結論を裏付ける次のような研究結果を得た。重要なことであるが、*Vorticella* sp. ではなくて *C. polyipinum* の若いコロニーを用いて、化学修飾実験を試みた。試しに、蛍光性のシステイン残基修飾剤としての和光純薬製 N-7-dimethyl-amino-4methyl-coumarinyl-maleimide (DACM) を用いた。200 kDa のタンパク質が蛍光性を持てば、何らの役に立つと考えた。何と、*Vorticella* sp. や *Zoothamnium* sp. と異なって、*C. polyipinum* のストークは、システイン残基修飾剤によってその収縮性を喪失したのである (Fang et al., 2005)。我々も Amos らもそうであったが、1958 年の Hoffmann-Berling 以来の先入観を打ち破れなかったのである。*C. polyipinum* の場合には、数個の枝のみを持つコロニーしかグリセリン処理モデルの収縮実験に使えないし、大量培養も難しいからである。*C. polyipinum* の古いスパズモネームは、自然のままでも変性しやすいが (図 17)、それは、一般にシステイン残基は、自然のままでも酸化し易いからであることを気付くことにもなった。大量の *C.*

*polyipinum* コロニーからの抽出タンパクのうち 200 kDa タンパク質のみが蛍光ラベルされていることが分かった (図 18)。*C. polyipinum* においては、200 kDa タンパク質がスパズミンと相補的な役割をする新規のタンパク質である、と結論付けた (Fang et al., 2005)。

しかしながら、*Vorticella* sp. においては、200 kDa タンパク質が見付からなかった。代わりに、50 kDa タンパク質が、スパズミンと相補的な役割をする新規で重要なタンパク質である、傍証を最近得ている。

*Vorticella* sp. を用いた所、そのストークのヒスチジン残基がスパズモネームの収縮に重要なアミノ酸残基であることを示した。Diethyl-pyrocabonate (DEPC) はヒスチジン、リシン、チロシンといった幾つかのアミノ酸残基と反応するが、pH 6.0 で、特にヒスチジン残基の化学修飾性が高い。研究の結果、スパズモネームの DEPC 化学修飾試薬の添加は収縮性を阻害することが分かった。同時に DEPC によるスパズモネーム抽出タンパク質のアミノ酸残基修飾は、吸光度が 244 nm で、DEPC の濃度上昇に伴って増加することを示しているが、これは DEPC によって修飾されたヒスチジン溶液の特徴と一致する。Hydroxylamine 処理によって、DEPC 処理によるスパズモネーム収縮の損失は、一部回復した。次に、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下での DEPC による阻害が調べられた。その結果、2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下では、スパズモネームの収縮性が再現された。一方、DEPC 修飾スパズミンの Native-PAGE 結果は、 $\text{Ca}^{2+}$  前処理に関係なく、 $\text{Ca}^{2+}$  結合能力が変化しないことを示し、このことは必須のヒスチジン残基がスパズミンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位に存在しないことを示唆している。これらの結果から、スパズモネームの収縮における DEPC の影響はスパズミンに対する修飾ではなく、スパズミン受容タンパク質と考えられる他のタンパク質を修飾したと結論づけられた。さらに、ヒスチジン残基を含むタンパク質を同定するために、GST-spasmin を DEPC 存在下/非存在下の夫々で、スパズモネーム全抽出タンパク質を同定したところ、約 40 kDa と約 50 kDa のタンパク質が DEPC に修飾を受けていることが分かった。さらに、免疫沈降法、SDS-PAGE および West-western Blotting により、ボルチケラのスパズモネーム収縮性に必須でヒスチジン残基を含むタンパク質は、50 kDa タンパク質であると結論付けることが出来た (Fang et al., 2005)。そこで、*C. polyipinum* の 200 kDa タンパク質は、分子進化の上で、*Vorticella* sp. の 50 kDa タンパク質の 4 量体であった可能性が高い。それでは、*Zoothamnium* sp. の場合には如何か？ 200 kDa タンパク質も 50 kDa タンパク質もない。予備的な研究では、100 kDa の可能性が高いが、確かな事はまだ言えない現状である。

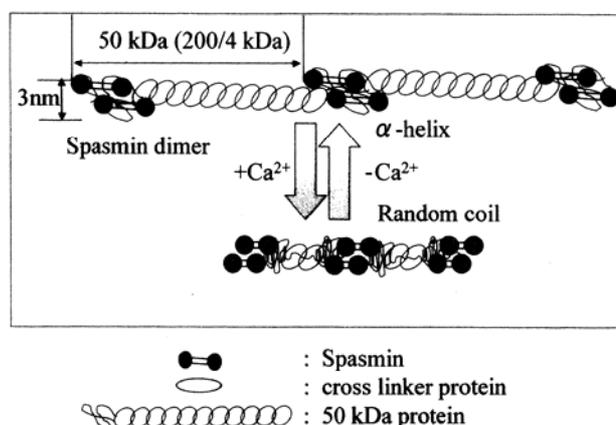


図 19. 3 ナノメートル直径フィラメント中のスパズミン (20 kDa) とその受容タンパク質 (50 kDa) の状態変化図。

## 7. スパズミン・相補的受容タンパク質複合体のラチェット収縮モデル

スパズミンは  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で、2 量体になり易く  $\text{Ca}^{2+}$  無しで、単量体にもどる性質がある。したがって、生体の 3 nm 直径フィラメント中でも 2 個のスパズミンが一对になって存在している可能性がある。実際、*V. convallaria* と *Z. arguskula* Strain Kawagoe の GST-spasmin の分離タンパク質は、夫々  $\text{Ca}^{2+}$  無しでは単量体であるが  $\text{Ca}^{2+}$  存在下では 2 量体を形成し易いことが分かっている (未発表の研究)。Wiech et al. (1996) は緑藻類とヒトのセントリンについて、似た報告をしている。ところで、巨大スパズモネームでは Km の異なる 2 種の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位 (即ち RF hand 構造) がある。またそのスパズミンには A と B の二種類ある。しかしその  $\text{Ca}^{2+}$  結合をする EF hand 構造は C 端のもののみで、他の 3 つの EF hand 構造は退化してしまっていると考えられる (Itabashi et al., 2003)。一方のスパズミンのみが収縮に機能している可能性もあるが、両方の可能性もある。実際は、どう成っているか分からないが、図 19 のような構造のスパズミン・相補的受容タンパク質複合体モデルが考えられた。スパズミンはカルモデュリンと同じように、ダンベル構造をしていて、その細い糸状の相補的受容タンパク質のどこかに対して巻きついている。糸状の相補的受容タンパク質は弾性要素そのものである。 $\text{Ca}^{2+}$  無しや、張力が無いときには、少なくとも部分的には、 $\alpha$ -ヘリックス構造をとっている。スパズミンに  $\text{Ca}^{2+}$  が結合すると、その構造と機能を少し変える。ヘモグロビンの酸素吸着に伴う R 状態から T 状態へのアロステリック転移を想

像してもよい。 $\text{Ca}^{2+}$  結合のエネルギーを利用して、弾性要素である相補的受容タンパク質の  $\alpha$ -ヘリックス構造がランダムコイル構造に転移する、と考える。ランダムコイル構造になれば、エントロピーが増加して収縮のエネルギーまたは力になる。図 20 に示されているように、巨大分離スパズモネームの赤外線顕微分光光度計で赤外線スペクトルを調べたところ、1546/cm と 1534/cm の波数にスペクトル変化があり、それは、 $\text{Ca}^{2+}$  添加によって、スパズモネーム蛋白質の二次構造が、 $\alpha$ -ヘリックス構造からランダムコイル構造に変化したことを示している。変化量は、不明である。 $\alpha$ -ヘリックス構造の変化は、スパズミンのみでも起きているかもしれない。実際、純度は不明であるが、スパズミン溶液で CD 変化を測定したことがある (Yamada-Horiuchi and Asai, 1985)。この構造変化は、転移的である。結晶が溶けて液体になったのと同様である。フローリーが筋肉において提案した結晶化・融解の収縮モデルと同じである。スパズミンへの  $\text{Ca}^{2+}$  結合が、弾性要素としての相補的受容タンパク質の構造転移をもたらしたのであるから、それはファイマンのいうパイオラチェット運動モデルそのものを提案していると信じる。ちなみに、ラチェットというのは、六角ネジのねじ回しや振り子式の柱時計の一方向的な運動のことである。筋肉の一方向的な滑り運動もラチェットのメカニズムで運動している筈である。低分子物質で起きる分子衝突にのみでは、特定の方法への運動は、決して起こらない。このことは電磁方程式を構築したマックスウエルが論じている。マックスウエルの魔 (デモン) ともいう。スパズモネームでは、スパズミンへの  $\text{Ca}^{2+}$  結合のエネルギーによって止め金

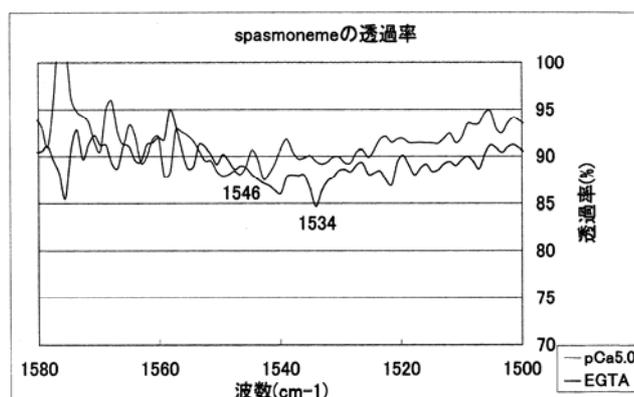


図 20. 巨大ズパズモネームの赤外顕微分光光度計によるスペクトル。厚み 50 ミクロンの水溶液中で測定。1534  $\text{cm}^{-1}$  に負のピークが見える曲線が  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で、ランダムコイル構造が多いことを示す (下の曲線)。それが  $\alpha$  ヘリックス構造になると 1546  $\text{cm}^{-1}$  に波数がシフトする。実際に、その曲線は、 $\text{Ca}^{2+}$  不存在下のものである (データは中島淳による卒業論文より引用)。

がはずされ、スパズミンの相補的受容タンパク質の部分的結晶構造の融解が起きると考えられる。ここで結晶構造の融解とは、タンパク質の  $\alpha$  ヘリックスペプチド構造がランダムコイル構造に転移したり、 $\beta$ 構造ペプチドのランダムコイル構造に転移したりすることを意味する。ランダムコイル構造は、ペプチドの両端の距離が小さいほうが安定であるから、収縮のための力 (エントロピー力) や収縮を引き起こす事が出来る。言い換えれば、タンパク質やゴムなどの高分子系では、その自由エネルギー (仕事をし得る熱力学的エネルギーのこと) は、エントロピー的エネルギーとポテンシャルエネルギーの二種のエネルギーをもっている。巨大分子とも言える固体物質の運動の基本はフック的な調和振動であり、高分子化合物ではゴムのな (したがって、エントロピー的な) ランダム運動だからである。蛋白質は、高分子化合物的な大変形の分子であると同時に、内部に疎水性基や水素結合で固まった固体であると言える。ペプチド構造の結晶化・融解の概念には、水素結合の生成と消失の概念が含まれる。一方、低分子物質からなるガスでは、分子運動のエネルギー (したがって、エントロピーによるエネルギー) のみであるし、結晶状態では、隣の分子との間の相互作用によるポテンシャルエネルギーをもっているだけである。ところで、中間状態の液体ではどうであろうか。この場合にも、自由エネルギーを仕事に変える端子をもっていないので、ラチェットの運動のモデルにはなり得ない。さらに、低分子物質の運動エネルギー (または運動に代わりうるエネルギー) は 1 モル当たり  $3RT/2$  であるのに対して、ATP 分解酵素反応をふくめて、基質結合反応のエネルギーは、上記の

エネルギーの 8 倍、すなわち、 $12RT$  の大きさである。したがって、タンパク質機能の発現時に、そのタンパク質内に分配されうる。また、自由エネルギーを仕事に変えるためには、その運動系 (高分子系) が、少なくとも三つの状態を持っていることである。横軸に状態 (または長さ) をとり、縦軸に外的張力 (または伝達しうる張力) をとった場合に、その三状態は、一直線上にあってはならない。同じ直線上を往復するだけで、仕事にはならない。仕事の大きさは、三状態のなす面積であるからである。ツリガネムシのスパズモネームの場合には、1)  $\text{Ca}^{2+}$  が結合していないスパズミンの状態、2) 張力・長さ依存であるが  $\text{Ca}^{2+}$  が結合しているスパズミンの状態、3) 張力なしの結晶状態のスパズミンの受容タンパク質、4) 張力に大きく依存し、結晶化・融解化の可能なスパズミンの受容タンパク質の状態、の 4 状態が考えられる。重力による柱時計の仕掛けやネジ回しなどのラチェットの運動が、生物では、「ツリガネムシの  $\text{Ca}^{2+}$  駆動収縮性 3 nm 直径バイオフィラメントで実現した」、と言える。ところで、蒸気エンジンすなわちカルノーサイクルの場合には、1) 低温・圧縮のガス状態、2) 加温・圧縮のガス状態、3) 爆発力をともなう膨張・高温のガス状態、4) 膨張・低温のガス状態、がある。言い換えれば、ツリガネムシのスパズモネームは、低温・高温の代わりに、 $\text{Ca}^{2+}$  非結合・ $\text{Ca}^{2+}$  結合を繰り返すカルノーサイクル・エンジンとも言える。

より一般的に言及すれば、基質の結合と解離によって 2 状態のアロステリック転移を行うすべてのタンパク質はモータータンパク質である。勿論、スパズミンやセントリンも含めてすべてのカルモデュリン

ファミリータンパク質もヘモグロビンもそうである。実際に、ヘモグロビンは、酸素結合によってサブユニット間の距離を 7 Å も変化することが知られている。問題は考えているタンパク質内の変形または発生張力を伝える手段（他の受容タンパク質や器官が必要）をもっているかどうかであるにすぎない。ヘモグロビンなどは水溶性であるので、勿論、変形は力として伝わらなくて、2変形の間を往復運動をするだけである。その意味で、生物運動を行う真のモータータンパク質は、その受容タンパク質を持っている筈である。

#### 8. 他分野への波及効果、特に真核細胞分裂の機構解明へ向けて

上のパイオラチュエット運動モデルは、他のモーター蛋白質としてのミオシン、ダイニン、キネシンなどへも基本的には適用可能である。Fアクチン上または微小管上で、2つの結合点を持ったモーター蛋白質としてのミオシンまたは、ダイニン・キネシンが収縮・伸長を繰り返すと同時に2つの結合点の離脱・再結合を繰り返すと考えられる。この場合の収縮・伸長もスバズモネームの場合と同じように、モーター蛋白質内のエントロピー的な変形と結晶化または融解の状態を繰り返す。エントロピー的な変形は、当然の事ながら張力・滑り速度依存的である。現在、分子的なメカニズムとしての筋肉収縮の研究が行き詰まっているのは、エントロピー的な変形の由来と、結晶化または融解の実体が不明だからである。研究の難しさは、ATP結合または、ATP分解・その反応物の解離中に、一連の上記の状態変化が連続技として起きてしまうからである。ツリガネムシのスバズモネームの場合には、一連の状態変化を人為的に止めて観測・測定出来るから運動性タンパク質としては、研究がやさしかった、と言える。すなわち、固体物質の運動の基本はフック的な調和振動であり、高分子化合物ではゴムのな（したがって、エントロピー的な）ランダム運動だからである。蛋白質は、内部に疎水性基が集まった固体であると同じに、可変的な性質を持つ高分子化合物であるからである。すべてのモーター蛋白質は、これらの性質を機能発現として進化した蛋白質と考えられる。この2つの機能が、単一の蛋白質内で発揮されるのか、複合蛋白質内で起きるのかは、case by caseであろう。

Corona fiber とか Fibrous corona と呼ばれる不定形のもやもやとした組織が中心体、核小体、キネトコアの周りであることを、2000年の米国生物物理学会に出席のおりに知った。文献で調べたところ、それらは、Fアクチンを溶かす薬剤や微小管を溶かす薬剤でも消失しないし、1MのKI塩溶液でも溶けない(Wordeman

et al., 1991; Rieder, 1982; Schibler and Pickett-Heaps, 1980; Pickett-Heaps and Carpenter, 1993; Paintrand et al., 1992; Schnackenberg et al., 1998)。電子顕微鏡でも、細いためか組織切片では構造が繊維状のものかどうかは良く分からない。この Corona fiber とか Fibrous corona とか呼ばれる不定形フィラメントが真核細胞分裂のミッシングリンクである可能性があるし、ツリガネムシの 3 nm 直径フィラメントを想像させる。実際に、牛の小脳から塩や蛋白質変性剤で難溶解性のタンパク質を抽出し、ボルチケラのスバズミン抗体に交差する数十 kDa のタンパク質を学生実験で見つけたことがあった。しかし、抗体の欠乏でその後の研究は中止することとなった。そこで、新しい研究計画として、同調培養した HeLa 細胞を研究材料とし、*Zoothamnium* の特異性の高い抗スバズミン 1 抗体 (Itabashi et al., 2003) を指標として、スバズミン類似タンパク質の探索が、板橋岳志を中心として再開することになった。何と、細胞質・細胞核の両方に抗スバズミン抗体が明瞭に標識された。さらに、抗スバズミン抗体陽性蛋白質の分子量は、ウエスタンブロッティング法で解析したところ、スバズミンとは大きく異なる高分子量の蛋白質が複数 (68/71 kDa, 55 kDa, 55/70 kDa) 発見された (Itabashi et al., 2004)。高分子量が大きく異なっても、変に思う事はない。たとえば、筋肉のコネクチン/タイチンでは、巨大分子量であるが、既存の蛋白質類のモジュール構造になっているからである。

#### 9. 残された研究課題

身近において、まだまだ研究すべき課題は多い。残ってしまった研究課題の第一は、当然に、弾性要素としてのスバズミン相補受容タンパク質の cDNA である。分子量が異なるので、*Carchesium* と *Vorticella* と *Zoothamnium* の3種でそれぞれ行わなければならない。標的となる蛋白質断片のペプチドを分離精製すれば、すぐに cDNA 増幅のマーカーになる。標的と技術的問題は既に解決しているので、残された課題は、「興味を持つ人材とささやかな資金」のみである。cDNA が決まれば、その蛋白質の物性研究が重要となってくる。

スバズミンやセントリンは、真核生物細胞では、アイソフォームとして、多数存在するので、それらの役割分担を決めなければならない。真核生物界全体にとって、極めて重要な課題である。スバズミンを収縮に直接関係する  $Ca^{2+}$  結合タンパク質の名前であると定義するば、セントリンは、その生理学的・生化学的役割分担は殆ど分かっていなくて、予想の闇を出ない (Salisbury, 2002)。それは、セントリンの対象蛋白質

とその役割が分からないからである。我々が発見した HeLa 細胞中の高分子量のスパズミン様タンパク質やその受容蛋白質の構造は不明のままである。それが3ナノメートル直径のフィラメントを構成しているという保証もまったくない。実際、Suzaki, T. らは多くの真核細胞の核小体に  $\text{Ca}^{2+}$  で収縮する繊維を発見したが、その直径は、3ナノメートルよりも大きいということである (Arikawa et al., 2003)。唯一の例外は、ゾウリムシの  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに Takahashi, M. ら (Gonda et al., 2004) の発見したセントリンが関係しているというものである。

個々のスパズミンの EF hand 構造の  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を調べると同時に、それをスパズモネームの収縮性の Km 値と比較しなければならない。それが成されれば、ツリガネムシの  $\text{Ca}^{2+}$  駆動ラチェットモデルがより現実的なものになるのである。

ツリガネムシのスパズモネームの主構成蛋白質は、スパズミンと弾性要素蛋白質であるが、ゴムの架橋の役目をする蛋白質も有るはずである。筋肉の  $\beta$  アクチニンや  $\alpha$  アクチニンのような役割をする蛋白質である。弾性要素蛋白質よりも疎水性が高いと考えられる。

## おわりに

以上のように、1965-6年ころの私自身のツリガネムシ運動観察に始まって、 $\text{Ca}^{2+}$  駆動スパズモネーム収縮とその構成主要モータータンパク質の同定と運動機能について述べてきた。一種の大河小説のような記事になった、と思う。大河小説のような科学研究の進行というのは、学生時代の私の先輩の一人が発した言葉である。

ヘモグロビンを含めて構造変化を起こす酵素およびタンパク質は、すべてモーター蛋白質である、と言えなくも無い。その熱力学的エネルギーは、当然に、内部エネルギーとエントロピー項との和である。そのエネルギーが大変形または張力という生理学的機能に具現されるように設計されたのが、スパズミンとその相補的 50/200 kDa タンパク質である。その意味で、大水和を含めて研究材料としての巨大スパズモネームは、すべてのモーター蛋白質のモデルであり、概念である。モデルとか概念の提出は、物理学者の得意とするべき分野である (樋渡宏一先生の言)。

## 謝辞

ツリガネムシのストークの収縮性の研究を始めてから、すでに三十数年になる。研究の歴史を通じて、主な貢献をした当研究室の4博士は、落合 勉、森山泰

誉、板橋岳志、Fang, Jie の諸氏である。この場を借りて感謝の意を表す。また、研究材料の採集などに当たっては、柳生亮三、樋渡宏一、斎藤 実、盛下 勇の諸先生に大変お世話になったことを記憶している。改めて感謝の意を表します。

## 参考文献

- Amos, W. B. (1971) A reversible mechanochemical cycle in the contraction of *Vorticella*. *Nature*, 229: 127-128.
- Amos, W. B. (1972) Structure and coiling of the stalk in the peritrich ciliates *Vorticella* and *Carchesium*. *J. Cell Sci.*, 10: 95-122.
- Amos, W. B. (1975) Contraction and calcium binding in the Vorticellid ciliates. *Molecules and Cell Movement*. Inoue, S. and Stephens, S. editors. Raven Press, New York: 411-436.
- Arikawa, M., Momokawa, N., Saito, A., Omura, G., Khan, S. M., Suetomo, Y., Kakuta, S. and Suzaki, T. (2003)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent contractility of isolated and demembrated macronuclei in the hypotrichous ciliate *Euplotes aediculatus*. *Cell Calcium*, 33:113-117.
- Asai, H. and Morales, M. F. (1965) Stochastic aspects of enzyme inhibition. *Biochemistry*, 4: 830-838.
- Asai, H., Ochiai, T., Fukui, K., Watanabe, M. and Kano, F. (1978): Improved preparation and cooperative calcium contraction of glycerinated *Vorticella*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 83: 795-798.
- Asai, H. and Ochiai, T. (1987) Dependence on ionic strength of the calcium-induced contraction of glycerinated stalk of the peritrich ciliate, *Vorticella convallaria*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87A: 565-567.
- Asai, H., Ninomiya, T., Kono, R-I. and Moriyama, Y. (1998) Spasmin and a Putative Spasmin Binding Protein(s) Isolated from Solubilized Spasmoneme. *J. Euk. Microbiol.*, 45:33-39.
- Asai, H., Yamamoto, S. and Sekimoto, K. (2001) Stretch-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindings to Spasmins in  $\text{Ca}^{2+}$ -induced Contractile Spasmoneme Filaments. *Biophysical J.*, 80(1): 71a.
- Ayrton, W. (1903) On *Zoothamnium geniculatum*, A New Infusorian. *J. Queckett Club (Microscopical) Ser 2*, 8:407-410.
- Carasso, N. and Favard, P. (1966) Mise en evidence du calcium dans les myonemes pedonculaires de cilies peritriches. *J. Microscop. (Paris)*, 5:759-770.
- Curtis, H. (1967) *The Marvelous Animals; An Introduction to the Protozoa*, The American Museum of Natu-

- ral History, The Natural History Press.
- Errabolu, R., Sanders, M. A. and Salisbury, J. L. (1994) Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. *J. Cell Sci.*, 107: 9-16.
- Fang, J., Zhang, B., Chen, N. and Asai, H. (2002) Chemical Modification of Glycerinated Stalks Shows Tyrosine Residues Essential for Spasmoneme Contraction of *Vorticella* sp. *Zool. Science*, 19: 931-937.
- Fang, J., Zhang, B. and Asai, H. (2003) Chemical Modification of Contractile 3 nm Diameter Filaments in Vorticellidae Spasmoneme by Diethylpyrocarbonate and its Reversible Renaturation by Hydroxyl-amine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310(4): 1067-1072.
- Fang, J., Nakamura, J., Itabashi, T. and Asai, H. (2005) Contraction deficiency of *Carchesium polypinum* spasmoneme by SH-modifying reagent and its 200 kDa protein. *Jpn. J. Protozool.*, 38: 101-102.
- Favard, P. and Carasso, N. (1965) Mise en evidence d'un reticulum endo-plasmique dans le spasmoneme de cillites peritriches. *J. Microscop.(Paris)*, 4: 567-572.
- Feynman, R. F., Leighton, R. B. and Sands, M. (1963) The Feynman Lecture on Physics. (Vol. I): p46.1. Addison-Wesley.
- Forrest, H. E. (1879a) The natural history and development of the Vorticellidae. *Midland Naturalist*, 2: 85-89.
- Forrest, H. E. (1879b) The natural history and development of the Vorticellidae. *Midland Naturalist*, 2: 109-111.
- Furssenko, A. (1929) Lebenszyklus und Morphologie von *Zoothamnium arbuscula* (Ehrenberg). *Archiv für Protistenkunde*, 67: 376-500.
- Gonda, M., Yoshida, A., Oami, K. and Takahashi, M. (2004) Centrin is essential for the activity of the ciliary reversal-coupled voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323: 891-897.
- Hoffmann-Berling, H. (1958) Der Mechanismus eines neuen, von der Muskelkontraktion verschiedenen Kontraktionszyklus. *Biochim. Biophys. Acta*, 27: 247-255.
- Huang, B., Mengersen, A. and Lee, V. D. (1988) Molecular cloning of cDNA for caltractin, a basal body-associated  $Ca^{2+}$ -binding protein: homology in its protein sequence with calmodulin and the yeast CDC31 gene product. *J. Cell Biol.*, 107: 133-140.
- Itabashi, T., Mikami, K., Fang, J. and Asai, H. (2002) Phylogenetic relationships between *Vorticella convallaria* and other species inferred from small subunit rRNA genes sequences. *Zool. Sci.*, 19: 931-937.
- Itabashi, T., Mikami, K. and Asai, H. (2003) Characterization of spasmin 1 gene in *Zoothamnium arbuscula* strain Kawagoe (protozoa, ciliophora) and its relation to other spasmins and centrin. *Res. Microbiol.* 54: 361-367.
- Itabashi, T., Terasaki, T. and Asai, H. (2004) Novel nuclear and cytoplasmic proteins detected by anti-*Zoothamnium arbuscula* (Protozoa) spasmins 1 antibody in mammalian cells are dependent on the cell cycle. *J. Biochem. (Tokyo)* 36: 651-657.
- Kahl, A. (1935) Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria), eine bearbeitung der freilebenden und ectommensalen Infusorien der Erde, unter Ausschluss der marinen Tintinnidae. 4. Peritricha und Chonotricha. In: G. Grimpe and E. Wagler Eds., *Die Tierwelt Deutschlands*, Tiel 30: 651-864.
- Kono, R-I., Ochiai, T. and Asai, H. (1997) Chemical modification of amino acid residues in glycerinated *Vorticella* stalk and  $Ca^{2+}$ -induced contractility. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 36: 305-312.
- Kono, R-I., Yufune, Y. and Asai, H. (1999) A novel 200 kDa protein in spasmoneme is essential for spasmoneme contraction. Abstract of 3rd European Congress of Protozoology and 9th European conference on Ciliate Biology, July, Denmark Helsingør.
- Maciejewski, E. J., Vacchiano, S.M., Mccutcheon, H. E. and Buhse, H. E. Jr. (1999): Cloning and expression of a cDNA encoding *Vorticella convallaria* spasmin; An EF-hand calcium-binding protein. *J. Euk. Microbiol.*, 46: 165-173.
- Miao, W., Yu, Y.-H. and Shen, Y.-F. (2001) Phylogenetic relationships of the subclass Peritrichia (Oligohymenophrea, Ciliophora) with emphasis on the genus *Epistylis*, inferred from small subunit rRNA genes sequences. *J. Euk. Microbiol.*, 48: 583-587.
- Moriyama, Y., Hiyama, S. and Asai, H. (1998) High-Speed Video Cinematographic Demonstration of Stalk and Zooid Contraction of *Vorticella convallaria*. *Biophys. J.*, 74: 487-491.
- Moriyama, Y., Yasuda, K., Ishiwata, S., and Asai, H. (1996):  $Ca^{2+}$ -induced tension development in the stalks of glycerinated *Vorticella convallaria*. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 34: 271-278.
- Moriyama, Y., Okamoto, H. and Asai, H. (1999) Rubber-Like Elasticity and Volume Changes in the Isolated Spasmoneme of Giant *Zoothamnium* sp. under  $Ca^{2+}$ -Induced Contraction. *Biophys. J.*, 76: 993-1000.
- Mueller, M. (1980a) Das Strauch-Glockentier *Zootham-*

- nium*; Beobachtungen an einer Protozoenkolonie. *Microkosmos*, 69: 222-225.
- Mueller, M. (1980b) Das Strauch-Glockentier *Zoothamnium*; Beobachtungen an einer Protozoenkolonie II. *Microkosmos*, 69: 334-338.
- Nakajima, Y., Hashimoto, K. and Asai, H. (1986) Developmental origin of ciliary root and spasmoneme in protista. *Cytobios*, 46: 106-114.
- Ochiai, T. and Asai, H. (1981) Effect of divalent cations on the loss in contractility of the glycerinated stalks of *Vorticella* sp. in high KCl solutions. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70A: 479-484.
- Ochiai, T., Hara, R. and Asai, H. (1983) Contraction of the spasmoneme and coiling of the sheath in the glycerinated stalk of *Vorticella*. *Cytobios*, 36: 95-105.
- Ochiai, T., Asai, H. and Ishii, S. (1984) Effects of pH and  $Mg^{2+}$  on the  $Ca^{2+}$ -threshold level for contraction of the glycerinated stalks of *Vorticella*. *Microbios Letters*, 27: 133-140.
- Ogawa, K. and Shimizu, T. (1993) cDNA sequence for mouse caltractin. *Biochem. Biophys. Acta*, 1216: 126-128.
- Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H. and Bornens, M. (1992) Centrosome Organization and Centriole Architecture; Their Sensitivity to Divalent Cations. *J. Struct. Biol.*, 108: 107-128.
- Pickett-Heaps, J. D. and Carpenter, J. (1993) An extended corna attached to metaphase kinetochores of the green alga *Oedogonium*. *Europ. J. Cell Biol.*, 60: 300-307.
- Rieder, C. L. (1982) The formation, Structure, and Composition of the Mammalian Kinetochores and Kinetochores Fiber. *Int. Review Cytology*, 79: 1-58.
- Salisbury, J. L. and Floyd, G. L. (1978) Calcium-induced contraction of the rhizoplast of a quadriflagellate green alga. *Science*, 202: 975-977.
- Salisbury, J. L. (1989) Centrin and the algal flagellar apparatus. *J. Phycol.*, 25: 201-206.
- Salisbury, J. L. (2002) Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.*, 12: 1287-1292.
- Schibler, M. J. and Pickett-Heaps, J. D. (1980) Mitosis in *Oedogonium*: spindle microfilaments and the origin of the kinetochores fiber. *Europ. J. Cell Biol.*, 22: 687-698.
- Schmidt, W. J. (1940) Die Doppelbrechung des Stieles von *Carchesium*, insbesondere die optische-negative Schwankung seines Myonemes bei der Kontraktion. *Protoplasma*, 35: 1-14.
- Schnackenberg, B. J., Khodjakov, A., Reider, C. L. and Palazzo, R. E. (1998) The assembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9295-9300.
- Shiono, H. and Naitoh, Y. (1997) Cellular contraction proceeds membrane depolarization in *Vorticella convallaria*. *J. Exp. Biol.*, 200 (pt 16): 2249-2261.
- Sugi, H. (1960) Propagation of contraction in the stalk muscle of *Carchesium*. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo*, IV.8: 603-615.
- Sugiura, K., Shibahara, T., Takagi, H., Ishiura, M. and Asai, H. (1999) Genomic DNA sequences of 18 kDa spasmin and its isoform from *Carchesium polypinum*. *Jpn. J. Protozool.*, 32: pp60.
- Townes, M. M. and Brown, D. E. S. (1965) The involvement of pH, adenosine triphosphate, calcium and magnesium in the contraction of the glycerinated stalks of *Vorticella*. *J. Cell Comp. Physiol.*, 65: 261-270.
- Treloar, L. R. G. (1975) The physics of rubber elasticity, 3rd Ed., Clarendon Press, Oxford.
- Yamada, K. and Asai, H. (1982) Extraction and some properties of the proteins, spastin B, from the spasmoneme of *Carchesium polypinum*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 91: 1187-119.
- Yamada-Horiuchi, K. and Asai, H. (1985) Circular Dichroism studies of Ca-binding proteins from the spasmoneme of *Carchesium polypinum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 927-931.
- Yokoyama, Y. and Asai, H. (1987) Contractility of the spasmoneme in glycerinated *Vorticella* stalk induced by various divalent metal and lanthanide ions. *Cell Motil. Cytoskel.*, 7: 39-45.
- Weis-Fogh, T. and Amos, W. B. (1972) Evidence for a New Mechanism of Cell Motility. *Nature*, 236: 301-304.
- Wesenberg-Lund, C. (1925) The Biology of *Zoothamnium geniculatum* (Ayrton). *D. Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Skrifter, Naturvidensk. og mathem. Afd.*, 8: 1-53.
- Wiech, H., Geier, B. M., Paschke, T., Spang, A., Grein, K., Steinkotter, J., Melkonian, M. and Schiebel, E. (1996) Characterization of green alga, yeast, and human centrins, Specific subdomain features determine functional diversity. *J. Biol. Chem.*, 131 (37): 22453-22461.
- Wordeman, L., Steuer, E., Sheetz, M. P. and Mitchison, T. (1991) Chemical subdomains within the kinetochores domain of isolated CHO mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.*, 114: 285-294.