## Review

# 繊毛虫の休眠シストについて

松坂理夫

熊本大学理学部環境理学科(現在:熊本大学名誉教授)
〒860-8555 熊本市黒髪2丁目

## On the resting cyst of ciliates

Tadao MATSUSAKA

Department of Environmental Science, Faculty of Science, Kumamoto University, Kumamoto 860-8555, Japan

現在記載されている自由生活をする原生動物の種 数は、研究者によって異なるが、繊毛虫だけでも 2,000 から 3,000 種、或いはそれ以上にのぼってい る。これら自由生活をする原生動物の多くにとっ て、彼らが棲息している環境が常に好適であるとは 限らない。彼らは基本的に単細胞であり、個々の細 胞が細胞膜を隔てて直接外部環境に接している。 従って、保護細胞層を持った多細胞生物と違って、 彼らが活動する場所には、たとえわずかであって も、水が存在することが必須である。彼らは、水域 はもちろん、土壌という水がないことの多い場所に も棲息している。とりわけ土壌中で生活する種は常 に乾燥の危険にさらされている。それにもかかわら ず、このように多数の種が存続している理由の一つ として、環境耐性のある休眠シスト(耐久シスト) を形成出来る種が多いことがある。

シスト形成という生物現象は、単細胞真核生物に おける細胞分化という視点からだけでも十分興味あ る現象である。その他に、言葉の上から何となく想 像がつく以上にはほとんど何も分かっていない休眠 現象そのものの解析や、シストが劣悪な環境に耐え

連絡先:〒862-8001 熊本市武蔵ヶ丘1丁目1-26 e-mail: matsu.t-a@h5.dion.ne.jp (Received: 6 July 2006) て長期間生き延びられる機構、それに伴う生体高分 子の長期保存の機構の解析など、色々な観点から非 常に興味ある研究分野である。生体高分子の長期保 存という観点では、昆虫などで知られている「凍結 保護物質」や好塩菌や好熱菌などで知られている 「補償物質」などと同様な、何らかの物質をシスト が蓄積している可能性もある。このような物質が、 生体高分子を様々な環境下で保存し、結果として 様々な環境下での「生き延び」を可能にしていると 考えることも出来るであろう。

シスト形成は古くから研究者の興味を引いてきた ようで、原生動物のシストに関する総説もこれまで いくつか公表されている(van Wagtendonk, 1955; Corliss & Esser, 1974; Bradbury, 1987 など)。私の知 る限りでは、繊毛虫のシスト形成のみに限定した Gutiérrez 等(1990); (2001)の総説が最も新しいもので ある。それぞれの総説は著者達の視点が異なるた め、一つの総説を読んだだけではシスト形成の全体 像をつかみにくい。この小論は、私がこれまで研究 してきた繊毛虫のシストにしぼって、未発表データ も加えた私の経験を中心にして、現在までに判って

※全ての電顕写真のバーは 500 nm を示す。

いること、判っていないこと、また、シストに関す る私の観点などについて概説してみたい。従って、 この小論もシストの全体像をつかむにはもの足らな い部分が多いと思われるので、他の総説も参照され たい。また、この小論で引用したデータの原著論文 を全て書き出すとそれだけで膨大な数になるので、 特に原著のデータが必要でない限り、かなりの部分 を前述の総説を引用することで済ませてある。

読んでいただけば分かることではあるが、一言で 言ってしまえば、繊毛虫のシストに関しては「ま だ、何も分かっていない」というのが実情である。 今後の研究を待たなければならないが、シストの研 究を志す方には、少なくとも 1980 年代以降の総説に は目を通して頂きたいし、そこに引用されている文 献にも当たって頂きたい。

### シストの環境耐性

休眠シストの多くが乾燥など様々な環境ストレス に対して強い耐性を持っていることは、生物学の 様々な教科書に記載されており広く知られている。 実際、シストを保存していた容器の水分が蒸発して 無くなってしまうことが時にある。しかし、この乾 燥した容器に水または培養液を加えると、多くの場 合、かなりの数の繊毛虫が再び出現する。土壌棲の 繊毛虫を扱っている人は、デシケータ中に1ヵ月以 上保存していた乾燥土壌に、蒸留水を加えるだけで 多数の繊毛虫が出現することも経験しているであろ う。ところが、実験的に一定の乾燥条件で乾燥させ たシストや、乾燥条件を変化させたシストを用い て、乾燥耐性を調べた報告は意外に少なく、しか も、半世紀以上も昔のものがほとんどである。乾燥 条件(乾燥の過程)はその後のシストの生存にかな り重要らしい。厳密には実験していないが、私の経 験によると、古いレタス培地中でそのまま乾燥させ たシストと、古い培地を塩溶液に取り替えてから乾 燥させたシストとを比べると、古い培地で乾燥させ たシストの脱シスト率の方がいつも幾分高い。高真 空中で3日間耐えた(Taylor & Strickland, 1936)等の 乾燥の程度や、乾燥した土壌中で 49 年後でも脱シス トできた等の、乾燥状態におかれた時間についての 報告もなされており、シストが厳しい乾燥条件や長 時間にわたる乾燥状態にも耐えられることが知られ ている(Corliss & Esser, 1974 参照)。また、乾燥されて いないシストは 44℃ に1時間も耐えられないのに、 乾燥されたシストは 120℃ の乾燥した高温にごく短 時間なら耐え、乾燥した 100℃ なら1時間も耐えら れたという (Taylor & Strickland, 1936) 。シストは低 温に対しても非常に強く、ぬれた状態でもゆっくり

と冷やしていけば、液体窒素の温度までは十分耐え られるし(松坂、1971)、多分、液体ヘリウム温度 にも耐えると思われる。また、乾燥したシストでは 同じ種の栄養体よりも4倍も強い紫外線にも耐えら れるという(Corliss & Esser, 1974参照)。

このように、シストが乾燥に対する高い耐性を備 えており、乾燥したシストの高温、低温、紫外線な どに対する高い耐性が、シストを形成出来る繊毛虫 の種の維持のみならず、シストが風によって空中を 運ばれる、いわゆる「air born protozoa」と呼ばれる 現象に象徴されるように、原生動物の分布拡大にも 重要な役割を担っているものと思われる。シストの 環境耐性についての新しい報告が余りないので、 Corliss & Esser (1974)による総説およびその引用文献 が現在でも十分役に立つので、参照されたい。

## シスト形成、脱シストの誘導要因

#### ・シスト形成の誘導要因

シスト形成の誘導要因についてはこれまで色々な 環境要因が挙げられている。これらの要因について も新しい報告があまりなく、Corliss & Esser (1974)に よる総説およびその引用文献を参照されたい。挙げ られている要因のいくつかを羅列してみると、餌の 不足、過剰の餌、乾燥、塩分濃度の上昇、過密化、 老廃物の蓄積、等がある。ここに羅列した要因は、 お互いに矛盾するものもあるし、いくつもがお互い に関連し合っているものもある。いずれにせよ、誘 導要因として報告されているものは実験条件下のも のであって、自然条件下でも成り立っているとは限 らない。餌が過剰に存在することなど、自然条件下 ではほとんどないであろう。しかし、実験室での飼 育条件下では、餌を過剰に与えるとシストを形成す る場合も確かにある。私の経験でも、餌を過剰に与 えられた繊毛虫は増殖がうまくいかず、一部はシス トを形成してしまった。しかし、この場合にはシス トの形成率が低く、過剰の餌そのものがシスト形成 を誘導したと言うよりも、餌となるバクテリアや小 型の原生動物が酸素や微量成分を消費してしまった ため、あるいは、繊毛虫自身および餌生物の老廃物 の急速な蓄積によるとも考えられる。実際に、半世 紀あまり前に、ビタミン類の不足がシスト形成を誘 導するという報告がなされている (Garnjobst, 1947)。このように、シスト形成の誘導要因に関し ては半世紀も前の研究報告がほとんどで、しかも、 種の違う様々な繊毛虫を使った報告が並立している ため、正当な比較が出来るかどうかに疑問がある 等、厳密な解析ができておらず、今のところ判らな いという以外にない。

シストの研究をしている研究者の大部分は、餌を なくすことでシストを形成させており、餌不足が 様々な繊毛虫のシスト形成の誘導要因の少なくとも 一つにはなっているようである。ところが、餌がな くなりさえすれば、シストを形成するかというと、 必ずしもそうとは限らない。シストを保存している ときに、自発的に脱シストし、再びシストを形成 し、ということを繰り返したあげく、最終的には繊 毛虫が死に絶えてしまうということが時に起こる。 試しに、培養液に移すことで脱シストさせた繊毛虫 を、餌を与えることなく脱シスト直後に塩溶液に移 してシストを形成させる、ということを連続して繰 り返したところ、3~5回のサイクル後には繊毛虫は シストを形成できずに死に絶えてしまった(松坂、 未発表)。半世紀も以前の報告であるが、Didinium がシストを形成するには、飢餓に陥っていない、十 分に餌を食べているゾウリムシを適量(食べられる ゾウリムシが多いとシストを形成せず増殖する) 摂 る必要があるという(Butzel & Bolten, 1968)。シス トを形成するときには、シスト壁などの新しい構造 物を形成するが、その素材を細胞内に蓄積した物質 に依存しているとしか考えられないので、あらかじ め十分な栄養の蓄積が必要なことは当然のことであ ろう。

後に述べるように、私の使っていた棘毛目の繊毛 虫では、シスト形成が始まると最初に口器が退化す る。退化の途中で餌を与えると、口器が機能しなく なっている場合はそのままシストを形成し、機能可 能な場合はシスト形成を中止し再び増殖を始めてし まった(Nakamura & Matsusaka, 1992)。近縁の繊毛 虫でも、シスト形成の初期にある個体から、実験的 に口器を切除するとシスト形成が早まるという報告 もある(Hashimoto, 1962)。私たちが観察した数種の棘 毛目の繊毛虫でも、シスト形成の最初の段階で口器 が退化した。シスト形成時に口器が退化することは Blepharisma でも知られている(Repak, 1968)。これ らのことから、かなり強引に推論すると、食胞をあ る期間形成出来ないと口器が退化し始め、口器が機 能しなくなるまでに次の餌を摂り新たな食胞を形成 出来なければ、そのままシストを形成する、と考え ることが可能なのではなかろうか。実際、Tomaru (2002)は餌の代わりにラテックスビーズを与え、食胞 を形成させることで、一時的にではあるが、シスト 形成を抑制させている。言い換えると、食胞を形成 出来る程度の餌がなくなるとシスト形成が誘導され る、と考えても良いのではなかろうか。自然界で は、乾燥などによる水の減少は塩分濃度の上昇に も、過密化にも、餌生物の減少にもつながるであろ う。餌生物が減少すれば食胞形成に支障を来すであ ろう。コルポダ類のように、増殖シストから休眠シ ストへ移行する仲間では、他の要因も働いている可 能性もあるが、餌の欠乏がシスト形成の少なくとも 一つの重要な誘導要因になっていると考えて良いで あろう。

シスト形成を誘導する他の要因として、繊毛虫自 身から分泌される「何か」がある閾値を超えて蓄積 すると、シスト形成を誘導する可能性もある。 Yonezawa (1986)は Euplotes を用いて、繊毛虫を取り 除いた古い培養液にシスト形成の誘導活性があるこ とを示している。Tomaru (2002)もやはり Euplotes で 同様なことを報告している。私自身も、数種の棘毛 目の繊毛虫を飼育し、自発的にシストを形成させて いて、容器内に数十から数百個のシストからなるシ ストの集塊を形成する種が複数あることを見つけ た。これらの種のシスト形成過程を見ていると、早 い時期に出来たシストのそばに多くの繊毛虫が集ま り、その場でシストを形成した。この場合、最初に シストを作った個体は別として、シスト形成中、あ るいは、出来たばかりのシストから分泌される「何 か」があり、その「何か」が他の細胞を誘引し、シ スト形成を促す効果があることを否定は出来ない。 しかし、ここに述べた例は全て餌がなくなった後に シストを形成しているので、一義的には餌の不足 (飢餓) が、繊毛虫を含めた多くの原生動物の少な くとも一つの重要なシスト形成誘導要因になってお り、何らかの誘導物質が存在するとしても、補助的 な要因として作用しているのではなかろうか。

## ・脱シストの誘導要因

シスト形成の誘導要因同様、脱シストの誘導要因 に関してもほとんど判っていない。一般に餌の存在 が脱シストを誘導すると言われている。ところが逆 に、バクテリアの存在が脱シストを遅らせるという 報告 (Jeffries, 1956) もある。一般に、餌の存在が脱 シストを誘導する理由として、餌から出される「何 か」が脱シストを誘導すると説明されている。確か に、シストを新しい培養液に入れると脱シストす る。しかし、オートクレーブにかけた培養液にシス トを移した後、短時間のうちに脱シストする種も多 く、特に、コルポダ類では1時間以内にほとんどの シストは脱シストしてしまう。この時間内に餌とな るバクテリアなどが十分に増殖し、ましてや、餌生 物から出される「何か」が蓄積されるとは考えにく い。また、脱シストの誘導に用いる培養液の種類に よって、脱シストに要する時間が違うことも経験し ている。このことは、餌生物から出される「何か」 というよりも、むしろ、培養液中の微量成分が脱シ ストを誘導すると考えた方がより適切なのではなか ろうか。培養液はあくまでも実験室で使われるもの で、自然界ではあり得ない。自然界では雨などによ る水の供給があるのみである。K イオンが脱シスト を促すという報告 (Strickland & Haagen-Smit, 1947) もあり、水そのもの、あるいは、水と水に溶け出し た環境由来の成分が脱シストを促すと考えても矛盾 しない。実際、シスト、特に一度乾燥させたシスト に蒸留水を与えるだけで、かなりの数の繊毛虫が脱 シストすることを経験している。私の場合は培養液 の乾燥残渣が残っているので、完全に水のみとは言 えないが、蒸留水が脱シストを促すという報告もさ れている (Beers, 1945) 。私の経験では、乾燥した シストでは(自然界でのシストは程度の差はあるに しても乾燥していると思われる)通常使う培養液は 脱シストの誘導にはむしろ有害で、蒸留水を与えた 方が脱シスト率は高くなる場合が多い。更に、私が 使ってきた棘毛目の繊毛虫数種では、シストが入っ ている液をピペッティングなどで手荒く撹拌すると 相当数の繊毛虫が脱シストしてくる。これらのこと から、シストへの水や水とともに低分子の微量成分 の出入りが脱シストを誘導すると考えるのは、強引 過ぎるであろうか。いずれにせよ、シスト形成の誘 導要因と同様、厳密な実験結果が公表されていない 現状では、脱シストの誘導要因に関しても、今のと ころ、水が絡んでいそうだとしか言えない。

実験的に脱シストの誘導要因を検討する際に気を つけるべきことがいくつかある。シストを別の容器 に移すときには、上に述べた撹拌と同じようなこと が起こるおそれがあるし、シストが形成されればす ぐ脱シスト出来るとは限らないことである。シスト が形成されてからある時間が経たないと脱シストの 誘導要因による刺激に反応出来ないことが *S. cavicola* (Nakamura & Matsusaka, 1991)と *Burusaria truncatella* (Beers, 1948)で示されている。また、脱シストの経過 をあまり頻繁に観察すると、脱シストが遅れること がある(Nakamura & Matsusaka, 1991)ので、注意を要 する。この理由は分かっていないが、観察のための 光照射が何か悪影響を与えるのではないかと疑って いる。

## シスト形成・脱シストの形態形成

#### ・シスト形成

繊毛虫のシストはどの種でも球形あるいはそれに 近い形をとっている。しかし、栄養期の繊毛虫は球 形に近い形のものもいるが、多くは球形とはほど遠 い形態を持っている。ここでは、複雑な形態をとっ ている栄養期の繊毛虫がどのような経過をたどって 球形のシストになっていくのかを、私が長年用いて きた棘毛目の繊毛虫について述べてみる。

私が使ってきた棘毛目の繊毛虫 Sterkiella cavicola は餌を食べ尽くすと自発的にシストを形成するが、 同調性が悪く、シスト形成の経過を観察するには都 合が悪い。しかし、餌をほぼ食べ尽くした初期定常 期の細胞を、餌を含まないおよそ 0.02 M の塩溶液に 移すとかなり同調性良くシスト形成を開始する (Matsusaka, 1977)。この場合、20℃で 1.5 ~ 2 時間後 にはシスト形成の最初の兆候が見られ、4.5 ~ 5 時間 後にはほとんどの繊毛虫がシストの形態に変換す る。

初期定常期の細胞を塩溶液に移した後 20℃で 1.5~2時間経つと、細胞内に持っていた顆粒などを 細胞肛門を通じて排出し、細胞が次第に透明になっ てくる。これがシスト形成の最初の兆候であり、3 時間後にはほとんど全ての細胞が透明になってい る。このとき一部の細胞は球形になる前段階の紡錘 形になっている。紡錘形になると、その後 15~ 20 分で球形になり、球形になってからやはり 15~ 20 分でシスト壁が形成され、見かけ上シスト形成が完 了する (Matsusaka, 1979)。

透明になり始めた繊毛虫を詳しく観察すると、波 動膜がその前端部(細胞口から遠い部分)から細胞 内に吸収されることで失われ始め、その吸収は波動 膜後端部(細胞口)に向かって進行する(Nakamura & Matsusaka, 1992)。波動膜の消失が完全に終わらない うちに、囲口部の膜板がその後端部(細胞口に近い 部分)からやはり細胞内へ吸収され消失し始める。 膜板の消失は波動膜とは逆に後方から前方へ向かっ て進む(Nakamura & Matsusaka, 1992)。しかし、細胞 前端部の膜板はその後長い間吸収されず、シスト形 成の終わり近く、細胞が球形になってシスト壁が形 成され始めてから吸収される。膜板の消失がある程 度進んだ段階から、それまで扁平であった細胞の形 が背腹にふくらみ始め、同時に前後に収縮し、紡錘 形を経て最終的に球形になる。細胞が背腹にふくら み始める時期に、腹面の棘毛や背面の剛毛も細胞内 に吸収され始め、最終的には細胞体には繊毛性の器 官は全く残らない。細胞が球形になった当初はまだ 膜板の前端部や棘毛の一部は残っていて細胞の回転 運動は活発に行われている。球形の細胞が回転運動 をしている時期に、シスト壁が外側になる部分から 順に分泌され、見かけ上のシスト形成は完了する。 繊毛性の器官の最終的な消失はシスト壁がほぼ完成 した後になる。シスト壁が完成し、細胞の回転運動 が止まった細胞でも収縮胞は活発に動いており、収 縮胞の活動が止まるのは更に 1 時間以上を要する。 ここに述べた繊毛性器官の消失は、あくまで私が 使ってきた S. cavicola を含むオキシトリカ科の繊毛



図1.シストの細胞表層部の電顕写真。シスト壁が外 側からエクト、メソ、エンドシストの3層構造である ことを示す。エンドシストに抗180kD抗体染色による 金粒子の付着に注意。金粒子の付着したエンドシスト と細胞質の間の電子密度の高い部分が顆粒状層。細胞 質の電子密度が高く細胞小器官の判別が困難である。



図2.シスト形成初期の細胞質。エクトシスト前駆体 の発達段階を示す。最も初期の物は図には示されてい ない。真ん中が初期、左が中期、右が成熟期。

虫に見られるもので、ユープロテス科の繊毛虫では シストでも繊毛を保持しているし(Walker & Maugel, 1980; Matsusaka 等, 1989)、コルポダでも繊毛は残っ ている(Tibbs, 1968)。また、オキシトリカ科の繊 毛虫では繊毛のみならず繊毛基粒体も失われるが、 同じ棘毛目のウロスティラ科の繊毛虫では繊毛は失 われるが、基粒体は全てではないにしても残ってい る(Rios 等, 1985)。このように、繊毛虫のグループに よって繊毛性器官の消失の程度にはかなりの違いが ある。

シストの電子顕微鏡像は、今までに報告されたオ キシトリカ科 (Berger & Foissner 1997 の見解ではそ の内のスタイロニキア亜科に入れられる種群。原論 文中ではオキシトリカ亜科のオキシトリカ属と記載 されている場合が多い)の繊毛虫のシストはどの種 でもほぼ同様な微細構造を示している(Grimes、 1973; Walker 等, 1975; 1980; Matsusaka, 1976; Verni 等, 1984; Delgado 等, 1987 など)。即ち、シストは外側 から薄く電子密度の高い層状構造のエクトシスト、 厚く細い繊維がまばらに存在する電子密度の低いメ ソシスト、薄く電子密度が高い無構造のエンドシス トとそれぞれ呼ばれる3層のシスト壁に包まれてお り、その細胞質の電子密度は細胞小器官の識別が困 難なほど高い。最内層のエンドシストと細胞膜の間 には顆粒状の物質が詰まった顆粒状層が存在する(図 1)。顆粒状層に見られる顆粒状物質は、シスト壁を 単離して電子顕微鏡で観察するとシスト壁にも細胞 膜にも付着していないことから、おそらく固定の際 の人工産物で、シストが生きているときは水溶性の コロイド状のものであろうと思われる。完成したシ スト細胞質には繊毛性の小器官はおろか微小管すら も形態学的には認められない。しかし、細胞質中に はチュブリンは残っており、繊毛を含む微小管は脱 重合した状態で保持されている(Nakamura & Matsusaka, 1985)。

栄養期の細胞の細胞質で空胞状の構造物の中に多 数散在していた電子密度の高い正体不明の粒子が、 透明になり始めた細胞の細胞質中では少なくなって いる。この粒子はシスト形成の過程で次第にいくつ かの集塊となり、その集塊が細胞外へ排出され、減 少する。結果として、栄養期の細胞に多数あったこ れらの粒子は透明になった細胞には見られなくな る。また、この時期には内部にミトコンドリアや小 胞体などを含んだ自食胞が多数形成される。これら の自食胞の内容物は次第に不明瞭になるが、自食胞 自体は、全てではないにしても、シストが完成され ても保持されている。これらの観察は、餌を含まな い塩溶液中でのシスト形成過程で行っているので、 外からの栄養供給は考えられない。従って、シスト 形成過程では、自食による細胞内構成物の分解でシ スト壁などの新しい構造物の原料を得ているのであ ろう。

透明になり始めた細胞の粗面小胞体の中に、中程 度の電子密度を持った無構造な物質が出現し、やが て、この中に微少な電子密度の高い顆粒が充満する ようになる。その顆粒の中に電子密度の高い円盤状



図3. エクトシスト前駆体のエクソサイトーシス。で きかけているエクトシストが層状構造を取っている ことがよく分かる。



図4.シストに見られる2種類の小核。クロマチンの 細い方がシストにのみ見られる小核。

のエクトシスト前駆体が形作られる(図2)。この前駆 体は細胞表層へ移動し、細胞が球形になった後、細 胞表面を包む2枚の膜の間にエクソサイトーシスで 放出され、エクトシストを形成する(図3) (Matsusaka, 1976)。球形の細胞の細胞質内には、微細 な繊維を含んだメソシストの前駆体と考えられる紐 状の構造物と、球状で電子密度の高い無構造の物質 を含んだエンドシストの前駆体も出現する。これら 二つの前駆体がどの細胞小器官に由来するのかは今 のところ分からない。エンドシストの前駆体もエク ソサイトーシスで分泌され、エンドシストを形成す る。しかし、メソシストはエンドシストが形成され 始める頃には、エクトシストの内側にいつの間にか 形成されており、その前駆体の分泌様式は不明のま まである。従って、メソシストの前駆体はメソシス トとの構造的な類似性と、メソシストが出来た細胞 ではこの構造物が認められなくなることからの推定 で、まだ確定はしていない。エンドシストの完成 後、顆粒状層がやはりエクソサイトーシスで分泌さ れ形成されるが、顆粒状層の由来も不明のまま残さ れている。

シスト形成過程で細胞質に見られる最も際だった 変化は、栄養期の細胞質中に多数存在した空胞状の 構造がシスト形成の進行に伴い減少し、シストが完 成するとまったく認められなくなることである。こ の空胞状の構造物の消失に伴って、細胞質の電子密 度が上がるが、収縮胞が動いている間はミトコンド リアなどの細胞小器官の識別は容易である。その後 数時間経って、成熟したと考えられるシストの細胞 質は細胞小器官の見分けが難しいほどに電子密度が 高くなっている(図1)。細胞質の電子密度の増加は、

シスト形成の最終段階であるシスト壁が出来た後も 1時間以上も収縮胞の活動が続くことから判断し て、細胞質の脱水によるものと考えている。多くの シスト研究者はシストがかなりの脱水状態にあると 考えており、そのように記載している人もあるが、 実際にシストの細胞質と栄養体の細胞質の水分量を 比較した報告は、私の知る限り、ない。栄養期の細 胞で散在していたミトコンドリアは、シスト形成後 期の細胞が紡錘形を取り始める頃から集合を始め、 成熟シストではいくつかの集塊を形成して、シスト 細胞質の表層部に位置するようになる(Grimes, 1973; Matsusaka, 1976; 1979, Matsusaka 等, 1984)。また、栄 養期では4葉に分かれていた大核は通常1つにまと まり、紐状のクロマチンが次第に太さを増し、球形 になった細胞ではいくつかの大きな集塊となる。そ の集塊が再び分散して、成熟シストでは小球状にな る。複数個ある小核は目立った構造変化を示さない が、大核のものに比べると元々細い紐状であったク ロマチンが、更に細く凝縮した小核が (図4)1個体 当たり少なくともいくつかは認められる。残りの小 核のクロマチンは栄養期の小核と同様な太さの紐状 を呈している。これら2種類の小核の存在意義は今 のところ判らない。しかし、私達が観察した数種の スタイロニキア亜科の繊毛虫のシストでも共通して このような2種類の小核が認められた(Kikukawa & Matsusaka, 1996)。また、後に述べる 140kD のタン パク質が、私たちが使っていた繊毛虫のみならず、 私たちが観察した全てのスタイロニキア亜科の繊毛 虫のシストでも、細いクロマチンを持ったシスト小 核にのみ存在すること (Kikukawa & Matsusaka, 1996)から、このタンパク質は系統を同じくする種

群で保存されており、共通の機能を持っていると考 えられる。

## ・脱シスト

脱シストの過程についても多くの報告があるが、 いずれもシストを培養液に移すことで脱シストを誘 導している。私が使っていた繊毛虫では、25℃で脱 シスト誘導後 15 分を過ぎる頃から収縮胞の活動が始 まる。生きたシストを通常の顕微鏡で観察している 限りは、収縮胞の出現が脱シストの最初の兆候であ る。しかし、電子顕微鏡による観察で、シストを培 養液に移すとごく短時間(5分程度)のうちに細胞 表層部で基粒体の形成が始まる(Matsusaka 等、 1984)。この時常に数個の基粒体が同時に見つか る。プロタルゴール染色したシストでは、収縮胞の 出現の前後に基粒体の形成が認められるようにな る。この時点では基粒体の集団が数個認められる。 基粒体の形成が一カ所で始まるのか、複数箇所で始 まるのかは、プロタルゴール染色では分解能と染色 汚れの問題で、電子顕微鏡観察では視野の狭さの問 題ではっきりはしていない。しかし、電子顕微鏡観 察でもかなり高頻度で初期の基粒体が見つかること から、多分、接近した複数箇所で基粒体の形成が始 まるものと考えている。その後、これらの基粒体の 集団が更に集まり、囲口部の膜板帯の原基を形成す る。囲口部の膜板帯原基が出来た後は二分裂時の形 態形成と同様に、波動膜の原基、棘毛の原基が形成 され、シスト壁内部で栄養期の繊毛性器官配列が完 成し、シスト壁を破って泳ぎ出てくる (Hashimoto, 1963; Grimes, 1973; Calvo 等, 1988) 。

私が使ってきた繊毛虫では、先に述べたようにシ ストには繊毛はおろか基粒体すらも存在しない。 従って、脱シストに際して基粒体はまったく新しく 形成される。基粒体あるいは中心体の新生時に知ら れている形成中心に相当する構造物は、ずいぶん探 したが、今のところ見つかっていない。また、脱シ スト時の基粒体の新生はシクロヘキシミド存在下で も起こるので(Matsusaka 等, 1984)、この過程での 基粒体新生は、全てではないにしても、タンパク質 合成なしで先に述べたチュブリンプールを使って行 われると考えられる。いくつかの報告によると、球 形で基粒体すらも存在しないシストでも、細胞の極 性や繊毛性器官の位置情報はどうやら保存されてい るらしい。ダブレットから形成されたシストからは ダブレットが脱シストしてくるし、脱シストしたダ ブレットの極性はシスト形成以前のものと同じで あった(Hammersmith, 1976; Jareño, 1981)。更に、 腹面の棘毛が余分に存在し、背面剛毛列数も多い繊 毛虫が形成したシストからは、腹面の棘毛配列は正 常に戻るが、背面の余分な剛毛列数は多いまま保存 された繊毛虫が脱シストしたという(Hammersmith & Grimes, 1981)。このことから、繊毛性器官の位置 情報は少なくとも背腹2カ所に存在すると想像され ている。この位置情報がシストのどこに存在するの かははっきりしていない。Jareño & Tuffrau (1979)は シストの大核から「茎」が細胞表層へ伸び、「茎」 が到達した細胞表層から更に繊維が伸びて、その繊 維に位置情報が担われていることを示唆している。

一方、Hashimoto (1963) はシストの細胞表層に二極に 収斂する繊維状構造の存在を示し、その構造の存在 する細胞表層に繊毛性器官の位置情報が存在するの ではないかとしている。また彼は細長い異常なシス トを形成させ、異常なシストに極性が保存されるこ とを示している (Hashimoto, 1964)。後に Grimes (1973) は電子顕微鏡でシストの細胞表層に溝を見つ け、シストの連続切片からこの溝が少なくとも一つ の極に収斂していることを示し、Hashimoto (1963)の 言う繊維状構造はシストの細胞表層に存在する溝で あろうとしている。この溝の形成過程については今 のところまったく分かっていないが、私もフリーズ フラクチャー法で溝が少なくとも一つの極には収斂 していることを観察している(松坂、未発表)。シ スト形成の最後に近いステージまでは少なくとも前 後軸は存在しているので、極を持った溝が細胞の軸 と関わりがあることは考えられるであろう。

#### 細胞化学的・生化学的・分子生物学的な知見

#### ・シスト壁

繊毛虫のシスト壁の構成成分に関する報告はきわ めて少ない。シスト形成にタンパク質の分解や合成 を伴っているという報告 (Matsusaka, 1979, Gutiérrez & Martín-González, 1990)から、シスト壁の構成成分 にタンパク質が含まれるであろうことは十分に想像 される。Tibbs (1966) が Colpoda steini のシスト壁 がグルタミン酸に富んでいることを報告したもの が、おそらく最初の化学的な存在証明であろう。そ の後、彼は同じ種のシスト壁のタンパク質がポリア ミンと共有結合をしていると報告している (Tibbs, 1982)。酵素による消化実験を含む細胞化学的な観 察から、S. cavicola のシスト壁にタンパク質と多糖類 とが含まれていることが分かっている(Matsusaka & Hongo, 1984)。Colpoda inflata でも阻害実験からシス ト壁に糖タンパク質が存在するという報告がなされ ている (Benitez 等, 1991; 1992; Martin-Gonzalez 等, 1991)。しかし、繊毛虫のシスト壁を完全に溶解す ることが非常に難しく、SDS-PAGE 等による分析も 上に述べた種の他 Paraurostyla (Rios 等, 1989)、



図5.シスト小核の免疫電顕写真。細いクロマチン部分に抗 140 kD 抗体染色による金粒子の付着が見られる。



図6.シスト形成過程の抗140kD 抗体によるイムノブ ロット。図の下の数字はシスト形成を誘導してからの 期間(単位:時間)。誘導後6時間で大部分の繊毛虫 が見かけ上シストになっていた。シスト形成の最終段 階の細胞が球形になってから140kD タンパク質が出 現することを示す。



図7.脱シスト過程での抗140kD 抗体によるイムノブ ロット。図の下の数字は脱シスト誘導後の期間(単 位:時間)。3時間後にはほとんどの個体が脱シスト していた。脱シスト直後の細胞にはまだ140kD タンパ ク質が存在することを示す。

Blepharisma (Suizu & Matsuoka, 1998)など限られた種 でしか行われていない。私たちの報告で(Matsusaka & Hongo, 1984)、シスト壁には SDS-PAGE で分離され る少なくとも8本のバンドが存在することが示唆さ れた。この内、見かけ上の分子量 180 kD のバンドに 対する抗体を作成し、免疫電子顕微鏡的な観察を 行った所、このタンパク質がシスト壁の最内層であ るエンドシストに存在することが明らかになった(図 1)。更に、ウェスタンブロット後のフィルターを PAS 染色するとこのバンドは強い陽性を示し、糖タ ンパク質であることも分かっている。また、このバ ンドは SDS-PAGE 後のゲルを通常のクマジーブルー で染色した場合はぼんやり染まる幅の広いバンドと して認められるが、転写後の PAS 染色ではしばしば 2~3本のバンドに分かれているように見えた。

180 kD のタンパク質に対する抗体を用いた免疫電 子顕微鏡法による調査で、この抗体がオキシトリカ 科の繊毛虫、特にスタイロニキア亜科の繊毛虫のシ ストでエンドシストを認識することが分かった (Kikukawa & Matsusaka, 1966)。このことは、少な くともこのペプチドが系統を同じくする繊毛虫グ ループ内で保存されており、共通の機能を持ってい ることを示唆している。シストに共通する機能とい う観点に立てば、第一に考えられるのは不都合な環 境条件に対する耐性であろう。全くの推測の域を出 ないが、180 kD の糖タンパク質はシスト壁に構造 的・化学的な丈夫さを与え、シストを機械的に保護 しているのではないかと考えている。このことを確 かめるためには、エクトシストおよびメソシストの 構成成分を明らかにし、それらとの協調作用を明ら かにする必要があろう。メソシストには 54kD のタン パク質が存在するようであるが (Himura & Matsusaka, 1993)、はっきりしていない。エクトシスト は、どうやらかなり高分子のタンパク質からなって いるらしいというところまでは分かっているし、ペ プシンによる分解に強い抵抗性があることも分かっ ているが(松坂・本郷、未発表)、詳しいことは分 かっておらず、今後の研究が待たれる。

#### ・核

シスト壁画分の SDS-PAGE によって見いだされた 見かけの分子量 140 kD のタンパク質は、当初状況証 拠からエクトシストに存在すると考えていた。この タンパク質に対しても抗体を作成し、免疫電子顕微 鏡的に検索したところ、このタンパク質はシスト壁 ではなく、シストの小核に特異的に存在することが 明らかになった (図5) (Himura & Matsusaka, 1993)。 その後、詳しく観察した結果、このタンパク質はシ ストの小核のうち、細く凝縮したクロマチンを持つ



図8.シスト形成最終段階のシスト壁3層が全て形成 されている個体の小核。クロマチンの一部が細く凝縮 している。凍結置換固定をした個体のため、氷晶によ る細胞質の破壊が多少見られるが、細いクロマチンの 部位に免疫電顕の金粒子が見られる。



図9.脱シスト直後の個体の小核。細く凝縮したクロ マチンが残っている。

小核のクロマチン部分に特異的に存在すること (Kikukawa & Matsusaka, 1996)、シスト形成の最終段 階の細胞が球形になった時期に出現し(図6)(Himura & Matsusaka, 1993)、脱シスト直後まで存続すること (図7) が明らかになった (Oda & Matsusaka, 2004a, b)。更に、140 kD のタンパク質に対する抗体を用い た免疫電子顕微鏡的な調査で、この抗体が、オキシ トリカ科スタイロニキア亜科の繊毛虫のシストで凝 縮した細いクロマチンを持つ小核のクロマチンを認 識することが分かった(Kikukawa, & Matsusaka, 1996)。更に、私たちの材料では、シスト形成の最終 段階であるシスト壁が完成した細胞で、小核のクロ マチンの一部が細く凝縮しているものが見つかるこ と(図8)、脱シスト直後の個体でも同様な小核が あること(図9)が分かってきている。これらのこ とは、少なくともこのタンパク質が同じ系統の繊毛 虫グループ内で保存されており、小核のクロマチン 凝縮に関わっていると考えても良さそうである。シ スト壁の項でも述べたが、シストに共通する機能と して第一に考えられるのは環境ストレスに対する耐 性であろう。140 kD のタンパク質はシストの小核ク ロマチンを凝縮させ、そのことで小核 DNA を乾燥や 紫外線といった環境ストレスから保護しているので はないかと想像している。しかし、繊毛虫で遺伝子 発現などの重要な機能を持っている核は、むしろ大 核であり、なぜ小核なのか、多少の疑問も残る。多 くの繊毛虫で、シスト形成に伴って大核のクロマチ ンは際だった形態変化を示す(形態形成の項参

照)。このことは大核にも小核の 140 kD タンパク質 と同じようなタンパク質が存在する可能性を強く示 唆しているのではなかろうか。この点を明らかにす べく、シストの大核のタンパク質についても多少調 べては見たが、今のところ否定的な結果しか出てい ない。シスト形成時に目立った形態変化を示す大核 で DNA の脱メチル化が起こること (Palacios 等, 1994)や DNA の結晶様構造が現れること (Gutiérrez 等, 1998; 2001)等も報告されている。これらの報告 を十分に考慮して、小核の 140 kD に類似のタンパク 質の検索を含め、将来の分子生物学的な解析が必要 である。

シスト形成に関する分子生物学的な解析はスペイ ンの Gutiérrez 一派が行いつつあるが (Gutiérrez 等, 2001)、まだはっきりした結果は報告されていな い。彼らは、シスト形成にはタンパク質合成や RNA 合成を伴うという報告を裏付けるように、シストに mRNA が存在することを見つけてはいる (Benitez & Gutiérrez, 1997)。しかし、その mRNA がシスト形成 時に働いたものの残余であるのか、脱シスト時に働 くものであるのかはまだはっきりしていない (Gutiérrez 等, 2001)。脱シストに関しても Villalobo 等 (2001)が脱シスト時に働く調節遺伝子を見つけた という報告以外は知らない。シスト形成を研究して いる研究者の絶対数が少なく、様々な課題が残され たままになっており、今後若い研究者がこの分野に 参加されることを期待する。

## 謝辞

北海道大学低温科学研究所で、繊毛虫の耐凍性の 研究から始まったシスト形成を研究をいつの間にか 30 年余り続けてきた。この間、熊本大学理学部生物 学科・生物科学科・環境理学科と私の所属は変わっ てきたが、いつも卒業研究や修士論文の研究、博士 論文の研究などの学生諸君が私の研究室に所属して くれ、様々な研究に携わってくれた。この小論を書 くに当たって、彼らの出してくれたデータや彼らと のディスカッションが非常に役に立っている。学生 諸君個々の名前は挙げないが、ここに彼らへの感謝 の意を表したい。

## 参考文献

- 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 *Burusaria* truncatella. Biol. Bull., 94: 86-98.
- Benítez, L. & J. C. Gutiérrez, 1997. Encystment-specific mRNA is accumulated in the resting cyst of the ciliate *Colpoda inflata*. Biochem. Mol. Biol. Intnl., 41: 1137-1141.
- Beniíez, L., A. Martín-González & J. C. Gutiérrez, 1991. Protein glycosylation has an important role in the encystment process of the ciliate *Colpoda inflata*. Cell Biol. Intnl. Rep., 15: 221-228.
- Benítez, L., G. Palacios, A. Martín-González & J. C. Gutiérrez, 1992. Protein glycosylation in ciliate cryptobiosis. *In* Recent advances in cellular and molecular biology, 1<sup>st</sup> World Congress of C. M. B., Paris, Peeters Press, Leuver, Belgium.
- Berger, H. & W. Foissner, 1997. Cladistic relationships and generic characterization of Oxytrichid hypotrichs (Protozoa, Ciliophora). Arch. Protistenkd., 148: 125-155.
- Bradbury, P. C.1987. Protozoan adaptations for survival. *In* Survival and dormancy of microorganisms. pp. 267-299. Henis, Y. ed. Wiley & Sons, New York
- Butzel, H. M. Jr. & A. B. Bolten, 1968. The relationship of the nutritive state of the prey organism *Paramecium aurelia* to the growth and encystment of *Didinium nasutum*. J. Protozool., 15: 256-258.
- Calvo, P., J. Martin, P. Delgado & A. Torres, 1988. Cortical morphogenesis during excystment in *Histriculus similis* (Hypotrichida: Oxytrichidae). J. Protozool., 35: 177-181.
- Corliss, J. O. & S. C. Esser, 1974. Comments on the role

of the cyst in the life cycle and survival of freeliving protozoa. Trans. Amer. Micros. Soc., 95: 578-593.

- Delgado, P., P. Calvo & A. Torres, 1987. Encystment in the hypotrichous ciliate *Paraurostyla weissei*: Ultrastructure and cytochemistry. J. Protozool., 34: 104-110/
- Garnjobst, L.1947. The effect of certain deficient media on resting cyst formation in *Colpoda duodenaria*. Physiol. Zool., 20: 5-14.
- Grimes, G. W. 1973. Differentiation during encystment and excystment in *Oxytricha fallax*. J. Protozool., 20: 92-104.
- Gutiérrez, J. C. & A. Martín-González, 1990. Evidence for protein degradation and synthesis during encystment of the ciliate *Colpoda inflata*. Microbios Lett., 43: 57-63.
- Gutiérrez, J. C., A. Martín-González & T. Matsusaka, 1990. Towards a generalized model of encystment (cryptobiosis) in ciliates: a review and a hypothesis. BioSystems, 24: 17-24.
- Gutiérrez, J. C., A. Martín-González, & S. Callejas, 1998. Nuclear changes, macronuclear chromatin reorganization and DNA modifications during ciliate encystment. Europ. J. Protistol., 34: 97-103.
- Gutiérrez, J. C., S. Callejas, S. Boniquel, L. Benítez & A. Martín-González, 2001. Ciliate cryptobiosis: a microbial strategy against environmental starvation. Int. Microbiol., 4: 151-157.
- Hammersmith, R. L. 1976. The redevelopment of heteropolar doublets and monster cells of *Oxytricha fallax* after cystment. J. Cell Sci., 22: 563-573.
- Hammersmith, R. L. & G. W. Grimes, 1981. Effects of cystment on the cells of *Oxytricha fallax* possessing supernumerary dorsal bristle rows. J. Embryol. Exp. Morph., 63: 17-27.
- Hashimoto, K. 1962. Relationships between feeding organelles and encystment in *Oxytricha fallax* Stein. J. Protozool., 9: 161-169.
- Hashimoto, K. 1963. Formation of ciliature in excystment and induced re-encystment of *Oxytricha fallax* Stein. J. Protozool., 10: 156-166.
- Hashimoto, K. 1964. Localization of ciliary primordia in induced abnormal cysts of *Oxytricha fallax*. J. Protozool., 11: 75-84.
- Himura, M. & T. Matsusaka, 1993. Appearance of two polypeptides during encystment in the stichotrich ciliate, *Histriculus cavicola*. Zool. Sci., 10: Suppl., 150. (Abstract).

- Jareño, M. A. 1981. Doubletes homoporares en Onychdromus acuminatus. Microbiol. Españ., 34: 45-60.
- Jareño, M. A. & M. Tuffrau, 1979. Le positionnement des primordiums cinétosomiens et la morphogenese sous kyste chez le cilié hypotriche Onychdromus acuminatus. Protistologica, 15: 597-605.
- Jeffries, W. B. 1956. Studies on excystment in the hypotrichous ciliate *Pleurotricha lanceolata*. J. Protozool., 3: 136-144.
- Kikukawa, M. & T. Matsusaka, 1996. Immunological characteristics of the cysts reflect the phylogenetic relationships of the stichotrich ciliates. Zool. Sci., 13: Suppl. 33. (Abstract).
- Martín-González, A., L, Benítez, N. Cortadellas & J. C. Gutiérrez, 1991. Detection of antigenic cyst wall elements in *Colpoda inflata*: An immunoelectron microscopic study and immunoblotting identification of cyst wall polypeptides. Cell. Mol. Biol., 37: 21-27.
- 松坂理夫 1971. 下毛目繊毛虫 *Pleurotricha* sp. の栄養 体と嚢子の耐凍性 低温科学 生物篇 29: 113-119.
- Matsusaka, T. 1976. An ultrastructural study of encystment in the hypotrichous ciliate *Pleurotricha* sp. Kumamoto J. Sci., Biol., 13: 13-26.
- Matsusaka, T. 1977. Induction of synchronous encystment in a hypotrichous ciliate, *Histriculus* sp. Exp. Cell Res., 110: 459-462.
- Matsusaka, T. 1979. Effect of cycloheximide on the encystment and ultrastructure of the ciliate, *Histriculus*. J. Protozool., 26: 619-625.
- Matsusaka, T. & F. Hongo, 1984. Cytochemical and electrophoretic studies on the cyst wall of a ciliate, *Histriculus muscorum* Kahl, J. Protozool., 31: 471-475.
- Matsusaka, T., T. Nakamura & K. Nagata, 1984. Ultrastructure, disintegration and formation of a cirrus in the vegetative, encysting and excysting ciliate, *Histriculus muscorum*. J. Electron Microsc., 33: 217-229.
- Matsusaka, T., O. Noguchi & F. Yonezawa, 1989. Cortical morphogenesis during encystment in a ciliate, *Euplotes encysticus* Yonezawa, 1985. Europ. J. Protistol., 24: 133-137.
- Nakamura, T. & T. Matsusaka, 1985. Presence of a tubulin pool in the resting cyst of the hypotrich ciliate, *Histriculus muscorum*. Cell Biol. Intnl. Rep., 9: 965-969.
- Nakamura, T. & T. Matsusaka, 1991. Effects of cyst age on excystment of the ciliate *Histriculus cavicola* (Kahl,

1935) (Ciliophora: Stichotrichia). Europ. J. Protistol., 27: 375-380.

- Nakamura, T. & T. Matsusaka, 1992. Reversibility of encystment in the ciliate, *Histriculus cavicola* (Kahl, 1935) (Ciliophora: Stichotrichia). Europ. J. Protistol., 28: 51-55.
- Oda, A. & T. Matsusaka, 2004. Appearance and disappearance of 140kD protein specific to the cyst phase micronuclei of the ciliate, *Sterkiella cavicola*. Zool. Sci., 21: 1276. (abstract).
- Oda, A. & T. Matsusaka, 2004. Appearance and disappearance of the 140kD protein of the ciliate, *Sterkiella cavicola*, and the ultrastructural changes of micronuclear chromatins during encystment and excystment. Jpn. J. Protozool., 38: 33-35.
- Palacios, G., A. Martín-González & J. C. Gutiérrez, 1994. Macronuclear DNA demethylation is involved in the encystment process of the ciliate *Colpoda inflata*. Cell Biol. Intnl., 18: 223-228.
- Repak, A. J. 1968. Encystment and excystment of the heterotrichous ciliate *Blepharisma stoltei* Isquith. J. Protozool., 15: 407-412.
- Rios, R. M., A. Torres, P. Calvo & C. Fedriani, 1985. The cyst of *Urostyla grandis* (Hypotrichida: Urostylidae): Ultrastructure and evolutionary implications. Protistologica, 21: 481-485.
- Rios, R. M., R. Sarmiento, A. Torres & C. Fedriani, 1989. Solubilization and electrophoretic studies of cyst wall proteins of a hypotrich ciliate. Biol. Cell., 67: 271-279.
- Strickland, A. G. R. & A. J. Haagen-Smit, 1947. Chemical substances inducing excystment of the resting cysts of *Colpoda duodenaria*. J. Cell. Comp. Physiol., 30: 381-390.
- Suizu, F. & T. Matsuoka, 1998. Biochemical analysis of cyst formation in unicellular *Blepharisma*. Cytobios, 90: 157-163.
- Taylor, C. V. & A. G. R. Strickland, 1936. Effects of high vacua and extreme temperatures on cysts of *Colpoda cucullus*. Physiol. Zool., 9: 15-26.
- Tibbs, J. 1966. The cyst wall of *Colpoda steini*. A substance rich in glutamic acid residues. Biochem. J. 98: 645-651.
- Tibbs, J. 1968. Fine structure of *Colpoda steini* during encystment and excystment. J. Protozool., 15: 725-732.
- Tibbs, J. 1982. Covalent bonding of protein to polyamine in the cyst coat of the protozoan *Colpoda steini*. Europ. J. Biochem., 122; 535-539.

- Tomaru, A. 2002. Encystment-inducing factors in the ciliate *Euplotes elegans*. Zool. Sci., 18: 741-746.
- Verni, F., G. Rosati & N. Ricci, 1984. The cyst of *Oxytricha bifaria* (Ciliata Hypotrichida). II. The ultrastructure. Protistologica, 20: 965-969.
- Villalobo, E., C. Moch, R. Perasso & A. Baroin-Tourancheau, 2001. Searching for excystmentregulated genes in *Sterkiella histriomuscorum* (Ciliophora, Oxytrichidae). A mRNA differential display analysis of gene expression in excysting cells. J. Euk. Microbiol., 48: 382-390.
- Wagtendonk, W. J. van. 1955. Encystment and excystment of protozoa. *In* Biochemistry and physiology of protozoa. Vol. II. pp. 85-90. Hunter, S. H. & A. Lwoff, eds. Academic Press, New York

- Walker, G. K. & T. K. Maugel, 1980. Encystment and excystment in hypotrich ciliates. II. *Diophris scutum* and remarks on comparative features. Protistologica, 16: 525-531.
- Walker, G. K., T. K. Maugel & D. Goode, 1975. Some ultrastructural observations on encystment in *Stylonychia mytilus* (Ciliophora: Hypotrichida). Trans. Amer. Micros. Soc., 94: 147-154.
- Walker, G. K., T. K. Maugel & D. Goode, 1980. Encystment and excystment in hypotrich ciliates I. *Gastrostyla steinii*. Protistologica, 16: 511-524.
- Yonezawa, F. 1986. Effect of various cell-free fluids on encystment in *Euplotes encysticus* (Ciliophora). J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B. Div. 1, 32: 245-254.