

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

遊佐 怜子¹, 多賀 郁乃², 沼田 治¹, 見上 一幸³

(¹筑波大学生命環境科学研究科, ²仙台白百合学園高等学校, ³宮城教育大学)

Probes into the clock of aging in *Paramecium tetraurelia* using microinjection of
macronuclear DNA

Reiko YUSA¹, Ikuno TAGA², Osamu NUMATA¹ and Kazuyuki MIKAMI³

(¹Graduate school of life and environmental sciences, University of Tsukuba, ²Sendai Shirayuri
Gakuen High School, ³Miyagi University of Education)

SUMMARY

After conjugation or autogamy in *Paramecium tetraurelia*, cumulative cell divisions result in the decrease of the fission rate and, eventually, in clonal death. The life span of *P. tetraurelia* is known to be about 200 fissions after autogamy. The clock for counting the number of fissions (i.e. clonal age) may lie in the chromosome of the macronucleus. To analyze whether clonal age is memorized in the macronucleus, we injected extracted macronuclear DNA of young cells into aged cells that were at S-phase. The cells that were injected with the DNA expressed the marker gene. However, the cells did not recover in fission rate nor prolong their life span. This result suggests that the clock is not located in the DNA, though that possibility cannot be completely ruled out.

[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およそ 200 分裂と言われており(Sonneborn, 1954)、寿命

の短くなる遺伝子が、高木ら (Takagi, Y., et al., 1989) によって発見されている。また、ゾウリムシの寿命と分裂速度は大核の age に依存していることがわかっている。

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）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。若い細胞の大核核質を老化した細胞の大核に入れてやると若返りが起こることから、大核のDNAあるいは核タンパク質に加齢を数え、記録する場所があると考えられる(Yusa, R., et al., 2007)。

本研究では、細胞分裂回数を記録する機構が大核の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 *P. 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 0.75ml 使用し、単離するごとに新しい液に交換していつ

た。単離から 24±2 時間後の細胞が何分裂したかをわかり、一日の分裂回数とした。マイクロインジェクション法で、stock51 のオートガミー後約 10 回分裂の DNA をそれぞれ株 d4-84 のオートガミー後約 110 回分裂の細胞の、S 期の大核内に入れ、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わるかを観察した。注射した総 DNA 量は約 5-6 pg である。DNA の抽出にはフェノール・クロロフォルム法を用いた。

[結果と考察] 総分裂回数が約 10 回の若い細胞の DNA を TE に溶解させたもの (DNA 濃度 1.106 mg/μl) を総分裂回数約 110 回の老化した大核に移植したところ、分裂速度の回復や寿命の伸びはみられなかった。これらのことから、細胞分裂回数の記憶は、DNA の複製回数として、DNA 上ではなく染色体の核タンパク質上に記録されている可能性がある。今後は抽出した核タンパク質の大核への注射による影響を調べる必要があるが、その前段階として、老化した分離大核の凍結融解液を作り、若い細胞へ注射する実験を進め、その効果を調べている。

[文献]

- 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., Taga, I., and Mikami, K. (2007) 原生動物学雑誌 第40巻 第1号 63-64.