Review

ゾウリムシの収縮胞複合体

石田正樹^{1*}·冨永貴志²

1 奈良教育大学教育学部理科教育講座 〒630-8528 奈良市高畑町

²徳島文理大学香川薬学部病態生理学講座 〒769-2193 香川県さぬき市志度1314-1

Contractile Vacuole Complex in Paramecium

Masaki ISHIDA¹ and Takashi TOMINAGA²

¹School of Science Education, Nara University of Education, Takabatake-cho, Nara 630-8528, ²Department of Neurophysiology Kagawa School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, Shido 1314-1, Sanuki, Kagawa 769-2193, Japan

収縮胞(contractile vacuole, CV)を岩波の「生物学辞 典」で調べると、「原生動物にみられる液胞の一種で、 拡張と収縮を周期的に反復する」と記載されている。 CVは、細胞内小器官の1つであり、顕微鏡の下で観察 すると、液体の流入によりゆっくりと膨らみ、定期的 にその内容物を細胞の外に放出する。Patterson (1980) のレビューによると、このような観察が最初になされ たのは、1776年の Spallanzani の論文にさかのぼる。 Leeuwenhoeckが顕微鏡を自作し、原生動物を発見した 1667 年から約 100 年後の事である。当時は、この液胞 の周りに膜はあるのであろうか?とか、その液体は何 処からくるのか?というような疑問に関して研究が 進められたが、この液胞が実は膜によりつつまれてお り、複数の膜系から構成されていることが判明したの は、電子顕微鏡が発明された後のことである。 Saedeleer and Wolff (1931)は、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。CVC は原生動物の多くにみられ、淡水産の繊 毛虫、鞭毛虫、そしてアメーバ、それから海産や寄生

*Corresponding author Tel/Fax: +81-742-27-9198 E-mail: masaki@nara-edu.ac.jp (Received: 6 June 2006) 性のものに良く観察される。また単細胞性の藻類や、 藻類や菌類の生活環中の特定の時期、淡水産の海綿動 物などにも観察される (reviewed by Kitching, 1967; Patterson, 1980; Zeuthen, 1992; Allen and Naitoh, 2002) 。 CVCの構造や構成には、細胞の種類によって差異がみ られるが、McKanna (1973a,b, 1974, 1976)は、繊毛虫、 鞭毛虫、そしてアメーバ、や淡水産の海綿のもつ CVC の比較形態学的研究から、CVCを構成する特定の膜に は、その細胞質表面に釘の頭のような突起が共通して 存在することを発見した。McKanna はまた、この突起 が水分の隔離に関係しているのではないかと推論し、 こうした突起を持つ膜系をさして"fluid segregation organelles"と呼んだ。しかしながら、後に Patterson (1980)は、彼の広範にわたるレビューの中でCVCがど のようにしてイオンおよび浸透圧の調節の機能を果 たしているのか、その機構を示す実験的データはほん の僅かであると結論づけていた。その後、収縮胞研究 の劇的な進歩は、1990年代になってもたらされたが、 現在に至るこの十数年の間に、CVCにおける様々な分



図1. 収縮胞の模式図

A は、CVC の断面の模式図を、B は、細胞の模式図を、C は放射状集水管の断面図をそれぞれ示している。AMP, 瓶状部 ampullae; CC, 集水管部 collecting canal; CV, 収縮胞 contractile vacuole; CV pore, 収縮胞孔 contractile vacuole pore; CVC, 収縮胞複合体 contractile vacuole complex; DS, デコレーテッド・スポンジオーム decorated spongiome; MTR, 微小管束 microtubular ribbon; SS, スムース・スポンジオーム smooth spongiome.

子の存在が明らかになるにつれ、CVCが浸透圧調節に 関わるとするこれまでの説が、実験的に証明されつつ ある現状である。本稿では、特にゾウリムシの収縮胞 の構造と機能に関して、これまでの研究を辿りなが ら、最近の研究を紹介し、今後の展望について述べて みたい。

|. 収縮胞の構造

原生動物の CV はほとんどの場合、スポンジオーム (spongiome) と呼ばれる小胞あるいは管状の膜構造 により取り巻かれている(Patterson, 1980)。原生動物 のなかで、もっとも組織的な CVC は、Paramecium に 観察される。Paramecium CVC の模式図を図1に示し



図 2. 抗a-チューブリンモノクローナル抗体による *P. caudatum*の間接蛍光抗体染色像

左側の細胞は、典型的な静止期の細胞の背中側に焦 点を合わせた像である。右側の細胞は分裂のとても早 い時期の細胞を側面から見た像であり、細胞中央部に 焦点を合わせた像である。白いアローヘッドは、収縮胞 の位置を示しており、左の細胞には2つの収縮胞が、右 の細胞には4つの収縮胞が各々観察される。尚、スケー ルバーは、50 µm を示している。

た。Paramecium の収縮胞は、細胞の背側に位置してお り、細胞口が存在する腹側とは反対側にある。通常、 1細胞につき、2個の CVC が細胞の前端側と後端側に 存在する(図2左)。稀に1細胞に1個しか存在しな い場合もあるが、その場合の CVC は比較的大きいも のが観察される(Allen et al., 1990)。一方、1つの細胞 に4個の少し小振りのCVCが観察されることがある。 これは、核や細胞質の分裂に先立って CVC が複製さ れた結果である(図2右)(Allen et al., 1990)。Parame -ciumの細胞分裂においては、この他、口部装置の複製 もまた同様に核や細胞質の分裂に先立って観察され るが、CVCの複製は口部装置の複製に次いで観察され る細胞分裂の徴候といえる(Fleury et al., 1995)。この 他、Paramecium を高い浸透圧溶液中で長く飼育して いると、5個以上の過剰な CVC を形成することが観 察されることが知られていた(未発表データ)。この 高浸透圧状態では、細胞分裂は観察されない。Iwamoto et al. (2003)の報告によると、低浸透圧への順応の過程 や、Ca²⁺イオンリッチな溶液で飼育すると、同様の事 が観察され、この時に形成される過剰な CVC は、細胞 分裂の場合とは異なり、既存の CVC の細胞後端部側 に形成されることが知られている。

Paramecium の CVC では、 次に示す 形態的に 識別さ

れる5つのコンポーネントが存在する。

- 1) 収縮胞孔 contractile vacuole pore (CV pore)
- 2) 収縮胞 contractile vacuole (CV)
- 新状部・集水管部 ampullae (AMP)・collecting canal (CC)
- 4) デコレーテッド・スポンジオーム decorated spongiome (DS)
- 5) スムース・スポンジオーム smooth spongiome (SS)

これら 5 つのコンポーネントは、CV pore から放射状 にのびる微小管束(microtubular riboon, MTR)により まとめられ、CVC を形成している(図 2)。MTR は、 SS と DS を除く、CV、AMP、CC のそれぞれの膜に結 合していることが観察されており(McKana, 1974; Hausmann and Allen, 1977; Allen and Fok, 1988)、また、 SS と DS は、CC とつながっている。結果として、5つ のコンポーネントはMTRによりCVC としてまとまる ことになる。以下に、各々の構造を取り上げ、詳細に 紹介する。

1) 収縮胞孔 (CV pore): 細胞表層の規則的なアル ベオラーサック (alveolar sac) をインターラプトした 形で出現し、細胞膜がそれと結合する微小管の筒の中 に陥入したような形態を示す(図1 A, 3C)。深さ1μm の漏斗状あるいは円筒状の筒の底面が、細胞膜と CV 膜が融合する場所となる。微小管の筒は、微小管が螺 旋状に配列したものであり、これより約 20-25 本から なる微小管束が、放射状に細胞質中に伸びている (McKana, 1973b; Hausmann and Allen, 1977)。微小管 と CV 膜、AMP 膜、CC 膜との間には、それぞれリン ク様の構造が観察されており、微小管が CVC の骨格 的な役割を果たしていると考えられている (Hausmann and Allen, 1977)。一般的に、膜と結合し ているような微小管は、微小管結合タンパク質により 安定化されているものが多いが、Paramecium の CV poreや CV の骨格である MTR を構成する微小管の場 合は、微小管重合阻害剤としてしられる colchicine に より消失しないことから、細胞表層や繊毛の微小管同 様に安定化された微小管であることが示されている

(Hausmann and Allen, 1977)

CVC の分裂は常に細胞の分裂に先立って観察され るが (Allen et al., 1990)、CVC の中で最初に複製される のは、CV pore を構成する微小管である。このことは、 数種の抗体を用いた間接蛍光法により示されている。 pore の複製は、既存の pore から派生するようにして行 われるが、複製された微小管の筒は、やがて細胞の前 端方向に移動し、これに引き続き放射状の微小管束の 形成が観察される (Fleury et al., 1995; Allen et al., 1990; Fok et al., 2002)。そして、この微小管の骨格のもとに、 既存の SS 膜や DS 膜が輸送され、再配置されてゆくよ うに観察される (Allen et al., 1990; Fok et al., 2002)。 再配置されることの根拠の一つは、細胞分裂に先立つ CVC の分裂時に DS を標識する抗体 DS-1(後に詳述す る)を用いて DS の量を観察するとその増加があまり 認められないことである (Allen et al., 1990)。

2) 収縮胞(CV): 外見上は、拡張と収縮を周期的 に反復する液胞膜である。Paramecium の収縮胞に関 しては、収縮に関係するミクロフィラメントやマイオ ネームなどの構造の収縮胞複合体における存在は、こ れまで報告がない。拡張期は比較的に時間のかかる過 程であり、この時、CV 膜と CV pore の細胞膜とは接し ていないことが判っている(Hausmann and Allen, 1977)。一方、収縮期は~0.3 秒といった短い過程で あり(Naitoh et al., 1997a)、この時、CV 膜と細胞膜と の融合が起こり、CV 内部の液体が細胞外に放出され ると考えられている(Allen and Naitoh, 2002)。

収縮期の CV 膜においては、興味深い形態変化の観察がなされている。それは、CV 膜の管状化である。電子顕微鏡観察により、収縮した後の CV 膜が、直径約40 nm の管状に変化し、SS に似た形態をとることが報告されている(Housmann and Allen, 1977; Tominaga et al., 1999)。

3) 瓶状部 (AMP) および集水管部 (CC): AMP は CC と一続きにつながった膜構造であり、後述する SS で取り囲まれていない部分が瓶状に拡張している (Housmann and Allen, 1977; Allen and Fok, 1988)。こ れら5~10本が、CV を中心に放射状に配列し、この ため**放射状水管 (radial canal)** ともよばれる。

光学顕微鏡観察において、AMP は CV と交互に脈動 (pulsation) するように観察される。CV から一見独立 して見えるこの膜系の CV 膜との違いは、しかしなが ら明瞭では無い。微分干渉のような光学顕微鏡によっ て観察している場合でも、AMP からの液体の注入と いうよりは、AMP 自体が膨張し、先の CV の収縮によ り生じた CVC 複合体の中央のスペースに入り込み、 収縮胞となるような印象をうける。

電子顕微鏡観察では、AMP 膜もまた収縮した後に 形態変化を示す。CV 膜同様に直径約 40 nm の管状に 変化し、やはり SS に似た形態をとることが報告され ている(Hausmann and Allen, 1977; Tominaga et al., 1999)。CC部分は、SS にとりかこまれており、凍結 割断レプリカ膜のディープエッチングによる観察に おいても、SS との結合部とみられる直径 40 nm の開口 を細胞質表面に持つ。

4) スムース・スポンジオーム (SS) : DS と対比し て滑らかな表面をもつ直径約 40 nm の管状膜のネッ トワーク構造である。岩波の生物学辞典にもあるよう に、当初は滑面小胞体の一部と考えられていたが、 Paramecium においては、CVC 付近に常に観察され、小 胞体と連続するような観察はなされていない(Allen and Naitoh, 2002)。図1にその模式的な構造を示した が、肝臓などの滑面小胞体と類似した概観をもち、SS は管状構造をとっている。Allen and Naitoh (2002) は 数多くの形態観察から、図1に示した構造よりは、む しろ規則的な網目状を呈するようなモデルを提唱し ている。SSは、一方ではCCとつながっており、他方 では DS ともつながっていると考えられている (Allen and Naitoh, 2002)。この事は、様々な電子顕微鏡観察 により支持されているが、特に Fok et al. (2002) の報 告にあるタンニン酸を用いた観察では、CV から侵入 したタンニン酸による電子密度の高い染色が、CV を はじめ放射水管につながる SS や DS の内部にのみ観 察され、これらの膜系の連絡の存在を強く示してい た。ただし、5-10本存在する全ての放射水管という訳 では無く、CVと連結した放射水管には観察された。

5) デコレーテッド・スポンジオーム(DS): McKanna (1973a,b, 1974, 1976)が、"fluid segregation organelles"と 呼んだ膜構造は、Paramecium の場合、この DS 膜であ る。釘の頭のような突起を細胞質側表面に持つ管状の 膜構造であり、管状膜の直径は、約 50 nm である。SS とは異なり、比較的直線的にのびる管状膜が多数平行 に束ねられた形態を示す(図1)。突起は、直径、約〜 10 nmの球形であり、2本の突起の列が螺旋に取り巻い ている。構造的には、原生動物ミトコンドリアの管状 クリステに観察される F-ATPase の配列に類似してい る(Allen et al., 1989; Allen, 1995)。DS 内腔の容積と突起 の体積の比を計算すると、ほぼ1:1となっており、 とても密に存在している(Fok et al., 1995)。

Fok et al. (1995) は、*Dictyostelium* やクロマフィン 顆粒 (chromaffin granule) の液胞型 H⁺-ATPase (V-ATPase)の触媒部 (V1 セクター) に対するポリクロー ナル抗体を用い、*Paramecium* の DS 膜上の突起が、こ れらの抗体とクロスリアクトすることを報告した。現 在では、この突起が V-ATPase の V 1 セクターである ことが証明されている (Fok et al., 2002)。

以上の5つのコンポーネントは、形態に基づく分類 であるが、上述したように、CV、AMP、CC等の膜に 関しては、収縮時に類似した形態変化を示す性質があ り、この分類が正しいかどうかは疑問視される。これ はあくまでも推測であるが、アメーバ類にみられるよ うなスポンジオーム部(水集積)とCV部(排出)の2 つのコンパートメントにより構成される単純な CVC



図3. 電極を刺入した収縮胞の形の変化(A)と電気生理学的パラメター変化(B) (A)2秒毎の電極を刺入した収縮胞のタイムラプス像。囲まれている部分が内液放出期。(B)Aの像と同時に 記録された電気生理学的パラメター。像より推定された膜面積変化(a)と膜容量(b)、膜電位(c)、膜抵抗(d) の変化の相関を見ることができる。Tominaga et al., 1998aより。

との対比から考えると、*Paramecium* の CVC は、細胞 内骨格によりシステム化された構造をとっているに 過ぎず、基本的にはほぼ同質のものであると考えても 良いのかも知れない。

膜の融合を観察する方法に、膜の静電容量 capacitanceを測定する方法がある。膜面積と静電容量 は比例するので膜が融合した時の膜面積の増大を静 電容量の増大として観察できるのである。Tominaga et al. (1998a) は、Parameicum CV に電極を刺入し、矩形 電流を注入することで膜の静電容量を測定した。結果 として、CV 膜の静電容量は拡張時には、ある一定の高 い値を示しているが、CV が収縮する直前に減少し、比 較的早い時間でまた元の高いレベルに戻ることが観 察された(図3)。静電容量をもとに膜面積を推定す ると、拡張期には上述の膜系が全て中央の球形の膜系 (CV) とつながっており、収縮期直前に他の膜系から





A, mAb DS-1 (液胞型プロトンポンプに対する抗体) と mAb SS-1 (細胞膜抗原に対する抗体) による 2 重染色像。B, mAB SS-1 のみによる染色像。DS-1 によりプロトンポンプを持つ膜である DS 膜が修飾 され、SS-1 により細胞膜、CV 膜、CC 膜、及び SS 膜が修飾されている。C, mAb TAB-2 (抗α-チューブ リンに対する抗体) による染色像。AMP, 瓶状構造; CV, 収縮胞; CV pore, 収縮胞孔; DS, デコレーテッ ド・スポンジオーム; SS, スムース・スポンジオー

切り離された球形の膜系が液の放出時に働く CV 膜と して機能することが示された(Tominaga et al., 1998b)。

また既に述べたように、CV 膜も AMP 膜も収縮時に は管状化し SS に似た形態をとることが報告されてお り (Allen and Fok, 1988)、また、Fok et al. (1995)が 用いた SS-1 というモノクローナル抗体は、CV、AMP、 CC 及び SS に共通の膜タンパク質が存在することを 示していた(図4)。これらの事実は、CV、AMP、CC 及び SS 膜は、少なくとも共通のタンパク質を共有す る膜であり、それぞれの膜の間には明確な区別がない 可能性を示している。

後述する NSF 抗体を用い膜融合の痕跡を解析した Kissmehl et al. (2002)の結果からは、細胞膜と CV 膜、 CV 膜と AMP 膜、CC 膜と SS 膜の接するあたりに、膜 融合の痕跡が蛍光標識として観察されている。おそら く CV、AMP、CC 及び SS 膜といった放射水管の膜は、 ほぼ同じような性質をもつものであり、それぞれの間 で融合と解離が頻繁に繰り返されており、拡張期には DS 膜も含めて連続した1つの膜構造となるものと推 測される。

ただし、DSに関しては、他の CVC の膜系とは異な る性質を示す報告が幾つかなされている。後述する高 浸透圧条件への順応過程において、他の CVC 膜系か ら液胞化し、消失することが報告されている。また消 失した DS 膜は、細胞の高浸透圧条件への順応が進む につれ、再び出現する(Ishida et al., 1996)。これらの 観察は、DS 膜が CVC の他の膜系とは、あきらかに違 う性質を持つ事を示している。

||. 収縮胞複合体の機能

収縮胞は、Paramecium の細胞の中で、律動的に拡張 と萎縮を繰り返し、光学顕微鏡観察で簡単に観察でき る。この細胞内小器官の機能はなんであろうか?この 間に対するそれまでの研究の数々は、細胞外の浸透圧 変化に対する CV の行動変化に関する実験であった り、あるいは、比較形態学的な観察が主体であり (Patterson, 1980)、収縮胞の発見から約 200 年もの間、 その浸透圧調節の機構を示す実験的データは僅かで しかなかった。つまりは、以下にあげるような収縮胞

機能を説明する為に重要な問に対する答えは、見つか

らない状態であった。

- 1) CV への水分集積の機構
- CVの内部の組成
- CV サイクル制御機構
- 4) CVの収縮機構
- 5) CV 膜と細胞膜の融合の機構

やがて、収縮胞による水分調節の機構に関する重要な 発見の数々は 1990 年代になってもたらされることと なる。

当時、収縮胞の研究が進んでいたのは、主に Acanthamoebaや Dictyostelium、そして本稿で取り扱う Paramecium であった。アメーバ様の細胞においては、 蓄積された情報量は多かったが、収縮胞とその他の液 胞を形態的に識別することが困難であり、複数のマー カーを必要とするという実験系としての欠点があっ た。一方、Paramecium は、情報量は少ないものの、最 も複雑な CVをもつ故に細胞内での位置は固定され、 他者にくらべて形態的同定が確実に行えるという利 点があった。

Heuser et al. (1993) は、Dictyostelium の収縮胞の DS 膜、McKanna が、"fluid segregation organelles"と呼んだ 膜構造、その突起部分が液胞型プロトンポンプである ことを示した。この発見は、これまで停滞していた収 縮胞研究の歴史を加速させる契機となった。同じ頃、 ハワイ大学の研究グループは、Paramecium の DS 膜に 存在する突起を特異的に認識するモノクローナル抗体 DS-1を既に得ていたが(Allen, et al., 1990)、この抗体 DS-1を細胞内に顕微注入することにより、CV の収縮 頻度と CV 直径から算出される内容物の排出量(CV



図 5. 液法型プロトンポンプの模式図 膜貫通したチャンネルドメインである V0 セク ター (a,c,d) と、触媒ドメインである V1 セクター (A,B,C,D,E,F,G,H)から構成される。(Nelson, N. and Harvey, W. 1999 を参考にした)

output)が、顕著に減少する事を報告した(Ishida et al., 1993)。収縮胞の構造と機能を結び付ける発見が、こ の当時なされはじめていた。また、Acanthamoebaでは、 Baines and Korn (1990)が Myosin Iの収縮胞局在を示し ており、このタンパク質に対する抗体を細胞内に注入 すると、収縮胞の活動を阻害するという報告 (Doberstein et al., 1993)がなされたのも同じ年であっ た。こうして、CVへの水分集積の機構やCVの収縮機 構に関する研究が進行していった。

1) CV への水分集積の機構

Fok, et al. (1995) は、CVCのDS 膜状の突起が細胞 性粘菌の Dictyostelium やクロマフィン顆粒 (chromaffin granule)の液胞型H⁺-ATPase (V-ATPase) の触媒部(V1セクター)に対するポリクローナル抗体 とクロスリアクトすることを報告した。V-ATPase は、 膜貫通のチャンネル部である V0 セクターと、細胞質 に突出する ATPase 活性をもつ部分である V1 セク ターから構成されるが(図5)、Dictyostelium と chromaffin granuleの抗体の抗原は、それぞれ、A サブ ユニットとBサブユニットであり、DS-1の抗原は、E サブユニットであることが後に示された(Fok, et al, 2002)。この他、低温感受性(V0とV1の解離)やV-ATPase 特異的阻害剤である Concanamycin B 低濃度 (μM以下)感受性などから、この突起が液胞型プロト ンポンプ (vacuolar type proton pump) の ATPase 活性部 位、V1 セクターであるという事が示され、現在では、 B サブユニットの配列が決定されている (Fok et al., 2002) 。これらの知見は、*Paramecium* の DS 膜上の V -ATPase による H⁺ の移動が、収縮胞の機能に深く関 係している可能性を示唆していた。

Parameicum 細胞を浸透圧が十分に高張溶液に暴露 すると、CVC は一旦活動を停止する。やがて、細胞の 順応により、徐々に活動を再開するのが観察される が、収縮胞が活動停止している細胞を DS-1 抗体で蛍 光標識すると、DS 部分の標識が細胞質全体に散らば るのが観察される。電子顕微鏡観察によると、DS 膜 から突起が無くなり、膜自体が小胞化していることが 判明した(Ishida et al., 1996)。この現象は、しかしな がら、高浸透圧溶液から元の溶液へ戻す事により、比 較的短い時間で回復する。また、高浸透圧溶液への順 応 (adaptation) 過程においても、CVC 機能の回復とパ ラレルにDS 膜構造の回復が観察された。このDS が消 失している細胞を、間接蛍光抗体法、凍結割断ディー プエッチング法や免疫電子顕微鏡の観察では、DS 膜 上の V0 セクターより V1 セクターが解離した事が示 され、このため DS 膜が液胞化したものと推測された (Allen, 1995; Ishida et al., 1996; Fok et al., 2002)。おそ らく、回復過程では、V0セクターと V1 セクターの再 結合が起こり、DS の膜構造が再構築されるものと推 測される。

こうした V1 セクターの解離と再結合は、細胞がス トレスにさらされた時に起こる事が、幾つかの研究で 示されている。鱗翅目の蛾の仲間(Manduca sexta)の 中腸にある V-ATPase では、脱皮の時における V1 セク ターの解離が観察されており (Merzendorfer et al., 1997; Sumner et al., 1995)、この解離は、脱皮後に回復 することが報告されている (Graf et al., 1996)。また、 Yeast においても、同様な V1 セクターの V0 セクター からの解離と再結合が報告されている(Kane, 1995: Liu et al., 2005)。また、近年 Paramecium においても、 人為的に導入した相補的な RNA による特定の遺伝子 の発現を阻害する方法 (RNAi: RNA interference) によ り、V1 V-ATPaseのC-あるいはF-サブユニット(図 5を参照)をサイレンスにした細胞では、DS構造が観 察されなくなることや、この時の CVC 機能が激烈に 低下するという報告がなされている(Wassmer et al., 2005a)

上記のような観察は、この DS 膜の存在が CVC 機能 の発現に大きく関係している事を示しており、浸透圧 ショックなどのストレスに対して、こうしたポンプ自 身の持つ性質による DS 膜の出現・消失の制御が行わ れている可能性を示唆していた。したがって、収縮胞 の機能を発現するには、この液胞型プロトンポンプを まとった DS 膜の存在が不可欠であり、プロトンポン プの作るプロトンの勾配が水分集積に重要な役割を 担うと、推測されたのである。

Tominaga et al. (1988a)は、CV にガラス微小電極を刺 入することでの膜電位を直接測定することに初めて 成功した。脈動する CV の膜電位を測定する事は、容 易なことでは無いのはいうまでも無いが、膜電位と CV の挙動を同時に測定することで、大変重要な情報 を得たのである。Paramecium に限らず細胞の膜電位 は通常細胞外を基準として細胞内側がネガティブ(-) にチャージしている。一方、測定された CV の膜電位 は CV 外(細胞質)を基準として CV 内側がポジティブ (+) であり、電位差は、約60mVであった。CV が収 縮期に DS 膜とつながる他の膜系から切り離される事 は既に述べたが、このポジティブチャージの膜電位 は、CV が他の膜系から切り離される時に減少した。拡 張期にはつまり、連続する他の膜系に膜電位を形成す る電池があるということになり、現在迄に蓄積された 知識から推測できる1つの可能性としては、DS 膜上 の液胞型プロトンポンプであろうと考えられた (Tominaga et al., 1988a,b) $_{\circ}$

V-ATPase の特異的阻害剤として知られる concanamycin Bは、CVの活動を強く阻害する事はす でに報告されているが(Fok et al., 1995)、Gronlien et al. (2002)は、この concanamycin Bを用いた CV 膜電位 の変化を記録した。CV 膜電位は、concanamycin B処理 により降下する事が判明し、DS 膜上の V-ATPaseの活 動と CV 膜電位の関係が強く示唆されている。

ここまでのところで、CVCの水集積の動力部分と推 測される分子の存在が示唆されてきた。しかしなが ら、それが動力源であるとするならば、液胞型プロト ンポンプが集積したH⁺イオン、あるいは、それにより 形成された膜電位をどのようにして水集積に利用し ているのであろうか、これまでの研究による V-ATPase を動力源とする説を十分に説得力のあるもの にするには、CVの内部の組成を知らなければならな い。この点に関して、Heuser et al. (1993)は、CVには、 H⁺イオン勾配を利用したイオンの輸送システムが存 在する仮説を提唱していた。細胞外に常に排出しても 枯渇しないものとして考えやすいのは、呼吸や窒素代 謝の終産物である、HCO³や NH4⁺等であり、こうした イオンがオスモライトとなり、最終的な水の移動が起 されると推測していたのである。

2) CV の内部の組成

Zeuthen (1992) のレビューによれば、1990 年代まで の知見から導き出される仮説として、CV は水を放出 しているとされてきた、しかしながら、CV がどのよう な内容物を持っているのか、それを示す直接的な証拠

は、その当時ではほんの僅かでしかなかった。Riddick (1968) は、CV の浸透圧を測定する為に、アメーバ Pelomyxa carolinensis の細胞を破壊して取り出した CV を用いて、これに氷点降下法を応用した。測定され た CV の浸透圧は、51 mOsmol であり、驚いたことに 細胞質の 117 mOsmol より低張であった (Riddick, 1968)。この値は、それより以前に、Amoeba proteus で 出された結果と類似していた。Amoeba proteus の CV は、32 mOsmol であり、細胞質が 101 mOsmol である (Shmidt-Nielsen and Schrauger, 1963) . Riddick (1968) の実験の優れた点は、CVの浸透圧と共に CV のイオ ン組成をも測定したことである。こうした CV イオン 組成の測定は、それまで誰も報告していなかったが、 それ以後 30 年余りの間、この報告以外の測定例は存 在しなかった。Riddick (1968) が測定できたイオンは、 しかしながら、 $Na^+ \ge K^+$ のみである。CV内部の Na^+ は 20 mM、K⁺は4.6 mM であり、この時細胞質は、Na⁺が 0.6 mM、K⁺が31 mM であった。一般に生体膜がわず かに水を通過させることは周知の事実であるが、この CV と細胞質の間の浸透圧差やイオンの濃度差では、 CVの中に水は集積できない状態である。これが、1990 年代までの大きなパラドックスであった。

これに対して、Stock et al. (2002) は、選択的イオン電 極を採用する事で、CV 内部のイオンの濃度を測定し、 同時に氷点降下法によって細胞質の浸透圧も測定し た。イオン電極で測定したイオンは、全部で4種類 (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, CI) であったが、これらイオンの濃度 から計算される CV 内部の浸透圧は、氷点降下法で測 定される細胞質のそれよりも常に高い値を示してい た。すなわち、CV 内部は常に細胞質より高張溶液であ り、低張な細胞質から浸透圧差により水は CV 内部に 移動する事が可能であることが判明した(Stock et al., 2001, 2002)。したがって、少なくとも、*Paramecium* に 関しては、浸透圧差のパラドックスは解消したと考え られる。

Stock et al. (2002) の報告によれば、測定された各々 のイオンは、以下の表1のようになっており、この実 験で示された CV 内部の浸透圧を決める主要なオスモ ライトは、K⁺ と CI であることになる。細胞外液にソ ルビトールあるいはコリンを加えて外液の浸透圧を コントロールする方法を用いて、K⁺ と CI イオンの細 胞質の濃度を測定してみると、これらイオンの濃度も 浸透圧の増加に応答して増加する。この時、CV 内部の K⁺ と CI イオン濃度も増加し、細胞質との間に双方供 に約 2.4 倍の濃度差で高い値を保持している(Stock et al., 2002)。さらに、Na⁺-K⁺-CI co-transporter の阻害剤 である furosemide (Brater, 1998; Lauf, 1984; Canessa et al., 1986; Garay et al., 1988)を用いた実験から、 Tominaga et al. (1998a)が推測していたような HCO³ 輸

表1. 細胞質と収縮胞(CV)内部のイオン組成

	細胞質	CV内部
\mathbf{K}^+	22.6 mM	56.0 mM
Na^+	3.92 mM	4.67 mM
Ca ²⁺	測定不能	0.23 mM
Cl	27.3 mM	66.5 mM

Stock et al. (2002)のデータより

送システムではなく、CV 膜上に存在すると仮定できるのは、K⁺ と CI イオンの能動的な共輸送体であると結論付けた(Stock et al., 2002)。

しかしながら、V-ATPase が集積した H⁺イオン、あ るいは、それにより形成された膜電位が、どのように して水集積に利用しているのか、その回答は得られて いない。Stock et al. (2002) は、CV 内部への積極的な Ca^{2+} の蓄積が観察されることから、V-ATPase との関 係を仮定しているが、この問題に関しては、まだまだ 不明な点が多い現状である。

Dictyostelium discoideum では、calmodulin (CaM)に対 する抗体で認識される CV 膜と推測される膜上に Ptype Ca²⁺ -ATPase の局在が示されている(Moniakis et al., 1995)。また、アンチセンス RNA により、既存の V -ATPase を抑えてしまうと、CV 内部への積極的な Ca²⁺ の蓄積の減少が観察されることも報告されている (Xie, et al., 1996)。Stock et al. (2002)が推測した CV 内腔への積極的な Ca²⁺の蓄積と V-ATPase との関係 は、この Dictyostelium の実験を根拠としているが、後 に述べるように、Dictyostelium における CV 膜の証明 には、問題が残される状態であった。

この他、Tominaga et al. (1998a) は、凍結割断レプ リカの観察から、CV 膜と CC 膜に観察される P-face の 9 nm の顆粒に着目し、水チャンネルの存在を想定して いたが、これはあくまでも推測の域をでない。筆者も 含め、他の動物から得られた水チャンネルの構成タン パク質である aquaporin に対する複数の抗体を用いた 結果は、現在までのところネガティブである(未公表 data)。一方、*Trypanosoma cruzi*では、aquaporin gene の同定がなされており、その分布が CV 膜に観察され るとの報告がある(Montalvetti et al. 2004)。*Paramecium* においても、CV と水チャンネルとの関係を明ら かにする事は、今後の課題であろう。

3) CV サイクル制御機構

収縮胞の脈動 (pulsation) のサイクルは、CV の緩や かな拡張と、比較的急速な収縮をくりかえす。例えば、 Axenic culture medium 中の *P. multimicronucleatum* の場 合 (Ishida et al., 1993)、一分間に平均して約6回の脈動 を行うが、そのリズムは常に一定という訳では無い。 また、前後2つのCVCの間で歩調を取り合っている訳 でも無い。それぞれのCVCが独自に不定期なリズム で脈動している。平均的なサイズにまで拡張したCV が排出されない場合もあり、そうした場合は、より大 きなCVへと拡張し、結果的には一回飛ばしの収縮が 起こる事も稀では無い。収縮は、細胞膜とCV膜の融 合によるエクソサイトーシスであるが、この膜融合の タイミングを何が決めているのかは、現在のところ不 明である。

Dictyosterium (Zhu et al., 1993) では、CV が CaM の 抗体により標識されることが報告されているが、繊毛 虫である Tetrahymena (Suzuki et al., 1982) や Paramecium (Momayezi et al., 1986) においても、CaM 存在を示す抗体標識が報告されており、それは CV pore にみられる。この収縮胞活動の最終段階である膜 融合には、こうした Ca²⁺-CaM 系の関与による制御が 行われている可能性は示されるものの依然不明な点 が多い現状である。

一方、Tani et al. (2000) は、顕微手術により単離した CV あるいは放射水管の膜を用いて、その活動を記録 し、興味深い報告をしている。単離した CV 膜あるい は放射水管の膜は、驚くべきことに、自発的に球形化 と弛緩を繰り返す性質を示した (Tominaga et.al. 1998b も参照)。この in vitro の系においては、可溶性の成分 は流失しているため、このリズムの制御が可溶成分に よるものとは考えにくい。さらに、取り出した CV 膜 を機械的に分断し、得られた2つのCV膜は、どちら もこの自発的な球形化と弛緩を繰り返す。ペースメー カーが有るとすれば、それは特別に局在するわけでは ないように考えられた。Tani et al. (2000) は、さらに、 この単離した CV を吸引することにより人為的に膜に 張力を発生させることで、リズムを外れた球形化が誘 導される事を発見し、張力により誘導される張力発生 メカニズムの存在を報告している。

Tani et al. (2000) は、さらに、CV の張力に着目し、 顕微手術的に細胞外に取り出した CV 膜の張力を測定 した。単離した CV 膜が球形化する時には、最大で 5× 10³ N/m であること、また、弛緩した最低の値は、一 般的な生体膜の張力と似通っており、1×10⁴ N/m であ ることを報告した(Tani et al., 2001)。このことにより、 CV 膜は、明らかに張力を発生する膜であることが証 明されたのである。さらに、興味深いことには、この 張力発生(球形化) は、緩衝液で洗い流すことにより 消失し、ATP の添加で再活性化されることも報告して いる(Tani et al., 2000)。能動的な張力発生であるとい える。

この張力はどのように発生しているのであろう か?残念ながら、この問に対する答えは、まだ得られ



図6 電気生理学的パラメターによりゾウリムシ細胞の電顕用固定標本を作るシステム CV 膜が丸くなる時に膜電位が下がることを検出し、固定液を細胞に吹きかけ固定標本を作る。Tominaga et al., 1999より改変。

ていない。単離した CV の球形化と弛緩のサイクル は、自律的であり、10 mM の EGTA 存在下で観察され る。ATP が必要であり、Ca²⁺ が存在しないのであるか ら、収縮性繊維の myoneme の収縮とも考えられない。 また、この in vitro の実験系において使用された微小 管の重合阻害剤(0.2 mM nocodazole, 2 mM colcemid, 20 mM colchicine)、やアクチン重合阻害剤(0.5 mM cytochalasin B) さらに、プロトンポンプの阻害剤(0.2 mM concanamycin B)の影響も調べているが、張力発生 には影響しなかった(Tani et al., 2000)。

Tani et al. (2000)は、この CV 膜の張力発生の動力源 として、「収縮胞の構造」で述べた"CV 膜の管状 化"(Allen and Fok, 1988; Hausmann and Allen, 1977; Tominaga et al., 1999)を考えている。また分子機構と して、エンドサイトーシスにおける膜の小胞化の分子 機械であり、GTPase活性を持つ dynamin 様タンパク質 による管状化も想定されている(Tani et al., 2001)。 Paramecium における dynamin の存在は既に報告され ている(Wiejak et al., 2004)。しかしながら、このタン パク質の存在を示す標識は、細胞質に散在して観察さ れ、残念な事に CV への分布は観察されていない。

CV 膜の管状化について、Naitoh et al. (1997a)は CV 膜の自発的曲げエネルギーの計算から管状化が CV 膜の球状化に十分なエネルギーを持つことを定量的に示唆している。また、Tominaga et al. (1999)は膜の球形

化がまさにおこっている時点でCV膜が管状化を起こ していることを、電気生理学的なパラメターを用いた ゾウリムシ細胞の瞬間固定法を開発し、電子顕微鏡観 察像であきらかにした(図6)。このCV膜の球形化 にともなって観察される能動的で自律的な張力発生 の意義に関して、Allen and Naitoh (2002)は、そのレ ビューの中で、CV 膜と細胞膜の融合における、CV pore との融合直径を決定し(Naitoh et al., 1997b)、ひ いては CV のリズム形成に重要な意味を持つと述べ ている。さらに、こうした張力が微小管と結合した他 の膜系との切り離しに重要な役割をもつと考えてい る。

このように、CV 膜自体にリズミカルな運動をおこ なう性質を持っていることが発見されたことは非常 に興味深く、CV 膜の拡張・収縮のリズムが膜の性質に より決められている可能性を暗示していた。しかしな がら、in vitroの CV 膜の一回の球形化・弛緩にかかる 時間は約30秒であり(Tani et al., 2000, 2001)、 in vivo の CV の脈動からすると、3 倍ほど長いものである。in vitro の CV 膜 では、融合する相手である細胞膜は、存 在せず、また、細胞内圧の消失や、可溶性成分の流失 などがあり、単純に、in vivo との比較はできない。こ の時間のギャップをうめる論拠が必要とされるよう に考える。自律的に球形化する膜と細胞膜の融合およ びこれに関わる様々な分子や、張力により誘導される 張力発生機構に細胞内圧がどう影響するか、また、失 われた可溶性成分の影響がいかなるものか、調べるべ き問題は山積している。

4) CV の収縮機構

収縮胞は、外見上"収縮"するようにみえるのでそう 呼ばれているが、その収縮性、言い換えると能動的な 収縮性の有無は、疑問視されている。特に、Paramecium においては、CV 膜に繊維状アクチン、あるいはもう1 つの収縮性繊維として知られるマイオネーム (myoneme)などの繊維構造が存在するといった報告は 無く、さらに、収縮性繊維の存在を示唆する免疫組織 科学的な報告もない。また、アクチン重合阻害剤であ る cytochalasin B によって、収縮は阻害されない (Housmann and Allen, 1977; Naitoh et al., 1997a)。した がって、少なくとも Paramecium の場合では、能動的な 収縮を疑問視する傾向にあった (Allen and Fok, 1988)。

Naitoh et al. (1997a) は、収縮胞が収縮する際の直径 と時間の関係について、いくつかの数理モデル(膜面 積に比例した張力発生モデル、細胞内圧モデル、表面 張力モデル、能動的収縮モデル)を提示した。そして 実際にCVの収縮にともなう直径の変化と時間経過を 測定し、これをモデルとの間で比較した(図7)。生 理学の王道とも言える方法である。この結果、細胞内



図7 収縮胞の径 D の n 乗の値を時間軸にそってプロットした図 Dの3 乗のみが時間に対して比例していることから、細胞膜の張力が CV 内液の 放出に重要であることが示された。Naitoh et al., 1997a より。

Eモデルに最も近似した値が得られ、能動的な収縮と いうよりも、細胞内圧による受動的な萎縮であること が示されたのである。また Naitoh et al. (1997a) は、 偶発的に壊れた細胞から遊離した CV においても同様 に計測し、CV 膜における張力発生の可能性をすでに 示していた。しかし、遊離した *in vitro* の CV 収縮にお ける直径変化と時間経過は、*in vivo* の収縮の時に観察 される現象よりは緩やかであった。したがって、*in vivo* では、細胞内圧による受動的な萎縮の方が、CV 膜で発 生する張力に勝っている事が示されたのである。この ように、少なくとも Paramecium の CV における収縮 は、能動的な収縮ではなく、受動的な萎縮であること が示唆されている。

一方、Acanthamoeba sp.においては、Myosin-IC や Myosin-II の分布が示され (Baines and Korn, 1990; Ostap et al., 2003)、細胞内注入された Myosin-IC のリン酸化 部位のアミノ酸配列に特異的抗体が、収縮胞の活動を 阻害するという報告がある(Doberstein et al., 1993)。 また、Dictyostelium においても、免疫組織学的に CaM

(Zhu and Clarke, 1992)、myosin-II やα-Kinase (Betapudi et al., 2005) 等の存在が示されており、収縮性繊維とその制御機構などが考えられている。したがって、これらの収縮胞は、能動的な収縮性をもつと考えられている。

5) CV 膜と細胞膜の融合の機構

近年、膜融合に関しては、収縮胞においても、融合 に関与するタンパク質分子の発見が次々となされて おり、その1つに NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor)がある。このタンパク質は ATPase 活性をもち、 SNAPs (soluble NSF attachment proteins) や SNAREs (SNAP receptors)といった分子とともに、小胞輸送に関 わることが様々な細胞で報告されている (Owen and Schiavo, 1999; May et al., 2001; Whiteheart et al., 2001)。 Morgan and Burgoyne (1995) のレビューによれば、NSF は分子シャペロンとして働くと考えられており、ATP の加水分解エネルギーを利用して、膜融合時に結合し た膜融合装置である 2 つの分子 vesicle (v)-及び target (t)-SNAREs 間の解離を引き起こす分子であると考え られている。

Kissmehl, et al. (2002)は、*Paramecium*のNSF gene を クローニングし、PtNSFに対する抗体を作成した。こ の抗体を用いて、さらにATP- γ -SとNEM (Nethylmaleimide)を作用させることで、NSFの膜への結 合を固定して、PtNSFの結合する標的の膜を特定し た。非常に興味深い事に、CVCにも anti-PtNSF 抗体標 識の分布は観察され、CV 膜や放射水管膜での均質な 弱い標識に加え、CV pore および CV と AMP の結合部、 そして放射水管上に島状の強い標識が観察されてい た (Kissmehl et al., 2002)。したがって、こうした部分 では、膜融合が起こっていた可能性が示されたことに なる。

このように、Parameciumにおいても、CV 膜と細胞 質膜の融合には、SNAREs 様の膜融合装置の介在が期 待される。ここからは、全くの推論であるが、Stock et al. (2002) が示したように、CV 内部には積極的に Ca²⁺ イオンが蓄積されているようであり、先に述べたよう に、CV pore には CaM が局在するという報告もある。 さらに想像を働かせれば、神経伝達物質の開口分泌に おける synaptotagmin を介した Ca^{2+} イオンにより制御 される分泌 (reviewed by Lindau, 2003; Weimer and Jorgensen, 2003) と類似した機構の存在が考えられな くもない。

一方、Dictyostelium では、SNAREsの CV 膜系への分 布こそ示されていないが、endo-lysosome 膜系には存 在しているとする報告がある(Bogdanovic et al., 2002)。また、膜の接着促進分子である Rab-4 あるい は Rab-14 様のタンパク質 RabD が V-ATPase ととも に、CVC の膜系に局在している事が示されている

(Bush et al., 1994; Bush et al., 1996; Harris et al., 2001; Harris and Cardelli, 2002; Knetsch et al., 2001) 。 RabD の ような小さな GTPase 分子は、初期 endosome への特異 的な膜輸送が行われるように働く分子であり (van der Shuijs et al., 1992) 、*Dictyostelium* においても lysosome の膜系にも同様に発見されている (Bush et al., 1996) 。 さらに、Padh et al. (1991)の報告によれば、CV 膜と endosome 系の膜とが *in vitro* では、融合できるという ことも報告されており、V-ATPase と分布を共にする ことからも、おそらく RabD は、V-ATPase の膜輸送に 関係していると考えられる。

この他、エンドサイトーシスの時に活躍するクラス リンアタプタータンパクの AP (adaptor protein)-1 も、 同様に CV 膜と endosome 系に共通に観察されており、 CV 膜の産生にかかわることが推測されている (Lefkir et al. 2003)。そして、CV における役割は全く不明であ るが、小胞輸送に関係するカルシウム結合タンパク質 である Copine A (Damer et al. 2005) なども報告されて いる。この脂質結合性のタンパク質は、細胞膜や end -lysosome の膜系、そして CV 膜の双方に観察される。 このように、*Dictyostelium* では、サイトーシスに関係 する様々なタンパク質の同定がなされており、それら は、endosome 膜系のみならず CV 膜系にも同様に観察 されている現状である。

この他、Dictyostelium の CV 膜系は、未同定のタンパ ク質輸送系に関わっているという報告がある(Sesaki et al., 1997)。24 kDa Ca²⁺依存性の細胞間接着分子 DdCAD-1 は、発生の間に細胞質から細胞表面への移 動するが、単離された CV は、ATP の存在下で DdCAD -1 をその内腔へ取り込むことが確認されており、CV のエクソサイトーシスによって細胞表面へ到達する と考えられている。

したがって、Dictyosteliumでは、endo-lysosome 膜系 と CVC 膜系、とくにスポンジオーム系の膜との間に連 絡があり、大変複雑な系となっている。これらの系を 十分に分離して認識することに難しさを伴うという 印象である。

一方、Dictyostelium の CV 膜系では、CV bladder にの み存在する drainin というタンパク質が発見されてい る(Becker et al., 1999)。このタンパク質は膜表面タンパ ク質であり、endo-lysosome の膜系には観察されてい ない。ジ-ンタ-ゲティング法により作成した draininnullの細胞は、低張溶液に sensitive であり、大きく膨 らんだ液胞を細胞表面に蓄積させることになるが、 drainin のレスキューは、低張液への抵抗性を取り戻さ せると報告している。Becker et al. (1999)は、この drainin という分子は、 膜融合にかかわる 膜融合のトリ ガー分子であると考えている。興味深い事に、CV 膜特 異的なタンパク質の family に属すると考えられるタ ンパク質は、Schizosaccharomyces pombe, や、Caenorhabditis elegans、それからヒトにも存在するが、残念 なことにそれらの細胞における機能については、不明 のままである。

Dictyostelium の CVC は、スポンジオーム様の管状膜 の部分と CV 膜にあたる bladder 部分により構成され るが、CV 膜に融合して行くスポンジオーム部分を endosome 膜系と明確に切り離して観察できるマー カーは現在までのところ存在しないようである。この 識別が明確にならない限りは、CVC機能の分子機構を 解析する上で、情報が煩雑となるように思われる。

終わりに

本稿では、Paramecium のもつ最も組織化された CVCを利用した実験系をメインに、Dictyosteliumをは じめ他の生物の CVC についても少し触れながら話を 進めて来た。両者を比較すると、Parameciumの実験系 は、CVCの形態的識別が容易に可能である。また、現 代の分子生物学の技術を持ってすれば、Dictyostelium や他の細胞で発見されたような様々な分子の同定を 行うことは可能であり、形態的母体の上に機構の解析 が容易であると考える。

しかしながら、こうした Dictyostelium の実験系のも つ同定の難しさの裏には、CVCの起源につながる情報 が埋没しているようにも感じられる。こうした意味に おいては、あるいは、より一般化した概念を築くとい う意味合いにおいては、現在研究が盛んな Paramecium と Dictyostelium の二つの系以外の CVC の 実験系が数多く出現する事が望まれる。

ゾウリムシの収縮胞複合体について、私見を交えな がら、その構造と機能の面に関するこれまでの知見の 紹介をして来たが、これまで述べて来たように、発見 から 230 年を経てもまだ解決されない問題が山積し ている。しかしながら、モデル生物の中でもマイナー な原生動物を使用した、さらにマイナーな細胞内小器

168

官の研究であっても、これほどに多くの研究者を巻き 込んで、これまで知られていなかった新しい事実の発 見をしつつ進歩してきたように考える。こうした未解 決の問題への挑戦の継続が叶えば、この不思議な細胞 内小器官の機能とその背後に有る分子機構が理解さ れ、その本当の姿もしくはその起源が見えてくるので あろう。

謝辞

この総説を書くにあたり、我々にこうした機会を与 えて下さった神戸大学理学部洲崎敏伸先生、奈良女子 大学理学部春本晃江先生に、深くお礼を申し上げま す。

引用文献

- Allen, R.D. (1995) Membrane tubulation and proton pumps, Protoplasma, 189, 1-8.
- Allen, R.D. and Fok, A.K. (1988) Membrane dynamics of the contractile vacuole complex of *Paramecium*. J. Protozool., 35, 63-71.
- Allen, R.D. and Naitoh, Y. (2002) Osmoregulation and contractile vacuole of protozoa. International Review of Cytology, 215, 351-394
- Allen, R.D., Ueno, M.S., Pollard, L.W. and Fok, A.K. (1990) Monoclonal antibody study of the decorated spongiome of contractile vacuole complexes of *Paramecium.* J. Cell Sci., 96, 469-475.
- Allen, R.D., Schroeder, C.C. and Fok, A.K. (1989) An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. J. Cell Biol., 108 (6), 2233-40.
- Baines, I.C. and Korn, E.D.(1990) Localization of myosin IC and myosin II in *Acanthamoeba castellanii* by indirect immuno-fluorescence and immunogold electron microscopy. J. Cell Biol. 111(5 Pt 1), 1895-18904.
- Becker, M., Matzner, M. and Gerisch, G. (1999) Drainin required for membrane fusion of the contractile vacuole in *Dictyostelium* is the prototype of a protein family also represented in man. EMBO J., 18(12), 3305-16.
- Betapudi, V., Mason, C., Licate,L. and Egelhoff, T.T. (2005) Identification and characterization of a novel α-kinase with a von Willebrand factor A-like motif localized to the contractile vacuole and Golgi complex in *Dictyostelium discoideum*. Mol. Biol. Cell, 16, 2248-2262.

- Bogdanovic, A., Bennett, N., Kieffer, S., Louwagie, M., Morio, T., Garin, J., Satre, M. and Bruckert, F. (2002) Syntaxin 7, syntaxin 8, Vti1 and VAMP7 (vesicleassociated membrane protein 7) form an active SNARE complex for early macropinocytic compartment fusion in *Dictyostelium discoideum*. Biochem J. 368(1), 29-39.
- Brater, D.C. (1998) Diuretic therapy. New Engl. J. Med. 339, 387-395.
- Bush, J., Nolta, K., Rodriguez-Paris, J., Kaufmann, N., O'Halloran, T., Ruscetti, T., Temesvari, L., Steck, T. and Cardelli, J. (1994) A Rab4-like GTPase in *Dictyostelium discoideum* colocalizes with V-H⁺-ATPases in reticular membranes of the contractile vacuole complex and in lysosomes. J. Cell Sci. 107, 2801-2812.
- Bush, J., Temesvari, L., Rodriguez-Paris, J., Buczynski, G. and Cardelli, J. (1996) A role for a Rab4-like GTPase in endocytosis and in regulation of contractile vacuole structure and function in *Dictyostelium discoideum*. Mol. Biol. Cell, 7, 1623-1638.
- Canessa, M., Brugnara, C., Cusi, D. and Tosteson, D.C. (1986) Modes of operation and variable stoichiometry of the furosemide-sensitive Na and K fluxes in human red cells. J. Gen. Physiol. 87, 133-142.
- Damer, C.K., Bayeva, M., Hahn, E.S., Rivera, J. and Socec, C.I. (2005) Copine A, a calcium-dependent membrane-binding protein, transiently localizes to the plasma membrane and intracellular vacuoles in *Dictyostelium*. BMC Cell Biol.12;6:46.(http:// www.biomedcentral. com/ 1471-2121/6/46
- Doberstein, S.K., Baines, I.C., Wiegand, G., Korn, E.D. and Pollard, T.D. (1993) Inhibition of contractile vacuole function in vivo by antibodies against myosin-I. Nature, 28,365(6449),841-843.
- Fleury, A., Callen, A-M., Bré, M-H., Iftode, F., Jeanmarie-Wolf, R., Levilliers, N. and Clérot, J-C. (1995) Where and when is microtubule diversity generated in *Paramecium* ? Immunological properties of microtubular networks in interphase and dividing cells. Protoplasma, 189, 37-60.
- Fok, A.K., Aihara, M.S., Ishida, M., Nolta, K.V., Steck, T.L. and Allen, R.D. (1995) The pegs on the decorated tubules of the contractile vacuole complex of *Paramecium* are proton pumps. J Cell Sci. 108 (10), 3163-70.
- Fok, A.K., Yamauchi, K., Ishihara, A., Aihara, M.S., Ishida, M. and Allen, R.D. (2002) The vacuolar ATPase of *Paramecium multimicronucleatum*: gene structure of

the B subunit and the dynamics of the V-ATPase-rich Osmoregulatory membranes. J. Euk. Microbiol., 49 (3):185-196.

- Garay, R. C., Nazaret, C., Hannaert, P. A. and Cragoe, E. J. Jr (1988) Demonstration of a [K⁺, Cl⁻] cotransport system in human red cells by itssensitivity to [(dihydroindenyl)oxy]alkanoic acids: regulation of cellswelling and distinction from bumetanidesensitive [Na⁺, K⁺, Cl⁻]-cotransport system. Mol. Pharamacol. 33, 696-701.
- Graf, R., Harvey, W.R. and Wieczorek, H. (1996) Purification and properties of a cytosolic V1-ATPase. J Biol. Chem. 271(34), 20908-20913.
- Gronlien, H.K., Stock, C., Aihara, M.S., Allen, R.D. and Naitoh Y.(2002) Relationship between the membrane potential of the contractile vacuole complex and its osmoregulatory activity in *Paramecium multimicronucleatum*. J. Exp. Biol. 205(20), 3261-70.
- Harris, E. and Cardelli, J. (2002) RabD, a *Dictyostelium* Rab14-related GTPase, regulates phagocytosis and homotypic phagosome and lysosome fusion. J. Cell Sci. 115(18), 3703-13.
- Harris, E., Cardelli, J. and Bush, J. (2001) A Rab11-like GTP-binding protein associates with and regulates the structure and function of the contractile vacuole in *Dictyostelium*. J. Cell Sci. 114, 3035-3045.
- Hausmann, K. and Allen, R. D. (1977) Membrane and microtubules of the excretory apparatus of *Paramecium caudatum. Cytobiologie*, 15, 303-320.
- Heuser, J., Zhu, Q. and Clarke, M. (1993) Proton pumps populate the contractile vacuoles of *Dictyostelium* Amoebae. J. Cell Biol., 121(6), 1311-1327.
- Ishida, M., Aihara, M.S., Allen, R.D. and Fok, A.K. (1993) Osmoregulation in *Paramecium*: the locus of fluid segregation in the contractilevacuole complex. J. Cell. Sci., 106, 693-702.
- Ishida, M., Aihara, M. S., Allen, R. D. and Fok, A. K. (1997) Acidification of the young phagosomes of *Paramecium* is mediated by proton pumps derived from the acidosomes. Protoplasma, 196, 12-20.
- Ishida, M., Fok, A. K., Aihara, M. S. and Allen, R. D. (1996) Hyperosmotic stress leads to reversible dissociation of the proton pump-bearing tubules from the contractile vacuole complex in *Paramecium*. J. Cell Sci., 109, 229-237.
- Iwamoto, M., Allen, R.D. and Naitoh, Y. (2003) Hypoosmotic or Ca²⁺-rich external conditions trigger extra contractile vacuole complex generation in Paramecium multimicronucleatum. J Exp Biol. 206(24),

4467-4473.

- Kane, P.M. (1995) Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase *in vivo*. J. Biol. Chem. 270,17025-17032
- Kissmehl, R., Froissard, M., Plattner, H., Momayezi, M. and Cohen, J. (2002) NSF regulates membrane traffic along multiple pathways in *Paramecium*. J. Cell Sci. 115(20), 3935-3946.
- Kitching, J.A. (1967) Contractile vacuoles, ionic regulation, and excretion. In Research in Protozoology. Vol. I., pp. 308-336. New York: Pergamon Press
- Knetsch, M.L., Schafers, N., Horstmann, H., Manstein, D.J. (2001) The *Dictyostelium* Bcr/Abr-related protein DRG regulates both Rac- and Rab-dependent pathways. EMBO J. 20(7), 1620-9.
- Lauf, P.K. (1984) Thiol-dependent passive K/Cl transport in sheep red cells: IV. Furosemide inhibition as a function of external Rb⁺, Na⁺, and Cl⁻. J.Membr. Biol. 77, 57-62.
- Leeuwenhoeck, A. van.(1677) Uintitled letter to the Royal Society. Phil. Trans. R. Soc., London, 12 821-831.
- Lefkir, Y., de Chassey, B., Dubois, A., Bogdanovic, A., Brady, R.J., Destaing, O., Bruckert, F., O'Halloran, T.J., Cosson, P. and Letourneur, F. (2003) The AP-1 clathrin-adaptor is required for lysosomal enzymes sorting and biogenesis of the contractile vacuole complex in *Dictyostelium* cells. Mol Biol Cell. 14(5), 1835-51.
- Lindau, M. (2003) Synaptotagmin function illuminated. J Gen Physiol. 122(3), 251-3.
- Liu, M., Tarsio, M., Charsky, C.M. and Kane, P.M. (2005) Structural and functional separation of the N- and Cterminal domains of the yeast V-ATPase subunit H. J Biol Chem. 280(44), 36978-85.
- MaKanna, J.A. (1973a) Membrane recycleing: Vesiculation of the amoeba contractile vacuole at systole. Science, 179, 88-90.
- MaKanna, J.A. (1973b) Fine structure of the contractile vacuole pore in *Paramecium*. J. Protozool. 20, 631-638.
- MaKanna, J.A. (1974) Permeability modulationg membrane coats. I. Fine structure of fluid segregation organelles of peritrich contractile vacuoles. J. Cell Biol., 63, 317-322.
- MaKanna, J.A. (1976) Fine structure of fluid segregation organelles of *Paramecium* contractile vacuoles. J. Ulrastruct. Res., 54, 1-10
- May, A.P., Whiteheart, S.W. and Weis, W.I. (2001) Unraveling the mechanism of the vesicle transport

ATPase NSF, the N-ethylmaleimidesensitive factor. J. Biol. Chem. 276, 21991-21994.

- Merzendorfer, H., Graf, R., Huss, M., Harvey, W.R. and Wieczorek, H. (1997) Regulation of protontranslocating V-ATPases. J. Exp Biol. 200(2), 225-235. Review.
- Momayezi, M., Kersken, H., Gras, U., Vilmart-Seuwen, J. and Plattner, H. (1986) Calmodulin in *Paramecium tetraurelia*: localization from the *in vivo* to the ultrastructural level. J. Histochem. Cytochem., 34, 1621-1638.
- Moniakis, J., Coukell, M.B., and Forer, A. (1995) Molecular cloning of an intracellular P-type ATPase from *Dictyostelium* that is up-regulated in calciumadapted cells. J Biol Chem. 24, 270(47), 28276-28281.
- Montalvetti, A., Rohloff, P. and Docampo, R. (2004) A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of Trypanosoma cruzi. J Biol Chem. 10, 279(37), 38673-38682.
- Morgan, A. and Burgoyne, R.D. (1995) Is NSF a fusion protein? Trends Cell Biol. 5, 335-339.
- Naitoh, Y., Tominaga, T., Ishida, M., Fok, A.K., Aihara, M.S., Allen, R.D. (1997a) How does the contractile vacuole of *Paramecium multimicronucleatum* expel fluid? Modeling the expulsion mechanism. J. Exp. Biol., 200(4), 713-721.
- Naitoh, Y., Tominaga, T. and Allen, R.D. (1997b) The contractile vacuole fluid discharge rate is determined by the vacuole size immediately before the start of discharge in *Paramecium multimicronucleatum*. J. Exp. Biol., 200(12):1737-1744.
- Nelson, N. and Harvey, W. (1999) Vacuolar and plasma membrane proton- adenosinetriphosphatases. Physiological Reviews, 79(2),361-385
- Nolta, K.V., Padh, H., and Steck, T.L. (1993) An immunocytochemical analysis of the vacuolar proton pump in *Dictyostelium discoideum*. J. Cell Sci. 105 (3), 849-59.
- Nolta, K.V. and Steck, T.L. (1994) Isolation and initial characterization of the bipartite contractile vacuole complex from *Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem. 269(3), 2225-2233.
- Ostap, E.M., Maupin, P., Doberstein, S.K., Baines, I.C., Korn, E.D. and Pollard, T.D. (2003) Dynamic localization of myosin-I to endocytic structures in *Acanthamoeba*. Cell Motil Cytoskeleton., 54(1):29-40.
- Owen, D.J. and Schiavo, G. (1999) A handle on NSF. Nat.

Cell Biol. 1, E127-E128.

- Padh, H., Lavasa, M., and Steck, T.L. (1991) Reconstitution of the association of endocytic vacuoles and acidosomes from *Dictyostelium*. J. Biol. Chem. 266, 12123-12126.
- Patterson, D.J. (1980) Contractile vacuoles and associated structures. Their organization and function. Biol. Rev., 55, 1-46.
- Riddick, D.H. (1968) Contractile vacuole in the amoeba *Pelomyxa carolinensis*. American Journal of Physiology 215, 736-740.
- Saedeleer, H. de and 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.
- Shmidt-Nielsen, B. and Schrauger, C.R. (1963) Amoeba proteus: studying the contractile vacuole by micropuncture. Science 139, 606-607.
- Sesaki, H., Wong, E.F. and Siu, C.H. (1997) The cell adhesion molecule DdCAD-1 in Dictyostelium is targeted to the cell surface by a nonclassical transport pathway involving contractile vacuoles. J Cell Biol. 25, 138(4), 939-51.
- Spallanzani, L. (1776) Opuscoli di fiscal animale e vegetabile. Modena: Societa Tipografica.
- Stock, C., Allen, R.D., and Naitoh, Y. (2001) How external osmolarity affects the activity of the contractile vacuole complex, the cytosolic osmolarity and the water permeability of the plasma membrane in *Paramecium multimicronucleatum*. J. Exp. Biol. 204 (2):291-304.
- Stock, C., Gronlien, H.K., Allen, R.D. and Naitoh Y. (2002) Osmoregulation in Paramecium: in situ ion gradients permit water to cascade through the cytosol to the contractile vacuole. J. Cell Sci. 115(11), 2339-48.
- Sugino, K., Tominaga, T., Allen, R.D. and Naitoh, Y. (2005) Electrical properties and fusion dynamics of in vitro membrane vesicles derived from separate parts of the contractile vacuole complex of *Paramecium multimicronucleatum*. J. Exp. Biol., 208(20), 3957-3969.
- Sumner, J.P., Dow, J.A., Earley, F.G., Klein, U., Jager, D. and Wieczorek, H. (1995) Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. J. Biol. Chem. 270(10), 5649-5653.
- Suzuki, Y.I., Ohnishi, K., Hirabayashi, T. and Watanabe, Y. (1982) *Tetrahymena* calmodulin. Characterization of

an anti-*Tetrahymena* calmodulin and the immunofluorescent localization in *Tetrahymena*. Exp. Cell Res., 137, 1-14.

- Tani, T., Allen, R.D. and Naitoh, Y. (2000). Periodic tension development in the membrane of the in vitro contractile vacuole of *Paramecium multimicronucleatum*: modification by bisection, fusion and suction. J. Exp. Biol. 203(2), 239-51.
- Tani, T., Allen, R.D. and Naitoh, Y. (2001) Cellular membranes that undergo cyclic changes in tension: Direct measurement of force generation by an in vitro contractile vacuole of *Paramecium multimicronucleatum*. J. Cell Sci. 114(4), 785-95.
- Tani, T., Tominaga, T., Allen, R.D. and Naitoh, Y. (2002) Development of periodic tension in the contractile vacuole complex membrane of paramecium governs its membrane dynamics. Cell Biol. Int., 26(10), 853-860. Review.
- Tominaga, T., Allen, R. and Naitoh, Y. (1998a). Electrophysiology of the in situ contractile vacuole complex of *Paramecium* reveals its membrane dynamics and electrogenic site during osmoregulatory activity. J. Exp. Biol. 201(3), 451-460.
- Tominaga, T., Allen, R.D. and Naitoh, Y. (1998b) Cyclic changes in the tension of the contractile vacuole complex membrane control its exocytotic cycle. J. Exp. Biol., 201 (18), 2647-2658.
- Tominaga, T., Naitoh, Y. and Allen, R.D. (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 (21), 3733-3745.
- Van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B. and Mellman, I. (1992) The small GTP-binding protein Rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. Cell, 70, 729-740.

- Wassmer, T., Froissard, M., Plattner, H., Kissmehl, R. and Cohen, J., (2005a) The vacuolar proton-ATPase plays a major role in several membrane-bounded organelles in Paramecium. J. Cell Sci., 118(13), 2813-2825.
- Wassmer, T., Kissmehl, R., Cohen, J., and Plattner, H. (2005b) Seventeen a-subunit isoforms of Paramecium V-ATPase provide high specialization in localization and function. Mol. Biol. Cell, 28, 1-34.
- Weimer, R.M. and Jorgensen, E.M. (2003) Controversies in synaptic vesicle exocytosis. J. Cell Sci. 116(18), 3661-3666.
- Whiteheart, S.W., Schraw, T. and Matveeva, E. A. (2001) Nethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function. Int. Rev. Cytol.207, 71-112.
- Wiejak, J., Surmacz, L., and Wyroba, E. (2004) Dynaminassociation with agonist- mediated sequestration of beta- adrenergic receptor in single-cell eukaryote *Paramecium. J. Exp. Biol.* 207(10), 1625-1632.
- Xie, Y., Coukell, M.B. and Gombos, Z. (1996) Antisense RNA inhibition of the putative vacuolar H(+)-ATPase proteolipid of Dictyostelium reduces intracellular Ca2+ transport and cell viability. J. Cell Sci. 109 (2), 489-97.
- Zeuthen, T. (1992) From contractile vacuole to leaky epithelia. Coupling between salt and water fluxes in biological membranes. Biochim. et Biophys. Acta, 1113, 229-258.
- Zhu, Q. and Clarke, M. (1992) Association of calmodulin and an unconventinal myosin with the contractile vacuole complex of *Dictyostelium discoideum*. J. Cell Biol., 118, 347-358.
- Zhu, Q., Liu, T. and Clarke, M. (1993) Calmodulin and the contractile vacuole complex in mitotic cells of *dictyostelium discoideum*. J. Cell Sci., 104 (4), 1119-1127.

172