

ゾウリムシ繊毛内における人工的 ATP 再生系の構築
野口 宗憲¹, 竹村 元志² (¹富山大・院理工, ²富山大・理・生物圏)

Reconstruction of an artificial ATP-regenerating system in the cilia of *Paramecium*

Munenori NOGUCHI¹ and Motoyuki TAKEMURA²

(¹Grad. Sch. of Sci. and Eng., Univ. of Toyama, ²Fac. Sci., Univ. Toyama)

SUMMARY

Cilia of *Paramecium* are long, thin organelles and diffusion from the cytoplasm may not be able to support the high ATP concentrations needed for dynein motor activity and intraflagellar transport (IFT). IFT brings axonemal proteins from the cell body to the ciliary tip. A phosphoarginine (PArg) shuttle system supports the intraciliary ATP concentration in *Paramecium* cilia. In this system, ATP and PArg diffuse into the ciliary compartment through a restricted opening to the cytoplasm. We do not know, however, whether proteins such as arginine kinase are able to diffuse into the ciliary compartment. We tried to construct an artificial ATP-regenerating system in the cilia of *Paramecium*. Exogenous creatine kinase diffused into the ciliary compartment through a restricted opening to the cytoplasm and worked as a phosphocreatine shuttle system. The intraciliary concentration of creatine kinase required for effective regeneration of ATP was estimated to be 7.4 μM .

【目的】 真核細胞の鞭毛・繊毛の形成や維持には、鞭毛内輸送 (intraflagellar transport: IFT) が重要な働きをしている。IFT とは、鞭毛、繊毛を構成する巨大分子や膜小胞などをモータータンパク質が IFT 複合体の cargo として B-チューブル上を輸送する現象である (Pazour and Rosenbaum, 2002)。一方、ATP 等の低分子物質は鞭毛、繊毛の基部から拡散によって繊毛内に送り込まれる。しかし、どのような物質が拡散あるいは IFT によって運ばれるのか明らかではないし、どれくらいの大きさのタンパク質粒子が繊毛基部から繊毛内に拡散しうるのか明らかでない。我々は、ゾウリムシから調製した繊毛膜が付いたままの表層シート (インタクトシート) では、生細胞の場合と同様 ATP 等の繊毛内への拡散は繊毛基部の開口部からのみ可能であることを利用して、ゾウリムシ繊毛内のアルギニンキナーゼ (ArgK) が、繊毛基部から流入するアルギニンリン酸 (PArg) の高エネルギーリン酸を利用して ATP を再生する仕組みである PArg シャトル機構が存在することを証明した (Noguchi et al., 2001)。繊毛内の ArgK は、おそらくは繊毛形成時に IFT によって細胞質から繊毛内に運ばれ所定の部位に固定されていると考えられる。このインタクトシートの繊毛に、外来のクレアチンキナーゼ (CrK) を繊毛基部から投与することにより、

- (1) 繊毛内に CrK が拡散によって流入しうるか、
- (2) 流入した CrK がクレアチンリン酸 (PCr) の存在によって有効に ATP を再生できるかどうかを調べる目的で、ゾウリムシ繊毛内の人工的な ATP 再生系の構築を試みた。

【材料と方法】 実験にはゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) のインタクトシートを用いた (Noguchi et al., 2001)。濾過と遠心によって集めたゾウリムシを洗浄後、先端を絞った駒込ピペットで 2 回ピペティングし、細胞を断片化した。この、細胞断片をスライドガラス上に滴下し、向かい合った両辺にワセリンを塗布したカバーガラスをその上にかぶせ灌流室をつくり、溶液を灌流することによりカバーガラスに貼り付いた細胞表層シートを得た。細胞表層シート上の繊毛の再活性化は、再活性化液を灌流することによって行った。基本となる再活性化液の組成は 1 mM MgCl_2 , 50 mM CH_3COOK , 1mM EGTA, 10 mM Tris-maleate (pH 7.0) で ATP や PArg, PCr, CrK, 0.1% Triton X-100 を実験にあわせて所定の濃度になるように加えた。再活性化溶液を順次灌流することにより、繊毛打の変化を 100W 超高压水銀ランプを光源とした暗視野顕微鏡下で連続的に観察した。繊毛打頻度は、インタクトシートの左半身における 3 つのポイントの繊毛打の一定回数に要する時間を計ることにより計測した。

【結果と考察】 インタクトシートでは繊毛は繊毛膜に覆われているため、再活性化した際 ATP は繊毛基部から流入する。PArg も同様に流入し、ゾウリムシの繊毛内で ATP 再生に利用される。このため、ATP に加え PArg を含む再活性化溶液は、ATP が低濃度の場合顕著に繊毛打頻度を上昇させる。この ATP 再生を担う内在の ArgK は、繊毛内に何らかの形で結合していて繊毛基部から流出しない。また、ゾウリムシには PCr シャトル機構は存在せず繊毛内に CrK は存

在しない。もし外来の CrK と PCr を繊毛基部から与えて内在の PArg シヤトルと同等の繊毛打頻度上昇がみられれば、CrK が繊毛基部から流入し人工の ATP 再生系として機能しうるということが証明できる。そこで、ATP のみで再活性化したインタクトシートの繊毛に ATP に加え PCr 及びウサギ筋肉由来の CrK (Roche 社製) を含む再活性化溶液を灌流して、繊毛打頻度の変化を調べたところ、0.6 mg/ml の CrK によって内在の PArg シヤトル機構と同等の ATP 再生効果を得られることが分かった。これは、CrK の分子量81 kDa から計算すると約7.4 μ M であり、このことは、10 μ M 程度の濃度のキナーゼが繊毛内で有効に ATP を再生しうることを意味する。また、シートを CrK を含まない溶液で洗浄すると CrK は繊毛内か

ら流出してきたことから、CrK は拡散により繊毛内に流入・流出すると考えられる。しかし、CrK の流入には ATP の流入より長い時間を要したことから、ATP の100倍以上の分子量の CrK は繊毛基部の開口部から流入することができるものの繊毛内への拡散にはかなりの抵抗があると考えられる。

[文献]

- Noguchi, M., Sawada, T., and Akazawa, T. (2001) ATP-regenerating system in the cilia of *Paramecium caudatum*. *J. Exp. Biol.* 204, 1063-1071
- Pazour GJ and Rosenbaum JL (2002) Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends in Cell Biol.*, 12, 551-555