

繊毛虫コルポータ (*Colpoda cucullus*) における休眠シスト誘導の
シグナル伝達系について

大谷 由香利, 佐橋 邦尚, 近藤 明日香, 長野 伸昭, 松岡 達臣 (高知大・理・生物科学)

Signaling pathway for resting cyst formation in the ciliated protozoan
Colpoda cucullus

Yukari OTANI, Kunihisa SABASHI, Asuka KONDO, Nobuaki NAGANO
and Tatsuomi MATSUOKA (Inst. Biol. Sci., Kochi Univ.)

SUMMARY

Resting cyst formation (encystment) of *Colpoda cucullus* is induced by an increase in external Ca^{2+} or overpopula-

tion of *Colpoda* vegetative cells, and is suppressed by the addition of food to the external medium. The Ca^{2+} -mediated or overpopulation-mediated cyst formation was suppressed by calmodulin antagonists (W-7, trifluoperazine), 2'-deoxyadenosine (a P-site inhibitor of adenylate cyclase) and Rp-cAMPS (a cAMP analog antagonist for cAMP-dependent proteins). In contrast, IBMX (a non-selective inhibitor of phosphodiesterase), cAMP or its membrane-permeable derivative (db-cAMP) had an encystment-inducing effect even in a Ca^{2+} -free medium. These results suggest that encystment induction in *Colpoda* may involve a rise in cAMP concentration through the activation of adenylate cyclase, and its activity is possibly regulated by Ca^{2+} /calmodulin (Ca^{2+} /CaM). *Colpoda* encystment was suppressed by the addition of D-glucose to the external medium. When D-glucose uptake was blocked by phlorizin, Ca^{2+} -mediated or overpopulation-mediated encystment was markedly suppressed. However, db-cAMP-mediated encystment was not suppressed by D-glucose. The results suggest that internalized D-glucose or its metabolic products have an effect upstream of cAMP production in the signaling pathway for induction of encystment.

【目的】乾燥および高温・低温耐性を有する休眠シスト形成は、土壌性繊毛虫コルポーダ (*Colpoda cucullus*) の陸上環境への巧妙な適応戦略であり¹⁾、シスト化は、外液の Ca^{2+} 濃度の上昇 (Ca^{2+} 誘導) やコルポーダ密度を高く保つ (過密誘導) ことによって誘導される¹⁾。外液の Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞内への Ca^{2+} の拡散をもたらすと考えられる²⁾。本研究では、シスト化を誘導する細胞内シグナル伝達経路の初期過程において、 Ca^{2+} /カルモジュリン (Ca^{2+} /CaM) とcAMPが関与する可能性を示した。

外液の餌が枯渇するとシスト化が誘導されることは古くから知られている³⁾。これは、餌が存在するとシスト化が抑制されていると解釈することができる。コルポーダの場合、バクテリア由来の可溶性分子だけでなくD-グルコースなどの栄養分子が外液に存在するとシスト化が抑制される。本研究では、D-グルコースが細胞外から作用するのか、細胞内に取り込まれた後どのようにしてシスト化抑制作用をもたらすのかについて考察する。

【方法】コルポーダ (*Colpoda cucullus*) 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 (1,500 g, 2分) して集め、1 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.2) で2回洗浄後 (1,500 g, 2分)、各テスト溶液 (200 μl) 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。シスト形成率の観察は実体顕微鏡下で行い、誘導後7または8時間後に計測した。

【結果と考察】まず、 Ca^{2+} 誘導や過密誘導によるシスト化がカルモジュリン阻害剤であるW-7 (1 μM) およびトリフルオペラジン (0.5 μM TFP) によって抑制されるかどうかを調べた結果、有意な ($p<0.05$, Mann-Whitney test) 抑制効果がみられた。ホスホジエステラーゼの非選択的阻害剤であるIBMX (500 μM) は有意な ($p<0.05$, Mann-Whitney test) シスト化誘導効果を示した。この結果は、サイクリックヌク

レオチドがシスト化誘導に関与していることを示唆している。そこで、cAMP、cGMPおよび膜透過型アナログであるジブチルcAMP (db-cAMP)、ジブチルcGMP (db-cGMP) のシスト化誘導効果を調べた結果 (それぞれ500 μM)、cAMPとdb-cAMPが顕著な ($p<0.05$, Mann-Whitney test) シスト化誘導効果を示すことがわかった。アデニレートシクラーゼのP-部位阻害剤である2'-デオキシアデノシン (10 μM) は、有意にシスト化を抑制した ($p<0.05$, Mann-Whitney test)。500 μM Rp-cAMPS (cAMP依存的タンパク質のcAMPアナログアンタゴニスト) はシスト化誘導を抑制する傾向を示した。これらの結果から、コルポーダのシスト化誘導は、 Ca^{2+} /CaMによって活性が制御されるタイプのアデニレートシクラーゼの働きで細胞内のcAMP濃度が上昇することによってもたらされることが示唆される。

外液にD-グルコース (500 μM) が存在すると、 Ca^{2+} 誘導および過密誘導によるシスト化が抑制された。このような条件下では36時間までに、細胞サイズと細胞数の増加がみられたので、グルコースは細胞内に取り込まれていると考えられる。そこで、グルコース輸送阻害剤であるフロリジン (100 μM) 処理によりグルコースの取り込みを阻害すると、グルコースによるシスト化誘導の抑制効果が失われた。この結果は、グルコースが細胞内に取り込まれた後にシスト化抑制効果をもたらすことを示している。過密誘導の場合と比較すると、db-cAMPによるシスト化誘導は、グルコースによる抑制効果が小さかった。このことは、グルコースまたはその代謝産物が、シスト化誘導のシグナル伝達系のcAMP生産の上流に作用する可能性を示唆している。

【文献】

- 1) 松岡達臣, (2007) 生物の科学「遺伝」 61, 87-92.
- 2) Akematsu, T. et al., (2008) Jpn. J. Protozool. 41, 90-91.
- 3) van Wagtenonck, W. J. (1955) Biochemistry and Physiology of Protozoa. (ed. Hutner, S. H., Lwoff, A.) p. 85-90.