
Mini Review

*Amoeba proteus*の収縮胞

西原絵里

兵庫県立大学大学院生命理学研究科生命科学専攻

〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1

Contractile vacuole of *Amoeba proteus*

Eri NISHIHARA

Department of Life Science, Graduate School of Life Science, University of Hyogo.

Harima Science Park City, Hyogo 678-1297

SUMMARY

The contractile vacuole (CV) is an organelle particularized to osmoregulation in protozoa. However, the understanding of mechanism of water uptake is still poor. The aim of the present article is to review the mechanism of water accumulation by CV in *Amoeba proteus*.

To visualize the dynamics of the CV in living cell, we used a styryl dye, FM4-64. Just after systole, the CV membrane was flattened. During diastole, a few vesicles were formed from the membrane and they fused each other before reformation of CV. Staining was maintained during continued contraction cycles. We conclude that the CV membrane is maintained during the CV cycle.

Based on the water permeability, the presence of aquaporin in the CV membrane has been predicted and we succeeded in cloning an aquaporin gene from *A. proteus* (*ApAQP*). Immunofluorescence microscopy with anti-*ApAQP* antibody revealed that *ApAQP* was localized on the CV membrane and the vesicles around CV. This is the first success in explaining high water permeability of the CV membrane by aquaporin. In addition, we found that V-ATPase was highly concentrated on the vesicle membranes around CV. These finding suggest that vesicles are involved in generating the osmotic gradient via the activity of V-ATPase and that water moves into the vesicles along the osmotic gradient.

*Corresponding author

Tel: +81-3-5803-5392, FAX: +81-3-5803-5215

e-mail: eniskid@twd.ac.jp

Received: 11 January 2007

1. はじめに

原生動物は収縮胞 (contractile vacuole, CV) と呼ばれる特殊な細胞小器官によって浸透圧調節を行う。近年、細胞性粘菌 *Dictyostelium* や繊毛虫 *Paramecium* において収縮胞複合体 (contractile vacuole complex, CVC) 関連タンパク質や生理学的機能について報告されている (Clarke M., et al., 2002; Sugino K., et al., 2005; Wassmer et al., 2005)。しかしながら、収縮胞への水集積機構について明らかにされていない。

Amoeba proteus (以下アメーバ) は‘アメーバ運動’であまりにも有名ではあるが、それ以上に魅惑的なのが‘アメーバの収縮胞’である。アメーバは収縮胞を1つもち、直径20~30 μm の球状構造をとる。その大きさゆえに、光学顕微鏡下での操作・観察に適している。また、収縮胞は細胞表層部に固定されており、容易に取り出すことができる。これらの特性を活かし、収縮胞への水集積機構の解明を目指し研究を行ってきたのでそれについて要約する。収縮胞複合体全般に関する知見については、石田正樹博士と富永貴志博士の総説 (Ishida and Tomimaga, 2006) を参考にさせていただきたい。

2. 収縮胞の微細構造

原生動物の収縮胞の多くはスポンジーム (spongiome) と呼ばれる小胞や管状構造に取り囲まれている (Patterson, 1980)。アメーバ収縮胞を電子顕微鏡で観察した結果、その周辺には多数のベシクル (約50 nm) の存在が確認できた (図1A)。また、このベシクルは収縮胞へ融合しているように見えた (図1B、矢じり)。このことから、アメーバ収縮胞は収縮胞膜とベシクル膜から構成され、ベシクルが収縮胞へ融合し、水を集積することが考えられた。

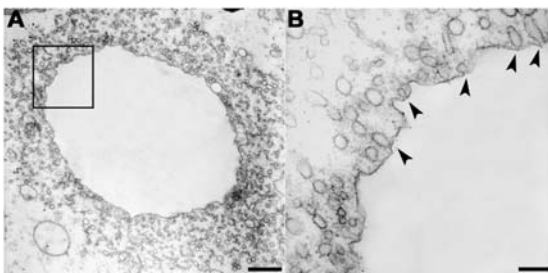


図1. 収縮胞の微細構造
スケールバー、500 nm(A)、100 nm(B)。

続いて、圧着凍結固定したアメーバを電子顕微鏡で観察した結果、細胞膜と収縮胞膜が直接融合していると思われる構造が観察された (洲崎敏伸博士 (神戸大学) との共同研究)。さらに、収縮胞孔 (CV pore) 部分には通常細胞膜表面にある糖衣 (glycocalyx) が見られなかった。

3. 収縮胞の動態

アメーバの収縮胞は収縮直後に全ての膜がベシクル化し、それらが融合することで再び形成されることが報告されている (McKanna, 1973; Patterson, 1980)。しかし、生体内における収縮胞の動態は明らかにされていない。そこで、エンドサイトーシスのトレーサーであるFM4-64 (Betz WJ, et al., 1992) を用いてアメーバ細胞の生体染色を行った。その結果、収縮胞が強く染色されたので、これを利用し、s生体内における収縮胞の動態を解析した (図2)。収縮直後、膜が凝集し、続いて、その膜から多数の小胞が形成された (図2A)。これら小胞は常に連結しており、顆粒質が流動している場合でも離れなかった。その後、小胞どうしが融合して収縮胞が再び形成され (図2B)、2~4分かけて膨張した後 (図2C)、収縮した。収縮直後、全ての膜がベシクル化

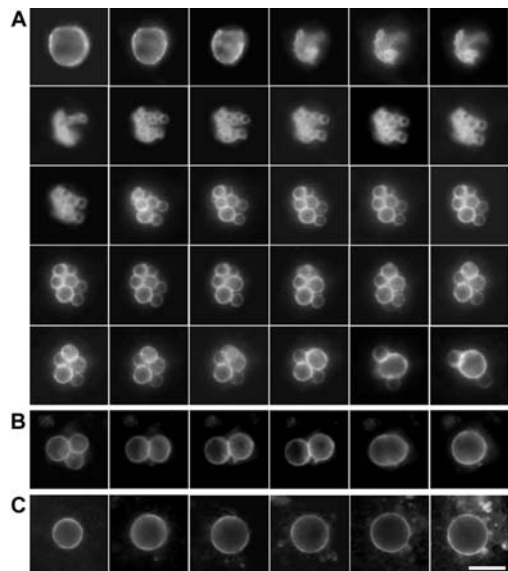


図2. 収縮胞の動態 (Nishihara et al., 2007)
スケールバー、20 μm 。

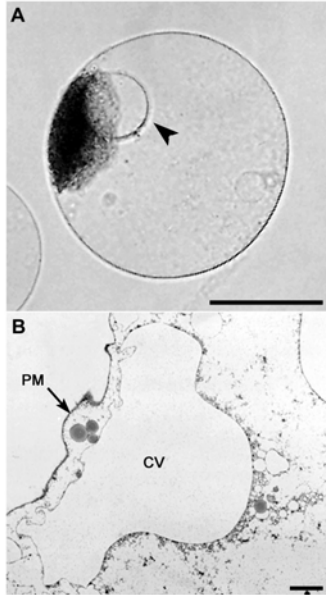


図3. 収縮胞を含む膜ゴーストの光学顕微鏡観察 (A) と電子顕微鏡観察 (B)
スケールバー、20 μm (A)、2 μm (B)

するかどうかについては今後の課題であるが、収縮胞は独立した膜からなり、短時間で劇的に形態を変えて水の集積・排出を行うことがわかった (Nishihara et al., 2007)。

4. 収縮胞を含む膜ゴーストの作製

アメーバ細胞を、Percollによる密度勾配遠心にかけ、収縮胞を含む細胞断片、膜ゴーストを得た (図3A、矢じり、収縮胞)。この膜ゴーストを電子顕微鏡により観察した結果、ベシクルが遠心方向に偏って存在していた (図3B、PM、細胞膜; CV、収縮胞)。収縮胞膜からベシクルが離れずに存在していたことから、細胞内においても収縮胞とベシクルが連結していることが示唆された。

5. 収縮胞の水集積

収縮胞膜の性質を調べるため、細胞から遊離した収縮胞を用いて生理学的解析を行った。遊離収縮胞周辺に高張液を灌流すると、その体積は急速に減少した。このことから、収縮胞膜は半透性であることがわかった。収縮胞は浸透圧差を利用して水を

集積している可能性が高い。さらに、この実験からアメーバ収縮胞膜の水透過係数を求めると、0.94 ($\mu\text{m}^2/\text{sec} \cdot \text{OsM}$) であった。これは、赤血球膜の水透過係数と近い値であった (Tazawa and Shimmen, 1987)。赤血球膜には水チャネル、アクアポリン (Aquaporin, AQP) が存在することが知られている (Preston MG, et al., 1992)。このことから、アメーバ収縮胞膜にもアクアポリンの存在が示唆された (Nishihara E, et al., 2004)。

そこで、アメーバAQP遺伝子 (ApAQP) の単離を試みた。その結果、アメーバからAQP様遺伝子の単離に成功した。これまでに寄生性原生動物 *Plasmodium* や *Trypanosoma* においてAQPのクローニングが報告されている (Hansen et al., 2002; Montalvetti et al., 2004) が、生理学的解析は乏しい。その遺伝子から推定されるアミノ酸配列はAQPに特異的な構造をとることがわかった。また、*Xenopus oocyte* を用いた解析より、ApAQPは水チャネルの機能を持つことがわかった (且原真木博士 (岡山大学資源生物科学研究所) との共同研究)。続いて、抗ApAQP抗体を作製しその抗体を用いてアメーバ細胞を免疫染色した。その結果、収縮胞のみに強い蛍光が確認できた (図4A)。また、収縮直後や膨張期にも蛍光を確認することができた。さらに、膜ゴーストを免疫染色

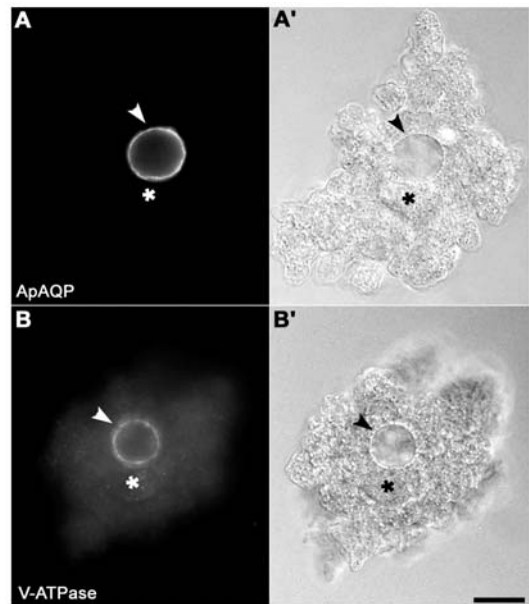


図4. 抗ApAQP抗体 (A) と抗V-ATPase抗体 (B) による免疫染色像
矢じりは収縮胞、アスタリスクは核を示す
スケールバー、25 μm 。

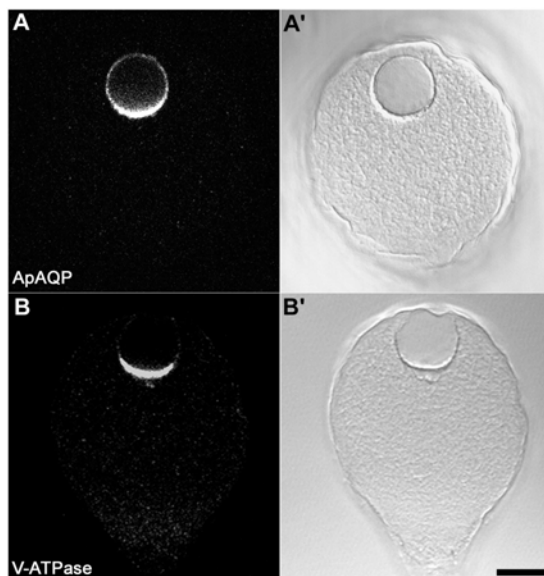


図5. 膜ゴーストにおける抗ApAQP抗体 (A) と抗V-ATPase抗体 (B) による免疫染色像
スケールバー、10 μ m。

した結果、収縮胞膜に蛍光が確認できた (図5A)。また、その蛍光に偏りがあったため、アクアポリンは収縮胞膜だけではなく、その周辺のベシクルにも存在すると考えられた。このことから、アクアポリンを介して収縮胞へ水が集積することが強く示唆された。

収縮胞膜が半透性を持つことから、水は膜内外の浸透圧差によって動くと考えられる。この浸透圧差形成にはプロトンポンプの関与が考えられている (Heuser J., et al., 1993)。そこで、小胞由来のプロトンポンプであるV-ATPaseに注目し、解析した。アメーバ細胞を抗V-ATPase抗体 (森山芳則博士 (岡山大学大学院・自然科学研究科) からのご供与) により免疫染色した結果、収縮胞付近に蛍光が観察できた (図4B)。また、収縮直後、膨張期にも蛍光が確認できた。さらに、膜ゴーストを抗V-ATPase抗体で免疫染色した結果、蛍光に偏りがあり、その蛍光は収縮胞膜のそれよりも強かった (図5B)。このことから、V-ATPaseは収縮胞周辺のベシクルに多く存在し、これらが水を集積するための浸透圧差形成に関与していることが示唆された。

6. 今後の課題

Paramecium 収縮胞内のイオン活性 (K^+ と Cl^-) が細胞内より約2倍高いことが報告されている (Stock et al., 2002)。つまり、V-ATPaseによって形成されたプロトン濃度勾配がこれらのイオンの輸送に用いられ、その結果、浸透圧差が形成され水が集積することが考えられる。では、収縮胞収縮時にはそれらのイオンが細胞外へ排出されるのであろうか。細胞内と等張もしくはそれ以上の浸透圧差を形成するイオンの量は多く、収縮するたびにそれらが捨てられるのか、疑問である。アメーバを純水中で培養した場合でも収縮胞のサイクルは停止することなく機能し、水を集積し続けた。今後、収縮胞内の浸透圧差形成にはどのような物質が関与しているのか、それらが再吸収されるのか、そういった点について明らかにする必要がある。

7. 謝辞

私の大学院での研究をまとめた形でミニレビューを書かせていただきました。アメーバ収縮胞を研究するにあたって、多くの方々からのご教授に厚くお礼を申し上げます。最後に、浸透圧の概念を教えてくださいました新免輝男教授、そしてアメーバのおもしろさ、細胞モデルという側面からの観察法を教えてくださいました園部誠司助教授に深謝いたします。

8. 参考文献

- Betz, W.J., Mao, F. and Bewick, G.S. (1992) Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J. Neurosci.* 12, 363–375
- Clarke, M., Kohler, J., Arana, Q., Liu, T., Heuser, J. and Gerisch G. (2002) Dynamics of the vacuolar H(+)-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of *Dictyostelium* cells. *J Cell Sci.* 115, 2893–2905.
- Hansen, M., Kun, J. F. J., Schultz, J. E. and Beitz, E. (2002) A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J. Biol. Chem.* 277, 4874–4882.
- Heuser, J., Zhu, Q. and Clarke, M. (1993) Proton pumps populate the contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* 121, 1311–1327.
- Ishida, M. and Tominaga, T. (2006) Contractile vacuole

- complex in *Paramecium*. Jpn. J. Protozool. 39, 157-172.
- McKanna, J.A. (1973) Membrane recycling: vesiculation of the amoeba contractile vacuole at systole. *Science* 179, 88-90.
- 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.* 279, 38673-38682.
- Nishihara, E., Shimmem, T. and Sonobe, S. (2004) Functional characterization of contractile vacuole isolated from *Amoeba proteus*. *Cell Struct. Funct.* 29, 85-90.
- Nishihara, E., Shimmem, T. and Sonobe, S. (2007) New aspect of the membrane dynamics of the *Amoeba proteus* contractile vacuole revealed by vital staining with FM4-64. *Protoplasma* 231, 25-30.
- 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, 2339-2348.
- 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, 3957-3969.
- Tazawa, M. and Shimmen, T. (1981) Regulation of water and ions. In "Water and Ions" ed., Kumazawa, K. Asakusa-shoten, Tokyo Japan. pp.18-77 (in Japanese).
- Patterson, D.J. (1980) Contractile vacuole and associated structure; their organization and function. *Biol. Rev.* 55, 1-46.
- Preston, G. M., Jung, J. S., Guggino, W. B. and Agre, P. (1993) The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J. Biol. Chem.* 268, 17-20.
- Wassmer, T., Froissard, M., Plattner, H., Kissmehl, R. and Cohen, J. (2005) The vacuolar proton-ATPase plays a major role in several membrane-bounded organelles in *Paramecium*. *J. Cell Sci.* 118, 2813-2825.

