

ヒメゾウリムシにおける大核交換移植を用いた加齢の研究

遊佐 怜子, 中村 裕希恵, 見上 一幸 (宮城教育大・EEC)

Aging control by the macronucleus, analyzed by macronuclear transplantation in
Paramecium tetraurelia

Reiko YUSA, Yukie NAKAMURA and Kazuyuki MIKAMI

(EEC, Miyagi University of Education)

SUMMARY

In *Paramecium tetraurelia*, the fission rate decreases with each cell cycle after conjugation or autogamy. Finally, it reaches zero and this results in clonal death. The lifespan after autogamy is generally about 200 fissions. Generally, clonal age is recorded by the length of the telomere. However, paramecium telomeres do not shorten in accordance with clonal age. So where is the clock for clonal age? It is known that the immaturity period for autogamy is measured by the number of rounds of DNA synthesis since autogamy. If this is also true for clonal aging, the clock must be integrated with chromatin replication. To analyze the clock for clonal age, macronuclear transplantation was used. When the macronucleus was transplanted from a young cell (20 fissions after autogamy) to an aged cell (170 fissions) from which the macronucleus had been removed, the fission rate of the aged cell recovered to that of the young cell by the 4th day after autogamy. The lifespan of the transplanted clones lengthened to 325 fissions. The total lifespan of the transplanted clone equals the sum of the recipient cell age (170 fissions) and the donor's remaining lifespan (155 fissions). In the reverse experiment, when a young amacronucleate cell (20 fissions) was transplanted with the macronucleus of an aged cell (170 fissions), the young cell decreased its fission rate for about 4 cell cycles. These results suggest that the clock for fission number after autogamy must be in the macronucleus.

[目的] ゾウリムシでは細胞分裂を繰り返すと加齢が進み、分裂率が低下して最終的にはクローン死が起こる (Sonneborn, 1954)。 *Paramecium tetraurelia* の場合、有性生殖からクローン死までの寿命の長さは

およそ 200 分裂と言われていおり (Sonneborn, 1954)、また寿命の短くなる遺伝子は、高木ら (Takagi, Y. et al., 1989) によって発見されている。これらの結果から、加齢は大核中の遺伝子によって

支配されていることが予測されるが、細胞分裂回数を記録する場所や機構はまだ明らかではない。加齢に伴う現象としては、細胞分裂率の低下の他に、オートガミー（自家生殖）の未熟期が知られている。*P. tetraurelia* では、有性生殖（接合またはオートガミー）後の一定期間（特定培養条件下で 15 ~ 25 分裂）の間、オートガミーの出来ない時期（オートガミー未熟期）がある。この未熟期の長さが大核 DNA の複製回数によって数えられていることは、大核の部分除去という手法で明らかにした (Mikami and Koizumi, 1983)。しかし加齢に伴う分裂率の低下という現象が、大核の DNA 合成回数に依存しているかどうか、また、その分裂回数の記録が大核にあるのかどうかについては、まだ直接的な証拠がない。そこで本研究では、*P. tetraurelia* を用いて、老化に伴う細胞分裂回数の低下という加齢現象を、老化細胞と若い細胞の間で核（大核）の交換移植という方法で解析を行なった。

[材料と方法] 株は *Paramecium tetraurelia* の stock51 (+/+) とトリコシストを発射できない突然変異遺伝子 *nd* をホモに持つ d4-84(*nd/nd*) を使用した。単離培養にはデプレッションスライドグラスを使用し、培養温度は恒温機の中で常に 27°C を保つようにした。レタス培養 (Hiwatashi, 1968) を用い、1 穴につき培養液を 0.75 ml 使用し、単離するごとに新しい液に交換していった。単離から 24±2 時間後の細胞が何分裂したかを はかり、6 クローン の平均を取った。マイクロインジェクション法で、stock51 のオートガミー後約 170 回分裂（1 日の分裂回数が約 4.5 回）と株 d4-84 のオートガミー後約 20 回分裂（1 日の分裂回数が約 2 回）の大核を入れ替え、それぞれの細胞の分裂率を計測した。

[結果と考察] オートガミーから約 20 回分裂後の d4-84 の大核を除き、約 170 回分裂後の stock51 の大核を交換移植した場合、移植後 4 日で手術細胞の分裂率がドナーである stock51 と同程度まで低下した。若い細胞は、老化した大核を移植されることにより、ドナーと同じように老化の傾向を示す。また、オートガミーから約 170 回分裂後の stock51 の大核を除き、約 20 回分裂後の d4-84 の大核を交換移植した場合、移

植後 4 日で手術細胞の分裂率がドナーである d4-84 と同程度まで回復した。また、分裂を停止して絶えるまでの総分裂回数は 325 回で、手術前のレシピエントクローン細胞の分裂回数 170 回と手術後のドナークローン細胞の分裂回数 155 回とを合計したものとなった。老化している細胞は、若い細胞から大核を移植されることによって、若い細胞と同じように若返ったといえる。これらの結果から、細胞質や細胞表層に細胞分裂回数が記録されているのではなく、大核自身の中に記録されていると結論できる。核の交換移植を行ってから分裂率に影響が現れるまでに数日要したのは、手術前の細胞の核の影響が細胞質に残っているためだと考えられる。また、本研究では大核移植の直前にドナー細胞からあらかじめ小核を抜き、小核が誤ってレシピエント細胞に移植されるのを防いだため、この移植実験への小核による影響は考えられない。今回の実験での、大核の交換移植による一日の細胞分裂回数への影響、及び分裂しなくなって絶えるまでの総分裂回数が変化したという結果から、加齢現象は専ら大核に依存していることを示すことができたと考える。このことは、細胞分裂の回数をカウントしている機構が大核内のどこかにあるということを示唆している。現在は、大核クロマチンまたはカリオプラズムの移植を行うことにより、その機構が大核内の染色体にあるのかどうかについて解析を進めている。加齢に伴う発生現象としてオートガミー未熟期の長さがあることはすでに述べた通りである。この未熟期の長さは DNA 合成回数に依存しているという結果が得られている (Mikami and Koizumi, 1983)。このことから、細胞分裂回数の記憶は、DNA の複製回数として、染色体上に記録されているのかもしれない。加齢に対する大核部分除去の影響について現在調べており、老化が DNA 合成回数という形で記録されているのかどうかを現在調べている。現在、多細胞生物においては加齢に伴ってテロメアーが短くなることが知られている。そのためテロメアーの長さが加齢現象の原因であるのではないかと考えられているが、*Paramecium* ではテロメアーの短縮が見られないと報告されている (Gilley and Blackburn, 1993)。加齢の基本がテロメアーにないとするれば、DNA 上のどこに、こういった形で記録されているのか、その機構

を採るための研究材料として *Paramecium* は大変興味深い。

[文献]

Gilley, D. and Blackburn, E. H. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Genetics) 91: 1955-1958.

Hiwatashi, K. (1968) Genetics, 58: 373-386.

Mikami, K and Koizumi, S (1983) Develop. Biol. 100: 127-132.

Sonneborn, T. M. (1954) J. Protozool., 1: 38-53.

Takagi, Y., Izumi, K., Kinoshita, H., Yamada, T., Kaji, K. and Tanabe, H. (1989) Genetics, 123: 749-754.