

繊毛虫コルポーダ (*Colpoda cucullus*) の休眠シスト形成過程における
形態変化について

舟谷 亮二, 木田 明美, 松岡 達臣 (高知大・理・生物科学)

Morphological events during resting cyst formation (encystment)
in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*

Ryoji FUNATANI, Akemi KIDA and Tatsuomi MATSUOKA (Inst. Biol. Sci., Kochi Univ.)

SUMMARY

Morphological events during encystment of *Colpoda cucullus* were studied. Some mitochondria were fragmented within 1 hr after onset of encystment induction. Thereafter, they were surrounded by membranes to form autophagosomes. In 1–2 hr, a mucus-like material was synthesized in the vacuoles (mucocyst) in the cytoplasm and the mucus masses were expelled to an extracellular space. Thereby, the cell was enveloped in a thin mucus layer. In 2–3 hr, the cells were rounded up; then surrounded by the outermost cyst wall layer (ectocyst), which is possibly derived from pellicle membranes. Chromatin granules were extruded from the macronucleus, and subsequently digested in autophagosomes. Ectocyst formation was followed by the formation of a second layer (endocyst) by the excretion of toluidine blue-stained substance (TBS) between the ectocyst and plasma membrane. The endocyst layers were formed periodically for several days. Finally, the cells were surrounded by a thin layer of mucus envelope, an ectocyst layer, and several layers of endocysts. The mitochondria activity was stopped at 7–15 hr after the onset of encystment induction. In the final step of cyst maturation (7 days), the mitochondria were surrounded by electron-lucent materials, all ciliary and kinetosomal structures disappeared, and electron-lucent granules were accumulated in the respective central regions of cells.

【目的】 繊毛虫コルポダの休眠シスト形成過程における細胞再構築プロセスについては、20世紀後半に公表された電子顕微鏡観察に基づく断片的な多数の研究報告があるが、そのすべてを統括してもその一端を理解することすら困難である。このため我々は、電子顕微鏡によるシスト形成過程の細胞構造再編過程を丹念に追跡し、数年前にその概要を解明するに至った (Kida and Matsuoka, 2006)。本研究では、電子顕微鏡観察による新たな知見に加えて、細胞化学的手法によって得られた情報も考慮することにより、シスト形成プロセスのさらなる解明を目的とした。

【方法】

培養

コルポダ (*Colpoda cucullus*) の培養は 0.05% 麦葉浸出液を用いて、23°C の暗条件下で行った。1~2日培養したコルポダを遠心して集め (1,500 g, 2分)、1 mM Tris-HCl (pH 7.2) で2回洗った後、1 mM CaCl₂ を含むシスト誘導液に懸濁してシスト化誘導した。

電子顕微鏡用試料作成

シスト壁未形成細胞 (誘導後1時間まで) の細胞懸濁液は、グルタルアルデヒド (GA) 固定液 (6% GA, 1% OsO₄, 100 mM カコジレートバッファー (pH 7.2), 4 mM ショ糖) と 1:6 の比率で混合して 10 分間前固定処理した。よく洗浄した後、細胞を後固定液中で (1% OsO₄, 100 mM カコジレートバッファー (pH 7.2), 2 mM ショ糖) 2 時間処理した。シスト誘導後 1 時間以降の細胞は、OsO₄ を含まない GA 固定液で 6 時間、後固定を 1 週間行った。

光学顕微鏡観察

ミトコンドリア膜電位を検出するために、MitoPT Kit (B-Brige International, Inc.) を使用した。膜電位形成の有無に関わらずミトコンドリアを観察する場合は、Mito Tracker Green FM (Invitrogen) を用いてミトコンドリアを蛍光染色した。リン脂質の検出には、HCS LipidTOX Phospholipidosis Detection Reagents (Invitrogen) を用いた。エンドシスト前駆体の染色には 0.1% トルイジンブルー、核染色は DAPI、リソソームなどの酸性顆粒の検出にはアクリジンオレンジを用いた。

【結果と考察】 電子顕微鏡を用いた観察により、以下の内容が明らかになった。まず、シスト誘導 0~1 時間でミトコンドリアの断片化がおこり、誘導 2 時間後までに網状小粒 (粘液多糖類の一種) が放出され、細胞は粘液多糖類の薄膜で包まれた。この後、

細胞外皮領域の膜系が融合して徐々に肥厚することによりシスト壁第 1 層であるエクトシスト層が形成された。エクトシスト層が膜系に由来することは、電子顕微鏡像だけでなく、この層がリン脂質検出試薬によって蛍光染色されることから示唆された。誘導後 2~3 時間後には、トルイジンブルー染色性の巨大な液胞からエンドシスト前駆体が細胞膜とエクトシスト層の間隙に放出され固化的ることによってシスト壁第 2 層であるエンドシスト層が形成された。エンドシスト前駆体は周期的に放出され、数日かけて数層のエンドシスト層が形成された。

細胞内の出来事に注目してみると、誘導 2~4 時間後には、大核から放出された多数のクロマチン粒子と断片化ミトコンドリアがオートファゴソームに取り込まれ、リソソームの融合によって消化が行われる過程が、電子顕微鏡像とアクリジンオレンジ染色像から明らかになった。誘導7時間後には大核から巨大クロマチン塊が放出される場合も観察された。

ミトコンドリアの膜電位の消失は、シスト誘導 7 時間後に始まり 15 時間後にはほとんどの細胞でほぼ完全に消失した。細胞内消化は、少なくとも 2~3 日で完了し、細胞は徐々に凝縮し (おそらく脱水される)、1 週間後には電子密度が低い不定形の物質が細胞表層近くに凝集したミトコンドリアを取り囲んだ。引き続き、電子密度が小さい多数の顆粒が細胞中央部に蓄積した。この状態のシストはこれ以上変化しないため、これが成熟シストであると結論した。成熟シストでは、繊毛構造だけでなくキネトソーム構造も観察できなかったことから、シスト形成過程において微小管系は完全に脱重合すると考えられる。

2006 年に公表した論文 (Kida and Matsuoka, 2006) において、エクトシスト層は、前駆体物質のエクトサイトーシスによって形成されることを示唆したが、本研究においてこの仮説は修正された。すなわち、エクトシスト層前駆体物質のエクトサイトーシスを示していると思われる電子顕微鏡像は、粘液多糖類を放出した直後の空胞であることがわかった。さらに、エクトシスト層がトルイジンブルーにより染色されず、かわりにリン脂質検出試薬により染色されること、エクトシストが肥厚する過程でエクトサイトーシス像が全く観察されないこともその根拠となる。

【文献】

- 1) Kida, A. and Matsuoka, T. (2006) *Inv. Surv. J.*, 3, 77-83.