

---

 Original
 

---

**繊毛虫コルポータダ (*Colpoda* sp.) のシスト形成・脱シスト誘導因子**

 和唐智子<sup>1</sup>・山岡雅仁<sup>1</sup>・長尾美智子<sup>2</sup>・荻沼一男<sup>2</sup>・松岡達臣<sup>1,\*</sup>
<sup>1</sup>高知大学理学部自然環境科学科 〒780-8520 高知市曙町2-5-1

<sup>2</sup>高知女子大学生活科学部環境理学科 〒780-8515 高知市永国寺町 5-15

**Inducing factors for encystment and excystment in ciliated protozoan *Colpoda* sp.**

 Tomoko WATOH<sup>1</sup>, Masahito YAMAOKA<sup>1</sup>, Michiko NAGAO<sup>2</sup>, Kazuo OGINUMA<sup>2</sup>  
 and Tatsuomi MATSUOKA<sup>1</sup>
<sup>1</sup>*Department of Natural Environmental Science, Faculty of Science, Kochi University,  
 Kochi 780-8520, Japan*
<sup>2</sup>*Department of Environmental Science, Kochi Women's University, Kochi 780-8515,  
 Japan*
**SUMMARY**

In many kinds of protozoans, cyst formation (encystment) and excystment which involves structural transformation processes constitute the drastic process of cell reconstruction mediated by signaling chains including gene expression that is triggered by environmental signals. In order to establish a model system for understanding the molecular mechanisms of encystment and excystment, we aimed to elucidate the environmental factors that activate the signal transduction chain leading to encystment and excystment of *Colpoda* sp. The present study showed that cyst formation of *Colpoda* was repressed by bacteria, while accelerated by saline solution. The excystment of the cells was induced by certain components contained in dried cereal leaves.

**はじめに**

原生動物の多くは乾燥、飢餓、周囲の水環境の悪化といった急激に変化する野外の苛酷な条件下で生活している。このような外部環境変化の下で生き延びるために、原生動物の一部にはシストになって休眠する

ものがある。休眠シスト形成および脱シスト過程では、環境シグナルの受容・変換および細胞内シグナリングを介した多くの遺伝子の発現調節を伴う細胞の劇的な再編成が起きると考えられる。現在までに、電子顕微鏡等を用いた形態変化の追跡 (Delgado et al., 1987; Delmonte Corrado et al., 1996; Foissner and Foissner, 1987; Grimes, 1973; Matsusaka, 1979; Matsusaka et al., 1989; Repak, 1968; Repak and Pfister, 1967; 高橋ら, 2002)、シスト化・脱シスト化誘導因子の探索 (Rastogi et al., 1973; Tomaru, 2002; Yonezawa and Takahashi, 1990)、シスト特異的に発現するタンパク質の解析 (Hirukawa et al., 1998; Izquierdo, et al., 2000; Suizu and Matuoka, 1998; Villalobo et al., 2001)、シスト形成・脱

---

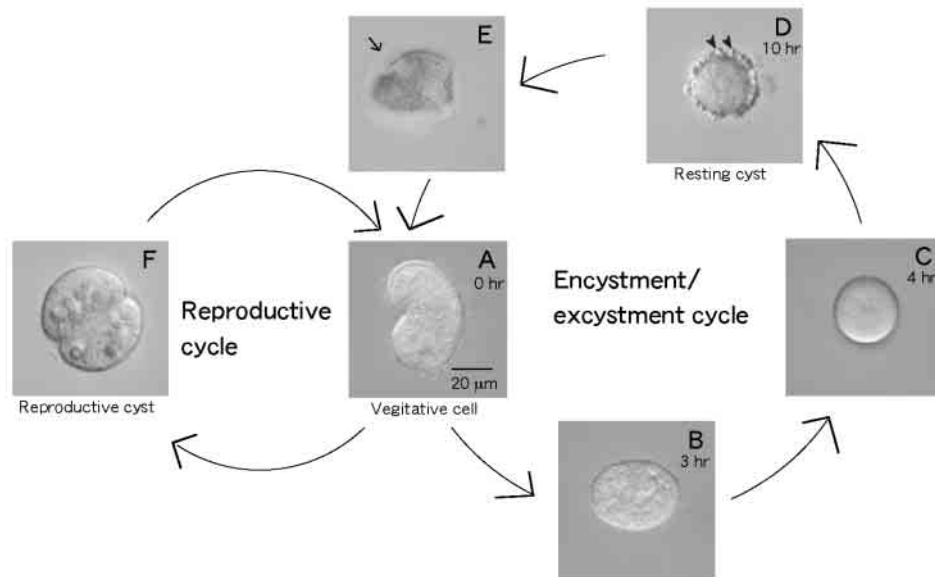
 \*Corresponding author

Tel: +81-88-844-8315

Fax: +81-88-844-8356

E-mail: tmatsuok@cc.kochi-u.ac.jp

Received 17 June 2003; Accepted 14 July 2003

Fig. 1. Life cycle of *Colpoda*.

シスト誘導に関わる受容体の探索 (Yang and Villemez, 1994) などに関する多くの研究がなされ様々な知見が得られている。しかし、残念ながら、多様な原生動物種においてなされた研究成果を統合しても、シスト形成や脱シストに至る全容を分子レベルで理解することは現時点では困難である。シスト形成や脱シスト化を高率にかつ同調的に速やかに誘導できる材料と実験系が用いられていないことが、分子レベルでの研究を飛躍的に展開できない一因であると思われる。それゆえに、分子レベルでの解析を可能にするようなモデル生物/実験系を構築することが重要である。

本研究の実験材料として用いたコルポーダ (*Colpoda* sp.) は畑の落ち葉から単離したものであるが、この種は増殖速度が非常に速く、短時間で高率にシスト形成/脱シストを誘導できることがわかった。すでにコルポーダのシスト形成に関しては複数の研究報告がなされているが (Delmonte Corrado et al., 1996; Izquierdo et al., 2000)、その誘導因子に関する確かな実証すら得られていないのが現状である。本研究では、コルポーダを用いてシスト形成/脱シスト誘導機構の全容解明に向けたモデル実験系を確立することを視野に入れ、その基盤的研究としてシスト形成および脱シストの誘導因子の探索を行い誘導因子を明らかにした。

## 材料と方法

畑で採取した落ち葉を蒸留水に浸し、脱シストして増殖したコルポーダ (*Colpoda* sp.) を単離し、麦葉浸出液 (0.01~0.1%) にバクテリア (*Enterobacter aerogenes*) を植え付けた培養液を用いてクローン培養を行った (23°C, 暗黒条件下)。麦葉浸出液 (1%) は、乾燥麦葉粉末 (5 g) を 500 ml の蒸留水に懸濁し数分間煮沸したものをろ過して作成した。バクテリアは 0.5% ポリペプトン、1% 肉エキス、0.5% NaCl を含む 1.5% 寒天培地で室温にて培養した。

シスト形成の誘導実験では、2~3日間培養したコルポーダをピペットを用いて時計皿に満たした約 2 ml の各種テスト液 (本文および図の説明に記述) に懸濁し、数回洗った後一定時間後に実体顕微鏡下で観察した。脱シスト誘導実験では、シスト化して数週間経過したものをピペットを用いて塩類溶液 (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.1) に懸濁して数回洗った後各種テスト液に移した。すべての実験は約 25°C、室内蛍光灯の光条件下 (0.1~0.5 W/m<sup>2</sup>) で行った。

麦葉成分を HPLC (ナカライ, Cosmosil 5C18-AR300 カラム装着) 分析する場合は、5 ml の麦葉浸出液 (1%) をロータリーエバポレータで乾燥し、0.1% TFA を含む 0.5 ml の蒸留水に再溶解 (10倍濃縮)

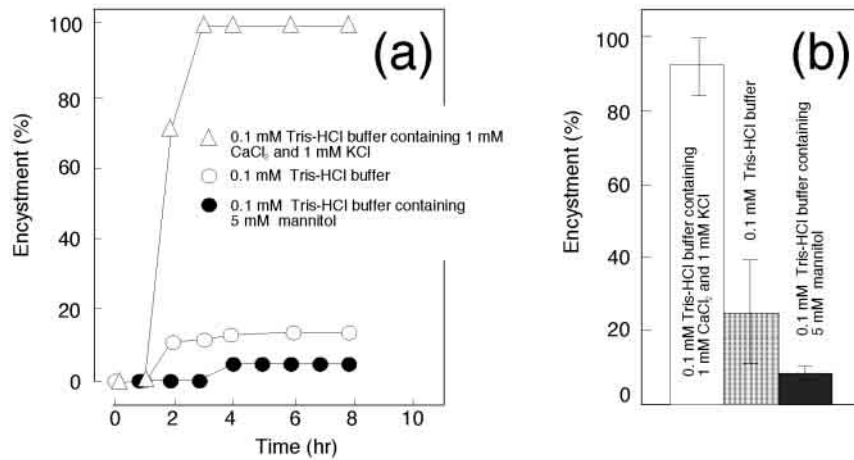


Fig. 2. Effects of salts (CaCl<sub>2</sub> and KCl) or mannitol on induction of *Colpoda* encystment. (a) Typical time course of encystment. The rate of encystment was expressed as the percentage of total number of tested cells (50-60 cells). (b) The rate of encystment (%) at 8 hr after induction. Columns and attached bars correspond to the means of four identical measurements (50-60 cells per measurement) and standard error.  $\triangle$  and open column, 0.1 mM Tris-HCl buffer (pH 7.1) containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM KCl;  $\circ$ , and shaded column, 0.1 mM Tris-HCl buffer (pH 7.1);  $\bullet$  and closed column, 0.1 mM Tris-HCl (pH 7.1) containing 5 mM mannitol.

したものを試料として用いた。上記サンプル100  $\mu$ lをカラムにアプライして得られた各分画を乾燥した後100  $\mu$ lの塩類溶液 (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.1) に溶解した。この液を10  $\mu$ lとしてシストを懸濁した990  $\mu$ lの塩類溶液に加え (0.1%麦芽浸出液1 mlに含まれる成分量に相当)、脱シストを観察した。

## 結果と考察

Fig. 1にコルポーダの生活環を示す。バクテリアを含む培養液中では、ほとんどのコルポーダは増殖サイクルをくり返した。増殖過程では、運動は停止し (繊毛が退化している可能性もある)、薄膜につつまれた状態で細胞分裂が起きて2細胞または4細胞が生じた (増殖型シスト) (Fig. 1F)。なお、栄養細胞 (Fig. 1A) のままで細胞分裂する個体は現在のところ観察されていない。休眠シスト形成が誘導されると、数時間以内に繊毛が退化するとともに細胞体は丸くなり (Fig. 1B, 1C)、完成したシストの表面には複数の突起様のものが観察された (Fig. 1D、矢印)。脱シストは誘導後数時間から24時間くらいまでに起きるが、脱シスト直前のものでは収縮胞が活動を開始するので識別が可能である。収縮胞が活動を開始してから約2時間程度経過すると、薄膜 (Fig. 1E、矢印) に包まれた細胞がシストの殻から出現し、数分後には薄膜が消失

して繊毛を有する新生栄養細胞となった。薄膜から細胞が出てくるのか薄膜が細胞に吸収されるのかについては現在のところ不明である。

塩類を含まない非常に薄い緩衝液 (0.1 mM Tris-HCl, pH 7.1) にコルポーダを懸濁した場合は、シスト形成が比較的高率に誘導される場合もあるがほとんど誘導されないこともあり、4回の実験結果の平均値は低い値を示した (Fig. 2b)。一方、外液に塩類が存在する場合はこのような不安定さは観察されず、各実験群においてほとんどの細胞がシスト化した (Fig. 2b)。この結果は、外液にシスト形成誘導因子や抑制因子が存在しない場合は、細胞がシスト化に向かうか栄養細胞の状態にとどまるかといった決定機構が不安定な状態にあることを示唆している。Fig. 2の結果は、外液中の塩類 (イオン) 濃度の上昇がシスト形成を誘導するために有効であることを示しているが、これは外液の浸透圧の上昇に起因するものかも知れない。このため、塩類溶液 (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KCl) と浸透圧的に等価な5 mMマニトール溶液中でのシスト形成率を観察した。この結果、マニトールによる外液浸透圧の上昇はシスト誘導効果はなく、むしろ抑制的な傾向がみられた (Fig. 2)。なお、Fig. 2b)に示す3実験群間においては有意な差が認められた ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test)。

Fig. 3に示すように、培養液中のコルポーダ栄養細胞を標準塩類溶液 (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KCl, 5 mM Tris-

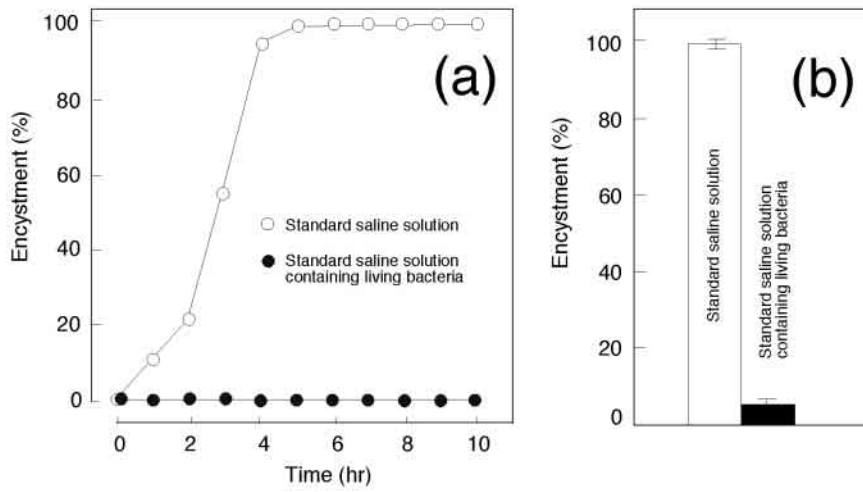


Fig. 3. Suppression of encystment of *Colpoda* by living bacteria. (a) Typical time course of encystment. The rate of encystment was expressed as the percentage of total number of tested cells (50 cells). (b) The rate of encystment (%) at 10 hr after induction. Columns and attached bars correspond to the means of four identical measurements (50 cells per measurement) and standard error. ○ and open column, standard saline solution (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.1); ● and closed column, standard saline solution containing living bacteria (*Enterobacter aerogenes*) (about 10<sup>6</sup> cells/ml).

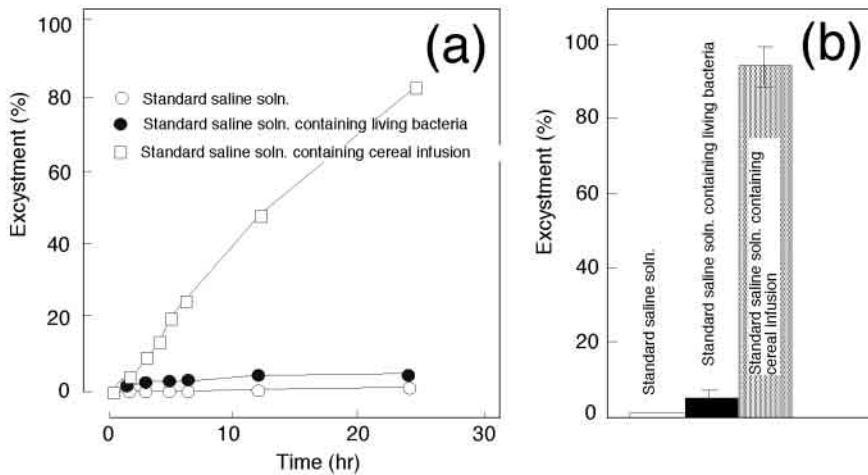


Fig. 4. Induction of excystment of *Colpoda* by cereal components. (a) A typical time course of excystment. The rate of excystment was expressed as the percentage of the total number of tested cells (50-100 cells). (b) The rate of excystment (%) at 24 hr after induction. Columns and attached bars correspond to the means of four identical measurements (50-100 cells per measurement) and standard error. ○ and open column, standard saline solution; ● and closed column, standard saline solution containing living bacteria (about 10<sup>7</sup> cells/ml); □ and shaded column, standard saline solution containing 0.1% cereal infusion. Cysts kept in the saline solution for several weeks were transferred into the test media.

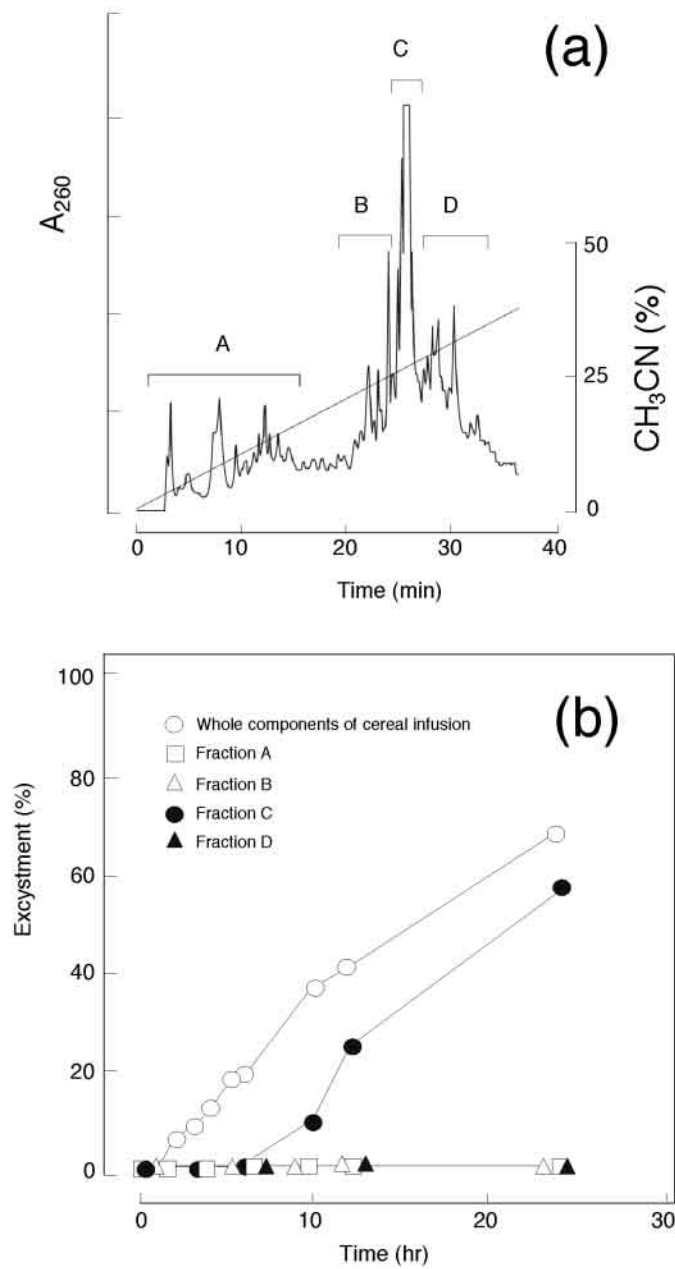


Fig. 5. (a) An elution profile of cereal components by a reverse-phase HPLC equipped with a column (Cosmosil 5C18 AR-300) having a 0-40% acetonitrile gradient containing 0.1% TFA. Prior to application of the sample (100  $\mu$ l) to the column, 5 ml of cereal infusion (1%) were dried and dissolved in 500  $\mu$ l of distilled water containing 0.1% TFA. (b) Effect of cereal components fractionated by HPLC on *Colpoda* excystment.  $\circ$ , whole components of cereal infusion;  $\square$ , fraction A;  $\triangle$ , fraction B;  $\bullet$ , fraction C;  $\blacktriangle$ , fraction D. Fractionated samples were dried and dissolved in 100  $\mu$ l of the saline solution. For assays, 10  $\mu$ l of the medium containing fractionated components was added to 990  $\mu$ l of saline solution suspending the cysts. The cysts kept in the saline solution for several weeks were transferred into the test media. The rate of excystment was expressed as the percentage of the total number of tested cells (50-100 cells).

HCl, pH 7.1) に懸濁した場合、顕著なシスト化が起きたが、バクテリアを含む塩類溶液に懸濁した場合はシスト化はほとんど観察されなかった。この場合、2実験群間に有意な差が認められた ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test)。この結果は、バクテリアの存在は塩類(イオン)濃度の上昇によって誘導されるシスト化を抑制することを示している。

標準塩類溶液に放置しておいたシストをバクテリアを植え付けた培養液(麦葉浸出液)に移すと脱シストが誘導される。この場合、脱シストを誘導した因子として、1) 培養液成分(麦葉成分)、2) バクテリアの存在、3) 塩濃度の減少が考えられる。そこで、同時に誘導し放置しておいたシストを種々の条件下において脱シスト率を調べた(Fig. 4)。この結果、新鮮な標準塩類溶液では脱シスト誘導効果がなかったが、麦葉浸出液を含む標準塩類溶液中では顕著な脱シストがおきた。この場合、麦葉成分を含む塩類溶液にバクテリアが増殖し、バクテリア単独あるいは麦葉成分との相乗的な作用によって脱シストが誘導された可能性も否定できない。このため、シストを30分ごとに新鮮な液(麦葉浸出液を含む標準塩類溶液)に移しかえバクテリアが増殖しないようにした条件下で脱シストの観察を行った。この結果、4時間後の脱シスト率は、30分ごとにシストを移しかえた場合は55.3%(4回の実験の平均値)、移しかえなかった場合54.5%(4回の実験の平均値)であり、バクテリアの増殖の影響を排除した条件下でも脱シストが誘導されることがわかった。さらに、通常の培養液に増殖する程度の密度のバクテリアを懸濁した標準塩類溶液中では、脱シスト率は非常に低かった(Fig. 4)、しかし、Fig. 4bに示す3実験群間において有意な差が認められたので( $p < 0.01$ , Kruskal-Wallis test)、微弱ながらバクテリアの存在も脱シスト誘導効果をもつことは否定できないが、脱シストを誘導する主因子は麦葉成分であるといえる。塩濃度の減少が脱シストを誘導するかどうかについては現在詳細に調査中である。

葉浸出液に含まれる脱シスト誘導効果をもつ成分を同定するために、逆相HPLC分析を行った(Fig. 5a)。得られた分画を4つに分け(A-D)、それぞれの分画に含まれる成分が脱シスト誘導効果をもつかどうかを調べた。この結果、分画Cに含まれる成分のみが脱シスト誘導効果を示すことがわかった(Fig. 5b)。現在のところ分画Cに含まれる成分をさらに分離することには成功していないが、乾燥麦葉に含まれる主要な水溶性成分が有効であることは確かである。

バクテリアの枯渇(Gutiérrez et al., 2001; Tomaru, 2002)や乾燥(山田・山際, 1980)はシスト形成誘導因子としてよく知られている事実であるが、本研究では、外液の塩(イオン)濃度の上昇によって誘導され

るシスト形成はバクテリアによってキャンセルされることが明らかになった。しかし、この結果から、野外でのコルポダのシスト化を説明することは困難であるように思われる。なぜならば、本研究で用いたコルポダのように一時的に出現する水環境を生き延びている原生動物の場合、乾燥に向かいつつある環境シグナルを感知してシスト化する誘導経路が最優先されることが重要であると考えられるからである。このため、乾燥シグナルとして働くと思われる外液中の塩類(イオン)濃度の上昇効果とバクテリア密度の関係について詳細に検討する必要がある。一方、脱シスト誘導因子は乾燥麦葉に含まれる水溶性成分である。この事実は、落ち葉周辺にごく短期間出現する水環境に適応した原生動物の生活環を説明することが可能である。すなわち、植物の枯葉の浸出液はバクテリアが増殖するために十分な栄養を供給できるので、このような成分を含む水環境は、コルポダのようなバクテリア捕食性の原生動物が増殖するのに適していると考えられる。

## 謝辞

高知大学自然環境科学科の町田吉彦氏にはデータの統計分析をお願いするとともに有益なご助言を頂いた。ここにお礼を申し上げる。

## 引用文献

- Delgado, P., Calvo, P. and Torres, A. (1987) Encystment in the hypotrichous ciliate *Paraurostyla weissei*: Ultrastructure and cytochemistry. *J. Protozool.* 34, 104-110.
- Delmonte Corrado, M. U., Chessa, M. G. and Pelli, P. (1996) Ultrastructural survey of mucocysts throughout the life cycle of *Colpoda cucullus* (Ciliophora, Colpodea). *Acta Protozool.* 35, 125-129.
- Foissner, I. and Foissner, W. (1987) The fine structure of the resting cysts of *Kahliella simplex* (Ciliata, Hypotrichida). *Zool. Anz.* 218, 65-74.
- Grimes, G. W. (1973) Differentiation during encystment and excystment in *Oxytricha fallax*. *J. Protozool.* 20, 92-104.
- Gutiérrez, J. C., Callejas, S., Borniquel, S., Benítez, L. and Martín-González, A. (2001) Ciliate cryptobiosis: a microbial strategy against environmental starvation. *Int. Microbiol.* 4, 151-157.
- Hirukawa, Y., Nakato, H., Izumi, S., Tsuruhara T. and Tomino, S. (1998) Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1398, 47-56.

- Izquierdo, A., Martín-González, A. and Gutiérrez, J. C. (2000) Resting cyst wall glycoproteins isolated from two colpodid ciliates are glycine-rich proteins. *Cell Biol. Int.* 24, 115-119.
- Matsusaka, T. (1979) Effect of cycloheximide on the encystment and ultrastructure of the ciliate, *Histiculus*. *J. Protozool.* 26, 619-625.
- Matsusaka, T., Noguchi, O. and Yonezawa, F. (1989) Cortical morphogenesis during encystment in a ciliate, *Euplotes encysticus* Yonezawa, 1985. *Europ. J. Protistol.* 24, 133-137.
- Rastogi, A. K., Sagar, P. and Agarwala, S. C. (1973) Role of riboflavin and certain amino acids in the excystment of *Schizopyrenus russelli*. *J. Protozool.* 20, 453-455.
- Repak, A. J. (1968) Encystment and excystment of the heterotrichous ciliate *Blepharisma stoltei* Isquith. *J. Protozool.* 15, 407-412.
- Repak, A. J. and Pfister, R. M. (1967) Electron microscopical observations on the extracellular structures of the resting cyst of *Blepharisma stoltei*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 86, 417-421.
- Suizu, F. and Matsuoka, T. (1998) Biochemical analysis of cyst formation in unicellular *Blepharisma*. *Cytobios* 96, 157-163.
- 高橋忠夫, 三好孝和, 鈴木武雄, 上瀧良一, 砂原俊彦 (2002) ボウフラから発見された繊毛虫テトラヒメナの増殖とシスト形成. *日本電子ニュース* 34, 6-9.
- Tomaru, A. (2002) Encystment-inducing factors in the ciliate *Euplotes elegans*. *Zool. Sci.* 19, 741-746.
- Villalobo, E., Moch, C., Perasso, R. and Baroin-Tourancheau, A. (2001) Searching for excystment-regulated genes in *Sterkiella histriomuscorum* (Ciliophora, Oxytrichidae): a mRNA differential display analysis of gene expression in excysting cells. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48, 382-390.
- 山田卓三, 山際 隆 (1980) 新しい教材生物の研究: 飼育培養から観察実験まで. 講談社 pp. 59-63.
- Yang, S. and Villemez, C. L. (1994) Cell surface control of differentiation in *Acanthamoeba*. *J. Cell. Biochem.* 56, 592-596.
- Yonezawa, F. and Takahashi, T. (1990) Encystment-inducing substance in cell-free fluid from the culture of the ciliate *Euplotes encysticus* grown in bacterized inorganic medium. *Zool. Sci.* 7, 1157a.
- Knoll, G., Kerboeuf, D. and Plattner, H. (1992) A rapid calcium influx during exocytosis in *Paramecium* cells is followed by a rise cyclic GMP within 1 s. *FEBS Letter*, 304, 265-268.
- Knoll, G., Grassle, A., Braun, C., Probst, W., Hohne-Zell, B. and Plattner, H. (1993) A calcium influx is neither strictly associated with nor necessary for exocytotic membrane fusion in *Paramecium* cells. *Cell Calcium*, 14, 173-183.
- Lima, O., Gulik-Krzywicki, T. and Sperling, L. (1989) *Paramecium* trichocysts isolated with their membranes are stable in the presence of millimolar  $Ca^{2+}$ . *J. Cell Sci.*, 93, 557-564.
- Plattner, H., Braun, C. and Hentschel, J. (1997) Facilitation of membrane fusion during exocytosis and exocytosis-coupled endocytosis and acceleration of "ghost" detachment in *Paramecium* by extracellular calcium. A quenched-flow/freeze-fracture analysis. *J. Membr. Biol.*, 158, 197-208.
- Wessenberg, H. and Antipa, G. (1970) Capture and ingestion of *Paramecium* by *Didinium nasutum*. *J. Protozool.*, 17, 250-270.
- Yagiu, R. and Shigenaka, Y. (1965). Electron microscopy of the ectoplasm and the proboscis in *Didinium nasutum*. *J. Protozool.*, 12, 363-381.