

アメーバの細胞質に存在する 微小顆粒と結晶の形態と元素組成の比較

八 島 洋 一*

(受付 2005年11月17日)

A comparative study on shape and elemental composition
of microgranules and crystals present in the cytoplasm of amoebae

Yoichi Yashima

Summary

In order to compare the difference of crystals and microgranules among *Amoeba proteus*, *Polychaos dubium* and the food organism chlorella free *Paramecium bursalia* collected from a natural freshwater pond, a study was performed using a light microscope (LM), transmission electron microscope (TEM), scanning electron microscope (SEM), and X-ray microanalyser. LM and SEM observation of the cytoplasm of *A. proteus* revealed numerous microgranules and small crystals of bipyramidal form, that of *P. dubium* revealed numerous microgranules and large crystals of platelike rectangular form, and that of *P. bursalia* revealed numerous microgranules and irregular shaped crystals. By using LM observation of a toluidine blue stained thick resin section, the outer layer of each crystal in *P. dubium* and the whole of each crystal in *A. proteus* was dyed dense ultramarine. The results of X-ray microanalysis showed as follows: The elemental composition of microgranules and crystals did not differ between the two species of *A. proteus* and *P. dubium*, and the elemental composition of both crystals consisted mainly of carbon, nitrogen and oxygen, and that of microgranules consisted of the same elements as crystals, plus the inorganic components magnesium, phosphorus, potassium, chlorine, and calcium. In *P. bursalia* no difference of the elemental composition between microgranules and crystals was observed. The inorganic component of the elemental composition of the microgranules and crystals was slightly different between amoebae and *P. bursalia*.

These results indicate that the crystals and microgranules of amoebae were not derived from the food organism *P. bursalia* but were originally synthesized in each cell, that the crystals of amoebae could be deposits or reservoirs of organic materials containing nitrogen, and that microgranules of amoebae could be deposits and reservoirs of certain ions and could be involved in the regulation of ion levels in the cell.

* 岩手医科大学 教養部 生物学

* Department of Biology, School of Liberal Arts and Sciences, Iwate Medical University

はじめに

原生動物にはいろいろな形の結晶が見られるが、多くの研究者によって結晶の形、成分と機能などについて調べられてきた。以前には結晶は細胞にとって不要な物質であり、排出物と考えられていた。アメーバでも結晶胞をもつものが多く、食性によってこれらが増減することが知られている (Andresen and Holter 1945)。これらの結晶はプリン誘導体のトリウレット (カルボニール・ジウレア) であると言われ、窒素代謝産物と考えられている (Griffin 1959, Grunbaun 1959)。アメーバの分類においては結晶の形や大きさが偽足、核、ウロイドなどとともに同定の特徴に用いられている (石井1999)。従属栄養生物では結晶の形や出現は取り込む栄養分と関係があるといわれ、ゾウリムシでは細菌を餌として与えると、小さな粒子状の結晶ができ、タンパク質や肉エキスを与えると多くの大きな結晶ができるといわれている。有孔虫ではミジンコや繊毛虫類を餌として与えると結晶ができるが、珪藻を与えると結晶はできないことも知られている。繊毛虫類の結晶にもいろいろな形のもがみられ、その成分は calcianstruvite であると言われ、有機物を含む結晶としては lithosome があり、今日では結晶の役割はイオンや窒素代謝物の沈着物または貯蔵庫であるか、もしくはある種のイオンの濃度を調節しているとの二つの仮説があるが、結晶の化学的、生理学的本質は解明されていない (Hausmann Hulsman and Radek 2003)。

本研究では、アメーバの微小顆粒と結晶の性質を調べるために、各種顕微鏡による形態観察を行うとともに走査型 X 線マイクロアナライザーによる元素分析を行い、さらに、餌生物の結晶 (微小顆粒) の元素とアメーバの結晶 (微小顆粒) の元素組成の比較を行って餌生物由来か、それともアメーバ細胞内で合成されたものかを検討した結果について報告する。

材料と方法

材料は盛岡市岩手公園の鶴ヶ池から採集したアメーバ、*Amoeba proteus* と *Polychaos dubium* の二種を使用した。これらのアメーバ二種からそれぞれ細胞 1 個体を単離し、餌としてミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) 白色細胞 (以下この細胞を WC とする) を用いて室温で培養し、クローンを作製した。培養はアメーバの生理的塩類溶液である KCM (石井1999) を、容器として 6 cm プラスチックシャーレを用いて行った。WC の培養は、Wheat grass powder 浸出液 (2.5g/l) に $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を 1g/l の割合で加え、これに *Klebsiella pneumoniae* を接種後 24 時間経過したものを培養液として用いて行った。

スライドガラス上に KCM をマイクロピペットで一滴おき、アメーバ細胞や餌の WC を 10 個体移し、カバーガラスで封じて光学顕微鏡用の生体標本作製した。また、核の観察は酢酸カーミンで染色を行った。

透過型電子顕微鏡 (TEM) 用の試料は、2.5% グルタルアルデヒド (0.05M リン酸緩衝液, pH 7.4) で室温、1.5 時間の前固定と 1% 四酸化オスミウム (0.05M リン酸緩衝液, pH 7.4) で 0°C、1 時間の後固定を行い、常法に従ってアルコールで脱水し、プロピレンオキサイドを通して spurr 樹脂に包埋して作製した。樹脂の重合が完了した後、厚さ 0.5 μm の厚切り切片と超薄切片を作製した。厚切り切片はトルイジンブルーで染色して光学顕微鏡で観察した。超薄切片は 1% 酢酸ウラニルと 0.2% クエン酸鉛で染色し、TEM (日立 H-7100) で観察した。

走査型電子顕微鏡 (SEM) とエネルギー分散型 X 線マイクロアナライザー用の試料は、SEM 用カーボン試料台上にマイクロピペットで数滴の超純水をおき、その中に遠心機用いて超純水で 2 回洗浄した 50 個体のアメーバ細胞 2 種それぞれを移して自然乾燥を行った後、カーボンを蒸着して作製した。WC の微小顆粒の分析用試料は、アメーバの場合と同様にカーボン試料台上で自然乾燥により作製した。また、約 100 ml の

培養を遠心により集めた WC を超純水で 2 回洗浄した後 2 ml に濃縮し、これをプラスチックサンプルチューブに移して -30°C のフリーザーで凍結した。これを室温に戻して解凍し、さらに、パスツールピペットでピペッティングを行って細胞を完全に破碎した。結晶を含む破碎液をアルミ試料台とカーボン試料台にマイクロピペットで数滴滴下して自然乾燥させて試料を作製した。WC 結晶の炭素元素の分析は、アルミ試料台を用いて無蒸着で行った。試料は SEM (日立 S-4700) で観察し、エネルギー分散型 (EDX) と波長分散型 (WDX) X 線マイクロアナライザー (日本電子 JXA-8900L) を用い、結晶、微小顆粒とそれら以外の細胞成分 (対照) について元素分析を行った。軽元素 (C, N, O) は WDX で、その他の元素は EDX で分析を行った。

結果

アメーバを光学顕微鏡で生体観察すると、*A. proteus* では $2 \sim 3 \mu\text{m}$ の透明な粒状の結晶 (図 1-②, ③) が、*P. dubium* では $10 \sim 20 \mu\text{m}$ の透明な板状をした多数の結晶 (図 1-⑤, ⑥) がいずれも細胞質全体に観察され、結晶の形や大きさに種による違いが認められた。餌の WC では、細胞質に種々のサイズの複雑な形をした透明な結晶 (図 1-①) が観察された。トルイジンブルー染色した切片を観察すると、*A. proteus* では結晶全体が濃青色に染色され (図 2-①矢印)、*P. dubium* では結晶の周囲が濃青色に染色されたが中央部は染色されなかった (図 2-②矢印)。酢酸カーミンで染色した *P. dubium* を観察すると、円盤状をした直径が $40 \mu\text{m}$ の核が 1 個とその周囲に透明な結晶が見られた。結晶の周囲はかすかに染色されていた (図 1-④)。

A. proteus の結晶を TEM で観察すると、一枚の膜 (矢印) でその周囲が囲まれ、結晶胞が形成されていた。結晶の部分は電子密度の高い物質が少し認められ、中央が空隙になっていた (図 2-③)。

餌生物の WC の試料を SEM で観察すると、結晶と微小顆粒が見られた。結晶は表面がひだ状になっているタイプとガラス片のようなタイプが見られた (図 3-②, ③)。サイズはそれぞれ $12.5 \mu\text{m}$ と $14.6 \mu\text{m}$ であった。微小顆粒のサイズは $1.7 \mu\text{m}$ 以下であった (図 3-①)。結晶と微小顆粒を構成する元素はともに同じであり、C, N, O, Na, Si, P, S, Cl, K, Ca の 10 元素が検出された (図 5-①, 図 6-①, ②, 表 1)。

A. proteus の試料を SEM で観察すると、サイズが $2 \sim 3 \mu\text{m}$ のバイピラミッド型の均一な結晶とその周囲に $0.6 \mu\text{m}$ 以下の微小顆粒が存在した (図 4-③)。これらを分析すると結晶からは C, N, O, P, S, K が、微小顆粒からは C, N, O, Mg, P, Cl, K, Ca が検出された (図 5-②, ③, 図 6-③, ④, 表 1)。今回の試料作製法で対照の部分に結晶が隠れている可能性があるため軽元素の検出は行なわなかったが、EDX の分析からは P, S, Cl, K の元素が検出された (図 6-⑤, 表 1)。

P. dubium でも $2.7 \sim 20 \mu\text{m}$ の大きさの異なる矩形層板状の結晶とその結晶に付着する $0.9 \mu\text{m}$ 以下の微小顆粒が見られ、大きな結晶には多数の微小顆粒が結合していた。これらを分析すると結晶からは C, N, O, P, K が、微小顆粒からは C, N, O, Mg, P, Cl, K, Ca の元素が検出された (図 5-④, ⑤, 図 6-⑥, ⑦, 表 1)。対照からは P, S, Cl, K の元素が検出された (図 6-⑧, 表 1)。

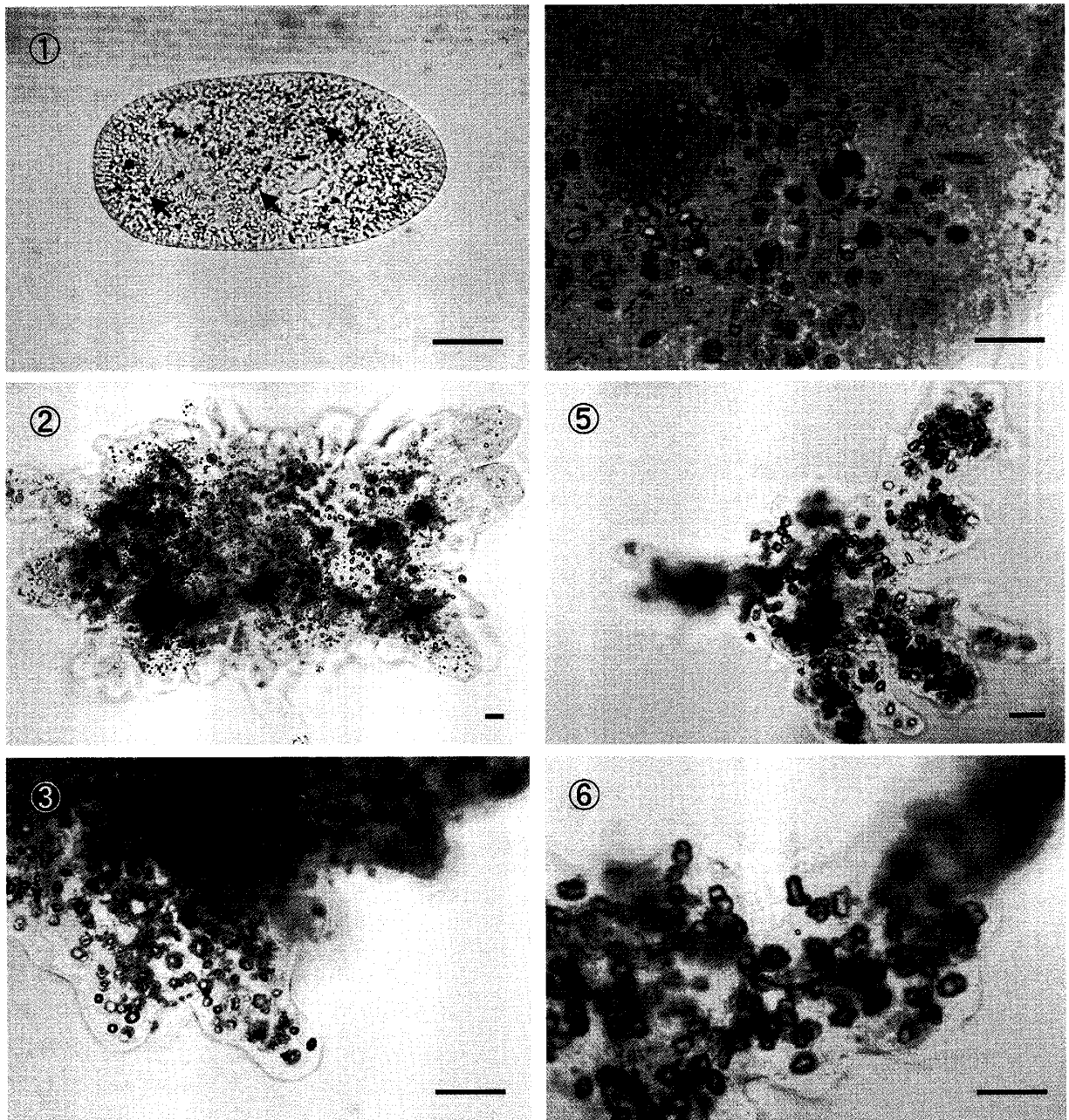


図1 光学顕微鏡写真

- ① ミドリゾウリムシ WC. 矢印は結晶を示す。スケールは20 μm .
- ② *A. proteus* の低倍写真。細胞質全体に点状に見える多数の結晶。スケール20 μm .
- ③ ②の一部を拡大。多数の結晶が粒状に見える。スケール20 μm .
- ④ *P. dubium* の酢酸カーミン染色写真。1個の赤く染色された核 (N) と周囲に見られる大きな結晶。スケール20 μm .
- ⑤ *P. dubium* の低倍写真。多数の結晶が細胞全体に見られる。スケール20 μm .
- ⑥ ⑤の一部を拡大。同じ大きさの結晶からなる。スケール20 μm .

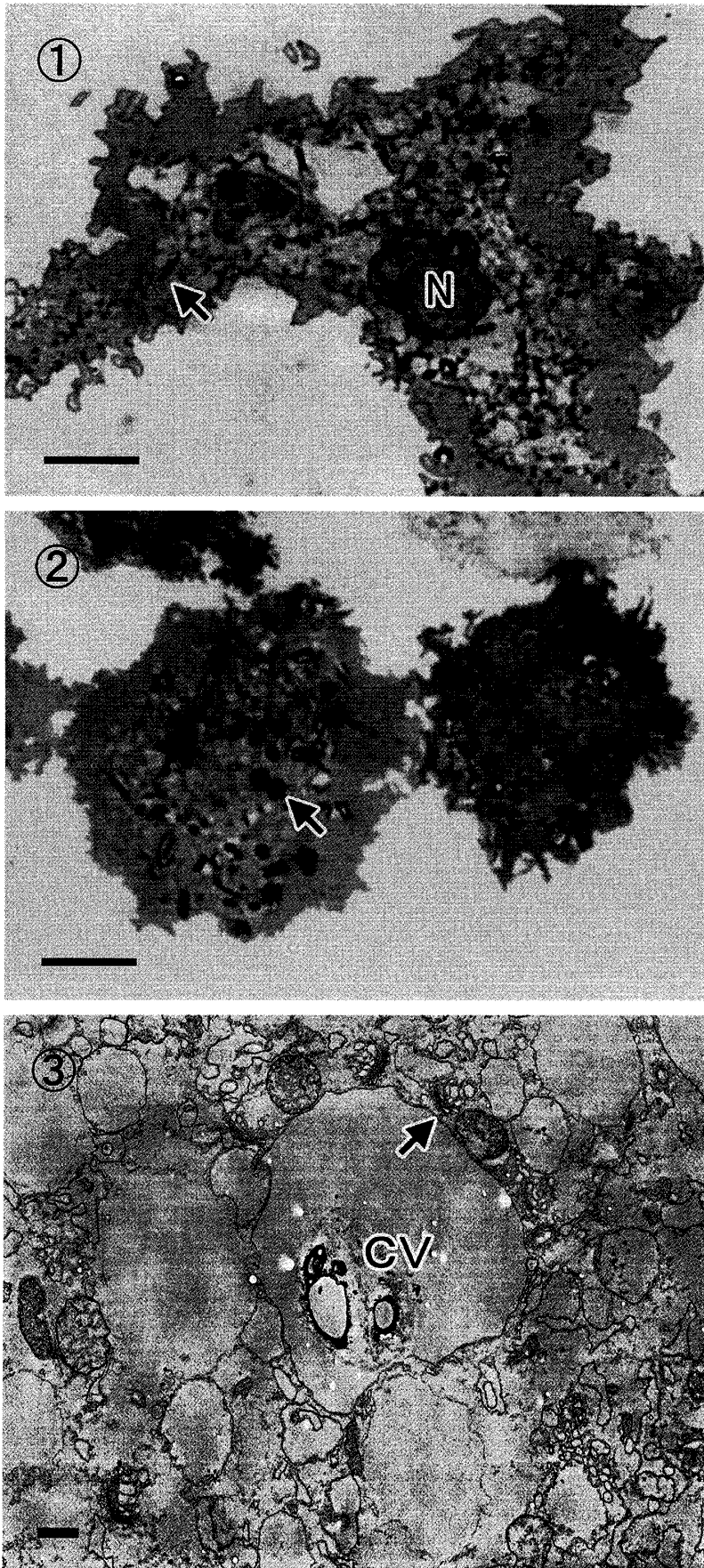


図2 アメーバ結晶の光顕写真とTEM写真

- ① *A. proteus* のトルイジンブルー染色標本。1個の核 (N) と多数の結晶 (矢印) が見られる。スケールは20 μm 。
- ② *P. dubium* のトルイジンブルー染色標本。大きな結晶 (矢印) の周囲が濃染されている。スケールは20 μm 。
- ③ *A. proteus* の結晶胞 (CV) のTEM写真。結晶胞のなかに電子密度の高い表面をもつ中空の結晶が見られる。スケールは1 μm 。

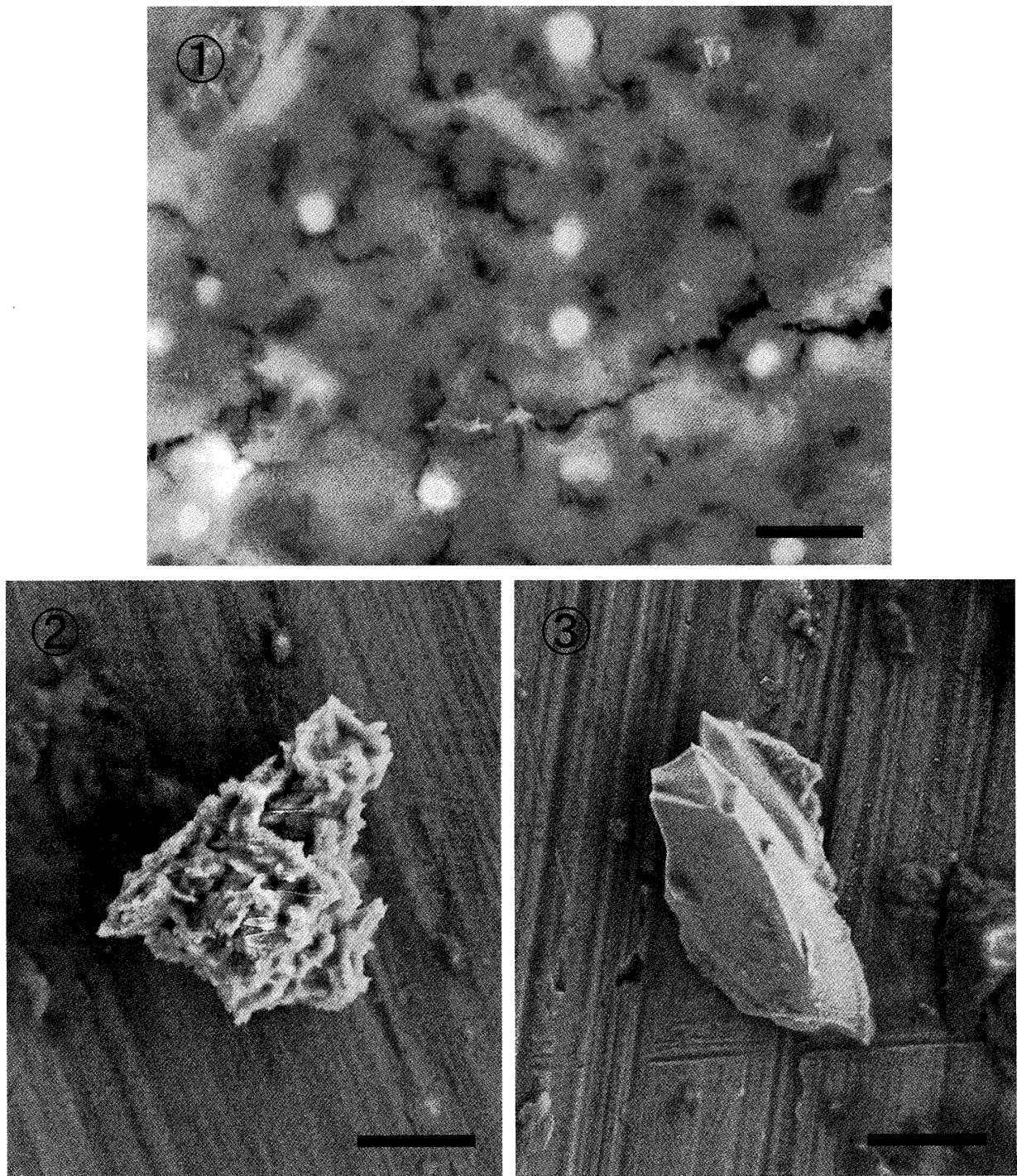


図3 ミドリゾウリムシ微小顆粒と結晶のSEM写真。

- ① ミドリゾウリムシの微小顆粒。スケールは5 μm 。
- ② ミドリゾウリムシのひだ状をした不規則な形の結晶。スケールは5 μm 。
- ③ ミドリゾウリムシのガラス片様の結晶。スケールは5 μm 。

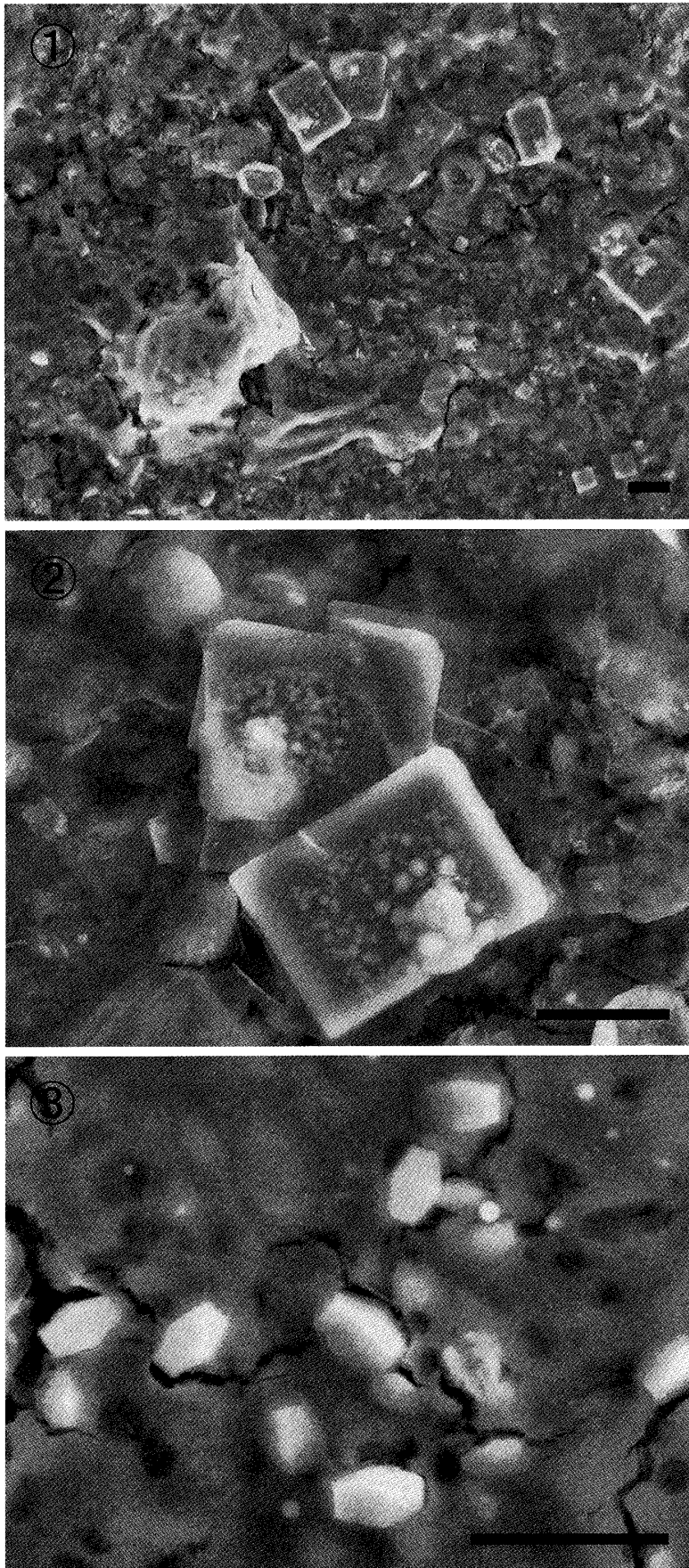


図4 アメーバの結晶と微小顆粒のSEM写真

- ① *P. dubium* の低倍写真. 種々のサイズの矩形層板状結晶が見られる. スケールは $10\mu\text{m}$.
- ② ①の結晶の拡大. 結晶に微小顆粒が多数付着している. スケールは $5\mu\text{m}$.
- ③ *A. proteus* の微小顆粒とバイピラミッド型の結晶. スケールは $5\mu\text{m}$.

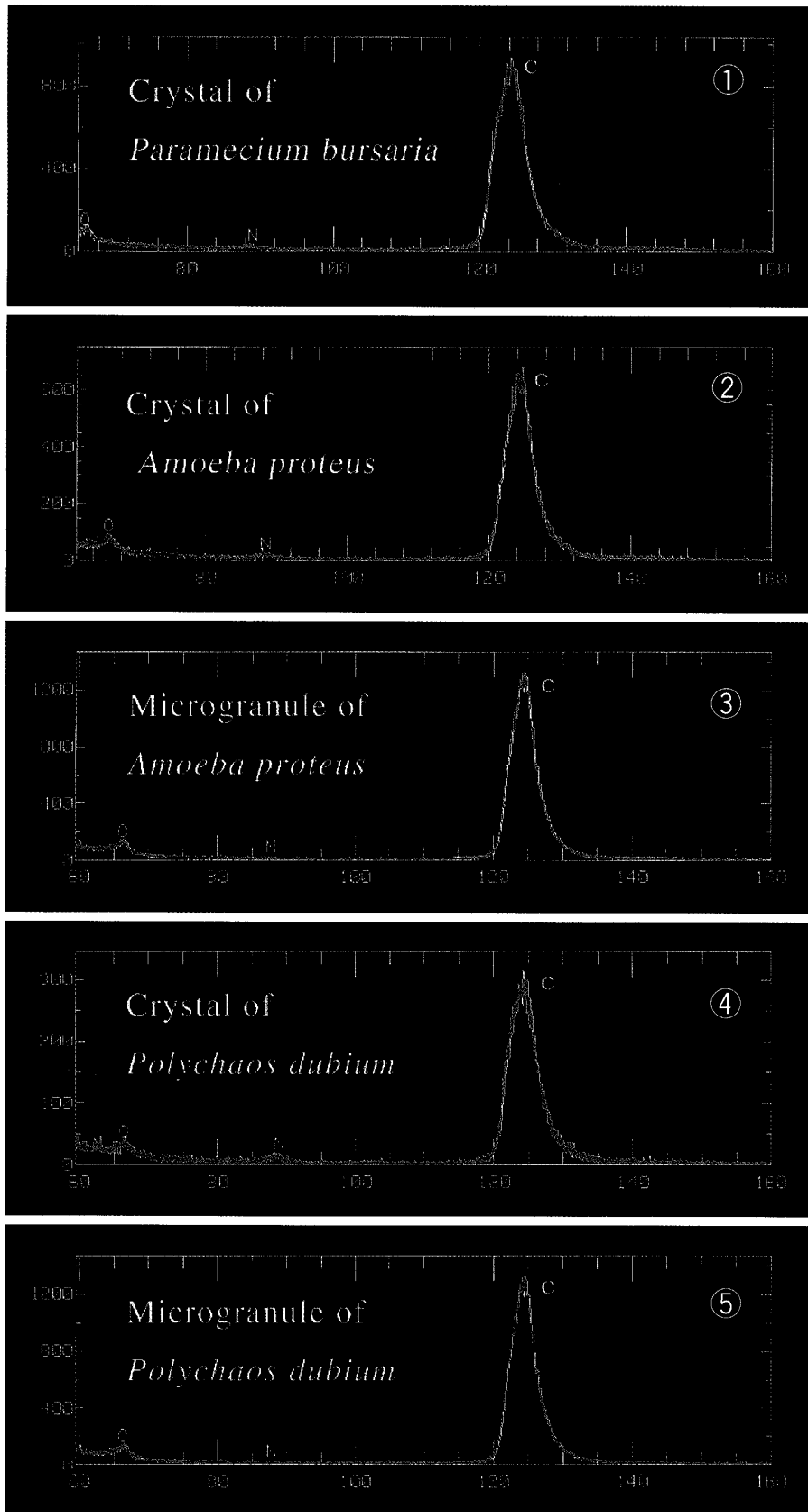


図5 WDX-X線スペクトラ
 ① ミドリゾウリムシの結晶.
 ② *A. proteus* の結晶.
 ③ *A. proteus* の微小顆粒.
 ④ *P. dubium* の結晶.
 ⑤ *P. dubium* の微小顆粒.

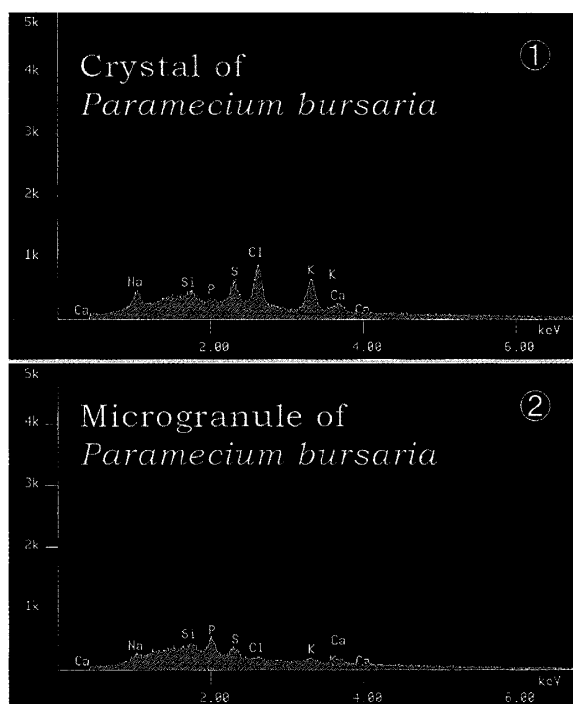


図6 EDX-X線スペクトラ
 ① ミドリゾウリムシの結晶。
 ② ミドリゾウリムシの微小顆粒。
 ③ *A. proteus* の結晶。
 ④ *A. proteus* の微小顆粒。
 ⑤ *A. proteus* の対照。
 ⑥ *P. dubium* の結晶。
 ⑦ *P. dubium* の微小顆粒。
 ⑧ *P. dubium* の対照。

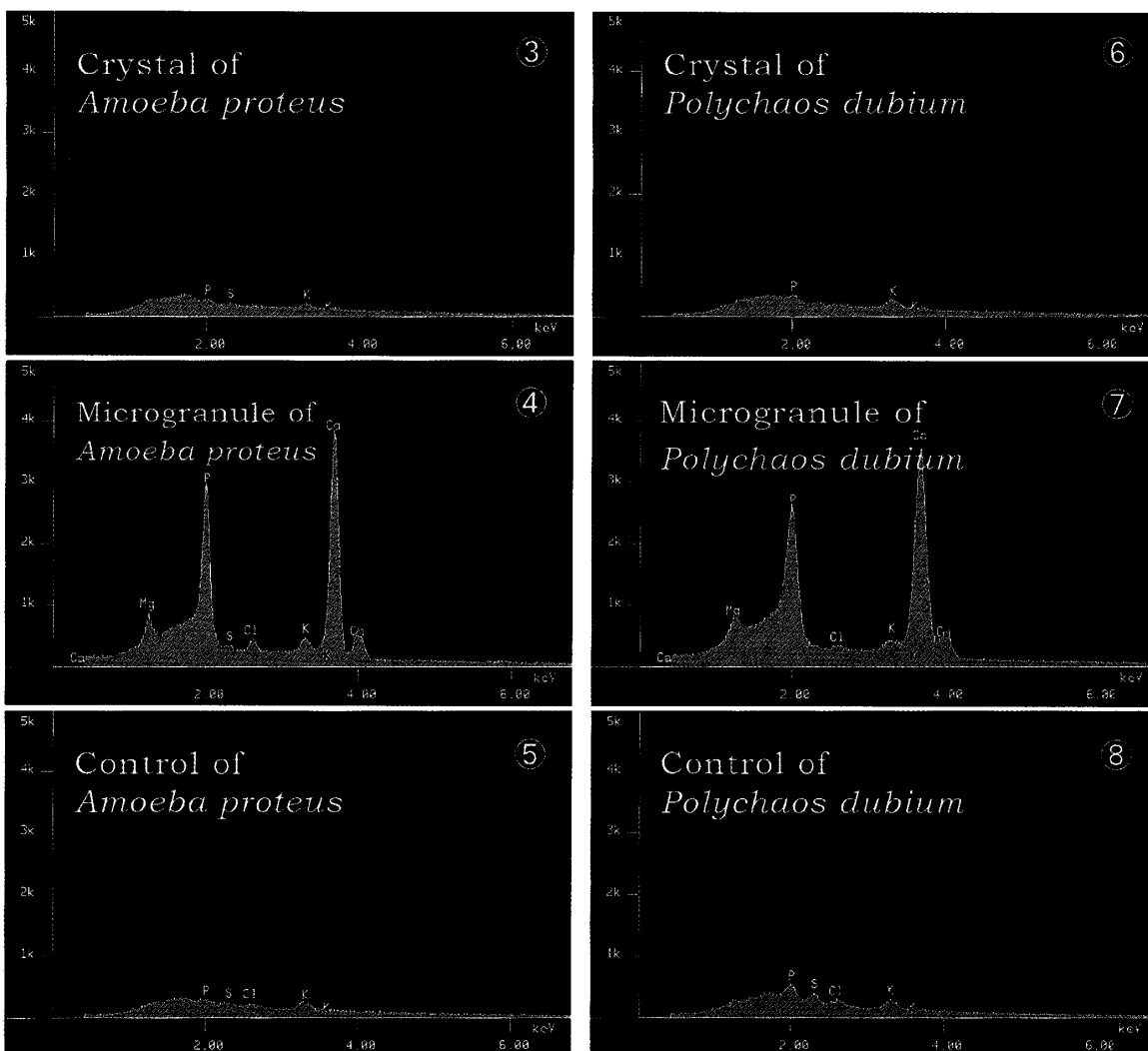


表1 WDX-, EDX-X線マイクロアナライザーによる結晶と微小顆粒の元素組成

試料	WDX	EDX
<i>Paramecium bursaria</i>		
結晶*	C, N, O	Na, Si, P, S, Cl, K, Ca
微小顆粒	C, N, O	Na, Si, P, S, Cl, K, Ca
<i>Amoeba proteus</i>		
結晶	C, N, O	P, S, K
微小顆粒	C, N, O	Mg, P, Cl, K, Ca
対照**		P, S, Cl, K
<i>Polychaos dubium</i>		
結晶*	C, N, O	P, K
微小顆粒	C, N, O	Mg, P, Cl, K, Ca
対照**		P, S, Cl, K

* 凍結融解とピペッテングにより作製した細胞破碎液の結晶。

** 試料台上で細胞を自然乾燥させた試料で、結晶や微小顆粒のない細胞成分の部分。印のついていないものは試料台上で細胞を自然乾燥させた試料の結晶と微小顆粒。

考 察

光学顕微鏡による形態学的な観察を行った結果、アメーバや*P. bursaria*の細胞質には形や大きさの異なる結晶と微小顆粒が二種類存在することがわかった。従来から知られていた結晶は、空胞のなかに入って結晶胞を形成しているが、微小顆粒については膜に包まれているかどうかは不明である。アメーバと*P. bursaria*の結晶の分布の違いが見られ、アメーバでは細胞質全体に均等に分布しているが、*P. bursaria*では大きな結晶は細胞の前端部や後端部に分布する傾向が見られ、小さな結晶は細胞質に均等に分布している。このような結晶の分布の違いは、アメーバでは結晶が原形質流動によって細胞内を移動することができるのに対し、*P. bursaria*では小さな結晶は原形質流動による移動が可能のために細胞内に均等に分布するが、大きな結晶は原形質流動で移動できないために分布のかたよりが生じることが原因と考えられる。アメーバと*P. bursaria*の微小顆粒については細胞内の分布については観察できなかった。

*P. bursaria*の結晶は不定形をした表面がひだ状や滑らかなガラス片様の構造をしているのに対し、Grunbaumら(1959)によると*A. proteus*ではバイミラミッド型、矩形板状型と菱形板状型の3型が観察されているが、アメーバの結晶

は定型のバイピラミッド型や矩形層板状型で、種によって一定の形をしていた。結晶のサイズは*P. bursaria*では15 μm 程度、アメーバの*A. proteus*では2~3 μm とほぼ一定、*P. dubium*では2.7~20 μm と違いが見られた。微小顆粒のサイズは*P. bursaria*が1.7 μm 以下、*A. proteus*の場合0.6 μm 以下、*P. dubium*の場合は0.9 μm 以下と違いが見られた。そして、*P. bursaria*と*A. proteus*の微小顆粒は結晶に付着しないで細胞質に存在するのに対し、*P. dubium*では結晶に付着している。結晶の形成過程を推定すると、*P. dubium*では結晶のサイズに大小があるので、結晶は結晶胞内で成長して大きくなるとともに微小顆粒が付着してくると考えられる。しかし、観察された結晶のうち最も小さな結晶には微小顆粒が付着していないので、結晶の成長に微小顆粒が関わっているのか、それともいないのかわからない。いずれにしても、*P. dubium*では微小顆粒と結晶が同一の結晶胞内で形成されるものと考えられる。これに対し、*A. proteus*や*P. bursaria*では結晶に微小顆粒が付着していないので、微小顆粒形成と結晶形成がおこる所は異なり、独立に形成されるものと考えられる。また、餌生物として同じものを与えても結晶の形がアメーバの種によって異なり、同種では一定の形の結晶を形成することから、種に

よって結晶の形は一定になるので分類の基準として使われている (Bovee and Jahn 1973, 石井 1999) が, これらと結果は一致する. これらのことから, アメーバは餌生物のからの結晶を老廃物として単に貯蔵しているのではなく, 細胞内に多数の微小顆粒や結晶があることから何らかの生理的性質をもっていると考えられる. アメーバの結晶は自身が取り込んだ餌生物の結晶を元にして形成したのか, 結晶形成と餌生物の結晶との関係は不明である.

これに対し, ゾウリムシ類や有孔虫類では餌生物の種類によって形成される結晶の形や大きさに違いが生じたり, 結晶の有無が生じたりすること (Hausmann, Hulsman and Radek 2003) や, ゾウリムシを飢餓状態におくと結晶は1~2日後に完全に消失し, 餌生物を与えると再出現することが知られている (Daniels 1973) が, この現象では結晶が栄養源として働いているように推測される. しかし, アメーバにおいてはこのような結晶の消失と再出現は短時間では観察されないが, 長時間の飢餓状態を続けるとこのような現象が起こるのかもしれない.

ゾウリムシやアメーバ類の結晶について種々の試薬に対する溶解度が Bernheimer (1938) によって調べられた結果, 水や酸, 塩基に溶解したが, 有機溶媒には溶解しなかった. これらの結果からアメーバではプリン誘導体のトリウレット (Griffin 1960) や尿素 (Grunbaum et al. 1959) の結晶といわれているが, 今回 X 線マイクロアナライザーで分析した2種のアメーバでも結晶を構成する元素は C, N, O が主体であり, 元素組成はトリウレットや尿素と一致するが, 水溶液中では溶解が起こらなかった. 無機成分として P, S, K の元素が検出されたが, これは対照で検出された元素とほとんど変わらないので, 細胞成分が結晶に付着していたことも考えられる. 結晶と対照の分析結果を比較すると, P, S, Cl, K の各元素の特性 X 線のカウント数はほぼ同じなのでアメーバの結晶は C, (H), O, N の有機物の元素で構成されていると考えられ有機物を染色するトルイジンブルー染色の結果

とも一致する. ただし, H の元素は X 線マイクロアナライザーでは検出することができないので推定したものである. 餌生物の *P. bursaria* の結晶でも主成分はアメーバと同様であったが, 無機成分として Na, Si, P, S, Cl, K, Ca の元素を含んでいたのでアメーバと元素組成に違いが見られる.

アメーバの微小顆粒に C, N, O の元素の他に無機成分として Mg, P, Cl, K, Ca の元素が検出された. これらの特性 X 線のカウント数と対照のそれらを比較すると, 明らかに違いがみられたので, 微小顆粒に対照の成分が付着したのではなく, 検出された元素は微小顆粒を構成する元素であったと考えられる. 微小顆粒の元素組成は *A. proteus* と *P. dubium* の2種でまったく同じであった. *P. bursaria* の微小顆粒の構成元素は結晶の元素組成とまったく同じであったので, *P. bursaria* では微小顆粒が結晶の形成に関係があると推定されるが, アメーバでは微小顆粒と結晶に無機成分の違いが見られたので, 結晶の形成に微小顆粒は直接関係がないようにも考えられる.

アメーバの微小顆粒の元素組成が *Paramecium tetraurelia* の結晶である calcian struvite (Hausmann et al. 2003) の元素組成と同じであったので, 微小顆粒はイオンの貯蔵やイオン量の調節などに関わり, 元素組成から N を含む有機物と考えられる結晶は, 栄養物質の貯蔵に関わっていると推定される.

謝 辞

本稿を終えるにあたり, ご助言とご校閲をいただきました本教室の松政正俊助教授, 三枝聖講師に感謝いたします. また, 結晶の SEM 像撮影と X 線微小分析を行っていただいた, 本学バイオイメージングセンターの吉田康夫主任技術員, 画像処理とプレートの作製をしていただいた大坪啓則専門技術員, 英文を校閲していただいた本学英语科ジェームズホップス講師の各氏に厚くお礼申し上げます.

参考文献

- Andresen N. and Holter H. (1945) Cytoplasmic changes during starvation of the amoeba *Chaos chaos* L. C. R. Trav. Lab. Carsberg. Ser. Chim. 25:1070-146
- Bernheimer A. W. (1938) A comparative study of the crystalline inclusions of protozoa. Trans. Am. Microscop. Soc.: 58 336-343
- Bovee E. C. and Jahn T. L. (1973) Taxonomy and Phylogeny in The Biology of Amoeba, ed. Jeon K. W. Academic Press 45-46
- Daniels E. W. (1973) Ultrastructure in The Biology of Amoeba, ed. Jeon K. W. Academic Press 155-167
- Griffin J. L. (1959) Identification of ameba crystals II. triuret in two crystal forms. Biochem. Biophys. Acta. 47: 433-439
- Grunbaunn B. W., Moller K. M. and Thomas R. S. (1959) Cytoplasmic crystals of the amoebae: *Amoeba proteus* and *Chaos chaos* Exp. Cell Res.:18, 385-388
- Hausmann K., Hulsmann N., and Radek R. (2003) Protistology E. Schwerizerbart'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart 239-240
- 石井圭一 (1999) アメーバ図鑑 金原出版

要約

アメーバの *A. proteus* と *P. dubium* の二種と餌生物の *P. bursalia* の細胞内に見られる微小顆粒と結晶を光顕, TEM と SEM を用いて形態観察を行うとともに, 走査型 X 線マイクロアナライザーを用いて元素分析を行い, それらの形態と元素組成の比較を行った。

光顕と SEM による観察で, *A. proteus* では多数の小さな微小顆粒とバイピラミッド型の結晶が, *P. dubium* では多数の微小顆粒と大きさの異なる矩形層板状型の結晶が, そして *P. bursalia* では微小顆粒と大きさの異なる不規則な形の結晶が観察された。アメーバの結晶をトルイジンブルー染色した厚切り樹脂切片を観察すると, *A. proteus* では結晶の全体が, *P. dubium* では結晶の表層部が濃青色に染色された。走査型 X 線マイクロアナライザーで微小顆粒と結晶の元素分析を行った結果, 微小顆粒と結晶の元素組成は *A. proteus* と *P. dubium* の間に違いが認められず, 結晶の元素組成は C, N, O であり, 微小顆粒では C, N, O, Mg, P, Ca であった。 *P. bursalia* では微小顆粒と結晶の元素組成に違いが認められなかった。アメーバと *P. bursalia* の間では無機成分にわずかな違いが認められた。

これらの結果から, アメーバの微小顆粒と結晶は餌生物の *P. bursalia* の微小顆粒や結晶に由来するのではなく, 各アメーバ自身が合成したものと考えられる。また, アメーバの結晶は元素組成から N を含む有機物の貯蔵に, 微小顆粒は無機物の貯蔵や細胞内のイオン濃度の維持に関与していると考えられる。