

## 高塩濃度処理によるゾウリムシ繊毛軸系内カルモジュリンの 存在状態変化の検出

久富 理, 野口 宗憲 (富山大学・院理工・生物圏)

### The effect of a high-salt extraction on the calmodulin within ciliary axonemes of *Paramecium*

Osamu KUTOMI and Munenori NOGUCHI

(Department of Environmental Biology and Chemistry, Faculty of Science, University of Toyama)

#### SUMMARY

The cilia on the demembrated cortical sheets of *Paramecium* lose the ability to cause “ciliary reversal” after a short period of extraction with a solution containing 0.5 M KCl. A portion of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein calmodulin (CaM) seems to be removed from ciliary axonemes by the extraction. However, we do not know what kind of structural changes are induced by the treatment. We used immunofluorescence labeling to examine the change in binding of anti-CaM antibodies to the ciliary axonemes after the high-salt extraction. The ciliary axonemes that were subjected to high-salt extraction were labeled more intensely than those that were not subjected to high-salt extraction. Similar results were obtained when isolated ciliary axonemes were used instead of cortical sheets. These results suggest that the removal of “ciliary reversal” in ciliary axonemes (extracted with 0.5 M KCl for a short period) is caused by some conformational changes around CaM in the ciliary axonemes.

[目的] 繊毛・鞭毛運動の調節において cAMP, cGMP,  $\text{Ca}^{2+}$ などのセカンドメッセンジャーが重要な役割を担っていると考えられている。ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は繊毛運動を調節することによって様々な行動を示し、とりわけ繊毛内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が 1  $\mu\text{M}$  以上に上昇すると繊毛逆転を引き起こし、後方遊泳することはよく知られているが (Naitoh Y and Kaneko H, 1972),  $\text{Ca}^{2+}$ による繊毛運動制御の分子機構についてほとんど明らかにされていない。

我々は、ゾウリムシの表層シートに KCl による短時間の高塩濃度処理を施した後、繊毛を ATP で再活性化すると  $\text{Ca}^{2+}$ が存在しているにもかかわらず繊毛逆転が起こらなくなる「繊毛逆転解除」が起こることを見いだした。さらに、KCl 処理によって繊毛軸系内から  $\text{Ca}^{2+}$ 受容タンパクであるカルモジュリン (CaM) が抽出されてくることがわかった。しかし、KCl の高塩濃度処理によって繊毛軸系にどのような構造変化が生じているか不明である。

そこで、本研究では、抗 CaM 抗体を一次抗体とする蛍光抗体法を用いて、高塩濃度処理に伴う繊毛軸系に対する抗 CaM 抗体の反応の変化を観察した。

[材料と方法] 実験にはゾウリムシの表層シートと単離した繊毛を 0.05% Triton-X 100 で除膜したものを用いた。シートは濾過と遠心によって集めたゾウリムシを洗浄した後、先端を細く絞った駒込ピペットで 2 回ピペッティングをして細胞を断片化した (Noguchi et al., 2001)。この細胞の断片をスライドガラス上に滴下し、その上に二辺にスベーパーとしてワセリンを塗ったカバーガラスをかぶせ灌流室をつくり、ワセリンを塗っていない辺の一方から K-acetate solution

(10 mM Tris-maleate pH 7.0, 50 mM K-acetate) を灌流することでカバーガラスに接着した表層シートを得た。繊毛の単離は Mogami と Takahashi (1983) の方法を改変して調製をし、表層シートと同様にしてプレパラートを作成した。繊毛の再活性化、除膜、高塩濃度処理、そして蛍光染色は一貫して溶液を灌流することによって行った。基本的な再活性化溶液は 10 mM Tris-maleate (pH 7.0), 50 mM K-acetate, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  で、ATP や Triton X-100, カリウム塩を実験にあわせ所定の濃度となるように加えた。 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は 1 mM EGTA を用いた  $\text{Ca}^{2+}$ 緩衝液で調節した。蛍光抗体法は、様々な条件下で高塩濃度処理をした繊毛軸系を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶かした 5% スキムミルクでブロッキングをした後、一次抗体 (Monoclonal mouse anti-CaM), FITC で蛍光標識をした二次抗体 (Rabbit anti-mouse IgG) の順に反応させ、蛍光顕微鏡で観察をした。一次抗体、二次抗体はともに Sigma 社のものを使用した。

[結果と考察] KCl による高塩濃度処理は、 $\text{Cl}^-$ の持つタンパク分子同士の疎水結合を弱めるカオトロピックな性質を利用し、ゾウリムシなど多くの真核生物の繊毛・鞭毛運動のモータータンパク質であるダイニン (特に外腕ダイニン) を抽出するのによく利用されている。KCl 処理によって繊毛軸系内の CaM が抽出されてくることから、KCl 処理後は抗 CaM 抗体は繊毛軸系と結合しなくなり繊毛軸系は蛍光を示さないという仮定をもとに実験を行った。しかし、コントロール実験として高塩濃度処理をしていない除膜シートを蛍光染色したが繊毛軸系はほとんど蛍光

を示さず、逆に 0.5 M KCl による高塩濃度処理を 1 分間行ったシートでは繊毛軸系全体が蛍光を示すという結果が得られた。そこで、0.5 M KCl による高塩濃度処理を 0~20 分の間で時間を変えて行った後、ATP で再活性化をしたときの繊毛運動を観察した後、蛍光抗体法で染色した繊毛軸系が示す蛍光の様子を観察した。その結果、1 分間以上処理をしたとき繊毛逆転解除が起こり、このとき繊毛軸系が蛍光を示した。このことから、繊毛逆転解除が起こった状態の繊毛軸系内の CaM は抗 CaM 抗体と結合できるようになり、その結果繊毛軸系全体が蛍光を示すものと考えられる。

次に、KCl 以外のカオトロピックな性質の異なる陰イオンのカリウム塩（今回は KNO<sub>3</sub>, KI, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K-acetate）で高塩濃度処理をした除膜シートに蛍光染色を施した。その結果、KNO<sub>3</sub> 処理した繊毛軸系は KCl 処理したときと同じくらいの蛍光を示した。Cl<sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> はカオトロピックな性質が類似しており、繊毛運動に対する作用も KCl と同様で繊毛逆転解除が見られたことから、繊毛逆転解除状態を引き起こす軸系の構造変化と抗 CaM 抗体の結合しやすさとは対応関係があると考えられる。Cl<sup>-</sup> よりもカオトロピックな性質が弱い K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> と K-acetate で処理したとき

は、繊毛運動に若干の阻害作用が見られるが、繊毛逆転解除は起きず、このときの繊毛軸系は弱い蛍光しか示さなかった。

シート上の繊毛軸系の場合と同様の実験を単離した繊毛軸系で行ったところ、KCl による高塩濃度処理を行ったものは軸系全体が蛍光を示し、シートと同様の結果が得られた。

以上のことから、KCl による高塩濃度処理によって繊毛逆転解除状態となった繊毛軸系は、繊毛軸系内の CaM が存在する部位に何らかの変化が起こっており、それが繊毛逆転解除を引き起こす原因であると考えられる。

#### 【文献】

- Mogami Y, Takahashi K (1983) Calcium and microtubule sliding in ciliary axonemes isolated from *Paramecium caudatum*. J Cell Sci 61: 107-121
- Naitoh Y, Kaneko H (1972) Reactivated Triton-extracted models of *Paramecium*: modification of ciliary movement by calcium ions. Science 176: 523-524
- Noguchi M, Sawada T, Akazawa, T (2001) ATP-regenerating system in the cilia of *Paramecium caudatum*. J Exp Biol 204: 1063-1071