

マイクロインジェクション法を用いた
*Paramecium tetraurelia*の加齢を記録する場の探索

遊佐 怜子¹, 多賀 郁乃², 見上 一幸¹

(¹宮城教育大学環境教育実践研究センター, ²仙台白百合学園高等学校)

Probes into the clock of aging in *Paramecium tetraurelia*
by the microinjection technique

Reiko YUASA¹, Ikuno TAGA² and Kazuyuki MIKAMI¹

(¹Miyagi University of Education, EEC., ²Sendai Shirayuri Gakuen)

SUMMARY

In the ciliate *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. Experiments with macronuclear transplantation showed that the lifespan and the decrease of fission rate are due to the age of the macronucleus. The result was supported by the transplantation of macronuclear chromatin. When the chromatin of a young cell was transferred into an aged cell, the cell recovered its fission rate and acquired a longer lifespan. Some of the clones survived for about 50 extra fissions. This evidence means that the clock for counting fission number must be in the karyoplasm of the macronucleus or in the chromosomes. We have attempted to transplant macronuclear DNA from a young cell into an aged cell but have so far failed in rejuvenation.

【目的】ゾウリムシは分裂を繰り返すことで加齢が進み、徐々に分裂率が低下して最終的には分裂限界（クローン死）を迎える（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分裂である（Sonneborn, 1954）。寿命の短くなる遺伝子が高木ら（Takagi, et al., 1989）によって発見されたこと、ゾウリムシの寿命と分裂速度は大核の加齢に依存していることなどから、加齢は大核によって支配されていることが予測される（Yusa and Mikami, 2005）。しかし、細胞分裂回数を記録する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（Sonneborn, 1954）。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された（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については、まだ直接的な証拠がない。本研究では、細胞分裂回数を記録する機構が大核クロマチンのDNA上にあるのか、それとも核タンパクの修飾なのかを明らかにするために、*P. tetraurelia* の老化細胞の大核に若い細胞の大核の核質とDNAを注射し、寿命と分裂速度がどのように変化するかを調べた。

【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℃を保つようにした。レタス（Hiwatashi, 1968）を用い、1穴につき培養液を0.75ml 使用し、単離するごとに新しい培養液に交換した。単離から24±2時間後の細胞が何分裂したかをはかり、一日の分裂回数とした。マイクロインジェクション法で、株stock51のクロマチンを含む核質またはDNAを株d4-84の細胞の大核内に入れ、手術細胞の表現型、一日の分裂回数、及び寿命がどのように変化するかを観察した。

【結果と考察】総分裂回数が約15回の若い細胞の核質を総分裂回数約180回の老化した細胞の大核に移植した。移植手術を行った細胞は、4例中3例において、ドナークロンの分裂率には達しなかったものの分裂率の回復が見られ、またクローン寿命がレシピエントクロンの最大寿命より約50分裂伸びた。手術細胞を複数のクローンに分けて培養し、表現型を調べると、この3例ではクローン内に野生型の細胞と劣性形質を示す細胞の両方が表れた系と、野生型の細胞のみが現れた系の二つが見られた。次に総分裂回数が約15回の若い細胞のDNAを総分裂回数約120回の老化した大核に0.5pg以上注射した。移植手術を行った細胞では、5例中5例において分裂率の回復或いは寿命の伸びといった変化は見られなかった。また、手術細胞を複数のクローンに分けて培養したところ、クローン内に野生型の細胞と劣性形質を示す細胞の両方が現れた系は出てきたが野生型の形質のみが現れた系は見られなかった。今後、注射するDNA量を増やしての検討が残されている。これらのことから、細胞分裂回数の記憶は核質内にあるのは確かだが、それがDNA上にあるのか核タンパクなのかはまだ明らかになっていない。現在、多細胞生物においては加齢に伴ってテロメアが短くなることが知られている。そのためテロメア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* ではテロメアの短縮が起こらないと報告されている（Gilley and Blackburn, 1994）。加齢の基本がテロメアにないとするれば、核クロマチン内のどこに、どういった形で記録されているのかは残された課題であり、その解決のために微量注射法を用いた本研究手法は有効であると考えられる。

【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.
Yusa, R. and Mikami, K. (2005) 原生動物学雑誌 第39巻 第1号94-96.