

博士論文

単細胞生物*Colpoda*の休眠シスト形成誘導の
分子機構に関する研究

平成26年 3月

提出先

高知大学大学院総合人間自然科学研究科

博士課程応用自然科学専攻

十亀 陽一郎

目次

要旨	1
序論	3
第1章 シスト誘導した <i>Colpoda cucullus</i> における細胞内Ca ²⁺ 濃度のFura 2レシオメトリ	
解析	6
材料と方法	7
結果と考察	9
図	11
第2章 シスト誘導した <i>Colpoda cucullus</i> においてcAMP依存的にリン酸化されるタンパク質の同定	
材料と方法	13
結果と考察	17
図表	21
第3章 <i>Colpoda cucullus</i> においてシスト誘導依存的に発現が変化するタンパク質の二次元電気泳動法およびLC-MS/MSによる解析	
材料と方法	27
結果	30
考察	33
図表	37
結論	42

謝辞-----44

引用文献-----45

付録 参考論文および発表論文-----50

要旨

真核単細胞生物の陸上環境への適応戦略は、環境耐性を有する休眠シストになることである。土壌性繊毛虫 *Colpoda cucullus* (*C. cucullus*) は、乾燥耐性、高温耐性、凍結耐性などを有する休眠シストを形成する。この過程は、 Ca^{2+} 存在下での細胞間物理的相互作用により誘導され、既存の細胞構造（核とミトコンドリア以外）が解体され、シェルター機能を有するシスト壁に囲まれた休眠型の細胞（ミトコンドリア膜電位は消失）に再構築される。その分子機構は、過去 1 世紀にも及ぶ研究にもかかわらず、ほとんどわかっていない。

我々は現在までに、細胞内 Ca^{2+} により活性化されると思われる本種のシスト誘導シグナル伝達系において、シスト誘導依存的に細胞内 cAMP 濃度が上昇し、リボソーム P0 タンパク質、リボソーム S5 タンパク質を含むいくつかのタンパク質のリン酸化レベルが上昇することや、ATP シンターゼ β 鎖と EF-1 α の発現量が増加することを明らかにした。

本研究では、まず、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素（Fura 2）を用いたレシオメトリ定量解析により、シスト誘導依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することを実証した。次に、cAMP-AM（細胞膜透過性の cAMP 類似体）存在下において、シスト誘導特異的にリン酸化レベルが上昇するタンパク質（シスト誘導特異的リン酸化タンパク質）を広い分子領域にわたって Phos-tag 化学発光解析した。その結果、シスト誘導特異的タンパク質のほとんどが、cAMP 依存的にリン酸化されることがわかった。シスト誘導特異的リン酸化タンパク質を Phos-tag agarose phosphate-affinity beads（Phos-tag ビーズ）により単離し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）した結果、新たにアクチン、ヒストン H4、Rieske 鉄-硫黄タンパク質がシスト誘導特異的にリン酸化されることが明らかになった。タンパク質のリン酸化は、形態形成に先行しておきる（シスト誘導 1 時間以内）ことから、これらのリン酸化タンパク質が、細胞構造解体と再構築を起こすシグナル伝達系に関与していることが推察される。

休眠シスト誘導後、12 時間以降、全タンパク質は急激に減少しはじめ、シスト細胞では栄養細胞の 1/5 程度になった。この事実は、シスト誘導後、転写の抑制が起きてい

ることを示唆している。そこで、シスト誘導後、mRNA 量の定量解析を行い、誘導後 3 時間以降、mRNA 量が徐々に減少することを明らかにした。また、ほとんどのタンパク質はシスト形成に伴って減少したが、シスト形成に関わる一部のタンパク質の場合、これとは全く異なった発現パターンを示した。本研究では、二次元電気泳動法および LC-MS/MS により非水溶性タンパク質に焦点を絞って、その発現変化を継時的に解析した。その結果、ヒートショックタンパク質 60 の発現量が、シスト誘導後速やかに一過的に上昇するなど、複数のタンパク質の発現量が、全タンパク質量の減少に同調せず変化することがわかった。これらのタンパク質の発現変化は、シスト形成過程における繊維の吸収やシスト壁の合成などを伴う形態形成とそれに付随する耐性獲得のプロセス、ミトコンドリア膜電位消失による代謝停止のプロセスなどと同調して起こるため、シスト形成過程において重要な役割を担っていることが考えられる。

序論

水田や一時的に出現する水環境に生息する単細胞生物の陸上環境への適応戦略は、環境耐性を有する休眠シストを形成することである。土壌性繊毛虫のコルポータ (*Colpoda cucullus*) の場合、水環境の消失をいち早く察知して、乾燥耐性だけでなく、凍結耐性や酸耐性を有する休眠シストを形成する (Corliss and Esser 1974; Maeda *et al.* 2005; Sogame *et al.* 2011c)。本種のシスト形成は、 Ca^{2+} を含む溶液中で細胞を高密度に保つことにより誘導できる (Ca^{2+} /高密度誘導) (Yamaoka *et al.* 2004; Maeda *et al.* 2005)。シスト形成が誘導されると、1-2時間程度で一部のミトコンドリアの断片化、網状球体の合成と細胞外への放出が起きる (Kida and Matsuoka 2006; Funatani *et al.* 2010)。これに続いて、シスト誘導後3時間後までに、シスト壁の最外層 (エクトシスト) が形成される (Kida and Matsuoka 2006; Funatani *et al.* 2010)。エクトシストが形成されると細胞の遊泳は停止するが、エクトシスト内部で、繊毛運動による回転運動がしばらく続く (Kida and Matsuoka 2006)。細胞の回転運動が停止すると、エンドシスト前駆体を含む巨大な液胞が出現し、細胞膜とエクトシスト層の間に前駆体が放出され、これが固化することによって第1層目のエンドシスト層が形成される。これに続いて周期的にエンドシスト前駆体が放出されることによって、最終的には1週間程度かけて数層のエンドシスト層が形成される (Kida and Matsuoka 2006; Funatani *et al.* 2010)。シスト誘導後2~4時間後のステージでは、大核からクロマチン顆粒が放出された後 (Kida and Matsuoka 2006; Funatani *et al.* 2010)、断片化されたミトコンドリアとともに自食作用により消化される (Funatani *et al.* 2010)。シスト誘導後7時間以降では、ミトコンドリアの膜電位が消失し始め、シスト誘導後15時間までにミトコンドリアの膜電位は完全に消失する (Funatani *et al.* 2010)。この時期には、大核から大きなクロマチン塊が放出され、自食作用により消化される (Akematsu and Matsuoka 2008; Funatani *et al.* 2010)。成熟シスト (シスト誘導後1~2週間) の細胞質には、多数の楕円体状の低電子密度顆粒が蓄積する (Kida and Matsuoka 2006; Funatani *et al.* 2010)。成熟シストでは、繊毛構造は完全に消失する (Kida and Matsuoka 2006; Funatani *et al.* 2010)。

Ca^{2+} /高密度誘導により誘導された*C. cucullus*のシスト形成は、細胞外 Ca^{2+} または細胞内 Ca^{2+} をキレートした場合抑制されることから、細胞間の物理的相互作用により外液中の Ca^{2+} の細胞内への拡散が促進され、これによりシスト形成を誘導する細胞内シグナル伝達系が活性化すると考えられている (Matusoka *et al.* 2009) . しかし、細胞相互の物理的接触によって実際に細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇するかどうかについては、実証されていない。そこで、本研究では、 Ca^{2+} の蛍光指示薬であるFura 2を用いたレシオメトリーにより、細胞間物理的接触依存的に細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇することを証明した (第1章) .

*C. cucullus*のシスト形成は、細胞内にcAMPを導入することによっても誘導される (Matsuoka *et al.* 2009; Sogame *et al.* 2011a, b) . 細胞内cAMP濃度の上昇は Ca^{2+} 依存的におきる (Asami *et al.* 2010) ことから、細胞内に拡散した Ca^{2+} が、 Ca^{2+} 結合タンパク質を介してアデニレートシクラーゼを活性化すると考えられる。これによりcAMP濃度が上昇し、cAMP依存的キナーゼ (タンパクキナーゼA; PKA) を介してタンパク質のリン酸化がおきることが予想される。実際、 Ca^{2+} /高密度依存的にシスト誘導を行った場合、複数のタンパク質のリン酸化レベルが上昇することが明らかになっている (Sogame *et al.* 2012a) . マススペクトル解析の結果、リン酸化タンパク質群のうち、24-kDaタンパク質 (p24) と大核に局在する33-kDaタンパク質 (p33) は、それぞれリボソームS5タンパク質とリボソームP0タンパク質であることが明らかになっている (Sogame *et al.* 2012a) . さらに、検出されたリン酸化タンパク質群のうち、33-kDa, 37-kDa, 43-kDa, 47-kDa, 49-kDaタンパク質 (p33, p37, p43, p47, p49) は、cAMP依存的にリン酸化レベルが上昇することが報告されている (Sogame *et al.* 2011a) . 本研究では、cAMP依存的にリン酸化されるさらなる複数のタンパク質を検出し、このうち数種のタンパク質をマススペクトル解析 (LC-MS/MS) により同定することに成功した (第2章) . 第2章では、*C. cucullus*リボソームS5タンパク質とリボソームP0タンパク質に加えて新たに同定されたcAMP依存的リン酸化タンパク質の機能について考察する。

シスト形成過程における細胞の形態形成の分子機構を理解するには、シスト形成誘導後に発現が変化するタンパク質群を同定し、それらのシスト形成における機能を解

明することが必須である。現在までに、シスト誘導依存的に発現量に変化するいくつかのタンパク質が同定されている。例えば、寄生性鞭毛虫*Giardia lamblia* (*G. intestinalis* もしくは*G. duodenalis*とも呼ばれる) では、シスト誘導後にシスト壁を構成するタンパク質と酵素群の発現量もしくは遺伝子の転写量が上昇することが報告されている (Carranza and Lujan, 2010; Lauwaet *et al.* 2007)。寄生性アメーバの*Entamoeba invadens*, *Entamoeba histolytica*や*Acanthamoeba castellanii*では、シスト形成過程において、複数のヒートショックタンパク質 (HSP), セリンプロテアーゼ (Moon *et al.* 2008), システインペプチターゼ (Ebert *et al.* 2008), エノラーゼ (Bouyer *et al.* 2009; Segovia-Gamboa *et al.* 2010, 2011) などの発現が変化することが知られている。自由生活種の*C. cucullus*では、シスト誘導2~3時間でATPシンターゼβ鎖が消失するとほぼ同時にペプチド伸長因子1α (elongation factor 1α; EF-1α) の発現量が顕著に増加することが報告されている (Sogame *et al.* 2012b)。しかし、シスト誘導後経時的かつ網羅的に解析した例はなく、断片的な情報が存在するに過ぎない。第3章では、*C. cucullus*のシスト形成過程における非水溶性タンパク質の発現変化を二次元電気泳動法により経時的かつ網羅的に解析し、発現量に変化がみられたタンパク質をマスペクトル解析により同定し、これらのタンパク質群のシスト形成における役割について考察する。

第1章

シスト誘導した*Colpoda cucullus*における細胞内Ca²⁺濃度のFura 2レシオメトリ解析

材料と方法

細胞の培養とシスト誘導

実験に使用した繊毛虫 *Colpoda cucullus* (*C. cucullus*, Nag-1株) は、高知県の土壌中より採集した。培養は、0.05% (w/v) 麦葉浸出液にて行い、適宜、餌のバクテリア (*Klebsiella pneumoniae*) を与えた。バクテリアは、1.5% agar (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) , 0.5% polypeptone (Nihon Pharmaceutical Co. Ltd.) , 1% Beef extract (Becton, Dickinson and Company) , 0.5% NaClを含む寒天培地上で培養した。通常、*C. cucullus*の培養は、フラスコもしくはシャーレを用いて行い、3日程度培養して増殖させ、そのまま静置して自発的にシスト誘導させた。培養は、フラスコまたはシャーレの底面に張り付いたシストの状態に保存し、使用時に脱シストさせて使用した。培養の場合、脱シストは、培養液を新しいものに取り替えることにより誘導した。実験には、脱シスト後1.5日程度培養した細胞を用いた。

実験に先立ち、培養した *C. cucullus*細胞は、フィルターまたは遠心 (1,500 ×g, 2分) により濃縮し、1 mM Tris-HCl (pH 7.2) に再懸濁する作業を2回繰り返すことにより洗浄した。シスト誘導は、洗浄後の細胞をシスト誘導液 (0.1 mM CaCl₂, 1 mM Tris-HCl, pH 7.2) に高密度 (50,000 cells/ml) で1時間懸濁することにより行った (Ca²⁺/高密度誘導)。

試薬の調製

1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester (Fura 2-AM, Dojindo Laboratories) は、5 mM になるように dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、ストックを作製した。ストックは、使用前に 1,000 倍希釈し、最終濃度が 5 μM (0.1% DMSO を含む) になるように調製した。

Fura 2レシオメトリ解析

解析に先立って、洗浄後の細胞を 10 μM EGTA と 5 μM Fura 2-AM (アセトキシメチル

基を付加したもの)を含む1 mM Tris-HCl (pH 7.2) に30分間懸濁することにより、細胞内にFura 2を導入した。その後、細胞を遠心(1,500 ×g, 1分)して集め、1 mM Tris-HCl (pH 7.2) と各種濃度のCa²⁺を含むそれぞれのテスト液 (図 1) に再懸濁する作業を2回繰り返した。細胞内Ca²⁺濃度は、細胞懸濁液を340 nmと380 nmで励起したときの蛍光(発光)強度の比 (F₃₄₀/F₃₈₀ ratio) として表した。測定中は、細胞がキュベットの底に沈殿することを防ぐため、スターラーを用い弱く攪拌した。0.1 mM Ca²⁺を含むテスト液は、ストックCaCl₂溶液とストックTris-HCl緩衝液 (pH 7.2) を適量混合した後、純水でメスアップすることにより作製した。外液Ca²⁺をキレートする場合は、テスト液に1 mM Tris-HCl (pH 7.2) と10 μM EGTAが含まれるように調製した。この場合、混入Ca²⁺濃度を10⁻⁶ Mであると仮定すると、10 μM (最終濃度) EGTAを添加することにより、遊離のCa²⁺濃度は約2×10⁻⁸ Mになると推定される。このとき、細胞外の遊離Ca²⁺濃度 ([Ca]_f) は、下記の式に従い算出した。

$$[Ca]_f = K_d[Ca]_t / ([EGTA] - [Ca]_f)$$

ここで、K_dは、EGTAのCa²⁺に対する解離定数であり、pH 7.2の場合、151 nMである (Tsien and Pozzan 1989) 。 [Ca]_tは、トータルCa²⁺濃度、 [EGTA]は、EGTAの濃度を示す。

結果と考察

図 1 は, Ca^{2+} 濃度が異なるテスト液に *C. cucullus* 増殖型細胞を異なる条件下で懸濁して, 細胞内の Ca^{2+} 濃度 (F_{340}/F_{380} ratio) の変化を経時的に記録した結果である. 0.1 mM Ca^{2+} を含む 1 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) に細胞を高密度 (50,000 cells/ml) で懸濁した場合 (シスト誘導条件と同一), 細胞懸濁液の F_{340}/F_{380} ratio は顕著に上昇した (図 1, '○'). この場合, Ca^{2+} 濃度を見積ると (*in vitro* calibration), 10^{-8} M 以下のレベルから 2×10^{-7} M まで上昇したことになる. この結果は, シスト誘導条件下 (Ca^{2+} /高密度誘導) では, 細胞内 Ca^{2+} 濃度が 2×10^{-7} M まで上昇することを示している. 一方, 10 μM EGTA (最終濃度) を含む 1 mM Tris-HCl (pH 7.2) (推定 Ca^{2+} 濃度は 2×10^{-8} M) に低密度で細胞を懸濁した場合, F_{340}/F_{380} ratio はわずかに上昇した (図 1, '□'). この結果から, 細胞を高密度に保つことにより, 細胞外 Ca^{2+} の細胞内への拡散が促進されることが示唆される.

1 mM Tris-HCl (pH 7.2) に高密度で細胞を懸濁した場合 (図 1, '■'), 低密度 (2,000 cells/ml) の生きた細胞と高密度 (48,000 particles/ml) の polystyrene latex particles (PLP) を混合して懸濁した場合 (図 1, '△') も, 比較的顕著な F_{340}/F_{380} ratio の上昇がみられた. このときの F_{340}/F_{380} ratio の上昇の度合は, 1 mM Tris-HCl (pH 7.2) に低密度 (2,000 cells/ml) で細胞を懸濁した場合 (図 1, '●') に比べて高い傾向を示した. CaCl_2 を添加していないテスト液に細胞を高密度に保った場合でも, F_{340}/F_{380} ratio は比較的顕著に上昇するのは, テスト液に Ca^{2+} が混入していることが原因であると思われる. このことは, EGTA の添加により外液 Ca^{2+} 濃度を 2×10^{-8} M まで下げると, 細胞内 Ca^{2+} 濃度はほとんど上昇しないという結果 (図 1, '□') からも示唆される. 低密度の細胞と高密度の PLP を混ぜて懸濁した場合でも, F_{340}/F_{380} ratio は比較的顕著に上昇するという結果 (図 1, '△') は, Ca^{2+} の細胞内への拡散促進が, 生きている細胞間の化学的な相互作用によるものではなく, 細胞間あるいは細胞と非生物粒子の物理的接触頻度の上昇によってもたらされることを示唆している. この結論は, 高密度の PLP 懸濁液に低密度の

C.cucullus 増殖型細胞を懸濁した場合でもシスト形成が顕著に誘導されるという事実 (Maeda *et al.* 2005) と矛盾しない。

1 mM Tris-HCl (pH 7.2) に低密度 (2,000 cells/ml) で細胞を懸濁した場合 (図 1, ‘●’) でも, F_{340}/F_{380} ratio はゆるやかに上昇した。このような条件下では, 低頻度ではあるがシスト形成が誘導される (自発的シスト誘導) ことが知られている (Matsuoka *et al.* 2009)。 Ca^{2+} を加えてない溶液中に低密度で細胞を懸濁したときでも, 細胞内 Ca^{2+} 濃度のわずかな上昇がおきるという今回の結果は, この条件下でシスト形成がわずかに誘導されるという現象を裏付けるものである。

1 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) に混入している Ca^{2+} 濃度を 10^{-6} M と仮定すると, 10 μ M EGTA (最終濃度) を添加した場合, テスト液の Ca^{2+} 濃度は理論上 2×10^{-8} M になる。しかしながら, 実際には, 細胞が実験液に持ち込む Ca^{2+} が存在するため, 実験液に含まれる Ca^{2+} 濃度は, 理論値より高くなると考えられる。このため, 10 μ M EGTA (最終濃度) を加えてテスト液の Ca^{2+} をキレートした場合でも, 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がわずかながら起きたと考えられる。

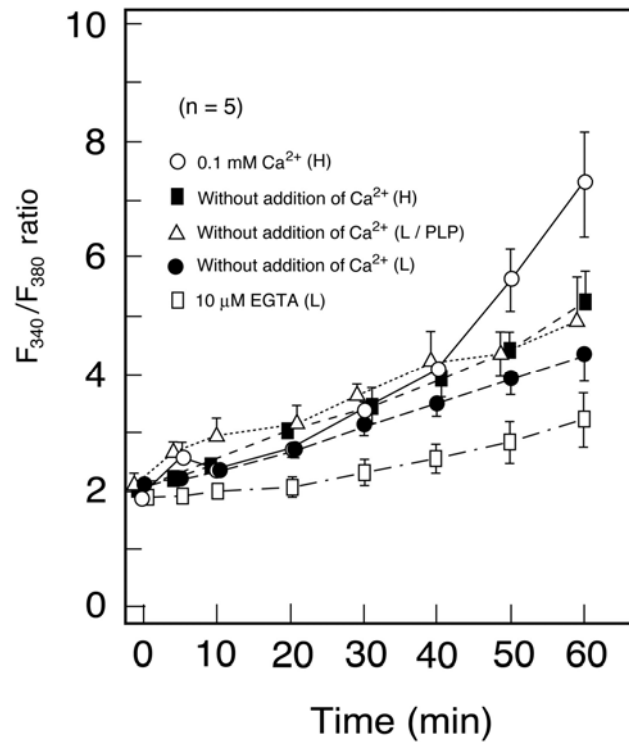


図1. さまざまなシスト誘導条件下での *C. cucullus* 増殖型細胞内の Ca^{2+} 濃度 (F_{340}/F_{380} ratio) の経時的変化. F_{340} と F_{380} は、それぞれ 340 nm と 380 nm の光で励起したときの細胞懸濁液の蛍光強度である. Fura 2-AM を導入した細胞は、以下のさまざまな溶液に低密度 (2,000 cells/ml, 'L') または高密度 (50,000 cells/ml, 'H') で懸濁した. ○, 0.1 mM CaCl_2 を含む 1 mM Tris-HCl (pH 7.2); ■, ●, CaCl_2 を加えていない 1 mM Tris-HCl (pH 7.2); □, 10 μM EGTA を含む 1 mM Tris-HCl (pH 7.2). △は CaCl_2 を加えていない 1 mM Tris-HCl (pH 7.2) に、低密度 (2,000 cells/ml) の生きた細胞と高密度 (48,000 particles/ml) の PLP (直径 26 μm , Sigma-Aldrich) を混合して懸濁したものである. ポイントとバーは、それぞれ異なる 5 サンプルの平均値と標準誤差を示す.

第2章

シスト誘導した*Colpoda cucullus*においてcAMP依存的にリン酸化されるタンパク質の同定

材料と方法

細胞の培養, シスト誘導およびサンプルの調製

実験に使用した絨毛虫 *C. cucullus*, Nag-1株の培養, 洗浄およびシスト誘導は, 1章に記述した方法に従って行った. シスト誘導しない場合は, 細胞を洗浄後, 1 mM Tris-HCl (pH 7.2) に低密度 (2,000 cells/ml) で1時間懸濁した. 図3に示す解析の場合, 洗浄した細胞を1 mM Tris-HCl (pH 7.2), もしくは10 μ M cAMP-AMを含む1 mM Tris-HCl (pH 7.2) にそれぞれ低密度 (2,000 cells/ml) で1時間懸濁した. 図3の場合, 全てのテスト液は0.1% DMSOを含む.

試薬の調製

Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate acetoxymethyl ester (cAMP-AM, Sigma-Aldrich) は, 10 mMになるようにDMSOに溶解してストック溶液とした. 使用直前にストックを1,000倍希釈し, 最終濃度が10 μ M (0.1% DMSOを含む) になるように調製した. タンパク質分解酵素阻害剤 [phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pepstatin, leupeptin, aprotinin] と脱リン酸化酵素阻害剤 (sodium orthovanadate, sodium fluoride) は, 下記のように調製した. PMSF (Boehringer-Mannheim) と pepstatin (Peptide Institute Inc.) は, それぞれ1 M, 1 mg/mlになるように DMSOに溶解してストック溶液とした. 使用直前にそれぞれのストック溶液を1,000倍希釈し, それぞれ最終濃度が1 mM, 1 μ g/mlになるように調製した. leupeptin (Peptide Institute Inc.), aprotinin (Sigma-Aldrich), sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich) は, 純水に溶解し, それぞれ1 mg/ml, 1 mg/ml, 1 Mになるようにストック溶液を作製した. それぞれのストック溶液を使用直前に1,000倍希釈し, 最終濃度が1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 1 mMになるように調製した. sodium fluoride (NaF) は, 純水に溶解して200 mMのストックを作製し, 最終濃度が1 mMになるように使用前に200倍希釈した.

細胞の破碎

図1~3に示す実験では、それぞれの実験液に1時間懸濁した細胞を遠心(1,500 ×g, 2分)により回収した。回収した細胞サンプルを2倍濃度のSDSサンプルバッファー（後述）と等量混合し、As One Model 226Aホモジナイザー（As One）で氷上にて破碎した。図4に示す実験の場合、シスト誘導を1時間行った後、細胞を-80℃に1時間以上静置し、室温で解凍後、さらにAs One Model 226Aホモジナイザーで氷上にて破碎した。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGEは、基本的にLaemmli (1970) に従って行った。ゲルは12.5%もしくは10%ポリアクリルアミドゲルを使用した。SDSサンプルバッファーは、30 mM Tris-HClバッファー (pH 6.8) であり、1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerolを含んでいる。1レーンあたり20 μlのSDSサンプルバッファーに溶解させた5,000細胞に相当する総タンパク質 (50 μg) をアプライした。

ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティングは、ウェット式装置とセミドライ式装置 (Hoefer TE70 semi-dry blotting system, Amersham Bioscience) を併用して行った。ブロットティングバッファーは、ウェット式の場合、10% methanolを含む10 mM 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid (CAPS) バッファー (pH 11) を用いた。一方、セミドライ式の場合は、A液 (300 mM Tris, 20% methanol) , B液 (25 mM Tris, 20% methanol) , C液 [20% methanolを含む25 mM Tris-borate buffer (pH 9.5)] を用いた。ウェット式の場合は50 Vの定電圧または350 mAの定電流で3時間、セミドライ式の場合は90 mAの定電流で1時間タンパク質をImmobilon-P transfer membrane (Millipore) に転写した。

Phos-tag/ECL

リン酸化タンパク質の検出は、phosphate-binding tag molecule (Phos-tag) を用いて

Kinoshita *et al.* (2006) の方法に従って行った。まず、SDS-PAGEしたタンパク質をウェスタンブロッティングによりメンブレンに転写し、これをビオチン化Phos-tag複合体 (Zn^{2+} -PhostagTM BTL-104, <http://www.phos-tag.com>) と発光基質 [horseradish peroxidase (HRP) -conjugated streptavidin, GE Healthcare Bio-Science] で処理した。HRPラベルされたリン酸化タンパク質は、enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (GE Healthcare) を用いて検出した。ECL検出の後、メンブレンをCBB染色液 [0.1% Coomassie brilliant blue R250 (CBB), 40% methanol, 1% glacial acetic acid] で染色し、50% methanol で脱色した。

CBB染色したプロットとPhos-tag/ECLシグナルの定量解析

図1では、50,000 cellsを200 μ lのSDSサンプルバッファーに可溶化したサンプルを準備し、それをゲルの各レーンに5 μ l (1,250 cells; 12.5 μ g total protein), 10 μ l (2,500 cells; 25 μ g total protein), 20 μ l (5,000 cells; 50 μ g total protein), 30 μ l (7,500 cells; 75 μ g total protein) アプライした。CBB染色したメンブレンの光学濃度 (メンブレン上のタンパク質量) と Phos-tag/ECLシグナルの光学濃度 (図1, 'Integrated density') は、以下のように求めた。無作為に選んだ3区画のCBB染色もしくはPhos-tag/ECLシグナルの光学濃度をそれぞれ各レーンごとにImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて測定した。その3区画の平均値を各レーンのCBB染色もしくはPhos-tag/ECLシグナルの光学濃度の相対値として表した (図1, 'Integrated density')。Phos-tag/ECLシグナルの場合、各バンドごとの光学濃度も測定して、実験区と対照区間の光学濃度の比率を算出した (図2, 3の右に記載)。

Phos-tag agarose phosphate-affinity beads (Phos-tagビーズ) によるリン酸化タンパク質の単離

まず、破碎した細胞サンプルを、遠心 (17,000 \times g, 20分) により上清 (水溶性タンパク質) と沈殿に分離した。沈殿を回収し純水に再懸濁した後、遠心 (17,000 \times g, 20分) により再沈殿させた。この作業を3回繰り返すことにより、純水で3回沈殿を洗浄し、沈殿分画より水溶性タンパク質と粘液多糖類を除去し、非水溶性タンパク質分画を得た。

得られた非水溶性タンパク質の全てをプロテアーゼ阻害剤とフォスファターゼ阻害剤を含むリシスバッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.4) , 0.15 M NaCl, 2.5% sodium deoxycholate, 2% NP-40, 1 mM N, N, N', N'-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) , 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF] に懸濁し, 4°Cで2時間静置した. その後, Kinoshita-Kikuta *et al.* (2009) に従い, サンプルに含まれるリン酸化タンパク質をPhos-tag agarose phosphate-affinity beads (Phos-tagビーズ) に吸着させた. リン酸化タンパク質を吸着させたPhos-tagビーズを, プロテアーゼ阻害剤とフォスファターゼ阻害剤を含むSDSサンプルバッファー [1% SDS, 30 mM Tris-HCl (pH 6.8) , 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µM sodium orthovanadate, 1 µM NaF] に懸濁し, 3分間ボイルした. その後サンプルを室温まで冷却し, Phos-tagビーズを含めたサンプルのすべてをウェルにアプライしてSDS-PAGEを行った.

液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS)

Phos-tag解析したウェスタンブロットをLC-MS/MSに使用する場合, Nakanishi *et al.* (2007) に従って1 Nのアンモニア水溶液で15分間3回処理してPhos-tagを除去した. LC-MS/MS解析に先立って, 目的のバンドをメンブレンから切りとって, 40 mM DTT (dithiothreitol) 処理 (37°Cで1時間) した後, 100 mM iodoacetic acid (室温で20分間) で処理し, 最後に100 mM acetic acidに溶解させた0.5% PVO (polyvinylpyrrolidone) で処理した (37°C, 30分間). メンブレン上でのタンパク質の消化は, 10% acetonitrile と1 pmol trypsin (Sigma-Aldrich) を含む, 10 µl の30 mM Tris-HCl 溶液 (pH 8.5) 中で37°Cで18時間行った. プロテアーゼ消化により得られたペプチド断片を0~40%のアセトニトリル勾配により60分間溶出し, Waters UPLC Xevo Qtof (Waters) を用いて解析した. 得られたデータ (ペプチド断片のアミノ酸配列) はWaters Protein-Lynx Global Server 2.4 (Waters) でプロセッシングし, PEAKS online 6.0 (Bioinformatics Solutions) を用いて, NCBI Entrez protein recordsの原生生物群の配列 (Alveolata protein sequences) を対象に検索することによりタンパク質の同定を行った.

結果と考察

図1は、*C. cucullus*のトータルタンパク質量（横軸）とCBB染色したウエスタンブロットの光学濃度（縦軸）の関係（図1a）およびPhos-tag/ECLシグナルの光学濃度（縦軸）の関係（図1b）を示している。この結果、アプライしたタンパク質量とCBB染色したウエスタンブロットの光学濃度およびアプライしたタンパク質量とPhos-tag/ECLシグナルの光学濃度は、このタンパク質量の範囲（0~75 μg ）では比例関係がなりたつことがわかった。したがって、CBB染色したウエスタンブロットの光学濃度とPhos-tag/ECLシグナルの光学濃度も比例関係が成り立つといえる。

シスト誘導した*C. cucullus*では（図2, 'Induced'）, シスト誘導を行わない場合（図2, 'Not induced'）に比べ、49, 47, 43, 37, 33, 31, 29, 27, 26, 24, 21-kDaタンパク質（p49~p21）のリン酸化レベルが、それぞれ1.3, 1.6, 1.8, 2.9, 3.1, 2.4, 1.4, 1.9, 3.2, 3.8, 8.0倍に上昇した。この場合、CBB染色したブロット（図2, 'CBB'）の光学濃度（メンブレン上のタンパク質量）は、2レーン間（'Not induced'と'Induced'）でほぼ同じであった（'Not induced' : 'Induced' = 1 : 1.1）。シスト誘導サンプルのタンパク質量がわずかに多いが（1.1倍）、CBB染色ブロットの光学濃度は、Phos-tagシグナル強度に比例するので（前述）、シスト誘導によるPhos-tag/ECLシグナルの増大は、タンパク質のリン酸化レベルの増大を反映しているといえる。

cAMP依存的なタンパク質のリン酸化

*C. cucullus*細胞を低密度条件下で（2,000 cells/ml）、10 μM cAMP-AMを含む1 mM Tris-HCl（pH 7.2）に1時間懸濁させてcAMPを細胞内に導入した後、タンパク質のリン酸化解析を行った（図3）。この結果、p49, p47, p43, p37, p33, p31, p27, p26, p24, p21のリン酸化レベルが、それぞれ1.5, 1.6, 1.9, 2.0, 2.0, 2.9, 4.7, 4.7, 2.9, 1.9倍に上昇した（図3, 'None [L]'と'cAMP-AM [L]'を比較）。この場合、CBB染色したブロット（図3, 'CBB'）の光学濃度は、2レーン間（'None [L]'と'cAMP-AM [L]'）で等しかった（'None [L]' :

‘cAMP-AM [L]=1 : 1). したがって, cAMP依存的なPhos-tag/ECLシグナルの増大は, タンパク質のリン酸化レベルの増大を反映しているといえる. これらのタンパク質の cAMP依存的なリン酸化は, おそらくcAMP依存的キナーゼ (protein kinase A; PKA) を介して行われると考えられる.

マスマスペクトル解析 (LC-MS/MS) によるリン酸化タンパク質の同定

シスト誘導後1時間の細胞に含まれるリン酸化タンパク質を Phos-tag ビーズを用いて捕捉し, SDS-PAGE により単離した. SDS-PAGE したタンパク質をメンブレンに転写した (図4, ‘CBB’). メンブレンを CBB 染色する前に, Phos-tag/ECL 解析を行った (図4, ‘P-tag’). その結果, Phos-tag シグナルは, p43, p37, p33, p29, p27, p24, p21 のみで検出され, p49, p47, p31, p26 からは検出されなかった (図4, ‘P-tag’). シグナルが検出されたタンパク質バンドをマスマスペクトル解析し, 得られたペプチド断片の配列をデータベース検索した (表1). その結果, p43 の5ペプチド断片のアミノ酸配列が *Karlostium micrum* のアクチン, p37 の2ペプチド断片のアミノ酸配列が *Perkinsus marinus* のヒストン H4 の部分アミノ酸配列と完全に一致した. また, p27 の2ペプチド断片のアミノ酸配列が *Tetrahymena thermophila* の Rieseke 鉄-硫黄タンパク質のアミノ酸配列と完全に一致し, 5断片のアミノ酸配列が部分的に一致した. p21 の1アミノ酸断片の配列は *T. thermophila* の hypothetical protein のアミノ酸配列と完全に一致し, 3断片のアミノ酸配列が部分的に一致した. しかしながら, このタンパク質と高い類似性を有するタンパク質はデータベース上でヒットしなかった.

本研究では, シスト誘導特異的リン酸化タンパク質を広い分子量域において Phos-tag/ECL し, p49, p47, p43, p37, p33, p31, p29, p27, p26, p24, p21 のリン酸化レベルが, シスト誘導特異的に上昇することを示した. この結果は, 部分的な解析を行った Sogame *et al.* (2011a) と Sogame *et al.* (2012a) の両方の結果と矛盾しない. 本研究では, 既に報告されている cAMP 依存的にリン酸化されるリン酸化タンパク質 (p49, p47, p43, p37, p33) (Sogame *et al.* 2011a) に加えて, シスト誘導依存的にリン酸化されるタンパク質 p31, p27, p26, p24, p21 が, cAMP 依存的にリン酸化されることを明らかにした. しかし,

シスト誘導特異的にリン酸化レベルが上昇した p29 は、リン酸アフィニティクロマトグラフィ (図 3) で検出できなかったため、cAMP 依存的にリン酸化されるか否かを明らかにすることができなかった。先行研究 (Sogame *et al.* 2011a) において報告されている p37.5 の Phos-tag/ECL シグナルは、今回の解析では検出できなかった (図 2, 3, 'P-tag')。cAMP 依存的リン酸化タンパク質のうち、p33 と p31 はリボソーム P0 タンパク質、p24 はリボソーム S5 タンパク質であることがすでに同定され、それらのシスト形成過程における役割も示唆されている (Sogame *et al.* 2012a)。すなわち、*C. cucullus* リボソーム P0 タンパク質は代謝の停止、大核クロマチンの凝縮などに関与し、*C. cucullus* リボソーム S5 タンパク質は細胞周期の停止に関与することが推察されている (Sogame *et al.* 2012a)。本研究では、先行研究において同定できなかったリン酸化タンパク質について、タンパク質サンプルの消化を trypsin で行うことにより再度解析を試み、cAMP 依存的にリン酸化レベルが上昇する p43, p37, p27 が、それぞれアクチン、ヒストン H4 (hyperacetylated form)、Rieske 鉄-硫黄タンパク質であることを明らかにした。

アクチンは、真正粘菌の *Physarum polycephalum* において、乾燥ストレス存在下でリン酸化され (Furuhashi *et al.* 1998)、リン酸化されたアクチンは、アクチン重合因子存在下でも重合しないことが *Amoeba proteus* において報告されている (Sonobe *et al.* 1986)。*C. cucullus* の成熟シストでは、微小管等の細胞骨格が分解されている (Funatani *et al.* 2010)。*C. cucullus* p43 (アクチン) のシスト誘導依存的リン酸化がアクチンの重合を阻害するのであれば、アクチンのリン酸化はシスト形成過程におけるアクチンフィラメントの脱重合をもたらすことが示唆される。

ヒストン H4 は、真核生物のヌクレオソームを形成するタンパク質の一つとして知られており (Kornberg 1974; Luger *et al.* 1997)、酵母の孢子形成の過程では、リン酸化され、クロマチンの凝集を促進することが報告されている (Krishnamoorthy *et al.* 2006)。*C. cucullus* のシスト形成過程の場合、大核クロマチンが凝集し、その一部が放出される現象が起こることが報告されている (Akematsu and Matsuoka 2008; Funatani *et al.* 2010)。それゆえ、リン酸化された p37 (ヒストン H4) は、*C. cucullus* シスト形成過程におけるクロマチンの凝集等の大核で起きるイベントに関与している可能性が考えられる。

Rieske 鉄-硫黄タンパク質は、ミトコンドリア膜透過性遷移孔の一部を形成し、リン酸化／脱リン酸化されることによりミトコンドリアのミトコンドリア膜透過性遷移現象 (MPT) の調節に関与することが報告されている (He and Lemasters 2005). それゆえ、*C. cucullus* のシスト形成過程における p27 (Rieske 鉄-硫黄タンパク質) のリン酸化は、シスト形成過程におけるミトコンドリアの膜電位消失イベント (Funatani *et al.* 2010; Sogame *et al.* 2014) に関与している可能性が考えられる。

本研究では、Phos-tag ビーズを用いて単離したタンパク質を SDS-PAGE/ウェスタンブロットティングし、Phos-tag/ECL 解析した。その結果、Phos-tag シグナルが、シスト誘導特異的リン酸化タンパク質のうち、p43, p37, p33, p29, p27, p24, p21 でのみ検出され、p49, p47, p31, p26 では検出されなかった (図 4, 'P-tag')。この結果はおそらく、脱リン酸化酵素存在下でタンパク質を処理しているにもかかわらず、サンプルの可溶化や Phos-tag ビーズによるリン酸化タンパク質の捕捉のためのサンプル処理の過程で、脱リン酸化されてしまったことに起因すると考えられる。また、高分子量域には、Phos-tag/ECL (図 2) で Phos-tag シグナルが検出されないタンパク質バンドが確認された (図 4, 'CBB')。これはおそらく、非リン酸化タンパク質が Phos-tag ビーズのアガロース部位へ非特異的に結合したことに起因すると考えられる。

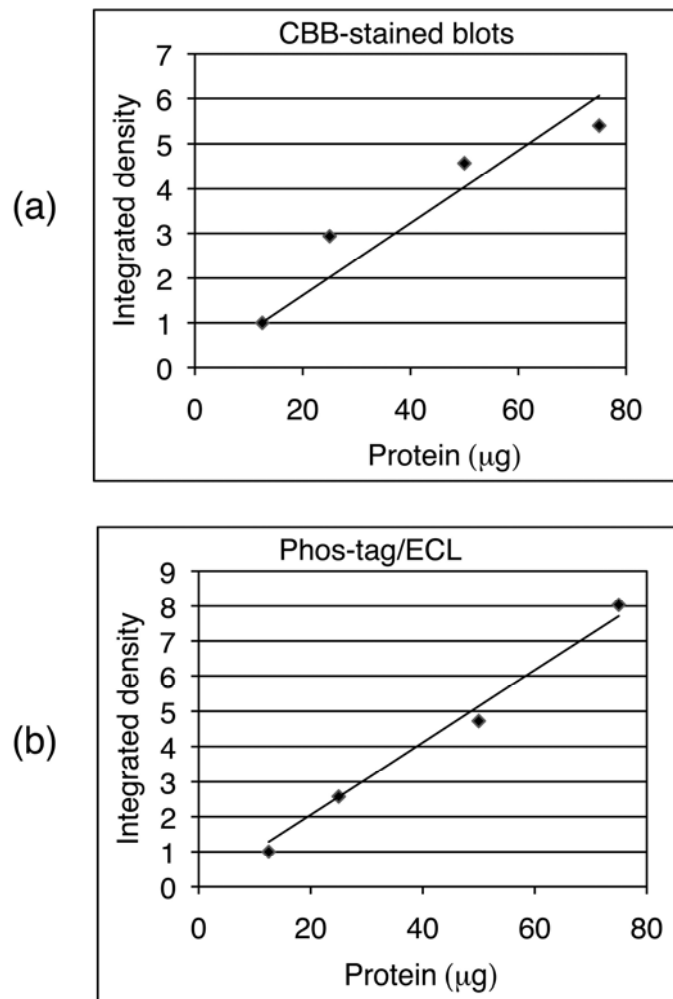


図1. シスト誘導1時間の *C. cucullus* のトータルタンパク質量（横軸 'Protein'）と CBB 染色プロットの光学濃度（縦軸 'Integrated density'）(a), および Phos-tag/ECL シグナル（縦軸 'Integrated density'）(b) の関係.

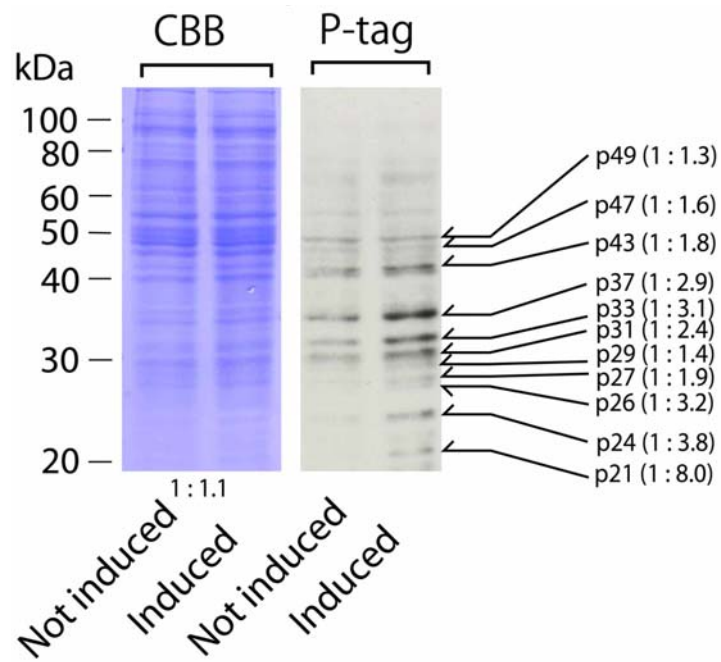


図 2. Phos-tag/ECL によるシスト誘導依存的リン酸化タンパク質の解析. ‘Not induced’, シスト誘導していないサンプル. ‘Induced’, シスト誘導 1 時間後のサンプル. ‘CBB’, Phos-tag/ECL 解析後, CBB 染色したブロット. 図の右側に付した数字は, 分子量を基準にしたタンパク質の仮称であり, () 内の比は, 各バンドの Phos-tag シグナルの光学濃度の比を示している.

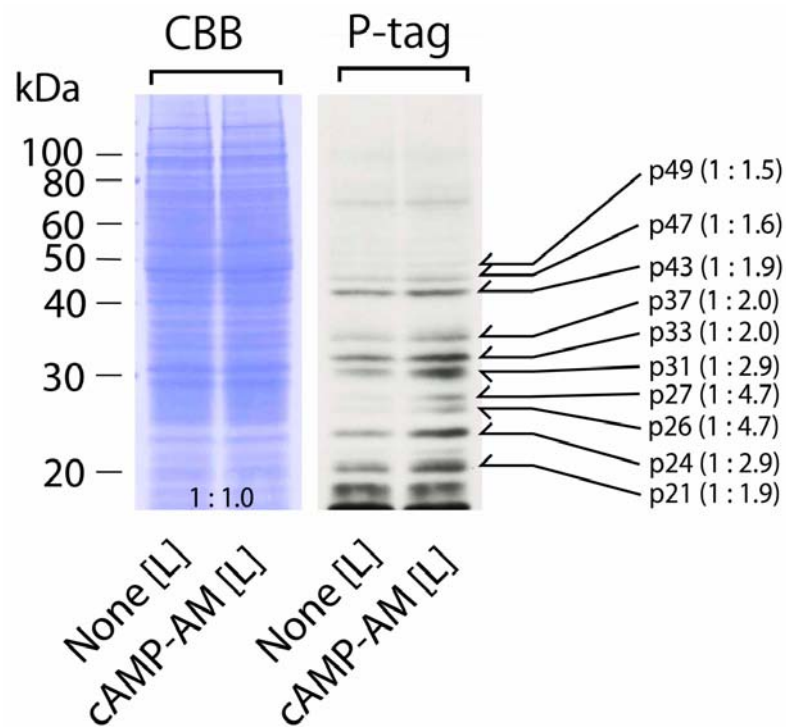


図3. Phos-tag/ECLによるcAMP依存的リン酸化タンパク質の解析. ‘None [L]’, cAMP-AMを導入していない低密度懸濁サンプル. ‘cAMP-AM [L]’, cAMP-AMを細胞内に導入して1時間経過したサンプル. ‘CBB’, Phos-tag/ECL解析後, CBB染色したプロット. 図の右側に付した数字は, 分子量を基準にしたタンパク質の仮称であり, ()内の比は, 各バンドのPhos-tagシグナルの光学濃度の比を示している.

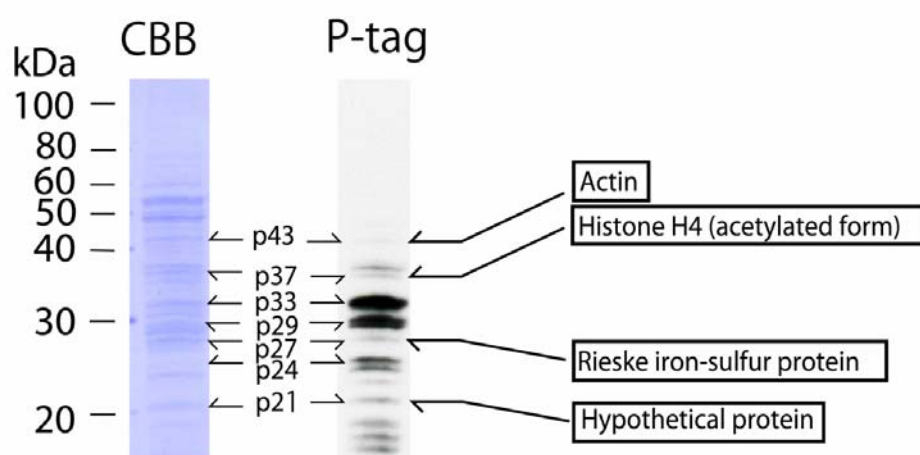


図4. シスト誘導1時間後の *C. cucullus* 細胞から単離したリン酸化タンパク質の SDS-PAGE 後の CBB 染色ウエスタンブロット (CBB) と Phos-tag 解析 (P-tag). リン酸化タンパク質の単離は, Phos-tag ビーズにより行った.

表 1. LC-MS/MS により同定されたシスト誘導依存的にリン酸化される *C. cucullus* タンパク質

Protein name	Bands of SDS-PAGE	Sequence of exactly matched peptides	Sequence of partially matched peptides**	Accession No. (organism)	Sequence coverage (%)
Actin	p43	AGFAGDDAPR, MPGIMVGMQDK, DSYVGDEAQS, LTEAPLNPK, ELTALAPSTMK		gi 157093087 (<i>Karolodinium micrum</i>)	14 (52AA/376AA)
Histone H4*	p37	ISGLIYEETR, TLYGFGG		gi 294888716 (<i>Perkinsus marinus</i>)	17 (17AA/103AA)
Rieske iron-sulfur protein	p27	LVEDK, PGNFGDHIDFK	<u>HLVEDKPTFEVTSR</u> , <u>VNIDNWFDENR</u> , <u>LYAMGVIGR</u> , <u>EENELPSNTLLDK</u> , <u>EVILSDAGNT</u>	gi 146164447 (<i>Tetrahymena thermophila</i>)	26 (69AA/269AA)
Hypothetical protein	p21	LYDPNTFYEHGDNP- AFK	<u>GTASEEELK</u> , <u>NWDDFLQRDCK</u> , <u>PVQSHGITK</u>	gi 146142959 (<i>Tetrahymena thermophila</i>)	22 (46AA/210AA)

*アセチル化されたHistone H4であることを示す.

** PEAKS online 6.0により推定される配列に一致したアミノ酸残基はアンダーラインを付してある.

第3章

Colpoda cucullus においてシスト誘導依存的に発現が変化するタンパク質の二次元電気泳動法および LC-MS/MS による解析

材料と方法

培養, シスト誘導および脱シスト誘導

*C. cucullus*の培養とシスト誘導は1章に記述した手順で行った。二次元電気泳動用サンプルの調製は、シスト誘導を開始してから、30分、1時間、1.5時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、11時間、1日、3日、7日、21日後に行った。シスト化は、シャーレもしくはマイクロチューブ内で細胞を静置することにより行った。シスト誘導してない増殖型細胞サンプルは、1章に記述した手順で細胞を洗浄し、直ちに細胞を処理した。脱シスト誘導は、シスト誘導後7日経過した休眠シストの外液を脱シスト誘導液 [0.2% (w/v) 麦葉浸出液] に交換することにより行った。

mRNAの定量

mRNA定量に先立ち、それぞれのシスト齢サンプル (800,000 細胞) からトータルRNAを抽出した。抽出は、ISOGEN-LS (NIPPON GENE Co., Ltd.) を用いて、プロトコルに記載されてある方法に従って行った。抽出したトータルRNAからのmRNAの単離は、PolyAtract mRNA Isolation System (Promega) を用いて、プロトコルに記載されてある方法に従って行った。単離したmRNA濃度は、260 nmの吸光度 (A_{260}) から算出した。

細胞破碎とサンプル調製

シスト誘導してない細胞は遠心 (1,500 ×g, 2分) によって集め、シスト細胞は、シャーレ底面からかき取ることにより回収した。図1に示す解析では、シスト誘導後の細胞だけでなく増殖型細胞も、2倍濃度のSDSサンプルバッファー (2章参照) と等量混合後、As One Model 226Aホモジナイザー を用いて氷上でホモジナイズして破碎した。

二次元電気泳動解析 (図2) に用いる細胞は、まず-80°Cに1時間以上静置して凍結させ、再度室温で解凍した。その後、2倍濃度のSDSサンプルバッファーと等量混合後、As One Model 226Aホモジナイザー を用いて氷上でホモジナイズして破碎した。細胞を

破碎した後、遠心 (8,000 ×g, 3分) して上清を捨て、沈殿分画に純水を加え再懸濁させた。この操作を3回繰り返す、沈殿分画を純水で洗浄することにより、水溶性タンパク質と細胞内に含まれるムコ多糖類をできるだけ除去した非水溶性タンパク質サンプルを得た。

SDS-PAGE

SDS-PAGEは、2章に記述した手順に従って行い、12.5%ポリアクリルアミドゲルを使用した。また、各レーンあたりのタンパク質量は、CBB染色ゲルを3区画 (図1a, 枠) に分け、それぞれの区画における各レーンの光学濃度をImageJを用いて測定することによって算出し、シスト誘導していないサンプル ('0 h'のレーン) のタンパク質量を100%として、相対値 (%) で表した (図1b) 。

二次元電気泳動

二次元電気泳動法によるタンパク質の解析は、O'Farrell (1975) に従った。等電点電気泳動に先立って、シスト誘導した*C. cucullus*の非水溶性成分を以下のように処理した。細胞を破碎し水溶性成分を除去して得たペレットを、Tris-HClを含まない2倍濃度のSDSサンプルバッファー (2章参照) と等量混合した後、3分間ボイルした。その後、等電点電気泳動用サンプルバッファー [8 M urea (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) , 2% pharmalyte (GE Healthcare) , 2% polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween-80, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) , 5% 2-mercaptoethanol] と1:5の割合で混合し、4°Cで2時間静置した。等電点電気泳動は、等電点ディスクゲル [8 M urea, 4.5% acrylamide, 0.2% N,N'-methylenebisacrylamide, 0.01% TEMED (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) , 2% Tween 80, 4.7% Pharmalyte, 0.07% ammonium persulfate] を使用し、100 Vで2時間、その後400 Vで4時間、室温で泳動を行った。等電点電気泳動後、ゲルを2% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerolを含む、60 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) に1時間浸して平衡化処理を行った。二次元目の電気泳動は、12.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、2章に記述したSDS-PAGEの手順に従って行った。なお、1回の解析に用いたサンプルは

400,000細胞から得られた非水溶性分画である。

LC-MS/MS

マスペクトル解析（LC-MS/MS）に先立ち、二次元電気泳動により分離した目的のタンパク質は、セミドライ式転写装置を用いてメンブレンに転写し、LC-MS/MS解析を行った（方法は2章に記述）。ただし、本解析ではPhos-tag処理はしていないので、メンブレンのアンモニア水溶液による処理は行わなかった。

結果

SDS-PAGEによるタンパク質発現変化の解析

図1aは、シスト誘導した*C. cucullus*タンパク質の発現変化をSDS-PAGEによって解析したものであり、図1bは、各区画における各レーンのタンパク質量(%)を示している。この解析結果からわかるように、シスト誘導後12時間以降は、細胞のトータルタンパク質量が徐々に減少し、成熟シスト細胞(誘導後7日以降)では、栄養細胞の1/5程度まで減少することが明らかになった。このようなタンパク質量の減少は、シスト壁に囲まれたシストが可溶化されにくくなったことによる‘みかけの減少’である可能性もある。そこで、増殖型細胞(図1c, 左端)、誘導後1週間の成熟シスト(図1c, 中央)、脱シスト直後の細胞(脱シスト誘導5時間後の細胞)(図1c, 右端)のSDS-PAGEを行った。この結果、成熟シストも脱シスト直後の増殖型細胞のタンパク質量は、誘導前の細胞のそれと比較して著しく減少していた。この結果は、シストがシスト壁に囲まれているためにSDSサンプルバッファーにより可溶化されにくいのではなく、シスト形成過程で実際にタンパク質量が減少することを示している。

mRNA定量

前述のようにシスト形成に伴って細胞含有タンパク質量が減少するという事実は、シスト誘導によりほとんどのタンパク質の転写が停止することを示唆している。そこで、シスト誘導後の細胞のmRNA量変化を継時的に測定した。その結果、シスト誘導後、3時間以降から細胞のmRNA量は著しく減少し、成熟シストでは栄養細胞の約1/5程度になった(図1d)。

発現変化するタンパク質の二次元電気泳動解析

シスト形成過程におけるタンパク質の発現変化を二次元電気泳動法により解析した。*C. cucullus*に多量に含まれるムコ多糖類が二次元電気泳動によるタンパク質のフォーカシングを妨害する。このため、ムコ多糖類が多く含まれると思われる水溶性分画を除去

した非水溶性成分に焦点を絞って二次元電気泳動を行った。その結果、先行研究 (Sogame *et al.* 2012b) において既に同定されている50-kDaタンパク質 (p50a, ATPシンターゼβ鎖) に加えて、60-kDa, 55-kDa, 52-kDa, 50-kDa, 49-kDa, 25-kDaタンパク質 (p60~p25) がシスト形成に伴うトータルタンパク質のゆるやかな減少とは異なる発現変化を示した (図2)。これらのタンパク質の経時的発現変化を図3にまとめた。p60の発現量は、細胞トータルタンパク質量がまだ減少しないシスト誘導後5時間で一過的に上昇した。p55の発現量は、シスト誘導後3時間以降上昇する傾向を示し、誘導後7時間までその発現量が維持され、誘導後8時間以降は上昇した (図2, 3)。その後、p55の発現量は、誘導後3日まで維持されるか少しずつ減少する傾向を示し、シスト誘導後7日の上昇し、その後急激に減少した。p52cの発現量は、誘導後5時間前後までは非常に少なく、その後3日程度までは、若干上昇する傾向を示し、誘導後7-21日では上昇した。p50a (ATPシンターゼβ鎖) は、シスト誘導後約5時間以降急速に減少した。p50dとp25は誘導後5時間以降減少し、誘導後3日までその発現量が維持された。誘導後7日以降では、その発現量は上昇した (図2, 3)。p49の発現量は、シスト誘導後1.5時間以降上昇し、誘導後7日までその発現量が維持されたが、その後発現量は急激に減少した。

LC-MS/MSによるタンパク質の同定

シスト形成過程において発現が変化したタンパク質スポット (図2, 3) をマスマスペクトル解析 (LC-MS/MS 解析) し、得られたペプチド断片の配列からタンパク質種を同定した (表1)。その結果、p60 (シスト誘導後5時間のサンプルより採取) の3ペプチド断片のアミノ酸配列が、*Perkinsus marinus* のHSP60の部分アミノ酸配列と完全に一致し、1ペプチド断片のアミノ酸配列が部分的に一致した。p55 (シスト誘導後7日のサンプルより採取) の6ペプチド断片のアミノ酸配列は、*Pyrocystis lunula* のアクチンの部分アミノ酸配列と完全に一致した。p52c (シスト誘導後7日のサンプルより採取) の20ペプチド断片のアミノ酸配列は、絨毛虫 *Sorogena stoianovitchae* のβ-チューブリンの部分アミノ酸配列と完全に一致した。p50aは、先行研究 (Sogame *et al.* 2012b) において、ATPシンターゼβ鎖であることがわかっている。しかし、本研究と先行研究では解

析方法が異なるため、再度解析した。その結果、p50a（シスト誘導後 1.5 時間のサンプルより採取）の 8 ペプチド断片のアミノ酸配列が、ATP シンターゼ β 鎖と高い相同性を示す繊毛虫 *Paramecium tetraurelia* の hypothetical protein の部分アミノ酸配列と完全に一致し、2 断片の配列が部分的に一致した。p50d（シスト誘導後 3.5 時間のサンプルより採取）の 12 ペプチド断片のアミノ酸配列は、*T. thermophila* の α -チューブリンの部分アミノ酸配列と完全に一致した。p49（シスト誘導後 3 時間のサンプルより採取）の 5 ペプチド断片のアミノ酸配列は、*Karlostidium micrum* のアクチンの部分アミノ酸配列と完全に一致した。p25（シスト誘導後 3.5 時間のサンプルより採取）の 3 ペプチド断片のアミノ酸配列は、繊毛虫 *Colpoda* sp. の α -チューブリンの部分アミノ酸配列と完全に一致した。

考察

シスト誘導後速やかに細胞のmRNA量が減少することが明らかになった (図1d) . この結果は, シスト形成過程における細胞のトータルタンパク質の減少は, 転写の抑制に起因する可能性を示唆している. 一方, 本研究では, mRNAを単離する際, ポリA配列を選択的に認識するPolyAtract mRNA Isolation Systemを使用した. それゆえ, シスト形成過程において, mRNAのポリA配列を選択的に除去するような修飾が行われていると仮定すると, 実際にはmRNA量は減少せず, 翻訳されずに細胞内にプールされている可能性も考えられる.

本研究において, シスト形成過程において発現量が変化する複数のタンパク質 (p60, p55, p52c, p50a, p50d, p49, p25) が同定された. p60 [ヒートショックタンパク質 (HSP) 60] は, シスト誘導後5時間で一過的に発現量が上昇した. HSPは, 様々な分子量のものが知られており, ストレス (特に高温ストレス) 存在下で, 生体分子の保護や生体反応のシグナル伝達系に関与することが知られている. 例えば, サナダムシ類の*Taenia solium*と*T. crassiceps*では, 環境ストレス (高温ストレス) に対する応答として, 複数のHSPの発現量が増加し, 多量に発現したHSPが他のタンパク質を保護していることが示唆されている (Vargas-Parada *et al.* 2001) . また, 海洋性コペポダの*Calanus finmarchicus*では, 高温ストレスを受けたとき, 3種のHSPの発現量が上昇し, 発現したHSPが他のタンパク質を高温による変性から守る働きを担っていることが報告されている (Aruda *et al.* 2011) . その他, 真正粘菌の*Physarum polycephalum* (Shimada *et al.* 1992) や *Phytophthora infestans* (Avrova *et al.* 2003) のシスト形成過程においてもHSPの発現量が上昇し, HSPが何らかの働きを担っていることが報告されている. さらに, 寄生性原生動物の*A. castellanii*では, シスト特異的にHSP70が発現することが知られている (Bouyer *et al.* 2009) . 寄生性種の*G. lamblia*でも, シスト形成過程において2種のHSPの発現量が一時的に4倍程度に上昇し, それらが分子シャペロンやストレス受容の引き金として働く可能性が示唆されている (Kim *et al.* 2009) . 本研究では, *C. cucullus*のシスト形成過程において, シスト誘導後5時間後, HSP60の発現量が一過的に上昇することを明らか

にした (図2, 3) . シスト誘導後数時間の *C. cucullus* 細胞は, 大規模なオートファジーによる過度なストレス環境にある (Funatani *et al.* 2010) . このステージにおいて発現量が増大する *C. cucullus* HSP60は, 細胞内ストレス環境下でのタンパク質の保護に関与している可能性がある. また, 以下の可能性も考えられる. ほとんどのタンパク質は, その量が著しく減少するものの, 成熟シストにおいて保持されているが (図1a) , おそらく不活性化された状態で保持されていると思われる. このプロセスにおいて, *C. cucullus* HSP60分子シャペロンが関与しているかも知れない.

p55とp49 (アクチン) は, シスト形成過程において発現量が上昇し, 成熟シスト (誘導後21日) では発現量が急激に減少した (図2, 3). この結果は, *G. lamblia*におけるシスト形成過程でアクチンのmRNA量の発現量が上昇するという報告 (Castillo-Romero *et al.* 2009) や *E. invadens*における完成シストでアクチンの発現量が減少するという報告 (Manning-Cela *et al.* 1994) と矛盾しない. *E. invadens*では, アクチンの重合を調節するprofilinの発現量がシスト形成過程で調節されることが報告されており (Makioka *et al.* 2012), *A. castellanii*では, アクチン脱重合因子 (Actophorin) とアクチン重合因子 (Gelation factor) の発現量がシスト形成過程で調節されており (Bouyer *et al.* 2009), シスト形成にはアクチンの働きが必須であることが示唆されている. また, *G. lamblia*では, シスト形成過程においてアクチンのmRNA量が増加し (Castillo-Romero *et al.* 2009), Rab11と共にCWP等の物質輸送に関与することが報告されている (Castillo-Romero *et al.* 2010). さらに *C. cucullus* の場合, アクチンフィラメントを束ねる機能を有する (Kurasawa *et al.* 1996) EF-1 α の発現量が, シスト誘導後数時間以降上昇することが報告されている (Sogame *et al.* 2012b) . これらの結果から判断すると, *C. cucullus* アクチンp55とp49は, シスト形成過程における細胞内の物質輸送や細胞骨格の動態に関わっており, シストが完成するまでの細胞骨格の維持に必要であることが考えられる.

第2章において, シスト誘導後 1 時間における *C. cucullus* p43アクチンのリン酸化がアクチンの脱重合に関与する可能性を示唆した. おそらく, *C. cucullus* のp55アクチン/p49アクチンはp43アクチンとはアイソフォームであって, シスト形成におけるその動態は異なることが推察される.

C. cucullus α -チューブリンであるp50dとp25 (p50dの断片である可能性がある) の発現量は、シスト誘導後5時間以降、減少した (図2, 3) . 電子顕微鏡を用いた形態学的観察では、シスト形成過程において、繊毛を構築していた微小管は脱重合する (Funatani *et al.* 2010) ことから、微小管の脱重合により生じたチューブリンは、他のタンパク質と同レベルまで分解されると思われる。一方、シスト誘導後7日以降では、 α -チューブリンの発現量は上昇した (図2, 3) . このステージでは、貯蔵栄養顆粒が出現し、細胞の中央部分に集められる様子が電子顕微鏡にて観察されている (Kida and Matsuoka 2006; Funatani *et al.* 2010) . それゆえ、シスト形成最終段階において、*C. cucullus* α -チューブリンは、細胞内の物質輸送や細胞骨格維持のための微小管重合に関与している可能性が考えられる。

p52c (*C. cucullus* β -チューブリン) の発現量は、シスト形成過程初期段階 (シスト誘導後5時間前後くらいまで) では非常に少ないが、その後発現量は上昇する傾向にあり、シスト誘導後21日では急激に上昇した (図2, 3) . この結果は、寄生性原生生物*G. lamblia* における結果 (Kim *et al.* 2009; Lingdan *et al.* 2012) に類似する。これらの結果から、*C. cucullus* β -チューブリン (p52c) は、 α -チューブリンと同様に、シスト形成最終期における細胞内の物質輸送や細胞骨格維持のための微小管合成に関与している可能性が考えられる。

C. cucullus アクチン (p55, p49) と*C. cucullus* α -チューブリン (p50d, p25) は、それぞれ2つのスポットに分離した (図2, 3) . p 25 α -チューブリンはサンプル処理中に内在性のプロテアーゼなどにより分解され断片化された産物であると思われる。 *C. cucullus* アクチン (p55, p49) の場合は、アイソフォームであるか、*G. lamblia*等の例にみられるように (Kim *et al.* 2009) , 化学修飾により分子量やpI値がシフトした可能性が考えられる。

C. cucullus ATPシンターゼ β 鎖 (p50a) は、増殖型細胞での発現量が多く、シスト誘導後約5時間以降発現量が減少した (図2, 3) . この結果は、Sogame *et al.* (2012b) の報告と一致している。 *C. cucullus* のシスト形成過程では、シスト誘導後7時間でミトコンドリアの膜電位が消失し始めることが報告されている (Funatani *et al.* 2010) . しかし、シスト形成が速やかに誘導された場合、誘導後3時間程度で膜電位が消失し始める (Sogame

et al. 2014). *Trypanosoma brucei*では, ATPシンターゼβ鎖の発現をRNAiノックダウンすると, ミトコンドリアの膜電位が消失することが報告されている (Brown *et al.* 2006). これらの結果は, *C. cucullus*のシスト形成過程におけるp50a (ATPシンターゼβ鎖) の発現量減少が, シスト形成過程におけるミトコンドリア膜電位停止による代謝停止プロセスと関与している可能性を示唆している.

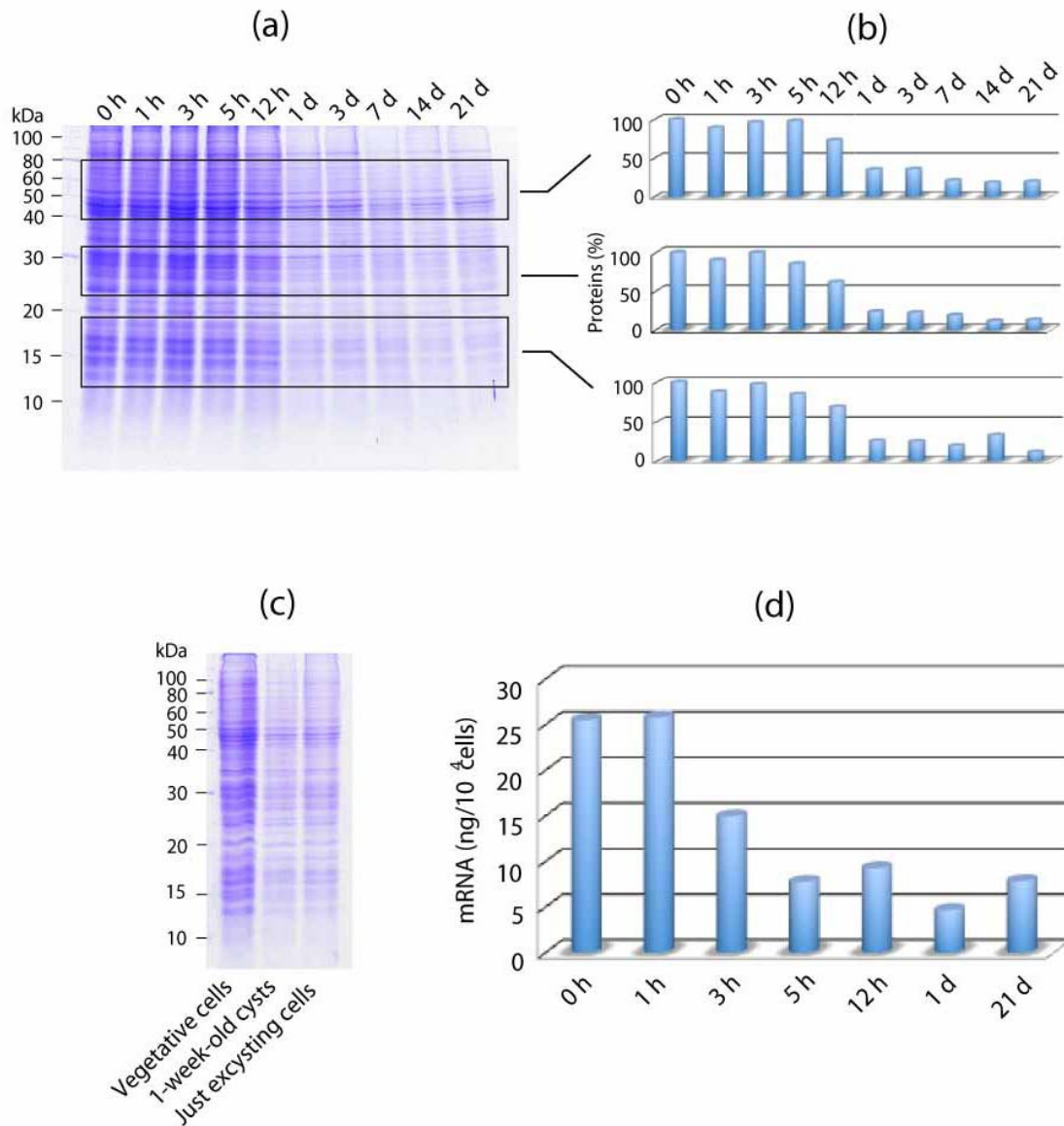


図1. *C. cucullus* シスト形成過程におけるタンパク質発現変化の SDS-PAGE 解析 (図 a, b) , 増殖型細胞/成熟シスト/脱シスト細胞の SDS-PAGE (図 c) およびトータル mRNA (10,000 細胞あたりの mRNA 量) の定量 (図 d) . 図 1 a, b, d のラベル (0 h~21 d) は, シスト誘導後の時間 (h) および日数 (d) を示す (ただし '0 h' は誘導していない増殖型細胞) . 図 1b. ゲルのそれぞれの区画 (長方形枠内) の各レーンのタンパク質量. 図 1c. 増殖型細胞 ('Vegetative cells') , シスト誘導後 1 週間のシスト ('1-week-old cysts') , 脱シスト誘導 5 時間後の細胞 ('Just excysting cells') の SDS-PAGE.

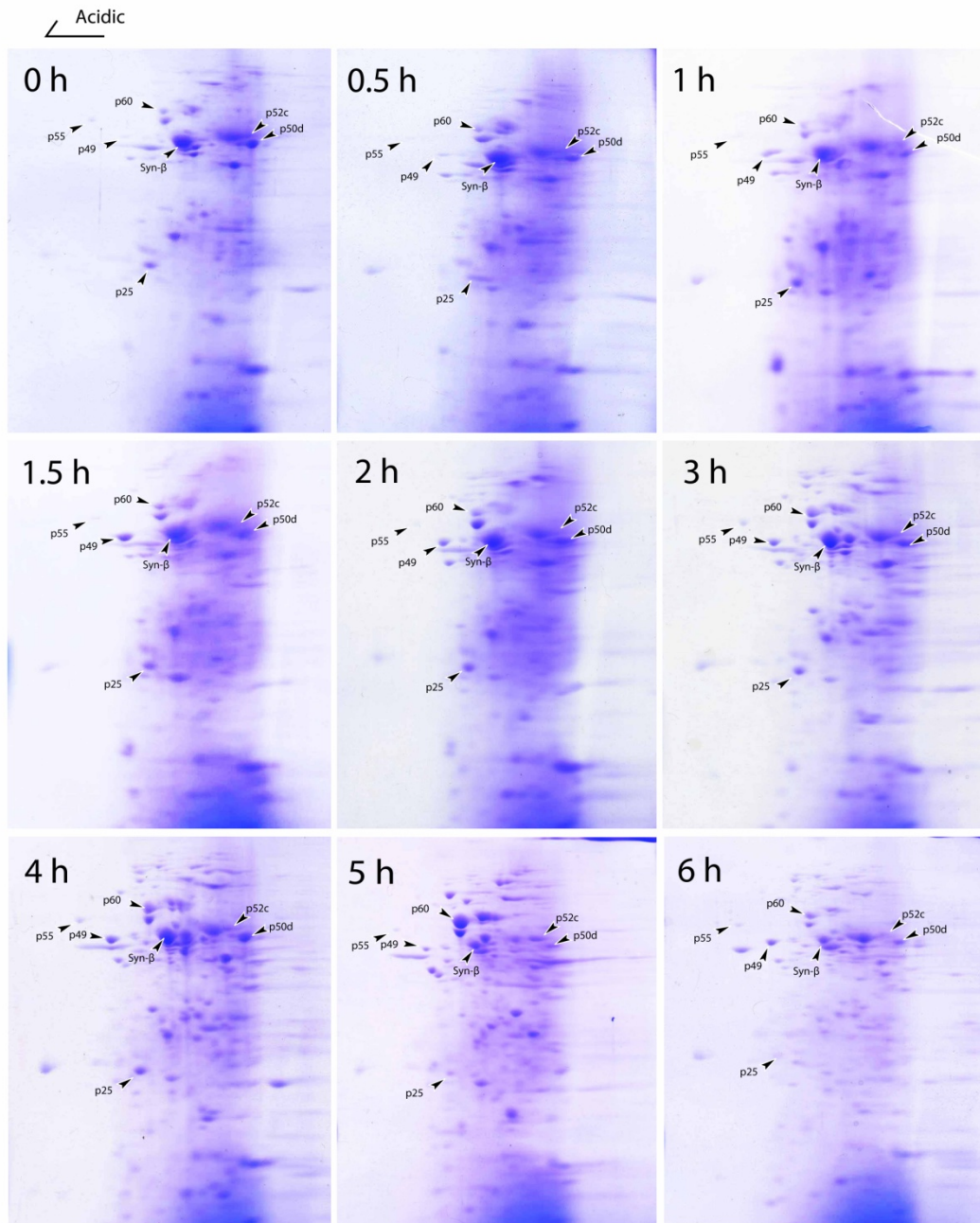


図2-1. シスト誘導後6時間までの非水溶性タンパク質の二次元電気泳動解析. 図中のラベル (0 h~6 h) は, シスト誘導後の時間 (h) を示す (ただし'0 h'は誘導していない増殖型細胞). それぞれのゲルにおける矢じりは, 発現が変化するタンパク質を示し, 'Syn-β'はATPシンターゼβ鎖を示す.

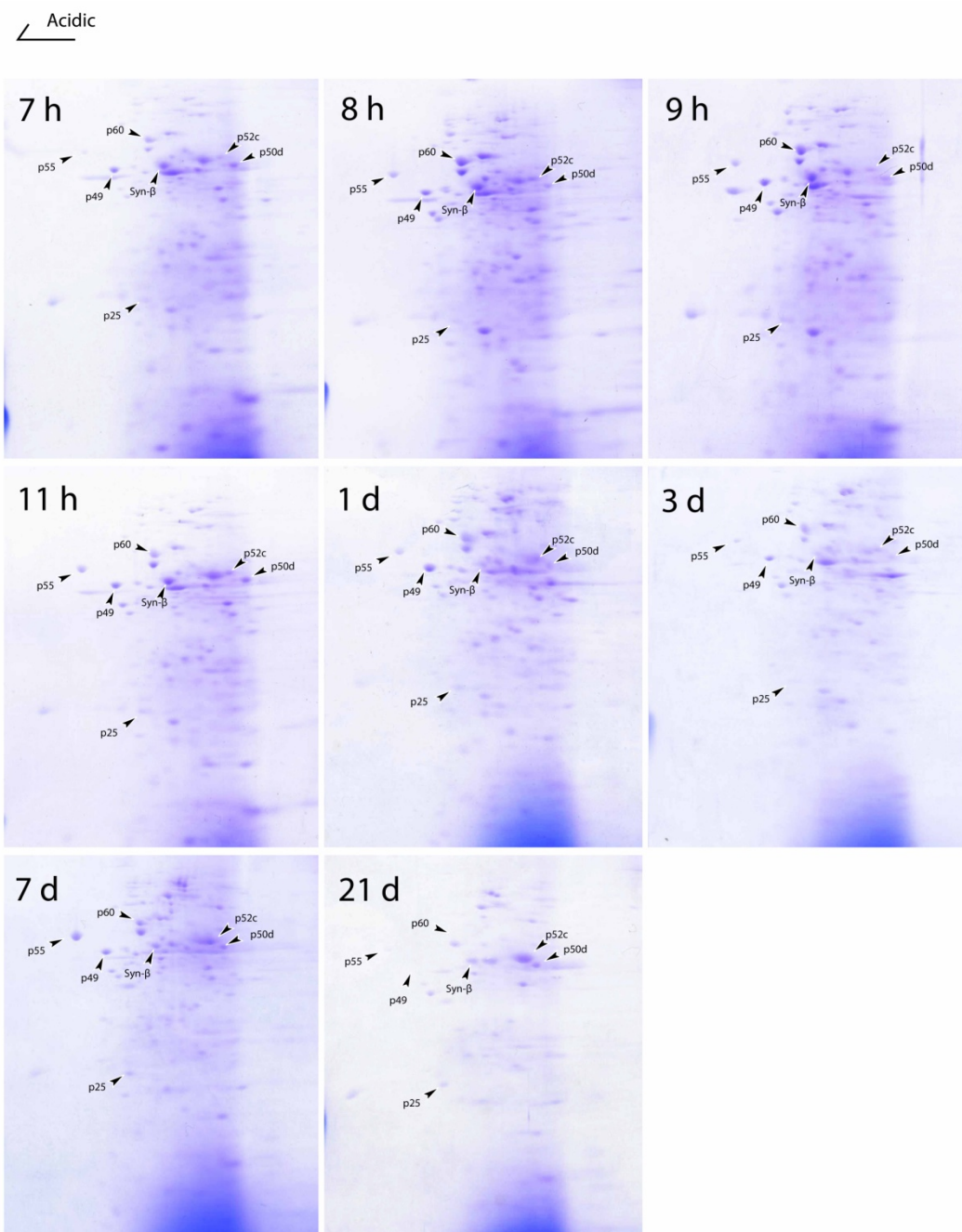


図2-2. シスト誘導後7時間~21日までの非水溶性タンパク質の二次元電気泳動解析. 図中のラベル(7h~21d)は, シスト誘導後の時間(h)と日数(d)を示す. それぞれのゲルにおける矢じりは, 発現が変化するタンパク質を示し, 'Syn-β'はATPシンターゼβ鎖を示す.

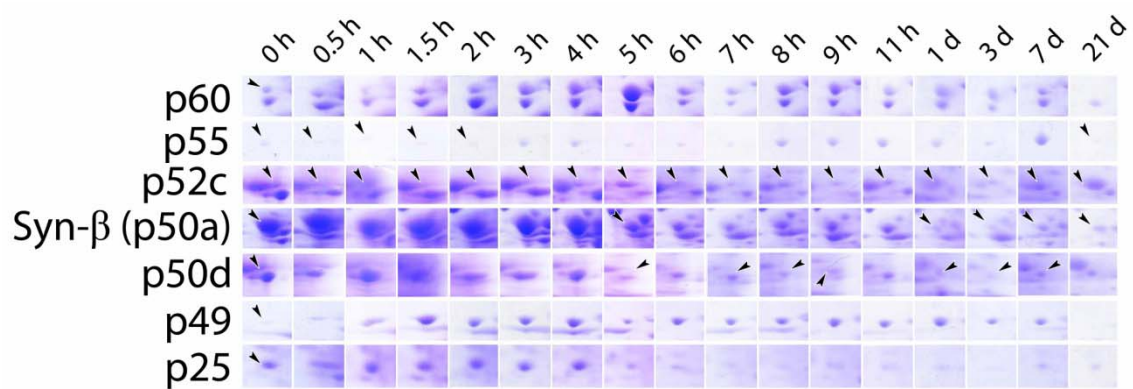


図3. シスト誘導後0時間~21日までの非水溶性タンパク質の二次元電気泳動解析によって得られた発現が顕著に変化するスポット. 図中のラベル (0 h~21 d) は, シスト誘導後の時間 (h) と日数 (d) を示す. 'Syn-β'はATPシンターゼβ鎖を示す.

表 1. LC-MS/MS にて同定されたシスト形成過程で発現変化する *C. cucullus* のタンパク質

Protein name	Spots	Sequence of exactly matched peptides	Sequence of partially matched peptides*	Accession No. (organism)	Sequence coverage (%)
Heat shock protein 60	p60	MLVGNRIADAVA, AVAAGMNPMDLK, AAVEEGVPGGGAALLR	<u>TNDIAGDGITITIVLARAIYR</u>	gi 239865761 (<i>Perkinsus marinus</i>)	11 (63AA/560AA)
	p55	AGFAGDDAPR, DSYVVGDEAQS, TEAPLNPK, GYSFTTTAER, SYELPDGQVITIGNER, IAPPER		gi 27450759 (<i>Pyrocystis lunula</i>)	17 (62AA/375AA)
Actin	p49	AGFAGDDAPR, DSYVVGDEAQS, VAPEEHPVLLTEAPLNPK, GYSFTTTAER, ELTALAPSTMK		gi 157093087 (<i>Karlodinium micrum</i>)	16 (60AA/376AA)
	p52c	FWEVISDEH, GIDPTGYHGDSDLQLER, INVYFNEATGGR, AILMDLEPGTMDSVR, AGPFGQLFRPDNFVFGQSGAGNNWAK, GHYTEGAELIDSVLDVVRK, EAEGDCCLQG- FQITH, SLGGGTGSGMGILLISK, VREEYPDR, IMETSVVPSPK, VSDTVVEPYNAILSVH, FPGQLNSDLRK, LAVNLIPPPR, ALTVPELTQ- QMFDK, NMMCASDPR, EVDEQMLNVQNK, NSSYFVEWIPNNIK, SSICDIPPK, MAVTFIGN- STAIQEMFK, RVAEQFTAMFR		gi 169659248 (<i>Sorogena stoianovitchae</i>)	64 (275AA/432AA)
Hypothetical protein homologous to ATP synthase β chain	p50a	VVDLLAPYAR, IGLFGGAGVGK, TVLIQELI- NNVAK, AHGGYSVFAGVGER, FTQACSEV- SALLGR, PAPTTEAHLDAITVLSR, ALTELG- IYPAVD, FLSQPFMSEVFSGRK	<u>CALYGMNEPPGAR</u> , <u>VGLTGLIVAEYER</u>	gi 145503262 (<i>Paramecium tetraurelia</i>)	27 (136AA/499AA)
	p50d	TIGGGDDAFNTFFSETGAGK, QLFHPEQLIS- GK, EDAANNFAR, EVDLCLDR, LSVYDGK, IHFMLSSYAPIISAEK, DVNASIATIK, TIQFVDWCPTGFK, AVCMISNSTAIAEVFSR, FDLMYAK, AFVHWYVVEGMEEGEFSEAR, EDLAALEK		gi 161729 (<i>Tetrahymena thermophila</i>)	33 (148AA/449AA)
α -Tubulin	p25	AVFLDLEPTVVDEVR, QLFHPEQLISGK, EDAANNFAR (3)		gi 2058297 (<i>Colpoda</i> sp.)	9 (36AA/380AA)

* PEAKS online 6.0により推定される配列に一致したアミノ酸残基はアンダーラインを付してある。

結論

1章では、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Fura 2 レシオメトリ解析により、*C. cucullus* の休眠シスト誘導条件下（細胞外 Ca^{2+} の存在下での細胞間物理的接触頻度の上昇）では、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することを実証した。また、*In vitro* calibration の結果、シスト誘導条件下で1時間刺激を継続すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が 10^{-8} M 以下のレベルから 2×10^{-7} M まで上昇することがわかった。本研究により、細胞相互の物理的刺激による細胞内への Ca^{2+} の拡散がシスト形成の細胞内シグナル伝達系を活性化するという仮説が完全に実証された。

シスト誘導すると1時間以内に細胞内 cAMP 濃度が上昇することがわかっている。cAMP 濃度の上昇は、細胞内に拡散した Ca^{2+} が Ca^{2+} 結合タンパク質を介してアデニレートシクラーゼを活性化することによると思われる。cAMP はタンパクキナーゼ A (PKA) を介して標的タンパク質のリン酸化をおこなうことが推察される。2章では、シスト誘導依存的にリン酸化されるタンパク質群を Phos-tag/ECL により検出し、これらのほとんどが cAMP 依存的にリン酸化されることを明らかにした。そして、これらのリン酸化タンパク質群のうちの数種のタンパク質をマスマスペクトル解析により同定した。

3章では、シスト誘導後に発現が著しく変化するタンパク質を二次元電気泳動により経時的に単離し、マスマスペクトル解析により同定した。

本研究および我々がすでに報告している結果から、*C. cucullus* の休眠シスト形成のシグナル伝達系が部分的にはあるが解明された。すなわち、シスト誘導刺激により細胞内に拡散した Ca^{2+} は、おそらく Ca^{2+} 結合タンパク質を介してアデニレートシクラーゼを活性化し、細胞内 cAMP 濃度の上昇をもたらすことが推察される。そして PKA の働きにより、アクチン、ヒストン H4、Rieske 鉄-硫黄タンパク質、リボソーム S5 タンパク質、リボソーム P0 タンパク質などの標的タンパク質のリン酸化がおきる（シスト形成におけるこれらのタンパク質の役割に関する考察は本文参照）。標的タンパク質群のリン酸化が、タンパク質の発現レベルの調節に関与するかどうかは不明であるが、シスト誘導後2~3時間以降、ミトコンドリア ATP シンターゼ β 鎖、ペプチド伸長因子 1α (EF- 1α)、ヒ

ートショックタンパク質60 (HSP60), アクチン, チューブリンなどのタンパク質の発現レベルに顕著な変化がおきる. これらのタンパク質群は, ミトコンドリアの電子伝達系の停止, 分子シャペロン機能, 細胞骨格の動態制御といった細胞のシスト化に伴う細胞再構築の過程で重要な役割を担っていると考えられる.

謝辞

本研究において、ご指導と本論文の御校閲を賜りました高知大学自然科学系理学部門の松岡達臣教授，藤原滋樹教授，三宅尚准教授に謹んでお礼申し上げます。本研究の遂行において、共同研究者としてご協力頂きました信州大学医学部の竹下敏一教授，小島克彦助教，広島大学大学院医歯薬学総合研究科の木下英司准教授，京都工芸繊維大学応用生物学部門の宮田清司准教授に謹んでお礼申し上げます。

また，本研究の遂行において，公益財団法人日本科学協会より『笹川研究助成』，日本学術振興会より『特別研究員奨励費』を賜りましたことを心より感謝致します。

引用文献

- Akematsu, T. & Matsuoka, T. 2008. Chromatin extrusion in resting encystment of *Colpoda cucullus*: a possible involvement of apoptosis-like nuclear death. *Cell. Biol. Int.*, **32**:31-38.
- Aruda, A. M., Baumgartner, M. F., Reitzel, A. M. & Tarrant, A. M. 2011. Heat shock protein expression during stress and diapause in the marine copepod *Calanus finmarchicus*. *J. Insect Physiol.*, **57**:665-675.
- Asami, H., Ohtani, Y., Iino, R., Sogame, Y. & Matsuoka, T. 2010. Behavior and Ca²⁺-induced cell signaling for encystment of *Colpoda cucullus*. *J. Protozool. Res.*, **20**:1-6.
- Avrova, A. O., Venter, E., Birch, P. R. J. & Whisson, S. C. 2003. Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. *Fungal Genet. Biol.*, **40**:4-14.
- Bouyer, S., Rodier, M. H., Guillot, A. & Héchard, Y. 2009. *Acanthamoeba castellanii*: proteins involved in actin dynamics, glycolysis, and proteolysis are regulated during encystation. *Exp. Parasitol.*, **123**:90-94.
- Brown, V. S., Hosking, P., Li, J. & Williams, N. 2006. ATP synthase is responsible for maintaining mitochondrial membrane potential in bloodstream from *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell*, **5**:45-53.
- Carranza, P. G. & Lujan, H. D. 2010. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes. Infect.*, **12**:71-80.
- Castillo-Romero, A., Leon-Avila, G., Rangel, A. P., Zarate, R. C., Tovar, C. G. & Hernandez, J. M. 2009. Participation of actin on *Giardia lamblia* growth and encystations. *PLoS One*, **4**:e7156.
- Castillo-Romero, A., Leon-Avila, G., Wang, C. C., Rangel, A. P., Nuez, M. C., Tovar, C. G., Ayala-Sumuano, J. T., Luna-Arias, J. P. & Hernandez, J. M. 2010. Rab11 and actin cytoskeleton participate in *Giardia lamblia* encystation, guiding the specific vesicles to the cyst wall. *Plos Neglect. Trop. Dis.*, **4**:e697.

- Corliss, J. O. & Esser, S. C. 1974. Comments on the role of the cyst in the life cycle and survival of free-living protozoa. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, **93**:578-593.
- Ebert, F., Bachmann, A., Nakada-Tsukui, K., Hennings, I., Drescher, B., Nozaki, T., Tannich, E. & Bruchhaus, I. 2008. An *Entamoeba* cysteine peptidase specifically expressed during encystation. *Parasitol. Int.* **57**:521-524.
- Furuhashi, K., Ishigami, M., Suzuki, M. & Titani, K. 1998. Dry stress-induced phosphorylation of *Physarum* actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **242**:653-658.
- Funatani, R., Kida, A., Wato, T. & Matsuoka, T. 2010. Morphological events during resting cystformation in the ciliate *Colpoda cucullus*. *Protistology*, **6**:204-217.
- He, L. & Lemasters, J. J. 2005. Dephosphorylation of the Rieske iron-sulfur protein after induction of the mitochondrial permeability transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**:829-837.
- Kida, A. & Matsuoka, T. 2006. Cyst wall formation in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*: cyst wall is not originated from pellicle membranes. *Inv. Surv. J.*, **3**:77-83.
- Kim, J., Bae, S. S., Sung, M. H., Lee, K. H. & Park, S. J. 2009. Comparative proteomic analysis of trophozoites versus cysts of *Giardia lamblia*. *Parasitol. Res.*, **104**:475-479.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. & Koike, T. 2006. Phosphate-binding tag: a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**: 749-757.
- Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E. & Koike, T. 2009. Phos-tag beads as an immunoblotting enhancer for selective detection of phosphoproteins in cell lysates. *Anal. Biochem.*, **389**:83-85.
- Kornberg, R. D. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, **184**:868-871.
- Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W. L., Dorsey, J., Schindler, K., Winter, E., Allis, C. D., Guacci, V., Khochbin, S., Fuller, M. T. & Berger, S. L. 2006. Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev.*, **20**:2580-2592.

- Kurasawa, Y., Watanabe, Y. & Numata, O. 1996. Characterization of F-actin bundling activity of *Tetrahymena* elongation factor 1 α investigated with rabbit skeletal muscle actin. *Zool. Sci.*, **13**:371-375.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
- Lauwaet, T., Davids, B. J., Reiner, D. S. & Gillin, F. D. 2007. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr. Opin. Microbiol.*, 10:554-559.
- Lingdan, L., Pengtao, G., Wenchao, L., Jianhua, L., Ju, Y., Chengwu, L., He, L., Guocai, Z., Wenzhi, R., Yujiang, C. & Xichen, Z. 2012. Differential dissolved protein expression throughout the life cycle of *Giardia lamblia*. *Exp. parasitol.*, **132**:465-469
- Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B. & Nash, T. E. 1995. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J. Biol. Chem.*, **270**:29307-29313.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**:251-260.
- Maeda, H., Akematsu, T., Fukui, R. & Matsuoka, T. 2005. Studies on the resting cyst of ciliated protozoan *Colpoda cucullus*: Resistance to temperature and additional inducing factors for en-or excystment. *J. Protozool. Res.*, **15**:7-13.
- Makioka, A., Kumagai, M., Hiranuka, K., Kobayashi, S. & Takeuchi, T. 2012. Expression analysis of Entamoeba invadens profilins in encystation and excystation. *Parasitol. Res.*, **110**:2095-2104.
- Manning-Cela, R., Meraz, M. A., Hernandez, J. M. & Meza, I. 1994. Actin mRNA levels and actin synthesis during the encystation of Entamoeba invadens. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **41**:360-365.
- Matsuoka, T., Kondoh, A., Sabashi, K., Nagano, N., Akematsu, T., Kida, A. & Iino, R. 2009. Role of Ca²⁺ and cAMP in a cell signaling pathway for resting cyst formation of ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *Protistology*, **6**:103-110.

- Moon, E. K., Chung, D. I., Hong, Y. C. & Kong, H. H. 2008. Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. *Eukaryot. Cell*, **7**:1513-1517.
- Nakanishi, T., Ando, E., Furuta, M., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Tsunasawa, S. & Nishimura, O. 2007. Identification on membrane and characterization of phosphoproteins using an alkoxide-bridged dinuclear *met al.* complex as a phosphatebinding tag molecule. *J. Biomol. Tech.*, **18**:278–286.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**:4007-4021.
- Segovia-Gamboa, N. C., Chávez-Munguía, B., Medina-Flores, Y., Cázares-Raga, F. E., Hernández-Ramírez, V. I., Martínez-Palomo, A. & Talamás-Rohana, P. 2010. *Entamoeba invadens*, encystation process and enolase. *Exp. Parasitol.*, **125**:63-69.
- Segovia-Gamboa, N. C., Talamás-Rohana, P., Ángel-Martínez, A., Cázares-Raga, F. E., González-Robles, A., Hernández-Ramírez, V. I., Martínez-Palomo, A. & Chávez-Munguía, B. 2011. Differentiation of *Entamoeba histolytica*: a possible role for enolase. *Exp. Parasitol.*, **129**:65-71.
- Shimada, Y., Kasakura, T., Yokota, M., Miyata, Y., Murofushi, H., Sakai, H., Yahara, I. & Murakami-Murofushi, K. 1992. Expression of a 66-kD heat shock protein associated with the process of cyst formation of a true slime mold, *Physarum polycephalum*. *Cell Struct. Funct.* **17**:301-309.
- Sogame, Y., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2011a. Ca²⁺-dependent in vivo protein phosphorylation and encystment induction in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *Eur. J. Protistol.*, **47**:208-213.
- Sogame, Y., Asami, H., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2011b. Possible involvement of cAMP and protein phosphorylation in the cell signaling pathway for resting cyst formation of ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *Acta Protozool.*, **50**:71-79.
- Sogame, Y., Kida, A. & Matsuoka, T. 2011c. Possible involvement of endocyst in tolerance of the resting cyst of *Colpoda cucullus* against HCl. *African J. Microbiol.*, **5**:4316-4320.

- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Fujiwara, S., Miyata, S., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2012a. Protein phosphorylation in encystment-induced *Colpoda cucullus*: localization and identification of phosphoproteins. *FEMS Microbiol. Lett.*, **331**:128-135.
- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2012b. EF-1 α and mitochondrial ATP synthase β chain: alteration of their expression in encystment-induced *Colpoda cucullus*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **59**:401-406.
- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2014. Identification of differentially expressed water-insoluble proteins in the encystment process of *Colpoda cucullus* by two-dimensional electrophoresis and LC-MS/MS analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **61**:51-60.
- Sonobe, S., Takahashi, S. Hatano, S. & Kuroda, K. 1986. Phosphorylation of *Amoeba* G-actin and its effect on actin polymerization. *J. Biol. Chem.*, **261**:14837–14843.
- Tsien, R. & Pozzan, T. 1989. Measurement of cytosolic free Ca²⁺ with Quin2. *Methods Enzymol.*, **172**:230-262.
- Vargas-Parada, L., Solís, C. F. & Laclette, J. P. 2001. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda) . *Parasitology*, **122**:583-588
- Yamaoka, M., Watoh, T. & Matsuoka, T. 2004. Effects of salts concentration and bacteria on encystment induction in ciliated protozoan *Colpoda* sp. *Acta Protozool.*, **43**:3-98.

付録

参考論文および発表論文

参考論文

1. Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2014. Identification of differentially expressed water-insoluble proteins in the encystment process of *Colpoda cucullus* by two-dimensional electrophoresis and LC-MS/MS analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **61**:51-60.

発表論文

1. 舟谷亮二, 十亀陽一郎, 末友靖隆 & 松岡達臣 2010. すぐ使える原生動物教材！コルポーダを使った実習マニュアル. *生物の科学 遺伝*, **64**:93-100.
2. Asami, H., Ohtani, Y., Iino, R., Sogame, Y. & Matsuoka, T. 2010. Behavior and Ca²⁺-induced cell signaling for encystment of *Colpoda cucullus*. *J. Protozool. Res.*, **20**:1-6.
3. Sogame, Y., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2011a. Ca²⁺-dependent in vivo protein phosphorylation and encystment induction in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *Eur. J. Protistol.*, **47**:208-213.
4. Sogame, Y., Asami, H., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2011b. Possible involvement of cAMP and protein phosphorylation in the cell signaling pathway for resting cyst formation of ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *Acta Protozool.*, **50**:71-79.
5. Sogame, Y., Kida, A. & Matsuoka, T. 2011c. Possible involvement of endocyst in tolerance of the resting cyst of *Colpoda cucullus* against HCl. *African J. Microbiol.*, **5**:4316-4320.
6. Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Fujiwara, S., Miyata, S., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2012a. Protein phosphorylation in encystment-induced *Colpoda cucullus*: localization and identification of phosphoproteins. *FEMS Microbiol. Lett.*, **331**:128-135.
7. Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2012b. EF-1 α and mitochondrial ATP synthase β chain: alteration of their expression in encystment-induced *Colpoda cucullus*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **59**:401-406.
8. Sogame, Y. & Matsuoka, T. 2012. Culture age, intracellular Ca²⁺ concentration, and protein phosphorylation in encystment-induced *Colpoda cucullus*. *Indian J. Microbiol.*, **52**:666-669.

9. 松岡達臣 & 十亀陽一郎 2012. 単細胞生物コルポーダの休眠シスト形成とPhos-tagによるリン酸化解析. *生物物理化学*, **56**:33-36.
10. 十亀陽一郎 & 松岡達臣 2012. 粘液多糖類を含む単細胞生物*Colpoda cucullus*タンパク質の解析-SDSを含むサンプルの二次元電気泳動-. *高知大学学術研究報告*, **61**:253-259.
11. Sogame, Y. & Matsuoka, T. 2013. Evaluation of Intracellular Ca²⁺ concentration by Fura 2 ratiometry in Encystment-induced *Colpoda cucullus*. *Acta Protozool.*, **52**: 51-54.
12. Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E., Funadani, R. & Matsuoka, T. 2013. Excystment-Dependent Protein Expression in Terrestrial Ciliate *Colpoda cucullus*. *Microbes Environ.*, **28**:388-390.