

ゾウリムシの温度記憶と細胞膜



研究ノート

中岡保夫*

Memory of Temperature and Cell Membrane in Paramecium

Key Words : Thermosensory Response, Membrane Fluidity, Fluorescence Image Analysis

1. はじめに

大学祭で何人かの市民の方が研究室を見学に来られた時のこと。私は単細胞生物のゾウリムシをみついているので、顕微鏡でゾウリムシを眺めてもらっていた(図1)。ゾウリムシの泳ぎをしばらく眺めていた中年の男性の方が突然、真顔で「ゾウリムシには脳みそがあるんですか?」と尋ねられた。私はつい「ゾウリムシは単細胞生物なので脳みそは・・・」というあたりまえの答えをしたところ、「そんなはずはない、必ず脳みそを持っているに違いない」という反論をされ、延々1時間近く脳みそ論議をしてしまった。しかし思い起こせば、私もゾウリムシを初めて眺めた時、同じような印象を持ったことからゾウリムシとのながい付き合いが始まった。私の場合、ゾウリムシを温度勾配のある容器の中に入れると、多くのゾウリムシは培養された温度を記憶しているかのように培養温度附近に集まってくる(図2)。単細胞生物のゾウリムシが温度の記憶を持つということに感心してしまっ

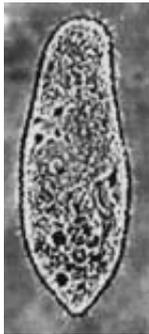


図1 ゾウリムシ
細胞表面にある多数の繊毛を打って水中を泳ぐ。細胞の長さは0.2-0.3 mm。



図2 温度勾配容器中のゾウリムシの分布
長さ4 cmの長方形の容器に右端が25 左端が22 になるような温度勾配をつけると、25 で培養されたゾウリムシは25 の側に集まる。長さは0.2-0.3 mm。

2. 温度記憶とイオン・チャネル

温度勾配容器の中でゾウリムシが培養された温度の場所に集まる時の泳ぎを解析してみると、培養温度から遠ざかる向きに泳ぐ時には高い頻度で方向変換するが、培養温度に近づく向きに泳ぐ時には方向変換の頻度が低く直進して泳ぐために培養温度附近に集まって来ることが分かる[1]。ゾウリムシは温度勾配容器の中を泳ぎ回りながら温度の時間的変化を感知し、温度の上昇または下降に対応して方向変換の頻度を調節し培養温度附近に集まるらしい。泳ぎが方向変換する頻度は、膜電位(細胞外をゼロとした時の細胞内の電位で-25mV程度)が変化することにより調節されている。温度が培養温度から急に下降した場合、膜電位は一過的に数mVプラス向きに変化(脱分極)するような温度受容電位を発生する。そうすると繊毛部分にある電圧感受性のイオン・チャネルが開き細胞外のCa²⁺が流入するために繊毛の逆転打が起き、泳ぎの方向変換頻度が増大する。温度を感じて発生する温度受容電位は、細胞体の前端部分にある温度感受性のイオン・チャネルが開き細胞内にCa²⁺が流入したことによって発生している[2]。培養温度附近に集まろうとする泳ぎは、細胞膜にある温度感受性のイオン・チャネルが



* Yasuo NAKAOKA
1944年2月生
1973年名古屋大学理学研究科物理学
現在、大阪大学生命機能研究科、助教授、
理学、生物物理学
TEL 06-6850-6543
FAX 06-6850-6543
E-mail: nakaoka@bpe.es.osaka-u.ac.jp

適応温度からの温度下降にตอบสนองして活性化することがその原因である。

ゾウリムシの持つ温度センサーは非常に敏感で、特に温度下降が培養温度からスタートした時には1分間に1 程度のゆっくりした下降速度でも、直ちにイオン・チャンネルが開き小さな振幅ではあるが膜電位の脱分極が発生する。従って温度感受性のイオン・チャンネルは温度がほんの少し変化した時点で開くことになる。そうすると、温度センサーはチャンネル蛋白の構造変化だけによって働くとは考えにくい。さらにこの温度センサーの応答は培養温度に依存しており、同じ温度下降刺激であっても培養温度よりも高い温度領域か低い温度領域かで応答が全く異なるし、培養温度の記憶は数時間たつと新しい培養温度の記憶に切り替わってしまう。このような温度センサーの特性は、温度感受性のチャンネル蛋白を取り巻く細胞膜の状態、特に膜を構成する脂質分子の運動状態を示す膜流動性が、チャンネルの活性調節を行っているからではないかと予想した。

3. 膜流動性の測定系

高感度で温度刺激にตอบสนองし培養温度を覚えているということと関連させて膜の状態を調べるには、このような機能を保持している生きた細胞での測定が望まれる。そのために生きた細胞の細胞膜を蛍光色素でラベルし蛍光顕微鏡で観察することによって細胞膜の状態を調べる方法を試みた [3]。

蛍光色素はラウルダン (laurdan; 6-lauroyl-2-dimethylaminonaphthalene) を用いた (図3)。

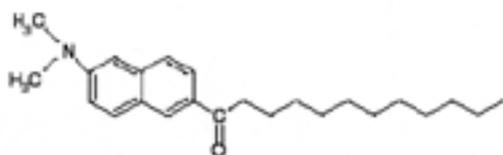


図3 ラウルダン分子

この色素は長い炭化水素鎖部分を疎水性の脂質二重層の内側にもぐりこませ、ナフタレン部分を二重層の外側に向けた状態で脂質膜と結合する。ナフタレンの両端には電子供与性のアミノ基と電子受容性のカルボニル基が付加されていて励起状態では大きな双極子モーメントを持っている。しかしナフタレン

部分に水などの極性を持った溶媒分子が来ると双極子緩和により、蛍光スペクトルが長波長側にシフトする。単一組成の脂質膜では温度上昇とともにゲル相から液晶相へときれいな相転移をするが、この転移に伴い液晶相では脂質分子のブラウン運動が激しくなってその配列が乱れる。同時にラウルダンのナフタレン部分に水分子が近づきやすくなり、蛍光スペクトルが長波長側へシフトする (図4)。

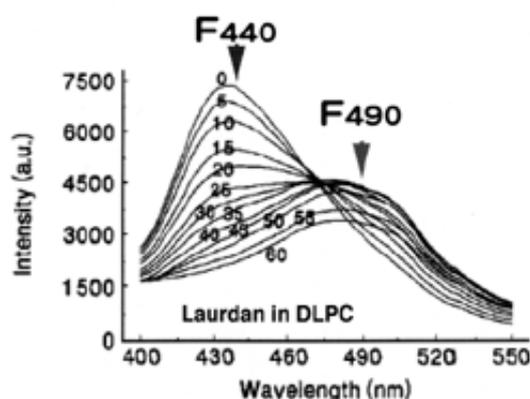


図4 脂質膜に結合したラウルダン蛍光スペクトルの温度による変化 [4]

ラウルダンの蛍光スペクトルの最大ピークは、ゲル相で440 nm (紫色)、液晶相では490nm (青色) 付近にある。そうするとこれらピークでの蛍光強度、 F_{440} と F_{490} とを比較することで膜脂質の運動性、膜流動性を評価することができる [4]。比較の方式としてGP (generalized polarization) $= (F_{440} - F_{490}) / (F_{440} + F_{490})$ を定義しGPの値を調べると、膜流動性の低いゲル相でGP値は大きく、膜流動性の高い液晶相ではGP値が小さくなる。

蛍光顕微鏡でラウルダン・ラベルした細胞を観察すると、蛍光画像の色合いから細胞膜の状態が分かるはずである。蛍光画像の各画素の色合いをGP値として2次元的に表したGP画像を描くために、蛍光顕微鏡に次のような光路を組み合わせた装置を作成した (図5)。励起光を当てた細胞の蛍光画像をダイクロイックミラーにより短波長側と長波長側の2つの光路に分離し、それぞれを440nmと490nmの単色フィルターを通過させて、 F_{440} と F_{490} 2つの画像を同時にイメージ・インテンシファイアー、CCDカメラに取り込みモニター画面の左右に並べて映す。これら2枚の画像をPCに取り込み、再度

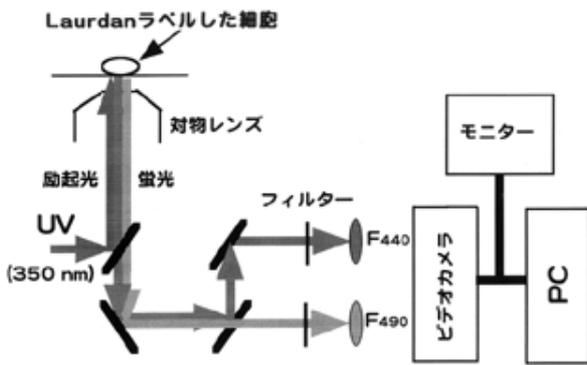


図5 蛍光画像解析のための光路の概略図

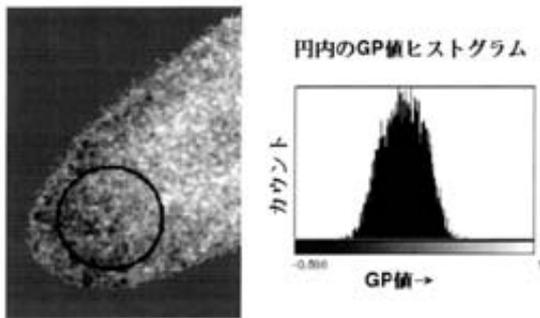


図6 GP画像とGP値ヒストグラム
温度感受性を持つ細胞前端部分での平均GP値を膜流動性の指標とした。

画像が完全に重なり合うような座標調整と画像間での演算を行うことによってGP画像を作成する。(図6)この装置は毎秒30コマで画像取り込みが可能なので、比較的速い膜流動性の変化を追うことができる。しかし、ラウルダンの蛍光は退色が速いために、

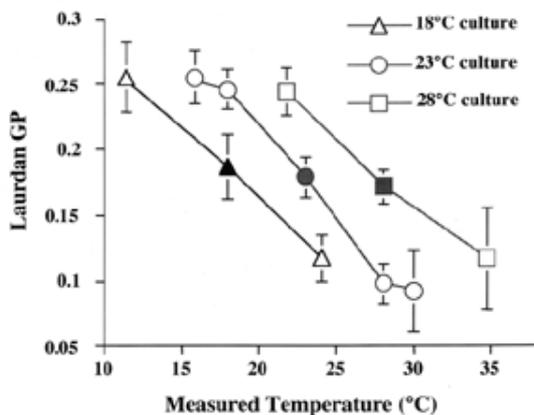


図7 いろいろな温度で測定したGP値
培養温度が18, 23, 28のゾウリムシについて測定した。塗りつぶしたシンボルは測定温度が培養温度と一致する時のGP値。

励起光の強度をできるだけ下げ一方でイメージ・インテンシファイアーにより検出感度を上げて画像を取り込んでいるが、それでも同じ細胞につき10秒程度の連続測定が限界である。

4. 温度記憶と膜流動性

ゾウリムシの温度記憶と細胞膜との関連を知るために、ゾウリムシ細胞のGP画像を作成し細胞の前端部分でのGP値を測定した。いろいろな温度で測定するとGP値は温度が高くなるにつれて減少し、膜流動性が温度とともに上昇する。このような測定を培養温度の異なるゾウリムシについて行ったところ、いずれも培養温度でのGP値はほぼ一定の値0.18であり、培養温度を中心にその上下5ほどの温度範囲内でGP値が温度に依存して大きく変化することが分かった(図7)。この結果は、培養温度では膜の流動性が一定の同じ状態に保たれており、培養温度からスタートする温度変化で膜流動性の大きな変化が起きることを示している。したがってゾウリムシの温度記憶は、膜流動性が温度に依存して大きく転移してゆく中心の温度を培養温度と一致させるような膜脂質の代謝調節によって形成されたと考えられる。単細胞生物のゾウリムシは脳を持たないが、その代用として細胞膜に単純な記憶機能を持たせているのであろう。

5. おわりに

多くの変温性の生物から抽出した膜脂質について、その相転移温度が培養温度の変化にともなって変化するという事は古くから知られている。しかし大きく転移する中心の温度が培養温度と一致するという今回の結果は、生きているゾウリムシ細胞の蛍光測定により初めて得られた。このような細胞膜の性質はゾウリムシだけでなく広く他の生物でも同じなのか、また培養温度からの温度変化で起きる大きな膜流動性変化がどのように作用してイオン・チャンネルを開かせるのか等の問題は今後の課題である。

参考文献

[1] Nakaoka, Y. et al. Temperature-sensitive behavior of *Paramecium caudatum*. J. Protozool. 24, 575-580 (1977).

- [2] Kuriu, T. et al. Cold-sensitive Ca²⁺ influx in Paramecium. J. Memb. Biol. 154, 163-167 (1996).
- [3] Sasaki, T. et al. Correlation between thermotolerance and membrane properties in Paramecium aurelia. J. Exp. Biol. 209, 3580-3586 (2006).
- [4] Parasassi, T. et al. Laurdan and prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. J. Fluorescence, 8, 365-373 (1998).

この記事をお読みにになり、著者の研究室の訪問見学をご希望の方は、当協会事務局へご連絡ください。事務局で著者と日程を調整して、おしらせいたします。

申し込み期限：本誌発行から2か月後の月末日

申し込み先：生産技術振興協会 tel 06-6944-0604 E-mail seisan@maple.ocn.ne.jp

必要事項：お名前、ご所属、希望日時（選択の幅をもたせてください）、複数人の場合はそれぞれのお名前、ご所属、代表者の連絡先

著者の都合でご希望に沿えない場合もありますので、予めご了承ください。

