

Paramecium multimicronucleatum における細胞内導入された
ミトコンドリア分画の細胞内消化過程の蛍光抗体法による解析

勝原 崇, 市野 綾子, 谷口 摩依, 峠 千尋, 楨原 尚美, 谷 佳奈子, 石田 正樹
(奈良教育大学理科教育講座)

Immunofluorescence study on the intracellular digestion process of a microinjected
mitochondria fraction in *Paramecium multimicronucleatum*

Takashi KATSUHARA, Ayako ICHINO, Mai TANIGUCHI, Chihiro TOUGE, Naomi MAKIHARA,
Kanao TANI and Masaki ISHIDA (School of Science Education, Nara University of Education)

SUMMARY

Autophagy is an ubiquitous process that occurs in all eukaryotic cells. During autophagy, cytosol and organelles are sequestered within double-membrane vesicles that deliver their contents to a lysosome/vacuole in which the macromolecules are degraded and recycled. Substantial progress has been made in identifying the proteins that are required for autophagy and in understanding its molecular basis; however, many questions remain unanswered. For example, neither the mechanism of vesicle formation nor the origin of the donor membrane is known. To study the mechanism of autophagic vacuole formation, we microinjected an isolated fraction of mitochondria of *Paramecium multimicronucleatum* into the cells of an identical clone. Prior to the microinjection, the isolated mitochondria fraction was stained with 5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) and was physically damaged by slow freezing. The isolated mitochondrial fraction was then analyzed for digestive vacuole (DV) membranes using three monoclonal antibody markers. We used mAb anti-B2 antigen, mAb anti-B3 antigen, or mAb anti-C5 antigen as the marker for membranes of discoidal vesicles/cytopharynx/DV-I, acidosome/DV-II, or all the DVs, respectively. Immunofluorescence studies of these mAb markers demonstrated that the membranes of vacuole-containing JC-1 were labeled with the three markers that were used. The injected mitochondria fraction was therefore definitely delivered to the lysosomal system. This probably occurred because the mitochondrial fraction was recognized as exogenous material by the cell itself, even though the fraction was of endogenous origin.

【目的】自食作用は、細胞内部において老朽化、損傷などによって活動不能となった器官を自ら消化する現象であり、ヒトを含む多くの真核生物において存在すると考えられている。これまでの研究で、癌の抑制や病原体への耐性、寿命の伸長など生物における様々な生体機能に関わっていることが示されている。Klionsky (2005) のレビューによれば、近年の多くの研究により自食作用に関わる多種のタンパク質が発見されているものの、各々のタンパク質の役割については不明な点が多い現状である。さらに、自食胞膜の由来についても、滑面小胞体から由来するとされているものの、滑面小胞体の定義自体曖昧であり、細胞質中の類似した形態を持つ膜系の総称である。よって自食胞膜の由来もまた、実質上不明である。本研究では、*Paramecium multimicronucleatum* の細胞内に、あらかじめ単離・染色しておいたミトコンドリア分画を導入した。本研究に用いた細胞群は、元来 1 個の細胞が分裂によって増殖した単一のクローン集団である。この集団から単離されたミトコンドリアは、したがって、同一クローン集団内で移植を行っても、自己非自己といった免疫的認識により排除されることはないと考えられる。そこで、本研究では、単離した分画に物理的ダメージを加えた後に細胞内に導入し、導入された分画による自食胞形成誘導の可能性を検証する。また、導入された分画の初期消化過程における膜の由来を探ることを目的とした。

【材料と方法】*P. multimicronucleatum* (syngen 2) は、無菌的に合成培地を使用して 24口にて培養した (Fok and Allen, 1979)。培養した細胞は、対数増殖期にて収穫した。ミトコンドリア分画の精製および 5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetaethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1, Molecular Probes, Inc., Netherlands) による染色は、谷口等 (2007) の方法に従った。比較的緩やかな凍結による氷晶形成により物理的ダメージを与え、これを IM 300 (NARISHIGE, Tokyo) を用いて、Ishida et al. (1993) の方法に従い、細胞体積の 2.3%程度にて細胞内導入した。*P. multimicronucleatum* および、3種の食胞膜標識である mAb anti-B2 antigen, mAb anti-B3 antigen, mAb anti-C5 antigen は、Agnes K. Fok¹ と Richard D. Allen² (¹Biology Program, ²Pacific Biosciences Research Center, University of Hawaii, Honolulu, HI 96822)の好意により分与された。

【結果と考察】*P. multimicronucleatum* の消化サイクルは、細胞咽頭における食胞 (digestive vacuole, DV) の形成に始まり、細胞肛門での未消化物排泄に至るまで、生化学・免疫組織化学的性質から 4つの段階に分けられており、それぞれ食胞形成過程 (DV-I)、酸性化過程 (DV-II)、消化過程 (DV-III)、排泄過程 (DV-IV) として識別されている (Allen and Fok, 2000)。本研究で用いた抗体、mAb anti-B2 antigen

は、食胞形成過程に属する DV-I および、そのドナー小胞である円盤小胞に共通する膜抗原を認識する。また、mAb anti-B3 antigen は、酸性化過程に属する DV-II およびそのドナー小胞である酸性小胞に共通する膜抗原を認識する。そして、mAb anti-C5 antigen は、DV-I から DV-IV に至るすべての食胞膜系に共通する膜抗原を認識する。これらの抗体は、FITC の緑色蛍光によりそれぞれ直接標識した。一方、ミトコンドリア分画の標識として用いた JC-1 は赤色蛍光を持つ。これらの異なる蛍光色の分布を比較することで、食胞膜系と導入された分画の分布を比較した。

ミトコンドリア分画を細胞内導入された細胞は、培養液中でそれぞれ 15分、30分、45分、60分、および 90分のインキュベーション後に化学固定された。全ての細胞において、細胞内導入された分画により、細胞質中に JC-1 の赤色蛍光が観察された。ミトコンドリア分画は、導入 15分後では細胞質中に分散しているように観察されるが、30分後には細胞質中に塊として集積するように観察される。このことは、導入された分画の細胞内消化が起こっていることを暗に示していた。そこで、分画導入後に固定した細胞を、mAb anti-B2 antigen, mAb anti-B3 antigen, mAb anti-C5 antigen により標識・蛍光観察した。mAb anti-C5 antigen の蛍光観察においては、導入後 30分の JC-1 の分布が、mAb anti-C5 antigen の蛍光分布とほぼ一致していた。すなわち、導入された分画は、食胞系の膜により取り囲まれた可能性が示された。また、mAb anti-B3 antigen の蛍光観察においては、導入後 45分に mAb anti-B3 antigen により標識された DV-II が、JC-1 の蛍光を内包する様子が観察された。

Paramecium の細胞内消化経路には酸性小胞およびライソソームが存在し、これらの小胞膜と食胞膜との融合で、食胞内部の消化が進行する。酸性小胞やライソソームは、食胞の特定のステージのみ融合可能であり、被融合膜系が存在して始めて融合することができる (Allen and Fok, 2000)。すなわち、この JC-1 で示される細胞内導入された分画の細胞内分布と DV 膜抗原の標識分布の一致は、導入された分画を取込む膜系の存在を示している。これら二つの抗体を用いた結果から、導入されたミトコンドリア分画は、食胞による細胞内消化を受けていることが示された。

一方、mAb anti-B2 antigen の蛍光観察では、導入後 30分に集積した JC-1 を取り囲む mAb anti-B2 antigen の標識が観察されたが、mAb anti-B2 antigen の標識が JC-1 の標識を内包しているか否かは不明瞭であった。この結果は、導入された分画の消化を行う食胞膜の形成では、そのドナーとして円盤小胞膜が利用されているという可能性を示唆している。しかしながら、一方では、導入分画を消化する食胞膜がすでに形成されており、その膜に円盤小胞膜が融合しているという可能性も考えられる。したがって、現段階においては、形成初期段階での自食胞膜

の由来を特定するには至らないと結論づけた。今後、分画導入後 30 分以内における詳細な免疫組織化学的観察あるいは電子顕微鏡による形態観察が望まれる。

[文献]

- 1) Allen R.D. and Fok A. K. (2000) *Int Rev Cytol.*, 198: 277-318.
- 2) Fok A.K. and Allen R.D. (1979) *J. Protozool.*, 26: 463-470.
- 3) Ishida M., Aihara M.S., Allen R.D. and Fok A.K. (1993) *J. Cell. Sci.*, 106: 693-702.
- 4) Klionsky, D.J. (2005) *J. Cell Sci.* 118: 7-18.
- 5) 谷口、峠、榎原、石田 (2007) 奈良教育大学附属自然環境教育センター紀要, 8: 1-8.