

繊毛虫コルポーダ (*Colpoda cucullus*) の休眠シスト形成：  
シスト形成誘導における  $\text{Ca}^{2+}$  の役割について

明松 隆彦<sup>1,2</sup>, 木田 明美<sup>1</sup>, 松岡 達臣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>高知大・理・生物科学, <sup>2</sup>金沢大・院自然・生命科学)

The role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the formation of resting cysts in the ciliated protozoan  
*Colpoda cucullus*

Takahiko AKEMATSU<sup>1,2</sup>, Akemi KIDA<sup>1</sup> and Tatsuomi MATSUOKA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Inst. Biol., Fac. Sci., Kochi Univ. <sup>2</sup>Div. Life Sci., Grad. Sch. of Natural Sci. and Technol., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

Resting cyst formation in *Colpoda cucullus* is caused by an increase in external  $\text{Ca}^{2+}$  or by overpopulation of *Colpoda*. This study aimed to elucidate whether encystment is mediated by the interaction of external  $\text{Ca}^{2+}$  with certain receptors located on the cell surface, or by  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins that are activated by the  $\text{Ca}^{2+}$  flowing into the cytoplasm. We found that adding calcium channel blockers ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ), EGTA and BAPTA in the surrounding medium suppressed  $\text{Ca}^{2+}$ -induced encystment, while adding the calcium ionophore A23187 tended to promote  $\text{Ca}^{2+}$ -induced encystment. We also found that overpopulation-mediated encystment was also suppressed by EGTA and BAPTA. These results suggest that an increase of external  $\text{Ca}^{2+}$  or overpopulation of *Colpoda* cells may elicit an inflow

of  $\text{Ca}^{2+}$ , which may activate the signaling pathway for encystment.

**[目的]** 土壌性繊毛虫コルポーダ (*Colpoda cucullus*) は、陸上環境への適応戦略として、乾燥、高温および低温耐性をもつ休眠シストを形成する<sup>(1,2)</sup>。コルポーダの休眠シスト形成は、外液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇 (乾燥予知シグナル) やコルポーダ密度を高く保つことによって誘導される<sup>(3)</sup>。本研究では、外液  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞膜上の受容体に作用するのか、あるいは細胞内に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  がシスト形成のシグナル伝達経路の活性化に関与するのかについて、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤、 $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤、 $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアを用いて検討した。

**[方法]** コルポーダは、バクテリア (*Enterobacter aerogenes*) を植え付けた 0.05% 麦葉浸出液で培養した。シスト形成の誘導実験では、1~2 日間培養した栄養細胞を遠心 (1,000 g, 2 分) して集め、1 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) で 2 回洗浄後 (1,000 g, 2 分)、各テスト溶液 (200  $\mu\text{L}$ ) に低密度 (500 ~ 1,000 細胞 / mL) または高密度 (5,000 ~ 10,000 細胞 / mL) で懸濁した。シスト形成率の計測は実体顕微鏡下で行い、誘導後 8 時間まで観察した。BAPTA-AM [ethylenebis(oxy-21-phenylenitrilo)tetraacetic acid tetra(acetoxymethyl) ester] は DMSO に溶解して 10 mM 原液を作成し、これを 1000 倍希釈してテスト液中の最終濃度が 10  $\mu\text{M}$  (DMSO の最終濃度は 0.1%) になるようにした。A23187 の場合は、DMSO に溶解して 1 mM 原液を作成し、これを 1000 倍希釈して用いた。

**[結果と考察]** まず、シスト形成を誘導することが報告されている塩類 ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ) について<sup>(3)</sup>、その有効濃度 ( $10^{-3}$  ~  $10^{-6}$  M) を調べた。この結果、 $\text{Ca}^{2+}$  は低濃度でも顕著なシスト形成誘導効果を示したが ( $10^{-5}$  M 以上の濃度において 70% 以上のシスト化)、 $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$  の場合は、1 mM 以下の濃度では顕著な効果はみられなかった。この結果は、 $\text{CaCl}_2$  溶液の作用が  $\text{Cl}^-$  ではなく  $\text{Ca}^{2+}$  に起因す

ることも示している。つぎに、 $\text{Ca}^{2+}$  が細胞外から作用するのか、細胞内に拡散して作用を及ぼすのかについて低密度条件下で検討した。まず、各種タイプの  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに対する特異性が低いチャンネル阻害金属イオン ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) および L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤であるベラパミル、ジルチアゼムを用いて、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的シスト化誘導が抑制されるかどうかを調べた。この結果、 $\text{Mn}^{2+}$ 、ベラパミル、ジルチアゼムは効果がなかったが、 $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  は阻害効果が認められた。

$\text{Ca}^{2+}$  を加えていない 1 mM Tris-HCl (pH 7.2) [ $\text{Ca}^{2+}$ -free 緩衝液] にも、わずかに  $\text{Ca}^{2+}$  が混入していると考えられるが、この液に栄養細胞を懸濁した場合でもわずかにシスト形成がおきる (自発的シスト化)。この液に最終濃度が 0.01 mM になるように EGTA を加えると [ $10^{-6}$  M  $\text{Ca}^{2+}$  が混入していると仮定した場合 EGTA の添加により  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は約  $10^{-8}$  M になる]、シスト形成は抑制された。 $\text{Ca}^{2+}$ -free 緩衝液中で細胞を高密度に保つことによって誘導されるシスト形成も、0.01 mM EGTA の添加により抑制された。0.01 mM (最終濃度) BAPTA-AM (細胞内に入ると BAPTA となりキレート能を有する) も自発的シスト化および過密誘導によるシスト化を抑制した。一方、 $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォア A23187 存在下 (最終濃度 1  $\mu\text{M}$ ) では、シスト形成の促進効果がみられた。これらの結果は以下のことを示唆している。(1) コルポーダの細胞膜は  $\text{Ca}^{2+}$  に対する透過性が大きいため、外液  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度上昇により  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介して細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  の拡散がおきる。(2) コルポーダの過密によるシスト化誘導は、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する膜の透過性の増大と関係がある。

#### [文献]

- 1) Watoh et al., (2003) Jpn. J. Protozool. 36, 105-111.
- 2) Maeda et al., (2005) J. Protozool. Res. 15, 7-13.
- 3) Yamaoka et al., (2004) Acta Protozool. 43, 93-98.