総説

土壌繊毛虫コルポーダの陸上環境への適応戦略:休眠シスト形成とその環境ストレス耐性

十亀 陽一郎^{1*}・島野 智之²・松岡 光³・有川 幹彦⁴・水津 太⁵・松岡 達臣⁴

Yoichiro SOGAME^{1*}, Satoshi D. SHIMANO², Kou MATSUOKA³, Mikihiko ARIKAWA⁴, Futoshi SUIZU⁵, Tatsuomi MATSUOKA⁴

要旨

多くの自由生活性の土壌繊毛虫は、環境ストレス耐性をもつ休眠シストを形成することにより、土壌環境にうまく適応している。休眠シストは、一時的な水環境の出現を察知し、短時間で増殖型細胞(栄養細胞)に分化し、増殖を開始する。そして、乾燥する前に、再び休眠シストを形成する。本稿では、繊毛虫 *Colpoda cucullus* Nag-1 がつくる休眠シストの環境ストレス耐性(紫外線耐性、超低温耐性、酸耐性)に焦点をあて、休眠シスト形成過程における形態形成とそれを制御するシグナル伝達系にも着目し、我々の最近の研究を中心に概説する。

キーワード: 紫外線耐性, 超低温耐性, 脱シスト, 酸耐性, 環境ストレス

1. はじめに

繊毛虫綱(Ciliophora)は、単系統の分類群である が、多様性が高く、少なくとも 8,000 種が属する分類 群である(Lynn, 2008). 繊毛虫の細胞は, 基本的に単 細胞性であるが故にひとつの細胞が数多くの機能を果 たすことができるよう高度に発達している. その例と して大核と小核の存在や繊毛の存在があげられる. 通 常の生命活動における生命情報を担うのは大核であ り、小核は有性生殖である接合を行うときのみ働き、 普段はほとんど機能していない. また細胞表層部には 繊毛を有し、繊毛虫は繊毛を使って遊泳することがで きる. 繊毛虫の生存には水が必須で, 多くの種が海水 から淡水域までの水環境に広く生息しているが、水が 存在しないことも多い土壌環境(水たまりなどの一時 的な水環境)にも繊毛虫が生息することが知られてい る. それらは、「土壌繊毛虫」と呼ばれ、500 種あまり が報告されている (Bamforth, 2001). 土壌繊毛虫が, 水がない土壌中で生存できる理由は、環境耐性のある

@ <u>0</u>

* Corresponding author Tel: 0246-46-0875

E-mail: sogame@fukushima-nct.ac.jp

Received: 26 Mar 2021; Accepted: 25 June 2021.

休眠シストを形成できるからである. 繊毛虫の休眠シスト形成は、大規模な形態学的かつ生理学的な変化を伴うプロセスである (Gutiérrez et al., 1990). 休眠シストは、「休眠」という言葉からも推測できるように、代謝が測定できないレベルまで抑制された無代謝休眠(cryptobiosis; Keilin, 1959)と定義される状態にある(Gutiérrez et al., 1990).

本稿で話題にする Colpoda cucullus Müller, 1773 Nag-1株(以下 C. cucullus は全て本株をさす)を含む、コルポーダ属の土壌繊毛虫 Colpoda spp. (以下、コルポーダとよぶ)は、田畑の水たまりなど一時的な水環境でよく見られる原生生物である。コルポーダは休眠シストに分化し、落ち葉の裏側や土壌に付着して乾燥を耐え忍ぶ。降雨などにより水環境が出現すると、コルポーダはわずか 1-2 時間で休眠シストの細胞構造を運動性をもつ増殖型細胞(栄養細胞)の構造に作り替え、休眠シストから脱出する(図 1,2 参照)。このような栄養細胞構造の再構築とシスト壁から脱出するまでのプロセスを脱シストと呼ぶ。脱シスト後、コルポーダは速やかに増殖(細胞分裂)を開始する。コルポーダの増殖は、単細胞生物で多く見られる単純な二

[「]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

²法政大学自然科学センター 〒102-8160 東京都千代田区富士見 2-17-1

³ 協和会病院 〒564-0001 大阪府吹田市岸部北 1-24-1

⁴高知大学理工学部生物科学科 〒780-8520 高知県高知市曙町2-5-1

 $^{^5}$ 北海道大学遺伝子病制御研究所 $\overline{ au}060$ -0815 北海道札幌市北区北15 条西7 丁目

分裂と異なり、増殖シスト(図1)を形成して進行し、 1 回の分裂で基本は 4 つの娘細胞に分裂する (図 1) (Foissner, 1993). 増殖シストは休眠シストとは異な り、薄膜に包まれている(本稿は休眠シストに関する 総説である).この増殖様式は、わずかの間しか存在 しない水環境中において素早く細胞数を増やすための 有効な適応戦略である.一方,乾燥は栄養細胞にとっ て致命的であるので、水環境が消失する前に再び休眠 シストを形成しなければならない. 野外環境では、乾 燥の到来に伴い、環境中の物質が濃縮されていく. 実 験室では、シスト形成は栄養細胞を高密度で Ca²⁺ を含 む液中に懸濁させることにより誘導できる(Yamaoka et al., 2004; Matsuoka et al., 2009) ため, コルポーダは, 塩 濃度(主に Ca^{2+}) の上昇を乾燥予知シグナルとして利 用していると考えられる.一方,脱シストは,クロロ フィリン溶液 (Tsutsumi et al., 2004) や培養液として使 用している干し草浸出液(Haagen-Smit and Thimann, 1938), 麦葉浸出液 (Tsutsumi et al., 2004) 等にシスト を浸すことにより誘導できる(図1). このようにコル ポーダは、休眠シスト形成/脱シストの生活サイクルと 分裂/増殖の生活サイクルを上手く使い分け、陸上環境 に適応している(Verni and Rosati, 2011).

コルポーダの休眠シストは、乾燥耐性(Corliss Esser, 1974) だけでなく, 紫外線耐性 (Matsuoka et al., 2017; Yamane et al., 2020), 超低温耐性 (Taylor and Strickland, 1936; Maeda et al., 2005; Müller et al., 2010), 酸耐性 (Sogame et al., 2011a) を備えている. 休眠シス ト形成は, 脱シストに比べると穏やかな経緯をたど り、シスト形成開始より 6 時間程度経過すれば一部の 耐性を発揮することが出来るようになるが、全ての耐 性をもつには約 1 週間以上を要する. この休眠シスト 形成過程は, 大規模な細胞構造の変化を伴うプロセス であり、複雑に制御されている. 本稿では、コルポー ダの休眠シストの形態形成やコルポーダの休眠シスト の紫外線耐性, 超低温耐性および酸耐性についての詳 細、そしてさらにシストへの分化を制御するシグナル 伝達系について、C. cucullus を用いた我々の研究内容を 中心として概説したい.

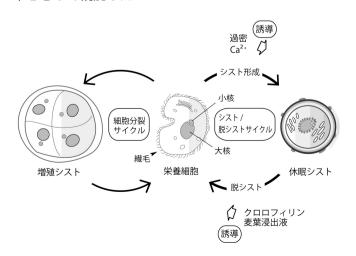


図 1. C. cucullus の生活史. 松岡 (2018) より改変.

2. 休眠シストの形態形成

我々がこれまでシスト研究に用いてきた *C. cucullus* の栄養細胞は、コルポーダ属特有の「おかめの顔」のような形状であり、その全身を繊毛が覆っている(図 2A). しかしながら休眠シストになると、ほかの多くの繊毛虫で見られるような球形を示す(図 2B). ここでは、シスト形成プロセス、とくに最も特徴的な構造であるシスト壁の形成過程に焦点をあて概説したい.

シスト形成は、飢餓により自発的に誘導されるが、外液に Ca^{2+} が存在する条件下で、コルポーダ栄養細胞を高密度に保つことにより実験的に効率よくシスト形成が誘導できる(Yamaoka et al., 2004; Matsuoka et al., 2009). シスト誘導後約 2 時間で栄養細胞は徐々に球形化し始める. それにともない、粘液と粘着性の小球塊レピドソーム(図 2C, 2D)が細胞外に放出され、粘

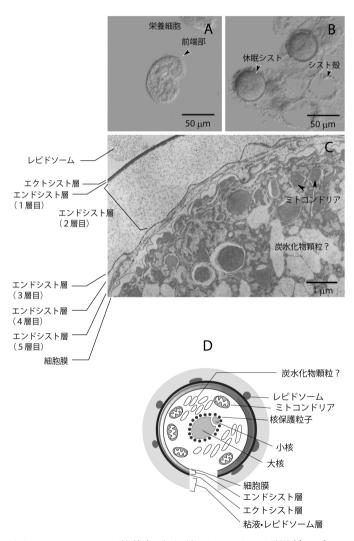


図 2. C. cucullus 栄養細胞と休眠シストの顕微鏡写真および休眠シストの模式図. (A) C. cucullus 栄養細胞の光学顕微鏡写真. (B) シスト誘導後 1 週間経過したシストを, 脱シスト誘導し 3 時間後の光学顕微鏡写真. 脱シストした細胞では, エンドシスト層に裏打ちされたエクトシストの殻が残る. (C) シスト誘導後 1 週間経過した休眠シスト (完成したシスト) の透過型電子顕微鏡写真, (C). (D) 休眠シストの模式図.

液・レピドソーム層 (図 2D) が形成される. レピド ソームは、網目状構造の顆粒で、アクチン (Sogame et al., 2020) やバクテリア型のペプチド伸長因子 EF-Tu と 相同性をもつ分子量 45 kDa のタンパク質 (Funadani et al., 2016) を含み、シスト同士またはシストと土壌など の基質との接着という重要な役割を担っていると考え られている. シストが固着すると細胞は完全に球形化 し、粘液・レピドソーム層と細胞膜の間に、単層で強 固な殻のようなエクトシスト層(図 2C, 2D)が形成さ れる (Funatani et al., 2010) . これで細胞は殼に囲まれ 丸くなるため、見かけ上休眠シストは完成したように 見える. しかしながら, この後も大規模な細胞構造の 作り替えは続く. エクトシスト層の形成後, それを裏 打ちするように多層からなるエンドシスト層(図 2C, 2D) が形成される. エンドシスト層の第 1 層目(図 2C) は, 誘導後 3-6 時間後に形成され, その後 1 日に 2 回程度, 既存のエンドシスト層と細胞膜の間に新たな 層が形成される. 電子顕微鏡写真を見ると, エンドシ スト層は、厚い層と薄い層が交互に形成されている (図 2C). これはおそらく細胞が周期的に収縮するこ とによるものである. すなわち, 細胞が収縮したとき には、既存のエンドシスト層と細胞膜の間に広い間隙 ができ,この間隙に液状のエンドシスト前駆体がエキ ソサイトーシスによって放出される. 最終的に, 細胞 は外側から、粘液・レピドソーム層、エクトシスト層 (単層),数層のエンドシスト層から成るシスト壁に 囲まれ、休眠シストは完成する(成熟シスト;図 2C, 2D) .

シスト壁の形成と並行して、ミトコンドリア電子伝達系は停止し、オートファジーにより一部のミトコンドリアや繊毛などの栄養細胞の構造が分解されていくという大規模なイベントが進行する(Funatani et al., 2010). その後、オートファジーによる栄養細胞構造の分解が始まり、約 1 日後には、核と凝集したミトコンドリア以外の細胞小器官は消失し、それら以外のスペースには、貯蔵炭水化物顆粒と思われる顆粒が存在している(Funatani et al., 2010). 興味深いことに、シストの核(大核と小核)は、 '核保護粒子'(後述)に取り囲まれ保護されるようになる(Matsuoka et al., 2017).

3. 休眠シストの紫外線耐性

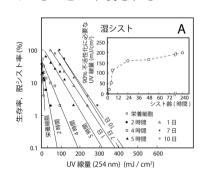
休眠シストの環境ストレス耐性は、我々の知る限り 20 世紀初頭から研究されてきた. なかには、休眠シストが乾燥した土壌中で 49 年以上も耐え脱シストしたというエキサイティングな報告 (Corliss and Esser, 1974) も見られる. このように休眠シストの耐性そのものは報告されてきたが、「乾燥耐性」の一つを取ってみても、その耐性の「しくみ」は全くと言って良いほどわかっていない. そもそもオミクス研究が飛躍的に発展した 1990 年代以降のシストの耐性に関する研究は案外に少ない.

コルポーダのように土壌表層部に生息する微生物に とっては, 乾燥だけでなく紫外線も致死的なストレス になり得る. 陸上では水中に比べ細胞にあたる紫外線 は強くなるからである. それゆえ彼らは、乾燥はもち ろん、紫外線に対する耐性も備えなければならない. 事実, 土壌アメーバの 1 種であるカステラーニアメー バ Acanthamoeba castellanii (属名の Acanthamoeba をさ して,アカントアメーバとよぶこともある)のシスト (Lonnen et al., 2014) やコルポーダのシストは強い紫外 線耐性を有する. 我々の実験では, C. cucullus の湿シス ト(水に浸したシスト)と乾燥シストにおける 90% 不 活性化に必要な紫外線(254 nm)線量は、それぞれ約 190 mJ/cm² と約 200 mJ/cm² であった (図 3A, B) (Yamane et al., 2020) . 枯草菌の胞子の90%不活性化 に必要な紫外線線量が 24.5-27.5 mJ/cm² ある (Nicholson and Galeano, 2003) ことを考えると, C. cucullusのシス トは非常に強い紫外線耐性をもつことがわかる. C. cucullus の栄養細胞は、15 mJ/cm² の紫外線線量で90% 不活性化されるため,紫外線耐性はシストになること により発揮されると考えられる (Matsuoka et al., 2017; Yamane et al., 2020). 紫外線耐性はシスト誘導後に 徐々に高くなり (図 3A), 特に, 誘導後 46 時間にお

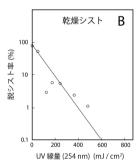
ける第 1 層目のエンドシスト層の形成 (Sogame et al.,

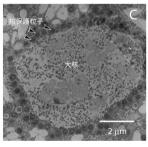
2011a) 後に著しく増強されることから(図3A), エン

ドシスト層が C. cucullus シストの紫外線耐性に関与し



ていることが示唆される.





(C), (D) Matsuoka, et al. (2017) を改変.

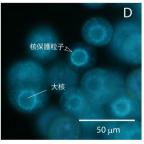
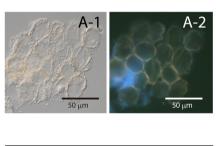


図 3. C. cucullus 休眠シストの紫外線耐性. (A) 湿シストの紫外線耐性とシスト形成に伴う紫外線耐性の獲得. 挿図は,湿シストの 90% 不活性化に必要な紫外線線量とシスト齢の関係. (B) 乾燥シストの紫外線耐性. (C)湿シスト大核の透過型電子顕微鏡写真. (D)湿シスト(シスト誘導後2週間以上経過したもの)に紫外線励起光を照射したときの自家蛍光(蛍光顕微鏡写真)(A),(B) Yamane et al. (2020)を改変.

C. cucullus の休眠シストに紫外線を照射すると、核を 取り囲む粒子(核保護粒子; 図 3C)とシスト壁(主に エンドシスト層)がそれぞれ青色,青緑色の自家蛍光 を発する (図 3D) (Matsuoka et al., 2017; Yamane et al., 2020) . 核保護粒子やシスト壁は何らかの色素を有 し、紫外線等のエネルギーを吸収することで無害な可 視光にエネルギーを変換し、細胞(特に DNA)を保護 していると考えられる. これを裏付けるため、シスト 壁が吸収する光波長を測定した(図4).シストの状態 ではシスト壁のみを単離することは困難であるが、脱 シスト誘導して,シストから出てきた栄養細胞を除去 することにより、粘液・レピドソーム層、エクトシス ト層およびエンドシスト層からなると思われるシスト 壁サンプルを得ることができる(図 4A-1). このシス ト壁サンプルの吸収スペクトルを測定してみると、400 nm 以下の広い紫外領域を吸収することがわかった(図 4B). 紫外線を照射したとき(図 4A-2), エンドシス ト層が最も強い自家蛍光を発し、粘液・レピドソーム 層からも蛍光が観測できる.一方,エクトシスト層は ほとんど自家蛍光を発していない. 紫外線耐性が著し く強くなるのは、エンドシスト第 1 層目が形成される 頃(シスト誘導 4-5 時間)であるので、主にエンドシ スト層が紫外線を吸収する役割を担っていると考えら れる (Yamane et al., 2020) . おそらく, 核保護粒子や シスト壁は、コルポーダが陸上環境に適応するための 重要な因子のひとつであろう.



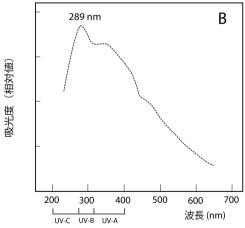
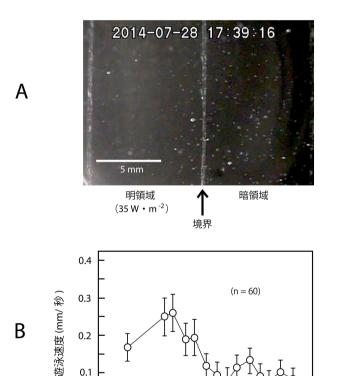


図 4. C. cucullus シスト壁の自家蛍光写真と吸収スペク トル. (A-1) シスト壁の微分干渉顕微鏡写真. 2) シスト壁を紫外線励起したときの自家蛍光(蛍光顕 微鏡写真). (B) シスト壁サンプルを寒天ゲルに懸濁 し, 積分球を用いて光散乱の影響を排除して測定した 吸収スペクトル. Yamane et al. (2020) を改変.

コルポーダの紫外線に対する適応戦略は、休眠シス トの紫外線耐性だけではない. 運動能力がある栄養細 胞は, 暗い場所に集まる性質(負の光集合)を有し (図 5A), 光から逃避することで紫外線に適応してい る. このような負の光集合は、明領域で定常的な遊泳 速度が大きくなり, 暗領域では遊泳速度が低下または 停止するしくみ (光カイネシス反応) により起こる (Kawano et al., 2017) . 光カイネシス反応の作用スペ クトル (図 5B) から, C. cucullus の負の光集合には青 色光の光受容体が関与することが示唆された(Kawano et al., 2017) . それゆえ栄養細胞はシスト形成に先立っ て、光に反応して暗い場所に集まることができる. 実 際に実験用チェンバーに C. cucullus 栄養細胞を入れ, チェンバーの半分の領域にのみ光を照射すると、暗い 側に集まって休眠シストに分化することがわかる(図 5A). このようにコルポーダは、まずシスト分化する 前になるべく安全な場所を選択し、シストを形成して 動けなくなってからは、シスト特異的細胞構造を上手 く利用し、ただ静かに紫外線を耐え忍ぶのである.



0.1

350

300

400

450 500

波長 (nm)

550 600 650

図 5. C. cucullus 栄養細胞の負の光集合と光カイネシス 反応の作用スペクトル. (A) 実験用チェンバーに、シ スト誘導した C. cucullus 栄養細胞の懸濁液を入れ, チェンバーの半分の領域に光を照射し、残りの半分は 遮光した. 8 時間放置すると, C. cucullus (白い点) は 暗い領域に集まって休眠シストになる. (B) 光強度依 存的な定常的遊泳速度の上昇反応(光カイネシス反 応) の作用スペクトル. Kawano et al. (2017) を改変.

4. 休眠シストの超低温耐性

46 億年の地球史の中には、原生代の地球全凍結をはじめ複数回の氷河期があったことは、多くの地球科学の総説や教科書に書かれており、広く知られている(田近、2007 など). Wright and Lynn (1997) によれば、繊毛虫綱は、20 億年以上前、すなわち原生代に起源があると考えられている. この報告に基づけば、コルポーダを含む繊毛虫は、地球全凍結などの極寒期を生き抜いてきたわけであるが、どうしてこのような環境を生き抜くことができたのであろうか. その疑問を解き明かすヒントが休眠シストの超低温耐性にあるかもしれないと夢が広がる.

C. cucullus の休眠湿シストを −30°C や −65°C の低温に 置き、数時間-数日後に取り出して解凍してもほとんど の細胞は生きている(脱シストする) (Maeda et al., 2005; Matsuoka et al., 2020) . 乾燥シストの場合は, な んと -180℃ の超低温にも耐性を示すことが報告されて いる (Taylor and Strickland, 1936). このような超低温 耐性は、シストが超低温下において凍結しない、すな わち細胞を破壊するほど大きな氷の結晶が生成しない ことによるものであろう. 乾燥シストの場合, 水分を ほとんど含まないので -180℃ で凍結しないのは驚くこ とではない. しかしながら, 湿シストの場合はどうで あろうか. C. cucullus の湿シストを高張液に浸すと、著 しく脱水されるので,湿シストの細胞内には多量の水 が含まれていることがわかる (Sogame et al., 2011a). そこで、湿シストを破砕して得た上清を -30℃ または -65℃ で冷却して顕微鏡観察してみると、氷晶の微小な 粒は生成するが大きな氷晶には成長しなかった (Matsuoka et al., 2020) . 湿シストの場合, 乾燥シスト のように単純に水がないから凍結しないわけではな く, 氷晶形成を阻害する何らかのメカニズムの存在が 示唆される. 具体的には, 不凍タンパク質や多糖類な どの不凍物質の関与が想定される. 寒冷地に生息する 動物からは様々な不凍タンパク質が発見されている. 不凍タンパク質は、氷結晶の表面に結合することで結 晶の成長を抑制する生体物質で、水溶液中の全ての氷 結晶の成長が阻害され、全体の凍結が回避される(西 宮ほか,2010). さらに不凍タンパク質は,細胞膜を 保護する機能があることも報告されている(西宮ほ か,2010). おそらくコルポーダも不凍タンパク質を 有し、細胞の凍結による傷害を緩和しているのであろ う. さらに、トレハロースのような糖類が不凍成分と して機能している(白樫, 2003)可能性も考えられ る. おそらくこれらの物質のうちのどれかが、生命が 氷河期を乗り越えられた秘密を解くカギの一つとなる 可能性が考えられる.

5. 休眠シストの酸耐性

経口的に消化管内に侵入する寄生性原生生物, 例えば, エントアメーバ *Entamoeba histolytica* (Serrano-Luna et al., 2013) やジアルジア *Giardia lamblia* (Hawrelak,

2003) は、消化液に耐える必要があるため、「酸耐 性」の獲得は彼らにとって最も重要な生存戦略であっ たと考えられる. 自由生活性(非寄生性)原生生物で あるコルポーダの休眠シストもまた,強い酸耐性を有 する. C. cucullus の休眠シストを 0.1 M HCl (pH 1) に 浸すと、シストは浸透圧により脱水されて小さくなる が培養液に戻すと脱シストすることができる(Sogame et al., 2011a; Nakamura et al., 2020) . シストが脱水され て収縮していることから、H⁺や CI⁻ はシスト壁を通過 し、細胞膜に到達していると考えられる. Gutknecht (1987) の人工平面膜を使った実験によれば、一方の膜面 に接する液の H^+ 濃度を 100 万倍増加させた場合 $(10^{-7}$ M から10⁻¹ M) でも、H⁺ に対する膜のコンダクタンス はたった 4 倍しか上昇しない. このことから, 0.1 M HCI 溶液中でも脂質二重層は破壊されないこと、および 脂質二重層そのものは、H⁺ に対する透過性が非常に小 さいということがわかる. おそらく休眠シスト細胞膜 も,人工膜と同様に、H⁺ に対する透過性が非常に低く 細胞内に H⁺ が流入することを防いでいるのであろう. 一方、栄養細胞は、酸に対する耐性をもたない. これ は,低 pH 条件下において,栄養細胞膜上に多数存在す るチャネルタンパク質が正常なコンフォメーションを 維持できず、細胞内に H⁺ が一気に拡散するためである と考えられる. 休眠シスト細胞の場合,シスト誘導 12 時間以降は, ほとんどのタンパク質の発現量は非常に 少なくなっていく (Sogame et al., 2014b) . それゆえ, シスト細胞の膜上にはチャネルタンパク質がほとんど 存在せず, H⁺ の細胞内への拡散がほとんど起きないの ではないかと思われる.また、シスト形成過程では、 細胞膜の再構築が起き, H⁺ 透過性をさらに小さくする ような脂質組成に変化している可能性もある.

消化管内寄生性の原生生物にとって酸耐性が最も重要な生存戦略であると考えられることは本章のはじめに述べたが、通常は寄生性ではないコルポーダが、なぜこのような強力な酸耐性を有するのだろうか?食物と共に経口的に動物の消化管内に入り、生息域を拡大することと関係があるのかもしれない.

6. 休眠シスト形成のシグナル伝達系

コルポーダの休眠シスト研究は、20 世紀初頭に始まったにも関わらず、休眠シスト形成のシグナル伝達系を含む分子機構は、最近まで「全くわからなかった」と言っても過言ではないだろう。しかし、ここ 10年間の研究の進展はめざましく、コルポーダだけでなく、その他の繊毛虫においても、シグナル伝達系を含むシスト形成の分子機構が明らかになりつつある。コルポーダでは、薬理学的手法により休眠シスト誘導初期シグナル伝達経路が提唱(Matsuoka et al., 2009)されて以来、2016年までに生化学的手法やマススペクトル解析、フィーディングRNAi 法などを用いた研究によりそのシグナル伝達系が解明されてきた(Sogame et al., 2011b, 2012a, b, 2014a, b, 2016)。その後、次世代シーケ

ンサーを用いたトランスクリプトーム解析により (Jiang et al., 2019), さらに下流のシグナル伝達経路が 明らかになってきた(図 6).

外液に Ca²⁺ が存在する条件下で、コルポーダ栄養細 胞を高密度に保つと、シスト形成が誘導される. EGTA を添加して外液 Ca^{2+} をキレートした場合や、 Ca^{2+} チャ ネル阻害剤存在下では、シスト形成が抑制される. BAPTA-AM「細胞内に入るようにアセトキシメチル基 (AM) がついた BAPTA] を細胞内に導入して、細胞 内の Ca²⁺ をキレートした場合もシスト形成が抑制され る. このような結果から、細胞相互の物理的接触刺激 により、細胞内への Ca²⁺ の流入が促進され、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇がシスト形成のシグナル伝達系のス イッチをオンにすると考えられた (Matsuoka et al., 2009) . その後, Ca²⁺ 蛍光指示薬 Fura 2-AM を用いた 蛍光レシオ解析により, 実際に細胞内 Ca²⁺濃度が上昇 することが証明された (Sogame and Matsuoka, 2013). Ca^{2+} はカルモジュリン (CaM) に結合し, Ca^{2+}/CaM は,アデニレートシクラーゼ (AC) を活性化する. こ の結果, cAMP 濃度が上昇し (Sogame et al., 2011b), cAMP/タンパク質キナーゼ A (PKA) 依存的なタンパク 質のリン酸化が、シスト誘導後 1 時間以内に起こる (Sogame et al., 2012a, 2014a) . シスト誘導依存的にリ ン酸化レベルが上昇するタンパク質のうち、同定され たものは、アクチン、リボソーム S5 タンパク質、過ア セチル化ヒストン H4, リボソーム P0 タンパク質, リ スケ鉄硫黄タンパク質 (RISP) である (図 (Sogame et al., 2012a, 2014a) . これらのリン酸化タン パク質は、休眠シスト形成過程における形態形成 (ア クチン),細胞周期の停止と分化(リボソーム S5 タン パク質),核クロマチンの凝縮や遺伝子発現のサイレ

休眠シスト誘導した *Colpoda aspera* では、5' adenosine monophosphate 活性化タンパクキナーゼ(AMPK)、オートファジー関連遺伝子、真核生物型伸長因子 2 キナーゼ(eEF-2K)などの発現量が増加し、真核生物型伸長因子 2 (eEF2)の発現が抑制される(Jiang et al., 2019). エネルギーセンサー分子であるAMPK は、(AMP+ADP)/ATP の比率の増加(Gowans and Hardie, 2014), Ca^{2+} /CaM 依存的キナーゼキナーゼ β (CaMKK β) (Hawley et al., 2005)および PKA(Kari et al., 2019)により活性化される.PKA による AMPK の活性化は、肝臓キナーゼ B1(LKB1)を介してなされるが、コルポーダでは、LKB1 は確認されていない.このようなトランスクリプトーム解析の結果から、AMPK 活性化のシグナル伝達経路が推定された(図 6)(Jiang et al., 2019).

ンシング(過アセチル化ヒストン H4), DNA 複製中に

シスト化が始まると、余分のクロマチンは核から放出 されて分解される(Akematsu and Matsuoka, 2008)こと

から大核クロマチンの再編や部分的排除(リボソーム PO タンパク質),アポトーシスの抑制(RISP)などに

関与すると思われる.

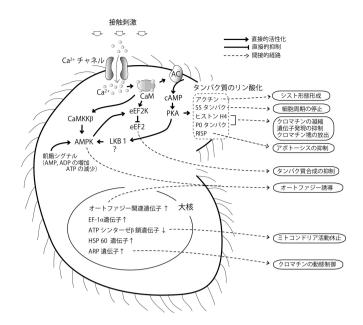


図 6. *C. cucullus* 休眠シスト形成の細胞内シグナル伝達系. Matsuoka (2021) を参考に作成した. 図中の略語は下記を示す. CaM:カルモジュリン, CaMKK β : Ca²⁺/CaM 依存的キナーゼキナーゼ β , AMPK: AMP 活性化タンパクキナーゼ, eEF-2K: 真核生物型伸長因子 2 キナーゼ, eEF2: 真核生物型伸長因子 2, LKB1: 肝臓キナーゼ B1, PKA: タンパクキナーゼ A, AC: アデニレートシクラーゼ, RISP: リスケ鉄硫黄タンパク質, ARP: アクチン関連タンパク質.

代謝におけるストレスの増大により ATP の減少およ び AMP の増加によって活性化することが知られている AMPK がコルポーダの休眠シスト誘導に関わっている ことは間違いなさそうである. なぜなら飢餓状態のコ ルポーダはシスト化しやすく, 対数増殖期の細胞は Ca²⁺ を含む液中で細胞密度を上げてもシスト化しにく い. 脱共役剤存在下でミトコンドリアの ATP 生成を抑 制するとシスト形成は促進される(Otani and Matsuoka, 2010/2011) . AMPK に直接作用して活性化する 5-アミ ノイミダゾール-4-カルボキサミドリボシド(AICAR) を細胞内に導入した場合も、シスト形成は促進される (データ未発表). 哺乳類細胞では様々な限定的要因 はあるが、AMPK は下流のオートファジーのシグナル 伝達経路を活性化することが知られている(猪俣ほ か, 2018). コルポーダにおいても、AMPK がオート ファジーの誘導に関わっている可能性が考えられる.

哺乳類細胞では、eEF2K は Ca²⁺/CaM や AMPK により活性化され、下流の分子 eEF2 をリン酸化することにより不活性化する(Ryazanov et al., 1988; Johanns et al., 2017). この結果、タンパク質合成が抑制される.シスト誘導したコルポーダでも、同様のシグナル伝達経路を介してタンパク質合成が抑制される可能性がある.シスト誘導してから数時間までは、栄養細胞構造の分解とシスト細胞構築に必要なタンパク質の合成が急速に進行する. このことから、eEF2 の不活性化によ

るタンパク質合成の抑制は、シストタンパク質の合成のピークが過ぎてから起こると考えるのが妥当であろう.

C. cucullus をシスト誘導した後、二次元電気泳動によ り経時的にタンパク質発現パターンを追跡してみる と、ほとんどのタンパク質量は誘導 12 時間以降、徐々 に減少していくが,一部のタンパク質の発現量は一過 的に著しく変化する(図 6, 大核内に↑↓で表示). ペ プチド伸長因子 1α (EF-1α) は、シスト誘導後 2-3 時間 で発現量が著しく増加し (Sogame et al., 2012b), 脱シ スト誘導により栄養細胞が再構築されるまで減少しな い (Sogame et al., 2013) . EF-1α は, ペプチド鎖の伸長 反応を担うタンパク質である.シスト形成の初期にお いて、シストタンパク質をすばやく合成するために EF-1α の発現量が増加することは理にかなっている. しか し、細胞骨格の動態制御等の EF-1α の多機能性 (Ejiri, 2002) やシストが完成しても EF-1α 量が減少しないこ とを考えると、本来の機能とは別の役割も担っている 可能性がある.

ミトコンドリアの ATP 合成酵素のサブユニットである ATP シンターゼ β 鎖も多機能タンパク質である. C. cucullus をシスト誘導して約 4 時間で,突然 ATP シンターゼ β 鎖の発現が停止する(Sogame et al., 2012b). 原生生物トリパノソーマにおける ATP シンターゼ β 鎖のノックダウン実験から,このタンパク質は,ミトコンドリアの膜電位の維持に必須であることが報告されている(Brown et al., 2006). C. cucullus では,ATP シンターゼ β 鎖の発現が停止する頃(シスト誘導後 3-4時間),ミトコンドリアの膜電位が消失する(Sogame et al., 2014b). コルポーダの休眠シストにおけるミトコンドリアの活動休止(膜電位の消失)は,ATP シンターゼ β 鎖の発現が停止することと密接な関係があると考えられる.

C. cucullus をシスト誘導してから 1-2 時間で,アクチンと相同性のある 49 kDa タンパク質の発現が突然増加する(Sogame et al., 2014b). このタンパク質は,最初はアクチンと考えられたが(Sogame et al., 2014b),その分子量から判断すると,アクチン関連タンパク質(Actin-related protein; ARP)であると考えるのが妥当であろう。ARP は核クロマチンのダイナミクスに関与することが知られているため(Oma and Harata, 2011),シスト形成に必要な遺伝子群の転写調節などに関与しているかもしれない。

7. 脱シスト

コルポーダの脱シストは、干し草などの浸出液 (Haagen-Smit and Thimann, 1938) , 銅クロロフィリン溶液 (Tsutsumi et al., 2004) , 鉄クロロフィリン溶液 (Morishita et al., 2020) にシストを浸すことにより効率よく誘導できる. 報告されていないが、マグネシウムクロロフィリンも同様の効果が期待できると考えられる. 脱シスト誘導後, 繊毛を含む栄養細胞構造は速や

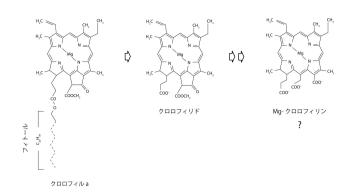


図 7. クロロフィル a の自然分解の初期過程. この過程 でクロロフィリンが生成されることは, まだ報告され ていない. Morishita et al. (2020) を改変.

かに(1-2 時間程度で)再構築される.新しい栄養細胞がほぼ完成すると、細胞は強固な殻(シスト壁)を自ら破りシストから脱出する.このシスト壁の破壊には、収縮胞を利用している.収縮胞が拍動を停止することにより、この中に水がどんどん集められ、収縮胞はシストの直径の半分以上の巨大液胞になる.高張液中でも液胞の膨張が起こることから(Funadani et al., 2013)、能動的に水が細胞内に取り込まれると考えられる.この液胞の膨圧により、強固なエクトシスト層が裂けて薄膜(エンドシスト層)に包まれた栄養細胞が脱出する.この薄膜は、脱シスト後数分以内に分解されるか物理的に裂け、栄養細胞が泳ぎだしてくる(Funadani et al., 2013).

干し草などに含まれる脱シスト誘導効果をもつ成分 の1つは、マグネシウムクロロフィリンか(図7),こ の分子によく似たクロロフィル由来の水溶性成分であ ると思われる (Morishita et al., 2020) . C. cucullus のシ スト壁は、フィコシアニン(40kDa)のような大きな分 子でさえ透過させるので(Morishita et al., 2020), クロ ロフィリンは,シスト壁を透過して細胞膜上の受容体 に結合すると考えられる. トリプシン処理により膜タ ンパク質の消化を試みると、シスト細胞は生きてお り、細胞膜の選択的透過性が維持されているにも関わ らず、クロロフィリンによる脱シスト誘導は起きない (Morishita et al., 2020) . このことはシスト細胞膜上 に、タンパク質性のクロロフィリン受容体の存在が示 唆されるが, 現在のところ, クロロフィリン受容体が 本当に存在するのかや、脱シスト誘導の細胞内シグナ ル伝達経路は全くわかっていない.

8. おわりに

多種多様な繊毛虫が世界各地に生息するが、そのどれもが適した環境に生息しているわけではない. 例えば彼らにとって「乾燥」は死に直結する環境ストレスであるにもかかわらず、乾燥土壌中にも彼らは生息する. Vargas and Hattori (1990) によれば、乾燥土壌 1 g 中には約 18,910 細胞の繊毛虫(コルポーダ属は 5,720 細

胞)が存在するらしい. 致死的な「乾燥」と隣り合わ せにこれだけ多くの繊毛虫が生息できるのは、環境ス トレス耐性を有する休眠シストを形成できるからであ る. 休眠シスト形成は、おそらく繊毛虫の陸上環境へ の適応における最も有効な戦略であった. 本稿では, 休眠シスト形成過程における形態形成やシグナル伝達 系にふれながら、休眠シストの耐性、特に「紫外線耐 性」「超低温耐性」「酸耐性」について紹介した. 残 念なことに, 陸上環境への適応における最も肝心な 「乾燥耐性」のしくみに関して著者らが語れること は, コルポーダは, 水たまりの塩類 (主に Ca²⁺) 濃度 の上昇を感知することで乾燥を予知してシスト化を開 始すること,シスト細胞の脱水・乾燥は,受動的なプ ロセスであることくらいである. シスト細胞内の水が 完全に失われる前に、細胞内の生体分子が壊れないよ うな細胞内環境をつくる必要があり、乾燥下において 水と置換して生体分子が壊れないように保持できるト レハロースのような糖が細胞内に充填される可能性が 高いが、推察の域をでない、乾燥耐性のしくみに関し ては、今後の研究に期待しよう.

コルポーダの休眠シストの最も特徴的な構造をあげるとすればそれはシスト壁であろう.本稿でシスト壁は粘液・レピドソーム層,エクトシスト層,エンドシスト層の構造からなることを紹介した.筆者らは長い間,コルポーダのシスト壁は,外界環境とシスト細胞を完全に遮断するバリアーであるとさせてしまうことがし,シスト壁は簡単に物質を透過させてしまう、ととに限れば,シスト壁は単純にバリアーということだけではなさそうである.粘液・レピドソーム層が,土生いはなさそうである.粘液・レピドソーム層が,土性や落ち葉などの基質にシストを付着させる役割を担い,固いエクトシスト層が細胞を物理的破壊から細胞を守る.そして,エンドシスト層が紫外線から細胞を守る役割を担っているのである.

最近、中国の研究グループにより、トランスクリプトーム解析が行われ(Jiang et al., 2019; Pan et al., 2019) , Matsuoka et al. (2009) で提唱された休眠シスト誘導初期シグナル伝達系が分子レベルで解明された.一般にシグナル伝達経路は、リン酸化などの翻訳後修飾によって情報が下流に伝えられる.休眠シスト誘導初期シグナル伝達系に続く一連のシグナル伝達経路のさらなる解明には、リン酸化タンパク質を網羅的に検出できるショットガンリン酸化プロテオミクス解析が有効な手段となりえるであろう.休眠シスト形成や脱シスト過程における栄養細胞の再構築という '細胞の形づくり'のからくりは、かつて我々が想像した以上に複雑であるようだ.

謝辞

本稿を執筆するにあたり、国立感染症研究所・寄生動物部/筑波大学・生命環境系 永宗 喜三郎 博士には多大なご助言を頂きました。深く御礼申し上げます。

引用文献

- Akematsu, T. and Matsuoka, T. (2008) Chromatin extrusion in resting encystment of *Colpoda cucullus*: a possible involvement of apoptosis-like nuclear death. *Cell Biol. Int.*, 32, 31–38. doi: 10.1016/j.cellbi.2007.08.012.
- Bamforth, S. S. (2001) Proportions of active ciliate taxa in soils. Biol. Fertil. Soil., 33, 197–203.
- Brown, S. V., Hosking, P., Li, J. and Williams, N. (2006) ATP synthase is responsible for maintaining mitochondrial membrane potential in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. Eukaryot. Cell, 5, 45–53. doi: 10.1128/EC.5.1.45-53.2006.
- Corliss, J. O. and Esser, S. C. (1974) Comments on the role of the cyst in the life cycle and survival of free-living protozoa. Trans. Amer. Micros. Soc. 93, 578–593.
- Ejiri, S. (2002) Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 1–21.
- Foissner, W. (1993) Colpodea (Ciliophora). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Funadani, R., Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Yamamoto, K., Tsujizono, T., Suizu, F., Miyata, S., Yagyu, K., Suzuki, T., Arikawa, M. and Matsuoka, T. (2016) Morphogenetic and molecular analyses of cyst wall components in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus* Nag-1. FEMS Microbiol. Lett., 363, fnw203. doi: 10.1093/femsle/fnw203.
- Funadani, R., Suetomo, Y. and Matsuoka, T. (2013) Emergence of the terrestrial ciliate *Colpoda cucullus* from the resting cyst: rupture of the cyst wall by active expansion of an excystment vacuole. Microbes Environ., 28, 149–152. doi.org/10.1264/jsme2.ME12145.
- Funatani, R., Kida, A., Watoh, T. and Matsuoka, T. (2010) Morphological events during resting cyst formation (encystment) in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. Protistology, 6, 204–217.
- Gowans, G. J. and Hardie, D. G. (2014) AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP. Biochem. Soc. Trans., 42, 71–75. doi: 10.1042/BST20130244.
- Gutknecht, J. (1987) Proton/hydroxide conductance and permeability through phospholipid bilayer membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6443–6446.
- Gutiérrez J. C., Martín-González A. and Matsusaka T. (1990)
 Towards a generalized model of encystment (cryptobiosis) in ciliates: a review and a hypothesis. Bio-Systems 24, 17–24. doi.org/10.1016/0303-2647(90)90025
 -V.
- Haagen-Smit, A. J. and Thimann, K. V. (1938) The excystment of *Colpoda cucullus*. I. The chemical nature of the excysting factors in hay infusion. J. Cell. Comp. Physiol., 11, 389–407.

- Hawley, S. A., Pan, D. P., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G. and Hardie, D. G. (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. Cell Metab., 2, 9–19. doi: 10.1016/ j.cmet.2005.05.009.
- Hawrelak, J. A. (2003) Giardiasis: Pathophysiology and management. Altern. Med. Rev., 8, 129–142.
- 猪俣恵, 堀江俊, 引頭毅 (2018) オートファジーと老化の 関連性. 岐歯学誌, 45, 1-7.
- Jiang, C., Wei, W., Yan, G., Shi, T. and Miao, W. (2019) Transcriptome analysis reveals the molecular mechanism of resting cyst formation in *Colpoda aspera*. J. Eukaryot. Microbiol., 66, 212–220. doi: 10.1111/jeu.12643.
- Johanns, M., Pyr Dit Ruys, S., Houddane, A., Vertommen, D., Herinckx, G., Hue, L., Proud, C. G. and Rider, H. M. (2017) Direct and indirect activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by AMP-activated protein kinase. Cell. Signal., 36, 212–221. doi: 10.1016/ j.cellsig.2017.05.010.
- Kari, S., Vasko, V. V, Priya, S. and Kirschner, L. S. (2019) PKA Activates AMPK through LKB1 signaling in follicular thyroid cancer. Front. Endocrinol., 10, 769. doi.org/10.3389/fendo.2019.00769.
- Kawano, N., Funadani, R., Arikawa, M., Harada, T., Suizu, F., Matsuoka, K. and Matsuoka, T. (2017) Photoresponse in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. Acta Protozool., 56, 1–7. doi: 10.4467/16890027AP.17.001.6965.
- Keilin, D. (1959) The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. Proc. Roy. Soc. Lond. B, 150, 149–191. doi: 10.1098/rspb.1959.0013.
- Lonnen, J., Putt, K. S., Kernick, E. R., Lakkis, C., May, L. and Pugh, B. (2014) The efficacy of *Acanthamoeba* cyst kill and effects upon contact lenses of a novel ultraviolet lens disinfection system. Am. J. Ophthalmol., 158, 460–468. doi: 10.1016/j.ajo.2014.05.032.
- Lynn, D. H. (2008) The ciliated protozoa 3rd Edition. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.
- Maeda, H., Akematsu, T., Fukui, R. and 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. doi: 10.32268/jprotozoolres.15.1-2_7.
- 松岡達臣 (2018) 細胞進化の極限に挑んだ単細胞生物 のはなし. 南の風社, 高知市.
- Matsuoka, K., Funadani, R. and Matsuoka, T. (2017) Tolerance of *Colpoda cucullus* resting cysts to ultraviolet irradiation. J. Protozool. Res., 27, 1–7. doi: 10.32268/jprotozoolres.27.1-2 1.
- Matsuoka, T., Kondoh, A., Sabashi, K., Nagano, N., Akematsu, T., Kida, A. and Iino, R. (2009) Role of Ca²⁺ and cAMP in a cell signaling pathway for resting cyst for-

- mation of ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. Protistology, 6, 103–110.
- Matsuoka, T., Sogame, Y., Nakamura, R., Hasegawa, Y., Arikawa, M. and Suizu, F. (2020) Antifreeze water-rich dormant cysts of the terrestrial ciliate *Colpoda cucullus* Nag-1 at -65°C: Possible involvement of ultra-antifreeze polysaccharides. Acta Protozool. 59, 141–147. doi: 10.4467/16890027AP.20.011.13266.
- Matsuoka, T. (2021) Early signaling pathways mediating dormant cyst formation in terrestrial unicellular eukaryote *Colpoda*. FEMS Microbiol. Lett, 368, fnab019. doi: 10.1093/femsle/fnab019.
- Morishita, M., Suizu, F., Arikawa, M. and Matsuoka, T. (2020) Effect of chlorophyllin on encystment suppression and excystment induction in *Colpoda cucullus* Nag-1: An implication of chlorophyllin receptor. Asian J. Microbiol. Biotech. Environ. Sci., 22, 573–578.
- Müller, H., Achilles-Day. U. E. M. and Day, J. G. (2010) Tolerance of the resting cysts of *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodea) and *Meseres corlissi* (Ciliophora, Spirotrichea) to desiccation and freezing. Eur. J. Protistol., 46, 133–142. doi: 10.1016/j.ejop.2009.12.004.
- Nakamura, R., Sogame, Y., Arikawa, M., Suizu, F. and Matsuoka, T. (2020) Tolerance of *Colpoda cucullus* Nag-1 wet resting cysts to extreme pH (pH 1 and 13): Implications of less permeability of the cyst membrane to H⁺ and OH⁻. J. Protozool. Res. 30, 38–46. doi: 10.24556/00004711.
- Nicholson, W. L. and Galeano, B. (2003) UV resistance of *Bacillus anthracis* spores revisited: Validation of *Bacillus subtilis* spores as UV surrogates for spores. of *B. anthracis* Sterne. Appl. Environ. Microb., 69, 1327–1330. doi: 10.1128/aem.69.2.1327-1330.2003.
- 西宮佳志, 近藤英昌, 坂下真実, 三浦愛, 津田栄 (2010) 不 凍タンパク質 機能と応用. 化学と生物, 48, 381– 388.
- Oma, Y. and Harata, M. (2011) Actin-related proteins localized in the nucleus: from discovery to novel roles in nuclear organization. Nucleus, 2, 38–46. doi: 10.4161/nucl.2.1.14510.
- Otani, Y. and Matsuoka, T. (2010/2011) Encystment-inducing factor "starvation" in ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. Protistology, 6, 245–250.
- Pan, N., Niu, T., Bhatti, M. Z., Zhang, H., Fan, X., Ni, B. and Chen, J. (2019) Novel insights into molecular mechanisms of *Pseudourostyla cristata* encystment using comparative transcriptomics. Sci. Rep., 9, 19109. doi: 10.1038/s41598-019-55608-7.
- Ryazanov, A. G., Natapov, P. G., Shestakova, E. A., Severin, F. F. and Spirin, A. S. (1988) Phosphorylation of the elongation factor 2: the fifth Ca²⁺/calmodulin-dependent system of protein phosphorylation. Biochimie, 70, 619–

- 626. doi: 10.1016/0300-9084(88)90245-3.
- Serrano-Luna, J., Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortiz-Estrada, G. and de la Garza, M. (2013) Proteases from *Entamoeba* spp. and pathogenic free-living *Amoebae* as virulence factors. J. Trop. Med., 2013, 890603. doi: 10.1155/2013/890603.
- 白樫了 (2003) 糖類 (トレハロース) の細胞内凍結抑制? 生産研究, 55,150-152.
- Sogame, Y., Hori, M., and Matsuoka, T. (2016) EF-1α silencing by feeding RNAi suppresses resting cyst formation in *Colpoda cucullus* Nag-1 strain. Inv. Surv. J., 13, 89–93.
- Sogame, Y., Kida, A. and Matsuoka, T. (2011a) Possible involvement of endocyst in tolerance of the resting cyst of *Colpoda cucullus* against HCl. African J. Microbiol. Res., 5, 4316–4320. doi: 10.5897/AJMR11.190.
- Sogame, Y., Kinoshita, E. and Matsuoka, T. (2011b) Ca²⁺-dependent *in vivo* protein phosphorylation and encystment induction in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. Eur. J. Protistol., 47, 208–213. doi: 10.1016/j.ejop.2011.02.003.
- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Fujiwara, S., Miyata, S., Kinoshita, E. and Matsuoka, T. (2012a) Protein phosphorylation in encystment-induced *Colpoda cucullus*: Localization and identification of phosphoproteins. FEMS Microbiol. Lett., 331, 128–135. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02560.x.
- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E. and Matsuoka, T. (2012b) EF-1α and mitochondrial ATP synthase β chain: Alteration of their expression in encystment-induced *Colpoda cucullus*. J. Eukariot. Microbiol., 59, 401 –406. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00628.
- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E., Funadani, R. and Matsuoka, T. (2013) Excystmentdependent protein expression in terrestrial ciliate *Colpoda cucullus*. Microbes Environ., 28, 388–390. doi: 10.1264/ jsme2.ME12200.
- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E. and Matsuoka, T. (2014a) Identification of cAMP-dependent phosphorylated proteins involved in the formation of environment-resistant resting cysts by the terrestrial ciliate *Colpoda cucullus*. Inv. Surv. J., 11, 213–218.
- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kinoshita, E. and Matsuoka, T. (2014b) Identification of differentially expressed water-insoluble proteins in the encystment process

- of *Colpoda cucullus* by two-dimensional electrophoresis and LC-MS/MS analysis. J. Eukariot. Microbiol., 61, 51–60. doi: 10.1111/jeu.12086.
- Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Kikuchi, S., Shimada, Y., Nakamura, R., Arikawa, M., Miyata, S., Kinoshita, E., Suizu, F. and Matsuoka, T. (2020) Analysis of water-soluble proteins by two-dimensional electrophoresis in the encystment process of *Colpoda cucullus* Nag-1 and cyto-skeletal dynamics. Acta Protozool., 59, 107–120. doi:10.4467/16890027AP.20.009.13264.
- Sogame, Y. and Matsuoka, T. (2013) Evaluation of intracellular Ca²⁺ concentration by fura 2 ratiometry in encystment-induced *Colpoda cucullus*. Acta Protozool., 52, 51–54. doi: 10.4467/16890027AP.13.005.0833.
- Taylor, C. V. and Strickland, A. G. R. (1936) Effects of high vacua and extreme temperatures on the cysts of *Colpoda cucullus*. Physiol. Zool., 9, 15–26.
- 田近英一 (2007) 地球凍結と生物進化. 地学雑誌, 116, 79-94.
- Tsutsumi, S., Watoh, T., Kumamoto, K., Kotsuki, H. and Matsuoka, T. (2004) Effects of porphyrins on encystment and excystment in ciliated protozoan *Colpoda* sp. Jpn. J. Protozool., 37, 119–126. doi: 10.18980/jjprotozool.37.2_119.
- Vargas, R. and Hattori, T. (1990) The distribution of protozoa among soil aggregates. FEMS Microbiol. Lett., 74, 73–77. doi: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04053.x.
- Venrni F.and Rosati G. (2011) Resting cysts: A survival strategy in Protozoa. Ciliophora. Ital. J. Zool. 78, 134–145. doi.org/10.1080/11250003.2011.560579.
- Wright, G. A. D. and Lynn, D. H. (1997) Maximum Ages of Ciliate Lineages Estimated Using a Small Subunit rRNA Molecular Clock: Crown Eukaryotes Date Back to the Paleoproterozoic. Arch. Protistenkd. 148, 329–341. doi: 10.1016/S0003-9365(97)80013-9.
- Yamane, S., Watanabe, M., Funadani, R., Miyazaki, R., Hasegawa, Y., Arikawa, M., Suizu, F., Matsuoka, K. and Matsuoka, T. (2020) Tolerance of *Colpoda cucullus* Nag-1 resting cysts and presumed structure for protection against UV light. Acta Protozool., 59, 55–60. doi:10.4467/16890027AP.20.004.12160.
- Yamaoka, M., Watoh, T. and Matsuoka, T. (2004) Effects of salt concentration and bacteria on encystment induction in ciliated protozoan *Colpoda* sp. Acta Protozool., 43, 93–98.