

ミドリゾウリムシの細胞内に認められる管状繊維構造

島田 晴美, 洲崎 敏伸 (神戸大・理・生物)

Tubular filaments in the cytoplasm of *Paramecium bursaria*

Harumi SHIMADA and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

By transmission electron microscopic observation, tubular filaments of 50–60 nm in diameter were found in the cytoplasm of *Paramecium bursaria*, extending from the surface of symbiotic *Chlorella* toward the inside of the cell. The tubular filaments appeared to be membranous structures, as they disappeared after treatment with Triton X-100, while subcortical microtubules remained intact after the detergent treatment. SDS-PAGE and Western blotting showed that *P. bursaria* possesses two proteins, of 35 kDa and 50 kDa, that react with α -tubulin antibodies. The 50-kDa protein is most likely α -tubulin, but the 35-kDa protein is unique to the cytoplasm of *P. bursaria*, and is neither detected in cilia nor originates from the symbiotic *Chlorella*. The origin of the protein and its relationship to the tubular filaments are obscure.

[目的] ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は、細胞内に数百個のクロレラを共生させている。このクロレラをミドリゾウリムシから除去、および再感染させることができることを利用して細胞内共生の確立と維持の研究が進められてきたが、詳しいメカニズムについて多くはわかっていない。本研究ではミドリゾウリムシにおいてクロレラが保持される仕組みに注目し、まず細胞表層で保持されているクロレラ周辺の電子顕微鏡観察を行った。すると、表層に定着しているクロレラの近傍から細胞内部に向かって伸びるように見える直径50~60nmの管状繊維構造が多数観察された。この構造がクロレラの表層保持に関与している可能性を考え、管状繊維構造の構造とその組成の解析を行っている。今回は、この構造が膜構造か微小管かという観点から解析を進めた。

[材料と方法] ミドリゾウリムシは、野外から採取し、無菌培養を行っている K-1株を用いた。細胞内で観察された管状繊維構造が膜構造であるかを検討するため、脱膜処理を行ったサンプルを作成した。0.1% Triton X-100で脱膜処理を行った細胞を、3%グルタルアルデヒド、0.5%オスミウムで固定し、包埋、超薄切片を作成した後、電子染色を施して透過型電子顕微鏡で観察した。管状繊維構造が微小管で

ある可能性を検討するため、免疫電顕法を行うことを目標に先ず SDS-PAGE 後、ウエスタンブロッティングを行い α -チューブリン分子の検出を試みた。繊毛と細胞体のサンプルは、脱繊毛処理を行い、繊毛と細胞体をそれぞれサンプルとした。脱繊毛処理は、集めてきた細胞を5%エタノールで処理し、3分間の vortex 後、遠心で上清と沈殿に繊毛と細胞体を分離させ、それぞれをサンプル作成した。

[結果と考察] 脱膜処理を施したサンプルを透過型電子顕微鏡で観察した結果、繊毛の細胞膜、さらにミトコンドリアの外膜が壊れていることから、細胞内まで十分に脱膜処理が行われていることが確認された。このとき、管状繊維構造は観察されなかった。これに対して、コントロールのサンプルでは管状繊維構造が細胞内の広域にわたって走っているのが観察された。また、微小管は、繊毛内部や細胞表層の直下において、脱膜処理サンプルでもコントロールのどちらのサンプルでも変わらずに観察された。これらのことから、クロレラ周囲で観察された管状繊維構造は微小管ではなく、膜構造である可能性が高い。しかし、微細構造的には脂質二重膜構造は確認できなかった。この管状繊維構造は収縮胞の末端に存在することが報告されている集水管構造である可能性もある。しかし、管状繊維構造は細胞全体に広

く分布していることと、極めて直線性の高い構造である点が集水管構造と異なっている。管状繊維構造が何であるのかについては、今後さらに詳しい解析が必要である。細胞抽出液をサンプルとし、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングを行い α -チューブリン分子の検出を試みた。すると、分子量約50kDaと約35kDaの2本のバンドが検出された。分子量から50kDaのタンパクはチューブリンであると考えられる。通常の緑色ミドリゾウリムシと共生藻をもたない白色のミドリゾウリムシを比較したとこ

ろ、共生藻の有無に関係なく35kDaタンパクは検出された。このことから、このタンパク質は共生クロレラ由来のものではなく、ゾウリムシ由来のものであることが示された。また、 β -チューブリン抗体では35kDaタンパクは検出されなかった。脱繊毛処理を行うことにより繊毛と細胞体とを分離し、それぞれについて35kDaタンパクの有無を調べたところ、35kDaタンパクは繊毛には存在せず、細胞体にのみ認められた。今後解析を進めてこの35kDaタンパクの正体を明らかにしたい。