

総説

ゾウリムシ収縮胞における水分集積機構に関する研究

石田正樹

Masaki ISHIDA

奈良教育大学教育学部理科教育講座 〒630-8528 奈良市高畑町

要旨

淡水に棲む原生生物は、細胞質と細胞外液（淡水）との浸透圧差から生じる水の流入により、常に細胞が破裂する危機にさらされている。収縮胞は、細胞内部に入ってくる水を外に汲み出すことで、浸透圧を一定に整え、この危機を回避し、細胞の生命維持に貢献している。いわば原生生物の生命維持の根幹に関わる大切な細胞内小器官である。本総説では、収縮胞がいかにして細胞内部の水分を集積しているのかについて、モデル生物であるゾウリムシの研究をベースに過去の収縮胞研究の歴史と最近の知見も含め紹介する。

キーワード： aquaporin, co-transporter, mAb, RNAi, V-ATPase, water permeability

1. はじめに

淡水に生息する原生生物では、細胞質とその外界である淡水との間の浸透圧差により、細胞膜を越えて水が細胞内に侵入する。浸透圧差がある限り過剰な水が流入するため、それに対抗する細胞壁を持たなければ、細胞は破裂する恐れがある。細胞壁を持たない多くの原生生物は、“収縮胞（収縮性小胞）”と呼ばれる水を排出する小器官を発達させることでこの問題を解決している (Kitching, 1967; Patterson, 1980; Zeuthen, 1992; Allen and Naitoh, 2002; Docampo et al., 2013)。収縮胞はヒトを含む脊椎動物には見られず、医学的な見地からは重要視されてこなかった。しかしながら、多くの単細胞生物において、また多細胞生物においても、生活史の一部に単細胞段階が存在する場合、収縮胞はしばしば細胞内に見出される。収縮胞は生命が海から淡水域に進出した時点から、浸透調節と呼ばれる基本的な調節機構の一翼を担っていると考えられる。

収縮胞に関する研究は、比較的歴史が古い。Patterson (1980) のレビューによると、収縮胞が初めて報告されたのは、18 世紀のことである (Spallanzani, 1776)。Spallanzani は、自由遊泳する生物（おそらくはゾウリムシ *Paramecium*）に脈動する星型の小器官があることを記載している。当時は、“液体の流入によりゆっくりと膨らみ、定期的にその内容物を細胞の外に放出する小胞”として発見され、その液体が何

であるのか、膜に包まれているのかも不明であった。1931年には Max Knoll や Ernst A. F. Ruska により電子顕微鏡が発明されたが、電子顕微鏡を使って、収縮胞が複数の膜系から構成される複合体であることが報告されたのは (De Saedeleer and Wolff, 1931)、まさにその年の出来事であった。原生生物は単細胞であるが故に、実験生物としては扱いやすく、中でも収縮胞は古くから人々の興味の対象であったことが偲ばれる史実である。

一般に収縮胞と呼ばれる細胞内の小胞は、収縮胞複合体 (contractile vacuole complex, CVC) の一部であり (De Saedeleer and Wolff, 1931)、その構造と組成は細胞の種類によって異なる (Patterson, 1980)。Patterson (1980) の記述によれば、鞭毛虫やアメーバのように、収縮胞とその周りに存在するプロトンポンプを持つ小胞の存在といった比較的単純な構造の収縮胞複合体を持つものから、藻類や小さな繊毛虫のように微小管の骨格を伴うものまでが報告されている。最も組織化された収縮胞複合体は、ゾウリムシのような比較的大きな繊毛虫に見られるもので、細胞膜の陥入である収縮胞孔 (contractile vacuole pore, CVP) を除けば、形態学的に異なる5つの膜系から構成されている：収縮胞 (contractile vacuole, CV)、瓶状部 (ampullae, AMP) と集水管 (collecting canal, CC)、スムーズ・スポンジオーム (smooth spongiome, SS)、デコレイテッド・スポンジオーム (decorated spongiome, DS) である (Hausmann and Allen, 1977; Tominaga et al. 1999; Ishida et al., 2021; 図 1)。これらの5つの膜系は、収縮胞孔から放射状に伸びる微小管束



Tel/Fax : 0246-46-0875
E-mail: masaki@cc.nara-edu.ac.jp
Received: 22 Nov 2024; Accepted: 22 Jan 2025.

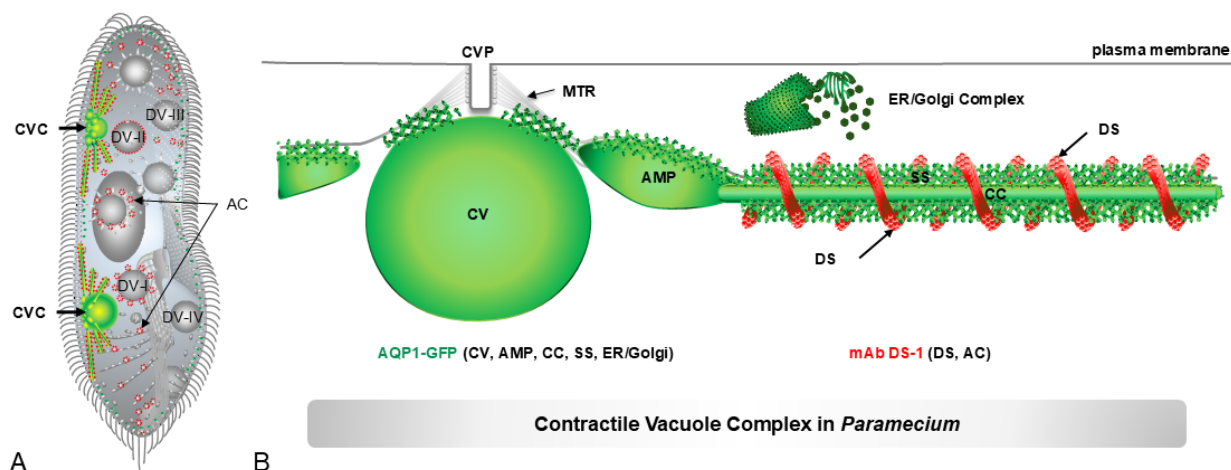


図1. ゾウリムシ収縮胞複合体の模式図。A, ゾウリムシ右側面の模式図。2つの収縮胞複合体 (CVC, contractile vacuole complex) が細胞の背中側に位置し、細胞質には食胞膜系 (DV-I~IV) の配置が示されている。B, 収縮胞複合体を拡大した模式図。この模式図では、AQP1-GFPで標識された部分は緑色で、mAb DS-1で標識された部分は赤色で示されている。AC, acidosome (酸性小胞)；AMP, ampullae (瓶状部)；AQP, aquaporin (アクアポリン)；CC, collecting canal (集水管)；CV, contractile vacuole (収縮胞)；CVP, contractile vacuole pore (収縮胞孔)；DS, decorated spongiome (デコレーテッド・スポンジオーーム)；DV, digestive vacuole (食胞)；ER/Golgi Complex, endoplasmic reticulum/Golgi apparatus complex (小胞体/ゴルジ体 複合体)；MTR, microtubular ribbon (微小管束)；SS, smooth spongiome (スムーズ・スポンジオーーム)。尚, Bは Ishida et al. (2021) の Fig. 6 を改変したものである。また, mAb DS-1 標識分布についての詳細は, Ishida et al. (1997) に準拠する。

(microtubular ribbon, MTR) によって連結され、収縮胞複合体を形成している。McKanna (1973a,b, 1974, 1976) は、さまざまな生物の収縮胞複合体を電子顕微鏡で観察した結果、それらを比較することで収縮胞複合体の膜系には釘の頭 “peg” のような突起を持つ膜が共通して存在することを発見し、この膜を “fluid segregation organelles (液体分離器官)” と命名した。収縮胞研究はやがて、1990年代から2000年代初頭にかけてそのピークを迎えることになるが (Ishida and Tominaga, 2006), 生化学やモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学、そして分子生物学の技術の発達により、この突起こそが液胞型プロトンポンプであることが証明されていったのである。この総説では、著者が携わった二つの機能分子、液胞型プロトンポンプとアクアポリンを中心に過去の収縮胞研究の歴史と最新の進展について紹介する。

2. 液胞型プロトンポンプ

液胞型プロトンポンプ (vacuolar-proton-ATPase, V-ATPase) は、ATPの加水分解により膜を隔ててプロトン (H^+) を電気化学的勾配に逆らって移動させる。V-ATPaseは、これまでの研究によりファゴソーム (phagosome), 酸性小胞 (acidosome), リソソーム (lysosome), 初期エンドソーム (early endosome), トランスゴルジ網 (trans-golgi network), 濃核分泌顆粒 (dense core

secretory granules), 植物の液胞などといった細胞内小器官の酸性化を担っている (Ishida et al., 1997; Sun-Wada et al., 2003; Nelson, 2003; Kluge et al., 2003)。このプロトン移動の重要な側面は、イオンの二次的能動輸送に利用できる電気化学的電位の生成である。その例は、神経伝達物質がシナプス小胞の内腔に濃縮されている神経細胞 (Roseth et al., 1995; Fonnum et al., 1998), クロマフィン顆粒 (Apps, 1997) で報告されており、収縮胞研究が盛んであった当時には、V-ATPaseがすべての淡水生物の浸透圧活性膜によるイオン取り込みのエネルギーを供給する可能性が提唱されていた (Wieczorek et al. 1999)。

ゾウリムシ (*Paramecium*, Fok et al., 1995), タマホコリカビ (*Dictyostelium*, Heuser et al., 1993), エキビョウキン (*Phytophthora*, Mitchell and Hardham, 1999) の収縮胞複合体は、すべて V-ATPaseを豊富に持っている。ほとんどの場合、この酵素複合体は管状膜系にあり、通常は収縮胞複合体の中でも大きな液胞に膨らむ膜系に付着している (Allen and Naitoh, 2002)。この大きな液胞は細胞膜と融合することによって、蓄積した液体を排出する。ゾウリムシでは、モノクローナル抗体 (mAb) DS-1 がデコレイテッド・スポンジオーーム (DS, 図1) 上の V-ATPase に特異的に結合することが免疫蛍光法と免疫凍結切片法で示され (Fok et al., 1995, 図2の赤色蛍光標識), この mAb をマイクロインジェクションにより細胞内に導入す

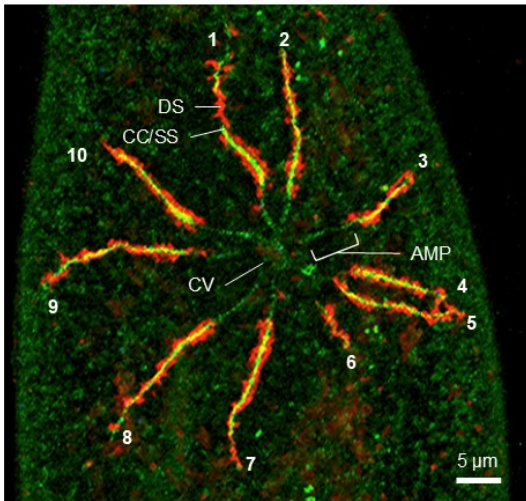


図2. *Paramecium multimicronucleatum* の収縮胞複合体における GFP-AQP1 の細胞内局在状態。化学固定された細胞は、V-ATPase に対するモノクローナル抗体 DS-1 (Allen et al., 1990; Fok et al., 1995; Fok et al., 2002) とインキュベートし、共焦点捜査型レーザー顕微鏡により撮影された。この画像は複数の光学切片を重ねることにより得られた 3D 投影画像である。緑色蛍光が GFP-AQP1 の局在を、赤色蛍光が DS-1 による標識を示す。図中の数字は、収縮胞複合体の放射管（瓶状部、集水管、スムーズ・スポンジオーンをまとめた名称）の数を示す。AMP, ampullae (瓶状部) ; AQP, aquaporin (アクアポリン) ; CC/SS, collecting canal (集水管) and smooth spongiome (スムーズ・スポンジオーン) ; CV, contractile vacuole (収縮胞) ; CVC, contractile vacuole complex (収縮胞複合体) ; DS, decorated spongiome (デコレーテッド・スポンジオーン)。

ると収縮胞複合体の体液分離活性が阻害されることから (Ishida et al., 1993), V-ATPase が浸透圧調節に関与していることが示されたのである。その後, Fok et al. (2002) は、精製されたホロ酵素のトリプシン断片の配列情報をもとに設計した PCR プライマーと、既存の *P. multimicronucleatum* のゲノム DNA ライブラリー (Yamauchi, 1995) を用いて V-ATPase の B サブユニットの遺伝子のクローニングに成功した。また、人為的に導入した相補的な RNA による特定の遺伝子の発現を阻害する方法である RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) により、V-ATPase の C-あるいは F-サブユニットをサイレンシング (遺伝子抑制) した細胞では、DS 構造の消失や、CVC 機能の激的な低下が報告された (Wassmer et al., 2005)。近年におけるこうした新しい分子生物学的手法による検証を経て、収縮胞に関わる機能分子としての V-ATPase の関与が、特にモデル生物であるゾウリムシにおいては疑いのないものとして理解されるようになった。

Tominaga et al. (1998a) は、ゾウリムシの収縮胞に電極を刺入し、収縮胞の膜電位を測定した。ゾウリムシの細胞の膜電位は、他の細胞同様に電氣的にネガティブ (マイナス) であるが、測定された収縮胞の膜電位は、+80 mV に達していた。V-ATPase が運び込む H^+ の形成する電位であると考えると矛盾しない結果であるが、細胞膜電位が -30 mV 程と考ええると驚くべき値である。ゾウリムシの V-ATPase はデコレーテッド・スポンジオーン (DS, 図 1, 2) に局在しているが、収縮胞が細胞膜と融合し内容物を放出する準備段階では、収縮胞は収縮胞複合体から一旦切り離される。この時、収縮胞の膜電位は急激に低下し、同時に膜抵抗が増加する (Tominaga et al., 1998a)。内容物が排出された後には、収縮胞複合体の放射水管が段階

的に収縮胞に再結合され、これに伴って段階的に収縮膜の膜電位が回復する (Grølien et al., 2002)。この事実は、V-ATPase を持つデコレーテッド・スポンジオーンが起電力を発生していることを裏付けていた。

では、収縮胞複合体はどのようにして V-ATPase が形成したプロトンの勾配をイオンの取り込みのエネルギーとして利用しているのだろうか？ Stock et al. (2002) は、4 種のイオン感受性電極を直接収縮胞内部へ刺入する方法を用いて、生細胞内での収縮胞内部のイオン濃度を測定した。その結果、収縮胞内のイオンで最も顕著に濃度が高いのは K^+ と Cl^- で、それぞれ 56 mM と 66.5 mM と測定された。一方、細胞質では、それぞれの濃度は 22.6 mM, 27.3 mM と測定された。すなわち、収縮胞内部は常に細胞質より高張であり、浸透圧差により水は、低張な細胞質から収縮胞内部に移動が可能であることが示されたのである。この測定により、Shmidt-Nielsen and Schrauger (1963) や Rid-dick (1968) による単離されたアメーバの収縮胞において観察された“浸透圧差のパラドックス”は、解消された。またこの測定により、収縮胞中で浸透圧差を形成するイオンは、 K^+ と Cl^- であると言及できるようになったのである。Stock et al. (2002) は、さらに、 $Na^+-K^+-Cl^-$ co-transporter の阻害剤である furosemide (Lauf, 1984; Garay et al., 1988) を用いた実験から、収縮胞膜上に存在すると仮定できるのは、 K^+ と Cl^- イオンの能動的な共輸送体であると結論付けた。しかしながら、furosemide が細胞膜の輸送体に働いたのか、あるいは収縮膜のそれであるのかは不明であり、間接的な効果であった可能性を否定できない。今後、後述するようなゾウリムシのゲノムデータベースを利用した共輸送体類似配列の検索や、それに基づいて設計した RNAi によるスクリーニングを通して、共輸

送体の同定につながる研究が期待される。

3. アクアポリン

アクアポリン (aquaporin, AQP) は、主要内在性タンパク質 (major intrinsic protein, MIP) スーパーファミリーに含まれ、しばしば“水チャネル”とも呼ばれる水の透過孔を形成するタンパク質である。主要内在性タンパク質スーパーファミリーのメンバーは、平均分子量 ~30 kDa で、比較的高い配列類似性を共有し、共通の構造を持つ。すなわち、5つのループ (A~E) でつながった 6 つの膜貫通 α -ヘリックス (TM1~6) から構成され、膜を貫通しない 2つのハーフヘリックス部分には、それぞれ高度に保存されたシグネチャー配列 (NPA motif), アスパラギン (Asn or N) – プロリン (Pro or P) – アラニン (Ala or A) をもつ。シグネチャー配列は孔の中心に位置し、水分子や尿素やグリセロールなどの物質を透過させる選択的フィルターとして働く (Agre, 2006; Engel et al., 2000; Gomes et al., 2009). これまでに AQP0 から AQP12 の 13 の AQP クラスが同定されており、構造的・機能的特性に基づいて 3 つのグループに分類されている。

1) オーソドックス AQP は、水に対して選択的に透過性であり、AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6, および AQP8 がこれに属する (Preston et al., 1994). 2) アクアグリセロポリンは、水分子に加えて、グリセロール (Fu et al., 2000), 尿素 (Echevarria et al., 1994), アンモニア (Holm et al., 2005), さらには気体 (Cooper and Boron, 1998) のような電荷を持たない小さな溶質に対しても透過性があり、AQP3, AQP7, AQP9, および AQP10 がこれに属する。3) スーパーアクアポリンは、細胞内に局在し、AQP11 と AQP12 が属する。ただし、その機能は現在研究中である (Itoh et al. 2005; Jung et al., 2020; Morishita et al., 2005).

ゾウリムシでは、形態学的・生理学的データからアクアポリンが収縮胞複合体の膜上に存在する可能性が予測されてきたが、生化学的・分子生物学的データはこれまで得られていなかった。Tominaga et al. (1998a, 1998b) は、収縮胞複合体における体液分離のために、デコレイテッド・スポンジオーム上の V-ATPase が収縮胞複合体の膜を横切って電気化学的勾配を作り、それが二次的にオスモライト (浸透圧を形成する原因物質: 当時は

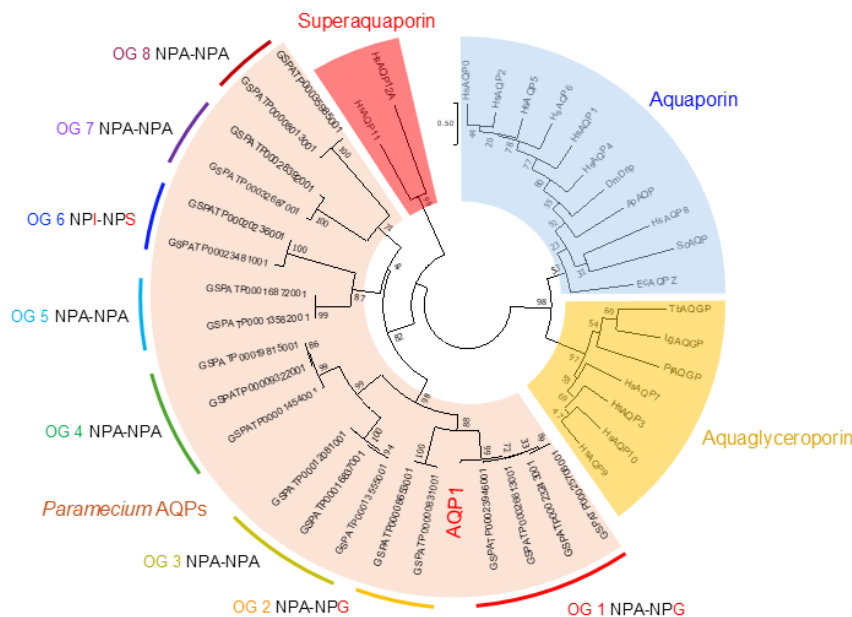


図3. AQP1 (*Paramecium multimicronucleatum* のAQP, PtAQP) を含むアクアポリンファミリーの分子系統解析結果。AQP1 および他の相同タンパク質配列の系統樹は、MEGA7パッケージ (Kumar et al. 2016) を用い、MUSCLEによるアミノ配列のアラインメントを行ったのちに最尤法で推定した。系統樹内の数字は、1,000回のブートストラップ解析による各内部枝の再現率 (%) を示す。各配列のアクセッション番号は以下の通り: ApAQP (A7BIX4), DmDrip (Q9V5Z7), EcAQPZ (B7MHI1), HsAQP0 (P30301), HsAQP1 (P29972), HsAQP2 (P41181), HsAQP3 (Q92482), HsAQP4 (P55087), HsAQP5 (P55064), HsAQP6 (Q13520), HsAQP7 (O14520), HsAQP8 (O94778), HsAQP9 (O43315), HsAQP10 (Q96PS8), HsAQP11 (Q8NBQ7), HsAQP12A (Q8IXF9), LgAQGP (E9JU08), PfAQGP (Q8WPZ6), AQP1 (AB771955), ScAQP (P0CD91), TbAQGP (C9ZQF9). AQP, アクアポリン; AQGP, アクアグリセロポリン; Ap, *Amoeba proteus*; Dm, *Drosophilla melanogaster*; Ec, *Escherichia coli*; Hs, *Homo sapiens*; Lg, *Leishmania guyanensis*; Pf, *Plasmodium falciparum*; Pt, *P. tetraurelia*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Tb, *Trypanosoma brucei*. OG, Ptのオノロググループ; PtAQP の 20 のタンパク質配列は、*ParameciumDB* (<https://paramecium.i2bc.paris-saclay.fr>, 2025.1.20 確認) から得られた。

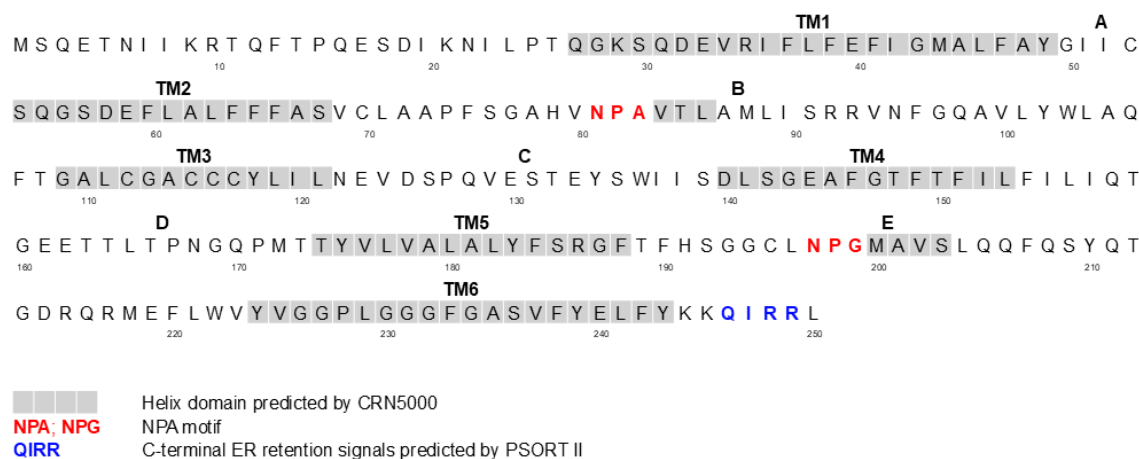


図4. *Paramecium multimicronucleatum* の *aqp1* の塩基配列から推定されたアミノ酸配列の二次構造予測. *P. multimicronucleatum* の AQP1 のタンパク質の二次構造の予測は, PDBj CRNPRED (<https://pdbj.org/crnpred>; Kinjo and Nishikawa, 2006, 2025.1.20 確認) の CNR 5000 (critical random networks) で行った. また, タンパク質のシグナル解析は, PSORT II (<https://psort.hgc.jp/form2.html>, 2025.1.20 確認) で行った. 濃い灰色で囲んだ配列は CRN5000によって予測された helix domain を示す. *aqp1* のアクセッション番号は AB771955. TM は, transmembrane domain を A~E は, loop domain を示す. 配列中の赤字は, NPA モチーフを, 青字 は, ER retention signal を示す.

HCO₃⁻ がその候補と考えられていた) を細胞質から内腔に輸送するという仮説を提唱した. この仮説では, 水分子はデコレイテッド・スポンジオーンを除く収縮胞複合体膜系に分布する“水チャネル”を通じて, 細胞質から収縮胞複体内腔へと受動的に拡散する. 彼らはまた, 凍結切断したレプリカの観察から, *P. multimicronucleatum* の収縮胞 (CV) および集水管 (CC) の膜の P-face に, 直径約 9 nm のタンパク質顆粒の均一な集団が存在することを示した. ただしこれは形態的観察にとどまり, 生化学的あるいは免疫組織科学的なデータは示されなかった. Sugino et al. (2005) は, 高浸透圧溶液中での単離収縮胞の収縮率から, *P. multimicronucleatum* の収縮胞膜の透水性を $4\text{--}20 \times 10^{-7} \mu\text{m/s/Pa}$ と推定した. この値は, Nishihara et al. (2004; 2008) が淡水アメーバである *Amoeba proteus* の単離された収縮胞膜から得た値と驚くほど類似していた. この高い透水性の値から, Sugino et al. (2005) は *P. multimicronucleatum* の収縮胞膜に水チャネルが存在する可能性を示唆したのである. また, *P. tetraurelia*では, ゲノムデータベース (*Paramecium* DB, <https://paramecium.i2bc.paris-saclay.fr>, 2025.1.20 確認) で 20 個にもおよぶ AQP のパラログやオオノログが見つかるものの, それらの発現産物に関する情報は無かった. このことは, AQP が重要な機能分子であるにもかかわらず, *Paramecium* DB が公表された 2006 年以降, 研究が行われてこなかったことを示していた. ゲノム重複等により生じたと考えられるこれらのホモ

ログ遺伝子は, 配列類似性から 8 種に分類できるが (図 3, OG1~8), それぞれの産物であるタンパク質の発現の有無は配列上からは推測できない. こうした困難さもあり, 事実上ゾウリムシの収縮胞研究はこの段階で頓挫した. ゾウリムシのアクアポリンに関する研究のブレークスルーは, 2021 年の我々の論文により達成されることになる (Ishida et al., 2021). 淡水環境に生息するゾウリムシにとって浸透圧調節は常に必要とされる非常に重要な機能である. したがって, この機能に関与するタンパク質は, 恒常的に発現していなければならない. そこで我々は *Paramecium* DB の配列情報に基づいて設計した縮重プライマーを用いて, AQP 遺伝子を RT-PCR で探索する戦略をとった. その結果, *P. multimicronucleatum* から AQP 様遺伝子 (*aqp1*) の cDNA 配列のクローニングに成功した (Ishida et al., 2021). 得られたゾウリムシ *aqp1* の 753 bp の ORF は, 251 アミノ酸残基のポリペプチドをコードしており, 予測分子量は 27.8 kDa, N 末端側のシグネチャーモチーフは NPA であったが, C 末端側のシグネチャーモチーフは NPG (アスパラギン-プロリン-グリシン) であった (図 4). また C 末には, PSORT II (<https://psort.hgc.jp/form2.html>, 2025.1.20 確認) の解析により, 小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) への保持シグナルの類似配列 (QIRR) が観察された (図 4). PDBj CRNPRED (<https://pdbj.org/crnpred>; Kinjo and Nishikawa, 2006, , 2025.1.20 確認) の CNR 5000 (critical random networks) を用いたタ

ンパク質の二次構造予測からは、ゾウリムシ AQP1 には、6 つの膜貫通ドメイン (図 4, TM1~6) とそれをつなぐ 5 つの連結ループ (A~E) の存在が示され、AQP ファミリーの他のメンバーとの構造的類似性が示された (Ishida et al., 2021). 図 5 は、Uniport (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A060N2T6/entry>, 2025.1.20 確認) の Alpha fold structure prediction (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/A0A060N2T6>, 2025.1.20 確認) により示された AQP1 (AB771955) の予測立体構造を示している. N 末や C 末は収縮胞複合体の膜の内腔側に位置し、NPA-NPG モチーフが、6 つのヘリックスで囲まれた孔の中心にフィルターとして位置していることがわかる. また、ゾウリムシ AQP1 が属するグループを確認するために、他の相同タンパク質との間での分子系統解析を実施したところ (図 3), ゾウリムシ AQP1 のアミノ酸配列はスーパーアクアポリングループ (AQP11 と AQP12) と同じクレードに入ることが示された. また、参考までに *P. tetraurelia* の AQP 類似配列を全て同一系統樹内に示したが、これらは全て同じクレード内に位置する. スーパーアクアポリングループは、原生生物では報告されていないことから、非常に興味深い結果である. 我々は、mRNA からクローニングをしていることから、得られたこのゾウリムシ AQP1 遺伝子は実際に細胞内で発現していると考えられる. また、上述したように予測されたタンパク質構造は AQP グループの一員としての配列特異性や構造特異性を合わせ持っていることが示唆された (図 4, 5).

図 2 は、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) 遺伝子をゾウリムシの遺伝子 *aqp1* と融合し、この遺伝子をゾウリムシに導入すること

で、発現させた融合タンパク質 (GFP-AQP1) の分布を示している. この GFP-AQP1 は、細胞質中に散在するおそくは小胞体 (ER) と考えられる構造物と、デコレートド・スポンジオーム (DS, DS-1による赤色蛍光標識) を除いた収縮胞複合体の膜系 (緑色蛍光, 図 2) に広く分布しているように観察される. このことは、Allen and Naitoh (2002) が収縮胞複合体は V-ATPase を持つ第一のコンパートメントと、直径 40 nm の細管に変化することにより収縮力を発生する第二のコンパートメントで構成されたとする考えによくフィットする. すなわち、第一のコンパートメントではオスモライトを集める起電力を作り、第二のコンパートメントでは集められたオスモライトが形成する浸透圧差を利用してアクアポリンが水を集め、収縮するのである.

さて、AQP1 の機能面に関してはどうなのであろうか? RNAi を用いたゾウリムシ AQP1 遺伝子のサイレンシングの効果を検証してみた. その結果、RNAi 処理は、生細胞の収縮胞機能に影響を与え、細胞死を引き起こすことが示された (Ishida et al., 2021). そこで細胞の様子を詳しくみると、表 1 に示すように、*aqp1* ノックダウン細胞 (AQP1-RNAi) では、処理後 24 時間に細胞の長さや幅の両方がコントロール (ND7-RNAi) に比べて有意に増加した. 結果として細胞容積も有意に増加している (322 ± 68 pl). ただし、細胞の長さに着目すると、コントロールとの比較から、一部の小さな若い細胞が死滅し、結果として大きな古い細胞の割合が増加したことがわかる. 一方、サイレンシング処理後 48 時間では、細胞長にコントロールと比較して有意差は見られなくなるが、細胞の幅は大きいままであった. この時、小さな若い細

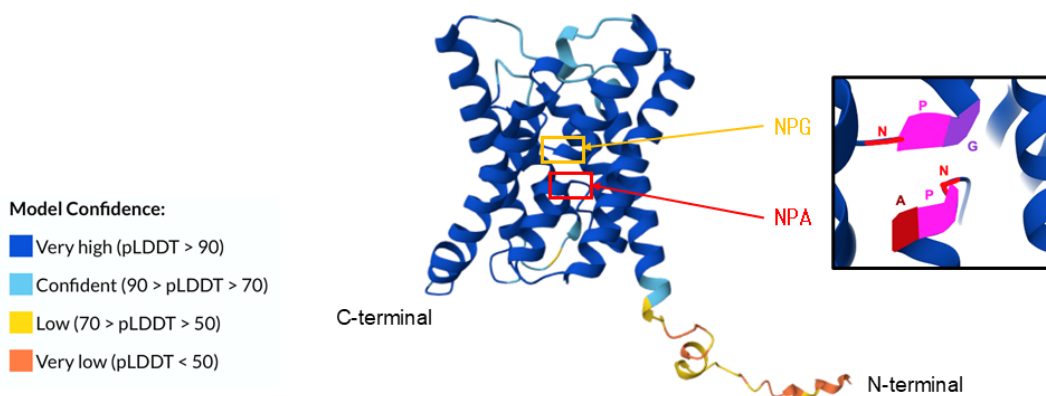


図5. *Paramecium multimicronucleatum* AQP1 の立体構造予測. この模式図は、Uniport (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A060N2T6/entry>, 2025.1.20 確認) のAlpha fold structure prediction (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/A0A060N2T6>, 2025.1.20 確認) により示された AQP1 (AB771955) の予測立体構造を示している. AlphaFold は、0 から 100 の間の 1 残基あたりの信頼性スコア (pLDDT) を生成し、pLDDT が低い領域は、単独では構造化されていない可能性を示している. 図中、細胞質側は上側であり、収縮胞内腔側は下側となるように配置している. AQP1 の場合、アクアポリンのシグネチャー配列であるNPAモチーフは、NPA (Asn-Pro-Ala) -NPG (Asn-Pro-Gly) である. 右の挿入図は、立体構造中の NPA モチーフの位置を拡大表示したものである.

表 1. *Paramecium multimicronucleatum* の細胞長, 細胞幅, 細胞体積に対する RNAi の効果

処理時間	RNAi	細胞長 (μm)	細胞幅 (μm)	細胞体積 (pl)
24 h	AQP1-RNAi	192 ± 15	83 ± 12	322 ± 68
	ND7-RNAi	178 ± 18 $\square^{**}$	74 ± 9 $\square^{**}$	255 ± 46 $\square^{**}$
48 h	AQP1-RNAi	181 ± 20	83 ± 11	298 ± 71
	ND7-RNAi	187 ± 15	70 ± 8 $\square^{**}$	257 ± 46 $\square^{**}$

RNAi 処理した 50 細胞から得られた値の平均値と標準偏差を示している。

AQP, aquaporin; **, significant at $p < 0.01$ (Student's t -test).

尚, この表は, Ishida et al. (2021) の Table 1 を翻訳・改変したものである。

表 2. *Paramecium multimicronucleatum* の収縮胞の最大直径, 収縮頻度, 細胞あたりの液体排出量に対する RNAi の効果

処理時間	RNAi	最大直径 (μm)	収縮頻度 (expulsions/min)	細胞あたりの 液体排出量 (pl/min)
24 h	AQP1-RNAi	11.4 ± 2.5	6.4 ± 2.5	8.8 ± 2.7
	ND7-RNAi	11.9 ± 1.8	8.4 ± 2.4 $\square^{**}$	14.1 ± 2.5 $\square^{**}$
48 h	AQP1-RNAi	11.3 ± 2.4	4.6 ± 2.7	6.4 ± 2.7
	ND7-RNAi	11.9 ± 2.1	8.1 ± 2.2 $\square^{**}$	14.1 ± 2.2 $\square^{**}$

RNAi 処理した 50 細胞から得られた値の平均値と標準偏差を示している。

AQP, aquaporin; CV, contractile vacuole; **, significant at $p < 0.01$ (Student's t -test).

尚, この表は, Ishida et al. (2021) の Table 2 を翻訳・改変したものである。

胞と大きな古い細胞の割合はコントロールと同等であり, 細胞はある程度摂餌能力を回復し, 増殖したため若い細胞が増加したものと考えられる。また, 細胞幅の測定結果から細胞は膨張しているといえる。結果として, 細胞体積は $298 \pm 71 \text{ pl}$ であり, コントロールに比べて有意に増加した。次に, 収縮胞の収縮頻度と最大直径から細胞あたりの液体排出量を計算してみると, オルガネラ機能にいくつかの欠陥があることがわかった (表2)。収縮頻度と最大直径から計算される細胞あたりの液体排出量/分は, *aqp1* ノックダウン処理後 24 時間の時点から有意に減少し, 処理後 48 時間では $4.6 \pm 2.7 \text{ pl/min}$ まで低下した。最大直径はコントロールと有意差がなかったため, この液体排出量の減少は主に収縮頻度に依存しているのがわかる。このことは, サイレンシングによりアクアポリン分子の数が減少し, 水を集めにくくなっていると考ええると矛盾がない。

上述したように, 現代の分子生物学の技術を導入することにより, ゴウリムシの収縮胞にはアクアポリンが存在し, 細胞質からの収縮胞への水分集積に関わっていることが示されたのである。しかしながら, ゴウリムシ AQP1 が実際にどのような物質を通過させているかは, 現在でも不明のままである。収縮胞の水分集積機構を考える上では, 非常に重要な情報であり, 今後, このタンパク質をアフリカツメガエルの卵母細胞 (*Xenopus oocyte*) に発現させ, 卵母細胞の膨張アッセイ法 (swelling assay) などによるこのチャンネルを透過

する物質の解析が望まれる。

まとめ

我々はゴウリムシというモデル生物において, 液胞型プロトンポンプとアクアポリンという二つの分子の存在を証明し, これら分子の収縮胞機能への関わりを明らかにしてきた。しかしながら, 表題に掲げた“水分集積の機構”を全て明らかにした訳ではない。液胞型プロトンポンプとアクアポリンのそれぞれの項で, その末尾において, 今後期待される課題をいくつか示した。それらを実施すれば, さらにいくつかの問題が見つかるかもしれないが, 水分集積機構の実態が見えてくる可能性は高い。今後の研究に期待している。

2006 年の *Paramecium* DB の公表以降, それまでの生理学的手法や形態学的手法, これに生化学的手法や免疫組織化学的手法を取り混ぜた研究に加え, 分子生物学的手法を用いた研究が可能となった。これまでの方法では証明に煩雑さを伴うものが, より簡便に示せるようになってきた印象を持っている。さらにいえば, ネット上で利用可能なソフトは充実し, 配列情報からアクセスできる情報が増えている。こうした分子生物学的手法は, 今後さらに主流となると考える。Ishida et al. (2021) がゴウリムシで用いた方法は, 分子生物学的手法の活用の一例を示したに過ぎないが, 方法論としては汎用性が高く, 対象物あるいは対象のモデル生物を変えて応用することで新しい事実が様々な分野で明らかになることが期待される。

謝辞

学会賞に推薦していただいた日本大学・文理学部・生命科学科 教授 岩本 政明 先生に深く感謝いたします。また、本総説の執筆機会を与えていただいた和文誌「原生生物」編集長 北出 理 先生に深く感謝いたします。そして、これまでにご指導をいただいた高知大時代の恩師である種田 耕二 先生、松岡 達臣 先生、広島大時代の恩師である故 重中 義信 先生 (2023.11.10 逝去)、洲崎 敏伸 先生、理化学研究所時代の恩師で有る塚原 保夫 先生、ハワイ大学の恩師である故 Richard D. Allen 先生 (2023.2.10 逝去)、Agnes K. Fok 先生、故 内藤 豊 先生 (2020.1.7 逝去)、共同研究者である三浦 健 先生、堀 学 先生、富永 貴志 先生、本研究に関わっていただいた学生の皆さま、さらには日本原生生物学会にご所属の先生方には大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

引用文献

- Agre, P. (2006) The aquaporin water channels. *Proc. Am. Thorac Soc.*, 3, 5–13. <https://doi.org/10.1513/pats.200510-109JH>
- Allen, R. D. and Naitoh, Y. (2002) Osmoregulation and contractile vacuoles of protozoa. *Int. Rev. Cytol.*, 215, 351–394. doi: 10.1016/s0074-7696(02)15015-7
- Apps, D. K. (1997) Membrane and soluble proteins of adrenal chromaffin granules. *Cell Dev. Biol.*, 8, 121–131. doi: 10.1006/scdb.1996.0131
- Cooper, G. J. and Boron, W. F. (1998) Effect of PCMBs on CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant. *Am. J. Physiol.*, 275, C1481–C1486. doi: 10.1152/ajpcell.1998.275.6.C1481
- De Saedeleer, H. and Wolf, E. (1931) La genese de la vesicule contractile chez une amibe d'eau douce. Demonstration d'un complexe vacuolaire. *C. R. Sances Soc. Biol.*, 106, 612–613.
- Docampo, R., Jimenez, V., Lander, N., Li, Z. H. and Niyogi, S. (2013) New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 305, 69–113. doi: 10.1016/B978-0-12-407695-2.00002-0
- Echevarria, M., Windhager, E. E., Tate, S. S. and Frindt, G. (1994) Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10997–11001. doi: 10.1073/pnas.91.23.10997
- Engel, A., Fujiyoshi, Y. and Agre, P. (2000) The importance of aquaporin water channel protein structures. *EMBO J.*, 19, 800–806. doi: 10.1093/emboj/19.5.800
- Fok, A. K., Yamauchi, K., Ishihara, A., Aihara, M. S., Ishida, M. and Allen, R. (2002) The vacuolar-ATPase of *Paramecium multimicronucleatum*: gene structure of the B-subunit and the dynamics of the V-ATPase-rich osmoregulatory membranes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 49, 185–196. doi: 10.1111/j.1550-7408.2002.tb00521.x
- Fonnum, F., Fykse, E. M. and Roseth, S. (1998) Chapter 7 Uptake of glutamate into synaptic vesicles. *Prog. Brain Res.*, 116, 87–101. doi: 10.1016/S0079-6123(08)60432-X
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J. and Stroud, R. M. (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, 290, 481–486. doi: 10.1126/science.290.5491.481
- Garay, R. C., Nazaret, C., Hannaert, P. A. and Cragoe, E. J. Jr. (1988) Demonstration of a [K⁺, Cl⁻] cotransport system in human red cells by its sensitivity to [(dihydroindenyl)oxy]alkanoic acids: regulation of cellswelling and distinction from bumetanide-sensitive [Na⁺, K⁺, Cl⁻]-cotransport system. *Mol. Pharmacol.*, 33, 696–701.
- Gomes, D., Agassi, A., Thie'baud, P., Delrot, S., Gero's, H. and Chaumont, F. (2009) Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788, 1213–1228. doi: 10.1016/j.bbame.2009.03.009
- Grønlien, H. K., Stock, C., Aihara, M.S., Allen, R.D. and Naitoh Y. (2002) Relationship between the membrane potential of the contractile vacuole complex and its osmoregulatory activity in *Paramecium multimicronucleatum*. *J. Exp. Biol.*, 205, 3261–70. doi: 10.1242/jeb.205.20.3261
- Hausmann, K. and Allen, R. D. (1977) Membranes and microtubules of the excretory apparatus of *Paramecium caudatum*. *Cytobiologie*, 15, 303–320.
- Heuser, J., Zhu, Q. and Clarke, M. (1993) Proton pumps populate the contractile vacuoles of *Dictyostelium* Amoebae. *J. Cell Biol.*, 121, 1311–1327. doi:10.1083/jcb.121.6.1311
- Holm, L. M., Jahn, T. P., Møller, A. L., Schjoerring, J. K., Ferri, D., Klaerke, D. A. and Zeuthen, T. (2005) NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflueger's Arch.*, 450, 415–428. doi: 10.1007/s00424-005-1399-1
- Ishida, M. and Tominaga, T. (2006) Contractile vacuole complex in *Paramecium*. *Jpn. J. Protozool.*, 39, 157–172. doi: 10.18980/jjprotozool.39.2_157
- Ishida, M., Aihara, M. S., Allen, R. D. and Fok, A. K. (1993) Osmoregulation in *Paramecium*: the locus of fluid segregation in the contractile vacuole complex. *J. Cell. Sci.*, 106, 693–702. doi: 10.1242/jcs.106.2.693
- Ishida, M., Aihara, M. S., Allen, R. D., Fok, A. K. (1997) Acidification of the young phagosomes of *Paramecium* is mediated by proton pumps derived from the acidosomes. *Protoplasma*, 196, 12–20. doi: 10.1007/BF01281054
- Ishida, M., Hori, M., Ooba, Y., Kinoshita, M., Matsutani, T., Naito, M., Hagimoto, T., Miyazaki, K., Ueda, S., Miura, K. and Tominaga, T. (2021) A functional aqp1 gene product localizes on the contractile vacuole complex in *Paramecium multimicronucleatum*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 68, e12843. doi:10.1111/jeu.12843
- Itoh, T., Rai, T., Kuwahara, M., Ko, S. B. H., Uchida, S., Sasaki, S. and Ishibashi, K. (2005) Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330, 832–838. doi: 10.1016/j.bbrc.

- 2005.03.046
- Jung, S. Y., Park, D. C., Kim, S. S. and Yeo, S. G. (2020) Expression, distribution and role of aquaporins in various rhinologic conditions. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 5853. doi: 10.3390/ijms21165853
- Kitching, J. A. (1967) Contractile vacuoles, ionic regulation, and excretion. In: *Research in Protozoology*, Vol. I. Pergamon Press, New York. pp. 308–336.
- Kluge, C., Lahr, J., Hanitzsch, M., Bolte, S., Gollmack, D. and Dietz, K. J. (2003) New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H^+ -ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 377–388. doi: 10.1023/a:1025737117382
- Lauf, P. K. (1984) Thiol-dependent passive K/Cl transport in sheep red cells: IV. Furosemide inhibition as a function of external Rb^+ , Na^+ , and Cl^- . *J. Membr. Biol.*, 77, 57–62. doi: 10.1007/BF01871100
- MaKanna, J.A. (1973a) Membrane recycling: Vesiculation of the amoeba contractile vacuole at systole. *Science*, 179, 88–90. doi: 10.1126/science.179.4068.88
- MaKanna, J.A. (1973b) Fine structure of the contractile vacuole pore in *Paramecium*. *J. Protozool.* 20, 631–638. doi: 10.1111/j.1550-7408.1973.tb03587.x
- MaKanna, J.A. (1974) Permeability modulationg membrane coats. I. Fine structure of fluid segregation organelles of peritrich contractile vacuoles. *J. Cell Biol.*, 63, 317–322. doi: 10.1083/jcb.63.1.317
- MaKanna, J.A. (1976) Fine structure of fluid segregation organelles of *Paramecium* contractile vacuoles. *J. Ultrastruct. Res.*, 54, 1–310. doi: 10.1016/s0022-5320(76)80002-0
- Mitchell, H. J. and Hardham, A. R. (1999) Characterization of the water expulsion vacuole in *Phytophthora nicotianae* zoospores. *Protoplasma*, 206, 118–130. doi: 10.1007/BF01279258
- Morishita, Y., Matsuzaki, T., Hara-chikuma, M., Andoo, A., Shi-mono, M., Matsuki, A., Kobayashi, K., Ikeda, M., Yamamoto, T., Verkman, A., Kusano, E., Ookawara, S., Takata, K., Sasaki, S. and Ishibashi, K. (2005) Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol. Cell Biol.*, 25, 7770–7779. doi: 10.1128/MCB.25.17.7770-7779.2005
- Nelson, N. (2003) A journey from mammals to yeast with vacuolar H^+ -ATPase (V-ATPase). *J. Bioenerg. Biomembr.*, 35, 281–289. doi: 10.1023/a:1025768529677
- Nishihara, E., Shinmen, T. and Sonobe, S. (2004) Functional characterization of contractile vacuole isolated from *Amoeba proteus*. *Cell Struct. Funct.*, 29, 85–90. doi: 10.1247/csf.29.85
- Nishihara, E., Yokota, E., Tazaki, A., Orii, H., Katsuhara, M., Kataoka, K., Igarashi, H., Moriyama, Y., Shimmen, T. and Sonobe, S. (2008) Presence of aquaporin and V-ATPase on the contractile vacuole of *Amoeba proteus*. *Biol. Cell*, 100, 179–188. doi: 10.1042/BC20070091
- Patterson, D.J. (1980) Contractile vacuoles and associated structures. Their organization and function. *Biol. Rev.*, 55, 1–46. doi: 10.1111/j.1469-185X.1980.tb00686.x
- Preston, G. M., Smith, B. L., Zeidel, M. L., Moulds, J. J. and Agre, P. (1994) Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science*, 265, 1585–1587. doi: 10.1126/science.7521540
- Riddick, D.H. (1968) Contractile vacuole in the amoeba *Pelomyxa carolinensis*. *Am. J. Physiol.*, 215, 736–740. doi: 10.1152/ajplegacy.1968.215.3.736
- Roseth, S., Fykse, E. M. and Fonnum, F. (1995) Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J. Neurochem.*, 65, 96–103. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.65010096.x
- Shmidt-Nielsen, B. and Schrauger, C.R. (1963) *Amoeba proteus*: studying the contractile vacuole by micropuncture. *Science*, 139, 606–607. doi: 10.1126/science.139.3555.606
- Sun-Wada, G. H., Wada, Y. and Futai, M. (2003) Lysosome and lysosome- related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase. *Cell Struct. Funct.*, 28, 455–463. doi: 10.1247/csf.28.455
- Spallanzani, L. (1776) *Opuscoli di fiscal animale e vegetabile*. Modena: Societa Tipografica.
- Stock, C., Grønlien, 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, 2339–48. doi: 10.1242/jcs.115.11.2339
- Sugino, K., Tominaga, T., Allen, R. D. and Naitoh, Y. (2005) Electrical properties and fusion dynamics in vitro membrane vesicles derived from separate parts of the contractile vacuole complex of *Paramecium multimicronucleatum*. *J. Exp. Biol.*, 208, 3957–3969. doi: 10.1242/jeb.01858
- Tominaga, T., Allen, R. D. and Naitoh, Y. (1998a) Electrophysiology of the in situ contractile vacuole complex of *Paramecium* reveals its membrane dynamics and electrogenic site during osmoregulatory activity. *J. Exp. Biol.*, 201, 451–460. doi: 10.1242/jeb.201.3.451
- Tominaga, T., Allen, R.D. and Naitoh, Y. (1998b) Cyclic changes in the tension of the contractile vacuole complex membrane control its exocytotic cycle. *J. Exp. Biol.*, 201, 2647–2658. doi: 10.1242/jeb.201.18.2647
- Tominaga, T., Naitoh, Y. and Allen, R. D. (1999) A key function of non-planar membranes and their associated microtubular ribbons in contractile vacuole membrane dynamics is revealed by electrophysiologically controlled fixation of *Paramecium*. *J. Cell Sci.*, 112, 3733–3745. doi: 10.1242/jcs.112.21.3733
- 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. doi: 10.1242/jcs.02405
- Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S., Ehrenfeld, J. and Harvey, W. R. (1999) Animal plasma membrane energizatoin by proton-motive V ATPases. *Bioessays*, 21, 637–648. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199908)21:8<637::AID-BIES3>3.0.CO;2-W

- Yamauchi, K. (1995) Structure and evolution of *Paramecium* hemoglobin genes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1264, 53–62. doi: 10.1016/0167-4781(95)00114-v
- Zeuthen, T. (1992) From contractile vacuole to leaky epithelia. Coupling between salt and water fluxes in biological membranes. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1113, 229–258. doi: 10.1016/0304-4157(92)90040-h