真核単細胞生物コルポーダの休眠機構解明に向けた生理・生化学的アプローチ

十 亀 陽一郎¹・松 岡 達 臣²

土壤に生息する真核単細胞生物は、乾燥耐性や紫外線耐性などの環境耐性を有する休眠型細胞（休眠シスト）を形成することにより、陸上環境にうまく適応している。降雨により一時的に水環境が出現すると、休眠型細胞は、あっという間に増殖型細胞（栄養細胞）につくりかえられる。短期間しか存在しない水たまりのなかで栄養細胞は非常に速いスピードで増殖する。そして乾燥が近づく、水たまりが消失する前に、すばやく休眠シストになる。単細胞生物の休眠シスト形成に関する研究は20世紀初頭より始まったが、そのしくみの一端を分子の言葉で語れるようになったのはごく最近のことである。本稿では、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 Ca^{2+} 依存的シグナル伝達系および休眠シスト形成過程において発現量が変動するタンパク質について、筆者らの研究を中心に紹介する。

1. はじめに

土壌性繊毛虫のコルポーダ (*Colpoda*) は、増殖に適した水環境中では、運動性のある増殖型細胞（栄養細胞）(図1 a) であるが、水たまりの消失といったような生存に不適な環境に曝されると、乾燥、紫外線、凍結、高温、酸などに対する耐性を有する休眠シスト（嚢子または包囊）になる(図1 b, c) ^{5, 17, 19, 22, 25}。降雨により適した水環境が再び出現すると、土壤や落ち葉などに付着していた休眠シストは1～2時間で増殖型細胞につくりかえられ、シストから脱出する(図1 b)。この場合、栄養細胞は薄膜（エンドシスト層）に囲まれた状態でシストから脱出するが、しばらくすると、この膜を破って（酵素により薄膜が溶かされる可能性もある）栄養細胞が泳ぎだす(図1 b)。この一連の過程を脱シスト（脱嚢）とよぶ。栄養細胞が脱出したあとのシスト殻は

粘液／レピドソーム層とエクトシスト層からなる。コルポーダにとって水たまりの消失は致死的であるため、乾燥を予知して速やかに耐乾性の休眠シストを形成する必要がある。コルポーダは、外液に溶けている物質の濃縮を感じることによって乾燥を予知している。とりわけ、外液 Ca^{2+} 濃度の上昇は、休眠シスト形成を誘導する重要な因子であることがわかっている³⁵。外液中の物質の濃縮だけでなく、細胞密度を高く保った場合も、休眠シスト形成が効率よく誘導される^{17, 34}。このような細胞過密および外液 Ca^{2+} 濃度の上昇による休眠シスト誘導は、別々の細胞内シグナル伝達経路を介してもたらされるのではないようである。すなわち、細胞過密による機械的接触が刺激となって、外液 Ca^{2+} の細胞内への拡散が促進されることにより、休眠シスト誘導の細胞内シグナル伝達系が活性化されると考えられている²¹。

休眠シスト誘導するとまず最初に遊泳行動に変化が起きる。直線的に前進遊泳していたコルポーダは、シスト誘導後30分くらいまでにスパイラル運動をするようになり(図2), 2～3時間で遊泳を停止する。このような遊泳行動の変化は細胞内に拡散した Ca^{2+} に起因するのかも知れない。遊泳を停止するとすぐに細胞は球形化する。タンパク質合成阻害剤存在下でもシスト誘導依存的な細胞の球形化は起きることから、新たなタンパク質合成は必要としないと考えられる¹⁰。しかし、タンパク質合成阻害剤存在下では、その後のシスト形成プロセスは進行しない。細胞が球形化する時期には(シスト誘導2～3時間)、ミトコンドリアのエネルギー代謝が停止し³¹、栄養細胞構造の分解とシスト壁の形成などの大規模な細胞構造の再構築が並行して始まる^{9, 13, 20}。その後、数日かけて、複数層からなるシスト壁(外側より粘液／レピドソーム層、単層のエクトシスト層、数層のエンドシスト層)に囲まれた休眠型細胞が形成され

図1 コルポーダ (*C. cucullus* Nag-1) の栄養細胞 (a) と休眠シスト (b) の光学顕微鏡写真および休眠シストの模式図 (c) (a) 山本圭介氏撮影。(c) 文献19) より改変。

¹Yoichiro SOGAME, 福島工業高等専門学校 化学・バイオ工学科 (〒970-8034 福島県いわき市平上荒川字長尾30)

²Tatsuomi MATSUOKA, 高知大学理工学部生物科学科 (〒780-8520 高知市曙町2-5-1)

Received 19 September, Accepted 8 November

図2 コルポーダの休眠シスト誘導後の遊泳行動の変化 (1秒間の遊泳軌跡をトレースしたもの) (a) 培養液に懸濁したコルポーダの遊泳軌跡 (休眠シスト誘導なし)。 (b) 休眠シスト誘導後の遊泳軌跡 (Ca²⁺ 誘導: 1 mM Ca²⁺ 存在下で細胞密度を2,000 細胞 / ml に保った)。コルポーダ懸濁液には最終濃度が約 1 % になるようにメチルセルロースを加えて観察した。文献2) より改変。

る (図1 c)。このプロセスについては、別の総説²⁰⁾で詳しく解説しているので参照して頂きたい。強固なエクトシスト層は、休眠シスト細胞を物理的に保護する役割を担う。エクトシスト層の内側にエンドシスト層が形成されると同時に酸耐性が獲得される²⁵⁾ことから、この層は外液環境とシスト細胞を遮断する役割を担っていると思われる。シスト壁最外層に分泌されたレピドソームは、細胞間および細胞と基質との接着に関与する¹³⁾。筆者らは、レピドソームを構築するタンパク質の1つ (45 kDa タンパク質) を同定することに成功した¹⁰⁾。このタンパク質は、ペプチド伸長因子 Tu (elongation factor Tu; EF-Tu) であり、バクテリアにおいて、リボソームにおけるペプチド伸長反応だけでなく、感染過程における動物組織への接着に関与する多機能タンパク質であることが知られている^{3, 12)}。休眠シスト形成の最終段階では、細胞内に低電子密度の不定形の物質がミトコンドリアや細胞内の構造体を取り囲むように充填される。これは、細胞内の分子や小器官を保護する役割を担うトレハロースのような物質である可能性が考えられる。完成した休眠シストでは、ミトコンドリアは表層部近くに凝集し、細胞内のスペースの大半は低電子密度の顆粒が占める。核は自家蛍光を発する多数の小さい粒子 (nuclei-surrounding particles; NSP) に囲まれ、レピドソームとエクトシスト層も自家蛍光を発する。最近、コルポーダの休眠シストは紫外線に対して強力な耐性を有することがわかった¹⁹⁾。これらの自家蛍光を発する構造が紫外線をカットすることにより、核などの細胞内の構造体や生命分子を保護する役割を担っていると思われる¹⁹⁾。

図3 コルポーダの休眠シスト誘導 (Ca²⁺ / 高密度誘導) による細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇 縦軸は、380 nm の光で励起したときと 340 nm の光で励起したときの蛍光強度の比であり、Ca²⁺ 濃度を反映している。白丸: 0.1 mM Ca²⁺ を含む外液にコルポーダを高密度 (50,000 細胞 / ml) で懸濁した場合。黒丸: Ca²⁺ を添加していない外液にコルポーダを低密度 (2,000 細胞 / ml) で懸濁した場合。白四角: 10 μM EGTA を含む外液 (Ca²⁺ を添加していない) にコルポーダを低密度 (2,000 細胞 / ml) で懸濁した場合。文献33) より改変。

2. Ca²⁺ がシスト形成のシグナル伝達系の引き金をひく

EGTA を外液に添加して細胞外 Ca²⁺ をキレートすると、細胞密度を高く保っても休眠シスト形成の誘導は抑制される²¹⁾。また、疎水基のアセトキシメチル基 (-AM) を付加した BAPTA-AM (この状態では Ca²⁺ キレート能はないが、細胞内に入るとエステラーゼにより AM 基が切断されて Ca²⁺ をキレートできるようになる) を外液に加え細胞内に導入して細胞内 Ca²⁺ をキレートした場合も、休眠シスト形成は抑制される²¹⁾。これらの結果から、筆者らは、細胞相互の接触刺激により外液から細胞内に拡散した Ca²⁺ がシスト形成のシグナル伝達系の引き金をひくのではないかと考えた²¹⁾。そこで Ca²⁺ 感受性色素である fura 2 を用いたレシオメトリーにより、シスト誘導によって細胞内 Ca²⁺ 濃度が実際に上昇するかどうかを検証した³³⁾。この測定では、コルポーダを fura 2-AM を含む液に懸濁して細胞内に fura 2 を導入し、休眠シスト誘導液に移しかえた後、380 nm および 340 nm の光で励起したときの細胞懸濁液の蛍光強度比 (Ca²⁺ 濃度を反映する値) を経時的に測定した (図3)。この結果、0.1 mM Ca²⁺ が存在する液中でコルポーダを高密度に保って休眠シストを誘導 (Ca²⁺ / 高密度誘導) したときは (図3, 白丸)、Ca²⁺ を添加してない液中に低密度で懸濁し

た場合 (図3, 黒丸) と比較して, 細胞内 Ca^{2+} 濃度は著しく上昇した。この場合, *in vitro* キャリブレーションにより推定される細胞内 Ca^{2+} 濃度は, シスト誘導前が10 nM以下, 誘導1時間後では200 nMであった。一方, 10 μM EGTAを含む液中 (コルポータ懸濁液中の混入 Ca^{2+} 濃度が1 μM であったとするとEGTAを添加することにより20 nMになると推定される) に低密度でコルポータを懸濁した場合は, 細胞内 Ca^{2+} 濃度はほとんど上昇しなかった (図3, 白四角)。以上の結果から, 休眠シスト誘導条件下では, 細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが実証された。

3. 休眠シスト誘導によるcAMP濃度の上昇とタンパク質のリン酸化 (図7参照)

Ca^{2+} 以外にも, 休眠シスト誘導に関わる細胞内シグナル分子の存在が薬理学的実験により示唆されている²¹⁾。

cAMPや細胞膜透過性のcAMPアナログであるジブチリルcAMPを外液に加えた場合は, Ca^{2+} 存在下で高密度誘導していないのに休眠シスト形成が誘導された (図4 a)。また, cAMP分解酵素であるホスホジエステラーゼの非選択的阻害剤である3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) 存在下でも, 同様に休眠シスト形成が誘導された (図4 b)。これらの結果は, 細胞内cAMP濃度の上昇が休眠シスト誘導に関わっていることを示している。そこで, cAMP酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay; EIA) により細胞内cAMP濃度の定量解析を行った結果, 休眠シスト誘導前は10 μM 前後に保たれていた細胞内cAMP濃度は, 誘導後1時間以内に最大で100 μM にまで上昇することがわかった (図4 c)^{2, 26)}。細胞内に拡散した Ca^{2+} が, カルシウム結合タンパク質を介してcAMP合成酵素であるアデニレートシクラーゼを活性化する可能性が考えられるが, まだその証拠は得られていない。細胞内のcAMP濃度が上昇すると,

図4 細胞内cAMPによるコルポータの休眠シスト誘導効果とcAMP依存的なタンパク質のリン酸化 (a) cAMP (500 μM) およびジブチリルcAMP (500 μM) による休眠シスト誘導効果。Db-cAMP; ジブチリルcAMP。Db-cGMP; ジブチリルcGMP。文献21)より改変。(b) ホスホジエステラーゼ阻害剤IBMX (500 μM) による休眠シスト誘導効果。コルポータは低密度 (500~1,000細胞/ml) でテスト液に懸濁した。文献21)より改変。(c) 休眠シスト誘導後 (Ca^{2+} 誘導: 1 mM Ca^{2+} 存在下で細胞密度は2,000細胞/mlに保った) 1時間経過したコルポータ細胞内のcAMP濃度 (nmol/ml)。文献2)より改変。(d) cAMP-AM (アセトキシメチル基を付加したcAMP) をコルポータ細胞内に導入することによりシスト誘導したサンプルにおいて, リン酸化レベルが増大するタンパク質。右の2レーン (P-tag) は, SDS-PAGE 後タンパク質をメンブレンに転写し, Phos-tag/ECLによりリン酸化タンパク質を検出したもの。左の2レーンは, Phos-tag/ECL 検出後にCBB (クマシーブリリアントブルー R250) 染色したメンブレン。文献27)より改変。

cAMP 依存的キナーゼ (protein kinase A; PKA) が活性化され、特定のタンパク質がリン酸化されることが予想される。そこで、休眠シスト誘導開始後1時間経過した細胞に含まれるタンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) した後、ウェスタンブロットリングしてPhos-tag/ECL 法 (phos-tag/enhanced chemiluminescence) により、リン酸化タンパク質を検出することを試みた。予想通り、休眠シスト誘導 (Ca^{2+} /高密度誘導) によって複数のタンパク質のリン酸化レベルが上昇したが²⁸⁾、これらのリン酸化タンパク質は、膜透過性のcAMP-AMを細胞内に導入したときにリン酸化レベルが上昇するタンパク質とはほぼ同じものであった (図4 d)。Phos-tag/ECL 法¹⁴⁾は広島大学の木下らによって開発された技法であり、タンパク質のリン酸化解析に革命をもたらした。それまで、信頼できる唯一の方法は放射性同位元素³²Pを用いた方法であり、安全性や汚染等に多大な注意を払いながらRI実験区画で実験しなければならなかった。一方、Phos-tagを用いたリン酸化解析では、通常の実験室で特別な装置も必要とせず、短時間で特異的にリン酸化タンパク質を検出することができる。抗リン酸化セリン抗体や抗リン酸化トレオニン抗体などを用いる方法もあるが、筆者らの経験では非特異的結合が大きな問題となる。

筆者らは、Phos-tag アフィニティカラムを用いてリン酸化タンパク質を精製し、精製サンプルをSDS-PAGE/ウェスタンブロットリングした。そして、目的のタンパク質バンド (休眠シスト誘導によりリン酸化レベルが上昇するバンド) を切り取ってタンデムマスマスペクトル解析 (以下MS解析) により、複数のリン酸化タンパク質を同定した²⁸⁾。このうち、リボソーム S5タンパク質 (分子量: 24 kDa) とリボソーム P0タンパク質 (コルポーダでは分子量31 kDaと33 kDaのものが存在する) は、リボソームのアセンブリや翻訳機能^{1, 15)}以外の機能も有する多機能タンパク質である。たとえば、リボソーム S5タンパク質は、ほ乳類細胞の細胞周期の停止に関与することが知られている¹⁸⁾。コルポーダにおいても、休眠シスト誘導による細胞周期の停止には、リボソーム S5タンパク質のリン酸化が関与している可能性がある。コルポーダでは、33 kDaのリボソーム P0タンパク質は大核に局在している²⁸⁾。抗リン酸化セリン抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡写真は、休眠シスト誘導により大核のリン酸化レベルが著しく上昇することを示しているが²⁸⁾、これは、リボソーム P0タンパク質やヒストン H4 (高アセチル化型) のリン酸化²⁷⁾によるところが大きいかも知れない。ところで、大核のリボソーム P0タンパク質は、コルポーダ休眠シスト形成において、どのような役割を担っているのだろうか? ショウジョウバエでは、リボソーム P0タンパク質が遺伝子の発現調節に関与することが示唆されている⁷⁾。コルポーダ mRNA 量は、休眠シスト誘導後3時間後には急速にその量が減少する³¹⁾。この事実、シスト誘導により、遺伝子発現の大規模なサイレンシングが速やかに起こることを示している。コルポーダのリボソーム P0タンパク質 (33 kDa) は、遺伝子の大規模サイレンシングと関係があるのかも知れない。

休眠シスト誘導開始後12時間以降は、ほとんどのタンパク質の量は、一定レベルまで急速に減少する³¹⁾。これらのタンパク質は、栄養細胞の構造と機能を担っていたと考えられるが、休眠シストが完成した後でも維持される³¹⁾。おそ

らく、脱シスト過程では、シスト細胞内に保持されていたこれらのタンパク質が栄養細胞構築のために使われると思われる。すなわち、脱シスト過程は、何もない状態から遺伝子発現を経て栄養細胞を構築するのではなく、「リザーブされているタンパク質部品を使って細胞構造を組み立てるプロセス」と言えそうである。

4. シスト形成に伴って発現量が変動するタンパク質

全タンパク質のSDS-PAGEパターンをみると、休眠シスト誘導後、大部分のタンパク質は発現量が徐々に減少していくが、これらとは著しく発現パターンが異なるタンパク質も存在する。たとえば、休眠シスト誘導後3~4時間で49 kDaのタンパク質量は突然増加し、50 kDaのタンパク質は消失する³⁰⁾。このようなタンパク質は、休眠シスト形成に深く関わっているに違いない。そこで、二次元電気泳動法を用いて、ユニークな発現パターンを示すタンパク質の検出を試みた。ところが、たった1個のタンパク質スポットすら分離することができないという予期しない問題に直面した³²⁾ (図5 a)。同じ方法でバクテリアサンプルを泳動すると、タンパク質のスポットは正常に分離したが (図5 b)、バクテリアサンプルにコルポーダサンプルを混合すると、タンパク質のスポットは全く得られなくなった (図5 c)。どうやら、タンパク質がうまく分離しない原因は、コルポーダサンプルにありそうである。コルポーダは粘液を含むので、粘液多糖類を分解するリゾチームでコルポーダサンプルを処理してからバクテリアサンプルと混合して泳動すると、タンパク質スポットが分離するようになった (図5 d)。おそらく、コルポーダに含まれる粘液多糖類にタンパク質がトラップされることが原因で、タンパク質が一次元目の等電点電気泳動 (IEF) ゲル中に入っていないため、フォーカシングしないのではないと思われる。そこで、コルポーダタンパク質をSDS処理することでタンパク質を負に荷電させて電場での移動力を大きくし、タンパク質を粘液多糖類から切り離すことを試みた。この場合、コルポーダを集めSDS-PAGE用サンプル処理液で処理してボイル後、5倍量のIEFサンプル処理液 (非イオン性界面活性剤を含む) を加えて混合した。上記の推察が正しいかどうかはともかくとして、このようなサンプル処理法により、コルポーダタンパク質を二次元電気泳動で分離することができるようになった (図6 a)。ところで、負電荷をもつSDSがタンパク質に多量に結合すればタンパク質は等電点にフォーカシングしないはずであるが、他の文献⁸⁾においても指摘されているように、SDSはIEFゲルを移動中にタンパク質から離れて陽極にまで移動するため、タンパク質が等電点にフォーカシングするのではないかと考えられる。

筆者らは、SDS-PAGEや二次元電気泳動により、シスト誘導後に発現量が特異的に変動する多くのタンパク質を検出し、このうちのいくつかをMS解析により同定することに成功した。これらは、ペプチド伸長因子1 α (elongation factor 1 α ; EF-1 α)、ATPシンターゼ β 鎖、ヒートショックタンパク質60 (HSP 60)、アクチン、 α -チューブリン、 β -チューブリンである (EF-1 α はSDS-PAGE、他は二次元電気泳動により同定)。HSP 60の発現量の増加は一過性であり、シスト誘導してから5時間後にピークに達する (図6 b)。この時期は、栄養細胞構造の消化がなされるステー

図5 バクテリアタンパク質の二次元電気泳動に対するコロポダ成分の影響 等電点電気泳動 (IEF) 用サンプル処理液とゲルに含まれる界面活性剤は1.9% (v/v) Nonidet P-40を用いた。(a) コロポダ。(b) バクテリア (*Klebsiella pneumoniae*)。 (c) コロポダ成分とバクテリアの混合物。(d) バクテリアとトリゾチーム処理したコロポダ成分の混合物。文献32) より改変

ジであるため⁹⁾、HSP 60はタンパク質の保護や修復に関与している可能性がある。アクチンやチューブリンの発現量の変動 (図6 b) は、休眠シスト細胞の構築と関係があると思われる。

トリパノソーマのATPシンターゼ β 鎖の発現をノックダウンすると、ミトコンドリア内膜の膜電位が消失することから、このタンパク質はATP合成を担うだけでなく、膜電位の維持に関与していると考えられている⁴⁾。コロポダの場合、休眠シスト誘導してから数時間でATPシンターゼ β 鎖の発現量が極端に低下するが (図6 b)、ミトコンドリアの膜電位も同時期に消失する³¹⁾。これらの事実は、コロポダにおいてもATPシンターゼ β 鎖の発現停止が、ミトコンドリアの膜電位の消失による電子伝達系の停止に関与していることを示唆している。ATPシンターゼ β 鎖の発現量は、脱シスト誘導により栄養細胞が再構築される時期に (脱シスト誘導後30~60分くらい) もとのレベルにもどる²⁹⁾。

EF-1 α は、ペプチド鎖伸長反応を担うEF-1を構成する4つのサブユニットのうちの1つであるが⁶⁾、アクチンフィラメントを束ねる機能¹⁶⁾、微小管の切断²³⁾、プロテアソーム依存的なタンパク質の分解¹¹⁾といったさまざまな機能を有する多機能タンパク質である。コロポダEF-1 α は、休眠シスト誘導後3~4時間で発現量が著しく増加し、脱シスト誘導により栄養細胞が構築されるまでこの量が維持される²⁹⁾ (脱シスト誘導後30~60分の間に発現量はもとのレベルにもどる)。筆者らは、休眠シスト形成におけるコロポダEF-1 α の役割を明らかにするために、EF-1 α 遺伝子の発現をフィーディングRNAi法を用いてノックダウンすることを試みた²⁴⁾。RT-PCRにより、ノックダウン細

図6 二次元電気泳動によるコロポダの休眠シスト誘導後に発現が特異的に変動するタンパク質の解析 (a) SDS (約0.2%)を含む条件下で等電点電気泳動 (IEF) したコロポダ非水溶性成分の二次元電気泳動パターン。泳動に先立って、コロポダサンプルはSDS-PAGE用サンプル処理液 (1% SDS, 2.5% 2-メルカプトエタノールを含む) 中で3分間煮沸した後、5倍量の2% Tween 80を含むIEF用サンプル処理液を加えて混合した。(b) 休眠シスト誘導後に発現量が著しく変動するタンパク質。文献31) より改変。

胞とノックダウンしなかった細胞のEF-1 α のmRNA 量を比較すると、ノックダウン細胞のmRNA 量は減少し、休眠シスト形成が遅れることがわかった。このことから、コルボダ EF-1 α が休眠シスト形成を進行させる上で何らかの役割を担っていることがわかる。EF-1 α の機能の1つはリボソームにおけるペプチド鎖伸長反応を担うことである。休眠シスト誘導依存的なEF-1 α 発現量の増加がタンパク質合成速度を加速させ、速やかに休眠型細胞を構築するのを可能にしているのかも知れない。

5. 今後の展望

休眠シスト誘導後数時間以内にトータル mRNA は激減することから、シスト誘導後すぐに遺伝子発現の大規模な抑制がおきると考えられる。休眠シスト形成に伴う遺伝子発現の抑制のしくみは、以前から研究者の興味をひく問題であったが未だに解明されていない。大核に局在するリン酸化タンパク質の機能解明も含めた今後の研究が待たれる。栄養細胞で発現していたタンパク質組成は、休眠シストが形成されてもさほど変化せず、少ないながら一定量が維持されている。mRNA の量は減少するが、完全には分解されることはなく、これも一定量が維持されている³¹⁾。このような事実から、脱シスト過程では、休眠シスト内にリザーブされていたmRNA やタンパク質を使って栄養細胞が組み立てられると考えられるが、その形態形成のしくみは全くわかっていない。たとえば、脱シスト誘導するとたった30分で決まった数の繊毛が決まった場所に正確に形成される。ところが、電子顕微鏡で観察してみても、繊毛の基部構造や細胞骨格は休眠シスト細胞には見当たらない⁹⁾。繊毛が形成される位置の目印はどこにあるのだろうか？ 繊毛の基部構造は本当に消失しているのだろうか？ まずはそこから丹念に調べる必要があるだろう。

栄養細胞構造の再構築プロセス(脱シスト)の引き金を引くのは、外液に加えたクロロフィリンのような水溶性分子

図7 コルボダの休眠シスト誘導の細胞内シグナル伝達系の一部 文献20) より改変。

である。このような脱シスト誘導分子の受容体はどこにあるのだろうか？ ある程度大きな分子であるクロロフィリンが、外界と休眠シスト細胞を遮断するはずのエンドシスト層を通過するとは考えにくい。また、多糖類で充填された流動性のない細胞質基質において、脱休眠の細胞内シグナル伝達はどのようにしてなされるのだろうか。

C. cucullus Nag-1のゲノム情報は得られていないため、MS解析では、他の原生生物のデータベースを検索することによってタンパク質を同定した。この場合、運良くタンパク質が同定できても、遺伝子のクローニングを経なければ次のステップに進むことはできない。また、MS解析によって得られたわずかのアミノ酸配列情報を用いて遺伝子をクローニングするのも簡単ではない。やはり、*C. cucullus* Nag-1のゲノム情報を解読することが近道であろう。

文 献

- 1) All-Robyn, J. A., Brown, N., Otaka, E. & Liebman, S. W.: Mol. Cell. Biol., 10, 6544-53 (1990)
- 2) Asami, H., Ohtani, Y., Iino, R., Sogame, Y. & Matsuoka, T.: J. Protozool. Res., 20, 1-6 (2010)
- 3) Balasubramanian, S., Kannan, T. R. & Baseman, J. B.: Infect. Immun., 76, 3116-3123 (2008)
- 4) Brown, S.V., Hosking, P., Li, J. & Williams, N.: Eukaryot. Cell, 5, 45-53 (2006)
- 5) Corliss, J. O. & Esser, S. C.: Trans. Amer. Micros. Soc., 93, 578-593 (1974)
- 6) Ejiri, S.: Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 1-21 (2002)
- 7) Frolov, M. V. & Birchler, J. A.: Genetics, 150, 1487-1495 (1998)
- 8) 深尾陽一朗 : Plant Organelles News Letter, 8, 10-13 (2008)
- 9) Funatani, R., Kida, A., Watoh, T. & Matsuoka, T.: Protistology, 6, 204-217 (2010)
- 10) Funadani, R., Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Yamamoto, K., Tsujizono, T., Suizu, F., Miyata, S., Yagyu, K., Suzuki, T., Arikawa, M. & Matsuoka, T.: FEMS Microbiol. Lett., 363, fnw203 (2016)
- 11) Gonen, H., Smith, C. E., Siegel, N. R., Kahana, C., Merrick, W. C., Chakraborty, K., Schwartz, A. L. & Ciechanover, A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7648-7652 (1994)
- 12) Granato, D., Bergonzelli, G. E., Pridmore, R. D., Marvin, L., Rouvet, M. & Corthésy-Theulaz, I. E.: Infect. Immun., 72, 2160-2169 (2004)
- 13) Kida, A. & Matsuoka, T.: Inv. Surv. J., 3, 77-83 (2006)
- 14) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. & Koike, T.: Mol. Cell Proteomics 5, 749-757 (2006)
- 15) Krokowski, D., Tchórzewski, M., Boguszevska, A. & Grankowski, N.: Biochim. Biophys. Acta, 1724, 59-70 (2005)
- 16) Kurasawa, Y., Watanabe, Y. & Numata, O.: Zool. Sci., 13, 371-375 (1996)
- 17) Maeda, H., Akematsu, T., Fukui, R. & Matsuoka, T.: J. Protozool. Res., 15, 7-13 (2005)
- 18) Matragkou, C. N., Papachristou, E. T., Tezias, S. S., Tsiftoglou, A. S., Choli-Papadopoulou, T. & Vizirianakis, I. S.: J. Cell Biochem., 104, 1477-1490 (2008)

- 19) Matsuoka, K., Funadani, R. & Matsuoka, T.: J. Protozool. Res., 27, 1-7 (2017)
- 20) 松岡達臣：生物の科学 遺伝, 71, 472-482 (2017)
- 21) Matsuoka, T., Kondoh, A., Sabashi, K., Nagano, N., Akematsu, T., Kida, A. & Iino, R.: Protistology, 6, 103-110 (2009)
- 22) Müller, H., Achilles-Day, U. E. M. & Day, J. G.: Eur. J. Protistol., 46, 133-142 (2010)
- 23) Shiina, N., Gotoh, Y., Kubomura, N., Iwamatsu, A. & Nishida, E.: Science, 266, 282-285 (1994)
- 24) Sogame, Y., Hori, M. & Matsuoka, T.: Inv. Surv. J., 13, 89-93 (2016)
- 25) Sogame, Y., Kida, A. & Matsuoka, T.: Afr. J. Microbiol. Res., 5, 4316-4320 (2011)
- 26) Sogame, Y., Kinoshita, E. & Matsuoka, T.: Eur. J. Protistol., 47, 208-213 (2011)
- 27) Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E. & Matsuoka, T.: Inv. Surv. J., 11, 213-218 (2014)
- 28) Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Fujiwara, S., Miyata, S., Kinoshita, E. & Matsuoka, T.: FEMS Microbiol. Lett., 331, 128-135 (2012)
- 29) Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E., Funadani, R. & Matsuoka, T.: Microbes Environ., 28, 388-390 (2013)
- 30) Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E. & Matsuoka, T.: J. Euk. Microbiol., 59, 401-406 (2012)
- 31) Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E. & Matsuoka, T.: J. Euk. Microbiol., 61, 51-60 (2014)
- 32) 十亀陽一郎, 松岡達臣：高知大学学術研究報告, 61, 253-259 (2012)
- 33) Sogame, Y. & Matsuoka, T.: Acta Protozool., 52, 51-54 (2013)
- 34) Strickland, A. G. R.: Physiol. Zool., 13, 356-365 (1940)
- 35) Yamaoka, M., Wato, T. & Matsuoka, T.: Acta Protozool., 43, 93-98 (2004)

Abstract

A physiological and biochemical approach to understanding cell dormancy mechanism of unicellular eukaryote *Colpoda*

Yoichiro SOGAME¹ and Tatsuomi MATSUOKA²

¹Department of Applied Chemistry & Biochemistry, National Institute of Technology, Fukushima College, Iwaki, Fukushima, 970-8034, Japan .

²Department of Biological Science, Faculty of Science & Engineering, Kochi University, Kochi 780-8520, Japan

Soil unicellular eukaryotes such as the ciliate *Colpoda* successively adapt to a terrestrial environment by promptly transforming into a resting cyst resistant to desiccation, freezing, high temperatures, UV light or acid, before the water puddles in which the vegetative cells proliferate dry out. In this review, we show the signaling pathways leading to the encystment of *Colpoda cucullus* Nag-1 which are triggered by Ca^{2+} , and discuss the roles of cAMP-dependent

phosphorylated proteins and differentially expressed proteins during the cyst formation.

Key words: *Colpoda*, resting cyst formation, Ca^{2+} , phosphorylation, protein expression