

ユーグレナ類ペラネマ *Peranema trichophorum* のムコシストの微細構造

吉見 英明, 洲崎 敏伸 (神戸大・院理・生物)

Ultrastructural analysis of mucocysts in the euglenoid flagellate
Peranema trichophorum

Hideaki YOSHIMI and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

Peranema trichophorum shows unique unidirectional gliding cell locomotion on the substratum at speeds up to 30 $\mu\text{m/s}$, which is the highest among all gliding microorganisms. We showed that treatment with 0.1–0.2 mM nicotinamide induced discharge of mucocysts from *P. trichophorum*, and that cell gliding was inhibited concomitantly with the treatment, suggesting a possible involvement of mucocyst discharge in gliding cell locomotion. Using negative-staining electron microscopy, the ejected content of the mucocyst was observed as an elongated shaft-like structure, 1,400 nm long and 230 nm wide, with characteristic helical striations. Ultrathin sectioning of intact *P. trichophorum* after fixation by freeze substitution revealed that the shaft-like structures in the intact mucocysts are shorter and wider in appearance (1,000 nm in length and 350 nm in width), with electron opaque materials inside the shaft. One tip of the mucocyst was found to be docked to the interlocking zone of the pellicular structure, where edges of the adjacent pellicular strips are mutually associated at the cell surface.

【目的】ペラネマは単細胞生物の中で最も高速の滑走運動をし、それは鞭毛上にあるマスティゴネマと基底面との相互作用により生み出されていることがわかっている¹⁾。今回、低濃度のニコチン酸アミド溶液にペラネマを入れるとムコシスト (mucocyst) が放出されることがわかった。このとき、鞭毛の短縮

やマスティゴネマの構造に変化がないにも関わらず、滑走運動の速度の低下が確認された。これよりムコシストの放出と滑走運動にはなんらかの関係性があるのではないかと考え、ペラネマの細胞の内外にあるムコシストの微細構造を観察した。

[方法]

ニコチン酸アミド溶液中での滑走運動速度の測定

ペラネマ *Peranema trichophorum* は、前回報告した市販牛乳を入れた培地にて *Chlorogonium* を餌として用い、無菌二者培養した²⁾。細胞を 400 g で 5 分間遠心分離した沈殿に洗浄液 (0.01% Knop, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.0) を加え懸濁した。シャーレに洗浄液を入れたものを 3 つ用意し、それらの 2 つにニコチン酸アミドを最終濃度が 0.1 mM と 0.2 mM になるように加えた。ペラネマ懸濁液を再度 400 g で 5 分間遠心し、沈殿を上記のシャーレに入れた。1 時間経過後に、滑走しているペラネマをビデオ録画し、各シャーレから滑走運動しているペラネマを 10 個体ずつ選び滑走運動の速度を測定した。速度を測定後に微分干渉顕微鏡でペラネマの鞭毛の長さを観察した。また、録画してから 1 時間後に、常法に従い、グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムでの二重化学固定を行い、Spurr 樹脂に包埋した後、超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡観察を行った。

ムコシストの放出過程の観察：洗浄液にニコチン酸アミドを最終濃度が 5 mM と 1 mM になるように加えたチューブと加えないチューブを各 2 本用意し、そこに洗浄液で洗浄したペラネマの沈殿を入れた。ペラネマを入れてからそれぞれの濃度の溶液で一方は 5 秒後、もう一方は 60 秒後にグルタルアルデヒドで固定した。その後サンプルを四酸化オスミウムで後固定し、透過型電子顕微鏡観察を行った。

ムコシストの細胞体内での分布と微細構造の観察及び大きさの測定：洗浄液で洗浄したペラネマの沈殿を 1 mM のニコチン酸アミドに入れた。1 分後にそのサンプルの一部を酢酸ウランによりネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。残りのサンプルは 20,000 g で 10 分間遠心し、得られた沈殿を化学固定し、透過型電子顕微鏡観察を行った。また、洗浄液で洗浄したペラネマの懸濁液を液体窒素にて瞬間的に凍結固定し、常法に従い凍結置換処理を行い透過型電子顕微鏡観察を行った。またそれぞれのサンプルから 20 個のムコシストを選び、長さおよび幅を測定した。

[結果] ニコチン酸アミド溶液中での滑走運動速度の測定：10 個体の平均速度は、ニコチン酸アミドを加えていない洗浄液中で 35.7 $\mu\text{m/s}$ 、ニコチン酸アミド濃度が 0.1 mM の溶液中で 27.4 $\mu\text{m/s}$ 、0.2 mM で 19.9 $\mu\text{m/s}$ であり、濃度依存的に滑走速度が低下することがわかった。またウェルチの t 検定により有意差も認められた。速度を測定後に微分干渉顕微鏡でペラネマの鞭毛の長さを観察したが、有意な差は認められなかった。また透過型電子顕微鏡観察にて鞭毛及びマスティゴネマの形態に差異は認められなかった。

ムコシストの放出過程の観察：ペラネマを入れてから 5 秒後にグルタルアルデヒドで固定した場合は、ニコチン酸アミド濃度が 5 mM 及び 1 mM のサ

ンプルで放出過程のムコシストを観察できた。一方ペラネマを入れてから 60 秒後に固定したサンプルでは放出過程のムコシストを観察できなかった。

ムコシストの細胞体内での分布と微細構造の観察：ニコチン酸アミド処理により、多量のムコシストの内容物が外液中に認められた。ムコシストの内容物は、中空のシャフト状の構造をしており、中央部には電子密度の高い帯状の構造が認められた。ネガティブ染色したサンプルにて放出されたムコシストの内容物の表面を観察すると、シャフトの壁には左巻きと右巻きの線状の構造が見られた。それらはシャフト構造の長軸方向と約 75.4 度の角度で交わっており、両巻きの線によって規則正しい菱形構造が形成されていた。この微細構造は凍結置換処理したサンプルのムコシストでも観察できたが、線と長軸方向のなす角はネガティブ染色の場合とは異なり、約 38.0 度であった。ムコシストの内容物の長さおよび幅の平均はネガティブ染色したサンプルで 1,400 nm と 230 nm、化学固定をしたサンプルでは細胞体内にあるムコシスト中で 1220 nm と 150 nm、細胞外へ放出されたものでは 1350 nm と 120 nm、凍結置換したサンプルでは細胞体内で 1030 nm と 350 nm であった。また細胞体内においてムコシストはペリクルの切れ目の部分で原形質膜にドッキングしており、細胞表面の直下に一様に分布していた。

[考察] ムコシストはエクストルソームの一種である。エクストルソームの機能としては、一般的には餌の捕食、外敵への攻撃、外敵からの防御、細胞体表面の保護、シスト壁の形成、などがあげられる。ペラネマのムコシストは、これらのいずれの機能も果たしている様子はなく、その機能は不明である。今回、ムコシストの放出により滑走運動が低下することがわかり、ムコシストの放出と滑走運動に関連がある可能性が初めて示された。細胞体の表面にはマスティゴネマにきわめて類似した微細な毛が多数存在しており、これが鞭毛に移行してマスティゴネマとなる可能性がある。ムコシストが滑走運動に関与することを説明する仮説の一つとして、ムコシストの内容物が細胞表面の毛の形成に関与している可能性が考えられる。すなわち、ニコチン酸アミドの効果として、ムコシストの内容物が放出され尽くした結果、鞭毛でのマスティゴネマが欠乏し、滑走運動の阻害につながった可能性がある。今後はムコシストの内容物の成分を単離し、滑走運動との関与を調べる予定である。

[文献]

- 1) Saito, A. et al. (2003) Gliding movement in *Peranema trichophorum* is powered by flagellar surface motility. *Cell Motil. Cytoskel.*, 55, 244-253.
- 2) 吉見、洲崎 (2009) *Peranema trichophorum* におけるマスティゴネマの単離と構成タンパク質の分析. 原生動物学雑誌, 42, 75-76.