

繊毛虫コルポーダにおけるクリプトビオシスの分子機構

有川幹彦・松岡達臣

はじめに

土壤中に生息する微生物は、一時的に出現する水環境に驚くほどうまく適応している。土壌性繊毛虫コルポーダ *Colpoda cucullus* Muller は、水たまりなどの水環境では運動性をもつ増殖型細胞（栄養細胞）として生息しているが、乾燥につながるような環境の変化を感知すると短時間で乾燥耐性をもつ無代謝型細胞（休眠シスト）に変化する。このような細胞状態をクリプトビオシスと呼ぶ。降雨などにより水環境が出現すると、再び増殖型細胞となってシストから脱出し、細胞分裂を繰り返して増殖する（図1, 松岡 2007）。我々は、コルポーダのクリプトビオシスを分子の言葉で説明することを目標とし、コルポーダのシスト形成/脱シスト過程に関わる環境因子、および分子機構について広く研究を行ってきた。本発表では、コルポーダのシスト形成過程に焦点を当て、1) シスト形成を誘導する環境因子、2) 細胞内微細構造の変化とシスト壁の構築、3) シスト形成に関わるシグナル伝達系、そして4) シスト形成に関わる遺伝子およびタンパク質発現解析について得られた最近の知見を紹介する。

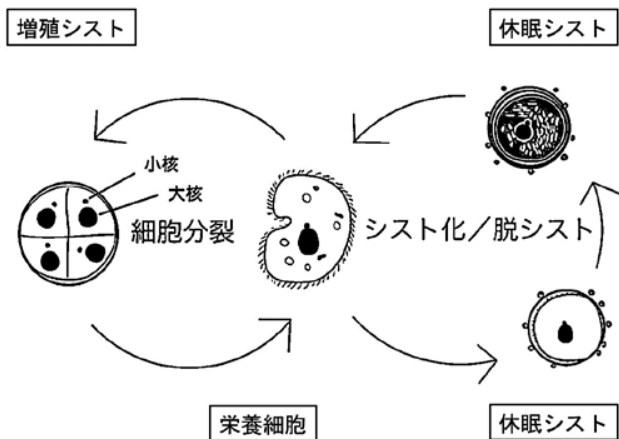


図1. コルポーダの生活史。コルポーダは、生存に適した環境では増殖シスト期を介した細胞分裂を繰り返す（増殖サイクル）。水環境が悪化してくると休眠シスト形成が誘導され、適した水環境が回復すると栄養細胞となり休眠シストの殻を破って泳ぎ出してくる（シスト化/脱シストサイクル）。

1) シスト形成を誘導する環境因子

土壌表層部で生活するコルポーダにとって乾燥は致死的である。したがって、コルポーダは水が干上がる前にこれを感知し、素早くシストを形成しなければならない。実験室では、細胞外液中に Ca^{2+} (0.1 - 1.0 mM) を添加することにより容易にシスト形成を誘導することができる (Watoh *et al.* 2003)。また、細胞密度を高くして細胞同士が物理的に接触する頻度を上げることによってもシスト形成を誘導できる (Maeda *et al.* 2005)。我々

の研究グループでは、コルポーダのこのような性質を利用して、 Ca^{2+} / overpopulation によるシスト形成誘導法を確立している。すなわち、遠心操作により過密状態にしたコルポーダ懸濁液に終濃度が 0.1 - 1.0 mM となるように Ca^{2+} を添加すると、数時間のうちに細胞は丸くなって運動性を失い、シャーレの底に張り付いてシスト化する。普段、実験室で行っているシスト研究には、このようにして人為的に誘導したシストを用いている。最近の研究において、培養液の温度を上げることでシスト形成が誘導されることを見出した。コルポーダは、25°C一定の培養条件では栄養細胞のままであるのに対し、培養温度を 30°C に上昇させると 2, 3 時間でシスト形成が誘導される (未発表)。これにより、シスト形成を誘導する因子として温度も含まれることが明らかになった。これらの実験結果より、自然界においては、太陽熱による水温上昇、および水分の蒸散による外液 Ca^{2+} 濃度と細胞密度の上昇がコルポーダのシスト形成を誘導すると考えられる。コルポーダはこれらの環境の変化を乾燥予知シグナルとして受容した後、速やかに休眠シストとなって乾燥から身を守るのである。

2) 細胞内微細構造の変化とシスト壁の構築

コルポーダのシスト形成過程では、時間の経過とともに、細胞の内外において劇的な変化が認められる。巨視的には、シスト形成誘導後 2, 3 時間のうちに、繊毛が細胞内に吸収されて消失し、それまで活発に遊泳していたソラマメ型の栄養細胞が球形になって運動性を失いシャーレの底面に固着する (Watoh *et al.* 2005)。微視的には、細胞内において、ミトコンドリアの膜電位が消失して活動が停止し、その後、断片化する。また、大核より多数のクロマチン粒子が放出され、続いて巨大クロマチン塊が放出される。さらには、断片化したミトコンドリアや放出されたクロマチン塊は、オートファゴソームに取り込まれてリソソームの融合により消化される (Funatani *et al.* 2010)。一方、細胞表面においては、シスト形成誘導後数時間のうちに、ムコシストと呼ばれる液胞から粘液物質が細胞外に分泌され、その後、レピドソームと呼ばれる微細繊維を含む小球体が分泌されて細胞表面を覆う。これらはシスト同士の接着、あるいはシャーレ底面への固着に役立っていると考えられる (Kida & Matsuoka 2006, Watoh *et al.* 2005)。最近の研究において、LC-MS/MS 解析により、レピドソームを構成する多くのタンパク質には伸長因子 Tu (Elongation Factor-Tu, EF-Tu) が含まれていることが明らかになった (Funadani *et al.* 2016)。多機能タンパク質と考えられている EF-Tu の機能を明らかにすることでシスト形成におけるレピドソームの働きを明らかにできると期待される。レピドソームの放出に続いて、単層ではあるが非常に強固な層（エクトシスト層）が形成される。その後、細胞内に出現した大きな液胞から液状の物質が分泌され、それが時間をかけて複数回繰り返されることにより、最外層（エクトシスト層）と細胞膜との間に

複数の層（エンドシスト層）が形成される。このようにして、シスト誘導がかかってからわずか数時間のうちに、細胞の内外において劇的な再編成、あるいは再構築が行われるのである。およそ2週間も経つと、細胞の中心部に核が位置し、表層部にミトコンドリアが凝集し、それ以外の部位に貯蔵栄養顆粒（トレハロース類似物質と考えられる）が蓄えられた成熟シスト（これ以降の大きな変化が認められないシスト）となってシスト形成は完了する（Funatani *et al.* 2010, Kida *et al.* 2006）。この状態になると、乾燥だけでなく、高温、凍結、さらには酸に対しても耐性をもち、生育環境が回復した際に脱シストする能力は数年間維持される。

3) シスト形成に関わるシグナル伝達系

シスト形成過程において Ca^{2+} が重要な働きをすることは先に述べた。シスト形成誘導時に細胞内 Ca^{2+} キレート剤を添加するとシスト形成率が約90%から約20%に抑制されたことから、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がシスト化の引き金になっていることが示唆される。 Ca^{2+} によるシスト形成誘導後、細胞内 cAMP 濃度がおよそ4倍に上昇することが確認され、また、細胞内への cAMP の人為的添加によりシスト形成率が約30%から約90%に増加した。このとき、細胞内では多くのタンパク質のリン酸化が促進されていたことから、シスト形成過程には Ca^{2+} -cAMP-PKA 経路が関わっていると考えられる（Sogame *et al.* 2011）。シスト形成誘導後にリン酸化されるタンパク質にはアクチン、ヒストン H4、リボソーム S5 タンパク質、およびリボソーム P0 タンパク質が含まれており、特に核内にてリン酸化されるリボソーム P0 タンパク質はシスト形成誘導後の代謝停止に関与している可能性が示唆される（Sogame *et al.* 2012, Sogame *et al.* 2014）。

4) シスト形成に関わる遺伝子およびタンパク質発現解析

二次元電気泳動による網羅的解析の結果、シスト形成誘導後に多くのタンパク質の発現量が増減していることが分かった（Sogame *et al.* 2014）。発現量が増加するタンパク質のうち、HSP60 はタンパク質の保護に、アクチンやチューブリンは細胞骨格の動態制御に関わっていると考えられ、発現量が低下するタンパク質のうち、ATP シンターゼはミトコンドリア電子伝達系の停止に関わっていると考えられる（Sogame *et al.* 2014）。また、シスト形成誘導後に伸長因子 1 α (EF-1 α) の発現量が増加する。Feeding RNAi 法により EF-1 α の発現を抑制した細胞ではシスト形成に時間的遅延が認められたことから、EF-1 α はシスト形成初期においてタンパク質翻訳などの重要な働きに関与していることが示唆される（Sogame *et al.* 2016）。このように、シスト形成誘導後に活性化するシグナル伝達系や、発現量が顕著に変化する遺伝子およびタンパク質の働きを詳細に解析することにより、将来的にはコルポダのシスト形成過程の分子機構の全容を解明できると考えている。

おわりに

我々は、コルポダのシスト形成／脱シスト過程に関わる環

境因子、および分子機構について広く研究を行ってきた。これまでの研究により、コルポダのクリプトビオシス機構の一部を分子の言葉で説明することができたと思う。今後、さらなる分子レベルでの解析を進めていきたい。また、休眠シストの長期生存機構や生体高分子の長期保存機構も興味ある研究テーマである。さらにはクリプトビオシスを示す他の生物との共通点や相違点などについても深く追求していきたい。

最後に、本ワークショップにおいて発表した内容のほとんどは、高知大学理学部理学科生物科学コース動物生理学研究室において、共同演者である松岡達臣先生の指導の下に行われた卒業研究や修士研究、および博士研究による成果である。また、他機関に所属する研究者との共同研究により得られた成果も含んでいる。この場を借りて、本研究に携わった全ての学生諸君や共同研究者の方々に感謝の意を表したい。

引用文献

- 松岡達臣 . 2007. 織毛虫コルポダの休眠シストについて . 生物の科学 遺伝 61: 87-92.
- Funatani, R., Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Yamamoto, K., Tsujizono, T., Suizu, F., Miyata, S., Yagyū, K. I., 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.
- Funatani, R., Kida, A., Watoh, T. & Matsuoka, T. 2010. Morphological events during resting cyst formation in the ciliate *Colpoda cucullus*. Protistology. 6: 204-217.
- Kida, A. & Matsuoka, T. 2006. Cyst wall formation in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*: cyst wall is not originated from pellicle membranes. Inv. Surv. J. 3: 77-83.
- 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.
- Sogame, Y., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2011. Ca^{2+} -dependent in vivo protein phosphorylation and encystment induction in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. Eur. J. Protistol. 47: 208-213.
- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Fujiwara, S., Miyata, S., Kinoshita, E. & Matsuoka, T. 2012. 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. 2014. Identification of differentially expressed water-insoluble proteins in the encystment process of *Colpoda cucullus* by two-dimensional electrophoresis and LC-MS/MS analysis. J. Eukaryot. Microbiol. 61: 51-60.
- Sogame, Y., Hori, M. & Matsuoka, T. 2016. EF-1 α silencing by feeding RNAi suppresses resting cyst formation in *Colpoda cucullus* Nag-1 strain. Inv. Surv. J. 13: 89-93.
- Watoh, T., Yamaoka, M., Nagao, M., Oginuma, K. & Matsuoka, T. 2003. Inducing factors for encystment and excystment in ciliated protozoan *Colpoda* sp. Jpn. J. Protozool. 36: 105-111.
- Watoh, 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.

(高知大学理学部)