

博士論文

真核単細胞生物 *Colpoda cucullus* Nag-1 の休眠シスト形成および
脱シストに関する研究

平成 29 年 3 月

高知大学大学院総合人間自然科学研究科

応用自然科学専攻

舟谷 亮二

目次

総論	-----	1
第1章 生体染色法を用いた繊毛虫コルポーダ (<i>Colpoda cucullus</i> Nag-1) の休眠シスト形成の細胞学的研究	-----	2
要約	-----	3
序論	-----	4
材料と方法	-----	6
結果と考察	-----	8
図	-----	11
第2章 繊毛虫コルポーダ (<i>Colpoda cucullus</i> Nag-1) 分子系統解析およびシスト壁構造の生化学的・微形態学的解析	-----	17
要約	-----	18
序論	-----	20
材料と方法	-----	22
結果と考察	-----	28
図	-----	32
第3章 繊毛虫コルポーダ (<i>Colpoda cucullus</i> Nag-1) の脱シスト：脱シスト液胞の能動拡張によるシスト壁の破壊と栄養細胞の脱出	-----	41
要約	-----	42
序論	-----	43

	材料と方法	44
	結果と考察	45
	図	48
謝辞		54
引用文献		
	総論	55
	第1章	57
	第2章	59
	第3章	61
付録	参考論文および発表論文	63

総論

土壌に生息する単細胞生物は、乾燥耐性だけでなく高温、凍結、酸などに対する耐性を有する休眠シストを形成することにより、陸上に一時的に出現する水環境にうまく適応している (Taylor and Strickland, 1936; Maeda *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2010; Sogame *et al.*, 2011). 降雨により水たまりが出現すると速やかに脱シスト (発芽) して細胞分裂を繰り返し、水環境が消失する前に再度休眠シストになる. 土壌性繊毛虫コルポダ (*Colpoda*) 類の場合, 水たまりの Ca^{2+} 濃度の上昇 (Yamaoka *et al.*, 2004) や細胞密度の上昇 (Strickland, 1940; Maeda *et al.*, 2005) を乾燥予告シグナルとして感知し休眠シスト形成が誘導される. *Colpoda cucullus* Nag-1 を用いた解析では, 外液 Ca^{2+} の存在下で細胞間の接触刺激 (機械刺激) により Ca^{2+} の細胞内拡散が促進され (Matsuoka *et al.*, 2009; Asami *et al.*, 2010; Sogame and Matsuoka, 2013), これに引き続いて細胞内 cAMP 依存的なタンパク質のリン酸化 (Asami *et al.*, 2010; Sogame *et al.*, 2012a; Sogame *et al.*, 2014a) やタンパク質の発現レベルの変化がおきる (Sogame *et al.*, 2012b; 2014b). 一方, 麦葉浸出液やポルフィリンの一種であるクロロフィリン-Cu は, *C. cucullus* Nag-1 のシスト形成を抑制し, 顕著な脱シスト誘導効果を示すことが知られている (Tsutsumi *et al.*, 2004).

休眠シスト形成や脱シスト過程は, 遺伝子制御された細胞レベルでの形態形成のプロセスであり, 細胞生物学における重要な研究テーマの 1 つであるが, その分子機構はほとんど解明されておらず, 形態学的研究基盤も十分とはいえない. 本研究では, *C. cucullus* Nag-1 を用いて, 第 1 章では, シスト形成初期過程における細胞内構造の変化を細胞学的に解析した. 第 2 章では, 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し, *C. cucullus* の近縁種との分子系統関係を明らかにした. さらに, シスト壁を形態的解析に加えて分子レベルでも解析し, シスト壁構成タンパク質の一つを同定した. また, 第 3 章では, 脱シスト過程の最終段階であるシストからの栄養細胞 (運動性を有する増殖型細胞) の脱出機構についても生理学的解析により明らかにした.

第1章

生体染色法を用いた繊毛虫コルポータ (*Colpoda cucullus* Nag-1) の休眠シ
スト形成の細胞学的研究

要約

土壌性繊毛虫 *Colpoda cucullus* Nag-1 のシスト形成初期過程では、一部のミトコンドリアの断片化、多数の粘着性小球構造（レピドソーム）の形成と細胞外への放出、シスト壁最外層であるエクトシスト層およびその内側でのエンドシスト層の形成が数時間以内におきることが知られている。本研究では、本種のシスト形成初期過程における細胞内構造の分解・再構築に関する細胞学的解析を行った。シスト誘導して数時間後までに、細胞内に多数のアクリジンオレンジ（AO）に染まるオートファゴソームが出現した。この結果から、シスト形成の初期過程（数時間～半日）では、シスト壁の形成と同時に栄養細胞構造体の消化がなされることがわかった。さらに、ミトコンドリアの膜電位が消失することから、シスト誘導後速やかにエネルギー代謝が停止することがわかった。エクトシスト層はトルイジンブルー（TB）染色では染まらなかったが、リン脂質検出試薬には染まることから、エクトシスト層の形成には膜系が関与している可能性が示唆された。

序論

土壌性繊毛虫コルポーダ (*Colpoda cucullus* Nag-1) の休眠シスト形成を誘導すると 1 時間以内に、一部のミトコンドリアの断片化がおきる (Kida and Matsuoka, 2006) . これに引き続いて (シスト誘導後 3 時間くらいまでに) , 多数のムコシストが細胞膜直下に並び、エクソサイトーシスによって粘液が細胞外に分泌されて粘液の皮膜を形成する (Funadani *et al.*, 2016) . このステージでは、細胞内に多数の粘着性小球構造 (レピドソーム) が形成され、粘液のエクソサイトーシスに引き続いて、レピドソームも細胞外へ放出されて粘液層にトラップされる (Funadani *et al.*, 2016) . 細胞が粘液層に被われると、コルポーダの遊泳力はなくなり、シャーレの底面への付着や細胞相互の接着が促進される. その後、コルポーダの細胞形態は球形化し、エクトシスト層 (単層) が形成される (シスト誘導後 2~4 時間). 電子顕微鏡観察に基づいて、エクトシスト層は、細胞表層の膜系に由来するという説が提唱されている (Funatani *et al.*, 2010; Kawakami and Yagi, 1963; Ruthmann and Kuck, 1985) が、この説を裏付ける十分な証拠は得られていない. 本研究では、エクトシスト層を単離し、リン脂質検出試薬による染色を試み、「エクトシスト層の膜系由来説」を支持する結果を得た.

エクトシスト層が完成するとすぐに第 1 層目のエンドシスト層が形成される. 細胞内にエンドシスト前駆物質 (Toluidine blue-stained substance; TBS) を含む巨大な液胞が出現し、TBS は細胞膜とエクトシスト層の間隙に放出され固化する (Funatani *et al.*, 2010; Watoh *et al.*, 2005) . TBS はその後、繰り返し分泌され、数日かけて数層のエンドシスト層が形成される (Funatani *et al.*, 2010) . 休眠シスト誘導後 10 時間くらい経過すると、大核からクロマチン塊が細胞質に放出され、オートファゴソームに取り込まれて消化される (Akematsu and Matsuoka, 2008) . 完成した休眠シスト (シスト誘導後数日~2 週間) の細胞構造は栄養細胞とは大きく異なる. すなわち、繊毛をはじめとする細胞骨格系、小胞体などの膜系、ミトコンドリア、核以外の細胞小器官は消失し、細胞質の大部分は貯蔵栄養顆粒と考えられる低電子密度の顆粒が占め、ミトコンドリアは細胞表層部

付近に凝集する (Funatani *et al.*, 2010; Kida and Matsuoka, 2006). この事実は, シスト形成過程で栄養細胞構造のほとんどが分解されることを示している. 本研究では, アクリジンオレンジ染色によりオートファゴソームを検出し, 休眠シスト誘導後の細胞内のオートファゴサイトーシスの様子を観察した. 休眠シストでは, ミトコンドリアのエネルギー代謝が停止することが予想されるが, これまでにその証拠は得られていない. 本研究では, シスト誘導後数時間でミトコンドリアの膜電位が消失する (電子伝達系が停止) ことを明らかにした.

材料と方法

1. 培養とシスト誘導

Colpoda cucullus Nag-1 株は、バクテリア (*Klebsiella pneumoniae*) を定期的に植菌した 0.05% (w/v) 麦葉浸出液中で培養した。 *K. pneumoniae* は、1.5% agar, 0.5% polypepton, 1% meat extract および 0.5% NaCl を含む寒天培地上で室温にて培養した。 シスト形成を誘導する場合は、1～2 日間培養したコルポーダ細胞を遠心 (1,000～1,500 g, 2 分) して集め、休眠シスト誘導液 [1 mM CaCl₂, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl (pH 7.2)] に懸濁した。

2. トルイジンブルー (toluidine blue ; TB) 染色

シスト誘導液に溶かした 0.1% トルイジンブルー (TB) を等量の細胞懸濁液と混合し、5～10 分間染色した後に観察した。

3. DAPI (4', 6-diamidino-2-phenyl-indole) 染色

シスト誘導したコルポーダを PBS 固定液 [3.7% paraformaldehyde, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ (pH 7.4)] 中に懸濁することにより 30 分間固定した。このサンプルを遠沈して (2,000 g, 1～2 分), PBS [140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ (pH 7.4)] に再懸濁することにより細胞を 2 回洗った。洗浄したサンプルは、1% Nonidet P-40 を含む PBS に懸濁して 30 分間インキュベートした。そして、PBS で洗浄後 1 mL の細胞懸濁液に 5 μ L の 0.02% DAPI (純水に溶解) を加えた (DAPI 最終濃度は 0.0001%)。

4. アクリジンオレンジ (acridine orange ; AO) 染色

シスト誘導しないコルポーダ栄養細胞は、アクリジンオレンジ (AO) を含む塩類溶液 [0.0001 % A, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl (pH 7.2)] に懸濁した。シスト誘導する場合は、AO を含むシスト誘導液 [0.0001 % AO, 1 mM CaCl₂, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl (pH 7.2)] に懸濁した。シスト誘導した細胞は、AO 染色液に懸濁した状態で放置し経時的に蛍光顕微鏡観察した。

5. ミトコンドリア膜電位検出およびミトコンドリアの染色

ミトコンドリア膜電位の検出では, MitoPT Kit (B-Brige International, Inc.) のストック液 [ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解] を 1 mM Tris-HCl (pH 7.2) で 100 倍希釈した染色液 (最終濃度 $3.83 \mu\text{M}$ MitoPT, 1% DMSO) に懸濁して 15 分間染色した. 膜電位の有無に関係なくミトコンドリアを染色する場合は, Mito Tracker Green FM (Invitrogen) を用いた. Mito Tracker Green ストック液 (DMSO に溶解) は, 1 mM Tris-HCl (pH 7.2) で 500 倍に希釈して用い (最終濃度 $1 \mu\text{M}$ Mito Tracker Green, 0.2% DMSO), 5 分間染色した. 染色後, 細胞を遠沈し (1,500 g, 2 分), シスト誘導液 [0.1 mM CaCl_2 , 1 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2)] に懸濁した. シスト誘導しない場合は, 1 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) に懸濁した.

6. リン脂質の検出

エクトシスト層に含まれるリン脂質は, HCS LipidTOX phospholipidosis detection 試薬 (Invitrogen) を用いて検出した. 染色液はシスト誘導液 [1 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.1 mM CaCl_2] で 500 倍希釈して使用した. 染色液を含むシスト誘導液中でシスト化した細胞サンプル (シスト誘導後 5~6 時間) にカバーガラスをかけ, 軽く指で押してエクトシスト層を乖離させて蛍光顕微鏡観察した.

7. 蛍光顕微鏡観察

蛍光染色した細胞は蛍光顕微鏡 (BX-50, Olympus) を用いて観察した. MitoPT 染色では WBV, DAPI と AO 染色では WU, リン脂質の検出では WIG のフィルターセットを用いた.

結果と考察

トルイジンブルー (TB) 染色液はグリコサミノグリカンのような多糖類と複合体をなすことが知られている (Shepard and Mitchell, 1976; Terry *et al.*, 2000). 図 1.1a-1 は, TB に濃く染まるエンドシスト前駆体 (TB-stained substance; TBS) が液胞 (V_{en}) からエクトシスト層と細胞膜の間隙に放出されている様子を示している (矢尻). 液胞内部が染色されない理由は, TB が液胞内まで拡散しないためであると考えられる.

図 1.1a-2 (挿図) は, TB 染色したシスト形成中の細胞のエクトシスト層を機械的にはがしたものである. この写真から, エクトシストは TB にほとんど染まらないことがわかる. 一方, リン脂質検出試薬で染色したシスト形成中の細胞から機械的にはがしたエクトシスト層は, 鮮やかに蛍光染色された (図 1.1b-2) (図 1b-1 は同じサンプルのノマルスキー微分干渉顕微鏡写真). この結果は, エクトシスト層がリン脂質を含んでいることを示しており, エクトシストが膜系に由来することを示唆している. グリコサミノグリカンのような陰イオン性多糖類は TB により濃く染まることが知られているが (Shepard and Mitchell, 1976; Terry *et al.*, 2000), エクトシスト層が TB にほとんど染まらないという事実は, エクトシスト層はこのような多糖類を含んでいないことを示唆している.

ミトコンドリアの電子伝達系の停止は膜電位の消失を伴い, これは MitoPT 蛍光染色により視覚化できる (膜電位が形成されていればミトコンドリアは赤い蛍光を発する). 休眠シスト誘導してから7時間後には多数のミトコンドリアの膜電位が消失し始め (図 1.2c), 15 時間後には膜電位は完全に消失した (図 1.2d).

電子顕微鏡観察により, 休眠シスト誘導後1時間以内に一部のミトコンドリアが断片化することが報告されている (Kida and Matsuoka, 2006; Funatani *et al.*, 2010). そこで, MitoTracker Green 蛍光染色により, シスト誘導後のミトコンドリアの数や形状を観察した (図 1.3). この結果, 休眠シスト誘導して1時間後では, 不規則かつサイズが小さいミトコンドリアが増加しているよ

うな傾向がみられた。

シスト誘導後数時間までに大核から小さい多数のクロマチン顆粒が放出されるが、クロマチン顆粒や断片化したミトコンドリアはオートファゴソームにとりこまれて消化されると思われる。そこで、リソソームが融合したオートファゴソームを検出するために、アクリジンオレンジ (AO) 染色してシスト誘導した細胞を経時的に蛍光顕微鏡観察した (図 1.4)。休眠シスト誘導後 5 時間でさまざまなサイズのオートファゴソーム (赤い蛍光を発する小胞) が大核 (図 1.4b, 'ma') 周辺や細胞質に出現した。サイズが小さいオートファゴソームはシスト誘導後 7 時間までに消失したが、その後、大きいサイズのオートファゴソームが出現し 24 時間でほぼ消化が完了した (図 1.4c, d, e)。大きいサイズのオートファゴソームは大核から放出されたクロマチン塊 (図 1.5, 矢尻) を取り込んだものであると推察される。クロマチン塊が大核から放出される様子は図 1.5 に示す (図 1.5, 矢尻)。

これまでの研究結果 (Kida and Matsuoka, 2006; Funatani *et al.*, 2010) と本研究の結果に基づいた *C. cucullus* Nag-1 の休眠シスト形成中の細胞構造変化の模式図を図 1.6a に示す。休眠シスト誘導後に起きる形態変化を以下に要約する。

(1) シスト誘導後 30 分～1 時間

一部のミトコンドリアが断片化する (その後数時間かけて消化される)。

(2) シスト誘導後 1～5 時間 (時系列順に記載)

2-1. ムコシストから粘液物質が細胞外に分泌され細胞を被う。このとき細胞内ではレピドソームが形成されつつある。

2-2. 粘液物質のエクソサイトーシスに引き続いて細胞外に放出され、粘液層にトラップされる。細胞が球形化し、大核から小さいクロマチン顆粒が放出される。クロマチン顆粒やその他の栄養細胞構造のオートファゴサイトーシスが顕著になる。

2-3. エクトシスト層が形成される。ミトコンドリアの膜電位が消失し始める。

2-4. エンドシスト層の第 1 層目が形成される。巨大な液胞から液状のエンドシスト前駆体が

細胞膜とエクトシスト層の間隙に放出され固化する.

(3) シスト誘導後 5 時間～数日 (時系列順に記載)

3-1. 大核からクロマチン塊が放出され, オートファゴサイトーシスにより消化される.

3-2. エンドシスト層の第 2 層目が形成される (1 日に 1~2 層のペースで形成). シスト誘導 24 時間くらいまでにオートファゴサイトーシスはほぼ完了する.

3-3. 低電子密度の顆粒が細胞質の大部分を占め, ミトコンドリアは細胞表層近くに凝集する.

電子顕微鏡観察により, エクトシスト層は前駆体物質のエクトサイトーシスによって形成され
ると考えられていたが (Kida and Matsuoka, 2006), その後, 細胞表層部の膜系 (アルベオラスと
細胞膜) に由来する可能性が強く示唆された (Funatani *et al.*, 2010 ; 図 1.6b). エクトシスト層が
リン脂質を含むことを示した本研究結果は, エクトシスト層が膜系に由来するという説を支持し
ている. 膜系由来説では, 細胞膜直下に並ぶアルベオラスとよばれる小胞同士が融合し, 内膜が
新しい細胞膜になり, 外膜は既存の細胞膜と融合して接着することによりエクトシスト層の形成
が始まる (図 1.6b). これが繰り返されてエクトシスト層が肥厚していくのか, 前駆物質のエク
トサイトーシスも関与するのかについては不明である.

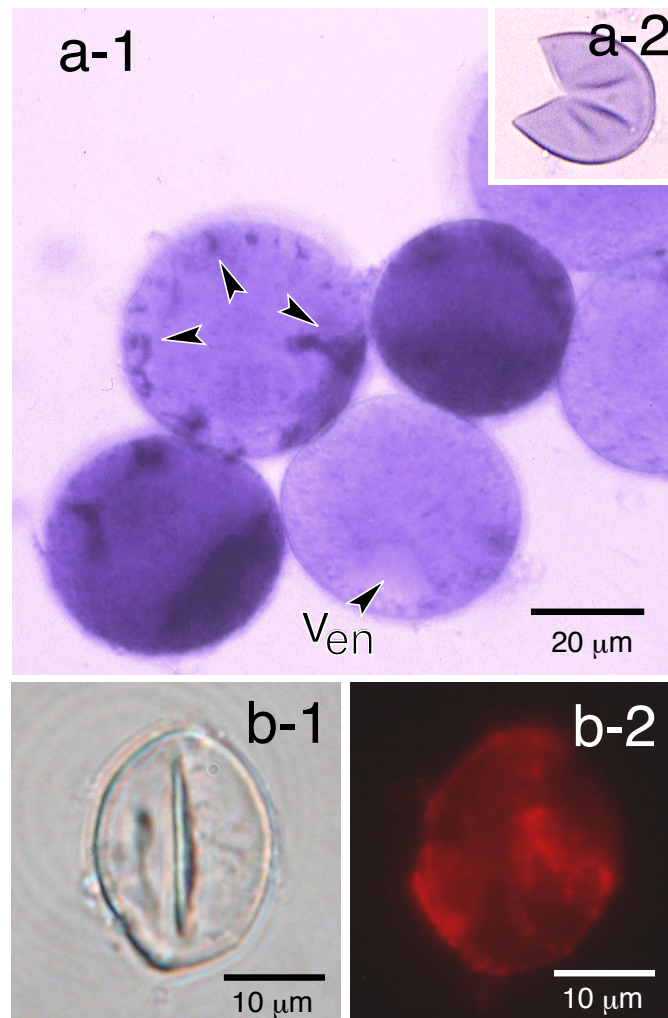


図 1.1 トルイジンブルー**(a)**またはリン脂質染色試薬**(b)**によるコルポーダのシスト壁の染色. **(a-1)** エンドシスト第一層が形成されつつあることを示すトルイジンブルー (TB) 染色像 (シスト誘導1.5~2時間後). 図中の矢尻は, トルイジンブルー染色性の物質 (エンドシストの前駆物質) が細胞膜とエクシスト層の間隙に分泌されている部位を示す. **V_{en}** エンドシスト前駆物質を含んでいると思われる大型液胞. **(a-2)** トルイジンブルー染色したシストから乖離させたエクシスト層. **(b)** リン脂質染色試薬を含むシスト誘導液中でシスト形成を誘導した細胞 (誘導後6時間) から乖離させたエクシスト層のノマルスキー微分干渉顕微鏡写真 **(b-1)** および蛍光顕微鏡写真 **(b-2)**. [Funatani *et al.* (2010) *Protistology* **6**: 204-217 より引用]

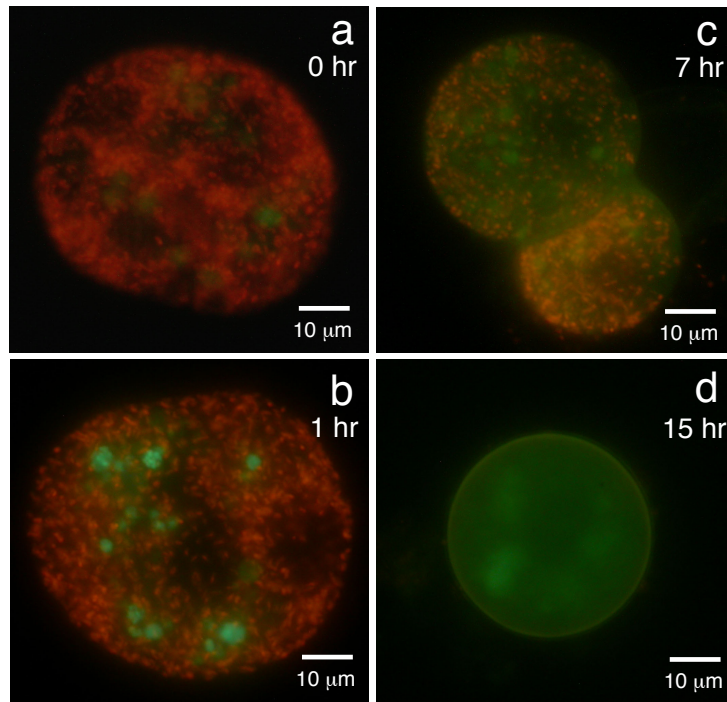


図 1.2 MitoPT 蛍光染色によるミトコンドリア膜電位の検出. コルポータ栄養細胞 (a) およびシスト誘導開始から 1 時間後 (b), 7 時間後 (c), 15 時間後 (d) のシスト形成中のコルポータ細胞. [Funatani *et al.* (2010) *Protistology* 6: 204–217 より引用]

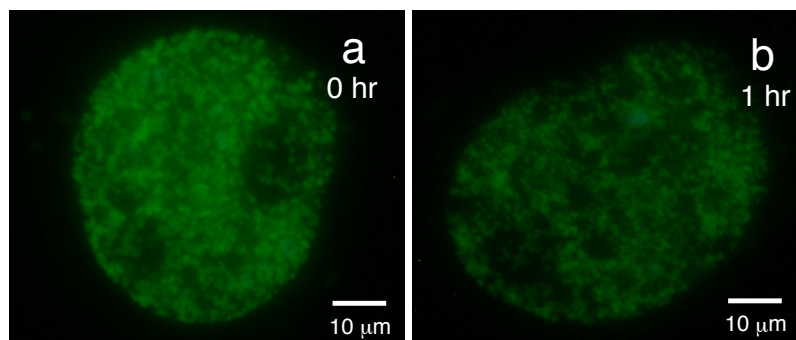


図 1.3 Mito Tracker Green によるミトコンドリアの蛍光染色. (a) コルポータ栄養細胞. (b) シスト誘導開始から1時間後のシスト形成中の細胞. [Funatani *et al.* (2010) *Protistology* 6: 204–217 より引用]

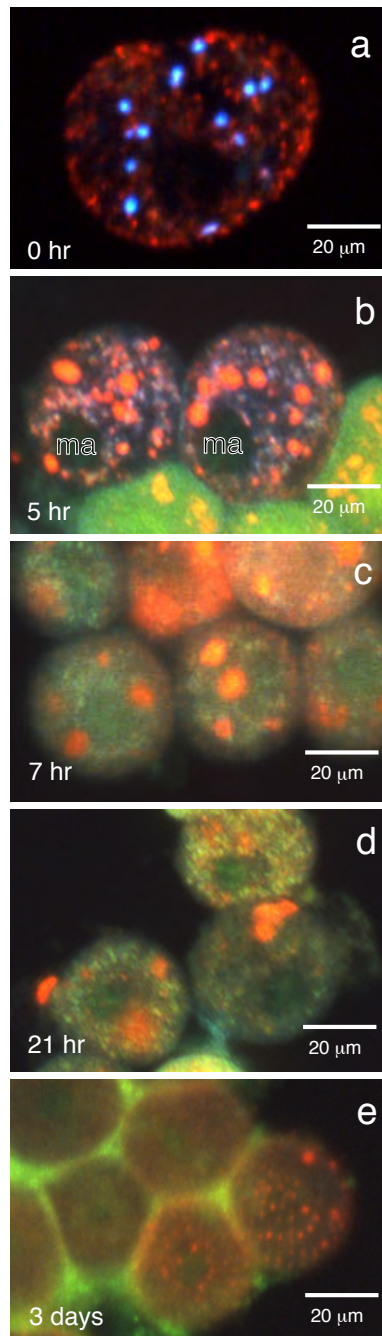


図 1.4 アクリジンオレンジ染色によるオートファゴソームの検出. コルポータ栄養細胞 (a) およびシスト誘導開始から 5 時間後 (b), 7 時間後 (c), 21 時間後 (d) および 3 日後 (e) のシスト形成中の細胞. **ma**, 大核. [Funatani *et al.* (2010) *Protistology* 6: 204–217 より引用]

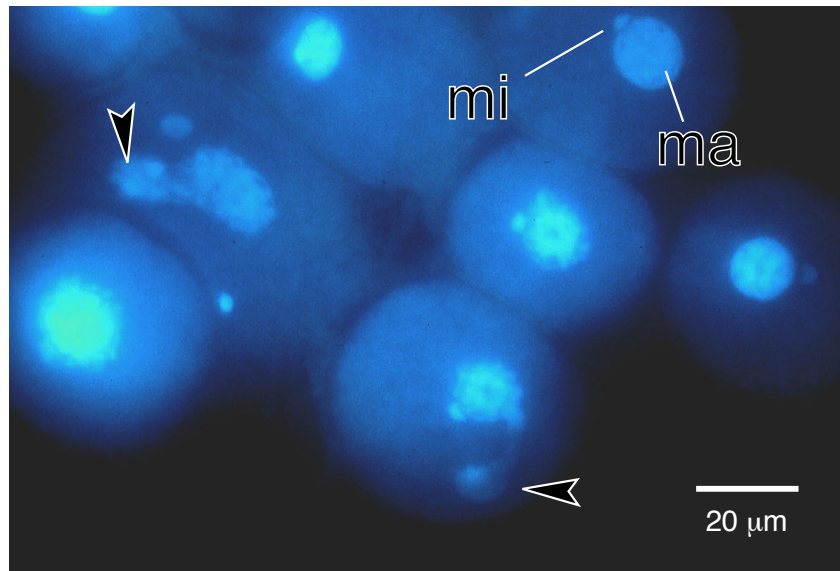


図 1.5 大核から放出されたクロマチン塊（矢尻）のDAPI染色（シスト誘導後10時間経過したコルポータ細胞）. **ma**, 大核, **mi**, 小核. [Funatani *et al.* (2010) *Protistology* **6**: 204–217 より引用]

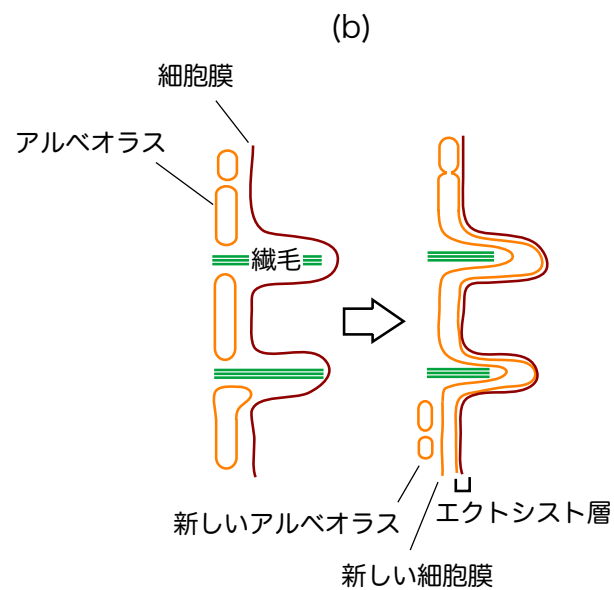
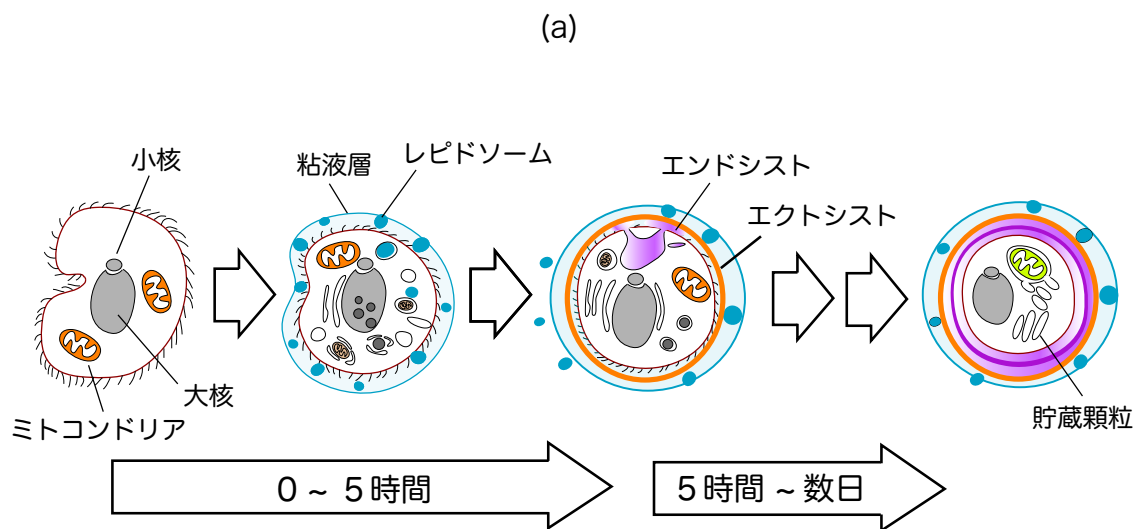


図 1.6 シスト形成過程 (a) およびエクトシスト層形成様式 (b) を示す模式図. [Funatani *et al.* (2010)]

Protistology 6: 204-217 より改変]

第2章

絨毛虫コルポーダ (*Colpoda cucullus* Nag-1) 分子系統解析およびシスト壁
構造の生化学的・微形態学的解析

要約

コルポータ (*C. cucullus* Nag-1) は高知県内の土壌表面から単離した繊毛虫である。本種は、栄養細胞の形態的特徴に基づいて *C. cucullus* と同定されたが、休眠シスト表層にレピドソームとよばれる多数の小球構造 (*C. cucullus* には存在しないとされる) が存在する。本研究では、18S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し、*C. cucullus* の近縁種との分子系統関係を明らかにした。

C. cucullus Nag-1 の休眠シスト壁は、最外層から順に、粘液層／レピドソーム層、エクトシスト層 (単層)、エンドシスト層 (数層) からなる。本研究では、コルポータのシスト壁を構成するタンパク質を同定することを目的とし、脱シスト後のシスト壁 (レピドソーム/粘液層に覆われたエクトシスト層) を回収し、これに含まれるタンパク質を SDS-PAGE 分析した。この結果、27 kDa, 31 kDa, 45 kDa の明瞭なバンドおよび 50～60 kDa のスメアな複数のバンドが検出された。27 kDa, 31 kDa および 45 kDa のバンドをマスマスペクトル (LC-MS/MS) 解析した結果、45 kDa タンパク質 (p45) がペプチド伸長因子 Tu (Elongation factor Tu; EF-Tu) であることがわかった。p45 がシスト壁のどの構造に局在するのかを明らかにするために、EF-Tu ポリクローナル抗体を用いた間接蛍光法によって解析した。この結果、p45 はレピドソームに局在することがわかった。また、レピドソームは酸性多糖類を染色するトルイジンブルーには染まらず、アミロイド繊維を特異的に染色するコンゴレッドで鮮やかに染色された。

レピドソームの形成様式を電子顕微鏡を用いて観察し、レピドソームがシスト誘導後3時間までに顆粒状または繊維様構造を含む高電子密度小胞 (顆粒小胞) 相互の融合および低電子密度構造体との融合によって形成されることがわかった。顆粒小胞の形成過程では、近傍の小胞体から出芽した小胞が顆粒小胞に融合する様子が観察された。

タンパク質合成阻害剤であるピューロマイシン ($50 \mu\text{g/mL}$) 存在下で休眠シスト誘導を行った場合、細胞形態は球形になったが、シスト壁成分 (エンドシスト層、エクトシスト層、レピドソーム、粘液層) は全く形成されなかった。この結果から、シスト壁の形成には新たなタンパク質

合成が必要であるが，細胞の球形化には新たなタンパク質合成は必要ないことが示唆された．

序論

コルポーダ (*C. cucullus* Nag-1) は、高知県内の土壌から休眠シストとして採集した繊毛虫である。本種の栄養細胞の形態的特徴は、Foissner (1993) により記載された *C. cucullus* のそれに一致することから、*C. cucullus* と同定された。しかし、Foissner (1993) が記載した *C. cucullus* の休眠シストの表面には、レピドソームとよばれる (Foissner *et al.*, 2011) 粘着性の小球体は分泌されないとされている。一方、*C. cucullus* Nag-1 の休眠シスト表層部には多数のレピドソームが分泌される (Kida and Matsuoka, 2006; Funatani *et al.*, 2010)、その微細構造は、繊維状または結晶様単位からなる網目構造をなし、Foissner ら (2011) が記載した *C. lucida* のそれに酷似する。本研究では、*C. cucullus* Nag-1 の形態学的な再検討に加えて、18S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し、Foissner ら (2011) によってすでに決定されている近縁種の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列と比較することによって、分子系統関係を明らかにした。

コルポーダにおいて休眠シスト誘導すると、以下に記載するような劇的な細胞構造の再編がなされる (Kida and Matsuoka, 2006; Funatani *et al.*, 2010)。休眠シスト誘導後、1 時間以内に一部のミトコンドリアの断片化 (最終的に消化される) がおき、これに引き続いてレピドソームが細胞内に形成される。レピドソームは、細胞外に放出されて細胞間および細胞と基質との接着の役割を担うと考えられている。レピドソームが細胞外に放出された後の細胞膜直下には、多数の空の楕円体状の液胞が並んでいるため、これらの楕円体状の液胞はレピドソームを放出した後の空胞であると考えられた (Funatani *et al.*, 2010)。しかし、本研究から、これらの液胞がレピドソームを放出した後の空胞ではなく、レピドソームの放出に先行して細胞外に分泌される粘液物質を蓄えたムコシストであることが判明した。ムコシストから粘液物質が放出され、これに引き続いてレピドソームが放出されると細胞は丸くなり、強固なシスト壁であるエクトシスト層 (単層) が形成される (シスト誘導後 2~4 時間)。すばやくシスト形成が誘導された場合は、このステージでミトコンドリアの膜電位が消失し (Funatani *et al.*, 2010; Sogame *et al.*, 2014)、細胞内の既存の構造

の消化が活発になる (Funatani *et al.*, 2010). エクトシスト層が形成されるとすぐに, エクトシスト層と細胞膜との間隙に, 液状のエンドシスト前駆物質が巨大な液胞から放出されて固化する. その後, 1 日に 1~2 層のエンドシスト層が形成され, 成熟した休眠シストでは最終的に数層のエンドシスト層が形成される.

エクトシスト層は, 細胞表層部の膜系に由来するという仮説が提唱されている (Funatani *et al.*, 2010) が, その形成プロセスや構成成分についてはほとんど明らかになっていない. 脱シスト誘導すると, シスト内部で速やかに栄養細胞が再構築され, エンドシスト層に囲まれた栄養細胞がシスト殻から脱出してくる. その後数分でエンドシスト層が除去 (分解) される (Funadani *et al.*, 2013). したがって, 栄養細胞が脱出した後に残ったシスト殻はエクトシストとそれに付随するレピドソームと粘液層である. 本研究では, 脱シスト誘導により得られたシスト殻に含まれるタンパク質の分析を試み, レピドソームに含まれるタンパク質の 1 つを同定した. さらに, 電子顕微鏡観察により, レピドソームの形成過程を明らかにした.

材料と方法

1. 培養とシスト誘導

Colpoda cucullus Nag-1 株は, 第 1 章に記述した方法で培養した. シスト形成を誘導する場合は, 1~2 日間培養した細胞を遠心 (700 g~1,500 g, 2~3 分) して集め, 1 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) で洗浄・遠沈 (700 g~1,500 g, 2~3 分) して休眠シスト誘導液 [0.1 mM CaCl_2 , 1 mM Tris-HCl (pH 7.2)] に高密度 (50,000~70,000 cells/mL) で懸濁した (Ca^{2+} / 高密度誘導). SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) 解析に用いた休眠シストは, 100 $\mu\text{g/mL}$ アンピシリンを含む誘導液中で高密度誘導することにより得た. シスト形成を誘導しない対照実験区として, 遠沈によって集めた細胞を 1 mM Tris-HCl (pH 7.2) 緩衝液に低密度 (2,000 cells/mL) で懸濁した.

2. 繊毛基部の銀染色 (Foissner, 1993)

コルポダ懸濁液 20 μL と等量のホルマリン固定液 (3.4%) をスライドガラス上で混合し, 2 分間放置して固定した. 次に, Fernandez-Galiano 溶液 (Foissner, 1993) を 20 μL 加えて 10 秒間攪拌し, 細胞を載せたスライドガラスをホットプレート上 (60°C) に置いた. 染色液が黄褐色に変化してからさらに 2 分間加温した後, ホットプレート上から取り出してチオ硫酸ナトリウム飽和溶液を 20 μL 加えた.

3. *C. cucullus* Nag-1 の 18S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列決定と分子系統解析

C. cucullus Nag-1 の 18S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の決定では, GenBank に登録されている *C. cucullus* の 18S リボソーム RNA 遺伝子 (部分配列 ; Accession No. EU039893) の塩基配列から以下の複数のプライマーを設計し, ゲノム DNA をテンプレートにして PCR を行った. 決定した塩基配列は GenBank (Accession No. AB918716) に登録した.

プライマー 1 (sense) : 5'-AGCATATGCTTGCTCTAAAG

プライマー1 (antisense) : 5'-TTACGCGCCTGCTGCCTTCC

プライマー2 (sense) : 5'-TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG

プライマー2 (antisense) : 5'-TATGATCCACTAGCCGACCA

プライマー3 (sense) : 5'-ATGGAGTAACAATTGGAGGG

プライマー3 (antisense) : 5'-CCATACTCCCCCAGAACCC

プライマー4 (sense) : 5'-GGGTTCTGGGGGGGAGTATGG

プライマー4 (antisense) : 5'-TCGGTAGGAGCGACGGGCGG

得られた *C. cucullus* Nag-1 の 18S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の分子系統解析は、田村 3-パラメータモデル (Tamura, 1992) に基づく最尤法によって行い、解析ソフトウェアとして MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) を使用した。分子系統解析において、外群として *Cyrtolophosis mucicola* の塩基配列を用い、ギャップや欠損したデータを含む座位はアライメント時に除去した。最終的なデータセットに含まれる座位の数は合計で 1,568 である。解析の結果得られた系統樹は、対数尤度が最大 (-3258.8173) となったものを示した。

4. コンゴレッド染色

ホルボータ栄養細胞を高密度で休眠シスト誘導液に懸濁し (Ca^{2+} /高密度誘導)、これを時計皿に移した。誘導開始後 6 時間経過したサンプルに、0.2% コンゴレッド水溶液を 10 分の 1 量滴下して 10 分間染色した後、液を捨て (休眠シストはシャーレ底面に付着している)、休眠シスト誘導液 [0.1 mM CaCl_2 , 1 mM Tris-HCl (pH 7.2)] で 2 回洗浄して微分干渉顕微鏡 (Olympus BX-50) で観察した。

5. トルイジンブルー (toluidine blue ; TB) 染色

コルボータ栄養細胞を高密度で休眠シスト誘導液に懸濁し (Ca^{2+} /高密度誘導), これを時計皿に移した. 誘導後 6 時間経過した休眠シストサンプルのシスト誘導液を捨て, 0.01% トルイジンブルーを含むシスト誘導液を注いで 5 分間染色した後, 微分干渉顕微鏡 (Olympus BX-50) で観察した.

6. シスト壁の単離

コルボータ栄養細胞を高密度で休眠シスト誘導液に懸濁し (Ca^{2+} /高密度誘導), これをガラスシャーレに移した. シスト誘導後 1 日経過した休眠シストサンプルのシスト誘導液を捨て (休眠シストはシャーレ底面に付着している), 脱シスト誘導液 (0.2% 麦葉浸出液) を注いで 2~3 時間放置した. ほとんどの休眠シストから栄養細胞が脱出したのを確認後, 栄養細胞を含む脱シスト誘導液を捨て, シャーレに付着したシスト殻をシスト壁洗浄液 [0.1 mM CaCl_2 , 100 $\mu\text{g/mL}$ アンピシリン, 1 mM Tris-HCl (pH 7.2)] で 3 回洗浄した. その後, へらでシスト壁をシャーレ底面から削り取って回収して遠沈後 (1,500 g, 2~3 分), シスト壁洗浄液に懸濁した. この洗浄操作を 10 回繰り返してシスト表面に付着しているバクテリアを除去した. さらに, シスト壁サンプルは, 界面活性剤を含む洗浄液 [1% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1 mM CaCl_2 , 1 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2)] に懸濁して 4°C で 1 時間インキュベートした. このサンプルを遠沈して (1,500 g, 2 分) 1 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) に再懸濁する操作を 3 回繰り返し SDS-PAGE 用のサンプルとした.

7. 透過型電子顕微鏡による観察

シスト誘導後 2 週間経過した休眠シストおよびシスト殻を固定する場合は, 前固定液 [6% グルタルアルデヒド, 1% OsO_4 , 100 mM カコジル酸緩衝液 (pH 7.2), 4 mM スクロース] で 6 時間前固定した. 次に, 前固定した試料を 100 mM カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) で 5 回洗浄して, 後固定液 [1% OsO_4 , 100 mM カコジル酸緩衝液 (pH 7.2), 2 mM スクロース] 中で 12 時間後固定した. シスト誘導後 3 時間の細胞は, 前固定液で 6 時間固定後, 100 mM カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) で 5 回洗浄し, 後固定液で 6 時間固定した. 後固定した試料は純水で 5 回洗浄し, 30, 40, 50,

60, 70, 80, 90, 100% エタノールシリーズに各 15 分間ずつ置換していき (100% は 2 回行った), 100% エタノール中で一晩脱水した. 次に, アセトンで 3 回洗浄し, 3 シリーズのアセトン/Spurr 樹脂の混合液 (①アセトン/Spurr 樹脂 = 2:1, ②1:1, ③1:2) に順次 3 時間ずつ減圧下で懸濁し樹脂置換を行った. 最後に 100% Spurr 樹脂に試料を懸濁し減圧下で一晩静置した. Spurr 樹脂に埋包した試料は 80°C で 9 時間処理して固化させた. 超薄切片の作製には, ウルトラミクロトーム (ULTRACUT, REICHERT) を使用し, 切片は 3% 酢酸ウランおよびクエン酸鉛でそれぞれ 10 分間染色した. 切片は透過型電子顕微鏡 (日立, H-7100) で観察した.

8. 免疫蛍光顕微鏡観察

コルボダ栄養細胞あるいはシスト誘導した細胞は, 2% パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁して 1 時間固定した. 次に, 固定した細胞を 0.05% Tween-20 を含む PBS (PBST) で洗浄した後, 1% NP-40 を含む PBS に懸濁して 1 時間放置した. さらに, 細胞を 1% ポリオキシエチレン(20)エチルエーテル (Brij 58) を含む PBS に移して 1 時間放置した後, サンプルを 2,000 g で 20 秒間遠心して集めて上清を捨て, PBS を加えて細胞を洗浄した. この操作をもう一度繰り返して細胞を洗浄し, 細胞を 4 μ g/mL の抗 Elongation factor Tu (抗 EF-Tu) ヤギポリクローナル抗体 (sc-12990, Santa Cruz Biotechnology, INC., U.S.A) を含む PBS に懸濁して 4°C で一晩インキュベートした. このサンプルを遠沈 (2,000 g, 20 秒間) して上清を除去し, PBS に再懸濁する操作を 2 回繰り返して細胞を洗浄し, 7.5 μ g/mL のビオチン標識抗ヤギ抗体を加えて暗黒下で 2 時間処理した. 処理後, 遠沈 (2000 g, 20 秒間) と PBS への再懸濁を 3 回繰り返して洗浄した後, 10 μ g/mL DyLight 594 ストレプトアビジンを含む PBS に懸濁して暗黒下で 2 時間インキュベートした. このサンプルを遠沈 (2000 g, 20 秒間) して上清を除去して PBS を加え, この操作をさらに 2 回繰り返して細胞を洗浄した後, WBV フィルターを取り付けた蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX-50) で観察した.

9. ポリアクリルアミド電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE)

ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli の方法 (Laemmli, 1970) に従って行った。コルボータ栄養細胞の SDS-PAGE では、培養した細胞を遠心して (1500 g, 1 分) 集め、100 μ g/mL アンピシリン (Wako, Osaka) を含む 1 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) に再懸濁することを繰り返すことにより 3 回洗浄した。その後、遠沈して (1500 g, 1 分)、1 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し、これを等量の 2 倍濃度の SDS サンプルバッファー [60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 20%グリセロール] と混合した。休眠シストの SDS-PAGE 用サンプルを作製する場合は、まず新鮮な休眠シスト誘導液 [0.1 mM CaCl_2 , 1 mM Tris-HCl (pH 7.2)] にシストを懸濁し、これに 2 倍濃度の SDS サンプルバッファーを等量混合した。単離したシスト壁サンプルは、洗浄後、1 mM Tris-HCl (pH 7.2) に懸濁した後、2 倍濃度の SDS サンプルバッファーと等量混合した。SDS-PAGE では、各レーンあたり 12,000 細胞から得られた試料を 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて 150V で泳動した。ゲルは 0.2% Coomassie brilliant blue R250 (CBB), 45% (v/v) メタノール, 10%酢酸を含む染色液で染色し、27% (v/v) メタノールと 9%酢酸を含む脱色液中で脱色した。

10. SDS-PAGE ゲルの PAS (periodic acid-Schiff) 染色

SDS-PAGE により得られたゲルを 12.5% (v/v) トリクロロ酢酸 (Wako) に 30 分間浸し、純水で洗浄した後、過ヨウ素酸液 [3% (v/v) 酢酸, 1.08% (w/v) 過ヨウ素酸二水和物 (Wako)] に 50 分間浸した。その後、ゲルを純水で 1 時間洗浄 (10 分間の洗浄を 6 回) し、暗黒下で Schiff 試薬 (Wako) に 50 分間浸した。続いてゲルを 0.5% (w/v) ピロ亜硫酸ナトリウム溶液 (Wako) に 30 分間浸した後、純水で一晩洗浄した。

11. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE により分離したタンパク質は、セミドライブロッティングシステム (Hoefer TE70, Amersham, Tokyo) を用いて、Immobilon-P transfer membrane (Millipore, Bedford, MA) に転写した。セミドライブロッティングシステムでは、3 種類のブロッティング液 [A 液: 300 mM Tris; B 液: 25 mM Tris; C 液: 25 mM Tris-borate 緩衝液 (pH 9.5)] を用いて 100 mA で 60 分間ブロッティングを

行った. タンパク質を転写したメンブレンは, 0.1% Coomassie brilliant blue R250 (CBB), 40% (v/v) メタノール, 1%酢酸を含む染色液中で染色後 50% (v/v) メタノール中で脱色した.

12. 液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) による解析

LC-MS/MS による解析では, Immobilon-P transfer membrane 上に転写されたタンパク質のバンドを切り取り, 40 mM dithiothreitol (DDT) 処理 (37°Cで1時間) により還元した後, 100 mM ヨード酢酸で処理 (室温で20分間) してシステイン残基をカルボキシメチル化した. プロテアーゼの非特異的な結合を阻止するため, 0.5% ポリビニルピロリドン (PVP40) を含む 100 mM 酢酸で処理 (37°Cで30分間) した. つぎに, 10%アセトニトリルおよび 1 pmol トリプシン (Sigma-Aldrich) を含む 10 mL の 30 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) に移して, 37°Cで18時間タンパク質の消化を行った. 得られたペプチド断片を 0%-40%のアセトニトリル勾配で溶出し, Waters UPLC Qtof で解析した. 得られたデータ (ペプチド断片のアミノ酸配列) は ProteinLynx Global Server 2.4 software (Waters) でプロセッシングし, PEAKS online 5.3 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada) を用い, NCBI Entrez protein records に登録されている原生物群の配列を対象に検索してタンパク質を同定した.

結果と考察

図 2.1A-a, b および表 2.1 に示すように、本研究で用いた *C. cucullus* Nag-1 株の栄養細胞の光学顕微鏡レベルでの形態学的特徴は、Foissner (1993) によって記載された *C. cucullus* のそれに一致した。*C. cucullus* Nag-1 株の休眠シスト (図 2.1A-b, c, d) の表層部には小球状のレピドソームが分泌され付着している。しかし、Foissner (1993) が記載した *C. cucullus* 休眠シストの表層には、レピドソームは存在しないとされている。*C. cucullus* Nag-1 株の休眠シスト表層部にみられるレピドソームは、*C. cucullus* に近縁な *C. lucida* のそれと全く同一の微細構造であることが最近わかってきた (Foissner *et al.*, 2011)。この事実から、*C. cucullus* Nag-1 株は Foissner が記載した *C. cucullus* と *C. lucida* の両方の形態的特徴を有するといえる。そこで、GenBank に登録されている *C. cucullus* の 18S リボソーム RNA 遺伝子の部分塩基配列から複数のプライマーを設計し、*C. cucullus* Nag-1 の 18S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の決定を行った (Accession No. AB918716)。 *C. cucullus* Nag-1 の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列は、Foissner ら (2011) が同定した *C. cucullus* の配列 (EU039893.1) と比較すると 99% (11614 塩基/1625 塩基) の一致率を示し、*C. lucida* (EU039895.1) の配列に対しても 99% (1588 塩基/1599 塩基) 一致した。最尤法により作成した分子系統樹に基づく、*C. cucullus* Nag-1 は *C. cucullus* よりも *C. lucida* に近縁であることを示唆している (図 2.1B)。

コルポーダ (*C. cucullus* Nag-1) の休眠シスト形成を誘導したときに、細胞外に分泌されるのはレピドソーム (図 2.1A, 'le') のみであると考えられてきたが (Funatani *et al.*, 2010)，本研究において、レピドソームの放出に先立ってムコシスト (図 1A-c, 'mc') から粘液物質が分泌されて粘液層 (図 2.1A-c, 'mu') が形成されることがわかった。したがって、脱シスト誘導によりエンドシスト層 (図 2.2A-a, 'en') に囲まれた栄養細胞 (図 2.2A-a, 've') が脱出したあとのシスト殻は、エクトシスト層 (図 2.2A-a, b, 'ec') にレピドソーム (図 2.2A-b, 'le') と粘液層が付着したものである。すでに報告されているように (Funadani *et al.*, 2013)，栄養細胞はエンドシスト層に囲まれた状態で脱出するので、シスト殻にはエンドシスト層は含まれていないと考えられる。シスト殻

の電子顕微鏡写真からも、エクトシスト層の内側にエンドシスト層が存在しないことが確認された (図 2.2A-b) .

シスト殻 (レピドソームと粘液層が結合したエクトシスト層) を集めて SDS-PAGE し, CBB 染色に先立って PAS 染色して糖タンパク質の検出を試みた (図 2.2B-a) . この結果, シスト誘導後 1 日経過した休眠シストサンプル (図 2.2B-a, 'Cy') では, 高分子量領域に糖を含むバンド (矢尻) がみられた. このバンドは, エンドシスト層の形成とともに太くなり (データは示さない) , 栄養細胞が脱出した後のシスト殻 (図 2.2B-a, 'Cw without En') サンプルでは消失することから, エンドシストに含まれる糖であると考えられる. この結果は, シスト殻サンプルには糖タンパク質が含まれていないことを示唆している. PAS 染色後にゲルを CBB 染色すると, シスト殻サンプルには, 27 kDa, 31 kDa, 45 kDa などの複数のタンパク質 (p27, p31, p45) が含まれることがわかった (図 2.2B-b, 'Cw without En') . ウェスタンブロッティングしたこれらのタンパク質 (p27, p31, p45) (図 2.2B-c) のマスペクトル解析を行った結果, p45 がペプチド伸長因子 Tu (Elongation factor Tu; EF-Tu) であることが明らかになった (表 2.2) .

p45 (*Colpoda* EF-Tu) がシスト殻サンプル (エクトシスト層, レピドソーム, 粘液層) のどの部分に存在するかを明らかにするために, 抗 EF-Tu ポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った結果, レピドソーム (図 2.3, 'le') が強く免疫染色された. この結果から, p45 (*Colpoda* EF-Tu) はレピドソームに局在することが明らかになった.

レピドソームは, 酸性粘液多糖類などと複合体を形成するトルイジンブルー (Shepard and Mitchell, 1976; Terry *et al.*, 2000) には染まらなかったが (図 2.4-a) , 繊維状タンパク質であるアミロイドを検出するコンゴレッド (Elghetany and Saleem, 1988) には強く染まった (図 2.4-b) . コンゴレッドは, アミロイドプロトフィブリルの重積 β シートによって形成される溝に結合することが知られている (Wu *et al.*, 2012) . 後述するように, レピドソーム前駆構造体や完成したレピドソームは, 高電子密度顆粒または繊維構造からなる (図 2.7) . この結果から, レピドソームに含まれるタンパク質は, アミロイドフィブリルと類似する構造をもつことが示唆される. ま

た、シスト壁サンプルには、PAS 染色されるバンドが認められないという結果（図 2.2B-a, ‘CW without En’）から判断すると、レピドソームは多糖類を含有していない可能性が高い。

シスト壁成分（エンドシスト層，エクトシスト層，レピドソーム，粘液層）の形成において，新たなタンパク質合成が必要かどうかを知るために，タンパク質合成阻害剤であるピューロマイシン（50 μ g/mL）存在下で休眠シスト誘導を行った．ピューロマイシンを含まない溶液中でシスト誘導した場合，シスト壁の形成に先立って細胞は球形化する（図 2.5A-a）．ピューロマイシン存在下でも球形化はおきたが（図 2.5A-b），この場合は細胞は運動性があり，シャーレ底面にも付着しないため，粘液物質は分泌されていないと推察される．また，細胞表層部にはレピドソームが放出されなかった（図 2.5A-b）．これらの結果から，シスト壁成分（エンドシスト層，エクトシスト層，レピドソーム，粘液層）の形成には新たなタンパク質合成が必須であることがわかった．ピューロマイシン（50 μ g/mL）の休眠シスト壁形成への影響を定量的に調べた結果を図 2.5B に示す．ピューロマイシン非処理細胞を休眠シスト誘導した場合，球形化した細胞のほとんどは，エンドシスト層，エクトシスト層，レピドソーム，粘液層を有するが（図 2.5B, 白ぬきカラム），ピューロマイシン処理した場合，球形化した細胞のほとんどがシスト壁を形成しなかった（図 2.5B, 灰色カラム）．しかし，ピューロマイシン処理による球形化は休眠シスト誘導によるものではなく，アーテファクトであるかも知れない．そこで，休眠シスト誘導せずに栄養細胞をピューロマイシン存在下で静置した．この結果，ピューロマイシン処理した細胞も非処理細胞も，細胞の形態は正常であった（図 2.5C）．このことから，ピューロマイシン存在下で休眠シスト誘導した細胞が球形化する現象は，休眠シスト形成の正常な現象であり，細胞表層部の細胞骨格系の動態変化を伴う可能性がある．そして，このプロセスは，新たなタンパク質合成を必要としないと考えられる．

図 2.6 および図 2.7 は，休眠シスト誘導後 3 時間経過したコルポダ細胞を用いてレピドソームの形成過程を電子顕微鏡観察した結果を示す．レピドソームの細胞外への放出に先立って，多数のムコシスト（図 2.6A, ‘mc’）が細胞膜直下に並び，ムコシスト内部の粘液物質（mu）が細胞

外に放出され、粘液層を形成する様子が観察された。このステージで細胞膜直下に並ぶムコシストは、レピドソームが放出された後の空胞であると考えられていたが (Funatani *et al.*, 2010) , 本研究によりこれが誤りであることが明らかになった。このステージでは、細胞内では、レピドソームが形成されている (図 2.6B, 'le') 。レピドソームの前駆構造体は高電子密度の顆粒または繊維様構造を蓄えた小胞 (顆粒小胞) (図 2.6B, 2.7a, b, 'pv') であると考えられ、これら相互の融合や低電子密度の別の構造体 (図 2.6B, 2.7b, 'lu') との融合 (図 2.6B, 四角で囲んだ部分の矢尻, 図 2.7b) によって大きさが増していくと考えられる。図 2.7c-e に示す電子顕微鏡写真は、レピドソーム内部の網目構造が完成する様子を示している。最初は、レピドソーム内部は密で不規則な繊維様構造であるが (図 2.7c) , 完成したレピドソームでは、規則正しい網目構造が形成されている (図 2.7e) 。

バクテリアでは、EF-Tu は様々な細胞内区画に局在し (Krab and Parmeggiani, 1998) , タンパク質合成、シャペロン機能 (Caldas *et al.*, 1998) , 感染過程における動物組織への接着 (Granato *et al.*, 2004; Balasubramanian *et al.*, 2008) , 繊維状構造体の形成 (Mayer, 2003) などの多機能性を有することが知られている。とりわけ、バクテリア EF-Tu が繊維構造形成に関与するという事実 (Mayer, 2003) は、*C. cucullus* Nag-1 の EF-Tu が、細胞間および細胞と基質との接着に関与するレピドソーム (Kida and Matsuoka, 2006) の繊維状および網目状構造の形成に関与するという考えと矛盾しない。

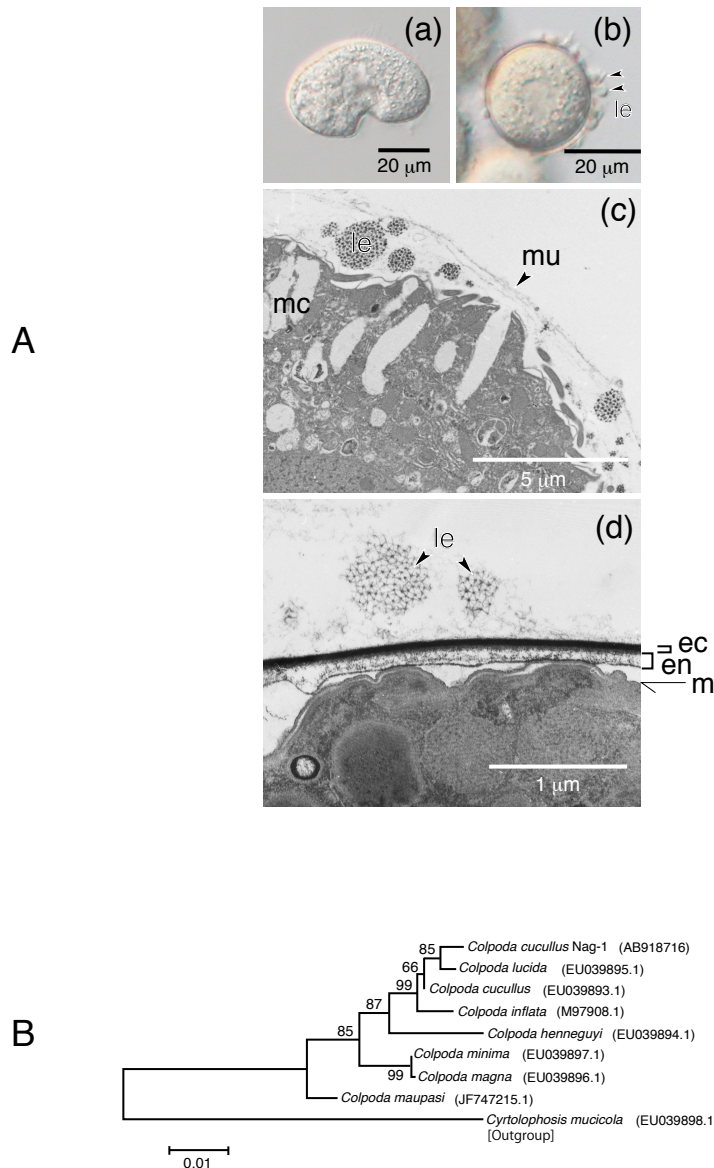


図 2.1 A - コルポーダ (*C. cucullus* Nag-1 株) の栄養細胞と休眠シスト. **(a)** 栄養細胞の光学顕微鏡写真. **(b)** 休眠シスト誘導 1 日後の光学顕微鏡写真. **(c)** 休眠シスト誘導 3 時間後の透過型電子顕微鏡写真. **(d)** シスト誘導 2 週間後の休眠シストの透過型電子顕微鏡写真. le, レピドソーム; mu, 粘液層; mc, ムコシスト; ec, エクトシスト層; en, エンドシスト層; m, 細胞膜. **B** - 田村 3-パラメータモデル (Tamura, 1992) に基づく最尤法による 18S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析によって得られたコルポーダ近縁種の分子系統樹. 系統樹内の枝に記した数値は 1000 回のブートストラップ検定において分類群の系統関係が再現される確率 (ブートストラップ確率) を示す. 種名の横にある括弧内の英数字は GenBank に登録されている 18S rRNA 遺伝子の塩基配列のアクセッションナンバーを示す. [Funadani *et al.* (2016) *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnw203 を改変]

表 2.1 *Colpoda cucullus* Nag-1 栄養細胞の形態的特性.

Characters	Means	SD	Maximum	Minimum
Body length (μm) (n = 30)	51.7	5.4	69.0	44
Body width (μm) (n = 30)	36.8	4.7	46.4	28.6
*Vestibulum position (μm) (n = 30)	24.6	2.9	30.7	16.7
Length (μm) of macronucleus (n = 30)	12.4	3.3	19.2	8.4
Width (μm) of macronucleus (n = 30)	10.3	3	16.7	8.3
Number of somatic kineties (n = 14)	27.6	3.5	33	21

*Vestibulum position: distance from anterior end to proximal edge of vestibulum. SD: standard deviation.

[Funadani *et al.* (2016) *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnw203 より引用]

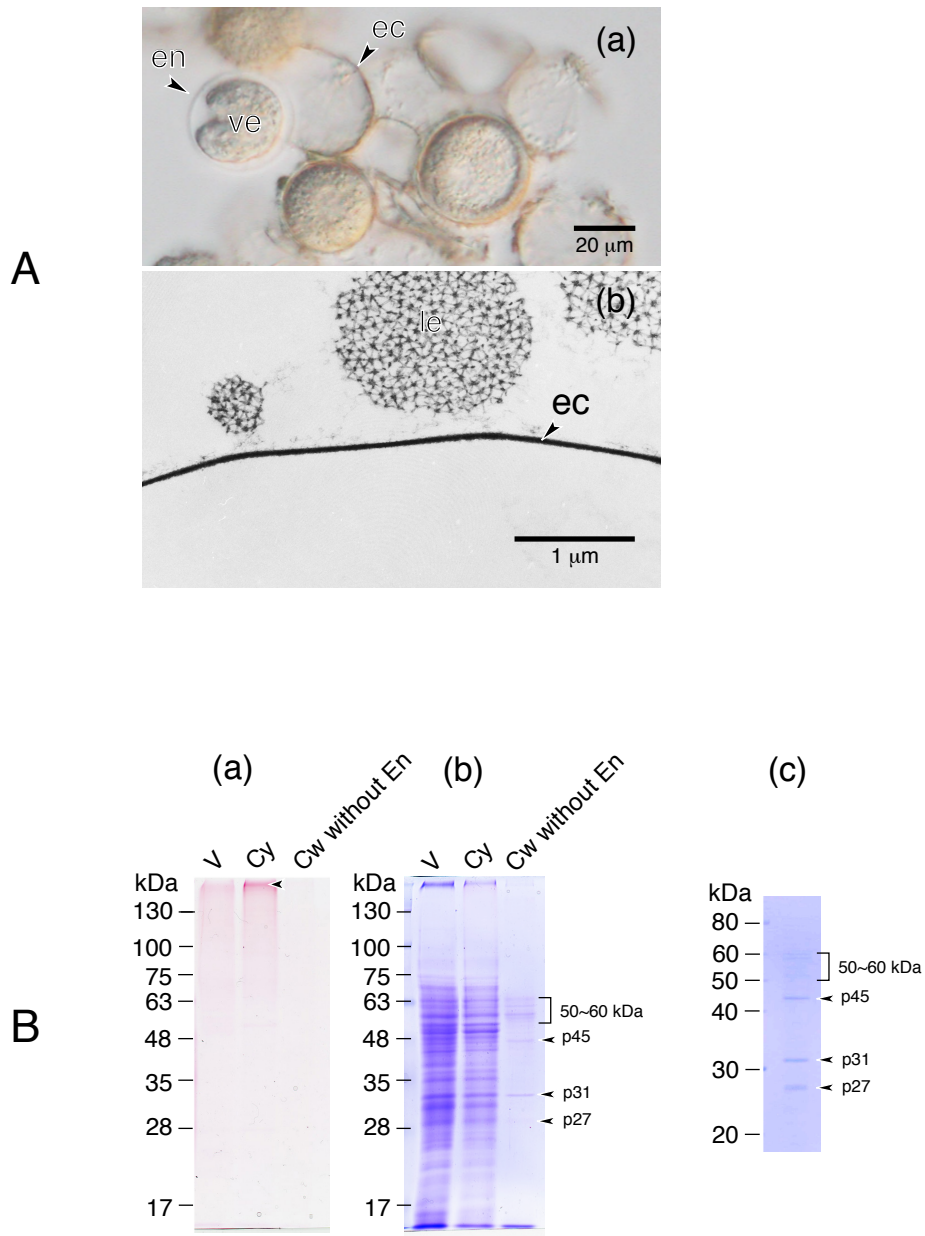


図 2.2 A - 休眠シストからの *C. cucullus* Nag-1 栄養細胞の脱出とシスト殻の構造. **(a)** エンドシスト層 ('en') に囲まれた栄養細胞 ('ve') がエクトシスト層 ('ec') を破って脱出した直後の細胞 (光学顕微鏡写真). **(b)** 栄養細胞が脱出した後のシスト殻 (シスト齢 2 週間) の電子顕微鏡写真. ec, エクトシスト層; le, レピドソーム. **B** - シスト壁タンパク質の SDS-PAGE. **(a)** サンプルを SDS-PAGE した後, PAS 染色したゲル. **(b)** PAS 染色したゲル (a) を CBB 染色したもの. (a) と (b) は同一サンプルである. **(c)** 単離したシスト壁サンプルを SDS-PAGE した後, メンブレンに転写して CBB 染色したもの. V, 栄養細胞; Cy, 休眠シスト (シスト齢 1 日); Cw without En, エンドシスト層を含まないシスト壁 (エクトシスト層, レピドソーム, 粘液層からなる) (シスト齢 1 日). [Funadani *et al.* (2016) *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnw203 より引用]

表 2.2 *C. cucullus* Nag-1 のシスト壁に含まれるタンパク質の LC-MS/MS による同定

Protein name	Band obtained	*Sequences of	Accession No.	Sequence
	by SDS-PAGE	exactly matched	(organisms)	coverage (%)
		peptides		
Elongation factor Tu	p45	EYADID <u>G</u> APEERAR,	gi 297385107	7
		GITINTAHVEYETANR	(<i>Kryptoperidinium foliaceum</i>)	(30AA/409AA)
		QVGVPYIIVFLNK	gi 283444974	5
			(<i>Mesodinium rubrum</i>)	(13AA/280AA)
		QVGVPYIIVFLNK	gi 283444972	5
			(<i>Dinophysis acuminata</i>)	(13AA/280AA)

*The methyl-esterified residue is underlined. [Funadani *et al.* (2016) *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnw203 より引]

用]

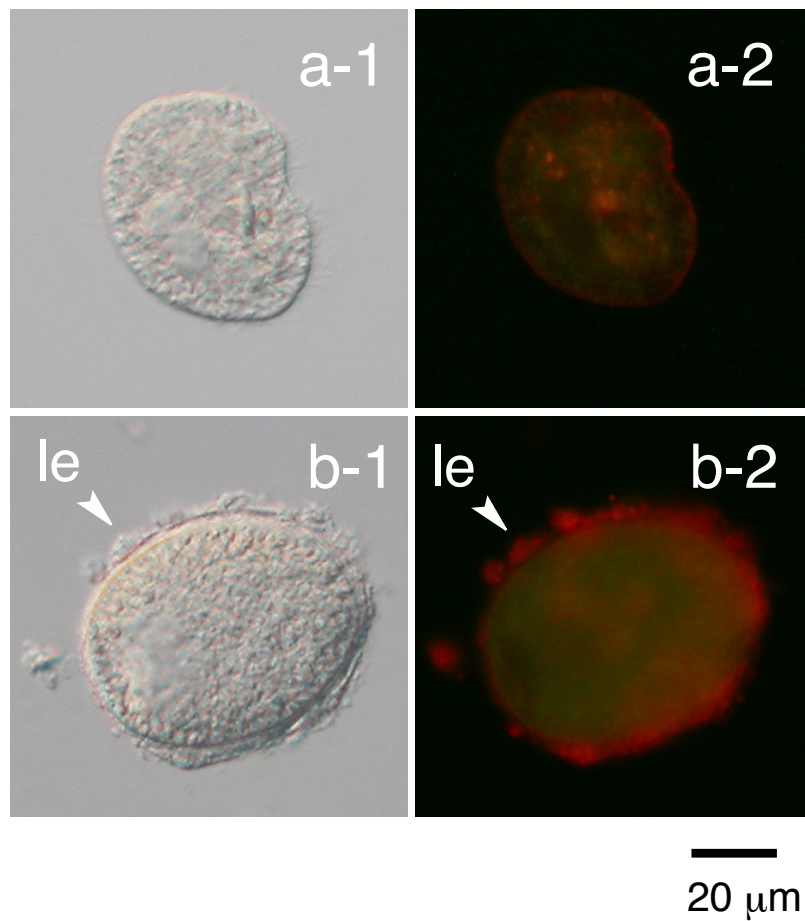


図 2.3 ペプチド伸長因子 Tu (EF-Tu) ポリクローナル抗体を用いた *C. cucullus* Nag-1 の免疫蛍光顕微鏡写真. 各顕微鏡写真のペア (a1/a-2, b-1/b-2) は, 同一細胞の微分干渉顕微鏡写真 (左側) と免疫蛍光顕微鏡写真 (右側) を示している. **(a-1/a-2)** 栄養細胞; **(b-1/b-2)** シスト誘導後 2 時間経過した細胞. [Funadani *et al.* (2016) *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnw203 より引用]

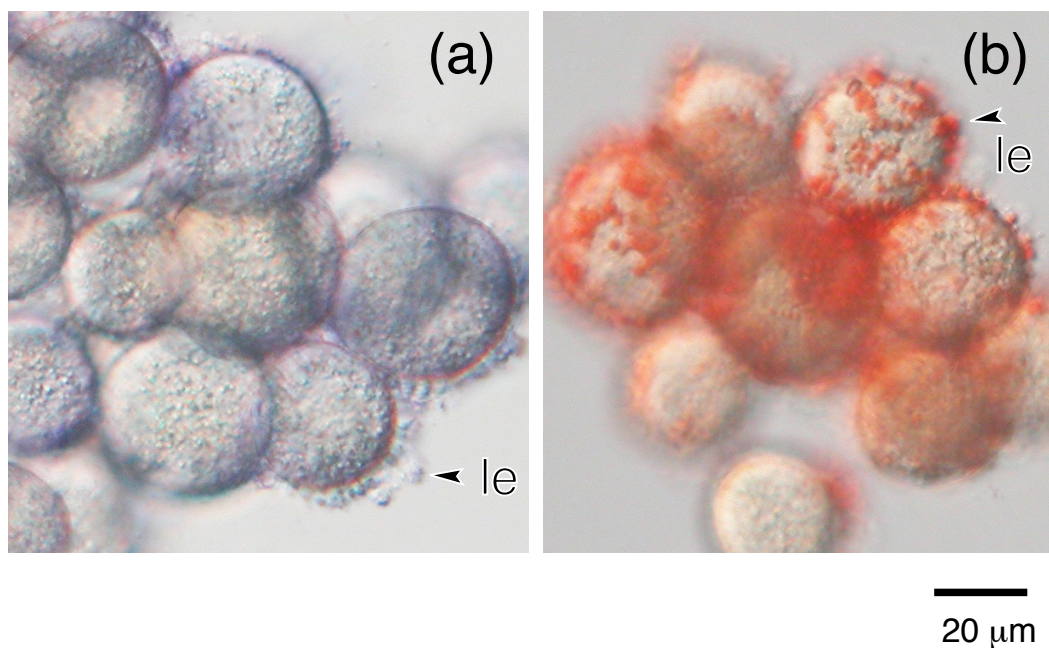


図 2.4 トルイジンブルーまたはコンゴレッドで生体染色した *C. cucullus* Nag-1 の休眠シストの光学顕微鏡写真. **(a)** シスト誘導後 6 時間経過した細胞をトルイジンブルーで染色したもの. **(b)** シスト誘導後 6 時間経過した細胞をコンゴレッド染色したもの. le, レピドソーム. [Funadani *et al.* (2016) *FEMS Microbiol. Lett.* 363: fnw203 より引用]

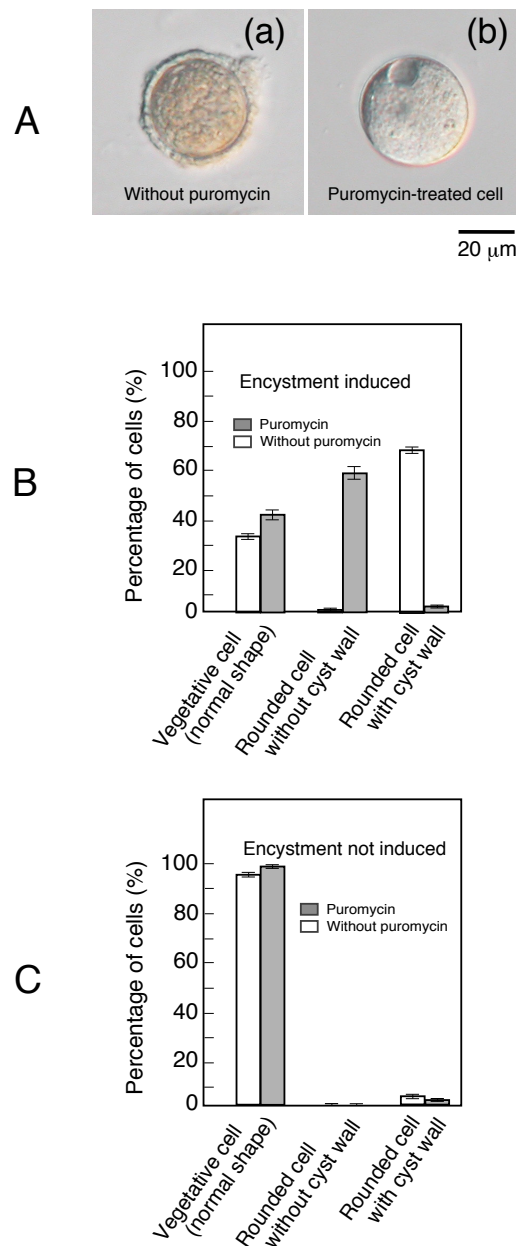


図 2.5 ピューロマイシン ($50 \mu\text{g/mL}$) による *C. cucullus* Nag-1 のシスト壁形成の阻害. **A** - ピューロマイシン非存在下 (a) およびピューロマイシン存在下 (b) で休眠シスト誘導した細胞 (休眠シスト誘導後 8 時間経過した細胞) の光学顕微鏡写真. **B** - ピューロマイシン存在下 (シスト誘導液に溶解) (灰色カラム) または非存在下 (白カラム) で, 休眠シスト誘導 (高密度誘導) して 8 時間後の細胞のシスト壁形成率 (%). **C** - ピューロマイシン存在下 (0.05%麦葉浸出液に溶解) (灰色カラム) または非存在下 (0.05%麦葉浸出液) (白カラム) で休眠シスト形成を抑制した状態 (細胞密度は $2,000 \text{ cells/mL}$) で 8 時間経過した栄養細胞の形状 (%). 各形状の細胞の割合 (%) は, 観察した全細胞数 (100-120 細胞) に対する百分率で表した. 図中のカラムとバーは 6 回の測定の平均値と標準誤差を示している. [Funadani *et al.* (2016) *FEMS Microbiol. Lett.* 363: fnw203 を改変]

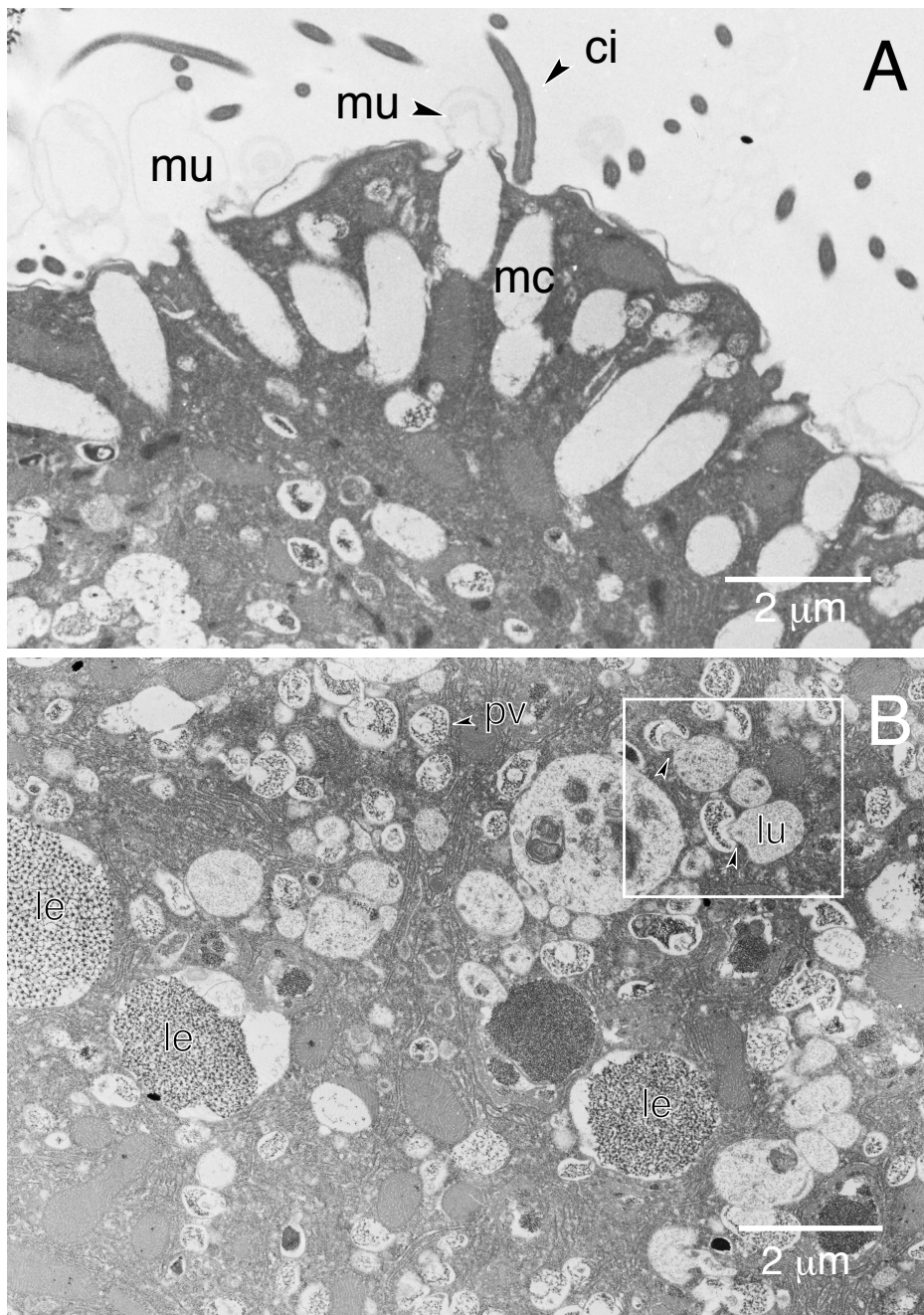


図 2.6 休眠シスト形成初期過程（シスト誘導後 3 時間）における *C. cucullus* Nag-1 の透過型電子顕微鏡写真. **A** - 細胞表層に並んだ楕円体状のムコシスト (mc) から粘液物質 (mu) が放出される様子を示す電子顕微鏡像. ci, 繊毛. **B** - レピドソーム形成過程を示す透過型電子顕微鏡像. pv, 微小顆粒または繊維様構造を含むレピドソーム前駆小胞 (顆粒小胞); lu, 低電子密度の構造体; le, レピドソーム. 顆粒小胞 (pv) と低電子密度構造体 (lu) が融合している様子を四角で囲った部分に矢尻で示す. [Funadani *et al.* (2016) *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnw203 を改変]

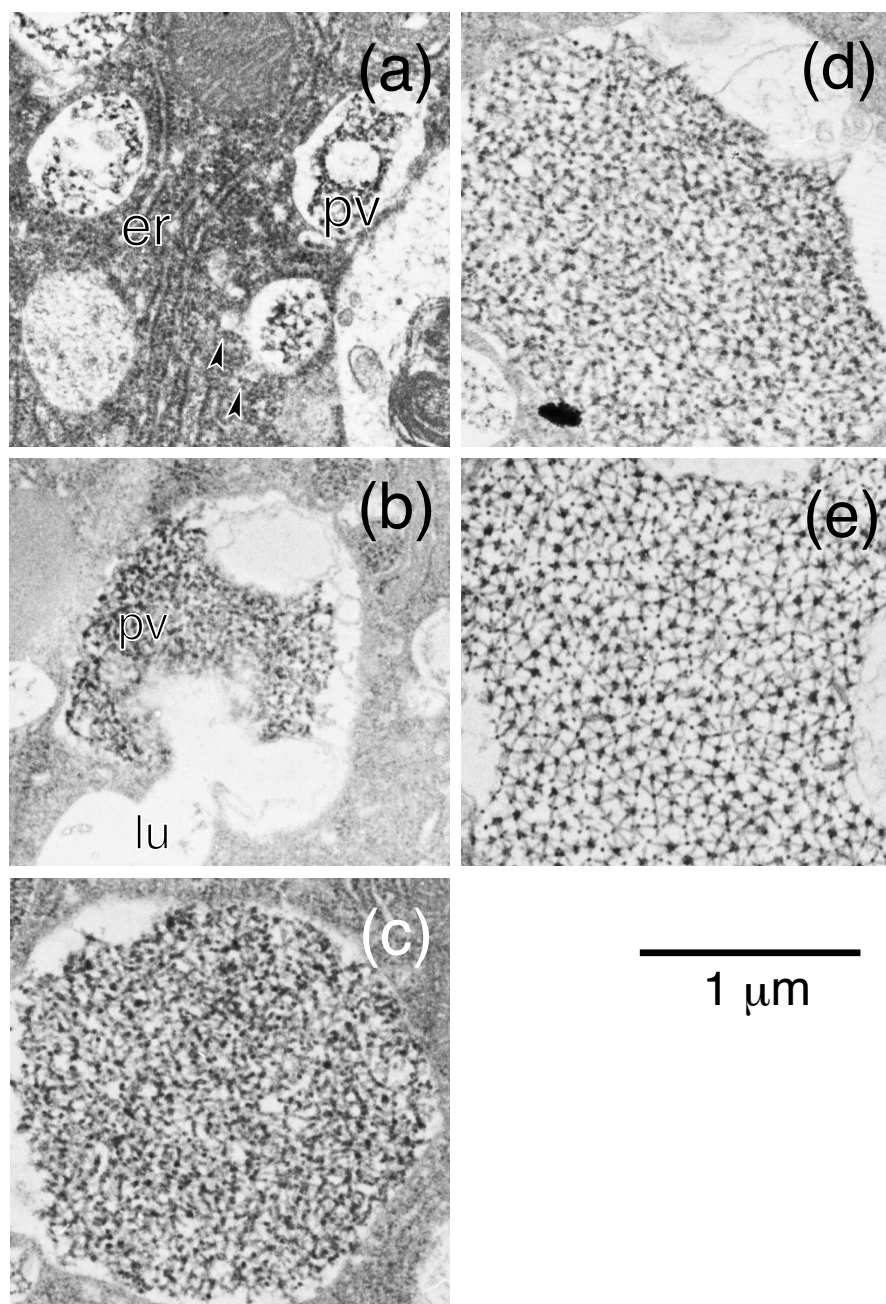


図 2.7 休眠シスト形成初期過程（シスト誘導後3時間）におけるレピドソームの形成過程を示す透過型電子顕微鏡写真（拡大像）。pv, 微小顆粒または繊維様構造を含むレピドソーム前駆小胞（顆粒小胞）；lu, 低電子密度の構造体；er, 小胞体。矢尻は小胞体（er）から出芽したと思われる小胞が顆粒小胞（pv）に融合している様子を示している。[Funadani *et al.* (2016) *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnw203 を改変]

第3章

繊毛虫コルポーダ (*Colpoda cucullus* Nag-1) の脱シスト：脱シスト液胞の
能動拡張によるシスト壁の破壊と栄養細胞の脱出

要約

脱シスト過程は休眠型細胞から増殖型細胞（栄養細胞）への形態形成のプロセスであり，その最終段階は，シストから増殖型細胞の脱出である．これには2通りの様式が存在する．すなわち，シスト壁に存在する脱出孔を通して細胞が脱出する方法と，収縮胞に由来すると考えられる巨大な液胞（脱シスト液胞）の拡張によって生じる膨圧によってシスト壁を破壊する方法である．*C. cucullus* Nag-1 の場合は，巨大な液胞（脱シスト液胞）の拡張によって生じる膨圧によって固いシスト壁（エクトシスト層）を破壊して増殖型細胞がシストから脱出する．本研究では，栄養細胞がシストから脱出するまでの脱シストプロセスを詳細に観察・記載し，脱シスト液胞の拡張のしくみを明らかにすることを目的とした．

脱シスト誘導後 30～40 分で収縮胞の拍動が始まる．その後，細胞がシスト壁内部で回転運動を開始すると収縮胞の拍動が停止し，収縮胞に由来すると考えられる液胞が出現した．液胞は徐々に膨張してエクトシスト層の破裂をもたらした．これにより，薄膜（エンドシスト）に被われた運動性の細胞がエクトシストから脱出し，液胞は急速に収縮して消失した．そして，再び収縮胞が出現して拍動を開始した．この後，細胞を被うエンドシストが薄くなり，栄養細胞がエンドシストを破って脱出して遊泳を開始した．

脱シスト誘導後に活動を開始した収縮胞の拍動頻度と外液ショ糖濃度の関係から，細胞の浸透圧は約 140 mM ショ糖と等張（浸透濃度：140 mOsm/L）であることがわかった．ところが，脱シスト液胞の膨張と栄養細胞の脱出は 140 mM 以上のショ糖濃度下でもおきた．栄養細胞の場合，ATP 合成阻害剤存在下では，拍動が停止した収縮胞の体積と細胞の体積がともに増加し，最終的に細胞は破裂したが，休眠シストの場合は，このような受動拡散のみではシスト壁を破裂させるだけの膨圧を発生させることはできなかった．以上の結果から，脱シスト液胞の膨張には，水の受動拡散だけでなく能動拡散が関与していることが示唆された．

序論

脱シストは、シスト壁に囲まれた休眠型細胞が運動性をもつ栄養細胞に再構築されるプロセスであり、その最終段階では、休眠シストから運動性の細胞（栄養細胞）が脱出する。休眠シストから栄養細胞の脱出様式は2通り知られている。すなわち、シスト壁に存在する脱出孔を通して細胞が脱出する様式（Beers, 1948; Repak, 1968; Kim and Taniguchi, 1995; Montagnes *et al.*, 2002）と脱シスト液胞（Müller, 2007）とよばれる液胞の拡張によって生じる膨圧によって強固なシスト壁を破壊する様式である（Beers, 1935, 1945, 1966; Hashimoto, 1963; Holt, 1972; Walker *et al.*, 1980; Gutiérrez *et al.*, 1981; Kamra and Sapra, 1991; Nakamura and Matsusaka, 1991; Adl and Berger, 1997; Müller, 2007）。コルポータ類は後者の様式により休眠シストから脱出する（Müller, 2007）。休眠シストから脱出直後の運動性をもつ栄養細胞は薄膜（エンドシスト層）によって被われているが、しばらくするとエンドシスト層が分解されて栄養細胞が泳ぎ出る（Corliss and Esser, 1974）。

脱シスト液胞は水の排出を停止した収縮胞に由来すると考えられており（Beers, 1966）、細胞内への水の受動拡散が脱シスト液胞の拡張に関与していることが予想される。しかし、細胞内への受動的な水の拡散のみによってシスト壁を破壊するのに十分な膨圧が発生するかどうかは明らかになっていない。受動的な水の拡散のみによって液胞が膨張するのであれば、細胞質と等張、あるいは細胞質より高張な溶液中では、脱シスト液胞の形成は起きないことが期待される。本研究では、等張液や高張液中、あるいはATP合成阻害剤存在下で脱シスト誘導して脱シスト液胞を観察し、その拡張には、水の受動拡散だけではなく能動拡散も関与することを明らかにした。

材料と方法

1. コルポータ (*C. cucullus* Nag-1) の培養と休眠シスト誘導および脱シスト誘導

C. cucullus Nag-1 の培養およびシスト誘導の手順は 1 章および 2 章に記した方法に従って行った。ただし、休眠シスト誘導では、誘導液に 20,000~30,000 cells/mL の細胞密度で懸濁した。脱シスト誘導をする場合、休眠シスト誘導してから 3 日以上経過したサンプルの上清を捨て（シストはシャーレ等の底面に付着している）、0.1 mM 銅クロロフィリンナトリウム (chlorophyllin-Cu) (図 3.2) または、0.2% の麦葉浸出液 (図 3.3) 溶液にシストを浸すことにより誘導した。脱シスト誘導後の休眠シストは容器底面からはがしとり、CCD ビデオカメラ (Victor JVC, KY-F550) を取り付けた微分干渉顕微鏡 (Olympus BX-51) またはカメラ (Nikon, Coolpix) を取り付けた微分干渉顕微鏡 (Olympus BX-50) を用いて観察した。体積の計算では、脱シスト液胞は楕円体の一部 (図 3.1A, 灰色部分)、収縮胞および休眠型細胞は球 (図 3.1B)、栄養細胞は楕円体 (図 3.1C) とみなした。それぞれの体積は図 3.1 に示す計算式により求めた (<http://keisan.casio.jp/>, 2012 年 2 月 28 日閲覧)。

結果と考察

図 3.2 は、0.1 mM クロロフィリン-Cu 液に休眠シストを浸すことによって脱シスト誘導した細胞が、シストから脱出するまでの経過を観察したものである。脱シスト過程で観察された主要な細胞内変化は以下の通りである。脱シスト誘導開始後、最も早い場合で 30 分後に細胞質に収縮胞が出現し、拍動を開始した (図 3.2A, cv)。その後しばらくすると収縮胞の拍動は停止し、これに代わって細胞質に脱シスト液胞が出現した (図 3.2B, ev)。液胞は徐々に拡張し、その膨張によって固いエクトシスト層 (図 3.2C-E, ec) が破壊されて、エンドシスト層 (en) に被われた栄養細胞がエクトシスト層から脱出した (図 3.2E-F)。その後、脱シスト液胞は急速に収縮して消失し (図 3.2 F-G)、再び細胞質に収縮胞 (図 3.2H, cv) が出現し拍動を開始した。エンドシスト層は細胞の運動により引き延ばされるようにして薄くなり (図 3.2H, en)、栄養細胞がエンドシストを破って泳ぎ出した (図 3.2I-J)。エクトシストから脱出した細胞は、エンドシスト層内でさかんに回転運動や前後への繰り返し運動を行い、エンドシストは徐々に引き延ばされ薄くなった。最終的に裂けるようにもみえるが、エンドシスト層は酵素によって分解されとする説もある (Corliss and Esser, 1974)。

脱シスト液胞の拡張が、細胞内への水の受動拡散によってもたらされるかどうかを知るために、高張液中で脱シスト液胞が拡張するかどうかを調べた。これに先立って、細胞内の浸透圧を推定するために、外液のショ糖濃度 (0.2% 麦葉浸出液成分も含む) と収縮胞の拍動頻度 (回数/分) の関係を求めた (図 3.3)。この実験では、各種濃度のショ糖を含む 0.2% 麦葉浸出液中で脱シスト誘導し、収縮胞の拍動が開始した直後 (脱シスト誘導後 30 分) に測定した。図 3.3 に示すように、ショ糖濃度の上昇に伴って拍動回数は低下し、140 mM ショ糖液中で拍動が停止した。この結果は、脱シスト誘導約 30 分後におけるシスト内部の浸透圧は 140 mM ショ糖溶液のそれに等しいことを示している (細胞の浸透濃度は 140 mOsm/L)。テスト液中には 0.2% 麦葉浸出液 [4.2 mOsm/L (凝固点降下法により決定)] も含まれるので、実際の浸透濃度は 140 mOsm/L より

少し高い値となると思われる。

脱シスト液胞の拡張が、細胞内への水の受動拡散に起因するのであれば、その拡張は等張液や高張液中では起きないはずである。そこで、各種濃度のショ糖を含む0.2%麦葉浸出液中で脱シスト誘導し、液胞の体積を経時的に計測した(図 3.4A)。この結果をもとに、液胞の拡張速度($\mu\text{m}^3/\text{min}$)を算出し、ショ糖濃度に対してプロットした(図 3.4B)。これらの結果から、細胞内の浸透圧を超える濃度のショ糖液中でも、脱シスト液胞の拡張(図 3.4A, B)とシストからの脱出(図 3.4C)が起きることが明らかになった。このことは、脱シスト液胞の拡張には細胞内への水の受動拡散だけでなく、能動拡散も関与していることを示唆している。

細胞内への水の能動拡散によって脱シスト液胞の膨張がもたらされるのであれば、エネルギー阻害剤存在下では液胞の拡張が抑制されることが予想される。そこで、チトクロームcオキシダーゼ阻害剤として知られているアジ化ナトリウム(Bennett *et al.*, 1996)の収縮胞および脱シスト液胞の拡張に対する影響を調べた(図 3.5, 3.6)。1 mMのアジ化ナトリウム存在下では、栄養細胞の収縮胞の拍動は停止し徐々に拡張していった(図 3.5)。この場合、小さい液胞が融合することにより水が収縮胞に集められている様子が観察された(図 3.5B, 矢尻)。細胞の体積は、収縮胞の拍動が停止してから30分までに1.5倍に達し破裂した(図 3.5A, B)。この結果は、1 mMのアジ化ナトリウム存在下では、拍動運動は停止するが集水機能は働いており(ATPを必要としない可能性が高い)、水の受動拡散により発生する膨圧により栄養細胞は容易に破裂することを示している。

図 3.6 は、各種濃度のアジ化ナトリウムを含む脱シスト誘導液中(0.2%麦葉浸出液)での脱シスト液胞の拡張を調べた結果である。アジ化ナトリウムの濃度依存的に液胞の膨張速度は低下し、1 mM アジ化ナトリウム存在下では計測開始9分後までは脱シスト液胞の拡張は見られなかった(図 3.6A)。しかし、10分後以降も観察を続けると、計測開始から15時間後までに非常にゆっくりとではあるが脱シスト液胞がある程度まで拡張した。これは水の受動拡散に起因すると思われるが、エクトシスト層の壁圧により水の受動拡散が抑制されるため、水の受動拡散は非常にゆ

つくりしたものになると思われる。この場合、エクトシストは破裂せず、脱シスト液胞はそれ以上膨張しなかった(30 時間後まで観察)。これらの結果は、エクトシスト層を破壊するためには、水の受動拡散だけでなく能動拡散による脱シスト液胞の拡張が必要であることを示唆している。

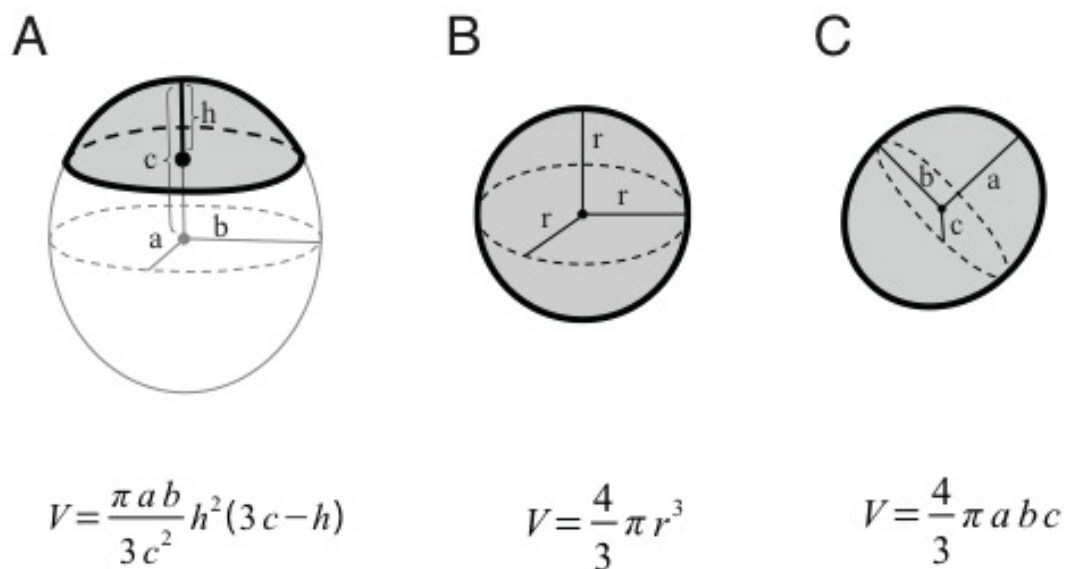


図 3.1 コルポーダの脱シスト液胞 **(A)**，収縮胞 **(B)** および栄養細胞 **(C)** の体積の算出方法. 脱シスト液胞，収縮胞，細胞はそれぞれ A~C の図形（灰色部分）とみなし，図の下に示した数式により体積を求めた. . [Funadani et al. (2013) *Microbes Environ.* **28**: 149–152 より引用]

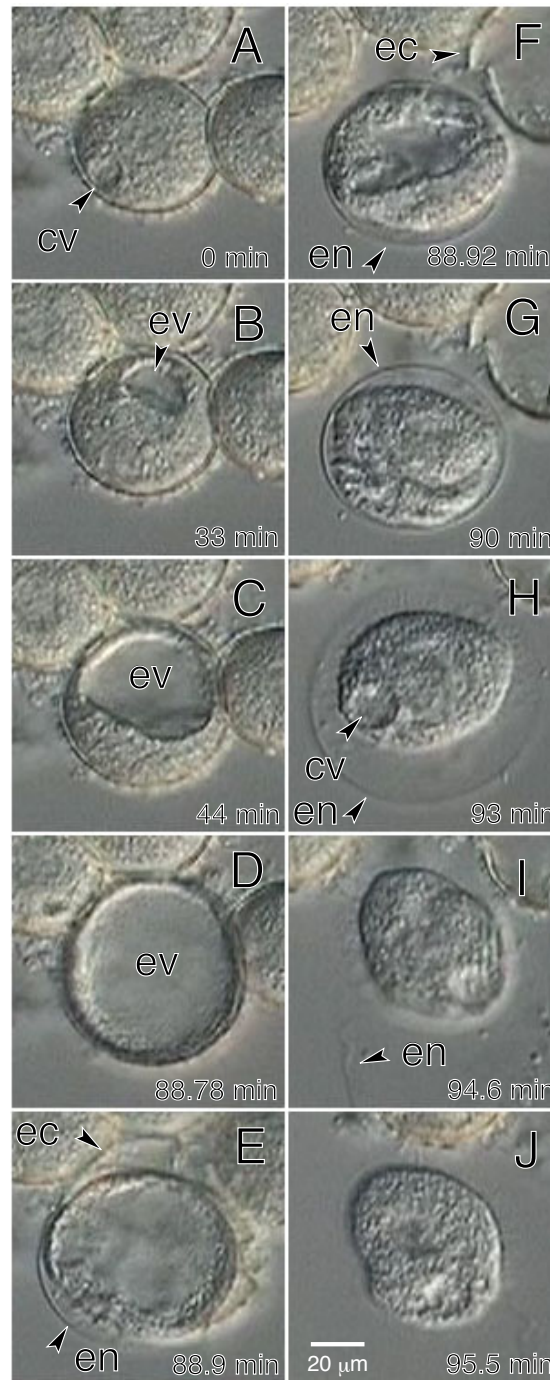


図 3.2 脱シスト誘導したコルポダ休眠シストからの栄養細胞の脱出様式. 図中の各静止画像(A~J)は, 収縮胞が拍動を開始してから0 (A), 33 (B), 44 (C), 88.78 (D), 88.9 (E), 88.92 (F), 90 (G), 93 (H), 94.6 (I), 95.5 分後 (J) に, ビデオカメラで録画した映像からキャプチャーして取得した. cv, 収縮胞; ev, 脱シスト液胞; en, エンドシスト; ec, エクトシスト. 脱シストは, 休眠シストを 0.1 mM 銅クロロフィリンナトリウムを含む 1 mM Tris-HCl (pH 7.2) に移すことによって誘導した. [Funadani et al. (2013) *Microbes Environ.* **28**: 149–152 より引用]

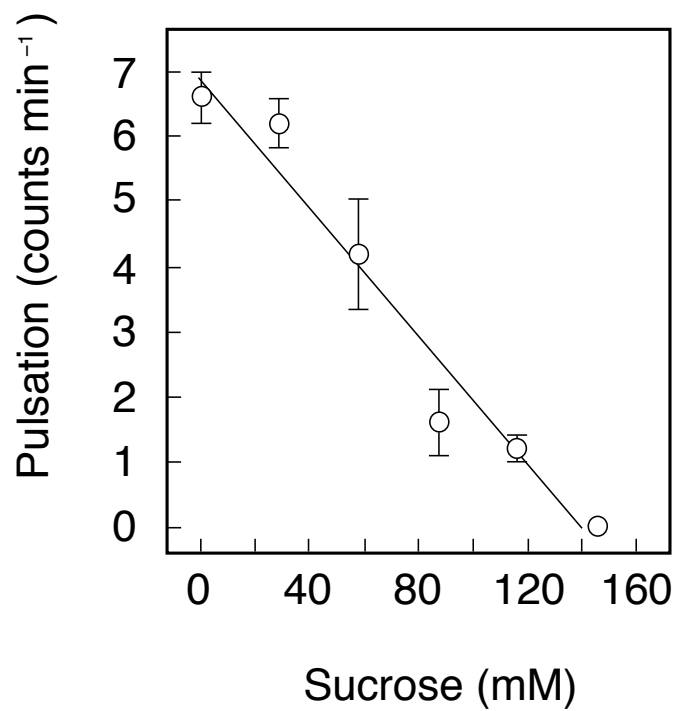


図 3.3 脱シスト誘導後に拍動を開始した直後のコルボータシストの収縮胞の拍動頻度. 図中のプロットは 5 個体の平均値, バーは標準誤差を示す. [Funadani et al. (2013) *Microbes Environ.* **28**: 149–152 より引用]

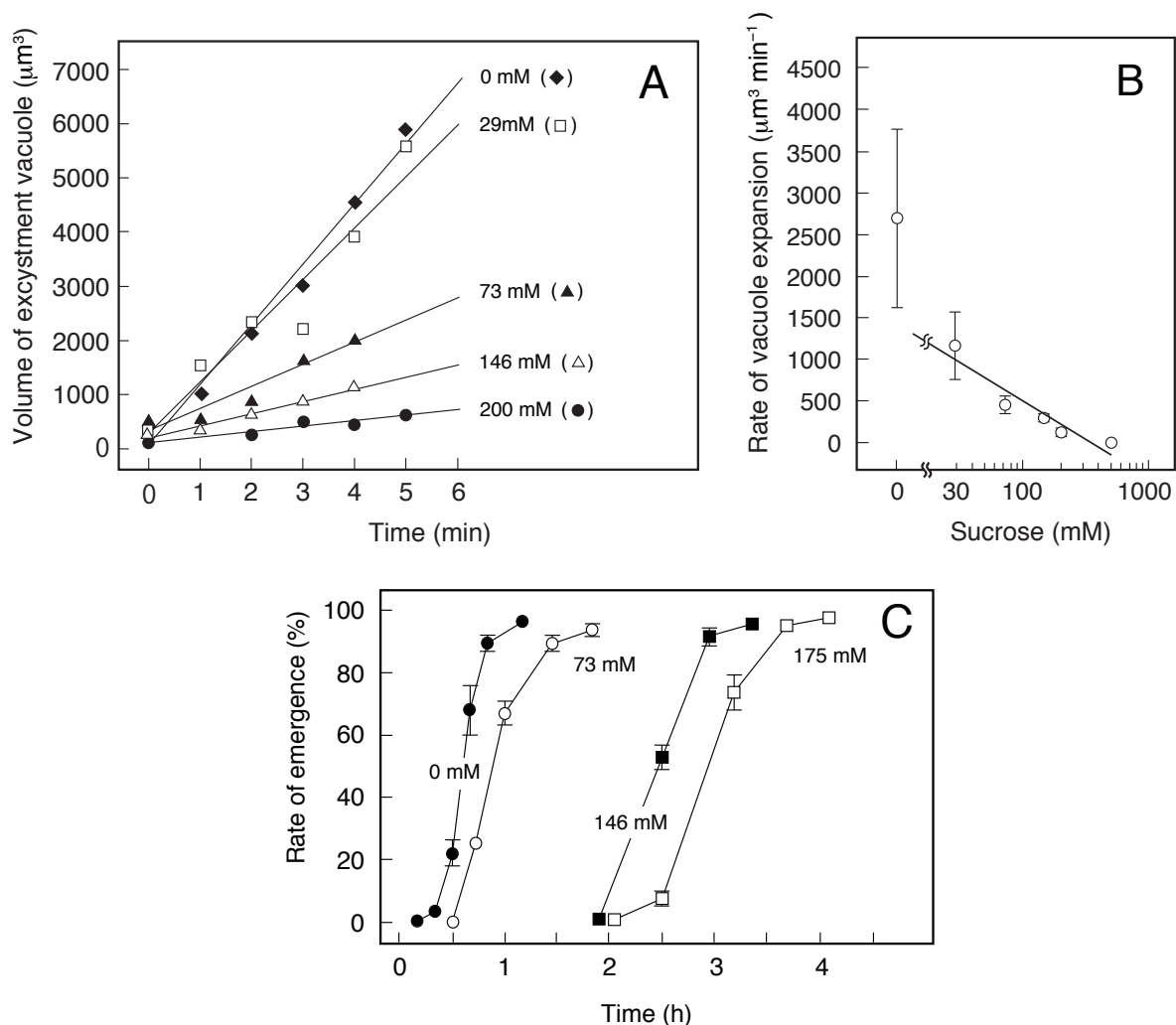


図 3.4 外液浸透圧の違いがコルポーダの脱シスト液胞の拡張速度および脱シスト率に及ぼす効果. **A** - 各種濃度のショ糖 (◆, 0 mM ; □, 29 mM ; ▲, 73 mM ; △, 146 mM ; ●, 200 mM) を含む脱シスト液 (0.2% 麦葉浸出液) 中での脱シスト液胞の体積の経時変化. 体積の測定は、収縮胞の拍動が停止した後に経時的に計測した. 図中の直線は、各種ショ糖濃度において液胞の体積が時間に比例して増加している部分の近似直線を示す. **B** - 脱シスト液胞の拡張速度とショ糖濃度の関係. 図中の○は液胞膨張速度 (図 3.4A の近似直線の傾き) の平均値 ($n=5$), バーは標準誤差を示す. **C** - 各種濃度のショ糖 (●, 0 mM ; ○, 73 mM ; ■, 146 mM ; □, 175 mM) を含む脱シスト液 (0.2% 麦葉浸出液) 中での脱シスト率の経時変化. 脱シスト率は底面に付着した休眠シスト (100~300 細胞) のうちの脱シストした細胞数を百分率で表した. プロットは5回の測定の平均値, バーは標準誤差を示す. [Funadani et al. (2013) *Microbes Environ.* **28**: 149–152 より引用]

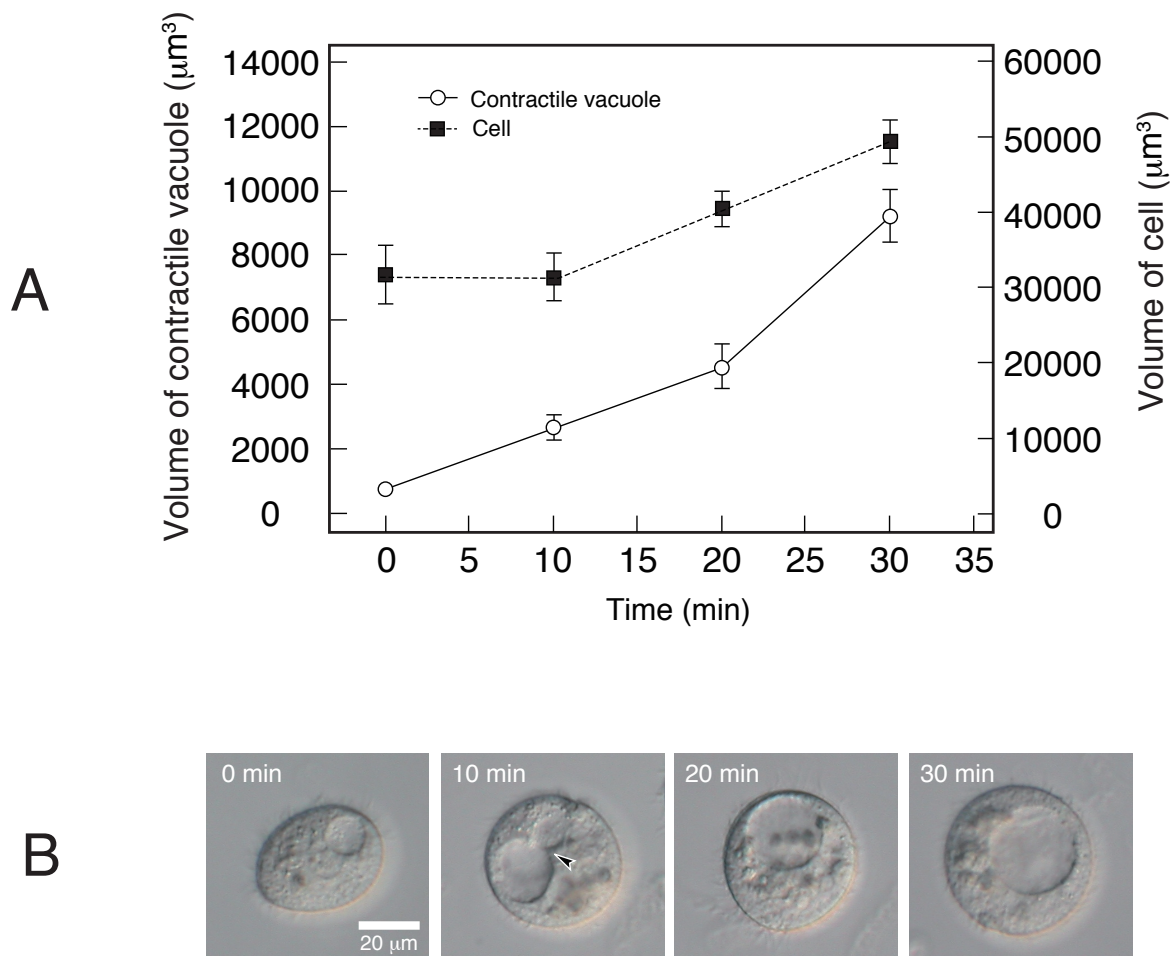


図 3.5 ATP 合成阻害剤アジ化ナトリウムがコルポダ栄養細胞の収縮胞に与える影響. **A** - 栄養細胞を 1 mM アジ化ナトリウム溶液に懸濁した後の収縮胞 (○) と細胞 (■) の体積の経時変化. プロットは 10 個体の平均値, バーは標準誤差を示す. **B** - 1 mM アジ化ナトリウム処理後の収縮胞と細胞の光学顕微鏡写真. 写真は, 細胞をアジ化ナトリウム溶液に懸濁してから 0 (懸濁直後), 10, 20, 30 分後に撮影した. 矢尻は小さい液胞が拍動していない収縮胞に融合して集水がなされる様子を示している. [Funadani et al. (2013) *Microbes Environ.* **28**: 149–152 より引用]

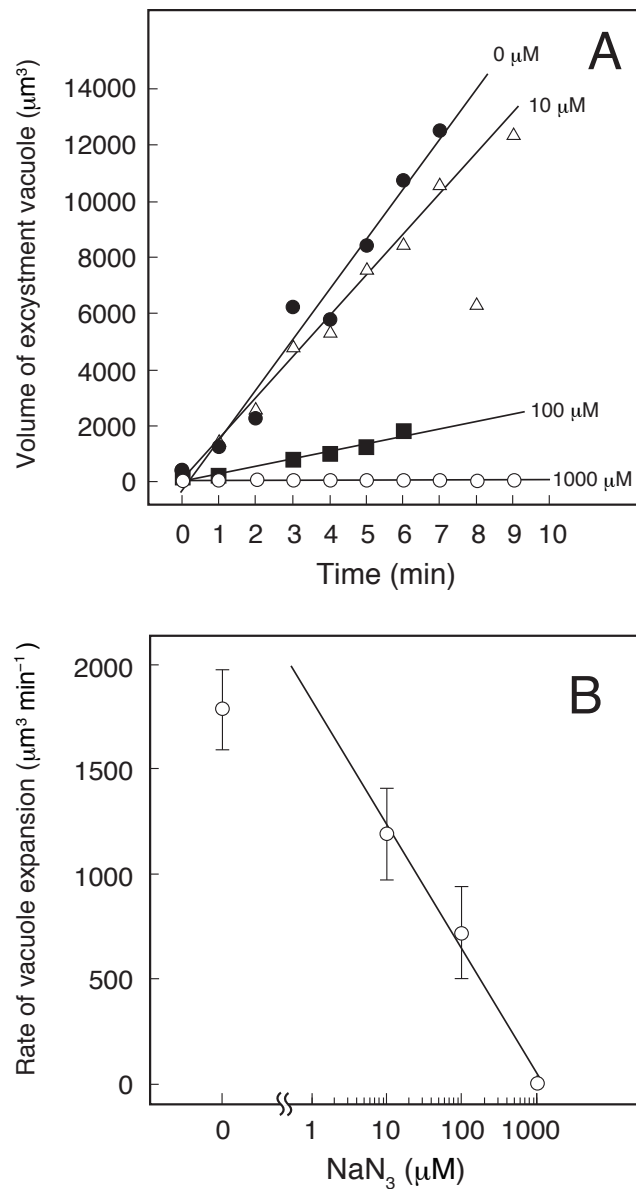


図 3.6 ATP 合成阻害剤アジ化ナトリウムが脱シスト誘導した細胞の脱シスト液胞拡張に与える影響. **A**- 各種濃度のアジ化ナトリウム (●, 0 μM ; △, 10 μM ; ■, 100 μM ; ○, 1000 μM) 存在下で脱シスト誘導したシストの脱シスト液胞体積の経時変化. 脱シスト誘導は, アジ化ナトリウムを含む脱シスト液 (0.2% 麦葉浸出液) に懸濁して行った. 体積の算出に必要な各パラメーターの計測は, 脱シスト液胞が出現した直後 (脱シスト誘導液に懸濁してから約 30 分後) に開始した. 1 mM アジ化ナトリウム存在下では脱シスト誘導開始から 3 時間後までは脱シスト液胞が出現しなかった. **B**- 各種濃度のアジ化ナトリウム存在下での脱シスト液胞の拡張速度 (μm³ min⁻¹). 拡張速度は図 3.6A の近似直線の傾きとして算出した. プロットは 5 回の計測の平均値, バーは標準誤差を示す. [Funadani et al. (2013) *Microbes Environ.* **28**: 149–152 より引用]

謝辞

本論文の研究成果は、以下の方々との共同研究により得られたものであり、ここに深い感謝の意を表します。竹下敏一教授（信州大学医学部）、小嶋克彦講師（信州大学医学部）、鈴木知彦教授（高知大学理学部）、十亀陽一郎博士（独立行政法人農業生物資源研究所 PD）、有川幹彦准教授（高知大学理学部）、宮田清司教授（京都工芸繊維大学）、水津 太准教授（北海道大学医学部）、八生健一氏（高知大学医学部）、辻圃智哉氏、山本圭介氏、木田明美博士、末友靖隆博士（岩国市立ミクロ生物館）。

引用文献

総論に関連する文献

- Asami, H., Ohtani, Y., Iino, R., Sogame, Y., Matsuoka, T. (2010) Behavior and Ca^{2+} -induced cell signaling for encystment of *Colpoda cucullus*. *J. Protozool. Res.* **20**: 1-6.
- 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.
- Matsuoka, T., Kondoh, A., Sabashi, K., Nagano, N., Akematsu, T., Kida, A., Iino, R. (2009) Role of Ca^{2+} and cAMP in a cell signaling pathway for resting cyst formation of ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *Protistology* **6**: 103-110.
- Müller, H., Achilles-Day, UEM., Day, JG. (2010) Tolerance of the resting cysts of *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodea) and *Meseres corlissi* (Ciliophora, Spirotrichea) to desiccation and freezing. *Eur. J. Protistol.* **46**: 133-142.
- Sogame, Y., Kida, A., Matsuoka, T. (2011) Possible involvement of endocyst in tolerance of the resting cyst of *Colpoda cucullus* against HCl. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5**: 4316-4320.
- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E., Matsuoka, T. (2014a) Identification of cAMP-dependent phosphorylated proteins involved in the formation of environment-resistant resting cysts by the terrestrial ciliate *Colpoda cucullus*. *Inv. Surv. J.* **11**: 213-218.
- 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. Euk.*

Microbiol. **59**: 401–406.

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

Sogame, Y. and Matsuoka, T. (2013) Evaluation of intracellular Ca^{2+} concentration by fura 2 ratiometry in encystment-induced *Colpoda cucullus*. *Acta Protozool.* **52**: 51–54.

Strickland, A. G. R. (1940). The effect of concentration of *Colpoda duodenaria* on the time required for encystment in food-free medium. *Physiol. Zool.* **13**: 356-365.

Taylor, C. V. and Strickland, A. G. R. (1936) Effects of high vacua and extreme temperatures on the cysts of *Colpoda cucullus*. *Physiol. Zool.* **9**: 15–26.

Tsutsumi, S., Wato, T., Kumamoto, K., Kotsuki, H., Matsuoka, T. (2004) Effects of porphyrins on encystment and excystment in ciliated protozoan *Colpoda* sp. *Jpn. J. Protozool.* **3**: 119–126.

Yamaoka, M., Wato, T., Matsuoka, T. (2004) Effects of salt concentration and bacteria on encystment induction in ciliated protozoan *Colpoda* sp. *Acta Protozool.* **43**: 93–98.

第1章に関連する文献

- Akematsu T. and 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.
- Funatani, R., Kida, A., Wato, T., Matsuoka, T. (2010) Morphological events during resting cyst formation (encystment) in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *Protistology* **6**: 204–217.
- Funatani, R., Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Yamamoto, K., Tsujizono, T., Suizu, F., Miyata, S., Yagyu, K., Suzuki, T., Arikawa, M., Matsuoka, T. (2016) Morphogenetic and molecular analyses of cyst wall components in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus* Nag-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnw203.
- Kawakami, H. and Yagyu, R. (1963) An electron microscopical study of the change of fine structures in the ciliate, *Colpoda cucullus*, during its life cycle. II. From the preencystment stage to the early stage of the formation of the first layer of resting cyst membrane. *Zool. Mag.* **72**: 146-151.
- Kida, A. and 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.
- Ruthmann, A. and Kuck, A. (1985) Formation of the cyst wall of the ciliate *Colpoda steinii*. *J. Protozool.* **32**: 677-682.
- Shepard, N. and Mitchell, N. (1976) Simultaneous localization of proteoglycan by light and electron microscopy using toluidine blue O. A study of epiphyseal cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* **24**: 621–629.
- Terry, DE., Chopra, RK., Ovenden, J., Anastassiades, TP. (2000) Differential use of alcian blue and toluidine blue dyes for the quantification and isolation of anionic glycoconjugates from cell cultures: application to proteoglycans and a high-molecular-weight glycoprotein synthesized by articular chondrocytes. *Anal. Biochem.* **285**: 211–219.

Wato, T., Sekida, S., Yamamoto, K., Kida, A., Matsuoka, T. (2005) Morphological study on the encystment of the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *J. Protozool. Res.* **15**: 20-28.

第2章に関連する文献

- Balasubramanian, S., Kannan, TR., Baseman, JB. (2008) The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumonia* elongation factor Tu interacts with fibronectin. *Infect. Immun.* **76**: 3116-3123.
- Caldas, TD., Yaagoubi, AEI., Richarme, G.(1998) Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J. Biol. Chem.* **273**: 11478-11482.
- Elghetany, MT. and Saleem, A. (1988) Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain Technol.* **63**: 201–212.
- Foissner, W. (1993) Colpodea (Ciliophora). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Foissner, W., Stoeck, T., Agatha, S., Dunthorn, M. (2011) Intraclass evolution and classification of the Colpodea (Ciliophora). *J. Euk. Microbiol.* **58**: 397–415.
- Funatani, R., Kida, A., Watoh, T., Matsuoka, T. (2010) Morphological events during resting cyst formation (encystment) in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *Protistology* **6**: 204–217.
- Funadani, R., Suetomo, Y., Matsuoka, T. (2013) Emergence of the terrestrial ciliate *Colpoda cucullus* from the resting cyst: Rupture of the cyst wall by active expansion of an excystment vacuole. *Microbes Environ.* **28**: 149–152.
- Funadani, R., Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Yamamoto, K., Tsujizono, T., Suizu, F., Miyata, S., Yagy, K., Suzuki, T., Arikawa, M., Matsuoka, T. (2016) Morphogenetic and molecular analyses of cyst wall components in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus* Nag-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnw203.
- Granato, D., Bergonzelli, GE., Pridmore, RD., Marvin, L., Rouvet, M., Corthésy-Theulaz, IE. (2004) Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect. Immun.* **72**: 2160–2169.

- Kida, A. and 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.
- Krab, I M., and Parmeggiani, A. (1998) EF-Tu, a GTPase odyssey. *Biochim Biophys Acta* **1443**: 1-22.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Mayer, F. (2003) Cytoskeletons in prokaryotes. *Cell. Biol. Int.* **27**: 429-438.
- Shepard, N., Mitchell, N. (1976) Simultaneous localization of proteoglycan by light and electron microscopy using toluidine blue O. A study of epiphyseal cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* **24**: 621–629.
- 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. Euk. Microbiol.* **61**: 51–60.
- Tamura, K. (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 678-687.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731–2739.
- Terry, D. E., Chopra, R. K., Ovenden, J., Anastassiades, T. P. (2000) Differential use of alcian blue and toluidine blue dyes for the quantification and isolation of anionic glycoconjugates from cell cultures: application to proteoglycans and a high-molecular-weight glycoprotein synthesized by articular chondrocytes. *Anal. Biochem.* **285**: 211–219.
- Wu, C., Scott, J., Shea, J-E. (2012) Binding of Congo red to amyloid protofibrils of the Alzheimer Ab₉₋₄₀ peptide probed by molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **103**: 550-557.

第3章に関連する文献

- Adl, S. M., Berger, J. D. (1997) Timing of life cycle morphogenesis in synchronous samples of *Sterkiella histriomuscorum*. I. The vegetative cell cycle. *Europ. J. Protistol.* **33**: 99-109.
- Beers, C. D. (1935) Structural changes during encystment and excystment in the ciliate *Didinium nasutum*. *Arch. Protistenk.* **84**: 133-155.
- Beers, C. D. (1945) Some factors affecting excystment in the ciliate *Tillina magna*. *Physiol. Zool.* **18**: 80-99.
- Beers, C. D. (1948) Excystment in the ciliate *Bursaria truncatella*. *Biol. Bull.* **94**: 86-96.
- Beers, C. D. (1966) The excystment process in the ciliate *Nassula ornata* Ehrbg. *J. Protozool.* **13**: 79-83.
- Bennett, M. C., Mlady, G. W., Kwon, Y.-H., Rose, G. M. (1996) Chronic in vivo sodium azide infusion induces selective and stable inhibition of cytochrome c oxidase. *J. Neurochem.* **66**: 2606-2611.
- 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. Micros. Soc.* **93**: 578-593.
- Funadani, R., Suetomo, Y., Matsuoka, T. (2013) Emergence of the terrestrial ciliate *Colpoda cucullus* from the resting cyst: Rupture of the cyst wall by active expansion of an excystment vacuole. *Microbes Environ.* **28**: 149-152.
- Gutiérrez, J. C., Torres, A., Perez-Silva, J. J. (1981) Excystment, cortical morphogenesis and nuclear processes during encystment and excystment in *Laurentiella acuminata* (Hypotrichida, Oxytrichidae). *Acta Protozool.* **20**: 145-152.
- Hashimoto, K. (1963) Formation of ciliature in excystment and induced re-encystment of *Oxytricha fallax* Stein. *J. Protozool.* **10**: 156-166.
- Holt, P. A. (1972) An electron microscope study of the rhabdophorine ciliate *Didinium nasutum* during excystment. *Trans. Am. Microscop. Soc.* **91**: 144-168.
- Kamra, K. and Sapra, G. R. (1991) Formation of a transient corticotype during excystment in

- Coniculostomum monilata* (Oxytrichidae, Hypotrichida) and its modification by reorganizations. *Eur. J. Protistol.* **27**: 331-342.
- Kim, Y. O. and Taniguchi, A. (1995) Excystment of the oligotrich ciliate *Strombidium conicum*. *Aquat. Microb. Ecol.* **9**: 149-156.
- Montagnes, D. J. S., Lowe, C. D., Poulton, A., Jonsson, P. (2002) Redescription of *Strombidium oculatum* Gruber 1884 (Ciliophora, Oligotrichia). *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**: 329-337.
- Müller, H. (2007) Live observation of excystment in the spirotrich ciliate *Meseres corlissi*. *Eur. J. Protistol.* **43**: 95-100.
- Nakamura, T. and Matsusaka, T. (1991) Effects of cyst age on excystment of the ciliate *Histriculus cavicola* (Kahl, 1935) (Ciliophora, Stichotrichia). *Eur. J. Protistol.* **27**: 375-380.
- Repak, A. (1968) Encystment and excystment of the heterotrichous ciliate *Blepharisma stoltei* Isquith. *J. Protozool.* **15**: 407-412.
- Walker, G. K., Mangel, T. K., Goode D. (1980) Encystment and excystment in hypotrich ciliates. I. *Gastrostyla steinii*. *Protistologica.* **16**: 511-524.

参考論文

1. Morphological events during resting cyst formation in the ciliate *Colpoda cucullus*.
(絨毛虫 *Colpoda cucullus* の休眠シスト形成過程における形態学的変化)
Funatani, R., Kida, A., Wato, T., Matsuoka, T. *Protistology* 6: 204-217, 2010.
2. Emergence of the terrestrial ciliate *Colpoda cucullus* from a resting cyst: Rupture of the cyst wall by active expansion of an excystment vacuole.
(土壌性絨毛虫 *Colpoda cucullus* の脱シスト：シスト壁は脱シスト液胞の能動的な膨張によって破壊される)
Funadani, R., Suetomo, Y., Matsuoka, T. *Microbes Environ.* 28: 149-152, 2013.
3. Morphogenetic and molecular analyses of cyst wall components in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus* Nag-1.
(絨毛虫 *Colpoda cucullus* Nag-1 株におけるシスト壁構成要素の形態学および分子生物学的解析)
Funadani, R., Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Yamamoto, K., Tsujizono, T., Suizu, F., Miyata, S., Yagy, K., Suzuki, T., Arikawa, M., Matsuoka, T. *FEMS Microbiol. Lett.* 363: fnw203, 2016.

その他の公表済み論文

1. 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. 舟谷亮二, 十亀陽一郎, 末友靖隆, 松岡達臣 *生物の科学 遺伝* 64: 93-100, 2010.
2. Excystment-dependent alteration of protein expression in terrestrial ciliate *Colpoda cucullus*.
(土壌性絨毛虫 *Colpoda cucullus* における脱シスト依存的なタンパク質発現の変化) Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E., Funadani, R., Matsuoka, T. *Microbes Environ.* 28: 388-390, 2013.