

繊毛虫コルポーダ (*Colpoda cucullus*) の休眠シスト形成に伴う  
大核クロマチンの放出について

明松 隆彦, 松岡 達臣 (高知大・理・生物科学)

Macronuclear chromatin extrusion during cyst formation of *Colpoda cucullus*

Takahiko AKEMATSU and Tatsuomi MATSUOKA (Dept. Biol., Fac. Sci., Kochi Univ.)

SUMMARY

During resting cyst formation of *Colpoda cucullus*, a part of the macronuclear chromatin mass is extruded into the cytoplasm about 10 hours after encystment is induced. The process of this nuclear event, called chromatin extrusion, was observed by acridine orange/Hoechst 33342 double staining. The extruded chromatin mass gradually reduced in size, acidified by fusing with a lysosome-like structure, and finally disappeared within 24 hours. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA showed that DNA was fragmented during digestion of the extruded chromatin mass. Although encystment could be induced in any growth phase, chromatin extrusion was observed only when cells in the logarithmic growth phase were induced to encyst. However, the chromatin extrusion was not observed during encystment of four cells which had been just produced by successive cell divisions. The results suggest that the chromatin extrusion is the process by which extra chromatin produced during S phase of the cell cycle is eliminated prior to the formation of resting cysts.

**[目的]** コルポーダは、休眠シスト形成の過程でしばしば大核クロマチンの一部分を細胞質中に放出する。この現象は“クロマチンエクストルージョン”と呼ばれており、放出された大核クロマチンは、時間経過とともに消失する<sup>1,2)</sup>。一方、クロマチンエクストルージョンが生じる細胞の生理条件に関しては詳細な研究が行われておらず、クロマチンエクストルージョンがどのような機能を果たしているのか分かっていない。そこで、本研究では、クロマチンエクストルージョンが高頻度に生じる細胞条件を検討し、その機能について考察した。さらに、放出後の大核クロマチンの挙動についても経時的な観察を行った。

**[材料と方法]** コルポーダ (*Colpoda cucullus*) はバクテリア (*Enterobacter aerogenes*) を植え付けた麦葉浸出液 (0.1 %) で培養した。シスト誘導は、栄養細胞を塩類溶液 (10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Tris-HCl, pH 7.2) に移すことによって行った。大核 DNA 量を定量する場合は、フォイルゲン染色したサンプルの蛍光画像を NIH image ソフトウェアを用いて解析した。DAPI

染色およびアクリジンオレンジ/ヘキスト 33342 染色による観察は、Mpoke and Wolfe<sup>3)</sup> のプロトコルに従って行った。

**[結果と考察]** 脱シストしたコルポーダを、餌を豊富に含む培養液に移すと、培養1日後に顕著な対数増殖期を迎え、2日後から細胞は徐々にシスト形成を始め、3日後にはほとんどの細胞がシストになった。それぞれの培養ステージの栄養細胞 (脱シスト直後、増殖期、シスト形成期) をフォイルゲン染色することにより、大核 DNA の蛍光強度を比較したところ、増殖期の細胞は他のステージと比較して約2倍の蛍光強度を示した。そこで、シスト形成誘導時の大核 DNA 量とクロマチンエクストルージョンの関係について調べるため、各培養ステージの栄養細胞を塩類溶液に移してシスト形成を誘導した。その結果、脱シスト直後の細胞では全くクロマチンエクストルージョンが観察されず、シスト形成期の細胞では、誘導後12時間から16時間にかけて全体の約10%のシストにクロマチンエクストルージョンが認められた。一方で、増殖期の細胞では、誘導後12時間から16時

間にかけて全体の約50%のシストにクロマチンエクストルージョンが認められた。これらの結果は、クロマチンエクストルージョンにシスト形成誘導時の大核DNA量が関与している可能性を強く示唆している。

コルポーダは、細胞分裂時に増殖シストと呼ばれる球体を形成し、その中で2回の細胞分裂を行って、計4つの娘細胞を生じる。増殖期に誘導したシストのなかには、1つのシストの中に細胞が2つ、または4つ含まれた状態のシストが観察された。これは、細胞分裂の途中でも、シスト形成誘導因子に晒されるとシスト形成能力が発現すること示している。この場合、2つの細胞を含むシストではクロマチンエクストルージョンが認められたが、4つの細胞を含むシストではクロマチンエクストルージョンが観察されなかった。この結果は、コルポーダはシスト形成に伴って、1細胞当たりの過剰な大核DNAを核外へ放出している可能性を示唆している。すなわち、4つの細胞を含むシストのように、複製された大核DNAが既に娘細胞へ分配された状態では、クロマチンエクストルージョンが起こらないと考えられる。

DAPI染色によりクロマチンエクストルージョンを経時的に観察したところ、シスト形成誘導後10時間頃から大核に括れが生じ、括れ出た大核クロマチンは12時間後にかけて完全に大核から分離して細胞質中に放出された。放出された大核クロマチンは球形化し、16時間後からそのサイズが徐々に縮小した。そして24時間後には、ほとんどのシストで放出クロマチンは消失した。シスト形成誘導後、4時間毎のシストからゲノムDNAを回収してアガロースゲル電気泳動を行ったところ、放出クロマチンが縮小を始

める16時間後から低分子量のDNA断片化が認められた。これらの結果は、放出クロマチンが24時間以内に、選択的に分解されている可能性を示唆している。

放出クロマチンの分解過程を観察するため、アクリジンオレンジとヘキスト33342により二重染色を行った。その結果、放出された大核クロマチンは球形化した後、16時間後から20時間後にかけて酸性化され、正常な大核(青)とは異なる蛍光(緑)を示した。そして、24時間後にかけて放出クロマチンはさらに酸性化が進み、消失の直前にはオレンジ色の蛍光を示した。この時期の放出クロマチンの周囲には、リソソーム様の酸性小器官が局在しており、放出クロマチンが分解される際、リソソームと融合した可能性が考えられた。これらの過程はテトラヒメナの接合における核アポトーシスと酷似しており<sup>3,4)</sup>、コルポーダのクロマチンエクストルージョンにおいてもアポトーシス様の核分解機構が関与している可能性がある。以上の結果から、クロマチンエクストルージョンは、アポトーシス様の核分解を伴った休眠シスト形成過程の大核DNA量調節機構であることが考えられた。

#### [文献]

- 1) Tiano et al., (1999) *Eur. J. Histochem.* 43, 113-120.
- 2) Chessa et al., (2001) *Eur. J. Psotistol.* 37, 281-290.
- 3) Mpoke and Wolfe, (1997) *J. Histochem. Cytochem.* 45, 675-683.
- 4) Kobayashi and Endoh, (2003) *Cell Death Differ.* 10, 634-640.