

マイクロインジェクションによるゾウリムシの低温耐性細胞質因子の研究  
佐々木 大, 芳賀 信幸 (石巻専修大学・理工)

Microinjection studies on the cytoplasmic factors responsible for low-temperature  
tolerance in *Paramecium caudatum*

Hajime Sasaki, Nobuyuki Haga (Dept. of Biol. Engin., Ishinomaki Senshu Univ.)

SUMMARY

In previous studies we have found remarkable differences in the ability of wild stock of *P. caudatum* to survive under low-temperature conditions. To test the presence of cytoplasmic factors that are associated with low-temperature tolerance, we performed cytoplasm transplantation experiments among stocks showing high survival rate at 5°C and

stocks showing low survival rate. As a result, we have found an increase of survival rate in low survival stocks after microinjection of cytoplasm from high survival stocks. The microinjection of fractions prepared from a high survival stock by preparative centrifugation showed that the cytoplasmic factor was predominantly fractionated in the supernatant. Preliminary characterization suggests that the factor is heat stable. Our study provides a new opportunity for understanding of molecular mechanisms underlying low-temperature tolerance in unicellular organisms.

**【目的】** 我々は、これまでに*P. caudatum*において多数の野外株を調査し、それぞれの株によって低温(5°C)における生存率に大きな違いがあることを見出した。このことから、*P. caudatum*は低温環境におかれた場合、温度変化に応答する形で細胞内に生理的な変化が生じている可能性が考えられる。そこで今回は生存率の高い株(KNZ2S1#26)と低い株(KNZ2S1#22)について、低温環境における生存能力に関与している細胞内因子について検討するため、microinjectionによる細胞質移植実験を行い、生存率の変化について調べた。

**【方法】** 実験に用いた株はKNZ2(金沢で遠藤により採取された株)の自系接合による子孫で、それぞれ低温条件下における生存率の異なる株である。5°Cで20日間の培養においてKNZ2S1#26は100%の生存率を示し、KNZ2S1#22は約20%、KNZ2S1#1は約40%、KNZ2S1#2は約80%、KNZ2S1#38は約70%の生存率を示す株である。

細胞質の移植はmicroinjectionによって、まず、KNZ2S1#26の25°C培養及び5°C培養(60日間)のものと、KNZ2S1#22の25°C培養のものとの間でを行い、5°Cにおける生存率の変化を比較した。また、KNZ2S1#1・#2・#38をdonorとし、KNZ2S1#22に細胞質を移植する実験も行った。

移植量はどの実験においても30~50plである。注射後30~120分後に、一細胞ずつ一穴に400µlのレタスジュースの入ったデプレッションスライドに移し、5°Cに設定したインキュベータにて5日間培養を行い、生存率を調べた。

遠心分離法により調製した細胞画分の移植実験で、25°Cで大量培養したKNZ2S1#26をhomogenizeしたものを5040gで遠心分離し、上清と沈殿に分けたものをそれぞれ注射した。このとき、沈殿に上清成分ができるだけ残らないようにするためにsolution A

(10mM KCl・5mM MgCl<sub>2</sub>・10mM Tris-HCl(pH7.4))を加えよく攪拌した後、再び遠心分離を行い上澄みを除去するという作業を3回繰り返して注射用の沈殿試料とした。上清についてはさらに105,000gでの遠心分離を行い、上清と沈殿に分け、それぞれを注射した。

**【結果】** KNZ2S1#26(25°C培養)の細胞質を移植されたKNZ2S1#22で低温生存率の上昇が見られた。しかし、5°Cで60日間培養したKNZ2S1#26の細胞質はKNZ2S1#22の生存率を上昇させることはなく、また、KNZ2S1#22の細胞質がKNZ2S1#26の生存率を低下させる結果も得られなかった。また、他の生存率の異なる細胞を用いて細胞質移植実験を行ったところ、生存率が高い株になるにつれてKNZ2S1#22の低温での生存率を上昇させることがわかった。

以上の結果をふまえた上で、25°Cにて培養したKNZ2S1#26の細胞画分を調製し、それぞれをKNZ2S1#22に注射した結果、上清画分において、強い低温生存率上昇効果が見られた。また、この上清を100°C、40°Cで熱処理しKNZ2S1#22に注射した結果、どちらにおいても低温生存率を上昇させることがわかった。

**【考察】** 今回の実験結果より、KNZ2S1#26を25°Cで培養した細胞質中に低温環境に対して生存率を上昇させる因子が含まれていると考えられる。また、KNZ2S1#26の5°Cで60日間培養した細胞質はKNZ2S1#22の生存率を上昇させる効果がなかったことより、この因子は25°C条件下で生成され、低温条件下では消費されてしまう可能性が考えられる。

また、105,000gでの遠心分離による細胞画分の移植実験の結果より、可溶性画分に有効成分が含まれていると考えられる。

本研究によって、これまで低温条件下での生存能力について不明な点が多かった*P. caudatum*の越冬に

関して、低温環境における生存能力に関与している細胞内因子の存在を確認することができた。我々はこの因子を低温耐性細胞質因子と位置づけ、今後、この因子の性質や機能について詳細な検討を加えていく予定である。